

## بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های ایرانی *Rhizoctonia solani* AG1-IA با استفاده از نشانگر مولکولی \*RAPD

Study of Genetic Diversity of Iranian isolates of *Rhizoctonia solani* AG1-IA using RAPD Markers

مهدیه خدایاری، ناصر صفایی\*\* و مسعود شمس بخش

گروه بیوتکنولوژی و گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

پذیرش ۱۳۸۸/۱/۱۶

دریافت ۱۳۸۶/۱۲/۲۱

### چکیده

قارچ *Rhizoctonia solani* AG1-IA (تلومورف *Thanatephorus cucumeris*)، عامل سوختگی غلاف برنج، در شالیزارهای شمالی ایران می باشد. با توجه به اهمیت بیماری و عدم وجود اطلاعات جامع و کامل از ساختار ژنتیکی جمعیت های این قارچ و با هدف برآورد تنوع ژنتیکی در میان ۲۵ جدایه جمع آوری شده از استان های گیلان (۲۳ جدایه) و مازندران (دو جدایه)، خصوصیات ریخت شناسی، سرعت رشد و تنوع ژنتیکی این بیمارگر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون تعیین گروه های آناستوموزی نشان داد که همه جدایه ها متعلق به گروه آناستوموزی AG1-IA می باشند. به منظور تشخیص سریع و تایید گروه آناستوموزی جدایه ها، تعداد ۱۰ جدایه به همراه جدایه های استاندارد AG1-IA و AG4، توسط آغازگرهای اختصاصی AG1-IA، بررسی و در تمام آنها یک قطعه باندی ۲۶۵ bp تکثیر شد. نتایج بررسی سرعت رشد، جدایه ها را به دو گروه تند رشد (۶۸ درصد جدایه ها) و کند رشد (۲۳ درصد جدایه ها) تقسیم نمود. تنوع ژنتیکی ۲۵ جدایه، با استفاده از نشانگر RAPD بررسی شد. از میان ۲۰ آغازگر مورد استفاده، باندهای حاصل از هفت آغازگر که در گستره ۲۵۰ تا

\* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه تربیت مدرس

\*\* مسئول مکاتبه

۵۰۰۰ جفت باز قرار داشت، با استفاده از ضریب تشابه Jaccard و روش UPGMA، توسط نرم‌افزار NTSYS-pc تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌ها انجام شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها را به دو گروه در سطح تشابه ۳۴ درصد تقسیم نمود که با گروه‌بندی جدایه‌ها به دو گروه تند رشد و کند رشد، مطابقت داشت. در سطح تشابه ۸۰ درصد، جدایه‌ها به ۲۳ گروه تقسیم شدند که بیانگر تنوع ژنتیکی بالای این جدایه‌ها می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه مولکولی نشان داد که جدایه‌های متعلق به یک ناحیه جغرافیایی، لزوماً دارای قرابت ژنتیکی نمی‌باشند. تشخیص سریع *R. solani* AG1-IA، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AG1-IA و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های عامل سوختگی غلاف برنج، توسط نشانگر RAPD، در این مطالعه انجام شد.

واژه‌های کلیدی: سوختگی غلاف برنج، *Rhizoctonia solani* AG1-IA، RAPD، آغازگرهای اختصاصی AG1-IA، ایران

#### مقدمه

قارچ *Rhizoctonia solani* Kühn، از لحاظ تاکسونومیک یک واحد مشخص نیست، بلکه یک گونه پیچیده، شامل گروه‌هایی که از لحاظ ژنتیکی مجزا هستند، می‌باشد (Liu et al. 1990, Cubeta & Vilgalys 1997). براساس گروه بندی آناستوموزی (Anastomosis group, AG) در شکل جنسی *Thanathephorus cucumeris*، گروه‌های آناستوموزی ۱ تا ۱۴ شناسایی و معرفی شده‌اند (Sneh et al. 1991, Carling 1996, Carling et al. 1999).

قارچ *R. solani* AG1-IA، از بیمارگرهای اندام‌های هوایی بوده که بیماری سوختگی غلاف را ایجاد می‌کند (Kim et al. 1996). سوختگی غلاف برنج یکی از مهمترین بیماری‌های قارچی در شالیزارهای شمالی کشور بوده (Forutan & Rahimian 1991) که بیمارگر عامل این بیماری، *R. solani*، اولین بار در ایران توسط ترابی و بینش (Torabi & Binesh 1984) گزارش شده است.

هرچند که تعیین ویژگی‌های گروه‌ها و زیرگروه‌های آناستوموزی براساس خصوصیات ریخت‌شناسی، بیماری‌زایی و رفتار آناستوموز موفق‌ترین تلاش‌هایی بوده که تاکنون برای

