بررسی تنوع ژنتیکی *Mycosphaerella graminicola* عامل سپتوریوز برگ گندم در ایران با استفاده از نشانگرهای SSR ، SCAR و rep-PCR*

STUDY ON THE GENETIC DIVERSITY OF *MYCOSPHAERELLA GRAMINICOLA* CAUSE OF SEPTORIA LEAF BLOTCH OF WHEAT IN IRAN USING SSR, SCAR AND REP-PCR MARKERS

سولماز کمیجانی[1]**، محمد رضوی[2] و حشمت الله امینیان[1]

(تاریخ دریافت:۳۸۸/۲۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۵)

چکیده

به‌منظور بررسی تنوع و تعیین میزان قرابت ژنتیکی جدایه‌های *Mycosphaerella graminicola* عامل سپتوریوز برگ گندم از هفت استان کشور شامل گلستان، مازندران، کرمانشاه، ایلام، اردبیل، خوزستان و فارس برگ‌های آلوده از مزارع گندم جمع‌آوری و ۵۸ جدایه انتخاب و با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR وSCAR تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های مختلف قارچ در کشور برآورد گردید. با محاسبه فراوانی آلل‌های به‌دست آمده در مناطق مختلف، در کل کشور و بین مناطق مختلف میزان و توزیع تنوع ژنتیکی در ایران به‌دست آمد. میزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در کشور بین ۰/۲۵ تا ۰/۶۲ در نوسان بود. میانگین کل تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها ۴۴٪ بود که ۷۷٪ تنوع در داخل جمعیت‌های مورد بررسی و ۲۳٪ در بین جمعیت‌های مورد بررسی توزیع شده بود. سپس با استفاده از rep-PCR و آغازگرهای BOX 1AR و2 ERIC قطعاتی از DNA تکثیر شد. اندازه قطعات تکثیر شده بین ۱۰۰bp تا ۱۵۰۰bp در نوسان بود. نتیجه تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA نشان داد که جدایهSt20 از کرمانشاه و جدایه St29 از ایلام بیشترین تشابه (۱۰۰٪) را داشتند و احتمالاً هر دو جدایه از یک دودمان ژنتیکی هستند. بقیه جدایه‌ها از نظر ژنتیکی بیش از ۵۰٪ با یکدیگر متفاوت بودند.

واژه‌های کلیدی: نشانگرهای مولکولی، جمعیت، *Septoria tritici*

Archive of SID

---

* : بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: komijani_solmaz@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲. استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

www.SID.ir

مقدمه

سپتوریوز برگ گندم یکی از بیماری‌های مهم گندم در دنیا است (Shaner *et al.* 1975). این بیماری در صورت مساعد بودن شرایط آب و هوایی باعث ایجاد خسارت شدید در محصول گندم می‌گردد. میزان خسارت حاصل از این بیماری تحت شرایط مناسب از ۲۵ تا ۵۰ درصد در ارقام حساس گندم گزارش شده است (King *et al.* 1983). عامل بیماری قارچ *Mycosphaerella graminicola* (Fückel) J. Schröt and Cohn می‌باشد. این بیماری برای اولین بار توسط *دسمازیرس* (Desmaziers 1842) از فرانسه گزارش گردید و پس از آن از سایر نقاط دنیا گزارش شد. این بیماری در ایران اولین بار توسط *پتراک* و *اسفندیاری* (Petrak & Esfandiari 1941) گزارش شد و بعد از آن *شریف* و *ارشاد* (Sharif & Ershad 1966) وجود آن را از سایر مناطق گندم خیز کشور گزارش کردند (Torabi 1979). یکی از راه‌های توصیه شده برای کنترل این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. به‌منظور اصلاح و انتخاب ارقام مقاوم، آگاهی از وضعیت تنوع ژنتیکی و تعیین میزان قرابت ژنتیکی جدایه‌های قارچ عامل بیماری در داخل جمعیت‌های قارچ از اهمیت زیادی برخوردار است (McDonald *et al.* 1995). فرم جنسی قارچ اولین بار توسط Sanderson درسال ۱۹۷۲ در نیوزلند شناسایی شد، سپس از کشورهای استرالیا، برزیل، هلند، انگلیس وآمریکا (Eyal *et al.* 1987) و اخیراً از کانادا (Hoorne *et al.* 2002) گزارش گردید. با توجه به اهمیت زیاد و خسارت زا بودن این بیماری در استان‌های مختلف کشور و با توجه به این که اطلاع از ساختار ژنتیکی قارچ در اتخاذ راهبردهای مناسب برای مدیریت بیماری ضروری است لذا در این بررسی تلاش گردید با استفاده از نشانگرهای SSRs (Simple Sequence Repeats) و SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions) تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ، تعیین گردد و با استفاده از نشانگر rep-PCR (Repetitive element-based polymerase chain reaction) میزان قرابت ژنتیکی جدایه‌ها مشخص شود.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

در این بررسی نمونه‌های دارای علائم بیماری سپتوریوز برگ گندم در بهار سال ۱۳۸۴ به‌صورت تصادفی از کانون‌های آلوده به بیماری در کشور جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. از استان‌های مازندران، گلستان، خوزستان، فارس، اردبیل(مغان) و ایلام از هر کدام ۹ نمونه که از مناطق مختلف جغرافیایی آن استان جمع‌آوری شده بود، انتخاب گردید ولی از استان کرمانشاه به‌دلیل پایین بودن سطح آلودگی فقط چهار نمونه دریافت شد. مجموعاً تعداد ۵۸ جدایه در آزمایش‌ها منظور گردید (جدول ۱).

