

## تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* از چغندر قند با

### استفاده از RAPD-PCR و آنالیز ITS-rDNA

Genetic diversity of sugar beet isolates of *Rhizoctonia solani* revealed by RAPD-PCR and ITS-rDNA analysis

سیدباقر محمودی\*، محمود مصباح، حشمت‌اله رحیمیان، عزیزاله عزیزاده و پیمان نوروزی  
موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران و  
دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

پذیرش ۱۳۸۴/۹/۲۳

دریافت ۱۳۸۴/۳/۳

#### چکیده

تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی *Rhizoctonia solani* جدا شده از قسمت‌های پوسیده ریشه چغندر قند، به وسیله RAPD-PCR و آنالیز ITS-rDNA مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۴ آغازگر تصادفی مورد استفاده در واکنش‌های RAPD-PCR، ۱۲ آغازگر چندشکلی خوبی بین جدایه‌های مورد بررسی نشان دادند. گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌ها، با استفاده از روش simple matching (نرم‌افزار SPSS version 11.5) جدایه‌های متعلق به گروه‌های آناستوموزی مختلف را در سطح تشابه ۸۵٪ از یکدیگر تفکیک نمود. رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی براساس RAPD-PCR با بیماری‌زایی، منطقه جغرافیایی و منبع بیمارگر (بافت میزبان) یافت

\* مسئول مکاتبه

نشد. در تکثیر نواحی فاصله‌ساز داخلی بین ژن‌های ریپوزومی با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 یک قطعه DNA به اندازه ۶۸۰ تا ۷۵۰ جفت باز ردیابی شد. قطعه مذکور با آنزیم‌های برشی *Pst1*, *EcoR1* و *Tru91* هضم گردید. آنزیم *Pst1* فاقد محل برش بود. الگوی حاصل از هضم آنزیم‌های *EcoR1* و *Tru91* جدایه‌های متعلق به گروه‌های آناستوموزی مختلف را از یکدیگر تمیز داد. به نظر می‌رسد به کمک RAPD-PCR و یا آنالیز ITS-rDNA بتوان گروه‌های مختلف آناستوموزی ریزوکتونیا را تشخیص داد.

#### واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، چغندر قند، *Rhizoctonia solani*, RAPD-PCR, ITS-rDNA

#### مقدمه

جنس ریزوکتونیا (*Rhizoctonia*) از نظر ژنتیکی، اکولوژیکی و بیماری‌زایی یک مجموعه متنوع می‌باشد. گونه *Rhizoctonia solani* به لحاظ تنوع بالای ژنتیکی به گونه مرکب (*R. solani* complex) مشهور است (Moore, 1996). براساس گروه‌بندی آناستوموزی (Anastomosis group) گونه *R. solani* به ۱۴ گروه مشخص که از نظر ژنتیکی از هم مجزایند، تقسیم‌بندی می‌شود (Carling, 2000). تعیین ویژگی‌های گروه‌ها و زیرگروه‌های آناستوموزی براساس ریخت‌شناسی، بیماری‌زایی و رفتار آناستوموز موفق‌ترین تلاش‌هایی بوده که تاکنون برای توصیف گوناگونی ژنتیکی موجود در جنس ریزوکتونیا انجام گرفته است (Vilgalys & Cubeta 1994, Carling et al. 2002).

مطالعه تنوع ژنتیکی ریزوکتونیایها ابتدا با روش‌های بیوشیمیایی نظیر الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی، آیزوزایم‌ها، زایموگرام پکتین و آنالیز اسیدهای چرب بیشتر در سطوح گونه و یا گروه آناستوموزی شروع شد و روش‌های مولکولی مختلف توانست اختلافات درون جمعیت را آشکار سازد (Matsumoto et al. 1996, Salazar et al. 2000, Carling et al. 2002).

روش‌های مولکولی چندی برای مطالعه ژن‌های ریپوزومی *R. solani* مورد استفاده قرار گرفته است. تکثیر قطعات فاصله‌ساز داخلی (Internal Transcribed Spacers) و برش آنها با آنزیم‌های برش دهنده و بررسی الگوی حاصل یکی از روش‌هایی است که عمدتاً در مطالعه

تنوع ژنتیکی در سطح گونه و گروه آناستوموزی مورد استفاده قرار گرفته است (Liu & Sinclair 1992, Cubeta & Vilgalys 1997). با استفاده از چندشکلی آیزوآنزیم‌ها و rDNA-RFLP پنج زیرگروه برای گروه آناستوموزی دو (AG-2) توصیف شد (Liu & Sinclair 1992). کانیماتسو و نیتو (Kanematsu & Naito 1995) با آنالیز rDNA-RFLP زیرگروه R. solani AG-2-3 را برای اولین بار توصیف کردند. آنالیز rDNA-RFLP از ۵۷ جدایه R. solani از گروه‌های آناستوموزی مختلف نشان داد که زیرگروه‌های موجود در گروه‌های آناستوموزی یک (AG-1) و دو (AG-2) می‌توانند به عنوان گروه‌های مشخصی توصیف شوند (Matsumoto et al. 1996). شنایدر و همکاران (Schneider et al. 1997) با استفاده از چندشکلی موجود در نواحی فاصله ساز داخلی ژن‌های rDNA، توانستند جدایه‌های R. solani AG-2-t را از سایر زیرگروه‌های موجود در گروه آناستوموزی (AG-2) جدا کنند اما استفاده از این روش جهت تشخیص سریع جدایه‌ها را توصیه نکردند. با استفاده از همین روش زیرگروه R. solani AG-2-2LP توصیف شد (Hyakumachi et al. 1998). تکثیر و توالی‌یابی نواحی فاصله‌ساز داخلی منجر به طراحی آغازگرهای اختصاصی برای زیرگروه‌های AG-2 R. solani شده است (van den Boogert et al. 1998, Salazar et al. 2000, Carling et al. 2002).