توصیف گوناگونی ژنتیکی موجود در جنس رایزوکتونیا انجام گرفته است ( Vilgalys & Cubeta 1994, Carling *et al.* 2002)، اما به دلیل وجود همپوشانی بین برخی از گروه‌های آناستوموزی (اگرچه با فراوانی کم)، موجب اشتباهات زیادی در شناخت زیر گونه‌های دقیق این قارچ شده است. به همین علت با این روش نمی توان تنوع ژنتیکی درون و بین گروه‌های آناستوموزی را برآورد نمود (Keijer *et al.* 1996, Kuninaga *et al.* 1985, Sneh *et al.* 1991)؛ بعلاوه فقدان خصوصیات پایدار ریخت شناسی و فیزیولوژیک در این بیمارگر (Mordue 1974)، شناخت جدایه های این گونه را مشکل و وقت گیر کرده است. با معرفی روش های بیوشیمیایی و مولکولی، استفاده از ابزارهای مدرن جایگزین روش های قدیمی تر مطالعه گروه های آناستوموزی و جمعیت های رایزوکتونیا شدند (Vilgalys & Cubeta 1994, Mordue *et al.* 1989). استفاده از آغازگرهای اختصاصی گروه های آناستوموزی مبتنی بر 28S، برای تشخیص سریع گروه های آناستوموزی *R. solani*، یکی از مناسبترین روش ها می باشد. این روش، بر خلاف روش های کلاسیک تشخیص گروه های آناستوموزی زمان بر نبوده و تشخیص سریع زیرگونه را فراهم می کند (Matsumoto 2002). از این آغازگر، در تشخیص بین گروه های آناستوموزی مختلف جدایه های *R. solani* استفاده شده است (Brisbane *et al.* 1995, Mazzola *et al.* 1996, Johanson *et al.* 1996, *et al.* 1997). در مطالعات ماتسوموتو و همکاران (Matsumoto *et al.* 1997) با استفاده از این روش توانستند جدایه های متعلق به گروه های آناستوموزی AG1-IA، AG1-IB، AG1-IC، AG1-1، AG2-2 و AG2-2 را بطور دقیق از یکدیگر تفکیک کنند.

جنبه های مختلف بیولوژی جنس رایزوکتونیا، به کمک نشانگرهای مولکولی مطالعه شده است (Kuninaga *et al.* 2000 a,b, Cubeta & Vilgalys 1997). پاسکوال و همکاران (Pascual *et al.* 2000) با بررسی ۵۲ جدایه AGI IA به دست آمده از ذرت و برنج در فیلیپین به کمک نشانگر رپید (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)، هفت گروه را در سطح ۷۵٪ متمایز نمودند. تودا و همکاران (Toda *et al.* 1999) با مطالعه ۴۱ جدایه *R. solani* متعلق به ۱۱ گروه آناستوموزی با نشانگرهای RAPD و اریک (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, ERIC)، توانستند تنوع بالایی را داخل گروه های آناستوموزی مورد

بررسی مشاهده کنند. دانکن و همکاران (Duncan *et al.* 1993) توانستند به کمک نشانگرهای تصادفی تفاوت‌های بین گروه‌های میان‌گونه‌ای (Inter Specific Group, ISG) استرالیایی و ژاپنی متعلق به یک منطقه جغرافیایی و یا مناطق مختلف را در *R. solani* نشان دهند. جدایه‌های ایرانی *R. solani* AGI-IA جمع‌آوری شده از روی برنج بر اساس مقایسه بیوشیمیایی (Tajick Ghanbari *et al.* 2004)، نقوش آنزیمی (Banihashemi *et al.* 2002، Mohammad *et al.* 2003)، مارکر پکتیک زایموگرام (Kosari *et al.* 2004) و نشانگر rDNA-RFLP (Tajick Ghanbari *et al.* 2005) بررسی شده‌اند. بر اساس این مطالعات اگرچه نشانگرهای غیر مولکولی وجود تنوع در جدایه‌ها را به اثبات رساندند اما تنها نشانگر مولکولی استفاده شده برای بررسی جمعیت‌های ایرانی این قارچ بیانگر عدم وجود تنوع ژنتیکی در این جدایه‌ها بود (Tajick Ghanbari *et al.* 2005).

با توجه به خسارت چشمگیر سوختگی غلاف ناشی از *R. solani* AGI-IA در مزارع برنج نواحی شمالی کشور (Forutan & Rahimian 1991) و محدودیت‌های تولید گیاهان مقاوم به بیماری‌های رایزوکتونایی (Li *et al.* 1995, Wan-Zhong *et al.* 2007)، بررسی تنوع ژنتیکی این قارچ، به منظور روشن شدن چشم‌انداز اصلاح و انتخاب گیاهان مقاوم و نیز کارایی روش‌های کنترل شیمیایی مرسوم، ضروری به نظر می‌رسد؛ از این رو در این پژوهش پس از تشخیص گروه آناستوموزی با روش کلاسیک و تایید آن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AGI-IA، از نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی میان جدایه‌ها استفاده شد.

### روش بررسی

جدایه‌های *R. solani* جمع‌آوری شده از ارقام مختلف برنج شهرستان‌های شمالی کشور (استان گیلان و دو جدایه از ساری)، مورد مطالعه قرار گرفتند (جدول ۳). جداسازی و خالص‌سازی آن‌ها روی محیط کشت WA و PDA (عصاره ۲۰۰ گرم سیب زمینی همراه با ۱۵ گرم دکستروز و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب) انجام شد. خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی ۲۵ جدایه منتخب بررسی شد.

### تعیین گروه آناستوموزی

تعلق کلیه جدایه‌ها به گروه آناستوموزی AGI-IA براساس امتزاج ریشه‌ای آنها با

جدایه‌ی آزمون کننده استاندارد از گروه آناستوموزی AGI-IA با استفاده از روش لام تمیز، مشخص شد (Dhingra & Sinclair 1995, Kronland & Stanghellini 1998).

#### اندازه گیری سرعت رشد

برای اندازه گیری سرعت رشد جدایه ها، از حاشیه فعال کشت های جوان دو تا سه روزه که در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد رشد کرده بودند، قرصی برداشته و در مرکز محیط کشت PDA در پتری های نه سانتی متری قرار داده شد. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد و میزان رشد آن ها پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری و میانگین داده ها در قالب طرح کاملاً تصادفی، محاسبه شد، سپس گروه بندی جدایه ها با استفاده از نرم افزار MVSP و ضریب اقلیدوسی انجام شد.

