مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 1، شماره 2، زمستان 1388)

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های ایرانی *Septoria tritici* با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

مریم دارستانی فراهانی[1]، ناصر صفایی*[2]، عزیزاله علیزاده[1]

[1] گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

بیماری سپتوریوز برگی گندم از مهمترین بیماریهای گندم در جهان و ایران می‌باشد که سالیانه خسارت فراوانی را به محصول گندم وارد می‌سازد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی *Septoria tritici*، نمونه‌های گندم آلوده از چهار استان خوزستان، گلستان، اردبیل و کرمانشاه جمع آوری و بررسی شد. از میان 88 جدایه بدست آمده، 26 جدایه بر اساس پراکنش جغرافیایی برای مطالعات بیماریزایی و بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر RAPD انتخاب شدند. تجزیه واریانس شدت بیماریزایی جدایه ها در سطح 99 درصد ($p<0.01$) معنی دار بود و براساس مقایسه میانگین شدت بیماریزایی جدایه ها با استفاده از آزمون دانکن به 5 گروه تقسیم شدند. در مطالعه تنوع ژنتیکی، از میان 15 آغازگر تصادفی بررسی شده، شش آغازگر شامل؛ OPC18 ، P14 ، RC09 ، R28 ، OPA04 ، Rotha14 بر اساس وضوح باند و تکرار پذیری انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از الگوی باندی مربوط به این شش آغازگر تصادفی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA جدایه‌های *Septoria tritici* مورد بررسی را در سطح تشابه 35 درصد، به 8 گروه تقسیم نمود که بیانگر تنوع ژنتیکی بالا در این جدایه‌ها می باشد و بر اساس تعداد کلاسترهای مربوط به جدایه ها، در منطقه اردبیل با 36/3 درصد بیشترین تنوع را نشان داد. این اولین گزارش از بررسی تنوع ژنتیکی در جدایه‌های *S. tritici* در ایران است.

واژه های کلیدی: بیماریزایی، تنوع ژنتیکی، *Septoria tritici*، گندم، RAPD-PCR

* نویسنده مسئول: ناصر صفایی تلفن: 021-48292288 Email : nsafaie@modares.ac.ir

مقدمه

سپتوریوز گندم (*Septoria tritici*) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مناطق تولید گندم در جهان بوده، و از جمله مهم ترین عوامل کاهش محصول می‌باشد (Linde *et al*., 2002; King *et al*., 1983; Eyal *et a*l., 1987). اهمیت بیماری و خسارت ناشی از آن زمانی افزایش یافت که ارقام مکزیکی با خواص زراعی خوب، نظیر عملکرد زیاد، قدرت سازش با محیط‌های مختلف و مقاومت در مقابل زنگ ها در سطح گسترده ای از کشورهای دنیا مورد استفاده قرار گرفت و چون این ارقام نسبت به بیماری سپتوریوز گندم حساس بودند در برخی از کشورها خسارت قابل توجهی وارد نمودند (Eyal Torabi, 1980, 1981)، در چند سال اخیر این بیماری به طور پراکنده در مناطق مختلف رخ داده و رو به گسترش بوده است و در بعضی از مناطق نظیر مزارعی از دشت آزادگان، ایذه و بهبهان در استان خوزستان بیماری به صورت اپیدمی شدید ظاهر شد. در یک جمعیت بیمارگر هر چه تنوع ژنتیکی بیشتر باشد، احتمال وقوع مقاومت در قارچ به قارچ کش مورد استفاده در برنامه‌ی مدیریت مبارزه قوی تر می شود. از طرفی پایداری مقاومت یا تحمل ارقام را، بدون اطلاع از ساختار ژنتیکی بیمارگر نمی‌توان پیش بینی نمود (McDonald and Martinez, 1990). بنابر این، با در دست داشتن اطلاعات صحیح از ساختار ژنتیک جمعیت *S. tritici* می‌توان ارقام مناسبی برای مناطق جغرافیایی مختلف یا جمعیت‌های متنوع این قارچ ایجاد نمود که این خود منجر به پایداری مقاومت در این مناطق جغرافیایی خواهد شد. اگرچه تنوع ژنتیکی *S. tritici* با استفاده از نشانگر RAPD (Razavi and Hughes, 2004) و سایر نشانگرها (McDonald and Martinez, 1990; Linde *et al*., 2002) در سایر نقاط جهان بررسی شده است، ولی گزارش در زمینه تنوع ژنتیکی این قارچ در ایران محدود است. کمیجانی و همکاران (1387)، نیز به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان نزدیکی ژنتیکی جدایه های قارچ عامل بیماری در ایران، 58 جدایه از 7 استان کشور را با استفاده از نشانگر rep-PCR، مطالعه کردند و نشان دادند که 56 جدایه بیش از 50٪ از نظر ژنتیکی از همدیگر متفاوت بودند و اغلب جدایه هایی که با همدیگر مشابه بودند از یک منطقه جغرافیایی بودند که نشانگر وجود دودمان های ژنتیکی مختلف در مناطق جغرافیایی کشور می باشد. ابرین بنا (1389)، 221 جدایه از پنج استان کشور را با استفاده از نشانگرهای AFLP و لوکوس تیپ آمیزشی بررسی کرده و نشان داد که پنج جمعیت مورد بررسی از نظر ژنتیکی متمایز، جریان ژنی بین آن ها محدود و به صورت گروه های مجزا از هم گروهبندی شدند و تنوع ژنی نیز در این جمعیت ها کم و در حالت عدم

تعادل پیوستگی بودند. در این پژوهش ضمن جمع‌آوری و جداسازی جدایه‌های *S. tritici* از چهار استان کشور، تنوع ژنتیکی آنها به کمک نشانگرهای مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفته است و تعیین تنوع موجود بین جدایه های ایرانی این قارچ صورت گرفته و این امر مهمترین قدم در مدیریت درست این بیمارگر در کشور به شمار می رود.

مواد و روش ها

جدا سازی بیمارگر

در بازدید از مزارع گندم، برگ های آلوده و حاوی پکنیدیوم در طی فصول زراعی سال های 1385-1384 و 1386-1385، جمع آوری گردید و در پاکت های کاغذی گذاشته و مشخصات گیاه بیمار، مزرعه، منطقه و تاریخ نمونه برداری روی تمام نمونه ها یادداشت گردید و به آزمایشگاه برای جداسازی منتقل شد. برای جداسازی بیمارگر ابتدا قطعات برگ زیر آب روان شستشو داده شدند سپس قطعات برگ پیکنید به گونه ای که منفذ پیکنید به سمت بالا باشد، روی لام های شیشه ای گذاشته و نمونه را در یک تشتک پتری حاوی کاغذ صافی اشباع شده با آب مقطر سترون قرارداده و درب آن، جهت حفظ رطوبت و جلوگیری از آلودگی بسته شد. تشتک ها در دمای 22 تا 24 سانتی گراد نگهداری و پس از 2 تا 8 ساعت با جذب رطوبت، خروج فتیله از روزنه پیکنیدها شروع شد. انتقال پیکنیدیوسپورها در شرایط سترون زیر هود انجام شد. با کمک نوک سوزن سترون قطره فتیله به محیط کشت آب آگار یا PDA حاوی کلرامفنیکل (250 میلی گرم در لیتر) یا استرپتومایسین سولفات (50 میلی گرم در لیتر) منتقل شد (Eyal *et al*., 1987).

خالص سازی بیمارگر و نگهداری آن

خالص سازی جدایه ها به روش تک اسپور کردن انجام شد. ابتدا با لوپ اسپورها را از سطح محیط کشت برداشته و در لوله آزمایشی که حاوی 9 میلی لیتر آب مقطر سترون بود، ریخته و سپس هم زده و سوسپانسیون اسپور تهیه شد و دوباره یک میلی لیتر از این سوسپانسیون به 9 میلی لیتر آب مقطر سترون در داخل لوله آزمایش دیگر اضافه شد و بعد از هم زدن، محیط یکنواختی تهیه شد. غلظت اسپور باید طوری باشد که بعد از پخش کردن در سطح تشتک پتری محتوی محیط کشت، اسپورها مجزا و با فاصله مشخصی از همدیگر قرار گیرند. بعد از تهیه سوسپانسیون، چند قطره از آن با لوپ در سطح تشتک پتری، محتوی لایه نازکی از محیط کشت آب آگار پخش گردید. سپس در داخل انکوباتور در دمای 25 درجه سانتی گراد قرار داده شد و 24 ساعت بعد پتری ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. اسپورهای جوانه زده مشخص

گردیدند. با سوزن سترون، قطعه حاوی اسپورهای جوانه زده به تشتک های پتری حاوی محیط کشت دارای کلرامفنیکل یا استرپتومایسین PDA انتقال داده شد و در انکوباتور برای رشد نگه داری شد. برای نگهداری به صورت کوتاه مدت، تشتک های پتری جدایه های کشت شده در سردخانه نگهداری شدند. برای نگهداری بلند مدت، 500 میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ را با 250 میکرولیتر گلیسرول مخلوط کرده و در میکروتیوپ 1/5 ریخته و با vortex مخلوط کرده و در فریزر 70- درجه نگهداری شدند.

تهیه زادمایه

برای تهیه **زادمایه** ارلن مایرهای 250 میلی‌لیتری محتوی محیط مایع استریل (Potato Dextrose Liquid medium) PDB با اسپورهای کشت جوان قارچ، که روی محیط جامد تشکیل شده است، مایه کوبی شدند. سپس ارلن مایرها به شیکر انکوباتور انتقال داده شده و به مدت 7 تا 10 روز در دمای 20 ° C با سرعت 100 دور در دقیقه نگهداری شدند. تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به کمک لام گلبول شمار شمارش شده و به تعداد 1×10^7 در هر میلی‌لیتر تنظیم شد.

مایه زنی گیاهچه های گندم در گلخانه

بعد از تهیه سوسپانسیون اسپور، گیاهچه های یک برگی (10 روزه) رقم داراب 2، که در گلدان های سترون در خاک بکر کشت شده بودند مایه زنی گردیدند. برای خاک گلدان ها پرلیت، خاک و خاک برگ سترون استفاده شد که اینها با نسبت 1:1:1 مخلوط و در گلدان های کوچک 500 گرمی ریخته شدند. بعد از آماده سازی خاک گلدان ها، بذرها را در داخل ظرف محتوی الکل 96 درصد به مدت 30 ثانیه ریخته و سپس الکل را تخلیه و دو بار با آب مقطر سترون، بذر ها شسته شدند. بعد از ضد عفونی سطحی، پنج بذر در داخل هر گلدان قرار داده شد و روی بذرها به ضخامت یک سانتی متر از همان خاک ریخته شد. زمانی که گیاهچه ها به مرحله یک برگی رسیدند، یک قطره توئین 20 درصد به سوسپانسیون اسپور اضافه گردید و مایه زنی با استفاده از آب فشان دستی انجام گرفت. پس از مایه زنی، گلدانهای حاوی گیاهچه ها به مدت 96 ساعت با کیسه های پلاستیکی پوشانده شد و کیسه ها با آب فشان دستی مرطوب نگه داشته شد. بعد از این مدت، کیسه ها از سطح گلدان ها برداشته شد.

آزمایش بیماریزایی جدایه‌ها

آزمایش بیماریزایی جدایه‌ها با پاشیدن سوسپانسیون اسپور هر جدایه با غلظت 1×10^7 روی گیاهچه های 10 روزه داراب 2 انجام شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام

شد و برای هر جدایه سه تکرار (گلدان) با یک شاهد (آب مقطر سترون) در نظر گرفته شد.

ارزیابی بیماری (Disease assessment)

آزمون بیماریزایی با استفاده از 26 جدایه بدست آمده از مناطق مختلف کشور انجام پذیرفت. یاداشت برداری از واکنش ژنوتیپ ها با ثبت شدت بیماری[1] و شیوع بیماری[2] انجام شد و شدت بیماری بر اساس مقیاس ارایه شده در روش دو رقمی ساری- پریسکات (Saari and Prescott, 1996) اندازه گیری شد.

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه های قارچ *Septoria tritici*

استخراج DNA

برای تهیه بیومس، ارلن مایرهای 250 میلی‌لیتری محتوی محیط مایع استریل (Potato Dextrose Liquid medium) PDB با اسپورهای کشت جوان قارچ که روی محیط جامد تشکیل شده است، تلقیح شدند. سپس فلاسک های ارلن به شیکر انکوباتور انتقال داده شده و به مدت 7 تا 10 روز در دمای 20 ° C با سرعت 100 دور در دقیقه نگهداری شدند. بعد از مدت تعیین شده، میسلیوم ها به کمک کاغذ صافی واتمن شماره یک و پمپ خلاء از محیط جدا شده و دوباره با آب مقطر سترون شستشو داده شدند تا باقیمانده محیط مایع از روی سطح میسلیوم شسته شود. میسلیوم های آبگیری شده پس از وزن شدن در داخل لوله فالکون قرار داده و بلافاصله به دمای 70- درجه سانتی گراد، در داخل اولترا فریزر منتقل شدند. به منظور استخراج DNA، از محلول نمکی DNA و مطابق روش صفایی و همکاران (Safaie *et al*., 2005) استفاده شد. برای اطمینان از موفقیت عمل استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت DNA استحصالی، پنج میکرولیتر از محلول DNA با یک میکرولیتر بافر رنگ 6X (90 میلی گرم برموفنل بلو، 60 میلی لیتر گلیسرول، 1/753 گرم EDTA و 40 میلی لیتر آب دوبار تقطیر) مخلوط گردید و در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. همچنین برای تعیین غلظت DNA استخراج شده، از دستگاه بیوفتومتر استفاده شد.

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه های قارچ *Septoria tritici* با استفاده از نشانگر RAPD

به منظور انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه های *S. tritici* با استفاده از نشانگر RAPD[1]، ابتدا 15 آغازگر تصادفی نوکلئوتیدی ساخت شرکت سیناژن در ایران، روی تعدادی از جدایه ها به عنوان DNA الگو مورد بررسی قرار گرفتند.

[1] Disease severity
[2] Disease incidence

فهرست آغازگرهای مورد استفاده و توالی ´3 – ´5 آن ها به قرار زیر است:

Roth-A14: TCTGTGCTGG	**P14:** CCACAGCACG	**Roth-A20:** GTTGCGATCC
Roth-A19: CAAACGTCGG	**R28:** ATGGATCCGC	**OPA07:** GAAACGGGTG
OPA04: AATCGGGCTG	**OPC18:** TGAGTGGGTG	**P14:** CCACAGCACG
R28: ATGGATCCGC	**RC09:** GATAACGCAC	**OPC19:**GTTGCCAGCC
OPA03:AGTCAGCCAC	**OPA14:**TCTGTGCTGG	**OPA11:**TTCCCGTCAT
OPA16:AGCCAGCGAA	**OPA18:** AGGTGACCGT	

واکنش های 25 میکرولیتری RAPD-PCR با استفاده از آغازگرهای 10 نوکلئوتیدی از سری آغازگرهای تصادفی دریافت شده از سیناژن تهیه گردید. هر واکنش شامل: آب دیونیزه (DW) 4 / 14 میکرولیتر، بافر PCR (PCR buffer 10X) 2، $MgCl_2$ (50 Mm) 0/6، dNTP mix (10Mm) 1 (10 µM)، آنزیم (Taq DNA polymerase, 5u/ml) 0/5، آغازگر 5/، DNA (30 ng) 1 میکرولیتر. تکنیک RAPD-PCR در ترموسایکلر اپندورف گرادیانت، شامل چرخه‌های 92 درجه سانتی‌گراد، به مدت 2 دقیقه، به دنبال آن تکرار 40 چرخه شامل 93 درجه سانتی‌گراد، 1 دقیقه، اتصال در دمای 36 تا 40 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و 70 درجه سانتی‌گراد، 2 دقیقه و 5 دقیقه در 70 درجه سانتی‌گراد، انجام گرفت. برای مشاهده محصول PCR، الکتروفورز با ژل آگارز 1 درصد انجام گرفت. برای این منظور، 1 گرم آگارز در 100 میلی لیتر بافر TBE (1X) (90 میلی مولار تریس، 90 میلی مولار اسید بوریک و دو میلی مولار EDTA) توسط حرارت حل گردید. زمانی که دمای ژل به حدود 55 درجه سانتی گراد رسید، پنج میکرولیتر از محلول اتیدیوم بروماید[2] با غلظت 10 میلی گرم در میلی لیتر، به آن اضافه و خوب مخلوط شد. ده میکرولیتر از محصول هر واکنش همراه دو میکرولیتر بافر رنگ 6x در این ژل با ولتاژ 80 ولت به مدت 2 ساعت رانده شد. برای تخمین اندازه فراورده های تکثیر شده طی واکنش PCR، از نشانگر نردبان ژنومی 1000 جفت بازی استفاده گردید. ژل تحت نور UV با طول موج 280 نانومتر قرار گرفت. در نهایت برای عکس برداری ژل، از دستگاه عکسبرداری Gel Doc. Vilber Lourmat T-5×20-2A استفاده گردید. عمل PCR حداقل دو بار برای هر جدایه تکرار گردید و فقط قطعاتی از DNA که باند خوبی از آن ها روی ژل دیده می شد، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای ایجاد ماتریس شباهت بین جدایه ها، وجود یا عدم وجود هر یک از باند ها به صورت اعداد

[1] Random Amplified Polymorphic DNA

[2] Ethidium bromide

یک و صفر (یک برای وجود هر باند DAN و صفر برای عدم وجود آن) تعیین و در نرم افزار Exel ثبت گردید. بر اساس نتایج ماتریس شباهت که با استفاده از ضریب تشابه جاکارد بدست آمده بود، تجزیه و تحلیل خوشه ای با روش UPGMA[1] در نرم افزار MVSP، انجام شد و دندروگرام مربوط به هر آغازگر به طور جداگانه و نیز دندروگرام مربوط به مجموع آغازگرها رسم گردید.

نتایج

جداسازی بیمارگر و انتخاب متنوع ترین افراد جمعیت بر اساس پراکنش جغرافیایی

از نمونه های گیاهی جمع آوری شده از مناطق خوزستان، گلستان، اردبیل، کرمانشاه، 88 جدایه بدست آمد که برای جداسازی عامل بیماری، تشتک های حاوی قطعات برگ در دمای 22 تا 24 سانتی گراد نگهداری شدند. زمان جذب رطوبت و خروج فتیله بستگی به میزان خشکی نمونه ها داشت. برگ های سبز و خشک 2 الی 3 و برگهای خشک و مرده به چندین ساعت زمان نیاز داشتند که در آن شرایط باقی بمانند. نمونه های برگ برای کنترل خروج قطرات فتیله و تشکیل آنها در بالای دهانه پیکنید مکررا زیر بینوکولر بررسی شدند. تراوشات فتیله روشن یا کدر بودند و کدر بودن نشانه فراوانی پیکنیدیوسپورها در قطره فتیله بود. از میان 88 جدایه بدست آمده، 26 جدایه بر اساس پراکنش جغرافیایی برای بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر RAPD انتخاب شدند.

بررسی بیماری زایی جدایه

ویرولانس 26 جدایه *Septoria tritici* در گلخانه، مورد آزمون قرار گرفت. علائم بیماری بر روی رقم داراب 2، 18 تا 24 روز بعد از مایه زنی مشاهده گردید. علائم بیماری ابتدا به صورت لکه های زرد رنگ در روی برگها ظاهر گردید. این لکه ها به تدریج بزرگتر و تیره تر شده تا اینکه نسوج برگ در محل لکه ها خشک و قهوه ای شدند. در داخل این لکه ها پیکنیدیوم های قارچ عامل بیماری بصورت نقاط سیاهرنگ در دو سطح برگ مشاهده گردید. تجزیه واریانس بیماریزایی جدایه ها در سطح یک درصد، تفاوت معنی داری نشان دادند (جدول1). جدایه ها بر اساس مقایسه میانگین با استفاده آزمون دانکن، به پنج گروه تقسیم شدند (جدول2) که به ترتیب شامل 20، 22، 13،22، 2 جدایه بودند. بیشترین شدت بیماری زایی مربوط به جدایه St-1 با شدت بیماری زایی 61/24 بود و کمترین مربوط به جدایه St-5 با شدت بیماریزایی 78/6 بود. میزان بیماری زایی

[1] Unweighted Pair Group Method With Arithmetic mean

جدایه ها هیچگونه ارتباط معنی داری بـا نـواحی جغرافیایی آنها نداشت.

جدول 1- آنالیز واریانس شدت بیماری مربوط به 26 جدایه *Septoria tritici* روی رقم داراب 2 در گلخانه.

منابع تغییرات C.O.V	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of Square	میانگین مربعات Mean of Square	F-value
تیمار Treatment	25	0.359	0.014	5.308**
خطا Error	52	0.141	0.003	
کل Total	77	0.500		

Coefficient of Variation= 9.95% * معنی دار در سطح یک درصد

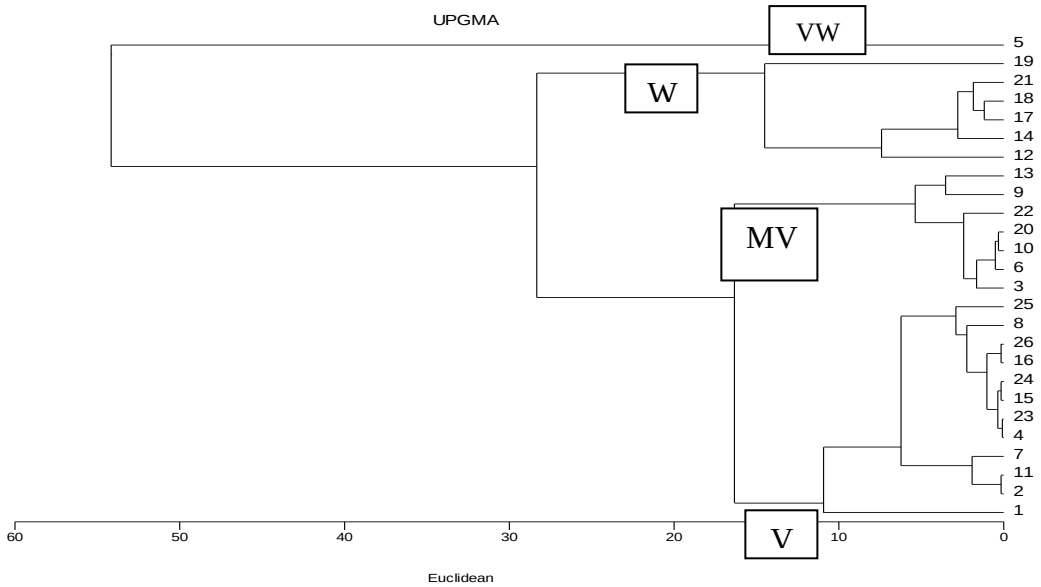
Table 1-Analysis of variation of disease intensity for 26 varieties of *Septoria tritici* on Darab 2 cultivar.

جدول 2- مقایسه میانگین های شدت بیماری مربوط به 26 جدایه *Septoria tritici* روی رقم داراب 2 در گلخانه.

نام جدایه Name of variety	میانگین شدت بیماری زایی Mean of disease	مقایسه میانگین Compare of Mean
St-1	61.24	A
St-2	56.32	ABC
St-3	42.72	ABCD
St-4	51.89	ABC
St-5	6.78	E
St-6	41.79	ABCD
St-7	57.62	AB
St-8	50.71	ABC
St-9	46.55	ABCD
St-10	41.55	ABCD
St-11	56.21	ABC
St-12	35.77	ABCD
St-13	44.06	ABCD
St-14	29.06	CD
St-15	52.10	ABC
St-16	52.82	ABC
St-17	31.01	BCD
St-18	30.17	BCD
St-19	21.32	DE
St-20	41.32	ABCD
St-21	31.88	BCD
St-22	40.14	ABCD
St-23	51.94	ABC
St-24	52.21	ABC
St-25	54.10	ABC
St-26	52.71	ABC

Table 2- Compare of disease intensity mean for 26 varieties of *Septoria tritici* on Darab 2 cultivar.

نمودار گروه بندی خوشه ای جدایه ها بر اساس شدت بیماری زایی نشان داد که 26 جدایه *S. tritici* در پنج گروه قرار گرفتند، که گروه V (virulent)، با شدت بیماریزایی 50/71 تا 61/24 درصد، شامل شش جدایه از خوزستان، دو جدایه از اردبیل و چهار جدایه از گلستان بود. گروه MV (Moderately virulent)، با شدت بیماری زایی 40/14 تا 46/55 درصد، شامل دو جدایه از گلستان، یک جدایه از اردبیل، چهار جدایه از خوزستان بود. گروه (W) Weak، شامل چهار جدایه از خوزستان، دو جدایه از اردبیل و دو جدایه از کرمانشاه بود و در نهایت یک جدایه بدست آمده از اردبیل کمترین شدت بیماری زایی را نشان داد و در گروه (VW) Very weak قرار گرفت (شکل 1).



شکل 1- خوشه بندی جدایه های *Septoria tritici* بر اساس شدت بیماری زایی آنها، V: ویرولانس شدید، MV: ویرولانس متوسط، W: ویرولانس ضعیف، VW: ویرولانس بسیار ضعیف.

Figure 1- Cluster for varieties of *Septoria tritici* based on their disease intensity. V: virulent, MV: Moderately virulent, W: Weak and VW: Very weak.

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه های *Septoria tritici*

همانطور که اشاره شد استخراج DNA به وسیله محلول نمکی DNA انجام گردید که طی این مرحله، DNA ژنومی قارچ در تمامی

جدایه ها به روش مذکور استخراج شد. از محاسن این روش می توان به صرفه جویی در وقت و عدم استفاده از مواد سمی مانند فنل و کلروفورم اشاره نمود. به منظور هماهنگ کردن غلظت های DNA استخراج شده در همه جدایه ها، با استفاده از آب دیونیزه سترون، غلظت DNA در همه جدایه ها پس از اندازه گیری به وسیله بیوفتومتر، به 30 نانوگرم در میکرولیتر رسانده شد.

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه های *Septoria tritici* با استفاده از نشانگر RAPD

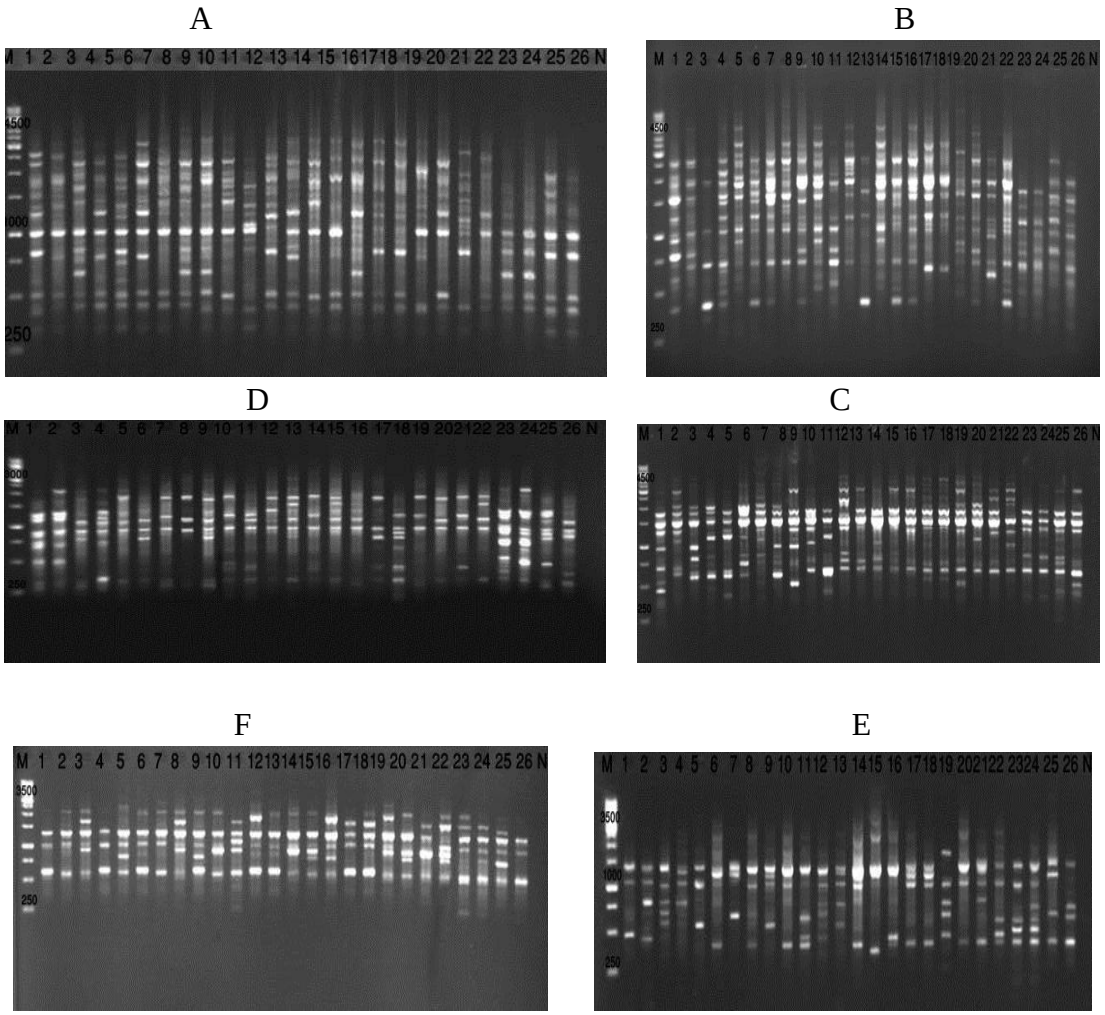
به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی قارچ *Septoria tritici* از میان 15 آغازگر تصادفی بررسی شده، شش آغازگر شامل؛ OPC18، P14، RC09، R28، OPA04 و Rotha14 بر اساس وضوح باند و تکرار پذیری انتخاب شدند (جدول 3). برای اطمینان از تکرارپذیری، واکنش تکثیر برای هر جدایه حداقل دو بار تکرار شد. تعداد قطعات چند شکل تولید شده با هر آغازگر 13 تا 25 عدد و دامنه اندازه قطعات تکثیر شده 0/25 تا 4/5 kb بود (شکل 2). هیچ کدام از شش آغازگر انتخاب شده و به کار رفته روی 26 جدایه مورد بررسی، نتوانستند جدایه ها را از لحاظ مناطق جغرافیایی کاملا تفکیک نمایند ولی در برخی موارد جدایه ها بر اساس محل جمع آوری از یکدیگر تفکیک شدند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه ای هر شش آغازگر RAPD نشان داد که در سطح تشابه 35 درصد، جدایه ها در 8 گروه قرار گرفتند. این 8 گروه به ترتیب23 (سه جدایه از خوزستان، یک جدایه از اردبیل، دو جدایه از گلستان)، 19/23 (دو جدایه از گلستان، سه جدایه از اردبیل)، 23 (شش جدایه از خوزستان)، 11/5 (دو جدایه از کرمانشاه و یک جدایه از خوزستان)، 3/8 (یک جدایه از اردبیل)، 7/6 (دو جدایه از خوزستان)، 7/6 (یک جدایه از اردبیل)، 7/6 (دو جدایه از گلستان) درصد از کل جدایه ها را شامل شدند (شکل 3).

جدول 3 – فهرست آغازگرهای مورد استفاده برای نشانگر RAPD.

نام آغازگر primer	توالی Sequence	b	p	q	چند شکلی Polymorphism
Roth-A14	5`- TCTGTGCTGG-3`	250-3500	0	16	100
OPC18	5`-TGAGTGGGTG-3`	250-4500	0	23	100
P14	5`-CCACAGCACG-3`	250-3000	0	13	100
R28	5`-ATGGATCCGC-3`	250-4500	0	24	100
RC09	5`-GATAACGCAC-3`	250-4500	1	25	96
OPA04	5`-AATCGGGCTG-3`	250-3000	1	25	96

P: monomorphic loci, q: polymorphic loci, b: band size (bp)

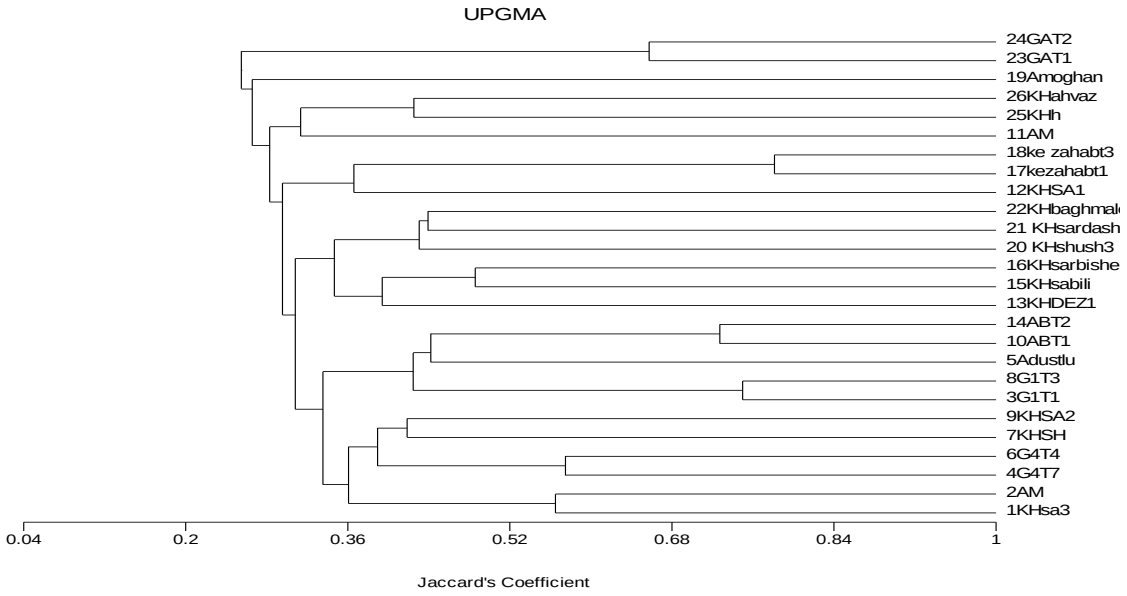
Table 3- List of used primers for RAPD marker.



شکل 2 - الگوی باندی تکثیر شده در جدایه های مختلف *Septoria tritici* با استفاده از آغازگرهای تصادفی روی ژل آگـارز 1/5 درصـد: R28, B; RCO9, C; OPA04, D; ROTHA14, E; P14, F; OPC18, A. M : نشانگر اندازه 1kb و N : کنترل منفی.

Figure 1- Banding patterns amplified in *Septoria tritici* isolates using random primers on agarose gel. A, OPC18; F, P14; E, ROTHA14; D, OPA04; C, RCO9; B, R28. Lane M: size marker 1kb, N: Negative control

بر این اساس، بالاترین تنوع به ترتیـب بین جدایه های استان های مناطق شمالی کشور اردبیل و گلستان ملاحظه شد کـه بـا توجـه بـه تعداد جدایه های گلستان (شش جدایه) نسـبت به جدایه های خوزستان (12 جدایـه) و تعـداد کلاستر های مربوط بـه اردبیـل (4) نسـبت بـه کلاسترهای مربوط به گلستان (3)، این تنوع در استان اردبیل و گلستان بسیار چشمگیرتر اسـت (جدول 4) و جدایه های کرمانشاه بـا اسـتفاده از تجزیه و تحلیل هر شش آغازگر تصادفی در کنار جدایه های خوزستان دسته بندی شدند.



شکل 3- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای داده های حاصل از شش آغازگر P14, RC09, Rotha14, R28, OPA04, OPC18 با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد.

Figure 2- Resulting dendrogram in cluster analysis of data of six random primers (P14, RC09, Rotha14, R28, OPA04, OPC18) using UPGMA method and Jaccard`s coefficient in *Septoria tritici* isolates.

جدول4- تعداد کلاسترهای تشکیل شده برای جمعیت های *S. tritici* هر استان با استفاده از نشانگرهای مختلف و درصد تنوع ژنتیکی.

ناحیه جغرافیایی Location	تعداد جمعیت Number of population	تعدادکلاستر (نشانگر RAPD) Cluster number of RAPD primer	درصد جمعیت Population %	درصد تنوع ژنتیکی برای نشانگر RAPD Genetic diversity (%)
خوزستان	12	3	46.1	27.2
گلستان	6	4	23.1	27.2
اردبیل	6	4	23.1	36.3
کرمانشاه	2	1	7.7	9

Table 4- Cluster number for *S. tritici* populations for 4 provinces using different markers and Genetic diversity (%).

بحث

اهمیت تنوع در بیماریزایی بیمارگرها، از جهات مختلف مورد توجه بیماری شناسان گیاهی می باشد. از این جهت محققان بـه دنبـال علـل و عوامـل تـاثیر گـذار در بیمـاریزایی بیمارگرهـا می باشند (Peever *et al*., 2000). وجود تنوع در بیماری زایی جدایه هـای *S. tritici*، قـبلا توسـط محققین مختلف مطالعه شده است (Van Ginkel and Scharen, 1988; Marshall, 1985). بررسی قدرت بیماریزایی جدایه ها در شرایط گلخانه هـا نشان داد که دامنه شـدت بیمـاری در جدایـه هـا بسیار متغیر می باشد و نشان دهنده متنـوع بـودن توان بیماری زایی جدایه ها مـی باشـد. همچنـین نتایج حاصـل نشـان داد کـه، شـدت بیمـاری در جدایـه هـا از 6/78 تـا 61/24 درصـد متغیـر می باشد. رضوی و هیوز (2003) نیز بـا بررسـی 90 جدایه از قارچ *M. graminicola*، جمع‌آوری شده از یک مزرعه در ایالت ساسـکاچوآن کانـادا نشان دادند که هم از نظر بیمـاری‌زایـی و هـم از نظـر قـدرت تهـاجمی بـین جدایـه‌هـا اخـتلاف معنی‌داری وجود داشت و این یافته هـا بـا نتـایج مارشال (Marshal, 1985) که گـزارش داد، تنـوع بیماری زایی در بـین جدایـه هـای *S. tritici* بـالا است، مطابقت دارد. از نشانگر مولکولی RAPD، در زمینه های مختلف تشـخیص و تنـوع ژنتیکـی جدایـه هـای قـارچی، مطالعـات رده بنـدی و فیلوژنتیکی اسـتفاده مـی شـود (Sharon *et al*., 2006; Tommerup *et al*., 1995). از میـان 15 آغازگر تصادفی با استفاده از نشـانگر RAPD، در این تحقیق شش آغـازگر شـامل OPC18، P14، RC09، R28، OPA04 و RothA14 دارای بیشـترین چنـد شـکلی بودنـد. ایـن آغازگرهـا نتوانستند جدایه ها را از لحاظ مناطق جغرافیـایی کـاملا تفکیـک نماینـد، ولـی در برخـی مـوارد جدایه ها بر اساس محل جمـع آوری از یکـدیگر تفکیک شدند. برای نمونه، جدایه های کرمانشـاه توسط همه آغازگرهای تصادفی (بجز آغازگر P14 و OPA04) کنار جدایـه هـای خوزسـتان دسـته بندی شدند، که ممکن است بیانگر منشـا گـرفتن برخی از جدایه های کرمانشاه از خوزسـتان و یـا بالعکس باشد. با استفاده از آغازگر R28 در سطح تشابه 48 درصد، سه جدایه از اردبیل کنـار یـک جدایه از گلستان دسته بندی شـد. همچنـین سـه جدایه اردبیل همگی در یک گـروه قـرار گرفتنـد. با استفاده از آغـازگر RC09 در سـطح تشـابه 48 درصد، دو جدایه از اردبیل با دو جدایه از گلستان در یک گروه حاوی دو زیر گروه قرار گرفتند. بـا استفاده از آغازگر P14 در سطح تشابه 76 درصد، جدایه های کرمانشـاه در یـک گـروه مجـزا قـرار گرفتند و یک جدایه از اردبیل کنـار دو جدایـه از گلستان دسته بندی شدند. بـا آغـازگر RothA14 در سطح 52 درصد دو جدایه از گلستان در کنـار دو جدایـه از اردبیـل دسـته بنـدی شـدند. نتـایج حاصل از ترکیب شش آغازگر تصادفی با استفاده

از نشانگر RAPD در سطح تشابه 35 درصد، جدایه ها را به 8 گروه تقسیم نمود، که این بیانگر تنوع بالای میان جدایه ها می باشد. وجود تنوع بالا در میان جدایه ها، با نتایج پژوهش مک دونالد و همکاران (McDonald *et al*., 1999, 1998) و لیند و همکاران (Linde *et al*., 2002)، که از نشانگر RFLP استفاده کرده بودند، مطابقت داشت. همچنین بالاترین تنوع بین جدایه های مناطق شمالی (استان های گلستان و اردبیل) ملاحظه شد. نتایج نشان داد، آغازگرهای OPA04 و RCO9 بیشترین باند چند شکل (25) را تولید نمودند و از 751 باند حاصل از RAPD، 98/66 درصد چند شکل بودند. رضوی و هیوز (Razavi and Hughes, 2003) نیز با بررسی 90 جدایه *M. graminicola* و با استفاده از 15 آغازگر تصادفی RAPD نشان دادند که آغازگر UBC757 بیشترین باند چند شکل (13) را تولید نمود و از 131 باند حاصل از RAPD، 96 درصد چند شکل بودند. همچنین تجزیه خوشه ای نشان داد که ماکزیمم تشابه بین جدایه ها 81 درصد بود که این نتایج توسط بوگر و همکاران (Boeger *et al*., 1993)، چن و مک دونالد (Chen and McDonald, 1996)، لیند و همکاران (Linde *et al*., 2002) و ژان و همکاران (Zhan *et al*., 2001) نیز به دست آمد. همچنین میزان بالای چند شکلی و نتایج تجزیه خوشه ای نشان داد که تولید مثل جنسی نقش مهمی در ساختار ژنتیکی *M. graminicola* در غرب کانادا دارد. در این پژوهش سطوح بالایی از نوع ژنتیکی در جمعیت *S. tritici* پدیدار گشت. نتایج بدست آمده از تجزیه خوشه ای همه آغازگرها نتوانست جدایه ها را از لحاظ مناطق جغرافیایی کاملا" تفکیک نمایند ولی در برخی موارد جدایه ها بر اساس محل جمع آوری از یکدیگر تفکیک شدند. درک کنونی ما از میزان تنوع ژنتیکی موجود در این گونه، محدود به بررسی جدایه های در دسترس می باشد. به هر حال کسب اطلاعات دقیق تر از تنوع ژنتیکی این قارچ وابسته به ادامه تحقیق با استفاده از جدایه های بیشتر از مناطق مختلف کشور، و همچنین به کارگیری نشانگرهای مولکولی دقیق و پیشرفته تر می باشد.

منابع

1. Abrinbana M (2010) Genetic analysis on the structure of *Mycosphaerella graminicola* populations and resistance to *Septoria tritici* blotch of wheat in Iran. Ph.D. Thesis. Faculty of agriculture. Tarbiat Modares University.
2. Boeger JM, Chen RS, McDonald BA (1993) Gene flow between geographic populations of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. Phytopathology 83: 1148-1154.

3.Chen RS, McDonald BA (1996) Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. Genetics 142: 1119-1127.
4.Eyal Z, Scharren AL, Prescott JM (1985) Global insights into virulence frequencies of *Mycospharella graminicola*. Phytopathology 75: 1456-1462.
5.Eyal Z, Scharen AL, Prescott JM, Van Ginkel M (1987) The *Septoria* Diseases of wheat. Concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico.
6.Eyal Z (1981) Integrated control of *Septoria* disease of wheat. Plant Dis. 65: 763-769.
7.McDonald BA, Martinez JP (1990) DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates and host cultivars. Phytophathology 86: 200-212.
8.King JE, Cook RJ, Melville SC (1983) A review of *Septoria* diseases of wheat and barley. Annual Applied Biology 103: 345-373.
9.Linde CC, Zhan J, McDonald BA (2002) Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: From lesions to continents. Phytopathology 92: 946-955.
10. Komijani S, Razavi M, Etebarian HR, Mardi M (2008) Study 0n the phylogenetic relationship of *Mycosphaerella graminicola* isolates cause of *Septoria* leaf blotch of wheat in Iran using rep-PCR. Proc. Of the 18th Iranian Plant Protection Congress. Volume II, Aug. 24-27, 2008. Iran, Hamedan. pp. 658.
11. McDonald BA, Zhan J, Varden O, Hogan K, Garton J, Pettway RE (1998) Proceedings of the Long Ashton *Septoria* Conference. In press.
12. McDonald BA, Mundt CC, Zhan J (1999) Population Genetics of *Mycosphaerella graminicola* and *Phaelosphaeria nodorum*. Proceedings of the fifth international *Septoria* workshop.
13. Razavi M, Hughes GR (2004) Molecular variability of *Mycosphaerella graminicola* as detected by RAPD markers. Journal of Phytopathology 152: 543-548.
14. Razavi M, Hughes GR (2003) Pathogenic and molecular variability in a population of *Mycosphaerella graminicola*, cause of *Septoria tritici* leaf blotch of wheat. Ph. D. thesis. Department of plant sciences, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
15. Safaie N, Alizadeh A, Saidi A, Rahimian H, Adam G (1384) Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat head blight. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 171-189.
16. Sharon M, Kuninaga S, Hyakumachi M, Sneh B (2006) The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp.Using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping Mycology Society of Japan. 47: 299-316.
17. Torabi M (1980) Causal organism of wheat *septoriose* and its distribution in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 16: 7-14.
18. Tommerup IC, Barrton JE, Q'Brien PA (1995) Reliability of RAPD fingerprinting of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*. Mycology Research 99: 179- 186.
19. Zhan J, Mundt CC, McDonald BA (2001) Using RFLPs to assess temporal variation and estimate the number of ascospores that initiate epidemics in field population of *Mycosphaerella graminicola*. Phytopathology 91: 1011-1017.

Genetic diversity of Iranian populations of *Septoria tritici* using RAPD analysis

Darestani Farahani M.[1], Safaie N. [1*], Alizadeh A.[1]
[1]Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiyat Modares University,

Abstract

Septoria leaf blotch is one of the most important wheat diseases worldwide including Iran. To study the genetic diversity of Iranian isolates of *Septoria tritici*, the infected samples were collected from Khuzestan, Golestan, Ardebil and Kermanshah provinces. Twenty six out of 88 recovered isolates were selected according to their geographical origins for studying virulence and their genetic diversity using RAPD analysis. Analysis of virulence of disease severity data was statistically significant at 99% confidence level ($p<0.01$). Comparison of the means of disease severity, using Duncan's multiple range test, divided the isolates into five groups. In genetic diversity studies, Six out of 15 random primers were polymorphic and reproducible. Cluster analysis of DNA fingerprint data using UPGMA method and Jaccard's coefficient, divided the isolates into 8 groups at 35% similarity level showing a high genetic diversity among Iranian populations of *S. tritici*. According to number of clusters in which the isolates of each region were placed, the highest genetic diversity belonged to Ardebil. This is the first report on the study of genetic diversity of Iranian populations of *S. tritici*.

Keywords: *Virulence, Genetic diversity, wheat, RAPD-PCR*

* Corresponding Author: Naser Safai Tel: 021-48292288 E-mail: nsafaie@modares.ac.ir