نقش *rDNAIGS1* در مطالعه تنوع ژنتیکی قارچ *Puccinia striiformis f.sp. tritici* عامل زنگ زرد گندم

حجت ا... ربانی نسب*- محمود اخوت- مهرداد عباسی- محمد ترابی- جواد مظفری[1]

تاریخ دریافت:۸۶/۱/۱۹

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۲۲

چکیده

توالی IGS1 برای شش جدایه ایرانی *Puccinia striiformis. f.sp.tritici* متعلق به شش نژاد متفاوت با منشا جغرافیایی و گروههای انگشت نگاری مختلف با یکدیگر مقایسه شدند. دو محصول PCRبه نامهای IGS 1A و IGS 1B به ترتیب با وزن مولکولی ۱/۳ و۱/۱ کیلو باز بدست آمد. تجزیه و تحلیل توالیIGS 1A و IGS 1Bنشان داد که یک پلی مورفیسم جهشی ناچیز بین ۶ جدایه(از ۰ تا ۱/۵ درصد) وجود داشت. مقایسه توالی های IGS 1A و IGS 1Bبا یکدیگر نشان داد که پلی مورفیسم بین دو نوع IGS به علت پلی مورفیسم طولی ناشی از حدود ۲۰۰ کیلو باز حذف/ اضافه شدن واحدهای تکراری است. دو فرضیه برای وجود دو نوع IGS1 مختلف وجود دارد: یا هر هسته از این قارچ جفت هسته‌ای شامل یک نوع IGS1 است یا اینکه دو واحد ریبوزومی مجزا در نتیجه نوترکیبی در یک هسته بوجود آمده اند.

واژه های کلیدی: Intergenic spacer, rDNA, *Puccinia striiformis* f.sp. tritici

مقدمه

قارچهای عامل زنگ، بیمارگرهای اجباری بسیار اختصاصی هستند. گونه *Puccinia striiformis westends* بر اساس بیماریزائی بر روی جنس یا گونه خاصی از میزبان به فرمهای اختصاصی مختلف تقسیم می گردد. فرم اختصاصی *Puccinia striiformis f.sp tritici* عامل یکی از مهمترین بیماریهای گندم در بسیاری از مناطق جهان و از جمله ایران است. فرمهای اختصاصی *Puccinia striiformis* بر اساس بیماریزا بودن یا نبودن روی ارقام یا ژنوتیپ های مختلف گندم به نژادهایی تقسیم می گردند. نژادها بر اساس نوع آلودگی که بر روی گروهی از ژنوتیپ‌ها یا لاین های تک-ژنی انتخابی ایجاد می‌نمایند و به نام ارقام افتراقی معروف هستند، شناسائی می‌شوند (۱۷). مناسبترین روش کنترل موثر زنگ زرد گندم استفاده از ارقام مقاوم است. در بسیاری از موارد، استفاده از ژنهای مقاومت اختصاصی به عنوان یک روش کنترل، موفقیت آمیز نبوده است چرا که جمعیت بیمارگر به سرعت دچار دگرگونی شده و در عرض چند سال قادر خواهد بود بر ژنهای مقاومت معرفی شده غلبه نموده و نژادهای مختلف در مناطق مختلف انتخاب می‌شوند. (۲، ۱۷ و ۱۹). تا کنون ویرولانس برای اکثر ژنهای معرفی

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد دانشگاه تهران، محقق مؤسسه گیاه پزشکی و محققین مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