#### تهیه توده میسلیمی

تولید توده میسلیمی جدایه های بیمارگر در محیط کشت مایع PDB (عصاره ۲۰۰ گرم سیب زمینی همراه با ۱۵ گرم دکستروز در یک لیتر آب) انجام گرفت. یک قرص پنج میلی متری از حاشیه پرگنه های دو تا سه روزه تشکیل شده بر روی محیط کشت PDA، به ازای هر جدایه جدا کرده و به فلاسک های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع سترون شده PDB منتقل شد. پس از گذشت سه تا پنج روز از رشد میسلیم در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بر روی شیکر دورانی، میسلیم حاصل توسط کاغذ واتمن و پمپ خلا از محیط مایع جدا و پس از شستشو با آب مقطر درون فالكون در اولترا فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

#### استخراج DNA

برای استخراج DNA هر جدایه، ۴۰ تا ۵۰ میلی گرم از میسلیم پودر شده توسط نیتروژن مایع، به میکروتیوب سترون منتقل و ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (100mM Tris-HCl (pH 8.0), 20mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.5M NaCl) اضافه شد. سپس، یک میکرولیتر از RNase (10mg/ml) به سوسپانسیون مذکور اضافه و پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد، روی یخ قرار داده شد. سپس ۰/۴ میلی لیتر محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل به نسبت ۱:۲۴ به سوسپانسیون حاصل اضافه و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتیفرود شده و فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد. DNA با اضافه نمودن ۰/۷ حجم ایزوپروپانول سرد با سانتیفرود به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه،

رسوب داده شد. پس از حذف ایزوپروپانول و تبخیر باقیمانده الکل، نمونه‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل حل شدند (Safaie *et al.* 2003). برای سنجش کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، از ژل آگارز ۰/۸٪ و روش اسپکتروفتومتری برای رساندن غلظت نهایی DNA جدایه‌ها به  $40 \text{ ng}/\mu\text{l}$  استفاده شد.

#### شناسایی AG1-IA *R. solani* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AG1-IA

برای تایید تعلق جدایه‌ها به گروه آناستوموزی AG1-IA تعداد ۱۰ جدایه به عنوان نماینده گونه توسط آغازگرهای اختصاصی این گروه که توسط ماتسوموتو و همکاران (Matsumoto *et al.*, 1996) طراحی شده است، مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون از جدایه‌های استاندارد AG1-IA بعنوان کنترل مثبت و جدایه استاندارد AG4 بعنوان کنترل منفی، استفاده شد. تکثیر قطعات DNA در دستگاه چرخه حرارتی (ترموسایکلر) مدل Master Eppendorf Gradient (ساخت شرکت Eppendorf آلمان) با واسرشته سازی اولیه DNA ژنومی در دمای  $95^\circ\text{C}$  به مدت پنج دقیقه و  $30$  چرخه شامل  $94^\circ\text{C}$ ، به مدت یک دقیقه برای واسرشته سازی؛  $54^\circ\text{C}$  به مدت  $2$  دقیقه برای اتصال و  $72^\circ\text{C}$  به مدت سه دقیقه برای گسترش و گسترش نهایی در دمای  $72^\circ\text{C}$  به مدت پنج دقیقه انجام گرفت (Matsumoto, 2002).

محصولات PCR در ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر (TBE (0.089 M Tris, 0.089 M boric acid, 0.002 M EDTA)، ولتاژ ثابت ۸۰ و به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۱ میکروگرم در میلی لیتر)، از نقوش حاصل عکس برداری شد.

#### شناسگر RAPD

تکنیک RAPD-PCR در مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی ۱  $2/5 \mu\text{l}$  از PCR Buffer از  $200 \mu\text{M}$  از هر یک از dNTP ها،  $1/5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ،  $50 \text{ mM}$  KCL،  $10 \text{ mM}$  Tris-HCL، pH 9.0)،  $0/4$  میکرومول از هر یک از آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی،  $40 \text{ ng}$  از DNA نمونه و  $0/5$  واحد آنزیم Taq Polymerase در دستگاه حرارتی اپندورف گرادیانت انجام شد. تکثیر قطعات DNA، با واسرشته سازی اولیه در دمای  $95^\circ\text{C}$  به مدت  $2$  دقیقه، و تکرار  $35$  چرخه شامل  $1$  دقیقه واسرشته سازی در دمای  $94^\circ\text{C}$ ،  $1:30$  دقیقه برای اتصال در دمای  $45/7^\circ\text{C}$  و  $2$  دقیقه برای گسترش در دمای  $72^\circ\text{C}$  و گسترش نهایی به مدت  $8$  دقیقه در  $70^\circ\text{C}$

انجام شد.

الکتروفورز محصولات PCR، با شدت ولتاژ ثابت ۸۰، به مدت ۳ ساعت در ژل آگارز ۱٪ و بافر (0.09M Tris, 0.09M boric acid, 0.002M EDTA) TBE انجام گرفت. رؤیت باندهای حاصل، پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۱ میکروگرم در میلی لیتر)، تحت نور UV انجام پذیرفت.

