

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
شماره ۶۳ (پاییز ۱۳۸۳)، صفحات ۷۰-۶۵

استفاده از روش RAPD جهت بررسی پلی مورفیسم DNA در سویه‌های جدا شده قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم

بهرنگ علنی: مربی پژوهشی علوم سلولی و ملکولی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
behrangha@yahoo.com

دکتر مصطفی مطلبی: دانشیار گروه بیولوژی ملکولی دانشگاه رازی کرمانشاه
دکتر محمد رضا زمانی: دانشیار گروه ژنتیک ملکولی دانشگاه رازی کرمانشاه
دکتر نصرت الله ضرغامی: استادیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
سیامک جبارزاده: کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر محمد رهبانی نوبر: استاد گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
محمد رضا مشایخی: کارشناس ارشد ژنتیک مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۱/۱۲/۲۱، بازنگری: ۸۲/۹/۱، پذیرش: ۸۲/۱۰/۱۷

چکیده

زمینه و اهداف: امروزه مارکرهای مبتنی بر DNA به خصوص روشهای وابسته به PCR نظیر RAPD به عنوان یکی از ابزارهای قوی مطالعه تنوع ژنتیکی در بین موجودات زنده به شمار می رود. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های جدا شده قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم از طریق دسته بندی سویه‌ها با استفاده از نشانگر ملکولی RAPD بود.

روش بررسی: در این تحقیق تعداد ۱۵ سویه قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم مورد مطالعه قرار گرفت. DNA از طریق روش تغییر یافته دلاپورتا استخراج شد و بعد از انجام PCR، به منظور بررسی الگوی پلی مورفیسم DNA، محصولات PCR به دست آمده همراه با مارکر ملکولی استاندارد DNA بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند. برای تجزیه و تحلیل آماری محصولات RAPD از روش UPGMA با برنامه SPSS استفاده شد و سویه‌ها بر روی دندروگرام دسته بندی شدند.

یافته‌ها: بر اساس نتایج ترکیبی حاصل از ۱۲ آغازگر سویه‌ها به سه گروه تقسیم شدند. بررسی نتایج حاصله نشان داد که سویه‌های استانهای غرب کشور دارای الگوی پلی مورفیسم DNA هستند، به طوری که تمامی این سویه‌ها با داشتن تنوع ژنتیکی پایین در یک گروه و در کنار هم دسته بندی شدند، در حالی که سویه‌های مربوط به استانهای شمال غرب کشور به دلیل داشتن الگوی پلی مورفیسم متنوع تر در هر سه گروه پراکنده شدند.

نتیجه گیری: مقایسه الگوی RAPD سویه‌ها با دسته بندی بر اساس منطقه جغرافیایی بیانگر وجود همبستگی بین الگوی RAPD سویه‌های غرب کشور با منشأ جغرافیایی شان بود. به عبارت دیگر RAPD قادر به تشخیص تفاوت بین سویه‌های این منطقه با سایر نقاط بوده است.

کلید واژه‌ها: RAPD، فوزاریوم اگزیسپوروم، پلی مورفیسم DNA

مقدمه

اولیه و ثانویه در جوامع انسانی و حیوانی هستند، تولید می کنند. علاوه بر آن، به عنوان جنگ افزار بیولوژیک نیز به کار می روند و یکی از عمده ترین و کاربردی ترین سلاح های بیولوژیک در فهرست جنگ افزارهای بیولوژیک محسوب می شوند. همچنین گونه مزبور به عنوان بیوراکتور برای تولید محصولات بیولوژیک خاصی به کار می رود (۳). خسارات اقتصادی ناشی از بیماریزایی این قارچ کپکی در سطح جهانی بالغ بر میلیاردها دلار است که سویه های مختلف این گونه از حیث بیماریزایی در انسان، حیوانات و گیاهان دارای ویرولانس متفاوت هستند (۴). با توجه به این که اطلاعات ژنتیکی بسیار اندکی از ساختار و توالی ژنومی ارگانسیم مورد نظر موجود است، مطالعات گسترده‌ای در مورد شناسایی سویه‌های مختلف این قارچ انجام می‌گیرد که بررسی

فوزاریوم اگزیسپوروم قارچ کپکی غیر بیماری‌زا شایعی است که عمدتاً پاتوژن گیاهی است و در عین حال به عنوان پاتوژن انسانی و حیوانی در بروز طیف وسیعی از عفونت‌ها مانند اتومایکوز، کراتیت قارچی، اونیکومایکوز، فوزاریوز ریوی و فوزاریوز سیستمیک دخالت دارد (۱). در دو دهه اخیر میزان موارد عفونت زایی سیستمیک فوزاریوم در جوامع انسانی به ویژه در میان افراد دچار ضعف ایمنی، پیوند مغز استخوان، پیوند اعضا، افراد HIV⁺ و مبتلا به ایدز به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. به ویژه موارد گزارش شده فوزاریوس سیستمیک ریوی از ناحیه جنوب شرقی آسیا حایز اهمیت است (۲).

