پژوهش و سازندگی

شماره ۷۲، پاییز ۱۳۸۵

در زراعت و باغبانی

مطالعه تنوع ژنتیکی گونه‌های Bipolaris عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در استان گیلان،براساس روش PCR-RFLP

• **محمدرضا صفری مطلق**، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت

• **محمدجوان نیکخواه**، استادیاردانشکده کشاورزی دانشگاه تهران،کرج

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۴

Email:ssafarimotlagh@yahoo.com

چکیده

بیماری لکه قهوه‌ای، یکی از مهمترین بیماری‌های بذرزاد برنج است. دو گونه از قارچ به عنوان عامل بیماری شامل Bipolaris oryzae و Bipolaris victoriae قبلاً از استان گیلان، گزارش شده بودند. مطالعه ۳۴۲ جدایه به دست آمده از شالیزارهای استان گیلان، دو گونه دیگر شامل B. indica و B. bicolor را به عنوان عوامل ایجاد کننده بیماری به گونه‌های قبلی اضافه نمود. اساس شناسایی، صفات مورفولوژیک قارچ مانند رنگ کلنی، شکل، رنگ و ابعاد کنیدیوم و کنیدیوفور، فرآیند تشکیل کنیدیوم و نحوه جوانه‌زنی آنها بود.گونه B. victoriae از بیشترین فراوانی در استان گیلان برخوردار بود و بعد از آن به ترتیب گونه‌های B. bicolor، B. oryzae و B. indica قرار داشتند. آزمایش بیماریزایی جدایه‌های این چهار گونه، روی نشاهای برنج در محیط دسیکاتور انجام گرفت که نشان داد که این قارچ روی برنج، بیماریزا بوده و موجب بروز علائم مشخص بیماری لکه قهوه‌ای برنج می‌گردد. از این ۳۴۲ جدایه، ۱۸۰جدایه به وسیله PCR-RFLP، مورد مطالعه قرار گرفتند. برای انجام این کار از دو دسته آغازگر وسه آنزیم برشی استفاده گردید. ابتدا DNA کل جدایه‌های مزبور استخراج ودر یک برنامه حرارتی در دستگاه ترموسایکلر، تکثیر و سپس با آنزیم‌های برشی، برش داده شدند. بر اساس تجزیه کلاستر به روش UPGMA ۴ گروه انگشت‌نگاری DNA مشخص شدند که به ترتیب گونه‌های B. victoriae با ۸۵٪، B. oryzae با ۱۰٪، B. bicolor با ۳٪ و B. indica با ۲٪ فراوانی را در برگرفتند. سطوحی از پلی‌مورفیسم در بین DNA جدایه‌های مختلف قارچی مشاهده گردید که این پلی‌مورفیسم، هم در درون گونه‌ها و هم در بین گونه‌های قارچی وجود داشت. الگوی باندهای DNA نتوانست همبستگی مستقیم بین پلی‌مورفیسم و شرایط آب و هوایی یا مناطق جغرافیایی را نشان دهد. از این رو، به کارگیری روش PCR-RFLP برای تفکیک قارچها در سطح گونه‌ای، مفید بوده و نتایج درخشانی را برای ارزیابی‌های بعدی از جمله معرفی ارقام مقاوم فراهم می‌کند.

کلمات کلیدی: برنج، لکه قهوه‌ای، Bipolaris، تنوع ژنتیکی، PCR-RFLP

Pajouhesh & Sazandegi: No 70 pp: 25-35

Study of genetic variation of Bipolaris species, the causal agent of rice brown spot disease in Guilan province based on PCR-RFLP

By:M. R. Safari Motlagh, Associated Prof, of Plant Pathology, College of Agriculture, Azad Univ., Rasht. M. J. Nikkhah ,Associated Prof. of Plant Pathology., College of Agriculture. Tehran Univ., Karaj.

Archive of SID

Pajouhesh & Sazandegi

www.SID.ir

Brown spot is one of the most important seedborne diseases of rice . Two species of fungus including *B. oryzae* and *B. victoriae* were previously record as the causal agent of disease in Guilan province. The study on 342 isolates of its fungus collected from rice fields of Guilan, revealed that besides the above species two other species including *B. indica* and *B. bicolor*, were reported as causal agent of the disease. The basis of identification, was morphological characteristics such as color of the colonies, shape, color and size of conidia and conidiophores, the process of conidium formation and pattern of conidium germination. B. victoriae was the most abundant species in Guilan, and B. oryzae, *B. bicolor* and *B. indica* were the subsequent species, respectively. Pathogenicity test on these four species was applied on seedlings of rice in dessicator, which revealed the pathogenicity of the species and their ability to cause brown spot on rice. 180 isolates of 342 isolates were studied by PCR-RFLP . In order to do PCR-RFLP, two groups of primers and three restriction enzyme were applied .At first, the DNA of all isolates was isolated, and was amplified in thermocycler. Cluster analysis using UPGMA method gaved four DNA fingerprinting groups in relation to *B. victoriae*, *B. oryzae, B. bicolor* and *B. indica* with the abundance of 85%, 10%, 3% and 2%, respectively. Levels of polymorphism was observed between DNA of different isolates as this polymorphism was observed either between or within species. The pattern of DNA bands couldn't show the direct correlation between polymorphism and climates or geographical areas. Therefore, application PCR-RFLP is useful for identification of the fungi at the species level and can provide good results for further studies including introduction of resistant varieties.

Key words: Rice-Brown Spot-Bipolaris-Genetic Variation-PCR-RFLP

مقدمه

بیماری لکه قهوه‌ای، از مهمترین بیماری‌های قارچی برنج است که در کلیه مراحل رشد گیاه از خزانه تا مزرعه، محصول را مورد حمله قرار می دهد (۱۱). قارچهای عامل بیماری تمامی اندامهای هوایی گیاه از جمله برگ، خوشه، سنبل و سنبلچه را مورد حمله قرار می دهند، ریشه‌های جوان و ساقه‌ها نیز به ندرت ممکن است آلوده شوندکه مهمترین علائم ایجادشده، لکه‌های قهوه‌ای رنگ، گرد تا بیضوی، گاهی کشیده باهاله زردرنگ است(۲۸). آلودگی صددرصد، سوختگی نشاها و نیز پوک شدن دانه‌ها از علائم بارز بیماری است (۱۰). عامل این بیماری ابتدا توسط Bredade Haan و *Helminthosporium oryzae* نامیده شد (۱۸). امروزه گونه‌های گرامینه‌ای Helminthosporium به سه جنس به اسامی *Drechslera,* Bipolaris, Exserohilum براساس صفات مورفولوژیکی مثل ویژگی‌های ظاهری کلنی، کنیدیوم، کنیدیوفور ، چگونگی هیلوم و طریقه جوانه‌زنی کنیدیوم، تفکیک گردیده اند(۳۰). این فرمهای غیرجنسی با سه فرم جنسی از رده آسکومیست‌ها در ارتباط هستند که بترتیب عبارتند از: Pyrenophora, Cochliobolus , Setosphaeria (۲۲). از روش‌های پیشرفته مولکولی مبتنی برDNA برای شناسایی عوامل مختلف بیماریزای گیاهی استفاده گردیده است (۱۹). از جمله این روش‌ها، PCR[1] (واکنش زنجیره ای پلیمراز) و RFLP[2] (چند شکل طولی رشته‌های برش یافته) است (۱۲) . یکی از انواع واکنش PCR، RAPD- PCR[3] می باشدکه برای انجام آن نیازی به اطلاعات اولیه در مورد توالی نوکلئوتیدی قطعه DNA هدف نیست (۲۰) . از روش RAPD-PCR برای تشخیص قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری لکه چشمی گندم(۲۶)، *Microdochium nivale* وتعداد دیگری از قارچهای بیماریزای گیاهی استفاده شده است (۲۹). جدایه‌هایی از *B. sorokiniana* در گیاه گندم جهت تعیین میزان تغییر پذیری ژنتیکی درون گونه ای به وسیله روش RAPD مورد بررسی قرار گرفتند و براین اساس سطح بالایی از تغییرپذیری ژنتیکی میان جدایه‌ها وجود داشت (۲۷). تنوع ژنتیکی میان بعضی از پاتوژن‌های ایجاد کننده بیماری‌های هلمینتوسپوریومی ذرت، برنج وگندم به وسیله دو روش PCR و RFLP[4]– PCR مورد ارزیابی قرار گرفته و سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در درون گونه‌ها و نیز بین گونه‌های مختلف مشاهده گردید(۳۴). همچنین از روش دیگری به نام PCR– RFLP برای شناسایی قارچهای بیماری‌زا استفاده شده است که در این روش فرآورده‌های واکنش PCR توسط آنزیم‌های برشی، برش یافته وسپس قطعات حاصل روی ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار می گیرند (۳۲). از این روش برای شناسایی اختصاصی قارچ *Gaeumannomyces graminis* عامل بیماری پاخوره غلات و نیز تعیین اختلاف جدایه‌هایی از قارچ Ampelomyces هیپرپارازیت سفیدک‌های سطحی استفاده شده است (۳۳). در ایران بیماری لکه قهوه‌ای، اولین بار در سال ۱۳۳۵ از مزارع برنج سواحل دریای خزر گزارش گردید (۱). پس از آن مطالعاتی توسط محققین دیگر برای شناسایی مورفولوژیکی جنس‌ها و گونه‌های قارچ وتاثیر بیماری روی رشد گیاهچه برنج، و واکنش برخی از ارقام برنج نسبت به آن انجام شد (۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹). از آنجائی‌که اسپورهای قارچهای عامل این بیماری از تنوع شکل، رنگ و اندازه زیادی برخوردار بوده به طوریکه گاهی میزان تنوع خصوصیات مورفولوژیکی همچون ابعاد کنیدیوم وکنیدیوفور که اساس تقسیم‌های تاکسونومیکی بر پایه مورفولوژی این صفات استوار است، حتی در داخل یک گونه بسیار چشمگیر است و نیز با توجه به این نکته که بیماری لکه