### تجزیه و تحلیل داده ها

الگوی باندهای حاصل از نشانگر RAPD، پس از امتیاز دهی باندها به صورت صفر و یک (وجود یا عدم وجود باند) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بر اساس داده های خام حاصل از داده های نشانگر RAPD، تجزیه خوشه ای با روش UPGMA (Rohlf, 1993) بر مبنای ماتریس فاصله، ضریب تشابه Jaccard (Jaccard, 1908)، و نرم افزار NTSYS-pc Ver2.0 انجام گرفت.

### نتیجه

#### بررسی های ریخت شناسی

پراگنه قارچ *R. solani* AG1-IA در سطح محیط کشت PDA نمادی بوده و ریشه ها به صورت متراکم در سطح و در برخی مواقع هم به صورت هوایی رشد نمودند. رنگ پراگنه ها ابتدا سفید و بعداً به رنگ کرم، قهوه ای روشن تا تیره تغییر کرد.

#### اندازه گیری سرعت رشد

نرخ رشد روزانه جدایه ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، بررسی شد. میانگین رشد جدایه ها در این دما ۲۱ میلی متر در روز اندازه گیری شد که طی سه روز جدایه ها تمام ظرف نه سانتی متری را پر نمودند (جدول ۱). بیشترین و کمترین سرعت رشد به ترتیب مربوط به جدایه های Rs-1 و Rs-19 بود. نتایج حاصل از گروه بندی خوشه ای، جدایه ها را به دو گروه مجزای تند رشد (۶۸٪ جدایه ها) و کند رشد (۳۲٪ جدایه ها) تقسیم کرد (شکل ۱).

#### تعیین گروه آناستوموزی

کلید جدایه ها با روش لام تمیز، با جدایه های آزمون کننده استاندارد از گروه های آناستوموزی AG1-IA مورد آزمون قرار گرفتند و براساس امتزاج ریشه ای بین آنها، تعلق آنها به گروه آناستوموزی AG1-IA تایید شد.

جدول ۱- فهرست جدایه های *Rhizoctonia solani* AG1-IA جداشده از غلاف برنج و متوسط

رشد ۲۵ جدایه منتخب

Table 1. List of isolates of *Rhizoctonia solani* AG1-IA and mean growth rates of 25 selected isolates

شماره جدایه Isolate no	محل جمع آوری Place collected	سرعت رشد Growth rate (mm/day) <sup>a</sup>
Rs1	Abatar, Guilan	10.8
Rs2*	Khalif Abad, Guilan	20.9
Rs3	Hashtpar, Guilan	25.3
Rs4*	Malfgan(Siahkol), Guilan	23.7
Rs5*	Kajan(Siahkol), Guilan	26.8
Rs6*	Amlash, Guilan	24.9
Rs7	Langrood, Guilan	13.4
Rs8*	Niroo Abad, Guilan	11.1
Rs9*	Rasht, Guilan	25.3
Rs10	Rasht, Guilan	14.5
Rs11	Rasht, Guilan	15.2
Rs12	Rasht, Guilan	13.8
Rs13	Astara, Guilan	11.5
Rs14	Fooman, Guilan	15.1
Rs15*	Sangar, Guilan	27.1
Rs16	Amlash, Guilan	25.3
Rs17	Malfgan(Siahkol), Guilan	27.1
Rs18*	Desiam, Guilan	27.1
Rs19	Kajan(Siahkol), Guilan	29.9
Rs20	Koomle, Guilan	28.4
Rs21	Langrood, Guilan	30.2
Rs22	Otaghvar, Guilan	20.3
Rs23	Shemelman, Guilan	25.3
Rs24*	Sari, Mazandaran	22.1
Rs25*	Sari, Mazandaran	25.9
Rs26	Some`Sara, Guilan	
Rs27	Rasht, Guilan	
Rs28	Rasht, Guilan	
Rs29	Rasht, Guilan	
Rs30	Rasht, Guilan	
Rs31	Rasht, Guilan	
Rs32	Rasht, Guilan	
Rs33	Rasht, Guilan	



Table 1. (continued)

جدول ۱- (ادامه)

Rs34	Rasht, Guilan
	Rasht, Guilan
Rs35	
Rs36	Rasht, Guilan
Rs37	Rasht, Guilan
Rs38	Rasht, Guilan
Rs39	Rasht, Guilan
	Rasht, Guilan
Rs40	
Rs41	Rasht, Guilan
Rs42	Amlash, Guilan
Rs43	Rezvanshahr, Guilan
Rs44	Rasht, Guilan
Rs45	Rasht, Guilan
Rs46	Rasht, Guilan

a) میانگین رشد سه تکرار برای هر جدایه\*

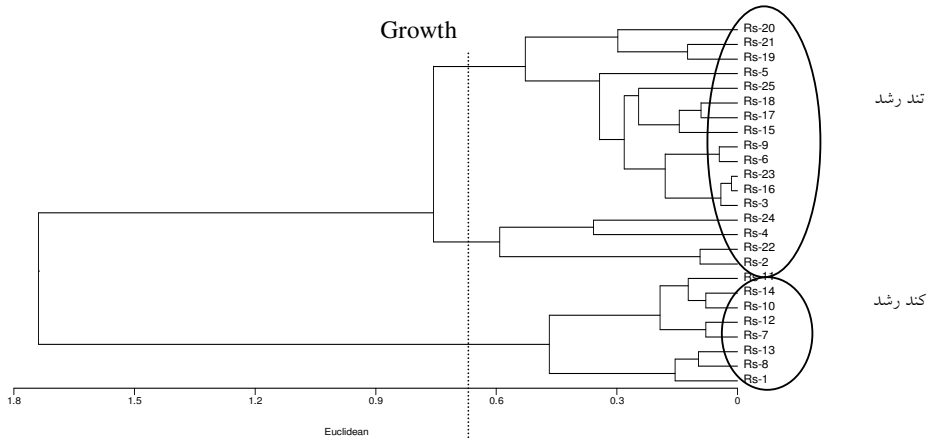
\*جدایه های استفاده شده در آنالیز با آغازگرهای اختصاصی