*. نویسنده مسئول Email: H rabbani Hrabbani wsr@yahoo. com

Archive of SID

www.SID.ir

شده در ایران دیده شده است. تنوع ژنتیکی در بین نژادهای *P.striiformis f.sp.tritici* در مقایسه با سایر بیمارگرهای قارچی اجباری غلات دانه ریز بسیار کم است (۱)که احتمالا به علت تولید مثل غیر جنسی آن توسط یوریدینیوسپورها است و مرحله اسیدیوم برای این قارچ شناخته نشده است (۶). با استفاده از نشانگر RAPD[1] تنوع ناچیزی برای جمعیت های قارچ عامل زنگ زرد در آمریکای شمالی بدست آمد(۴). از ۲۳ نژاد شناسایی شده در آمریکای شمالی ۲۲ نژاد حدود ۷۸ درصد با هم شباهت داشته و فقط یک جدایه جمع آوری شده از روی تریتیکاله با بقیه متفاوت بود. نشانگر AFLP[2] یک جمعیت کلونال را در شمال غرب اروپا شناسایی نمود (۸). هر چند تحقیقات نگارنده با کمک نشانگر AFLP تنوع نسبتا خوبی را در بین جدایه های ایرانی نشان داد(منتشر نشده). واحد های تکراری DNA ریبوزومی (rDNA) به عنوان یک فاکتور مناسب برای شناسایی بسیاری از گونه های قارچی استفاده شده‌اند (۱۸). نشانگر ITS برای شناسایی گونه های قارچی بسیارنزدیک به هم مفید بوده است (۱۴و ۲۰). یک فاصله گذار بزرگ به نام IGS (قبلا NTS=non transcribed spacer) زیر واحدهای ۱۸s و ۲۸s را از هم جدا می‌کند که خود این ناحیه نیز دارای تکرارهائی است و هر تکرار شامل یک آرایش تندم از زیر واحدهای تکراری است (۱۶). بخش IGS سریعترین منطقه در حال تکامل rDNA است، همراه با تعداد و سازمانی از تکرارهای داخلی که اختصاصی گونه بوده و اغلب بین جمعیت ها، افراد و حتی در داخل یک سلول منفرد متنوع است (۱۵). IGS تنوع بین و داخل گونه‌ای بیشتری نسبت به ITS نشان داده است. چند شکلی (Polymorphism) IGS در بین نه نژاد *P.graminis f.sp. tritici* عامل زنگ سیاه گندم (۱۰) و ۶ نژاد *P.hordei* عامل زنگ قهوه‌ای جو (۹) گزارش شده است. کمجاتی و همکاران (۱۱) به کمک توالی‌های IGS، SSR[3] و SRAP[4] پلی مورفیسم *P. striiformis* را مطالعه نمودند. آنها بین *P. striiformisf.sp.hordei* و *P. striiformisf.sp.tritici* تنوع و تفاوت مشاهده نمودند. اما داخل فرم اختصاصی اول تنوع چندانی وجود نداشت. سلین و همکاران(۳)در مطالعه توالی IGS1 متعلق به سه جدایه اروپایی قارچ عامل زنگ زرد گندم چندشکلی جهشی کمی بین سه جدایه(۰/۷ تا ۱/۱) گزارش نمودند. برای بررسی تنوع ژنتیکی شش جدایه ایرانی که از لحاظ جغرافیایی، تا حدودی بیماریزایی و انگشت نگاری DNA بر اساس نشانگر AFLP با هم متفاوت بودند، توالی IGS1 آنها مورد بررسی قرار گرفت و این جدایه های ایرانی با سه جدایه اروپایی نیز مقایسه شدند.

مواد و روش ها

شش جدایه *Puccinia striiformis f.sp. tritici* که به لحاظ جغرافیایی، بیماریزایی و انگشت نگاری AFLP (نگارنده اول، منتشر نشده) با هم متفاوت بودند، برای این آزمایش انتخاب شدند. علاوه بر اینها توالی های IGS1 جدایه‌های 470232،470258و 470248 به ترتیب از شمال فرانسه، جنوب فرانسه و سوئد و توالی IGS جدایه Lentinula edodes به عنوان Outgroupاز بانک ژن (NCBI GenBank or DNA database) تهیه شدند (جدول ۱).

جهت استخراج DNA تخریب دیواره سلولی به روش ساییدن اسپورها داخل بافر استخراج و به کمک ترکیب فنل-کلروفورم-ایزوآمیل الکل انجام گرفت. ۱۵ میلی گرم یوردینیوسپور به تیوب‌های ۲ml اضافه و به اندازه حجم اسپور خرده سنگ‌های استریل سیلیکون به تیوب اضافه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر بافر استخراج شامل Tris-Hcl (۱۰۰

1. Random Amplified polymorphic DNA
2. Amplified Fragment Length Polymorphism
3. simple sequence Repeats
4. Sequence-related amplifiedpolymorphism

Archive of SID

www.SID.ir

جدول(۱) نام جدایه ها، رقم میزبان، محل جمع آوری جدایه ها، نژادهای فیزیولژیک، فنوتیپ نژادها و گروه انگشت نگاری AFLP
Table 1. Isolate name, Host cultivars, Sampling location, Physiological race, Race phenotype and AFLP group

