Archive of SID

بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۲ / شماره ۲ / سال ۱۳۹۵: ۲۴۹-۲۶۶

بررسی پراکنش و تنوع ژنتیکی آلودگی ایسیومی زرشک و اهمیت آن در بیماری زنگ زرد گندم در استان لرستان*

فرشته مهدی‌نیا[1]**، حسین علایی[2]، ابراهیم صداقتی[2] و علی دهقانی[3]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۳)

چکیده

زنگ های گندم از جمله زنگ زرد و سیاه از مهمترین عوامل بیماریزای فارچی گندم درجهان و ایران می باشند که با تولید نژادهای جدید ناشی از جهش یا نوترکیبی جنسی غالبا" باعث بروز اپیدمی های شدید و کاهش عملکرد محصول میشوند. در این پژوهش پراکنش و تنوع ژنتیکی آلودگی ایسیومی بوته های زرشک و ارتباط آنها با زنگ زرد گندم مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۹۵ نمونه از اندامهای آلوده ایسیومی زرشک از رویشگاه‌های طبیعی بروجرد، دورود، ازنا و الیگودرز جمع آوری گردید. مایه‌زنی گیاهچه‌های گندم با ایسیوسپورهای برگ‌های آلوده زرشک در شرایط گلخانه و مزرعه انجام شد. نتایج آزمون بیماریزایی نشان داد که جدایه های ایسیومی قادر به تولید یوردینیوسپورهای زنگ زرد گندم (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) و زنگ سیاه گندم (*P. graminis* f. sp. *tritici*) روی ارقام حساس می باشند. برای شناسایی مولکولی جدایه ها، دی ان ای ژنومی جدایه های ایسیومی زرشک با استفاده از آغازگرهای ناحیه‌ی rDNA تکثیر و تعیین توالی گردید. بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های ایسیومی با تکثیر ناحیه‌ی IGS1-rDNA در ۱۳٤ جدایه انجام شد. نتایج بررسی های مولکولی با تائید نتایج آزمون بیماریزایی نشان داد که بوته‌های زرشک میتوانند میزبان ایسیومی زنگ زرد و زنگ سیاه گندم در استان لرستان باشند. تکثیر ناحیه‌ی IGS1 در جدایه‌های منطقه‌ی ازنا و الیگودرز بیشتر بصورت ۳ باندی بترتیب با فراوانی ۱۵ و۲۱ جدایه بود. در منطقه دورود بیشتر بصورت پنج باندی (۲٦ جدایه) و در بروجرد بصورت دو باندی (۱۰جدایه) مشاهده شد و نشان داد که تنوع ژنتیکی بین ایسیوسپورهای مناطق نمونه‌برداری شده وجود دارد.

کلیدواژه: *Puccinia striiformis*، میزبان واسط، IGS1-rDNA، زرشک، زنگ نواری

---

* بخشی از رساله کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به گروه بیماری شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه دانشگاه ولیعصر (عج)، رفسنجان

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

۱. دانشجویی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر(عج)، رفسنجان.

۲. استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر(عج) رفسنجان.

۳. عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان

www.SID.ir

Archive of SID

Distribution and genetic diversity of aecial infection on barberry and its importance to wheat yellow rust disease in Lorestan Province*

F. Mehdinia[1]*, H. Alaei[2], E. Sedaghati[2], and A. Dehghani[3]

(Received: 28.12.2014; Accepted: 23.5.2016)

Abstract

Wheat rusts including stripe and stem rusts are the most important fungal diseases in the world and Iran as frequently causes natural epidemics and significant yield loses due to rapid development of new races in life cycle resulted from mutation or sexual recombination. In this research, distribution and genetic diversity of aecial infection on barberry bushes and their relation to wheat yellow rust was studied. A total of 95 samples of infected leaves to aecial stage on barberry bushes were collected from Borujerd, Dorud, Azna and Aligudarz regions. To identify the rust species, *in vivo* and *in vitro* pathogenicity test were conducted by artificial inoculation of wheat seedlings using collected aeciospores from each region. The results showed the production of urediniospores of *P. striiformis* f. sp. *tritici* (yellow rust) as well as *P. graminis* f. sp. *tritici* (black rust) in inoculated wheat seedlings. Molecular detection and sequencing of the rDNA regions of representative aecial isolates on Barberry were done. Genetic diversity of 134 aecial isolates was also studied by amplification of IGS1-rDNA region. The Results also confirmed the pathogenicity test and showed that barberry could be the aecial host of yellow and black rusts in Lorestan province. The IGS-rDNA amplification of aecial isolates from Azna and Aligudarz showed most a production of three bands with a frequency of 15 and 21 isolates respectively. In Dorud samples was with five bands (26 isolates) as well as in Broujerd samples with two bands (10 isolates) in which showed a genetic variation among aecial isolates collected from sampling regions in Lorestan province.

Keywords: *Puccinia striiformis*, alternate host, IGS1-rDNA, Berberis, Stripe rust

* A Part of MSc. Thesis of the First Auther, Submitted to College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran.

** Corresponding author's E-mail: **fmehdinia@yahoo.com**

1. Former M.Sc. Student of Plant Pathology, Vali-Ee-Aasr Univ. of Rafsanjan, Iran
2. Assistant Prof. of Plant Pathology, Vali-Ee-Asr Univ. of Rafsanjan, Iran.
3. Faculty Member, Agricultural and Natural Resources Research Center, Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زنگ های غلات شامل زنگ سیاه (*Puccinia graminis* Pers:Pers f. sp. *tritici* Erikss.& E. Henn.)، زنگ قهوه ای (*P. triticina* Erikss.) و زنگ زرد (*P. striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Erikss) به عنوان عوامل اصلی و مهم محدودکنندهٔ تولید گندم در سراسرجهان و ایران به شمار می روند (Abbasi *et al.* 2004, Singh *et al.* 2011, Singh *et al.* 2015). زنگ زرد گندم یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در بسیاری از مناطق ایران ازجمله استان لرستان است که موجب کاهش عملکرد محصول می گردد (Rabaninasab *et al.* 2008b, Afshari 2010, Safavi 2015).

کشت ارقام حساس، تغییر پذیری در عامل بیماری‌زا و وجود شرایط اقلیمی مناسب باعث بروز اپیدمی های ویران کننده این بیماری می‌شود. زنگ زرد علاوه بر گندم به چاودار و ۱۸ جنس از گندمیان حمله می‌کند و بسیاری از باریک برگهای (چمن‌های) چند ساله از منابع مهم نگهداری قارچ عامل محسوب می‌شوند و احتمالاً می توانند به عنوان منبع اینوکلوم برای مناطق و کشتزارهای گندم دریافت کننده بعدی به شمار روند بطوریکه مهاجرت فصلی یوردینیوسپورها از دشت به ارتفاعات و بالعکس توسط محققین گزارش شده است (Hovmøller *et al.* 2002, Ma *et al.* 2010, Hovmøller *et al.* 2015).

حدود ۶۵ نژاد فیزیولوژیکی برای این زنگ شناسایی شده است. بوته‌های زرشک با نام علمی *Berberis* spp. L. به‌عنوان میزبان واسط برای بیماری‌های قارچی زنگ سیاه گندم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند، ولی اهمیت و نقش آن برای بیماری زنگ زرد گندم با عامل *P. striiformis* f.sp. *tritici* تا سال ۲۰۱۰ ناشناخته بود. جین و همکاران (Jin *et al.* 2010) بر اساس مطالعات آزمایشگاهی *In vitro* برای اولین‌بار بوته های زرشک را به عنوان میزبان واسط زنگ زردگندم گزارش کردند. امروزه میزبان واسط بودن بوته های زرشک در بعضی از مناطق توسط محققین مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است (Jin 2011, Zhao *et al.* 2013, Rodriguez-Algaba *et al.* 2014, Wang *et al.* 2015b) ولی با توجه به بررسی های انجام شده هنوز مطالعه ای در این خصوص در مناطق مهم گندم کاری ایران صورت نگرفته است.

