دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال سوم، شماره اول، بهار و تابستان 1394
صص 22-15

استفاده از مارکرهای مولکولی RAPD در تفکیک ارقام مقاوم و حساس گندم نسبت به بیماری لکه برگی سپتوریایی گندم

محمدرضا اصلاحی[1*]

تاریخ دریافت: 93/6/12 تاریخ پذیرش: 93/8/27

چکیده

لکه برگی سپتوریایی گندم که توسط قارچ *Mycosphaerella graminicola* ایجاد می‌گردد یکی از مهمترین بیماری‌های گندم است که می تواند در صورت وجود شرایط مناسب به صورت اپیدمی درآمده و خسارت سنگینی به محصول وارد نماید. یکی از روشهای مبارزه با بیماری استفاده از ارقام مقاوم است. در سالهای اخیر استفاده از نشانگرهای مولکولی به منظور بررسی مقاومت به بیماری در گندم توسعه پیدا کرده است. یکی از این نشانگرها، نشانگرهای RAPD هستند. در مطالعه صورت گرفته کاربرد این نشانگرها در تفکیک ارقام مقاوم و حساس نسبت به بیماری سوختگی برگ گندم از یکدیگر با استفاده از 7 نشانگر RAPD و 3 رقم مقاوم و حساس به بیماری مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت که در آخر تنها نشانگر OPH20 توانست یک باند پلی مورفیک در ناحیه 1200bp در ارقام مقاوم ایجاد کند که این باند در ارقام حساس مشاهده نشد. بنابراین با توجه به تعدد زیاد ارقام شاید بتوان از این نشانگر برای تفکیک ارقام مقاوم از حساس نسبت به بیماری سوختگی برگ گندم در آینده استفاده کرد.

واژه های کلیدی : لکه برگی سپتوریایی، گندم، نشانگر OPH20

[1]- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.
*- نویسنده مسئول مقاله: mr_eslahi@yahoo.com

مقدمه

بیماری سوختگی برگ گندم یکی از مهمترین و مخرب‌ترین بیماریهای گندم است (Eyal *et al*., 1985). این بیماری بوسیله قارچ *Mycosphaerella graminicola* (Fückl) J.Schröt.in Cohen با شکل غیرجنسی *Zymoseptoria tritici* (Quaedvlieg *et al*., 2011) ایجاد می گردد. این بیماری پس از کشت وسیع ارقام زودرس و نیمه پاکوتاه سیمیت که به بیماری سپتوریوز حساس بودند توسعه و اهمیت پیدا کرد. ارقام پاکوتاه سیمیت به دلیل عملکرد بالا و مقاومت به زنگ‌ها در سطح وسیعی در کشورهای مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. با بروز اپیدمی‌های شدید، میزان خسارت و کاهش محصول بین 25 تا 50 درصد گزارش شده است (King *et al*., 1983; Eyal *et al*., 1985; Eyal *et al*., 1987).

در سالهای اخیر این بیماری در بعضی از استانهای کشور ازقبیل خوزستان و گلستان به صورت اپیدمی های شدید بروز کرد و کاهش محصول در استان های خوزستان و گلستان تا حدود 44 درصد برآورد شد (Dadrezaei *et al*., 2003; Kia and Torabi, 2008). روشهای مختلف زراعی از قبیل تناوب، شخم، و استفاده از مخلوط ارقام و کشت و یا آبیاری تابستانه می تواند به کنترل بیماری کمک نماید. علاوه بر روشهای زراعی از قارچکش ها نیز برای کنترل بیماری استفاده می گردد (Cowger *et al*., 2000). اما استفاده از ارقام مقاوم به عنوان بهترین و موثرترین راه کنترل بیماری توصیه شده است (Eyal, 1981). در دهه های اخیر ژنهای مقاومت به *M. graminicola* در گندم های هگزاپلوئید مکان یابی و تاکنون 18 ژن مقاومت (*Stb 1- Stb 18*) شناسایی و معرفی شده‌اند (Tabib Ghaffary *et al*., 2011, 2012).

موفقیت در برنامه های مدیریت بیماری و نیز برنامه های اصلاحی برای مقاومت به بیماری مستلزم وجود اطلاعات کافی و دقیق در زمینه ساختار ژنتیکی جمعیت های قارچ عامل بیماری، شناسایی منابع مقاومت موثر و در نهایت نحوه کنترل ژنتیکی مقاومت در ارقام مقاوم است. همسانه سازی ژنهای *stb* به دلیل ژنوم بزرگ گندم مشکل است (Somasco *et al*., 1996; Adhikari *et al*., 2003). تاکنون مطالعاتی در خصوص مقاومت کمی، نحوه توارث، شناسایی و مکان یابی جایگاه صفت‌های کمی (QTL) موثر در مقاومت نسبت به *M. graminicola* انجام شده است (Eriksen *et al*., 2003; Simón *et al*., 2004; Tabib Ghaffary *et al*., 2011, 2012). استفاده از نشانگرهای مولکولی شناسایی و مکان یابی QTL را امکان پذیر کرده است (Eriksen *et al*., 2003). همچنین می‌توان از نشانگرهای مولکولی برای تفکیک ارقام حساس و مقاوم از یکدیگر استفاده کرد (Botez *et al*., 2009).