\*Isolates which used in AG1-IA specific primers analysis

جدول ۲- آغازگرهای تصادفی مورد استفاده و نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل باندها

Table 2. List of random primers used and the result of analysis of their amplified bands

توالی (Primer sequence)	تعداد باندهای تکثیر شده (No. of fragments amplified)	تعداد		درصد پلی مورفیک (Polymorphic Percentage)
		تعداد لوکوس های پلی مورفیک (No. of Polymorphic locus)	تعداد لوکوس های منو مورفیک (No. of Monomorphic locus)	
5'-GAAACGGGTG-3'	117	11	0	100%
5'-AATCGGGCTG-3'	291	22	0	100%
5'-AGCCAGCGAA-3'	140	11	2	78%
5'-TGAGTGGGTG-3'	129	14	1	93%
5'-GTTGCCAGCC-3'	162	14	1	93%
5'-ATGGATCCGC-3'	213	15	1	93%
5'-GATAACGCAC-3'	256	19	1	95%
	1308	107	6	94%



شکل ۱- گروه بندی جدایه های *Rhizoctonia solani* AG1-IA مورد مطالعه، بر اساس داده های حاصل از میزان سرعت رشد آنها.

Fig. 1. Clustering of *Rhizoctonia solani* AG1-IA isolates based on their growth rate.

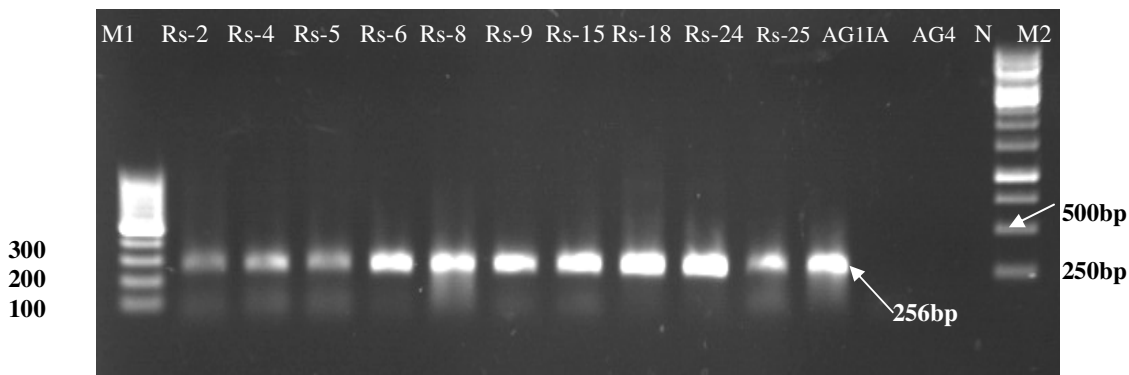
### بررسی مولکولی جدایه ها

#### تایید گروه آناستوموزی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AG1-IA

برای تشخیص جدایه ها به روش مستقیم و تایید تعلق آنها به گروه آناستوموزی AG1-IA تعداد ده جدایه به عنوان نماینده جمعیت توسط جفت آغازگرهای اختصاصی گونه مورد مطالعه قرار گرفتند. این آغازگرها توانستند در این جدایه ها و جدایه استاندارد AG1-IA، یک قطعه ۲۶۵ جفت بازی را به طور اختصاصی تکثیر نمایند (شکل ۲). این آغازگرها در جدایه AG4 که به عنوان کنترل منفی استفاده شد، هیچ قطعه ای را تکثیر نکردند.

#### بررسی تنوع ژنتیکی با نشانگر RAPD

از میان ۲۰ آغازگر آزمون شده، هفت آغازگر OPA04, OPA07, OPC18, OPC19, R28 و RC09 (جدول ۲) تکرارپذیری و پلی مورفیسم بالاتری را نشان دادند که نمونه ژل حاصل از آغازگر RC09 در شکل ۳ آورده شده است.

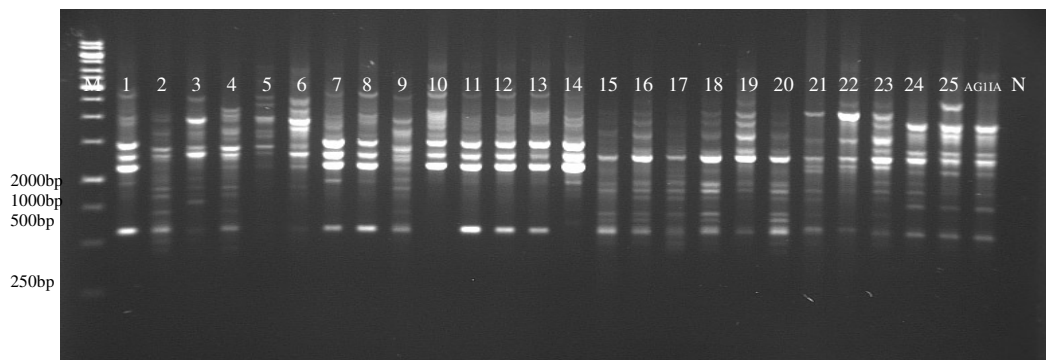


شکل ۲- باند اختصاصی 265bp تکثیر شده در ۱۰ جدایه *Rhizoctonia solani* و جدایه استاندارد AG1-IA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AG1-IA.