در ایران طبق نظر گیاه شناسان پنج گونه وحشی زرشک شامل زرشک معمولی (*Berberis vulgaris*)، زرشک راست خوشه (*B. orthobotrys*)، زرشک خراسانی (*B. khorasanica*)، زرشک زالزالکی (*B. crataegina*) و زرشک زرافشانی (*B. integerrima*) وجود دارد (Kafi & Balandary 2001). در دنیا میزبانهای واسط زنگ زرد گونه‌های مختلف زرشک از قبیل *B. chinensis*, *B. koreana*, *B. holstii*, *B. vulgaris* و نیز هیبرید بین گونه‌ای میان *B. koreana* ×*B. thunbergii* گزارش شده است که اغلب این گونه‌ها در برابر زنگ ساقه گندم دارای مقاومت بالایی هستند. زنگ زرد نیز به عنوان زنگ ماکروسیکلیک و دگر پایه محسوب می‌گردد. با توجه به حضور چرخه‌ی جنسی *P. striiformis* f.sp. *tritici* روی زرشک، این گیاه می تواند نقش اساسی در ترکیبات جدید بیماری‌زایی این قارچ ایفا کند. با توجه به تنوع بالای ژنتیکی در این زنگ به نظر می‌رسد که علاوه بر جهش و هیبریداسیون رویشی، نوترکیبی جنسی نیز عامل اصلی این تنوع ژنتیکی باشد. تا کنون بیش از ۴۰ ژن مقاومت به زنگ زرد (Yr) شناخته شده است. استفاده از ژن‌های مقاومت اختصاصی به عنوان یک روش کنترل مناسب برای زنگ زرد، موفقیت آمیز نبوده است چرا که جمعیت بیمارگر به

www.SID.ir

Archive of SID

سرعت دچار دگرگونی شده و در عرض چند سال قادر خواهد بود بر ژن‌های مقاومت معرفی شده غلبه نمایند(Steele *et al.* 2001). بنابراین داشتن اطلاعات بیشتر در خصوص ساختار ژنتیکی جمعیت‌های موجود و ارتباط بین این جمعیت و میزبان واسط ضروری است تا بتوان تاثیر این مقاومت‌ها را ارزیابی و یا پیش بینی کرد. در گذشته تعیین تنوع ژنتیکی قارچ‌ها منحصراً به کمک تعیین نژاد و بر پایه‌ی استفاده گروهی از ارقام افتراقی استوار بود. گرچه این روش مزایا و معایب خاص خود را دارد ولی در جای خود به عنوان بهترین و مهم‌ترین روش برای تعیین تفاوت ژنتیکی جمعیت‌های قارچ محسوب می‌شود.

امروزه با ابداع روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR، شناسایی ژنوتیپ و پاتوتایپ های قارچ‌ها از جمله زنگها دچار تحول گردید. روش انگشت‌نگاری DNA، ابزاری قدرتمند برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ‌های زنگ می‌باشد که توسط محققین مختلفی روی جمعیت‌های متعددی از قارچهای عامل زنگ زرد، زنگ سیاه و زنگ قهوه ای غلات (Chen *et al.* 1993, Autrique *et al.* 1995, Chen *et al.* 1995, Keiper *et al.* 2003) و یا سایر زنگها (Gomez *et al.* 2006) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. برای شناخت عمیق از اپیدمیولوژی، ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی در بیمارگرهای قارچی لازم است از یک نشانگر ژنتیکی مناسب استفاده کرد. واحدهای تکراری DNA ریبوزومی (rDNA) به‌عنوان یک فاکتور مناسب برای شناسایی و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی بسیاری از گونه‌های قارچی از جمله قارچهای زنگ استفاده شده‌اند بطوریکه چند شکلی بین‌گونه‌ای و گاهی اوقات حتی درون‌گونه‌ای را ردیابی می کند (Simon & Weiß 2008, Alaei *et al.* 2009b, De Backer *et al.* 2011, Alaei *et al.* 2012). وانگ و همکاران (Wang *et al.* 2012) تکثیر ناحیه‌ی IGS1-rDNA برای سه جدایه‌ی *P. striiformis* f.sp. *tritici* با استفاده از آغازگرهای ناحیه محافظت‌شده نواحی 5s و ۲۸s را با موفقیت انجام دادند. نقش IGS1-rDNA در مطالعه تنوع ژنتیکی سه جدایه از قارچ *P. striiformis* f.sp. *tritici* عامل بیماری زنگ زرد گندم در ایران توسط ربانی‌نسب و همکاران (Rabaninasab *et al.* 2008a) و زنگ قهوه ای گندم (Dadrezaie *et al.* 2013, Niazmand *et al.* 2013) بررسی شده است.

با توجه به اهمیت اقتصادی محصول گندم و اهمیت بیماری زنگ زرد گندم در استان لرستان، هدف از این پژوهش ردیابی و شناسایی قارچ عامل زنگ زرد گندم *P. striiformis* f.sp. *tritici* در آلودگی های ایسیومی زرشک با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه IGS1-rDNA بود. هدف دوم این پژوهش، بررسی نقش برته‌های زرشک به عنوان میزبان واسط زنگ زرد گندم در استان لرستان با استفاده از آزمون بیماریزایی ایسیوسپورها روی گیاهچه های گندم و مطالعه تنوع ژنتیکی آلودگی های ایسیومی زرشک با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می باشد که امید است یافته‌های حاصل از این پژوهش بتواند دریچه‌ای جدید برای شناخت زیست‌شناسی و چرخه‌ی زندگی زنگ زرد گندم باز نماید و همچنین مقدمه ای برای بررسی‌های بیشتر نقش برته‌های زرشک در ایجاد اپیدمی های زنگ زرد و زنگ سیاه گندم باشد.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری

نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش طی ماههای تیر تا مهر سال ۱۳۹۱ از برته‌های زرشک آلوده به مرحله

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ – موقعیت جغرافیایی نمونه های استفاده شده در این پژوهش و نتایج آزمون بیماری زایی آلودگی ایسومی برگ زرشک روی گیاهچه های گندم

Table 1. Location of the samples used in this study and the results of pathogenicity test of aecium bearing barberry leaf samples on wheat seedlings.

Date (2012)	Location	Isolate Code	# of Sample	Height (m)	Longtitude Latitude	Pathogenicity test	
						Pst	*Pgt*
01/07	Dorud Choobdar Olia	CH1-CH10	10	2021	49 53 19 18 33 37 30 01	+	-
09/07	Aligudarz Sad road	A1-A10	10	1804	49 39 34 03 33 02 42 08	+	+
09/07	Aligudarz KizanDare	A11-A15	5	1889	49 37 36 05 33 02 02 07	+	+
09/07	Aligudarz KizanDare	A16-A20	5	2209	49 55 27 06 33 01 12 05	+	+
29/07	Dorud Chamnar	M21-M25	5	1638	49 11 45 03 33 23 05 01	+	-
29/07	Dorud Daryab	D1-D10	10	1647	49 11 57 08 33 25 39 04	+	-
04/08	Azna Darband	M1-M20	20	1720	49 25 23 01 33 27 12 04	+	-
08/08	Dorud ChoobdarOlia	CH11-CH30	20	2030	49 08 19 08 33 37 35 01	+	-
22/09	Borujerd Dehgah	B1-B10	10	1955	49 44 28 06 33 39 02 02	+	-

Puccinia striiformis f. sp. *tritici* (Pst)
Puccinia graminis f. sp. *tritici* (Pgt)
Positive (+) assay for Uredinia formed by inoculating wheat with aeciospores; negative (–).

ایسیومی در مناطق مختلف رویشگاه‌های طبیعی استان لرستان شامل ارتفاعات شهرهای بروجرد، دورود، ازنا و الیگودرز جمع‌آوری شد (جدول ۱). در هر منطقه به‌صورت تصادفی تعدادی برته انتخاب شد و از اندام های آلوده به مرحله‌ی ایسیومی بالغ زنگ روی شاخ و برگ از جهت های مختلف برته ها به صورت تصادفی نمونه تهیه گردید. نمونه ها در کیسه های کاغذی قرار داده شد و به آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی استان لرستان، شهر خرم آباد منتقل و درشرایط دمای اتاق خشک شدند و سپس در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس برای استفاده های بعدی نگهداری شد. ریخت شناسی جوش ها و وجود مراحل مختلف زنگ روی نمونه‌ها توسط استریومیکروسکوپ بررسی شد. اسلایدهای میکروسکوپی از برش‌های عرضی جوش ها با استفاده از تیغ جراحی در محلول رنگ آمیزی لاکتوفنل (Sinclair & Dhingra 1995) تهیه شد و با میکروسکوپ نوری ((Olympus BH2) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های یوریدیوسپور از زنگ سیاه گندم (*P. graminis* f.sp. *tritici*) و زنگ قهوه ای گندم (*P. triticina*) از بخش تحقیقات غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، تهیه شد. یک نمونه زنگ زرد گندم (*P. striiformis* f.sp. *tritici*) جمع آوری شده در سال۱۳۸۷ از استان همدان نیز از هرباریوم آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان تهیه گردید. یک جدایه‌ی زنگ زرد جدا شده از علف هرز جودره *Hordeum spontaneum* L. در منطقه الیگودرز و یک

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه از گندمیان آلوده به مرحله تلیومی زنگ سیاه که در سایه‌انداز و اطراف بوته‌های زرشک آلوده به زنگ روییده بودند و همچنین نمونه زنگ سیاه گندم از مزارع بروجرد و نمونه زنگ زرد گندم از مزارع دورود برای انجام کارهای مولکولی جمع آوری و در این پژوهش استفاده شد.

مایه‌زنی ایسیوسپورهای زرشک روی گیاهچه های گندم

به منظور اثبات بیماری‌زایی ایسیوسپورها بر روی گندم و بررسی نتایج آلودگی آنها به بیماری زنگ سیاه (ساقه) *P. graminis* f.sp. *tritici* و یا زنگ زرد (نواری) گندم *P. striiformis* f.sp. *tritici* مایه زنی مصنوعی گیاهچه ها بر اساس روش شرح داده شده در شرایط گلخانه و مزرعه (Safavi & Afshari 2012) با اندکی تغییر انجام شد. از ارقام گندم الوند، بهار، بولانی و موروکو استفاده شد. رقم بهاره بولانی از گندم‌های بومی ایران می باشد که تاکنون ژن مقاومت به زنگ زرد در آن شناخته نشده است و به عنوان رقم حساس مورد استفاده قرار گرفت. رقم موروکو هم به عنوان رقم حساس به زنگ سیاه و زرد گندم در این آزمایش استفاده گردید. آزمایشات گلخانه ای در گلخانه ی بخش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه ولی عصر (عج) انجام شد. جوانه زنی بذور گندم در ظروف پتری با نگه‌داری در دمای ۲۰-۱۸ درجه سلسیوس انجام شد. تعداد ۳۰-۲۰ عدد بذر جوانه‌زده به‌صورت متراکم در گلدان‌های ۱۵ سانتی‌متری حاوی خاک استریل(خاک، ماسه، خاک‌برگ و کود پوسیده به نسبت ۳:۳:۳:۱) کاشته شد و در دمای۲۰-۱۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد نگهداری شد (Elahinia 2010). مایه‌زنی گیاهچه ها در مرحله یک برگی انجام شد. ابتدا سطح برگ گیاهچه ها با سوسپانسیون آب مقطر استریل همراه با یک قطره سورفکتانت Tween 20 در هر لیتر توسط آب‌پاش دستی مه‌پاشی گردید. سپس مخلوط ایسیوسپورها با حامل پودر تالک به نسبت ۴:۱ توسط گردپاش دستی به طور یکنواخت روی سطح برگ‌ها پاشیده شد. پس از انجام گردپاشی مجدداً سطح برگ‌ها با سوسپانسیون آب و سورفکتانت Tween 20 مه‌پاشی شد. گلدان‌های مایه‌زنی شده درون ظروف پلاستیکی درپوش‌دار(اکواریومی) با رطوبت نسبی در حد اشباع (بیش از ۹۵ درصد) قرار داده شد و در شرایط تاریکی با دمای ۱۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس نمونه ها به گلخانه با شرایط دمایی ۲۰-۱۴ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی انتقال داده شدند.

آزمایشات مزرعه ای در مزرعه تحقیقاتی بخش بیماری شناسی گیاهی مرکز تحقیقات استان لرستان، شهر خرم آباد انجام شد. بدین منظور زمینی به مساحت ۱۲ متر مربع با قطعات یک متر مربع در نظر گرفته شد و در هر قطعه ارقام بولانی، موروکو و الوند و ترکیبی از سه رقم فوق در چهار قسمت کشت گردید. مایه‌زنی گیاهچه ها با ایسیوسپورهای جمع آوری شده از مناطق بروجرد، دورود، ازنا و الیگودرز در مرحله دو برگی انجام شد. برای هر جدایه دو تکرار در نظر گرفته شد. مایه زنی قطعات با جدا کردن آنها با پوشش پلاستیکی به صورتی انجام شد تا از اختلاط آلودگی تیمارها و شاهد سالم جلوگیری شود و همچنین رطوبت نسبی بالا برای ایجاد آلودگی فراهم باشد. ۱۶ روز پس از مایه‌زنی گیاهچه‌های گندم با ایسیوسپورهای برگ زرشک، نمونه های برگ آلوده به یوردینیوسپورهای زنگ جمع‌آوری شد. اسلایدهای میکروسکوپی از اسپورهای قارچ در لاکتوفنل تهیه و بوسیله میکروسکوپ نوری (Olympus BH2) مورد بازبینی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی مولکولی بیمارگر

استخراج دی.ان.ای

از تک جوش‌های ایسیومی روی برگ‌های زرشک و سایر نمونه های زنگ گندم به روش ستیل تری‌متیل آمونیوم بروماید دو درصد (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) طبق روش تغییر یافته موری و تامپسون(Murray & Thompson 1980) استخراج دی.ان.ای انجام شد. برای استخراج دی.ان.ای، مقدار ۳۰-۲۰ میلی‌گرم با خراش از قسمت‌های یک جوش ایسیوسپور از برگ‌های آلوده برته‌های زرشک و یا یوریدیوسپورهای زنگ گندم داخل لوله های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل قرار داده شد و در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد (Alaei *et al.* 2009b). ۵۰ میکرولیتر بافر استخراج (۱۰۰ میلی‌مولار تریس اسید کلریدریک، pH ۸، ۱/۴ مولار کلرید سدیم، ۲۰ میلی‌مولار Na-EDTA، یک درصدحجمی بتا-مرکاپتواتانول و دو درصد CTAB) به ایسیوسپورها اضافه شد. به اندازه حجم اسپورها خرده شیشه های (glass beads) استریل با قطر ۰/۵ میلی متر به لوله ها اضافه گردید. با استفاده از یک دسته هاون کوچک فلزی استریل اسپورها داخل لوله سائیده شدند. مجددا ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به تیوب‌ها اضافه شده و تیوب‌ها به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شد. سوسپانسیون اسپور به به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در این مدت لوله‌ها چند بار تکان داده شدند. سپس ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوآمیل‌الکل (۱:۲۴ v/v) به سوسپانسیون حاصل اضافه و بعد از چند دقیقه ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دوردر دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی (حاوی دی.ان.ای) به لوله های جدید حاوی ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد منتقل گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد. سپس دی.ان.ای نمونه ها طی چندین مرحله سانتریفوژ به روش علایی و همکاران (Alaei et al. 2009b) استخراج گردید و به مدت یک شب در دمای یخچال و سپس تا انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

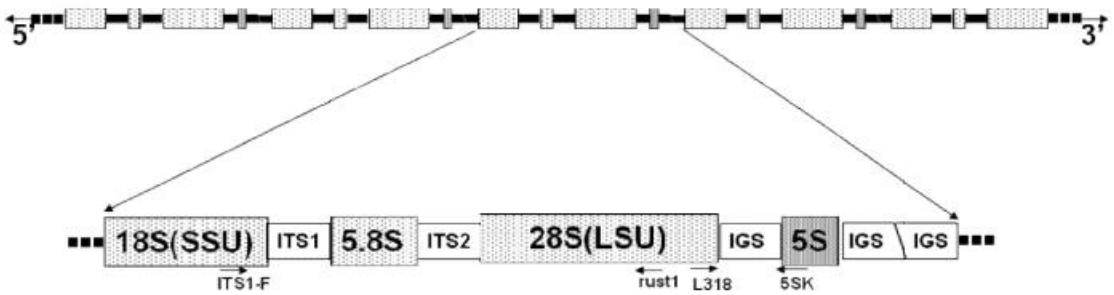
بررسی تنوع ژنتیکی آلودگی ایسیومی زرشک با تکثیر ناحیه IGS1-rDNA

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی مرحله ایسیومی زنگ روی زرشک و ارتباط آنها با زنگ های گندم شامل زنگ سیاه (*P. graminis* f.sp. *tritici*)، زنگ زرد (*P. striiformis* f.sp. *tritici*) و زنگ قهوه‌ای گندم (*P. triticina*)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر نواحی ITS و IGS از دی.ان.ای ریبوزومی (شکل ۱) با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی ITS1F/rust1 و L318/5Sk به ترتیب شرح داده شده توسط گاردس و برانز (Gardes & Bruns 1993) و روس آمسالگ (Roose-Amsaleg *et al.* 2002) با کمی تغییرات انجام شد.

آغازگرها با توالی‌های نوکلئوتیدی ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes & Bruns 1993) و Rust1 (5'-GCTTACTGCCTTCCTCAATC-3') (Liu *et al.* 1993) و نیز جفت آغازگر L.318 (5'-GCTACGATCCACTGAGGTTC-3') (Kim *et al.* 1992) و 5SK (5'-CTTCGCAGATCGGACGGGAT-3') (Wolters & Erdmann 1988) توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی ساخته و تهیه شد. به منظور اطمینان از شناسایی جدایه ها، تکثیر و تعیین توالی ناحیه ITS از دی.ان.ای ریبوزومی با

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- نقشه کلی ژنوم RNA ریبوزومی و جایگاه آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Fig. 1. Schematic overview of the ribosomal RNA gene clusters including the location of the primers used in this study

استفاده از آغازگرهای ITS1F/rust1 در جدایه‌های زنگ سیاه، زنگ زرد و زنگ قهوه‌ای گندم و همچنین دو جدایه از ایسیوسپورهای زنگ روی زرشک انجام شد. تکثیر ناحیه IGS1 از دی.ان.ای ریبوزومی با استفاده از آغازگرهای L318/5SK در ۱۳۴ جدایه مرحله ایسیومی زرشک و همچنین جدایه‌های زنگ سیاه، زنگ زرد و زنگ قهوه‌ای گندم انجام شد. مخلوط هر واکنش PCR (۵۰ میکرولیتر) شامل بافر 1x PCR (۱۰ میلی‌مولار تریس-اسیدکلریدریک و ۵۰ میلی‌مول کلرید پتاسیم pH۹)، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۲ میکرومولار از هر یک از آغازگرها و ۱/۲۵ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase به همراه پنج میکرولیتر از نمونه دی.ان.ای استخراج شده بود. تمام مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از شرکت سیناژن تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر C-1000 (Bio Rad, USA) با شرایط تکثیر بصورت پنج دقیقه واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۴۰ چرخه در ۹۴ درجه سلسیوس (یک دقیقه)، دمای اتصال ۵۵ درجه سلسیوس (یک دقیقه) (برای جفت پرایمر L138/5SK) و۴۴ درجه سلسیوس (یک دقیقه) (برای جفت پرایمر ITS1F/rust1)، ۷۲ درجه سلسیوس (سه دقیقه و سی ثانیه) و در نهایت ۱۰ دقیقه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول حاصل از واکنش PCR روی ژل آگارز یک‌ونیم درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. نقوش الکتروفورزی حاصل زیر نور ماورای بنفش مشاهده گردید و از نتایج به‌دست آمده، توسط دستگاه Gel Documentation (Uvidoc)عکس‌برداری و ثبت گردید.

