

## 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 BLOTH OF WHEAT IN IRAN USING SSR, SCAR AND REP-PCR MARKERS

سولماز کمیجانی<sup>۱\*</sup>، محمد رضوی<sup>۲</sup> و حشمت الله امینیان<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۰۵/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۰۵)

### چکیده

به منظور 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 و SCAR تنوع ژنتیکی در داخل جمیعت‌های مختلف قارچ در کشور برآورد گردید. با محاسبه فراوانی آلل‌های به دست آمده در مناطق مختلف، در کل کشور و بین مناطق مختلف میزان و توزیع تنوع ژنتیکی در ایران به دست آمد. میزان تنوع ژنتیکی جمیعت‌ها در کشور بین ۰٪/۲۵ تا ۰٪/۶۲ در نوسان بود. میانگین کل تنوع ژنتیکی جمیعت‌ها ۴۴٪ بود که ۷۷٪ تنوع در داخل جمیعت‌های مورد بررسی و ۲۳٪ در بین جمیعت‌های مورد بررسی توزیع شده بود. سپس با استفاده از rep-PCR و آغازگرهای ERIC BOX 1AR و 2 BOX 1AR قطعاتی از DNA تکثیر شد. اندازه قطعات تکثیر شده بین ۱۰۰ bp تا ۱۵۰ bp در نوسان بود. نتیجه تجزیه خوش‌های با استفاده از ضربیت تشابه دایس و روش UPGMA نشان داد که جدایه St20 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، جمیعت، *Septoria tritici*.

\*: 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

## مقدمه

است لذا در این بررسی تلاش گردید با استفاده از نشانگرهای SSRs (Simple Sequence Repeats) و SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions) نوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ، تعیین گردد و با استفاده از نشانگر rep-PCR (Repetitive element-based polymerase chain reaction) میزان قربت ژنتیکی جدایه‌ها مشخص شود.

## روش بررسی

### جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

در این بررسی نمونه‌های دارای علائم بیماری سپتورویز برگ گندم در بهار سال ۱۳۸۴ به صورت 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 بود، انتخاب گردید ولی از استان کرمانشاه به دلیل 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 ضدغونی سطحی شده و. سپس هر سه یا چهار قطعه برگ در یک تشتک پتری حاوی محیط کشت آب آگار قرار داده شدند. بعد از ۱۶-۲۴ ساعت قطعات برگ در زیر بینوکولر بررسی شد، از پیکنیدیوم‌هایی که تولید اوز کرده بودند با کمک سوزن سترون، پیکنیدیوسپورهای قارچ به محیط کشت آب آگار ۱۵٪ (۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب) یا محیط کشت

سپتورویز 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 Mycosphaerella graminicola (Fückel J. Schröt and Cohn 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 قربت 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 در سال ۱۹۷۲ در نیوزلند شناسایی شد، سپس از کشورهای استرالیا، برباد، هلند، انگلیس و آمریکا (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

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 جداي	Sampling Location	شماره جداي	محل جمع‌آوري
Isolate No.	Sampling Location	Isolate No.	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		

استفاده از لوب سترون از پرگنهای تشکیل شده قبلی مجدداً در محیط کشت YMDA به صورت خطوط موازی کشت داده شد. بعد از گذشت سه الی چهار روز یک تک پرگنه انتخاب و به محیط 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

از نه جفت آغازگرهای SSRs که توسط اون 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 و ۳ ذکر گردیده است.

برای واکنش PCR از پروتوكل 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 به مدت ۱۲۰ ثانیه، ۳۰ چرخه که هر چرخه شامل سه مرحله واسرشته سازی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگر در بین ۵۰ تا ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، بسط آغازگرها در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و یک چرخه نهایی بسط آغازگرها در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. در شرایط بهینه برای تهیه میکرولیتر از محصول PCR مقدار ۱۵/۸ میکرولیتر آب مقطمر دو بار تقطییر، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (۲ pmol/µl)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10x، ۲ MgCl<sub>2</sub> میکرولیتر مخلوط dNTP (۰/۸ mM)، ۳ میکرولیتر *Taq DNA Polymerase* (۶ mM)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA (۰/۲ ng/µl) (معادل یک واحد) و ۰/۵ میکرولیتر DNA نمونه (۰/۲ 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 Sequi-Gen® GT Sequencing gel Apparatus Bio-Rad (آمریکا) و ژل پلی آکریل آمید ۶٪ با رنگ آمیزی به روش نیترات نقره استفاده گردید.

انتقال داده شد. پرگنهای حاصل از رشد این تک پرگنهای 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 YMDS متقل گردید. تشتک‌ها در انکوباتور  $21 \pm 2$  درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد از سه الی چهار روز که قارچ‌ها رشد کرده بودند به وسیله اسکارپل سترون از سطح محیط جمع‌آوری و به تشتک‌های استریل متقل و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر  $-20$  درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز درایر مدل (Christ-Alpha 1-4) خشک گردیدند. قارچ‌های خشک شده در هاون‌های چینی سترون که قبلاً در فریزر  $-20$  درجه سلسیوس قرار داده شده بودند، پودر شدند (این عمل بلا فاصله بعد از خروج قارچ‌ها از فریز درایر انجام گرفت تا قارچ‌های خشک شده رطوبت محیط را نگیرند). برای استخراج DNA ژنومی از روش رایدر و برودا (Raeder & Broda 1985) استفاده گردید. استخراج شده جدایه‌های قارچ *M. graminicola* در فریزر  $-20$  نگهداری شدند. کمیت و کیفیت DNA‌های استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و ژل آگارز تعیین و غلظت آنها به  $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$  تنظیم شد.

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

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های *M. graminicola* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور

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

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

نام آغازگرها Primer name	توالی تکرارشونده گزارش شده Reported repeat motif	توالی آغازگرها Primers sequence
ST <sub>2</sub> C <sub>10</sub>	(AGCGG)	5'AGGCCGAGAAACTTGCTTCAG3' (F) 5'AATGAACCGTCCCCTGGACGTG3' (R)
ST <sub>1</sub> E <sub>7</sub>	(CGG)	5'GATCTCGAGCAGGGCGGAAGT3' (F) 5'TCACACGCTGGTCTGTGAATC3' (R)
ST <sub>2</sub> E <sub>4</sub>	(GGC)	5'GAAGATCAACAGCAT GGGCGG3' (F) 5'CTCCAGAGGGATCACAAAGGC3' (R)
ST <sub>1</sub> E <sub>3</sub>	(CGG)	5'GTTCCGCCGGTCAAGTCG3' (F) 5'GCCAAGGCAGTCTGCTC3' (R)
ST <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	(CGG)	5'ACGTTCACATCTTCATACC3' (F) 5'CTCTAGCTCTACCTTAAT3' (R)
ST <sub>1</sub> G <sub>7</sub>	(TG)	5'ATGCTGAGAAGTTCGGTGAGG3' (F) 5'CGTTCTCCACCTCCTCCAACACT3' (R)
ST <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	(GGC)/(GGT)	5'TTTTCCTCTCTCCCGTGC3' (F) 5'CTCTCGTCAACCCCCAGAC3' (R)
ST <sub>1</sub> A <sub>4</sub>	(CCG)	5'GGTTCGATGGAGAGATT3' (F) 5' TCACCTCCTCATCGCAGA3' (R)
ST <sub>1</sub> D <sub>7</sub>	(AC)	5'ATCCTCCATTCACTACTGCAT3' (F) 5'TGTGGAACAGGAATAGGCTTG3' (R)

### آنالیز داده‌ها و محاسبه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های

#### *M. graminicola*

به منظور برآورده تنوع ژنتیکی در کل جمعیت نمونه‌های *M. graminicola* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور و هم‌چنین برآورده تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت نمونه‌های هر استان، ابتداء فراوانی هر کدام از آلل‌های مختلف در کل جمعیت جدایه‌ها و جمعیت نمونه‌های هر استان برآورده 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

### یادداشت برداری از نقوش الکتروفورزی

برای محاسبه وزن مولکولی باندهای حاصل ابتدا وزن مولکولی هر کدام 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 (Thompson 1989) Gel ver. 2. 1 قطعه تخمین زده شد. قطعات DNA تکثیر شده با وزن‌های مولکولی متفاوت به عنوان آلل‌های مختلف مکان ژنی مورد بررسی منظور گردیدند. در مورد جدایه‌هایی که باند مورد انتظار تشکیل نشده بود، عدم تشکیل باند به عنوان آلل Null در نظر گرفته شد (جدول ۴).

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

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

نام آغازگرها Primers name	توالی آغازگرها Primers sequences	
I <sub>12</sub>	5' TTGCTTTATTCCGACACGTC3' 5' TCGCGCCTTGATAGTTCACTG3'	(Forward) (Reverse)
W <sub>6</sub>	5' ATGTATGAGCGGGTGGCG3' 5' GCCCTGCAAATACCGACATTC3'	(Forward) (Reverse)
M <sub>13</sub>	5' ACGGCCTGGCACTGACAGGTG3' 5' CGCAAGTCCGTTCTCTTCAACTC3'	(Forward) (Reverse)

جدول ۴. 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 SCARs

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 (°C) آغازگرها Optimum annealing temperature	وزن مولکولی قطعات تکثیر شده (bp) Range of amplified fragment size (bp)	تعداد الالهای شناسایی شده در جمعیت No. of alleles amplified	تعداد جدایه‌های دارای آل نول No. of isolates with null allele
ST <sub>2</sub> E <sub>4</sub>	58	90-124	4	1
ST <sub>2</sub> C <sub>10</sub>	58	52-60	3	1
ST <sub>1</sub> G <sub>7</sub>	50	98-109	2	3
ST <sub>1</sub> E <sub>7</sub>	50	90-98	2	1
M <sub>13</sub>	65	1136-1416	3	20
W <sub>6</sub>	58	132-152	2	1

از روش کولمر و همکاران (Kolmer *et al.* 1995) استفاده گردید.

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

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

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.

به منظور شناسایی تعداد هاپلوتیپ‌های مولکولی موجود در کل جمعیت نمونه‌های مورد بررسی *M. graminicola*

اتصال آغازگر در ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، بسط آغازگرها در ۶۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و یک چرخه نهایی بسط آغازگرها در ۶۵ سلسیوس به مدت هشت دقیقه.

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

#### تجزیه داده‌ها

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

#### نتایج

از نه چفت آغازگر میکروستلایت مورد بررسی چهار جفت شامل آغازگرهای ST<sub>1</sub>E<sub>7</sub>, ST<sub>1</sub>G<sub>7</sub>, ST<sub>2</sub>C<sub>10</sub>, ST<sub>2</sub>E<sub>4</sub> که قادر به تکثیر باندهای قوی شدند، برای آزمایش انتخاب شدند. بقیه آغازگرها به دلیل عدم تولید باند اختصاصی مورد نظر مورد استفاده قرار نگرفتند. شکل ۱ آلل‌های مختلف تکثیر شده توسط چفت آغازگر ST<sub>2</sub>E<sub>4</sub> را نشان میدهد. از سه چفت آغازگرهای SCAR چفت

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

#### آغازگر

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

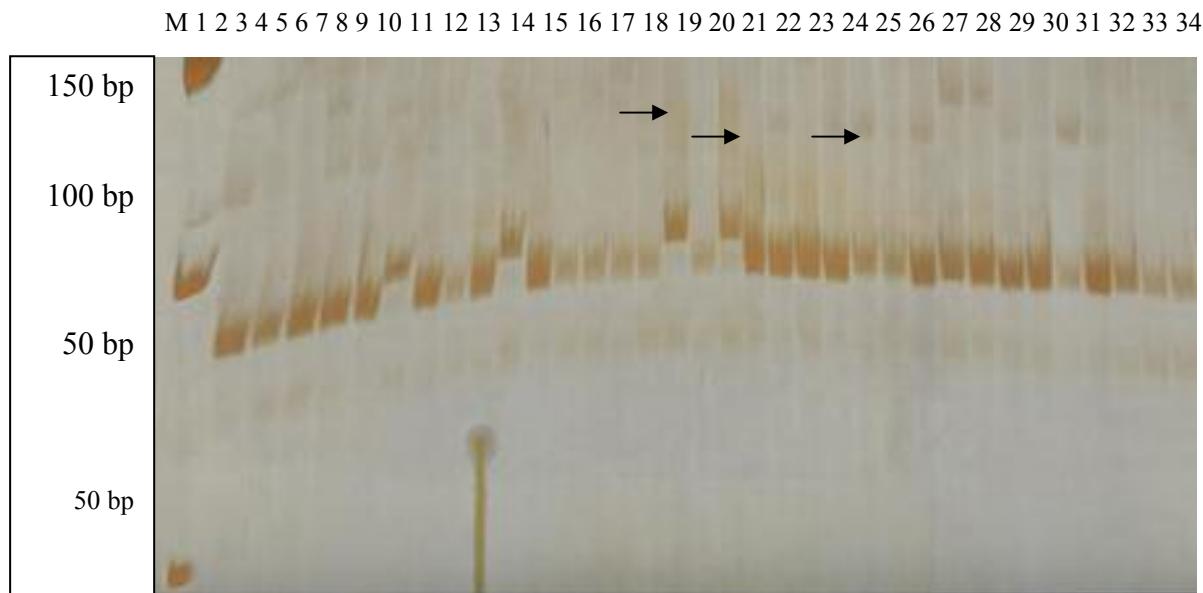
#### و آغازگر

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

این آغازگرهای 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 موردنظر تغییراتی در پروتکل صورت گرفت. حجم کل محلول PCR در این پروتکل ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل: ۱۷/۷۵ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر بافر PCR ۱۰x، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP (۰/۸ mM)، ۲ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> (۰/۲۵ mM)، ۰/۴ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ pmol/µl)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA Polymerase و 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 به مدت دو دقیقه، ۳۵ سیکل که هر سیکل شامل سه مرحله واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه،

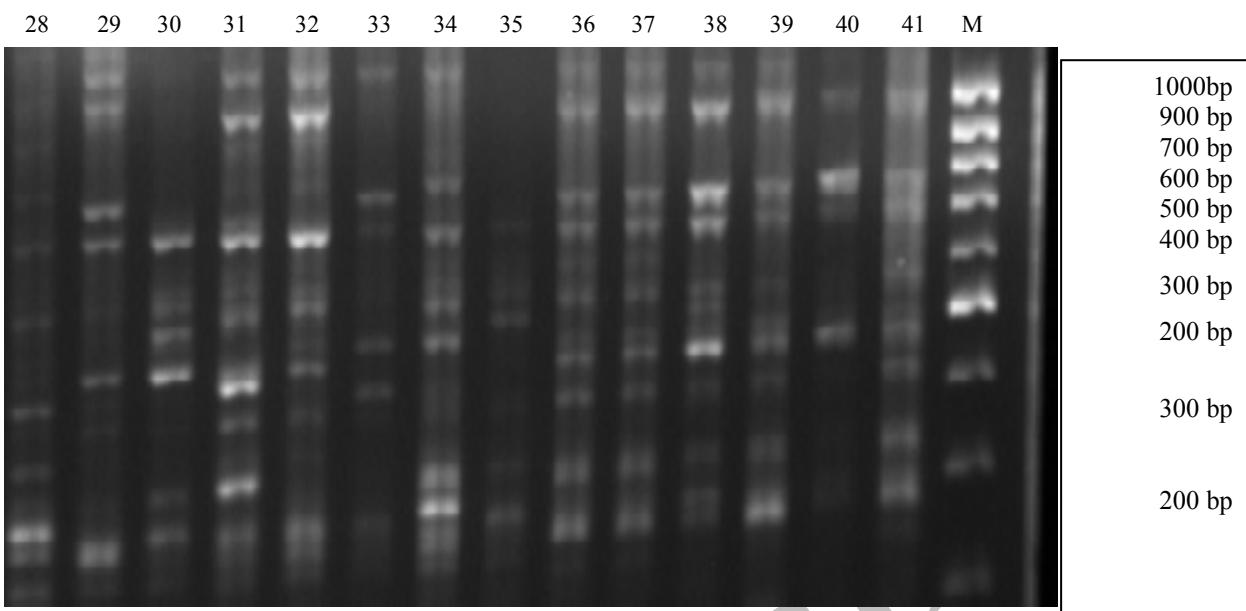


شکل ۱. آلل‌های مختلف تکثیر شده توسط نشانگر مایکرو ستلایت<sub>۴</sub> ST<sub>۲</sub>E<sub>۴</sub> در بین جدایه‌های St1-St34 Mycosphaerella graminicola مربوط به مناطق مختلف ایران (اعداد درج شده در بالای شکل شماره جدایه‌های الکتروفورز شده و M نشانگر استاندارد ۵۰ bp می‌باشد. پیکان‌های سیاه رنگ سه الی مختلف یک مکان ژئی را نشان می‌دهند)