دکن و همکاران (Duncan et al. 1993) روش RAPD-PCR را ابزار مناسبی برای تشخیص گروه‌های آناستوموزی ریزوکتونیا تشخیص دادند. مومنی و همکاران (۲۰۰۲) تنوع ژنتیکی جدایه‌های بیماری‌زای R. solani جمع‌آوری شده از مزارع چغندرقد خراسان را با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD بررسی کردند و از آن به عنوان تکنیکی مناسب برای تشخیص گروه‌های آناستوموزی ریزوکتونیا یاد کردند. این تکنیک ضمن سادگی و سرعت در انجام آن، آنالیز هم‌زمان چندین لوکوس ژنتیکی را فراهم می‌کند (Duncan et al. 1993). نتایج مطالعات لوبک و پولسن (Lubeck & Poulsen 2001) روی ۱۶ جدایه ریزوکتونیا جدا شده از سیب‌زمینی و چغندرقد با استفاده از تکنیک UP-PCR با نتایج حاصل از آنالیز همین جدایه‌ها براساس rDNA-RFLP مطابقت داشت. در بررسی جدایه‌های مزرعه‌ای R. solani AG-2-2 جدا شده از چغندرقد به کمک آغازگرهای تصادفی تفاوت‌های مختصری دیده شده اما از نظر توان بیماری‌زایی بین جدایه‌ها ارتباطی مشاهده نشده است (Zens et al. 1999). در بررسی تنوع

بیماری‌زایی ۱۵ جدایه *R. solani* AG-4 به وسیله RAPD-PCR و آنالیز ITS-rDNA جدایه‌های با قدرت بیماری‌زایی بالا (hypervirulent) الگوی بانندی بسیار مشابهی در واکنش‌های RAPD-PCR با یکدیگر داشته‌اند (Huang & Tschen 2000).

تاکنون گروه‌های آناستوموزی AG-4, AG-3, AG-2-2IV, AG-2-2IIIB, AG-2-1, AG-1-IC و AG-5 از چغندر قند گزارش شده‌اند (Sneh *et al.* 1991). این بیمارگر در چغندر قند طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه و طوقه و سوختگی برگ‌گی را موجب می‌شود (Herr 1996). گروه‌های آناستوموزی AG-3, AG-5, AG-2-1, AG-4, AG-2-2 به ترتیب اهمیت، به عنوان عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه چغندر قند گزارش شده‌اند (Windels & Nabben 1989, Rush *et al.* 1994). گروه آناستوموزی یک (AG-1) و چهار (AG-4) به همراه گروه‌های آناستوموزی دوهسته‌ای AG-A, AG-C, AG-E, AG-I, AG-K به‌عنوان عوامل مرگ گیاهچه چغندر قند معرفی شده‌اند (Sneh *et al.* 1991). از عوامل سوختگی برگ، گروه‌های آناستوموزی AG-4, AG-2-2, AG-1 گزارش شده‌اند (Naito 1984, Whitney & Duffus 1986).

مطالعه ژنتیک جمعیت از نظر درک صحیح از چگونگی تکامل در پاسخ به روش‌های مختلف مبارزه (McDonald 1997) و اتخاذ روش‌های موثر مدیریت بیمارگرها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Malvick & Percich 1998). در این بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. solani* متعلق به گروه‌های آناستوموزی (AG-2) و (AG-4) با سطوح مختلف بیماری‌زایی (virulence) با استفاده از نشانگر RAPD و آنالیز ITS-rDNA مطالعه شد. امکان تمایز جدایه‌های با قدرت بیماری‌زایی بالا از جدایه‌های با قدرت بیماری‌زایی پایین با استفاده از این نشانگر، از دیگر اهداف این تحقیق بود.

## روش بررسی

### جدایه‌های مورد بررسی

در این بررسی ۱۸ جدایه مزرعه‌ای *R. solani* متعلق به گروه‌های آناستوموزی (AG-2) و (AG-4) که از مناطق مختلف چغندرکاری کشور جمع‌آوری شده بود به همراه جدایه‌های

استاندارد دریافتی از دکتر بنی هاشمی (دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز) مورد استفاده قرار گرفتند. خصوصیات جدایه‌های مورد بررسی در جدول ۱ آمده است. تعیین گروه آناستوموزی و بیماری‌زایی جدایه‌ها، قبلاً مورد بررسی قرار گرفته بود (محمودی و همکاران، ۲۰۰۴).

جدول ۱- جدایه‌های ریزوکتونیای مورد استفاده در واکنش RAPD-PCR و آنالیز rDNA

Table 1. *Rhizoctonia* isolates used in RAPD-PCR and ITS-rDNA analysis

آناستوموز جدایه isolate no.	گروه AG	علائم بیماری disease symptom(s)	منطقه جغرافیایی geographic location	منبع source	بیماری‌زایی virulence
Rh125	2	-	Kermanshah	-	high
Rh170	2	-	Khorassan	-	high
Rh188	2	root rot	Kerman	root	high
Rh211	2	Root & crown rot	Moghan	crown	high
Rh226	2	-	Chenaran	-	high
Rh119	2	-	Kermanshah	-	low
Rh121	2	-	Kermanshah	-	low
Rh145	2	root rot	Chenaran	root	low
Rh163	2	root rot	Chenaran	root	low
Rh129	4	root rot	Lorestan	root	high
Rh130	4	root rot	Lorestan	root	high
Rh140	4	root rot	Moghan	root	high
Rh189	4	root rot	Kerman	root	high
Rh251	4	root & crown rot	Lorestan	crown	high
Rh157	4	root rot	Nishabour	root	low
Rh158	4	-	Khorassan	-	low
Rh186	4	root rot	Hamadan	root	low
Rh261	4	-	Karaj	sclerotia	low
AG-1	1	-	-	-	-
AG-2-1	2-1	-	-	-	-
AG-2-2	2-2	-	-	-	-
AG-3	3	-	-	-	-
AG-4	4	-	-	-	-
AG-5	5	-	-	-	-

#### تهیه توده میسلیمی

تولید توده میسلیمی جدایه‌های بیمارگر در محیط‌کشت مایع (عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی همراه با ۱۵ گرم دکستروز در یک لیتر آب) صورت گرفت. دو قرص پنج میلی‌متری از حاشیه کلنی‌های سه تا پنج روزه جدایه‌های بیمارگر برداشته شده و به

فلاسک‌های ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع PDB منتقل گردید. فلاسک‌ها سپس به مدت ۵-۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد روی شیکر دورانی قرار داده شدند. پس از این مدت محتوای هر یک از ارلن‌ها، از کاغذ صافی شماره یک واتمن (Whatman No.1) قرار داده شده روی قیف بوخنر و با کمک پمپ خلا عبور داده شد. تودهٔ میسلیومی، از محیط‌کشت مایع جدا شده و با آب مقطر سترون شستشو گردید. تودهٔ میسلیومی پس از برداشت و توزین در پوشش آلومینیومی قرار داده شد و تا مرحلهٔ استخراج DNA در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