در تحقیقی 21 لاین دی هاپلوئید مقاوم و 2 لاین حساس به بیماری توسط نشانگرهای هم بارز SSR برای انتخاب مبتنی بر مارکر ارقام مقاوم و حساس مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان دادکه نشانگرهای SSR می‌توانند در برنامه اصلاح گندم به منظور شناسایی ژنهای مقاومت نسبت به *M. graminicola* و تسهیل انتخاب ارقام، مفید واقع شوند (Botez *et al*., 2009). در تحقیق دیگری نشانگرهای RAPD و SSR به منظور یافتن پیوستگی ژنی بین نشانگرها و ژنهای مقاوم به *M. graminicola* مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بعضی از نشانگرهای RAPD توانستند فقط یک باند پلی موفیک را در ناحیه 1200bp در لاین های مقاوم نسبت به لاین های حساس

ایجاد نمایند. همچنین از بین 6 جفت نشانگر SSR، فقط 3 جفت توانستند لاین های مقاوم را از لاین های حساس مجزا نمایند (Curticiu *et al*., 2009). بنابراین این تحقیق به منظور تایید کاربرد استفاده از نشانگرهای RAPD در تفکیک ارقام مقاوم و حساس به *M. graminicola* انجام شد.

مواد و روش ها

برای انجام این تحقیق 3 رقم مقاوم و 3 رقم حساس گندم نسبت به *M. graminicola* مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA از ارقام با استفاده از روش حامد و همکاران (Hameed *et al*., 2004) انجام شد. برای استخراج DNA، 100 میلیگرم برگ تازه گندم پس از قرار گرفتن در نیتروژن مایع درون یک هاون چینی به خوبی پودر گردید. پودر به دست آمده به درون یک میکروتیوب 1/5 میلی لیتری منتقل و سپس 600 میکرولیتر بافر استخراج گرم روی آن ریخته شد و میکروتیوب در حمام آب گرم در دمای 65 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه قرار گرفت به طوریکه هر 3 دقیقه میکروتیوب به آرامی به منظور مخلوط شدن بهتر بافر با پودر حاصله تکان داده شد. بعد از این مدت میکروتیوب از حمام آب گرم خارج و به مدت 1 الی 2 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس 600 میکرولیتر از ایزوآمیل الکل – کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه و به آرامی مخلوط شد. میکروتیوب ها به مدت 5 دقیقه در 4000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و بعد از آن فاز بالایی به یک میکروتیوب 1/5 میلی لیتری منتقل گردید. 2 برابر حجم محلول، اتانل 96 درصد سرد به فاز رویی که قبلا به یک میکروتیوب دیگر منتقل شده بود اضافه شد و به آرامی 5 تا 10 بار با تکان دادن مخلوط گردید و دوباره در 10000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد تا DNA رسوب گردد. پس از سانتریفیوژ و تشکیل رسوب DNA اتانل به دقت برداشته شد و نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت 5 تا 10 دقیقه خشک شدند. پس از خشک شدن نمونه‌ها 20 میکرولیتر بافر TE به میکروتیوب‌ها اضافه گردید تا رسوب تشکیل شده حل گردد. به منظور حذف وجود احتمالی RNA در نمونه به دست آمده، به هریک از میکروتیوب ها 1 میکرولیتر آنزیم ریبونوکلئاز اضافه شد و نمونه ها در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 25 دقیقه نگهداری شدند. سپس نمونه ها در دمای منهای 20 درجه سانتی گراد برای آزمایشات بعدی نگهداری گردیدند.

واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

برای انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز از 7 پرایمر پلی مورفیک RAPD استفاده شد (جدول1). به این منظور 100 نانو گرم DNA استخراج شده برای هر واکنش استفاده گردید. ابتدا مخلوطی از 1X PCR buffer، 1/5Mm $MgCl_2$، 100ng DNA، 0.20 Mm dNTPs از هر کدام، 200Nm ازپرایمر RAPD و 2/5 U/µl آنزیم Taq تهیه گردید و واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Techne (مدل TC-512 Gradient) در سیکل‌های دمایی 1 دقیقه 94

درجه سانتی گراد، 1 دقیقه 56 درجه سانتی گراد و 1 دقیقه 72 درجه سانتی گراد به تعداد 30 سیکل و به دنبال آن در 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه انجام شد. سپس محصول واکنش در ژل آگارز 1/5 درصد به مدت 3 ساعت در ولتاژ ثابت الکتروفورز گردید. برای رنگ امیزی و مشخص شدن باندها روی ژل آگارز از DNA safe stain ساخت شرکت سیناکلون استفاده شد.

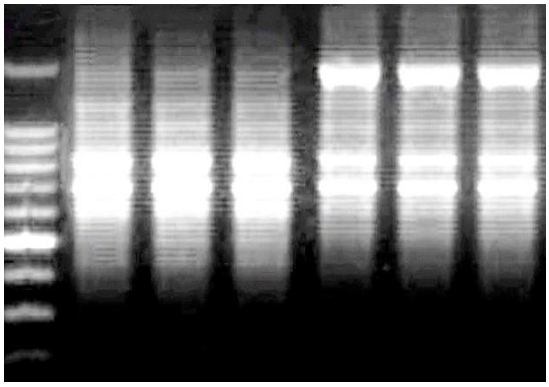
جدول 1- فهرست آغازگرهای RAPD مورد استفاده

ردیف	نام آغازگر	تولی آغازگر
1	OPC13	5 -AAGCCTCGTC-3
2	OPC20	5 -ACTTCGCCAC-3
3	Mic14	5 -TGAGTGGGTG-3
4	SET5	5 -AAGAGCCCGT-3
5	OPH20	5 -GGGAGACATC-3
6	OPAB18	5 -CTCGCGTGTC-3
7	OPC10	5 -TGTCTGGGTG-3

نتایج و بحث:

تاکنون تعداد زیادی از نشانگرهای DNA معرفی شده اند و در تجزیه های ژنتیکی موجودات زنده مورد استفاده قرار گرفته اند، این نشانگرها از نظر بسیاری از ویژگی ها مانند درجه چند شکلی، غالب یا همبارز بودن، تعداد جایگاه های تجزیه شده در هر آزمایش، توزیع در سطح کروموزوم، تکرار پذیری، نیاز و یا عدم نیاز به توالی یابی DNA و هزینه مورد استفاده با همدیگر متفاوت هستند. یکی از این نشانگرها که در تحقیقات ژنتیکی استفاده می شود، نشانگرهای RAPD می باشند. این نشانگرها از مزایایی چون عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA برای طراحی و ساخت آغازگرها و امکان بررسی همزمان چندین جایگاه در ژنوم نمونه ها بهره می برند (Naghavi *et al*., 2009). در سالیان اخیر از این نشانگرها برای تفکیک لاین های مقاوم و حساس نسبت به بیماری از یکدیگر استفاده شده است (Curticia *et al*., 2009). در این تحقیق به منظور تفکیک ارقام از نظر مقاومت و یا حساسیت نسبت به *M. graminicola* از 7 نشانگر RAPD استفاده گردید در بین آغازگرهای استفاده شده تنها آغازگر OPH 20 یک باند پلی مورفیک در ناحیه تقریبا 1200bp ایجاد نمود که این باند در ارقام حساس دیده نشد (شکل 1).

L CS3 CS2 CS1 CR3 CR2 CR1



شکل 1- محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز روی ژل آگارز 1/5 درصد.
CR= رقم مقاوم، CS= رقم حساس و L-100bp ladder

این نتایج مشابه نتایجی بود که قبلا با لاین های دی هاپلوئید نیز بدست آمده است (Curticia *et al*., 2009). بنابراین به نظر می رسد که از این آغازگر می توان در تفکیک ارقام مقاوم و حساس نسبت به *M. graminicola* استفاده نمود. اما نتایج با کاربرد ارقام مقاوم بیشتر و همچنین ارقام گندم تتراپلوئید مورد تایید تر خواهد بود. بنابراین نشانگرهای RAPD، نشانگرهای بارزی هستند که می توانند به یک ژن مقاومت لینک شوند به طوریکه در ارقام مقاوم با ایجاد یک باند پلی مورفیک که در ارقام حساس دیده نمی شود، بتوان ارقام را از هم تفکیک نمود.

References

1. Adhikari T B, Anderson J M and Goodwin S B. 2003. Identification and molecular mapping of a gene in wheat conferring resistance to *Mycosphaerella graminicola*. Phytopathology 93: 1158–1164.
2. Botez C, Pamfil D, Curticiu D, Cota L and Saulescu N N. 2009. Marker assisted selection for *Septoria tritici* resistance in wheat dihaploid lines. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 37: 253–255.
3. Cowger C, Hoffer M and Mundt C. 2000. Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. Plant Pathology 49: 445–451.
4. Curticiu D, Balazs E, Briciu D, Briciu C, Taoutaou A, Pop T, Ganea S, Cota L and Botez C. 2009. RAPD and SSR marker selection for some dihaploid wheat lines for *Septoria tritici* resistance. Journal of Horticulture, Foresting and Biotechnology 13: 114–117.
5. Dadreazaei ST, Minasian V, Torabi M, Ayeneh GA. 2003. Effect of *Septoria tritici* infection at different growth stages on yield and yield components of three wheat cultivars. Seed and Plant Improvement Jouranal 19:101–116.
6. Eriksen L, Borum F and Jahoor A. 2003. Inheritance and localisation of resistance to *Mycosphaerella graminicola* causing *Septoria tritici* blotch and plant height in the wheat (*Triticum aestivum* L.) genome with DNA markers. TAG Theoretical and Applied Genetics 107: 515–527.
7. Eyal Z, Scharen A, Huffman M and Prescott J. 1985. Global insights into virulence frequencies of *Mycosphaerella graminicola*. Phytopathology 75: 1456–1462.
8. Eyal Z, Scharen A, Prescott J and Van Ginkel M. 1987. The *Septoria* diseases of wheat: concepts and methods of disease management. International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT), Mexico: Texcoco. 46 p.
9. Eyal Z. 1981. Integrated control of *Septoria* diseases of wheat. Plant Disease 65: 763–768.
10. Hameed A, Malik SA, Iqbal N, Arshad R and Farooq S. 2004. A rapid method for isolating high yield and quality DNA from leaves, roots and coleptile of wheat (*Triticum aestivum*) suitable for apoptotic and other molecular studies. International Journal of Agriculture and Biology 2: 383–387.
11. Kia S and Torabi M. 2008. Effects of infection with *Septoria* leaf blotch (*Septoria tritici* Rob. ex Desm.) at different growth stages on yield and yield components of wheat cultivars in Gorgan. Seed and Plant Improvement Journal 24: 237–250.
12. King J, Cook R and Melville S. 1983. A review of *Septoria* diseases of wheat and barley. Annals of applied biology 103: 345–373.
13. Naghavi MR, Ghareyazie B and Hosseini Slakade G. 2009. Molecular Markers. 3rd edition. Tehran: Tehran University Publication. 340 p.
14. Quaedvlieg W, Kema G, Groenewald J, Verkley G, Seifbarghi S, Razavi M, Gohari A M, Mehrabi R and Crous P. 2011. *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 26: 57.
15. Simón M, Ayala F, Cordo C, Röder M and Börner A. 2004. Molecular mapping of quantitative trait loci determining resistance to *Septoria tritici* blotch caused by *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Euphytica 138: 41–48.
16. Somasco O, Qualset C and Gilchrist D. 1996. Single - gene resistance to *Septoria tritici* blotch in the spring wheat cultivar 'Tadinia'. Plant Breeding 115: 261–267.

17. Tabib Ghaffary SM, Faris JD, Friesen TL, Visser RGF, Van Der Lee TAJ, Robert O and Kema GHJ. 2012. New broad-spectrum resistance to *Septoria tritici* blotch derived from synthetic hexaploid wheat. TAG Theoretical and Applied Genetics 124: 125–142.
18. Tabib Ghaffary SM, Robert O, Laurent V, Lonnet P, Margalé E, Van Der Lee TAJ, Visser RGF and Kema GHJ. 2011. Genetic analysis of resistance to *Septoria tritici* blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache. TAG Theoretical and Applied Genetics123: 741–754.

Using RAPD molecular markers to differentiate resistant and susceptible cultivars to *Mycosphaerella graminicola*

M.R. Eslahi*[1]

Abstract

Septoria leaf blotch caused by *Mycosphaerella graminicola* is one of the most important diseases of wheat that can become epidemic and cause severe yield loss in favorable conditions. There are different methods to control this disease but using resistant cultivars is a safe and suitable way for its control. Traditional evaluation of disease resistance is very time consuming. In recent years, molecular markers such as RAPD have been developed for quick evaluation of resistant cultivars. In this study seven RAPD molecular markers were separately assayed for ability to differentiate three resistant and three sensitive cultivars to *Septoria* leaf blotch. The results showed that only OPH20 marker created one sharp polymorphic band in 1200bp region in the resistant cultivars while this band was not observed in the sensitive cultivars. So considering the abundance of cultivars, this molecular marker may be suggested for use to differentiate cultivars against *Mycosphaerella graminicola* in future research projects.

Keywords: Septoria leaf blotch, wheat, OPH20

[1]- Assistant Professor, Department of Plant Protection research, Agricultural and Natural Resources Research Center of Khozestan Province, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author: mr_eslahi@yahoo.com