Archive of SID

مطالعه جمعیت‌های *Rhizoctonia solani* AG-1-IA جدا شده از برنج دراستان مازندران به کمک rDNA RFLP

Studies on populations of *Rhizoctonia solani* AG-1-IA isolated from rice by rDNA RFLP in Mazandaran Province

محمدعلی تاجیک‌قنبری*، حشمت‌اله رحیمیان و عزیزاله علیزاده

دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه مازندران و دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

دریافت ١٣٨٣/٩/١ پذیرش ٨٤/٦/٢

چکیده

به‌منظور ارزیابی چندشکلی نواحی حد فاصل ژن‌های ٢٨s و ١٨s در ژنوم قارچ عامل سوختگی غلاف برنج، ٥٤ جدایه *Rhizoctonia solani* AG-1-IA جدا شده از نواحی مختلف استان مازندران مورد ارزیابی قرار گرفتند. از جدایه ها DNA ١٠-١٠٠ ng/µl استخراج و از آنها به عنوان الگودر واکنش‌های PCR استفاده شد. نواحی هدف توسط جفت آغازگرهای ITS 4 و ITS 5 در ٢٥ چرخه گرمایی در PCR تکثیر شدند. ارزیابی محصولات PCR به کمک ژل اکریل‌آمید ٨٪ جدایه‌ها را به دوگروه عمده تقسیم کرد. در گروه اول (٧٢٪ جدایه‌ها) محصول از یک قطعه ٧٠٠ جفت بازی و در گروه دوم (٢٨٪جدایه‌ها) از سه قطعه با بزرگی ٧٠٠ ، ٨٥٠ و٩٥٠ جفت بازی تشکیل شده بود. آنزیم‌های برشگر *Eco*RI ,*Taq*I, *Xho*II ,*Hae*III دارای محل برش و *Xho*I , *Bam*HI و *Hind*III فاقد محل تشخیص و برش در محصولات PCR هر دو گروه بودند. هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم‌های برشگر فوق

* مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های *Rhizoctonia solani* AG-1-IA موجود در هر یک از گروه‌ها را یکسان منعکس کرد. براساس ارزیابی‌های نشانگر rDNA RFLP جمعیت قارچ عامل سوختگی غلاف برنج شامل دو زیر جمعیت با فراوانی ۲۸٪ و ۷۲ ٪ در مازندران است.

واژه‌های کلیدی: برنج، سوختگی غلاف، PCR، rDNA RFLP، *Rhizoctonia solani* AG-1-IA

مقدمه

Rhizoctonia solani Kühn به عنوان یک بازیدیومیست خاکزاد که گیاهان زراعی و غیرزراعی متعددی را مورد حمله قرار می‌دهد، تا حد زیادی مورد توجه بوده است. با گذشت قریب ۱۹۰ سال از توصیف دکاندول از قارچ رایزوکتونیا و انتشار مقاله‌های فراوان اذعان می‌شود که زوایای مختلف بیولوژی و تاکسونومی رایزوکتونیا همچنان ناشناخته است و از آن به عنوان *Rhizoctonia solani* species complex یاد می‌شود (Cubeta & Vilgalys 1997). تا دو دهه پیش موضوع غالب گزارش‌ها و مقاله‌ها تفاوت‌های مرفولوژیک، رفتار بیماریزایی، وسعت و دامنه میزبانی و همچنین پدیده همدهانی هیفی (Anastomosis) بود، اما با معرفی روش‌های بیوشیمیایی و ملکولی ابزارهای مدرن جایگزین روش‌های قدیمی‌تر مطالعه جمعیتهای رایزوکتونیا شدند. با آشکار شدن روابط پلی بین گروه‌های آناستوموزی (Anastomosis Groups = AGs) اعتبار گروه‌های آناستوموزی، مورد تردید واقع شد (Ogoshi 1996). به عقیده *آدامز* (Adams 1996) آناستوموز کمک شایانی به شناخت قارچ رایزوکتونیا به عنوان یک واحد تکاملی کرده است. بنا به نظر *کوبتا و یلگالیز* (Cubeta & Vilgalys 1997) گروه‌بندی آناستوموزی همچنان بزرگترین پیشرفت در شناخت تنوع ژنتیکی در داخل جنس رایزوکتونیا است.

نتایج بررسی‌های مولکولی محدوده گروه‌های آناستوموزی را تأیید و مشخص کرد (Vilgalys & Cubeta 1994; Kuninaga & Yokosawa 1982a,b; Carling *et al.* 1988; Vilgalys, 1988) . نشانگرهای مولکولی مانند هیبریداسیون DNA-DNA کمابیش أین مسئله را تأیید و بر تفکیک و اعتبار بیشتر گروه‌های آناستوموزی صحه گذاشتند (Carling & Kuninaga 1990, Vilgalys & Cubeta, 1994). جنبه‌های مختلف بیولوژی جنس *Rhizoctonia* به کمک

www.SID.ir

Archive of SID
نشانگرهای مولکولی مطالعه شده است (Cubeta &Vilgalys 1997; Sneh *et al.* 1996; Kuninaga *et al.* 2000 a,b). توالی‌هایی از DNA که RNAهای ریبوزومی را کد می‌کنند نواحی مناسبی جهت بررسی روابط فیلوژنیک و تاکسونومیک بین قارچ‌ها به‌حساب می‌آیند (Bruns *et al.* 1992). در قارچ‌ها ژن‌های ریبوزومی (rDNA) در داخل هسته و بر روی DNA میتوکندریایی قرار گرفته‌اند (White *et al.* 1990). ژن‌های ریبوزومی هسته‌ای در دو گروه ۱۸s ویژه زیر واحد ریبوزومی کوچک و ۵/۸s و ۲۸s ویژه زیرواحد بزرگ ریبوزوم قرارمی‌گیرند. فاصله بین قطعات ۱۸s و ۲۸s را دو قطعه فاصله ساز داخلی (ITS1 و ITS2) و یک قطعه ۵/۸ s پر کرده است (Cubeta *et al.* 1996).

