

تنوع ژنتیکی *Ascochyta rabiei* با استفاده از استاندارد نمودن RAPD

*اباصلت حسین‌زاده کلاگر^۱ و علی برزگر^۲

^۱استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران، ^۲استادیار گروه گیاهپزشکی مجتمع آموزش عالی علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۸۵/۴/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۸/۲۷

چکیده

بیماری برق زدگی که عامل آن *Ascochyta rabiei* (Pass) Labrousse است از بیماری‌های ویران‌گر مزارع نخود (*Cicer arietinum* L.) می‌باشد. در این مطالعه ۵۶ جدایه *A. rabiei* جمع‌آوری شده از استان‌های کرمانشاه، لرستان، کردستان، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و همدان مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA به روش CTAB از میسلیم‌های قارچ انجام شد. پلی‌مورفیسم DNA در این جدایه‌ها با استفاده از ۱۲ پرایمر تصادفی بررسی شد. آنالیز خوشه‌ای محصولات PCR چهار پرایمر *ArPU1*، *Ar173*، *Ar08 2* و *Ar171* به روش UPGMA انجام شد. نتایج نشان داد این جدایه‌ها در آنالیز خوشه‌ای بخاطر داشتن الگوی پلی‌مورفیسمی متفاوت DNA در ۷ گروه با سطح تشابه ۷۵ درصد قرار گرفتند. پیشنهاد می‌گردد اگر پلی‌مورفیسم باندهای جدایه‌ها با استفاده از مهاجرت باندهای مارکری استاندارد شود، RAPD نه تنها قادر به تفکیک جدایه‌های *A. rabiei* به گروه‌های مختلف است بلکه تکنیکی مؤثر، سریع و قابل حصول برای مطالعه تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های قارچ می‌باشد. همچنین استاندارد نمودن باندهای پلی‌مورفیک در تکنیک‌های مشابه مولکولی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌مورفیسم DNA، *Ascochyta rabiei*، پرایمر راندوم، استاندارد نمودن باندها

مقدمه

تا سال ۱۹۹۶ مجموعاً ۱۷۱ عامل بیماری‌زا (۶۷ نوع عامل قارچی، ۳ نوع عامل باکتریایی، ۲۲ نوع عامل ویروسی و مایکوپلاسمایی و ۸۰ نوع عامل نامتودی) از مزارع نخود ۵۵ کشور گزارش شدند (کایزر، ۱۹۹۷). در این میان *Ascochyta rabiei* (Pass) Labrousse در ۳۳ کشور مشاهده و گزارش گردید (کایزر و همکاران، ۱۹۹۷؛ ننی و همکاران، ۱۹۸۹).

قارچ *Ascochyta rabiei* عامل ایجادکننده بیماری برق‌زدگی نخود (*Ascochyta blight*) می‌باشد که با

توجه به شرایط اقلیمی ویژه‌ای که در غرب آسیا و آفریقای شمالی برای شیوع این بیماری وجود دارد، آن را بیماری نخود در منطقه WANA^۱ نیز می‌نامند (منباگا، ۱۹۹۷). این قارچ از مهمترین و مخرب‌ترین عوامل بیماری‌زای نخود (*Cicer arietinum* L.) است (کایزر، ۱۹۹۷؛ ننی و ردی، ۱۹۸۷) و در سال‌هایی که بیماری فراگیر می‌شود تا ۱۰۰ درصد خسارت محصول در اغلب کشورها (سینگ، ۱۹۹۷) و تقریباً در تمام مناطق

1- West Asia and North Africa

ژل‌ها و بکار بردن مارکری با باندهای بیشتر به‌طوری‌که غالب باندهای PCR حاصل از هر پرایمر مهم است. هدف این تحقیق استاندارد نمودن مهاجرت باندهای مارکری و پلی‌مورفیسم باندهای جدایه‌های *A. rabiei* در ژل‌های مختلف که اهمیت به‌سزایی در تکرارپذیری RAPD دارد است.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچ *Ascochyta rabiei*: تعداد ۵۶ جدایه *A. rabiei* در طول این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. جدایه‌ها قبلاً از مزارع مختلف نخود و از استان‌های مختلف ایران از جمله کرمانشاه، لرستان، کردستان، آذربایجان‌رقی، آذربایجان‌ربی و همدان جمع‌آوری و خالص‌سازی شدند. جدایه‌ها به‌ترتیب با علامت‌های اختصاری JK01-29, IL01-10, JO00, IE01-10, IW01-03 و IH01-03 کدگذاری شدند (زمانی و همکاران، ۲۰۰۱؛ مطلبی و همکاران، ۲۰۰۳).

محیط‌کشت قارچ: جهت نگهداری قارچ از ۳۹ گرم محیط‌کشت PDA در یک لیتر آب مقطر استفاده گردید. جهت تهیه میسلیم قارچ برای استخراج DNA از محیط‌کشت مایع ریچارد^۳ که شامل ده گرم نیترات پتاسیم، ۵ گرم دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم، ۲/۵ گرم سولفات منیزیم (دارای ۷ آب)، ۰/۰۲ گرم کلرید آهن، ۵۰ گرم ساکارز در یک لیتر آب مقطر بود، استفاده شد.

