انگشت‌نگاری ژنتیکی جدایه‌های عامل نوار قهوه‌ای برنج با استفاده از ERIC-PCR

مائده تقی‌پور*[۱]، حشمت‌اله رحیمیان[۱]، ولی‌اله بابائی‌زاد[۱] و محمد علوی[۲]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، استادیار بیماری شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان
*maedeh.taghipour@gmail.com

چکیده

بیماری نوار قهوه‌ای برنج (brown stripe of rice)یکی از بیماری‌های شایع در خزانه‌های برنج (*Oryza sativa* L.) می‌باشد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها، نمونه برداری از خزانه های برنج از نقاط مختلف استان مازندران صورت پذیرفت. عامل بیماری بر اساس آزمون‌های بیوشیمیائی، فیزیولوژیکی و بیماری‌زائی (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*(*Aaa* تشخیص داده شد. اثر انگشت ژنتیکی حاصل از ERIC- PCR با یکدیگر و با جدایه های مرجع ارزیابی گردید. مقایسه نقوش قطعات DNA تکثیر شده در ERIC-PCR نشان دادکه جدایه‌ها در سطح تشابه ۲۰ درصد در دو گروه قرار گرفتند و نیز گروهها با تشابه ۳۵ و ۶۵ درصد به ترتیب به ۵ و ۱۰گروه افزایش یافتند که این نتایج نشان دهنده وجود تنوع زیاد در این زیر گونه است. اکثر جدایه‌ها (۱۴ جدایه از ۲۰ جدایه) با جدایه مرجع*Aaa* در یک گروه قرار گرفتند. پیش از این گزارشی در زمینه وجود سطح بالائی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های این عامل باکتریائی در دست نبوده است.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی ،نوار قهوه‌ای برنج ،ERIC-PCR.

مقدمه

برنج *Oryza sativa* L. یکی از گیاهان دیپلوئید تیره گندمیان است که پس از گندم دومین محصول استراتژیک دنیا محسوب می‌شود (شریف نبی، ۱۳۸۹). از بیماری‌های باکتریائی برنج می‌توان نوار قهوه‌ای برنج را نام بردکه علائم آن روی گیاهچه‌های برنج در خزانه قابل مشاهده است. عامل این بیماری *Acidovorax avenae* معرفی شده‌است (Rahimian , 1986). با توجه به اینکه نزدیک به نیمی از سطح زیر کشت برنج کشور به استان مازندران تعلق دارد (مجنون حسینی، ۱۳۹۰) شناسائی و بررسی تنوع ژنتیکی عوامل بیماریزای این محصول، از جمله جدایه‌های باکتری فوق، از نظر تدوین راهبردهای منتهی به کنترل بیماری‌ها، حائز اهمیت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

از برگ‌های دارای علائم نواری باکتریائی نشاهای برنج در استان مازندران نمونه برداری و جهت شناسائی و بررسی تنوع

ژنتیکی عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل گردید. جداسازی باکتری طبق روش‌های متداول صورت گرفت. آزمون‌های بیوشیمیائی ، فیزیولوژیکی و بیماری‌زائی بر اساس روش‌های متداول باکتری شناسی برای شناسائی جدایه‌ها بکار رفت (Schaad *et al.* 2001).

استخراج DNA ژنومی

جدایه‌ها پس از دو روز رشد روی محیط آگار غذائی در دمای C ˚۲۸ - ۲۵، در آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون در آمدند. به هر سوسپانسیون به اندازه ۵۰- ۲۵ میکرولیتر هیدروکسید پتاسیم ۵٪ اضافه شد. نمونه‌ها به مدت دو تا سه دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. نمونه‌ها به مدت۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس لایه بالائی به عنوان نمونه حاوی DNA برداشته شد. از این نمونه‌ها، به عنوان DNA قالب در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد.

انگشت‌نگاری DNA با[1] ERIC – PCR

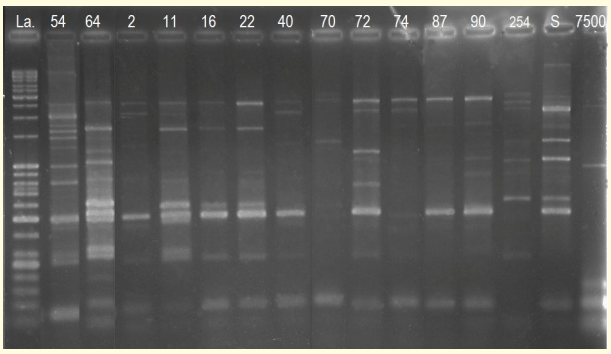
انگشت‌نگاری DNA ژنومی باERIC – PCR با استفاده از آغازگرهای ERIC1R (5´-ATGTAAGCT CCTGGG GATTCAC-3') و ERIC2 (5´-AAGTAAGTGACTGGGGTG AGCG-3´) طبق روش‌های توصیه شده و با کمی تغییر انجام گردید (Versalovic *et al.* 1991). واکنش‌هابه حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10x، ۲/۵ میلی مولار MgCl2، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط dNTP، ۴۰۰ پیکومول از هریک از آغازگرها ،۱/۵ میکرولیتر از نمونه حاوی DNA الگو و ۱/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز انجام شد.

پنج میکرولیتر از محصول PCR با دو میکرولیتر محلول بارگذاری نمونه حاوی ۴۰٪ گلیسرول و ۰/۱ درصد برم فنل بلو مخلوط شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت انجام پذیرفت. برای تعیین اندازه قطعات از نشانگر kb۱ (ساخت شرکت Fermentas , Lithuania) استفاده گردید. ژل با اتیدیوم بروماید (محلول ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) رنگ آمیزی و از آن عکس برداری شد (Ausubel *et al.* 1992). گروه بندی جدایه‌ها با مقایسه نقوش قطعات DNA در ژل و نمره‌دهی بر پایه وجود یا عدم وجود قطعات همسان و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت. دندروگرام با روش مقایسه جفت‌ها از طریق میانگین‌های بی‌وزن (UPGMA) و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS 2.02 ترسیم گردید.

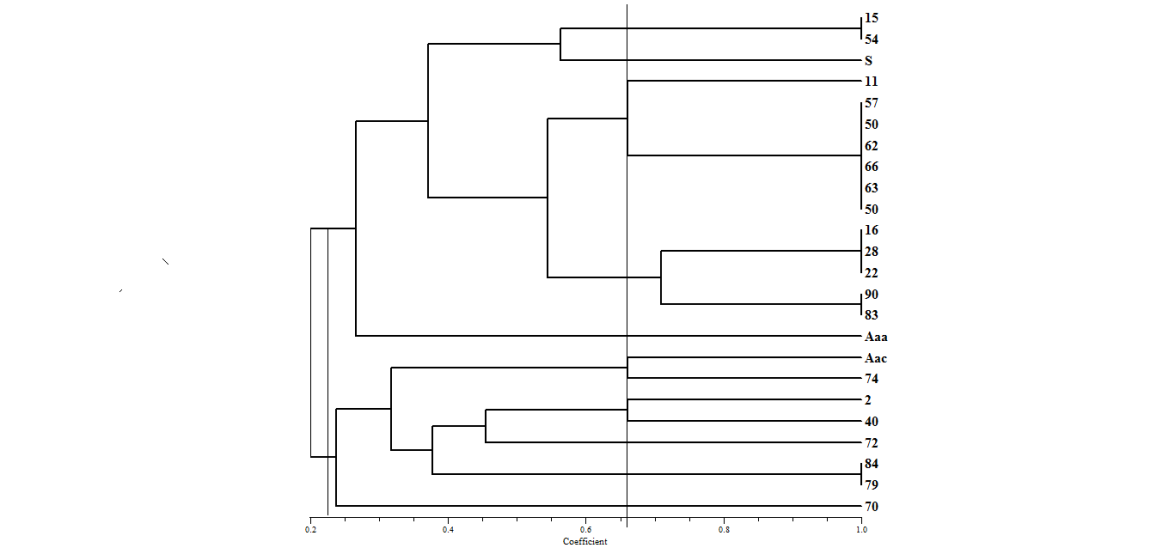
نتایج و بحث

پس از کشت نمونه‌های دارای علائم نوار قهوه‌ای و بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی ، ۲۰ جدایه از گیاهچه برنج به عنوان *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* شناسائی و برای بررسی تنوع ژنوتیپی به کار برده‌شدند. در انگشت‌نگاری ژنتیکی DNA ژنومی با ERIC-PCR (شکل ۱) جدایه‌ها در سطح تشابه ۲۰ درصد در دو گروه قرار گرفتند و در سطوح تشابه ۳۵ و ۶۵ درصد، آنها به ترتیب به ۵ و ۱۰ گروه دسته بندی شدند که نشان‌دهنده وجود تنوع زیاد در این زیر گونه است. اکثر (۶۶ درصد) جدایه‌ها با جدایه مرجع *Aaa* ICMP 254 (International Collection of Microorganisms from Plants. Auckland,New Zealand) در یک گروه قرار گرفتند. جدایه مرجع *A.a.* subsp. *citrulii* با سایر جدایه‌ها در گروه دیگری واقع شد (شکل ۲).

1- Enterobacterial repetitive intergenic consensus



شکل۱- نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA جدایه‌های *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* با ERIC-PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ رنگ شده با اتیدیوم بروماید. ستون‌ها 54,64,2,11,16,22,40,70,72,74,87,90 : جدایه های برنج. 254,S: جدایه مرجع *Aaa* 7500: جدایه مرجع *Aac*. La : نشانگر جرم مولکولی.



شکل۲- دندروگرام الگوی اثر انگشت جدایه‌هادر آزمون ERIC-PCR .جدایه‌های شماره 54,64,2,11,16,22,40,70,72,74,87,90: جدایه های *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* از خزانه‌های برنج مازندران. S,254 : جدایه مرجع: *Aaa* .7500 :جدایه مرجع *Aac*

تحقیق حاضر نشانگر وجود تنوع قابل ملاحظه‌ای در جمعیت‌های *Aaa* در گیاهچه برنج از نظر زمینه ژنتیکی است. تنوع جدایه‌ها می‌تواند نشانه بروز تغییرها ، اضافه یا حذف شدن ها و جهش‌هائی باشد که به مرور زمان در جمعیت های باکتری اتفاق افتاده‌است. این تحقیق اولین گزارش از وجود تنوع ژنتیکی جدایه‌های عامل نوار قهوه‌ای برنج می‌باشد.

منابع

شریف‌نبی ب ، ۱۳۸۹. بیماری‌های گیاهان زراعی. دانشگاه صنعتی اصفهان.

مجنون حسینی ن، ۱۳۹۰. زراعت غلات. انتشارات دانشگاه تهران.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman, and K. Struhl. 1992. Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates, Wiley Interscience, New York.

Rahimian H, 1986. Incidence of bacterial stripe of rice in Iran. Iran Agricultural Research. 5: 63- 71.

Schaad, N. W., J. B. Jones, and W.Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. Pp.235-250. APS Press

Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R Lupski. 1991. Distribution of repetive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research. 19: 6823-6831