Archive of SID
www.SID.ir

قهوه‌ای برنج در سال‌های اخیر به ویژه درمراحل نشاکاری و خوشه دهی، خسارت زیادی به محصول برنج در استان گیلان وارد نموده، انجام تحقیق مزبور ضروری گردید که اهداف آن شامل بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین چهارگونه از قارچ Bipolaris براساس روش PCR– RFLP بود که این بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و همچنین تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها را در برمی گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

نمونه‌برداری از خرانه‌ها و مزارع آلوده در سه مرحله نشاء، برگ و خوشه برنج انجام گرفت. برای نمونه‌برداری از روش Zia و همکاران (۳۵) استفاده گردید. بدین معنی که در هر مزرعه از منطقه برنجکاری ۵ نمونه برگ یا خوشه آلوده بطور تصادفی به ازای هر ۵۰ متر فاصله انتخاب گردیدند. هر شهرستان استان گیلان به عنوان یک منطقه محسوب شده و در هر منطقه با توجه به وسعت ۶ ـ ۲ مزرعه انتخاب شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از اندام‌های آلوده گیاهی، به طور جداگانه در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند و با چسباندن برچسب روی کیسه‌ها، محل و تاریخ جمع‌آوری آنها مشخص گردید. سپس به آزمایشگاه انتقال یافته و در یخچال در دمای ۴-۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس عملیات آزمایشگاهی در روز بعد با استفاده از این نمونه‌ها انجام شد.

جداسازی، خالص سازی و نگهداری جدایه‌های قارچی

جداسازی قطعات آلوده از برگ و خوشه انجام گرفت، بدین معنی که پس از جداسازی قطعات از حد فاصل بین بافت آلوده و سالم در برگ و نیز بذرهای آلوده در خوشه، ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ و شستشو با آب مقطر انجام شد و پس از آبگیری قطعات جدا شده روی محیط کشت، کشت داده شدند. برای این کار از محیط‌های کشت مختلفی شامل PDA[5] (سیب زمینی، دکستروز، آگار)، WA[6] (آب ـ آگار)، TWA Wheat straw[7] + (آب معمولی آگار+ کاه استریل گندم) به ترتیب برای جداسازی و رشد کلنی قارچ، خالص سازی و تک اسپور کردن و شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های قارچی استفاده گردید(۳۰). برای نگهداری جدایه‌های قارچی، پس از رشد کلنی قارچ روی محیط کشت PDA در تشتک‌های پتری، کاغذ صافی استریل روی این محیط قرار داده شد و پس از انتقال به انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتیگراد و گذشت۵- ۴ روز و رشد کلنی قارچ روی سطح کاغذ صافی، کاغذ صافی از محیط کشت جدا و به قطعات کوچکی تقسیم گردید و به شیشه‌های استریل و سپس به فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت.

شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های قارچی

برای شناسایی مورفولوژیکی، پس از کشت قطعاتی از کلنی قارچ روی محیط کشت TWA + Wheat strawو انتقال تشتک‌های پتری به انکوباتور با دمای۲۶درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲ تا ۳ هفته (بسته به نوع جدایه)، اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از اسیدلاکتیک۲۵٪ از اسپورهای تولید شده تهیه و با استفاده از میکروسکوپ Olympus CH-۲ مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور ویژگی‌هایی چون رنگ و شکل کلنی، نحوه رشد میسلیوم‌ها، رنگ و ابعاد کنیدیوفور، طول، عرض، تعداد دیواره عرضی و رنگ کنیدیوم و محل خروج لوله‌های تندشی در زمان جوانه زنی کنیدیوم مطالعه شدند.

آزمایش بیماریزایی

آزمایش بیماریزایی در محیط دسیکاتور انجام گرفت و از هر گونه پنج جدایه به عنوان نماینده بررسی شد . برای این منظور ابتدا مقداری از بذور برنج پس از استریل شدن در اتوکلاو در ماسه سترون در تشتک‌های پتری قرار داده شدند (در دودسیکاتور، یکی به عنوان شاهد و دیگری به عنوان تیمار)، پس از اضافه کردن آب مقطر سترون به هر یک از تشتک‌ها و قرار دادن دسیکاتورها با درب بسته در انکوباتور با دمای۲۶درجه سانتیگراد، پس از ۱۸- ۱۶ روز که نشاهای داخل دسیکاتور به مرحله دو برگی رسیدند مایه زنی با استفاده از سوسپانسیون اسپوری به میزان ۴×۱۰^{۴} اسپور در میلی لیتر آب مقطر به همراه توئین ـ ۲۰ به میزان ۰/۱٪ برای افزایش جذب سطحی انجام شد.

ارزیابی‌های مولکولی

تهیه میسلیوم

برای این منظور ابتدا میسلیوم قارچ تأمین گردید که این کار با استفاده از کشت کاغذ صافی حاوی کلنی قارچ روی محیط کشتPDA، انتقال دیسک‌هایی از کلنی رشد کرده قارچ به محیط کشت مایع (حاوی عصاره ۲۰۰گرم سیب زمینی، ۱۷ گرم سوکروز و آب مقطر) انجام گرفت. ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع به شیکر (با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه) انتقال یافته و پس از حدود یک هفته، میسلیوم‌های قارچ به دست آمدند، پس از آن حذف آب از این میسلیوم‌ها انجام شد. برای اینکار از ابزار و وسایلی همچون پمپ خلأ، ارلن با لوله جانبی، قیف بوخنر و کاغذ صافی استفاده گردید. بدین ترتیب که ابتدا قیف بوخنر برروی ارلن قرار داده شد، سپس سطح قیف بوخنر با الکل ۹۶ درجه ضدعفونی گردید و یک کاغذ صافی استریل برروی سطح این قیف قرار گرفت. لوله‌ای از پمپ خلأ به ارلن اتصال یافت، پس از روشن کردن پمپ، قطعات میسلیوم رشد کرده در محیط کشت مایع در ارلن، با استفاده از پنس استریل به سطح کاغذ صافی واقع در روی قیف بوخنر انتقال یافتند. پمپ خلأ به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه روشن بود و باعث حذف آب از میسلیوم‌ها و جمع شدن آن در ارلن خلأ گردید. همچنین برای حذف کامل آب از میسلیوم‌ها، عمل آبگیری مجدد با قرار دادن میسلیوم‌های بدست آمده در لابلای کاغذ صافی‌های استریل انجام گرفت.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش Rapid mini- preparation of fungal DNA استفاده گردید(۲۱). برای این منظور ابتدا حدود ۳۰۰ میلیگرم از میسلیوم‌های موجود با ترازوی حساس توزین گردید . سپس میسلیوم‌های وزن‌شده در داخل‌هاون‌های چینی قرار داده شده و با استفاده از ازت مایع و کوبیدن با دسته‌هاون، کاملاً به صورت پودر درآمدند و با استفاده از کاردک، این پودر به داخل تیوب‌های ۱/۵ ml انتقال داده شدند و بر روی درب هریک از این تیوب‌ها، شماره جدایه مورد نظر نوشته شد.

