Archive of SID

مقایسه مولکولی جمعیت‌هایی از *Meloidogyne javanica* و *Meloidogyne incognita* در ایران با روش PCR – RFLP

عصمت مهدیخانی مقدم[۱]، احمد خیری[۲] و مجتبی محمدی[۲]

چکیده

استخراج DNA از تخم و لارو سن دوم نماتد با روش فنل – کلروفرم در مورد جمعیت‌هایی از گونه‌های *Meloidogyne javanica* و*Meloidogyne incognita* از ایران انجام و پس از تعیین کمیت و کیفیت، جهت انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی C_2F_3 / 1108 (۲۰ و ۲۳ نوکلئوتیدی)، قسمتی از DNA میتوکندریایی مربوط به ژن کد کننده سیتوکروم اکسیداز، تکثیر و یک نوار ۱/۷ کیلو باز درمورد جمعیت‌های هر دو گونه ایجاد گردید. قطعات تکثیری با آنزیم‌های محدودکننده *Alu*I، *Dra*I و *Hin*fI برش داده شد و نتایج حاصل در ژل آگاروز مورد ارزیابی قرار گرفت. دو آنزیم محدود کننده *Alu*I و *Dra*I هیچ‌گونه برشی درطول قطعه DNA تکثیر شده ایجاد نکردند. برش قطعه ۱/۷ کیلو باز با آنزیم محدودکننده *Hin*fI نقوش مشخصی را برای جمعیت‌های *M. javanica* و *M. incognita* ایجاد نمود. در جمعیت‌های *M. javanica* قطعهٔ ۱/۷ کیلو باز به دو قطعه ۱/۰و ۰/۷ کیلو باز و در جمعیت‌های *M. incognita* قطعه ۱/۷ کیلو باز به سه قطعه ۱/۰، ۰/۴ و ۰/۳ کیلو باز برش داده شد. اما تفاوتی بین جمعیت‌های مختلف هر گونه مشاهده نگردید .

واژه‌های کلیدی: DNA میتوکندریایی، *Meloidogyne*، آنزیم‌های محدود کننده، PCR- RFLP، ایران

مقدمه

ژنوم یا DNA نماتد به دلیل این‌که تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرد و در تمام مراحل زندگی نماتد بدون تغییر باقی می‌ماند، دارای نشانگرهای پایدار و مفیدی برای شناسایی نماتدها می‌باشد. بررسی و مطالعه مستقیم ژنوتیپ نماتدها علاوه بر این‌که شناسایی آنها را ممکن می‌سازد، منابع اطلاعاتی مهمی نیز جهت بررسی روابط تکاملی و خویشاوندی بین گروه‌های مختلف فراهم می‌سازد. در نماتدهای مولد گره ریشه DNA کروموزومی، DNA میتوکندریایی و DNA ریبوزومی هرسه به عنوان ابزاری جهت شناسایی مولکولی نماتدها مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. تشخیص مولکولی نماتدها نیازمند مشخص کردن DNA از نظر فیزیکی است که با استفاده از

۱. استادیار گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. به ترتیب استاد و استادیار گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم‌های محدودکننده امکان‌پذیر است. کوران و همکاران با استفاده از آنزیم محدودکننده *Eco*RI، DNA جمعیت‌های مختلف گونه‌های *M. javanica*، *M. incognita*، *M. hapla* و *M. arenaria* را برش داده و تفرق ژنوتیپی آنها را بر اساس اختلاف طول قطعات DNA مشخص نمودند (۴). از طریق آنالیز ($RFLP_S$) (Restriction Fragment Length Polymorphisms) توسط زو و همکاران در سال ۱۹۹۳ و هیات و همکاران در سال ۱۹۹۵، گونه‌های *Meloidogyne* بر اساس DNA هسته‌ای تفکیک و تمایز یافته‌اند (۸ و ۱۲). پاورز و هریس با استفاده از روش PCR (Polymerase Chain Reaction) پنج گونه *Meloidogyne* را شناسایی کردند (۱۱).