خالص‌سازی محصول PCR و تعیین توالی ناحیه‌ی rDNA

محصولات PCR حاصل از آغازگرهای ITS1F/Rust1 و L318/5Sk (فقط برای تک باند اول) باارسال به شرکت دنا زیست مشهد به ترتیب برای نواحی ITS-rDNA و IGS1-rDNA از روی ژل اگارز برش داده شد و با استفاده از کیت Axyprep PCR Cleanup Kit مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده، خالص‌سازی شدند. برای تعیین توالی ناحیه‌ی تکثیر شده، نمونه ها به انستیتوی ملی بیوتکنولوژی کشاورزی کره‌ی‌جنوبی فرستاده شدند. توالی‌های به‌دست آمده ابتدا با نرم‌افزار BioEdit مورد بازبینی قرار گرفت. سپس توالی‌ها در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ارائه شدند. توالی‌ها براساس بالاترین درصد شباهت با

www.SID.ir

Archive of SID

توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و تطبیق داده شدند.

نتایج و بحث

پراکنش و شناسایی گونه های زرشک آلوده به زنگ در مناطق نمونه برداری شده

در این پژوهش در مجموع ۹۵ نمونه آلودگی ایسیومی روی برته‌های زرشک *Berberis* spp. از رویشگاه‌های طبیعی استان لرستان جمع‌آوری گردید. اگر چه در بعضی از مناطق مورد مطالعه از جمله گهر دورود و نوژیان و همچنین در ارتفاعات بالا، برته‌های زرشک عاری از آلودگی ایسیومی زنگ بودند ولی در بیشتر مناطق کوهستانی نمونه برداری شده، رویشگاه‌های طبیعی برته های زرشک دارای آلودگی شدید ایسیومی زنگ بود که در اکثر موارد در شیب جنوبی کوه‌ها قرار داشتند. آلودگی برته‌های زرشک به مرحله‌ی ایسیومی زنگ سیاه از ارتفاع ۶۵۰ متر تا ۲۳۸۰ متر از سطح دریا توسط عباسی و همکاران،(Abbasi *et al.* 2002) مشاهده گردیده است. پراکندگی گونه‌های مختلف زرشک تا ارتفاع ۳۵۰۰-۳۰۰۰ متری از سطح دریا گزارش شده است (Tiwari *et al.* 2012). تنها مکان رویشگاه طبیعی زرشک در منطقه بروجرد روستای دهگاه با ارتفاع حدود ۱۹۵۵ متر از سطح دریا بود که برته‌های زرشک در این ناحیه در دامنه‌ی کوه‌ها و در فاصله‌ی چندکیلومتری از مزارع و کشت‌زارهای گندم بود. در بازدید از مزارع گندم این ناحیه زنگ سیاه گندم مشاهده شد. در نواحی کوهستانی الیگودرز با آب‌و هوایی معتدل و زمستان‌های سرد و برف‌گیر فاصله‌ی برته‌های زرشک تا مزارع گندم حدودا" ۵۰-۶۰ کیلومتر بود و در سال ۱۳۹۲ آلودگی به زنگ زرد گندم به‌صورت لکه‌ای در مزارع گندم مشاهده شد. در نواحی کوهستانی دورود با شرایط آب و هوایی معتدل با زمستان‌های سرد و ارتفاع بیش از ۲۰۰۰ متر از سطح دریا، اکثرا رویشگاهای برته‌های زرشک در مجاورت مزارع گندم قرار داشتند و در مزارع زنگ زرد مشاهده شد. رویشگاه‌های طبیعی برته‌های زرشک ازنا نیز در منطقه‌ای کوهستانی با شرایط آب و هوایی معتدل و زمستان‌های سرد در مجاورت مزارع و کشت‌زارهای گندم بود و در سال ۱۳۹۲ آلودگی زنگ زرد گندم مشاهده شد. گونه‌های غالب زرشک در ارتفاعات دورود و ازنا *B. vulgaris* و ارتفاعات بروجرد و الیگودرز *B. integerrima* بودند. اسپرموگونیوم‌های تشکیل شده، در برته‌های زرشک زیر اپیدرمی و کروی بوده، معمولاً در سطح فوقانی برگ وگاهی در سطح زیرین برگ‌های زرشک روی لکه‌های قهوه‌ای رنگ به صورت دستجات مشخص تشکیل می‌شوند. رنگ اسپرموگونیوم‌ها از عسلی تا قهوه‌ای تیره متغیر است. ایسیوم‌ها به صورت گروهی در قسمت زیرین برگ و به‌ندرت در سطح فوقانی برگ تشکیل شده و حالت فنجانی تا استوانه‌ای دارند. علاوه بر سطح برگ، دمبرگ، میوه و دم میوه‌های زرشک نیز توسط دستجات ایسیدی آلوده می‌گردند. تشکیل ایسیوم‌ها روی میوه باعث عدم رسیدن میوه‌ها، خشک شدن خوشه‌ها، چروکیدگی و تیره رنگی میوه‌ها و بالاخره ریزش آن‌ها می‌گردد (بدون نمایش داده). وقوع آلودگی زنگ روی بوته های زرشک بسته به ناحیه نمونه برداری از عدم آلودگی تا صد درصد آلودگی متغییر بود. بیشترین میزان آلودگی‌های ایسیومی مربوط به برته‌های زرشک منطقه‌ی دهگاه بروجرد (بیش از ۷۵ درصد برته‌ها با سطح آلودگی شدید) و کمترین میزان آلودگی در ناحیه کیزان‌دره و جاده سد الیگودرز (کمتر از۲۵ درصد برته‌ها با سطح آلودگی پائین) بود. آلودگی‌های ایسیومی در منطقه الیگودرز محدود به نقاط نکروزه در سطح برگ با تک ایسیومهای سفید رنگ و بندرت روی

www.SID.ir

Archive of SID

شاخه‌ها قابل مشاهده بود. میزان آلودگی بوته ها در مناطق دربند ازنا ۲۵ درصد و در چوبدر علیا و چمنار دورود حدود۵۰ درصد با سطح آلودگی متوسط مشاهده شد. تعداد جوش های ایسیومی روی برگ در نواحی مختلف نمونه برداری متفاوت بود از تک جوش‌های ایسیومی تا تعداد زیاد بطوریکه بخش زیادی از سطح برگ را گرفته بود (بدون نمایش داده). ایسیوم‌های بالغ دارای پریدیوم سفید رنگ، که ارتفاع آن تا ۲/۴ میلی‌متر می‌رسید. ایسیوسپورها غالباً چند وجهی دارای دیواره‌ی بی‌رنگ با ضخامت حدود یک میکرومتر و به‌صورت دسته‌های زنجیری و پشت‌سرهم می‌باشند. ضخامت دیواره در قسمت رأس یا متمایل به رأس اسپور بیش از طرفین بود. دیواره‌ی اسیوسپورها به‌طور ظریف زگیل‌دار است و بعضاً در بین زگیل‌های ظریف و یک‌دست زگیل‌های درشت با اندازه‌های متفاوت به چشم می‌خورند که با نتایج عباسی (Abbasi 2001) مطابقت داشت. درتمامی نمونه‌های بررسی شده تفاوتی در اندازه و رنگ اسیوسپورها قابل مشاهده نبود (بدون نمایش داده). در طول بررسی های میدانی شناسایی گونه های *Puccinia* spp. بر اساس ریخت شناسی ایسیوم روی بوته های زرشک امکان پذیر نبود.