روش‌های ملکولی متقاوتی برای مطالعه ژن‌های ریبوزومی *R. solani* مورد استفاده قرار گرفته است که از جمله آنها مقایسه برشهای قطعات حاصل از PCR و مقایسه توالی نواحی مختلف rDNA را می‌توان ذکر کرد (Keijer *et al.* 1996, Kuninaga *et al.* 2000 a ,b). در این راستا آغازگرهای اولیگو نوکلئوتیدی فراوانی طراحی و معرفی شده‌اند (Gardes & Bruns 1993, Vilgalys & Hester 1990, White 1990). نتایج بررسی‌های انجام شده در زمینه‌های چندشکلی rDNA در گروه‌های آناستوموزی *R.solani* وابستگی AGها به یکدیگر را تایید (Kuninaga *et al.* 2000a, Kanematsu & Naito 1995, Matsumoto *et al.* 1996 b)، و حتی روابط بین زیر گروه‌ها را نیز مشخص کرده است (Liu & Sinclair 1992, 1993). در مطالعات *لیو و سینکلر* (Liu & Sinclair 1993) روی ژن‌های ریبوزومی، طول قطعات ITS بین bp ۷۴۰–۶۳۰ در گروه‌های آناستوموزی مختلف به‌دست آمده است. Boysen و همکاران (1996) قرابت اعضای AG-4 *R. solani* را با مقایسه توالی نوکلئوتیدی ناحیه 5.8s – ITS ثابت نمودند. نتایج تجزیه وتحلیل‌های فیلوژنتیک آنها نشان داد که جدایه‌های AG-4 به سه گروه منطبق با توان بیماریزایی و پراکنش اکولوژیکی قابل تقسیم هستند. *کونیناگا* و همکاران (1997) با مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی کد کننده rDNA در ٤٥ جدایه از گروه‌های آناستوموزی و زیر گروه‌های مختلف نشان دادند که توالی‌های 5.8s rDNA شدیداً حفاظت شده هستند، اما تفاوت‌های قابل توجهی در نواحی حد فاصل آن با قطعات , 28s و18s (ITS) در بین جدایه‌ها وجود دارد. *کونیناگا* و همکاران (2000a) در بررسی بعدی روی نواحی مختلفITS و 5.8s

www.SID.ir

Archive of SID
rDNA در بین جدایه‌های AG-3 جدا شده از سیب‌زمینی نتایج مشابهی را بدست آوردند. این محققین (Kuninaga *et al.* 2000b) در بررسی جدایه‌های توتون که خصوصیات بینابین AG-BI و AG-2-1 را داشتند، وابستگی کامل جدایه‌های BI جدا شده از توتون با جدایه‌های 2-1 را با مقایسه توالی نواحی ITS – rDNA ثابت و با قاطعیت آنها را AG-2-1 معرفی کردند.

بیشتر مطالعات مولکولی رایزوکتونیا در سطح و در بین گروه‌های آناستوموزی بوده ولی درزمینه تنوع درسطح زیرگروه‌ها تحقیقاتی انجام نشده است. در بررسی حاضر ساختار جمعیت *R. solani* AG-1-IA به‌عنوان یک زیر گروه و یک جمعیت اختصاصی بیماریزا در برنج با نشانگر rDNA RFLP مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی

آماده‌سازی جدایه‌ها و استخراج DNA

جدایه‌های جمع‌آوری شده از نقاط مختلف استان مازندران (جدول ۱)روی محیط عصاره سیب‌زمینی- دکستروز (Potato dextrose broth) به مدت۵-۳ روز در دمای اتاق کشت و توده‌های میسلیومی از محیط جدا و با آب مقطر شستشو شدند. توده میسلیومی جدایه‌ها با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک وسپس پودرشده و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA براساس روش *کانی‌ماتسوونایتو* (1995) صورت گرفت. سی میلی‌گرم پودر خشک میسلیوم از هر جدایه به لوله‌های اپندورف ۲ میلی‌لیتری منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر با فرلیز کننده (50 mM Tris –HCl , pH = 7.2,1% 2-mercaptoethanol, 1% sodium N–lauryl–sarcosinate, 50 mM EDTA) به آنها اضافه و کاملاً مخلوط شد. لوله‌ها نیم ساعت در حمام آبگرم ٦٥ درجه سانتی گرادقرار گرفتند. پس از سرد شدن تا دمای محیط ۲۵۰ میکرولیتر فنل اشباع با تریس و سپس ۲۵۰ میکرولیتر مخلوط کلرفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ٢٤ به ١) به آنها اضافه و ۳۰-۱۵ دقیقه به آرامی زیر و رو شدند. لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ و رو نشین به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. بعد از اضافه کردن ۰/۱ حجم استات سدیم سه مولار با pH = ۵/۳ و ۰/٥٤ حجم ایزوپروپانول سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نمونه‌ها به مدت دو ساعت تا یک شب در ۲۰ - درجه سانتی‌گراد

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری شدند. لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شـده و رسـوب بـا اتـانول ۷۰ % شسته شد. بعد از خشک کردن در دمای محیط، رسوب در ۵۰µl بافر Tris , 2mM EDTA 10 mM سترون حل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۱- فهرست جدایه‌های *Rhizoctonia solani* AG-1-IA مورد استفاده و محل جمع‌آوری