جداسازی و خالص‌سازی قارچ عامل بیماری

قارچ عامل بیماری از برگ‌های آلوده که دارای پیکنیدیوم قارچ بودند، جداسازی شد. قطعات دارای علائم هر برگ در شرایط کاملاً سترون ضدعفونی سطحی شده و. سپس هر سه یا چهار قطعه برگ در یک تشتک پتری حاوی محیط کشت آب آگار قرار داده شدند. بعد از ۲۴-۱۶ ساعت قطعات برگ در زیر بینوکولر بررسی شد، از پیکنیدیوم هایی که تولید اوز کرده بودند با کمک سوزن سترون، پیکنیدیوسپورهای قارچ به محیط کشت آب آگار۱/۵٪ (۱۵گرم آگار در یک لیتر آب) یا محیط کشت

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. مشخصات نمونه‌های برگ گندم آلوده به سپتوریوز جمع‌آوری شده از مناطق مختلف گندم‌کاری‌های کشور در سال ۱۳۸۴-۸۵

Table 1. Characteristics of isolates *Septoria tritici* leaf blotch of wheat sampled from different provinces of Iran during 2005-2006

شماره جدایه Isolate No.	محل جمع‌آوری Sampling Location	شماره جدایه Isolate No.	محل جمع‌آوری Sampling Location
St1	Golestan, Ghonbad	St16	Mazandarn, Ghaloghah
St2	Golestan, Ghonbad	St17	Mazandarn, Ghaloghah
St3	Golestan, Kalaleh	St18	Mazandarn, Ghaloghah
St4	Golestan, Ghonbad	St19	Kermanshah, Bistoon
St5	Golestan, Aghgala	St20	Kermanshah, Bistoon
St6	Golestan, Bandar Turkman	St21	Kermanshah, Bistoon
St7	Golestan, Ata Abad	St22	Kermanshah, Bistoon
St8	Golestan, Ghonbad	St23	Ilam, Dehloran
St9	Golestan, Bandar Turkman	St24	Ilam, Dehloran
St10	Mazandarn, Sari	St25	Ilam, Dehloran
St11	Mazandarn, Tirtash	St26	Ilam, Dehloran
St12	Mazandarn, Tirtash	St27	Ilam, Dehloran
St13	Mazandarn, Tirtash	St28	Ilam, Dehloran
St14	Mazandarn, Tirtash	St29	Ilam, Dehloran
St15	Mazandarn, Ghaloghah	St30	Ilam, Dehloran
St31	Ilam, Dehloran	St47	Ardebil, Pars Abad
St32	Khuzestan	St48	Ardebil, Pars Abad
St33	Khuzestan	St49	Ardebil, Pars Abad
St34	Khuzestan, Safiabad	St50	Fars, Norabad Mamasani
St35	Khuzestan, Andimeshk	St51	Fars, Norabad Mamasani
St36	Khuzestan, Safiabad	St52	Fars, Norabad Mamasani
St37	Khuzestan, Sardasht	St53	Fars, Norabad Mamasani
St38	Khuzestan, Sardasht	St54	Fars, Norabad Mamasani
St39	Khuzestan, Sardasht	St55	Fars, Firooz Abad
St40	Khuzestan, Sardasht	St56	Fars, Firooz Abad
St41	Ardebil, Bilasovar	St57	Fars, Firooz Abad
St42	Ardebil, Bilasovar (Ajirlou)	St58	Fars, , Norabad Mamasani
St43	Ardebil, Pars Abad		
St44	Ardebil, Pars Abad		
St45	Ardebil, Pars Abad		
St46	Ardebil, Pars Abad		

YMDA (۰/۲ گرم آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، آب مقطر یک لیتر، ۴ گرم دکستروز، ۴ گرم عصاره مالت، ۴ گرم عصاره مخمر، ۱۵ گرم آگار) انتقال داده شدند. برای خالص‌سازی قارچ عامل بیماری، با استفاده از لوپ سترون از پرگنه‌های تشکیل شده قبلی مجدداً در محیط کشت YMDA به‌صورت خطوط موازی کشت داده شد. بعد از گذشت سه الی چهار روز یک تک پرگنه انتخاب و به محیط YMDA

Archive of SID

www.SID.ir

انتقال داده شد. پرگنه‌های حاصل از رشد این تک پرگنه‌ها، قارچ‌های خالصی بودند که برای ادامه آزمایش‌ها استفاده شدند.

استخراج DNA

از هر جدایه خالص شده سوسپانسیون اسپور تهیه شد و به سطح چهار تشتک حاوی محیط YMDA منتقل گردید. تشتک‌ها در انکوباتور ۲±۲۱ درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد از سه الی چهار روز که قارچ‌ها رشد کرده بودند به‌وسیله اسکارپل سترون از سطح محیط جمع‌آوری و به تشتک‌های استریل منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز درایر مدل (Christ-Alpha 1-4) خشک گردیدند. قارچ‌های خشک شده در هاون‌های چینی سترون که قبلا در فریزر ۲۰- درجه سیلسیوس قرار داده شده بودند، پودر شدند (این عمل بلافاصله بعد از خروج قارچ‌ها از فریزدرایر انجام گرفت تا قارچ‌های خشک شده رطوبت محیط را نگیرند). برای استخراج DNA ژنومی از روش *رایدر و برودا* (Raeder & Broda 1985) استفاده گردید. DNA استخراج شده جدایه‌های قارچ *M. graminicola* در فریزر ۲۰- نگه‌داری شدند. کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و ژل آگارز تعیین و غلظت آنها به ۲۰ ng/µl تنظیم شد.

بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های قارچ *M. graminicola* با استفاده از نشانگرهای (SSRs) و (SCARs)

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های *M. graminicola* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور از نه جفت آغازگرهای SSRs که توسط *اُون و همکاران* (Owen *et al.* 1998) و همچنین سه جفت آغازگرهای SCAR که توسط *گودوین و کما* (Goodwin & Kema 1998) معرفی و ابداع شده بودند استفاده گردید. این آغازگرها توسط شرکت Fermentase (به نمایندگی شرکت فرآیند دانش) ساخته شدند. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ و۳ ذکر گردیده است.

برای واکنش PCR از پروتوکل *اون و همکاران* (Owen *et al.* 1998) با اندکی تغییرات استفاده گردید. چرخه حرارتی این روش شامل چرخه واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۲۰ ثانیه، ۳۰ چرخه که هر چرخه شامل سه مرحله واسرشت سازی در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگر در بین ۵۰ تا ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، بسط آغازگرها در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۰ ثانیه و یک چرخه نهایی بسط آغازگرها در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. در شرایط بهینه برای تهیه ۲۵ میکرولیتر از محصول PCR مقدار ۱۵/۸ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر(۲pmol/µl)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x PCR، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۰/۸mM)، ۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (۶mM)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA Polymerase (معادل یک واحد) و ۰/۵میکرولیتر DNA نمونه(۲۰ ng/µl) استفاده گردید. تکثیر DNA توسط دستگاه ترمو سایکلر (Bio-Rad آمریکا مدل I Cycler) صورت گرفت. برای الکتروفورز محصولات نهایی PCR از دستگاه Sequencing gel Apparatus مدل Sequi-Gen® GT (Bio-Rad آمریکا) و ژل پلی آکریل آمید ۶٪ با رنگ آمیزی به‌روش نیترات نقره استفاده گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. مشخصات و توالی آغازگرهای SSRs مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Mycosphaerella gramimicola* در ایران