گونه های مختلف فوزاریوم نظیر فوزاریوم اگزیسپوروم گروه مهمی از مایکوتوکسین های موسوم به تریکوتسن را که عامل مایکوتوکسیکوز

غربی (F21، F18 و F15) لرستان (F23، F45 و F47) ایلام (F24)،
F25 و F26) کرمانشاه (F31 و F30) و کرمان (F53) جمع آوری
شده بودند. سویه‌ها بعد از ۸ روز کشت در درون لوله‌های ۳۰ میلی
لیتری درپوش دار بر روی محیط جامد PDA، برای مدتی کوتاه در
۴°C نگهداری شدند. برای انجام مطالعات ملکولی، سویه‌ها به ارلن‌های
۱۰۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت مایع CSDA [۴] گرم پودر نخود،
۲ گرم دکستروز [Merck]، ۰/۰۵ گرم آنتی بیوتیک کلرامفنیکل
(جهت جلوگیری از رشد باکتریهای ساپروفیت، ۰/۱ میلی لیتر اتانول
۹۵ درصد) با pH = ۴/۵ تلقیح و سپس به انکوباتور منتقل شدند.
دستگاه در وضعیت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد
تنظیم شد. پس از هفت روز ارلن‌ها از انکوباتور خارج و با استفاده از
کاغذ صافی (Watman No.۱) محیط کشت‌ها صاف شدند و از
میسلیوم‌های سویه‌ها جهت استخراج DNA به منظور بررسی الگوی
پلی مورفیسم با استفاده از نشانگر RAPD استفاده شد (۱۰).

استخراج DNA: برای استخراج DNA از روش تغییر یافته
دلپورتا استفاده شد (۱۱). مقدار ۰/۲۵ گرم از میسلیوم سویه با افزودن
مقداری مساوی پودر شیشه و ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراجی DNA
(۲۰۰ میلی مولار Tris-HCl [pH ۸]، ۲۰ میلی مولار EDTA، ۲۵۰
میلی مولار NaCl، ۵٪ SDS) داخل لوله‌های اپندورف ساییده شد تا
کاملاً همگن شود. نمونه‌ها در دمای ۷۰-۶۵ درجه سانتیگراد به مدت
۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اسنات پتاسیم ۵ مولار
سرد (۴ درجه سانتی گراد) به نمونه اضافه شد و لوله‌ها به مدت ۱۰
دقیقه در دمای صفر درجه قرار داده شدند. ۴۰۰ میکرولیتر از کلروفرم
سرد (۲۰- درجه سانتیگراد) به نمونه اضافه شد و به مدت ۷ دقیقه در
۱۲۰۰×g سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به اپندورف‌های جدید منتقل و
مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزو پروپانل (۲۰- درجه سانتیگراد) به آن اضافه
شد و مواد داخل به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰×g سانتریفیوژ گردید.
سپس فاز رویی به آرامی خارج و رسوب DNA حاصل با اتانل ۷۵
درصد سرد و سپس شست‌وشو داده شده و در ۲۰ میکرولیتر از آب
مقطر دوبار تقطیر استریل سرد ۴ درجه یا TE بافر حل شد و برای
استفاده‌های بعدی در دمای ۲۰°C نگهداری گردید. کیفیت DNA
ژنومی استخراج شده از دو روش اندازه گیری میزان جذب
۲۶۰/۲۸۰ نانومتر و نیز الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۷٪ بر اساس
روش مایرز تعیین گردید (۱۲). برای مشخص کردن مقدار DNA به
دست آمده مطابق روش ابراین از اندازه‌گیری جذب نوری در ۲۶۰
نانومتر استفاده شد (۱۳).

