

مطالعه ساختار جمعیت *Pyricularia grisea* جدا شده از برنج بر اساس نشانگر مولکولی rep-PCR و شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی

پرستو مطلبی^{۱*}، محمد جوان نیکخواه^۲، سید محمود اخوت^{۳*} و خلیل بردی فتوحی^۴
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد و استادیار
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۲۷ - تاریخ تصویب: ۸۹/۴/۱)

چکیده

به منظور تعیین تنوع ژنتیکی *Pyricularia grisea* ۳۵ جدایه تک اسپور بر اساس انگشت‌نگاری DNA به روش rep-PCR و شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی در این تحقیق استفاده شدند. جدایه‌ها در سالهای ۱۳۷۶-۱۳۷۸ از خوشه‌های آلوده به بیماری بلاست مزارع برنج استان گیلان جمع‌آوری گردید. برای تعیین تنوع ژنتیکی و شناسایی دودمان‌های کلونی پراکنده در جمعیت قارچ، از دو آغازگر طراحی شده بر اساس توالی نوکلئوتیدهای قطعه ERIC و BOX استفاده گردید. قطعات DNA با طولی بین ۴۰۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز تکثیر شدند. چهار دودمان کلونی در بین جدایه‌ها شناسایی و با حروف A، B، C و D مشخص شدند. دودمان کلونی A با فراوانی حدود ۷۴/۲۸٪ دودمان کلونی غالب را تشکیل داد. برای شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی، جهش یافتگان *nit* در محیط حداقل حاوی ۵٪ کلرات جداسازی و آزمونهای مکمل سازی جهش یافته‌های *nit* در تمام حالات ممکن روی محیط حداقل انجام شد. چهار گروه سازگاری رویشی VCG1، VCG2، VCG3 و VCG4 در بین جدایه‌ها تشخیص داده شد. گروه VCG3 با ۱۴ جدایه، گروه غالب بود. در این تحقیق نشان داده شد که نتایج جدایه‌های به دست آمده از برنج که چهار گروه سازگاری رویشی تشکیل دادند، در تعیین تنوع ژنتیکی به روش مولکولی از یکدیگر با بیش از ۸۰٪ شباهت تفکیک شدند و بیشترین تعداد جدایه‌های VCG3 در دودمان کلونی A قرار داشتند. هر دو روش نشان داد که تنوع ژنتیکی کمی در درون جمعیت قارچ بر روی برنج وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: بلاست برنج، جهش یافتگان *nit*، دودمان کلونی، هاپلوטיפ

مقدمه

تیره گرامینه گزارش شده است (Couch & Kohn, 2002; Farman, 2002; Lumbsch & Huhndorf, 2007; Tredway et al., 2003; Valent, 1997). بلاست، مهمترین بیماری است که توسط *P. grisea* روی برنج در بیشتر مناطق برنجکاری دنیا ایجاد می‌شود

قارچ *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. [تلمورف: *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr یک آسکومیست هتروتالیک است که به عنوان عامل بیماری بلاست برنج و لکه برگ‌های هرز