### استخراج DNA

استخراج DNA مطابق روش نوروزی (۲۰۰۳) و ویناند (Weiland 1997) و با تغییراتی جزئی (سانتریفوژ با ده هزار دور در دقیقه در شرایط آزمایشگاه) صورت گرفت. مقدار ۰/۵ گرم از توده میسلیومی هر یک از جدایه‌های مورد مطالعه که در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده بود، درون هاون چینی قرار داده شد. سپس حدود ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (100mM Tris-HCL(PH 8.0), 20mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.5 M NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate) به آن اضافه گردید. توده میسلیومی حدود یک دقیقه در هاون نرم شد تا حالت خمیری پیدا کند. مخلوط حاصل به میکروتیوب اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌ها پنج دقیقه روی یخ قرار گرفتند. به هر یک از میکروتیوب‌ها هم حجم محتویات هر میکروتیوب مخلوط اشباع بافری فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۵:۲۴:۱) اضافه گردید و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق کاملاً بهم زده شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق، سانتریفوژ شدند. محلول رونشین به یک میکروتیوب جدید انتقال یافته و معادل ۰/۶ حجم آن (حدود ۵۰۰ میکرولیتر) ایزوپروپانول سرد به آن اضافه گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق سانتریفوژ شدند. رسوب حاصل با اتانول ۹۵ درجه شستشو داده شد و پس از خشک شدن در دمای محیط، در ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حاوی ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنزیم ریبونوکلاز، حل شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در

دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار گرفت. بعد از این، میکروتیوب‌ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. خلوص و غلظت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید.

#### واکنش PABD-PCR

واکنش PCR پس از توزیع اجزاء واکنش در لوله‌ها، با افزودن نمونه DNA الگو، در دستگاه ترموسایکلر (Biometra) انجام شد. برنامه واکنش PCR شامل مراحل واسرشتگی مقدماتی به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۴°C، واسرشتگی به مدت ۴۵ ثانیه در ۹۴°C، اتصال به مدت ۴۵ ثانیه در ۳۴/۵°C، گسترش به مدت ۸۰ ثانیه در ۷۲°C، گسترش نهائی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بود. مراحل واسرشتگی تا گسترش ۳۵ مرتبه تکرار گردید (Weising *et al.* 1995). DNA جدایه‌های مورد بررسی (جدول ۱) با استفاده از ۱۴ آغازگر تصادفی (جدول ۲) تکثیر شد.

جدول ۲- آغازگرهای تصادفی مورد استفاده

Table 2. Random primers used

آغازگر (Primer)	توالی آغازگر (Sequence)
UBC222	5'-AAG CCT CCC C-3'
UBC228	5'-GCT GGG CCG A-3'
UBC280	5'-CTG GGA GTG G-3'
UBC282	5'-GGG AAA GCA G-3'
UBC290	5'-CCG CGA GCA C-3'
AB01-16	5'-TTT GCC CGG A-3'
AB02-06	5'-AAG ACC CCT C-3'
AB02-14	5'-TGC GGC TGA G-3'
AB02-18	5'-GGA CTG CAG A-3'
AB03-18	5'-TGG TCG CAG A-3'
AB05-06	5'-CAA GGG CAG A-3'
AB05-15	5'-GGA TGC CAC T-3'
AB07-04	5'-GTA GGC CTC A-3'
AB09-09	5'-GGG GGA GAT G-3'

ارزیابی محصول واکنش PCR روی ژل آگارز یک درصد صورت گرفت. به این منظور مقدار ۶ میکرولیتر از محصول هر واکنش همراه با ۱/۵ میکرولیتر بافر بارگذاری به درون چاهک‌های ژل ریخته شده و الکتروفورز تحت شرایط ۲/۵ ولت بر سانتیمتر صورت گرفت. پس از پایان الکتروفورز، ژل‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در محلول حاوی ۱ μg/ml اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس به مدت ۷-۵ دقیقه در آب مقطر رنگ‌زدائی شدند. باندهای RAPD در معرض لامپ UV مشاهده شده و از آنها عکس برداری گردید. بافر اجرا در دستگاه الکتروفورز نوع TAE (حاوی ۴۰mM Tris-acetate و ۱mM Na<sub>2</sub>EDTA) و بافر بارگذاری 6X (شامل ۰/۲۵ درصد بروموفنل بلو و ۴۰ درصد وزنی - حجمی (w/v) ساکاروز) بود (Sambrook *et al.* 1989).

جدول ۳- اجزای واکنش PCR

Table 3. Components of PCR reaction

PCR components	اجزاء واکنش	مقدار برداشت (μl)	final concentration	غلظت نهائی
MgCl <sub>2</sub> (25mM)		1.5	1.5 mM	
dNTPs (25mM)		2	0.2 mM	
Reaction buffer <sup>1</sup> 10X		2.5	1 X	
Taq polymerase (5 U / μl)		0.2	1 Unit	
Primer (50ng / μl)		0.5	50 ng	
DNA (50 ng / μl)		1	50 ng	
ddH <sub>2</sub> O		17.3	-	

<sup>1</sup> [750 mM Tris-HCl (pH8.8), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> و 0.1% Tween20]

#### مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های بیمارگر براساس rDNA

تکثیر قطعات rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و مشابه واکنش PAPD-PCR انجام شد در این واکنش از آغازگرهای 5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3' ITS4 و 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' ITS5 به میزان ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد (Schneider *et al.* 1997, Salazar *et al.* 2000). سیکل‌های حرارتی واکنش PCR به ترتیب ۹۴



درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و مراحل دوم تا چهارم ۳۰ مرتبه تکرار شد.

#### ارزیابی محصول PCR

ارزیابی محصول واکنش PCR روی ژل آگاروز ۱٪، ۲٪ و اکریل آمید ۸٪ صورت گرفت. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول هر واکنش همراه با ۲/۵ میکرولیتر بافر بارگذاری به درون چاهک‌های ژل ریخته شده و الکتروفورز تحت شرایط ۹۰ ولت به مدت ۱/۵ ساعت برای ژل آگاروز و ۶ تا ۱۲ ساعت برای ژل اکریل آمید صورت گرفت. رنگ‌آمیزی و مشاهده باندها با روش یاد شده قبلی صورت گرفت.

