بررسی مولکولی و فیلوژنتیکی جدایه‌های جنس *Rhizopus* بر اساس منطقه ITS و مناطق D1-D2 از DNA ریبوزومی*

MOLECULAR AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Rhizopus* ISOLATES BASED ON IT'S REGION AND D1-D2 REGIONS OF rDNA

پریسا محمدی[1]**، حسن‌رضا اعتباریان[1]، رسول زارع[2] و محسن ابراهیمی[3]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۷/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۱)

چکیده

سی و هفت جدایه از جنس *Rhizopus* به دست آمده از میزبان‌های مختلف در استان‌های تهران، آذربایجان غربی، یزد و کردستان جهت مطالعات تاکسونومیکی مورد بررسی قرار گرفتند. منطقه ITS شامل ژن 5.8S و مناطق D1-D2 مربوط به DNA ریبوزومی با استفاده از جفت آغازگرهای ITS1/NL4 تکثیر شدند. محصولات تکثیر شده توسط PCR با استفاده از آنزیم‌های برشی *Hae*III، *Rsa*I، *Hinf*I و *Msp*I مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند و هفت جدایه نماینده، انتخاب شده و توالی‌یابی شدند. توالی‌های به دست آمده با ۲۳ توالی از بانک ژن مقایسه شدند. براساس آنالیز فیلوژنتیک و محاسبه فاصله ژنتیکی جدایه‌های *Rhizopus* در سه گروه قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده، سه گونه شناسایی شد: *R. lyococcus* ، *R. stolonifer* var. *stolonifer* و *R. oryzae*. گونه *R. lyococcus* برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شود. هر سه گونه شناسایی شده برای اولین بار از میزبان‌های هلو، شلیل، زردآلو، توت‌فرنگی، طالبی، خرمالو، آفتاب‌گردان و گوجه‌فرنگی از ایران جداسازی شده‌اند و گونه *R. stolonifer* var. *stolonifer* برای اولین بار از روی شلیل از دنیا گزارش می‌شود. در این تحقیق نشان داده شد که مناطق D1–D2 از بخش LSU در DNA ریبوزومی نسبت به منطقه ITS در فیلوژنی این جنس مناسب‌تر است.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، گونه، رده‌بندی، تاکسونومی و DNA ریبوزومی

Archive of SID

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mohammadi_par@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲. استاد بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

۳. استادیار زراعت و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

مقدمه

جنس *Rhizopus* متعلق به شاخه *Zygomycota*، راسته *Mucorales* و تیره *Absidiaceae* است

www.SID.ir

(Alexopoulos *et al*. 1996). بعضی گونه‌های ریزوپوس بیمارگرهای بعد از برداشت هستند که باعث پوسیدگی ریزوپوسی می‌شوند (Vágvölgyi *et al*. 2004). یکی از این گونه‌ها *Rhizopus stolonifer* (گونه تیپ) است که باعث پوسیدگی در هسته‌داران می‌شود. بیمارگر از طریق زخم‌ها وارد میوه شده و باعث نرم و آبکی شدن بافت‌های آلوده می‌شود این بیمارگر چون در سطح میوه مستقر است بنابراین به سرعت می‌تواند پخش شود و در عرض چند روز اکثر میوه‌ها را آلوده کند (Abdalla *et al*. 2008). شرایط مطلوب برای رشد این بیمارگر دمای ۳۰°C-۲۰ و هوای مرطوب است (Schwartz & Gent 2005). گونه‌های *R. stolonifer*، *R. oryzae*، *R. lyococcus* و *R. sexualis* علاوه بر هسته‌داران باعث خسارت در توت فرنگی و تمشک (Dennis 1979)، سیب زمینی شیرین (Martin 1964)، انگور (Ben-Arie *et al*. 1991) و طالبی (Wade & Morris 1982) هم می‌شوند. بعضی از گونه‌ها باعث آلودگی غذا از طریق تولید مایکوتوکسین‌ها و دیگر ترکیبات فعال بیولوژیکی می‌شوند (Jennessen *et al*. 2005). بعضی گونه‌های *Rhizopus* بیماری‌زای انسانی بوده (Schipper *et al*. 1996, Voigt *et al*. 1999, Zycha *et al*. 1969) و باعث موکورمایکوزیس (Mucormycosis) می‌شوند. بعضی از اعضای این جنس به طور سنتی در تهیه غذاهای تخمیری (در آسیا) مثل تمپه، پکا و راگی (Liou *et al*. 2007) و هم‌چنین در تولید استروئیدها، اسیدهای آلی، بتاکاروتن و انواع محصولات تخمیری (Hesseltine & Ellis 1973) استفاده می‌شوند. جنس *Rhizopus* برای اولین بار توسط *اهرنبرگ* در سال ۱۸۱۸ و با نام *Mucor stolonifer* معرفی شد که در سال ۱۸۲۰ اهرنبرگ آن را به *Rhizopus nigricans* تغییر داد. در سال ۱۹۰۲ *وولمین* و در سال ۱۹۱۳ *لیند* نام *R. stolonifer* را به کار بردند (Schipper 1984). توصیف اولیه‌ای که برای جنس *Rhizopus* ارایه شده است، شامل اسپورانژیوفورهای تشکیل شده روی استولون‌ها که به صورت تکی یا اغلب به صورت خوشه‌ای، یا غیر منشعب، گاه‌گاهی نزدیک رأس منشعب شده‌اند، چند اسپوری، اسپورانژیوم‌ها انتهایی، کروی با کولوملای مشخص، آپوفیزدار، خاکستری تا قهوه‌ای به هنگام بلوغ، اسپورانژیوسپورها کروی تا بیضی و زاویه‌دار هستند. زیگوسپورها دارای تیغ یا زگیل که در میسلیوم‌های هوایی بین سوسپنسورهای متقابل، ایزوگاموس و بدون زواید تزیینی تشکیل می‌شوند (Schipper 1984). قبلاً گونه‌های جنس *Rhizopus* بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی شناسایی می‌شدند. از جمله معایب روش‌های ریخت‌شناسی، علی‌رغم وقت‌گیر بودن، از دقت و حساسیت و تخصص یافتگی کافی برخوردار نیستند. در واقع می‌توان گفت که استفاده از ویژگی‌های فنوتیپی برای تشخیص عوامل بیماری‌زای گیاهی لازم ولی جهت تفکیک جدایه‌های عامل بیماری کافی نیستند (Maclean *et al*. 1993).

ولی در سال‌های اخیر در کنار آرایه‌بندی کلاسیک از روش‌های مولکولی RAPD (Vágvölgyi *et al*. 2004)، PCR-RFLP (Park *et al*. 2003) و تعیین ترادف (Liou *et al*. 2007, Abe *et al*. 2006, 2007, Saito *et al*.2004) برای شناسایی و طبقه‌بندی اعضای این جنس استفاده شده است. در ایران گزارش‌های محدودی از گونه‌های ریزوپوس وجود دارد که *ارشاد* (Ershad 2009) آنها را در کتاب قارچ‌های ایران گنجانده است. در بسیاری از موارد، فقط نام گونه‌ها در نوشته‌های مربوط درج شده و هیچ‌گونه توصیفی از آنها ارایه نشده

Archive of SID

www.SID.ir

است. در برخی از موارد نیز، شناسایی گونه‌ها بر اساس صفات جنس این قارچ و نوع میزبان آنها استوار بوده است که معیارهای دقیقی برای تعیین گونه به نظر نمی‌رسند. در ایران فقط دو گونه *R. oryzae* و *R. stolonifer* از میزبان‌های مختلف توسط قارچ‌شناسان برای میکوفلور ایران معرفی شده است (Ershad 2009). با توجه به خسارت‌های اقتصادی عامل پوسیدگی ریزوپوسی و مشکلات مربوط به شناسایی این قارچ با روش‌های ریخت‌شناسی و کلاسیک، استفاده از روش‌های مولکولی که امروزه به دلیل حساسیت، سرعت و دقت به طور گسترده در مطالعات تاکسونومیکی و فیلوژنتیکی قارچ‌ها استفاده می‌شود، می‌تواند در شناسایی قارچ عامل بیماری و هم‌چنین اعمال روش‌های مدیریتی خاص در جهت کاهش بیماری نقش بسزایی داشته باشد. هدف این تحقیق جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف جنس *Rhizopus* با استفاده از نشانگر مولکولی PCR-RFLPs و تعیین توالی چند جدایه و آنالیز فیلوژنتیکی آنهاست.

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری

میوه‌های آلوده (هلو، شلیل، توت فرنگی، زردآلو، خرمالو، طالبی، گوجه‌فرنگی و آفتابگردان) از استان‌های تهران، آذربایجان غربی، یزد و کردستان جمع‌آوری شدند (جدول ۱) و با قرار دادن آنها در پاکت‌های کاغذی، جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند. بخش‌های آلوده در زیر هود توسط سوزن سترون برداشته شده و به تشتک‌های حاوی WA (Water Agar) و PDA (Potato Dextrose Agar) منتقل شدند. تشتک‌ها در انکوباتور ۲۵°C قرار داده شدند. پرگنه‌های رشد کرده به روش تک اسپور و یا نوک ریسه خالص شدند. قارچ‌های خالص شده در لوله‌های آزمایش حاوی PDA رشد داده شده و در دمای ۴°C نگهداری شدند.

بررسی دماهای رشدی

به منظور بررسی بر اساس دماهای رشدی قرص‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه در حال رشد پرگنه‌های مربوط به هر جدایه برداشته و به تشتک‌های حاوی MA (Malt Agar) منتقل شد و در دماهای ۵°C، ۱۰°C، ۱۵°C، ۲۰°C، ۲۵°C، ۳۰°C، ۳۳°C، ۳۵°C، ۴۰°C، ۴۵°C قرار گرفتند و با استفاده از کلید اسخیپر (Schipper 1984) شناسایی شدند.

مطالعات مولکولی

استخراج DNA از بافت قارچ

داخل فلاسک‌های ۱۰۰ میلی لیتری، مقدار ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth) و یا محیط کشت MY (Malt Yeast Extract) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱°C سترون شدند. در هر کدام از فلاسک‌ها چند قرص به قطر پنج میلی‌متر از کشت ۷-۳ روزه قارچ اضافه شد و سپس در ۲۵°C به مدت ۵-۴ روز نگهداری شدند. برای جداسازی میسلیوم‌ها، محتویات فلاسک‌ها روی کاغذ صافی سترون ریخته شدند و بعد از آب گیری، میسلیوم‌ها داخل فویل آلومینیومی گذاشته شدند و تا هنگام جداسازی DNA در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند. به منظور استخراج DNA از بافت قارچ از روش

جدول ۱. جدایه‌های جمع‌آوری شده ریزوپوس از استان‌های تهران، آذربایجان غربی، یزد و کردستان

Archive of SID

www.SID.ir

Table 1. Isolates of *Rhizopus* obtained from Tehran, West Azarbaijan provinces, Yazd and Kordestan Provinces

جدایه	محل جمع‌آوری	نوع میزبان
P1, P3, P5, P11, P12, P13, P14, P15, P16	Pakdasht	peach
P2	Urmia-Emamzade	peach
P4, P6	Urmia	peach
P7, P8, P9, P10	Urmia-Nazloo	peach
S1, S2, S3	Urmia	strawberry
S4	Urmia-Emamzade	strawberry
S5	Urmia-Nazloo	strawberry
S6	Urmia-Lashenloo	strawberry
S7	Sanandaj	strawberry
SUN1	Pakdasht	sunflower
SUN2	Urmia-Arnesa	sunflower
SUN3	Urmia-Sheikhsarmast	sunflower
A1, A2	Pakdasht	apricot
T1, T2, T3	Pakdasht	tomato
M1	Pakdaht	melon
M2	Yazd-Roknabad	melon
N1, N2, N3	Pakdasht	nectarine
KH	Pakdasht	persimmon

دلاپورتا (Dellaporta 1983) استفاده شد. پس از اتمام عملیات استخراج، کیفیت و کمیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد سنجش قرار گرفت.

تکثیر rDNA

برای تکثیر rDNA از آغازگرهای ITS1: 5′-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-<G>-3′ (White *et al.* 1990) و NL4: 5'- GGT-CCG-TGT-TTC-AAG-ACG-<G>-3' (O'Donnell 1992)، ساخت شرکت سیناژن استفاده شد. تکثیر DNA در حجم ۲۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل ۲ میکرولیتر بافر PCR (PCR buffer 10X)، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ (50 mM) (10X)، ۱/۶ میکرولیتر dNTPs (2.5 mM)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (10 mM)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* (5 U/µl)، یک میکرولیتر DNA (50 ng) الگو و ۱۳/۴ میکرولیتر آب دیونیزه سترون صورت گرفت. برنامه حرارتی برای PCR شامل ۹۵°C پنج دقیقه، ۳۴ چرخه (۹۵°C یک دقیقه، ۵۵ °C یک دقیقه و ۷۲°C یک‌و نیم دقیقه) و مرحله پایانی شامل ۷۲°C ده دقیقه انجام شد (Purkayastha *et al.* 2006).

برش محصولات PCR

محصول PCR هر جدایه با چهار آنزیم مختلف *Hae*III، *Hinf*I، *Rsa*I و *Msp*I برش داده شد. به منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌ها ابتدا داده‌های حاصل از هضم آنزیمی به صورت ۱ (حضور باند) و ۰ (عدم حضور باند) در برنامه Excel وارد گردید و با استفاده از ضریب تشابه

Archive of SID

www.SID.ir

جاکارد (Jaccard's coefficient) در برنامه SIMQUAL در نرم افزار NTSYS-pc (version 2.02) ماتریس تشابه محاسبه شد و سپس با استفاده از برنامه SAHN و روش UPGMA مورد بررسی قرار گرفت و دندروگرام آن ترسیم گردید.

تعیین توالی، ردیف کردن توالی‌ها و مطالعات فیلوژنتیکی

محصول PCR هفت جدایه نماینده جهت تعیین توالی (Sequencing) به شرکت Eurofins MWG Operon در کشور آلمان فرستاده شدند. برای تصحیح و هم‌ردیف‌سازی اولیه توالی‌ها از برنامه GeneDoc (Nicholas and Nicholas 1997) استفاده شد. توالی جدایه‌های مورد بررسی همراه با توالی تعداد دیگری از جدایه‌های گرفته شده از بانک ژن جهت تجزیه و تحلیل منطقه ITS، ژن 5.8S و مناطق D1-D2 ابتدا به صورت اتوماتیک و سپس به صورت دستی تنظیم و اصلاح شدند. سپس فایل ماتریکس توالی‌ها با فرمت Clustal جهت ترسیم شجره فیلوژنتیکی در نرم‌افزار CLUSTAL X (ver. 1.81) (Thompson *et al.* 1997) انتقال داده شدند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با روش محاسبه فاصله انجام شد. شجره نیز با روش NJ (Neighbor-Joining) و ۱۰۰۰ بار تکرار Bootstrap و هم با روش Maximmum Parsimony و ۲۰۰۰ بار تکرار Bootstrap ترسیم شد. فاصله ژنتیکی جدایه‌ها از طریق مقایسه توالی نوکلئوتیدها توسط نرم‌افزار PAUP ver. 4.0b10 (Swofford 2003) انجام شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق۳۷ جدایه که از استان‌های تهران، آذربایجان غربی، یزد و کردستان جمع‌آوری شده بودند برای شناسایی بر اساس دماهای رشدی و روش‌های مولکولی مانند RFLPs و مقایسه توالی مناطق ITS و D1-D2 مورد بررسی شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این بررسی گونه‌های *R. stolonifer* جدا شده از هلو، شلیل، توت‌فرنگی، زردآلو و گوجه‌فرنگی، *R. lyococcus* جدا شده از هلو و توت‌فرنگی و *R. oryzae* جدا شده از هلو، توت‌فرنگی، شلیل، زردآلو، گوجه‌فرنگی، طالبی، آفتاب‌گردان و خرمالو شناسایی شدند.

شناسایی جدایه‌ها بر اساس دماهای رشدی

جدایه‌های *Rhizopus* نسبت به دما حساس بوده و گونه‌های این جنس در دماهای مختلف از هم تفکیک می‌شوند. به‌طوری‌که در این بررسی ۱۸ جدایه مربوط به *R. stolonifer* در دامنه دمایی ۳۳°C–۵ و سه جدایه *R. lyococcus* در دامنه دمایی ۳۵°C–۵ رشد کردند. ۱۶ جدایه مربوط به گونه *R. oryzae* در دامنه دمایی ۴۵°C–۱۰ قادر به رشد بودند. *اسخیپر* (Schipper 1984) حداکثر دمای رشد برای گروه *R. stolonifer* را ۳۳°C و ۳۵°C و برای گونه *R. oryzae* دمای ۴۵°C را گزارش کرده است. *لیو و همکاران* (Liou *et al.* 2007) حداکثر دمای رشد برای گونه *R. stolonifer* را ۳۳°C، برای گونه *R. lyococcus* دمای ۳۵°C و برای گونه *R. oryzae* دمای ۴۵°C را گزارش کرده‌اند.

تکثیر بخش‌های مختلف rDNA

با استفاده از آغازگرهای ITS1 و NL4 منطقه ITS شامل ژن 5.8S و مناطق D1-D2 مربوط به DNA ریبوزومی تکثیر شد و در هر جدایه فقط یک قطعه به طول ۱۵۸۰،

Archive of SID

www.SID.ir

۱۴۶۰ و ۱۳۳۰ جفت باز تشکیل شد (شکل ۱). تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های ریزوپوس بر اساس روش UPGMA (شکل ۲) صورت گرفت. در این روش جدایه‌های مورد بررسی در سه گروه اصلی قرارگرفتند.

هضم محصول PCR توسط آنزیم‌های محدودگر و تجزیه داده‌ها

محصول تکثیر شده با آغازگرهای ITS1 و NL4 از جدایه‌های مختلف با چهار آنزیم برشی *Hin*fI ، *Hae*III، *Msp*I و *Rsa*I در شرایط مناسب برای هر جدایه تیمار و محصول روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. اندازه قطعات تیمار شده با این آنزیم‌ها در جدول ۲ آمده است.

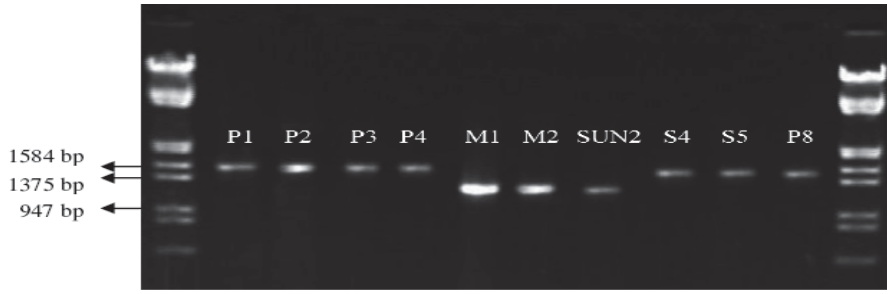
باندهای حاصل از تکثیر با استفاده از آغازگرهای ITS1 و NL4 به طول ۱۵۸۰، ۱۴۶۰ و ۱۳۳۰ جفت باز بودند. هضم محصولات PCR با آنزیم *Hin*fI در گونه *R. oryzae*، با آنزیم *Hae*III در گونه‌های *R. oryzae* و *R. lyococcus*، آنزیم *Rsa*I در گونه‌های *R. stolonifer* و *R. lyococcus* و با آنزیم *Msp*I در گونه‌های *R. oryzae* و *R. lyococcus* قطعاتی را تولید کرد که مجموع اندازه‌های آنها معادل محصولات PCR هضم نشده نبود و باقیمانده قطعات حاصل از هضم قابل آشکارسازی نبود. در مورد هضم باند ۱۵۸۰ جفت بازی در *R. stolonifer* توسط *Hae*III و ۱۴۶۰ جفت بازی در *R. lyococcus* توسط *Rsa*I نیز چنین اتفاقی روی داد. باند ۱۵۸۰ جفت‌بازی در *R. stolonifer* قابل هضم با آنزیم *Msp*I نبود. در آنالیز حاصل از گروه‌بندی خوشه‌ای یک گروه ۱۸ عضوی، یک گروه ۱۶ عضوی و یک گروه سه عضوی مشخص شد که اعضای هر یک از گروه‌ها در درون خود ۱۰۰٪ تشابه داشتند. در سطح تشابه ۶٪ گروه مربوط به *R. lyococcus* (گروه C) از دو گروه دیگر جدا شد. در سطح تشابه ۱۵٪ دو گروه مربوط به *R. stolonifer* و *R. oryzae* (گروه A و B) از هم جدا شدند.

تعیین توالی، ردیف کردن توالی‌ها و مطالعات فیلوژنتیک

بعد از خوشه‌بندی بر اساس RFLPs هفت جدایه (جدایه‌های P1، P2، P4، SUN2، M1، S4 و S5) از سه گروه مشخص شده برای تعیین توالی ارسال گردید. ردیف کردن جدایه‌ها به همراه نمونه‌های استخراج شده از GenBank صورت گرفت، در این مطالعه توالی جدایه‌های مربوط به گونه *R. oryzae* با جدایه‌های دریافت شده از GenBank ردیف شدند، اما جدایه‌های مربوط به گونه‌های *R. stolonifer* و *R. lyococcus* با بقیه نمونه‌ها ردیف نشدند و به این دلیل از آنالیز منطقه ITS در این تحقیق صرف‌نظر شد. *لیو و همکاران* (Liou *et al.* 2007) با مطالعه روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های مختلفی از ریزوپوس بر اساس توالی منطقه D1-D2 دریافتند که این منطقه نسبت به توالی منطقه ITS پتانسیل زیادی برای مطالعات فیلوژنتیکی جدایه‌های این قارچ دارد. آنها نشان دادند که منطقه ITS به دلیل تنوع زیاد برای مطالعات فیلوژنتیکی جنس ریزوپوس مناسب نیست. مقایسه توالی حدود۶۰۰ جفت بازی ناحیه D1-D2 این گونه‌ها با توالی‌های گونه‌های دریافت شده از GenBank صورت گرفت. در این بررسی یک گونه *Mucor indicus* به عنوان گروه خارجی منظور گردید.