لازم به ذکر است که پس از قراردادن پودر میسلیوم در تیوب‌ها، این تیوب‌ها بلافاصله به فریزر با دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال

Archive of SID

www.SID.ir

یافتند تا از حالت طبیعی خارج نشده و آبدار نشوند.

سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده با استفاده از میکروپیپت‌های حساس به هرکدام از این تیوب‌ها اضافه گردید که برای تهیه این بافر از ۴۰۰ میلی‌مول Tris-Hcl با pH=۸، ۶۰ میلی‌مول EDTA با pH=۸، ۱۵۰ میلی‌مول NaCl و SDS استفاده گردید. سپس درب تیوب‌ها بسته شده، خوب تکان داده شدند تا میسلیوم‌ها در داخل بافر، غوطه‌ور گردند. آنگاه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از ۱۰ دقیقه ۱۵۰ میکرولیتر بافراستات پتاسیم ۵ مولار به هر تیوب اضافه شده، سپس عمل vortex کردن با دستگاه vortex انجام گردید. پس از آن سانتریفیوژ در دمای ۱۵درجه سانتی‌گراد، زمان ۱ دقیقه و سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. پس از این کار، مایع رویی با میکروپیپت‌های حساس جدا شد و در تیوب‌های ۱/۵ میلی متر جدیدی ریخته شد و دوباره عمل سانتریفیوژ به طریقی که در بالا ذکر شده بود، تکرار گردید. پس از سانتریفیوژ کردن، حدود ۵۰۰ میکرولیتر از مایع موجود در تیوب‌ها با میکروپیپت برداشته شده و به تیوب‌های جدیدی انتقال یافتند که این عمل برای حذف قطعات میسلیوم موجود در مایع انجام گرفت. پس از این عمل، هم حجم آن (حدود ۵۰۰ میکرولیتر) ایزوپروپیل الکل به هرکدام از تیوب‌ها به منظور حذف پروتئین، اضافه گردید. تیوب‌ها چندین بار برگردانده شدند و سپس برای ۲ دقیقه در سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند. در این حال، مایع رویی حذف گردید و قسمت جامد که برای انجام این کار لازم است، باقی ماند. ۳۰۰ میکرولیتر از اتانول ۷۰٪ به هر تیوب حاوی قسمت جامد برای رسوبدهی DNA اضافه شد و بدنبال آن سانتریفیوژ در سرعت ۱۰ هزار دور در دقیقه و مدت زمان ۱ دقیقه انجام گرفت. تیوب‌ها کاملاً وارونه شده و محتویاتشان بیرون ریخته شدند. تیوب‌ها بروی کاغذ خشک‌کن یا دستمال کاغذی قرار داده شدند تا مایع موجود در آنها به طور کامل حذف گردد (برای سرعت بخشیدن به کار می‌توان این تیوب‌ها را با درب‌های باز در داخل انکوباتور با دمای حدود ۳۰ ـ ۴۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۴۵ دقیقه، نگهداری نمود). آنگاه ۵۰ میکرولیتر بافر TE (1X Tris-EDTA) به هرکدام از تیوب‌ها اضافه گردید. برای حل‌شدن بهتر DNA در بافر TE، بهتر است که بافر TE ابتدا در بن‌ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت یک تا دو ساعت قرار داده شود سپس به هرکدام از تیوب‌ها اضافه گردد. پس از اضافه کردن بافر TE، تیوب‌ها تکان داده شدند تا قسمت جامد کاملاً در بافر، حل گردد. پس از حل شدن DNA، این تیوب‌ها به فریزر با دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. ضمناً در تمام مراحل انجام کار نام یا شماره جدایه‌های قارچی برروی درب تیوب‌ها نوشته شدند.

مشاهده DNA استخراج شده به کمک الکتروفورز

از ژل آگاروز ۱/۴٪ استفاده گردید (۱۴). برای این منظور ۲ میکرولیتر بافر Loading (شامل بروموفنل بلو۰/۲۵ درصد و سوکروزدر آب ۴۰ درصد) و ۱۰ میکرولیتر نمونه DNAبا هم مخلوط شدند و به داخل چاهک‌ها انتقال یافتند. سپس دستگاه روی ولتاژ ۱۲۰ و زمان ۶۰ـ۴۵ دقیقه تنظیم گردید. پس از انتقال نمونه‌ها، ژل از سینی ژل جدا و در دستگاه Geldocumentation مدل Bio-Rad با استفاده از اشعه ماورابنفش، عکس‌برداری از DNA انجام گرفت.

PCR-RFLP

ابتدا از روش RAPD-PCR و دودسته از آغازگرهای تصادفی استفاده گردید و سپس فرآورده‌های حاصل با سه آنزیم برشی، برش داده شدند. دسته اول آغازگرهای به کار رفته A۰۱، A۰۲، A۰۶، A۰۸، B۰۶، B۰۷ و OPC۱۳ و دسته دوم شامل آغازگرهای A، B، C، D، E، F، G، H، I، J بودند(۲۷). لازم به ذکر است که DNA ۱۸۰ جدایه قارچی در این روش مورد ارزیابی قرار گرفتند(جداول ۱ و ۲).

همه واکنش‌ها در یک حجم ۲۵ میکرولیتری شامل بافر ۱۰X (با غلظت نهایی ۱X،شامل ۵۰میلی مول کلرید پتاسیم و ۲۰ میلی مول تریس با pH=۸/۴) ۰/۱۲ میلی مول dNTPs، ۱۰ نانو گرم DNA ژنومی، ۵ میلی مول کلرید منیزیوم،۱/۲۵ میکرومول از هر آغازگر و ۱ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase انجام شدند (جدول۳). روش انجام کار بدین‌ترتیب بود که ابتدا کلیه مواد به استثنای DNAهای قارچی با استفاده از میکروپیپت در داخل تیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری PCR با هم مخلوط گردیدند و یکبار سانتریفیوژ شدند (در مدت زمان ۱ دقیقه و سرعت ۳۰۰۰ دور) سپس ۱ میکرولیتر از DNAهای جدایه‌های مختلف قارچی به هر یک از مخلوط‌های فوق (شامل ۲۴ µl ماده) اضافه شد و دوباره عمل سانتریفیوژ با همان شرایط ذکر شده در بالا انجام گرفت.سپس این تیوب‌ها به دستگاه ترموسایکلر انتقال یافتند که از نوع Biometra-Tgradient بود.شرایط سیکل حرارتی PCR به قرار زیر بود :یک سیکل ابتدایی (Predenaturing) شامل : ۱دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ سیکل دیگر شامل : ۱دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد دقیقه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۹۴ درجه دمای واسرشت شدن، ۳۵ درجه دمای اتصال و ۷۲ درجه دمای بسط).

