مقاله کوتاه

بررسی مولکولی جدایه‌های *Absidia* بر اساس ناحیه rDNA-ITS *

MOLECULAR ANALYSIS OF *Absidia* ISOLATES BASED ON rDNA-ITS REGION

زهرا ده بوید[۱]**، محمدعلی تاجیک قنبری[۱]، حشمت‌اله رحیمیان[۱] و مهدی ارزنلو[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۷)

چکیده

جنس *Absidia* از خانواده *Absidiaceae* و راسته *Mucorales* است که برخی گونه‌های این جنس به عنوان عوامل ایجادکننده بیماری موکورومیکوزیس در انسان و حیوانات مهم هستند. به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی جنس *Absidia* نمونه‌برداری از برخی خاک‌های استان مازندارن به عمل آمد. با کشت سوسپانسیون خاک در محیط اختصاصی رزبنگال بیست جدایه مربوط به این جنس جداسازی شد. براساس تشخیص مورفولوژیکی کلیه جدایه‌ها متعلق به گونه *Absidia repens* بودند. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه تحلیل فیلوژنتیک جدایه‌ها از شش جدایه DNA استخراج شد و ناحیه ITS (شامل ۵/۸ S) از rDNA تعیین توالی شد و با نرم‌افزارهای Chromas Pro، MEGA5 همراه با نمایندگانی از گونه‌های دیگر که از بانک ژن به دست آمده بودند مورد ارزیابی قرار گرفتند. گونه *Absidia repens* در درخت فیلوژنتیکی حاصل، در کلاد جداگانه از سایر گونه‌ها قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، تنوع زیستی، مازندران، *Absidiaceae*

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:zahra.dehbovid@gmail.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار، استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲: استادیار بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

مقدمه

جنس *Absidia* (van Tieghem 1876) متعلق به زیرشاخه *Mucoromycotina* (Hibbett *et al*. 2007) و راسته *Mucorales* است. اکثر اعضای این جنس به عنوان پوده‌رست‌های ساکن خاک و یکی از عوامل موکورومیکوزیس (Mucormycosis) در انسان و حیوانات مطرح می‌باشند (Ribes *et al*. 2000, Thirion-Delalande *et al*. 2005). در حال حاضر این جنس با توجه به کاربردهای وسیع در بیوتکنولوژی، همانند اهمیت در انتقال میکروبیولوژیکی، اهداف دارویی و اقتصادی یا حتی تجزیه آلاینده‌های زیست محیطی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Guiraud *et al*. 2008; Chen *et al*. 2007). نام‌گذاری جنس *Absidia* (از ریشه :absis, arcus) اوایل ۱۸۷٦ با توصیف این جنس توسط ون‌تیگم (۱۸۷٦) شروع شد؛ ون‌تیگم این جنس را با ویژگی‌هایی همانند: ۱) استولون کمانی با ریزوئید، ۲) قرار گرفتن اسپورانژیوفور بین دو ریزوئید، ۳) وجود اسپورانژیوفور در قسمت‌های هوایی استولون، ٤) آپوفیز و اسپورانژیوم گلابی شکل با دیواره ناپایا و ٥) زیگوسپور احاطه شده با زوائدی از پایه نگهدارنده توصیف کرد که در ادامه، توصیفات توسط تاکسونومیست‌های مشهوری مانند *لندنر* (Lendner 1924)، *بینیر* (Bainier 1889) و *هاجم* (Hagem 1908) تکمیل شد. خصوصیت اصلی *Absidia* براساس توصیفات *هوفمن و همکاران* (Hoffmann *et al*. 2007) شامل کلنی‌های سریع الرشد با ریسه‌هایی مرکب از استولون‌های هوایی شبیه به ریزوئید، اسپورانژیوفورها راست، ساده یا منشعب، به صورت دسته‌ای در قاعده با آپوفیزهای قیفی شکل و اسپورانژیوسپورها تک یاخته، بی‌رنگ، بدون خار، اسپورانژیوم‌ها گلابی شکل، چند اسپوری، انتهایی با ستونک مخروطی شکل دارای برآمدگی رأسی می‌باشد. در ارتباط با منشا فیلوژنتیکی این جنس *اودانل* و *همکاران* (O'Donnell *et al*. 2001) فرضیه منوفیلیتیک بودن *Absidia* را با مطالعه گونه‌های *A. corymbifera* و *A. repens* رد کردند، در سال‌های اخیر شواهد مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی حاصل از آنالیز فیلوژنی منجر به پذیرش فرضیه پلی‌فیلیتیک بودن *Absidia* شده است (Voigt & Wo¨stemeyer 2001, Kwas´na *et al*. 2006). *هوفمن* و *همکاران* (۲۰۰۷) براساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با آغازگرهای ITS1 و ITS2 جنس *Absidia* را به دو گروه میانه‌دوست و گرمادوست تقسیم کردند. پژوهش حاضر به‌منظور تعیین توالی، آنالیز مولکولی و فیلوژنتیکی جدایه‌های *Absidia repens* با استفاده از آغازگرهای نواحی rDNA انجام شد.

