مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت های *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* در ایران با استفاده از نشانگر AFLP*

Study of genetic diversity in *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* populations using AFLP markers

حجت‌اله ربانی نسب، سید محمود اخوت، محمد ترابی، قربانعلی حجارود، عباس شریفی‌تهرانی، جواد مظفری و مهرداد عباسی**

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، واحد پاتولوژی غلات موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج و موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

دریافت ۱۳۸۶/۳/۳۰ پذیرش ۱۳۸۷/۸/۸

چکیده

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* عامل بیماری زنگ زرد گندم، با استفاده ار نشانگر AFLP، ۸۶ جدایه درطول فصل زراعی ۸۴-۸۳ جمع‌آوری و تکثیر شد. پس از استخراج DNA واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از چهار ترکیب آغازگر AFLP انجام شد. محصولات تکثیری بر روی ژل پلی اکریل آمید تفکیک و پس از رنگ‌آمیزی، امتیازدهی و تجزیه خوشه‌ای براساس ۹۷ نشانگر چندشکل انجام شد. تنوع ژنتیکی موجود در بین جمعیت‌ها برای تفکیک آن‌ها از یکدیگر کافی بوده است. نتایج نشان داد جمعیت‌های گلستان و مازندران یک دودمان کلونال هستند. نزدیکی ژنتیکی بین جدایه‌های جنوب و شمال غرب احتمال وجود جریان ژنی بین این مناطق را نشان می‌دهد. جمعیت کرج کاملا متمایز از سایر جمعیت‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: زنگ زرد، گندم، تنوع ژنتیکی، AFLP

---

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه تهران

** مسئول مکاتبه

www.SID.ir

قارچ .*Puccinia striiformis* West. f.sp. *tritici* Eriks عامل زنگ زرد یا نواری گندم یکی از مهمترین و گسترده ترین بیماریهای گندم در جهان و از جمله ایران است. اپیدمی‌های طبیعی در مناطق شمالی و جنوبی ایران، به تناوب به وقوع پیوسته و بخصوص زمانی که بهار سرد و بارانی باشد، احتمال طغیان زنگ زرد بیشتر است. تحقیقات *بایلیس و همکاران* (Bayles *et al*. 2000) نشان داد که در بسیاری از موارد استفاده از ژنهای مقاومت اختصاصی به عنوان یک روش کنترلی موفقیت آمیز نبوده است، چرا که جمعیت بیمار گر به سرعت دستخوش تغییر شده و قادر است طی فقط چند سال بر ژنهای مقاومت غلبه نماید. بنابراین اطلاعات بیشتری در خصوص ساختار ژنتیکی جمعیت های طبیعی مورد نیاز است تا بتوان با در نظر گرفتن سایر فاکتورها از جمله میزبان یک روش مدیریتی پایدار و موثر را انتخاب نمود. توانائی محققین برای گسترش روشهای کنترلی موثر و پایدار علیه بیماریهای گیاهی قویا بر اساس دانش ساختار جمعیت بیمار گر و قابلیت سازگاری آن با ارقام جدید استوار است. *هافمولر* و همکاران (Hovmoller *et al.* 2002)، *هافمولر* (Hovmoller 2001) و *جوستسن* و همکاران (Justesen *et al.* 2002) تنوع ژنتیکی جمعیت‌های اروپایی زنگ زرد گندم را در یک مقیاس وسیع مورد مطالعه قرار داده، مهاجرت در مسافت های طولانی، جریان ژنی و امکان تبادل جمعیت‌ها بین کشورهای انگلیس، دانمارک و فرانسه را از عوامل اصلی تنوع ژنتیکی موجود گزارش نموده‌اند. نشانگرAFLP برای مطالعه جمعیت هائی که تنوع ژنتیکی پائینی دارند بسیار مناسب است؛ چون تکنیک AFLP تعداد زیادی نشانگر های تکرار پذیر فراهم می نماید. *وان در لی و همکاران* (Van der lee *et al.* 1997) و *میجر و همکاران* (Majer *et al*. 1996) نشانگر AFLP را برای مطالعه بسیاری از قارچها استفاده نموده و نتایج قابل توجهی بدست آوردند. در اروپای غربی یک تلاش گروهی برای مطالعه زنگ زرد گندم بر اساس نشانگرAFLP در حال انجام است. *هافمولر و همکاران* (۲۰۰۲) به کمک نشانگرAFLP نشان دادند که جمعیت های زنگ نواری گندم در شمال اروپا به صورت کلونال بوده و قابلیت مهاجرت درمسافت های طولانی را دارند. تحقیق حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های طبیعی عامل زنگ زرد گندم درایران با استفاده از نشانگر AFLP انجام شد .

Archive of SID

www.SID.ir

روش و بررسی

نمونه‌برداری از استانهای مازندران، گلستان، خوزستان، فارس، خراسان (شمالی و جنوبی، غرب و شمال غرب (شامل همدان، کرمانشاه، ایلام و اردبیل) و مرکز شامل (تهران و قزوین) که در طی فصل زراعی ۸۴–۸۵ زنگ زرد مشاهده شده بود، انجام شد. جدایه ها روی گندم رقم بولانی تکثیر شدند. اسپورها در دمای$4^{o}C$ به مدت ۲ روز بوسیله سیلیکاژل در دسیکاتور خشک شده تا زمان استخراج DNA در$-80^{o}C$ نگهداری شدند. پس از استخراج DNA بر اساس روش *لوریس و همکاران* (Lorys *et al.* 2002) کمیت و کیفیت DNA با استفاده از ژل آگاروز و اسپکتروفتومتر نانودراپ(Nano drop) اندازه‌گیری شد. نمونه‌هایDNA (۱۰۰ نانوگرم) پس از تیمار با دو آنزیم برشی *Eco*RI و *Mse*I و اتصال آدابتورها با دو آغازگر *Eco*RI و *Mse*I فاقد نوکلوئید های انتخابی تکثیر شدند. محصولات تکثیر اولیه پس از۲۰ بار رقیق شدن، با استفاده از ۴ ترکیب آغازگر *Eco*RI+GC-*Mse*I+AA، *Eco*RI+AC-*Mse*I+AG، *Eco*RI+GT-*Mse*I+GT و *Eco*RI+AG-*Mse*I+AC. به روش *لوریس و همکاران* (۲۰۰۲) الکتروفورز گردید و سپس تکثیر انتخابی شدند. محصولات تکثیری با استفاده از ژل واسرشته ساز پلی اکریل آمید ۶/۵ درصد و به روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد. برای هر ترکیب آغازگر الگوی نوارها به صورت دستی و با توجه به وجود یا عدم وجود نوارها امتیاز دهی شده و طول آنها با استفاده از نرم افزار Gene tools تخمین زده شد. فقط نشانگرهای واضح و تکرار پذیر بین ۱۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز برای تجزیه و تحلیل امتیاز دهی شدند. تجزیه داده ها با استفاده از روش UPGMA، ضریب شباهت Nei با کمک نرم افزار Pop-gene 32 انجام شد (Yeh *et al.* 1997) .

نتیجه و بحث

تکنیک AFLP یک انگشت نگاری DNA حاوی اطلاعات مفید با کیفیت خوب تولید نمود. بطور متوسط ۷۸/۲۵ نوار در محدوده ۱۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز به ازای هر ترکیب آغازگر در مجموع جمعیت ها شناسایی شد. بطور میانگین ۳۰/۹۷ درصد آنها چندشکل بودند. برای ترکیب های آغازگر *Eco*RI+GC-*Mse*I+AA، *Eco*RI+AC-*Mse*I+AG، *Eco*RI+GT-*Mse*I+GT ، *Eco*RI+AG-*Mse*I+AC به ترتیب ۷۵، ۸۱، ۸۹ و ۶۸ نوار شناسائی شد که به ترتیب دارای ۲۵

Archive of SID

www.SID.ir

(۳۱/۹۴ درصد)، ۲۶ (۳۳/۲۲ درصد)، ۲۹(۳۷ درصد) و ۱۷ (۲۱/۷۲ در صد) نوار چندشکل بودند. مجموعا ۹۷ نشانگر چندشکل برای ۸۶ جدایه مورد آزمایش ردیابی شد.

میانگین تنوع ژنتیکی برای تمامی جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه براساس ضریب Nei ، ۳۸٪ بود. نتایج نشان داد که شباهت ژنتیکی اکثر جمعیتها با جمعیت های غرب و شمال غرب بیشتر از ٦٥ درصد است و از طرفی اکثر جمعیت ها بیشترین فاصله ژنتیکی را با جمعیت های کرج / قزوین دارند(جدول یک). با توجه به اینکه شباهت ژنتیکی جمعیت های مازندران و گلستان بیش از ۹۰ درصد است به نظر می رسد که این دو جمعیت یک دودمان کلونال را تشکیل دهند. وجود ارقام یکسان در این دو منطقه، شرایط آب و هوایی نزدیک به هم احتمال نقش جریان ژن در کاهش تنوع ژنتیکی و به عبارت دیگر همسان سازی جمعیت‌ها را پررنگ می نماید. از طرفی علیرغم فاصله جغرافیایی طولانی بین اکثر جمعیت‌های شمال غرب کشور احتمال وجود جریان ژنی پلکانی بین جمعیت‌های مختلف با جمعیت شمال غرب را تایید می کند. نتایج این تحقیق با نتایج AFLP برای سایر قارچها سازگار است. برای مثال *میجر و همکاران*(Majer *et al*. 1998) از AFLP برای مطالعه پلی مورفیسم ژنتیکی ۷۹ جدایه مزرعه ای *Pyrenopeziza brassicae* در اروپا به کمک سه ترکیب آغارگر ٤٨ نشانگر چندشکل یافتند و ٢٤/٦ درصد از جایگاههای ژنی چندشکل بودند. *لوریس و همکاران* (۲۰۰۲) به کمک چهار ترکیب آغازگر، ٦٧ نشانگر چندشکل یافتند و ۲۰/۳ درصد از جایگاههای ژنی چندشکل بودند. *چن و همکاران* (Chen *et al*. 1993)، *هافمولر و همکاران* (۲۰۰۲)، و *استیل و همکاران* (Steele *et al*. 2001) تنوع ژنتیکی *P.striiformis* f.sp.*tritici* را با تعداد نسبتاً کمی از جدایه ها در یک مقیاس جغرافیایی وسیع مطالعه نموده‌اند که غالباً هم پلی مورفیسم قابل توجهی بدست نیامده است. در تحقیق حاضر جدایه‌های مربوط به هفت جمعیت از ۵۲ منطقه مختلف ایران و از روی ۲۵ رقم متفاوت جمع آوری شدند. نتایج این بررسی احتمال وقوع جریان ژن و مهاجرت اسپورها را در برخی مناطق اثبات می‌کند. وجود فاصله ژنتیکی زیاد بین جمعیت مرکز و سایر جمیعت‌ها احتمالاً به علت کافی نبودن تعداد جدایه های انتخابی از منطقه مرکز می باشد. به نظر می رسد، وجود تنوع ژنتیکی در جدایه های ایرانی بی تاثیر از جایگاه ایران به عنوان خاستگاه گندم و فراوانی خویشاوندان ژنتیکی میزبان نباشند .این وضعیت برای

Archive of SID

www.SID.ir

بیمارگرهای اجباری با اختصاص یافتگی میزبان نمود بیشتری دارد. *گودوین و همکاران* (Goodwin *et al.* 1992) نشان دادند که تنوع ژنتیکی *Phytophthora infestans* در مکزیک به عنوان خاستگاه اولیه سیب زمینی، بسیار بیشتر از تنوع مشاهده شده در ایرلند، حتی پس از اپیدمی شدید بیماری است. با توجه به تنوع ژنتیکی مشاهده شده برای جمعیت های ایران، اهتمام به کشت ارقام با ژنهای مقاومت متفاوت بویژه در مناطقی که جدایه های منتسب به آنها، شباهت ژنتیکی بیشتری باهم دارند، می‌تواند از طغیان بیمارگر تاحد زیادی جلوگیری نماید.

جدول ۱- شباهت ژنتیکی و فاصله ژنتیکی جمعیت های مورد مطالعه بر اساس ضریب Nei (Pop-gene 2.33)

Table 1. Genetic similarity and genetic distance of population according to Nei coefficient (Pop-gene 2.33)

Pop ID	Golestan	Khorasan	Fars	West/Nwest	Khuzestan	Mazandaran	center
Golestan	****	0.64	0.69	0.68	0.7	0.92	0.59
Khorasan	0.44	****	0.69	0.78	0.76	0.67	0.6
Fars	0.37	0.38	****	0.84	0.77	0.65	0.67
West/North west	0.38	0.25	0.17	****	0.77	0.66	0.74
Khuzestan	0.26	0.27	0.27	0.25	****	0.72	0.65
Mazandaran	0.08	0.4	0.43	0.41	0.32	****	0.56
center	0.53	0.51	0.4	0.29	0.42	0.58	****

* Nei's genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

سپاسگزاری

از پرسنل محترم واحد پاتولوژی غلات در موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر بویژه سرکار خانم زهره بیات و نسرین طلائی که در مراحل تکثیر و تعیین نژاد به اینجانب کمک نمودند، سپاسگزارم.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (23-21) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID
www.SID.ir

آدرس نگارندگان: حجت‌اله ربانی‌نسب، سید محمود اخوت، قربانعلی حجارود و عباس شریفی‌تهرانی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، محمد ترابی و جواد مظفری، موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، مهرداد عباسی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

Archive of SID

www.SID.ir