Archive of SID

مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
شمارهٔ ۶۳ (پاییز۱۳۸۳)، صفحات ۷۰- ۶۵

استفاده از روشRAPD جهت بررسی پلی مورفیسم DNA در سویه‌های جدا شده قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم*

بهرنگ علنی: مربی پژوهشی علوم سلولی وملکولی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
behrangha@yahoo.com
دکترمصطفی مطلبی: دانشیار گروه بیولوژی ملکولی دانشگاه رازی کرمانشاه
دکترمحمد 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 سویه های‌جدا شده قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* از طریق دسته بندی سویه‌ها با استفاده از نشانگر ملکولیRAPD 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 استانداردDNA بر روی ژل آگارز۲٪ الکتروفورز شدند. برای تجزیه و تحلیل آماری محصولات RAPD از روش UPGMA با برنامهٔ SPSS استفاده شد و سویه‌ها بر روی دندروگرام دسته بندی شدند.

یافته ها: بر اساس نتایج ترکیبی حاصل از ۱۲ آغازگر سویه ها 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 سویه های این منطقه با سایر نقاط بوده است.

کلید واژه ها: RAPD ، *فوزاریوم اگزیسپوروم* ، پلی مورفیسم DNA

مقدمه

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 عفونت ها 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 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(٤). با توجه به این که اطلاعات ژنتیکی بسیار اندکی از ساختار و توالی ژنومی ارگانیسم مورد نظر موجود است، مطالعات گسترده‌ای در مورد شناسایی سویه‌های مختلف این قارچ انجام می‌گیرد که بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

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

نشانگر های 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 کرده اند. این نشانگرها خود به دو گروه عمده شامل نشانگرهای وابسته به PCR و مستقل از آن تقسیم بندی می‌شوند. از این میان، نشانگرهای RAPD، AFLP، ALP و غیره جزو نشانگرهای وابسته به PCR کاربرد بیشتری دارند (٦).

روش RAPD[1] روش مبتنی بر PCR است که بر پایه تکثیر تصادفی توالی‌های ژنومی استوار است و به وسیلهٔ 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 می‌کند. 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 طورتصادفی روی دوقطعه از DNA قرار بگیرند، فرآورده های 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، تهیهٔ نقشهٔ های 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 سویه های 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 ۱۹۹٦ بر روی *فوزاریوم آوناسوم* مشخص شد که دسته بندی بر اساس الگوی RAPD و ایزوآنزیمی در نژادهای مختلف قارچ *فوزاریوم* می تواند به‌عنوان ابزاری مطمئن جهت شناسایی سایر قارچ‌ها هم در سطح نژاد و هم در سطح گونه به‌کار 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 روش ها

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 F۵۸، F۲ و F۵۹) آذربایجان غربی (F۲۱، F۱۸ و F۱۵) لرستان (F۲۳ ، F۴۵ و F۴۷) ایلام (F۲۴ ، F۲۵ و F۲۶) کرمانشاه (F۳۱ و F۳۰) و کرمان (F۵۳) جمع آوری شده بودند. سویه‌ها بعد از ۸ روز کشت در درون لوله‌های ۳۰ میلی لیتری درپوش دار بر روی محیط جامد PDA[2]، برای مدتی کوتاه در ٤°C نگهداری شدند. برای انجام مطالعات ملکولی، سویه‌ها به ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت مایع CSDA [3] [٤ 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 ارلن ها از انکوباتور خارج و با استفاده از کاغذ صافی(Watman No.۱) محیط کشت ها صاف شدند و از میسیلیوم‌های سویه‌ها جهت استخراج DNA به منظور بررسی الگوی پلی‌مورفیسم با استفاده از نشانگر RAPD استفاده شد(۱۰).

استخراج DNA : برای استخراج DNA از روش تغییر یافته دلاپورتا استفاده شد(۱۱). مقدار ۰/۲۵گرم از میسیلیوم سویه با افزودن مقداری مساوی پودر شیشه و۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراجی DNA (۲۰۰ میلی مولار Tris-HCl [pH ۸]،۲۰ میلی مولار $EDTANa_2$، ۲۵۰ میلی مولار NaCl، ۵٪ SDS) داخل لوله های اپندورف سابیده شد تا کاملاً همگن شود. نمونه ها در دمای ۷۰-٦۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه قرارداده شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار سرد(٤ درجه سانتی گراد) به نمونه اضافه شد و لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه دردمای صفر درجه قرارداده شدند. ٤۰۰ میکرولیتر از کلروفرم سرد (۲۰- درجه سانتیگراد) به نمونه اضافه شد و به مدت ۷ دقیقه در ۱۲۰۰۰×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 ۱۲۰۰۰× g سانتریفوژ 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 ٤ درجه یا TE بافرحل شد و برای استفاده‌های بعدی در دمای ۲۰ °C- نگهداری گردید. کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از دو روش اندازه گیری میزان جذب ۲٦۰/۲۸۰ 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 اُبراین از اندازه‌گیری جذب نوری در ۲٦۰ نانومتر استفاده شد (۱۳).

RAPD-PCR : به منظور بهینه سازی شرایط RAPD، غلظت واکنش‌گرها[4] 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 x PCR، ۳۷/۵ میکرولیتر از آب مقطر دوبار تقطیر استریل و پنج واحد بر میکرولیتر آنزیم پلیمراز Taq DNAدر داخل لوله های 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 سایتیفیک انگلستان) تنظیم گردید. در این برنامه یک دور جهت تک رشته ای شدن کلیDNA اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹٤ درجه، ۳٤ دور شامل مراحل مربوط به اتصال پرایمر به مدت ۹۰ ثانیه که دمای اتصال برای هر آغازگر در *جدول ۱* مشخص

www.SID.ir

1. Random Amplified Polymorphism DNA
2. Potato Dextrose Agar
3. Chick-pea Seed Meal Dextrose Agar
4. PCR Reaction mixture

Archive of SID

شده است، سنتز DNA به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه، تک رشته‌ای شدنDNA های ساخته شده به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۹٤ و یک دور جهت تکمیل اتصال پرایمر وتکمیل ساختDNA به مدت ٦ 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 کلیهٔ 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 تجزیهٔ خوشه ای[1] با برنامهٔ SPSS به روشUPGMA و بر اساس الگوی چند شکلی DNA ی محصولات RAPD به طور جداگانه برای هر آغازگر و نیز حالت ترکیبی آنها انجام گرفت و دوری و نزدیکی سویه ها بررسی شد.

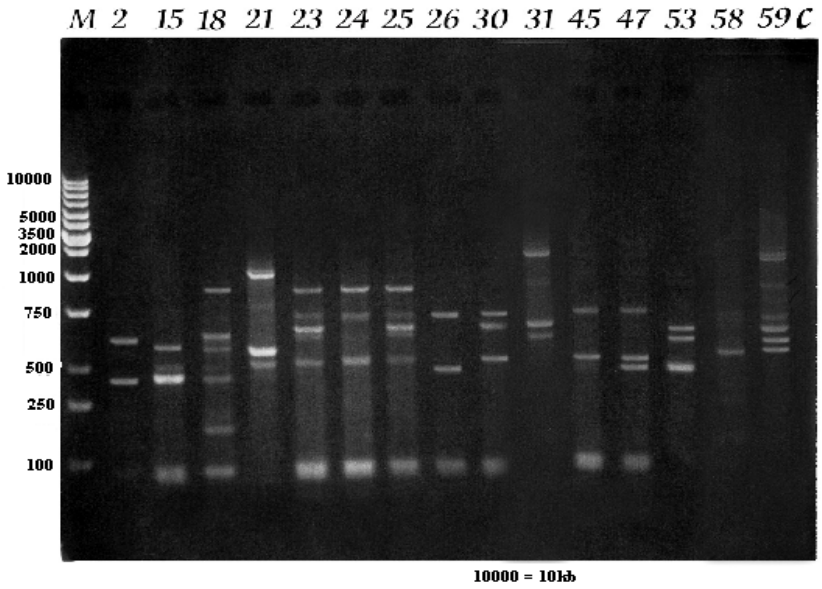
یافته ها

به منظور بررسی الگوی پلی مورفیسم DNA بین ۱۵ سویه جدا شده قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم*، سویه‌های ایزوله قارچ در محیط کشت مایع CSDA به مدت ۷ روز کشت شدند. سپس محیط‌های کشت صاف شد و از میسلیوم‌ها 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 پروتئیناز K درجریان استخراج DNA نیست.

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 (*تصویر۱*).

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 اگزیسپوروم* جمعاً ۱٤۱ نوار به دست آمد. با استفاده از جدول ماتریس صفر و یک، تجزیهٔ خوشه‌ای با برنامهٔ SPSS به روشهای مختلف تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوی چند شکلی DNA ی 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 سویه ها بررسی شد.