#### هضم محصول PCR

از آنزیم‌های *EcoR1*، *Pst1* و *Tru91* برای هضم قطعات DNA تکثیر شده توسط آغازگرهای ITS4 و ITS5 استفاده شد. هر واکنش هضم در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکروگرم محصول PCR، سه واحد آنزیم، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش 10X مخصوص هر آنزیم و ۱۷/۲ میکرولیتر آب دو بار تقطیر سترون بود. هضم به مدت یک ساعت و نیم در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام و نمونه‌های هضم شده تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### ارزیابی و مقایسه محصولات هضم

ده میکرولیتر از محصول هضم شده به همراه دو میکرولیتر رنگ (شامل ۰/۲۵ درصد بروموفنل بلو و ۴۰ درصد وزنی - حجمی (w/v) ساکاروز) در چاهک‌های ژل آگاروز ۲٪ و یا اکریل آمید ۸٪ ریخته شده و الکتروفورز در جریان ۱۰۰ ولت به مدت ۵ تا ۱۲ ساعت انجام گردید. ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و بررسی گردید.

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

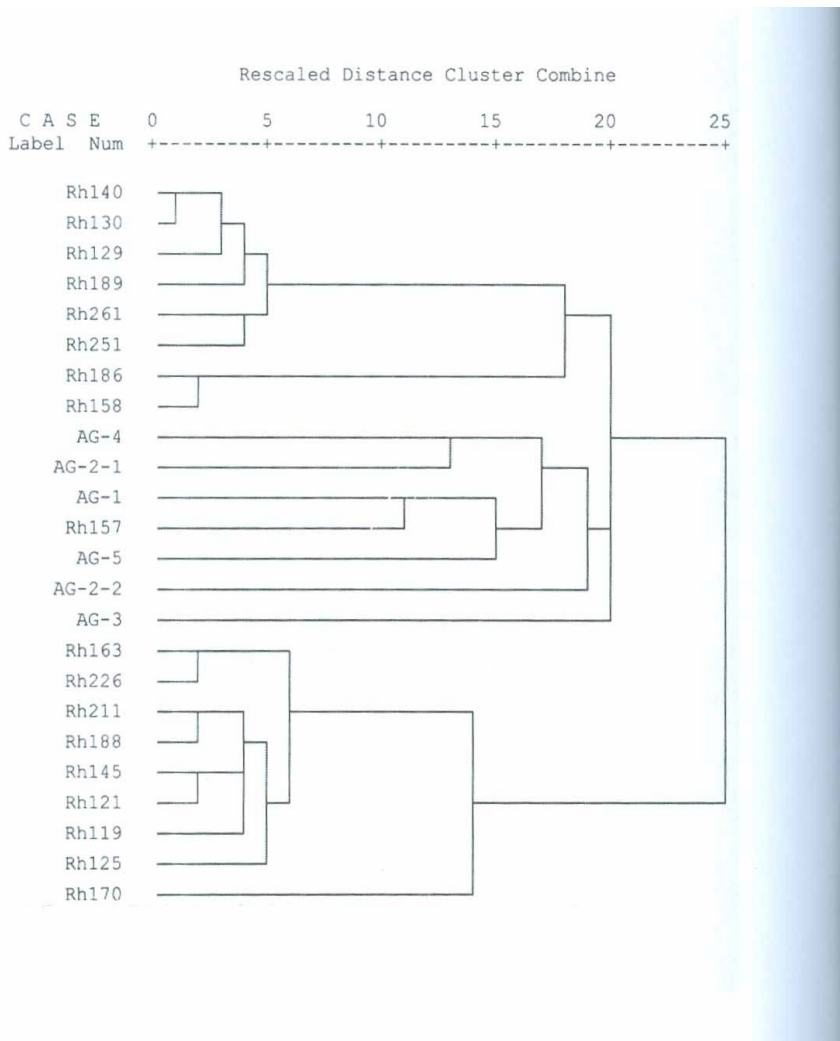
گروه‌بندی خوشه‌ای جدایی‌ها، با استفاده از روش simple matching (نرم‌افزار SPSS version 11.5) انجام شد. در این روش وجود یا عدم وجود باند به ترتیب با نمره‌های یک و صفر ارزیابی شد.

#### نتیجه

در واکنش‌های RAPD از ۱۴ آغازگر از سری آغازگرهای University of British Columbia (UBC) و Advanced Biotechnology (AB) استفاده شد که ۱۲ آغازگر چند شکلی خوبی بین جدایه‌های مورد بررسی نشان دادند. آغازگرهای UBC282 و AB01-16، در اکثر جدایه‌ها تکثیری انجام ندادند. دندروگرام حاصل از گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از روش Simple matching در شکل ۱ نشان داده شده است. در سطح تشابه ۷۵٪ جدایه‌ها در دو گروه قرار گرفتند. کلیه جدایه‌های *R. solani* AG2-2 در یک گروه و جدایه‌های متعلق به AG-4 به همراه جدایه‌های استاندارد ۱-۵ در گروه دوم دسته‌بندی شدند. کلیه گروه‌های آناستوموزی در سطح تشابه ۸۵٪ از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۱). رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی براساس RAPD-PCR با بیماری‌زایی جدایه‌ها، منطقه جغرافیایی و منبع بیمارگر (بافت میزبان) یافت نشد. در بین آغازگرهای تصادفی مورد بررسی (جدول ۲) آغازگرهای AB05-06، UBC280، AB02-06 و AB05-15 هر کدام به تنهایی در سطح تشابه ۸۵٪ قادر به دسته‌بندی مناسب جدایه‌های مورد بررسی براساس گروه آناستوموزی بودند (شکل ۲).

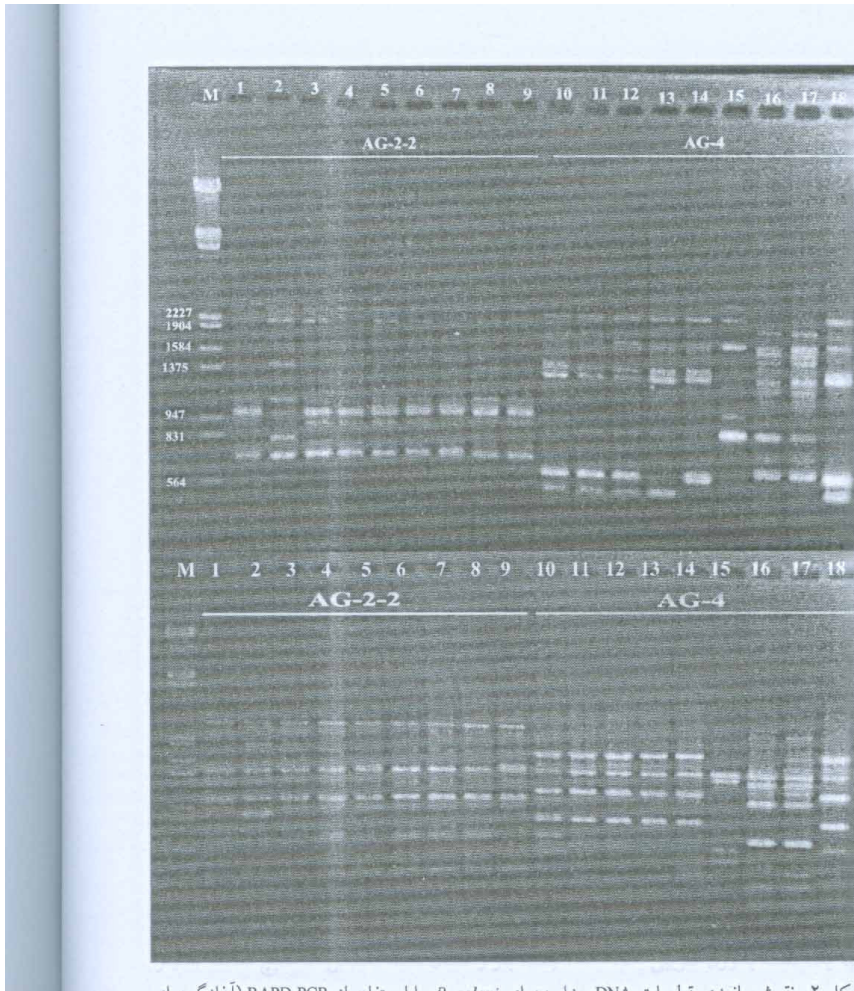
#### تنوع ژنتیکی جدایه‌های بیمارگر براساس آنالیز rDNA

محصول تکثیر شده از DNA جدایه‌های مختلف با استفاده از آغازگرهای ITS5-ITS4 روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد متشکل از یک قطعه DNA با اندازه تقریباً یکسان برای کلیه جدایه‌ها با وزن تقریبی ۷۰۰ جفت باز بود (شکل ۳). ارزیابی محصول PCR تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای ITS5-ITS4 روی ژل آگاروز ۲٪، جدایه‌ها را به دو گروه یک و دو بانندی تقسیم کرد. برخی از جدایه‌ها دو بانند به وزن تقریبی ۷۰۰ و ۷۵۰ جفت باز را تولید کردند حال آن که بقیه یک قطعه با وزن تقریبی ۷۵۰-۶۸۰ جفت باز را نشان دادند (شکل ۳). هیچ قطعه تکثیر شده‌ای در شاهد‌های منفی مشاهده نگردید. کلیه جدایه‌های دو بانندی متعلق به گروه آناستوموزی دو (*R. solani* AG2-2) بودند. براساس الگوی حاصل از این آغازگرها روی ژل آگاروز ۲٪ جدایه‌های متعلق به AG-4 از جدایه‌های AG-2-2 قابل تفکیک بودند (شکل ۳).



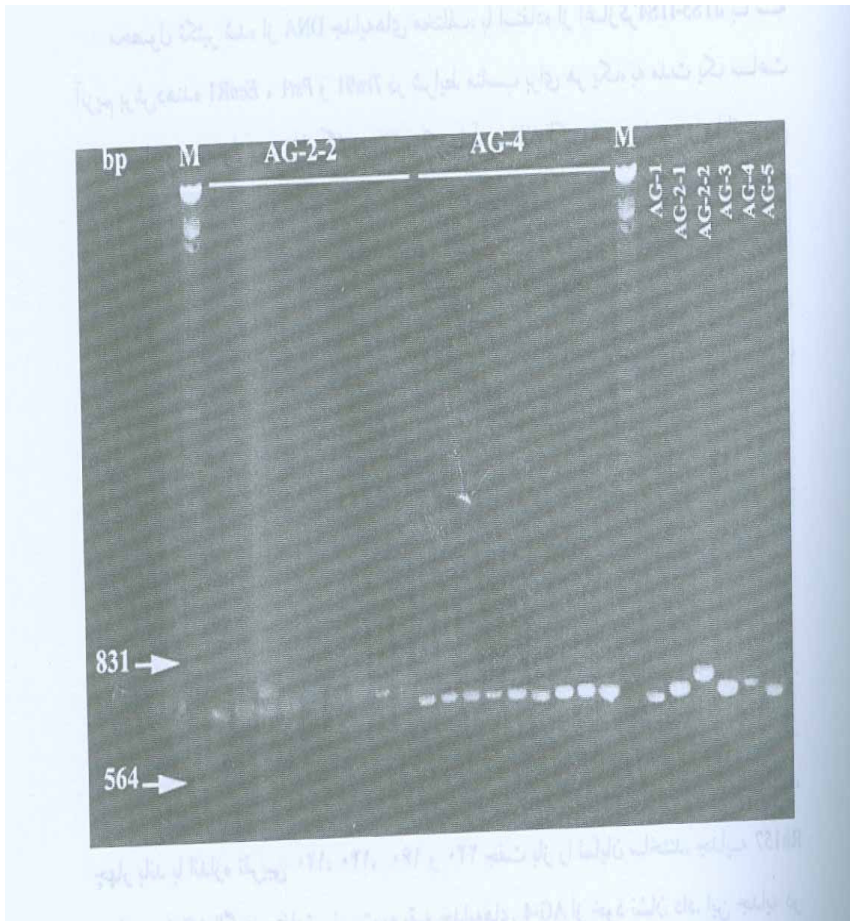
شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های ریزوکتونیا با استفاده از داده‌های حاصل از مطالعه تنوع ژنتیکی براساس نشانگر RAPD.

Fig. 1. Clustering of *Rhizoctonia* isolates based on fingerprint patterns using RAPD markers.



شکل ۲- نقوش بانندی قطعات DNA جدایه‌های *R. solani* با استفاده از RAPD-PCR (آغازگرهای UBC280 (بالا) و AB-2-06 (پایین). شماره‌های ۱ تا ۱۸ به ترتیب در جدول ۱ آمده است. M نشانگر وزن مولکولی است.

Fig. 2. Fingerprint patterns of isolates of *R. solani* generated by RAPD-PCR with primers UBC280 (bottom) and AB-2-06 (top). Numbers 1-18 are given in Table 1. M: size marker (2kb).



شکل ۳ - نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های ریزوکتونیا با استفاده از آغازگرهای ITS4-ITS5 در ژل آگاروز ۲٪. M نشانگر وزن مولکولی.

Fig. 3. Electrophoretic patterns of PCR -amplified ITS-rDNA of *Rhizoctonia solani* isolates in a 2% agarose gel. M: size marker.