Table 2- Name and sequence of SSRs primers used for studying genetic diversity of populations of *Mycosphaerella gramimicola* in Iran

نام آغازگرها Primer name	توالی تکرارشونده گزارش شده Reported repeat motif	توالی آغازگرها Primers sequence
ST_2C_{10}	(AGCGG)	5′AGGCCGAGAAACTTGCTTGCAG3′ (F) 5′AATGAACCGTCCCATGGACGTG3′ (R)
ST_1E_7	(CGG)	5′GATCTCGAGCAGGGCGGAAGT3′ (F) 5′TCACACGCTGGTCTGTGAATC3′ (R)
ST_2E_4	(GGC)	5′GAAGATCAACAGCAT GGGCGG3′ (F) 5′CTCCAGAGGGATCACAAAGGC3′ (R)
ST_1E_3	(CGG)	5′GTTCCGCCGGTCGAAGTCG3′ (F) 5′GCCAAGGCACTGCTGCTC3′ (R)
ST_1B_3	(CGG)	5′ACGTTCACATCTTCATACC3′ (F) 5′CTCTAGCTCTACCTTAAT3′ (R)
ST_1G_7	(TG)	5′ATGCTGAGAAGTTCGGTGAGG3′ (F) 5′CGTTCTTCCACCTCCTCCAACACT3′ (R)
ST_1A_2	(GGC)/(GGT)	5′TTTTCCTCTCTCCCGTGC3′ (F) 5′CTCTCGTCAACCCCAGAC3′ (R)
ST_1A_4	(CCG)	5′GGTTCGATGGAGAGATTT3′ (F) 5′ TCACCTCCTCATCGCAGA3′ (R)
ST_1D_7	(AC)	5′ATCCTCCATTCACTACTGCAT3′ (F) 5′TGTGGAACAGGAATAGGCTTG3′ (R)

یادداشت برداری از نقوش الکتروفورزی

برای محاسبه وزن مولکولی باندهای حاصل ابتدا وزن مولکولی هرکدام از باندهای نشانگر استاندارد و هم‌چنین فاصله آنها از ابتدای چاهک تعیین گردید سپس فاصله قطعات DNA تکثیر شده از جدایه‌های مختلف قارچ *M. graminicola* که با استفاده از مارکرهای مختلف SSR و SCAR تکثیر شده بود از ابتدای چاهک‌ها اندازه‌گیری گردید. سپس با استفاده از برنامه Gel ver. 2. 1 (Thompson 1989) وزن مولکولی هر قطعه تخمین زده شد. قطعات DNA تکثیر شده با وزن‌های مولکولی متفاوت به‌عنوان آلل‌های مختلف مکان ژنی مورد بررسی منظور گردیدند. در مورد جدایه‌هایی که باند مورد انتظار تشکیل نشده بود، عدم تشکیل باند به‌عنوان آلل *Null* در نظر گرفته شد(جدول ۴).

آنالیز داده‌ها و محاسبه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *M. graminicola*

به‌منظور برآورد تنوع ژنتیکی در کل جمعیت نمونه‌های *M. graminicola* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور و هم‌چنین برآورد تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت نمونه‌های هر استان، ابتدا فراوانی هر کدام از آلل‌های مختلف در کل جمعیت جدایه‌ها و جمعیت نمونه‌های هر استان برآورد گردید سپس با استفاده از فرمول زیر (Nei 1973):

$$H = 1 - \sum X_i^2$$

تنوع ژنتیکی برای آن مکان ژنی محاسبه گردید. در فرمول فوق H تنوع ژنتیکی (تنوع ژنی یا تنوع آللی) جمعیت مورد بررسی می‌باشد و X_i فراوانی هر کدام از آلل‌های مختلف آن مکان ژنی می‌باشد. هم‌چنین تنوع ژنتیکی کل جدایه‌ها با استفاده از فرمول

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳. مشخصات و توالی آغازگرهای SCARs مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Mycosphaerella gramimicola* در ایران

Table 3- Name and sequence of SCARs primers used for studying genetic diversity of populations of *Mycosphaerella gramimicola* in Iran

نام آغازگرها Primers name	توالی آغازگرها Primers sequences	
I_{12}	5′TTGCTTTTATTCCGACACGTC3′	(Forward)
	5′TCGCGCCTTGCATAGTTCAGT3′	(Reverse)
W_6	5′ATGTATGAGCGGCGGTTGGCG3′	(Forward)
	5′GCCCTGCAAATACCGACATTC3′	(Reverse)
M_{13}	5′ACGGCGTGGCACTGACAGGTG3′	(Forward)
	5′CGCAAGTCCGTTCTTCTTTCAATC3′	(Reverse)

جدول۴. دمای بهینه اتصال آغازگرها، وزن مولکولی قطعات تکثیر شده، تعداد آلل‌های شناسایی شده در جمعیت قارچ *Mycosphaerella* graminicola و تعداد جدایه‌های دارای آلل نول در نشانگرهای میکروستلایت و SCAR

Table 4. Optimum annealing temperatures, molecular weight of amplified fragments, numbers of identified alleles and number of isolates of M. graminicola with null allele using SSRs and SCARs markers.

آغازگرها Primers	دمای بهینه اتصال آغازگرها($^{\circ}C$) Optimum annealing temperature	وزن مولکولی قطعات تکثیر شده(bp) Range of amplified fragment size (bp)	تعداد اللهای شناسایی شده در جمعیت No. of alleles amplified	تعداد جدایه‌های دارای الل نول No. of isolates with null allele
ST_2E_4	58	90-124	4	1
ST_2C_{10}	58	52-60	3	1
ST_1G_7	50	98-109	2	3
ST_1E_7	50	90-98	2	1
M_{13}	65	1136-1416	3	20
W_6	58	132-152	2	1

زیر *نی* (Nei 1973):

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

به تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها و میان جمعیت‌ها تجزیه گردید که در آن H_T تنوع ژنتیکی کل جمعیت و H_S میانگین تنوع ژنتیکی جمعیت در هر کدام از استان‌های مورد بررسی است و D_{ST} تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌های مختلف است.

به‌منظور شناسایی تعداد هاپلوتیپ‌های مولکولی موجود در کل جمعیت نمونه‌های مورد بررسی *M. graminicola* از روش *کولمر و همکاران* (Kolmer *et al*. 1995) استفاده گردید.

