ژنتیک نوین
دوره سوم ، شماره۲ ، تابستان ۱۳۸۷
صفحه۴۶-۳۷

مقایسه نشانگرهای مولکولی RAPD، ISSR و ERIC در بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *Rhizoctonia solani* AG1-IA

مهدیه خدایاری[۱]، ناصر صفایی[۲*]، مسعود شمس بخش[۲]
۱ – دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
۲ –دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیماری شناسی گیاهی
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: nsafaie@modares.ac.ir

چکیده

بیماری سوختگی غلاف برنج ناشی از *Rhizoctonia solani* AG 1-IA، یکی از مهمترین بیماری‌های قارچی برنج در شالیزارهای شمال کشور می‌باشد. با توجه به اهمیت بیماری و عدم وجود اطلاعات جامع و کامل از ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این قارچ، تعیین نشانگر مناسب در بررسی تنوع ژنتیکی آن، ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های RAPD، ISSR و ERIC، جدایه‌ها را در دو گروه کاملا مجزای ژنتیکی قرار داد که نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه اصلی نیز مؤید این مطلب بود. بعلاوه همبستگی مثبت و معنی داری میان ماتریس‌های تشابه حاصل از داده های RAPD، ISSR و ERIC با یکدیگر و بطور مجزا مشاهده شد. نیکویی برازش خوشه بندی نیز در سطح بسیار خوبی قرار گرفت، به منظور تعیین کارایی نشانگرها، محتوای اطلاعاتی چندشکلی آنها (PIC) شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر(EMR) محاسبه شد. شاخص‌های مورد بررسی در نشانگر ERIC بعلت استفاده از آغازگرهای بلندتر و دمای اتصال بیشتر، نسبت به دو نشانگر ISSR و RAPD در سطح بالاتری قرار گرفتند. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که با وجود خصوصیات مشترکی نظیر غالبیت، سادگی و سرعت عمل بالا در هر سه نشانگر RAPD، ISSR و ERIC و همچنین قدرت تفکیک جدایه‌ها به دو گروه کاملا مجزای ژنتیکی، نشانگر ERIC قدرت بیشتری در آشکارسازی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها دارد.

واژه های کلیدی
تنوع ژنتیکی،
تشابه ژنتیکی،
نشانگرهای مولکولی،
قارچ *Rhizoctonia solani* AG1-IA

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.2.5.4]

مقدمه

سه بیماری بلاست، لکه قهوه‌ای و سوختگی غلاف، از بیماری‌های مهم قارچی برنج، در ایران و جهان می‌باشند (Suparyono *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1983). در سال‌های اخیر بیماری سوختگی غلاف به دلیل گسترش استفاده از کودهای شیمیایی و ارقام پرمحصول که پنجه‌های متراکم و پرپشت دارند، اهمیت ویژه ای یافته است. از میان انواع مختلف سوختگی غلاف گزارش شده در دنیا، دو تیپ آن یعنی سوختگی غلاف ناشی از *Rhizoctonia solani* AG1-IA و سوختگی موجی ساقه حاصل از *R. oryzae sativae* در ایران گزارش شده است (Rahimian, 1989; Torabi and Binesh, 1984). از بین دو تیپ فوق، اولی خسارت چشمگیری به مزارع برنج نواحی شمالی کشور وارد می‌کند (Forutan and Rahimian, 1991). قارچ *R. solani* از لحاظ تاکسونومیکی یک واحد مشخص نیست بلکه مجموعه ای از گونه‌ها (*R. solani* complex or collective species) می‌باشد و شامل گروه‌هایی است که از لحاظ ژنتیکی جدا هستند (Liu *et al*, 1990; Cubeta and Vilgays, 1997). علت در هم آمیخته بودن تاکسونومی و ژنتیک جمعیت این قارچ استفاده از صفاتی در گروه بندی آن است که پایه و اساس آنها شباهت‌ها و تفاوت‌های مورفولوژیک، می‌باشد (Kuninaga and Yokosawa, 1985a; Sneh *et al.*,1991; Keijer *et al.*, 1996). به منظور کنترل بیماری، اقتصادی‌ترین و مناسب ترین روش، استفاده از ارقام متحمل و مقاوم می‌باشد که برای توسعه این ارقام، آگاهی از ساختار جمعیت بیمارگر ضروری است (Groth and Bond, 2007; Martinez and English, 1997).