محصول تکثیر شده از DNA جدایه‌های مختلف، با استفاده از آغازگر ITS5-ITS4، با سه آنزیم برش‌دهنده *EcoR1*، *Pst1* و *Tru91* در شرایط مناسب برای هر یک، به مدت یک ساعت و نیم تیمار و محصول روی ژل آگاروز ۲٪ و اکریل‌آمید ۸٪ الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید. آنزیم برش‌دهنده *Pst1* دارای محل برش روی قطعه مذکور نبود.

#### برش با آنزیم *EcoR1*

با هضم آنزیمی محصولات PCR جدایه‌های مختلف با این آنزیم دو قطعه با طول متفاوت به دست آمد. در جدایه‌های AG-2-2 روی ژل آگاروز ۲٪ یک باند قطور به طول تقریبی ۳۸۰ جفت باز مشخص شد. جدایه‌های Rh121، Rh226، Rh125 و Rh163 باند دیگری به اندازه ۴۱۰ جفت باز نشان دادند. در جدایه‌های AG-4، روی ژل آگاروز ۲٪ دو باند قابل تفکیک بود اندازه این باندها در ژل اکریل‌آمید ۸٪، ۳۴۰ و ۳۷۰ جفت باز تخمین زده شد (شکل ۴).

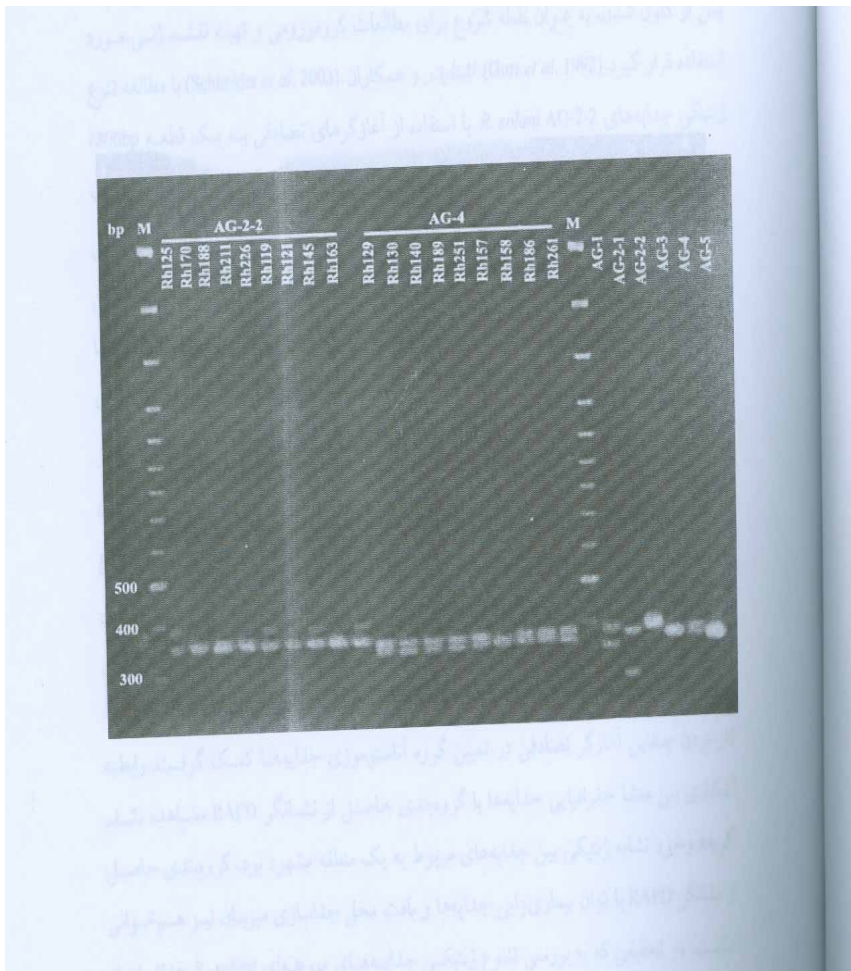
#### برش با آنزیم *Tru91*

در هضم محصول PCR جدایه‌های AG-2-2 با آنزیم *Tru91* و الکتروفورز در ژل آگاروز ۲٪ و اکریل‌آمید ۸٪ دو باند نمایان شد (شکل ۵). در جدایه‌های AG-4 روی ژل آگاروز ۲٪ نیز دو باند با اندازه تقریبی ۲۳۰ و ۱۶۰ جفت باز مشخص شد. این جدایه‌ها روی اکریل‌آمید، چهار باند با اندازه تقریبی ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰ و ۲۲۰ جفت باز را نمایان ساختند. جدایه Rh157 متعلق به الگوی متفاوتی نسبت به بقیه جدایه‌های AG-4 از خود نشان داد. این جدایه در ژل آگاروز ۲٪ دو باند به اندازه ۲۳۰ و ۲۵۰ جفت باز و در ژل اکریل‌آمید سه باند به طول ۱۴۰، ۲۲۰ و ۲۶۰ جفت باز داشت (شکل ۵).

#### بحث

#### تنوع ژنتیکی جدایه‌های ریزوکتونیا با استفاده از RAPD-PCR

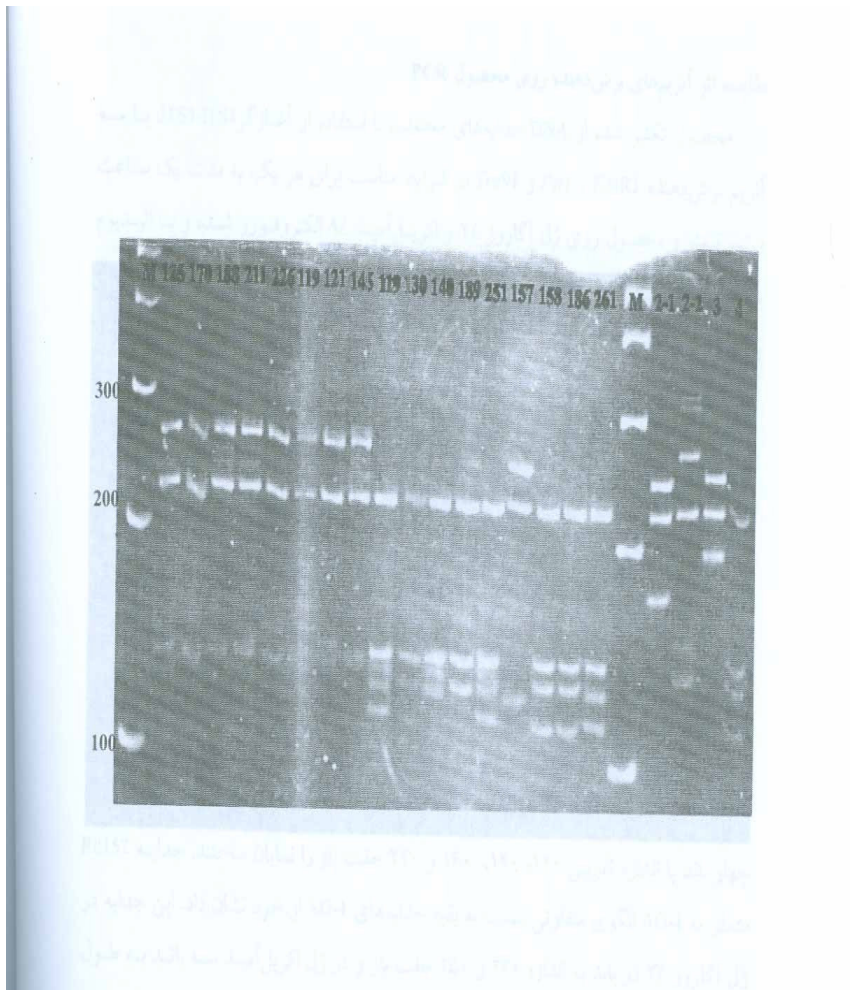
نتایج حاصل از مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های ریزوکتونیا نشان داد که نشانگر RAPD ابزار مفیدی برای مطالعه تنوع در این قارچ می‌باشد. پس از معرفی RAPD، هم‌اکنون از این روش در زمینه‌های مختلف تشخیص و تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچی، مطالعات



شکل ۴- نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های ریزوکتونیا هضم شده با آنزیم برش‌دهنده

EcoRI روی ژل آگاروز. ۲٪ M نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰ جفت باز).

Fig. 4. Electrophoretic patterns of PCR-amplified ITS-rDNA of *Rhizoctinia solani* isolates digested with *EcoRI* in a 2% agarose gel. M, size marker (100 pb).



شکل ۵- نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های ریزوکتونیا هضم شده با آنزیم برش‌دهنده Tru91 روی ژل اکریل‌آمید (پایین). M نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰ جفت باز).

Fig. 5. Electrophoretic patterns of PCR-amplified ITS-rDNA of *Rhizoctonia solani* isolates digested with *Tru91* in 8% acrylamide (bottom) gels M: size marker (100 bp).



رده‌بندی و تعیین روابط فیلوژنتیکی استفاده می‌شود. در این روش، DNA تکثیر شده می‌تواند پس از کلون شدن، به عنوان نقطه شروع برای مطالعات کروموزومی و تهیه نقشه ژنی مورد استفاده قرار گیرد (Gurr et al. 1992). اشنایدر و همکاران (Schneider et al. 2003) با مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. solani* AG-2-2 با استفاده از آغازگرهای تصادفی به یک قطعه 1800bp دست یافتند که منحصر به جدایه‌های این زیرگروه بود و براساس آن آغازگر اختصاصی جهت ردیابی *R. solani* AG-2-2IIIB در خاک و گیاه طراحی کردند. به استناد نتایج این پژوهش می‌توان در تشخیص جدایه‌های ریزوکتونیای متعلق به گروه‌های آناستوموزی مختلف از این نشانگر مولکولی بهره جست (شکل ۲). گروه‌بندی خوشه‌ای ۱۸ جدایه ریزوکتونیا با خصوصیات بسیار متنوع با استفاده از این نشانگر و آن هم با تعداد ۱۲ آغازگر تصادفی، توانست جدایه‌های متعلق به گروه‌های آناستوموزی مختلف را مشخصاً از یکدیگر متمایز نماید. مومنی و همکاران (۲۰۰۲) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. solani* جمع‌آوری شده از مزارع چغندرقد خراسان این نشانگر را به عنوان ابزاری مناسب برای ارزیابی تنوع جدایه‌های *R. solani* معرفی کردند. با توجه به این که گروه‌بندی جدایه‌های این قارچ براساس گروه آناستوموزی امری اجتناب‌ناپذیر است (Carling et al. 2002) و تعیین سطوح تنوع براساس گروه آناستوموزی (AG) وقت گیر بوده و فاقد دقت لازم است، می‌توان از نشانگر RAPD، با به کار بردن چندین آغازگر تصادفی در تعیین گروه آناستوموزی جدایه‌ها کمک گرفت. رابطه آشکاری بین منشا جغرافیایی جدایه‌ها با گروه‌بندی حاصل از نشانگر RAPD مشاهده نشد. اگرچه وجود تشابه ژنتیکی بین جدایه‌های مربوط به یک منطقه مشهود بود. گروه‌بندی حاصل از نشانگر RAPD با توان بیماری‌زایی جدایه‌ها و بافت محل جداسازی میزبان نیز هم‌خوانی نداشت. در تحقیقی که به بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مزرعه‌ای *R. solani* جدا شده از چغندرقد به کمک نشانگر تصادفی پرداخته بود، از نظر توان بیماری‌زایی بین جدایه‌ها ارتباطی مشاهده نشده بود (Zens et al. 1999). مومنی و همکاران (۲۰۰۲) نیز در بررسی‌های خود اعلام نموده‌اند که با کمک نشانگر RAPD معیارهای منطقه جغرافیایی و بیماری‌زایی قابل بررسی است اما در قیاس با معیار گروه آناستوموزی درخور توجه نیست.

طول قطعات تکثیری حاصل از آغازگرهای ITS4 و ITS5 در این پژوهش با آن چه که محققین قبلی برای گروه‌های آناستوموزی به دست آورده بودند هم‌خوانی داشت. گروه آناستوموزی در محصولات PCR حاصل از این آغازگرها، قابل بررسی و براین اساس جدایه‌های متعلق به گروه‌های آناستوموزی مختلف از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۳). سایر محققینی که از این آغازگرها در آنالیز و تعیین توالی قطعات حاصل از آنها استفاده کرده‌اند آن را برای گروه‌بندی جدایه‌های ریزوکتونیا و ارتباط آن با گروه‌های و زیرگروه‌های آناستوموزی مفید دانسته‌اند (Kanematsu & Naito 1995, Gonzalez *et al.* 2000, Kuninaga & Carling 2000).