**Fig 1.** Different alleles amplified using ST<sub>2</sub>E<sub>4</sub> 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)

جمعیت‌های مورد آزمایش تقسیم‌بندی شد، ۷۷٪ تنوع در داخل جمعیت‌ها و ۲۳٪ تنوع بین مناطق توزیع شده بود (جدول ۵). با استفاده از روش کولمر و همکاران (Kolmer *et al.* 1995) تعداد ۲۳ هاپلوتیپ مختلف در بین ۵۸ جدایه مورد بررسی شناسایی گردید. این هاپلوتیپ‌ها (فوتیپ‌های مولکولی) به طور تصادفی در میان مناطق مختلف نمونه‌برداری توزیع شده بودند. به طور 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،

آغازگرهای M<sub>13</sub> و W<sub>6</sub> توانستند تغییرات ژنتیکی جدایه‌ها را نشان دهند ولی جفت آغازگر I<sub>12</sub> باندی تشکیل داد که در تمامی جدایه‌ها یکسان بود، بنابراین در محاسبات وارد نگردید. برای بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ ابتدا فراوانی آلل‌های به دست 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<sub>1</sub>G<sub>7</sub> و حداقل تنوع ژنتیکی (۰/۶۲) با نشانگر M<sub>13</sub> محاسبه گردید (جدول ۵). وقتی تنوع ژنتیکی محاسبه شده برای هر مکان به تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌های قارچ و بین



شکل ۲. نقوش الکتروفورزی حاصل از به کارگیری rep-PCR با آغازگرهای ERIC1AR و BOX 2 در بین 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 استاندارد ۱۰۰ bp 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.

آغازگرهای Primers	تنوع کل آل ها Total allelic diversity	تنوع آل ها در بین مناطق Allelic diversity among locations	تنوع آل ها در داخل مناطق Allelic diversity within locations
ST <sub>2</sub> E <sub>4</sub>	0.50	0.08	0.42
ST <sub>2</sub> C <sub>10</sub>	0.40	0.15	0.26
ST <sub>1</sub> G <sub>7</sub>	0.25	0.06	0.19
ST <sub>1</sub> E <sub>7</sub>	0.43	0.06	0.37
M <sub>13</sub>	0.62	0.19	0.42
W <sub>6</sub>	0.43	0.06	0.37
Mean	0.44	0.10	0.34

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 به کار رفته است، استفاده از ارقام مقاوم به عنوان 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  $0/44\%$  بود. وقتی تنوع ژنتیکی کل جمعیت به تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌های قارچ و بین جمعیت‌های مورد آزمایش تقسیم‌بندی شد،  $0/77\%$  تنوع در داخل جمعیت‌ها و  $0/23\%$  تنوع بین مناطق توزیع شده بود. مک دونالد و مارتینز (McDonald & Martinez 1990) با به‌کارگیری نشانگرهای RFLP تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت *M. graminicola* در کالیفرنیا را  $0/45\%$  گزارش نمودند. اون و همکاران (Owen *et al.* 1998) با به‌کارگیری ۹ جفت آغازگر میکروستلاتیت تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت *M. graminicola* را  $0/49\%$  به‌دست آوردند. رضوی و هیوز (Razavi & Hughes 2004) تنوع ژنتیکی ۹۰ جدایه قارچ *M. graminicola* جمع‌آوری شده از ۱۰

اردبیل و فارس پراکنده بود (جدول ۶).

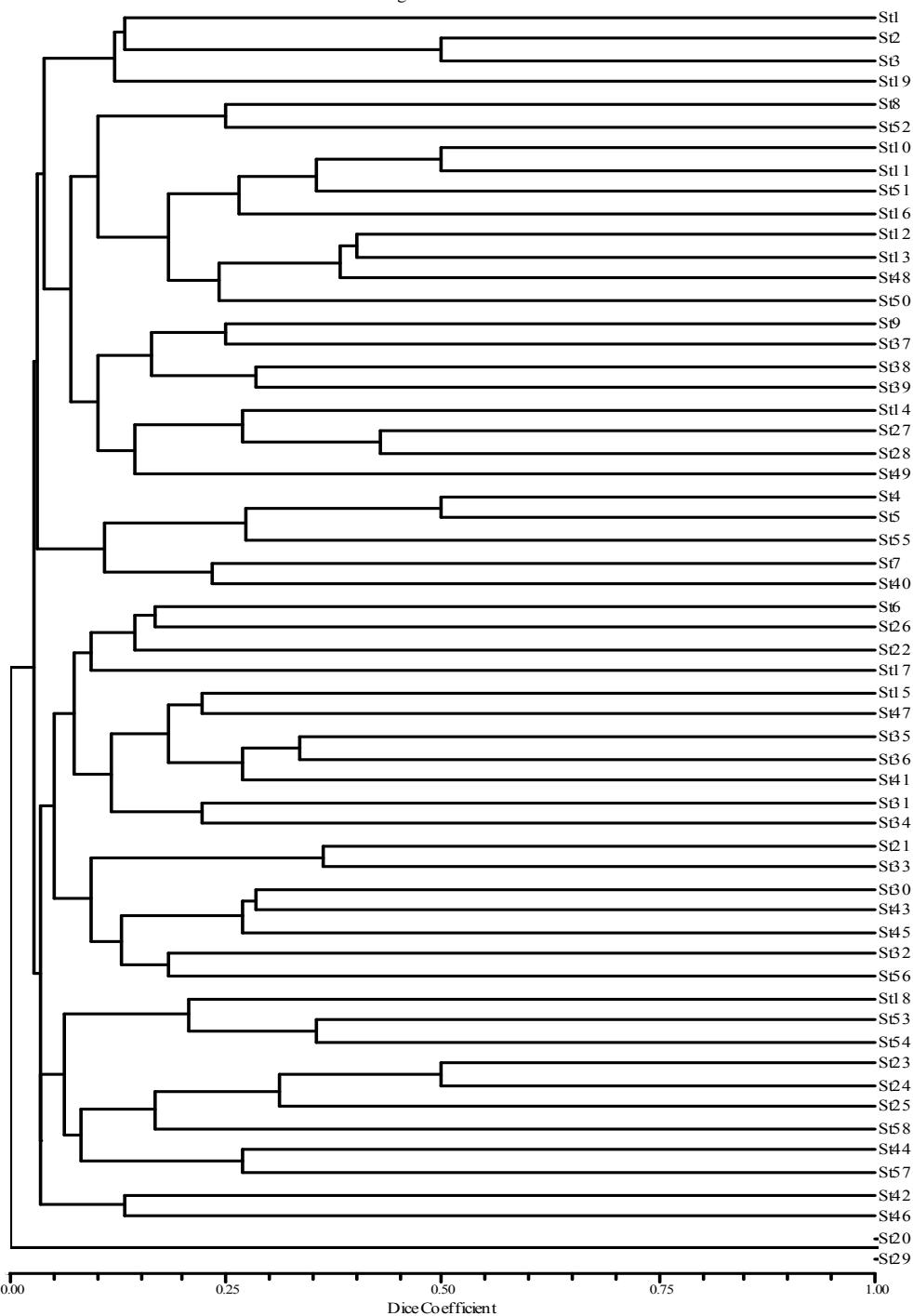
به‌کارگیری آغازگرهای ERIC 1AR و BOX 2 توانست قطعات متعددی از DNA ژنوم جدایه‌های *M. graminicola* را تکثیر نماید اما فقط قطعات تکثیر شده بین  $100\text{ bp}$  تا  $1500\text{ bp}$  در محاسبات منظور گردید. مجموعاً  $158$  قطعه DNA در میان کل جمعیت جدایه‌های مورد بررسی که از وضوح خوبی برخوردار و تکرارپذیر 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  $100\text{ bp}$  می‌باشد. نتیجه تجزیه خوش‌های با استفاده از ضربی تشابه UPGMA نشان داد که جدایه St 20 جمع‌آوری شده از کرمانشاه و جدایه St 29 جمع‌آوری شده از ایلام  $100\%$  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  $0/5\%$ ). هم‌چنین بین جدایه‌های St 23 و St 24 جمع‌آوری شده از St 2، St 3، St 4، St 5 و جدایه‌های St 10 و St 11 جمع‌آوری شده از استان گلستان و جدایه‌های St 27، St 28، St 29، St 30، St 31، St 32، St 33، St 34، St 35، St 36، St 37، St 38، St 39، St 40، St 41، St 42، St 43، St 44، St 45، St 46، St 47، St 48، St 49، St 50، St 51، St 52، St 53، St 54، St 55، St 56، St 57، St 58، St 59، St 60، St 61، St 62، St 63، St 64، St 65، St 66، St 67، St 68، St 69، St 70، St 71، St 72، St 73، St 74، St 75، St 76، St 77، St 78، St 79، St 80، St 81، St 82، St 83، St 84، St 85، St 86، St 87، St 88، St 89، St 90، St 91، St 92، St 93، St 94، St 95، St 96، St 97، St 98، St 99، St 100، St 101، St 102، St 103، St 104، St 105، St 106، St 107، St 108، St 109، St 110، St 111، St 112، St 113، St 114، St 115، St 116، St 117، St 118، St 119، St 120، St 121، St 122، St 123، St 124، St 125، St 126، St 127، St 128، St 129، St 130، St 131، St 132، St 133، St 134، St 135، St 136، St 137، St 138، St 139، St 140، St 141، St 142، St 143، St 144، St 145، St 146، St 147، St 148، St 149، St 150، St 151، St 152، St 153، St 154، St 155، St 156، St 157، St 158، St 159، St 160، St 161، St 162، St 163، St 164، St 165، St 166، St 167، St 168، St 169، St 170، St 171، St 172، St 173، St 174، St 175، St 176، St 177، St 178، St 179، St 180، St 181، St 182، St 183، St 184، St 185، St 186، St 187، St 188، St 189، St 190، St 191، St 192، St 193، St 194، St 195، St 196، St 197، St 198، St 199، St 200، St 201، St 202، St 203، St 204، St 205، St 206، St 207، St 208، St 209، St 210، St 211، St 212، St 213، St 214، St 215، St 216، St 217، St 218، St 219، St 220، St 221، St 222، St 223، St 224، St 225، St 226، St 227، St 228، St 229، St 230، St 231، St 232، St 233، St 234، St 235، St 236، St 237، St 238، St 239، St 240، St 241، St 242، St 243، St 244، St 245، St 246، St 247، St 248، St 249، St 250، St 251، St 252، St 253، St 254، St 255، St 256، St 257، St 258، St 259، St 260، St 261، St 262، St 263، St 264، St 265، St 266، St 267، St 268، St 269، St 270، St 271، St 272، St 273، St 274، St 275، St 276، St 277، St 278، St 279، St 280، St 281، St 282، St 283، St 284، St 285، St 286، St 287، St 288، St 289، St 290، St 291، St 292، St 293، St 294، St 295، St 296، St 297، St 298، St 299، St 300، St 301، St 302، St 303، St 304، St 305، St 306، St 307، St 308، St 309، St 310، St 311، St 312، St 313، St 314، St 315، St 316، St 317، St 318، St 319، St 320، St 321، St 322، St 323، St 324، St 325، St 326، St 327، St 328، St 329، St 330، St 331، St 332، St 333، St 334، St 335، St 336، St 337، St 338، St 339، St 340، St 341، St 342، St 343، St 344، St 345، St 346، St 347، St 348، St 349، St 350، St 351، St 352، St 353، St 354، St 355، St 356، St 357، St 358، St 359، St 360، St 361، St 362، St 363، St 364، St 365، St 366، St 367، St 368، St 369، St 370، St 371، St 372، St 373، St 374، St 375، St 376، St 377، St 378، St 379، St 380، St 381، St 382، St 383، St 384، St 385، St 386، St 387، St 388، St 389، St 390، St 391، St 392، St 393، St 394، St 395، St 396، St 397، St 398، St 399، St 400، St 401، St 402، St 403، St 404، St 405، St 406، St 407، St 408، St 409، St 410، St 411، St 412، St 413، St 414، St 415، St 416، St 417، St 418، St 419، St 420، St 421، St 422، St 423، St 424، St 425، St 426، St 427، St 428، St 429، St 430، St 431، St 432، St 433، St 434، St 435، St 436، St 437، St 438، St 439، St 440، St 441، St 442، St 443، St 444، St 445، St 446، St 447، St 448، St 449، St 450، St 451، St 452، St 453، St 454، St 455، St 456، St 457، St 458، St 459، St 460، St 461، St 462، St 463، St 464، St 465، St 466، St 467، St 468، St 469، St 470، St 471، St 472، St 473، St 474، St 475، St 476، St 477، St 478، St 479، St 480، St 481، St 482، St 483، St 484، St 485، St 