تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* در استان کرمانشاه

Genetic Diversity in Population of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Sampled from Kermanshah Province

مریم یوسفوند[۱]، سعید عباسی[۲*]، کیانوش چقامیرزا[۳]و صحبت بهرامی‌نژاد[۳]

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

چکیده

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

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

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

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

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

*: نویسنده مسوول Email: abbasikhs@yahoo.com

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

مقدمه

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

قارچ *Gaeumannomyces* دارای هفت گونه‌ی شناخته شده است که هر کدام دارای دامنه‌ی میزبانی متفاوتی هستند. *فریمن و وارد، راچدوانگ* (Freeman and Ward, 2004; Rachdowang, 1999). مهم‌ترین گونه‌ی آن گونه‌ی *G. graminis* دارای چهار واریته‌ی شناخته شده شامل *G. g.* var. *tritici*، *G. g.* var. *avenae*، *G. g.* var. *maydis* و *G. g.* var. *graminis* می‌باشد. هر یک از این واریته‌ها دارای طیف میزبانی متفاوتی هستند. واریته‌ی *G. g.* var. *tritici* عامل اصلی پاخوره‌ی گندم است که به جو، تریتیکاله و چاودار نیز حمله می‌کند، اما قادر به ایجاد آلودگی در یولاف نیست. واریته‌ی *G. g.* var. *avenae* علاوه‌بر میزبان‌های فوق، یولاف را نیز مورد حمله قرار می‌دهد. واریته‌ی *G. g.* var. *maydis* اغلب به ذرت حمله می‌کند و واریته‌ی *G. g.* var. *graminis* برخی علف‌های گرامینه، برموداگراس و برنج را مورد حمله‌ی خود قرار می‌دهد. *فریمن و وارد*، 2004؛ *فولی* و همکاران (Fouly *et al.*, 1996). گسترده بودن دامنه‌ی میزبانی، انتشار وسیع جغرافیایی و قدرت بقاء از یک سو و پیچیدگی محیط خاک که موجب ناکارآمدی کنترل شیمیایی می‌شود، مدیریت و مهار این بیماری را بغرنج ساخته است. روش‌های زیادی برای کنترل و مهار این بیماری معرفی شده است که از آن جمله می‌توان به از بین بردن بقایای گیاهی و علف‌های هرز، استفاده از میکروارگانیسم‌های همستیز، شخم عمیق، کنترل شیمیایی، استفاده از ارقام متحمل و تناوب زراعی اشاره کرد. هرچند هیچ‌یک از این روش‌ها در مهار کامل بیماری موفق نبوده‌اند؛ ولی در مجموع، تناوب زراعی روشی مناسب برای مهار بیماری قلمداد گردیده است. *تیلسان* و همکاران؛ *متری* و همکاران (Tilson *et al.*, 2005; Mathre *et al.*, 1998). مدیریت موفق بیماری، مستلزم تعیین واریته‌های بیمارگر در منطقه، شناخت کافی از نحوه انتشار بیماری و میزان تنوع پذیری در جمعیت بیمارگر می‌باشد. شناسایی واریته‌های عامل بیماری پاخوره در منطقه، امکان تصمیم‌گیری در خصوص انتخاب گیاهان مناسب جهت تناوب کشت را فراهم ساخته و مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی بیمارگر در جدایه‌های مناطق مختلف و بررسی انطباق تنوع ژنتیکی با پراکنش جغرافیایی جدایه‌های بیمارگر، به شناخت ما از چگونگی انتشار بیماری کمک فراوانی خواهد کرد. استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA روش جدید و سریعی در مطالعات تنوع ژنتیکی برای بدست آوردن بینشی در مورد ساختار پیچیده جمعیت قارچ‌هایی نظیر *G. graminis* که دامنه وسیعی از گیاهان زراعی را آلوده می‌سازد، می‌باشد. *باول و دابرونا* (Bavol and Dubrovna, 2009). در این میان، توالی‌های بین ریزماهواره Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) یک نشانگر مولکولی نیمه تصادفی است. *بارنت و برانچارد* (Bornet and Branchard, 2001) که نخستین بار توسط *زیتکویچ و همکاران، ۱۹۹۴* (Zietkiewicz *et al.*, 1994) ابداع شد. تکثیر در این نشانگر در حضور یک آغازگر مکمل با توالی‌های SSR یا ریزماهواره هدف انجام می‌پذیرد و تنوع حاصل از فراورده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تابعی از تعداد واحدهای ریزماهواره‌هاست. از نشانگر ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها از جمله جدایه‌های *G. graminis* استفاده شده است (*باول و دابرونا*، 2009).

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

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های آلوده

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

جداسازی بیمارگر

نمونه‌های آلوده ابتدا کاملاً با آب شستشو داده شدند تا گل و لای و آلودگی‌های سطحی آن‌ها حذف شوند. سپس با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی گردیده و قطعاتی از بافت آلوده درون تشتک‌های پتری روی محیط آب آگار یا عصاره سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام سولفات استرپتومایسین قرار داده شدند. تشتک‌های پتری سپس در ژرمیناتور و در دمای ۲۵°C نگهداری شده و به صورت روزانه مورد بازدید قرار گرفتند. پس از ظهور پرگنه‌های قارچی، ضمن مشاهده حاشیه‌ی پرگنه در حال رشد قارچ در زیر استریومیکروسکوپ، یک نوک ریسه‌ی منفرد برداشته شده و به محیط کشت PDA انتقال داده شد (*فریدمن و وارد*، 2004).

شناسایی جدایه‌های بیمارگر

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

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

برای تشخیص واریته‌ی جدایه‌های قارچی و تأیید تعلق آن-ها به گونه‌ی *G. graminis* از آغازگرهای اختصاصی شامل آغازگرهای NS5:GGT-RP و NS5:GGA-RP استفاده شد. *فولی و ویکینسون*، ۲۰۰۰ (Fouly and Wilkinson, 2000). سه جدایه مربوط به قارچ‌های *Pythium aphanidermatum*، *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* به نیز به‌عنوان شاهد منفی در این آزمون شناسایی مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Corbett Research, Australia) در حجم ۲۵µl شامل ۲/۵µl بافر PCR(10x)، ۱/۶ µl $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۰/۵ µl dNTPs mix (۱۰ mM)، ۱/۵ µl از هریک از آغازگرهای بالا دست (NS5: 5'AACTTAAAGGAATTGACGGAAG3') و پایین‌دست (GGT-RP: 5'TGCAATGGCTTCGTGAA3') یا (GGA-RP: 5'TTTGTGTGTGACCATAC3') ساخت شرکت ژن فناوران با غلظت ۱۰ پیکومول، ۳ µl از DNA نمونه (۱۰ ng/µl)، ۰/۲µl آنزیم Taq DNA Polymerase (معادل یک واحد) و ۱۴/۲ µl آب دیونیزه سترون انجام گرفت.

تکثیر قطعات DNA طبق برنامه پیشنهادی *فولی و ویکینسون*، (2000) شامل واسرشتگی اولیه به‌مدت سه دقیقه در دمای ۹۳°C و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۳°C به‌مدت یک دقیقه، اتصال در ۵۲°C، یک دقیقه، بسط در ۷۲°C، یک دقیقه و نهایتاً بسط نهایی در ۷۲°C به‌مدت پنج دقیقه به انجام رسید.

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

آزمون ISSR-PCR

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

جدول ۱: مشخصات جدایه‌های *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* به‌دست آمده از مناطق مختلف استان کرمانشاه

Table 1: Characterization of the *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Isolates obtained from different regions of Kermanshah province

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

کد جدایه Isolates code	محل جمع آوری Location	جدایه‌های مورد استفاده در مطالعه تنوع ژنتیکی Isolates used in the study of genetic diversity
G78	اسلام آباد	✶
G79	جاده‌ی صحنه	✶
G80	درود فرامان	✶
G81	درود فرامان	✶
G82	درود فرامان	✶
G83	درود فرامان	✶
G84	درود فرامان	✶
G92	جاده‌ی گیلانغرب	✶
G93	جاده‌ی گیلانغرب	✶
G94	جاده‌ی گیلانغرب	
G95	جاده‌ی کامیاران	
G96	پاوه	✶
G97	اسلام آباد	

برای آغازگرهای ISSR واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری برای هر جدایه، شامل ۲/۵ µl بافر (10X) PCR، ۱/۶ µl $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۰/۵ µl dNTP (10mM)، ۲/۵ µl آغازگر (10µM)، ۰/۲µl آنزیم *Taq* DNA Polymerase (معادل یک واحد)، ۱۵/۲µl آب دیونیزه سترون و ۲/۵µl از نمونه DNA (10ng/µl) هر یک از جدایه‌ها صورت گرفت. برای کنترل منفی ۲/۵ µl آب دیونیزه سترون به جای DNA نمونه مصرف گردید. تکثیر قطعات DNA به‌صورت یک چرخه مقدماتی شامل مراحل واسرشتگی مقدماتی ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C، واسرشت‌سازی ۲۰ ثانیه در ۹۴°C، اتصال ۱ دقیقه در ۵۰-۵۶°C، بسط ۲۰ ثانیه در ۷۲°C و به دنبال آن تکرار ۴۰ چرخه و بسط نهایی ۶ دقیقه در ۷۲°C صورت گرفت. الکتروفورز محصولات PCR در هر مورد، با شدت ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت با ژل آگارز ۱/۲ درصد و بافر TBE به مدت یک ساعت و نیم انجام شد. رویت و عکس‌برداری از نوارهای حاصل، با استفاده از اتیدیوم‌بروماید و زیر نور UV انجام پذیرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمون ISSR-PCR

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

نتایج

شناسایی و تعیین واریته‌ی جدایه‌های بیمارگر

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

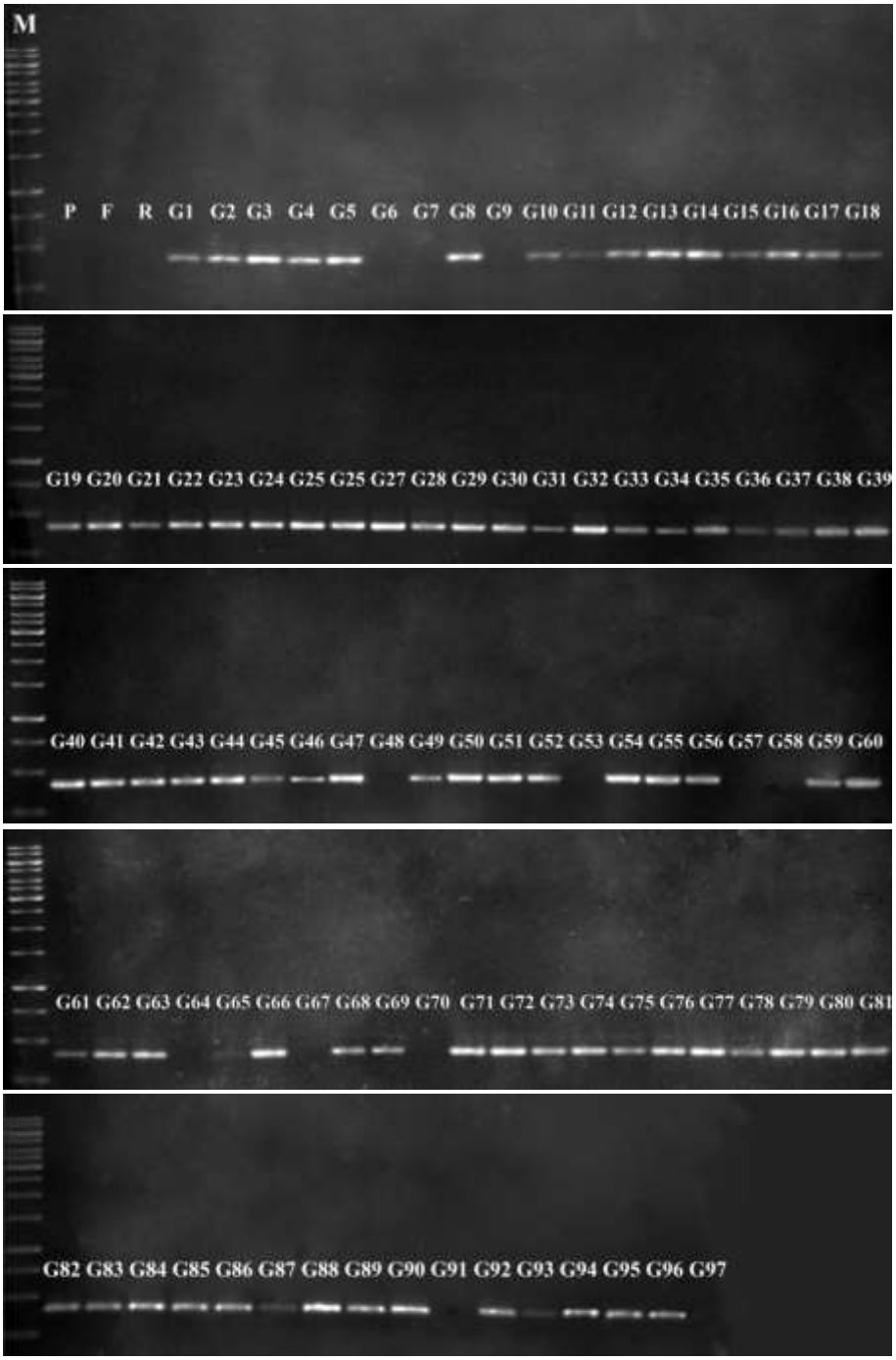
آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده شامل یک بالادست NS5 و دو فرو دست شامل GGT-RP و GGA-RP بودند؛ که بالادست NS5، برای هر فرودست به‌طور جداگانه مورد استفاده قرار گرفت. جفت آغازگر NS5:GGT-RP برای ۸۴ جدایه از مجموع ۹۷ جدایه‌ی مورد آزمون، فقط یک باند در محدوده‌ی ۴۱۰ جفت‌باز تولید نمودند، اما در محدوده ۳۰۰ جفت‌باز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

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

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمون ISSR-PCR

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

مختلف استان انتخاب و تنوع ژنتیکی آن‌ها با استفاده از تکنیک ISSR مورد آزمون قرار گرفت. به این منظور از میان ۲۰ آغازگر ISSR آزمون شده، تعداد ۱۰ آغازگر که تکرارپذیری و چند شکلی بیشتری نشان دادند، انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر در جدول ۲ ارائه شده است.



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

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

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

جدول ۲: درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات ۱۰ آغازگر مورد استفاده برای انگشت‌نگاری ژنومی ۵۴ جدایه *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* با استفاده از تکنیک ISSR-PCR

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

نام آغازگر Primer	۳'→۵'	دمای اتصال آغازگر°C Annealing Temperature	PIC[2]	MI[1]	تعداد کل باندها Total Bands	تعداد باند چندشکل The number of Polymorphic Bands
UBC 807	$(AG)_8T$	53	0/35	5/26	15	15
UBC 868	$(GAA)_6$	54	0/32	5/20	16	16
UBC 884	$HBH(AG)_6$	51	0/37	4/86	13	13
UBC 866	$(CTC)_6$	50	0/31	4/40	14	14
UBC 873	$(GACA)_3GAC$	50	0/31	5/96	19	19
UBC 856	$(AC)_8YA$	51	0/33	6/60	20	20
UBC 818	$C(AC)_7AG$	52	0/38	5/32	14	14
UBC 860	$(TG)_9RA$	50	0/32	3/94	12	12
UBC 855	$(AC)_3(CA)_3CYT$	56	0/31	4/15	13	13
UBC 864	$(ACTG)_4$	50	0/27	3/62	13	13
میانگین Average			0/32	4/93	14/9	14/9

۱. شاخص نشانگر، ۲. چند شکل محتوای اطلاعاتی

1.Marker Index , 2. Polymorphic Information Content

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

تجزیه واریانس مولکولی ISSR

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

جدول ۳: تجزیه واریانس مولکولی برای ۵۴ جدایه از قارچ *Gaeumannomyces graminis* براساس داده‌های ISSR
Table 3: Analysis of molecular variance (AMOVA) for 54 isolates of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* based on ISSR data

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

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

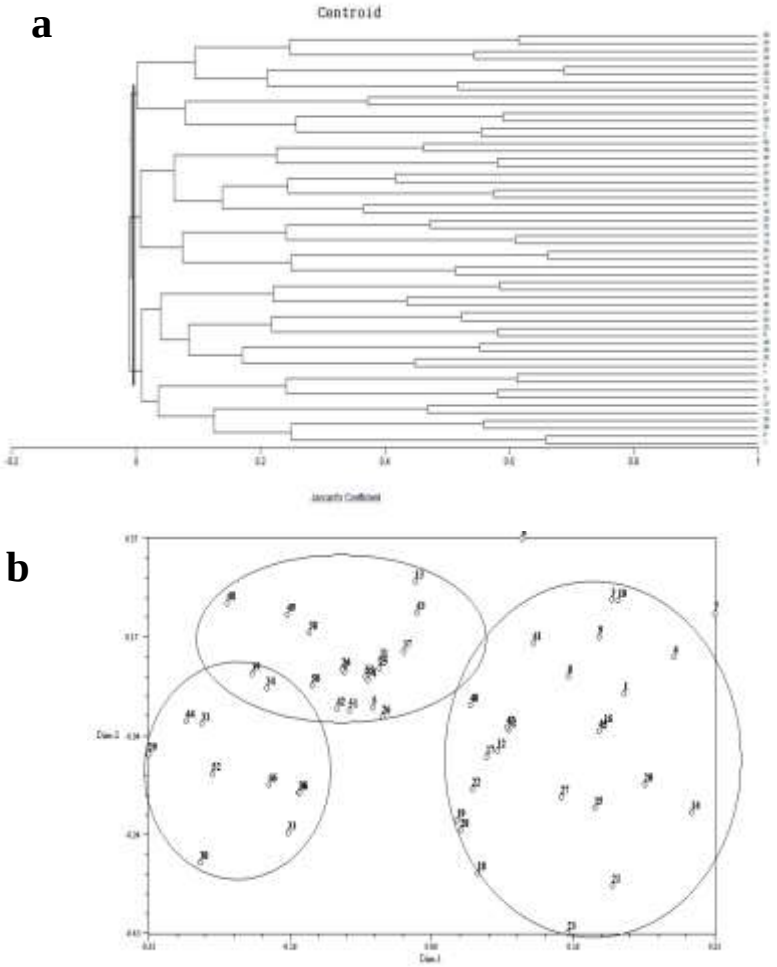
بحث

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

در این مطالعه، هیچ یک از جدایه‌های شناسایی شده به واریته‌ی *G. g.* var. *avenae* تعلق نداشته و لذا انتظار می‌رود قادر به ایجاد بیماری در یولاف نباشند. یولاف به‌دلیل داشتن ساپونین ضدقارچی موسوم به اوناسین در ریشه خود از حمله بسیاری از بیمارگرها جلوگیری می‌کند؛ اما واریته‌ی *G. g.* var. *avenae* به دلیل داشتن آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی ساپونین، یولاف را نیز مورد حمله قرار می‌دهد. *بویر* و همکاران، *اسبورن* و همکاران (Bowyer *et al*., 1995; Osbourn *et al*., 1994). به هرحال، براساس نتایج این مطالعه، تمامی جدایه‌ها به واریته *G. g.* var. *tritici* تعلق داشتند. لذا، حضور واریته‌ی *G. g.* var. *avenae* در مزارع استان کرمانشاه بعید به‌نظر می‌رسد. از این‌رو، کشت یولاف به‌عنوان یک غله‌ی جایگزین به‌منظور مهار بیماری و در عین حال حفظ سطح تولید غلات قابل توصیه خواهد بود.

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

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



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

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

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که نشانگر ISSR، نشانگر مناسبی جهت مطالعات تنوع ژنتیکی در جمعیت *G. graminis* می‌باشد. این نشانگر توسط محققین دیگر نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *G. graminis* مورد استفاده قرار گرفته است (*باول و دابرونا*، 2009).

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

سپاسگزاری

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

منابع:

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