بررسی میزان خویشاوندی جدایه‌های مختلف *M. graminicola* با استفاده از تکنیک rep-PCR

این نشانگر قابلیت تشخیص توالی‌های تکرار شونده در داخل ژنوم و تکثیر نواحی بین آنها را دارد و بر این اساس برای انگشت‌نگاری DNA جدایه‌های قارچ و شناسایی

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه‌های مشابه و تعیین میزان خویشاوندی آنها استفاده می شود. آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی از دکتر بوریس مک دونالد در دانشگاه فدرال سویس اخذ گردید. توالی این آغازگرها به‌صورت زیر بودند (Brunner *et al.* 2008; Versalovic *et al.* 1991, 1994).

آغازگر

(5′-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3′) (Reverse) (BOX 1AR)

و آغازگر

(5′-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3′) (Forward) 2 (ERIC)

این آغازگرها توسط شرکت Fermentas (آلمان به نمایندگی شرکت فرآیند دانش) سفارش و ساخته شدند. در استفاده از این نشانگرها تفاوت جدایه‌ها در تعداد باندهای مشاهده شده (تعداد توالی‌های تکرار شونده در داخل ژنوم هر جدایه) و وزن مولکولی باندهای تکثیر شده می‌باشد.

برای بهینه‌سازی PCR با آغازگرهای مورد استفاده آزمایش طبق روش انجام شده توسط مک دونالد (مکاتبات شخصی) شروع شد. در ادامه برای حصول نتیجه مورد نظر تغییراتی در پروتکل صورت گرفت. حجم کل محلول PCR در این پروتکل ۲۵میکرولیتر درنظر گرفته شد که شامل: ۱۷/۷۵ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر بافر PCR 10x، ۲میکرولیتر از مخلوط dNTP (۰/۸mM)، ۲میکرولیتر $MgCl_2$ (۴ mM)، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ pmol/µl)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA Polymerase (معادل یک واحد)، ۰/۵ میکرولیتر از DNA نمونه (۲۰ ng/µl) بود.

چرخه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر عبارت بود از: یک چرخه واسرشت سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت دو دقیقه، ۳۵ سیکل که هر سیکل شامل سه مرحله واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۶۰ ثانیه، بسط آغازگرها در ۶۵ درجه سلسیوس به‌مدت پنج دقیقه و یک چرخه نهایی بسط آغازگرها در ۶۵ سلسیوس به‌مدت هشت دقیقه.

محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۲٪ در دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ به‌مدت ۴۵ دقیقه، الکتروفورز شد. برای محاسبه وزن مولکولی قطعات تکثیر شده از نشانگر استاندارد ۱۰۰bp استفاده گردید و نتایج به‌دست آمده توسط دستگاه Gel Documentation Uvi Doc (Uvi Tec، انگلستان) عکس برداری شد و از باندهای حاصل یادداشت‌برداری شد.

تجزیه داده‌ها

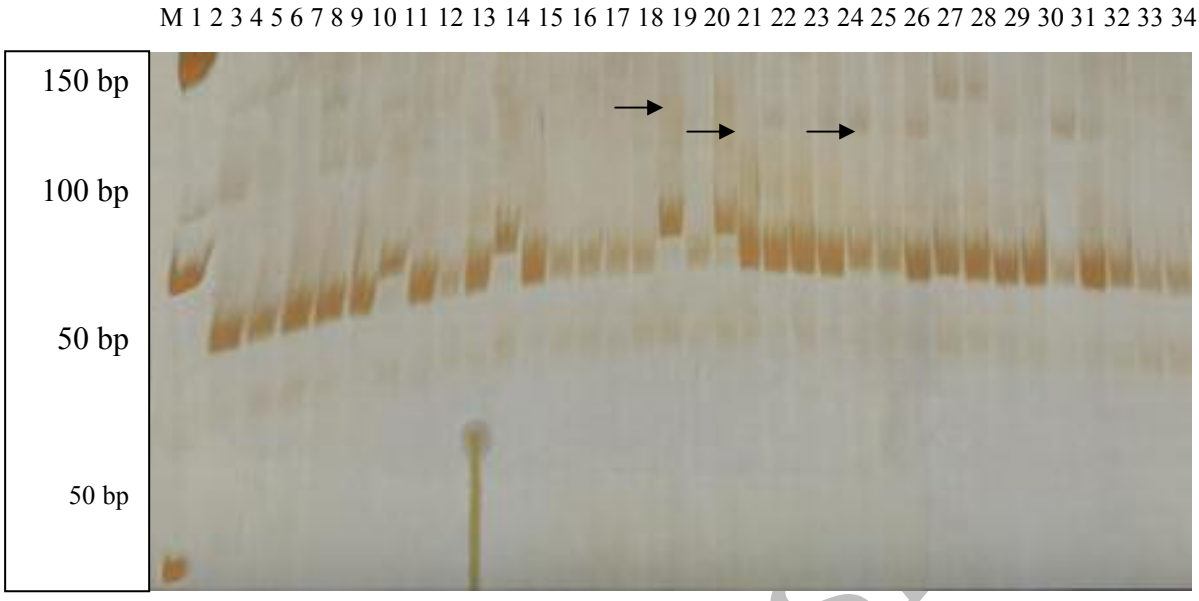
به‌منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌های *M. graminicola* ابتدا داده‌ها به‌صورت حضور باند (۱) و یا عدم حضور باند (۰) در برنامه Excel وارد شد سپس با استفاده از ضریب تشابه دایس (Dice's coefficient) دربر نامه SIMQUAL در نرم افزار NTSYS-pc (Version 2) ماتریس تشابه محاسبه گردید. سپس با استفاده از برنامه SHAN و متد UPGMA تجزیه خوشه‌ای انجام گردید.

نتایج

از نه جفت آغازگر میکروسٹلایت مورد بررسی چهار جفت شامل آغازگرهای ST_2E_4، ST_2C_{10}، ST_1G_7و ST_1E_7 که قادر به تکثیر باندهای قوی شدند، برای آزمایش انتخاب شدند. بقیه آغازگرها به‌دلیل عدم تولید باند اختصاصی مورد نظر مورد استفاده قرار نگرفتند. شکل ۱ آلل‌های مختلف تکثیر شده توسط جفت آغازگر ST_2E_4 را نشان میدهد. از سه جفت آغازگرهای SCAR جفت

Archive of SID

www.SID.ir



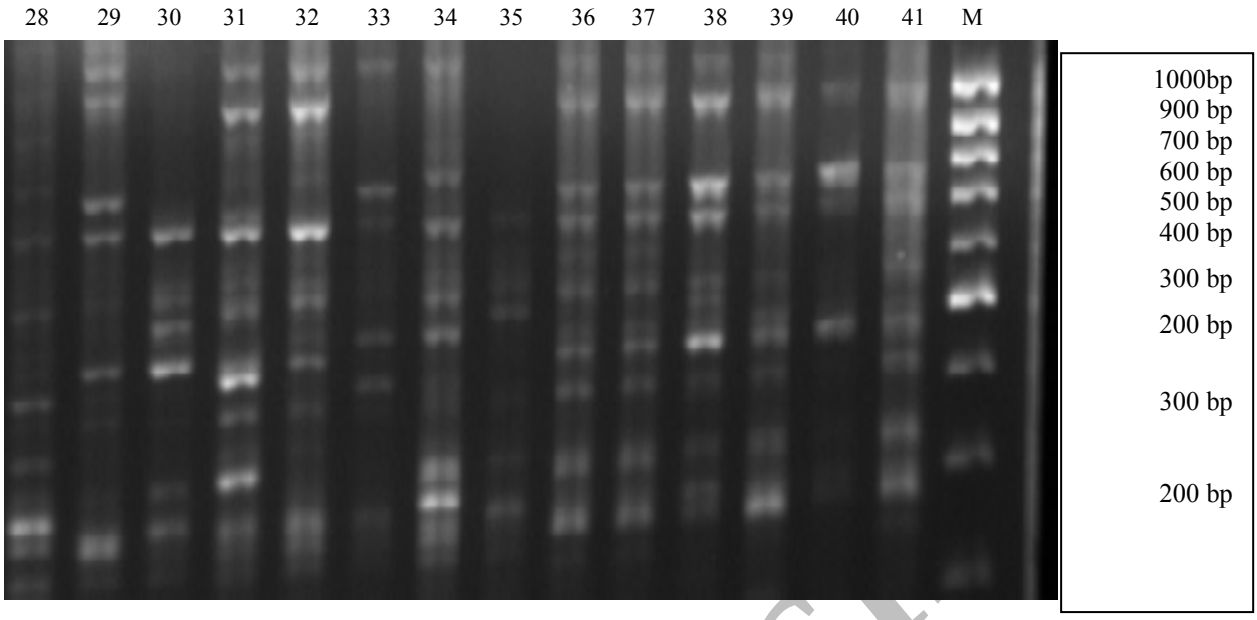
شکل ۱ . آلل‌های مختلف تکثیر شده توسط نشانگر مایکرو ستلایتST_2E_4 دربین جدایه‌های St1-St34 *Mycophaerella graminicola* مربوط به مناطق مختلف ایران (اعداد درج شده در بالای شکل شماره جدایه‌های الکتروفورز شده و M نشانگر استاندارد۵۰ bp می باشد. پیکان‌های سیاه رنگ سه الل مختلف یک مکان ژنی را نشان می‌دهند)

Fig 1. Different alleles amplified using ST_2E_4 microsatellite marker among 34 isolates of *Mycosphaerella graminicola* from different parts of Iran (line 2 to line 35 are St1-St34 and line 1 is 50bp DNA size marker)

آغازگرهای M_{13} و W_6 توانستند تغییرات ژنتیکی جدایه‌ها را نشان دهند ولی جفت آغازگر I_{12} باندی تشکیل داد که در تمامی جدایه‌ها یکسان بود، بنابراین در محاسبات وارد نگردید. برای بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ ابتدا فراوانی آلل‌های به‌دست آمده توسط هر جفت آغازگر در هر استان و در کل کشور محاسبه گردید. بررسی تنوع ژنتیکی در کل جمعیت جدایه‌های قارچ *M. graminicola* نشان داد که میانگین تنوع ژنتیکی جمعیت ۰/۴۴ بود و حداقل تنوع ژنتیکی (۰/۲۵) با نشانگر ST_1G_7 و حداکثر تنوع ژنتیکی(۰/۶۲) با نشانگر M_{13} محاسبه گردید (جدول ۵). وقتی تنوع ژنتیکی محاسبه شده برای هر مکان به تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌های قارچ و بین جمعیت‌های مورد آزمایش تقسیم‌بندی شد، ۷۷٪ تنوع در داخل جمعیت‌ها و ۲۳٪ تنوع بین مناطق توزیع شده بود (جدول۵).

با استفاده از روش *کولمر و همکاران* (Kolmer *et al.* 1995) تعداد ۳۳هاپلوتیپ مختلف در بین ۵۸ جدایه مورد بررسی شناسایی گردید. این هاپلوتیپ‌ها (فنوتیپ‌های مولکولی) به‌طور تصادفی در میان مناطق مختلف نمونه‌برداری توزیع شده بودند. به‌طور مثال در استان مازندران، در بین نه جدایه مورد بررسی هفت هاپلوتیپ شناسایی گردید و فقط دو جدایه در یک هاپلوتیپ قرار گرفتند. هاپلوتیپ HP1 با داشتن ۱۲٪ فراوانی هاپلوتیپ غالب بود و در مناطق ایلام، خوزستان،

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲. نقوش الکتروفورزی حاصل از به‌کارگیری rep-PCR با آغازگرهای ERIC1AR وBOX 2 دربین جدایه‌های St28- St41 قارچ *Mycosphaerella graminicola* جدا شده از مناطق مختلف ایران (اعداد درج شده در بالای شکل، شماره جدایه‌های الکتروفورز شده به ترتیب از چپ به راست St28 تا St41 و M نشانگر استانداردbp ۱۰۰ می‌باشد)

Fig 2. Electrophoresis pattern of rep-PCR products by ERIC 1AR& BOX 2 primers among *Mycosphaerella graminicola* St28-St41 isolates from different parts of Iran (left to right. line 1 to line 14 are St28-St41 isolates and line 15 is 100 bp DNA size marker)

جدول ۵. تنوع ژنتیکی در داخل و در میان مناطق مورد بررسی در جمعیت *Mycosphaerella graminicola* مربوط به مناطق مختلف ایران با استفاده از چهار نشانگر SSR و دو نشانگر SCAR.

Table 5.Genetic diversity within and among locations of *Mycosphaerella graminicola* populations using four SSR and two SCAR markers.