روش استخراج DNA: جدایه‌ها در ارلن‌های نیم لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط مایع ریچارد به مدت ۷-۱۰ روز در تاریکی، دمای اپتیمم (۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد) و همزدن ۲۵۰ دور در دقیقه، کشت شدند. سپس میسلیم هر جدایه به‌طور جداگانه استخراج گردید و بعد از شستشو با آب مقطر توسط دستگاه Freeze drying خشک شده و با هاون به‌صورت پودر در آمدند. استخراج DNA ژنومی از پودر میسلیم‌ها به روش CTAB^۴ انجام شد

نخود کاری ایران گزارش شده است (بنی‌هاشمی، ۱۹۷۲؛ کایزر، ۱۹۷۲؛ زمانی و همکاران، ۲۰۰۱).

برای مطالعه تنوع ژنتیکی از صفات مختلفی مثل صفات مرفولوژیکی، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها استفاده می‌شود (گبتس، ۱۹۹۳) در قارچ‌ها مطالعه این گونه صفات برای بررسی تنوع ژنتیکی دارای محدودیت‌هایی می‌باشد (گراوهارست و همکاران، ۱۹۹۱). در صورتی‌که مارکرهای مبتنی بر DNA به‌خصوص روش RAPD می‌تواند به‌عنوان یک ابزار قوی برای این منظور استفاده گردد (ویگت و همکاران، ۱۹۹۵). و به‌خاطر دقت، سرعت، نیاز به مقدار کم DNA ژنومی، عدم نیاز به شناخت ترادف خاص از DNA ژنومی برای ساختن پرایمر، عدم نیاز به مواد نشاندار و صرف هزینه کم در تکنیک RAPD، این تکنیک یکی از مارکرهای مناسب در مطالعه قارچ‌ها می‌باشد (ویگت و همکاران، ۱۹۹۵). ضمن این که تکنیک RAPD می‌تواند تنوع ژنتیکی موجود در ژنوم را با حساسیت و دقتی برابر در مقایسه با دیگر تکنیک‌ها از جمله RFLP نشان دهد (تاتینی و همکاران، ۱۹۹۶). استفاده از روش RAPD برای شناسایی ارقام و رده‌بندی قارچ‌ها به‌خصوص قارچ *A. rabiei* به سرعت مورد استقبال قرار گرفته است (فیشر و همکاران، ۱۹۹۵؛ چانگو و همکاران، ۲۰۰۴؛ زمانی و همکاران، ۱۹۹۸). از سوی دیگر مطالعات گلخانه‌ای و آنزیمی نشان داده است که این دسته از قارچ‌ها دارای تنوع فنوتیپی بالایی از نظر قدرت بیماری‌زایی (زمانی و همکاران، ۲۰۰۱) و فعالیت آنزیمی (مطلبی و همکاران، ۲۰۰۳) می‌باشند. لذا مطالعه تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از مارکرهای مولکولی چند شکلی تکثیر شده تصادفی DNA یا RAPD^۱ (ویلیام و همکاران، ۱۹۹۰) گامی مهم در شناسایی قارچ‌های *A. rabiei* می‌باشد. برای تکرارپذیری نتایج حاصل از RAPD، رعایت شرایط مساوی در کلیه مراحل استخراج DNA، PCR و الکتروفورز و همچنین استفاده از یک نوع مارکر در کلیه

2- Potato Dextrose Agar, Merck

3- Richard's Broth

4- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

1- Random Amplified Polymorphic DNA

(سمبروک و راسل، ۲۰۰۱) رنگ‌آمیزی گردیدند و سپس توسط دستگاه UV Transilluminator مشاهده و عکس‌برداری شدند.

روش‌های آماری در آنالیز محصولات RAPD برای تجزیه آماری محصولات RAPD از میزان مهاجرت باندها استفاده گردیده است (سمبروک و راسل، ۲۰۰۱). میزان مهاجرت هر یک از باندها با دقت ۰/۰۵ میلی‌متر با استفاده از کولیس سنجیده شد (جدول ۲). به‌منظور افزایش تکرارپذیری الگوی DNA به‌دست آمده در این مرحله از آنالیز علاوه بر رعایت شرایط بهینه فوق از الگوی ارائه شده توسط دیگر محققین (نی، ۱۹۷۲؛ نی و لی، ۱۹۷۹) استفاده گردید. برای این منظور هر ژل به‌عنوان جامعه آماری جداگانه و سپس هر باند به‌عنوان یک صفت و جدایه‌ها به‌عنوان افراد جامعه فرض شد و یک نوع مارکر برای تمام پرایمرها استفاده گردید (ترجیحاً این مارکر بزرگترین باند و کوچک‌ترین باند DNA در اغلب جدایه‌ها را دربرمی‌گرفت). سپس تک‌تک باندهای مارکری ژل‌های مختلف نسبت به هم استاندارد گردیدند و محدوده هر باند مارکری تعیین و تعریف شد. در مرحله بعد تک‌تک باندهای هر یک از جدایه‌ها (که در حکم فرد) در ژل (جامعه) براساس باند مارکری استاندارد شدند و ارزش‌گذاری صفر و یک صورت گرفت. بر این اساس چون الکتروفورز محصول PCR هر یک از پرایمرها در یک ژل مقدور نبود لذا برای هر پرایمر مهاجرت باندهای مارکری یکی از ژل‌ها به‌عنوان مبنا (ژل استاندارد) قرار داده شد (جدول ۲). از آنجایی که حرکت DNA در ژل آگارز از معادله لگاریتمی $\text{Log } Y = a + b \text{Log } X$ پیروی می‌کند، معادله خطی لگاریتمی مارکر ژل استاندارد با مارکر دیگر ژل‌ها محاسبه گردید (جدول ۳) (سمبروک و راسل، ۲۰۰۱). سپس با قرار دادن مهاجرت باندهای هر ژل در معادله مربوطه مهاجرت‌های استاندارد شده تک‌تک ژل‌ها محاسبه گردید (جدول ۳). به این ترتیب نه تنها باندهای مارکری بلکه مهاجرت دیگر باندهای جدایه‌ها نیز استاندارد شدند (جدول ۴). چون مهاجرت باندهای

(دویلی و دویلی، ۱۹۹۰)، DNA استخراج شده به‌دست آمده در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شد و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده بعدی نگهداری گردید. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از نسبت $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ و کمیست آن از رابطه $[\text{dsDNA}] \mu\text{g/ml} = 50 \times \text{P} \times \text{OD}_{260}$ ، که در این رابطه P درجه رقت می‌باشد، بررسی و اندازه‌گیری گردید (سمبروک و همکاران، ۲۰۰۱).

پرایمرهای مورد استفاده: در این تحقیق تعداد ۱۲ اولیگومر ۹-۱۰ نوکلئوتیدی به شرح جدول ۱ به‌عنوان پرایمر (آغازگر) مورد استفاده قرار گرفت. این پرایمرها از پرایمرهای عمومی است. بعد انتخاب دمای تقریبی اتصال با استفاده برنامه Oligo5، توسط شرکت MWG-Biotech (Germany) سنتز شدند.

شرایط RAPD: برای انجام واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر ابتدا مخلوط ۰/۲ واحد آنزیم DNA پلی‌راز *Taq*، ۲۵ نانوگرم DNA ژنومی، ۰/۵ میکرومولار پرایمر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl_2 و بافر 1X از PCR (شامل ۱۰ میلی‌مولار KCl، ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH ۸/۸) و ۰/۰۸ درصد Nonidet P40) در غلظت نهایی تهیه گردید. سپس واکنش PCR در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه به‌منظور دنیچر شدن اولیه و ۳۵ دور با برنامه ۱/۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۳۲ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، انجام شد. بعد از اتمام ۳۵ دور، واکنش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه جهت انجام بسط نهایی اینکوبه گردید. محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد با بافر TBE^۳ براساس دستورالعمل عمومی (سمبروک و همکاران، ۲۰۰۱) الکتروفورز گردید. باندهای DNA در ژل‌های آگارز، به‌مدت ۴۵-۳۰ دقیقه درون محلول ۰/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید به روش عمومی

- 1- Double Strand DNA
- 2- Polymerase Chain Reaction
- 3- Tris-Borate-EDTA

گردید. برای این منظور ابتدا میانگین‌ها و انحراف معیار باندهای متناظر محاسبه شد.

مارکری در تمام ژل‌ها یکسان نبودند به‌منظور یکسان نمودن آنها برای هر باند مارکری حد بالا و پایین تعریف

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق و تعداد چند شکلی باندی مشاهده شده در محصولات PCR ی جدایه‌های مختلف قارچ *Ascochyta rabiei*.

نام	جهت پرایمر 5' → 3'	تعداد نوکلئوتید	تعداد چند شکلی باندی
Ar079	5'-GAAAGAGCGG-3'	۱۰	۸
Ar081	5'-ACGGTCTTGG-3'	۱۰	۸
Ar082	5'-ACGATCGCGG-3'	۱۰	۹
Ar171	5'-GAAACAGCGG-3'	۱۰	۹
Ar172	5'-GGAGCCCAC-3'	۹	۶
Ar173	5'-GGAGGGTGTT-3'	۱۰	۷
Ar174	5'-ACGATCGCGG-3'	۱۰	۹
ArPU1	5'-ACTGGGACTC-3'	۱۰	۹
ArPU2	5'-AGATGCAGCC-3'	۱۰	۶
ArPU3	5'-ACTGGGACTC-3'	۱۰	۵
Ar0R1	5'-CGGCCACCCT-3'	۱۰	۷
Ar0R2	5'-CGCGTGCCAG-3'	۱۰	۶

با استفاده از جدول ماتریس صفر و یک، ماتریس تشابه بر مبنای ضریب تشابه نی (۱۹۷۲) تشکیل گردید. این ماتریس به ماتریس فاصله تبدیل شد. تجزیه کلاستر به روش UPGMA^۱ با برنامه SPSS براساس ماتریس فاصله الگوی چند شکلی DNA محصولات RAPD پرایمرها به‌صورت ترکیبی ترسیم شد (دانجی و همکاران، ۲۰۰۴؛ چانگو و همکاران، ۲۰۰۴) و آنالیز تابع تشخیص بالاترین اختلاف واقعی بین گروه‌ها تعیین گردید.

سپس با استفاده از تابع توزیع نرمال و رابطه $X = m \pm Z\delta$ حدود هر باند مارکری محاسبه گردید. در مرحله بعد برای تسهیل در آنالیز اندازه باندی، دسته‌ها را با حرف بزرگ و فاصله‌های قبل از اولین باند مارکری با حروف کوچک اندیس‌دار و فواصل بین دسته‌ها با حروف بزرگ اندیس‌دار نمایش داده شد (جدول ۴). سپس براساس وجود و یا عدم وجود هر باند PCR که در این فاصله قرار داشت به‌ترتیب عدد یک و یا صفر به هر دسته نسبت داده شد و جدول ماتریس صفر و یک شکل گرفت.

1- Unweighted Pair Grouped Method by Arithmetic average

جدول ۲- میزان مهاجرت‌های خام محصولات RAPD پرایمر *ArPU1* (الف) و باندهای مارکری (ب) در ژل‌های مختلف (به میلی‌متر).

ب						الف									
پرایمر <i>ArPU1</i>						پرایمر <i>ArPU1</i>									
باند (bp)						ژل*									
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	ژل	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	۱	۵۷/۰	۴۴/۰	۳۸/۵	۲۷/۵	۲۳/۵	۲۱/۵	۲۰/۵	۱۹/۵	۱۸/۵	۱۷/۵
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	۲	۴۷/۸۶	۴۴/۵	۳۱/۰	۳۶/۶۳	۲۳/۵	۲۱/۵	۲۰/۵	۱۹/۵	۱۸/۵	۱۷/۵
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	۳	۵۷/۸	۴۶/۰	۴۲/۰	۳۳/۰	۲۳/۵	۲۱/۵	۲۰/۵	۱۹/۵	۱۸/۵	۱۷/۵
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	۴	۵۸/۲	۵۰/۱	۳۹/۱	۲۳/۰	۲۳/۵	۲۱/۵	۲۰/۵	۱۹/۵	۱۸/۵	۱۷/۵
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	۵	۵۷/۲	۴۹/۱	۳۸/۰	۲۲/۰	۲۲/۵	۲۱/۵	۲۰/۵	۱۹/۵	۱۸/۵	۱۷/۵

* منظور شماره ژلی است که محصول PCR آن جدایه قرار دارد

bp = جفت باز

جدول ۳- ضرایب معادله رگرسیونی و مهاجرت باندهای مارکری استاندارد شده (ب): ژل چهارم محصول پرایمر *ArPU1* به‌عنوان ژل (جامعه) استاندارد می‌باشد.

ب						الف			
پرایمر <i>ArPU1</i>						پرایمر <i>ArPU1</i>			
باند (bp)						ژل			
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	ژل	R ²	b	a	ژل
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	۱	۰/۹۹۹۹	۱/۰۱۰۴	-۰/۰۲۴۶	۱
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	۲	۱/۰۰۰۰	۱/۰۰۶	-۰/۰۱۹۶	۲
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	۳	۱/۰۰۰۰	۱/۰۱۶	-۰/۰۳۷۷	۳
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	۴	ژل استاندارد			۴
۱۴۴۴	۱۳۰۷	۰۴۷۵	۰۳۶۸	۰۳۱۵	۵	۰/۹۹۹۹	۱/۰۱۸۳	-۰/۰۴۰۸	۵

R² = ضریب تبیین

bp = جفت باز

جدول ۴- میزان مهاجرت‌های استاندارد شده محصولات RAPD پرایمر *ArPU1*، براساس ژل چهارم محصول پرایمر *ArPU1* (الف) و ماتریس صفر و یک حاصل از محصولات RAPD پرایمر *ArPU1* جدایه‌های مختلف قارچ *Ascochyta rabiei* (ب).

ب												الف											
پرایمر <i>ArPU1</i>												پرایمر <i>ArPU1</i>											
Code												ژل											
E00	C02	C01	B04	B03	B01	B00	A00	a10	a08	a07	Code	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰		
۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	IK01	-	-	-	۵۶/۱۴	۴۳/۳۴	۳۷/۹۳	۲۷/۱۰	۲۳/۱۷	۲۱/۲۰	۲۰/۲۰	۱۹/۲۰	۱۸/۲۰
۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	IK02	-	-	-	۵۶/۱۴	۳۷/۹۳	۲۷/۱۰	۲۳/۱۷	۲۱/۲۰	۲۰/۲۰	۱۹/۲۰	۱۸/۲۰	۱۷/۲۰
۱	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱	IK03	-	-	-	۵۶/۶۳	۳۳/۵	۲۳/۱۷	۲۱/۲۰	۲۰/۲۰	۱۹/۲۰	۱۸/۲۰	۱۷/۲۰	۱۶/۲۰
۰	۱	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۱	IK04	۴۷/۱۴	۴۳/۸۴	۳۰/۵۵	۶۲/۴۰	۲۳/۱۷	۲۱/۲۰	۲۰/۲۰	۱۹/۲۰	۱۸/۲۰	۱۷/۲۰	۱۶/۲۰	۱۵/۲۰
۱	۱	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	IK05	-	-	۵۶/۹۳	۴۵/۳۱	۴۱/۳۸	۳۲/۵۱	۲۳/۱۷	۲۱/۲۰	۲۰/۲۰	۱۹/۲۰	۱۸/۲۰	۱۷/۲۰
۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	IK06	-	-	-	۳۹/۹۰	۲۲/۴۸	۱۹/۷۲	۱۸/۷۲	۱۷/۷۲	۱۶/۷۲	۱۵/۷۲	۱۴/۷۲	۱۳/۷۲
۰	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۱	۰	IK07	-	۴۱/۸۷	۳۳/۹۹	۳۰/۵۵	۲۵/۱۸	۲۱/۸۹	۲۰/۸۹	۱۹/۸۹	۱۸/۸۹	۱۷/۸۹	۱۶/۸۹	۱۵/۸۹

نتایج و بحث

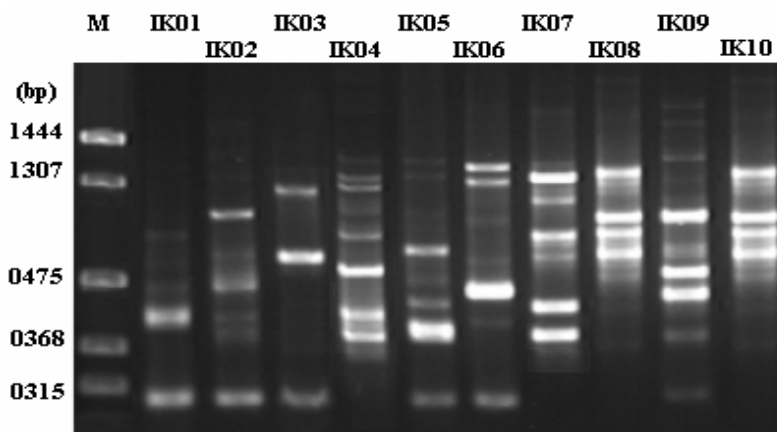
در سطح تشابه ۷۵ درصد قرار گرفتند به طوری که ۳۶ جدایه در گروه I قرار دارند که دارای تنوع بالای ژنتیکی بالا هستند و پنج جدایه‌ای که در گروه VI قرار گرفتند دارای تنوع کمتری نسبت به مابقی جدایه‌ها می‌باشند (شکل ۲).

در مطالعه دیگر میزان باندهای تکثیر شده از هر جدایه توسط هر یک از پرایمرها مورد بررسی قرار گرفت و سپس جدول توافق برای باندهی پرایمرها ایجاد شد. همان طوری که در جدول ۵ آمده است مقادیر χ^2 معنی دار است و این بدان معناست که جدایه‌ها از نظر باندهی، و پرایمرها از نظر تأثیر بر روی جدایه‌ها و اثر متقابل پرایمرها در جدایه‌ها متفاوت است. و نتیجه آزمون علامت^۱ نیز نشان می‌دهد^۲ که این پرایمرها در اتصال به DNA ژنومی با هم دیگر متفاوت می‌باشند (جدول ۵).

آنالیز وزنی باندها براساس معادله مهاجرت وزنی مارکر انجام شد. بعد از تبدیل و تعیین حد بالا و پایین وزن باندها، میزان باندهی هر جدایه با هر یک از پرایمرها در محدوده اوزان باندهی مورد مطالعه قرار گرفت نتایج نشان می‌دهد که محصولات PCR پرایمرهای *Ar082* و *Ar171* در اغلب جدایه‌ها دارای باندهای متراکم B03 به وزن ۶۴۱-۸۲۱ جفت باز، B02 به وزن ۸۲۱-۱۱۸۳ جفت باز، C00 به وزن ۴۰۰-۶۱۵ جفت باز و باند C01 به وزن ۳۵۰-۴۰۰ جفت باز (این باند فقط در محصولات *Ar171* می‌باشد. اما در محصولات PCR پرایمرهای *Ar173* و *ArPU1* در اغلب جدایه‌ها بجای باند C00 باندهای C01 به وزن ۳۵۰-۴۰۰ و E00 به وزن ۲۷۵-۳۰۰ جفت باز دیده می‌شود (شکل ۳). این احتمال که این باندها به عنوان باندهای شاخص تکثیر شده برای شناسایی جدایه‌های قارچی جدایه *A. rabiei* از دیگر جدایه‌های قارچی باشند نیاز به تحقیق بیشتری دارد.

برای افزایش تکرارپذیری RAPD ابتدا DNA ژنومی استخراج شده از پودر میسیلیوم با کیفیت بین ۱/۸-۲ و در رقت‌های ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر DNA برای هر جدایه انتخاب گردید. سپس پارامترهای مؤثر در PCR از جمله غلظت‌های مختلف DNA، $MgCl_2$ ، پرایمر و dNTP و آنزیم DNA پلی‌مراز *Taq* بهینه و انتخاب شدند. تحت شرایط بهینه‌سازی شده فوق، محصول PCR با استفاده از هر یک از پرایمرها، دارای چند شکلی DNA ای در جدایه‌های مختلف قارچ *A. rabiei* بود (جدول ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از DNA ژنومی ۵۶ جدایه مختلف *A. rabiei* برای هر یک از پرایمرها به طور جداگانه صورت گرفت. کلیه محصولات PCR بر روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز و رنگ‌آمیزی شدند (شکل ۱). بعد از عکس برداری، باندهای مارکری و DNA به روش مذکور استاندارد شدند و ماتریس صفر و یک تشکیل گردید. سپس براساس ماتریس صفر و یک تعداد کل الگوی چند شکلی DNA محصولات RAPD حاصل از ۱۲ پرایمر و ۵۶ جدایه مختلف قارچ *A. rabiei* مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴). محصولات PCR پرایمرهای *Ar082*، *Ar171*، *ArPU1* و *Ar174* با دارا بودن ماکزیمم نه قطعه باندهی دارای بیشترین پلی مورفیسم DNA با قطعاتی به طول ۲۶۹-۲۹۳۳ جفت باز مشاهده شدند در حالی که پرایمر *ArPU3* دارای کمترین قطعه باندهی است. از آنجایی که ۲۴۰، ۱۹۰، ۲۳۱ و ۱۷۵ محصول PCR، به ترتیب برای پرایمرهای *Ar082*، *Ar171*، *ArPU1* و *Ar174* در ۵۶ جدایه، تکثیر گردید. آنالیز کلاستری به روش UPGMA با برنامه SPSS براساس ماتریس فاصله الگوی RAPD با این چهار پرایمر مختلف انجام شد. نتایج نشان داد ۵۶ جدایه *A. rabiei* در ۷ گروه متفاوت



شکل ۱- محصولات RAPD جدایه‌های مختلف *Ascochyta rabiei* با پرایمر راندوم در ژل آگارز ۲ درصد.

جدول ۵- جدول توافقی بین جدایه‌های مختلف با پرایمرهای مختلف.

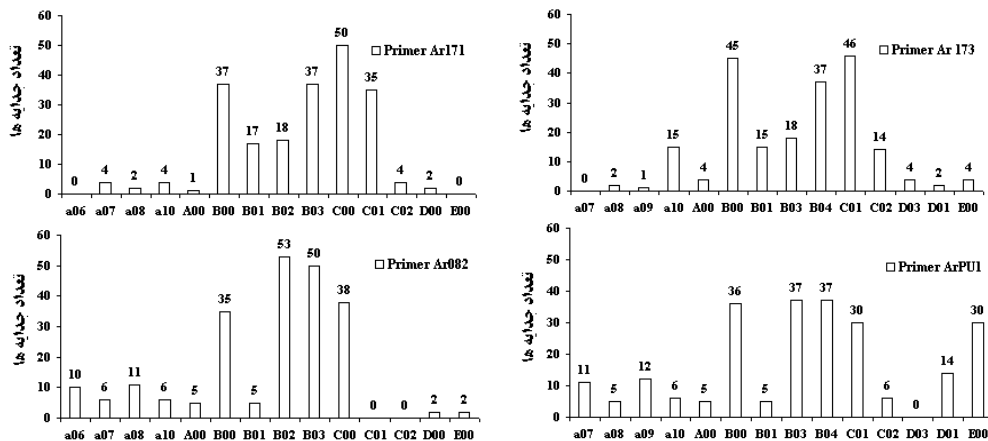
۳/۱۹۲	مقدار کای مربع محاسبه شده برای پرایمرها
۶/۶۶	مقدار کای مربع جدول برای پرایمرها در سطح احتمال یک درصد
۲۴/۶	مقدار کای مربع محاسبه شده برای جدایه‌های مختلف
۸۲/۴۵	مقدار کای مربع جدول برای جدایه‌های مختلف در سطح احتمال یک درصد
۱۷/۷۸	مقدار کای مربع محاسبه شده برای اثر متقابل پرایمرها در جدایه‌های مختلف
۸۲/۴۵	مقدار کای مربع جدول برای اثر متقابل پرایمرها در جدایه‌های مختلف در سطح احتمال یک درصد
۰/۰۱۴۷	مقدار آزمون علامت در مقایسه با سطح احتمال ۵ درصد

Sclerotinia sclerotiorum (مارگارث و همکاران، ۱۹۹۹) و غیره مورد استفاده قرار گیرد. به طوری که ۵۶ جدایه *A. rabiei* بر این اساس در گروه‌های متفاوت در سطوح مختلف قرار گرفتند که نشان‌دهنده تنوع موجود بین جدایه‌ها می‌باشد (شکل ۱). این تحقیق استاندارد نمودن الگوی چندشکلی تکثیر شده تصادفی DNA در ژل آگارز به منظور حصول به ماتریس صفر و یک را پیشنهاد می‌کند تا یکی از گام‌های مهم و اساسی در این گونه از مطالعات می‌باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از آقایان دکتر محمدرضا زمانی و دکتر مصطفی مطلبی به خاطر اهداء نمودن جدایه‌های قارچی، برخی از پرایمرها و راهنمایی‌های سخاوتمندانه و نیز از کمک آقای مختار زارع تشکر و قدردانی می‌گردد.

مقایسه نتایج این تحقیق با آنالیز RAPD انجام شده توسط فیشر و همکاران در سال ۱۹۹۵، که جهت دسته‌بندی ۳۰ جدایه بیماری‌زای قارچ *A. rabiei* که از مناطق مختلف ایتالیا جمع‌آوری شده بودند، کاملاً مشابه بود. از سوی دیگر با آنالیز RAPD انجام شده توسط چانگو و همکاران در سال ۲۰۰۴، جهت دسته‌بندی و مقایسه ویرولان‌س ۴۰ جدایه قارچ *A. rabiei* که از کشورهای مختلف جمع‌آوری شده بودند، همخوانی داشت. نتایج این مطالعه و مقایسه آن با نتایج تحقیق دیگر محققین ذکر شده نشان داد، استفاده از روش RAPD ضمن مستقل بودن از فعالیت و موقعیت ژن‌ها، می‌تواند برای گروه‌بندی ایزوله‌های قارچ‌های مختلف از جمله *Guignardia citricarpa* (جلینک بلانکو و همکاران، ۲۰۰۲)، *Bipolaris sorokiniana* (مولر و همکاران، ۲۰۰۵)، *Fusarium oxysporum* (بوشناوسکی و همکاران، ۲۰۰۳؛ علنی و همکاران، ۲۰۰۴) و



شکل ۳- فراوانی محصولات RAPD با پرایمرهای Ar082، Ar171، ArPU1 و Ar173 بر اساس مهاجرت باندها.

منابع

- Alani, B., Zamani, M.R., Motallebi, M., Zarghami, N., Jabbarzadeh, S., Rrahbani, M., and Mashayekhi, M.A. 2004. Using random amplified polymorphism DNA (RAPD) technique for DNA polymorphism in isolated strains of *Fusarium oxysporum*. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences. 63:65-70.
- Banihashemi, Z. 1972. Report on studies on pulse crop diseases in fars province regional pulse improvement project. Annual Report. 144-216.
- Bocianowski, J., Chełkowski, J., Kuczyńska, A., Wioeniewska, H., Surma, M., and Adamski, T. 2003. Assessment of RAPD markers for barley doubled haploid lines resistant and susceptible to *Fusarium culmorum* at seedling and adult plant growth stages. J. Appl. Genet. 44(3): 355-360.
- Chongo, G., Gossen, B.D., Buchwaldt, L., Adhikari, T., and Rimmer, S.R. 2004. Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. Plant Dis. 88(1): 4-10.
- Crowhurst, R.N., Hawthore, B.T., Rikkerink, E.H.A., and Templeton, M.D. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA, Curr. Genet. 20: 391-396.
- Dangi, R.S., Lagu, M. D., Choudhary, L.B., Ranjekar, P.K., and Gupta, V.S. 2004. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. BMC Plant Biology. 4(13): 1-11.
- Diekmann, M. 1992. Use of climatic parameter to predict the global distribution of *Ascochyta* blight on chickpea. Plant Dis. 76: 409-412.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1990. Isolation of DNA from fresh plant tissue. Focus. 12: 13-15.
- Fischer, C., Porta-Puglia, A., and Barz, W. 1995. RAPD analysis of pathogenic variability in *Ascochyta rabiei*. Journal Phytopathology. 143; 601-607.
- Gepts, P. 1993. The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies, P51-94, In: Hecht, M.K. (ed.), Evolutionary biology, Vol. 27, Plenum Press, New York.
- Glienke-Blanco, C., Aguilar-Vildoso, C.V., Vieira, L.C., Barroso, P.A.V., and Azevedo, L. 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. Genetics and Molecular Biology. 25(2):251-255
- Jan, H., and Wiese, M.V. 1991. Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting in the Palous. Plant Dis. 75: 904-906.
- Kaiser, W.J. 1972. Occurrence of three fungal diseases of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Iran. In: Pl, P. (ed.), Bull. FAO. 20: 73-78.
- Kaiser, W.J. 1997. Teleomorph of *Ascochyta rabiei* and its significance in breeding Chickpea. P3-21, In: Udupa, S. M., and F. Weigand (eds.), Proceeding of the symposium on application of DNA fingerprinting for crop improvement: Marker assisted selection of chickpea for sustainable agriculture in the dry areas, ICARDA, Aleppo, Syria.

15. Margaret, A., Carpenter, M.A., Frampton, C., and Stewart, A. 1999. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 27: 13-21
16. Menbaga, M.T. 1997. Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* and Ascochyta blight resistance in Chickpea. P23-37, In: Udupa, S. M., and F. Weigand (eds.), Proceeding of the symposium on application of DNA fingerprinting for crop improvement: Marker assisted selection of chickpea for sustainable agriculture in the dry areas, ICARDA, Aleppo, Syria.
17. Motallebi, M., Zamani, M.R., and Hosseinzadeh Colagar, A. 2003. Relationship between polygalacturonase activity and pathogenicity among Iranian isolates of *Ascochyta rabiei*. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*. 6(4): 159-169.
18. Müller, M.V.G., Germani, J.C., and Van Der Sand, S.T. 2005. The use of RAPD to characterize *Bipolaris sorokiniana* isolates. *Genet. Mol. Res.* 4 (4): 642-652.
19. Nei, M., and Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5269-5273.
20. Nei, M. 1972. Genetic distances between populations. *Am. Nat.*, 106: 283-292.
21. Nene, Y.L., Sheila, V.K., and Shara, S.B. 1989. A world list of Chickpea (*Cicer arietinum*) and pigeonpea (*Cajanus cajan*) pathogens Legumes pathology progress report. Patancheru, Andrapradesh, India, ICARDA, P 270.
22. Nene, Y.L., and Reddy, M.V. 1987. Chickpea diseases and their control. P233-270, In: Saxena, M.C. and K.B. Singh, (eds.), *The Chickpea*, CAB International Oxon, UK.
23. Punithalingam, E., and Holliday, P. 1972. *Ascochyta rabiei*, Inst. Kew, Surrey, England. 337p.
24. Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York, NY. 1600p
25. Singh, K.B. 1997. Experience with pyramiding of Ascochyta blight resistance genes in Kabuli chickpea, P.121-126, In: Udupa, S. M., and F. Weigand (eds.), Proceeding of the symposium on application of DNA fingerprinting for crop improvement: Marker assisted selection of chickpea for sustainable agriculture in the dry areas, ICARDA, Aleppo, Syria.
26. Tatineni, V., Cantrell, R.G., and Davis, D.D. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs, *Crop Sci.* 36: 186-192.
27. Voigt, K., Schleier, S., and Bruckner, B. 1995. Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Genet.* 27: 528-535.
28. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Tivak, K.J., Raflaski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
29. Zamani M.R., Motallebi, M., and Hosseinzadeh Colagar, A. 1998. Virulence and polymorphic DNA relationships of *Ascochyta rabiei* to geographical regions. *Iranian Journal of Biology.* 7:1-17.
30. Zamani, M.R., Motallebi, M., and Hosseinzadeh Colagar, A. 2001. In vitro pathogenicity of *Ascochyta rabiei* on chickpea roots. P43-47, In: Proceeding of The Iranian Biology Conference, Shiraz, Iran.

***Ascochyta rabiei* genetic diversity by using of RAPD standardization**

***A. Hosseinzadeh Colagar¹ and A. Barzegar²**

¹Assistant Prof., Dept. of Biology Mazandaran University, Babolsar, Iran,

²Assistant Prof., Dept. of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources Educational Complex, Iran

Abstract

Ascochyta blight caused by *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse is a devastating disease of chick-pea (*Cicer arietinum*). Fifty-six isolates of *Ascochyta rabiei* on chick-pea collected from Kermanshah, Hamedan, Lorestan, Kordestan, East Azerbaijan and West Azerbaijan provinces were studied. This isolates were collected from infected chick-pea plants showing the *Ascochyta* blight symptoms. CTAB method used for genomic DNA extraction from fungal mycelium. Random Amplified Polymorphic DNA/ RAPD studied by 12 random primers. Cluster analysis for PCR products of four primers (*Ar173*, *ArPU1*, *Ar082* and *Ar171*) performed by UPGMA (Unweighted pair grouped method by arithmetic average) method. Results showed that these isolates because of different patterns of DNA polymorphism were categorized into seven groups with in 75% similarity levels. We recommend that if the polymorphism of the isolates bands were standardized by migration of marker bands, RAPD technique not only could separate the isolates in multiple groups but also is an effective, rapid, reliable technique to study genetic variability between fungal isolates. Other hand standardization polymorphic bands were used in the similar molecular techniques.

Keywords: DNA polymorphis; *Ascochyta rabiei*; Random primers; Bands standardization.

*- Corresponding Author; Email: ahcolagar@umz.ac.ir