پلوکوین و همکاران دو ایزوله از *M. hapla* را با شناسایی ژنوم میتوکندریایی آنها مورد بررسی قرار دادند (۱۰). سنیس در سال ۱۹۹۳، DNA چهار گونه عمده *Meloidogyne* را با استفاده از روش PCR RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) مورد بررسی قرار داد (۳). فارگت و همکاران برای شناسایی گونه‌های *Meloidogyne* از روش PCR-RFLP استفاده کردند (۶). زیجلسترا و همکاران برای تفکیک گونه‌های مختلف *Meloidogyne* در جمعیت‌های مخلوط، روش ITS-$RFLP_S$ (Internal Transcribed Spacers) را به‌کار بردند (۱۳). بلوک و همکاران توالی ناحیه IGS (Intergenic Spacers) بین ژن‌های ۱۸S و ۵S، DNA ریبوزومی گونه‌های *M. javanica*، *M. incognita* و *M. arenaria* را با چندین جمعیت از گونه *M. mayaguensis* و یک جمعیت از *M. hapla* را به وسیله PCR مورد مقایسه قرار دادند (۱). علی‌رغم این‌که جمعیت‌های مورد مطالعه از نواحی جغرافیایی متفاوتی انتخاب شده بود، تنوع توالی در ناحیه بین ژن‌های ۱۸S و ۵S سه گونه *M. javanica*، *M. incognita* و *M. arenaria* مشاهده نگردید (۱). در بررسی دیگر، بلوک و همکاران (۱۹۹۷) تنوع ژنتیکی بین گونه‌های *Meloidogyne* در مناطق گرمسیری و جمعیت‌های داخل یک گونه را بر اساس روش RAPD –PCR مورد بررسی قرار دادند (۲). در مورد گونه *M. arenaria* بیشترین تنوع داخل گونه وجود داشت که با تعداد کمی آغازگر اختصاصی قابل تشخیص بود. هم‌چنین مشخص شد که بعضی از جمعیت‌های *M. arenaria* بسیار نزدیک به *M. javanica* هستند (۲). زیجلسترا و همکاران با ۱۲ جفت آغازگر، DNA جدایه‌های مختلف سه گونه *M. javanica*، *M. incognita* و *M. arenaria* را مورد بررسی قرار دادند (۱۴). فوری و همکاران (۲۰۰۱) گونه‌های مختلف نماتد مولد گره ریشه را در افریقای جنوبی شناسایی و به وسیله روش‌های (Sequence Characterized Amplified Region) SCAR-PCR و PCR– ITS از یکدیگر تفکیک نمودند (۷).

در این بررسی هدف تفکیک جمعیت‌های *M. javanica* و *M. incognita*، جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران، با استفاده از روش $PCR –RFLP_S$ بوده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۲۰ جمعیت از دو گونه *M. javanica* و *M. incognita* مورد بررسی قرار گرفت. مشخصات جمعیت‌های مورد مطالعه در جدول ۱ داده شده است. پس از استخراج نماتدها از ریشه‌های آلوده و شناسایی گونه‌ها بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی و مرفومتریکی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها، لاروهای سن دوم و نرها، جمعیت‌های مختلف هر گونه روی ریشه بوته‌های سالم گوجه فرنگی (رقم Rutgers) در گلخانه تکثیر و از نمونه‌های خالص جهت استخراج DNA استفاده شد (۹). هم‌چنین جمعیت‌های *M. incognita* با استفاده از میزبان‌های افتراقی تعیین نژاد شد (۵). جمعیت‌های مورد مطالعه از این گونه، نژاد دو *M. incognita* بودند.

پس از استخراج DNA از تخم و لارو سن دوم نماتد با روش فارگت و همکاران، جهت ارزیابی کیفی وکمی آن، DNA حاصل در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز گردید و با اتیدیوم بروماید ۰/۱٪ رنگ آمیزی شد. مقدار DNA به وسیله دستگاه UV Transiluminator به طور چشمی تخمین زده شد و سپس به

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱. مشخصات جمعیت های مورد مطالعه از نظر محل جمع آوری، میزبان‌ها، گونه‌ها و کد مولکولی

جدایه‌ها	محل جمع‌آوری نمونه	گیاه میزبان	گونه جدا شده	کد مولکولی
۱	کرج- سنقرآباد	کدو	*M. javanica*	J1
۲	کرج - کمال آباد	گوجه فرنگی	*M. javanica*	J2
۳	کرج - جعفرآباد	لوبیا	*M. javanica*	J3
۴	مشهد - خواجه ربیع	گوجه فرنگی	*M. javanica*	J4
۵	مشهد - تبادکان	مرزه	*M. javanica*	J5
۶	ارومیه - بادرلو	کلم	*M. javanica*	J6
۷	هشتگرد	خیار	*M. javanica*	J7
۸	همدان	سیب زمینی	*M. javanica*	J8
۹	شیراز	گوجه فرنگی	*M.javanica*	J9
۱۰	کرمان	پسته	*M. javanica*	J10
۱۱	مازندران - نشتارود	کیوی	*M. incognita*	I1
۱۲	مازندران - رویان	کیوی	*M. incognita*	I2
۱۳	مازندران - تیرتاش	توتون	*M. incognita*	I3
۱۴	گیلان - طالش	توتون	*M. incognita*	I4
۱۵	گیلان - صومعه سرا	توتون	*M. incognita*	I5
۱۶	گیلان - فومن	توتون	*M. incognita*	I6
۱۷	گیلان - بریران	آفتابگردان	*M. incognita*	I7
۱۸	قم	انار	*M. incognita*	I8
۱۹	ورامین - فیروزآباد	انجیر	*M. incognita*	I9
۲۰	ورامین - فیروزآباد	گوجه فرنگی	*M. incognita*	I10

وسیله اسپکتروفتومتر میزان DNA بر حسب نانوگرم اندازه‌گیری گردید. در صورت مناسب بودن مقدار DNA، نمونه جهت انجام آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تقویت نوارهای حاصل از محصولات PCR، پنج میکرولیتر از محصول هر واکنش به عنوان DNA قالب در نظر گرفته شد و مراحل فوق دوباره تکرار گردید. جهت انجام آزمون PCR از روش پاورز و هریس(۱۹۹۳) استفاد شد و از یک جفت آغازگر به نام‌های C2F3 (۲۳ نوکلئوتیدی) و1108 (۲۰ نوکلئوتیدی) که بر اساس ژن کد کننده سیتوکروم اکسیداز در نماتدهای مولدگره ریشه طراحی شده، از شرکت MBI در آلمان تهیه و استفاده گردید. توالی نوکلئوتیدی آغازگرها به‌صورت زیر می‌باشد.

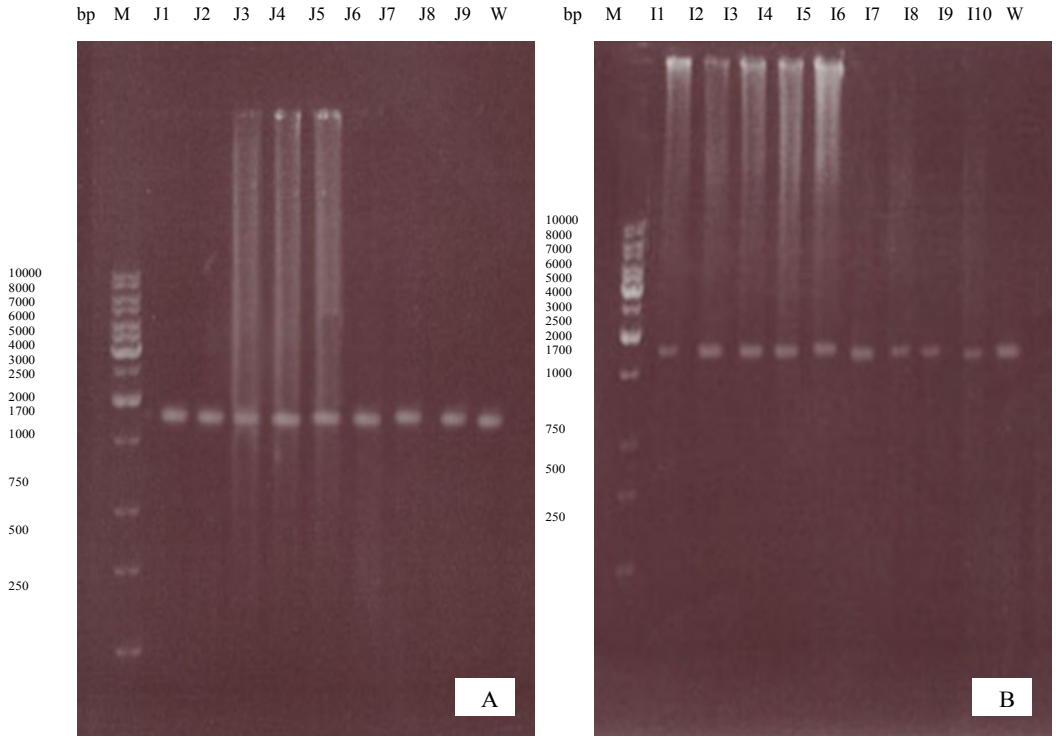
C2F3 5'- GGTC AATGTTCAGAAATTTGTG G-3'

1108 5'- TACCTTTGACCAATCACGCT-3'

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه Palm Cycler مدل Gpool ساخت شرکت Corbett Research کشور استرالیا انجام شد. حجم نهایی مخلوط برای هر واکنش در آب دیونیزه ۵۰ میکرولیتر درنظر گرفته شد. این مخلوط حاوی بافر PCR (۱۰x) ۵ میکرولیتر، کلرورمنیزیوم ۱/۵ میلی مولار، مخلوط بازهای آدنین، گوانین، سیتوزین وتیمین ۱/۶ میلی مولار، آغازگرها از هرکدام ۱/۶ میکرو مولار، قالب DNA ۱۰ تا ۱۵ نانوگرم و ۲ واحد DNA *Taq* Polymerase بود. در برنامه تکثیر DNA، واسرشت سازی (Denaturing) اولیه سیکل اول در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه انجام گرفت، سپس ۴۵ سیکل انجام شد. مرحله واسرشت سازی دو رشته در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، مرحله چسبیدن اغازگرها به DNA هدف (Annealing) در ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. الگوی قطعه DNA تکثیر شده (۱/۷ کیلوباز) توسط پرایمرهای اختصاصی C2F3 / 1108 (PCR) در جمعیت‌های دوگونه *M. javanica* (A) و *M. incognita* (B) در ژل آگارز

M – مارکر؛J1– کدو سنقرآباد (کرج)؛ J2– گوجه فرنگی کمال آباد (کرج)؛ J3– لوبیا جعفرآباد (کرج)؛ J4– گوجه فرنگی خواجه ربیع (مشهد)؛ J5– مرزه تبادکان (مشهد)؛ J6 – کلم بادرلو (ارومیه)؛ J7– خیار هشتگرد؛ J8– سیب زمینی همدان؛ J9– گوجه فرنگی شیراز؛ I1– کیوی نشتارود (مازندران)؛ I2– کیوی رویان (مازندران)؛ I3– توتون تیرتاش (مازندران)؛ I4– توتون طالش (گیلان)؛ I5– توتون صومعه سرا(گیلان)؛ I6– توتون فومن (گیلان)؛ I7– آفتابگردان بریران (گیلان) ؛ I8– انار قم ؛ I9– انجیر فیروزآباد (ورامین)؛ I10– گوجه فرنگی فیروزآباد (ورامین)؛ w – آب.

دقیقه، تکثیر DNA هدف (Extension) در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی DNA هدف (Additional extension) نیز در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد. در این آزمون برای مرحله چسبیدن آغازگرها به DNA هدف دما به صورت گرادیانت در نظر گرفته شد. سری دمایی از ۴۸ درجه تا ۵۸ درجه سانتی‌گراد بودکه درجه حرارت ۵۴ درجه سانتی‌گراد مناسب‌ترین دما در نظر گرفته شد.

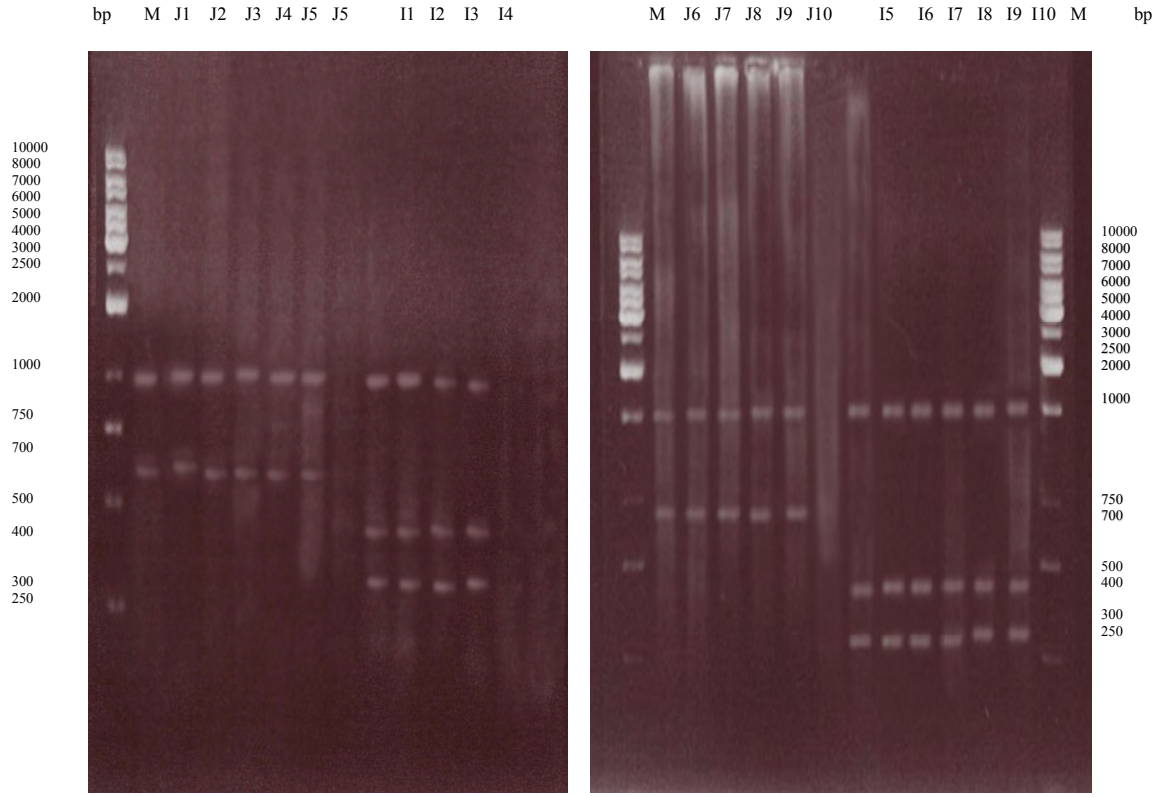
جهت انجام آزمون RFLP، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آنزیم‌های محدود کننده *Alu*I، *Dra*I و *Hin*fI واکنش داده شد. حجم نهایی مخلوط برای هر واکنش در آب دیونیزه ۳۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. این مخلوط حاوی DNA (محصول PCR)، آنزیم محدود کننده ۳۰ واحد و ۳ میکرولیتر بافرآنزیم محدود کننده بود. مخلوط واکنش در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب نگه داشته شد. نتایج حاصل به همراه یک مارکر نردبانی یک کیلو باز در ژل آگاروز ۱/۵ درصد و در الکتروفورز افقی DNA مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس از آن عکس‌برداری شد.

نتایج و بحث

جمعیت‌های مختلف هر دو گونه در واکنش زنجیره ای پلیمراز، یک نوار۱/۷ کیلو باز ایجاد نموده و دوگونه از یکدیگر قابل تفکیک نبود (شکل ۱)، بنابراین می‌بایست واکنشRFLP جهت تفکیک دو گونه انجام شود. نتایج نشان داد که دو آنزیم

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. الگوی هضم تولیدات تکثیری PCR با آنزیم محدود کننده *Hin*f1 در جمعیت‌های دو گونه *M. javanica* (دو نوار ۱/۰ و ۰/۷ کیلو باز) و *M. incognita* (سه نوار ۱/۰، ۰/۴ و ۰/۳ کیلو باز) در ژل آگاروز.

M – مارکر ؛ J1 – کدو سنقر آباد (کرج) ؛ J2 – گوجه فرنگی کمال آباد (کرج) ؛ J3– لوبیا جعفرآباد (کرج) ؛ J4 – گوجه فرنگی خواجه ربیع (مشهد) ؛ J5 – مرزه تبادکان (مشهد) ؛ I1– کیوی نشتارود(مازندران) ؛ I2 – کیوی رویان (مازندران) ؛ I3 – توتون تیرتاش (مازندران) ؛ I4 – توتون طالش (گیلان) ؛ J6– کلم بادرلو (ارومیه) ؛ J7– خیار هشتگرد؛ J8 – سیب زمینی همدان ؛ J9 – گوجه فرنگی شیراز ؛ J10 – پسته کرمان؛ I5– توتون صومعه سرا (گیلان) ؛ I6 – توتون فومن (گیلان) ؛ I7 – آفتابگردان بریران (گیلان) ؛ I8 – انار قم ؛ I9 – انجیر فیروزآباد (ورامین)؛ I10– گوجه فرنگی فیروزآباد (ورامین) .

محدودکننده *Alu*I و *Dra*I هیچ‌گونه تغییری در طول قطعه DNA تکثیر شده ایجاد نکرده و DNA تکثیری به صورت ۱/۷ کیلو باز باقی ماند ولی آنزیم محدود کننده *Hin*fI قطعه ۱/۷ کیلو باز را در جمعیت‌های مختلف دو گونه *M. javanica* و *M. incognita* برش داد. برش قطعه ۱/۷ کیلو باز با *Hin*fI نقوش مشخصی را برای جمعیت‌های دو گونه *M. javanica* و *M. incognita* تولید کرد (شکل ۲). تولیدات تکثیری جمعیت‌های *M. javanica* با استفاده از آنزیم محدود کننده *Hin*fI به دو قطعه ۱/۰ و ۰/۷ کیلو باز برش داده شد ویک مکان برش اضافی در *M. incognita* قطعه ۰/۷ کیلو باز را به دو قطعه ۰/۴ و ۰/۳ کیلو باز برش داد (شکل ۲). بنابراین آنزیم محدود کننده *Hin*fI جمعیت‌های دو گونه *M. javanica* و *M. incognita* را از یکدیگر متمایز کرده ولی بین جمعیت‌های مختلف هر گونه اختلافی دیده نشد. (شکل ۲). نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج به‌دست آمده توسط پاورز و هریس (Powers & Harrris, 1993) مطابقت دارد. پاورز و هریس نیز با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده *Dra*I و *Hin*fI توانستند پنج گونه از جنس *Meloidogyne* از جمله *M. javanica* و *M. incognita* را از یکدیگر متمایز کنند. در

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات پاورز و هریس نیز همه جمعیت‌های *M. javanica* و *M. incognita* در واکنش PCR قطعه ۱/۷ کیلو باز را ایجاد نموده و پس ازبرش با آنزیم محدود کننده در گونه *M. javanica* دو قطعه ۱/۰و ۰/۷ کیلو باز و در گونه *M. incognita* سه قطعه ۱/۰، ۰/۴ و ۰/۳ کیلو باز ایجاد شد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از خانم دکتر میناکوهی حبیبی و آقای مهندس کیوان غضنفری تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Blok, V.C., M.S. Phillips and M. Fargette. 1997. Comparison of sequences from the ribosomal DNA intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root knot nematodes. J. Nematol. 29(1): 16-22.
2. Blok, V.C., M.S. Phillips, J.W. McNicol and M. Fargette. 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by PAPDs. Fundam. and Appl. Nematol. 20(2): 127-133.
3. Cenis, J.L. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA. Phytopathology 83(1): 76-80.
4. Curran, J., M.A. McClure and J. Webster. 1986. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total DNA. J. Nematol. 18(1): 83-86
5. Eisenback, J. and H.H. Triantaphyllou. 1991. Root knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. PP.191-274. *In*: W.R. Nickle (Ed.), Manual Agricultural Nematology. Marcel Dekker Inc., New York.
6. Fargette, M., M.S. Philli, V.C. Blok, R. Waugh and D.L. Trudgill. 1996. An RFLP study of relationships between species, populations and resistance breaking lines of tropical species of *Meloidogyne*. Fundamental Appl. Nematol. 19(2): 193-200.
7. Fourie, H., C. Zijlstra and A.H. McDonald. 2001. Identification of root knot nematode species occuring in South Africa using the SCAR-PCR technique. J. Nematol. 3(7): 675-680.
8. Hiatt, E.E. L. Georgi, S. Huston, D.C. Harshman, S.A. Lewis and A.G. Abbott. 1995. Intra and inter population genome variation in *Meloidogyne arenaria*. J. Nematol. 27(2):143-152.
9. Jepson, S.B. 1987. Identification of root knot nematodes (*Meloidogyne* species). CAB. Int. Pub., New York.
10. Peloquin, J.J., D. Mck. Bird, I. Kaloshian and W.C. Mathews. 1993. Isolates of *Meloidogyne hapla* with distinct mitochondrial genomes. J. Nematol.25(2): 239-243.
11. Powers, T.O. and T.S. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. J. Nematol. 25(1): 1-6.
12. Xue, B., D.L. Baillie and J.M. Webster. 1993. Amplified fragment length polymorphisms of *Meloidogyne* spp. using oligonucleotide primers. Fundamental and Appl. Nematol. 16: 481-487.
13. Zijlstra, C., J.B. Uenk and C.H. Vabsilfhout. 1997. A reliable, precise method to differentiate species of root knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. Fundam. Appl. Nematol. 20(1): 59-63.
14. Zijlstra,C., D.T.H. M.Donkers-Venne and M. Fargette. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. J. Nematol. 2(8): 847-853.

www.SID.ir