بسم الله الرحمن الرحیم

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **محبوبه هراتیان** دانشجوی رشته **بیماری شناسی گیاهی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۶** مقطع **دکتری** دانشکده **کشاورزی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

آئین‌نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **بیماری شناسی** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر ناصر صفایی** و **دکتر بهرام شریف نبی** و مشاوره **دکتر سید باقر محمودی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰% بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **محبوبه هراتیان** دانشجوی رشته **بیماری شناسی گیاهی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: محبوبه هراتیان

تاریخ و امضا

دانشکده کشاورزی

رساله دکتری بیماری شناسی گیاهی

گرایش قارچ شناسی

عنوان رساله

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت های گروه آناستوموزی چهار (AG-4) *Rhizoctonia solani* در ایران

نگارش:

محبوبه هراتیان

اساتید راهنما:

دکتر ناصر صفایی، دکتر بهرام شریف نبی

استاد مشاور:

دکتر سید باقر محمودی

تیر ۱۳۹۱

چکیده

گروه آناستوموزی چهار قارچ *Rhizoctonia solani* بیمارگر مهم و عامل بیماری مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه در بسیاری از گیاهان می باشد. تاکنون هیچ گونه اطلاعاتی در ارتباط با نقش ساختار ژنتیکی و مرحله جنسی در اپیدمیولوژی AG-4 وجود ندارد. لذا این تحقیق با اهداف تعیین تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت های *R. solani* AG-4 با استفاده از آغازگرهای طراحی شده توسط زالا و همکاران (۲۰۰۸) و فروکو و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. صد و نود وهفت جدایه از مزارع مختلف از شش استان ایران (آذربایجان غربی، اصفهان، البرز، خراسان، لرستان و همدان) جمع آوری و ساختار ژنتیکی این قارچ برای بررسی تمایز جغرافیایی با استفاده از هفت جایگاه ریزماهواره ای ارزیابی شد. اغلب ژنوتیپ های چندجایگاهی مختص هر جمعیت بوده و تعداد کمی از ژنوتیپ های چندجایگاهی مشترک بود. بین جمعیت های مختلف جریان ژنی بالا تا متوسط، بر اساس شاخص تثبیت (F_{ST}) متوسط تا بالا در مقایسه جفت جمعیت ها مشاهده شد. تنوع ژنوتیپی بالا، نسبت بخش کلونال متوسط و وجود ژنوتیپ های اختصاصی جمعیت مطابق با سیستم تولید مثلی مخلوط برای جمعیت های مورد بررسی بود. احتمال داده می شود که خروج از موازنه هاردی وینبرگ، عدم موازنه گامتی و افزایش معنی دار هموزیگوت ها در نیمی از جایگاهها یا بیش از نیمی از جایگاهها به دلیل حضور آلل های ثبت نشده و اثر والاند باشد. تاکنون نشانگر ریزماهواره ای برای بررسی تنوع ژنتیکی در این بیمارگر طراحی نشده است. در این پژوهش ۱۱ جایگاه ریزماهواره ای چندشکل از *R. solani* AG-4 با استفاده از روش غنی سازی طراحی گردید. تمامی این جایگاهها برای ارزیابی تنوع ژنی در جمعیت آلوده کننده لوبیا سبز در استان اصفهان مورد استفاده قرار گرفت. تعداد کل آلل ها از سه تا هفت آلل متغیر بود. میانگین شاخص PIC برای ۱۱ جایگاه ۰/۶۵ بود که نشان داد تمام جایگاههای ریزماهواره ای چندشکلی بالایی دارند. به منظور توالی یابی ناحیه ITS-rDNA با استفاده از آغازگرهای ITS4/ITS5 ، ۱۳ جدایه نماینده از شش میزبان متفاوت با ژنوتیپ چندجایگاهی ریزماهواره ای مختلف انتخاب گردید. درخت حاصل از تجزیه و تحلیل این توالی ها ، جدایه های مورد بررسی را به سه زیرگروه فیلوژنتیکی HGI ، HGII و HGIII تفکیک نمود. از میان ۱۳ جدایه مذکور، شش جدایه به طور تصادفی از شش میزبان مختلف برای آزمون بیماریزایی تقاطعی انتخاب شد. تمام جدایه ها قادر به بیماریزایی در تمام میزبانهای مورد آزمون، با شدت بالاتر روی میزبان اصلی خود بودند که با اختصاصی شدن میزبان مطابقت داشت. به نظر می رسد که تمایز جدایه ها در سطح ITS-rDNA با شدت بیماریزایی آنها ارتباط نداشته باشد. این پژوهش اولین تجزیه و تحلیل ژنتیک جمعیت *R. solani* AG-4 عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه می باشد. همچنین اولین گزارش از طراحی جایگاههای ریزماهواره ای برای AG-4 می باشد که می تواند ابزار مفیدی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت *R. solani* AG-4 فراهم کند.

