

تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ *Gaeumannomyces graminis var tritici* در استان کرمانشاهGenetic Diversity in Population of *Gaeumannomyces graminis var. tritici* Sampled from Kermanshah Provinceمریم یوسفوند^۱، سعید عباسی^{۲*}، کیانوش چقامیرزا^۳ و صحبت بهرامی نژاد^۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۹

چکیده

بیماری پاخوره غلات ناشی از *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & Oliver مخرب‌ترین بیماری ریشه‌ی غلات در سراسر جهان است که از نقاط مختلف کشور از جمله استان کرمانشاه گزارش شده است. در این مطالعه، طی فصل زراعی ۸۹-۸۸، بیش از ۳۰۰ مزرعه گندم و جو در نقاط مختلف استان کرمانشاه مورد بازدید قرار گرفته و نمونه‌های آلوده که نشانه‌های خوشه سفیدی و سر سفیدی نشان می‌دادند جمع‌آوری گردید. پس از کشت و جداسازی قارچ‌های بیمارگر، وجود قارچ *G. graminis* در ۱۳۹ مزرعه گندم و جو به اثبات رسید که بیانگر شیوع بیماری پاخوره گندم در حدود نیمی از مزارع بازدید شده می‌باشد. از بین جدایه‌های به دست آمده، ۹۷ جدایه‌ی *G. graminis* با توزیع جغرافیایی مناسب جهت مطالعات بعدی انتخاب گردید. به منظور حصول اطمینان از صحت شناسایی جدایه‌های به دست آمده، از دو جفت آغازگر شامل NS5:GGA-RP و NS5:GGT-RP برای شناسایی و تفکیک واریته‌های بیمارگر استفاده شد. از بین ۹۷ جدایه‌ی مذکور، ۸۴ جدایه با تکثیر دو قطعه ۴۱۰ و ۴۰۰ جفت‌بازی به ترتیب توسط آغازگرهای NS5:GGT-RP و NS5:GGA-RP، به عنوان *G. graminis var. tritici* شناسایی شدند، اما در سایر جدایه‌ها آغازگرهای مذکور قادر به تکثیر هیچ قطعه‌ای نبودند. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *G. graminis* عامل بیماری پاخوره غلات، ۵۴ جدایه با در نظر گرفتن پراکنش جغرافیایی انتخاب و با استفاده از روش انگشت نگاری مولکولی ISSR مورد مطالعه قرار گرفتند. از مجموع ۲۰ آغازگر ISSR، ۱۰ آغازگر که چندشکلی و تکرارپذیری بالایی نشان دادند، برای تکثیر DNA جدایه‌های منتخب به کار گرفته شدند. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل، جدایه‌ها را به سه گروه تقسیم نمود؛ اما هیچ ارتباط روشن و واضحی بین گروه‌بندی خوشه‌ای و پراکنش جغرافیایی جدایه‌ها وجود نداشت. نتایج این مطالعه نشان داد که نشانگر ISSR نشانگر مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی در جدایه‌های *G. graminis var. tritici* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: انگشت نگاری ژنومی، پوسیدگی، جو، طوقه و ریشه گندم

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳. دانشیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه

* نویسنده مسوول Email: abbasikhs@yahoo.com

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشگاه رازی می‌باشد.

مقدمه

از میکروارگانسیم‌های همستیز، شخم عمیق، کنترل شیمیایی، استفاده از ارقام متحمل و تناوب زراعی اشاره کرد. هرچند هیچ‌یک از این روش‌ها در مهار کامل بیماری موفق نبوده‌اند؛ ولی در مجموع، تناوب زراعی روشی مناسب برای مهار بیماری قلمداد گردیده است. تیلسان و همکاران؛ متری و همکاران (Tilson et al., 2005; Mathre et al., 1998). مدیریت موفق بیماری، مستلزم تعیین واریته‌های بیمارگر در منطقه، شناخت کافی از نحوه انتشار بیماری و میزان تنوع پذیری در جمعیت بیمارگر می‌باشد. شناسایی واریته‌های عامل بیماری پاخوره در منطقه، امکان تصمیم‌گیری در خصوص انتخاب گیاهان مناسب جهت تناوب کشت را فراهم ساخته و مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی بیمارگر در جدایه‌های مناطق مختلف و بررسی انطباق تنوع ژنتیکی با پراکنش جغرافیایی جدایه‌های بیمارگر، به شناخت ما از چگونگی انتشار بیماری کمک فراوانی خواهد کرد. استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA روش جدید و سریعی در مطالعات تنوع ژنتیکی برای بدست آوردن بینشی در مورد ساختار پیچیده جمعیت قارچ‌هایی نظیر *G. graminis* می‌سازد، می‌باشد. *باول و دابرونا* (Bavol and Dubrovna, 2009). در این میان، توالی‌های بین ریزماهواره Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) یک نشانگر مولکولی نیمه تصادفی است. *بارنت و برانچارد* (Bornet and Branchard, 2001) که نخستین بار توسط *زیتکویچ و همکاران*، 1994 (Zietkiewicz et al., 1994) ابداع شد. تکثیر در این نشانگر در حضور یک آغازگر مکمل با توالی‌های SSR یا ریزماهواره هدف انجام می‌پذیرد و تنوع حاصل از فراورده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تابعی از تعداد واحدهای ریزماهواره‌هاست. از نشانگر ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها از جمله جدایه‌های *G. graminis* استفاده شده است (*باول و دابرونا*، 2009).

مطالعه حاضر با هدف شناسایی واریته‌های بیمارگر در مزارع گندم و جو استان کرمانشاه و بررسی میزان تنوع ژنتیکی درون واریته‌ی *G. g. var. tritici* با استفاده از نشانگرهای ISSR به اجرا درآمد.

بیماری پاخوره که توسط گونه‌ی *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & Olivier ایجاد می‌شود، یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های غلات دانه‌ریز محسوب می‌شود. خسارت چشمگیر بیماری پاخوره، سبب شده تا قارچ عامل بیماری در ردیف یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد در محصولات کشاورزی قرار گیرد. *کوک؛ الیوت و لندشوت* (Cook, 2003; Elliott and Landschoot, 1991). به اعتقاد برخی از محققین، پاخوره گندم پس از زنگ سیاه، دومین بیماری مخرب گندم در جهان محسوب می‌شود. *ترولدنیر* (Trolldenier, 1981). *واکر* (Walker, 1981) بیماری پاخوره را نخستین بار در سال ۱۸۲۳ به‌عنوان یکی از بیماری‌های گیاهان گرامینه در سوئد توصیف نمود. در ایران، این بیماری اولین بار در سال ۱۳۶۷ از مزارع دشت ناز ساری و همچنین سایر مناطق استان مازندران و گرگان توسط فروتن و همکاران (۱۳۶۸) گزارش شد و در حال حاضر وجود این بیماری در اغلب مناطق کشور از جمله استان کرمانشاه به اثبات رسیده است (صفایی و همکاران، ۱۳۸۶). خسارت بیماری در برخی از مزارع آلوده در کشور تا ۸۰ درصد نیز برآورد شده است (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۷).

قارچ *Gaeumannomyces* دارای هفت گونه‌ی شناخته شده است که هر کدام دارای دامنه‌ی میزبانی متفاوتی هستند. *فریمن و وارد؛ راجدوانگ* (Freeman and Ward, 2004; Rachdowang, 1999). مهم‌ترین گونه‌ی آن گونه‌ی *G. graminis* دارای چهار واریته‌ی شناخته شده شامل *G. g. var. tritici*، *G. g. var. avenae*، *G. g. var. maydis* و *G. g. var. graminis* می‌باشد. هر یک از این واریته‌ها دارای طیف میزبانی متفاوتی هستند. واریته‌ی *G. g. var. tritici* عامل اصلی پاخوره‌ی گندم است که به جو، تریتیکاله و چاودار نیز حمله می‌کند، اما قادر به ایجاد آلودگی در یولاف نیست. واریته‌ی *G. g. var. avenae* علاوه بر میزبان‌های فوق، یولاف را نیز مورد حمله قرار می‌دهد. واریته‌ی *G. g. var. maydis* اغلب به ذرت حمله می‌کند و واریته‌ی *G. g. var. graminis* برخی علف‌های گرامینه، برموداگراس و برنج را مورد حمله‌ی خود قرار می‌دهد. *فریمن و وارد*، 2004؛ *فولی و همکاران* (Fouly et al., 1996). گسترده بودن دامنه‌ی میزبانی، انتشار وسیع جغرافیایی و قدرت بقا از یک سو و پیچیدگی محیط خاک که موجب ناکارآمدی کنترل شیمیایی می‌شود، مدیریت و مهار این بیماری را بغرنج ساخته است. روش‌های زیادی برای کنترل و مهار این بیماری معرفی شده است که از آن جمله می‌توان به از بین بردن بقایای گیاهی و علف‌های هرز، استفاده

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های آلوده

به منظور جمع‌آوری نمونه‌های آلوده به بیماری پاخوره غلات، طی فصل زراعی ۹۰-۸۹، از ۳۰۷ مزرعه‌ی گندم و جو در مناطق مختلف استان کرمانشاه شامل شهرستان‌های کرمانشاه، دالاهو، اسلام‌آباد، ثلاث باباجانی، گیلانغرب، سرپل ذهاب، روانسر، جوانرود، پاره، بیستون، هرسین، صحنه، سنقر و کنگاور در زمان ظهور سنبله بازدید به عمل آمد و از گیاهان مشکوک به آلودگی که حالت خوشه سفیدی داشتند، نمونه برداری صورت گرفت. نمونه‌های آلوده پس از حذف قسمت‌های اضافی در داخل پاکت‌های کاغذی قرار داده شده و ضمن ثبت مشخصات، در اسرع وقت جهت کشت نسوج آلوده و جداسازی بیمارگر به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی بیمارگر

نمونه‌های آلوده ابتدا کاملاً با آب شستشو داده شدند تا گل و لای و آلودگی‌های سطحی آن‌ها حذف شوند. سپس با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی گردیده و قطعاتی از بافت آلوده درون تشتک‌های پتری روی محیط آب آگار یا عصاره سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام سولفات استرپتومایسین قرار داده شدند. تشتک‌های پتری سپس در ژرمیناتور و در دمای ۲۵°C نگهداری شده و به صورت روزانه مورد بازدید قرار گرفتند. پس از ظهور پرگنه‌های قارچی، ضمن مشاهده حاشیه‌ی پرگنه در حال رشد قارچ در زیر استریومیکروسکوپ، یک نوک ریشه‌ی منفرد برداشته شده و به محیط کشت PDA انتقال داده شد (فریدمن و وارد، ۲۰۰۴).