486، St 487، St 488، St 489، St 490، St 491، St 492، St 493، St 494، St 495، St 496، St 497، St 498، St 499، St 500، St 501، St 502، St 503، St 504، St 505، St 506، St 507، St 508، St 509، St 510، St 511، St 512، St 513، St 514، St 515، St 516، St 517، St 518، St 519، St 520، St 521، St 522، St 523، St 524، St 525، St 526، St 527، St 528، St 529، St 530، St 531، St 532، St 533، St 534، St 535، St 536، St 537، St 538، St 539، St 540، St 541، St 542، St 543، St 544، St 545، St 546، St 547، St 548، St 549، St 550، St 551، St 552، St 553، St 554، St 555، St 556، St 557، St 558، St 559، St 560، St 561، St 562، St 563، St 564، St 565، St 566، St 567، St 568، St 569، St 570، St 571، St 572، St 573، St 574، St 575، St 576، St 577، St 578، St 579، St 580، St 581، St 582، St 583، St 584، St 585، St 586، St 587، St 588، St 589، St 590، St 591، St 592، St 593، St 594، St 595، St 596، St 597، St 598، St 599، St 600، St 601، St 602، St 603، St 604، St 605، St 606، St 607، St 608، St 609، St 610، St 611، St 612، St 613، St 614، St 615، St 616، St 617، St 618، St 619، St 620، St 621، St 622، St 623، St 624، St 625، St 626، St 627، St 628، St 629، St 630، St 631، St 632، St 633، St 634، St 635، St 636، St 637، St 638، St 639، St 640، St 641، St 642، St 643، St 644، St 645، St 646، St 647، St 648، St 649، St 650، St 651، St 652، St 653، St 654، St 655، St 656، St 657، St 658، St 659، St 660، St 661، St 662، St 663، St 664، St 665، St 666، St 667، St 668، St 669، St 670، St 671، St 672، St 673، St 674، St 675، St 676، St 677، St 678، St 679، St 680، St 681، St 682، St 683، St 684، St 685، St 686، St 687، St 688، St 689، St 690، St 691، St 692، St 693، St 694، St 695، St 696، St 697، St 698، St 699، St 700، St 701، St 702، St 703، St 704، St 705، St 706، St 707، St 708، St 709، St 710، St 711، St 712، St 713، St 714، St 715، St 716، St 717، St 718، St 719، St 720، St 721، St 722، St 723، St 724، St 725، St 726، St 727، St 728، St 729، St 730، St 731، St 732، St 733، St 734، St 735، St 736، St 737، St 738، St 739، St 740، St 741، St 742، St 743، St 744، St 745، St 746، St 747، St 748، St 749، St 750، St 751، St 752، St 753، St 754، St 755، St 756، St 757، St 758، St 759، St 760، St 761، St 762، St 763، St 764، St 765، St 766، St 767، St 768، St 769، St 770، St 771، St 772، St 773، St 774، St 775، St 776، St 777، St 778، St 779، St 780، St 781، St 782، St 783، St 784، St 785، St 786، St 787، St 788، St 789، St 790، St 791، St 792، St 793، St 794، St 795، St 796، St 797، St 798، St 799، St 800، St 801، St 802، St 803، St 804، St 805، St 806، St 807، St 808، St 809، St 8010، St 8011، St 8012، St 8013، St 8014، St 8015، St 8016، St 8017، St 8018، St 8019، St 8020، St 8021، St 8022، St 8023، St 8024، St 8025، St 8026، St 8027، St 8028، St 8029، St 8030، St 8031، St 8032، St 8033، St 8034، St 8035، St 8036، St 8037، St 8038، St 8039، St 8040، St 8041، St 8042، St 8043، St 8044، St 8045، St 8046، St 8047، St 8048، St 8049، St 8050، St 8051، St 8052، St 8053، St 8054، St 8055، St 8056، St 8057، St 8058، St 8059، St 8060، St 8061، St 8062، St 8063، St 8064، St 8065، St 8066، St 8067، St 8068، St 8069، St 8070، St 8071، St 8072، St 8073، St 8074، St 8075، St 8076، St 8077، St 8078، St 8079، St 8080، St 8081، St 8082، St 8083، St 8084، St 8085، St 8086، St 8087، St 8088، St 8089، St 8090، St 8091، St 8092، St 8093، St 8094، St 8095، St 8096، St 8097، St 8098، St 8099، St 80100، St 80101، St 80102، St 80103، St 80104، St 80105، St 80106، St 80107، St 80108، St 80109، St 80110، St 80111، St 80112، St 80113، St 80114، St 80115، St 80116، St 80117، St 80118، St 80119، St 80120، St 80121، St 80122، St 80123، St 80124، St 80125، St 80126، St 80127، St 80128، St 80129، St 80130، St 80131، St 80132، St 80133، St 80134، St 80135، St 80136، St 80137، St 80138، St 80139، St 80140، St 80141، St 80142، St 80143، St 80144، St 80145، St 80146، St 80147، St 80148، St 80149، St 80150، St 80151، St 80152، St 80153، St 80154، St 80155، St 80156، St 80157، St 80158، St 80159، St 80160، St 80161، St 80162، St 80163، St 80164، St 80165، St 80166، St 80167، St 80168، St 80169، St 80170، St 80171، St 80172، St 80173، St 80174، St 80175، St 80176، St 80177، St 80178، St 80179، St 80180، St 80181، St 80182، St 80183، St 80184، St 80185، St 80186، St 80187، St 80188، St 80189، St 80190، St 80191، St 80192، St 80193، St 80194، St 80195، St 80196، St 80197، St 80198، St 80199، St 80200، St 80201، St 80202، St 80203، St 80204، St 80205، St 80206، St 80207، St 80208، St 80209، St 80210، St 80211، St 80212، St 80213، St 80214، St 80215، St 80216، St 80217، St 80218، St 80219، St 80220، St 80221، St 80222، St 80223، St 80224، St 80225، St 80226، St 80227، St 80228، St 80229، St 80230، St 80231، St 80232، St 80233، St 80234، St 80235، St 80236، St 80237، St 80238، St 80239، St 80240، St 80241، St 80242، St 80243، St 80244، St 80245، St 80246، St 80247، St 80248، St 80249، St 80250، St 80251، St 80252، St 80253، St 80254، St 80255، St 80256، St 80257، St 80258، St 80259، St 80260، St 80261، St 80262، St 80263، St 80264، St 80265، St 80266، St 80267، St 80268، St 80269، St 80270، St 80271، St 80272، St 80273، St 80274، St 80275، St 80276، St 80277، St 80278، St 80279، St 80280، St 80281، St 80282، St 80283، St 80284، St 80285، St 80286، St 80287، St 80288، St 80289، St 80290، St 80291، St 80292، St 80293، St 80294، St 80295، St 80296، St 80297، St 80298، St 80299، St 80300، St 80301، St 80302، St 80303، St 80304، St 80305، St 80306، St 80307، St 80308، St 80309، St 80310، St 80311، St 80312، St 80313، St 80314، St 80315، St 80316، St 80317، St 80318، St 80319، St 80320، St 80321، St 80322، St 80323، St 80324، St 80325، St 80326، St 80327، St 80328، St 80329، St 80330، St 80331، St 80332، St 80333، St 80334، St 80335، St 80336، St 80337، St 80338، St 80339، St 80340، St 80341، St 80342، St 80343، St 80344، St 80345، St 80346، St 80347، St 80348، St 80349، St 80350، St 80351، St 80352، St 80353، St 80354، St 80355، St 80356، St 80357، St 80358، St 80359، St 80360، St 80361، St 80362، St 80363، St 80364، St 80365، St 80366، St 80367، St 80368، St 80369، St 80370، St 80371، St 80372، St 80373، St 80374، St 80375، St 80376، St 80377، St 80378، St 80379، St 80380، St 80381، St 80382، St 80383، St 80384، St 80385، St 80386، St 80387، St 80388، St 80389، St 80390، St 80391، St 80392، St 80393، St 80394، St 80395، St 80396، St 80397، St 80398، St 80399، St 80400، St 80401، St 80402، St 80403، St 80404، St 80405، St 80406، St 80407، St 80408، St 80409، St 80410، St 80411، St 80412، St 80413، St 80414، St 80415، St 80416، St 80417، St 80418، St 80419، St 80420، St 80421، St 80422، St 80423، St 80424، St 80425، St 80426، St 80427، St 80428، St 80429، St 80430، St 80431، St 80432، St 80433، St 80434، St 80435، St 80436، St 80437، St 80438، St 80439، St 80440، St 80441، St 80442، St 80443، St 80444، St 80445، St 80446، St 80447، St 80448، St 80449، St 80450، St 80451، St 80452، St 80453، St 80454، St 80455، St 80456، St 80457، St 80458، St 80459، St 80460، St 80461، St 80462، St 80463، St 80464، St 80465، St 80466، St 80467، St 80468، St 80469، St 80470، St 80471، St 80472، St 80473، St 80474، St 80475، St 80476، St 80477، St 80478، St 80479، St 80480، St 80481، St 80482، St 80483، St 80484، St 80485، St 80486، St 80487، St 80488، St 80489، St 80490، St 80491، St 80492، St 80493، St 80494، St 80495، St 80496، St 80497، St 80498، St 80499، St 80500، St 80501، St 80502، St 80503، St 80504، St 80505، St 80506، St 80507، St 80508، St 80509، St 80510، St 80511، St 80512، St 80513، St 80514، St 80515، St 80516، St 80517، St 80518، St 80519، St 80520، St 80521، St 80522، St 80523، St 80524، St 80525، St 80526، St 80527، St 80528، St 80529، St 80530، St 80531، St 80532، St 80533، St 80534، St 80535، St 80536، St 80537، St 80538، St 80539، St 80540، St 80541، St 80542، St 80543، St 80544، St 80545، St 80546، St 80547، St 80548، St 80549، St 80550، St 80551، St 80552، St 80553، St 80554، St 80555، St 80556، St 80557، St 80558، St 80559، St 80560، St 80561، St 80562، St 80563، St 80564، St 80565، St 80566، St 80567، St 80568، St 80569، St 80570، St 80571، St 80572، St 80573، St 80574، St 80575، St 80576، St 80577، St 80578، St 80579، St 80580، St 80581، St 80582، St 80583، St 80584، St 80585، St 80586، St 80587، St 80588، St 80589، St 80590، St 80591، St 80592، St 80593، St 80594، St 80595، St 80596، St 80597، St 80598، St 80599، St 80600، St 80601، St 80602، St 80603، St 80604، St 80605، St 80606، St 80607، St 80608، St 80609، St 80610، St 80611، St 80612، St 80613، St 80614، St 80615، St 80616، St 80617، St 80618، St 80619، St 80620، St 80621، St 80622، St 80623، St 80624، St 80625، St 80626، St 80627، St 80628، St 80629، St 80630، St 80631، St 80632، St 80633، St 80634، St 80635، St 80636، St 80

جدول ۶. 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	تعداد در مناطق Numbers within locations
		within population	
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	4(1)
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)

Similarity of 58 isolates of *Mycosphaerella graminicola* collected from seven provinces of Iran using Dice coefficient



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 به کمک نشانگر rep-PCR (آغازگرهای ERIC1AR و BOX 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.**

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 صفتی آباد دزفول که به صورت 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 به دلیل دور بودن از سایر مناطق جغرافیایی دنیا، منشا گرفتن جمعیت فوق از چند جدایه محدود 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 ضربیت 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 به کارگیری 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

نقشه مختلف یک مزرعه در ایالت ساسکاچوان کانادا را ۴۴٪ 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 ۹۸ جدایه *M. graminicola* که از مناطق، مزارع و برگ‌های مختلف یک گیاه در سوئیس، اسرائیل و ایالت‌های ارگون و تگزاس آمریکا جمع‌آوری نموده بودند دریافتند که میانگین تنوع ژنتیکی در کشور سوئیس ۴۷٪، در اسرائیل ۵۰٪، و در ایالت‌های ارگون و تگزاس آمریکا ۴۴٪ بوده میانگین تنوع ژنتیکی به دست 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 داخل جمعیت‌ها و ۲۳٪ در بین جمعیت‌ها توزیع شده بود. نامبردگان نشان دادند که پایین بودن تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها به دلیل وقوع جریان ژنی (gene flow) می‌باشد. توزیع میزان تنوع ژنتیکی در داخل 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 به دلیل 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

سیکل جنسی در طی مراحل تقسیم میوز ترکیب جدیدی از زن‌ها 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 سasan رجایی، مهندس خشنود نوراللهی، مهندس غفور زاده دباغ و مهندس داریوش صفائی در جمع‌آوری و ارسال نمونه‌های قارچ عامل بیماری سپتوريوز تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع

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

قارچ *M. graminicola* شناسایی شد، که هاپلوتیپ HPT1 بیشترین فراوانی را داشت و به عنوان هاپلوتیپ غالب جمعیت می‌باشد. با توجه به این که 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 معمولاً به صورت غیرجنسی به صورت پیکنید در بقایای گیاهی زمستان گذرانی می‌کند و در اوایل بهار با تولید پیکنیدیوسپور آلدگی‌های اولیه آغاز می‌شود و هم‌چنین در بعضی از کشورها که فرم جنسی قارچ از آن کشورها گزارش شده آسکوکسپورها نقش مهمی در ایجاد آلدگی اولیه ایفا می‌کنند و با توجه به گزارش اخیر هر دو تیپ آمیزشی قارچ *M. graminicola* از ایران (Komijani et al. 2008)، احتمالاً 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