تقریباً تا دو دهه پیش تفاوت‌های مورفولوژیک، بیماریزایی، دامنه میزبانی و همچنین پدیده همدهانی هیف‌ها توجه اغلب رایزوکتونیا شناسان دنیا را به خود معطوف داشت (Ogoshi, 1996). در پدیده آناستوموز هیف‌های مربوط به جدایه‌های خویشاوند با یکدیگر می‌توانند جوش بخورند که بیانگر سازگاری رویشی آنها با یکدیگر است و این جدایه‌ها در یک گروه آناستوموزی(Anastomosis Group, AG) قرار می‌گیرند. جدایه‌هایی که قادر به آناستوموز با یکدیگر نیستند متعلق به AG مختلف می باشند (Anderson, 1982). وجود اشتباهاتی در وقوع آناستوموزها، میان گروه‌های مختلف گونه، مشکلاتی را برای شناخت ساختار این گونه‌های پیچیده ایجاد نمود. به همین علت استفاده از این روش داده‌های قابل اعتمادی را در بررسی تنوع ژنتیکی و یا ارتباطات تاکسونومی درون و یا میان گروه های AG ارائه نمی‌دهد (Kuninaga, and Yokosawa, 1985a,b; Sneh *et al.*, 1991; Keijer *et al.*, 1996)؛ بعلاوه فقدان خصوصیات پایدار مورفولوژیک و فیزیولوژیک در این بیمارگر، شناخت جدایه‌های این گونه را مشکل و وقت گیر کرده است (Mordue, 1974). با ورود روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی به عرصه آزمایشگاه‌های تحقیقاتی باب جدیدی گشوده شد و ابزارهای مدرن مولکولی نظیر نشانگرهای مولکولی جایگزین روش‌های قدیمی‌تر مطالعه جمعیت‌های قارچی شدند و با تجزیه و تحلیل DNA، محققین علم ژنتیک را در زمینه‌های مختلف نظیر مطالعات فیلوژنی، تعیین میزان قرابت، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تعیین محل ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و کیفی، انتقال ژن، تشخیص بیماری‌ها و غیره یاری رساندند (Vilgalys and Cubeta, 1994; Mordue *et al.*, 1989). در میان نشانگرهای مولکولی مختلف، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR مانند RAPD، ISSR و rep-PCR به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA جهت طراحی و ساخت آغازگرها، به وفور استفاده شده است (Sharon *et al.*, 2006 ;Toda *et al.*,1999; Gulaeria *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2005)؛ در این میان نشانگر RAPD به علت سادگی روش، هزینه پایین و سرعت بالا و عدم نیاز به کاوشگر و مواد رادیواکتیو(نقوی و همکاران، ۱۳۸۴) در بررسی تنوع ژنتیکی میان گروه‌های مختلف *R. solani* استفاده شده است (Duncan *et al.*, 1993; Toda *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2000; Gulaeria *et al.*, 2007) هرچند که عدم تکرار پذیری این نشانگر در نتیجه استفاده از آغازگرهای کوتاه و عدم امکان تشخیص سیستم آللی، قابلیت اعتماد به این نشانگر را کاهش داده است (Philips and Vasil, 2001; Tommerup *et al.*, 1995)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.2.5.4]

از سال ۱۹۹۴، نشانگر مولکولی به نام Inter-Simple Sequence Repeat Amplification یا ISSR، برای انگشت نگاری DNA بکار گرفته شد (Zietkiewicz *et al.*, 1994) که آغازگرهای آن مبتنی بر آغازگرهای SSR تغییر یافته براساس توالی‌های مجاور ریز ماهواره‌ها که در سراسر ژنوم پراکنده‌اند می باشد.استفاده از این روش مانند نشانگر RAPD بسیار سریع و آسان بوده و قابلیت تکثیر نشانگر SSR را داشته و چند شکلی بیشتری را نسبت به آغازگرهای RAPD نشان دهد(Nagaoka and Ogihara, 1997). از این نشانگر نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ ها استفاده شده است (Esselman *et al.*, 1999; Gulaeria *et al.*, 2007; Toda *et al.*, 1999)

وجود توالی های پراکنده تکراری وارونه در ژنوم باکتری‌ها که به شدت در ژنوم حفاظت شده‌اند موجب ابداع روش جدیدی در تعیین تنوع ژنتیکی در قارچ‌ها، تجزیه و تحلیل ارتباطات فیلوژنتیکی و گسترش روش‌های تشخیص گونه‌های درون جنس شده است (de Bruijn, 1992; Rodriguez-Barradas, *et al.*, 1995). این توالی‌ها اولین بار در باکتری‌های *Streptococcus pneumoniae*، *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* شناخته شده اند و با عناوینی چون عناصرBOX (Martin *et al.*, 1992)، REP (Stern *et al.*, 1984)، PU (Gilson *et al.*, 1984) و یا IRU(Sharples *et al.*, 1990) (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) ERIC نامگذاری شده‌اند که تکثیر این نواحی اساس نشانگر rep-PCR می‌باشد. این نشانگرها با استفاده از دو آغازگر قادر به تکثیر نواحی بین دو توالی تکراری (Versalovic *et al.*, 1991,1994) و یا میان این واحدها و دیگر واحدهای تکراری می‌باشند (Sechi *et al.*, 1998).

با توجه به اهمیت قارچ *R. solani* و خسارت‌های عمده‌ای که به گیاهان زراعی وارد می‌کند، تعیین نشانگر مناسب و برتر در بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها مقایسه نشانگرهای مولکولی مختلف، ضروری به نظر می‌رسد. این پژوهش به مقایسه تنوع ژنتیکی جدایه‌های جمع آوری شده *R. solani* توسط سه سیستم نشانگری RAPD، ISSR و rep-PCR، با استفاده از شاخص‌های مختلف و تعیین کارایی این نشانگرها برای انعکاس گوناگونی ژنتیکی این بیمارگر می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

مشخصات جدایه‌های قارچ

چهل و هفت جدایه قارچ *R. solani*، از مرکز تحقیقات برنج رشت تهیه و در این پژوهش از آن استفاده شد. این جدایه‌ها طی سال ۱۳۸۲ از غلاف برگ ارقام مختلف برنج استان‌های گیلان (تعداد ۴۵ جدایه) و مازندران (تعداد دو جدایه) جداسازی شدند. در این پژوهش از جدایه خالص شده و استاندارد *R. solani* AG1-IA (تهیه شده از کلکسیون قارچ آزمایشگاه بیماری شناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس)، برای مطالعه بیشتر سایر جدایه ها استفاده شد.

جدایه ها از جهت ظاهری، آزمون آناستوموز و بیماری زایی بررسی و پس از استخراج DNA، تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از سه سیستم نشانگری RAPD، ISSR و rep-PCR بررسی شد (خدایاری و همکاران، زیر چاپ؛ Khodayari *et al.*, In Press)

نشانگرها

در این پژوهش از داده‌های مربوط به سه نشانگرRAPD، ISSR و rep-PCR استفاده شد. برای نشانگر RAPD هفت آغازگر OPA04, OPA07, OPC18, OPC19, R28 و RC09 (جدول ۲)، برای نشانگر ISSR چهار آغازگر و برای نشانگر rep-PCR از یک جفت آغازگر ERIC استفاده شد. آغازگرهای مذکور بر اساس چندشکلی و تکرار پذیری انتخاب شدند؛ برای اطلاع از جزئیات روش کار، به مقالات خدایاری و همکاران (خدایاری و همکاران، زیر چاپ ،Khodayari *et al.*, In Press) مراجعه شود.

تجزیه داده ها

نشانگرهای به کار رفته در این پژوهش، جزء نشانگرهای غالب بوده که در تفسیر ژل هر سه سیستم وجود (۱) یا عدم وجود (صفر) باند امتیاز دهی شد (Sharma *et al.*, 2005; Toda *et al.*, 1999).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.2.5.4]

تجزیه خوشه‌ای

بر اساس داده‌های خام حاصل از نشانگرهای مولکولی RAPD ، ISSR و ERIC، تجزیه خوشه‌ای با روش (Rohlf, 1993) UPGMA، با استفاده از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard, 1908)، برای تعیین تشابه بین دو فرد، و نرم افزار NTSYS-pc (ver.2.1) انجام شد.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و مقایسه ماتریس‌ها و آزمون مانتل

برای مشاهده فواصل بین جدایه‌ها به صورت دو بعدی، آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بعنوان مکمل روش خوشه بندی و از آزمون مانتل برای تعیین همبستگی بین ماتریس‌های تشابه حاصل از تجزیه داده‌ها، استفاده شد (Mantel, 1967). بررسی همبستگی بین ماتریس کوفنتیک و ماتریس تشابه یا فاصله ضریب کوفنتیک به عنوان معیاری برای اندازه گیری نیکویی برازش خوشه بندی (Goodness of Fit) مورد استفاده قرار گرفت. میزان نیکویی برازش در دامنه ۱> r ≥۰ متغیر می باشد.r ≥ ۰/۹ ، برازش بسیار خوب، ۰/۹≥ r ≥۰/۸ ، برازش خوب، ۰/۸≥r ≥ ۰/۷، برازش ضعیف و ۰/۷ ≥ r برازش بسیار ضعیف را نشان می دهد (Rohlf, 1993).

محاسبه هتروزیگوسیتی، شاخص نشانگری و نسبت چندگانه برای تشخیص موثرترین نشانگر در تعیین تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های *R. solani*، حضور و یا غیاب هر باند DNA در هر جایگاه ژنی، به عنوان یک آلل در نظر گرفته شد سپس میزان چندشکلی نشانگر (Polymorphism Information Content)، با استفاده از جمع مربع فراوانی آللی و حذف جایگاه ژنی منومورف با استفاده از فرمول (۱) محاسبه شد (Lynch and Walsh, 1998). در این فرمول p_i فراوانی آلل iام و n تعداد آلل هاست.

(۱). $PIC= 1-\sum_{i=1}^{n} P_i^2$

شاخص نشانگری(MI=Marker Index) که بیانگر میزان چندشکلی است و می‌تواند بعنوان شاخصی جهت برآورد کارایی یک نشانگر در یک ژرم پلاسم ناشناخته استفاده گردد (Powel *et al.*, 1996)، با استفاده از روش پاول و همکاران (Powel *et al.*, 1996) که در فرمول شماره ۲ به آن اشاره شده است، محاسبه شد

(۲). MI=PIC×EMR

نسبت چندگانه مؤثر (EMR: Effective Multiplex Ratio) که بیانگر تعداد جایگاه های ژنی چندشکل موجود در یک ژرم پلاسم می باشد، بر حسب فرمول (۳) محاسبه شد.

(۳) $EMR= n_p \times \beta$

دراین فرمول، n_p تعداد کل باندهای چندشکل و β ($ß = n_{p/}(n_{p+}n_{np})$) نسبت تعداد باند چندشکل به تعداد کل باند،می‌باشد (Powel *et al.*, 1996).

نتایج و بحث

در این تحقیق سه سیستم نشانگری RAPD، ISSR و ERIC برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ جدایه‌ی قارچ عامل سوختگی غلاف برنج مقایسه شدند.

بطور متوسط از مجموع هفت آغازگر استفاده شده در نشانگر RAPD، ۱۶ جایگاه ژنی به ازای هر آغازگر بدست آمد که چندشکلی بسیار خوبی (۹۴/۵٪) را نشان داد. بیشترین تعداد جایگاه ژنی مربوط به آغازگر OPA04 و کمترین آنها برای آغازگر OPA07 ایجاد شد. از میان چهار آغازگر ISSR که دارای تکرارپذیری و چندشکلی بالایی بودند (۸۴/۲٪)، بطور میانگین ۱۵ جایگاه ژنی حاصل شد که با آغازگر P6 بیشترین و آغازگر P5 کمترین تعداد جایگاه ژنی حاصل شد. تمام باندهای تکثیر شده با نشانگر ERIC نیز چندشکل بودند.

در مقایسه درصد چندشکلی حاصله توسط هر یک از نشانگرهای RAPD، ISSR و ERIC، و همچنین متوسط جایگاه ژنی چندشکل بدست آمده به ازای هر آغازگرRAPD (۱۶جایگاه ژنی)، ISSR (۱۴ جایگاه ژنی) و ERIC (۲۰ جایگاه ژنی)، مشاهده شد که استفاده از نشانگر ERIC در تعیین تنوع ژنتیکی *R. solani* AG1-IA نسبت به دو نشانگر ISSR وRAPD توانایی بیشتری داشته است؛ این نتیجه با یافته‌های حاصل از دیگر تحقیقات مشابه بود؛ بلند بودن توالی آغازگرهای ERIC و بالا بودن دمای اتصال آنها(annealing temperature)، موجب اختصاصی تر عمل کردن این نشانگر نسبت به دیگر نشانگرهای استفاده شده در تحقیق شده است (Sharma *et al.*, 2005)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.2.5.4]

(جدول۲). بالا بودن تعداد جایگاه ژنی حاصل از نشانگر RAPD نسبت به ISSR را می‌توان به اتصال غیر اختصاصی آغازگرهای RAPD به نقاط مختلف ژنوم به دلیل کوتاه بودن توالی آنها، نسبت داد. در پژوهشی که توسط ایسلمان و همکاران (1999) به منظور تعیین تنوع ژنتیکی قارچ *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* با نشانگرهای RAPD و ISSR صورت گرفت، میزان چندشکلی بیشتری در میان جدایه‌های مورد بررسی با نشانگر ISSR نسبت به نشانگر RAPD دیده شد؛ وی علت آن را فراوانی مناطق تکرار شونده در ژنوم قارچ، گزارش نمود. تفاوت این نتایج را می‌توان در تنوع موجود در توالی‌های ژنوم قارچ‌های مورد مطالعه بررسی کرد.

وجود شرایط دقیق و دمای اتصال بالای آغازگرها در دو سیستم نشانگری ISSR و ERIC در مقایسه با RAPD باعث می شود تا دو فردی که از لحاظ وجود یک قطعه با هم متفاوتند به خوبی از یکدیگر تفکیک شوند درحالیکه در آزمون RAPD امکان اتصال آغازگرها به یکدیگر وجود دارد (Dulson, 1998). البته نتایج حاصل از تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. solani* AG1-IA مورد بررسی در این پژوهش با نشانگر RAPD، نشان داد که این نشانگر در صورت استفاده صحیح، ابزار مفیدی برای مطالعه تنوع در این قارچ می‌باشد. این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه دانکن و همکاران (Duncan *et al.*, 1993)، مؤمنی و همکاران (۱۳۸۴) و محمودی و همکاران (۱۳۸۴)، مطابقت داشت.

تجزیه خوشه‌ای

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ۱۸۷ آلل (۲۳۲۴ باند الگوی باندی) حاصل از تلفیق داده‌های سه نشانگر RAPD، ISSR و ERIC، بر اساس ضریب جاکارد در سطح تشابه ۴۰ درصد، جدایه‌ها را به دو گروه مجزا تقسیم نمود (شکل۴). گروه اول ۳۲ درصد جدایه‌ها و گروه دوم ۶۸ درصد از آنها را شامل شد. گروه اول شامل جدایه های کند رشد و گروه دوم در بر گیرنده جدایه‌های تند رشد بودند (داده ها نشان داده نشده‌اند. خدایاری و همکاران، زیر چاپ)

تجزیه به مؤلفه اصلی، مقایسه ماتریس‌ها و آزمون مانتل

پلات شکل ۵ نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه اصلی داده‌های RAPD، ISSR و ERIC را نشان می‌دهد. در این پلات جدایه‌ها در دو گروه کاملاً مجزا قرار گرفتند. پلات‌های مربوط به تجزیه هر یک از سیستم‌های نشانگری بطور جداگانه نیز مؤید این نتیجه بود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند.خدایاری و همکاران، زیر چاپ).

میزان همبستگی بین ماتریس‌های تشابه حاصل از داده‌های RAPD، ISSR و ERIC با یکدیگر و بطور مجزا با استفاده از آزمون مانتل تعیین شد که در تمام حالات همبستگی مثبت و معنی‌دار بود. وجود همبستگی بین نتایج حاصل از نشانگر RAPD با نشانگرهای ISSR و ERIC حاکی از دقت در انجام کار با نشانگرهای تصادفی است (مؤمنی و همکاران، ۱۳۸۴؛ محمودی و همکاران، ۱۳۸۴؛Duncan *et al.*, 1993)؛ هر چند که پایداری نشانگر ERIC و ISSR به ترتیب، بیشتر از نشانگر RAPD می‌باشد؛ به گونه‌ای که استفاده از یک جفت آغازگر ERIC همان نتایجی را که چندین آغازگر RAPD در آشکارسازی تنوع ژنتیکی به دست می‌دهند را در بردارد.

نیکویی برازش خوشه بندی با ماتریس تشابه (ضریب کوفنتیک) (جدول۱) نیز نشان داد که اندکی تطابق بیشتر بین دندروگرام‌های حاصل از RAPD و ISSR نسبت به ERIC وجود دارد؛ اما در مجموع چون در هر سه روش عدم وجود باند در معیار اندازه گیری منظور نمی شود بنابراین تفاوت چندانی میان همبستگی‌ها دیده نشد و برازش در سطح بسیار خوبی قرار گرفت.

محاسبه هتروزیگوسیتی، شاخص نشانگری و نسبت چندگانه

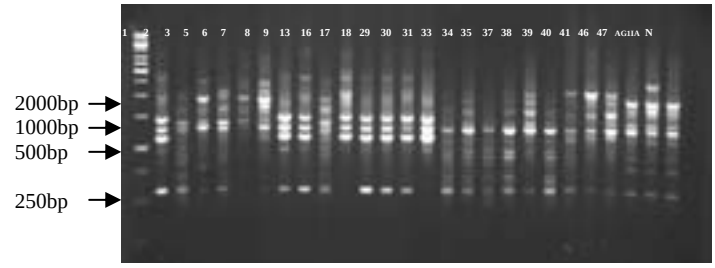
با استفاده از فراوانی آللی، شاخص‌های PIC، MI و EMR برای هر نشانگر و بطور جداگانه محاسبه گردید. بیشترین میزان PIC توسط نشانگر ERIC (۰/۴۴) و کمترین آن توسط نشانگر ISSR (۰/۳۷) بدست آمد؛ برای نشانگر RAPD نیز PIC بینابین دو نشانگر ERIC وISSR حاصل شد (۰/۴۰). این مطلب بیانگر توانایی بیشتر نشانگر ERIC نسبت به دو نشانگر دیگر در تعیین تنوع ژنتیکی بود. این نتیجه با یافته های شارما و همکاران

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.2.5.4]

(۲۰۰۵) که در تعین تنوع ژنتیکی این قارچ از نشانگرهایRAPD، ISSR و rep-PCR استفاده نموده‌اند، مشابهت داشت (جدول۲).

به منظور تعیین کارایی نشانگرها در تعیین چندشکلی، شاخص نشانگری و نسبت چندگانه مؤثر محاسبه شد.این شاخص‌ها در نشانگر ERIC به علت استفاده از آغازگرهای بلندتر نسبت به دو نشانگر ISSR و RAPD اطلاعات بیشتری را فراهم کرده است. بر خلاف پیش بینی، شاخص نشانگری و نسبت چندگانه مؤثر در نشانگر RAPD، بیشتر از نشانگر ISSR بود؛ علت این اختلاف بالا بودن تعداد آلل‌های چندشکل به ازای هر آغازگر RAPD نسبت به ISSR بوده است که نتایج حاصل مطابق با نتایج شارما و همکاران (Sharma *et al*., 2005) بود. لازم به ذکر است که با توجه به ژنوم و جدایه‌های قارچی، نسبت چندگانه مؤثر ممکن است متفاوت باشد که با تغییر در تعداد و نوع آغازگرها نتایج متفاوتی بدست می‌آید(Powel *et al*., 1995).

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که با وجود خصوصیات مشترکی نظیر غالبیت، سادگی و سرعت عمل بالا در هر سه نشانگر RAPD، ISSR و ERIC و همچنین قدرت تفکیک مشابه جدایه‌ها به دو گروه کاملا مجزای ژنتیکی توسط هر یک از سیستم‌های نشانگری (خدایاری و همکاران، زیر چاپ)، نشانگر ERIC، به علت بلند بودن توالی آغازگرها و دمای اتصال بالاتر، درمقایسه با دو نشانگر RAPD و ISSR، توانایی بیشتری در تفسیر تنوع ژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد (Kang *et al*., 2002; Sharma *et al*., 2005). در پژوهش‌های بعدی می‌توان از این نشانگرها در بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه های *Rhizoctonia* با تعداد نمونه ی بیشتری بهره جست.

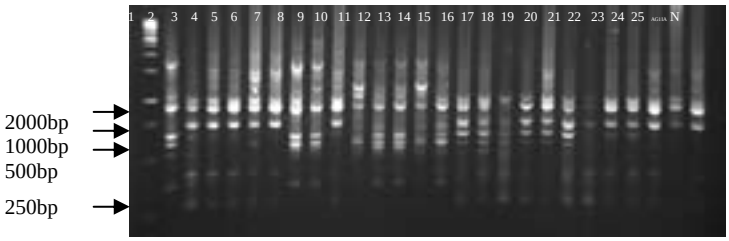


شکل۱: الگوی باندی RAPDحاصل از تکثیر جدایه ها ی *Rhizoctonia solani* با استفاده از آغازگر RC09

M: نشانگر مولکولی 1Kb

AG1 IA: کنترل مثبت

N : کنترل منفی (H_2O)

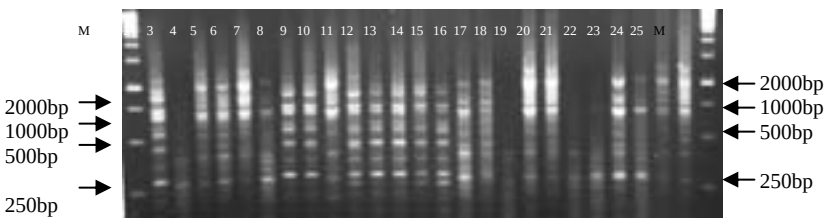


شکل ۲: الگوی باندی ISSR حاصل از تکثیر جدایه ها ی *Rhizoctonia solani* با استفاده از آغازگر P5

M: نشانگر مولکولی 1Kb

AG1 IA: کنترل مثبت

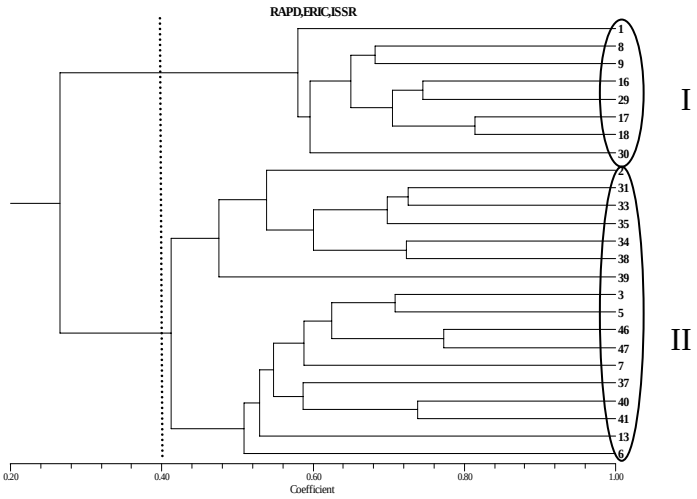
N : کنترل منفی (H_2O)



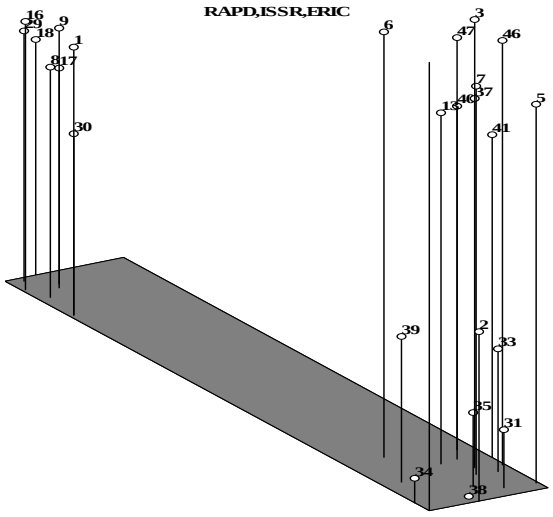
شکل۳: الگوی باندی حاصل از تکثیر جدایه ها ی *Rhizoctonia solani* با استفاده از آغازگرهای ERIC

M: نشانگر مولکولی 1Kb

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.2.5.4]



شکل۴: دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ماتریس تشابه Jaccard. برای ۲۵ جدایه منتخب *Rhizoctonia solani* AG1-IA با استفاده از تلفیق داده‌های حاصل از سه نشانگر RAPD، ISSR وERIC



شکل۵: پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتریس تشابه Jaccardبرای ۲۵ جدایه منتخب *Rhizoctonia solani* AG1-IA با استفاده از تلفیق داده‌های حاصل از سه نشانگر RAPD، ISSR وERIC و در نامگذاری جدایه‌ها حروف Rs حذف شده است .

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.2.5.4]

جدول۱: نتایج آزمون مانتل برای سه نشانگر RAPD، ISSR وERIC

	RAPD	ISSR	ERIC	RAPD+ISSR+ERIC
همبستگی بین ماتریس تشابه جاکارد و ماتریس کوفنتیک حاصل از آن	r = 0.91 p = 0.002	r = 0.94 p= 0.002	r = 0.86 p= 0.002	r = 0.94 P= 0.002

۱۰۰۰مرتبه پرمیوتیشن تست

جدول ۲: مجموع جایگاه ژنی، تعداد جایگاه ژنی چندشکل، میزان چندشکلی نشانگر(PIC) تعداد باندهای چندشکل(**β**)، نسبت چند گانه موثر(**EMR**) و شاخص نشانگری(**MI**) حاصل از سه نشانگر RAPD، ISSR و rep-PCR در بررسی ۲۵ جدایه قارچ *Rhizoctonia solani* AG1-1A

نام آغازگر	توالی	مجموع جایگاه های ژنی	تعداد جایگاه های ژنی چندشکل	PIC	β	EMR	MI
RAPD							
OPA04	5`GAAACGGGTG-3`	22	22	0.41	1.00	22.00	9.05
OPA07	5`-AATCGGGCTG-3`	11	11	0.42	1.00	11.00	4.61
OPA16	5`-AGCCAGCGAA-3`	14	12	0.37	0.86	10.29	3.82
OPC18	5`-TGAGTGGGTG-3`	15	14	0.41	0.93	13.07	5.42
OPC19	5`-GTTGCCAGCC-3`	15	14	0.36	0.93	13.07	4.74
R28	5`-ATGGATCCGC-3`	16	15	0.44	0.94	14.06	6.20
RC09	5`-GATAACGCAC-3`	20	19	0.40	0.95	18.05	7.19
Total		113	107				
Average				0.40	0.94	14.5	5.86
ISSR							
P1	5`- TCTCTCTCTCTCTCTCC-3`	15	15	0.42	1.00	15.00	6.27
P5	5`-ACACACACACACACACYC-3`	12	11	0.36	0.92	10.08	3.66
P6	5`-GAGAGAGAGAGAGAGAYG-3`	21	17	0.32	0.81	13.76	4.47
ISSR-02	5`-ACTGACTGACTGACTG-3`	16	14	0.38	0.88	12.25	4.61
Total		64	57				
Average				0.37	0.90	12.77	4.75
ERIC 1R **ERIC 2I**	5`-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3` 5`-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3`	23	23	0.44	1	23	10.05
Total Markers		200	187				

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.2.5.4]

منابع

۱ ترابی م، بینش، ح (۱۳۶۳)،بیماری شیت بلایت برنج ، بررسی در مورد عامل بیماری ، پراکندگی و حساسیت چند رقم برنج در استان‌های شمالی ایران بیماریهای گیاهی (۲۰) ۳۴-۲۱.

۲ خدایاری م؛ صفایی ن؛ شمس بخش م. بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی *Rhizoctonia solani* AG1-IA با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD، بیماریهای گیاهی، زیر چاپ.

۳ رحیمیان، ح. (۱۳۶۷). سوختگی موجی ساقه برنج در ساری، بیماری‌های گیاهی، (۲۵):۴۶-۴۰

۴ مؤمنی، ج.، مظفری، ج.، فلاحتی رستگار، م.، جعفرپور، ب. (۱۳۸۴). تعیین تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های *Rhizoctonia solani* بیماریزا در مزارع چغندرقند استان خراسان به کمک نشانگر مولکولی RAPD، بیماری‌های گیاهی ۴۱: ۵۰۵-۴۹۵.

۵ محمودی، س.ب.، مصباحی، م.، علیزاده، م.، نوروزی، پ. (۱۳۸۴). بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* با RAPD و ITS-rDNA. بیماری‌های گیاهی۱۲: ۵۴۲-۵۲۳.

۶ نقوی، م.، قره یاضی، ب.، حسینی سالکده، ق. (۱۳۸۴). نشانگرهای مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۲۰ صفحه.

7 Anderson, N. A. (1982). The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani* Annu. Rev. Phytopath. 20:329-374

8 Groth, D. E. and Bond, J. A. (2007). Effects of cultivars and fungicides on rice sheath blight, yield, and quality. Plant Disease 91: 1647-1650.

9 Cubeta, M. A., and Vilgalys, R. (1997). Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. Phtopathology 87:480-484.

10 de Bruijn, F. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58:2180–2187.

11 Dulson, J., Kott, L. S., and Rirle, V, L. (1998). Efficacy of bulked DNA samples for RAPD DNA fingerprinting of genetically complex *Brassica napus* cultivars. Euphytica 102:65-70.

12 Duncan, S., Barton, J. E., and Ó Brien, P. A. (1993). Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by Random Amplified Polymorohic DNA assay. Mycol. Res. 97:1075-1082.

13 Esselman, E. J., Jianqiang, L., Crawford, D. J., Winduss, J. L., and Wolfe, A. D. (1999). Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and Intersimple Sequence Repeat (ISSR) markers. Mol. Ecol. 8:443-451.

14 Forutan, A., and Rahimian, H. (1991). Distribution and characterization of isolates of *Rhizoctonia solani* and *R .oryzae-sativa* in rice fields of Mazandaran. Iran. J. Plant Pathol. 27:45-51.

15 Gilson, E., Clement, J. M., Brutlag, D., and Hofnung, M. (1984). A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E.coli*. EMBO 3:1417–1421.

16 Guleria, S., Aggarwal, R., Thind, T. S., and Sharma, T. R. (2007). Morphological and Pathological Variability in Rice Isolates of *Rhizoctonia solani* and molecular analysis of their Genetic Variability. Phytopathology 155:654–661.

17 Jaccard, P. (1908). Nouvelles researches sue la disterbiution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat 44:223-270.

18 Kang, H. W., Park, D. S., Go, S. J., and Eun, M. Y. (2002) Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequences of Korean weedy rice. Mol. Cells. 13:281–287.

19 Keijer, J., Houterman, P. M., Dullemans, A. M., and Korsman, M. G. (1996). Heterogenicity in electrophoretic karyotype within and between anastomosis groups of Rhizoctonia solani. Mycol. res. 100:789-797.

20 Khodayari, M., Safaie, N., Shamsbakhsh, M. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG1-IA isolates, the causal agent of rice sheath blight, using morphological and molecular markers. J. Phytopathology (In Press).

21 Kuninaga, S., and Yokosawa, R. (1985a). DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn. VI. Genetic relatedness among seven anastomosis groups. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 51:127-132.

22 Kuninaga, S., and Yokosawa, R. (1985b). DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn. VII. Genetic relatedness between AG-BI and other anastomosis groups. Annual Phytopathology Society Jappan 51:133-138.

23 Lee, F. N., and Rush, M. C. (1983). Rice sheath blight: a major rice disease. Plant Dis. 67:829-832.

24 Liu, Z., Nickrent, D. L., and Sinclair, J. B. (1990). Genetic relationships among isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2 based on isozyme analysis. Ann. J. Plant Pathol. 12:376–382.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.2.5.4]

25 Lynch, M and walsh, JB. (1998) Genetics and analysis of Quantitative trates. Sinauer Assocs., Inc., Sunderland MA.
26 Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. **27**:209-220.
27 Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D. A., Boulnois G. J., and Claverys, J. P. (1992) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Res. 20:3479–3483.
28 Martinez, F.N., and English, J.T. 1997. Population genetics of soilborne fungal plant pathogens (Introduction). Phytopathology 87: 446-447.
29 Mordue, J. E. M. (1974). *Thanatephorus cucumeris*. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycologycal Institute, No.409, 2p.
30 Mordue, J. E. M., Currah, R. S., and Bridge, P. D. (1989). An integrated approach to *Rhizoctonia* taxonomy: cultural, biochemical and numerical techniques. Mycol. Res. 92:78-90.
31 Nagaoka T, and Ogihara, Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RAPD and RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 94:597-602.
32 Ogoshi, A.(1996). The genus *Rhizoctonia* pages1-9. In *:Rhizoctonia* species:Taxonomy,Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control; B.Sneh, S.Jabaji-Hare, S.Neate and Digst ,G. eds., Kluwer Academic Publishers, London.
33 Pascual, C. B., Toda, T., Raymondo, A. D., and Hyakumachi, M. (2000). Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. Plant Pathology 49:108–118
34 Phillips, R.L., and Vasil, I. K. (2001). DNA-based markers in plants. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 497 pp.
35 Powell W., Morgante, M., Andre, C., Vogel, J., Tingey, S and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsattlite) markers for germplasm analysis. Molecular breeding. 2:225-238.
36 Rodriguez-Barradas, M. C., Hamill, R. J., Houston, E. D., Georghiou, P. R., Clarridge, J. E., Regnery, R. L., Koehler, J. E. (1995). Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. J. Clin. Microbiol. 33:1089–1093.
37 Rohlf, F. J. (1993). NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Setauket, NY, USA, Exeter Biological Software.
38 Sechi, L.A., Zanetti, S., Dupré, I., Delogu, G., Fadda, G. (1998). Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J. Clin. Microbiol. 38:128–132.
39 Sharma, M., Gupta, S. K., and Sharma, T. R.(2005). Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. Phytopathology 153:449–456.
40 Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., and Sneh, B. (2006). The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. Using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping Mycol. Soc. Jpn. 47:299–316
41 Sharples G. J., and Lloyd, R. G. (1990). A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. Nucleic Acids Res 18:6503–6508.
42 Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. (1991). Identification of *Rhizoctonia* Species. APS Press. 133p.
43 Stern, M. J., Ames, G. L., Smith, N. H., Robinson, E. C., Higgins, C. F., (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell 37:1015–1026.
44 Suparyono, Catindig, J. L. A., Castilla, N. P., Elazequi, F. A. (2003). Sheath Blight of Rice. International Rice Research Institute. Available in:http://www.knowledgebank.irri.org/ ricedoctor-mx
45 Toda, T., Hyakumachi, M., and Arora, D. K. (1999). Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP-PCR. Microbiol. Res 154:247–258.
46 Tommerup, I. C., Barton, J. E., and O'Brien, P. A. (1995). Reliability of RAPD fingerprinting of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*. Mycol Res 99:179–186.
47 Versalovic, J., and Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19:6823–6831.
48 Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J., and Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Meth. Mol. Cell. Biol. 5:25–40.
49 Vilgalys, R., and Cubeta, M. A. (1994). Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia.* Ann. Rev Phytopath 32:135-155.
50 Zietkiewicz, E., Fafalski, A., and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176-183.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1387.3.2.5.4]