M<sub>1</sub>: نشانگر اندازه 100bp، M<sub>2</sub>: نشانگراندازه 1Kb، AG4: کنترل منفی آغازگرهای اختصاصی،

AG1-IA: جدایه استاندارد و کنترل مثبت، N: کنترل منفی واکنش PCR

Fig. 2. Amplification of a specific 265bp band in 10 isolates of *R. solani* generated using AG1-IA specific primers. M<sub>1</sub>: 100bp size marker, M<sub>2</sub>: 1Kb size marker, AG1-IA: Standard isolate as positive control, AG4: Negative control for specific primers, N: Negative control for PCR

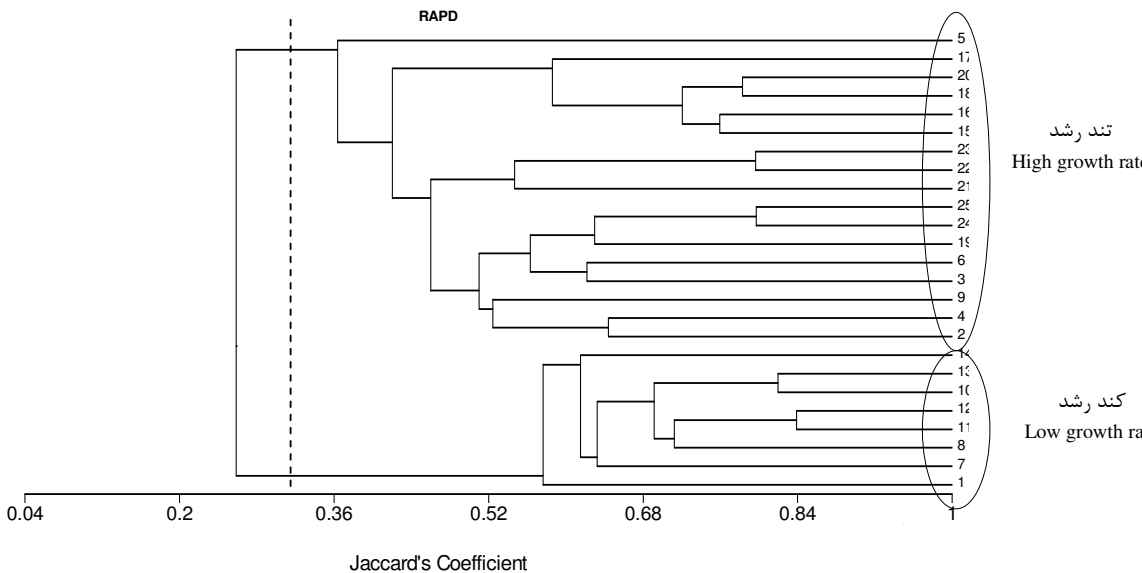


شکل ۳- الگوی باندهی RAPD حاصل از تکثیر کلیه جدایه های *Rhizoctonia solani* با استفاده از آغازگر RC09.

M: نشانگر اندازه 1Kb، AG1-IA: جدایه استاندارد و کنترل مثبت، N: کنترل منفی واکنش PCR

Fig 3. Fingerprint patterns of isolates of *R. solani* generated by RAPD's RC09 primer.

M: 1Kb size marker, AG1-IA: Standard isolate as positive control, N: Negative control for PCR



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از اثرانگشت DNA بدست آمده از هفت آغازگر تصادفی در ۲۵ جدایه *Rhizoctonia solani* AG1-IA جمع‌آوری شده از استان‌های گیلان (۲۳ جدایه) و مازندران (دو جدایه).

Fig. 3. Resulting dendrogram based on DNA fingerprinting data which were obtained from seven random primers in 25 *Rhizoctonia solani* AG1-IA isolates collected from Guilan (23 isolates) and Mazandaran (two isolates).

از مجموع داده‌های حاصل از این هفت آغازگر ۱۳۰۸ باند در محدوده ۲۵۰ تا ۵۰۰۰ جفت باز برای ۲۵ جدایه بدست آمد که توانست پلی مورفیسم بسیار خوبی را نشان دهد. بیشترین تعداد باند توسط آغازگر OPA04 و کمترین آن توسط آغازگر OPC18 بدست آمد. دندروگرام حاصل از این تعداد باند بر اساس ضریب جاکارد در سطح شباهت ۳۴ درصد جدایه‌ها را به دو گروه تفکیک کرد. تمام این آغازگرها قادر به تفکیک جدایه‌ها به گروه‌های تندرشد و کندرشد بودند. گروه اول کلیه‌ی جدایه‌های کندرشد (۳۲٪ کل جدایه‌ها) و گروه دوم کلیه‌ی جدایه‌های تندرشد را (۶۸٪ کل جدایه‌ها) در بر گرفت.

از مجموع الگوهای باندهای RAPD، ۱۱۳ لوکوس حاصل شد که ۶ لوکوس (۵/۵ درصد)

منومورفیک و ۱۰۷ لوکوس (۹۴/۵ درصد) پلی مورفیک بودند. در میان این آغازگرها بیشترین پلی مورفیسیم توسط آغازگرهای OPA04 و OPA07 و کمترین آن توسط آغازگر OPC18 حاصل شد. بیشترین تشابه بر اساس ضریب جاکارد (Jaccard)، در میان دو جدایه Rs-17 و Rs-18 با ۸۳٪ تشابه و کمترین تشابه نیز میان دو جدایه ی Rs-10 و Rs-17 با ۱۰٪ تشابه، مشاهده شد. در سطح تشابه ۸۰ درصد نیز تعداد گروه ها به ۲۳ گروه افزایش یافت که بیانگر تنوع بالای مشاهده شده در بین این گروه از جدایه ها می باشد. این آغازگرها قادر به تشخیص جدایه ها بر حسب مناطق جغرافیایی آنها نبودند.

## بحث

### بررسی تنوع بر اساس خصوصیات ریخت شناسی

بررسی خصوصیات ظاهری ریشه های قارچ *R. solani* مورد مطالعه در این تحقیق مطابق با مطالعات اوگوشی (Ogoshi 1975, 1987) و اسنه و همکاران (Sneh et al. 1991) بود. رنگ پرگنه ها مطابق مشاهدات سویتینگهام و مکنیش (Swingham & McNish 1994)، از سفید تا قهوه ای روشن و تیره متفاوت بود. در بررسی های انجام شده تعلق کلیه جدایه های عامل پوسیدگی غلاف برنج به گروه آناستوموزی AGI-IA با انجام آزمون کلاسیک آناستوموز (Ogoshi 1987) با جدایه استاندارد، مورد تایید قرار گرفت. از لحاظ نرخ رشدی، جدایه ها دارای رشدی سریع و بیشتر از ۲۱ میلی متر در روز بودند که با نتایج سویتینگهام و مکنیش (Swingham & Mc Nish 1994) و گولریا و همکاران (Guleria et al. 2007) تطابق داشت درحالیکه اسنه و همکاران نرخ رشدی جدایه های متعلق به گروه آناستوموزی AGI-IA را ۳۰ میلی متر در روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گزارش کرده بودند که این تفاوت در سرعت رشد می تواند بعلت تفاوت دمایی نگهداری جدایه ها باشد. نتایج حاصل از گروه بندی خوشه ای، موید تقسیم جدایه ها در دو گروه کاملاً مجزا از جهت نرخ رشدی بود.

### تایید گروه آناستوموزی با استفاده از آغازگر اختصاصی AGI-IA

استفاده از آغازگرهای ریبوزومی برای تشخیص سریع گروه های آناستوموزی *Rhizoctonia solani* یکی از مناسبترین روش ها می باشد (Matsumoto 2002) که در مطالعات ماتسوموتو و همکاران (Matsumoto et al. 1997) با استفاده از آن توانستند جدایه های متعلق به AGI-IA،

AG 2-1, AG 2-2, AG1-IB, AG1-IC, را بطور دقیق از یکدیگر تفکیک کنند. در مطالعه حاضر نیز ۱۰ جدایه رایزوکتونمای جدا شده از غلاف برنج به عنوان نماینده جمعیت مورد مطالعه، توسط این آغازگرها مورد بررسی قرار گرفتند که در تمامی آنها باند ۲۶۵ جفت بازی مطابق با مطالعات ماتسوموتو (Matsumoto 1996) مشخص بود. این آغازگرها قادر به تکثیر این منطقه در جدایه‌ی متعلق به AG4، نبودند. این نتیجه نیز با دستاورد حاصل از پژوهش ماتسوموتو (Matsumoto 2002) مطابقت داشت.

تشخیص قارچ *R. solani* بعنوان عامل سوختگی غلاف برنج با استفاده از روش‌های کلاسیک اولین بار در ایران توسط ترابی و بینش گزارش شده است (Torabi & Binesh 1984)، و تشخیص مولکولی آن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AG1-IA، برای اولین بار در این پژوهش انجام شد.

#### بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با نشانگر RAPD

نتایج حاصل از مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های رایزوکتونیا نشان داد نشانگر RAPD، در صورت استفاده صحیح، ابزار مفیدی برای مطالعه تنوع در این قارچ می‌باشد. این نتایج با دستاوردهای حاصل از مطالعات دانکن و همکاران (Duncan *et al.* 1993)، مومنی و همکاران (Momeni *et al.* 2005) و محمودی و همکاران (Mahmoudi *et al.*, 2005)، مطابقت داشت. از این نشانگر، در زمینه‌های مختلف تشخیص و تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچی، مطالعات رده‌بندی و فیلوژنتیکی استفاده می‌شود (Sharon *et al.* 2006, Gurr *et al.* 1992).

نتایج حاصل از الگوی بانندی بدست آمده از هفت آغازگر استفاده شده در این تحقیق بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالایی در درون گروه آناستوموزی AG1-IA می‌باشد. این نتیجه موید مطالعات محققین قبلی مبنی بر متنوع و پیچیده بودن گروه‌های درون گونه‌ای *R. solani* می‌باشد (Cubeta & Vilgalys 1997, Momeni *et al.* 2005).

#### نتایج تجزیه خوشه‌ای

الگوهای بانندی حاصل از مجموع هفت آغازگر RAPD بدست آمده از ۲۵ جدایه مورد مطالعه، جدایه‌ها را در سطح تشابه ۳۴ درصد به دو گروه مجزای ژنتیکی تقسیم نمود. این دو گروه با نتایج حاصل از اندازه‌گیری سرعت رشد، کاملاً مطابقت داشتند اما ارتباطی بین

گروه‌بندی جدایه‌ها با مناطق جمع‌آوری آنها، دیده نشد. این یافته با نتایج حاصل از تحقیق *تودا/ و همکاران (Toda et al. 1999)* و *محمودی و همکاران (Mahmoudi et al. 2005)* مبنی بر عدم وجود رابطه بین پراکنش جغرافیایی جدایه‌ها و گروه‌های حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی، مطابقت داشت؛ در بررسی پلی مورفیسم DNA در دو گروه آناستوموزی AG2 و AG4 قارچ *R. solani* در مزارع چغندرقد استان خراسان، *مومنی و همکاران (Momeni et al. 2005)* با کمک نشانگر RAPD توانستند این دو گروه آناستوموزی را از یکدیگر جدا کنند و درحالی‌که معیار منطقه جغرافیایی را قابل بررسی اعلام نمودند، نقش گروه آناستوموزی را در ایجاد تنوع مهمتر ذکر کردند. هرچند که وجود رابطه ژنتیکی و منطقه جغرافیایی توسط دیگر محققین گزارش شده است (*Singh et al. 2002, Toda et al. 1998, Sharma et al. 2005*) اما عدم تطابق آن را می‌توان در وجود سایر عواملی که باعث تنوع ژنتیکی قارچ‌ها و یا عوامل موثر در جابجایی آنها (Gene flow) می‌شوند جستجو کرد (*Burdon & Silk 1997*).

در این تحقیق، در سطح تشابه ۸۰ درصد تعداد گروه‌ها به ۲۳ گروه افزایش یافت که این نشان دهنده تنوع بسیار بالای مشاهده شده در میان جدایه‌ها می‌باشد هر چند که ۹۲٪ جدایه‌ها از استان گیلان می‌باشد اما با این وجود تنوع چشمگیری در میان جدایه‌ها قابل مشاهده است. از این روش برای بررسی تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های AG1 جمع‌آوری شده از استرالیا و ژاپن نیز استفاده شده است که در آنجا نیز تنوع قابل توجهی در میان جدایه‌ها دیده شده است و حتی در میان جدایه‌های متعلق به یک منطقه نیز این تنوع قابل مشاهده بوده است (*Duncan et al. 1993*).

*تودا/ و همکاران (Toda et al. 1999)* نیز تنوع بالایی را داخل گروه‌های آناستوموزی مورد بررسی با نشانگرهای RAPD و ERIC گزارش کرده‌اند. *پاسکوال و همکاران (Pascual et al. 2000)* نیز با کمک نشانگر RAPD، ۵۲ جدایه AGI-IA به دست آمده از ذرت و برنج در فیلیپین را در هفت گروه در سطح تشابه ۷۵٪ متمایز نمودند. این درحالیست که در جدیدترین تحقیق انجام شده توسط *تاجیک قنبری و همکاران (Tajick Ghanbari et al. 2005)*، نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی *R. solani* AGI-IA جدا شده از روی برنج توسط هفت آنزیم برشی استفاده شده در نشانگر مولکولی «DNA-RFLP»، چهار آنزیم

برشگر آن دارای محل برش بودند که قادر به نشان دادن پلی مورفیسم در جمعیت AGI-IA نبودند و طبق این نتایج جدایه‌های موجود در هر یک از گروه‌ها یکسان و شباهت افراد در زیرگروه‌های *R. solani*، نزدیک به ۱۰۰٪ بیان شده است؛ در حالیکه نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. solani* توسط نشانگر RAPD در این پژوهش، کاملاً این مطلب را رد می‌کند و تنوع بالایی را در میان زیرگروه AGI-IA نشان می‌دهد. استفاده از تعداد معدودی از آنزیم‌های برشی و عدم وجود مکان برش برای آنزیم‌های بکار رفته در قطعه مورد نظر، می‌تواند علت عدم همخوانی نتایج باشد. بعلاوه در پژوهش تاجیک قنبری کلیه جدایه‌های مورد بررسی از استان مازندران جمع‌آوری شده بودند در حالیکه در تحقیق حاضر ۹۲٪ جدایه‌ها متعلق به استان گیلان می‌باشد که تفاوت جغرافیایی نیز می‌تواند یکی دیگر از دلایل تفاوت موجود در نتایج باشد. نکته قابل توجه اینکه دو جدایه جمع‌آوری شده از مازندران (Rs-25 و Rs-24)، در این تحقیق نیز تا ۸۰٪ بهم شباهت نشان دادند که البته بدلیل کم بودن تعداد این جدایه‌ها، در مورد تنوع ژنتیکی آنها در استان مازندران نمی‌توان قضاوت کرد. تا قبل از اجرای این پژوهش، اطلاعات ناچیزی در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی AGI-IA *R. solani*، با استفاده از نشانگرهای مولکولی وجود داشت. در این تحقیق برای اولین بار تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی AGI-IA *R. solani*، پس از تشخیص مولکولی سریع با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه، با نشانگر مولکولی RAPD نشان داده شده است. برای بررسی‌های بیشتر تنوع در میان جدایه‌ها استفاده از جمعیت‌های بزرگتر و همچنین نشانگرهای مولکولی متنوع‌تر ضروری می‌باشد؛ همچنین از آغازگرهای اختصاصی AGI-IA که در این پژوهش برای تشخیص سریع این زیرگونه بهینه شد، می‌توان برای تشخیص سریع آلودگی در نمونه‌های آلوده قبل از جداسازی نیز استفاده نمود که نیازمند تحقیقات بیشتر می‌باشد.

## منابع

جهت ملاحظه به صفحات (50-55) متن انگلیسی مراجعه شود.



نشانی نگارندگان: مهدیه خدایاری، ناصر صفایی و مسعود شمس بخش، گروه بیوتکنولوژی و گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس