

مقایسه نشانگرهای مولکولی RAPD، ISSR و ERIC در بررسی تنوع

ژنتیکی قارچ *Rhizoctonia solani* AG1-IA

مهديه خداياری^۱، ناصر صفايي^{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 کاملاً 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 داده‌های 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 بعلاوه 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 کاملاً مجزای ژنتیکی، نشانگر ERIC قدرت بیشتری در آشکارسازی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها دارد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،

تشابه ژنتیکی،

نشانگرهای مولکولی،

قارچ *Rhizoctonia solani* AG1-IA

جدایه‌هایی که قادر به آناستوموز با یکدیگر نیستند متعلق به AG مختلف می‌باشند (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 گروه‌های 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 قدیمی تر 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.*, 2005; Sharma *et al.*, 2007). 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 آلی، قابلیت اعتماد به این نشانگر را کاهش داده است (Philips and Vasil, 2001; Tommerup *et al.*, 1995).

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 ویژه‌ای 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, 1984; Torabi and Binesh, 1989). 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 تاکسونومیک یک واحد مشخص نیست بلکه مجموعه‌ای 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 مناسب‌ترین 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 همدانه‌ی هیف‌ها توجه اغلب ریزوکتونیا 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.

تعيين كارايي اين نشانگرها براي انعكاس گوناگوني ژنتيكي اين بيمارگر مي پردازد.

مواد و روش ها

مشخصات جدايه هاي قارچ

چهل و هفت جدايه قارچ *R. solani*، از مركز تحقيقات برنج رشت تهيه و در اين پژوهش از آن استفاده شد. اين جدايه ها طی سال ۱۳۸۲ از غلاف برگ ارقام مختلف برنج استان هاي گيلان (تعداد ۴۵ جدايه) و مازندران (تعداد دو جدايه) جداسازي شدند. در اين پژوهش از جدايه خالص شده و استاندارد *R. solani* AGI-IA (تهيه شده از كلسيون قارچ آزمايشگاه بيماري شناسي دانشكده كشاورزي، دانشگاه تربيت مدرس)، براي مطالعه بيشتر ساير جدايه ها استفاده شد.

جدايه ها از جهت ظاهري، آزمون آناستوموز و بيماري زايبی بررسي و پس از استخراج DNA، تنوع ژنتيكي جدايه ها با استفاده از سه سيستم نشانگري RAPD، ISSR، rep-PCR بررسي شد (خداياري و همكاران، زير چاپ؛ Khodayari et al., In Press)

نشانگرها

در اين پژوهش از داده هاي مربوط به سه نشانگر RAPD، ISSR و rep-PCR استفاده شد. براي نشانگر RAPD هفت آغازگر OPA04، OPA07، OPC18، OPC19، R28 و RC09 (جدول ۲)، براي نشانگر ISSR چهار آغازگر و براي نشانگر rep-PCR از يك جفت آغازگر ERIC استفاده شد. آغازگرهاي مذکور بر اساس چندشكلي و تکرار پذيري انتخاب شدند؛ براي اطلاع از جزئيات روش كار، به مقالات خداياري و همكاران (خداياري و همكاران، زير چاپ، Khodayari et al., In Press) مراجعه شود.

تجزيه داده ها

نشانگرهاي به كار رفته در اين پژوهش، جزء نشانگرهاي غالب بوده كه در تفسير ژل هر سه سيستم وجود (۱) يا عدم وجود (صفر) باند امتياز دهی شد (Sharma et al., 2005; Toda et al., 1999).

از سال ۱۹۹۴، نشانگر مولكولي به نام Inter-Simple Sequence Repeat Amplification يا ISSR، براي انگشت نگاري DNA بكار گرفته شد (Zietkiewicz et al., 1994) كه آغازگرهاي آن مبتني بر آغازگرهاي SSR تغيير يافته براساس توالي هاي مجاور ريز ماهواره ها كه در سراسر ژنوم پراكنده اند می باشد. استفاده از اين روش مانند نشانگر RAPD بسيار سريع و آسان بوده و قابليت تكثير نشانگر SSR را داشته و چند شكلي بيشترى را نسبت به آغازگرهاي RAPD نشان دهد (Nagaoka and Ogihara, 1997). از اين نشانگر نيز براي بررسي تنوع ژنتيكي قارچ ها استفاده شده است (Esselman et al., 1999; Gulaeria et al., 2007; Toda et al., 1999)

وجود توالي هاي پراكنده تكراري وارونه در ژنوم باكتري ها كه به شدت در ژنوم حفاظت شده اند موجب ابداع روش جديدي در تعيين تنوع ژنتيكي در قارچ ها، تجزيه و تحليل ارتباطات فيلوژنتيكي و گسترش روش هاي تشخيص گونه هاي درون جنس شده است (de Bruijn, 1992; Rodriguez-Barradas, et al., 1995). اين توالي ها اولين بار در باكتري هاي *Streptococcus* شناخته شده اند و با عناويني چون عناصر BOX (Martin et al., 1992)، REP (Stern et al., 1984)، PU (Gilson et al., 1984) و IRU (Sharples et al., 1990) يا Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) ERIC (نامگذاري شده اند كه تكثير اين نواحي اساس نشانگر rep-PCR می باشد. اين نشانگرها با استفاده از دو آغازگر قادر به تكثير نواحي بين دو توالي تكراري (Versalovic et al., 1991, 1994) و يا ميان اين واحدها و ديگر واحدهاي تكراري می باشند (Sechi et al., 1998).

با توجه به اهميت قارچ *R. solani* و خسارت هاي عمده اي كه به گياهان زراعي وارد می كند، تعيين نشانگر مناسب و برتر در بررسي تنوع ژنتيكي قارچ ها مقايسه نشانگرهاي مولكولي مختلف، ضروري به نظر می رسد. اين پژوهش به مقايسه تنوع ژنتيكي جدايه هاي جمع آوري شده *R. solani* توسط سه سيستم نشانگري RAPD، ISSR و rep-PCR، با استفاده از شاخص هاي مختلف و

تجزیه خوشه‌ای

بر اساس داده‌های خام حاصل از نشانگرهای مولکولی RAPD، ERIC و ISSR، 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 کوفتیک و ماتریس تشابه یا فاصله ضریب کوفتیک به عنوان معیاری برای اندازه گیری نیکویی برازش خوشه بندی (Goodness of Fit) مورد استفاده قرار گرفت. میزان نیکویی برازش در دامنه $0 < r < 1$ متغیر می باشد. $0/9 \leq r$ ، برازش بسیار خوب، $0/8 \leq r \leq 0/9$ ، برازش خوب، $0/7 \leq r \leq 0/8$ ، برازش ضعیف و $r \leq 0/7$ 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 (1) محاسبه شد (Lynch and Walsh, 1998). در این فرمول P_i فراوانی آلل i ام و n تعداد آلل هاست.

$$(1). PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

شاخص نشانگری (MI=Marker Index) که بیانگر میزان چندشکلی است و می تواند بعنوان شاخصی جهت برآورد کارایی یک نشانگر در یک ژرم پلاسما 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

$$(2). MI = PIC \times EMR$$

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

$$(3) EMR = n_p \times \beta$$

در این فرمول، n_p تعداد کل باندهای چندشکل و β (نسبت تعداد باند چندشکل به تعداد کل باند، می باشد (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 آغازگر RAPD (۱۶ جایگاه 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 و RAPD 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)

(جدول ۲). بالا بودن تعداد جاياگاه ژني حاصل از نشانگر RAPD نسبت به ISSR را مي توان به اتصال غير اختصاصي آغازگرهاي RAPD به نقاط مختلف ژنوم به دليل کوتاه بودن توالي آنها، نسبت داد. در پژوهشي که توسط ايسلمان و همکاران (1999) به منظور تعيين تنوع ژنتيكي قارچ *Calamagrostis porteri ssp. insperata* با نشانگرهاي RAPD و ISSR صورت گرفت، ميزان چندشكلي بيشتري در ميان جدايه هاي مورد بررسي با نشانگر ISSR نسبت به نشانگر RAPD ديده شد؛ وي علت آن را فراواني مناطق تکرار شونده در ژنوم قارچ، گزارش نمود. تفاوت اين نتايج را مي توان در تنوع موجود در توالي هاي ژنوم قارچ هاي مورد مطالعه بررسي کرد.

وجود شرايط دقيق و دماي اتصال بالاي آغازگرها در دو سيستم نشانگري ISSR و ERIC در مقايسه با RAPD باعث مي شود تا دو فردي که از لحاظ وجود يک قطعه با هم متفاوتند به خوبي از يکديگر تفکيک شوند درحاليکه در آزمون RAPD امکان اتصال آغازگرها به يکديگر وجود دارد (Dulson, 1998). البته نتايج حاصل از تنوع ژنتيكي جدايه هاي *R. solani* AG1-IA مورد بررسي در اين پژوهش با نشانگر RAPD، نشان داد که اين نشانگر در صورت استفاده صحيح، ابزار مفيدي براي مطالعه تنوع در اين قارچ مي باشد. اين نتيجه با نتايج حاصل از مطالعه دانکن و همکاران (Duncan et al., 1993)، مؤمني و همکاران (۱۳۸۴) و محمودي و همکاران (۱۳۸۴)، مطابقت داشت.

تجزيه خوشه اي

نتايج حاصل از تجزيه و تحليل ۱۸۷ آلل (۲۳۲۴ باندا الگوي باندي) حاصل از تلفيق داده هاي سه نشانگر RAPD، ISSR و ERIC، بر اساس ضريب جاکارد در سطح تشابه ۴۰ درصد، جدايه ها را به دو گروه مجزا تقسيم نمود (شکل ۴). گروه اول ۳۲ درصد جدايه ها و گروه دوم ۶۸ درصد از آنها را شامل شد. گروه اول شامل جدايه هاي کند رشد و گروه دوم در بر گيرنده جدايه هاي تند رشد بودند (داده ها نشان داده نشده اند. خداياري و همکاران، زير چاپ)

تجزيه به مؤلفه اصلي، مقايسه ماتريس ها و آزمون مانتل پلات شکل ۵ نتايج حاصل از تجزيه به مؤلفه اصلي داده هاي RAPD، ISSR و ERIC را نشان مي دهد. در اين پلات جدايه ها در دو گروه کاملاً مجزا قرار گرفتند. پلات هاي مربوط به تجزيه هر يک از سيستم هاي نشانگري بطور جداگانه نيز مؤيد اين نتيجه بود (داده ها نشان داده نشده اند. خداياري و همکاران، زير چاپ).

ميزان همبستگي بين ماتريس هاي تشابه حاصل از داده هاي RAPD، ISSR و ERIC با يکديگر و بطور مجزا با استفاده از آزمون مانتل تعيين شد که در تمام حالات همبستگي مثبت و معني دار بود. وجود همبستگي بين نتايج حاصل از نشانگر RAPD با نشانگرهاي ISSR و ERIC حاكي از دقت در انجام کار با نشانگرهاي تصادفي است (مؤمني و همکاران، ۱۳۸۴؛ محمودي و همکاران، ۱۳۸۴؛ Duncan et al., 1993)؛ هر چند که پايداري نشانگر ERIC و ISSR به ترتيب، بيشتراز نشانگر RAPD مي باشد؛ به گونه اي که استفاده از يک جفت آغازگر ERIC همان نتايجي را که چندين آغازگر RAPD در آشکارسازي تنوع ژنتيكي به دست مي دهند را در بردارد.

نيکوبي برازش خوشه بندي با ماتريس تشابه (ضريب کوفتنيک) (جدول ۱) نيز نشان داد که اندکي تطابق بيشتري بين دندروگرام هاي حاصل از RAPD و ISSR نسبت به ERIC وجود دارد؛ اما در مجموع چون در هر سه روش عدم وجود باندا در معيار اندازه گيري منظور نمي شود بنابراين تفاوت چنداني ميان همبستگي ها ديده نشد و برازش در سطح بسيار خوبي قرار گرفت.

محاسبه هتروزيگوسيتي، شاخص نشانگري و نسبت چندگانه با استفاده از فراواني آلي، شاخص هاي MI، PIC و EMR براي هر نشانگر و بطور جداگانه محاسبه گرديد. بيشتري ميزان PIC توسط نشانگر ERIC (۰/۴۴) و کمترين آن توسط نشانگر ISSR (۰/۳۷) بدست آمد؛ براي نشانگر RAPD نيز PIC بينابين دو نشانگر ERIC و ISSR حاصل شد (۰/۴۰). اين مطلب بيانگر توانايي بيشتري نشانگر ERIC نسبت به دو نشانگر ديگر در تعيين تنوع ژنتيكي بود. اين نتيجه با يافته هاي شارما و همکاران

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 کاملاً 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، در مقایسه با دو نشانگر RAPD و ISSR، توانایی بیشتری در تفسیر تنوع ژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد (Kang et al., 2005; Sharma et al., 2002). در پژوهش‌های بعدی می‌توان از این نشانگرها در بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌های *Rhizoctonia* با تعداد نمونه‌ی بیشتری بهره جست.

(۲۰۰۵) که در تعیین تنوع ژنتیکی این قارچ از نشانگرهای RAPD، ISSR و rep-PCR استفاده نموده‌اند، مشابهت داشت (جدول ۲). 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 RAPD و ISSR 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 شمارما 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).

شکل ۱: الگوی بانندی RAPD حاصل از

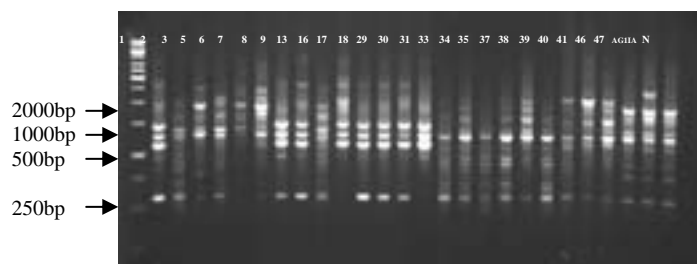
تکثیر جدایه‌های *Rhizoctonia solani*

با استفاده از آغازگر RC09

M: نشانگر مولکولی 1Kb

AG1 IA: کنترل مثبت

N: کنترل منفی (H₂O)



شکل ۲: الگوی بانندی ISSR حاصل از

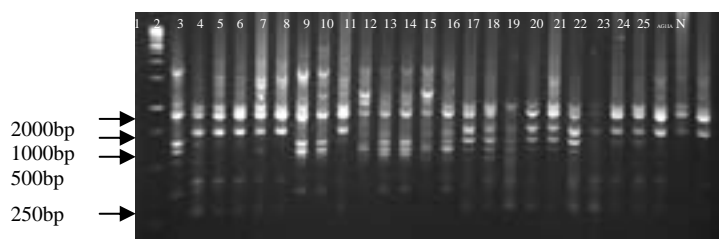
تکثیر جدایه‌های *Rhizoctonia solani*

با استفاده از آغازگر P5

M: نشانگر مولکولی 1Kb

AG1 IA: کنترل مثبت

N: کنترل منفی (H₂O)

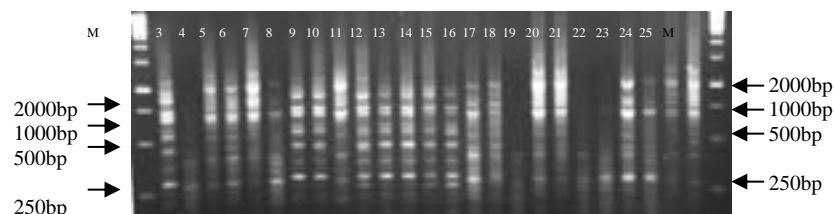


شکل ۳: الگوی بانندی حاصل از تکثیر

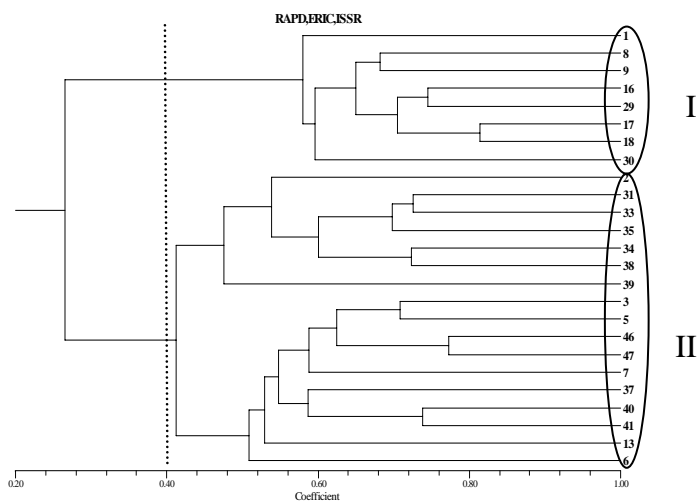
جدایه‌های *Rhizoctonia solani* با

استفاده از آغازگرهای ERIC

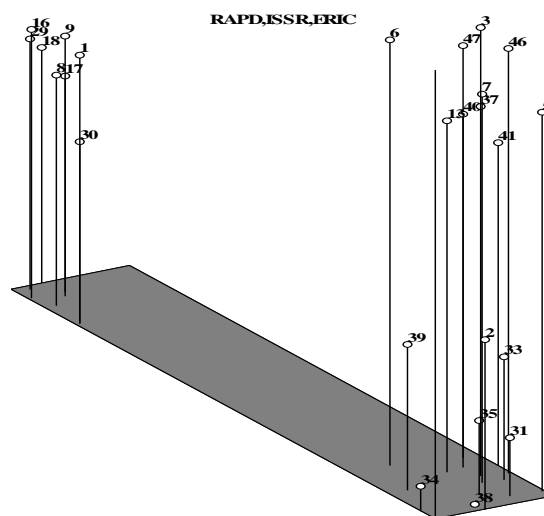
M: نشانگر مولکولی 1Kb



شکل ۴: دندروگرام ترسيم شده بر اساس روش UPGMA و ماتريس تشابه Jaccard. برای ۲۵ جدایه منتخب *Rhizoctonia solani* AG1-IA تلفیق داده‌های حاصل از سه نشانگر RAPD، ERIC و ISSR



شکل ۵: پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتريس تشابه Jaccard برای ۲۵ جدایه منتخب *Rhizoctonia solani* AG1-IA با استفاده از تلفیق داده‌های حاصل از سه نشانگر RAPD، ERIC و ISSR و در نامگذاری جدایه‌ها حروف Rs حذف شده است.



جدول ۱: نتایج آزمون مانتل برای سه نشانگر RAPD، ISSR و ERIC

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

*** مرتبه پرمیوتیشن تست

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

نام آغازگر	توالی	تعداد		PIC	β	EMR	MI
		مجموع جایگاه های ژنی	جایگاه های ژنی چندشکل				
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'-TCTCTCTCTCTCTCC-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'-GAGAGAGAGAGAGAYG-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	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	23	23	0.44	1	23	10.05
ERIC 2I	5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'						
Total Markers		200	187				

منابع

- 12 Duncan, S., Barton, J. E., and Ó Brien, P. A. (1993). Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by Random Amplified Polymorphic 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 J.* 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 recherches 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.
- 1 ترابي م، بييش، ح (۱۳۶۳)، بيماري شيت بلايت برنج، بررسي در مورد عامل بيماري، پراكندي و حساسيت چند رقم برنج در استان‌هاي شمالي ايران بيماريهاي گياهي (۲۰) ۲۱-۳۴.
- 2 خداياري م؛ صفايي ن؛ شمس بخش م. بررسي تنوع ژنتيكي جدايه‌هاي ايراني AG1-IA *Rhizoctonia solani* با استفاده از نشانگر مولكولي RAPD، بيماريهاي گياهي، زير چاپ.
- 3 رحيميان، ح. (۱۳۶۷). سوختگي موجي ساقه برنج در ساري، بيماري‌هاي گياهي، (۲۵): ۴۶-۴۰.
- 4 مؤمني، ج.، مظفري، ج.، فلاحتي رستگار، م.، جعفرپور، ب. (۱۳۸۴). تعيين تنوع ژنتيكي بين جدايه‌هاي *Rhizoctonia solani* بيماريزا در مزارع چغندر قند استان خراسان به كمك نشانگر مولكولي RAPD، بيماري‌هاي گياهي ۴۱: ۴۹۵-۵۰۵.
- 5 محمودي، س.ب.، مصباحي، م.، عليزاده، م.، نوروزي، پ. (۱۳۸۴). بررسي تنوع ژنتيكي جدايه‌هاي *Rhizoctonia solani* با RAPD و ITS-rDNA. بيماري‌هاي گياهي ۱۲: ۵۴۲-۵۲۳.
- 6 نقوي، م.، قره ياضي، ب.، حسيني سالكده، ق. (۱۳۸۴). نشانگرهاي مولكولي، 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. *Phytopathology* 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.

- 25 Lynch, M and Walsh, J.B. (1998) Genetics and analysis of Quantitative traits. 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 Mycological 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* pages 1-9. 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 (microsatellite) 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/ricedocor-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.