کلمات کلیدی: ریزوکتونیا، گروه آناستوموزی، ساختار جمعیت، ریزماهواره، بیماریزایی تقاطعی

فهرست مطالب

عنوان .....صفحه
فهرست مطالب .....أ
فهرست شکل ها .....ز
فهرست جدول ها .....ح

فصل اول: مقدمه ۱
مقدمه ۲
فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده ۶
۲-۱- بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه ریزوکتونیایی ۷
۲-۱-۱- عامل بیماریزا و علائم بیماری ۷
۲-۱-۲- توسعه بیماری ۷
۲-۱-۳- چرخه زندگی و فرآیند آلودگی ۸
۲-۲- گونه کمپلکس *R. solani* ۹
۲-۳- گروههای آناستوموزی (Anastomosis Groups= AG) ۱۴
۲-۳-۱- واکنشهای ناسازگاری رویشی و جنسی ۱۲
۲-۴-AG-4 و زیرگروههای مرتبط با آن ۱۴
۲-۵- بررسی روابط تکاملی در گروههای آناستوموزی مختلف بر اساس rDNA و توالی یابی ناحیه ITS ۱۴
۲-۶-ساختار ژنتیکی و ژنتیک جمعیت ۱۶
۲-۷- عوامل مؤثر در ژنتیک جمعیت ۱۸
۲-۷-۱- جهش ۱۸
۲-۷-۲-جریان ژنی و ژنوتیپی ۱۹
۲-۷-۳- نوترکیبی و تولیدمثل جنسی ۲۱
۲-۷-۴- سیستم آمیزشی ۲۲
۲-۷-۵-رانش ژنتیکی ۲۴
۲-۷-۶- تنگنا ۲۴
۲-۷-۷- انتخاب طبیعی ۲۴

فهرست مطالب (ادامه)

عنوان .....صفحه
۲-۸- انتخاب نشانگر ۲۵
۲-۹- ریزماهواره ها ۲۶
۲-۹-۱- انواع ریزماهواره ها ۲۶
۲-۹-۲- پراکندگی ریزماهواره ها در ژنوم ۲۷
۲-۹-۳- تکامل ریزماهواره ها ۲۸
۲-۹- ۴- مدل های جهش ریزماهواره ها ۳۱
۲-۱۰- شناسایی و جداسازی ریزماهواره ها ۳۲
۲-۱۱- روش های جداسازی ریزماهواره ها ۳۳
۲-۱۲- جداسازی ریزماهواره ها از طریق تهیه کتابخانه ۳۴
۲-۱۲-۱- کتابخانه های غنی نشده ۳۴
۲-۱۲-۲- کتابخانه های غنی شده ۳۴
۲-۱۳-روش های جداسازی ریزماهواره بدون تهیه کتابخانه ۳۷
۲-۱۴- ژنتیک جمعیت گروههای مختلف آناستوموزی در ***R. solani*** ۳۷
فصل سوم: مواد و روش ها ۴۰
۳-۱- جمع آوری نمونه ۴۱
۳-۱-۱- جداسازی قارچ ریزوکتونیا از غلاف، طوقه و ریشه ۳۶
۳-۱-۲- خالص سازی جدایه ها ۳۷
۳-۱-۳- شناسایی جدایه های متعلق به AG-4 ..... ۳۷
۳-۱-۴- نگهداری جدایه ها ۴۲
۳-۲- استخراج DNA ژنومی ۴۲
۳-۲-۱- تولید انبوه میسلیوم ۴۷
۳-۲-۲- استخراج ژنومی به روش موری و تامپسون ۴۷
۳-۲-۳- تعیین کیفیت و کمیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۴۸

فهرست مطالب (ادامه)

عنوان .....صفحه
۳-۳- بررسی ساختار جمعیت با استفاده از آغازگرهای SSR از پیش طراحی شده ۴۹
۳-۳-۱-بهینه سازی شرایط واکنش PCR برای جایگاههای ریزماهواره ای ۴۹
۳-۳-۲- بررسی چندشکلی آغازگرهای SSR از پیش طراحی شده ۵۰
۳-۳-۳- تجزیه و تحلیل داده ها.....۵۲
۳-۳-۴-تنوع ژنوتیپی.....۵۲
۳-۳- ۵- تنوع ژنی و تمایز جمعیت ها.....۵۳
۳-۳-۶- آزمون توارن هاردی وینبرگ و توازن گامتی.....۵۴
۳-۳-۷- پارامترهای جمعیت نگاری.....۵۴
۳-۴- شناسایی و جداسازی توالی های ریزماهواره ای.....۵۵
۳-۴-۱- انتخاب ترکیب مناسب آنزیمی.....۵۵
۳-۴- ۲- برش اصلی DNA ژنومی.....۵۶
۳-۴-۳-حذف انتهای چسبنده قطعات.....۵۸
۳-۴-۴-حذف گروههای فسفریل از انتهای' ۵ قطعات.....۵۸
۳-۴-۵- اتصال لینکر **SNX** به قطعات DNA برش خورده و دفسفریله شده.....۵۹
۳-۴-۶- ترمیم شکاف بین لینکر SNX و قطعات DNA.....۶۱
۳-۴-۷- بررسی کیفیت انجام واکنش اتصال.....۶۲
۳-۴-۸- غنی سازی جهت افزایش فراوانی توالی های تکراری در کتابخانه ژنومی ناقص.....۶۳
۳-۴-۹- آماده سازی ذرات مغناطیسی پوشیده شده شده با استرپتاویدین.....۶۴
۳-۴-۱۰- تکثیر قطعات حاصل از دو رگ سازی.....۶۶
۳-۴-۱۱- برش آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Nhe*I برای تولید قطعات با انتهای چسبنده.....۶۷
۳-۴-۱۲- استخراج پلاسمید pBluescript II SK از باکتری ***E. coli***.....۶۸
۳-۴-۱۳- برش پلاسمید pBluescript آنزیم *Xba*I.....۷۰
۳-۴-۱۴- حذف گروههای فسفریل از انتهای '۵ قطعات پلاسمیدی برش خورده.....۷۱
۳-۴-۱۵- اتصال DNA غنی سازی شده به پلاسمید برش خورده.....۷۱

فهرست مطالب (ادامه)

عنوان ..... صفحه
۳-۴-۱۶- تهیه سلولهای مستعد ***E. coli*** ۷۲
۳-۴-۱۷- انتقال پلاسمید حاوی قطعه مورد نظر به باکتری های مستعد شده ***E. coli*** ۷۳
۳-۴-۱۸- غربال سازی همسانه ها با استفاده از PCR ۷۴
۳-۴-۱۹- کشت باکتری ها جهت توالی یابی ۷۵
۳-۴-۲۰- نگهداری طولانی مدت همسانه ها ۷۵
۳-۵- طراحی آغازگرهای SSR به منظور تکثیر نواحی ریزماهواره ۷۶
۳-۵-۱- طراحی آغازگرهای ریزماهواره ای ۷۷
۳-۵-۲- بهینه سازی شرایط واکنش PCR برای آغازگرهای طراحی شده ۷۷
۳-۵-۳- بررسی چندشکلی آغازگرهای طراحی شده ۷۷
۳-۵-۴- تجزیه و تحلیل داده ها ۷۸
۳-۶- بررسی ناحیه ITS- rDNA در جدایه های نماینده خالص شده از میزبانهای مختلف ۷۸
۳-۶-۱- تکثیر ناحیه ITS-rDNA ۷۸
۳-۶-۲- توالی یابی و تجزیه و تحلیل ناحیه ITS-rDNA ۷۸
۳-۷- مقایسه شدت بیماریزایی جدایه های خالص شده ۷۹
۳-۷-۱- آزمون کلاسیک بیماریزایی تقاطعی ۷۹
۳-۷-۲- محاسبات آماری ۸۰
فصل چهارم: نتایج و بحث ۸۱
۴-۱- جمع آوری نمونه ۸۲
۴-۱-۲- جداسازی و خالص سازی جدایه ها ۸۲
۴-۱-۳- شناسایی جدایه های متعلق به AG-4 ..... ۸۲
۴-۲- استخراج DNA ژنومی ۸۳
۴-۳- بررسی ساختار جمعیت با استفاده از آغازگرهای SSR از پیش طراحی شده ۸۳
۴-۳-۱- بهینه سازی تکثیر قطعات حاصل از آغازگرهای SSR ۸۳

فهرست مطالب (ادامه)

عنوان ..... صفحه
۴-۳-۲- بررسی چند شکلی آغازگرهای SSR از پیش طراحی شده ۸۴
۴-۴- تجزیه وتحلیل داده ها ۸۶
۴-۴-۱- تنوع ژنوتیپی ۸۶
۴-۴-۲- تنوع ژنی ۸۹
۴-۴-۳- تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی ۹۱
۴-۴-۴- آزمون توازن هاردی وینبرگ و توازن گامتی ۹۶
۴-۵-۴- پارامترهای جمعیت نگاری ۱۰۲
۴-۵- شناسایی و جداسازی توالی های ریزماهواره ای ۱۰۶
۴-۵-۱- برش DNA ژنومی ۱۰۶
۴-۵-۲- حذف انتهای چسبنده قطعات حاصل از برش DNA ژنومی با آنزیم ***Nhe*I** ۱۰۷
۴-۵-۳- حذف گروههای فسفریل از انتهای' ۵ قطعات DNA ۱۰۷
۴-۵-۴- اتصال لینکر به قطعات دفسفریله شده ۱۰۸
۴-۵-۵- ترمیم شکاف موجود بین لینکر SNX و قطعات DNA ۱۰۹
۴-۵-۶- بررسی کیفیت واکنش اتصال ۱۰۹
۴-۵-۷- غنی سازی قطعات دارای توالی های ریزماهواره ای با استفاده از تکنیک دو رگ سازی ۱۱۰
۴-۵-۸- تکثیر محصولات غنی سازی شده در PCR ۱۱۱
۴-۵-۹- برش محصول PCR با آنزیم ***Nhe*I** برای ورود به پلاسمید ۱۱۲
۴-۵-۱۰- استخراج پلاسمید pBluescript II SK و برش آن با آنزیم *Xba*I ۱۱۲
۴-۵-۱۱- حذف گروههای فسفریل از دو انتهای' ۵ قطعات پلاسمیدی برش یافته ۱۱۳
۴-۵-۱۲- انتقال پلاسمید حاوی قطعه مورد نظر به باکتری مستعد ۱۱۴
۴-۵-۱۳- غربال سازی همسانه ها برای توالی یابی با استفاده از Colony PCR ۱۱۴
۴-۵-۱۴- کشت باکتری ها جهت توالی یابی ۱۱۵
۴-۶- توالی یابی و طراحی آغازگرهای SSR مناسب به منظور تکثیر نواحی ریزماهواره ۱۱۶
۴-۶-۱- بهینه سازی تکثیر قطعات خاصل از آغازگرهای **SSR** طراحی شده ۱۲۲
۴-۶-۲- بررسی چندشکلی آغازگرهای ریزماهواره ای طراحی شده ۱۲۶

۴-۶-۳- تجزیه و تحلیل داده ها ۱۲۶
۴-۷- توالی یابی و تجزیه وتحلیل ناحیه ITS-rDNA ۱۳۰
۴-۸- بررسی شدت بیماریزایی تقاطعی جدایه ها روی میزبانهای مختلف ۱۳۴
۴-۸-۱- بررسی شدت بیماریزایی جدایه های مختلف مورد آزمون روی هر میزبان ۱۳۴
۴-۸-۲- مقایسه شدت بیماریزایی هر جدایه در میزبانهای مورد آزمون ۱۳۸
۴-۸-۲- مقایسه سه زمان یادداشت برداری پس از مایه زنی ۱۴۰
۴-۹- نتیجه گیری کلی و پیشنهادها ۱۴۲
۴-۹-۱- تجزیه و تحلیل تمایز ژنتیکی جمعیت ها ۱۴۲
۴-۹-۲- بررسی احتمال وقوع نوترکیبی و روش تولید مثل ۱۴۳
۴-۹-۳- شناسایی، جداسازی و طراحی آغازگرهای ریزماهواره ای برای *R. solani* AG-4 ۱۴۴
۴-۹-۴- توالی یابی ناحیه ITS- rDNA ۱۴۴
۴-۹-۵- مقایسه شدت بیماریزایی تقاطعی ۱۴۵
منابع ۱۴۶

فهرست شکل ها

عنوان ..... صفحه
شکل۲-۱- منابع تغییرات ژنی و ژنوتیپی در جمعیت های عامل بیماریزا ۱۸
شکل ۲-۲- کراسینگ آور نابرابر بین کروموزوم های همولوگ ۲۹
شکل ۲-۳- لغزش و سرخوردگی در طی همانندسازی ۳۰
شکل ۴-۱- DNA استخراج شده از جدایه های مختلف متعلق به گروه AG-4 ..... ۸۳
شکل ۴-۲- الگوهای باندی حاصل از تکثیر آغازگر TC-06 در جدایه های *R. solani* متعلق به AG-4 ..... ۸۵
شکل ۴-۳- برش DNA ژنومی با چهار آنزیم *Xmn*I، *Nhe*I، *Rsa*I و *Hae*III ۱۰۷
شکل ۴-۴- تأیید حفظ قطعات DNA در محدوده ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ نوکلئوتیدی بعد از واکنش دفسفریلاسیون ۱۰۸
شکل ۴-۵- لینکر SNX و جایگاه های برشی تعبیه شده در آن ۱۰۹
شکل ۴-۶- بررسی واکنش اتصال با استفاده از واکنش PCR ۱۱۰
شکل ۴-۷- بررسی کیفیت غنی سازی قطعات DNA واجد ریزماهواره ۱۱۱
شکل ۴-۸- برش قطعات DNA با آنزیم *Nhe*I ۱۱۲
شکل ۴-۹- بررسی کیفیت استخراج پلاسمید pBluescript و برش آن با آنزیم *Xba*I ۱۱۳
شکل ۴-۱۰- نمایی از توالی پلاسمید pBluescript SK و مکان های برشی بر روی آن ۱۱۵
شکل ۴-۱۱- غربال سازی همسانه ها با تکنیک Colony PCR ۱۱۵
شکل ۴-۱۲- نمایی از کروماتوگرام حاصل از همسانه های توالی یابی شده ۱۱۶
شکل ۴-۱۴- الگوهای باندی حاصل از تکثیر آغازگر **AG-4_ L33 F/R** در جدایه های *Rhizoctonia solani* AG-4 ..... ۱۲۷
شکل ۴-۱۴- الگوهای باندی حاصل از تکثیر جفت آغازگر **AG-4_ L12F/R** در جدایه های ***R. solani*** ۱۲۷
شکل ۴- ۱۵- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس داده های توالی **ITS-rDNA** ۱۳۱

فهرست جدول ها

عنوان ..... صفحه

جدول ۳-۱- اسامی و مشخصات جدایه های مورد بررسی در جمعیت ALB جمع آوری شده از استان البرز ۴۳

جدول۳-۲- اسامی و مشخصات جدایه های جمعیت AZAR جمع آوری شده از استان آذربایجان غربی ۴۳

جدول۳-۳- اسامی و مشخصات جدایه های مورد بررسی در جمعیت HAM جمع آوری شده از استان همدان ۴۴

جدول۳-۴- اسامی و مشخصات جدایه های مورد بررسی در جمعیت ISF جمع آوری شده از استان اصفهان ۴۴

جدول۳-۵- اسامی و مشخصات جدایه های مورد بررسی در جمعیت KHO جمع آوری شده از استان خراسان ۴۶

جدول۳-۶- اسامی و مشخصات جدایه های مورد بررسی در جمعیت LOR جمع آوری شده از استان لرستان ۴۶

جدول۳-۷- لیست آغازگرهای مورد استفاده در بررسی ساختار جمعیت ۴۹

جدول ۳-۸- مقادیر و مواد مورد نیاز برای واکنش PCR ۵۰

جدول۳-۹- مواد لازم جهت ژل پلی آکریلامید ۱۶% غیرواسرشته ساز ۵۱

جدول ۳-۱۰- مقادیر مورد نیاز برای واکنش برش اصلی DNA ژنومی ۵۶

جدول۳-۱۱- ترکیب و مقدار مواد مورد نیاز برای حذف انتهای چسبنده قطعات ۵۸

جدول ۳-۱۲- مقدار و مواد مورد نیاز برای واکنش حذف گروه های فسفریل انتهای '۵ قطعات DNA ۵۹

جدول ۳-۱۳- مواد مورد نیاز برای واکنش اتصال لینکر به قطعات DNA ۶۱

جدول ۳-۱۴- مواد لازم جهت ترمیم اتصال لینکر SNX به قطعات DNA ۶۱

جدول ۳-۱۵- مواد و مقادیر مورد نیاز در واکنش PCR جهت بررسی واکنش اتصال ۶۲

جدول ۳-۱۶- ترکیب مواد در واکنش اتصال کاوشگرها به قطعات DNA ۶۳

جدول ۳-۱۷- مقادیر مواد لازم در PCR جهت بررسی و تکثیر قطعات حاصل از دورگ سازی ۶۶

جدول ۳-۱۸- مواد مورد نیاز جهت برش قطعات DNA غنی سازی شده با آنزیم *Nhe*I ۶۷

جدول ۳-۱۹- ترکیب مواد و مقادیر در واکنش برش آنزیمی پلاسمید ۷۰

جدول ۳-۲۰- مواد مورد نیاز جهت دفسفریلاسیون پلاسمید برش یافته ۷۱

جدول ۳-۲۱- مواد مورد نیاز جهت اتصال قطعات DNA غنی سازی شده با پلاسمید برش خورده ۷۲

جدول ۳-۲۲- مواد و مقادیر مورد نیاز در Colony PCR ۷۵

جدول ۳-۲۳- مقادیر و مواد مورد نیاز برای واکنش PCR با آغازگرهای طراحی شده ۷۷

جدول ۴-۱- اندازه های کلی تنوع ژنوتیپی در شش جمعیت مختلف جغرافیایی *R. solani* AG-4.....۸۸
جدول ۴-۲- اندازه های تنوع ژنی و هتروزیگوسیتی در شش جمعیت مختلف جغرافیایی *R. solani* AG-4.....۹۰
جدول ۴-۳- توزیع مرتب شده [a]تنوع ژنی بین شش جمعیت مختلف جغرافیایی *R. solani* AG-4.....۹۱
جدول ۴-۴- اندازه تمایز جمعیت بین جمعیت های *R. solani* AG-4 بر اساس مقایسه شاخص F_{ST} و داده های تصحیح شده برای همسانی.....۹۳
جدول ۴-۵- نتایج آزمون موازنه هاردی وینبرگ و موازنه گامتی در شش جمعیت مختلف *R. solani* AG-4 .....۹۷
جدول ۴- ۶- نتایج ارزیابی تنگنا در شش جمعیت مختلف جغرافیایی *R. solani* AG-4 بر اساس آزمونهای Sign و Wilcoxon با استفاده از مدل SMM.....۱۰۳
جدول ۴- ۷نتایج ارزیابی تنگنا در شش جمعیت مختلف جغرافیایی AG-4 بر اساس آزمونهای Signو Wilcoxon با استفاده از مدل TPM.....۱۰۳
جدول ۴- ۸- بررسی کروماتوگرام حاصل از توالی یابی.....۱۱۷
جدول ۴-۹- فهرست جفت آغازگرهای طراحی شده به همراه دمای اتصال بهینه سازی شده برای هر یک از آن ها.....۱۲۲
جدول ۴-۱۰- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده های جفت آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق.....۱۲۸
جدول ۴- ۱۱- شباهت توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA در جدایه های مختلف *R. solani* AG-4.....۱۳۳
جدول ۴-۱۱ - نتایج تجزیه واریانس شدت بیماریزایی ناشی از شش جدایه از MLMG های مختلف روی شش میزبان مختلف در شرایط گلخانه.....۱۳۵
جدول ۴-۱۲ آمار توصیفی شدت بیماریزایی ناشی از شش جدایه از MLMG های مختلف روی شش میزبان مختلف در شرایط گلخانه بر اساس آزمون LSD.....۱۳۶

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

بیماری پوسیدگی ریشه ریزوکتونیایی که بوسیله قارچ خاکزاد *Rhizoctonia solani* Kuhn [(*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] ایجاد می شود یک بیماری جدی در سراسر جهان است. بسته به گروه آناستوموزی، *R. solani* می تواند میزبانهای مختلف را مورد حمله قرار دهد که از میان آنها گروه آناستوموزی AG-4 باعث پوسیدگی بذر، مرگ گیاهچه پس از جوانه زنی و پوسیدگی ریشه در محصولات مهم گیاهی مانند چغندرقند، لوبیا و غیره می گردد (شریف نبی و بنی هاشمی ۱۳۷۵، صفایی و همکاران ۱۳۷۸) و از اهمیت قابل توجهی برخوردار است.

اگرچه وضعیت تاکسونومیکی گروههای آناستوموزی هنوز مورد بحث است، اما AG-4 قبل از توصیف گروه آناستوموزی، به عنوان یک گونه مجزا توسط کتیلا (Kotila, 1929) و بعد ازآن توسط محققان دیگر (Sakasena and Vaartaj 1961; Talbot, 1970; Anderson, 1982; Ogoshi, 1987) معرفی شد. جدا شدن *R. solani* بر اساس توالی ITS-rDNA به گروههای آناستوموزی و زیر گروهها حاکی از وجود گروههای تکاملی مستقل در این گونه کمپلکس می باشد و به این ترتیب اساس مطالعه بیولوژی و ژنتیک جمعیت بوجود آمده است (Cubeta and Vilgalys, 1997). تکامل بیمارگر که نوعی تغییر ژنتیکی است به دلیل تغییرات محیطی در اکوسیستم های کشاورزی شامل استفاده از واریته های مقاوم، قارچکشها، آبیاری، گردش زراعی و فشار انتخاب اتفاق می افتد (Mc Doland, 1997). علاوه بر

توالی ITS -rDNA، بررسی ساختار ژنتیکی به عنوان اولین مرحله در مطالعه ژنتیک جمعیت نیز تاریخچه و پتانسیل تکاملی عامل بیمارگر را نشان می دهد (Mc Doland, 1997). لذا تجزیه و تحلیل تنوع ژنی و ژنوتیپی در بررسی عوامل مؤثر در تکامل جمعیت های مختلف یک گروه آناستوموزی، از اهمیت به سزایی برخوردار می باشد. استفاده از ریز ماهواره ها به عنوان ابزار قوی برای تمایز بین جمعیت های جغرافیایی در بررسی ژنتیک جمعیت نتایج معنی داری نشان داده است. اگرچه توالی های ریز ماهواره ای در قارچها با فراوانی نسبتاً پائین وجود دارند، ولی چندشکلی داخل گونه ای و جمعیت و رتبه دهی آسان منجر به کاربرد رو به افزایش آنها شده است. تاکنون ۱۰جایگاه ریز ماهواره ای چند شکل از AG-1-IA توسط زالا و همکاران (Zala *et al.* 2008) برای تعیین ژنوتیپ جمعیتهای AG-1 IA و ۱۴ آغازگر ریزماهواره ای برای AG-3 شناسایی و طراحی شده است. اگرچه برخی ابهامات در زمینه بیولوژی و ساختار ژنتیکی *R. solani* روشن شده است، اما همچنان سؤالات پایه در ارتباط با ناهمگونی ژنتیکی، ماهیت جمعیت ها و افراد در بسیاری از گروههای آناستوموزی از جمله AG-4 بدون پاسخ مانده است. لذا این تحقیق با اهداف زیر روی گروه AG-4 انجام می شود.

۱- بررسی ساختار ژنتیکی درون و بین جمعیتی گروه AG-4 با استفاده از آغازگرهای طراحی شده توسط زالا و همکاران (Zala *et al.*, 2008) و فروکو و همکاران (Ferruchu *et al.*, 2009)

۲- شناسایی، جداسازی و معرفی آغازگرهای ریزماهواره ای در *R. solani* AG-4

۳- تعیین توالی ناحیه ITS-rDNA جدایه های نماینده از میزبانهای متفاوت با گروه ژنوتیپی چندجایگاهی ریزماهواره ای (MLMG) [1]مختلف

۴- انجام آزمون های مایه زنی تقاطعی با استفاده از جدایه های نماینده از میزبانهای مختلف با MLMG متفاوت به منظور بررسی شدت بیماریزایی هر جدایه روی میزبان اصلی خود و میزبان‌های دیگر

۵- مقایسه نتایج حاصل از بررسی ژنوتیپی جدایه ها با آغازگرهای ریزماهواره ای، ITS- rDNA و شدت بیماریزایی

سئوال مطرح شده در ارتباط با هدف اول این پژوهش این است که آیا جمعیت های جغرافیایی *R. solani* AG-4 در ایران از یکدیگر متمایز می شوند؟ فرضیه ما در پاسخ به این سئوال تمایز ژنتیکی این جمعیت ها و عدم جریان ژنی بین جمعیت های مختلف مورد بررسی می باشد. اشاره به این نکته ضروری است که با توجه به آنچه در منابع ذکر شده است (Sneh *et al.*, 1996) این تحقیق با فرض عدم اختصاصی شدن جمعیت های میزبانی مختلف انجام می شود. در این بخش از تحقیق، با استفاده از تجزیه و تحلیل داده های حاصل از نشانگرهای ریزماهواره ای احتمال وقوع نوترکیبی و نوع روش تولید مثل در این بیمارگر مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرد. محققان نشان داده اند که AG-4 دارای تولیدمثل جنسی و سیستم آمیزشی از نوع هتروتال می باشد. اگرچه ممکن است بازیدیوسپورها در بیماریهای گیاهچه و ریشه ریزوکتونیایی اهمیت اپیدمیولوژیکی در طول یک فصل نداشته باشند اما حتی وقوع مقدار اندک نوترکیبی در *R. solani* می تواند روی ساختار جمعیت این بیمارگر تأثیر معنی داری داشته باشند (Milgroom, 1996). از آنجائیکه یک ارگانیسم هتروتال در حال نوترکیبی با شاخص هایی مانند وجود تنوع ژنوتیپی بالا، مقدار پائین بخش کلونال، نشانگرهای خنثی و درموازنه HW و موازنه گامتی مشخص می گردد (Mc Donald and Linde 2002; Milgroom, 1996)، لذا در این پژوهش، شاخص هایی مانند تنوع ژنی و ژنوتیپی محاسبه و آزمون موازنه هاردی وینبرگ (HWE) [۲] و موازنه گامتی (GE) [۳] در جمعیت‌های مورد بررسی انجام می شود.

---

[1]- Multi Locus Microsatellite Genotype
1- Hardy Weinberg Equilibrium
[2]- Gametic Equilibrium

در بخش دوم این پژوهش با توجه عدم شناسایی و طراحی آغازگرهای ریزماهواره ای چندشکل در *R. solani* AG-4 از یک جدایه نماینده از این گروه با استفاده از روش تهیه کتابخانه ژنومی غنی شده اقدام به جداسازی و شناسایی جایگاههای ریزماهواره ای می شود. آغازگرهای ریزماهواره ای چندشکل معرفی شده در این پژوهش می توانند در آینده به عنوان ابزار مفیدی در بررسی ژنتیکی جمعیت های مختلف و روابط فیلوژنتیکی در این گروه مورد استفاده قرار گیرند.

در ادامه این تحقیق جدایه های نماینده از میزبانهای مختلف بر اساس ژنوتیپ چندجایگاهی ریزماهواره ای انتخاب می شوند. سئوال این است که آیا این جدایه ها در توالی ITS-rDNA تفاوت دارند؟ فرضیه ما در این بخش تمایز ژنتیکی جدایه های منتخب بر اساس ناحیه ITS-rDNA می باشد.

در بخش نهایی جدایه های نماینده *R. solani* گروه AG-4 خالص سازی شده از میزبان های مختلف از لحاظ بیماریزایی در آزمون مایه زنی تقاطعی مورد مقایسه قرار می گیرند. سئوال این است که آیا جدایه های مورد آزمون در شدت بیماریزایی روی میزبان خود در مقایسه با دیگر میزبانها تفاوت دارند؟ در پاسخ به این سئوال فرض می شود که جدایه های مختلف میزبانی در آزمون مایه زنی تقاطعی شدت بیماریزایی بالاتری روی میزبان اصلی خود نشان می دهند.

فصل دوم

مروری بر مطالعات انجام شده