تصویر۱: الگوی چند شکلی DNA حاصل ازRAPD 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 ۲تا ۵۹ مشخص کننده الگوی پلی مورفیسم DNA سویه‌های جدا شده قارچ و ستون ۱۷ (C) مربوط به کنترل منفیPCR

1. Cluster analysis

www.SID.ir

Archive of SID

در بررسی گروه‌بندی‌های به‌دست آمده از نتایج هر یک از آغازگرها بر اساس تأیید جدول تابع تشخیص و گروه‌بندی مقایسه ای مزدوج (*جدول ۳*) در روش وارد[1] سویه‌ها بر روی دندروگرام‌های حاصله در گروههای مختلف قرار گرفتند. مقایسه گروه‌بندی به‌دست آمده بر روی دندروگرام حاصل از هر پرایمر با دسته بندی سویه‌ها براساس منطقه جغرافیایی نشان داد که تنها پرایمر ۸۱ توانسته است سویه‌های استان‌های لرستان شامل F۴۷، F۴۵ و F۲۳ ایلام شامل F۲۴ ، F۲۵ و F۲۶ همراه با یکی از سویه‌های استان کرمانشاه به‌نام F۳۰ که از نظر جغرافیایی به هم نزدیک هستند، در یک گروه قرار گرفتند و سویه‌های 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 ودر بررسی نتایج حاصل از پلی مورفیسم DNA از ترکیب داده های حاصل از دوازده آغازگر (*جدول۱*) دندروگرام به دست آمده سویه‌ها را در سه گروه دسته بندی کرد : گروه اول شامل ٤ عضو F۲، F۱۸، F۵۳ و F۵۸ گروه دوم شامل ۱۰ عضو F۱۵، F۲۳، F۲۴، F۲۵، F۲۶، F۳۰، F۳۱، F۴۵، F۴۷ و F۵۹ بوده ودر گروه سوم سویه F۲۱ قرار گرفت(دندروگرام ۱) . آنالیز تابع تشخیص و گروه‌بندی مقایسه ای مزدوج نیز با احتمال ۱۰۰ درصد اختلاف واقعی 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(*جدول۲*).

مقایسه گروه‌بندی به‌دست آمده از دندروگرام حاصل از الگوی پلی مورفیسم DNA با روش RAPD دوازده آغازگر با دسته بندی سویه ها براساس منطقه جغرافیایی نشان می‌دهد که ۱۰۰٪ سویه‌های استان‌های غرب کشور در گروه دوم دندروگرام حاصل از الگوی DNA تکثیر شده به وسیله روش RAPD با دوازده آغازگر دسته بندی شدند بنابراین سویه‌های منطقه غرب کشور الگوی پلی مورفیسم مشابهی دارند و به‌دلیل نزدیکی ساختار ژنتیکی شان تقریباً در یک گروه مجزا قرار گرفته‌اند، در حالی‌که سویه‌های استانهای دیگر دارای الگوی پلی مورفیسم متفاوتی هستند و در هر سه گروه پراکنده شده‌اند.

طبق جدول ۲ مقدار P بین گروهها کمتر از ۰/۰۵ است و گروههای به‌دست آمده ارتباط معنی داری با یکدیگر ندارند و بین گروهها اختلاف واقعی ۱۰۰٪ وجود دارد.

جدول۱: 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′-GGAGGGTGTT-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

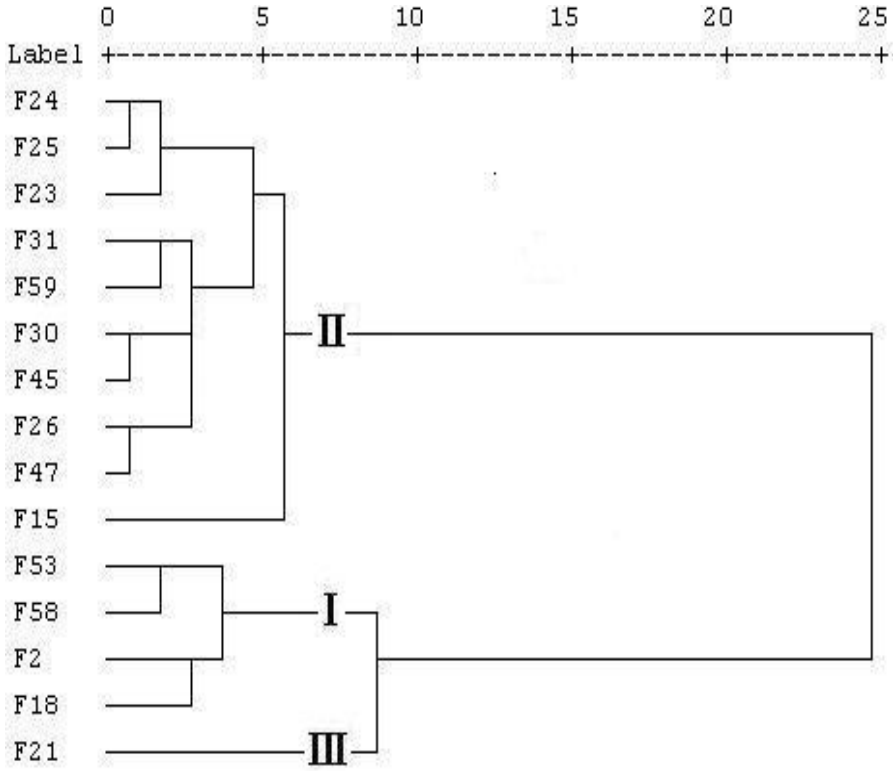
جدول۲: جدول تابع تشخیص و گروه‌بندی مقایسه ای مزدوج (روش وارد) برای گروههای سه گانهٔ حاصل از الگوی چند شکلی DNA با استفاده از ترکیب داده‌های حاصل از دوازده آغازگر.

	دسته		اعضاء گروههای به دست آمده			کل
			۱	۲	۳	
	گروه	۱	٤	۰	۰	٤
		۲	۰	۱۰	۰	۱۰
		۳	۰	۰	۱	۱
دسته	درصد اختلاف گروهها	۱	۱۰۰	۰	۰	۱۰۰
		۲	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰
		۳	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰
	P	۱	-	۰	۰/۰۰۳	
		۲	۰	–	۰	
		۳	۰/۰۰۳	۰	–	

1. Ward

www.SID.ir

Archive of SID



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 گروه ۲ قرار گرفته اند.در حالی‌که سویه‌های استانهای شمال غرب کشور در هر سه گروه پراکنده شده اند.

بحث

در هنگام بررسی یک گونه از قارچ با سویه‌های مختلفی از آن مواجه می شویم که با هم اختلاف جزیی دارند. این اختلاف‌ها در برخی خصوصیات فنوتیپی نظیر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، شدت بیماریزایی، انواع توکسین‌های تولید شده و فعالیت آنها و دیگر ویژگی هاست. 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، به‌طوری‌که این اختلاف‌ها مستقیماً و با بررسی DNA آنها با روشهای مناسب قابل پیگیری است(۱۴).

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 اگزیسپوروم* اطلاعاتی در دست نیست، این روش برای بررسی پلی مورفیسم DNA می تواند سودمند باشد (۱۵).

www.SID.ir

Archive of SID

در این تحقیق با به‌کارگیری ۱۲ نشانگر RAPD تنوع ژنتیکی بین ۱۵ سویه قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* 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 به‌دست نیامد و مشخص شد که گروههای به‌دست آمده کاملاً مستقل از هم هستند و بین گروهها اختلاف واقعی ۱۰۰٪ وجود دارد. این موضوع صحت نتایج حاصل را نشان داد ($p< ۰/۰۵$).

در مطالعه حاضر دسته بندی به‌دست 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 مورفیسم 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 حالی‌که سویه‌های استانهای شمال غرب کشور دارای الگوی پلی مورفیسم متفاوتی بودند و در گروههای مختلف قرار گرفتند. آسیگبتس و همکاران در (۱۶) مطالعاتی بر روی الگوی پلی مورفیسم سه نژاد مربوط به ٤٦ جدایه قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* با روش RAPD انجام دادند، آنها را به سه گروه جداگانه دسته بندی کردند. آنان مشاهده کردند که RAPD می تواند ایزوله ها را بر اساس نژاد کاملاً از همدیگر تفکیک کند. همچنین ایزوله های مربوط به منطقه چین با داشتن الگوی پلی مورفیسم مشابه در یک گروه جداگانه قرار گرفتند، در حالی‌که 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 همکاران با بررسی تنوع ژنتیکی بین سویه‌های قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* از طریق الگوی RAPD نشان دادند که دسته‌بندی به دست آمده با نتایج حاصل از بیماریزایی از همبستگی کامل برخورداراست، در حالی‌که 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 مورفیسم 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 کارآیی این روش را در عرصه مطالعات ژنتیکی از طریق طبقه بندی آنها نشان می‌دهد پیشنهاد می‌شود تا با انجام مطالعات پیشرفته‌تر به‌وسیله استفاده از سایر نشانگرهای ملکولی و ریخت‌شناسی و ادغام نتایج حاصله به بررسی و شناخت هر چه بهتر ذخایر توارثی 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 & Hygiene1995; 52: 559-564.
13. Meyers JA, Sanchez D, Elwell l, 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.

www.SID.ir