در مرحله بعد، فرآورده‌های RAPD-PCR، به وسیله آنزیم‌های برشی، برش داده شدند. روش انجام کار به این ترتیب بود که فرآورده‌های PCR ۲۰ جدایه قارچی، از چهار گونه شناسایی شده، انتخاب گردیدند سپس با آنزیم‌های برشی، برش داده شدند. حجم کل واکنش ۲۵µl بود(۲۷). میزان فرآورده PCR، ۱۰ میکرولیتر، میزان بافرآنزیم(۱ml) ۱۰X ۲/۵ میکرولیتر و مقدار آنزیم برشی، ۰/۳ میکرولیتر بود. این مواد با یکدیگر مخلوط شده و همراه با آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانیده شدند. لازم به ذکر است که آنزیم‌های برشی به کار رفته آنزیم‌های Eco RI، Hind III و Bam HI با غلظت ۱۰u/µl بودند. واکنش برشی در بن‌ماری (یا انکوباتور) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳ ساعت انجام گرفت. پس از این مدت، مقایسه اندازه رشته‌ها با استفاده از ۱Kb DNA ladder (marker) روی ژل آگاروز ۲ درصد انجام گرفت. در روش الکتروفورز، ۱۵ میکرولیتر از فرآورده برش داده شده با ۳ میکرولیتر از loading buffer مخلوط شده و در چاهک‌های ژل ۲ درصد ریخته شد و به مدت ۲ ساعت در ولتاژ ۷۰، الکتروفورز گردید. پس از آن، عکس‌برداری از رشته‌های DNA با استفاده از دستگاه Geldocumentation و اشعه U.V انجام گرفت. آنالیز باندهای به دست آمده با به کارگیری نرم افزار Quantity one انجام شد و باندها براساس تعداد جفت باز طبقه‌بندی شدند. سپس براساس وجود باند (عدد ۱) و بر اساس عدم وجود باند (عدد صفر) داده شد و سپس این اطلاعات با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel ۲۰۰۰ جمع‌بندی شدند و آنگاه تجزیه و تحلیل ژنتیکی و تجزیه کلاستر با استفاده از نرم افزارهای

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱ـ دسته اول از آغازگرهای تصادفی به کار رفته در مطالعه جدایه‌های قارچ .Bipolaris spp

آغازگر	ردیف نوکلئوتیدی '۵ - '۳	غلظت (OD)
A۰۱	CCCAAGGTCC	۱۵ u/ml
A۰۲	GGTGCGGGAA	۱۳ u/ml
A۰۶	GAGTCTCAGG	۹ u/ml
A۰۸	ACGCACAACC	۱۴ u/ml
B۰۶	GTGACATGCC	۱۱ u/ml
B۰۷	AGATGCAGCC	۱۰/۵ u/ml
OPC۱۳	AAGCCTCGTC	۱۳ u/ml

جدول ۲ـ دسته دوم از آغازگرهای تصادفی به کار رفته در مطالعه جدایه‌های قارچ Bipolaris spp

کد	نوالی لوکلئوئیدی '۵ - '۳	غلظت
A	GGT-CTC-CTA-G	۱۰ u/ml
B	CGG-AGA-GCG-A	۱۴ u/ml
C	CCG-GCA-TAG-A	۱۲ u/ml
D	TGG-GCT-CGC-T	۱۴ u/ml
E	ACT-TGT-GCG-G	۱۸ u/ml
F	CCC-ACT-GAC-G	۱۴ u/ml
G	CTG-AGG-AGT-G	۱۶ u/ml
H	GGT-CAA-CCC-T	۱۸ u/ml
I	GCG-GGA-GAC-C	۱۲ u/ml
J	CCT-CAC-CTG-T	۱۴ u/ml

جدول ۳ـ خصوصیات موادمصرف‌شده برای هر واکنش RAPD-PCR

نوع ماده	میزان مصرف
dd water	۱۵/۶۵ µl
۱۰ X PCR buffer	۲/۵ µl
dNTPs	۱ µl
MgCl۲	۱ µl
BSA (بووین سرم آلبومین)	۰/۴ µl
Primer	۱/۲۵ µl
Taq DNA Polymerase	۰/۲ µl
DNA template (DNA قالب)	۱ µl
حجم نهایی ۲۵µl	

www.SID.ir

NTSYS-pc 2.02 و Popgene 1.31 و Arlequin 2.00 انجام شد.

نتیجه و بحث

شناسایی جدایه‌های قارچی بر اساس صفات مورفولوژیک

در مجموع از مزارع برنج نمونه برداری شده، ۶۰۰ جدایه به دست آمدکه ۳۴۲ جدایه متعلق به جنس Bipolaris Shoemaker بودند. در مورد جدایه‌های متعلق به جنس Bipolaris، براساس صفات مورفولوژیکی همچون شکل ظاهری کلنی، مورفولوژی کنیدیوم‌ها و کنیدیوفور، فرآیند تشکیل کنیدیوم و نحوه جوانه زدن کنیدیوم‌ها، ۴گروه مختلف تشخیص داده شدند که هرگروه معرف یک گونه خاص از جنس Bipolaris بود که عبارت بودند از ۱ـ گونه *B. oryzae* که حدود ۱۰٪ از جدایه‌های موجود را در بر گرفت. کنیدیوفورها به ابعاد ۷ـ۴×۵۸۰ـ۴۳۰ میکرومتر، کنیدیوم‌های آن خمیده، قایقی تا دوکی شکل، زرد کم رنگ تا قهوه‌ای تیره به ابعاد ۲۶ ـ ۱۰ ×۱۲۵ ـ ۴۶/۵میکرومتر بوده، دارای۱۲ ـ۵ دیواره عرضی و هیلوم کنیدیوم کوچک، تیره یا روشن، اغلب بر آمده و به طور جزئی پاپیل دار بودند (۱۶، ۲۸، ۳۰) (شکل ۱ ضمیمه).

۲ـ گونه *B. victoriae* که حدود ۸۵٪ از جدایه‌ها را شامل گردید. کنیدیوفورها به ابعاد ۹ـ۵×۳۴۰ـ ۵۰ میکرومتر، کنیدیوم‌های آن دوکی یا دوکی وارونه، قهوه‌ای روشن تا تیره، به ابعاد ۲۴ ـ ۹ × ۱۴۳ ـ ۳۲ میکرومتر دارای ۱۳ ـ ۴ دیواره عرضی بوده، هیلوم کوچک ولی دارای بر آمدگی یا پاپیل نبودند (۱۶،۲۵،۳۰) (شکل ۲ ضمیمه).

۳ ـ گونه *B. indica* که حدود ۲٪ از جدایه‌ها را در بر گرفت. کنیدیوفورها به ابعاد ۱۰ـ۷ × ۳۵۰ ـ ۲۶۰ میکرومتر، کنیدیوم‌های آن راست، به میزان کم چماقی تا بیضوی بوده، هیلوم در برخی کنیدیوم‌ها بر آمده ولی در تعدادی دیگر اینطور نبود . رنگ آن زیتونی کمرنگ تا تیره به ابعاد ۲۵ ـ ۱۲ × ۶۹ ـ ۳۵ میکرومتر، دارای ۸ ـ ۴ دیواره عرضی بودند(۳۰) (شکل ۳ ضمیمه). ۴ـ گونه *B. bicolor* که حدود ۳٪ از جدایه را در بر می گرفت. کنیدیوفور به ابعاد ۱۰ ـ ۵ × ۴۰۰ ـ ۳۰۰ میکرومتر، کنیدیوم‌های آن راست تا خمیده، استوانه ای و ترجیحاً در قسمت وسط وسیع‌تر و دارای ۸ ـ ۳ دیواره عرضی بوده، به ابعاد ۱۷ ـ ۹ × ۵۹۰ ـ ۳۱ میکرومتر، در بسیاری از حالات سلول‌های مرکزی کنیدیوم‌های بالغ اغلب قهوه‌ای تیره بوده، اما سلول‌های انتهایی شفاف یا خیلی رنگ پریده بودند. ابعاد هیلوم ۵ ـ ۳ میکرومتر بود(۳۰) (شکل ۴ ضمیمه). لازم به ذکر است که کنیدیوم‌های هر چهار گونه، از سلول‌های انتهایی جوانه می زدند.

آزمایش بیماریزایی

اولین علائم در مورد سه گونه *B. oryzae* ، *B .victoriae* و *B. indica* ۴ روز و در مورد گونه *B. bicolor* ۲ روز پس از مایه زنی به صورت نقاط سر سنجاقی ظاهر شده که بتدریج به صورت لکه‌های قهوه‌ای، کشیده، بیضوی تا گرد، گاهی باهاله زرد در آمدند. در راستای انجام اصول کخ، قارچ‌های مایه زنی شده، مجدداً از گیاهان آلوده جدا و با پاتوژن اولیه مطابقت داده شدند. همچنین هفت روز پس از مایه زنی با ۴ گونه ازقارچ مزبور، نتایج زیر حاصل گردید(جدول ۴). بدین ترتیب در زمینه مقایسه شدت بیماریزایی گونه‌های مایه زنی شده، تقسیم بندی زیر قابل ذکر است:

۱- *B. oryzae*

۲- *B. indica*

۳- *B. indica*

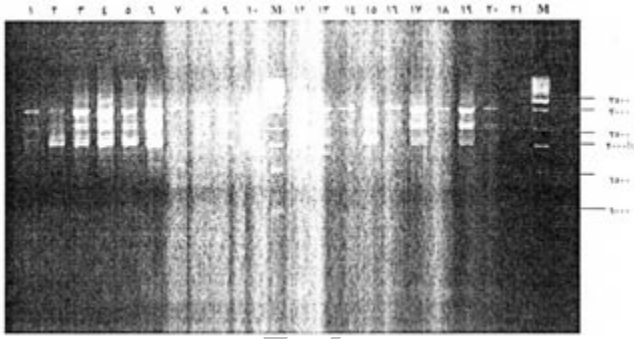
۴- *B. bicolor*

ارزیابی جدایه‌های چهار گونه از *Bipolaris* براساس روش PCR-RFLP

در این بررسی، تنوع ژنتیکی موجود بین جدایه‌های *B .oryzae*، *B. indica* و *B. victoriae* و *B. bicolor* با استفاده از دو دسته آغازگر تصادفی و ۳ آنزیم برشی به کمک روش PCR-RFLP موردارزیابی قرار گرفت. اساس کار بر مطالعه و آنالیز پلی مورفیسم DNA در جدایه‌های قارچی قرار داشت، از هفت آغازگر دسته اول، چهار آغازگر A۰۸، A۰۱۰ B۰۷و B۰۶ و از ده آغازگر دسته دوم، دو آغازگر A و J، DNA اکثر جدایه‌های قارچی را تکثیر نمودند. همچنین از سه آنزیم برشی به کار رفته، آنزیم Hind III، باندهای برش یافته بیشتری را تولید کرد.

بیشترین باند تولید شده در آغازگر A و کمترین آن در آغازگر B۰۶بوده است،در حالی که بیشترین باندهای پلی مورفیک در آغازگر J و کمترین آن در دو آغازگر B۰۶و A۰۸ مشاهده گردید(جدول۵). پس از انجام عملیات الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲٪، سطوحی از پلی‌مورفیسم بین DNA جدایه‌های قارچی به کار رفته مشاهده گردید (شکل ۱). همچنین، تجزیه کلاستر با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc ۲،۰۲، انجام گرفت (شکل ۲).

براساس تجزیه کلاستر، پنج گروه یا دسته، قابل تشخیص بودند. در گروه اول و دوم، جدایه‌های گونه *B. oryzae*، در گروه سوم، جدایه گونه *B. indica*، در گروه چهارم، جدایه‌های گونه *B. victoriae* و در نهایت در گروه پنجم، جدایه گونه *B. bicolor* جای داشتند. جدایه‌های گونه *B.*



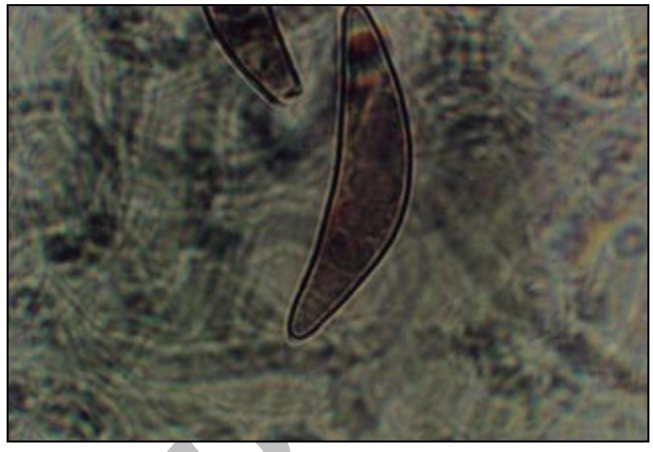
شکل ۱ ـ الگوی باندهای حاصل در اثر به کارگیری آنزیم برشی Hind III روی فرآوردههای PCR که با استفاده از آغازگر A تکثیر شده بودند.

باند ۱: Bi۲۱۳، باند ۲ : Bi۲۱۱، باند ۳: Bi۲۰۸، باند ۴: Bi ۱۶۷، باند ۵: Bi ۶۲، باند ۶: Bi ۱۵۸، باند ۷ : Bi ۱۳، باند ۸: Bi ۱۷، باند ۹: Bi ۴۹، باند ۱۰: Bi ۵۶، باند ۱۱ : ۱Kb DNA Ladder (marker)، باند ۱۲ : Bi ۲۲۰، باند ۱۳ : Bi ۲۱۹، باند ۱۴: Bi ۲۱۵،باند ۱۵ : Bi ۲۲۲، باند ۱۶: Bi ۲۱۲، باند ۱۷: Bi ۱۷۷، باند ۱۸ : Bi ۲۳۸، باند ۱۹: Bi ۱۵۹، باند ۲۰ : Bi ۲۸۰، باند ۲۱ : Bi ۲۵۷، باند ۲۲ : ۱Kb DNA Ladder (marker).

باندهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷،۸ و ۱۸متعلق به گونه *B. oryzae*، باندهای ۹ و ۱۰ به ترتیب متعلق به گونه‌های *B. indica* و *B. bicolor* و بقیه باندها متعلق به گونه *B. victoriae* هستند.

اعداد کنار ژل نشان دهنده تعداد جفت بازها در مارکر هستند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- کنیدیوم قارچ *Bipolaris oryae* با بزرگنمایی تقریبی ۴۶۰ برابر

شکل ۳- کنیدیوم قارچ *Bipolaris indica* با بزرگنمایی تقریبی ۴۶۰ برابر

شکل ۲- کنیدیوم و کنیدیوفر قارچ *Bipolaris victoriae* با بزرگنمایی تقریبی ۲۳۰ برابر

شکل ۴- کنیدیوم و کنیدیوفر قارچ *Bipolaris bicolor* با بزرگنمایی تقریبی ۲۳۰ برابر

oryzae خود به دو گروه تقسیم شده و در گروه‌های ۱ و۲ قرار داشتند. در این گروه بندی، ضریب تشابه جدایه‌های *B. oryzae*، ۷۹/۸٪، ضریب تشابه گونه *B. indica*، ۷۹/۵٪، ضریب تشابه جدایه‌های *B. victoriae*، ۸۵/۴ ٪ و ضریب تشابه گونه *B. bicolor*، ۷۵/۶٪ بود. علاوه بر آن جدایه‌های گونه *B. victoriae*، خود با ضریب تشابه ۸۵/۴٪ به دو گروه دیگر تقسیم گردید. همچنین، گروه اول جدایه‌های گونه *B. oryzae*، با ضریب تشابه ۷۹/۸٪، خود در دو گروه جای گرفتند و این در حالی بود که گروه دوم از جدایه‌های این گونه، با ضریب تشابه حدود ۹۰٪، در دو گروه، تقسیم‌بندی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری بیشتری با دو نرم افزار Popgene ۱/۳۲ و Arlequin ۲/۰۰، بر اساس داده‌های مربوط به جدایه‌هایی از دو گونه از قارچ یعنی *B. oryzae* و *B. victoriae* انجام گرفت. بدین‌ترتیب مشخص شد که درصد تنوع ژنتیکی درون جدایه‌های دو گونه از قارچ *Bipolaris*، یعنی *B. oryzae* و *B. victoriae*، ۳۵/۶۵٪ بوده که بیشتر از درصد تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های این دو گونه از قارچ به میزان ۳۴/۶۵ ٪ است، از این رو تجزیه واریانس مولکولی و FST یا شاخص تثبیت در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است (از آنجائیکه تعداد جدایه‌های یافت شده متعلق به دو گونه *B. indica* و *B. bicolor* محدود بوده امکان ارزیابی بیشتر آنها وجود نداشت).

بدین ترتیب مشخص شد که درصد تنوع ژنتیکی درون جدایه‌های دو گونه از قارچ Bipolaris به استثنای لوکوس ۳ (آغازگر A۰۸)، از درصد تنوع ژنتیکی بین آنها، بیشتر بوده است (جدول ۶).FST در سه لوکوس اول، در سطح احتمال ۱٪ و در لوکوس چهارم و پنجم در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود ولی، در لوکوس ۶، معنی‌دار نبوده است. بیشترین درصد تنوع بین جدایه‌ها در لوکوس ۳ (آغازگر A۰۸) و کمترین درصد تنوع بین جدایه‌ها در لوکوس ۶ (آغازگر J) دیده شده است. بیشترین درصد تنوع درون جدایه‌ها، در لوکوس ۶ (آغازگر J) و کمترین درصد تنوع درون جدایه‌ها در لوکوس ۳ (آغازگر A۰۸)، مشاهده گردید. علت این مسأله که درصد تنوع درون جدایه‌های دو گونه از قارچ مزبور در آغازگر A۰۸ کمتر از

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴ـ مقایسه کمّی برگ های آلوده و سالم گیاه برنج پس از مایه زنی با ۴ گونه از قارچ *Bipolaris*

گونه های قارچ				
	B. oryzae	*B .victoriae*	*B. indica*	*B. bicolor*
تعداد کل برگ	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
برگ های بیمار	۱۵	۱۳	۱۱	۱۰
برگ های مرده	۳	۲	۲	۱
برگ های سالم	۲	۵	۷	۹

جدول ۵ ـ ارتباط بین نوع آغازگر به کار رفته و مشخصات باندهای حاصل بر اساس PCR-RFLP

آغازگر	ردیف نوکلئوتیدی ۵´ - ۳´	تعداد باندهای تولید شده	تعداد باندهای پلی مورفیک	دامنه باندهای تولید شده(برحسب bp)
A۰۱	CCCAAGGTCC	۲۳	۲۲	۸۵۰_ ۳۵۰۰
A۰۸	ACGCACAACC	۱۵	۱۱	۸۰۰- ۳۰۰۰
B۰۶	GTGACATGCC	۱۲	۱۱	۱۳۰۰-۳۰۰۰
B۰۷	AGATGCAGCC	۲۷	۲۰	۱۲۰۰- ۳۱۰۰
A	GGTCTCCTAG	۳۳	۲۵	۶۰۰ - ۲۷۰۰
J	CCTCACCTGT	۳۰	۲۶	۱۰۰۰ - ۲۸۰۰

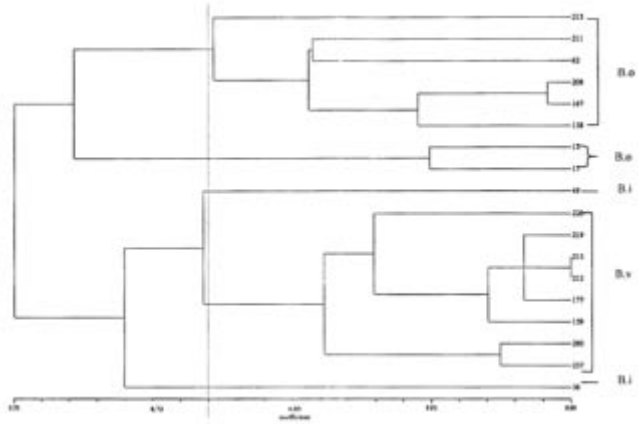
درصد تنوع بین آنها بود، کمتر بودن تعداد آللهای مؤثر این آغازگر بوده است که نتوانسته تنوع درون جدایه‌های هر یک از دو گونه از قارچ را به خوبی آغازگرهای دیگر، مشخص نماید. میانگین تنوع ژنی برای جدایه‌های گونه *B. oryzae*، ۴/۴۲۸۵۷۱ ± ۲/۴۴۱۴۸۹ و برای جدایه‌های گونه *B. victoriae*، ۵۶۵۴۴۷/۰ ± ۳۶۸۱۸۳/۰ برآورد گردید (۱۷) که درنتیجه این میانگین در گروه اول بیشتر بود و تفاوت معنی داری وجود داشت. تعداد لوکوس‌های پلی‌مورفیک در جدایه‌های گونه *B. oryzae* ۴۰ لوکوس و درصد لوکوس‌های پلی‌مورفیک ۴۶/۵۱ درصد برآورد گردید. همچنین برای جدایه‌های گونه دوم یعنی *B. victoriae*، تعداد لوکوس‌های پلی‌مورفیک ۲۲ و درصد پلی‌مورفیک ۲۵/۵۸ درصد تعیین شد.

بر پایه این اطلاعات مشخص گردید که بیشترین تعداد آلل مشاهده شده در آغازگر A بوده و بیشترین تعداد آلل موثر در آغازگر J قرار داشته است. کمترین آلل مشاهده شده در آغازگر B۰۶ و کمترین آلل موثر در آغازگر A۰۸ مشاهده گردید(شکل۳)، از این رو در این روش آغازگر J برای ارزیابی میزان پلی مورفیسم، در این قارچ مناسب تر است. مشخص گردید که بر اساس شاخص نی(۲۴)، جدایه‌های این دو گونه از Bipolaris ۸۰/۰۷٪ همانندی ژنتیکی و ۲۲/۲۳٪، فاصله ژنتیکی دارند.

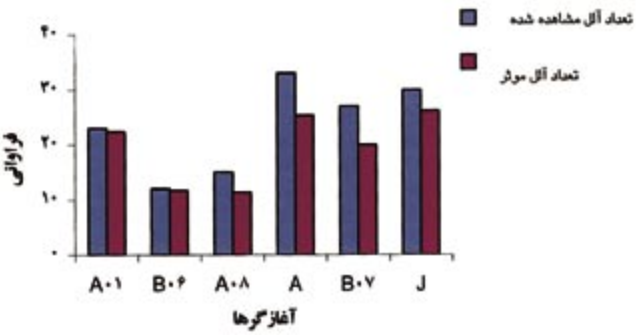
گونه‌های Helminthosporium روی گندمیان که امروزه تحت عنوان سه جنس Bipolaris، Drechslera وExserohilum نامیده می‌شوند (۳۰)، از تنوع چشمگیری برخوردار است، این امردقت و اعتبار اطلاعات ذخیره شده را کاهش داده و اهمیت توجه به مورفولوژی کنیدیوم و کنیدیوفور که اساس تاکسونومی مورفولوژیک بر آن استوار است را دو چندان می سازد، به ویژه با توجه به این نکات که مورفولوژی کنیدیوم و کنیدیوفور بسیار تحت تاثیر عوامل محیطی همچون، حرارت، رطوبت و pH محیط کشت قرار دارد، بطوریکه با افزایش میزان قند بیشتر از ۴٪ و ازت بیشتر از ۰/۲٪ طول، عرض و تعداد دیواره عرضی اغلب کنیدیها کاهش می‌یابد (۱۵، ۳۱). و نیز دامنه تنوع و تغییر صفات مورفولوژیکی حتی در داخل یک گونه بسیار زیاد بوده و این امر، کار محقق را در هنگام تفکیک به خصوص در سطح