مایه‌زنی ایسیوسپورهای زرشک روی گیاهچه های گندم

مایه‌زنی‌های ایسیوسپورهای زرشک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان لرستان روی گیاهچه‌های گندم به منظور ردیابی زنگ سیاه و زنگ زرد گندم در شرایط گلخانه و مزرعه نتایج موفقیت‌آمیزی داشت(شکل ۲). در شرایط مزرعه بیش‌ترین علائم آلودگی زنگ روی دو رقم حساس گندم موروکو و بولانی مشاهده شد و هیچ گونه علایمی روی ارقام الوند و بهار مشاهده نشد. جوش‌های یوردینیوسپور زنگ زرد پس از گذشت ۱۵-۱۸ روز از مایه زنی ایسیوسپورهای زرشک منطقه‌ی ازنا، دورود و بروجرد مشاهده شد. اما با مایه‌زنی ایسیوسپورهای منطقه‌ی الیگودرز هر دو نوع زنگ زرد گندم و زنگ سیاه گندم مشاهده شد. در تیمار شاهد هیچ گونه علایمی مبنی بر ایجاد آلودگی به زنگ مشاهده نشد. در گیاهچه‌های گندم مایه‌زنی شده حضور یوردینیوسپورهای زنگ زرد به همراه لکه‌های بافت مرده در برگ‌ها مشاهده شد. عامل زنگ زرد یا نواری به‌واسطه‌ی دارا بودن تلیوم‌ها و یوردینیوم‌هایی که غالباً روی نوارهای مشخص سبزرد یا بافت مرده تشکیل می‌شوند و یوردینیوسپورهای با دیواره‌ی بی‌رنگ و منافذ تندشی غیرواضح از سایر گونه‌های زنگ گندم قابل شناسایی است. علایم نشان‌دهنده زنگ سیاه روی گندم‌های مایه‌زنی شده با ایسیوسپورهای منطقه الیگودرز روی ساقه و غلاف ساقه گندم دیده شد (شکل ۲). جوش‌ها ابتدا بسته بوده و با رشد کافی، سبب تخریب اپیدرم می‌گردند و تولید توده‌های اسپوری حاوی یوردینیوسپور می‌کند که روی جوش‌ها قرمز رنگ یا قهوه‌ای مایل به خرمایی می‌باشند. یوردینیوسپورها غالباً مستطیلی کشیده و به رنگ قهوه‌ای دارچینی بودند. با توجه به نتایج مایه‌زنی گیاهچه‌های گندم با ایسیوسپور در شرایط گلخانه و مزرعه و تولید یوردینیوسپورهای زنگ نواری گندم ۱۶ روز پس از مایه‌زنی می توان فرضیه میزبان واسط بودن گونه‌های زرشک *B. vulgaris* و *B. integerrima* را برای زنگ زرد گندم در استان لرستان پذیرفت. اگر چه در بعضی مناطق امریکا بدلیل شرایط اقلیمی خاص، فنولوژی رشد زرشک در شرایط طبیعی منطقه و از بین رفتن مرحله تلیومی زنگ زرد، بوته های زرشک نمی توانند در کامل شدن چرخه جنسی زنگ نقش داشته باشد (Wang & Chen 2015, Wang *et al.* 2015a) اما موضوع میزبان

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲- آلودگی ایسیومی در سطح زیرین برگ زرشک گونه *Berberis vulgaris* (A) ؛ آلودگی برگ‌گندم به جوش های زنگ زرد *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* بعد از مایه‌زنی گیاهچه ها با ایسیوسپورهای *Berberis vulgaris* (B) و *Berberis integerrima* (C) در شرایط گلخانه؛ آلودگی ساقه‌گندم به جوش های زنگ سیاه *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* بعد از مایه‌زنی گیاهچه ها با ایسیوسپورهای *Berberis integerrima* (D).

Fig. 2. Aecial infection on the back of the leaves of *Berberis vulgaris* in the field (A); Uredinia of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* on wheat leaves after artificial inoculation with aeciospores collected from *Berberis vulgaris* (B) and *Berberis integerrima* (C) under controlled conditions; Stem rust, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* on wheat stem after artificial inoculation with aeciospores collected from *Berberis integerrima* under controlled conditions (D).

واسط بودن گونه های زرشک برای زنگ نواری گندم توسط بسیاری از محققین با انجام آزمون بیماریزایی در شرایط کنترل شده گزارش شده است (Jin *et al.* 2010, Jin 2011, Zhao *et al.* 2013) بطوریکه آلودگی گیاهچه های گندم با ایسیوسپورهای زرشک منجر به تولید یوریدیوسپور زنگ نواری گندم و همچنین آلودگی گونه های مختلف زرشک با یوریدیوسپورهای زنگ نواری گندم در شرایط طبیعی نیز گزارش شده است(Rodriguez-Algaba *et al.* 2014, Wang *et al.* 2015b).

شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی آلودگی ایسیومی زرشک با تکثیر ناحیه IGS1-rDNA

تکثیر ناحیه‌ی ITS-rDNA در جدایه‌های زنگ زرد، زنگ سیاه و زنگ قهوه ای گندم و همچنین آلودگی ایسیومی زرشک، باآغازگرهای عمومی ITS1F/rust1 با موفقیت انجام شد و در تمام جدایه‌ها یک باند با اندازه‌ی ۱۲۰۰ جفت بازی ایجاد گردید. تفاوتی بین باندهای جدایه‌های زنگ گندم و آلودگی ایسیومی زرشک با استفاده از این پرایمرها قابل مشاهده نبود (بدون نمایش داده). شناسایی ملکولی جدایه ها با مقایسه‌ی نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی آنها شامل یوردینیوسپورهای زنگ زرد *P. striiformis* f.sp *tritici* گندم‌های مایه‌زنی شده با ایسیوسپورهای زرشک، یوردینیوسپورهای زنگ سیاه گندم *P. graminis* f.sp *tritici* ، یوردینیوسپورهای زنگ قهوه‌ای گندم *P. triticina* و جدایه‌ی ایسیوسپوری زنگ زرشک منطقه بروجرد، انجام شد و با استفاده از نرم‌افزار Clustal X و پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص شد که نمونه‌های ایسیوسپوری زنگ زرشک منطقه بروجرد با درصد تشابه ۸۷ درصدی به‌عنوان *P. striiformis* f.sp *tritici* با توالی‌های مرجع معتبر، منطبق می‌باشد (جدول

www.SID.ir

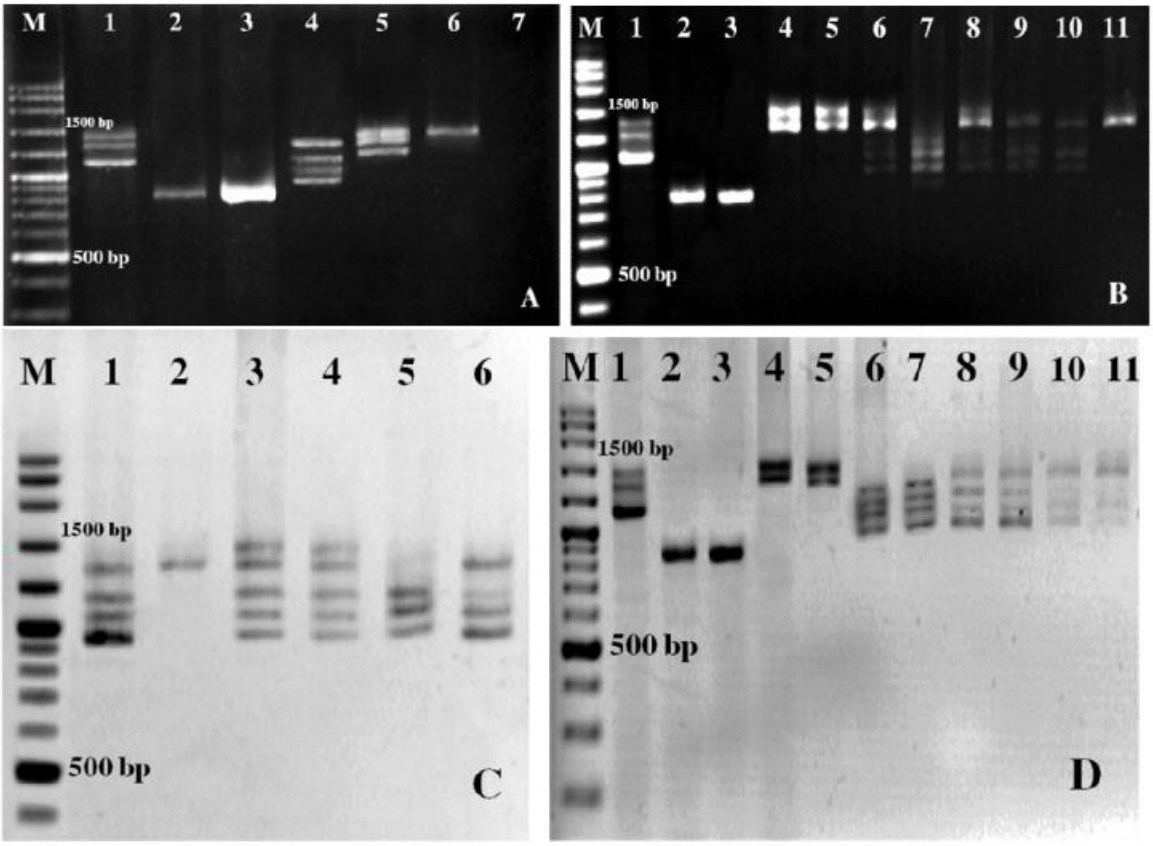
Archive of SID

۳). واحدهای تکراری دی ان ای ریبوزومی (rDNA) به‌عنوان یک مارکر مناسب برای شناسایی بسیاری از گونه‌های قارچی از جمله زنگها استفاده شده است (Szabo & Kolmer 2007, Alaei *et al.* 2009b). توالی های مربوط به ناحیه ITS با تعداد نسخه زیاد در داخل ژنوم و با تنوع مناسب بین گروه های مختلف قارچی غالبا" با ثبات هستند و معمولا برای بررسی تفاوت های ژنتیکی گونه های یک جنس و طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی و شناسایی گونه استفاده می شوند(Alaei *et al.* 2009a).