شناسایی جدایه‌های بیمارگر

شناسایی مقدماتی جدایه‌های بیمارگر، با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی پرگنه، نحوه رشد و شکل انشعابات میسلیوم صورت گرفته و در مرحله بعد توانایی تولید پریتسیوم و هیفوپودیوم مورد بررسی قرار گرفت. با این حال بمنظور حصول اطمینان از صحت تشخیص جدایه‌ها، از آغازگرهای اختصاصی استفاده گردید.

DNA ژنومی ۹۷ جدایه‌ی قارچی که در شناسایی مقدماتی بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناسی، متعلق به گونه‌ی *G. graminis* شناخته شده بودند (جدول ۱)، مطابق روش توماس (Thomas, 2004) استخراج گردید. کیفیت DNA استخراج شده با الکتروفورز و غلظت آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Cary 100scan (varian) مورد سنجش قرار گرفت.

برای تشخیص وارپته‌ی جدایه‌های قارچی و تأیید تعلق آن-ها به گونه‌ی *G. graminis* از آغازگرهای اختصاصی شامل آغازگرهای NS5:GGA-RP و NS5:GGT-RP استفاده شد. فولی و ویکنسون، ۲۰۰۰ (Fouly and Wilkinson, 2000). سه جدایه مربوط به قارچ‌های *Pythium aphanidermatum*، *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* به نیز به‌عنوان شاهد منفی در این آزمون شناسایی مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Corbett Research, Australia) در حجم ۲۵ μl شامل ۲/۵ μl بافر dNTPs mix ۰/۵ μl، (۵۰ mM) MgCl₂ ۱/۶ μl، PCR(10x) (۱۰ mM)، ۱/۵ μl از هر یک از آغازگرهای بالا دست (NS5: 5'AACTTAAAGGAATTGACGGAAG3' یا (GGT-RP: 5'TGCAATGGCTTCGTGAA3') (GGA- RP: 5'TTTGTGTGTGACCATAC3') ساخت شرکت ژن فناوری با غلظت ۱۰ پیکومول، ۳ μl از DNA نمونه (۱۰ ng/μl)، ۰/۲ μl آنزیم Taq DNA Polymerase (معادل یک واحد) و ۱۴/۲ μl آب دیونیزه سترون انجام گرفت.

تکثیر قطعات DNA طبق برنامه پیشنهادی فولی و ویکنسون، (۲۰۰۰) شامل واسرشتگی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۳°C و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۳°C به مدت یک دقیقه، اتصال در ۵۲°C، یک دقیقه، بسط در ۷۲°C، یک دقیقه و نهایتاً بسط نهایی در ۷۲°C به مدت پنج دقیقه به انجام رسید.

الکتروفورز محصولات PCR با ولتاژ ۱۲۰ و به مدت یک ساعت در ژل آگارز ۱/۴ درصد انجام شد. عکس برداری از ژل‌ها پس از رنگ‌آمیزی به کمک محلول اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه عکس برداری با سیستم UVP صورت گرفت. تشخیص مولکولی جدایه‌ها و شناسایی وارپته بیمارگر بر اساس وجود یا عدم وجود قطعات تکثیر شده و طول قطعات صورت گرفت.

آزمون ISSR-PCR

از بین جدایه‌های *G. g. var. tritici*، ۵۴ جدایه با پراکنش مناسب جغرافیایی از نقاط مختلف استان انتخاب و تنوع ژنتیکی آن‌ها با استفاده از تکنیک ISSR مورد آزمون قرار گرفت. از میان ۲۰ آغازگر ISSR که مقدمتاً مورد آزمون قرار گرفتند، ۱۰ آغازگر که تکرار پذیری و چندشکلی بیشتری نشان دادند، برای آزمون کلیه جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲).

جدول ۱: مشخصات جدایه‌های *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* به دست آمده از مناطق مختلف استان کرمانشاه
 Table 1: Characterization of the *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Isolates obtained from different regions of Kermanshah province

جدایه‌های مورد استفاده در مطالعه تنوع ژنتیکی Isolates used in the study of genetic diversity	محل جمع آوری Location	کد جدایه Isolates code	جدایه‌های مورد استفاده در مطالعه تنوع ژنتیکی Isolates used in the study of genetic diversity	محل جمع آوری Location	کد جدایه Isolates code
*	کوزران	G36	*	سرپل ذهاب	G1
*	کوزران	G37		ثلاث باباجانی	G2
*	کوزران	G38	*	سرپل ذهاب	G3
	کوزران	G39		گیلانغرب	G4
	کوزران	G40	*	گیلانغرب	G5
	کوزران	G41		گیلانغرب	G6
*	کوزران	G42		گیلانغرب	G7
	کوزران	G43	*	گیلانغرب	G8
	کوزران	G44		گیلانغرب	G9
	کوزران	G45		روستای فرامان	G10
	کوزران	G46	*	نجیوران	G11
*	کوزران	G47		قزاقچی	G12
	کوزران	G48	*	قزاقچی	G13
	جاده روانسر - پاه	G49		قزاقچی	G14
*	جاده روانسر - پاه	G50	*	قزاقچی	G15
	جوانرود	G51	*	قزاقچی	G16
	جوانرود	G52		قزاقچی	G17
*	کوزران	G53		قزاقچی	G18
*	کوزران	G54		قزاقچی	G19
	کوزران	G55	*	قزاقچی	G20
*	کوزران	G56	*	قزاقچی	G21
	کوزران	G57		قزاقچی	G22
	کوزران	G58	*	سراب قنبر	G23
	کوزران	G59	*	سراب قنبر	G24
*	جوانرود	G60	*	سراب قنبر	G25
	کوزران	G61		سراب قنبر	G26
	کوزران	G62	*	سراب قنبر	G27
*	ماهیدشت	G63		سراب قنبر	G28
*	بیستون	G64	*	سراب قنبر	G29
*	بیستون	G65		سراب نیلوفر	G30
*	بیستون	G66		سراب نیلوفر	G31
*	بیستون	G67	*	سراب نیلوفر	G32
*	بیستون	G68		کوزران	G33
	بیستون	G69		کوزران	G34
	هرسین	G70		کوزران	G35
*	میان راهان	G85	*	هرسین	G71
	میان راهان	G86	*	هرسین	G72
*	سنقر	G87	*	هرسین	G73
*	سنقر	G88	*	هرسین	G74
*	سنقر	G89	*	ماهیدشت	G75
*	جاده‌ی اسلام آباد - کرنند	G90		ماهیدشت	G76
*	جاده‌ی اسلام آباد - کرنند	G91	*	ماهیدشت	G77

جدایه‌های مورد استفاده در مطالعه تنوع ژنتیکی Isolates used in the study of genetic diversity	محل جمع آوری Location	کد جدایه Isolates code
*	جاده‌ی گیلانغرب	G92
*	جاده‌ی گیلانغرب	G93
	جاده‌ی گیلانغرب	G94
	جاده‌ی کامیاران	G95
*	پاوه	G96
	اسلام آباد	G97

جدایه‌های مورد استفاده در مطالعه تنوع ژنتیکی Isolates used in the study of genetic diversity	محل جمع آوری Location	کد جدایه Isolates code
*	اسلام آباد	G78
*	جاده‌ی صحنه	G79
*	درود فرامان	G80
*	درود فرامان	G81
*	درود فرامان	G82
*	درود فرامان	G83
*	درود فرامان	G84

نتایج

شناسایی و تعیین وارپته‌ی جدایه‌های بیمارگر

از مجموع ۳۰۷ مزرعه‌ی مورد بازدید در ۱۴ شهرستان استان کرمانشاه، در ۱۳۹ مزرعه متعلق به ۱۲ شهرستان، وجود *G. graminis* به اثبات رسید که بیانگر شیوع بیماری پاخوره گندم در حدود نیمی از مزارع بازدید شده می‌باشد. چنان‌که پیش‌تر اشاره شد، از بین جدایه‌های به‌دست آمده، ۹۷ جدایه با پراکنش جغرافیایی مناسب انتخاب و برای تأیید صحت شناسایی جدایه‌ها و تعیین وارپته‌ی آن‌ها از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد.

آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده شامل یک بالادست NS5 و دو فرو دست شامل GGT-RP و GGA-RP بودند؛ که بالادست NS5، برای هر فرودست به‌طور جداگانه مورد استفاده قرار گرفت. جفت آغازگر NS5:GGT-RP برای ۸۴ جدایه از مجموع ۹۷ جدایه‌ی مورد آزمون، فقط یک باند در محدوده‌ی ۴۱۰ جفت‌باز تولید نمودند، اما در محدوده ۳۰۰ جفت‌باز هیچ بانندی مشاهده نشد (شکل ۱). آغازگرهای NS5:GGA-RP برای جدایه‌های مذکور یک باند در محدوده‌ی ۴۰۰ جفت‌باز تولید کردند. مطابق شکل ۱، در این آزمون، برای ۱۳ جدایه، هیچ بانندی مشاهده نشد.

نتایج حاصل از تکثیر DNA جدایه‌های منتخب با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی، ضمن تأیید شناسایی ۸۴ جدایه، نشان داد که جدایه‌های مورد آزمون به وارپته‌ی *G. g. var. avenae* تعلق داشته و وارپته‌ی *G. g. var. tritici* در بین جدایه‌های جمع‌آوری شده وجود ندارد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمون ISSR-PCR

همان‌طورکه قبلاً اشاره شد، از بین جدایه‌های *G. g. var. tritici* ۵۴ جدایه با پراکنش مناسب جغرافیایی از نقاط

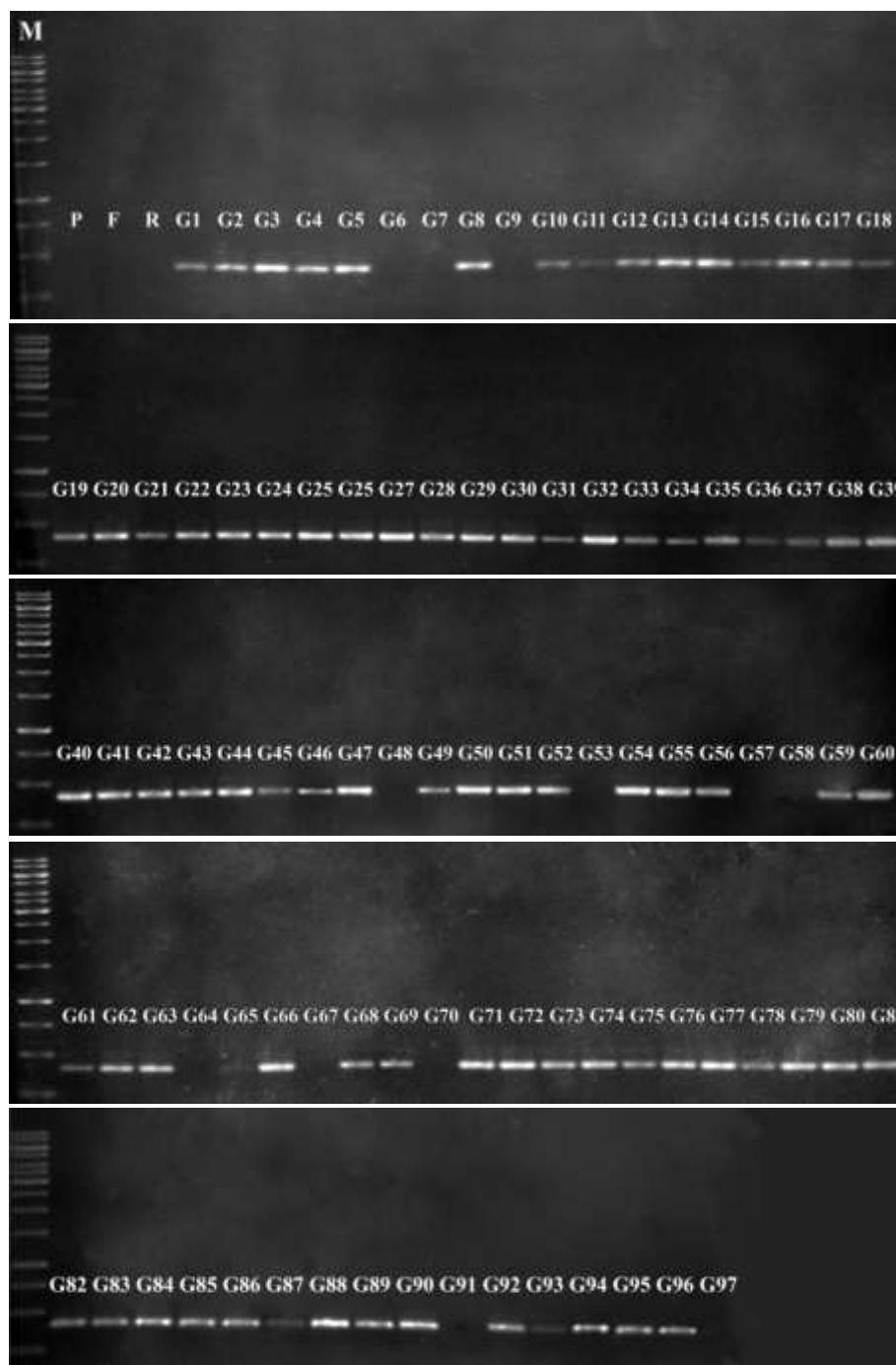
برای آغازگرهای ISSR واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری برای هر جدایه، شامل ۲/۵ μl بافر (10X) PCR، ۲/۵ μl dNTP (10mM)، ۰/۵ μl MgCl₂ (۵۰ mM)، ۱/۶ μl آغازگر (10μM)، ۰/۲ μl آنزیم Taq DNA Polymerase (معادل یک واحد)، ۱۵/۲ μl آب دیونیزه سترون و ۲/۵ μl از نمونه DNA (10ng/μl) هر یک از جدایه‌ها صورت گرفت. برای کنترل منفی ۲/۵ μl آب دیونیزه سترون به جای DNA نمونه مصرف گردید. تکثیر قطعات DNA به‌صورت یک چرخه مقدماتی شامل مراحل واسرشتگی مقدماتی ۵ دقیقه در ۹۴°C، واسرشت‌سازی ۲۰ ثانیه در ۹۴°C، اتصال ۱ دقیقه در ۴۰-۵۶°C، بسط ۲۰ ثانیه در ۷۲°C و به دنبال آن تکرار ۴۰ چرخه و بسط نهایی ۶ دقیقه در ۷۲°C صورت گرفت. الکتروفورز محصولات PCR در هر مورد، با شدت ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت با ژل آغاز ۱/۲ درصد و بافر TBE به مدت یک ساعت و نیم انجام شد. رویت و عکس‌برداری از نوارهای حاصل، با استفاده از اتیدیوم‌بروماید و زیر نور UV انجام پذیرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمون ISSR-PCR

پس از ظهور ژل، برای نوارهای واضح و تکرارپذیر عدد یک و برای عدم وجود نوار در ردیف هم‌وزن، عدد صفر منظور گردید. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی با استفاده از نرم‌افزارهای GenAlex ver 6.1، NTSYSpc ver 2.02، VSP ver 3.131 به روش Centroid و براساس ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت. پیکال و اسموس (Peakall and Smouse, 2006) برای مشاهده فواصل بین جدایه‌ها به صورت دو بعدی، از آنالیز تجزیه به مختصات اصلی PCoA به‌عنوان مکمل روش خوشه بندی استفاده شد.

تکرارپذیری و چند شکلی بیشتری نشان دادند، انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر در جدول ۲ ارائه شده است.

مختلف استان انتخاب و تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از تکنیک ISSR مورد آزمون قرار گرفت. به این منظور از میان ۲۰ آغازگر ISSR آزمون شده، تعداد ۱۰ آغازگر که



شکل ۱: الگوهای باندهای حاصل از تکثیر DNA ۹۷ جداییه *Gaeumannomyces graminis* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی NS5:GGT-RP

M: نشانگر اندازه (1 Kb)؛ P، F و R: به ترتیب *Pythium aphanidermatum*، *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* به عنوان شاهد منفی

Fig.1: Banding patterns produced by DNA amplification of 97 isolates of *Gaeumannomyces graminis* using *G. graminis*-specific primer sets NS5:GGT-RP. First lane (M): DNA ladder (1 Kb); P, F and R: *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* respectively as negative controls

جدول ۲: درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات ۱۰ آغازگر مورد استفاده برای انگشت‌نگاری ژنومی ۵۴ جدایه *Gaeumannomyces*

graminis var. *tritici* با استفاده از تکنیک ISSR-PCR

Table 2: Percentage of polymorphic bands and polymorphic information content generated by 10 ISSR markers used to fingerprint genetic diversity among 54 isolates of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

نام آغازگر Primer	۳'→۵'	دمای اتصال آغازگر °C Annealing Temperature	PIC ²	MI ¹	تعداد کل باندها Total Bands	تعداد باند چندشکل The number of Polymorphic Bands
UBC 807	(AG) ₈ T	53	0/35	5/26	15	15
UBC 868	(GAA) ₆	54	0/32	5/20	16	16
UBC 884	HBH(AG) ₆	51	0/37	4/86	13	13
UBC 866	(CTC) ₆	50	0/31	4/40	14	14
UBC 873	(GACA) ₃ GAC	50	0/31	5/96	19	19
UBC 856	(AC) ₈ YA	51	0/33	6/60	20	20
UBC 818	C(AC) ₇ AG	52	0/38	5/32	14	14
UBC 860	(TG) ₉ RA	50	0/32	3/94	12	12
UBC 855	(AC) ₃ (CA) ₃ CYT	56	0/31	4/15	13	13
UBC 864	(ACTG) ₄	50	0/27	3/62	13	13
میانگین Average			0/32	4/93	14/9	14/9

۱. شاخص نشانگر، ۲. چند شکل محتوای اطلاعاتی

1.Marker Index , 2. Polymorphic Information Content

تجزیه واریانس مولکولی ISSR

دندروگرام حاصل از گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگر ISSR به روش Centroid بر اساس ضریب تشابه جاکارد ترسیم گردید (شکل ۲-a) که ضریب کوفنتیک بر اساس این ضریب ۰/۶۶ به دست آمد. به منظور تعیین تعداد مطلوب و تعیین بهترین نقطه برش دندروگرام، تجزیه واریانس مولکولی داخل و بین گروه‌ها و محاسبه شاخص Φ به روش AMOVA و براساس داده‌های نشانگر ISSR صورت گرفت که نتایج آن در جدول ۴ آورده شده است. در این روش بهترین نقطه برش نقطه‌ای است که نسبت به سایر نقاط برش بالاترین مقدار Φ را دارا باشد که بر این اساس سه گروه برای دندروگرام حاصل از نشانگر ISSR تشخیص داده شد. در تجزیه واریانس مولکولی با احتساب گروه‌بندی ناحیه‌ای درصد واریانس بین گروه‌ها هشت درصد در حالی که واریانس داخل جمعیت‌ها ۹۲ درصد به دست آمد. پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز مؤید همین مطلب می‌باشد (شکل ۲-b).

از مجموع الگوهای باندهای ISSR، ۱۴۹ جایگاه ژنی حاصل شد که همگی چندشکل بودند. بیش‌ترین جایگاه ژنی چند شکل توسط آغازگر UBC 856 (۲۰ جایگاه ژنی) و کم‌ترین آن توسط آغازگر UBC 860 (۱۲ جایگاه ژنی) حاصل شد. در بین این آغازگرها، آغازگر UBC856 بالاترین قدرت تفکیک را به خود اختصاص داد. بیش‌ترین مقدار PIC معادل ۰/۳۸ و مربوط به آغازگر UBC818 و کم‌ترین میزان آن ۰/۲۷ و مربوط به آغازگر UBC864 و میانگین PIC محاسبه شده در این تحقیق ۰/۳۲ بود. بالا بودن میزان PIC در این مطالعه نشان‌دهنده کارایی آن‌ها در تمایز جدایه‌ها می‌باشد. شاخص نشانگر براساس نوارهای چندشکل برای هر آغازگر محاسبه شد که از ۳/۶۲ تا ۶/۶۰ متغیر بود. بیش‌ترین مقدار شاخص نشانگر ۶/۶۰ و مربوط به آغازگر UBC856 بود که نشان دهنده کارایی بالای این آغازگر در تعیین چندشکلی می‌باشد. آغازگر UBC864 با شاخص نشانگری ۳/۶۲ کارایی چندانی در مقایسه با سایر آغازگرها نداشت.

جدول ۳: تجزیه واریانس مولکولی برای ۵۴ جدایه از قارچ *Gaeumannomyces graminis* براساس داده‌های ISSR

Table 3: Analysis of molecular variance (AMOVA) for 54 isolates of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* based on ISSR data

Φ	درصد واریانس کل % Of total Variance	واریانس اجزاء Variance Components	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی Degree of freedom	منبع تغییر Source of variation
$\Phi_{ST}=0.079$	٪8	2.380	139.552	2	بین جمعیت‌های داخل گروه‌ها Between Populations
	٪92	27.647	1409.985	51	داخل جمعیت‌ها Within Populations
		30.026	1549.537	53	کل Total

بعید به نظر می‌رسد. از این رو، کشت یولاف به‌عنوان یک غله‌ی جایگزین به‌منظور مهار بیماری و در عین حال حفظ سطح تولید غلات قابل توصیه خواهد بود.

در این مطالعه، به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی *G. g. var. tritici* عامل بیماری پاخوره، ۵۴ جدایه از میان ۹۷ جدایه به‌دست آمده انتخاب و توسط نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که جمعیت بیمارگر از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار می‌باشد که احتمالاً بخشی از این تنوع از پایین بودن فشار انتخاب در جمعیت این بیمارگر ناشی می‌شود. از آن جایی که تاکنون هیچ رقم مقاومی برای مهار بیماری پاخوره شناخته نشده است. /شر و شیپتون؛ اسکات و هالینز (Asher and Shipton, 1981; Scott and Hollins, 1997) تغییر ارقام غلات کشت شده در استان، موجب اعمال فشار انتخاب که می‌تواند بخشی از جمعیت بیمارگر را حذف و در نتیجه موجب کاهش تنوع ژنتیکی در بیمارگر شود، نشده است. همچنین عدم استفاده از روش کنترل شیمیایی نیز سبب شده تا از این طریق نیز هیچ‌گونه فشار انتخابی متوجه بیمارگر نباشد.

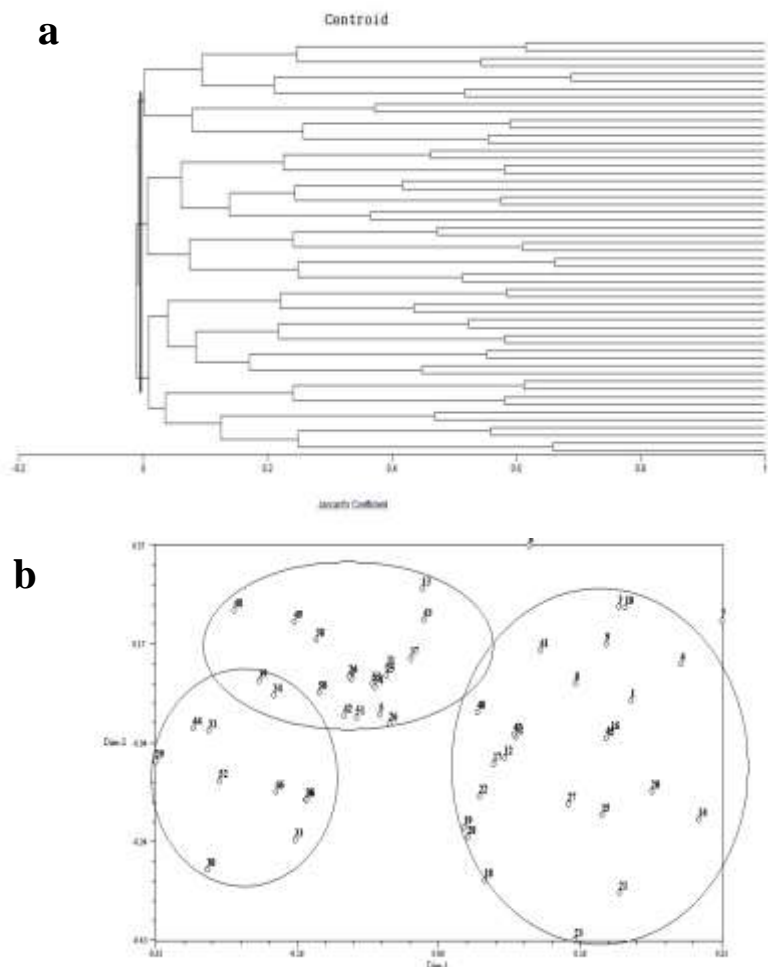
از آنجایی که نامتقارن بودن دندروگرام، گروه‌بندی را دچار ایراد می‌کند محمدی و همکاران (Mohammadi et al., 2008)، در این مطالعه، جهت ترسیم دندروگرام الگوریتم‌های مختلف بررسی شدند. در نهایت دندروگرامی با حداقل میزان اثر زنجیره‌ای (Chainig effect) برای گروه‌بندی انتخاب شد. چنان‌که اشاره شد دندروگرام به‌روش Centroid براساس ضریب تشابه جاکارد ترسیم گردید که ضریب کوفنتیک براساس این ضریب ۰/۶۶ به‌دست آمد. پایین بودن ضریب کوفنتیک در داده‌های مولکولی، البته نشان‌دهنده برآزش نامناسب داده‌ها با دندروگرام نمی‌باشد، بلکه می‌تواند در اثر عواملی مانند ماهیت داده‌ها از جمله وجود تنوع در آن‌ها یا کم بودن توزیع نشانگرها در ژنوم باشد. رودریگز و همکاران (Rodrigues et al., 2002).

دندروگرام حاصل، جدایه‌ها را در سه گروه قرار داد. این نتایج نشان دادند که براساس ضریب تشابه جاکارد جدایه‌های موجود در کلاسترهای یک و دو، دو و سه بیشترین شباهت ژنتیکی و جدایه‌های قرار گرفته در کلاستر یک و سه کمترین شباهت ژنتیکی را دارا هستند. همچنین تطابق چندانی بین جدایه‌ها و منطقه جغرافیایی در تجزیه کلاستر مشاهده نشد.

بحث

در این مطالعه، از مجموع ۹۷ جدایه‌ی قارچ *G. graminis* که براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی شناسایی شده بودند، برای ۸۴ جدایه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی NS5:GGT-RP و NS5:GGA-RP به‌ترتیب یک باند ۴۱۰bp و یک باند ۴۰۰bp تولید شد. جدایه‌های مذکور، بر این اساس به‌عنوان واریته‌ی *G. g. var. tritici* شناخته شدند؛ اما برای ۱۳ جدایه‌ی باقیمانده هیچ بانندی مشاهده نشد. عدم تکثیر DNA جدایه‌های مذکور می‌تواند ناشی از ناتوانی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر DNA همه جدایه‌ها باشد. عدم قطعیت در تکثیر DNA تمامی جدایه‌ها توسط آغازگرهای مذکور در مطالعات سایر محققین نیز به اثبات رسیده است (توماس، 2004).

در این مطالعه، هیچ یک از جدایه‌های شناسایی شده به واریته‌ی *G. g. var. avenae* تعلق نداشته و لذا انتظار می‌رود قادر به ایجاد بیماری در یولاف نباشند. یولاف به‌دلیل داشتن ساپونین ضدقارچی موسوم به اوناسین در ریشه خود از حمله بسیاری از بیمارگرها جلوگیری می‌کند؛ اما واریته‌ی *G. g. var. avenae* به دلیل داشتن آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی ساپونین، یولاف را نیز مورد حمله قرار می‌دهد. بویر و همکاران، اسبورن و همکاران (Bowyer et al., 1995; Osbourn et al., 1994). به هر حال، براساس نتایج این مطالعه، تمامی جدایه‌ها به واریته *G. g. var. tritici* تعلق داشتند. لذا، حضور واریته‌ی *G. g. var. avenae* در مزارع استان کرمانشاه



شکل ۲: a- دندروگرام ترسیم شده براساس روش Centroid برای ۵۴ جدایه منتخب *Gaeumannomyces graminis* با استفاده از تلفیق داده‌های حاصل از الگوهای باندهای ISSR و b- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتریس تشابه جاکارد

Fig. 2: A dendrogram depicting genetic relationship among 54 isolates of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* produced based on ISSR data, using Centroid method- Biplot obtained from principal components analysis using Jaccard's similarity matrix

زمین‌های زیر کشت محصولات زراعی به‌ویژه غلات را آلوده سازد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه سرکار خانم دکتر لیلا زارعی در اجرای این پژوهش قدردانی نمایند.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲۴-۲۵ متن انگلیسی مراجعه شود.

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که نشانگر ISSR، نشانگر مناسبی جهت مطالعات تنوع ژنتیکی در جمعیت *G. graminis* می‌باشد. این نشانگر توسط محققین دیگر نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *G. graminis* مورد استفاده قرار گرفته است (باول و دابرونا، ۲۰۰۹).

نتایج تجزیه کلاستر داده‌های حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های منتخب *G. graminis* با استفاده از نشانگر ISSR، نشان داد که تطابق آشکاری بین تنوع ژنتیکی و پراکنش جغرافیایی جدایه‌ها وجود ندارد. گروه‌بندی جدایه‌هایی با موقعیت جغرافیایی دور از هم می‌تواند ناشی از انتقال بیمارگر از نقطه‌ای به نقطه دیگر باشد. از آنجایی که قارچ عامل بیماری یک قارچ خاک‌زاد است، می‌تواند از طریق خاک به کمک ادوات کشاورزی و یا آب آبیاری به سایر مناطق سرایت کرده و