Archive of SID
www.SID.ir

گونه‌ها دشـوار می سـازد، از این رو انجام تحقیقات مولکولـی که می تواند مکمّل روش‌های سـنتی تشخیص باشـد، ضروری به نظر می رسد. در مورد تنوع ژنتیکی گونه‌های Bipolaris تحقیقات زیادی در دنیا انجام نگرفته و در ایران نیز این اولین تحقیق درمورد تنوع قارچ مزبور است. در این تحقیق در مجموع چهار گروه انگشـت نگاری DNA که معرف چهار گونه از Bipolaris بودند مشـخص گردیدند. در میـان این چهار گروه، گونـه *B. victoriae* با دارا بـودن ۸۵٪ از کل جدایه‌ها بزرگترین گروه را تشـکیل داد و در تمامی مزارع برنج‌کاری گیلان و از ارقام غالب برنج همچون حسنی،هاشـمی، علی کاظمی، خزر، سـپید رود و حتی ارقام برنج هیبرید موسسـه تحقیقات برنج کشور و نیز خوشه، برگ و نشا برنج جداسازی گردید. دومین گروه، گونه *B. oryzae* با ۱۰٪ فراوانی بود که از نظر منطقه انتشـار، وسـعت کمتری داشته و همچنین بیشـتر از ارقام محلی همچون علی کاظمی وهاشمی جداسازی شدند و روی ارقام پر محصول مانند خزر و سپیدرود کمتر وجود داشته ولی از نظر منشـا تفاوت چشـمگیری با گروه قبل نداشته و از خوشه، برگ ونشا برنج جدا گردیدند. سـومین گروه، گونه *B. bicolor* با ۳٪ فراوانی قرار داشت که از نظر منطقه انتشـار، رقم نمونه و منشـا محدود بـه منطقه امیربکنده و برگ رقم‌هاشـمی بـود. *B. indica* چهارمین گروه را بـا حدود ۲٪ فراوانی تشـکیل داد که محدود به منطقه گلشـن و خوشه رقم محلی نامعلومی بود. با اسـتفاده از روش PCR-RFLP، امکان تفکیـک و تمایز این چهار گونه از قارچ فراهم گردید و این گونه‌ها در گروه‌های مجزایی قرار گرفتند و درستی و انطباق مطالعات مولکولی و روش‌های مورفولوژیکی فراهم گردید. همچنین سطوحی از تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های دو گونه غالب یعنی *B. victoriae* و *B. oryzae* و درون جدایه‌های هر یک از این دوگونه مشاهده گردید که درصد تنوع ژنتیکی درون جدایه‌ها بیشتر از در صد تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های این دوگونه بود. همچنین ارتباط معنی داری بین گونه قارچ و منطقه جغرافیایی یا شرایط آب و هوایی بدست نیامد، فقط برخی ازجدایه‌های قارچی که میزان بالایی ازتشـابه ژنتیکی را نشان می دادند از نظر منشا نمونه از جمله خوشه یکسان بودند (شکل ۲). در این مطالعه میزان تنوع ژنتیکی درون جدایه‌های



شکل ۲ ـ فنوگرام ایجاد شده براساس روش UPGMA برای ۲۰ جدایه از Bipolaris، عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج، به کمک تکنیک PCR-RFLP



شکل ۳ ـ مقایسه آللهای مشاهده شده و مؤثر در ۶ آغازگر به کار رفته در PCR-RFLP برای جدایه هایی ازدو گونه Bipolaris

جدول ۶ ـ ارزیابی نتایج پلی‌مورفیسم در لوکوسها در درون و بین جدایه های دو گونه از قارچ Bipolaris.

	درون جدایه های هر گونه			بین جدایه های دو گونه			
FST	درصد تنوع	Vb	درجه آزادی	درصد تنوع	Va	درجه آزادی	لوکوس
۰/۴۶۴۲۹**	۵۳/۵۷۱۴۳	۰/۲۶۷۸۶	۱۴	۴۶/۴۲۸۵۷	۰/۲۳۲۱۴	۱	آغازگر A۰۱= ۱
۰/۳۹۲۸۶**	۶۰/۷۱۴۲۹	۰/۳۰۳۵۷	۱۴	۳۹/۲۸۵۷۱	۰/۱۹۶۴۳	۱	آغازگر B۰۶= ۲
۰/۶۹۶۴۳**	۳۰/۳۵۷۱۴	۰/۱۵۱۷۹	۱۴	۶۹/۶۴۲۸۴	۰/۳۴۸۲۱	۱	آغازگر A۰۸= ۳
۰/۰۸۹۲۹*	۹۱/۰۷۱۴۳	۰/۴۵۵۳۶	۱۴	۸/۹۲۸۵۷	۰/۰۴۴۶۴	۱	آغازگر A= ۴
۰/۱۲۵۰۰*	۸۷/۵۰	۰/۴۳۷۵۰	۱۴	۱۲/۵۰	۰/۰۶۲۵۰	۱	آغازگر B۰۷= ۵
۰/۰۱۷۸۶ ns	۹۸/۲۱۴۲۹	۰/۴۹۱۰۷	۱۴	۱/۷۸۵۷۱	۰/۰۰۸۹۳	۱	آغازگر J= ۶

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۷ ـ شاخص‌های تنوع استاندارد و مولکولی برای جدایه های گونه *B. oryzae*

تنوع ژنی	تعداد مکان‌های پلی‌مورفیک	تعداد لوکوس به کار رفته	تعداد لوکوس	هاپلوتیپ‌ها در نمونه	تعداد هاپلوتیپ‌ها	تعداد کپی‌های ژنی
۱/۰۰۰۰ ± ۰/۰۶۲۵	۵	۶ لوکوس با کمتر از ۵ درصد اطلاعات گمشده	۶	۸	۸	۸

جدول۸ـ شاخص‌های تنوع استاندارد و مولکولی برای جدایه های گونه ***B. victoriae***

تنوع ژنی	تعداد مکانهای پلی‌مورفیک	تعداد لوکوس به کار رفته	تعداد لوکوس	هاپلوتیپ‌ها در نمونه	تعداد هاپلوتیپ‌ها	تعداد کپیهای ژنی
۱/۰۰۰۰ ± ۰/۰۶۲۵	۶	۶ لوکوس با کمتر از ۵ درصد اطلاعات گمشده	۶	۸	۸	۸

گونه *B. oryzae* در مقایسه با میزان تنوع درون جدایه‌های گونه *B. victoriae* بیشتر بود. مطالعات انجام شده (۳۴) نشان داد که گونه‌های Drechslera، Bipolaris وExserohilum از نظر ژنتیکی از یکدیگر متمایزند. در یک تحقیق دیگر سطوحی از تنوع ژنتیکی در درون جدایه‌هایی از گونه *B. sorokiniana* در گیاه گندم مشاهده گردید، به طوریکه تعداد رشته‌های پلی مورفیک حتی برای یک جدایه وقتی از رقم‌های متفاوت گندم به دست آمدند، متغیر بود. یکی از دلایل تنوع ژنتیکی کمتر در بین جدایه‌ها در مقایسه با تنوع درون آنها، احتمالاً می‌تواند ناشی از همپوشانی زیاد جدایه‌های قارچی باشد که در نتیجه پدیده جریان ژن[8] حاصل شده است. به نظر می‌رسد که در نتیجه کاشت مداوم محصول برنج و آلودگی آن توسط گونه‌های مختلف Bipolaris، برخی از جدایه‌های قارچی با یکدیگر اختلاط یافته و در نتیجه جمعیت‌هایی با مخلوطی از ژنوتیپ‌های متفاوت را به وجود آورده‌اند. بر طبق نظر بوردن و سیلک (۱۳) قارچ‌های بیماریزای گیاهی، اغلب در نتیجه موتاسیون و نوترکیبی به صورت منبع عمده‌ای از تنوع ژنتیکی عمل می‌نمایند. در داخل یک گونه جریان ژنی بین جدایه‌ها، تکمیل کننده این مراحل بوده که به صورت پروپاگول‌هایی از یک منطقه اپیدمی به منطقه دیگر گسترش یافته و از بخشی به بخش دیگر می‌روند. جریان ژن همراه با نیروهای تکاملی دیگر، می‌توانند منجر به گسترش ژن‌های منفرد، ژنوتیپ‌ها و حتی استقرار جمعیت‌های مختلف در مناطق متفاوت گردند(۲۳). بر پایه تنوع ژنتیکی بالایی که درون گونه‌ها وجود داشته، پیشنهاد می‌گردد که جریان ژنی قابل توجهی بین جدایه‌های درون‌گونه‌ای وجود دارد. اما جدایه‌های بیشتر و از مناطق جغرافیایی متفاوت به همراه تعداد بیشتری از آغازگرها، بایستی آزمایش گردند تا این فرضیه، تأیید گردد.در هر صورت نتایج این تحقیق، نشان‌دهنده اهمیت روش‌های مولکولی در شناسایی دقیق قارچ‌های بیماریزا و طبقه‌بندی آنها است، به ویژه با توجه به این نکته که از این یافته می‌توانیم در تولید ارقام مقاوم به قارچ استفاده نماییم.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری مسؤولین محترم موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، همچنین آقایان دکتر سید اکبر خداپرست استاد یار محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و مهندس عبادی عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات برنج، تشکر می نماییم.