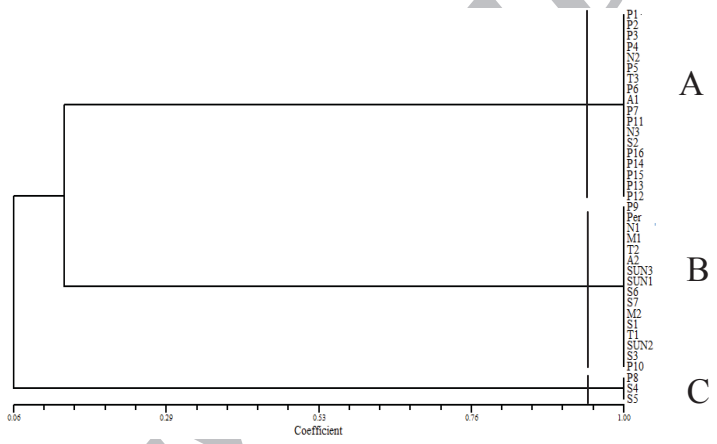
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. منطقه ITS و D1-D2 تکثیر یافته در جدایه‌های *Rhizopus* spp. توسط آغازگرهای ITS1 و NL4 (M نشانگر با وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت باز)

Fig. 1. ITS and D1-D2 regions amplified using ITS1 and NL4 primers (M, size marker with 1000 bp molecular weight)



شکل ۲. دندروگرام تشابه ۳۷ جدایه متعلق به جنس *Rhizopus* با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه Jaccard

Fig. 2. Dendrogram of 37 isolates of *Rhizopus* genus created by UPGMA method with Jaccard coefficient

آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌های ریزوپوس براساس روش‌های NJ و Maximum Parsimony در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. به طورکلی نتایج تجزیه با استفاده از هر دو روش گویای تفکیک و جدایی کامل گونه‌های ریزوپوس مورد بررسی بود. در هر دو روش جدایه‌های مورد تجزیه در سه گروه (گروه A، B و C) قرار گرفتند و این گروه‌ها در روش NJ با ۶۵٪ Bootsrap و در روش Maximum Parsimony با ۵۶٪ Bootsrap حمایت شد و بقیه نمونه‌هایی که توالی آنها از بانک ژن استخراج شده بودند در داخل این گروه‌ها قرار گرفتند (شکل ۳). بعد از محاسبه فاصله ژنتیکی توسط نرم‌افزار PAUP ver. 4.0b10 دیده شد که میزان شباهت ژنتیکی بین این جدایه‌ها و جدایه‌های دریافت شده از GenBank بسیار زیاد (حدود ۹۹٪ و ۱۰۰٪) است. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جدایه‌های مربوط گونه‌های *R. stolonifer* و *R. lyococcus* با جدایه‌های مربوط به گونه *R. oryzae* بود. کمترین فاصله ژنتیکی بین جدایه‌های مربوط به گونه‌های *R. stolonifer* و *R. lyococcus* دیده شد. گروه اصلی A به دو زیر گروه تفکیک شد که در زیرگروه اول جدایه‌های گونه

www.SID.ir

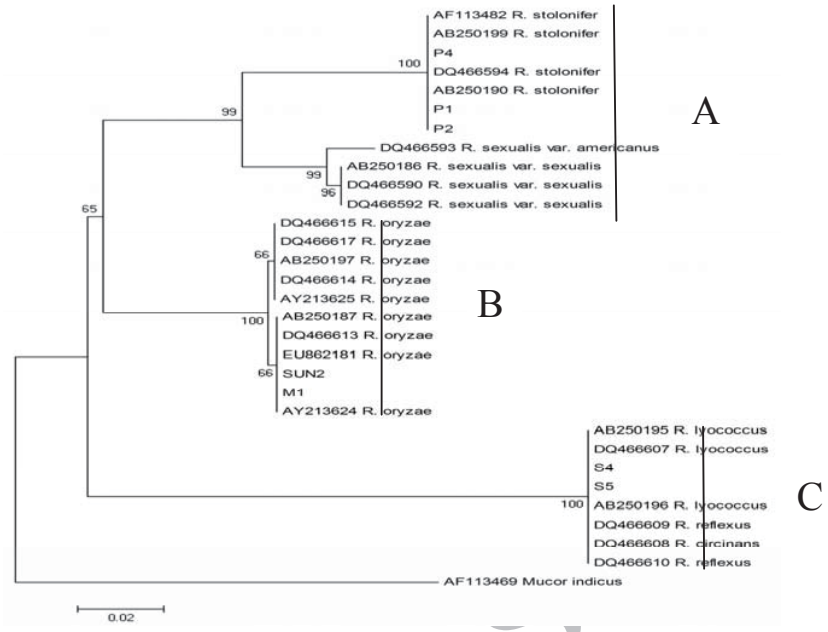
جدول۲. اندازه قطعات (تکثیر شده با آغازگرهای**ITS1** و **NL4**) تیمار شده با آنزیم‌های برشی مختلف در جدایه‌های مختلف ***Rhizopus*** **spp.**

Table 2. Restriction fragments obtained after digestion of PCR products with various enzymes

*Hinf*I	*Hae*III	*Rsa*I	*Msp*I	جدایه‌ها
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P1
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P2
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P3
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P4
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P5
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P6
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P7
500,410,90	700,320,240,100,100	580,420,310,150	860,350,250	P8
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	P9
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	P10
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P11
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P12
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P13
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P14
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P15
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	P16
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	S1
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	S2
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	S3
500,410,90	700,320,240,100,100	580,420,310,150	860,350,250	S4
500,410,90	700,320,240,100,100	580,420,310,150	860,350,250	S5
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	S6
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	S7
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	SUN1
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	SUN2
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	SUN3
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	A1
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	A2
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	T1
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	T2
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	T3
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	M1
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	M2
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	N1
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	N2
490,430,250	750,430,220,80	700,450,430	1580	N3
490,430,210,110,90	700,350,200,80	400,300,200,130	730,600	KH

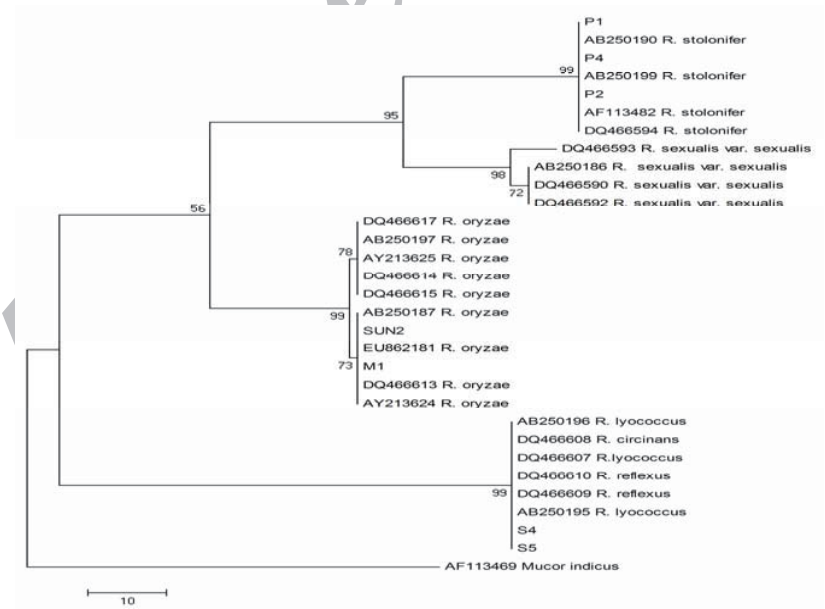
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳. کلادوگرام حاصل از آنالیز توالی D1-D2 به روش Neighbor-joining با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap. AF113469 به عنوان گروه خارجی استفاده شده است. عدد بالای شاخه‌ها نتیجه آزمون Bootstrap را نشان می‌دهند.

Fig. 3. Cladogram based on D1-D2 sequences with Neighbor-joining method and 1000 bootstrap repeats. AF113469 used as an outgroup.



شکل ۴. کلادوگرام حاصل از آنالیز توالی D1-D2 به روش Maximum Parsimony با ۲۰۰۰ تکرار Bootstrap. AF113469 به عنوان گروه خارجی استفاده شده است. عدد بالای شاخه‌ها نتیجه آزمون Bootstrap را نشان می‌دهند.

Fig. 4. Cladogram based on D1-D2 sequences with Maximum Parsimony method and 2000 bootstrap repeats. AF113469 used as an outgroup.

www.SID.ir

R. stolonifer که از بانک ژن استخراج شده بودند و سه جدایه P1، P2 و P4 جدا شده از هلو با ۱۰۰٪ حمایت Bootstrap قرار گرفتند و در زیرگروه دوم تمام جدایه‌های مربوط به *R. sexualis* که از بانک ژن گرفته شده بودند با ۹۹٪ حمایت Bootstrap قرار گرفتند. گروه اصلی B شامل جدایه‌هایی از *R. oryzae* که از بانک ژن استخراج شده بودند و دو جدایه SUN2 و M1 جدا شده از آفتاب‌گردان و طالبی با ۱۰۰٪ حمایت Bootstrap قرار گرفتند. در گروه اصلی C جدایه‌هایی از *R. lyococcus* که از بانک ژن دریافت شده بودند و دو جدایه S4 و S5 مربوط به *R. lyococcus* جدا شده از توت‌فرنگی با ۱۰۰٪ حمایت Bootstrap قرار گرفتند. به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق مشخص نمود که مناطق D1-D2، کارآیی قابل قبولی در تعیین موقعیت تاکسونومیکی تمام جدایه‌ها داشت.

مقایسه توالی D1-D2 در جدایه‌های مربوط به گونه *R. stolonifer* نشان داد که این جدایه کاملاً با توالی این منطقه در گونه *R. stolonifer* ۱۰۰٪ مشابهت دارد و در آنالیز فیلوژنتیکی با NJ و Maximum Parsimony این گونه در گروه *R. stolonifer* قرار گرفت. *لیو* و همکاران (Liou *et al.* 2007) این گونه را با نام *R. stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. var. *stolonifer* ذکر کرده‌اند. برای برقراری فیلوژنی مولکولی جنس *Rhizopus* و مقایسه آن با طبقه‌بندی فعلی، *ابه* و همکاران (Abe *et al.* 2006) سه منطقه 18S، ITS و 28S D1/D2 از DNA ریبوزومی را توالی‌یابی کردند. آنها سه گروه A، B و C را مطابق با سه گروه *اسخیپر* (Schipper 1984; Schipper & Stalpers 1984) (*microsporus*-group، *stolonifer*-group و *R.oryzae*) مشخص کردند. در این مطالعه آنها دریافتند که شباهت توالی دو واریته *R. stolonifer* var. *lyococcus* و *R. stolonifer* var. *stolonifer* زیاد نیست، بنابراین در دو گروه جداگانه طبقه‌بندی شدند.

نمونه دیگری که در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفت گونه *R. lyococcus* بود. مقایسه توالی منطقه D1-D2 نشان داد که این جدایه کاملاً با توالی این منطقه در گونه *R. lyococcus* ۱۰۰٪ مشابهت دارد و در آنالیز فیلوژنتیکی با NJ و Maximum Parsimony این گونه در گروه *R. lyococcus* قرار گرفت. *ابه* و همکاران (Abe *et al.* 2006) با مقایسه توالی D1-D2 و 18S مشاهده کردند که گونه *R. lyococcus* با *R. stolonifer* var. *stolonifer* در یک گروه قرار نمی‌گیرد و فاصله ژنتیکی این دو گروه از هم زیاد بود. *لیو* و همکاران با مطالعه روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های مختلفی از ریزوپوس بر اساس توالی منطقه D1-D2 دریافتند گونه *R. lyococcus* که دارای اسپورانژیوفورهای خمیده می‌باشد و قبلاً جزو واریته‌های *R. stolonifer* طبقه‌بندی می‌شد (Abe *et al.* 2006, Vágvölgyi *et al.* 2004, Liou *et al.* 2001, Schipper, 1984) خود گونه مجزایی است.

گونه *R. oryzae* نمونه دیگری بود که در این تحقیق بررسی شد. جدایه‌هایی از این گونه که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند از لحاظ دمای رشدی با مشخصات ارائه شده توسط *اسخیپر* (Schipper 1984) مطابقت داشت. مقایسه توالی منطقه D1-D2 در این جدایه نشان داد که کاملاً با توالی این منطقه درگونه *R. oryzae* ۱۰۰٪ مشابهت دارد و در آنالیز فیلوژنتیکی با NJ و Maximum Parsimony این گونه در گروه *R. oryzae* قرار گرفت. *لیو* و همکاران (Liou *et al.* 2007) نشان دادند که این گونه در فیلوگرام

Archive of SID

www.SID.ir

حاصل از آنالیز ژنتیکی به صورت یک گروه مجزا طبقه‌بندی می‌شود.

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، سه گونه: *R. oryzae*، *R. stolonifer* var. *stolonifer* و *R. lyococcus* شناسایی شدند که گونه *R. lyococcus* برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شود و برای میکوفلور ایران جدید است. هر سه گونه شناسایی شده برای اولین بار از میزبان‌های هلو، شلیل، زردآلو، توت‌فرنگی، طالبی، خرمالو، آفتاب‌گردان و گوجه‌فرنگی از ایران جداسازی شده‌اند. گونه *R. stolonifer* var. *stolonifer* برای اولین بار از روی شلیل از دنیا گزارش می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه سرکارخانم مهندس مهرنوش محمدی‌فر کارشناس محترم آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی و سرکارخانم مهندس نرجس محمدی کارشناس محترم آزمایشگاه مرکزی پردیس ابوریحان ابراز می‌دارند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (57-55) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir