

استفاده از روش RAPD جهت بررسی پلی مورفیسم DNA در سویه‌های جدا شده قارچ فوزاریوم اگزيسپوروم

بهرنگ علنی: مربی پژوهشی علوم سلولی و ملکولی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
behrangha@yahoo.com

دکتر مصطفی مطلبی: دانشیار گروه بیولوژی ملکولی دانشگاه رازی کرمانشاه
دکتر محمد رضا زمانی: دانشیار گروه ژنتیک ملکولی دانشگاه رازی کرمانشاه
دکتر نصرت الله ضرغامی: استادیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
سیامک جبارزاده: کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر محمد رهبانی نویر: استاد گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
محمد رضا مشایخی: کارشناس ارشد ژنتیک مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۱/۱۲/۲۱، بازنگری: ۸۲/۹/۱، پذیرش: ۸۲/۱۰/۱۷

چکیده

زمینه و اهداف: امروزه مارکرهای مبتنی بر DNA به خصوص روشهای وابسته به PCR نظیر RAPD به عنوان یکی از ابزارهای قوی مطالعه تنوع ژنتیکی در بین موجودات زنده به شمار می رود. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی سویه های جدا شده قارچ فوزاریوم اگزيسپوروم از طریق دسته بندی سویه ها با استفاده از نشانگر ملکولی RAPD بود.

روش بررسی: در این تحقیق تعداد ۱۵ سویه قارچ فوزاریوم اگزيسپوروم مورد مطالعه قرار گرفت. DNA از طریق روش تغییر یافته دلاپورتا استخراج شد و بعد از انجام PCR، به منظور بررسی الگوی پلی مورفیسم DNA، محصولات PCR به دست آمده همراه با مارکر ملکولی استاندارد DNA بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند. برای تجزیه و تحلیل آماری محصولات RAPD از روش UPGMA با برنامه SPSS استفاده شد و سویه ها بر روی دندروگرام دسته بندی شدند.

یافته ها: بر اساس نتایج ترکیبی حاصل از ۱۲ آغازگر سویه ها به سه گروه تقسیم شدند. بررسی نتایج حاصله نشان داد که سویه های استانهای غرب کشور دارای الگوی پلی مورفیسم DNA هستند، به طوری که تمامی این سویه ها با داشتن تنوع ژنتیکی پایین در یک گروه و در کنار هم دسته بندی شدند، در حالی که سویه های مربوط به استانهای شمال غرب کشور به دلیل داشتن الگوی پلی مورفیسم متنوع تر در هر سه گروه پراکنده شدند.

نتیجه گیری: مقایسه الگوی RAPD سویه ها با دسته بندی بر اساس منطقه جغرافیایی بیانگر وجود همبستگی بین الگوی RAPD سویه های غرب کشور با منشأ جغرافیایی شان بود. به عبارت دیگر RAPD قادر به تشخیص تفاوت بین سویه های این منطقه با سایر نقاط بوده است.

کلید واژه ها: RAPD، فوزاریوم اگزيسپوروم، پلی مورفیسم DNA

مقدمه

فوزاریوم اگزيسپوروم قارچ کپکی غیر بیماری زا شایعی است که عمدتاً پاتوژن گیاهی است و در عین حال به عنوان پاتوژن انسانی و حیوانی در بروز طیف وسیعی از عفونت ها مانند اتومایکوز، کراتیت قارچی، اونیکومایکوز، فوزاریوز ریوی و فوزاریوز سیستمیک دخالت دارد (۱). در دو دهه اخیر میزان موارد عفونت زایی سیستمیک فوزاریوم در جوامع انسانی به ویژه در میان افراد دچار ضعف ایمنی، پیوند مغز استخوان، پیوند اعضا، افراد HIV⁺ و مبتلا به ایدز به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. به ویژه موارد گزارش شده فوزاریوس سیستمیک ریوی از ناحیه جنوب شرقی آسیا حایز اهمیت است (۲).

گونه های مختلف فوزاریوم نظیر فوزاریوم اگزيسپوروم گروه مهمی از مایکوتوکسین های موسوم به تریکوتسن را که عامل مایکوتوکسیکوز اولیه و ثانویه در جوامع انسانی و حیوانی هستند، تولید می کنند. علاوه

بر آن، به عنوان جنگ افزار بیولوژیک نیز به کار می روند و یکی از عمده ترین و کاربردی ترین سلاح های بیولوژیک در فهرست جنگ افزارهای بیولوژیک محسوب می شوند. همچنین گونه مزبور به عنوان بیوراکتور برای تولید محصولات بیولوژیک خاصی به کار می رود (۳). خسارات اقتصادی ناشی از بیماریزایی این قارچ کپکی در سطح جهانی بالغ بر میلیارد ها دلار است که سویه های مختلف این گونه از حیث بیماریزایی در انسان، حیوانات و گیاهان دارای ویرولانس متفاوت هستند (۴). با توجه به این که اطلاعات ژنتیکی بسیار اندکی از ساختار و توالی ژنومی ارگانسیم مورد نظر موجود است، مطالعات گسترده ای در مورد شناسایی سویه های مختلف این قارچ انجام می گیرد که بررسی پلی مورفیسم DNA با استفاده از نشانگرهای ملکولی DNA در این مورد می تواند سودمند باشد (۵).

نشانگرهای ملکولی DNA که از اوایل دهه ۱۹۸۰ تا به امروز معرفی شده‌اند، دقیق‌ترین ابزار بررسی ساختار ژنتیکی، تعیین روابط دقیق فیلوژنتیکی و نیز در تشخیص سریع گونه‌ها و واریته‌های موجودات زنده از جمله جنس فوزاریوم را فراهم کرده‌اند. این نشانگرها خود به دو گروه عمده شامل نشانگرهای وابسته به PCR و مستقل از آن تقسیم بندی می‌شوند. از این میان، نشانگرهای RAPD، AFLP، ALP و غیره جزو نشانگرهای وابسته به PCR کاربرد بیشتری دارند (۶).

روش RAPD^۱ روش مبتنی بر PCR است که بر پایه تکثیر تصادفی توالی‌های ژنومی استوار است و به وسیله آن می‌توان انگشت نگاری DNA یک ژنوم بزرگ و پیچیده را تهیه کرد. در این روش برخلاف روش‌های استاندارد PCR از یک آغازگر به طول ۱۰-۹ نوکلئوتید که ردیف بازی آن به طور قراردادی تعیین می‌گردد استفاده می‌شود. در این واکنش یک آغازگر منفرد نقاط مکمل خود را روی دو رشته DNA ژنومی نمونه پیدا و خود را در آن نقاط بر روی دو رشته DNA متصل می‌کند. اگر محل اتصال آغازگرها در روی دو رشته متقابل به هم نزدیک باشند (فاصله ای که DNA قابل تکثیر باشد) توالی بین آن دو نقطه اتصال طی PCR تکثیر خواهد شد. بنابراین چنانچه دو آغازگر به طور تصادفی روی دو قطعه از DNA قرار بگیرند، فرآورده‌های حاصل از آنها متفاوت خواهد بود؛ به عبارت دیگر، الگوی RAPD آنها متفاوت است. از این تفاوت‌ها برای مطالعات الگوی پلی مورفیسم DNA، تعیین روابط فیلوژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی و... می‌توان استفاده کرد. همچنین استفاده از مارکر RAPD به دلیل مزایای بالای آن از قبیل استفاده از آغازگرهای تصادفی، عدم نیاز به توالی DNA و مواد رادیواکتیو از اهمیت بسزایی برخوردار است (۷). به علاوه، از این روش به عنوان یکی از نشانگرهای ملکولی مهم در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مربوط به نژادها و سویه‌های قارچ فوزاریوم *اکزیسپوروم* استفاده می‌شود، به طوری که مارتین و همکاران در ۱۹۹۳ با بررسی تنوع ژنتیکی بین سویه‌های مربوط به چهار نژاد آن با روش RAPD نشان دادند که سویه‌های مربوط به نژاد ۲ از لحاظ الگوی نوار دهی از همشکلی بالایی نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار هستند و در یک گروه دسته بندی شدند (۸). همچنین در بررسی‌های ماتیلا و همکاران در ۱۹۹۶ بر روی فوزاریوم *آوناسوم* مشخص شد که دسته بندی بر اساس الگوی RAPD و ایزوآنزیمی در نژادهای مختلف قارچ فوزاریوم می‌تواند به عنوان ابزاری مطمئن جهت شناسایی سایر قارچ‌ها هم در سطح نژاد و هم در سطح گونه به کار رود (۹). بنابراین روش RAPD به عنوان بهترین روش جهت مطالعه ملکولی این سویه‌ها انتخاب شد. سهولت انجام RAPD و سریع بودن آن از دیگر دلایل انتخاب این روش بود.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه و محیط کشت: تعداد ۱۵ سویه قارچ فوزاریوم *اکزیسپوروم* که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفتند، از مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی کرمانشاه تهیه شده بودند. این سویه‌ها از استانهای آذربایجان شرقی (با کدهای F۲، F۵۸، F۵۹ و F۵۹) آذربایجان غربی (F۲۱، F۱۸ و F۱۵) لرستان (F۲۳، F۴۵ و F۴۷) ایلام (F۲۴)، F۲۵ و F۲۶) کرمانشاه (F۳۱ و F۳۰) و کرمان (F۵۳) جمع آوری شده بودند. سویه‌ها بعد از ۸ روز کشت در درون لوله‌های ۳۰ میلی

لیتری درپوش دار بر روی محیط جامد PDA^۲، برای مدتی کوتاه در ۴°C نگهداری شدند. برای انجام مطالعات ملکولی، سویه‌ها به ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت مایع CSDA^۳ [۴] گرم پودر نخود، ۲ گرم دکستروز [Merck]، ۰/۰۵ گرم آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (جهت جلوگیری از رشد باکتریهای ساپروفیت، ۰/۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد) با pH = ۴/۵ تلقیح و سپس به انکوباتور منتقل شدند. دستگاه در وضعیت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تنظیم شد. پس از هفت روز ارلن‌ها از انکوباتور خارج و با استفاده از کاغذ صافی (Watman No.۱) محیط کشت‌ها صاف شدند و از میسیلیوم‌های سویه‌ها جهت استخراج DNA به منظور بررسی الگوی پلی مورفیسم با استفاده از نشانگر RAPD استفاده شد (۱۰).

استخراج DNA : برای استخراج DNA از روش تغییر یافته دلاپورتا استفاده شد (۱۱). مقدار ۲۵/۰ گرم از میسیلیوم سویه با افزودن مقداری مسوای پودر شیشه و ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراجی DNA (۲۰۰ میلی مولار Tris-HCl [pH ۸]، ۲۰ میلی مولار EDTA، ۲۵۰ میلی مولار NaCl، ۵٪ SDS) داخل لوله‌های اپندورف ساییده شد تا کاملاً همگن شود. نمونه‌ها در دمای ۷۰-۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه قرارداده شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار سرد (۴ درجه سانتی گراد) به نمونه اضافه شد و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای صفر درجه قرارداده شدند. ۴۰۰ میکرولیتر از کلروفرم سرد (۲۰- درجه سانتیگراد) به نمونه اضافه شد و به مدت ۷ دقیقه در ۱۲۰۰۰xg سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به اپندورف‌های جدید منتقل و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزو پروپانل (۲۰- درجه سانتیگراد) به آن اضافه شد و مواد داخل به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰xg سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی به آرامی خارج و رسوب DNA حاصل با اتانل ۷۵ درصد سرد و سپس شست‌وشو داده شده و در ۲۰ میکرولیتر از آب مقطر دوبار تقطیر استریل سرد ۴ درجه یا TE بافر حل شد و برای استفاده‌های بعدی در دمای ۲۰°C - نگهداری گردید. کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از دو روش اندازه گیری میزان جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر و نیز الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۷٪ بر اساس روش مایرز تعیین گردید (۱۲). برای مشخص کردن مقدار DNA به دست آمده مطابق روش اُبراین از اندازه‌گیری جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر استفاده شد (۱۳).

RAPD-PCR : به منظور بهینه سازی شرایط RAPD، غلظت واکنش‌گرها^۴ برای حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۶۰ نانوگرم از آغازگر، dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار، MgCl₂ با غلظت ۵۰ میلی مولار، ۵ میکرولیتر از بافر ۱۰x PCR، ۳۷/۵ میکرولیتر از آب مقطر دوبار تقطیر استریل و پنج واحد بر میکرولیتر آنزیم پلیمرز Taq DNA در داخل لوله‌های اپندورف ۱۰۰ میکرولیتر تنظیم و آماده شد و پس از آماده سازی واکنش‌گرهای RAPD برنامه لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر MAXI-GENE (شرکت استوارت ساینترفیک انگلستان) تنظیم گردید. در این برنامه یک دور جهت تک رشته ای شدن کلی DNA اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه، ۳۴ دور شامل مراحل مربوط به اتصال پرایمر به مدت ۹۰ ثانیه که دمای اتصال برای هر آغازگر در جدول ۱ مشخص شده است، ستر DNA به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه، تک رشته‌ای شدن DNAهای ساخته شده به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۹۴ و یک دور جهت

در حجم‌های ۵۰ میکرولیتری بهینه سازی شد. این شرایط بهینه سازی شده موجب تکرارپذیری واکنش می‌شود.

پس از آماده سازی واکنش‌گرهای RAPD، دما، زمان و برنامه لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر تنظیم شد. پس از اتمام واکنش به منظور بررسی الگوی پلی مورفیسم DNA بین سویه‌ها کلیه محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز گردیده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و رنگ زدایی از ژل با آب مقطر، در زیر نور ماورای بنفش توسط دوربین پلوراید عکس برداری شد (تصویر ۱).

برای تجزیه و تحلیل آماری محصولات RAPD از میزان حرکت نسبی نوارها استفاده شد. میزان حرکت هر یک از نوارها با دقت $\frac{1}{3}$ میلیمتر سنجیده شد. بر اساس وجود یا عدم وجود هر نوار از محصولات PCR به ترتیب عدد یک یا صفر به آن نسبت داده و به این ترتیب جدول ماتریس صفر و یک رسم شد. بر اساس ماتریس صفر و یک تعداد کل الگوهای چند شکلی DNA محصولات RAPD حاصل از آغازگرهای ۱۲ آغازگر برای ۱۵ سویه قارچ فوزاریوم اگریسپوروم جمعاً ۱۴۱ نوار به دست آمد. با استفاده از جدول ماتریس صفر و یک، تجزیه خوشه‌ای با برنامه SPSS به روشهای مختلف تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوی چند شکلی DNA محصولات RAPD، به طور جداگانه برای هر آغازگر و نیز حالت ترکیبی آنها انجام گرفت. بررسی ها نشان داد که روش UPGMA نتایج منطقی و مطمئن تری را به دست می‌دهد و لذا بر این اساس دوری و نزدیکی سویه‌ها بررسی شد.

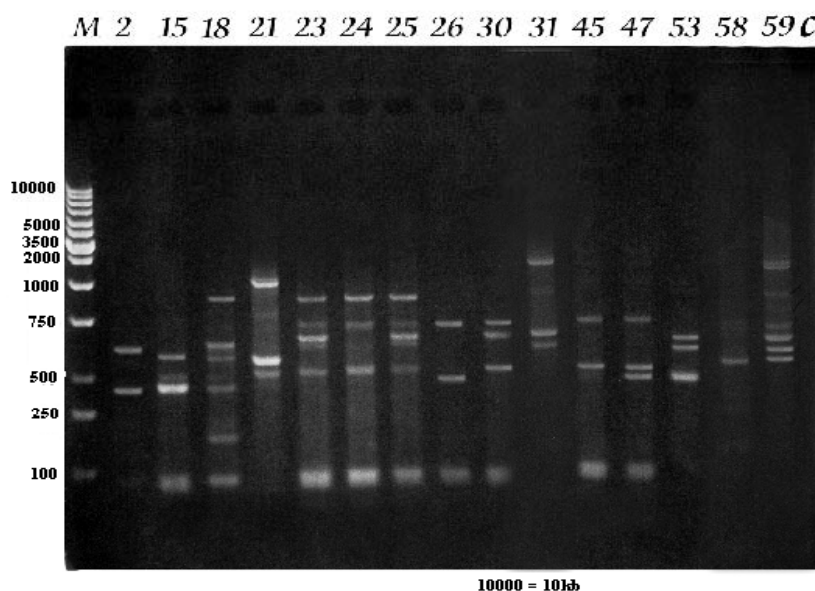
تکمیل اتصال پرایمر و تکمیل ساخت DNA به مدت ۶ دقیقه به ترتیب در دماهای ۳۱ و ۷۲ بر روی دستگاه ترموسایکلر تنظیم شد. RAPD برای هر یک از ۱۲ آغازگر که توالی آنها در جدول ۱ آمده است، انجام گرفت و بعد از اتمام PCR کلیه محصولات PCR همراه با نشانگرهای ملکولی DNA بر روی ژل آگارز ۲٪ و ولتاژ ثابت ۷۰ ولت، در شرایط کاملاً یکسان الکتروفورز شد. از ژل‌ها پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و رنگ زدایی از آب مقطر، در زیر نور ماورای بنفش توسط دوربین پلوراید عکس برداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری محصولات RAPD از میزان حرکت نوارها استفاده و جدول ماتریس صفر و یک رسم شد. با استفاده از جدول ماتریس صفر و یک تجزیه خوشه‌ای با برنامه SPSS به روش UPGMA و بر اساس الگوی چند شکلی DNA محصولات RAPD به طور جداگانه برای هر آغازگر و نیز حالت ترکیبی آنها انجام گرفت و دوری و نزدیکی سویه‌ها بررسی شد.

یافته‌ها

به منظور بررسی الگوی پلی مورفیسم DNA بین ۱۵ سویه جدا شده قارچ فوزاریوم اگریسپوروم، سویه‌های ایزوله قارچ در محیط کشت مایع CSDA به مدت ۷ روز کشت شدند. سپس محیط‌های کشت صاف شد و از میسلیم‌ها جهت استخراج DNA ژنومی استفاده شد. بعد از استخراج DNA به روش دلاپورتا، کیفیت و کمیت DNA استخراجی تعیین گردید. بررسی ها نشان داد که DNA استخراجی نسبتاً خالص بوده و نیازی به پروتئیناز K در جریان استخراج DNA نیست.

به منظور بهینه سازی شرایط RAPD پارامترهای مؤثر مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به آزمون‌های مختلف شرایط برای انجام واکنش



تصویر ۱: الگوی چند شکلی DNA حاصل از RAPD با استفاده از آغازگر ۸۱ در ژل آگارز ۲٪. ستونها از چپ به راست ستون ۱ (M) مربوط به مارکر وزن ملکولی استاندارد DNA، ستونهای مربوط به اعداد ۲ تا ۵۹ مشخص کننده الگوی پلی مورفیسم DNA سویه‌های جدا شده قارچ و ستون ۱۷ (C) مربوط به کنترل منفی PCR

را مورد تأیید قرار داد و مشخص کرد که ارتباط معنی داری بین گروهها وجود ندارد و گروههای به دست آمده کاملاً مستقل از هم هستند (جدول ۲).

مقایسه گروه بندی به دست آمده از دندروگرام حاصل از الگوی پلی مورفسم DNA با روش RAPD دوازده آغازگر با دسته بندی سويه ها براساس منطقه جغرافیایی نشان می دهد که ۱۰۰٪ سويه های استان های غرب کشور در گروه دوم دندروگرام حاصل از الگوی DNA تکثیر شده به وسیله روش RAPD با دوازده آغازگر دسته بندی شدند بنابراین سويه های منطقه غرب کشور الگوی پلی مورفسم مشابهی دارند و به دلیل نزدیکی ساختار ژنتیکی شان تقریباً در یک گروه مجزا قرار گرفته اند، در حالی که سويه های استانهای دیگر دارای الگوی پلی مورفسم متفاوتی هستند و در هر سه گروه پراکنده شده اند.

طبق جدول ۲ مقدار P بین گروهها کمتر از ۰/۰۵ است و گروههای به دست آمده ارتباط معنی داری با یکدیگر ندارند و بین گروهها اختلاف واقعی ۱۰۰٪ وجود دارد.

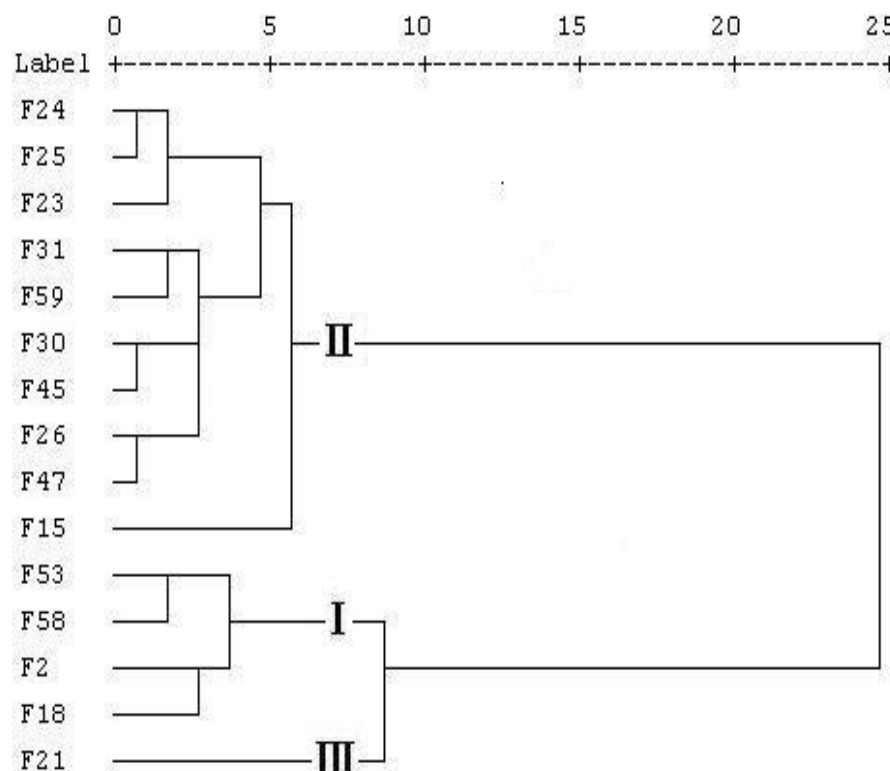
در بررسی گروه بندی های به دست آمده از نتایج هر یک از آغازگرها بر اساس تأیید جدول تابع تشخیص و گروه بندی مقایسه ای مزدوج (جدول ۳) در روش وارد سويه ها بر روی دندروگرام های حاصله در گروههای مختلف قرار گرفتند. مقایسه گروه بندی به دست آمده بر روی دندروگرام حاصل از هر پرایمر با دسته بندی سويه ها براساس منطقه جغرافیایی نشان داد که تنها پرایمر ۸۱ توانسته است سويه های استان های لرستان شامل F۴۷، F۴۵ و F۲۳ ایلام شامل F۲۴، F۲۵ و F۲۶ همراه با یکی از سويه های استان کرمانشاه به نام F۳۰ که از نظر جغرافیایی به هم نزدیک هستند، در یک گروه قرار گرفتند و سويه های جمع آوری شده از دیگر استان ها در گروههای دیگر توزیع شده اند. در مرحله بعد ترکیب داده های حاصل از ۱۲ پرایمر مورد استفاده در این تحقیق انجام پذیرفت و در بررسی نتایج حاصل از پلی مورفسم DNA از ترکیب داده های حاصل از دوازده آغازگر (جدول ۱) دندروگرام به دست آمده سويه ها را در سه گروه دسته بندی کرد: گروه اول شامل ۴ عضو F۲، F۱۸، F۵۸ و F۵۹ گروه دوم شامل ۱۰ عضو F۱۵، F۲۳، F۲۴، F۲۵، F۲۶، F۳۰، F۳۱، F۴۵، F۴۷ و F۵۹ بوده و در گروه سوم سويه ۲۱ قرار گرفت (دندروگرام ۱). آنالیز تابع تشخیص و گروه بندی مقایسه ای مزدوج نیز با احتمال ۱۰۰ درصد اختلاف واقعی بین این سه گروه

جدول ۱: اطلاعات مربوط به مشخصات ۱۲ پرایمر مورد مطالعه در این تحقیق

درصد G+C	دمای اتصال °C	توالی آغاز گر	نام آغاز گر
۶۰	۳۲	5'-GAAACAGCCGG-3'	۱۷۱
۷۸	۳۲	5'-GGAGCCCAC-3'	۱۷۲
۶۰	۳۲	5'-GGAGGGTGTT-3'	۱۷۳
۶۰	۳۴	5'-ACGATCGCGG-3'	۱۷۴
۶۰	۳۲	5'-AGATGCAGCC-3'	Pu۱
۶۰	۳۲	5'-ACGGATCCTG-3'	Pu۲
۶۰	۳۲	5'-ACTGGGACTC-3'	Pu۳
۶۰	۳۲	5'-GGTTCTTGCA-3'	۸۱
۸۰	۳۶	5' CGGCCACCCT 3'	R۱
۸۰	۳۶	5' CGCGTGCCAG 3'	R۲
۸۰	۳۶	5' CCGGGCAAGC 3'	R۳
۶۰	۳۲	5' ACGACCGACA 3'	G۱۹

جدول ۲: جدول تابع تشخیص و گروه بندی مقایسه ای مزدوج (روش وارد) برای گروههای سه گانه حاصل از الگوی چند شکلی DNA با استفاده از ترکیب داده های حاصل از دوازده آغازگر.

دسته	اعضاء گروههای به دست آمده	کل		
		۱	۲	۳
گروه	۱	۴	۰	۰
	۲	۰	۱۰	۰
	۳	۰	۰	۱
دسته	درصد	۱۰۰	۰	۰
	اختلاف	۰	۱۰۰	۰
	گروهها	۰	۰	۱۰۰
		۰/۰۰۳	۰	۰/۰۰۳
P	۱	-	۰	۰
	۲	۰	-	۰
	۳	۰/۰۰۳	۰	-



دندروگرام ۱: نمودار حاصل از تجزیه خوشه ای ۱۵ سویه بر اساس الگوی چند شکلی DNA حاصل از RAPD از ترکیب دوازده آغازگر. طبق نمودار سویه ها در سه گروه دسته بندی شده و کلیه سویه های منطقه غرب کشور در گروه ۲ قرار گرفته اند. در حالی که سویه های استانهای شمال غرب کشور در هر سه گروه پراکنده شده اند.

بحث

بین گروهها اختلاف واقعی ۱۰۰٪ وجود دارد. این موضوع صحت نتایج حاصل را نشان داد ($p < 0.05$).

در مطالعه حاضر دسته بندی به دست آمده از روش RAPD با تفکیک سویه ها بر اساس جدایی جغرافیایی مقایسه شد و نتایج این بررسی نشان داد که سویه های منطقه غرب کشور دارای الگوی پلی مورفسم مشابهی هستند. این سویه ها به دلیل شباهت در ساختار ژنتیکی شان در یک گروه مجزا قرار گرفته اند که بیانگر تنوع ژنتیکی کم بین سویه های این منطقه می شود. در حالی که سویه های استانهای شمال غرب کشور دارای الگوی پلی مورفسم متفاوتی بودند و در گروههای مختلف قرار گرفتند. آسیگیتس و همکاران در (۱۶) مطالعاتی بر روی الگوی پلی مورفسم سه نژاد مربوط به ۴۶ جدایه قارچ فوزاریوم /گزیسپوروم با روش RAPD انجام دادند، آنها را به سه گروه جداگانه دسته بندی کردند. آنان مشاهده کردند که RAPD می تواند ایزوله ها را بر اساس نژاد کاملاً از همدیگر تفکیک کند. همچنین ایزوله های مربوط به منطقه چین با داشتن الگوی پلی مورفسم مشابه در یک گروه جداگانه قرار گرفتند، در حالی که سویه های سایر کشورها با دارا بودن ساختار ژنتیکی متفاوت در هر سه گروه پراکنده شدند. در مطالعه آنان مقایسه دسته بندی انجام گرفته بر اساس RAPD با نتایج حاصل از بیماریزایی تجانس بسیار کمتری داشت. از طرف دیگر، خیمز و همکاران با بررسی تنوع ژنتیکی بین سویه های قارچ فوزاریوم /گزیسپوروم از طریق الگوی RAPD نشان دادند که دسته بندی به دست آمده با نتایج حاصل از بیماریزایی از همبستگی کامل برخوردار است، در

در هنگام بررسی یک گونه از قارچ با سویه های مختلفی از آن مواجه می شویم که با هم اختلاف جزئی دارند. این اختلاف ها در برخی خصوصیات فنوتیپی نظیر ویژگی های ریخت شناسی، شدت بیماریزایی، انواع توکسین های تولید شده و فعالیت آنها و دیگر ویژگی هاست. از آنجا که صفات فنوتیپی در سطح مواد ژنتیکی و بازهای DNA رمزدهی می شوند، انتظار می رود که هر گونه تنوع در خصوصیات ظاهری بین دو موجود در سطح DNA آنها انعکاس یابد، به طوری که این اختلاف ها مستقیماً و با بررسی DNA آنها با روشهای مناسب قابل پیگیری است (۱۴).

برای بررسی تنوع در سطح DNA روشهای مختلفی ارایه شده است که همه روزه بر تعدادشان افزوده می شود. روش PCR با انواع مختلفی که دارد یکی از این روشها است. یکی از انواع PCR روش RAPD است و در مواردی که اطلاعات محدودی در مورد توالی بازهای DNA یک موجود در اختیار است کاربرد ویژه ای دارد. از آنجا که در مورد توالی بازهای DNA قارچ فوزاریوم /گزیسپوروم اطلاعاتی در دست نیست، این روش برای بررسی پلی مورفسم DNA می تواند سودمند باشد (۱۵).

در این تحقیق با به کارگیری ۱۲ نشانگر RAPD تنوع ژنتیکی بین ۱۵ سویه قارچ فوزاریوم /گزیسپوروم مشاهده شد و سویه ها در سه گروه دسته بندی شدند. در بررسی جدول تابع تشخیص و آنالیز مقایسه ای مزدوج ارتباط معنی داری بین گروهها به دست نیامد و مشخص شد که گروههای به دست آمده کاملاً مستقل از هم هستند و

شناخت هر چه بهتر ذخایر توارثی و ساختار ژنتیکی این سویه ها پرداخته شود. این موضوع سبب شناسایی هر چه سریعتر خصوصیات مجموعه های ژنتیکی می شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از مساعدت های دکتر علی برزگر، استادیار دانشگاه ساری بخاطر محاسبات آماری، تشکر می کنند.

حالی که مقایسه نتایج حاصل از جدایی جغرافیایی تجانس بسیار پایینی داشت (۱۷). در مطالعه حاضر نیز مقایسه الگوی RAPD سویه ها با دسته بندی بر اساس منطقه جغرافیایی بیانگر وجود همبستگی بین الگوی پلی مورفسم سویه های غرب کشور با منشأ جغرافیایی شان بوده است. به بیان دیگر، RAPD قادر به تشخیص تفاوت بین سویه های این منطقه با سایر نقاط است. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و همچنین بررسی مطالعات قبلی که کارایی این روش را در عرصه مطالعات ژنتیکی از طریق طبقه بندی آنها نشان می دهد پیشنهاد می شود تا با انجام مطالعات پیشرفته تر به وسیله استفاده از سایر نشانگرهای ملکولی و ریخت شناسی و ادغام نتایج حاصله به بررسی و

References

1. Dursun D, Fernandez V, Miller D, Alfonso EC. Advanced fusarium keratitis progressing to endophthalmitis. *Cornea* 2003; 22:300-3.
2. Cocuroccia B, Gaido J, Gubinelli E, Annessi G, Girolomoni G. Localized cutaneous hyalohyphomycosis caused by a *Fusarium* species infection in a renal transplant patient. *Clin Microbiol* 2003; 41(2): 905-7.
3. Wheat LJ, Goldman M, Sarosi G. State-of-the-art review of pulmonary fungal infections (Review) *Semin Respir Infect* 2002 ;17(2):158-81.
4. Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, Heymans C, Duchateau V, Verdebout JM, Crokaert F. Cross reaction between a pan-candida genus probe and *Fusarium spp.* in a fatal case of *Fusarium oxysporum* pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(2):149-52.
5. Liddel CM. Introduction: Recent advance in *Fusarium systematic*. *Phytophath* 1991; 81: 1044-1045.
6. Jamil FF, Sarwar N, Sarwar M, Khan JA, and Kahl G. Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* populations in Pakistan causing blight of chickpea. *Physiol and Molec Plant Path* 2000; 57: 243 - 254.
7. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:6531-6535.
8. Martin MJ, Simon CJ, and Nuehlbauer FJ. Use of Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) to Characterize Race 2 of *Fusarium oxysporum f.sp pisi*. *Phytopath* 1993; 83: 612-614.
9. Yli-Mattila T, Paavanen S, Parikka A., Tahvonen R, and Karjalainen, R. Isozyme and RAPD-PCR analyses of *Fusarium avenaceum* strains from Finland. *Plant Path* 1996; 45:126-134.
10. Namiki F, Shiomi T, kayamura T, and Tsuge T. Characterization of the fomae specials of *Fusarium oxysporum* causing wilt of cucurbits by DNA fingerprinting with nuclear repetitive DNA sequences. *Appl Envir Microbe* 1994; 60: 2684 - 2691.
11. Dellaporta SL. A plant chromosomal DNA minipreparation. *Plant Mol Biol Rep* 1983; 1:19-21.
12. Morgan U, Constantine C, O'Donoghue P, Meloni B P, et al. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis. *Am J Trop Med & Hygiene* 1995; 52: 559-564.
13. Meyers JA, Sanchez D, Elwell I, and Falkow S. Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 1976; 127: 1529-1537.
14. Paavanen SH, Hyvonen J, Bulat SA, and Yli-Mattila T. RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analyses in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates. *Mycol Res* 1999; 103: 625-634.
15. Bentley S, Pegg KG, and Dale JL. Genetic variation among a worldwide collection of isolates of *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* analyzed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycol Res* 1995; 99: 1378-1384.
16. Assigbetse KB, Fernandez D, Dubois MP, Geiger JP. Differentiation of *Fusarium oxysporum f.sp vasinfectum* races by Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytophath* 1994; 84: 622-6.
17. Jimenez GM, Perez-Artes E and Rodriguez JD. Characterization of pathotype and races of *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* and nonpathogenic *F. oxysporum* infecting chickpea by RAPD-PCR. In 3rd European conference on grain legumes and Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet European demands in Valladolid, Spain. 1998; 96-97.