ساختار جمعیت قارچ *P. grisea* با الگو قرار دادن توالی Pot2 به کمک نشانگر rep-PCR در نقاط مختلف دنیا انجام شده است (Suzuki *et al.*, 2006; Roumen *et al.*, 1997; Prabhu *et al.*, 2002; Piotti *et al.*, 2005; George *et al.*, 1998; Correll *et al.*, 2000) Javan-Nikkhah *et al.* (2004) جدایه‌های قارچ *P. grisea* به دست آمده از برنج را با الگو قرار دادن توالی Pot2 و براساس نشانگر مولکولی rep-PCR مورد بررسی قرار دادند که نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی کم در جدایه‌های *P. grisea* در ایران بود که با نتایج دیگر نقاط دنیا شباهت داشت. Vera Cruz *et al.* (1996) به کمک آغازگرهای طراحی شده از روی توالی DNA تکرار شونده به نام‌های REP، ERIC و BOX در نشانگر rep-PCR استرین‌های عامل بیماری سوختگی باکتریایی برنج^۴ را مورد مطالعه قرار دادند. علاوه بر باکتری‌ها، در سال‌های اخیر از نشانگر rep-PCR به کمک آغازگرهای طراحی شده از روی توالی‌های نوکلئوتیدی فوق در مطالعه تنوع ژنتیکی قارچ‌ها نیز بخوبی استفاده شده است. Jedryczka *et al.* (1999) در لهستان جدایه‌های قارچ *Leptosphaeria maculans* را مورد تجزیه و تحلیل قرار داده و جدایه‌های تولیدکننده توکسین را از جدایه‌هایی که قادر به تولید توکسین نبودند، بر اساس انگشت‌نگاری DNA آنها با نشانگر فوق تفکیک نمودند. MacDonald *et al.* (2000) نیز گونه‌های *Tilletia* را بر اساس انگشت‌نگاری DNA در نشانگر rep-PCR با هم مورد مقایسه قرار دادند و ارتباط فیلوژنتیک آنها را نشان دادند. سازگاری رویشی و تشکیل هتروکاریون در اثر تلاقی میسلیم‌های جدایه‌های سازگار یکی از عوامل بروز تغییر در قارچ‌ها است. گروه‌های سازگاری رویشی^۵، حاصل تشکیل هتروکاریون پایدار در جمعیت قارچ‌ها هستند و هتروکاریون‌ها نتیجه پیوند (آناستوموز) بین هیف‌ها می‌باشند و فقط جدایه‌هایی که دارای آل‌های یکسان در تمام لوکوس‌های *vic*^۶ باشند قادر به تشکیل هتروکاریون پایدار هستند و در یک گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند (Leslie, 1993). Genovesi &

(Ou, 1985). تاکنون چندین روش کنترل برای این بیماری معرفی شده است که یکی از بهترین روش‌ها معرفی ارقام مقاوم برنج به بلاست می‌باشد. اما مدیریت بلاست از طریق اصلاح ارقام مقاوم، به علت شکست مقاومت تحت شرایط مزرعه، موفقیت محدودی داشته است (Ou, 1985; Zeigler, 1998). عوامل متعددی در ایجاد تغییرات ژنتیکی قارچ‌ها دخالت دارند و تحقیقات نشان داده‌اند که قارچ *P. grisea* از نظر ژنتیکی تغییرپذیر است و با تولید نژادهای بیماری‌زای جدید قادر به شکستن مقاومت میزبان در طی چند سال بعد از بوجود آمدن رقم مقاوم است (Hebert, 1971). به همین دلیل شناسایی و طبقه‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های حاصل می‌تواند ابزار مفیدی برای کمک به ایجاد لاین‌های مقاوم در مقابل همه ژنوتیپ‌های قارچ در هر منطقه محسوب گردد.

روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA بر اساس انگشت‌نگاری DNA نیز به خوبی برای مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ به کار رفته و نتایج سودمندی به دست آمده است (Levy *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1999; Kachroo *et al.*, 1994).

اکثر قریب به اتفاق مطالعاتی که برای تجزیه و تحلیل جمعیت قارچ *P. grisea* در نقاط مختلف دنیا انجام شده بر اساس انگشت‌نگاری DNA به کمک نشانگر RFLP بر پایه توالی نوکلئوتیدی تکرار شونده MGR586 به عنوان نشانگر مولکولی بوده است (Zeigler *et al.*, 1998). در نتیجه، معلوم گردید که هر جمعیت قارچ از تعدادی گروه انگشت‌نگاری^۱ تشکیل شده است. هر گروه انگشت‌نگاری توسط Levy *et al.* (1991) اصطلاحاً تحت عنوان یک دودمان کلونی^۲ نامگذاری گردید. George *et al.* (1998) با الگو قرار دادن توالی تکرار شونده Pot2، نشانگر مولکولی rep-PCR^۳ مبتنی بر قطعه DNA تکرار شونده را به عنوان جایگزینی مناسب برای RFLP جهت انگشت‌نگاری DNA جدایه‌های قارچ و تنوع ژنتیکی آنها معرفی کردند. تاکنون چندین مطالعه در زمینه شناخت

4. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
5. Vegetative compatibility groups
6. Vegetative incompatibility

1. Fingerprinting group
2. Clonal lineage
3. Repetitive element-based PCR

P. grisea که طی سالهای ۱۳۷۶-۱۳۷۸ از خوشه‌های آلوده به بیماری بلاست مزارع برنج استان گیلان جمع‌آوری گردیدند و در کلکسیون قارچ‌شناسی بخش بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران نگهداری می‌شوند، استفاده گردید (جدول ۱).