RAPD-PCR: به منظور بهینه سازی شرایط RAPD غلظت
واکنش‌گرها، برای حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۰ نانوگرم از DNA
ژنومی، ۶۰ نانوگرم از آغازگر، dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار، MgCl2
با غلظت ۵۰ میلی مولار، ۵ میکرولیتر از بافر ۱۰× PCR،
۳۷/۵ میکرولیتر از آب مقطر دوبار تقطیر استریل و پنج واحد بر
میکرولیتر آنزیم پلیمرز Taq DNA در داخل لوله‌های اپندورف ۱۰۰
میکرولیتر تنظیم و آماده شد و پس از آماده سازی واکنش‌گرهای
RAPD برنامه لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر
MAXI-GENE (شرکت استوارت ساینتیفیک انگلستان) تنظیم گردید. در این
برنامه یک دور جهت تک رشته ای شدن کلی DNA اولیه به مدت ۵
دقیقه در دمای ۹۴ درجه، ۳۴ دور شامل مراحل مربوط به اتصال پرایمر
به مدت ۹۰ ثانیه که دمای اتصال برای هر آغازگر در جدول ۱ مشخص

پلی مورفیسم DNA با استفاده از نشانگرهای ملکولی DNA در این مورد
می تواند سودمند باشد (۵).

نشانگرهای ملکولی DNA که از اوایل دهه ۱۹۸۰ تا به امروز
معرفی شده‌اند، دقیق ترین ابزار بررسی ساختار ژنتیکی، تعیین روابط
دقیق فیلوژنتیکی و نیز در تشخیص سریع گونه‌ها و واریته‌های
موجودات زنده از جمله جنس فوزاریوم را فراهم کرده‌اند. این
نشانگرها خود به دو گروه عمده شامل نشانگرهای وابسته به PCR و
مستقل از آن تقسیم بندی می‌شوند. از این میان، نشانگرهای RAPD،
ALP، AFLP و غیره جزو نشانگرهای وابسته به PCR کاربرد بیشتری
دارند (۶).

روش RAPD^۱ روش مبتنی بر PCR است که بر پایه تکثیر تصادفی
توالی‌های ژنومی استوار است و به وسیله آن می توان انگشت نگاری
DNA یک ژنوم بزرگ و پیچیده را تهیه کرد. در این روش برخلاف
روش‌های استاندارد PCR از یک آغازگر به طول ۱۰-۹ نوکلئوتید که
ردیف بازی آن به طور قراردادی تعیین می گردد استفاده می شود. در
این واکنش یک آغازگر منفرد نقاط مکمل خود را روی دو رشته DNA
ژنومی نمونه پیدا و خود را در آن نقاط بر روی دو رشته DNA متصل
می کند. اگر محل اتصال آغازگرها در روی دو رشته متقابل به هم
نزدیک باشند (فاصله ای که DNA قابل تکثیر باشد) توالی بین آن دو
نقطه اتصال طی PCR تکثیر خواهد شد. بنابراین چنانچه دو آغازگر به
طور تصادفی روی دو قطعه از DNA قرار بگیرند، فرآورده‌های حاصل
از آنها متفاوت خواهد بود؛ به عبارت دیگر، الگوی RAPD آنها متفاوت
است. از این تفاوت‌ها برای مطالعات الگوی پلی مورفیسم DNA، تعیین
روابط فیلوژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی و... می توان استفاده کرد.
همچنین استفاده از مارکر RAPD به دلیل مزایای بالای آن از قبیل
استفاده از آغازگرهای تصادفی، عدم نیاز به توالی DNA و مواد
رادیواکتیو از اهمیت بسزایی برخوردار است (۷). به علاوه، از این روش
به عنوان یکی از نشانگرهای ملکولی مهم در مطالعه تنوع ژنتیکی
جمعیت‌های مربوط به نژادها و سویه‌های قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم
استفاده می شود، به طوری که مارتین و همکاران در ۱۹۹۳ با بررسی
تنوع ژنتیکی بین سویه‌های مربوط به چهار نژاد آن با روش RAPD
نشان دادند که سویه‌های مربوط به نژاد ۲ از لحاظ الگوی نوار دهی از
همشکلی بالایی نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار هستند و در یک
گروه دسته بندی شدند (۸). همچنین در بررسی‌های ماتیلا و همکاران
در ۱۹۹۶ بر روی فوزاریوم آوناسوم مشخص شد که دسته بندی بر
اساس الگوی RAPD و ایزوآنزیمی در نژادهای مختلف قارچ فوزاریوم
می تواند به عنوان ابزاری مطمئن جهت شناسایی سایر قارچ‌ها هم در
سطح نژاد و هم در سطح گونه به کار رود (۹). بنابراین روش RAPD به
عنوان بهترین روش جهت مطالعه ملکولی این سویه‌ها انتخاب شد.
سهولت انجام RAPD و سریع بودن آن از دیگر دلایل انتخاب این
روش بود.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه و محیط کشت: تعداد ۱۵ سویه قارچ فوزاریوم
اگزیسپوروم که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفتند، از مرکز
تحقیقات جهاد دانشگاهی کرمانشاه تهیه شده بودند. این سویه‌ها از
استانهای آذربایجان شرقی (با کدهای F2، F58 و F59) آذربایجان

