

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی قارچ

Macrophomina phaseolina، عامل پوسیدگی ذغالی سویا،

با استفاده از نشانگرهای ISSR و rep-PCR

فرناز جلالی^۱، ناصر صفایی^{۲*}، سعید عباسی^۳

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس دانشکده

کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی

۳- استادیار دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nsafaie@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۹)

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی *Macrophomina phaseolina* عامل پوسیدگی ذغالی سویا، ۲۴ جدایه از این قارچ جداسازی شده از مناطق عمده کشت سویای ایران شامل استان‌های گلستان، مازندران، اردبیل و لرستان با استفاده از دو روش مختلف انگشت نگاری مولکولی ISSR و rep-PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. از مجموع ۱۰ آغازگر ISSR، سه آغازگر واجد چند شکلی و تکرار پذیری بیشتر بوده، به همراه آغازگرهای BOX 1A، ERIC 2I، ERIC 1R و REP 2I برای تکثیر DNA جدایه‌ها به کار رفتند. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مجموع آغازگرهای ISSR جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۸ درصد به سه گروه تقسیم نموده و به استثنای یک جدایه از استان اردبیل، سایر جدایه‌های غیر گلستان را از جدایه‌های استان گلستان تفکیک کرد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مجموع آغازگرهای rep-PCR جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۹ درصد به هفت گروه تقسیم نمود. این گروه‌بندی بی‌ارتباط با محل جغرافیایی جدایه‌ها بود. نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز این گروه‌بندی‌ها را تایید کرد. همبستگی مثبت و معنی‌داری میان ماتریس‌های تشابه حاصل از داده‌های ISSR و rep-PCR با یکدیگر و به طور مجزا مشاهده شد. نیکویی برازش خوشه بندی نیز در سطح بسیار خوب قرار گرفت. میزان چندشکلی بدست آمده برای نشانگر ISSR معادل ۸۷ درصد و برای نشانگر rep-PCR معادل ۹۱ درصد محاسبه گردید. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که با وجود خصوصیات مشترکی نظیر غالبیت، سادگی و سرعت عمل بالا در هر دو سیستم نشانگرهای ISSR و rep-PCR، نشانگر ISSR قدرت بیشتری در آشکارسازی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *M. phaseolina* با توجه به محل جغرافیایی آن‌ها دارد.

واژه‌های کلیدی

پوسیدگی ذغالی،
سویا،

Macrophomina phaseolina،
rep-PCR،
ISSR

مقدمه

بیماری پوسیدگی ذغالی سویا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول در سطح جهان به ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری با آب و هوای نیمه‌خشک می‌باشد. در ایران نیز این بیماری در برخی از مناطق کشت سویا، خسارت قابل توجهی را به این محصول وارد می‌کند. قارچ عامل بیماری، *Macrophomina phaseolina* قارچی پلی‌فاژ می‌باشد که بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی متعلق به ۱۰۰ خانواده اعم از تک‌لپه و دولپه را آلوده می‌کند (۴). این قارچ خاک‌زاد و بذرزاد می‌باشد (۲۱). گسترده بودن دامنه میزبانی، انتشار وسیع جغرافیایی و قدرت بقای زیاد و نیز پیچیدگی محیط خاک که موجب ناکارآمدی کنترل شیمیایی می‌شود، مدیریت و مهار این بیماری را بغرنج ساخته است. از این‌رو، همانند سایر بیماری‌های خاک‌زاد، استفاده از ارقام مقاوم در تلفیق با روش‌های زراعی، مناسب‌ترین، اقتصادی‌ترین و عملی‌ترین راه کنترل این بیماری می‌باشد. در این راستا، به منظور تدوین و اجرای برنامه‌های بهنجاری، شناخت ساختار جمعیت عامل بیماری‌زا و دقت و سهولت ارزیابی مقاومت از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. در واقع، یکی از دلایل عمده عدم توفیق در مدیریت بیماری‌های گیاهی، ناشی از شناخت اندک از ساختار ژنتیکی جمعیت‌های بیمارگر می‌باشد (۱۷).

علیرغم دامنه میزبانی وسیع، جمعیت‌های این قارچ تحت گونه *M. phaseolina* قرار داده می‌شوند و با وجود تنوع قابل توجهی که در جمعیت‌های این قارچ گزارش شده است، تلاش‌ها برای تشخیص زیر گونه‌های آن بر مبنای اندازه میکرواسکلریت‌ها، خصوصیات کشت، تغییر در جمعیت‌های بیمارگر در خاک در پاسخ به تناوب و تنوع در بیمارزایی، به دلیل تنوع وسیع درون گونه یا مشکلات در کمی کردن صفات به شکست انجامیده‌اند (۹ و ۲۳).

استفاده از نشانگرهای مولکولی بر مبنای DNA روش جدید و سریعی در مطالعات تنوع ژنتیکی برای بدست آوردن بینشی در مورد ساختار پیچیده جمعیت قارچ‌های پلی‌مورف نظیر *M. phaseolina* که دامنه وسیعی از گیاهان زراعی را آلوده می‌سازد، می‌باشد. انواع متفاوتی از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز

(PCR) از جمله RAPD (۴، ۸، ۱۰ و ۲۷)، RFLP (۲، ۲۴ و ۳۰)، AFLP (۷، ۱۸ و ۳۱) SSR (۵ و ۱۲) و URP-PCR (۱۳) در مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *M. phaseolina* در کشورهای مختلف به کار رفته‌اند.

از سال ۱۹۹۴، نشانگر مولکولی (Inter-simple sequence repeat amplification) در مطالعات ژنتیکی قارچ‌ها به کار رفت (۳۵). در این روش برای انگشت نگاری DNA از آغازگرهای SSR تغییر یافته براساس توالی‌های مجاور ریز ماهواره‌ها که در سراسر ژنوم پراکنده‌اند، استفاده می‌شود. این روش نیمه انتخابی بوده و پرایمرهای آن دارای طولی برابر با ۱۴ تا ۲۲ جفت باز (به صورت قلاب شده در انتهای ۳ یا ۵) می‌باشند. تکثیر در این نشانگر، در حضور یک آغازگر مکمل با توالی‌های SSR یا Microsatellite هدف، انجام می‌پذیرد و تنوع حاصله در طول فرآورده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تابعی از تعداد واحدهای ریزماهواره است (۳۴).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر مبنای توالی‌های تکرار شونده (rep-PCR)^۱ روش انگشت نگاری ژنومی دیگری است که کارایی آن برای تشخیص مولکولی گونه‌های باکتریایی اثبات گردیده است (۲۶ و ۳۳). خانواده‌های توالی‌های DNA تکرار شونده به نام‌های توالی پالیندرومی تکرار شونده خارج ژنی (REP)^۲ تا ۳۵ تا ۴۰ جفت بازی، توالی توافقی تکرار شونده داخل ژنی انتروباکتریایی (ERIC)^۳ تا ۱۲۴ تا ۱۲۷ جفت بازی و عنصر BOX^۳ ۱۵۴ جفت بازی، درون ژنوم گونه‌های مختلف باکتری‌ها پراکنده‌اند (۱۵ و ۳۲). گرچه آغازگرهای rep-PCR برای عناصر تکرار شونده در ژنوم‌های پروکاریوتی طراحی گردیدند، اما مشاهده شده است که آغازگرهای BOX، ERIC و REP توالی‌های بین توالی-های تکرار شونده در پروکاریوت‌ها (۱۴) و نیز برخی ژنوم‌های قارچی را هم با موفقیت تکثیر می‌کنند (۶) و برای مطالعه تنوع در سطوح بین و یا درون گونه جنس‌های قارچی متعدد به کار رفته‌اند (۳، ۱۹، ۲۰ و ۲۲). از این‌رو، rep-PCR روش نسبتاً جدیدی برای

^۱ Repetitive Extragenic Palindrome- based Polymerase Chain Reaction

^۲ Repetitive Extragenic Palindrome

^۳ Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

تعیین تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های قارچی می‌باشد که می‌تواند روش‌های موجود انگشت‌نگاری مبتنی بر DNA را تکمیل کند (۱۱). این روش انگشت‌نگاری‌های DNA را با تکثیر توالی‌های بین کپی‌های پراکنده تصادفی از یک قطعه DNA تکرار شونده در ژنوم، ایجاد می‌کند. استفاده از این نشانگر و نیز آغازگرهای میکروساتلایت قبلاً برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های هندی *M. phaseolina* جداسازی شده از گیاهان مختلف گزارش شده است (۲۵). مطالعه حاضر به بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی *M. phaseolina* روی سویا، جمع‌آوری شده از ۴۸ محل مختلف ۴ استان کشور، با استفاده از دو نشانگر مولکولی مختلف ISSR و rep-PCR می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی

در بازدیدهایی که در سال ۱۳۸۵ از مزارع سویا در استان‌های گلستان، مازندران، اردبیل و لرستان به عمل آمد، نمونه‌های مشکوک به بیماری پوسیدگی ذغالی با علائم پژمردگی و وجود نقاط سیاه‌رنگ در طوقه و ساقه گیاه جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌های آلوده ابتدا کاملاً با آب شستشو داده شدند تا گل و لای و آلودگی‌های سطحی آن‌ها حذف شوند. سپس با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی گردیده و قطعاتی از بافت آلوده درون تشتک‌های پتری روی محیط کشت آب آگار یا عصاره‌ی سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) حاوی ۲۵۰ قسمت در میلیون (ppm) کلرامفنیکل قرار داده شد. به منظور رشد قارچ، تشتک‌های پتری در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۳۵- ۲۸ نگهداری شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک ریشه انجام گرفت. از مجموع ۴۸ جدایه *M. phaseolina* به دست آمده از گیاه سویا، ۲۴ جدایه با توجه به پراکنش جغرافیایی انتخاب و در مطالعه حاضر به کار رفتند (جدول ۱).

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی جدایه‌های قارچی مطابق روش صفایی و همکاران (۱۳۸۴) استخراج گردید (۱). به این منظور، ۵۰-۴۰ میلی‌گرم پودر شده قارچ در نیتروژن مایع به یک میکروتیوب ۱/۵ ml

منتقل و سپس ۴۰۰ μl بافر استخراج (۱۰۰mM Tris-HCl، mM EDTA ۵ و ۴/۱M NaCl [pH=7.5-8]) به هر میکروتیوب اضافه گردید. محتویات میکروتیوب توسط دستگاه ورتکس (vortex) به مدت چند ثانیه هم زده شد و کاملاً مخلوط گردید. میکروتیوب‌ها سپس به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبی با دمای $^{\circ}\text{C}$ ۶۵ قرار داده شدند. پس از انتقال میکروتیوب‌ها بر روی یخ، به منظور سرد شدن و ته نشین شدن کامل پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها، محتویات میکروتیوب با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۴ و به مدت ۱۰ دقیقه، در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار (64R, Beckman) سانتریفوژ شد. محلول رویی با احتیاط زیاد به کمک میکروپیپت به میکروتیوب تمیز و سترون دیگری منتقل شده و ۰/۷ حجم آن ایزوپروپانول اضافه گردید. میکروتیوب به آرامی وارونه شد تا محتویات آن مخلوط گردد و سپس در دستگاه سانتریفوژ بدون یخچال (Eppendorph 5415D, Hamburg, Germany) به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از حذف ایزوپروپانول (فاز رویی)، رسوب حاصل در معرض هوای اتاق قرار گرفت تا باقیمانده الکل تبخیر و رسوب DNA در مجاورت هوا خشک گردد. سپس ۵۰ μl آب دیونیزه سترون به رسوب DNA اضافه و یک شب در یخچال نگهداری شد تا DNA در آب حل گردد. در ادامه و به منظور حذف RNA موجود، یک میکرولیتر RNase (۱۰mg/ml) به محلول حاصل اضافه گردید و پس از ۲ ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق، محلول به دست آمده در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۲۰- نگهداری شد. کیفیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز و غلظت آن توسط دستگاه بیوفتومتر (Eppendorph AG 22331, Hamburg, Germany) مورد سنجش قرار گرفت.

تکثیر PCR و الکتروفورز ژل

از میان ده آغازگر ISSR که مقدماتاً مورد آزمون قرار گرفتند، سه آغازگر تکرار پذیری و چندشکلی بیشتری را نشان دادند. در نتیجه این سه آغازگر به همراه آغازگرهای ERIC2I، ERIC1R، BOX1A و REP2I برای تکثیر کلیه جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲).

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *M. phaseolina* عامل پوسیدگی ذغالی سویا جمع‌آوری شده از چهار استان کشور

ردیف	محل جمع‌آوری	کد جدایه	ردیف	محل جمع‌آوری	کد جدایه
۱	کردکوی- گلستان	G-13*	۲۵	کفشگیری- گلستان	G-Ka3
۲	آق قلا- گلستان	G-16*	۲۶	کفشگیری- گلستان	G-Ka4
۳	خان بین- گلستان	G-19*	۲۷	کفشگیری- گلستان	G-Ka5*
۴	قرن آباد- گلستان	G-20*	۲۸	لمسک- گلستان	G-Lm1
۵	حسین آباد- گلستان	G-21*	۲۹	لمسک- گلستان	G-Lm2*
۶	عطا آباد- گلستان	G-22*	۳۰	لمسک- گلستان	G-Lm3
۷	علی آباد- گلستان	G-23*	۳۱	لمسک- گلستان	G-Lm4
۸	بابلسر- مازندران	M-30*	۳۲	لمسک- گلستان	G-Lm5*
۹	الشتر- لرستان	L-Al*	۳۳	نصر آباد- گلستان	G-NA1*
۱۰	جعفرآباد- اردبیل	A-Ja1*	۳۴	نصر آباد- گلستان	G-NA2
۱۱	جعفرآباد- اردبیل	A-Ja2*	۳۵	نصر آباد- گلستان	G-NA3
۱۲	بالاجاده- گلستان	G-Bj1*	۳۶	نصر آباد- گلستان	G-NA4
۱۳	بالاجاده- گلستان	G-Bj2	۳۷	نصر آباد- گلستان	G-NA5
۱۴	بالاجاده- گلستان	G-Bj3	۳۸	سر کلاته- گلستان	G-Sk1*
۱۵	بالاجاده- گلستان	G-Bj4*	۳۹	سر کلاته- گلستان	G-Sk2
۱۶	بالاجاده- گلستان	G-Bj5	۴۰	سر کلاته- گلستان	G-Sk3
۱۷	مغان- اردبیل	A-Mo*	۴۱	سر کلاته- گلستان	G-Sk4
۱۸	قلندر محله- گلستان	G-Gm1	۴۲	سیدمیران- گلستان	G-Sm1*
۱۹	قلندر محله- گلستان	G-Gm2*	۴۳	سیدمیران- گلستان	G-Sm2
۲۰	قلندر محله- گلستان	G-Gm3	۴۴	سیدمیران- گلستان	G-Sm3*
۲۱	قلندر محله- گلستان	G-Gm4	۴۵	سیدمیران- گلستان	G-Sm4
۲۲	قلندر محله- گلستان	G-Gm5	۴۶	توسکستان- گلستان	G-Tu1*
۲۳	کفشگیری- گلستان	G-Ka1*	۴۷	توسکستان- گلستان	G-Tu2
۲۴	کفشگیری- گلستان	G-Ka2	۴۸	توسکستان- گلستان	G-Tu3

* جدایه‌های استفاده شده در مطالعه تنوع ژنتیکی

جدول ۲- توالی کل آغازگرهای ISSR و rep-PCR آزمون شده.

نشانه‌گر	آغازگر	توالی
ISSR	ISSR02*	5'-ACTGACTGACTGACTG-3'
	ISSR10	5'-CACCACCACCACCAC-3'
	P1	5'-TCTCTCTCTCTCTCC-3'
	P4*	5'-GCG(CGA) ₅ -3'
	P5	5'-ACACACACACACACACYC-3'
	P6	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYG-3'
	Stag1	5'-BDBACAACAACAACAACA-3'
	Stag2	5'-CAACAACAACAACA-3'
	Stag3	5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3'
	PCMS*	5'-(GTC) ₇ -3'
rep-PCR	ERIC 1R*	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'
	ERIC 2I*	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
	BOX 1A*	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'
	REP 2I*	5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

* آغازگرهایی که تکرار پذیری و چندشکلی بیشتری داشته و برای کلیه جدایه‌ها استفاده شدند.

مرحله اتصال ۱/۵ دقیقه در °C ۵۳، مرحله گسترش دو دقیقه در °C ۷۲ و در پایان مرحله گسترش نهایی ۸ دقیقه در °C ۷۲ صورت گرفت.

برنامه PCR برای آغازگر BOX1A به صورت یک چرخه مقدماتی شامل مراحل واسرشتگی مقدماتی ۵ دقیقه در °C ۹۴، اتصال مقدماتی ۲ دقیقه در °C ۶۸، گسترش مقدماتی ۲ دقیقه در °C ۷۰ و سپس تکرار ۴۴ چرخه شامل مراحل واسرشتگی یک دقیقه در °C ۹۴، اتصال ۱ دقیقه در °C ۶۰، گسترش ۲ دقیقه در °C ۷۰ و در پایان گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در °C ۷۰ صورت گرفت. برنامه PCR برای آغازگر REP2I به صورت ۲ دقیقه در °C ۹۵، ۳۰ ثانیه در °C ۹۲، و سپس تکرار ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشتگی ۳۰ ثانیه در °C ۹۲، اتصال ۳۰ ثانیه در °C ۳۸، گسترش ۳ دقیقه و بیست ثانیه در °C ۶۸ و در پایان گسترش نهایی ۸ دقیقه در °C ۶۸ صورت گرفت.

الکتروفورز محصولات PCR در هر مورد، با شدت ولتاژ ثابت ۸۵ ولت، در ژل آگارز یک درصد در بافر 1X TBE انجام شد. رویت باندهای حاصل، با استفاده از اتیدیوم بروماید (۱ µg/ml) و تحت نور UV انجام پذیرفت.

برای آغازگرهای ISSR واکنش PCR در حجم واکنش ۲۰ µl برای هر جدایه شامل ۲ µl از بافر PCR ۱۰X، ۱۳/۵ µl آب دیونیزه سترون، ۰/۶ µl MgCl₂ (۵۰ mM)، ۰/۴ µl dNTP mix (۱۰ mM)، ۱ µl از هر یک از آغازگرها (۱۰ µM)، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۲ µl از DNA نمونه (۱ ng/µl) صورت گرفت. برای کنترل منفی ۲ µl آب دیونیزه سترون به جای DNA نمونه مصرف گردید. تکثیر PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorph AG 22331, Hamburg, Germany) برای آغازگرهای ISSR02 و P4 به صورت یک چرخه مقدماتی شامل مراحل واسرشتگی مقدماتی ۵ دقیقه در °C ۹۵، اتصال مقدماتی ۴۵ ثانیه در °C ۴۵، گسترش مقدماتی یک دقیقه در °C ۷۲، به دنبال آن تکرار ۳۸ چرخه شامل مراحل واسرشتگی ۴۵ ثانیه در °C ۹۵، اتصال ۴۵ ثانیه در °C ۵۰، گسترش یک دقیقه در °C ۷۲ و در پایان، مرحله گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در °C ۷۲ صورت گرفت. برای آغازگر PCMS دمای اتصال در چرخه ها °C ۶۷ مناسب تشخیص داده شد.

برای آغازگرهای rep-PCR حجم و مواد مورد استفاده در مخلوط واکنش همانند ISSR بود. برنامه PCR برای آغازگرهای ERIC به صورت مرحله واسرشتگی مقدماتی ۲ دقیقه در °C ۹۵، سپس تکرار ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشتگی یک دقیقه در °C ۹۴،

تجزیه و تحلیل داده‌ها

با توجه به اینکه نشانگرهای بکار رفته در این تحقیق جزو نشانگرهای غالب می‌باشند، در هر دو روش، تفسیر ژل با وجود (۱) یا عدم وجود (۰) باند امتیازدهی شد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش^۴UPGMA، ضریب تشابه جاکارد و نرم افزار^۵NTSYS-pc (ver.2.1) صورت گرفت. برای مشاهده فواصل بین جدایه‌ها به صورت دو بعدی، از آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی به عنوان مکمل روش خوشه بندی و برای تعیین همبستگی بین ماتریس‌های تشابه حاصل از تجزیه داده‌ها، از آزمون مانتل استفاده شد (۱۶). بررسی همبستگی بین ماتریس کوفتیک و ماتریس تشابه یا فاصله ضریب کوفتیک نیز به عنوان معیاری برای اندازه گیری نیکویی برازش خوشه بندی (Goodness of fit) مورد استفاده قرار گرفت (۲۹).

نتایج

تجزیه و تحلیل انگشت نگاری‌های ژنومی ISSR

از میان ده آغازگر ISSR آزمون شده، تعداد سه آغازگر ISSR02، PCMS و P4 تکرار پذیری و چندشکلی بیشتری را نشان داده و در نتیجه برای کلیه جدایه‌ها استفاده شدند (شکل ۱). تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر و محدوده آنها مطابق جدول ۳ می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مجموع الگوهای باندهای حاصل از مجموع آغازگرهای ISSR جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۸ درصد به سه گروه تقسیم نمود. پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز موید همین مطلب می‌باشد (شکل ۲).

گروه اول جدایه مازندران (۴ درصد جدایه‌ها)، گروه دوم دو جدایه از اردبیل به همراه جدایه لرستان (۱۳ درصد جدایه‌ها) و گروه سوم کل جدایه‌های گلستان (۱۹ جدایه) و یک جدایه از اردبیل (۸۳ درصد جدایه‌ها) را در بر گرفت. بنابراین با استفاده از این نشانگر، به استثنای جدایه A-Mo از استان اردبیل، سایر

جدایه‌های غیر استان گلستان از جدایه‌های استان گلستان تفکیک گردیدند.

از مجموع الگوهای باندهای ISSR، ۴۸ جایگاه ژنی حاصل شد که شش جایگاه ژنی یک شکل بوده و نهایتاً ۸۷ درصد چندشکلی نشان دادند. بیشترین جایگاه ژنی چندشکل توسط آغازگر P4 (۱۸ جایگاه ژنی) و کمترین آن توسط آغازگر ISSR02 (۹ جایگاه ژنی) حاصل شد. در بین این آغازگرها تنها آغازگر P4 به تنهایی قادر به تفکیک کامل جدایه‌ها بر مبنای منشا جغرافیایی بود. بیشترین تشابه بر اساس ضریب جاکارد، در میان دو جدایه G-21 و G-19 با یکدیگر و G-Sm3 و G-Na1 با یکدیگر با ۱۰۰ درصد تشابه و بیشترین فاصله ژنتیکی در میان جدایه مازندران با سایر جدایه‌ها با ۳۰ درصد تشابه مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل انگشت نگاری‌های ژنومی rep-PCR

آغازگرهای ERIC 1R، ERIC 2I، BOX 1A و REP 2I قادر به ایجاد الگوهای باندهای چندشکل و تکرار پذیر برای جدایه‌های *M. phaseolina* بوده و در نتیجه برای کلیه جدایه‌ها استفاده شدند (شکل ۳). تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر و محدوده آنها مطابق جدول ۳ می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الگوهای باندهای حاصل از مجموع آغازگرهای rep-PCR جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۹ درصد به هفت گروه تقسیم نمود. پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز موید همین مطلب می‌باشد (شکل ۴).

گروه اول جدایه مازندران (۴ درصد جدایه‌ها)، گروه دوم یک جدایه گلستان (۴ درصد جدایه‌ها)، گروه سوم دو جدایه اردبیل و یک جدایه گلستان (۱۳ درصد جدایه‌ها)، گروه چهارم چهار جدایه گلستان (۱۷ درصد جدایه‌ها)، گروه پنجم جدایه لرستان (۴ درصد جدایه‌ها)، گروه ششم یک جدایه اردبیل (۴ درصد جدایه‌ها) و گروه هفتم ۱۳ جدایه گلستان (۵۴ درصد جدایه‌ها) را در بر گرفت.

از مجموع الگوهای باندهای rep-PCR، ۵۴ جایگاه ژنی حاصل شد که ۵ جایگاه ژنی یک شکل بوده و نهایتاً ۹۱ درصد چندشکلی نشان دادند. بیشترین جایگاه ژنی چندشکل توسط آغازگر REP 2I (۱۳ جایگاه ژنی) حاصل شد. بیشترین تشابه بر اساس

^۴ Unweighted pair-group method

^۵ Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1

تعیین گردید که در تمام حالات همبستگی مثبت و معنی‌دار بود. نیکویی برازش خوشه‌بندی با ماتریس تشابه (ضریب کوفتیک) (جدول ۴) برای داده‌های حاصل از ISSR در سطح بسیار خوب ($r \leq 0/9$)، برای داده‌های حاصل از rep-PCR در سطح خوب ($0/8 \leq r \leq 0/9$) و برای تلفیق داده‌های حاصل از هر دو آغازگر نیز در سطح بسیار خوب ارزیابی گردید.

ضریب جاکارد، در میان جدایه‌های G-Ka1 و G-Ka5 با تشابه ژنتیکی ۹۲ درصد و بیشترین فاصله ژنتیکی در میان جدایه مازندران با سایر جدایه‌ها (با ۴۶ درصد تشابه) مشاهده شد. این نشانگر از لحاظ جغرافیایی قادر به تفکیک جدایه‌ها نبود.

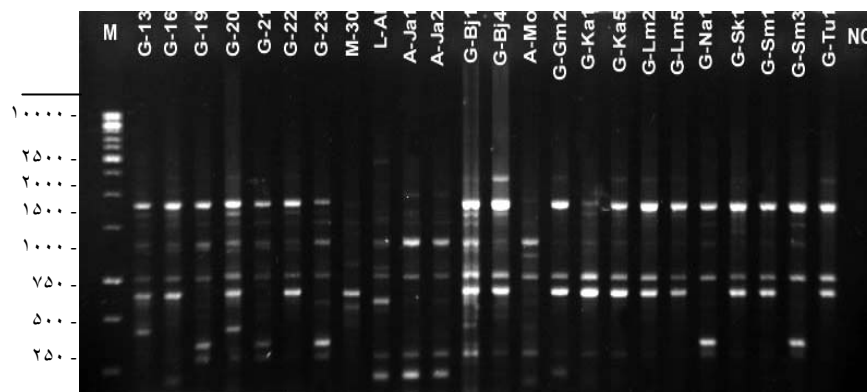
مقایسه ماتریس‌ها و آزمون مانتل میزان همبستگی بین ماتریس‌های تشابه حاصل از داده‌های ISSR و rep-PCR با یکدیگر و بطور مجزا با استفاده از آزمون مانتل

جدول ۳- تعداد و محدوده باندهای تولید شده توسط آغازگرهای مورد بررسی.

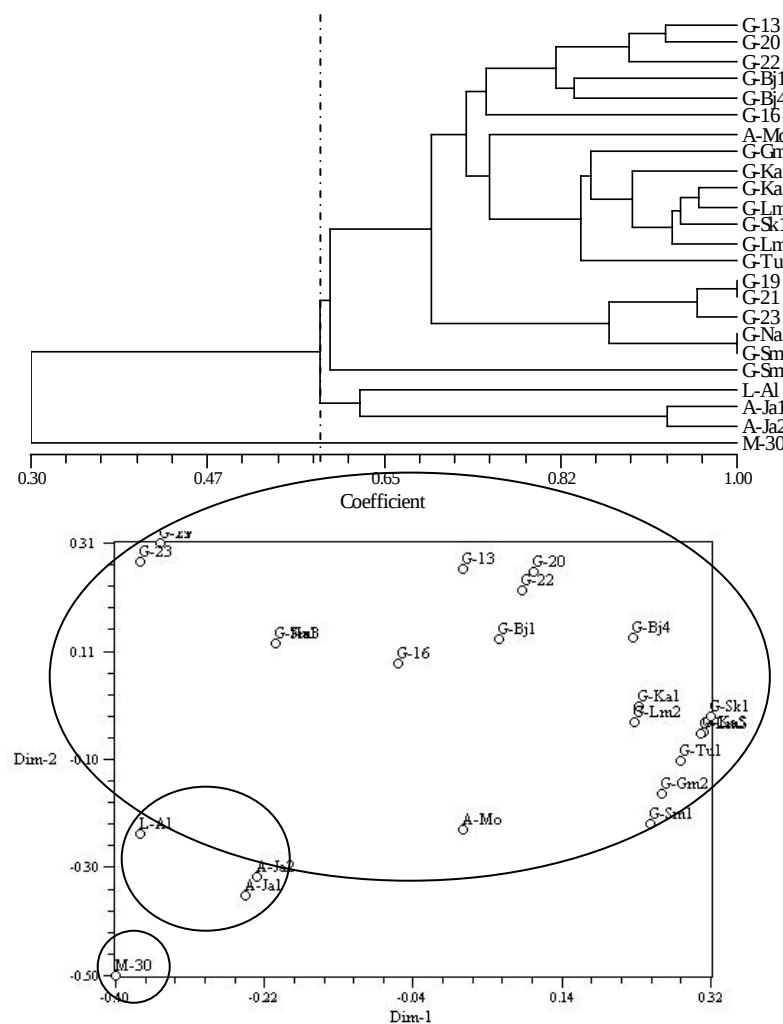
آغازگر	مجموع باندها	تعداد باندهای چندشکل	محدوده باندها
ISSR02	۱۸۵	۱۱۳	۲۵۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز
P4	۱۵۸	۱۵۸	کمتر از ۲۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز
PCMS	۲۶۰	۱۸۸	۵۰۰ تا ۴۰۰۰ جفت باز
کل ISSR	۶۰۳	۴۵۹	کمتر از ۲۵۰ تا ۴۰۰۰ جفت باز
ERIC 1R	۱۴۹	۱۲۵	۲۵۰-۳۰۰۰ جفت باز
ERIC 2I	۲۰۱	۱۲۹	۲۵۰-۲۵۰۰ جفت باز
BOX 1A	۱۳۰	۱۳۰	۵۰۰-۳۰۰۰ جفت باز
REP 2I	۱۶۴	۱۴۰	۲۵۰ تا بیش از ۱۰۰۰۰ جفت باز
کل rep-PCR	۶۴۴	۵۲۴	۲۵۰ تا بیش از ۱۰۰۰۰ جفت باز

جدول ۴- نتایج آزمون مانتل (۱۰۰۰ مرتبه پرمیویشن تست)

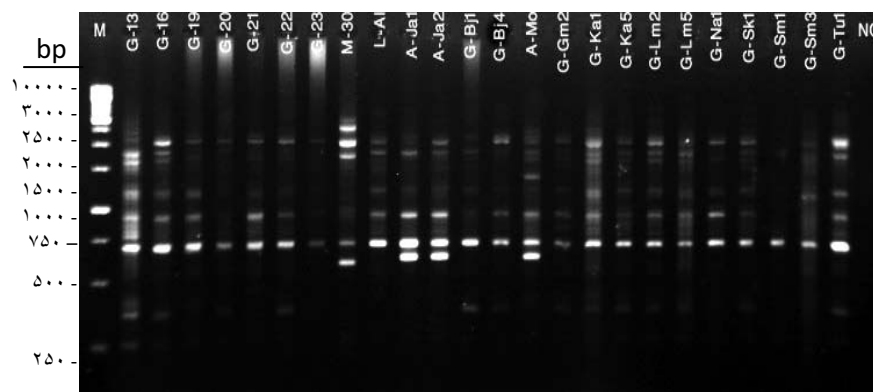
	ISSR	rep-PCR	ISSR+ rep-PCR
همبستگی بین ماتریس تشابه جاکارد و	$r = 0/94$	$r = 0/82$	$r = 0/91$
ماتریس کوفتیک حاصل از آن	$p = 0/002$	$p = 0/002$	$p = 0/002$



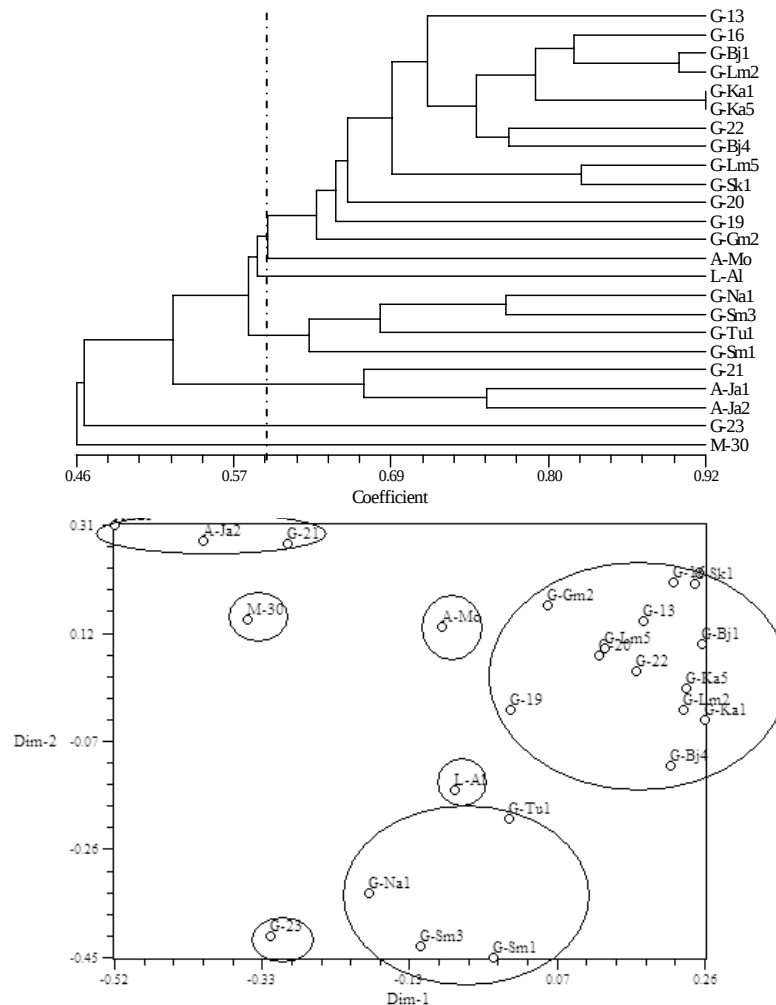
شکل ۱- الگوی باندی حاصل از ۲۴ جدایه منتخب *M. phaseolina* با استفاده از آغازگر P4. M: نشانگر مولکولی 1Kb، NC: کنترل منفی.



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA برای ۲۴ جدایه منتخب *M. phaseolina* با استفاده از تلفیق داده‌های حاصل از الگوهای بانندی ISSR و پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتریس تشابه جاکارد.



شکل ۳- الگوی بانندی حاصل از ۲۴ جدایه منتخب *M. phaseolina* با استفاده از آغازگر ERIC 1R
M: نشانگر مولکولی 1Kb، NC: کنترل منفی.



شکل ۴- دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA برای ۲۴ جدایه منتخب *M. phaseolina* با استفاده از مجموع آغازگرهای rep-PCR و پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی بر روش ماتریس تشابه جاکارد

بحث

گروه بود؛ در حالیکه با استفاده از نشانگر rep-PCR در سطح تشابه مشابه (۵۹ درصد) تعداد گروه‌ها به هفت گروه افزایش می‌یافت که می‌تواند نشان از قدرت تفکیک بالاتر این نشانگر در مقایسه با ISSR باشد. بلندتر بودن توالی آغازگرهای rep-PCR و نیز نیمه اختصاصی بودن آغازگر ISSR و اختصاصی بودن نشانگرهای rep-PCR این امر را توجیه می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که این عناصر تکرار شونده که در سلسله باکتری‌ها بسیار حفاظت شده‌اند، در قارچ *M. phaseolina* متعلق به قارچ‌های ناقص نیز وجود دارند. از سوی دیگر متوسط جایگاه ژنی چندشکلی به ازای هر آغازگر ISSR، ۱۴ جایگاه ژنی و به ازای هر آغازگر rep-PCR ۱۲ جایگاه ژنی محاسبه گردید. ضمن اینکه

نتایج تحقیق حاضر کارآیی روش‌های انگشت نگاری ژنومی با استفاده از نشانگرهای ISSR و rep-PCR را برای مطالعه تنوع ژنتیکی در قارچ *M. phaseolina* تایید می‌کند. مزایای مهم استفاده از این روش‌ها سادگی آنها، عمومیت آغازگرهای PCR، تحمل دامنه وسیعی از غلظت‌های DNA در ایجاد نتایج تکرارپذیر و امکان تجزیه و تحلیل رایانه‌ای داده‌ها می‌باشد (۲۵).

در بررسی درصد چندشکلی حاصله توسط هر یک از نشانگرها این میزان برای نشانگر ISSR معادل ۸۷ درصد و برای نشانگر rep-PCR معادل ۹۱ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. در سطح تشابه ۵۸ درصد نشانگر ISSR قادر به تفکیک جدایه‌ها به سه

نیکویی برازش خوشه‌بندی با ماتریس تشابه (ضریب کوفتیک) نیز نشان داد که اندکی تطابق بیشتر بین دندروگرام‌های حاصل از ISSR نسبت به rep-PCR وجود دارد، اما در مجموع چون در هر دو روش عدم وجود باند در معیار اندازه‌گیری منظور نمی‌شود، بنابراین تفاوت چندانی میان همبستگی‌ها دیده نشد و برازش در سطح بسیار خوبی قرار گرفت.

پورکایستا و همکاران (۲۵) با استفاده از آغازگرهای میکروساتلایت در دو وضعیت touchdown و non-touchdown و نیز نشانگر rep-PCR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۷۰ جدایه *M. phaseolina* جداسازی شده از میزبان‌های مختلف، شامل سه جدایه سویا، بین دو جدایه هندی سویا به ترتیب سطح تشابه ژنتیکی ۶۰، ۸۷ و ۷۵ درصد و بین این دو جدایه با جدایه سوم (جدایه پاکستانی) به ترتیب سطح تشابه ژنتیکی ۴۵، ۴۰ و ۴۵ درصد را گزارش کردند. ضرایب همبستگی کوفتیک در این سه روش به ترتیب معادل ۸۸، ۸۵ و ۸۳ درصد محاسبه شده بود. آنها همچنین نتیجه گرفته بودند که rep-PCR از قدرت تفکیک بالاتری در آشکارسازی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *M. phaseolina* نسبت به دو روش دیگر برخوردار است. یافته‌های مطالعه حاضر نیز این نتیجه را تایید می‌کند.

جانا و همکاران (۱۲) با استفاده از سه آغازگر SSR، ۴۰ جدایه *M. phaseolina* جداسازی شده از سویا و پنبه در هند و آمریکا را مطابق میزبان و منطقه جغرافیایی در سه گروه اصلی دسته‌بندی کردند. گروه اول با ۲۷ جدایه سویا و ۸۰ درصد تشابه و گروه دوم با ۳ جدایه سویا و ۵۲ درصد تشابه تشکیل گردید و گروه سوم، شامل جدایه‌های آمریکایی جدا شده از ریشه پنبه با سطح تشابه ۹۷ درصد بود.

در مطالعه بیرد و همکاران (۵) با استفاده از ۱۲ آغازگر SSR، دندروگرام حاصل، ۱۰۹ جدایه *M. phaseolina* جداسازی شده از مناطق جغرافیایی مختلف آمریکا و میزبان‌های مختلف (۷۹ جدایه از سویا) را مستقل از میزبان و محل جغرافیایی گروه‌بندی کرد. چنانکه در نتایج سایر پژوهشگران با استفاده از نشانگرهای مختلف (۱۸، ۲۴، ۲۷، ۲۸ و ۳۱) نیز دیده شده بود، این دو نشانگر توانستند به طور کاملاً واضح زیر گروه‌های معینی را بر

مبنای منشأ جغرافیایی آشکار سازند. با این حال، بر مبنای دندروگرام به دست آمده با نشانگر ISSR می‌توان استنباط کرد که این روش تا حد زیادی قادر به تفکیک جدایه‌های غیر استان گلستان از جدایه‌های استان گلستان می‌باشد.

مطالعه حاضر تنوع قابل ملاحظه‌ای در میان جدایه‌های سویای *M. phaseolina* تشخیص داد، ضمن اینکه برخی جدایه‌ها با هر دو روش با یکدیگر دسته‌بندی شده و دسته‌بندی برخی دیگر از جدایه‌ها در این دو روش با یکدیگر متفاوت بود. تمامی گروه‌های تشکیل شده به وسیله یک روش منفرد انگشت نگاری تایید نمی‌شدند، به این دلیل که آغازگرهای مختلف مناطق مختلفی از ژنوم را هدف قرار داده و تنوع ژنتیکی را به شکل مختلفی نشان می‌دهند. گروه بندی متفاوت جدایه‌ها با استفاده از این دو نشانگر در مطالعات پورکایستا و همکاران نیز مشاهده شده بود (۲۵).

گروه‌بندی جدایه‌هایی با منشأ جغرافیایی دور از هم (مثلاً جدایه لرستان با جدایه‌های اردبیل در روش ISSR یا جدایه A-Mo از اردبیل با جدایه‌های گلستان در هر دو روش) با یکدیگر می‌تواند ناشی از انتقال بیمارگر از طریق بذر باشد که به ایجاد جدایه‌هایی با الگوی مشابه در مناطق دور از هم در سطح کشور انجامیده است. انتقال توسط بذر نقش مهمی در توزیع جغرافیایی *M. phaseolina* بازی کرده (۲) و احتمالاً به سطح بالای تنوع ژنتیکی مشاهده شده در میان جدایه‌ها در این مطالعه کمک کرده است.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی وسیع در این گونه قارچ پلیمورف نه تنها در بین جدایه‌های میزبان‌ها و مناطق جغرافیایی مجزا، بلکه در درون جمعیت‌های جدایه‌های جمع آوری شده از یک میزبان گیاهی و حتی در یک منطقه (مثلاً جدایه‌های سیدمیران در استان گلستان Sm) نیز دیده می‌شود. فعالیت ترانسپوزان‌ها و نرخ موتاسیون بالای میکروساتلایت‌ها می‌تواند در تنوع ژنتیکی ایجاد شده به وسیله نوترکیبی شبه جنسی این قارچ مهم و موثر باشد (۲۵). با توجه به اینکه میکرواسکلرت‌ها از تورم یک سلول منفرد یا ترکیب دو سلول از دو هیف مجاور تشکیل می‌گردند، ترکیب بین سلول‌های رویشی می‌تواند هتروکاریون‌ها را شکل داده و نوترکیبی شبه جنسی بین

sequence repeats and cross genus transferability to related genera within Botryosphaeriaceae. Mycopathologia (In Press).

6. Van Belkum A, Scherer S, Van Alphen L, and Verbrugh H (1998) Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. Microbiology and Molecular Biology Review, 62: 275-293.

7. Brooker N, Lord J R, Long J, and Jayawardhana A (2008) AFLP analysis of genetic diversity in charcoal rot fungal populations impacted by crop rotations. Communications in Agriculture and Applied Biological Sciences, 73: 7-19.

8. Das I K, Fakrudin B, and Arora D K (2008) RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some indian isolates *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationship with pathogenicity. Microbial Research, 163: 215-224.

9. Dhingra O D, and Sinclair J B (1972) Variation among isolates of *Macrophomina phaseoli* (*Rhizoctonia bataticola*) from the same soybean plant. (Abstr.) Phytopathology, 62(suppl.): S1108.

10. Ganeshamoorthi P, Anand T, Saravanan A, Prakasam V, Chandarmohan N, and Ragupathi N (2010) Cultural and genetic variability in *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. And incidence of Mulberry root rot. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43: 123-132.

11. George M L C, Nelson R J, Ziegler R S, and Leung H (1998) Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. Phytopathology, 88: 223-229.

12. Jana T, Sharma T R, and Singh N K (2005a) SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. Mycological Research, 109: 81-86.

13. Jana T K, Singh N K, and Sharma T R (2005b) Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR. Canadian Journal of Microbiology, 51: 159-164.

14. Kaur B, Purkayastha S, Dilbaghi N, and Chaudhury A (2005) Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *cyamopsidis*, the bacterial blight pathogen of clusterbean, using PCR-based molecular markers. Journal of Phytopathology, 153: 470-479.

15. Lupski J R, and Weinstock G M (1992) Short interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. Journal of Bacteriology, 174: 4525-4529.

16. Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Researches, 27: 209-220.

17. Martin F N, and English J T (1997) Population genetics of soilborne fungal plant pathogens (Introduction). Phytopathology, 87: 446-447.

18. Mayek-Peres N, Lopes Castaneda C, Gonzalez-Chavira M, Garcia-Espinosa R, Acosta-Gallegos J A, Martinez-De la Vega O, and Simpson J (2001) Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based

ژن‌های هسته رخ دهد (۸). مجموع این نکات این فرضیه را که پاراسکسوالیسم (parasexualism) نیز می‌تواند منبع احتمالی تولید ژنوتیپ‌های جدید محسوب گردد، تقویت می‌کند (۲۵).

مطالعه حاضر اطلاعات قابل توجهی در رابطه با تنوع ژنتیکی در جدایه‌های ایرانی سویای *M. phaseolina* با کمک دو نشانگر مولکولی مختلف rep-PCR و ISSR فراهم آورد. برای روشن ساختن میزان نوترکیبی در جمعیت‌های این قارچ نمونه‌برداری بیشتر و در سطح وسیع‌تری لازم است. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان تنوع در *M. phaseolina* نسبتاً بالا است. در مورد بیماری‌گری که ذاتاً ساپروفیت و فرصت طلب است، تنوع ژنتیکی بالا به بقاء آن در طبیعت کمک می‌کند. ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی *M. phaseolina* مرحله اول در درک ساختار جمعیت بیمارگر عامل پوسیدگی ذغالی می‌باشد و به نظر می‌رسد به طور ویژه وقتی مفید است که با آزمایشات *in vitro* و *in planta* (از جمله آزمایش بیماری‌زایی جدایه‌ها و حساسیت به کلرات) نیز ترکیب گردد.

منابع

۱. صفایی ن، علیزاده ع، سعیدی ع، رحیمیان ح، و آدام گ (۱۳۸۴) تشخیص مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی *Fusarium graminearum* عامل بلایت سنبله گندم، مجله بیماری‌های گیاهی، ش ۴۱-۱۸۹-۱۷۱.
2. Almeida A M R, Abdelnoor R V, Arias C A A, Carvalho V P, Jacoud-Filho D S, Marin S R R, Benato L C, Pinto M C, and Carvalho C G P (2003) Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. Fitopatologia Brasileira, 28: 279-285.
3. Arruda M C C, Miller R N G, Ferreira M A S V, and Felipe M S S (2003) Comparison of *Crinipellis perniciosus* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence based PCR genomic fingerprinting. Plant Pathology, 52: 236-244.
4. Babu B K, Reddy S S, Yadav M K, Sukumar M, Mishra V, Saxena A K, and Arora D K (2010) Genetic diversity of *Macrophomina phaseolina* isolates from certain agro-climatic regions of India by using RAPD markers. Indian Journal of Microbiology (In Press).
5. Baired R E, Wadi P A, Allen T, McNeill D, Wang X, Moulton J K, Rinehart T A, Abbas H K, Shier T, and Trigiano R N (2010) Variability of United States isolates of *Macrophomina phaseolina* based on simple

on pathogenic and AFLP genotype. Physiological and Molecular, Plant Pathology, 59: 257-263.

19. McDonald J G, Wong E, and White G P (2000) Differentiation of *Tilletia* species by rep-PCR genomic fingerprinting. PlantDisease, 84: 1121-1125.

20. Mehta A, Mehta Y R, and Rosato Y B (2002) ERIC and REP-PCR banding patterns and sequence analysis of the internal transcribed spacer of rDNA of *Stemphylium solani* isolates from cotton. Current Microbiology, 44: 323-328.

21. Ndiaye M (2007) Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the sahel. PhD Thesis Wagening University, the Netherland, PP114.

22. Palencia E R, Klich M A, Glenn A E, and Bacon C W (2009) Use of rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section Nigri. Journal of Microbiology Methods, 79: 1-7

23. Pearson C A S, Leslie J F, and Schwenk F W (1986) Variable chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina* from corn, soybean, and soil. Phytopathology, 76: 646-649.

24. Purkayastha S, Kaur B, Dilbaghi N, and Chaudhury A (2006) Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of clusterbean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. Plant Pathology, 55: 106-116.

25. Purkayastha S, Kaur B, Arora P, Bisyer I, Dilbaghi N, and Chaudhury A (2008) Molecular genotyping of *Macrophomina phaseolina* isolates: Comparision of microsatellite primed PCR and repetitive element sequence-based PCR. Journal of Phytopathology, 156: 372-381.

26. Rademaker J L W, and deBruijn F J (1997) Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: Caetano-Anolles, G, Gressho, P. M. (eds), DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. New York, NY, USA, Wiley.

27. Rajkumar Bashasab f, and Kuruvinashetti M S (2007) Genetic variability of sorghum charcoal rot pathogen(*Macrophomina phaseolina*) assessed by random DNA markers. The Plant Pathology Journal, 23: 45-50.

28. Reyes-Franco M C, Hernandez-Delgado S, Beas-Fernandes R, Medina-Fernandes M, Simpson J, and Mayek-Perez N (2006) Pathogenic and genetic variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. Phytopathology, 154: 447-453.

29. Rholf F J (2000) NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Setauket, NY, USA, Exeter publishing.

30. Su G, Suh S O, Schneider R W, and Russian J S (2001) Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology, 70 :13-17.

31. Vandermark G, Martnez O, Pecina V, and Alvarado M J (2000) Assessment of genetic relationship among isolates of *Macrophomina phaseolina* using

simplified AFLP technique and two different methods of analysis. Mycologia, 92: 656-664.

32. Versalovic J, Kapur V, Mason E O J R, Shah U, Koeuth T, Lupski J R, and Musser J M (1993) Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston: identification and molecular characterization of multiple clones. Journal of Infected Disease, 167: 850-856.

33. Versalovic J, Schneider M, deBruijn F J, and Lupski L R (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods of Molecular and Cell Biology, 5: 25-40.

34. Weising K, Nybom H, Wolff K, and Meyer W (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Fla. P.322.

35. Zietkiewicz E, Fafalski A, and Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176-183.