روش بررسی

جداسازی قارچ‌های موکورال از نمونه خاک‌های مورد مطالعه با تهیه سوسپانسیون خاک به روش *دینگرا* و *سینکلر* (Dhingra & Sinclair 1995) در محیط اختصاصی رزبنگال (حاوی ۰/۵گرم $MgSO_4$، ۰/۵گرم KH_2PO_4، ۰/۵گرم K_2HPO_4، ۰/۵گرم Yeast extract، ۰/۵گرم Peptone، ۰/۰۵گرم Rosbangal، ۰/۰۵گرم Streptomycin و۱۷ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) با اعمال تغییرات صورت گرفت. شناسایی براساس مورفولوژی پرگنه در محیط کشت و خصوصیات میکروسکوپی، براساس کلیدهای قارچ‌شناسی موجود انجام شد (Ellis & Hesseltine 1966, Schipper 1990). با توجه به وضعیت جغرافیایی و خصوصیات

مورفولوژیکی پرگنه‌ها تعدادی جدایه به‌عنوان نماینده انتخاب (جدول ۱) و مورد بررسی قرار گرفت. توده میسلیومی جدایه‌های قارچ در محیط کشت مایع PDB (عصاره ۵۰ گرم سیب زمینی همراه ۵ گرم دکستروز در یک لیتر آب) تهیه شد. جهت استخراج DNA تخریب دیواره سلولی به وسیله ازت مایع و به روش *راپلی* (Rapley 2000) انجام گردید. کیفیت و کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتر و هم‌چنین الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸درصد در بافر TBE 1X (۲ میلی‌مولار EDTA، ۹۰ میلی‌مولار Tris و ۹۰ میلی‌مولار Boric acid) مورد ارزیابی قرار گرفت. تکثیر کامل ناحیه ITS1-5.8 S-ITS2 از rDNA با استفاده از جفت آغازگر ITS5 (5´GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3´) و ITS4 (5´TCCTCCGCTTATTGATATGC3´) (White *et al.* 1990) انجام شد. واکنش PCR در مخلوط ۲۵ µl (1X PCR buffer، $MgCl_2$ ۲/۵ mM، dNTP ۰/۲mM، Primers ۰/۲mM، *Taq*-polymerase ۲/۵ U) انجام گردید و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (BioRAD) با برنامه حرارتی شامل واسرشتگی مقدماتی ۴ دقیقه در $94^{\circ}C$، ۳۵ چرخه با واسرشتگی ۱ دقیقه در $94^{\circ}C$، اتصال یک دقیقه در $60^{\circ}C$، گسترش یک دقیقه در $72^{\circ}C$، گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در $72^{\circ}C$ صورت گرفت. محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد بافر TBE 1X با ولتاژ ۸۰ V الکتروفورز شد.

سپس با کیت خالص‌سازی (QiagenIncValencia, CA, PCR USA) مطابق با دستور عمل شرکت سازنده خالص گردید. محصولات خالص شده در جهت مستقیم توسط شرکت BIONEER کره توالی‌یابی شدند اما در بعضی نواحی دارای حرف N (ناشناخته) بودند که با مراجعه به منحنی مربوطه به نوکلئوتید، با کمک نرم افزار Chromas Pro تصحیح شد و سپس همولوژی توالی در بانک ژن (NCBI) مورد بررسی قرار گرفت. روابط فیلوژنی میان جدایه‌های جمع‌آوری شده همراه با توالی تعدادی دیگری از جدایه‌های گرفته شده از بانک ژن به روش Neighbor-Joining و Parsimony مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و درخت فیلوژنتیکی رسم شد. اعتبار شاخه با انجام اعتبارسنجی (Bootstrap) در ۱۰۰۰ تکرار مورد سنجش قرار گرفت و ارزش بیشتر از ۵۰ در روی درخت نشان داده شد. ارزیابی‌ها در نرم افزار MEGA5 انجام گردید.

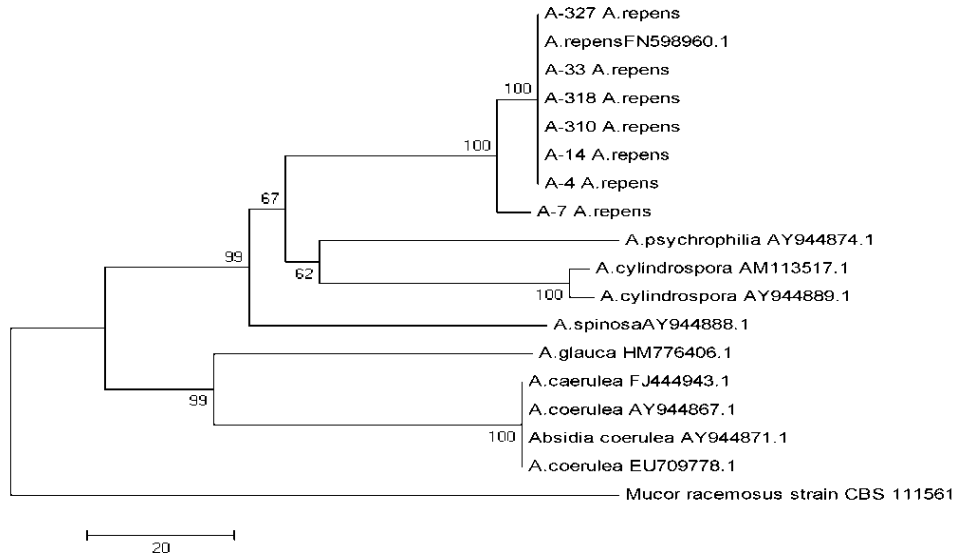
نتایج و بحث

در تحقیق حاضر بیست جدایه مربوط به جنس *Absidia* از خاک‌های استان مازندران جداسازی شد. مشخصات گونه *A. repens* جداسازی شده از خاک‌های مناطق زراعی و غیرزراعی دامیر، اوجی‌آباد، ساری، بهشهر، جنگل دارب‌کلا و جنگل نکا با توصیفات *هستین و الیس* (۱۹۶۶) و *اسخیپر* (۱۹۹۰) مطابقت دارد. تعداد هفت جدایه به‌منظور بررسی مولکولی با ITS مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول PCR جفت آغازگر ITS4 و ITS5 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد متشکل از تک باند DNA در محدوده ۶۰۰ جفت بازی برای جدایه‌ها بود. توالی نوکلئوتیدی به‌دست آمده به‌منظور شناسایی مولکولی در بانک ژن همردیف شدند و همولوژی ۱۰۰-۹۹٪ با گونه *A. repens* نشان دادند. توپولوژی درخت فیلوژنیک ترسیم شده بین جدایه‌های *A. repens* جمع‌آوری شده و توالی جدایه‌های گرفته شده از بانک ژن با روش Neighbor-Joining و Parsimony در نرم افزار MEGA5 مشابه بود. در شکل (۱) درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از روش Neighbor-JJoining نمایش داده شده است.

جدول ۱. جدایه‌های ایرانی *Absidia* مطالعه شده و شماره دسترسی آنها برای توالی ITS-rDNA

Table1. Iranian isolate of studied *Absidia* and their asseccion numbers for rDNA-ITS sequence

گونه (Species)	شماره جدایه (Isolate)	استان (Province)	منطقه (Locality)	شماره دسترسی (Accession ITS)
Absidia sp.	A-7	Mazandaran	ماه فروز محله (Mahfrozmahale)	JQ683214
Absidia repens	A-4	Mazandaran	دامیر (Damir)	JQ683213
Absidia repens	A-14	Mazandaran	اوجی آباد (Uojiabad)	JQ683215
Absidia repens	A-33	Mazandaran	ساری (Sari)	JQ683216
Absidia repens	A-310	Mazandaran	ساری (Sari)	JQ683217
Absidia repens	A-318	Mazandaran	بهشهر (Behshahr)	JQ683218
Absidia repens	A-327	Mazandaran	نکا (Neka)	JQ683219



شکل ۱. درخت تکاملی بر اساس توالی ناحیه rDNA ITS1-ITS2 جدایه‌های *Absidia* به‌دست آمده در این بررسی به همراه توالی و گروه خارجی گرفته شده از NCBI. درخت با روش Neighbor-Joining در نرم افزار MEGA5 ترسیم شده است. عدد اعتبارسنجی (bootstrap) برای ۱۰۰۰ تکرار و بالای ۵۰ در بالای شاخه‌ها نشان داده شده است.

Fig. 1. A phylogenetic tree based on rDNA ITS1- ITS2 sequences showing the relationships among *Absidia* spp. isolated in this study, out group and sequences extracted from NCBI. The tree was constructed by Neighbor-Joining method, using MEGA5. Bootstrap support (1000 replications; >50%) are shown above the branches

اودانـل و همکـاران (۲۰۰۱) بـر اسـاس آنـالیز فیلـوژنی rDNA ۱۸S، ۲۸S و اگـزون‌هـای ژن *tef* بـه همـراه ویژگـی‌هـای مورفولوژیـک فرضـیه پلـی‌فیلیتیـک بـودن *Absidia* را مطرح کردنـد کـه اخیـراً ایـن فرضـیه توسـط *کواسنا و همکاران* (Kwasna *et al*. 2006) به وسیله آنالیز PCR-RFLP حمایت شده است. در پژوهش حاضر گـروه میانـه‌دوسـت *A. repens* (Hoffmann *et al*. 2007) بـه لحاظ مورفولوژیکی و مولکولی مورد مطالعه قـرار گرفـت. در درخت فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز ناحیه ITS به همراه خـصوصیات مورفولـوژیکی متفـاوت ماننـد وجـود اسـپورانژیوم ثانویـه در کـشت‌هـای قـدیمی، اسپورانژیوسپورهای تخـم‌مرغـی شـکل و صـاف، گونـه *A. repens* به خوبی از سایر گونه‌های ایـن جـنس متمـایز گردید. *A. repens* همانند گونـه‌هـای میانـه‌دوسـت دارای زیگوسپورهایی بـا دیـواره ضـخیم بـه همـراه زوائـد روی پایه‌های نگهدارنده زیگوسـپور اسـت کـه از ویژگـی‌هـای منحـصر بفـرد گونـه‌هـای میانـه‌دوسـت مـی‌باشـد (Zycha *et al*. 1969). نتـایج بـه‌دسـت آمـده از آنـالیز فیلوژنتیک جدایه‌های بومی به‌دست آمـده در ایـن بررسـی به همراه توالی گرفته شده از بانک ژن، فرضیه پلی‌فیلیتیک بـودن *Absidia* را قـوت مـی‌بخـشد. هـم‌چنـین در تأییـد کارهای قبلی در استفاده از ناحیه ITS، با توجه به قابلیـت بالا در شناسایی مولکـولی و رده‌بنـدی مـی‌تـوان از آن بـه عنـوان ناحیـه بـسیار مناسـب جهـت تـسهیل شناسـایی مورفولوژیک در سطح گونه و آنالیز فیلوژنتیکی بهره برد.

منابع

جهـت ملاحظـه بـه صـفحات (163-161) مـتن انگلیـسی مراجعه شود.