Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤١، ١٣٨٤

بررسی چند شکلی DNA در گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia solani* در مزارع چغندرقند استان خراسان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD*

Analysis of DNA polymorphism in anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* in sugarbeet fields of Khorasan Province using RAPD markers

حسن مومنی*، جواد مظفری، ماهرخ فلاحتی‌رستگار و بهروز جعفرپور**

دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، بخش تحقیقات ژنتیک و ذخایر توارثی

دریافت ١٣٨٣/٦/٢ پذیرش ٨٤/٦/٢

چکیده

مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه چغندرقند دراثر *Rhizoctonia solani* هر ساله خسارت زیادی به محصول چغندرقند در استان خراسان وارد می‌کند. در این تحقیق چند شکلی DNA در جدایه‌های بیماریزای *R. solani* متعلق به گروه‌های آناستوموزی AG_{2-2} و AG_4 با استفاده از روش Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) بررسی گردید. به این

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه فردوسی مشهد

** مسئول مکاتبه

منظور پس از استخراج DNA با استفاده از روش CTAB، واکنشهای RAPD با استفاده از سری

www.SID.ir

Archive of SID

آغازگرهای UBC انجام شد. هفت آغـازگر بـه نـام‌هـای UBC6، UBC53، UBC82، UBC196، UBC199، UBC222 و UBC228 چند شکلی بالایی بین جدایه‌های قارچ نشان دادند. به‌طوری که از کل ۱۰۵ باند DNA ایجاد شده ۷۸ باند (حدود۷۵٪ بانـدها) چنـد شـکل بودنـد. بـا کمـک نرم‌افزار Photocapt MW الگوی باندهای DNA جدایه‌ها با هر یـک از آغازگرهـای چنـدشـکل مشخص و ماتریس صفر و یک بر اساس حضور (۱) و عـدم حضـور (0) بانـد تشـکیل شـد. براساس این ماتریس صفر و یک و با کمک ضریب تشابه نئی، ماتریس فاصله ژنتیکی جدایه‌ها به‌دست‌آمده و دندروگرام فاصله ژنتیکی جدایه‌ها ترسیم شد. جدایه‌های متعلق بـه یـک گـروه آناستوموزی قرابت ژنتیکی بیشتری نسبت به جدایه‌های دیگر نشان دادند. گروه‌بندی جدایه‌هـا نشان داد که گرچه عامل اقلیمی، عامل مهمی در گروه‌بندی به حساب می‌آید ولی اهمیت آن به اندازه عامل گروه آناستوموزی نیست. عامل بیماریزایی نیـز بـه عنـوان یـک عامـل جـانبی در گروه‌بندی جدایه‌ها مؤثر بوده، ولی مانند گروه آناستوموزی به‌عنوان یک عامل اصلی و مهم در گروه‌بندی به حساب نمی‌آید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد کـه نشـانگر مولکـولی RAPD جهت بررسی تنوع بین جدایه‌های قارچ *R. solani* ابزار مناسبی است.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، چندشکلی DNA، *Rhizoctonia solani*، RAPD

مقدمه

یکی از بیماری‌های مهمی که در سراسر دنیا خسارت زیادی به چغندرقنـد وارد مـی‌سـازد مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقند می‌باشد که عامل آن قارچ *Rhizoctonia solani* Kuhn است. مطالعات بیولوژیک و ژنتیک جمعیت نشان می‌دهد که این قـارچ یـک گونـه پیچیـده و وسـیع اسـت کـه گـروه‌هـای ژنتیکـی مشـخص و متنـوع را شـامل مـی‌شـود (Yang *et al.* 1996, Cubeta & Vilgalys 1997). اگرچه اساس ژنتیکی پدیده آناسـتوموزی هنـوز کاملا شناخته شده نیست ولی روش ارزشمندی در طبقه‌بندی قارچ‌هـا بـه شـمار مـی‌رود. بـا استفاده از این روش ١٤ گروه آناستوموزی (AG) Anastomosis Group در *R. solani* تشخیص داده شده است (Cubeta & Vilgalys 1997). گروه‌های AG_4 و AG_{2-2} بیشـترین خسـارت را بـه ترتیب در مراحل گیاهچه و گیاه کامـل در چغندرقنـد وارد مـی‌کننـد (Momeni 2002). پاسـخ

www.SID.ir

Archive of SID

صحیح به سؤال‌های اساسی پیرامون تنوع ژنتیکی و روابط سیستماتیک این گروه‌ها از اهمیت زیادی در مدیریت کنترل این بیماری برخوردار است (Balali *et al.* 1996). این گروه‌ها علاوه بر چغندرقند در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (Wright & Grijalba 2000). البته بررسی تنوع ژنتیکی در این گونه از طریق مطالعات معمول مورفولوژی قارچ و بررسی گروه‌های آناستوموزی وقت گیر و غیردقیق بوده و از حساسیت کافی برای تمایز جدایه‌ها برخوردار نیست. به‌طوری که مورفولوژی پرگنه با گذشت زمان و بالا رفتن سن پرگنه تغییر می‌کند (Baird *et al.* 2000). تاکنون روش‌های مولکولی (Salazar *et al.* 2000) و بیوشیمیایی (Priyatmpjo *et al.* 2001)، جهت تخمین تنوع ژنتیکی درون و بین گروه‌های آناستوموزی گونه‌های چندهسته‌ای و دو هسته‌ای ریزوکتونیا ، با موفقیت به کار رفته است، به‌طوری که پیشرفت زیادی در زمینه تعیین خصوصیات ژنوتیپی جمعیت‌های ریزوکتونیا، با استفاده از نشانگرهایی مانند آیزوزایمها (Isozymes)، RFLP و RAPD بدست آمده است (Bounou *et al.* 1999). کاربرد روش RAPD که در آن از یک آغازگر چند نوکلئوتیدی کوتاه تصادفی برای تکثیر توالی‌های DNA استفاده می‌شود به علت عدم نیاز به اطلاعات توالی DNA ژنوم بیمارگر، سرعت و سهولت کاربرد آن توسعه زیادی یافته است. به ویژه استفاده از RAPD برای تعیین تفاوت و تنوع درون گونه‌ای در میکروارگانیسم‌ها موفقیت‌آمیز بوده است (Duncan *et al.* 1993). *تومراپ* و همکاران (۱۹۹۵) طی یک بررسی، قابل اعتماد بودن و تکرارپذیر بودن RAPD در شناسائی قارچهای بازیدیومیست را نشان دادند. بررسی تنوع ژنتیکی در جدایه‌های *R. solani* گروه‌های AG_1 تا AG_8 با استفاده از RAPD موثر و موفقیت‌آمیز بودن این تکنیک در متمایز نمودن گروه‌های AG را نشان داد (Tommerup *et al.* 1995).

در تحقیق حاضر چندشکلی DNA در گروه‌های آناستوموزی عمده بیماریزای *R. solani* جمع‌آوری شده از مزارع چغندرقند استان خراسان به کمک نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفته و امکان استفاده از آن جهت طبقه‌بندی جدایه‌ها در مقایسه با گروه‌های آناستوموزی که قبلا تعیین شده بود (Momeni 2002) مطالعه گردیده است.

روش بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

هشتاد و دو جدایه قارچ ریزوکتونیا از مناطق عمده چغندرکاری خراسان جمع‌آوری و پس از تعیین جدایه‌های چندهسته‌ای، آزمون بیماریزایی در دو مرحله گیاهچه‌ای و گیاهان بالغ ده هفته‌ای انجام شد و میزان آلودگی به صورت چشمی از ۰ تا ٤ رتبه‌بندی گردید (Momeni 2002). تنوع چند شکلی DNA جدایه‌های گروه‌های آناستوموزی AG_4 و AG_{2-2} که عوامل عمده مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقند در استان خراسان تشخیص داده شدند، مورد بررسی قرار گرفت.

ارتباط گروه‌های آناستوموزی با تنوع چندشکلی DNA جدایه‌های قارچ با استفاده از تعداد جدایه‌های مساوی از هر گروه آناستموزی (پنج جدایه از گروه AG_{2-2} و پنج جدایه از گروه AG_4) مورد بررسی قرار گرفت. ارتباط شرایط اقلیمی محل جمع‌آوری جدایه‌ها با تنوع چندشکلی DNA آنها بررسی شد. مشخصات جدایه‌های قارچ *R. solani* مورد بررسی در جدول ۱ آمده است.

به‌منظور استخراج DNA، جدایه‌های *R. solani* در محیط‌کشت مایع Potato Dextrose Broth (PDB) به مدت یک هفته کشت داده شدند. توده میسلیومی تولید شده با استفاده از پارچه ململ صاف شد. استخراج DNA از توده میسلیومی جدایه‌های قارچ مطابق روش CTAB انجام پذیرفت (Udupa *et al.* 1998). پس از سنجش کمی و کیفی DNA به‌ترتیب با روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز، در صورت برخوردار بودن از کمیت و کیفیت مناسب برای انجام واکنش‌های RAPD استفاده شد.

پس از بررسی بیش از ٤۰ آغازگر از سری آغازگرهایUBC، از هفت آغازگر به نام‌های UBC6، UBC53، UBC82، UBC196، UBC199، UBC222، UBC228 که چندشکلی خوبی در جدایه‌های این قارچ نشان می‌دادند، استفاده شد. واکنش‌های RAPD در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. مواد و ترکیبات استفاده شده از شرکت سیناژن تهیه گردید که شامل $MgCl_2$ 50mM (0.75µl)، 10x Buffer (2.5µl)، dNTPs Mix 1.25 mM (4µl)، primer 10mM (5µl)، DNA 20ng/µl (5µl)، *Taq* DNA Polymerase 1unit و ddH_2O (5.75µl) بود. شاهد منفی در واکنشها، شامل تمام موارد فوق به استثنای DNA الگو بود. چرخه‌های دمائی به‌کار رفته در جدول ۱- جدایه‌های مورد بررسی قارچ *Rhizoctonia solani* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

استان خراسان

Table 1. *Rhizoctonia solani* isolates collected from different parts of Khorasan province

شماره جدایه No. of Isolate	محل جمع‌آوری Location	گروه آناستوموزی Anastomosis Group
Tj6	تربت جام	AG_4
Tj13	تربت جام	AG_{2-2}
Ma4	مشهد	AG_4
Ma12	مشهد	AG_{2-2}
Fa1	فریمان	AG_4
Fa9	فریمان	AG_{2-2}
Ch1	چناران	AG_4
Ch2	چناران	AG_{2-2}
Ch3	چناران	AG_4
Ch5	چناران	AG_4
Ch6	چناران	AG_4
Ch10	چناران	AG_4
Th2	تربت حیدریه	AG_4
Th3	تربت حیدریه	AG_{2-2}
Th5	تربت حیدریه	AG_4
Th7	تربت حیدریه	AG_{2-2}
Th10	تربت حیدریه	AG_4

PCR شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤°C به مدت ۳ دقیقه و چهل چرخه شامل مراحل واسرشت سازی در دمای ۹٤ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۳۵ °C به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۳ دقیقه و در خاتمه یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه بود. چرخه‌های حرارتی فوق با استفاده از دستگاه

www.SID.ir

Archive of SID

Techne Genius Thermocycler انجام شد.

پس از اتمام عمل RAPD-PCR، ۱۰ میکرولیتر از تولیدات PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد و تحت ولتاژ ۷۵ و جریان ۵۰۰ میلی‌آمپر به مدت ۲/۵ ساعت الکتروفورز شدند. سایز مارکر Lambda DNA/Hind III EcoRIdigest استفاده شد. ژل الکتروفورز پس از نیم ساعت رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و ٤٥ دقیقه رنگ‌بری غیراختصاصی در آب مقطر توسط دستگاه Gel Documentation مشاهده و عکس‌برداری گردید.

با کمک نرم افزارPhotocapt MW الگوی باندهای DNA جدایه ها با هریک از آغازگرهای چندشکل مشخص شد و ماتریس صفر و یک بر اساس حضور (1) و عدم حضور (0) باند تشکیل شد. براساس این ماتریس صفر و یک و با کمک ضریب تشابه نئی (Nei.1978)، ماتریس فاصله ژنتیکی جدایه‌ها به دست آمد. تجزیه خوشه‌ای براساس روش مراتبی (Hierarchical Technique) و با استفاده از مدل جمع‌آوری (Agglomeration) در نرم‌افزار STATISTICA(Version5) انجام گرفته و دندروگرام قرابت ژنتیکی جدایه‌ها ترسیم شد. برای رسم دندروگرام از روش UPGMA استفاده گردید.

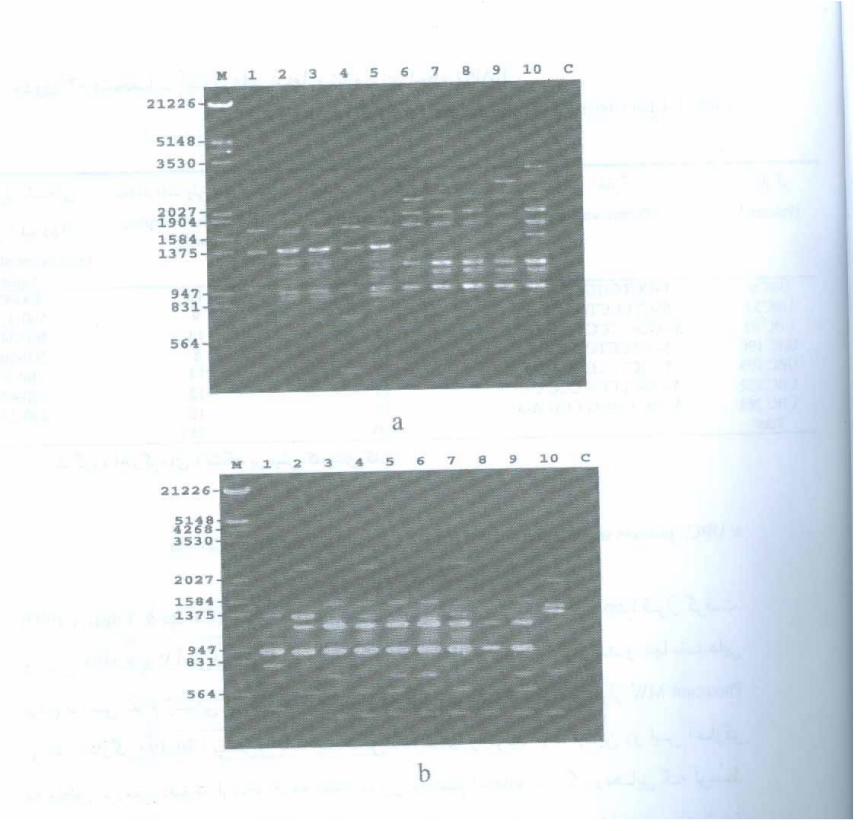
نتیجه و بحث

از میان ٤٠ آغازگر استفاده شده از سری آغازگرهای UBC، تعداد ۷ آغازگر در واکنش RAPD از DNA ده جدایه قارچ *R. solani* متعلق به گروه‌های آناستوموزی AG_{2-2} و AG_4 محصولات تکثیر شده چندشکل خوبی تولید کردند (شکل ۱). نام و مشخصات آغازگرهای به کار رفته به همراه تعداد باندهای تکثیر شده، باندهای چندشکل و نیز دامنه اندازه باندهای تولید شده در هر آغازگر در جدول ۲ نشان داده شده است.

تعداد کل باندهای تکثیر شده با ۷ آغازگر ۱۰۵ باند بود که از این تعداد ۷۸ باند چندشکل بودند. بدست آوردن این تعداد باند چندشکل تنها با ۷ آغازگر، بیانگر وجود تنوع ژنتیکی زیاد در درون و بین گروه‌های آناستوموزی *R. solani* است. این موضوع مؤید مطالعات محققین قبلی مبنی بر متنوع و پیچیده بودن درون گونه‌ای *R. solani* نیز می‌باشد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱- چندشکلی DNA حاصل از RAPD درجدایه‌های قارچ *Rhizoctonia solani* جمع‌آوری شده از مزارع چغندرقند استان خراسان توسط آغازگر UBC199 (a) وآغازگر UBC53 (b). ستون‌ها به‌ترتیب از چپ به راست: نشانگر با وزن مولکولی مشخص (Lambda DNA/Hind III EcoRI digest) (M) و جدایه‌های Tj13 (۱)، Ma12 (۲)، Fa9 (۳)، Tj6 (٤)، Th7 (٥)، Ch2 (٦)، Ma4 (۷)، Fa1 (۸)، Th2 (۹)، Th10 (۱۰) و شاهد منفی(C).

Fig. 1. RAPD products generated with primers UBC199(a) and UBC53(b) in isolates of *Rhizoctonia solani* collected from sugarbeet fields of Khorasan province.From left to right : size marker (Lambda DNA/Hind III EcoRI digest) and isolates Tj13(1), Ma12(2), Fa9(3), Tj6(4), Th7(5), Ch2(6), Ma4(7), Fa1(8), Th2(9), Th10(10) and negative control(c).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای استفاده شده برای انجام RAPD

Table 2. Characteristics of primers used for RAPD analysis

آغازگر (Primer)[a]	توالی آغازگر (Primer sequence)	تعداد باند تکثیر شده (No. of fragments amplified)	تعداد باند پلی مورفیک (No. of Polymorphic bands)	دامنه طول باندهای ارزیابی شده (bp) (size range of scorable bands)
UBC6	5'-CCTGGGCCTA-3'	17	12	400-450
UBC53	5'-CTCCCTGAGC-3'	15	9	500-3300
UBC 82	5'- GGG CCC GAG G-3'	15	13	500-3800
UBC 196	5'- CTCCTCCCCC-3'	11	8	300-3000
UBC 199	5'- GCTCCCCCAC-3'	20	14	100-300
UBC 222	5'- AAG CCT CCC C-3'	15	12	500-4500
UBC 228	5'- GCT GGG CCG A-3'	12	10	200-1500
Total	-	105	78	-

a. گروه آغازگرهای دانشگاه بریتیش کلمبیای کانادا

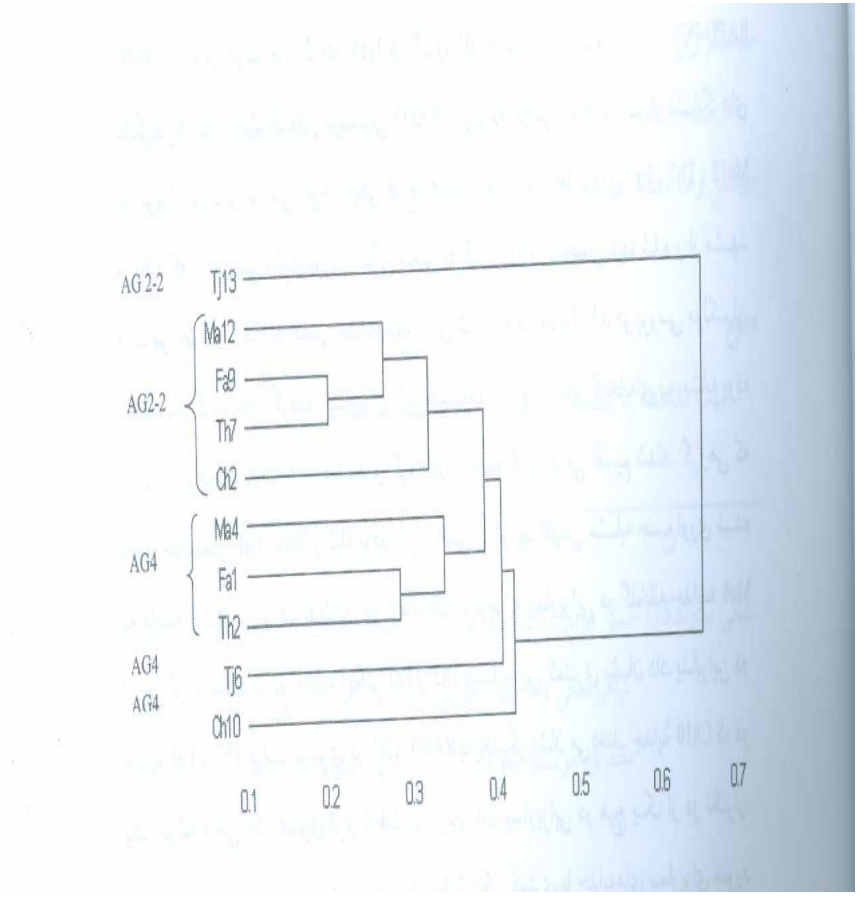
a: UBC, primers set of University of British Columbia, Vancouver, Canada

(Cubeta & Vilgalys 1997). اندازه محصولات تکثیر شده بین ۰/۲ –٤/٥ Kbp قرار گرفت. واکنش RAPD با ۷ آغازگر ذکر شده بر روی ۱۰ جدایه قارچ دو بار تکرار شد و تنها باندهایی برای بررسی تنوع ژنتیکی در نظر گرفته شدند که قابل خواندن توسط نرم افزار Photocapt MW بودند. آغازگر UBC199 بیشترین باند چندشکل (١٤ باند) را تولید کرد، از این رو این آغازگر به منظور بررسی دقیق‌تر ارتباط گروه آناستوموزی و اقلیم استفاده شد. گروه‌هایی که توسط بررسی RAPD مشخص شدند با گروه‌هایی که توسط بررسی آناستوموزی تشخیص داده شده بودند ارتباط نزدیکی را نشان دادند. این موضوع نشان می‌دهد که نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع بین گروه‌های آناستوموزی در *R. solani*، از توانایی و دقت کافی برخوردار بوده و قادر است علاوه بر تنوع ژنتیکی بین گروه‌ها، تنوع درون گروه‌ها را نیز که توسط بررسی‌های آناستوموزی قابل تشخیص نمی‌باشد، مشخص نماید. دندروگرام حاصل از داده‌های ترکیبی ۷ آغازگرمورد آزمایش، توانست تنوع درون گروه‌های آناستوموزی AG_{2-2} و AG_4 و نیز تنوع بین گروهها را نشان دهد (شکل ۲). در بررسی آناستوموزی که قبلا گزارش گردیده

www.SID.ir

Archive of SID

(Momeni. 2002) جدایه‌های Ch2 ، Th7، Fa9، Ma12 و Tj13 متعلق به گروه AG_{2-2} و جدایه‌های Fa1 ، Ma4 ، Ch10 ، Tj6 و Th2 متعلق به گروه AG_4 تشخیص داده شده بودند.



شکل۲- روش UPGMA جهت تجزیه خوشه‌ای باندهای حاصل از RAPD با استفاده از ۷ آغازگر در ۱۰ جدایه قارچ *Rhizoctonia solani* متعلق به گروه‌های AG_{2-2} (پنج جدایه) وAG_4 (پنج جدایه).

Fig. 2. UPGMA Cluster analysis of bands produced by RAPD using 7 primers on 10 isolates of *Rhizoctonia solani* belonging to AG_{2-2} (5 isolates)and AG_4(5 isolates) groups

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه Tj13 با وجود اینکه در بررسی‌های آناستوموزی همانند جدایه‌های Th7 ، Fa9 ، Ma12 و Ch2 درگروه AG_{2-2} قرارگرفته بود، در دندروگرام حاصل از نتایج RAPD بصورت مجزا مشاهده شد براساس نتایج حاصل از آزمون بیماریزایی در گلخانه خاصیت بیماریزایی این جدایه نسبت به بقیه جدایه‌های هم گروه، کمتر بود. جدایه Tj13 از نظرمیزان خسارت وارده به گیاه در آزمون بیماریزایی ۲ و بقیه جدایه‌های گروه AG_{2-2} ، ٤ برآورد شدند (Momeni 2002). دو بار بررسی آناستوموزی روی این جدایه با تمام گروه‌های AG استاندارد نشان داد که جدایه Tj13 گرچه با گروه AG_{2-2} واکنش آناستوموزی می‌دهد ولی با گروه‌های AG_3 و AG_5 نیز واکنش نشان می‌دهد. لذا این جدایه را باید جزو گروهی از ریزوکتونیاها دانست که با جدایه‌های گروه‌های مختلف ریزوکتونیا واکنش آناستوموزی می‌دهد و اصطلاحاً AGBI نامیده می‌شوند. قرار گرفتن Tj13 در گروه AGBI پس از انجام واکنش RAPD-PCR بیانگراین است که نشانگرهای مولکولی RAPD، ابزار دقیق‌تر و مناسب‌تر از نشانگرهای مورفولوژیکی برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *R. solani* هستند. جدایه‌های Fa9 ، Th7 ، Ma12 و Ch2 که در بررسی آناستوموزی همگی متعلق به گروه AG_{2-2} تشخیص داده شده و از مشهد و مناطق اطراف با شرایط اقلیمی مشابه جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱)، در بررسی مولکولی نیز در یک گروه جای گرفتند. بیماریزایی این جدایه‌ها در بررسی‌های گلخانه‌ای نیز مشابه بوده است (با درجه خسارت ٤). جدایه‌های گروه AG_4 به سه گروه فرعی تقسیم شدند. گروهی که شامل جدایه‌های Fa1، Ma4 و Th2 بودند، از مناطقی با شرایط اقلیمی مشابه جمع‌آوری شده که فاصله زیادی نیز از هم نداشتند. در آزمایشات مربوط به بیماریزایی در گلخانه جدایه Ma4 از این گروه نسبت به دو جدایه دیگر Fa1 و Th2 بیماریزایی کمتری نشان داد. بنابراین دو جدایه Fa1 و Th2 قرابت بیشتری در آنالیز RAPD با یکدیگر نشان می‌دهند. جدایهٔ Ch10 که در یک خوشه فرعی تک عضوی قرار گرفت در آزمایشات بیماریزایی در هیچ یک از دو تکرار، بیماریزایی نشان نداد. شاید به همین علت ارتباط ژنتیکی کمتری با جدایه‌های بیماریزای مورد بررسی داشته و در یک خوشه جداگانه قرارگرفته است. جدایهٔ Tj6 از گروه AG_4 در یک خوشه فرعی مستقل قرار گرفت. این جدایه از منطقه تربت‌جام جمع‌آوری شده است که نسبت به سایر مناطق که گروه‌های AG_4 این دندروگرام از آن شهرستان‌ها جمع‌آوری شده‌اند،

www.SID.ir

Archive of SID

از اقلیم گرم و خشک‌تری برخوردار بوده و دورتر قرار دارد. فاصله زیاد و تفاوت اقلیمی می‌تواند دلیلی بر جداشدن این جدایه از سایر جدایه‌های AG_4 باشد.

به‌منظور بررسی دقیق‌تر ارتباط شرایط اقلیمی محل پراکنش جدایه‌ها با چندشکلی DNA آنها، جدایه‌های جمع‌آوری شده از دو منطقه چناران و تربت حیدریه با استفاده از پرایمر UBC199 که بالاترین چندشکلی را ایجاد کرده بود، مطالعه گردید. در این مطالعه نیز مشاهده گردید که جدایه‌های مربوط به یک گروه آناستوموزی هرچند از دو منطقه جداگانه باشند در یک گروه (خوشه) جای می‌گیرند که موید نقش مهمتر گروه آناستوموزی در ایجاد تنوع می‌باشد.

سپاسگزاری

از مساعدت‌های شرکت تحقیقات چغندرقند خراسان و همکاری صمیمانه سرکار خانم مهندس رعنا دستجردی در انتشار این مقاله صمیمانه تشکرمی‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (217-215) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: حسن مومنی، دکتر ماهرخ فلاحتی‌رستگار و دکتر بهروز جعفرپور، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، دکتر جواد مظفری، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر، کرج

www.SID.ir