در این مطالعه از سه آنزیم برش‌دهنده *EcoR1*، *Pst1* و *Tru91* جهت هضم قطعه تکثیری حاصل از آغازگرهای ITS4 و ITS5 استفاده شد. آنزیم *Pst1* جایگاه برش روی قطعه مذکور نداشت. لیو و سنکلی (Liu & Sinclair 1992) با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 و ۱۰ آنزیم برش‌دهنده، چندشکلی قطعات تکثیری توسط آغازگر فوق را بین جدایه‌های AG-2 مطالعه کردند. در بررسی‌های آنها نیز آنزیم *Pst1* روی قطعات تکثیری AG-2 فاقد محل تشخیص و برش بود.

قطعات حاصل از هضم محصول PCR جدایه‌های مورد بررسی، با آنزیم *EcoR1* جدایه‌های AG-2 و AG-4 را به دو گروه تقسیم کرد. اغلب جدایه‌های AG-2 دارای یک باند به وزن تقریبی ۳۸۰ جفت باز بودند. با توجه به طول قطعه برش نخورده (۷۵۰ جفت باز) شاید باقیمانده طول قطعه فوق به قطعات بسیار کوچک غیر قابل آشکارسازی توسط ژل آگاروز ۲٪ تبدیل شده است و یا این که قطعه دیگر به طول ۳۷۰ جفت باز قادر به تفکیک از قطعه ۳۸۰ جفت بازی توسط آگارز ۲٪ نمی‌باشد. جدایه‌های AG-4 دو باند به وزن تقریبی ۳۴۰ و ۳۷۰ جفت باز را آشکار ساختند.

الگوی حاصل از هضم، با استفاده از آنزیم *Tru91* بین جدایه‌های مورد بررسی چندشکلی نشان داد. در بین جدایه‌های AG-4، جدایه Rh157 الگویی متفاوت از بقیه جدایه‌ها نشان داد. این جدایه برخلاف بقیه جدایه‌ها که دارای دو باند به وزن ۲۳۰ و ۱۴۰ جفت باز در ژل آگاروز بودند، دارای دو باند به وزن ۲۳۰ و ۲۶۰ جفت باز بود. جدایه‌های AG-4 در ژل اکریل

آمید ۸٪ چند شکلی بیشتری از خود نشان دادند. بر این اساس، جدایه‌های AG-4 به پنج گروه (چهار گروه تک عضوی و یک گروه بزرگ) تقسیم شدند. جدایه‌های Rh157، Rh130، Rh140 و Rh189 هر کدام در یک گروه جداگانه قرار گرفتند.

نتایج حاصل از این بررسی با نتایج سایر محققینی (Kanematsu & Naito 1995, Schneider *et al.* 1997) که از آنزیم *EcoR1* جهت بررسی چند شکلی جدایه‌های AG-2 استفاده کرده‌اند با قدری تفاوت در برآورد طول قطعات حاصله مطابقت دارد. بر اساس منابع مورد بررسی به نظر می‌رسد تاکنون از آنزیم *Tru91* در بررسی چند شکلی ریزوکتونیا استفاده نشده است. در آنالیز چندشکلی ITS-rDNA، برخی از جدایه‌های AG-4 الگوهای هضم قطعات نامتعارف (heterogenous) در استفاده از آنزیم *Tru91* (جدایه Rh157) نمایش دادند. /شنایدر و همکاران (Schneider *et al.* 1997) نیز در مطالعه جدایه‌های AG-1 و AG-t به چنین موارد غیر متعارف برخوردند. عواملی نظیر غلظت آنزیم، زمان نگهداری برای هر آنزیم، وجود آلودگی در زمان استخراج DNA از عوامل فیزیکی و محیطی موثر می‌باشند. تکرار آزمایش و اخذ نتایج مشابه احتمالات فوق را رد کرده و دلایل دیگری برای کسب چنین نتایجی می‌طلبد. /شنایدر و همکاران (Schneider *et al.* 1997) وجود نایکنواختی در الگوهای هضم را به طبیعت هتروکاریوتیک *R. solani* مرتبط دانستند. وجود هسته‌ای که با سایر هسته‌های هیف قدری تفاوت داشته باشد. منشا هتروکاریون می‌تواند پدیده پل (bridging phenomenon) بین جدایه‌ها و یا تنوع ژنتیکی حاصل از مرحله جنسی باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد. نکته قابل توجه دیگر که به این نایکنواختی دامن می‌زند، وجود کروموزومهای مختلف با توالی‌های ITS متفاوت است (Schneider *et al.* 1997). توالی‌های ITS مختلف از یک جدایه منحصر به فرد *R. solani* قبلاً گزارش شده است (Schneider *et al.* 1997). علیرغم استفاده از تعداد محدود آنزیم برش‌دهنده، جدایه‌های مورد بررسی در سطح گروه آناستوموزی از یکدیگر متمایز شدند. با این توصیف، به نظر می‌رسد با استفاده از روش ITS-RFLP بر پایه PCR می‌توان در تشخیص گروه‌های آناستوموزی جدایه‌های *R. solani* بهره جست. برخی از محققین ضمن تایید تشخیص گروه‌های آناستوموزی با استفاده از این روش، با بهره‌گیری از آن، زیرگروه‌هایی برای گروه آناستوموزی دو نیز معرفی کردند (Liu & Sinclair 1992, Kanematsu & Naito 1995 Schneider *et al.* 1997, Hyakumachi *et al.*

1998) حال آنکه برخی دیگر به دلیل وجود تنوع در درون جدایه‌های متعلق به یک گروه، این روش را در تشخیص روزمره و آسان گروه‌های آناستوموزی مناسب تشخیص نداده‌اند (Schneider *et al.* 1997, Lubeck & Poulsen 2001) در این پژوهش تنوع تعداد نسبتاً کمی جدایه (۱۸ جدایه) با استفاده از RAPD-PCR و ITS-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. تعمیم نتایج تحقیق به سایر گروه‌های آناستوموزی و استفاده از آنها در تشخیص روتین گروه‌ها نیاز به تحقیقات تکمیلی دارد.

### سپاسگزاری

از آقای دکتر محمدعلی تاجیک قنبری به خاطر در اختیار گذاشتن آغازگرهای ITS و از سرکارخانم مهندس مهدیه بنی‌هاشمی و آقای کریم کشاورز به خاطر همکاری در اجرای آزمایش‌ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع

جهت ملاحظه منابع به صفحات (223-227) متن انگلیسی مراجعه شود.

---

نشانی نگارندگان: سیدباقر محمودی، محمود مصباح، حشمت‌اله رحیمیان، عزیزاله علیزاده و پیمان نوروزی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران و دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس