

پراکنش و فراوانی ژن‌های تولید کننده توکسین (*ToxB* و *ToxA*) در جمعیت‌های قارچ
Pyrenophora tritici-repentis عامل بیماری لکه خرمایی گندم در شمال ایران

**Distribution and Frequency to Toxin Producing Genes (*ToxA* and *ToxB*) in
Populations of *Pyrenophora tritici-repentis*, the Causal Agent of Wheat
Tan Spot in North of Iran**

مهناز رجب پور^۱، رحیم مهربانی^۲، محمد ترابی^۳ و امین ابراهیمی^۴

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین - پیشوا، دانشکده
کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین

۲ و ۴- به ترتیب استادیار و محقق موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۷

چکیده

رجب پور، م.، مهربانی، ر.، ترابی، م. و ابراهیمی، ا. ۱۳۹۳. پراکنش و فراوانی ژن‌های تولید کننده توکسین (*ToxB* و *ToxA*) در جمعیت‌های قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* عامل بیماری لکه خرمایی گندم در شمال ایران. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰: ۸۳-۷۳.

بیماری لکه خرمایی گندم به دلیل حساسیت بالای اکثر ارقام گندم، در مناطق شمالی کشور به شدت در حال گسترش است. استفاده موفق از ارقام مقاوم به این بیماری منوط به وجود اطلاعات کافی از ساختار ژنتیکی عامل بیماری و به ویژه وجود و عدم وجود فاکتورهای بیماری‌زایی در داخل جمعیت قارچ است. تحقیق حاضر اولین گزارش در زمینه پراکنش و فراوانی ژن‌های تولید کننده توکسین‌های *ToxB* و *ToxA* در جمعیت‌های قارچ عامل بیماری در ایران است. در این تحقیق نمونه‌های برگی آلوده گندم نان دارای علائم لکه خرمایی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از جداسازی، خالص‌سازی و تکثیر عامل بیماری، DNA جدایه‌ها استخراج شد. نمونه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی ژن‌های تولید کننده توکسین‌های اختصاصی (*ToxB* و *ToxA*) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ۸۶٪ از جدایه‌ها دارای ژن *ToxA*، ۷۷٪ از جدایه‌ها دارای ژن *ToxB* و ۶۴٪ از جدایه‌ها دارای هر دو فاکتور بیماری‌زایی بودند. بر اساس این نتایج اکثر جدایه‌های قارچ عامل لکه خرمایی در شمال ایران دارای ژن‌های *ToxA* و *ToxB* بوده و پراکنش آن‌ها در جدایه‌های مورد مطالعه منحصر به موقعیت‌های جغرافیایی خاصی نبود. این بررسی نشان داد علائم تکروز و کلروز ایجاد شده در روی ارقام گندم را می‌توان به فراوانی بالای این دو ژن نسبت داد.

واژه‌های کلیدی: گندم، بیماری لکه خرمایی، فاکتورهای بیماری‌زایی، ژن‌های تولید کننده توکسین، *Pyrenophora tritici-repentis*

مقدمه

(Postnifova and Khasanov, 1998). این

بیماری از آن نظر اهمیت فراوانی دارد که دقیقاً در مناطقی که بیماری زنگ زرد و قهوه‌ای به دلیل استفاده از ارقام مقاوم کنترل شده، به شدت شایع شده است (Di Zinno *et al.*, 1998؛ Francl, 1998). در طول بیست سال گذشته تقریباً همه ساله این بیماری در مزارع استان‌های گلستان و مازندران وجود داشته و هر سه تا چهار سال یک بار به حالت همه‌گیری و با شدت بالا ظاهر گردیده است (ترابی، گزارش‌های منتشر نشده). بررسی‌های اخیر نشان داد این بیماری در شرایط اپیدمی و در ارقام حساس بین ۵ تا ۵۰ درصد خسارت وارد می‌کند. لکه خرمایی گندم در مناطق شمالی کشور به شدت در حال گسترش است و زادمایه بیماری سال به سال در مزارع استان گلستان بیشتر می‌شود به طوری که در سال‌های اخیر این بیماری به یک بیماری مهم گندم در منطقه تبدیل شده است (مشاهدات نگارندگان).

این قارچ هم از طریق جنسی و هم از طریق غیر جنسی تکثیر پیدا می‌کند. در روش غیر جنسی کنیدی‌های ۷-۴ سلولی روی کنیدیوفورها تشکیل می‌شوند. در روش جنسی سودوتسیومها (Pseudothecia) به صورت نقاط سیاه رنگ که حاوی آسک‌ها هستند بر روی برگ تشکیل می‌شوند. آسک‌ها معمولاً دارای هشت آسکوسپور سه سلولی هستند (Hosford, 1971؛ Weise, 1987).

در میان عوامل بیماری‌زای گندم، قارچ‌ها از اهمیت فراوانی برخوردارند به طوری که زنگ‌ها، بیماری‌های فوزاریومی، لکه برگی‌ها و سیاهک‌ها باعث کاهش شدید عملکرد و کیفیت گندم می‌شوند. بیماری لکه خرمایی گندم در بسیاری از مناطق جهان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم مطرح است. لکه خرمایی گندم توسط قارچ نکروتروف *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (anamorph: *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem. بیماری در آمریکا در سال ۱۹۴۰ گزارش شد و از آن زمان تاکنون وقوع و شدت آن در حال افزایش است (Pfender and Wootke, 1987). خسارت این بیماری در شرایط اپیدمی تا ۵۰٪ محصول بالغ می‌شود (Lamari and Strelkov, 2010). لکه خرمایی گندم در آمریکای جنوبی به عنوان سریع‌ترین بیماری در حال گسترش مطرح است و خسارت‌های قابل توجهی در آرژانتین، برزیل و پاراگوئه به محصول گندم وارد کرده است (Ciuffetti and Tuori, 1999). این بیماری در مناطق شمالی استرالیا به عنوان مهم‌ترین بیماری برگی شناخته شده است (Loughman *et al.*, 1998). لکه خرمایی گندم سال ۱۹۸۶ از آسیای مرکزی گزارش و به سرعت به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم مطرح شد

شده کاملاً نتیجه برهمکنش اختصاصی قارچ و میزبان است (Lamari and Bernier, 1989)؛ بنابراین (Lamari and Bernier, 1991)، بنابراین گروه‌بندی جدایه‌ها می‌تواند بر اساس نوع پاتوتایپ و توانایی تولید نکروز و یا کلروز آن‌ها روی برگ‌های ارقام افتراقی انجام شود (Lamari and Bernier, 1989). نکروز و کلروز حاصل از بیماری لکه خرمایی توسط سه توکسین ToxA، ToxB و ToxC ایجاد می‌شود، بنابراین از آن‌ها به عنوان فاکتورهای بیماریزایی نام برده می‌شود (Friesen et al., 2003)؛ Lamari and Strelkov, 2010؛ Strelkov and Lamari, 2003). ToxA باعث ایجاد نکروز و دو توکسین دیگر باعث ایجاد کلروز می‌شوند. تاکنون ژن‌های ToxA و ToxB شناسایی و کلون شده‌اند اما ژن ToxC کلون نشده و بنابراین با توجه به عدم شناسایی ژن ToxC نمی‌توان با آزمون ژنتیکی وجود و یا عدم وجود این ژن را در جدایه‌ها ارزیابی کرد. تحقیق حاضر با توجه به اهمیت زیاد دو توکسین ToxA و ToxB در ایجاد نکروز و کلروز، برای بررسی پراکنش و فراوانی ژن‌های ToxA و ToxB در جمعیت‌های قارچ عامل بیماری در مناطق آلوده ایران به اجرا در آمد.

مواد و روش‌ها

ضمن سفر به مناطق آلوده مورد کشت در استان‌های مازندران و گلستان در بهار سال

آسکوسپورهای آزاد شده در اوایل فصل زراعی می‌توانند به عنوان زادمایه اولیه، آلودگی ایجاد کنند. اسپورهای جوانه زده‌ی قارچ عامل بیماری به طور مستقیم از کوتیکول نفوذ می‌کنند (Dushnicky et al., 1996). این بیماری معمولاً روی برگ‌های پائینی دیده شده و در شرایط اپیدمی برگ‌های بالایی و مخصوصاً برگ پرچم به شدت آلوده می‌شود. بیماری لکه خرمایی ابتدا به صورت لکه‌های کوچک تیره و بیضوی یا دوکی شکل با حالت روشن در اطراف لکه ظاهر می‌شود. این لکه‌ها به سرعت به لکه‌های گسترده قهوه‌ای رنگ تبدیل شده و در آلودگی‌های شدید کل برگ به حالت سوختگی در می‌آید (Hosford, 1971). در انتهای فصل، اندام‌های جنسی قارچ به صورت نقاط کوچک سیاه رنگ روی قسمت‌های آلوده تشکیل می‌شود که فرم زمستان‌گذرانی قارچ نیز هستند.

مطالعات اولیه بیانگر وجود تفاوت در بیماریزایی جدایه‌های مختلف قارچ عامل لکه خرمایی بود (Luz and Hosford, 1980)؛ (Weis, 1987). پارامترهایی نظیر اندازه لکه، درصد نکروز برگ (Schilder and Bergstrom, 1990)، تعداد لکه‌ها و درصد آلودگی (Daluz and Hosford, 1980) می‌توانند به عنوان معیارهایی برای تفاوت جدایه‌ها از نظر بیماریزایی مورد استفاده قرار گیرند. محققین نشان داده‌اند که علائم نکروز و کلروز ایجاد

و میسلیموم جدایه‌ها پس از تکثیر، در نیتروژن مایع پودر شده و بلافاصله به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و ۶۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به آن‌ها اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته و سپس ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم/ایزوآمیل‌الکل (۱:۲۴) به تیوب‌ها اضافه گردید و پنج دقیقه به آرامی در دمای اتاق به هم زده شدند و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز روشن به تیوب جدید منتقل گشته و استات سدیم ۵ مولار (pH = 5.2) به نسبت یک دهم حجم بافر استخراج به نمونه‌ها اضافه شد. بعد از اضافه شدن استات سدیم، ایزوپروپانول سرد (به مقدار هم حجم) به تیوب اضافه و سپس برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سانتریفیوژ دوم در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه انجام شد که در این مرحله DNA به صورت رسوب نازکی در ته تیوب قرار گرفته و فاز مایع دور ریخته شد. شستشوی رسوب DNA با اتانول ۷۰٪ انجام شد و لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق به صورت درب باز و وارونه گذاشته شد تا خشک شوند. رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE [Tris-HCl pH=7 (10mM), EDTA (1mM)] استریل حل شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. برای بررسی کیفیت DNA و موفقیت

۱۳۹۱، نمونه‌های برگی آلوده گندم نان دارای علائم لکه خرمایی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی قارچ، ابتدا قطعاتی از برگ دارای علائم بیماری جدا شده و به وسیله هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۲-۳ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. قطعات برگ سه بار با آب مقطر استریل شستشوی سطحی شده و در نهایت روی محیط کشت آب-آگار قرار گرفته و تستک‌های پتری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا قارچ عامل بیماری اسپورزایی نماید. اسپورهای تولید شده از سطح برگ جمع‌آوری و با کمک لوپ سترون روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) خط‌کشی و خالص‌سازی قارچ با استفاده از روش تک اسپور انجام شد.

از آن جا که ژن‌های کدکننده دو توکسین ToxA و ToxB تولید شده توسط عامل بیماری لکه خرمایی شناسایی شده‌اند، برای مطالعه وجود و فراوانی این ژن‌ها در جدایه‌ها و جمعیت قارچ از روش PCR استفاده شد. بدین منظور از آغازگرهای اختصاصی دو ژن ToxA و ToxB و همچنین *CHS1* به عنوان کنترل استفاده شد (Andrie *et al.*, 2007). استخراج DNA از جدایه‌ها با استفاده از روش SDS (Sodium Didecyle Sulphate) انجام شد. بدین منظور ابتدا بافر استخراج [Tris-HCl pH=8 (100mM), EDTA (50mM), NaCl (500mM), 2β-mercaptoethanol (2%), SDS (1%)]

به مدت ۲ دقیقه و در خاتمه یک چرخه بسط نهایی در دمایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه تنظیم شد. برنامه حرارتی برای ژن *ToxB* به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در خاتمه یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه تنظیم شد. برای انجام الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده PCR از ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

استفاده از مقاومت ژنتیکی اقتصادی‌ترین و کم خطرترین روش از نظر زیست محیطی برای کنترل بیماری‌های گیاهی است، به همین دلیل یافتن منابع مقاومت و به کارگیری آنها در بسیاری از برنامه‌های به‌نژادی از اولویت برخوردار است. استفاده موفق از ارقام مقاوم منوط به وجود اطلاعات کافی از عامل بیماری است، چرا که تعیین راهکارهای مناسب در برنامه‌های اصلاح برای مقاومت به بیماری مستلزم وجود اطلاعات کافی و دقیق در زمینه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بیماری، شناسایی فاکتورهای بیماری‌زایی و پراکنش و

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از آغازگرهای CHS-79F و CHS-354R به عنوان کنترل مثبت (Internal control) استفاده شد. این آغازگرها بخشی از ژن کایتین سینتاز ۱ (Chitin synthase 1) را تکثیر می‌کنند. آغازگرهای مربوط به مکان ژنی *CHS1* قطعات ۲۷۵-bp تولید می‌کند. آغازگرهای TA51F و TA52R مربوط به ژن *ToxA* قطعات ۵۷۳-bp تولید کرده در حالی که آغازگرهای *ToxB* قطعات ۲۳۲-bp تولید می‌کنند. آغازگرهای TB60R، TB6R، TB71F و TB71F قادرند *ToxB* را در نژادهای مختلف قارچ تکثیر کنند. آغازگرهای TB58R و TB71F قادرند *ToxB* که یک هومولوگ غیر فعال *ToxB* است را شناسایی و تفکیک کنند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش با استفاده از بافر PCR (1X)، آغازگرهای اختصاصی هر کدام با غلظت ۲۰۰ نانومولار، آنزیم تگ پلی‌مراز 1 (unit)، dNTPs (0.2 mM)، کلرید منیزیم به غلظت ۲/۵ میلی مولار، ۱۰ نانوگرم DNA، ۰/۲ دای متیل سولفو کساید (فقط برای *ToxB*) انجام شد. برنامه حرارتی PCR برای ژن‌های *ToxA* و *CHS1* به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ۲۲ جدایه از ۱۵ منطقه استان‌های مازندران و گلستان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی دو توکسین *ToxA* و *ToxB* و همچنین ژن کایتین سینتیز (*CHS1*) انجام شد (جدول ۱). نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌ها قطعه ۲۷۵-bp را تکثیر دادند که بیانگر کیفیت و کمیت مناسب DNA برای آزمایش‌های PCR بود (شکل ۱).

فراوانی آن در داخل جمعیت قارچ عامل بیماری است. تاکنون چنین اطلاعاتی در مورد قارچ عامل بیماری لکه خرمایی گندم در ایران منتشر نشده است. با توجه به اهمیت زیاد دو توکسین *ToxA* و *ToxB* در ایجاد نکروز و کلروز، تحقیق حاضر برای بررسی پراکنش و فراوانی ژن‌های *ToxA* و *ToxB* با استفاده از آزمون‌های ژنتیکی تعیین حضور این ژن‌ها در جمعیت‌های قارچ عامل این بیماری به اجرا درآمد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های *ToxA* و *ToxB* در جدایه‌های قارچ *Pyrenophora tritici-repentis*

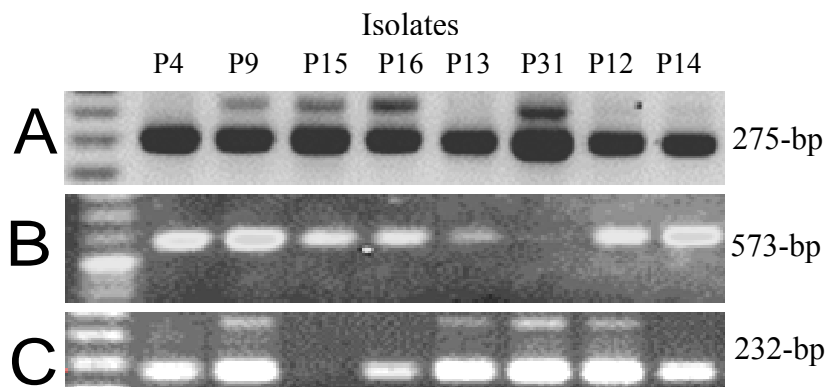
Table 1. Primers used for detection of *ToxA* and *ToxB* in isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*

ژن Gene	آغازگر Primer	توالی Sequence
<i>ToxA</i>	TA51F	5'-GCGTTCTATCCTCGTACTTC-3'
	TA52R	5'-GCATTCTCCAATTTTCACG-3'
<i>ToxB</i>	TB71F	5'-GCTACTTGCTGTGGCTATC-3'
	TB6R	5'-ACGTCCTCCACTTTGCACACTCTC-3'
	TB60R	5'-ACTAACAACGTCCTCCACTTTG-3'
<i>Toxb</i>	TB58R	5'-TATGAATGATTGACTGGGGTTA-3'
<i>CHS-1</i>	CHS-79F	5'-TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG-3'
	CHS-354R	5'-TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG-3'

Andrie *et al.* (2007)

انتظار بودند که بیانگر وجود ژن *ToxA* در این جدایه‌ها بود. برای ۳ جدایه نیز هیچ گونه تکثیری انجام نشد که نشانگر عدم حضور ژن *ToxA* بود. در جدول ۲ وجود یا عدم وجود این ژن برای ۲۲ جدایه قارچ عامل بیماری ارابه شده است. جدایه‌های P31، P33 و P35 قطعات مذکور را تکثیر ندادند

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *ToxA* برای جدایه‌های *P. tritici-repentis* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی TA51F و TA52R انجام و در تعدادی از نمونه‌ها منجر به تکثیر قطعه مورد انتظار به اندازه ۵۷۳-bp شد (شکل ۱). نتایج نشان داد از میان ۲۲ جدایه، ۱۹ جدایه (حدود ۸۶٪) قادر به تکثیر قطعه مورد



شکل ۱- قطعات تکثیر شده برای تعدادی از جدایه های قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های (A) *CHS-1*، (B) *ToxA* و (C) *ToxB*
 Fig. 1. Amplified fragments for some *Pyrenophora tritici-repentis* isolates using *CHS-1* (A), *ToxA* (B) and *ToxB* (C) genes specific primers

فعالیت همزمان ژن‌های *ToxA*، *ToxB* یا *ToxC* که هنوز ژن مربوط به آن شناسایی نشده است، باشد. مطالعات لیپوینت و همکاران (Lepoint *et al.*, 2010) نشان داد که از میان ۸۲ جدایه تعداد ۶۸ (۸۳٪) جدایه حاوی ژن *ToxA* بوده و تنها دو جدایه حاوی ژن *ToxB* بودند که نشان‌دهنده فراوانی کم *ToxB* در میان جدایه‌های مورد بررسی آنها بود. نتایج تحقیقات در ایالت آرکانزاس آمریکا نیز نشان داد که تنها ۱۴٪ از جدایه‌های به دست آمده حاوی ژن *ToxA* و به همین میزان حاوی ژن *ToxB* و تنها از میان ۴۲ جدایه مورد بررسی ۲ جدایه حاوی دو ژن *ToxA* و *ToxB* با هم بودند (Andrie *et al.*, 2007). آنتونی و همکاران (Antoni *et al.*, 2010) نشان دادند که از میان ۱۱۹ جدایه متعلق به استرالیا هیچ کدام حاوی ژن *ToxB* نبوده در حالی که همه جدایه‌ها دارای ژن *ToxA* بودند. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در منطقه شمال ایران

که نشان داد این جدایه‌ها جزو نژادهایی هستند که این توکسین را تولید نمی‌کنند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، با استفاده از آغازگرهای *ToxB* نشان داد که فقط آغازگرهای TB71F و TB60R قطعه مورد انتظار به اندازه ۲۳۲-bp را تکثیر دادند. شکل ۱ بیانگر تکثیر این قطعات با آغازگرهای مذکور برای تعدادی از جدایه‌های ایرانی *P. tritici-repentis* است. در مجموع از میان ۲۲ جدایه، در ۱۷ جدایه (حدود ۷۷٪) قطعه موردنظر برای ژن *ToxB* تکثیر شد و در ۵ جدایه P24، P23، P22، P15، P6 و P23 تکثیر قطعه مورد انتظار برای ژن *ToxB* انجام نشد.

بر اساس نتایج به دست آمده از میان ۲۲ جدایه، تعداد ۱۴ جدایه حاوی هر دو ژن *ToxA* و *ToxB* بودند که این یافته نشان می‌دهد که بیش از ۶۳٪ جدایه‌ها قادر به تولید همزمان دو توکسین *ToxA* و *ToxB* هستند، بنابراین علائم نکروز و کلروز توأم مشاهده شده روی برگ نمونه‌های جمع‌آوری شده می‌تواند حاصل

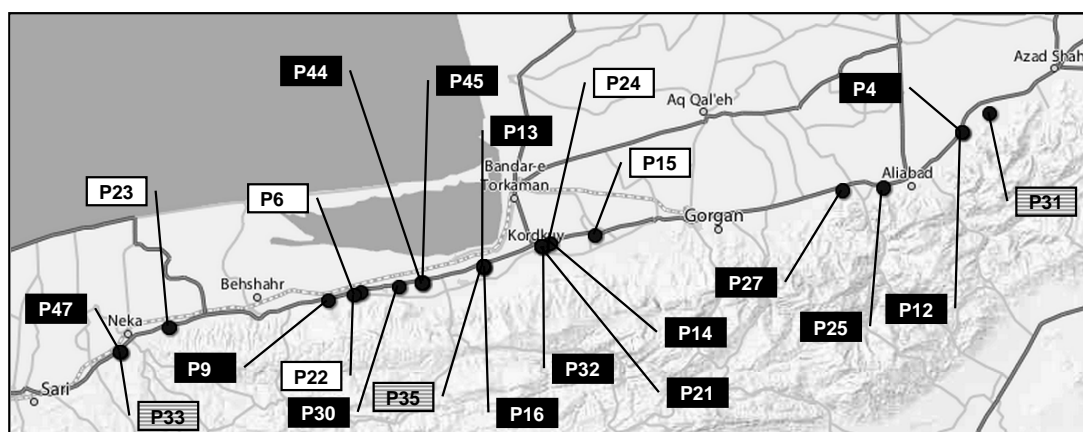
جدول ۲- جدایه‌های قارچ عامل بیماری لکه خرمایی (*Pyrenophora tritici-repentis*) جمع‌آوری شده از مناطق شمالی ایران و نتایج حاصل از آزمون مولکولی تشخیص حضور ژن‌های *ToxA*، *ToxB* و *CHS1* در آنها

Table 2. Fungal isolates of tan spot disease (*Pyrenophora tritici-repentis*) collected from north of Iran and the results of molecular detection of *ToxA*, *ToxB* and *CHS1* genes

مشخصات جدایه			موقعیت جغرافیایی مکان نمونه‌برداری		ژن‌های مورد بررسی		
Isolate information			Coordinate of sampling location		Genes of studied		
شماره	کد	تاریخ جداسازی	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	<i>CHS1</i>	<i>ToxA</i>	<i>ToxB</i>
No.	Code	Isolation Date	Longitude	Latitude	<i>CHS1</i>	<i>ToxA</i>	<i>ToxB</i>
1	P4	26.5.2012	54°58'25"	36°59'15"	+	+	+
2	P6	17.5.2012	53°45'35"	36°43'37"	+	+	-
3	P9	27.7.2012	53°41'39"	36°42'51"	+	+	+
4	P12	01.8.2012	54°58'25"	36°59'15"	+	+	+
5	P13	24.7.2012	54°00'21"	36°46'08"	+	+	+
6	P14	16.7.2012	54°08'25"	36°48'24"	+	+	+
7	P15	27.7.2012	54°13'52"	36°49'14"	+	+	-
8	P16	25.7.2012	54°00'21"	36°46'08"	+	+	+
9	P21	27.7.2012	54°07'25"	36°48'08"	+	+	+
10	P22	27.7.2012	53°44'41"	36°43'28"	+	+	-
11	P23	27.7.2012	53°22'15"	36°40'17"	+	+	-
12	P24	26.7.2012	54°07'25"	36°48'08"	+	+	-
13	P25	01.8.2012	54°48'47"	36°53'49"	+	+	+
14	P27	18.7.2012	54°43'51"	36°53'37"	+	+	+
15	P30	01.8.2012	53°50'04"	36°44'16"	+	+	+
16	P31	01.8.2012	55°01'41"	37°01'05"	+	-	+
17	P32	26.7.2012	54°07'25"	36°48'08"	+	+	+
18	P33	01.8.2012	53°16'17"	36°37'50"	+	-	+
19	P35	25.7.2012	54°00'21"	36°46'08"	+	-	+
20	P44	01.8.2012	53°52'55"	36°44'37"	+	+	+
21	P45	01.8.2012	53°52'55"	36°44'37"	+	+	+
22	P47	06.7.2012	53°16'17"	36°37'50"	+	+	+
Total no.	22				22	19	17

جمعیت‌های این قارچ در منطقه هلال حاصلخیز بیشترین تنوع نژاد را دارند و این منطقه به عنوان منشا تکامل و خاستگاه این قارچ معرفی شده است (Lamari and Strelkov, 2010). تحقیق حاضر به عنوان اولین بررسی پراکنش و فراوانی ژن‌های *ToxA* و *ToxB* در جمعیت‌های قارچ عامل بیماری لکه خرمایی در ایران نشان داد که

فراوانی ژن‌های *ToxA* و *ToxB* بیشتر از میزان گزارش شده برای سایر نقاط جهان است اما پراکنش این ژن‌ها در جمعیت‌های مورد مطالعه منحصر به موقعیت‌های جغرافیایی خاصی نیست (شکل ۲). این نتایج با مطالعات اخیر لاماری و استرلکف (Lamari and Strelkov, 2010) مطابقت دارد. این محققین نشان دادند که



شکل ۲- پراکنش حضور ژن‌های *ToxA* و *ToxB* در جدایه‌های قارچ عامل بیماری لکه خرمایی (*Pyrenophora tritici-repentis*) در مناطق مختلف استان‌های مازندران و گلستان بر اساس داده‌های موقعیت جغرافیایی (GPS)

جدایه‌های حاوی ژن *ToxA* در مستطیل‌های هاشور خورده، جدایه‌های حاوی ژن *ToxB* در مستطیل‌های سفید و جدایه‌های حاوی ژن‌های *ToxA/ToxB* در مستطیل‌های سیاه مشخص شده اند.

Fig. 2. Distribution of *ToxA* and *ToxB* genes in fungal isolates of tan spot disease (*Pyrenophora tritici-repentis*) in different locations of Mazandaran and Golestan provinces based on GPS coordinates

Isolates possessing *ToxA*, *ToxB* and *ToxA/ToxB* genes are depicted as patterned, white and black rectangles, respectively.

فراوانی زیاد این دو ژن نسبت داد.

اکثر جدایه‌های ایرانی این قارچ حاوی ژن‌های *ToxA* و *ToxB* بوده و علایم همزمان نکروز و کلروز ایجاد شده روی ارقام گندم را می‌توان به

References

- Andrie, R. A., Pandelova, L., and Ciuffetti, L. A. 2007. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. *Phytopathology* 97: 694-701.
- Antoni, E. A, Rybak, K., Tucker, M. P., Hane, J. K., Solomon, P. S., Drenth, A., Shankar, M., and Oliver, R. P. 2010. Ubiquity of *ToxA* and absence of *ToxB* in Australian populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australasian Plant Pathology* 39: 63-68.

- Ciuffetti, L. M., and Tuori, R. P. 1999.** Advances in the characterization of the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *Phytopathology* 89: 444-449.
- Daluz, W. C., and Hosford, R. M. 1980.** *Pyrenophora trichostoma* races for virulence to wheat in the central plains of North-America. *Phytopathology* 70: 1193-1196.
- Di Zinno, T., Longree, H., and Maraite, H. 1998.** Diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates from warm wheat growing areas: Pathogenicity, toxin production, and RAPD analysis. pp. 302-311. In: Duveiller, E., Dubin, H. J., Reeves, J., and McNab, A. (eds.) *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*. CIMMYT, Mexico, D. F. Mexico.
- Dushnicky, L. G., Ballance, G. M., Sumner, M. J., and MacGregor, A. W. 1996.** Penetration and infection of susceptible and resistant wheat cultivars by a necrosis toxin-producing isolate of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 18: 392-4.
- Francl, L. 1998.** Components of the tan spot disease cycle. pp. 28-36. In: Duveiller, E., Dubin, H. J., Reeves, J., and McNab, A. (eds.) *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*. CIMMYT, Mexico, D. F. Mexico.
- Friesen, T. L., Ali, S., Kianian, S., Francl, L. J., and Rasmussen, J. B. 2003.** Role of host sensitivity to *ptr* ToxA in development of tan spot of wheat. *Phytopathology* 93: 397-401.
- Hosford, R. M. 1971.** A form of *Pyrenophora-trichostoma* pathogenic to wheat and other grasses. *Phytopathology* 61: 28-35.
- Lamari, L., and Bernier, C. C. 1989.** Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] based on lesion type. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 49-56.
- Lamari, L., and Bernier, C. C. 1991.** Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology* 81: 1092-1095.
- Lamari, L., and Strelkov, S. E. 2010.** The wheat/*Pyrenophora tritici-repentis* interaction: progress towards an understanding of tan spot disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 32: 4-10.

- Lepoint, P., Renard, M. E., Legreve, A., Duveiller, E., and Maraite, H. 2010.** Genetic diversity of the mating type and toxin production genes in *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology* 100: 474-483.
- Loughman, R., Wilson, R. E., Roake, J. E., Platz, G. J., Rees, R. G., and Ellison, E. W. 1998.** Crop management and breeding for control of *Pyrenophora tritici-repentis* causing yellow spot of wheat in Australia. pp. 10-17. In: Duveiller, E., Dubin, H. J., Reeves, J., and McNab, A. (eds.) *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*. CIMMYT, Mexico, D. F. Mexico.
- Luz, W. C. da, and Hosford, R. M. Jr. 1980.** Twelve *Pyrenophora trichostoma* races for virulence to wheat in the Central Plains of North America. *Phytopathology* 70: 1193-1196.
- Pfender, W. F., and Wootke, S. L. 1987.** Production of pseudothecia and ascospores by *Pyrenophora tritici-repentis* in response to macronutrient concentrations. *Phytopathology* 77: 1213-1216.
- Postnifova, E. N., and Khasanov, B. A. 1998.** Tan spot in central Asia. pp. 107-113. In: Duveiller, E., Dubin, H. J., Reeves, J., and McNab, A. (eds.) *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*. CIMMYT, Mexico, D. F. Mexico.
- Schilder, A. M. C., and Bergstrom, G. C. 1990.** Variation in virulence within the population of *Pyrenophora tritici-repentis* in New-York. *Phytopathology* 80: 84-90.
- Strelkov, S. E., and Lamari, L. 2003.** Host-parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 339-349.
- Weise, M. V. 1987.** *Compendium of Wheat Diseases*. 2nd ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 112 pp.