Isolate	Cultivar	Locatio	Race	Race Phenotype*																				AFLP Group
G.DK1	Tajan	Golestan	66E168 A^+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	-	ND	-	-	SU	A	A
Dez	Chamran	Khuzestan	178E0 A^-	-	2	-	-	-	-	7	-	9	-	-	22	23	24	-	-	SD	-	SU	-	C
Darab	Darab	Fars	66E66 A^+	-	-	-	-	-	-	7	-	9	-		22	23	24	-	-	-	SP	SU	A	Single4
Iranshahr	Line	Baluchest	178E0 A^-	-	2	-	-	-	-	7	8	9	-	19	22	23	24	-	-	SD	-	SU	-	Single8
Neysh	Roshan	Khorasan	222E79 A^+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	10	-	22	23	24	-	ND	SD	SP	-	A	G
Moq3	Bulani	Ardebil	66E66 A^+	-		-	-	-	-	7	-	9	-	-	22	23	24	-	-	-	SP	SU	A	Single10
470258	?	S France	6E16	-	2	-	-	-	6	7	8	-	?	?	?	?	?	?	?	-	?	-	?	-
470232	?	N France	232E137	-	2	3	4	-	-	-	-	9	?	?	?	?	?	?	?	SD		SU	?	-
470248	?	Sweden	104E9	-	-	3	4	-	-	-	-	-								SD		SU		

*- شدت بیماری زایی Yr1=1, Yr2=2, Yr3=3, Yr4=4, Yr5=5, Yr6=6, Yr7=7, Yr8=8, Yr9=9, Yr10=10, Yr19=19, YR22=22, Yr23=23, YrA=A,

Yr24=24, YrSu=SU, YrSP=SP, YrSD=SD, YrND=ND,YrCV=CV, - عدم شدت بیماری زایی

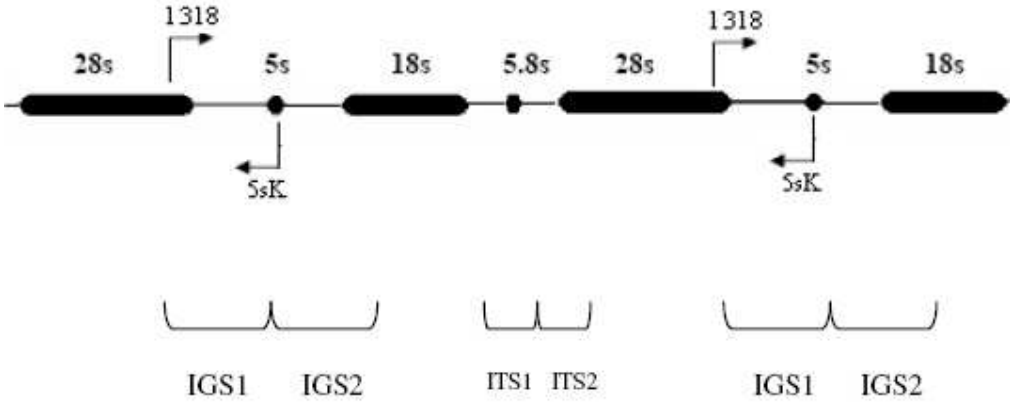
میلی مولار)، EDTA (۲۰ میلی مولار) و Nacl (۰/۸ مولار) به تیوب‌ها اضافه شد. پس از اضافه کردن یک میکرولیتر مرکاپتواتانول با استفاده از یک مته کوچک (mini-pestle) پلاستیکی استریل اسپورها داخل لوله سائیده شدند. مجددا ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به لوله‌ها اضافه شده و پس از یک ورتکس ۳۰ ثانیه‌ای، تیوب‌ها در ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت نگهداری شدند. سپس DNA طی چندین مرحله سانتریفوژ به روش لوریس و همکاران (۱۲) استخراج شد. برای حذف RNA، ۲ میکرولیتر RNAse به این محلول اضافه و به مدت یک ساعت در دمای $37^0 C$ نگهداری شد. DNA استخراج شده در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

جهت انجام PCR برای تکثیر ناحیه IGS در نمونه های زنگ زرد مورد بررسی از روش سلین و همکاران (۳) استفاده شد. آغازگرهای L.318(5´GCTACGATCCACTGAGGTTC3´)و 5sk (3´CTTCGCAGATCGGACGGGAT5´) ساخت شرکتFermentas در این واکنش استفاده شدند. این آغازگرها تکثیر ناحیه‌ای را در فاصله بین ژنهای ۲۸s و 5s در DNA ریبوزومی به نام IGS1 آغاز می کنند (شکل ۱). برای تکثیر DNA از ترموسایکلر مدل Bio-rad استفاده گردید. پس از اتمام PCR محصولات آن روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شدند. برای تهیه نمونه های شاهد از دو جدایه *Puccinia graminis f.sp. tritici* و *Puccinia triticina* استفاده شد (واحد پاتولوژی غلات). بدین منظور

Archive of SID

www.SID.ir

یک میکرولیتر از DNA این دو قارچ به روشی که قبلاً شرح داده شد تهیه، با استفاده از دو آغازگر ذکر شده ناحیه IGS1 آنها تکثیر گردید. پس از اتمام PCR محصولات آن روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شدند.



شکل(۱) منطقه قابل تکثیر با استفاده از آغازگرهای L.318 و 5skروی rDNA

برای استخراج DNA از ژل آگاروز ابتدا با قرار دادن ژل روی دستگاه Transilluminator باندها با تیغ تیز و به سرعت و تا حد امکان نازک بریده شده و در تیوب های ۲ میلی لیتری قرار داده شدند. سپس با استفاده از کیت BioFlux طی دستورالعمل کیت DNA از ژل آگاروز استخراج شد. اندازه گیری مقدار و همچنین کیفیت DNA با دستگاه اسپکتروفتومتر Nano-drop انجام شد. بدین منظور ابتدا با یک میکرولیتر Elution buffer دستگاه را کالیبره نموده و سپس یک میکرولیتر از محلول حاوی DNA استخراج شده را روی صفحه فلزی مخصوص قرار داده شد و میزان کیفیت DNA مورد بررسی بوسیله دستگاه محاسبه شد.

برای تعیین توالی DNA ابتدا لازم بود تا محصولات IGS PCR در باکتری *col:Eschercia* کلون شوند لذا نسبت به کلون سازی با استفاده از کیت PGEM ^{R}-T vector system (Promega) اقدام گردید. انجام این عمل خود شامل دو مرحله اساسی واکنش جوش[1] و انتقال ژنتیکی[2] (Transformation) بود.انتقال ژنتیکی به روش شوک حرارتی[3] انجام گرفته پس از مرحله انتقال ژنتیکی دو نوع پرگنه آبی و سفید از باکتری *E.coli* روی محیط کشت LB agar تیمار شده با ۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر آمپی سیلین، ۴۰ میکرو لیتر از محلول x-Gal هفت میکرو لیتر محلول IPTG مورد انتظار بود. روی محیط کشت مورد انتظار بود (شکل ۳). پرگنه های سفید رنگ حاوی پلاسمیدها نوترکیب با قطعه DNA مورد نظر بوده، با استفاده از خلال دندان استریل این پرگنه‌ها (ترجیحا از مرکز تشتک پتری) برداشته و به داخل لوله های کشت حاوی ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر آنتی بیوتیک آمپی سیلین منتقل شدند. هر تک پرگنه داخل لوله کشت مجزا کشت داده شد. غالبا۸ تا ۱۰ پرگنه سفید رنگ انتخاب و داخل لوله های کشت حاوی محیط LB مایع کشت داده شده و در $37^{0}C$ و ۲۵۰rpm در انکوباتور (Rotary shaking incubator) انکوبه گردید. لوله‌ها در این مرحله برای یک شب (Over night) نگهداری شدند. پس

1. Ligation reaction
2.Transformation
3. Heat shock

Archive of SID

www.SID.ir

از رشد پرگنه های سفید باکتری در $37^{0}C$، لوله‌ها از انکوباتور خارج شده و در ۱۰۰۰۰xg برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. رونشین[1] تخلیه شده و لوله‌ها با معکوس نگهداشتن روی یک کاغذ خشک کن کاملا خشک و عاری از مایع گردیدند. سپس با استفاده از کیت Biospin پلاسمید استخراج شد.

به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مرحله تعیین توالی، از کیت ABI PRISM® BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) استفاده گردید.

برای شناسایی توالی های تکثیر شده IGS1، این توالی‌ها به کمک نرم افزار اینترنتی NCBI Blast Search مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از Edit نمودن توالی ها، هم‌ترازی چندگانه[2] توالی‌ها به کمک نرم افزار Meg align از بسته نرم افزاری ClustralX انجام شد. به منظور بررسی چگونگی ارتباط‌جدایه‌ها با یکدیگر دندروگرام مربوطه با استفاده از نرم افزار Clustral X وبه روش پیوست همسایه ها[3] ترسیم شد (شکل ۴). قارچ بازیدیومیست *Lentinula edoddes* که توالی IGS آن حدود یک کیلو جفت باز است به عنوان out Group در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

تکثیر rDNA IGS از شش جدایه *Puccinia striiformis f.sp.tritici* با جفت پرایمرهای L318 و5SK روی ژل آگاروزیک درصد دو باند تولید نمود(شکل ۲). این قطعات حدوداً ۱/۳ و ۱/۱کیلوجفت بازی به ترتیب به نامهای IGS1 A و IGS1 B نام گرفتند (جدول ۲). این در حالی است که از تکثیر rDNA IGS1 گونه‌های *P.triticina* عامل زنگ قهوه‌ای گندم و*P.graminis f.sp.tritici* عامل زنگ سیاه گندم فقط یک باند بدست آمد. وجود دو محصول PCR برای ناحیه IGS1 احتمالا به علت هتروژنیسیتی در طول نواحی IGS1 در *P.striiformis f.sp.tritici* است. پس از انجام واکنش جوش و انتقال ژنتیکی قطعاتIGS1A و IGS1B به پلاسمید باکتری حاوی ژن تشتک های پتری در خصوص رشد پرگنه‌ها وارسی شدند (شکل ۳). تعیین توالی با کیفیت مناسب انجام شد. به کمک نرم افزار اینترنتی NCBI Blast Searchمشخص شد که توالی های تکثیر شده از جدایه های ایرانی شبیه به توالی IGS1 مربوط به قارچ *P.striiformis f.sp. tritici* است.

همترازی توالی های IGS1 A مربوط به شش جدایه Dez ،Neyshabour ،Darab ، Moqan ،Iranshahr و Gorgan نشان دهنده ۱/۴-۰ درصد تفاوت بین آنها بود. از طرفی همترازی توالی های IGS1 B همین جدایه‌ها با همدیگربیانگر وجود ۱/۵-۰ درصد اختلاف بین آنهاست. همترازی توالی های IGS1 A و IGS1 Bمتعلق به نه جدایه بررسی شده در این تحقیق حداکثر ۲ درصد بود.

بر اساس این درخت شجره یابی، چندشکلی موجود در توالی IGS1 باعث شده است که محصولات حاصل از تکثیر این ناحیه (IGS1A , IGS1B) در دو گروه جداگانه قرار بگیرند. علیرغم تفاوت بیماریزایی و نژادی و همچنین جدایی جغرافیایی شش جدایه ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق، به علت تشابه بسیار زیاد توالیIGS1در آنها برخی از جدایه‌ها در یک شاخه قرار گرفتند. جدایه های اروپایی نیز با جدایه های ایرانی تشابه قابل ملاحظه و گاهی ۱۰۰ درصد نشان دادند.

P.striiformis f.sp.*tritici* به شدت دارای ثبات بوده است. سلین و همکاران(۳) نیز در مطالعه IGS1 مربوط به قارچ *P.striiformis* f.sp.*tritici* بین ۷/. تا ۱/۱ درصد اختلاف بین سه جدایه فرانسوی و سوئدی مختلف مشاهده نمودند.

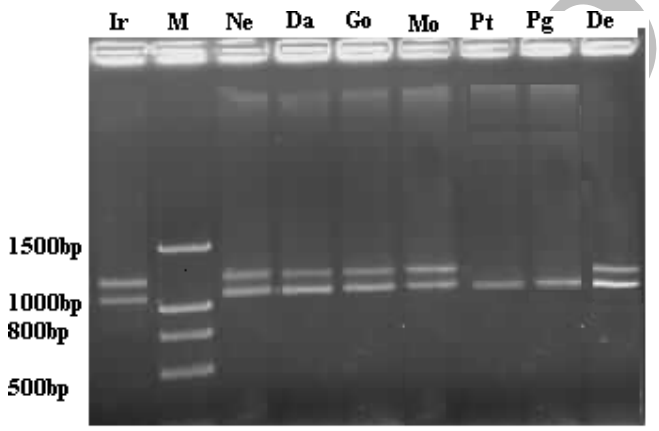
1.Supernatant
2.Multiple alignment
3.Neighbur Joining

Archive of SID

www.SID.ir

جدول (۲) اسامی توالی های IGS1 نه جدایه *P.striiformis f.sp. tritici*

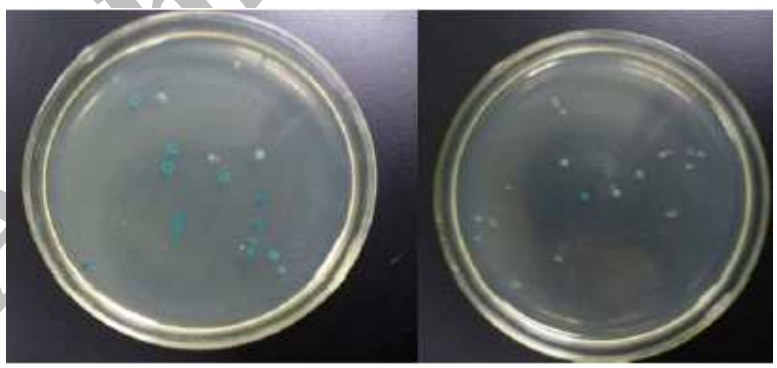
نام جدایه	IGS1A (~1/3 kbp)	IGS1B (~ 1/1 kbp)
Darab	Darab A	Darab B
Iranshahr	Iranshahr A	Iranshahr B
Neyshabour	Neyshabour A	Neyshabour B
Moqan	Moqan A	Moqan B
Gorgan	Gorgan A	Gorgan B
Dez	Dez A	Dez B
470232	AY117126	AY117127
470258	AY117128	AY117129
470248	AY117130	AY117131



شکل(۲) نقوش الکتروفورزی محصولاتPCR ناحیه IGS1 شش جدایه *P.striiformis f.sp.tritici* و دو شاهد *Pt:Puccinia triticina* و *Pg: Puccinia graminis f.sp. tritici*.

Ne:NeyshabourIr: IranshahrGo:Gorgan Mo:Moqan

M: Marker Da: Darab De: Dez

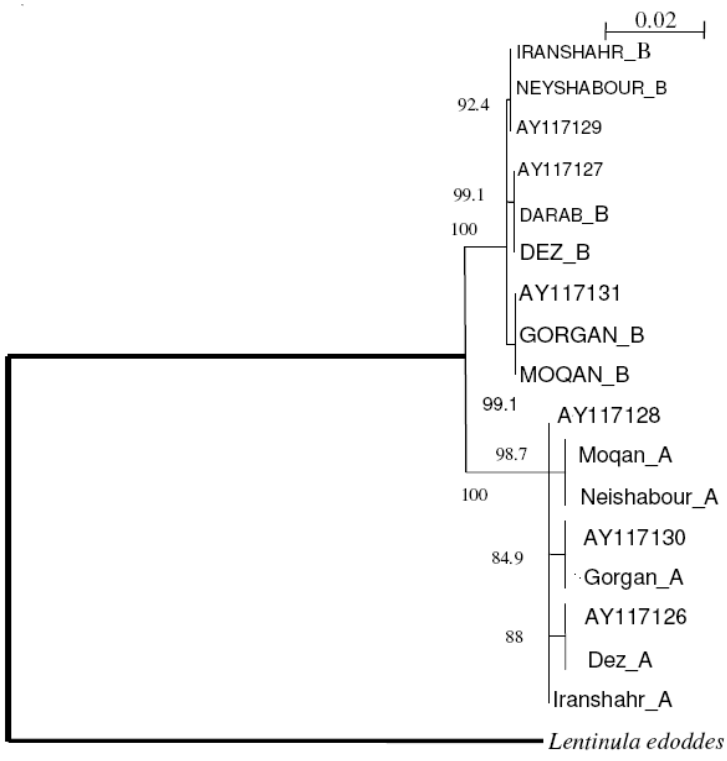


شکل(۳) پرگنه‌های سفید(مثبت) و آبی (منفی)

جنینگز و همکاران (۹)در مطالعه IGS1 مربوط به۶ جدایه قارچ *Puccinia hordei* از ۴ نژاد متفاوت فقط ۱۷/. تا ۵/. درصد اختلاف در یک قطعه تولیدی ۶/. کیلوبازی حاصل از تکثیر ناحیه IGS1 مشاهده نمودند. این نتایج با تحقیقات سلین و همکاران(۳) و تحقیق حاضر از لحاظ تفاوت ناچیز بین توالی IGS1 جدایه های مختلف همخوانی دارد

Archive

www.SID.ir



شکل(۴) دندروگرام حاصل از مقایسه توالی IGS1 در جدایه های *P.striiformis f.sp. tritici* ایرانی و اروپایی به کمک نرم افزار Clustral X و به روش Neighbur joining و انجام Bootstrapping به کمک نرم افزار NjPlot

هر چند پلی مورفیسم توالی‌ها فوق العاده کم است، اما پلی مورفیسم طولی در IGS1 قارچ *P.striiformis f.sp.tritici* مشاهده شد و این قارچ دو توالی به نامهای IGS1 A و IGS1 B تولید نمود.

همانطور که نتایج سلین و همکاران (۳) نشان داد در این تحقیق نیز حاصل تکثیر ناحیه IGS1 دو قطعه حدودا ۱/۱ و ۱/۳ کیلوبازی بود که برای هر یک از ۶ جدایه مورد بررسی مشاهده شد. این پدیده متفاوت از تنوعی است که برای سایر زنگها گزارش شده است.

کیم وهمکاران (۱۰)در بررسی چندشکلی طولی ناحیه IGS1، ۱۴ جدایه متعلق به ۹ نژاد قارچ *Puccinia graminis f.sp. tritici* گزارش نمودند که که از تکثیر ناحیه مذکور در نژادهای بررسی شده ۱تا ۶ محصول به اندازه تقریبی ۱/۰۲ تا ۱/۵۸ کیلو باز بدست آمد. هر چند نژادهای داخل زنگ سیاه قابل شناسایی بود اما جدایه های مربوط به یک نژاد قابل تشخیص نبودند.

بر اساس این درخت شجره ای، چندشکلی موجود در توالی IGS1 باعث شده است که درمحصولات حاصل ازتکثیر این ناحیه در بررسی چندشکلی طولی توالی IGS1 در *P.hordei* فقط یک محصول ۶/. کیلو بازی در تمام شش جدایه مورد بررسی گزارش شود (۹).

توالی ناحیه IGS1 در *Puccinia striiformis f.sp. tritici* همانند سایر قارچها، جانوران و گیاهاندارای چندین واحد تکراری یا مناطق ویژه تکراری است(۵). تغییر در تعدادکپی های این واحد های تکراری باعث پلی مورفیسم طولی در IGS1 شده و یا احتمالا ناشی از نوترکیبی میتوتیک بین

Archive of SID

www.SID.ir

کروماتیدهای خواهری است. این پدیده در خصوص Neotyphodium endophyte (Ascomycota) توسط گانلی و اسکات (۷) به اثبات رسیده است.

وضعیت جفت هسته‌ای قارچ و هتروزیگوت بودن جدایه‌ها احتمالا باعث ایجاد دو نوع IGS1 متمایز در هسته های مختلف شده و باعث پلی مورفیسم طولی در جدایه های *Puccinia striiformis f.sp. tritici* شده است.

هتروزیگوسیتی در IGS2 قبلا در قارچ *Laccaria bicolor* که یک بازیدیومیست اکتومیکوریز است گزارش شدهاست(۱۳). مکانهای ژنی IGS2 به نسبت ۱:۱در فرزندان هاپلوئید تقسیممی شوند.

مطالعه حاضر در خصوص IGS1 *Puccinia striiformis f.sp tritici* نشان داد که این بیمارگر با دو نوع IGS1 قابل شناسایی است. با تحقیقات بیشتر می‌توان از این پدیده به عنوان یک نشانگر در شناسایی زود هنگام عامل زنگ زرد گندم استفاده نمود. تفاوت توالی IGS1Aو IGS1B حدود ۲۰۰نوکلئوتید است. این پدیده یا به علت حذف واحدهای تکراری IGS1B یا افزوده شدن واحدهای تکراری به IGS1A در اثر جهش است. نتایج این آزمایش نشان داد که توالی IGS1 به عنوان یک مارکر مولکولی قابلیت چندانی در مطالعه تنوع ژنتیکی نداشته، در عوض به نظر میرسد در صورت مطالعه سایر بیمارگرهای مهم گندم، این توالی در شناسایی این قارچ توانایی ویژه‌ای داشته باشد.

سپاسگزاری

از آقای پروفسور ژن شن کانگ به خاطر کمک در انجام تحقیقات مولکولی و همچنین سرکارخانم معصومه طلایی و سرکار خانم زهره بیات به خاطر کمک در انجام تحقیقات گلخانه‌ای نهایت تشکر را داریم.

منابع

1. Andrivon, D. & de Vallavieille-Pope, C. 1995 Race diversity and complexity in selected populations of fungal biotrophic pathogens of cereals. Phytopathology 85: 897±905.
2. Bayles R.A., Flath, K., Hovmoller, M.S. and de Vallavieille-Pope, C. 2000. Breakdown of the Yr17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. Agronomie 20: 805-811.
3. Celine, R. A., de Vallavieille-Pope, C., Yves, B. and Caroline, L.2002. Characterisation of a length polymorphism in the two intergenic spacers of ribosomal RNA in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat yellow rust. Mycoogical Research. 106 (8) : 918±924
4. Chen, X.M., Line, R.F., and Leung, H. 1993. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. Phytopathology, 83: 1489–1497.
5. Cordesse, F., Cooke, R., Tremousaygue, D., Grellet, F. & Delseny, M. (1993) Fine structure and evolution of the rDNA intergenic spacer in rice and other cereals. Journal of Molecular Evolution 36:369±379.
6. Cummins, G. B. 1971. The Rusts Fungi of Cereals, Grasses, and Bamboos. Springer-Verlag, New York.
7. Ganley, A. R. D. & Scott, B. 1998. Extraordinary ribosomal spacer length heterogeneity in a *Neotyphodium endophyte* hybrid: implications for concerted evolution. Genetics 150: 1625±1637.
8. Hovmøller, M. S., Justesen, A. F. and Brown, J. K. M. 2002. Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in north-west Europe. Plant Pathology (London), 51: 24–32.
9. Jennings,J. M., Newton, A. C. and Buck, K. W. 1997. Detection of polymorphism in *Puccinia hordei* using RFLP and RAPD markers, differential cultivars, and analysis of the Intergenic Spacer Region of rDNA. Phytopathology 145: 511±519.
10. Kim, W. K., Zerucha, T.& Klassen, G. R. 1992. A region of heterogeneity adjacent to the 5s ribosomal RNA gene of cereal rusts. Current Genetics 22: 101±105.
11. Komjáti, H., Pasquali, M., Hubbard, A., Lee, D. and Bayles, R. 2004. IGS, SSR and SRAP analysis of *Puccinia striiformis* isolates. *In* Proceedings of the 11th International Cereal Rusts and Powdery Mildews

Archive of SID

www.SID.ir

Conference. 22–27August 2004, John Innes Centre, Norwich, UK. European and Mediterranean Cereal Rust Foundation, Wageningen, Netherlands. Cereal Rusts and Powdery Mildews Bulletin, Abstr. A2.33. Available from http://www.crpmb.org/icrpmc11/abstracts.htm[accessed 8 July 2005].

12. Lorys, M.,Villaréal, M. A., Lannou, C., de Vallavieille-Pope, C. and Neema, C. 2002. Genetic Variability in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Populations Sampled on a Local Scale during Natural Epidemics. Applied Environmental Microbiology 68(12): 6138–6145.
13. Martin, F., Selosse, M. A.and Le, Tacon F. 1999. The nuclear rDNA intergenic spacer of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* : structural analysis and allelic polymorphism. Microbiology 154: 1605±1611.
14. Nazar, R. N., Hu, J., Schmidt, J., Culham, D. & Robb, J. 1991. Potential use of PCR-ampli®ed ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of Verticillium wilt pathogens. Physiologic and Molecular Plant Pathology 39: 1±12.
15. Paule, M. R. and Lofquist AK. 1996. Organization and expression of eukaryotic ribosomal RNA genes. In Ribosomal RNA: structure, evolution, processing, and function in proteinbiosynthesis (ed. R. A. Zimmerman & A. E. Dahlberg), pp.395–420. New York: CRC Press.
16. Reeder, R. H. 1990.rRNA synthesis in the nucleolus. *Trends Genet*. 6, 390–394.
17. Stubbs, R. W. 1985. Stripe rust. *In* Cereal rusts. Vol. II. Disease, distribution, epidemiology, and control. *Edited by* A.P. Roelfs and W.R. Bushnell. Academic Press, New York. pp. 61–101.
18. Takamatsu, S. 1998. PCR applications in fungal phylogeny. In Applications of PCR in Mycology (P. D. Bridge, D. K. Arora, C. A. Reddy & R. P. Elander, eds): 125±152. CAB International,Wallingford.
19. Wellings, C. R. and McIntosh, R. A. 1990. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Australasia: pathogenic changes during the first 10 years. Plant Pathology (Oxford), 39: 316–325.
20. Zambino, P. J. & Szabo, L. J. 1993. Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. Mycologia 85: 401±414.

Archive of SID

www.SID.ir

The role of rDNA IGS1 in studing of genetic variability of Yellow rust disease agent,*Puccinia striiformis f.sp. tritici*

H. Rabbani Nasab[*] - M. Okhovat - M.Abbasi - M.Torabi - J. Mozaffari[1]

Abstract

Sequences of the intergenic spacer between the 28S and the 5S rDNA genes (IGS 1) were compared for six *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* isolates, of different geographic origins, virulence spectra and AFLP groups. Two PCR products (IGS 1A and IGS 1B, of 1.3 and 1.1 kb, respectively) were recovered from all spore multiplications. The analysis of IGS 1A or IGS 1B showed that a low mutational polymorphism existed among the six isolates (from 0 to 1.5%). The comparison of IGS 1A and IGS 1B to each other showed that the polymorphism between the two types of IGS was due to a length polymorphism consisting of about 200 bp insertion/deletion located in the repeated region. Two hypotheses can be proposed to explain the coexistence of two different IGS 1 types within one isolate : either each nucleus of this dikaryotic fungus contains one type of IGS 1 or there are two discrete ribosomal units resulting from recombination in the same nucleus.

Key words: Intergenic spacer, rDNA, *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*

Archive of SID

* Corresponding author Email: Hrabbani wsr@yahoo.com
1. Contribution from College of Agriculture, University of Tehran and Seed&plant improvement Institue

www.SID.ir