آغازگرها Primers	تنوع کل آلل ها Total allelic diversity	تنوع آلل‌ها در بین مناطق Allelic diversity among locations	تنوع آلل‌ها در داخل مناطق Allelic diversity within locations
ST_2E_4	0.50	0.08	0.42
ST_2C_{10}	0.40	0.15	0.26
ST_1G_7	0.25	0.06	0.19
ST_1E_7	0.43	0.06	0.37
M_{13}	۰0.62	0.19	0.42
W_6	0.43	0.06	0.37
Mean	0.44	0.10	0.34

Archive of SID
www.SID.ir

اردبیل و فارس پراکنده بود (جدول۶).

به‌کارگیری آغازگرهای ERIC 1AR و2 BOXتوانست قطعات متعددی از DNA ژنوم جدایه‌های *M. graminicola* را تکثیر نماید اما فقط قطعات تکثیر شده بین ۱۰۰ bp تا ۱۵۰۰ bp در محاسبات منظور گردید. مجموعاً ۱۵۸ قطعه DNA در میان کل جمعیت جدایه‌های مورد بررسی که از وضوح خوبی بر خوردار و تکرارپذیر بودند شناسایی و در محاسبات منظور گردید. شکل ۲ نقوش الکتروفورزی جدایه‌های St28 تا St41 را نشان می‌دهد که در آن ستون اول نشانگر استاندارد ۱۰۰ bp می‌باشد. نتیجه تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA نشان داد که جدایه St 20 جمع‌آوری شده از کرمانشاه و جدایه St 29جمع‌آوری شده از ایلام ۱۰۰٪ با همدیگر مشابه بودند و احتمالاً هر دو جدایه از یک دودمان ژنتیکی باشند و بین این دو جدایه با بقیه جدایه‌ها کمترین تشابه وجود داشت (کمتر از ۵٪). هم‌چنین بین جدایه‌های St 23 و St 24 جمع‌آوری شده از منطقه ایلام، جدایه‌های St 4، St 5 و جدایه‌های St 3، St 2 جمع‌آوری شده از استان گلستان و جدایه‌های St 10 و St 11 جمع‌آوری شده از منطقه مازندران بیش از ۵۰ ٪ تشابه وجود داشت. ضمناً جدایه‌های St28 , St 27 جمع‌آوری شده از ایلام با داشتن ۴۰٪ تشابه و جدایه‌های St13 , St 12 جمع‌آوری شده از مازندران، جدایه‌های St 35، St 36 جمع‌آوری شده از خوزستان و جدایه‌های St53 , St 54 جمع‌آوری شده از فارس حدودا ۳۵٪ تشابه داشتند (شکل۳).

بحث

سپتوریوز برگ یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم می‌باشد به‌طوری‌که در اروپا در درجه اول اهمیت قرار دارد و خسارت قابل توجهی به محصول وارد می‌آورد (Shaner *et al*. 1975; Anonymous 1965; Shaw and Royle 1989; Thomas *et al*. 1989). استفاده از ارقام پا کوتاه و پرمحصول در چند سال اخیر در ایران و بسیاری از کشورهای دیگر باعث گسترش این بیماری شده است (Torabi *et al.* 2002). با توجه به استراتژیک بودن محصول گندم و سیاست حفظ خود کفایی گندم، نیاز به استفاده از راهکارهای صحیح و اصولی برای کنترل و مدیریت این بیماری خسارت زا احساس می‌شود. در بین تمام راه‌های مختلفی که برای کنترل این بیماری و کاهش خسارت آن به‌کار رفته است، استفاده از ارقام مقاوم به‌عنوان مطمئن‌ترین و اقتصادی‌ترین روش مبارزه با بیماری می‌باشد. به‌منظور انتخاب ارقام مقاوم به بیماری، آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بیماری ضروری است. نتایج این بررسی نشان داد که جمعیت قارچ عامل بیماری در ایران از تنوع ژنتیکی زیادی برخوردار است. میانگین تنوع ژنتیکی کل جمعیت نمونه‌های مورد بررسی ۰/۴۴ بود. وقتی تنوع ژنتیکی کل جمعیت به تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌های قارچ و بین جمعیت‌های مورد آزمایش تقسیم‌بندی شد، ۷۷٪ تنوع در داخل جمعیت‌ها و ۲۳٪ تنوع بین مناطق توزیع شده بود. *مک دونالد و مارتینز* (McDonald & Martinez 1990) با به‌کارگیری نشانگرهایRFLP تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت *M. graminicola* در کالیفرنیا را ۰/۴۵ گزارش نمودند. *اون وهمکاران* (Owen *et al.* 1998) با بکارگیری ۹ جفت آغازگر میکروستلایت تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت *M. graminicola* را ۰/۴۹ به‌دست آوردند. *رضوی و هیوز* (Razavi & Hughes 2004) تنوع ژنتیکی ۹۰ جدایه قارچ *M. graminicola* جمع‌آوری شده از ۱۰

Archive of SID

www.SID.ir

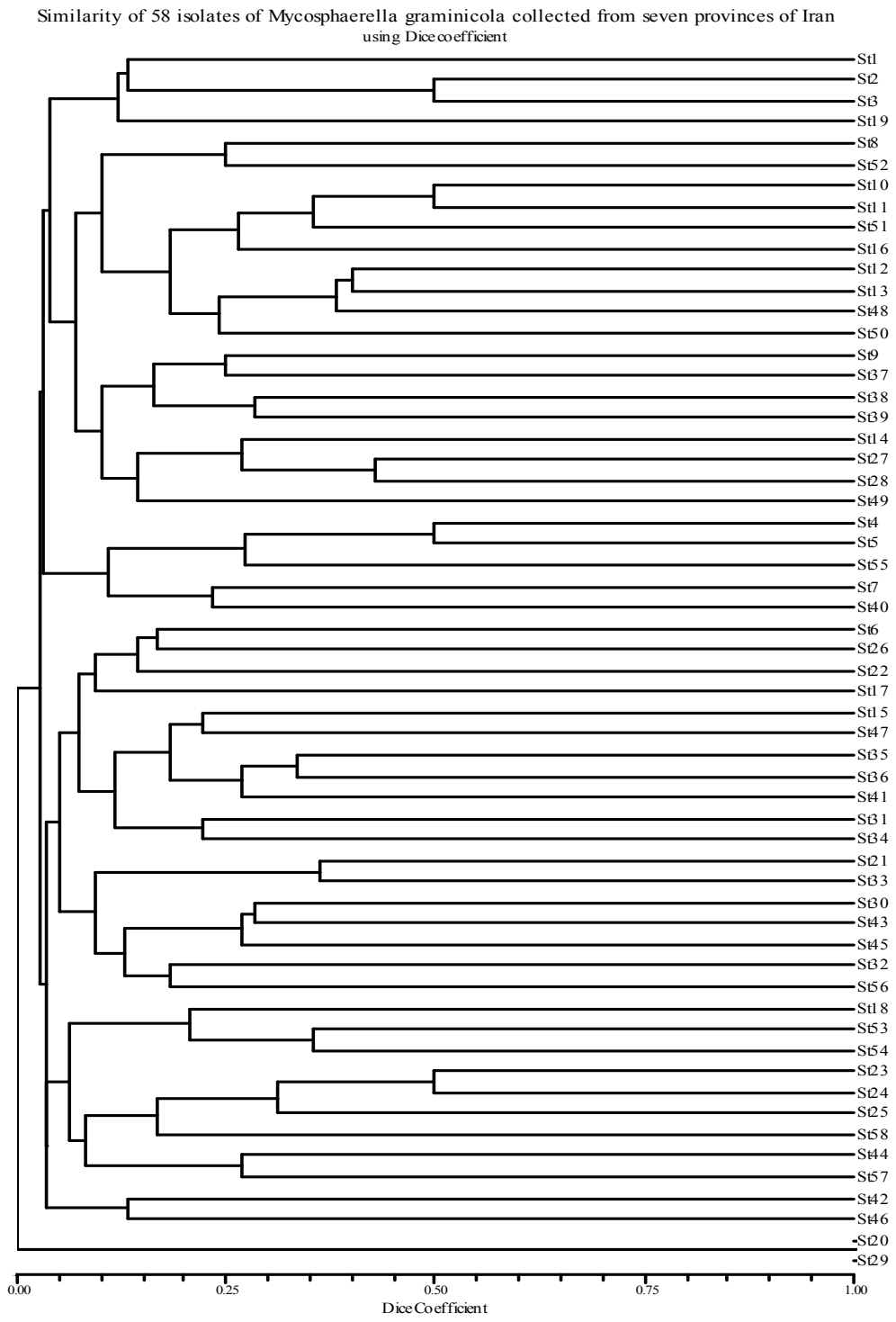
جدول۶. هاپلوتیپ‌های شناسایی شده براساس فراوانی آلل‌ها با استفاده از نشانگرهای SSR و SCAR در جمعیت‌های *M. graminicola* در مناطق مختلف ایران

Table 6.The haplotype groups of *M. graminicola* identified based on the frequency of alleles of SSR and SCAR markers at different location of Iran

گروه هاپلوتیپی Haplotype group	فنوتیپ مولکولی (هاپلوتیپ) Molecular phenotype (Haplotype)	تعداد در بین جمعیت Numbers within population	تعداد در مناطق Numbers within locations
HP1	1 1 1 1 1 1	7	4(1) 5(2) , 6(1) , 7(1) ,
HP2	1 1 2 1 1 1	6	1(1) ،6(2) ،7(3)
HP3	1 1 1 2 1 1	6	2(1) 4(2) , 6(2) , 7(1) ,
HP4	1 1 1 1 2 1	1	۴(۱)
HP5	1 1 1 1 1 2	4	1(2) , 5(2)
HP6	1 1 1 1 1 3	1	6(1)
HP7	1 1 1 1 1 4	1	5(1)
HP8	2 2 1 1 1 1	2	2(2)
HP9	1 1 2 1 1 2	1	4(1)
HP10	1 1 1 2 2 1	2	6(2)
HP11	1 1 1 2 1 2	3	1(1) , 4(2)
HP12	1 1 3 1 1 3	1	3(1)
HP13	2 2 1 1 2 1	1	2(1)
HP14	1 1 2 1 2 2	2	1(1), 5(1)
HP15	1 2 2 1 2 2	1	4(1)
HP16	2 1 2 2 1 3	1	3(1)
HP17	1 2 2 2 1 3	1	2(1)
HP18	1 2 3 1 2 2	1	4(1)
HP19	3 1 1 2 1 1	1	1(1)
HP20	3 1 1 1 1 2	1	1(1)
HP21	1 1 1 1 3 2	1	5(1)
HP22	1 3 2 1 2 2	1	1(1)
HP23	1 3 1 1 2 3	1	2(1)
HP24	1 1 3 1 1 2	2	3(2)
HP25	1 3 1 1 2 2	1	2(1)
HP26	1 3 1 3 2 1	1	7(1)
HP27	1 3 1 1 2 3	1	2(1)
HP28	3 3 1 1 2 3	1	2(1)
HP29	1 1 1 2 1 4	1	1(1)
HP30	1 1 1 1 2 4	1	5(1)
HP31	1 4 1 2 2 1	1	6(1)
HP32	1 3 4 1 2 2	1	5(1)
HP33	2 2 5 1 1 2	1	2(1)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳. دندروگرام تشابه ۵۸ جدایه مختلف *Mycosphaerella graminicola* مربوط به مناطق مختلف ایران که با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه دایس بر اساس الگوی DNA تکثیر شده به‌کمک نشانگر rep-PCR (آغازگرهای ERIC1AR وBOX 2) ترسیم گردیده است.

Fig 2. Dendrogram of similarity of 58 isolates of *Mycosphaerella graminicola* from different parts of Iran using rep-PCR markers (ERIC 1AR & BOX 2 primers) and UPGMA clustering method and Dice's similarity coefficient.

www.SID.ir

نقطه مختلف یک مزرعه در ایالت ساسکاچوان کانادا را ۰/۴۴۱ برآورد نمودند که ۸۸٪ تنوع در داخل مکان‌های نمونه بر داری و ۱۲٪ آن در بین مکان‌های نمونه‌برداری توزیع شده بود.

لیندا و همکاران (Linde *et al.* 2002) با بررسی ۱۰۹۸جدایه*M. graminicola* که از مناطق، مزارع و برگ‌های مختلف یک گیاه در سویس، اسرائیل و ایالت‌های ارگون و تگزاس آمریکا جمع‌آوری نموده بودند دریافتند که میانگین تنوع ژنتیکی در کشور سوئیس۰/۴۷، در کشور اسرائیل ۵۰ /۰، و در ایالت‌های ارگون و تگزاس آمریکا ۰/۴۴ بود۰ میانگین تنوع ژنتیکی به‌دست آمده در این بررسی برای ایران با میانگین تنوع ژنتیکی *M. graminicola* در آمریکا مطابقت دارد ولی از میانگین تنوع ژنتیکی سوئیس و اسرائیل کمتر است. هم‌چنین نامبردگان گزارش نمودند که در حدود ۷۷٪ تنوع در داحل جمعیت‌ها و ۲۳٪ در بین جمعیت‌ها توزیع شده بود. .نامبردگان نشان دادند که پایین بودن تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها به‌دلیل وقوع جریان ژنی (gene flow) می‌باشد. توزیع میزان تنوع ژنتیکی در داحل و بین جمعیت‌های مورد بررسی در این تحقیق با نتایج نامبردگان مطابقت دارد. پایین بودن تنوع ژنتیکی در بین استان‌های مورد بررسی در این تحقیق نیز ممکن است به‌دلیل وقوع جریان ژنی در این مناطق باشد و نیاز به بررسی‌های جامع‌تری دارد.

اخیراً *جورجنز و همکاران* (Jürgens *et al.* 2006) با بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *M. graminicola* در ایران، اسرائیل، آرژانتین و استرالیا گزارش نمودند که جمعیت جمع‌آوری شده از اسرائیل بیشترین تنوع ژنتیکی را داشت اما جمعیتی که از منطقه دزفول در استان خوزستان ایران جمع‌آوری شده بودند کمترین تنوع ژنتیکی را داشت و هاپلوتیپ‌های مشابه در داخل جمعیت فوق زیاد بود. بنا به گزارش نامبردگان ظاهراً نمونه‌برداری از مزارع آزمایشی مرکز تحقیقات کشاورزی صفی آباد دزفول که به‌صورت مصنوعی با اسپورهای قارچ مایه‌زنی شده بودند انجام گرفته بود و پایین بودن تنوع ژنتیکی در جمعیت فوق دور انتظار نبوده است (Jürgens *et al.* 2006). هم‌چنین نامبردگان گزارش نمودند که تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های قارچ *M. graminicola* جمع‌آوری شده از استرالیا نیز کمتر بود و پایین بودن تنوع ژنتیکی در این منطقه را به‌دلیل دور بودن از سایر مناطق جغرافیایی دنیا، منشا گرفتن جمعیت فوق از چند جدایه معدود قارچ و احتمال وقوع ریزش ژنتیکی (Genetic drift) نسبت دادند.

استفاده از نشانگر rep-PCR در این بررسی مؤید وجود تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت‌های قارچ عامل بیماری در ایران می‌باشد. نتایج گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس نشان داد که فقط دو جدایه St29, St20 دارای هاپلوتیپ مشابه هستند و بقیه جدایه‌ها بیش از ۵۰٪ از نظر ژنتیکی از همدیگر متفاوت بودند ولی جدایه‌هایی که با همدیگر مشابه بودند از یک منطقه جغرافیایی بودند که نشانگر وجود همسانه‌های تقریباً مشابه در مناطق جغرافیایی کشور می‌باشد. *بنک و مک دونالد* (Banke & McDonald 2005) در جدایه‌های جمع‌آوری شده از مزارع مختلف در سوئیس با به‌کارگیری rep- PCR نیز نشان دادند که سطح بالایی از تنوع در میان جمعیت قارچ *M. graminicola* وجود دارد. نتایج آنها نشان داد که در جمعیت قارچ در سوئیس و اسرائیل درجه بالایی از چند شکلی وجود دارد.

براساس فراوانی آلل‌های شناسایی شده توسط میکروستلایت و SCAR ۳۳ هاپلوتیپ در کل جمعیت

Archive of SID

www.SID.ir

قارچ *M. graminicola* شناسایی شد، که هاپلوتیپ HPT1 بیشترین فراوانی را داشت و به‌عنوان هاپلوتیپ غالب جمعیت می‌باشد. با توجه به این‌که این هاپلوتیپ در چند منطقه وجود دارد از این هاپلوتیپ در صورتی که دارای قدرت بیماری‌زایی بالایی باشد می‌توان در انتخاب ارقام مقاوم برای آن مناطق استفاده نمود. وجود هاپلوتیپ‌های مختلف نشان می‌دهد که هر کدام از جدایه‌ها ژنوتیپ متفاوتی دارند و نحوه توزیع هاپلوتیپ‌ها در میان مناطق نشان می‌دهد که احتمالاً هم تولید مثل غیرجنسی و هم تولید مثل جنسی در ساختار جمعیت قارچ در ایران نقش دارد. با توجه به این‌که قارچ عامل بیماری معمولا به‌صورت غیرجنسی به‌صورت پیکنید در بقایای گیاهی زمستان گذرانی می‌کند و در اوایل بهار با تولید پیکنیدیوسپور آلودگی‌های اولیه آغاز می‌شود و هم‌چنین در بعضی از کشورها که فرم جنسی قارچ از آن کشورها گزارش شده آسکوسپورها نقش مهمی در ایجاد آلودگی اولیه ایفا میکنند وبا توجه به گزارش اخیر هر دو تیپ آمیزشی قارچ *M. graminicola* از ایران (Komijani *et al.* 2008)، احتمالا هر دو نوع تولید مثل جنسی و غیرجنسی در ساختار ژنتیکی قارچ *M. graminicola* در ایران مؤثر هستند . وجود فرم جنسی در داخل جمعیت‌های قارچ باعث می‌شود که در هر بار سیکل جنسی در طی مراحل تقسیم میوز ترکیب جدیدی از ژن‌ها حاصل گردد که این پدیده منجر به ایجاد تنوع ژنتیکی می‌گردد و گاهی منجر به پیدایش ژنوتیپ‌هایی از پاتوژن می‌گردد که از قدرت بیماری‌زایی و تطابق بیشتری برخوردار هستند و می‌توانند سریعاً به مقاومت موجود میزبان غلبه نمایند (Mc Donald & Linde 2002). لذا جهت مدیریت این نوع بیماری‌ها استفاده از مقاومت‌های غیر وابسته به نژاد مناسب‌تر خواهد بود.

سپاسگزاری

از همکاری و پشتیبانی علمی و مالی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور و هم‌چنین از کمک همکاران محترم آقایان دکتر محمد علی آقاجانی، دکتر محمد ترابی، مهندس ساسان رجایی، مهندس خشنود نوراللهی، مهندس غفور زاده دباغ و مهندس داریوش صفایی در جمع‌آوری و ارسال نمونه‌های قارچ عامل بیماری سپتوریوز تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (29-27) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir