

مقایسه نشانگرهای مولکولی RAPD، ISSR و ERIC در بررسی تنوع

ژنتیکی قارچ *Rhizoctonia solani* AG1-IA

مهديه خداياري^۱، ناصر صفائي^{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. به‌علاوه 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 به‌لحاظ 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.

واژه های کلیدی

تنوع ژنتیکی،

تشابه ژنتیکی،

نشانگرهای مولکولی،

قارچ *Rhizoctonia solani* AG1-IA

مقدمه

سه بیماری باستان، 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.

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 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.*, 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 آللی، قابلیت اعتماد به این نشانگر را کاهش داده است (Philips and Vasil, 2001; Tommerup *et al.*, 1995).

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 جدایه‌ها استفاده شد.

جدایه‌ها 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 نشانگر RAPD، 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 داده‌ها

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).

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 قارچ‌ها استفاده شده است (Esselman et al., 1999; Gulaeria et al., 2007; Toda et al., 1999).

وجود توالی‌های 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* و *Escherichia coli pneumoniae* شناخته شده‌اند و با عناوینی چون عناصر BOX (Martin et al., 1992)، REP (Stern et al., 1984)، PU (Gilson et al., 1984)، IRU (Sharples et al., 1990) و ERIC (Intergenic Consensus) 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

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 $0 \leq r < 1$ متغیر می باشد. $r \leq 0/9$ ، 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 (۱) محاسبه شد (Lynch and Walsh, 1998). در این فرمول P_i فراوانی آلل i ام 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 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

$$(۲). MI = PIC \times EMR$$

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.

$$(۳) EMR = n_p \times \beta$$

در این فرمول، n_p تعداد کل باندهای چندشکل و β $(\beta = n_p / (n_p + n_{np}))$ 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 RAPD و ISSR 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 جايگاه 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 ژنتيکي قارچ *Calamagrostis porteri ssp. insperata* با نشانگرهاي RAPD و ISSR صورت گرفت، ميزان چندشکلي بيشترى 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 ژنتيکي جدايه هاي *R. solani* AG1-IA مورد بررسي در اين پژوهش با نشانگر RAPD، نشان داد که اين نشانگر در صورت استفاده صحيح، ابزار مفيدى براى مطالعه تنوع در اين قارچ مي باشد. اين نتيجه با نتايج حاصل از مطالعه دانکن و همکاران (1993) (Duncan et al., 1993)، مؤمنى و همکاران (۱۳۸۴) و محمودى و همکاران (۱۳۸۴)، مطابقت داشت.

تجزيه خوشه اي

نتايج حاصل از تجزيه و تحليل ۱۸۷ آلل (۲۳۲۴ باند 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 (مؤمنى و همکاران، ۱۳۸۴؛ محمودى و همکاران، ۱۳۸۴؛ Duncan et al., 1993). هر چند که پايداري نشانگر ERIC و ISSR به ترتيب، بيشتر از نشانگر RAPD مي باشد؛ به گونه اي که استفاده از يک جفت آغازگر ERIC همان نتايجي را که چندين آغازگر RAPD در آشکارسازي تنوع ژنتيکي به دست مي دهند را در بر دارد.

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

محاسبه هتروزيگوسيتي، شاخص نشانگري و نسبت چندگانه با استفاده از فراواني آللي، شاخص هاي PIC، MI و EMR براى هر نشانگر و بطور جداگانه محاسبه گرديد. بيشترين ميزان توسط نشانگر ERIC (۰/۴۴) و کمترين آن توسط نشانگر ISSR (۰/۳۷) بدست آمد؛ براى نشانگر RAPD نيز PIC بينابين دو نشانگر ERIC و ISSR حاصل شد (۰/۴۰). اين مطلب بيانگر توانايي بيشتر نشانگر ERIC نسبت به دو نشانگر ديگر در تعيين تنوع ژنتيکي 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 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).

شکل ۱: الگوی بانندی RAPD حاصل از

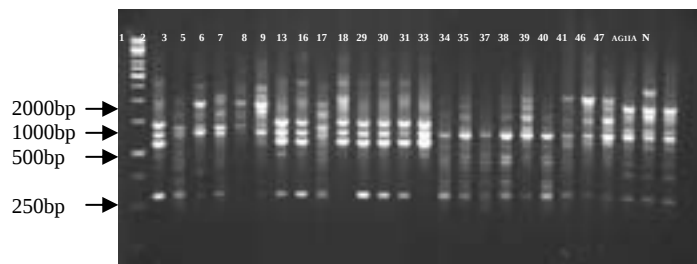
تکثیر جدایه‌های *Rhizoctonia solani*

با استفاده از آغازگر RC09

M: نشانگر مولکولی 1Kb

AG1 IA: کنترل مثبت

N: کنترل منفی (H₂O)



شکل ۲: الگوی بانندی ISSR حاصل از

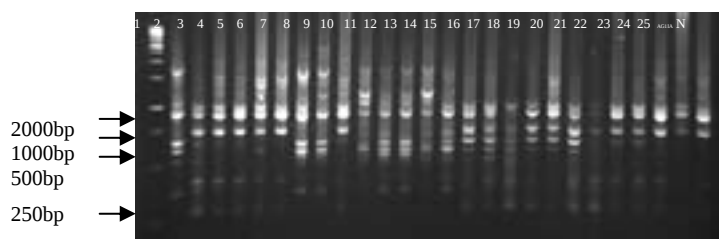
تکثیر جدایه‌های *Rhizoctonia solani*

با استفاده از آغازگر P5

M: نشانگر مولکولی 1Kb

AG1 IA: کنترل مثبت

N: کنترل منفی (H₂O)

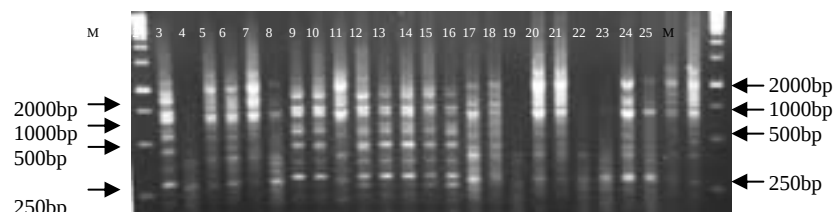


شکل ۳: الگوی بانندی حاصل از تکثیر

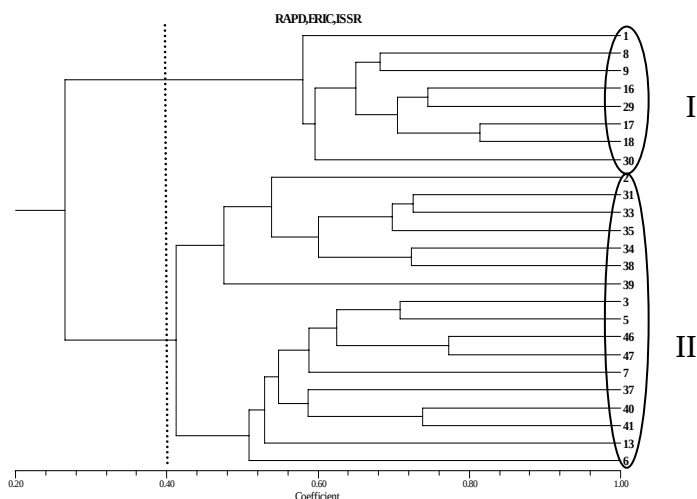
جدایه‌های *Rhizoctonia solani* با

استفاده از آغازگرهای ERIC

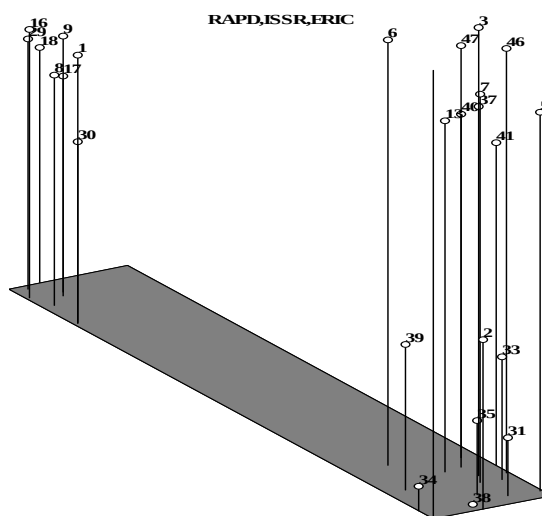
M: نشانگر مولکولی 1Kb



شكل ۴: دندروگرام ترسيم شده بر اساس روش UPGMA و ماتريس تشابه Jaccard. براي ۲۵ جدايه منتخب *Rhizoctonia solani* AG1-IA تلفيق داده‌هاي حاصل از سه نشانگر RAPD، ERIC و ISSR



شكل ۵: پلات سه بعدي حاصل از تجزيه به مختصات اصلي به روش ماتريس تشابه Jaccard براي ۲۵ جدايه منتخب *Rhizoctonia solani* AG1-IA با استفاده از تلفيق داده‌هاي حاصل از سه نشانگر RAPD، ISSR و ERIC و در نامگذاري جدايه‌ها حروف Rs حذف شده است.



جدول ۱: نتایج آزمون مانیتل 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 جایگاه های ژنی چندشکل	مجموع جایگاه های ژنی	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'-TCTCTCTCTCTCTCC-3'	15	15	0.42	1.00	15.00	6.27
P5	5'-ACACACACACACACYC-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'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'	23	23	0.44	1	23	10.05
ERIC 2I	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-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 ترابی م، بیش، ح (۱۳۶۳)، بیماری شیت بلایت برنج، بررسی در مورد عامل بیماری، پراکندگی و حساسیت چند رقم برنج در استان‌های شمالی ایران بیماری‌های گیاهی (۲۰) ۲۱-۳۴.
- 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): ۴۰-۴۶.
- ۴ مؤمنی، ج.، مظفری، ج.، فلاحتی رستگار، م.، جعفرپور، ب. (۱۳۸۴). تعیین تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های *Rhizoctonia solani* بیماریزا در مزارع چغندر قند استان خراسان به کمک نشانگر مولکولی RAPD، بیماری‌های گیاهی ۴۱: ۴۹۵-۵۰۵.
- ۵ محمودی، س.ب.، مصباحی، م.، علیزاده، م.، نوروزی، پ. (۱۳۸۴). بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* با RAPD و ITS-rDNA، بیماری‌های گیاهی ۱۲: ۵۲۳-۵۴۲.
- 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. *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, 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 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* 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 (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/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.