تکثیر ناحیه‌ی IGS1-rDNA در ۱۳۴ جدایه از آلودگی ایسیومی زرشک به همراه جدایه‌های زنگ سیاه، زنگ قهوه‌ای و زنگ زرد گندم، با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی L318/5SK موفقیت‌آمیز بود. الگوی باندی حاصل از تکثیر ناحیه‌ی IGS1 برای نمونه‌های زنگ زرد گندم (*P. striiformis* f.sp. *tritici*) بدست آمده از گیاهچه های آلوده توسط مرحله ایسیومی تمام مناطق تولید سه باند به اندازه‌های ۱/۳۹، ۱/۳۲ و ۱/۱۳ کیلوبازی نمود که منطبق بر یافته‌های وانگ و همکاران (Wang *et al.* 2012) می باشد در حالیکه برای تمامی نمونه های زنگ سیاه گندم (*P. graminis* f.sp. *tritici*) و زنگ قهوه ای گندم (*P. triticina*) فقط یک باند حدود ۰/۸۳ کیلوبازی ردیابی شد. این نتایج مطابق با ربانی نسب و همکاران (Rabaninasab *et al.* 2008a)، کیم و همکاران (Kim *et al.* 1992) و نیازمند و همکاران (Niazmand *et al.* 2013) است. تکثیر ناحیه‌ی IGS1 برای نمونه‌های زنگ زرد علف هرز جودره *H. spontaneum* و نمونه زنگ زرد همدان تعداد دو باند به اندازه ۱/۱ و ۱/۳ کیلو باز مشاهده شد که منطبق بر یافته‌های ربانی نسب و همکاران (Rabaninasab *et al.* 2008b) برد. مقایسه نتایج به‌دست آمده از تعداد و اندازه‌ی باندهای تکثیر شده‌ی ناحیه‌ی IGS1 نشان داد که تنوع ژنتیکی بین ایسیوسپورهای مناطق نمونه‌برداری شده وجود دارد (شکل ۳ و جدول ۲). تعداد باندهای بدست آمده در کل جدایه ها از تک باندی تا حداکثر ۶ باندی متغییر برد (جدول ۲). تکثیر ناحیه‌ی IGS1 در جدایه‌های ایسیوسپور جمع آوری شده از منطقه‌ی ازنا و الیگودرز بیشتر بصورت ۳ باندی بترتیب با ۱۵ و ۲۱ جدایه بود. درحالیکه در منطقه دورود بیشتر بصورت پنج باندی (۲۶ جدایه) و در منطقه بروجرد بصورت دو باندی (۱۰ جدایه) مشاهده شد (جدول ۲). ناحیه IGS نیز به عنوان بخشی از دی ان ای ریبوزومی دارای توالی های تکرار شونده داخلی و اختصاصی گونه است. این ناحیه نسبت به ITS اغلب دارای درجه بالاتری از تنوع درون و بین گونه ای در قارچها و کاملا اختصاصی می باشد (Simon & Weiß 2008). گزارشهای متعددی در خصوص مطالعات IGS روی زنگها با تنوع بالا وجود دارد. کیم و همکاران(Kim *et al.* 1992) تنوع بالایی را در بین پاتوتیپ های عامل زنگ سیاه کندم *P. graminis* f. sp. *tritici* گزارش و الگوی باندی یک تا ۶ محصول را به اندازه ۱/۰۲ تا ۱/۵۸ کیلو باز مشاهده نمودند. چند شکلی در ناحیه IGS1 شش پاتوتیپ قارچ *P. hordei* عامل زنگ قهوه ای جو (Jennings *et al.* 1997) و زنگ قهوه ای گندم (Niazmand *et al.* 2013) نیز گزارش شده است. وجود چند شکلی دو قطعه ای در ناحیه IGS1 زنگ زرد گندم نیز توسط ربانی نسب و همکاران (Rabaninasab *et al.* 2008b) در شش جدایه ایرانی و همچنین روس آمسالگ و همکاران (Roose-Amsaleg *et al.* 2002) در بین شش جدایه اروپایی گزارش نموده اند. مطالعه حاضر نیز نشان

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- الگوی باندی حاصل از تکثیر ناحیه‌ی **IGS1-rDNA** جدایه‌های ایسبومی بوته‌های زرشک آلوده و بیمارگر زنگ زرد، زنگ سیاه و زنگ فهوه‌ای گندم روی ژل آگارز ۱/۵ درصد شامل: (**M**) نشانگر ۱۰۰ جفت بازی **DNA**؛ (**A1، B1، D1**) زنگ زرد گندم ***Puccinia striiformis* f.sp. *tritici***؛ (**A2، B2 و D2**) زنگ سیاه گندم ***Puccinia graminis* f.sp. *tritici***؛ (**A3، B3 و D3**) زنگ فهوه ای گندم ***Puccinia triticina***؛ (**B4-5، D4-5**) جدایه‌های ایسبومی منطقه بروجرد؛ (**C1-6، D8-9**) جدایه‌های ایسبومی منطقه دورود؛ (**A4-6، B9-11، D10-11**) جدایه‌های ایسبومی منطقه ازنا و (**B6-8، D6-7**) جدایه‌های ایسبومی منطقه الیگودرز، (**A7**) آب دو بار تقطیر (کنترل منفی).

Fig. 3. PCR amplification of the IGS1-rDNA region in aecial isolates of infected barberry bushes and the pathogen of yellow rust, stem rust as well as brown rust of wheat on 1.5 % agarose gel including: (M) 100 bp DNA ladder ; (A1, B1, D1) *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ; (A2, B2, D2) *P. graminis* f. sp. *tritici* ; (A3, B3, D3) *Puccinia triticina*; (B4-5, D4-5) aecial isolates from Borujerd regions; (C1-6, D8-9) aecial isolates from Dorud regions; (A4-6, B9-11, D10-11) aecial isolates from Azna regions; (B6-8, D6-7) aecial isolates from Aligudarz regions; (A7) MiliQ water (negative control).

از تنوع و چند شکلی در ناحیه IGS1 مرحله ایسیومی زنگ سیاه و زرد گندم میباشد که ممکن است ناشی از تنوع اختصاصی درون گونه ای در تعداد کپی های این واحدهای تکراری باشد بدین معنی که توالی های نوکلئوتیدی این واحد های تکراری متفاوت می باشد.

متنوع بودن این واحدهای تکراری در ناحیه ITS زنگ سفید داوودی *Puccinia horiana* توسط علایی و همکاران (**Alaei *et al.* 2009b**) گزارش شده است. دلیل دوم ممکن است به واسطه نوترکیبی میتوتیک کروماتید های خواهری و وضعیت جفت هسته ای ایسیوسپورها

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- تعداد و اندازه باندهای DNA تکثیر شده ناحیه IGS1-rDNA در جدایه های ایسیومی زرشک

Table 2. Size and the number of DNA bands resulted in PCR amplification of IGS1-rDNA region in aecial isolates on barberry.

Location (Isolates)	observed Bands	# of isolates	Representative Isolate(s) code	Size (Kb)
Borujerd (15)	1	3	B1-2	1.3
	1	3	B8	0.83
	2	**10**	B3, B9, B10	1.3, 1.4
	3	2	B4-1	0.95,1, 1.3
Dorud (55)	1	7	CH3,CH15	1.34
	3	4	CH21	0.98-1.07-1.37
	4	18	CH4, CH18,CH17	0.94-1-1.15-1.34
	5	**26**	CH2	0.98-1.07-1.16-1.38-1.5
	6	**1**	CH30	0.98-1.07-1.1-1.38-1.5- 1.6
Azna (33)	1	7	M20	1.57
	3	**15**	M9, M13, M17, M21	1.26, 1.42, 1.69
	4	11	M6, M3	1.03, 1.13, 1.23, 1.4
Aligudarz (32)	1	2	A1-2	1.06
	1	2	A2-1	0.83
	2	6	A15	0.98-1.07
	3	**21**	A9	0.9-1.03-1.3
	4	3	A12, A13,	0.95-1.05-1.16-1.32

باعث ایجاد چند شکلی شده است و یا ممکن است به دلیل تنوع گونه ای زنگ زرد و سیاه گندم باشد که زرشک به عنوان میزبان واسط آنها می باشد.

نتایج بدست آمده از تکثیر ناحیه‌ی IGS1 در جدایه‌های ایسیوسپور نشان داد که درتمامی مناطق نمونه برداری شده الگوی باندهای بدست آمده در بعضی از جدایه ها مشابه به الگوی باندی زنگ زرد گندم می باشد. در منطقه الیگودرز از ۳۲ جدایه ۶/۲۵ درصد الگوی باندی مشابه زنگ سیاه و ۹۳/۷۵ درصد الگوی مشابه زنگ زرد را نشان دادند. در منطقه بروجرد، از میان ۱۵ جدایه ۲۰ درصد الگوی باندی محدوده‌ی زنگ سیاه و ۸۰ درصد الگوی باندی زنگ زرد را نشان دادند. در منطقه دورود در بین ۵۵ جدایه، ۱۰۰ درصد نمونه‌ها الگوی باندی در محدوده‌ی زنگ زرد مشاهده شد . با ترجه به توالی یابی بخشی از این الگوی باندی و مشابهت (درصد مشابهت اشاره شده بسیار پایین است و نمی توان بطور قاطع اعلام نظر نمود.) آن با جدایه های زنگ زرد گندم موجود در بانک ژن تائیدی بر نتایج حاصل از آزمون بیماری زایی است که بوته های زرشک می توانند به عنوان میزبان واسط زنگ زرد گندم معرفی شوند (جدول ۳). این نتایج با بررسی های میدانی در خصوص مشاهده بیماری زنگ زرد و سیاه گندم در مناطق نمونه برداری شده مطابقت دارد. با این وجود تحقیقات تکمیلی در این خصوص با کلون سازی تک تک باندهای حاصل در الگوهای متفاوت باندی مشاهده شده و توالی یابی آنها و همچنین بررسی کامل چرخه زندگی زنگ با آزمون بیماری زایی در شرایط طبیعی روی زرشک که در حال انجام است ضروری به نظر می رسد. نمونه‌های دورود و ازنا از نظر الگوی باندی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- شناسایی مولکولی جدایه های استفاده شده با توالی یابی نواحی rDNA و راس شمار آنها همراه با میزان تشابه با گونه های موجود در بانک ژن

Table 3. Molecular identification of the isolates included in sequence analysis of rDNA region and their accession number as well as highest similarities with NCBI GenBank species.

Isolate name	# of bands and Size (Kb) in PCR amplify-cation of rDNA regions		Accession number		GenBank isolate identification/ Identities	
	ITS	IGS	ITS	IGS	ITS	IGS
P. striiformis f. sp. *tritici*	1 (1.2)	3 (1.13,1.32,1.39)	KR230394	KR230398	DQ417398 (100%)	FJ224381 (100%)
P. graminis f. sp. *tritici*	1 (1.2)	1 (~0.83)	KR230395	NP	EU014046 (93%)	NP
P. triticina	1 (1.2)	1 (~0.83)	KR230396	NP	DQ417419 (99%)	NP
Single aecium - Borujerd	1 (1.2)	2 (~1.3 , 1.4)	NP	KR230399	NP	AY117131 (87%) AY117126

NP = not performed

تکثیر ناحیه IGS1 شباهت‌های زیادی به‌هم دارند و با توجه به اطلاعات هواشناسی استان لرستان، دارای شرایط اقلیمی مدیترانه‌ای بوده و ارتفاع از سطح دریا در هر دو منطقه تقریباً مشابه است، جهت وزش باد غالب، جنوبی بوده که احتمال حرکت اسپورها را از مناطق ازنا به سمت مناطق دورود افزایش می‌دهد و در واقع امکان مبادله‌ی اسپورها را افزایش داده است، با توجه به وجود ارتفاعات در این نواحی و همچنین سطح وسیع رویشگاه‌های برته‌های زرشک و فاصله‌ی مکانی از هم تنوع ژنتیکی در می‌ان جدای‌ه‌ها زی‌اد بود. علاو بر این وجود کشت‌زارهای گندم در اطراف و نزدیک به محل روی‌شگاه‌های طب‌ی‌ع‌ی برته‌های زرشک می‌تواند دل‌ی‌ل اصل‌ی تنوع زیاد در الگوی باندی این مناطق باشد. تنوع ژنتیکی در محصول PCR ایسیوسپورهای منطقه بروجرد نسبت به سایر نواحی بسیار پایین بود و اکثر نمونه‌ها الگوی باندی مشابه‌ای (دو باندی) را نشان می‌دادند. وجود نژادهای های مشترک وکم بودن تنوع ژنتیکی بین جدایه های بروجرد احتمالاً به علت افزایش امکان تبادلات ژنتیکی بین جدایه ها است. به عبارت دیگر جریان ژنی باعث یکدست شدن ژنوتیپ ها در این منطقه شده است. الگوی باندی حاصل از نمونه زنگ زرد جمع آوری شده از مزارع گندم بروجرد مشابه الگوی باندی حاصل از تکثیر بعضی از جدایه های ایسیوسپورمنطقه بروجرد بود که نشان می‌دهد برته‌های زرشک منطقه بروجرد علاوه‌بر میزبانی زنگ سیاه میزبان زنگ زرد نیز می‌باشند. تعیین توالی ناحیه‌ی IGS1 نمونه‌ی منتخب از مرحله‌ی ایسیومی زنگ زرشک مناطق نمونه‌برداری بروجرد، میزبانی زنگ زرد را در بین برته‌های زرشک این منطقه اثبات کرد. تنها مکان رویشگاه طبیعی زرشک در بروجرد منطقه دهگاه برد که در مکانی دره‌مانند واقع شده است و جهت وزش باد غالب در منطقه غربی می‌باشد. با توجه به شرایط اقلیمی منطقه طی سال‌های ۹۱ و ۹۲ به دلیل خشک‌سالی و کم‌آبی سطح زیر کشت گندم بسیار پائین و میزان آلودگی به زنگ نیز در منطقه کم بود ولی در سال‌های زراعی ۸۶-۱۳۸۵ گزارش

www.SID.ir

Archive of SID

های متعددی در خصوص بروز بیماری زنگ سیاه از بروجرد وجود دارد که بروز زنگ سیاه در این منطقه سابقه نداشته و غیر معمول ارزیابی شده بود. تنوع ژنتیکی در نمونه های ایسیوسپور منطقه الیگودرز نسبتا"پایین ارزیابی شد و اکثر نمونه‌ها الگوی باندی مشابه‌ای (سه باندی) را نشان می‌دادند. زیرا میزان و سطح آلودگی برته‌های زرشک در این منطقه بسیار پایین بود و به دلیل وجود ارتفاعات بالا بسیاری از برته‌های زرشک فاقد آلودگی ایسیومی بودند. نتایج نشان داد که گونه‌های زرشک این منطقه میزبان زنگ سیاه و زنگ زرد گندم هستند. وجود شرایط آب و هوایی سرد و کوهستانی بودن منطقه با دامنه‌های برف‌گیر و وجود جهت وزش باد غالب جنوبی این نواحی از انتقال اسپور این منطقه با قسمت‌های دیگر نمونه‌برداری شده استان جلوگیری می‌کند. همچنین به دلیل کوهستانی بودن منطقه و عدم وجود کشت‌زارهای گندم در اطراف رویشگاه‌های طبیعی برته‌های زرشک امکان تبادل ژنی در این منطقه پایین می‌باشد و وجود تنوع در ایسیوسپورها می‌تواند موثر از علف‌های هرز گندمیان باشد که در سایه‌انداز و اطراف برته‌های زرشک روییده بودند و به نظر می‌رسد چنین جوامع گیاهی می توانند نقش مهمی در تکامل و ایجاد نژادهای جدید زنگ سیاه و زنگ زرد گندم داشته باشند.

زنگ زرد یا نواری گندم یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در سراسر دنیا است که مرحله یوردیوم دیکاریوتی نقش مهمی در ایجاد آلودگی و اپیدمی های شدید بازی می‌کند. با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش ازآزمون بیماریزایی و تجزیه و تحلیل مولکولی آلودگی های ایسیومی جمع آوری شده از ارتفاعات لرستان، برته‌های زرشک می‌توانند میزبان واسط زنگ زرد و زنگ سیاه گندم باشند که باعث ایجاد نژاد های جدید فیزیولوژیک با قدرت بیماری‌زایی متفاوت می شوند وبا شکستن مقاومت ارقام گندم در اپیدمی نقش مهمی داشته باشند. این نتایج می تواند اهمیت و نقش مهم برته های زرشک را در اپیدمی های زنگ زرد گندم در استان لرستان را مشخص نماید که با توجه به اهمیت اقتصادی محصول گندم می‌تواند تهدید جدی برای مزارع و تولید گندم باشد. یافته های این پژوهش می تواند جهت انجام تحقیقات بیشتر برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک و بررسی ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی زنگ زرد گندم حائز اهمیت باشد و درک ما را برای توسعه استراتژی‌های موثر در کنترل بهتر این بیماری افزایش دهد.

منابع

Abbasi, M. 2001. Taxonomic investigation of *Puccinia* species parasitic on Poaceae in Iran. Ph.D. thesis, submitted to Tehran University Karaj 235 p.

Abbasi, M., Hedjaroude, G., Scholler, M. and Goodwin, S. 2004. Taxonomy of *Puccinia striiformis* sl in Iran. Rustaniha 5: 199-224 (in Persian with English Summary).

Abbasi, M., Hedjaroude, G. A., Ershad, D. and Termeh, F. 2002. On the taxonomy of *Puccinia graminis* Pers. and some remarks on the ecology of the rust in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 38: 71-76 (in Persian with English Summary).

Afshari, F. 2010. Prevalent pathotypes of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology 10: 67-78.

Alaei, H., Baeyen, S., Maes, M., Höfte, M. and Heungens, K. 2009a. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum* x *morifolium* through conventional and real-time PCR. Journal of Microbiological Methods 76: 136-145.

www.SID.ir

Archive of SID

Alaei, H., De Backer, M., Nuytinck, J., Maes, M., Höfte, M. and Heungens, K. 2009b. Phylogenetic relationships of *Puccinia horiana* and other rust pathogens of *Chrysanthemum*× *morifolium* based on rDNA ITS sequence analysis. Mycological Research 113: 668-683.

Alaei, H., Mohammadi, A. H. and Dehghani, A. 2012. Molecular characterization of the rDNA-ITS sequence and a PCR diagnostic technique for *Pileolaria terebinthi*, the cause of pistachio rust. Phytopathologia Mediterranea 51: 488-495.

Autrique, E., Tanksley, S. D., Sorrells, M. E. and Singh, R. P. 1995. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. Genome 38: 75-83.

Chen, X., Line, R. F. and Leung, H. 1993. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. Phytopathology 83: 1489-1497.

Chen, X., Line, R. F. and Leung, H. 1995. Virulence and polymorphic DNA relationships of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* to other rusts. Phytopathology 85: 1335-1342.

Dadrezaie, S. T., Lababidi, S., Nazari, K., Goltapeh, E. M., Afshari, F., Alo, F., Shams-Bakhsh, M. and Safaie, N. 2013. Molecular genetic diversity in Iranian populations of *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust. American Journal of Plant Sciences 4: 1375.

De Backer, M., Alaei, H., Van Bockstaele, E., Roldan-Ruiz, I., van der Lee, T., Maes, M. and Heungens, K. 2011. Identification and characterization of pathotypes in *Puccinia horiana*, a rust pathogen of *Chrysanthemum* x *morifolium*. European Journal of Plant Pathology 130: 325-338.

Elahinia, S. 2010. Assessment of urediniospore germination of *Puccinia striiformis* at various temperatures on agar and detached leaves of wheat. Journal of Agricultural Science and Technology 2: 41-47.

Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes' application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2: 113-118.

Gomez, D. R., Evans, K. J., Harvey, P. R., Baker, J., Barton, J., Jourdan, M., Morin, L., Pennycook, S. R. and Scott, E. S. 2006. Genetic diversity in the blackberry rust pathogen, *Phragmidium violaceum*, in Europe and Australasia as revealed by analysis of SAMPL. Mycological Research 110: 423-430.

Hovmøller, M., Justesen, A. and Brown, J. 2002. Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in north-west Europe. Plant Pathology 51: 24-32.

Hovmøller, M., Walter, S., Bayles, R., Hubbard, A., Flath, K., Sommerfeldt, N., Leconte, M., Czembor, P., Rodriguez-Algaba, J. and Thach, T. 2015. Replacement of the European wheat yellow rust population by new races from the centre of diversity in the near Himalayan region. Plant Pathology: DOI: 10.1111/ppa.12433.

Jennings, J., Newton, A. and Buck, K. 1997. Detection of polymorphism in *Puccinia hordei* using RFLP and RAPD markers, differential cultivars, and analysis of the intergenic spacer region of rDNA. Journal of Phytopathology 145: 511-519.

Jin, Y. 2011. Role of *Berberis* spp. as alternate hosts in generating new races of *Puccinia graminis* and *P. striiformis*. Euphytica 179: 105-108.

Jin, Y., Szabo, L. J. and Carson, M. 2010. Century-old mystery of *Puccinia striiformis* life history solved with the identification of Berberis as an alternate host. Phytopathology 100: 432-435.

Kafi, M. and Balandary, A. 2001. Berberis : production and processing. Zaban va Adab Press, Mashhad, Iran 209 (in Persian with English Summary).

Keiper, F. J., Hayden, M. J., Park, R. F. and Wellings, C. R. 2003. Molecular genetic variability of Australian isolates of five cereal rust pathogens. Mycological Research 107: 545-556.

Kim, W., Zerucha, T. and Klassen, G. 1992. A region of heterogeneity adjacent to the 5S ribosomal RNA gene of cereal rusts. Current Genetics 22: 101-105.

Liu, Z., Szabo, L. J. and Bushnell, W. 1993. Molecular cloning and analysis of abundant and stage-specific mRNAs for *Puccinia graminis*. Molecular Plant Microbe Interactions 6: 84-84.

Ma, J., Chen, X., Wang, M. and Kang, Z. 2010. Constructing physical and genomic maps for *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the wheat stripe rust pathogen, by comparing its EST sequences to the genomic sequence of *P. graminis* f. sp. *tritici*, the wheat stem rust pathogen. Comparative and Functional Genomics 2009: 1-13.

Murray, M. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4326.

Niazmand, A., Abbasi, M., Afshari, F., Rezaee, S. and Hajmansoor, S. 2013. Study of genetic diversity of

www.SID.ir

Archive of SID

Puccinia triticina pathotypes, the causal agent of wheat leaf rust in Iran based on rDNA IGS1 sequenceing. Iranian Journal of Plant Pathology 49: 157-169 (in Persian with English Summary).

Rabaninasab, H., Okhovat, M., Abbasi, M., Torabi, M. and Mozafari, J. 2008a. The role of rDNA IGS1 in studing of genetic vaiability of yellow rust disease agent, *Puccinia striiformis* f.sp. *tririci*. Journa of Plant Protection 22: 61-70 (in Persian with English Summary).

Rabaninasab, H., Okhovat, M., Torabi, M., Abbasi, M. and Mozafari, J. 2008b. Virulence and molecular diversity in *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* from Iran. Journa of Plant Protection 22: 47-60 (in Persian with English Summary).

Rodriguez-Algaba, J., Walter, S., Sørensen, C. K., Hovmøller, M. S. and Justesen, A. F. 2014. Sexual structures and recombination of the wheat rust fungus *Puccinia striiformis* on *Berberis vulgaris*. Fungal Genetics and Biology 70: 77-85.

Roose-Amsaleg, C., De Vallavieille-Pope, C., Brygoo, Y. and Levis, C. 2002. Characterisation of a length polymorphism in the two intergenic spacers of ribosomal RNA in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat yellow rust. Mycological Research 106: 918-924.

Safavi, S. A. 2015. Effects of yellow rust on yield of race-specific and slow rusting resistant wheat genotypes. Journal of Crop Protection 4: 395-408 (in Persian with English Summary).

Safavi, S. A. and Afshari, F. 2012. Identification of resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in some elite wheat lines. Journal of Crop Protection 1: 293-302 (in Persian with English Summary).

Simon, U. K. and Weiß, M. 2008. Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. Molecular Biology and Evolution 25: 2251-2254.

Sinclair, J. B. and Dhingra, O. D. 1995. Basic plant pathology methods. 2nd ed., CRC Press. USA. 434 p.

Singh, R. P., Hodson, D. P., Huerta-Espino, J., Jin, Y., Bhavani, S., Njau, P., Herrera-Foessel, S., Singh, P. K., Singh, S. and Govindan, V. 2011. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. Annual Review of Phytopathology 49: 465-481.

Singh, R. P., Hodson, D. P., Jin, Y., Lagudah, E. S., Ayliffe, M. A., Bhavani, S., Rouse, M. N., Pretorius, Z. A., Szabo, L. J. and Huerta-Espino, J. 2015. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: Continued threat to food security and prospects of genetic control. Phytopathology 105: 872-884.

Steele, K., Humphreys, E., Wellings, C. and Dickinson, M. 2001. Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* by use of molecular markers. Plant Pathology 50: 174-180.

Szabo, L. J. and Kolmer, J. A. 2007. Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus Puccinia triticina. Molecular Ecology Notes 7: 708-710.

Tiwari, U. L., Adhikari, B. S. and Rawat, G. S. 2012. A checklist of berberidaceae in Uttarakhand, Western Himalaya, India. Check List 8: 610-616.

Wang, M. and Chen, X. 2015. Barberry does not function as an alternate host for *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the US Pacific Northwest due to teliospore degradation and barberry phenology. Plant Disease 99:1500-1506.

Wang, M. N., Wan, A. M. and Chen, X. M. 2015a. Barberry as alternate host is important for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* but not for *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the U.S. Pacific Northwest. Plant Disease 99: 1507-1516.

Wang, Y., Hao, B., Zhang, Q., Tuo, E., Sun, G., Zhang, R., Jin, S., Zhu, M., Wang, Y. and Hsiang, T. 2012. Discovery of multiple IGS haplotypes within genotypes of *Puccinia striiformis*. Fungal Biology 116: 522-528.

Wang, Z., Zhao, J., Chen, X., Peng, Y., Ji, J., Zhao, S., Lv, Y., Huang, L. and Kang, Z. 2015b. Virulence variations of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* isolates collected from *Berberis* spp. in China. Plant Disease: PDIS-12-14-1296-RE.

Wolters, J. and Erdmann, V. A. 1988. Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. Nucleic Acids Research 16: r1-r70.

Zhao, J., Wang, L., Wang, Z., Chen, X., Zhang, H., Yao, J., Zhan, G., Chen, W., Huang, L. and Kang, Z. 2013. Identification of eighteen *Berberis* species as alternate hosts of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and virulence variation in the pathogen isolates from natural infection of barberry plants in China. Phytopathology 103: 927-934.

www.SID.ir