Table 1. List of isolates of *Rhizoctonia solani* used and sites of collection

Isolate No.	Place collected	Isolated from	Isolate No.	Place collected	Isolated from
13	Amir kola	Sheath	350	Noor-4	Sheath
26	AB –FR *	Sheath	361	Noor – 10	Leaf
44	Amol -28	Sheath	365	Noor-4 -2	Sheath
50	Behshahr-9	sheath	373	Rooyan -2	Sheath
53	Behshahr -15	Sheath	378	AF-O -1 **	Sheath
62	Behshahr -27	Sheath	381	AF-O-4	Seed
73	Jouybar -5	Seed	389	Salmanshahr -1	Sheath
78.1	Jouybar -14	Sheath	400	FD -3***	Sheath
95	Amirkola-18	Sheath	401	FD-4	Sheath
108	Semeskandeh-60	Sheath	403	Ghaemshahr -1	Sheath
201	Mahmoodabad-2	Sheath	405	Ghaemshahr-3	Sheath
204	Panhashahr-1	Sheath	411	Kiakola -2	Sheath
208	Panhashahr-5	Sheath	414	Kiakola -5	Sheath
231	Noushahr-forest-6	Sheath	416	Kiakola-Jouybar-1	Sheath
235	Noushahr-3	Sheath	418	Kiakola-Jouybar-3	Sheath
241	Noushahr-2	Sheath	421	Darvishkheil	Sheath
245	Noushahr-6	Sheath	434	Babol-Balamaleh- 1	Sheath
253	Sardabrood -8	Sheath	438	Balamaleh-River	Sheath
256	FR-A +	Sheath	448	Balamaleh – Dam	Sheath
268	Hachrood -8	Sheath	466	Babol – Hajikola -1	Sheath
271	Aseram-1	Leaf	469	Amol-Khatib	Seed
311	Amol-Chamestan -2	Sheath	477	Babol-Delavarkola-2	Leaf
323	Freydoonkenar-2	Sheath	484	Babol-Doonehsar	Sheath

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1. (contined) جدول ۱– (ادامه)

329	Freydoonkenar-8	Sheath	R-5	Vajargah-5	Leaf
335	Freydoonkenar-14	Leaf	R-12	Kelachay-3	Sheath
338	Mahmmodabad-Glan-2	Sheath	R-22	Hasansara-1	Sheath
G-23	Gorgan-Kordkouy-5	Sheath	R-29	Langrood-3	sheath

AB-FR*=Amol –Babol road ,Freydoonkenar branch , AF-0-1** = Between Amol and Freydoonkenar-Oujiabad, FD-3*** = Freydoonkenar toward Darvishkheil , FR-A+= Freydoonkenar toward Amol

برای تعیین غلظت و خلوص نسبی DNA استخراج شده از ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. سه میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده بهمراه یک میکرولیتر محلول حاوی رنگ (برم فنل بلو٪ ۰/۰۹ ، EDTA ٦٠ mM و٪ ٦٠ گلیسرول) و دو میکرولیتر آب مقطر به چاهک‌های ژل انتقال داده و الکتروفورز در سیستم بافری TBE(9mM Tris,9mM Boric acid , 2mM EDTA pH 8.8) در ولتاژ ٦٠ ولت به مدت دو ساعت انجام شد. جهت ارزیابی غلظت از DNA خالص فاژλ با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر و هم حجم با نمونه‌های DNA استفاده شد. ژل در محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و غلظت نسبی DNA استخراج شده در مقایسه با غلظت DNA فاژλ تعیین گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)

تکثیر قطعات rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. مخلوط واکنش PCR شامل ۲/۵ µl از PCR buffer 10X ، ۰/۷۵ µl از $MgCl_2$ ۵۰ mM، ۰/۵ µl از dNTP Mix ۱۰ mM ، ۰/۲ µl از *Taq* DNA polymerase ۵u/µl، ۱µl از آغازگر بالادست (ITS5 با توالی ’GCGG-3 5’- CGTAGGTGAACCT)با غلظت µ ۱۰ ng/ ،۱µl از آغازگر پائین دست (ITS4 با توالی-`5 `TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) با غلظت µl ۱۰ ng / و µl ۱۸/۰۵ آب مقطر دیونیزه دوبار تقطیر و سترون برای هر واکنش بود. بعد از اضافه کردن µl ۱ از DNA هر جدایه به عنوان الگو یک لایه روغن معدنی به سطح مخلوط واکنش افزوده شده و لوله‌ها به ترموسایکلر (Biometra-Personal Cycler) منتقل شدند. برنامه PCR شامل: ^{C} ° ۹٤ به مدت ۱۰ دقیقه و۲۵

www.SID.ir

Archive of SID
چرخه ^{C} ° ٩٤ به مدت ١ دقیقـــه، ^{C} ° ٦٠ به مدت ١دقیـــــقه، ^{C} ° ٧٢ به مدت ١ دقیقـه ویـک مرحله گسترش نهایی ^{C} ° ٧٢ به مدت ١٠ دقیقه بود.

ارزیابی محصول PCR

ارزیابی محصول PCR روی ژل اکریلامید ٨٪ انجام شد. دو و نیم میکرولیتر از محصول هر یک از واکنش‌ها به همراه µl ١محلول حاوی رنگ و µl ٢/٥ آب مقطر به چاهک‌های ژل منتقل و الکتروفورز در بافر TBE و ولتاژ ١٠٠ ولت به مدت ٣/٥ ساعت انجام شد. از قطعـات ژنـوم فاژ λ هضـــم شده با , *Hind* III و*Eco* RI به عنوان نشانگر وزن مولکولی اسـتفاده شـد. ژل در محلول اتیدیوم بروماید (µg /ml ٠/٥)به مدت ٢٠ دقیقه رنگ‌آمیـزی و پـس از انتقـال بـه آب مقطر از آن عکس گرفته شد.

٥- هضم محصول PCR

از آنزیم‌های برشگر *Bam* HI, *Taq* I , *Hae* III , *Xho* I, *Xho* II, *Eco RI* و *Hind* III برای هضم قطعات DNA تکثیر شده استفاده شد. هر واکنش هضـم شـامل ١٠ میکرولیتـر محصـول PCR، ١١/٥ میکرولیتر آب مقطرسترون دوبار تقطیر، ٢/٥ میکرولیتر بافر واکنش X ١٠ مخصوص هـر آنزیم برشی و یک واحدآنزیم برشی (با غلظت 1u/µl)بود. هضم بمدت یک ساعت در C ° ٣٧ (واکنش‌های *Taq* I درC ° ٦٥) انجام و نمونه‌های هضم شده تا زمان الکتروفـورز در C ° ٢٠- نگهداری شدند.

ارزیابی و مقایسه محصولات هضم

ده میکرولیتر از محصول هضم بهمراه µl ٢ رنگ در چاهک‌های ژل اکریل آمید٪ ٨ ریخته شده و الکتروفورز در جریان ٦٠ ولت به مدت ٤ ساعت انجـام گردیـد. از پلازمیـد pBR 322 برش داده شده با آنزیم *Hae* III به عنوان نشـانگر وزن مولکـولی اسـتفاده شـد. ژل سـپس در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد.

نتیجه

استخراج DNA

از جدایه‌های مختلف *Rhizoctonia solani* AG-1-IA بین ng ١٠٠ - ١٠ DNA به‌دست آمـد

www.SID.ir

Archive of SID
که از آنها به عنوان الگو در واکنش‌های PCR استفاده شد. به‌منظور خلوص بیشتر DNA مرحله فنل-کلرفرم بین ۲ تا ۵ بار تکرار و در مواردی از فقط فنل و در انتها یک مرحله کلرفرم نیز استفاده شد. رسوب با اتانول ۹۶ درصدیا مطلق بسیار بیشتر از ایزوپروپانول بود ولی محصول بدست آمده در غالب موارد قابل تکثیر نبود و ایزوپروپانول برای رسوب‌دهی نهایی DNA نتیجه بهتری در موفقیت تکثیر با PCR داشت.

واکنش زنجیره پلیمراز (PCR)

با الکتروفورزمحصول تکثیرشده از DNA جدایه‌های مختلف با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 روی ژل آگارز٪ ۱ یک قطعه DNA با اندازه یکسان دیده شد. الکتروفورز محصول روی ژل اکریلامید منجر به متمایز گردیدن جدایه‌ها به دو گروه گردید. در گروه اول قطعات تکثیر شده تنها حاوی یک باند DNA با بزرگی تقریبی ۷۰۰ جفت بازی و در گروه دوم سه قطعه ۷۰۰ ، ۸۵۰ و ۹۵۰ جفت بازی بود (شکل ۱).

مقایسه اثر آنزیم‌های برشگر روی محصول DNA

در تیمار محصولات PCR با آنزیم‌های برشگر، آنزیم‌های *Eco*RI ، *Xho*II ، *Taq*I و*Hae*III روی قطعات ۷۰۰ ،۸۵۰ و۹۵۰ جفت بازی جدایه‌های گروه‌های یک و سه باندی محل تشخیص و برش داشتند ولی آنزیم‌های *Bam*HI , *Hind*III , *Xho*I فاقد محل شناسایی و برش بودند. نتایج به دست آمده از تیمار محصول با آنزیم‌های هضم‌کننده به شرح زیر می‌باشد:

محصول برش با آنزیم *Taq* I

در هضم DNA تکثیر شده، در جدایه‌های مختلف با *Taq* I محصول هضم شده در جدایه‌های گروه یک باندی به سه قطعه شکسته شد. این سه قطعه در تمامی جدایه‌های گروه یک باندی مشابه بود. با مقایسه طول قطعات حاصله با نشانگر وزن مولکولی مشخص گردید که سه قطعه به ترتیب۵۰ ، ۳۰۰ و ۳۵۰ جفت باز هستند. محصول DNA جدایه‌های گروه سه باندی نیز توسط *Taq* I بریده شده و از هر سه قطعه (قطعه‌های ۸۵۰،۷۰۰ و۹۵۰ جفت بازی) قطعات کوچکتری به‌دست آمد. نقوش باندهای به‌دست آمده بین جدایه‌های این گروه یکسان بوده و تفاوتی بین جدایه‌ها مشهود نبود. باند۷۰۰ جفت بازی قطعه‌های ۵۰،۳۰۰ و۳۵۰ جفت بازی، مشابه محصول گروه یک باندی، باند۸۵۰ جفت بازی قطعه‌های ٤۰۰ و ٤۵۰ جفت بازی

www.SID.ir

Archive of SID
و باند ۹۵۰ جفت بازی دو قطعه ٤۰۰ و ۵۵۰ جفت بازی را تولید کردند (شکل۲).

محصول برش با آنزیم *Xho* II

با هضم DNA تکثیری جدایه‌های مختلف گروه یک باندی آنزیم *Xho*II سه قطعه متفاوت با اندازه‌های به ترتیب ۵۰۰ ، ۳۰۰ و ۲۰۰ جفت باز به‌دست آمد. بین نقوش باندهای جدایه‌های مختلف تفاوتی دیده نشد. در جدایه‌های سه باندی نیز باند اول (باند ۷۰۰ جفت بازی)به سه قطعه با اندازه‌های یاد شده شکسته شد. باندهای ۸۵۰ و۹۵۰ جفت بازی این گروه هر یک به دو قطعه تبدیل شدند. طول قطعه‌های حاصل از باند۸۵۰ جفت بازی ۲۰۰ و ٦۵۰ جفت باز وقطعه‌های به‌دست آمده از باند ۹۵۰ جفت بازی ۲۰۰ و ۷۵۰ جفت بازی بود. نقوش باندهای حاصل از هضم *Xho*II کاملاً مشابه بوده و تفاوتی در بین جدایه‌های گروه سه باندی مشاهده نگردید.

محصول برش با آنزیم *Hae* III

در هضم محصول PCR جدایه‌های گروه یک باندی با آنزیم *Hae* III سه قطعه با اندازه متفاوت تولید شد. طول قطعات حاصله در تمامی جدایه‌های این گروه مشابه بوده و تفاوتی بین جدایه‌ها مشاهده نگردید. باندهای حاصل ۷۰ ، ۱۲۰ و ۵۰۰ جفت باز طول داشتند. در جدایه‌های گروه سه باندی نیز محصول هضم باندهای۷۰۰ ، ۸۵۰ و۹۵۰ جفت بازی سه قطعه متفاوت بود. باند ۸۵۰ جفت بازی به سه قطعه ۸۰ ، ۱۲۰ و ٦۵۰ جفت بازی و باند۹۵۰ جفت بازی به قطعات ۸۰ ، ۱۲۰ و ۷۵۰ جفت بازی شکسته شده بود. نقوش باندهای حاصل از هضم در تمامی جدایه‌های گروه سه باندی یکسان بود (شکل ۳).

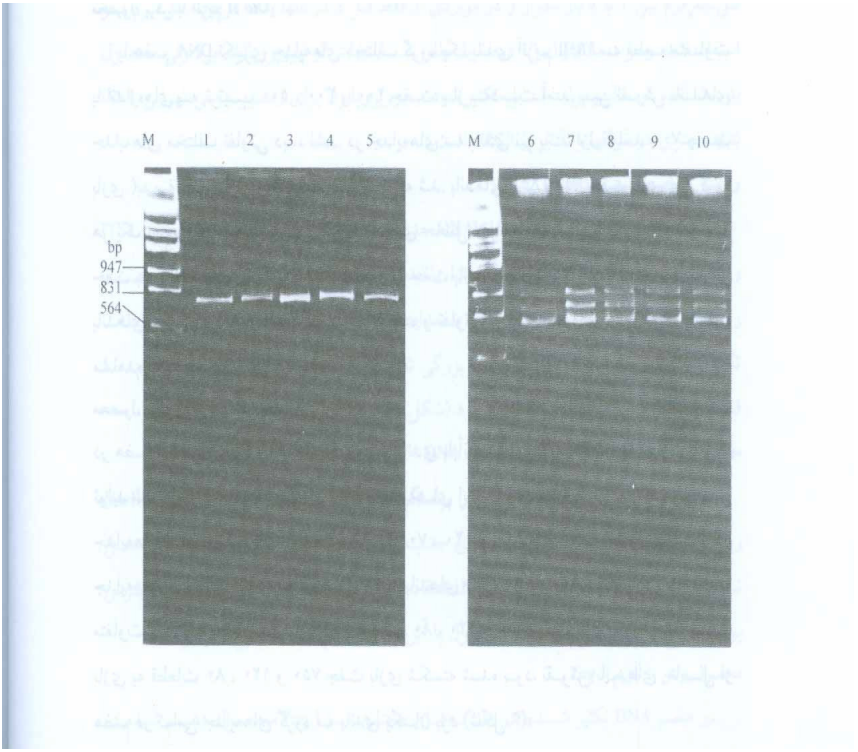
محصول برش با آنزیم *Eco*RI

در نتیجه هضم آنزیمی باند ۷۰۰ جفت بازی محصولات PCR جدایه‌های گروه یک باندی با آنزیم *Eco* RI دو قطعه با طول متفاوت به دست آمد. باندهای حاصل درتمام جدایه‌ها ٦۵۰ و ٤۰۰ جفت باز طول داشته نقوش آنها بین تمام جدایه های گروه یکسان بود.

باند ۷۰۰ جفت بازی جدایه‌های گروه سه باندی نیز پس از هضم با *Eco*RI محصولاتی مشابه یک باندی‌ها تولید وبین جدایه‌ها نیز تفاوتی نشان نداد. باند ۸۵۰ جفت بازی جدایه‌های گروه سه باندی دو قطعه با طول متفاوت ایجاد کرد. قطعه‌های ناشی از هضم ۷۵۰ و ٤۵۰

www.SID.ir

Archive of SID

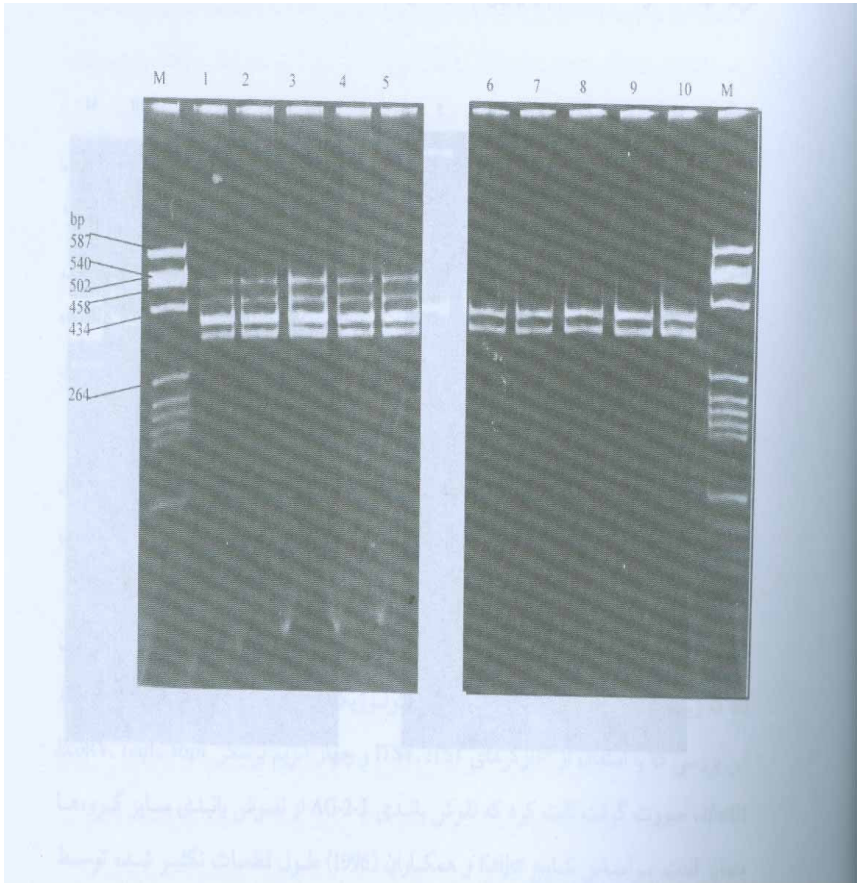


شکل ۱- نقـوش بانـدهای محصـولات PCR تکثیـر شـده بـا آغازگرهـای ITS 4 و ITS 5 جدایـه‌هـای *Rhizoctonia solani* AG1-IA جداشده از برنج ازنواحی شمالی ایران روی ژل اکریـل آمیـد ۸٪ رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. چاهک‌های ۱تـا ۱۰ بـه ترتیـب مربـوط بـه جدایـه‌هـای ۲۶،۱۳،۶۳ ، ۹۵ ، ۱۰۸ (گروه یک باندی) و۲۰۴ ،۲۰۸ ،۲۳۱،۲۳۵ ، ۲۴۱ (گروه سـه بانـدی) و M شاخص وزن مولکولی (DNA فاژ λ هضم شده با *Eco*RI و*Hind*III) هستند.

Fig. 1. Electrophoretic patterns of PCR products from *Rhizoctonia solani* AG1-IA isolates of rice on 8% polyacrylamide gel stained with Et-Br. Isolates lanes 1, isolate13; 2, isolate26; 3 isolate,63; 4, isolate 95; 5, isolate 108; 6, isolate 204;7, isolate 208; 8, isolate 231;9, isolate 235;10 , isolate 241, M lanes lambda DNA *Eco*RI, *Hind*III digest as molecular weight marker.

www.SID.ir

Archive of SID

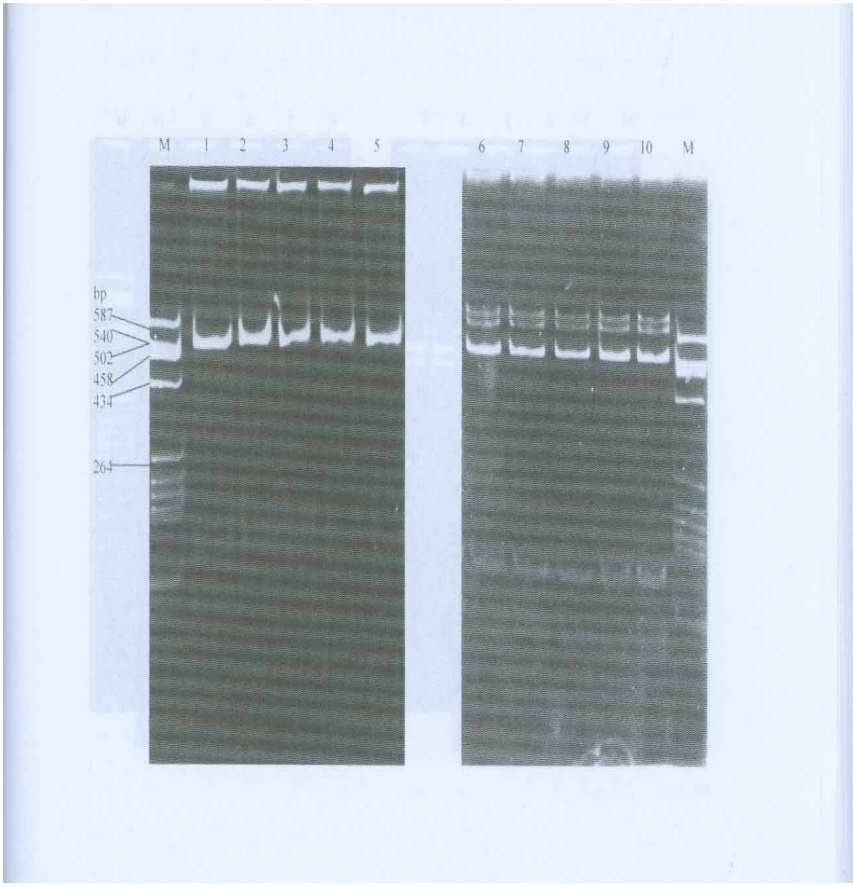


شکل ۲- نقوش باندهای محصولات PCR جدایه‌های AG1-IA *Rhizoctonia solani* جداشده از برنج از نواحی شمالی ایران هضم شده با آنزیم برشگر *Taq*I روی ژل اکریل آمید ۸٪ رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. چاهک‌های ۱تا ۱۰ به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های ۱۳،۲۶، ۶۳، ۹۵، ۱۰۸ (گروه یک باندی) و ۲۰۴، ۲۰۸، ۲۳۱،۲۳۵ ، ۲۴۱ (گروه سه باندی) وM شاخص وزن مولکولی DNA پلازمید pBR322 هضم شده با *Hae*III هستند.

Fig. 2. Electrophoretic patterns of *Taq*I digested PCR products from *Rhizoctonia solani* AG1-IA isolates of rice on 8% acrylamide stained with Et-Br. Isolates lanes: 1,isolate13; 2, isolate26; 3 isolate,63; 4, isolate 95; 5, isolate 108; 6, isolate 204;7, isolate 208; 8, isolate 231; 9, isolate 235;10, isolate 241, M lanes pBR322 *Hae*III digest as molecular weight marker.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- نقوش باندهای محصولات PCR جدایه‌های AG1-IA *Rhizoctonia solani* جداشده از برنج از نواحی شمالی ایران هضم شده با آنزیم برشگر *Hae*III روی ژل اکریل آمید ۸٪ رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. چاهک‌های ۱تا ۱۰ به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های ۱۳،۲۶، ۶۳، ۹۵، ۱۰۸ (گروه یک باندی) و ۲۰۴، ۲۰۸، ۲۳۱،۲۳۵ ، ۲۴۱ (گروه سه باندی) و M شاخص وزن مولکولی DNA پلازمید pBR322 هضم شده با *Hae*III هستند.

Fig. 3. Electrophoretic patterns of *Hae*III digested PCR products from *Rhizoctonia solani* AG1-IA isolates of rice on 8% acrylamide stained with Et-Br. Isolates lanes: 1,isolate13; 2, isolate26; 3 isolate, 63 ; 4, isolate; 5, isolate; 6, isolate 204;7, isolate 208; 8, isolate 231; 9, isolate 235;10, isolate 241, M lanes pBR322 *Hae*III digest as molecular weight marker.

www.SID.ir

Archive of SID
جفت باز بود. حاصل هضم باند ۹۵۰ جفت بازی نیز دو قطعه باند با اندازه متفاوت بود که طول آنها ۸۵۰ و ۵۵۰ جفت باز و بین جدایه‌های مختلف یکسان بود.

بحث

هدف از این مطالعه بررسی تنوع جدایه‌های عامل شیت بلایت برنج براساس چند شکلی احتمالی در نواحی ژن‌های ریبوزومی بود. مطالعه چند شکلی ومقایسه توالی‌های مربوط به نواحی کد کننده اجزاء ریبوزوم به عنوان یک نشانگر قابل اعتماد جهت بررسی‌های فیلوژنتیکی جمعیت‌ها و زیرگروه‌های رایزوکتونیا توسط محققین متعددی انجام شده است، (Matsumoto & Matsuyama 1998, Kanematsu & Naito 1995, Liu & Sinclair 1992, Kuninaga *et al*., 2000a, Matsumoto *et al.* 1996 a, b 1997).

عمده بررسی‌ها با مطالعه چندشکلی نواحی مختلف ژن‌های ریبوزومی با آنزیم‌های برشگر صورت گرفته اما مقایسه توالی نوکلئوتیدی قطعات فوق (Kuninaga *et al.* 2000a, b, 1997, Boysen *et al.* 1996) نیز در سال‌های اخیر انجام گرفته است. مقایسه زیرگروه جدیدی از AG-2 جدا شده از برگهای سویا با زیرگروه‌های پیشین آن نشان داد که زیرگروه AG-2-3 یک زیرگروه مستقل اکولوژیکی است (Kanematsu & Naito 1995). این بررسی که با استفاده از آغازگرهای ITS1 , ITS4 و چهار آنزیم برشگر *Eco*RV, *Taq*I , *Msp*I *Hae*III، صورت گرفت ثابت کرد که نقوش باندی AG-2-3 از نقوش باندی سایر گروه‌ها متمایز است. براساس نتایج Keijer و همکاران (1996) طول قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای ITS1 , ITS4 در داخل گروه‌های آناستوموزی یکسان ولی بین آن‌ها متفاوت بود. آن‌ها با استناد به همین خصوصیت گروه‌های آناستوموزی را گروه‌های مجزای ژنتیکی دانستند. همچنین براساس نتایج هضم محصولات PCRبا آنزیم *Eco*RI دو گروه AG-1 و AG-2 با گروه بندی آن‌ها براساس آناستوموز منطبق بود. در تحقیق دیگری با استفاده از آغازگرهای , ITS1 ITS4 و ده آنزیم برشگر، چندشکلی قطعات تکثیری در بین زیرگروه‌های AG-2 مشخص گردید. طول قطعات تکثیری بین گروه‌های درون گونه‌ای 2A , 2E ۰/٦۹ کیلوباز و گروه‌های درون گونه‌ای2B , 2C, 2D، ۰/۷٤ کیلوباز بود. همچنین پنج آنزیم برشگر

www.SID.ir

Archive of SID
*Pst*I , *Xhn*I , *Kpn*I , *Eco*RV , *Bam*HI روی قطعات تکثیری AG-2 فاقد محل تشخیص و برش بودند (Liu & Sinclair 1992).

ماتسوموتو و همکاران (1996 b) با تکثیر ژن‌های ریبوزومی28S گروه‌های مختلف آناستوموزی *R. solani* و هضم با چهار آنزیم برشگر (*Hpa*II , *Hha*I , *Hae*III , *Bam*HI) چند شکلی درجدایه‌های گروه‌های آناستوموزی مختلف را نشان دادند. در بین جدایه‌های مورد استفاده آن‌ها ۵ جدایه متعلق به AG-1-IA جدا شده از برنج وجود داشت که همه نقوش باندی یکسان داشتند.

کونیناگا و همکاران (1997) با مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS در بین و در داخل گروه‌های آناستوموزی مختلف وجود تفاوت‌ها و شباهت‌هایی را آشکار ساختند. در تمامی گروه‌های آناستوموزی مطالعه شده طول قطعه 5.8S ثابت و از ۱۵۵ باز تشکیل شده بود، اما طول نواحی ITS بین گروه‌های آناستوموزی‌ها بسیار متنوع، ولی در داخل یک گروه‌های آناستوموزی یا یک زیرگروه (از جمله 1-IA) نسبتاً ثابت و با تفاوت در حد چند نوکلئوتید بود. در گروه‌بندی خوشه‌ای AG-1 یک گروه خواهری کاملاً متمایز از سایر AGها را از نظر توالی نوکلئوتیدی تشکیل داد.

ماتسوموتو و همکاران (1996,b) در بررسی دیگر چندشکلی بین ٤ گونه رایزوکتونیا (*R. solani* AG-1-IA, *R. oryzae* ,*R. oryzae-sativae, R. fumigata* و AG-2-2IIIB) بیماریزا روی غلاف برنج را با استفاده از آغازگر و آنزیم‌های متعدد نشان دادند. در این بررسی نیز جدایه‌های متعلق به AG – 1-IA از نقوش باندی یکسانی برخوردار بودند.

ماتسوموتو و همکاران (1997 a ,b,c) در تلاشی برای آشکارسازی و شناسایی قارچ‌های مختلف عامل بیماری‌های برنج در داخل گیاه موفق شدند عامل شیت بلایت را به کمک PCR و آغازگرهای مناسب به سادگی تشخیص دهند. نقوش باندی حاصل از هضم قطعات تکثیر شده توسط آنزیم های برشگر یکسان بود.

در تحقیق حاضر چندشکلی نواحی ITS5 , 5.8 S r DNA وITS4 توسط آنزیم‌های برشگر انتخابی بررسی شد. محصول PCR ٥٤ جدایه با یکدیگر مقایسه شده و براین اساس جدایه‌ها به دو گروه یک باندی و سه باندی تقسیم شدند. در گروه یک باندی یک قطعه با طول

www.SID.ir

Archive of SID
bp ۷۰۰ تکثیر شد که طول آن با قطعه تکثیر شده توسط *لیووسینکلر* (1992)از زیرگروه‌های Boysen , AG – 2 و همکاران (1996) از زیرگروه‌های AG-1 بسیار نزدیک بود. در گروه سه باندی علاوه بر باند bp ۷۰۰ دو قطعه دیگر با اندازه تقریبی ۸۵۰ و ۹۵۰ جفت باز نیز مشاهده گردید. نقوش حاصل از هضم آنزیمی هر یک از باندهای سه گانه خاص همان آنزیم بود .هضم محصولات PCR گروه‌های یک و سه باندی با آنزیم‌های *Taq*I و *Hae* III قطعاتی را تولید کرد که مجموع اندازه‌های آنها معادل محصول PCR هضم نشده هر یک از گروه‌ها بود. نتایج حاصل از هضم آنزیم‌های *Xho*II و *Eco*RI با نتایج بدست آمده از دو آنزیم قبلی متفاوت بود. نتایج برش با *Xho*II نشان داد که صرف نظر از طول یکسان زنجیره‌های ۷۰۰ جفت بازی محصولات PCR زنجیره‌های تکثیری به دو دسته قابل تقسیم هستند. دسته اول دارای یک محل تشخیص و برش برای *Xho*II وقطعات ۵۰۰ و ۲۰۰ جفت بازی ودسته دوم دارای دو محل تشخیص و برش و سه قطعه ۲۰۰ و ۲۰۰ و ۳۰۰ جفت بازی تولید کردند. به این ترتیب محصول نهایی هضم قطعه‌های ۲۰۰و۳۰۰و۵۰۰ جفت بازی بود.

هضم باندهای سه گانه با *Eco*RI وجود بیش ا زیک دسته زنجیره تکثیری در محصولات PCR را تآیید کرد. باند ۷۰۰ جفت بازی دو سری محصول هضم داشت. سری اول شامل فقط یک قطعه ٤۰۰ جفت بازی بودکه به نظر می‌رسد ۳۰۰ جفت باز باقیمانده آن به‌طور کامل هضم شده باشد. به همین ترتیب باقیمانده هضم زنجیره‌های سری دوم نیز ٦۵۰ جفت باز بود. در هر دو مورد باقیمانده قطعات حاصل از هضم توسط ژل اکریل آمید ٪۸ قابل آشکارسازی نبود. این توضیح علت ایجاد محصولات هضم ٤۵۰ و ۷۵۰ جفت بازی از محصول PCR ۸۵۰ جفت بازی و ۸۵۰ و۵۵۰ جفت بازی از باند ۹۵۰ جفت بازی را به سادگی بیان می‌کند.

از آنجا که باندهای ۸۵۰ و ۹۵۰ جفت بازی تفاوت مختصری بین ۲۵۰ – ۱۵۰ جفت باز با باند مشترک ۷۰۰ جفت بازی دارند و از طرفی محدوده تکثیری آن‌ها توسط آغازگرهای یکسان شناسایی و تکثیر شده است، احتمال دارد در قسمتهای میانی آن‌ها قطعاتی با توالی‌های تکراری وجود داشته باشد. این قطعه تکراری می‌تواند یک نسخه از rDNA 5.8S یا یک tRNA در حد فاصل بین دو ITS باشد.

آنچه که از بررسی‌های انجام شده تا به امروز روی نواحی ژن‌های ریبوزومی *R. solani* به

www.SID.ir

Archive of SID

دست آمده نشان دهنده وجود تفاوتهای قابل توجه در بین گروه‌های آناستوموزی و بـه میـزان کمتربین زیر گـروه‌هـا بـوده اسـت (Keijer *et al.* 1996, Matsumoto *et al.* 1997 Kanematsu & Naito 1995, Kuninaga *et al.* 1997). نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد درداخل زیرگروه مطالعه شده تفاوت‌ها به حداقل رسیده و شباهت افراد به ۱۰۰٪ نزدیـک مـی‌شـود. مطالعـاتی از ایـن دست درجمعیتهای داخل زیر گروه‌های سایر گروه‌های آناستوموزی نیز قابل پیگیری است. بنا به نظر *کونیناگا* (1996) شواهد کافی برای معرفی گروه‌های آناسـتوموزی *R. solani* به‌عنوان گونه‌های مستقل موجوداست اما برای أین تبدیل بایستی تـا ارائـه دلایـل بیشـتر منتظـر مانـد. بررسی‌های مولکولی در داخل زیر گروه‌ها و ارائه نتایجی از قبیل آنچه که در أیـن تحقیـق بـه دست آمده است می‌تواند کمک شایانی به معرفی گروه‌هـای آناسـتوموزی *R. solani* بـه‌عنـوان گونه‌های جدید رایزوکتونیا بنماید.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (222-219) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: محمدعلی تاجیک‌قنبری، حشمت‌اله رحیمیان و عزیزالـه علیـزاده، دانشـکده علوم کشاورزی دانشگاه مازندران و دانشکده کشـاورزی دانشـگاه تربیـت مدرس

www.SID.ir