به منظور بهینه سازی شرایط RAPD پارامترهای مؤثر مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به آزمون‌های مختلف شرایط برای انجام واکنش در حجم‌های ۵۰ میکرولیتری بهینه سازی شد. این شرایط بهینه سازی شده موجب تکرارپذیری واکنش می‌شود.

پس از آماده سازی واکنش‌گرهای RAPD، دما، زمان و برنامه لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر تنظیم شد. پس از اتمام واکنش به منظور بررسی الگوی پلی مورفیسم DNA بین سویه‌ها کلیه محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز گردیده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و رنگ زدایی از ژل با آب مقطر، در زیر نور ماورای بنفش توسط دوربین پلوراید عکس برداری شد (تصویر ۱).

برای تجزیه و تحلیل آماری محصولات RAPD از میزان حرکت نسبی نوارها استفاده شد. میزان حرکت هر یک از نوارها با دقت $\frac{1}{20}$ میلیمتر سنجیده شد. بر اساس وجود یا عدم وجود هر نوار از محصولات PCR به ترتیب عدد یک یا صفر به آن نسبت داده و به این ترتیب جدول ماتریس صفر و یک رسم شد. بر اساس ماتریس صفر و یک تعداد کل الگوهای چند شکلی DNA محصولات RAPD حاصل از آغازگرهای ۱۲ آغازگر برای ۱۵ سویه قارچ فوزاریوم آگریسپوروم جمعاً ۱۴۱ نوار به دست آمد. با استفاده از جدول ماتریس صفر و یک، تجزیه خوشه‌ای با برنامه SPSS به روشهای مختلف تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوی چند شکلی DNA محصولات RAPD، به طور جداگانه برای هر آغازگر و نیز حالت ترکیبی آنها انجام گرفت. بررسی ها نشان داد که روش UPGMA نتایج منطقی و مطمئن تری را به دست می‌دهد و لذا بر این اساس دوری و نزدیکی سویه‌ها بررسی شد.

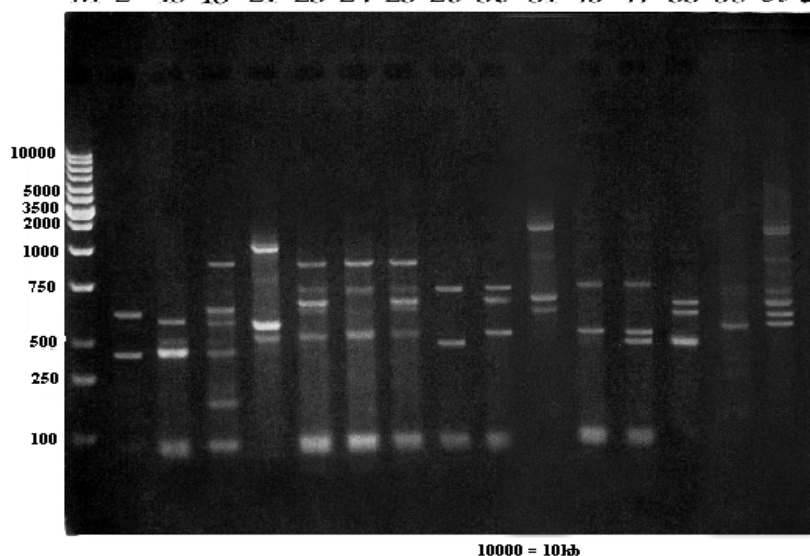
شده است، سنتز DNA به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه، تک رشته‌ای شدن DNA های ساخته شده به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۹۴ و یک دور جهت تکمیل اتصال پرایمر و تکمیل ساخت DNA به مدت ۶ دقیقه به ترتیب در دماهای ۳۱ و ۷۲ بر روی دستگاه ترموسایکلر تنظیم شد. RAPD برای هر یک از ۱۲ آغازگر که توالی آنها در جدول ۱ آمده است، انجام گرفت و بعد از اتمام PCR کلیه محصولات PCR همراه با نشانگرهای ملکولی DNA بر روی ژل آگارز ۲٪ و ولتاژ ثابت ۷۰ ولت، در شرایط کاملاً یکسان الکتروفورز شد. از ژل‌ها پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و رنگ زدایی ژل با آب مقطر، در زیر نور ماورای بنفش توسط دوربین پلوراید عکس برداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری محصولات RAPD از میزان حرکت نوارها استفاده و جدول ماتریس صفر و یک رسم شد. با استفاده از جدول ماتریس صفر و یک تجزیه خوشه‌ای با برنامه SPSS به روش UPGMA و بر اساس الگوی چند شکلی DNA محصولات RAPD به طور جداگانه برای هر آغازگر و نیز حالت ترکیبی آنها انجام گرفت و دوری و نزدیکی سویه‌ها بررسی شد.

یافته‌ها

به منظور بررسی الگوی پلی مورفیسم DNA بین ۱۵ سویه جدا شده قارچ فوزاریوم آگریسپوروم، سویه‌های ایزوله قارچ در محیط کشت مایع CSDA به مدت ۷ روز کشت شدند. سپس محیط‌های کشت صاف شد و از میسلیم‌ها جهت استخراج DNA ژنومی استفاده شد. بعد از استخراج DNA به روش دلاپورتا، کیفیت و کمیت DNA استخراجی تعیین گردید. بررسی ها نشان داد که DNA استخراجی نسبتاً خالص بوده و نیازی به پروتیناز K در جریان استخراج DNA نیست.

M 2 15 18 21 23 24 25 26 30 31 45 47 53 58 59 C



تصویر ۱: الگوی چند شکلی DNA حاصل از RAPD با استفاده از آغازگر ۸۱ در ژل آگارز ۲٪. ستونها از چپ به راست ستون ۱ (M) مربوط به مارکر وزن ملکولی استاندارد DNA، ستونهای مربوط به اعداد ۲ تا ۵۹ مشخص کننده الگوی پلی مورفیسم DNA سویه‌های جدا شده قارچ و ستون ۱۷ (C) مربوط به کنترل منفی PCR

1. Cluster analysis

بین این سه گروه را مورد تأیید قرار داد و مشخص کرد که ارتباط معنی داری بین گروهها وجود ندارد و گروههای به دست آمده کاملاً مستقل از هم هستند (جدول ۲).

مقایسه گروه بندی به دست آمده از دندروگرام حاصل از الگوی پلی مورفیسیم DNA با روش RAPD دوازده آغازگر با دسته بندی سویه ها براساس منطقه جغرافیایی نشان می دهد که ۱۰۰٪ سویه های استان های غرب کشور در گروه دوم دندروگرام حاصل از الگوی DNA تکثیر شده به وسیله روش RAPD با دوازده آغازگر دسته بندی شدند بنابراین سویه های منطقه غرب کشور الگوی پلی مورفیسیم مشابهی دارند و به دلیل نزدیکی ساختار ژنتیکی شان تقریباً در یک گروه مجزا قرار گرفته اند، در حالی که سویه های استانهای دیگر دارای الگوی پلی مورفیسیم متفاوتی هستند و در هر سه گروه پراکنده شده اند. طبق جدول ۲ مقدار P بین گروهها کمتر از ۰/۰۵ است و گروههای به دست آمده ارتباط معنی داری با یکدیگر ندارند و بین گروهها اختلاف واقعی ۱۰۰٪ وجود دارد.

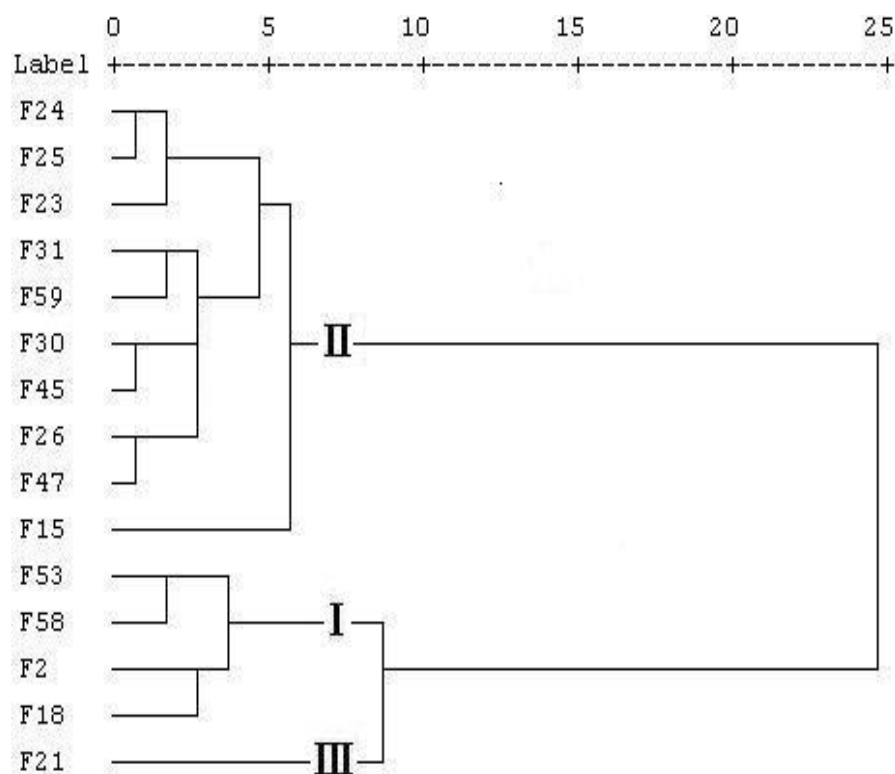
در بررسی گروه بندی های به دست آمده از نتایج هر یک از آغازگرها بر اساس تأیید جدول تابع تشخیص و گروه بندی مقایسه ای مزدوج (جدول ۳) در روش وارد^۱ سویه ها بر روی دندروگرام های حاصله در گروههای مختلف قرار گرفتند. مقایسه گروه بندی به دست آمده بر روی دندروگرام حاصل از هر پرایمر با دسته بندی سویه ها براساس منطقه جغرافیایی نشان داد که تنها پرایمر ۸۱ توانسته است سویه های استان های لرستان شامل F۴۷، F۴۵ و F۲۳ ایلام شامل F۲۴، F۲۵ و F۲۶ همراه با یکی از سویه های استان کرمانشاه به نام F۳۰ که از نظر جغرافیایی به هم نزدیک هستند، در یک گروه قرار گرفتند و سویه های جمع آوری شده از دیگر استانها در گروههای دیگر توزیع شده اند. در مرحله بعد ترکیب داده های حاصل از ۱۲ پرایمر مورد استفاده در این تحقیق انجام پذیرفت و در بررسی نتایج حاصل از پلی مورفیسیم DNA از ترکیب داده های حاصل از دوازده آغازگر (جدول ۱) دندروگرام به دست آمده سویه ها را در سه گروه دسته بندی کرد: گروه اول شامل ۴ عضو F۱۸، F۱۵، F۲۶، F۳۰، F۳۱، F۴۵، F۴۷ و F۵۹ بوده و در گروه سوم سویه F۲۱ قرار گرفت (دندروگرام ۱). آنالیز تابع تشخیص و گروه بندی مقایسه ای مزدوج نیز با احتمال ۱۰۰ درصد اختلاف واقعی

جدول ۱: اطلاعات مربوط به مشخصات ۱۲ پرایمر مورد مطالعه در این تحقیق

نام آغاز گر	توالی آغاز گر	دمای اتصال °C	درصد G+C
۱۷۱	5'-GAAACAGCGG-3'	۳۲	۶۰
۱۷۲	5'-GGAGCCCAC-3'	۳۲	۷۸
۱۷۳	5'-GGAGGGTGT-3'	۳۲	۶۰
۱۷۴	5'-ACGATCGCGG-3'	۳۴	۶۰
Pu۱	5'-AGATGCAGCC-3'	۳۲	۶۰
Pu۲	5'-ACGGATCCTG-3'	۳۲	۶۰
Pu۳	5'-ACTGGGACTC-3'	۳۲	۶۰
۸۱	5'-GGTTCTGGCA-3'	۳۲	۶۰
R۱	5' CGGCCACCCT 3'	۳۶	۸۰
R۲	5' CGCGTGCCAG 3'	۳۶	۸۰
R۳	5' CCGGGCAAGC 3'	۳۶	۸۰
G۱۹	5' ACGACCGACA 3'	۳۲	۶۰

جدول ۲: جدول تابع تشخیص و گروه بندی مقایسه ای مزدوج (روش وارد) برای گروههای سه گانه حاصل از الگوی چند شکلی DNA با استفاده از ترکیب داده های حاصل از دوازده آغازگر.

کل	اعضای گروههای به دست آمده			دسته
	۳	۲	۱	
۴	۰	۰	۴	۱
۱۰	۰	۱۰	۰	۲
۱	۱	۰	۰	۳
۱۰۰	۰	۰	۱۰۰	۱
۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۲
۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۳
	۰/۰۰۳	۰	-	۱
	۰	-	۰	۲
	-	۰	۰/۰۰۳	۳



دندروگرام ۱: نمودار حاصل از تجزیه خوشه ای ۱۵ سویه بر اساس الگوی چند شکلی DNA حاصل از RAPD از ترکیب دوازده آغازگر. طبق نمودار سویه‌ها در سه گروه دسته بندی شده و کلیه سویه‌های منطقه غرب کشور در ۲ قرار گرفته اند. در حالی که سویه‌های استانهای شمال غرب کشور در هر سه گروه پراکنده شده اند.

بحث

برای بررسی تنوع در سطح DNA روشهای مختلفی ارایه شده است که همه روزه بر تعدادشان افزوده می‌شود. روش PCR با انواع مختلفی که دارد یکی از این روشها است. یکی از انواع PCR روش RAPD است و در مواردی که اطلاعات محدودی در مورد توالی بازهای DNA یک موجود در اختیار است کاربرد ویژه‌ای دارد. از آنجا که در مورد توالی بازهای DNA قارچ فوزاریوم آگریسپوروم اطلاعاتی در دست نیست، این روش برای بررسی پلی مورفیسم DNA می‌تواند سودمند باشد (۱۵).

در هنگام بررسی یک گونه از قارچ با سویه‌های مختلفی از آن مواجه می‌شویم که با هم اختلاف جزئی دارند. این اختلافها در برخی خصوصیات فنوتیپی نظیر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، شدت بیماریزایی، انواع توکسین‌های تولید شده و فعالیت آنها و دیگر ویژگی‌هاست. از آنجا که صفات فنوتیپی در سطح مواد ژنتیکی و بازهای DNA رمزدهی می‌شوند، انتظار می‌رود که هر گونه تنوع در خصوصیات ظاهری بین دو موجود در سطح DNA آنها انعکاس یابد، به طوری که این اختلافها مستقیماً و با بررسی DNA آنها با روشهای مناسب قابل پیگیری است (۱۴).

همکاران با بررسی تنوع ژنتیکی بین سویه‌های قارچ فوزاریوم آگریسپوروم از طریق الگوی RAPD نشان دادند که دسته‌بندی به دست آمده با نتایج حاصل از بیماری‌زایی از همبستگی کامل برخوردار است، در حالی که مقایسه نتایج حاصل از جدایی جغرافیایی تجانس بسیار پایینی داشت (۱۷). در مطالعه حاضر نیز مقایسه الگوی RAPD سویه‌ها با دسته بندی بر اساس منطقه جغرافیایی بیانگر وجود همبستگی بین الگوی پلی مورفسم سویه‌های غرب کشور با منشأ جغرافیایی شان بوده است. به بیان دیگر، RAPD قادر به تشخیص تفاوت بین سویه های این منطقه با سایر نقاط است. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و همچنین بررسی مطالعات قبلی که کارایی این روش را در عرصه مطالعات ژنتیکی از طریق طبقه بندی آنها نشان می‌دهد پیشنهاد می‌شود تا با انجام مطالعات پیشرفته‌تر به وسیله استفاده از سایر نشانگرهای ملکولی و ریخت‌شناسی و ادغام نتایج حاصله به بررسی و شناخت هر چه بهتر ذخایر تواری و ساختار ژنتیکی این سویه ها پرداخته شود. این موضوع سبب شناسایی هر چه سریعتر خصوصیات مجموعه های ژنتیکی می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از مساعدت های دکتر علی برزگر، استادیار دانشگاه ساری بخاطر محاسبات آماری، تشکر می‌کنند.

در این تحقیق با به کارگیری ۱۲ نشانگر RAPD تنوع ژنتیکی بین ۱۵ سویه قارچ فوزاریوم آگریسپوروم مشاهده شد و سویه ها در سه گروه دسته بندی شدند. در بررسی جدول تابع تشخیص و آنالیز مقایسه‌ای مزدوج ارتباط معنی داری بین گروهها به دست نیامد و مشخص شد که گروههای به دست آمده کاملاً مستقل از هم هستند و بین گروهها اختلاف واقعی ۱۰۰٪ وجود دارد. این موضوع صحت نتایج حاصل را نشان داد ($p < 0/05$).

در مطالعه حاضر دسته بندی به دست آمده از روش RAPD با تفکیک سویه‌ها بر اساس جدایی جغرافیایی مقایسه شد و نتایج این بررسی نشان داد که سویه‌های منطقه غرب کشور دارای الگوی پلی مورفسم مشابهی هستند. این سویه‌ها به دلیل تشابه در ساختار ژنتیکی شان در یک گروه مجزا قرار گرفته اند که بیانگر تنوع ژنتیکی کم بین سویه های این منطقه می‌شود. در حالی که سویه‌های استانهای شمال غرب کشور دارای الگوی پلی مورفسم متفاوتی بودند و در گروههای مختلف قرار گرفتند. آسیگننس و همکاران در (۱۶) مطالعاتی بر روی الگوی پلی مورفسم سه نژاد مربوط به ۴۶ جدایه قارچ فوزاریوم آگریسپوروم با روش RAPD انجام دادند، آنها را به سه گروه جداگانه دسته بندی کردند. آنان مشاهده کردند که RAPD می‌تواند ایزوله ها را بر اساس نژاد کاملاً از همدیگر تفکیک کند. همچنین ایزوله های مربوط به منطقه چین با داشتن الگوی پلی مورفسم مشابه در یک گروه جداگانه قرار گرفتند، در حالی که سویه‌های سایر کشورها با دارا بودن ساختار ژنتیکی متفاوت در هر سه گروه پراکنده شدند. در مطالعه آنان مقایسه دسته بندی انجام گرفته بر اساس RAPD با نتایج حاصل از بیماری‌زایی تجانس بسیار کمتری داشت. از طرف دیگر، خیمنز و

References

1. Dursun D, Fernandez V, Miller D, Alfonso EC. Advanced fusarium keratitis progressing to endophthalmitis. *Cornea* 2003; 22:300-3.
2. Cocuroccia B, Gaido J, Gubinelli E, Annessi G, Girolomoni G. Localized cutaneous hyalohyphomycosis caused by a *Fusarium* species infection in a renal transplant patient. *Clin Microbiol* 2003; 41(2): 905-7.
3. Wheat LJ, Goldman M, Sarosi G. State-of-the-art review of pulmonary fungal infections (Review) *Semin Respir Infect* 2002 ;17(2):158-81.
4. Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, Heymans C, Duchateau V, Verdebout JM, Crokaert F. Cross reaction between a pan-candida genus probe and *Fusarium spp.* in a fatal case of *Fusarium oxysporum* pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(2):149-52.
5. Liddel CM. Introduction: Recent advance in *Fusarium systematic*. *Phytophath* 1991; 81: 1044-1045.
6. Jamil FF, Sarwar N, Sarwar M, Khan JA, and Kahl G. Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* populations in Pakistan causing blight of chickpea. *Physiol and Molec Plant Path* 2000; 57: 243 - 254.
7. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:6531-6535.
8. Martin MJ, Simon CJ, and Nuehlbauer FJ. Use of Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) to Characterize Race 2 of *Fusarium oxysporum f.sp pisi*. *Phytopath* 1993; 83: 612-614.
9. Yli-Mattila T, Paavanen S, Parikka A., Tahvonen R, and Karjalainen, R. Isozyme and RAPD-PCR analyses of *Fusarium avenaceum* strains from Finland. *Plant Path* 1996; 45:126-134.
10. Namiki F, Shiomi T, kayamura T, and Tsuge T. Characterization of the fomae specials of *Fusarium oxysporum* causing wilt of cucurbits by DNA fingerprinting with nuclear repetitive DNA sequences. *Appl Envir Microbe* 1994; 60: 2684 - 2691.
11. Dellaporta SL. A plant chromosomal DNA minipreparation. *Plant Mol Biol Rep* 1983; 1:19-21.
12. Morgan U, Constantine C, O'Donoghue P, Meloni B P, et al. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis. *Am J Trop Med & Hygiene* 1995; 52: 559-564.
13. Meyers JA, Sanchez D, Elwell I, and Falkow S. Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 1976; 127: 1529-1537.
14. Paavanen SH, Hyvonen J, Bulat SA, and Yli-Mattila T. RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analyses in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates. *Mycol Res* 1999; 103: 625-634.
15. Bentley S, Pegg KG, and Dale JL. Genetic variation among a worldwide collection of isolates of *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* analyzed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycol Res* 1995; 99: 1378-1384.
16. Assigbetse KB, Fernandez D, Dubois MP, Geiger JP. Differentiation of *Fusarium oxysporum f.sp vasinfectum* races by Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytophath* 1994; 84: 622-6.
17. Jimenez GM, Perez-Artes E and Rodriguez JD. Characterization of pathotype and races of *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* and nonpathogenic *F. oxysporum* infecting chickpea by RAPD-PCR. In 3rd European conference on grain legumes and Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet European demands in Valladolid, Spain. 1998; 96-97.