پاورقی‌ها

1 - Polymerase Chain Reaction
2 - Restriction Fragment Length Polymorphism
3 - Random Amplified Polymorphic DNA
4 -PCR based RFLP
5 –Potato Dextrose Agar
6 – Water Agar
7 – Tap Water Agar+ Wheat straw
8 - Gene flow

منابع مورد استفاده

۱ـ بهداد، ا. ۱۳۶۲؛ بیماری‌های گیاهان زراعی ایران. چاپخانه نشاط اصفهان. ۴۴۲ صفحه.

۲ـ پاداشت، ف. فردوس، ب. و دریغ گفتار، ف. ۱۳۷۷؛ بررسی رابطه بیماری لکه قهوه‌ای برنج با عناصر موجود در گیاه و خاک. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. ۵ ـ ۱ شهریور. صفحه ۸۴.

۳ـ پاداشت، ف. و ایزدیار، م. ۱۳۷۷؛ بررسی بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گیلان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، کرج. ۵ ـ ۱ شهریور. صفحه ۸۳.

Archive of SID
www.SID.ir

۴ـ ترابی، م. ۱۳۶۳؛ مقایسه چند روش آزمایشگاهی به منظور جداسازی قارچ *Drechslera oryzae* از بذور آلوده برنج. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۲۰. شماره (۴ ـ ۱): ۷ ـ ۱.

۵ـ خسروی، و ۱۳۷۸؛ بررسی مهمترین بیماری‌های قارچی بذرزاد برنج در ارقام غالب منطقه مازندران. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۰۲ صفحه.

۶ـ ذاکری، ز. ۱۳۶۶؛ بررسی علل غیر طبیعی بودن و تغییر شکل (آنومالی) گیاهچه‌های برنج در اثر قارچ‌های بذرزاد. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۲۳. شماره (۴ ـ ۱): ۲۷ ـ ۱۹.

۷ـ رضوی، س. ا. ۱۳۷۲؛ مطالعه پراکندگی، خواص فنوتیپی، تاکسونومی و بیماریزایی جداشده‌های مختلف شبه جنس Helminthosporium و شبه جنسهای وابسته به آن از گیاه برنج در استانهای فارس، کهگیلویه و بویراحمد. پایان نامه فوق لیسانس در رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز. ۱۳۰ صفحه.

۸ـ صفری مطلق، م. ر. ۱۳۷۹؛ اتیولوژی بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گیلان. پایان نامه فوق لیسانس در رشته بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۹۴ صفحه.

۹ـ فروتن، و. و بامدادیان،ط. ۱۳۷۲؛ خلاصه مقالات اولین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه تهران دانشکده کشاورزی. ۲۳۶صفحه.

10-Aluko, M. O. 1975; Crop lossed caused by brown leaf spot disease of rice in Nigeria. Plant Disease Report, 59: 609-613.

11-Bhattacharry,D. and Mukhopudhyay, N.K. 1986; Surface adherence and penetraability of mycobacillin as affected by adjuvants.Indian Phytopathology.39(3): 390-394.

12-Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. 1980; Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.

13-Burdon, J. J. and Silk, J. 1997; Source and patterns of diversity in plant pathogenic fungi. Phytopathology, 87: 664-669.

14-Davis, L., Kuehle, M., and Battey, J. 1994; Basic methods in molecular biology. 2nd ed. 777 pp.

15 -Elliot, E. S. 1949; The effect of the sugar concentration on conidial size of some species of Helminthosporium. Phytopathology, 39: 935-958.

16-Ellis, M. B. 1971; Dematiaceous Hyphomycetes. CMI,Kew, England, 608 pp.

17-Excoffeir, L. and Slatking, M. 1995; Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. Mol. Biol. Evol. 12: 921-927.

18-Gangopadhyay, S., and Padmanabhan, S. Y. 1987; Breeding for disease resistance in rice. Oxford & IHB Publishing Co. Calcatta. 340 pp.

19-Henson, J. M., and French, R. 1993; The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Ann. Rev. Phytopathol. 31: 81-109.

20-Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. 1989; PCR protocols: a Guide to Methods and Applications, Academic Press. San Diego. 482 pp.

21-Liu, D., Coloe, S., Baird, R., and Pedersen, J. 2000; Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. Journal of Clinical Microbiology, Vol.35 :471.

22-Luttrell, E. S. 1977; Correlation between conidial and ascigerous state characters in Pyrenophora , Cochliobolus and Setosphaeria. Rev. Mycol. 41: 271-79.

23-McDermott, J. M. and McDonald, B. A. 1993; Gene flow in plant pathosystems. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 353-373.

24 -Nei, M. 1978; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89:583-590.

25 -Nelson , R.R. and Kline, D.M. 1961; The pathogenicity of certain species of Helminthosporium to species of the graminea. Plant Disease Reporter, 45: 644-648.

26-Nicholson, P., and Parry, D. W. 1996; Development and use of a PCR assay to detect Rhizoctonia cerealis, the cause of sharp eye spot in wheat. Plant Pathology, 45: 872 883.

27-Oliveira, A. M. R., Matsumura, A. T. S., Prestes, A. M., and Van Der Sane, S. T. 2002; Intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates determined by random-amplified polymorphic DNA (RAPD). Genetics and Molecular Research, 1(4): 350-358.

28-Ou, S. H. 1985; Rice diseases. Commonwealth Mycological Institute. 2nd ed. 380 pp.

29-Parry, D. W., and Nicholson, P. 1996; Development of a PCR assay to detect Fusarium poae in wheat. Plant Pathology, 45: 383-391.

30-Sivanesan, A. 1987; Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their telemorphs. CAB International Mycological Institute. 261 pp.

31-Trainor, M. J., and Marthinson, C. A. 1978; Nutrition during spore production and the inoculum potential of Helminthosporium maydis race T. Phytopathology, 68: 1049-1053.

32-Ward, E. 1995; Improved polymerase chain reaction (PCR) detection of *Gaeumannomyces graminis* including a safeguard against false negatives. European Journal of Plant Pathology, 101: 561-566.

33-Ward, E., and Akrofi, A. Y. 1994; Identification of fungi in the Gaeumannomyces - Phialophora complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. Mycol. Res. 98: 219-224.

34-Weikert-Oliveira, R.C.B., Resende, M. A., Valerio, H. M., Caligiorne, R.B., and Pavia, E. 2002; Genetic variation among pathogens causing Helminthosporium diseases of rice, maize and wheat. Fitopathologia Brasileira, 27(6): 238-246.

35-Xia, J. Q., Correl, J. C., Lee, F. N., Marchetti, M. A., and Rhoads, D. D. 1993; DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in the Magnaporthe grisea (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas. Phytopathology, 83: 1029-1035.

Archive of SID

www.SID.ir