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. grisea* بر اساس rep-PCR

آماده‌سازی میسلیوم و استخراج DNA

جهت تهیه میسلیوم کافی برای استخراج DNA، حلقه‌های میسلیومی چهار تا شش میلی‌متری تهیه و به تعداد چهار حلقه در محیط عصاره مخمر قرار داده شد. برای تهیه‌ی محیط عصاره مخمر، دو گرم عصاره مخمر و ۱۰ گرم دکستروز در یک لیتر آب مقطر حل گردید (Piotti *et al.*, 2005) و پس از قرار دادن چهار حلقه میسلیومی داخل هر ظرف ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری، آنها به مدت پنج تا هفت روز بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای اتاق (دمای ۲۴-۲۸ درجه سلسیوس) قرار گرفتند. برای جداسازی میسلیوم از محیط مایع، از پمپ خلاء و قیف بوختر استفاده شد. در نهایت، شیشه‌های پنی‌سیلین حاوی میسلیوم قارچ در فریزر با دمای ۲۰°C- قرار گرفتند. استخراج DNA بر اساس روش فنل-کلروفرم (Liu *et al.* 2000) انجام گردید.

MaGill (1976) و همچنین Crawford *et al.* (1986) با تلاقی دادن جهش یافتگان^۱ اکسوتروف ایجاد شده در اثر نور ماورای بنفش در قارچ *P. grisea* تعداد نسبتاً زیادی از فنوتیپ‌های نوترکیب را مشاهده کردند و نتیجه گرفتند که ژن‌های *vic* ممکن است در قارچ فعال نبوده و علت اصلی بروز پدیده نوترکیبی را چرخه شبه جنسی^۲ دانستند. در آزمایش‌های دیگری که با استفاده از جهش‌یافتگان اکسوتروف خود به خودی قارچ *P. grisea* انجام گردید، Correll *et al.* (2000) در ایالت آرکانزاس و Javan-Nikkhah (2002) در ایران نتایجی در خصوص فعال بودن ژن‌های *vic* در قارچ *P. grisea* به دست آوردند.

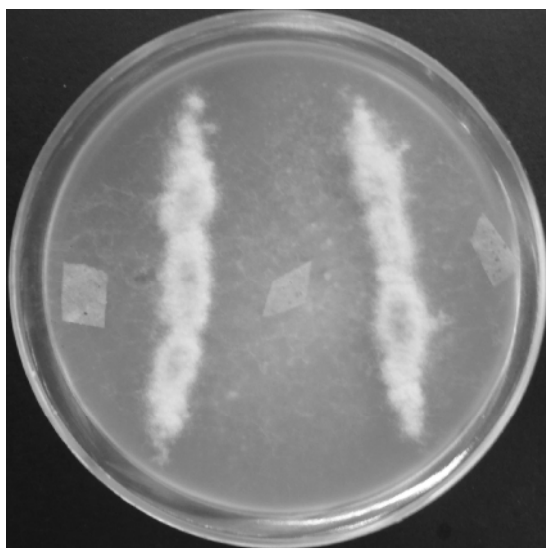
عمده‌ترین اهداف این تحقیق انگشت‌نگاری DNA و شناسایی دودمان‌های کلونی^۳ و شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی در بین جدایه‌های *P. grisea* به دست آمده از برنج بود.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های *P. grisea*

در این تحقیق از ۳۵ جدایه تک اسپور شده قارچ

1. Mutants
2. Parasexualism
3. Clonal lineages



شکل ۱- تشکیل هتروکاریون در اثر تلاقی جدایه Shn1 با جدایه Sht25 (نماینده *P. grisea* در ناحیه تلاقی). جدایه نماینده در وسط و جدایه Shn1 در طرفین قرار دارند. با بروز این فنوتیپ جدایه Shn1 در گروه سازگاری رویشی VCG3 قرار می‌گیرد.

جدول ۱- جدایه‌های قارچ *P. grisea*، رقم برنج، تیپ آمیزشی و گروه‌های سازگاری رویشی در جمعیت آن

ردیف	جدایه	گروه VCG	رقم گیاه برنج	تیپ آمیزشی
۱	Ash8	1	بی‌نام	Mat1-1
۲	Ash9	1	بی‌نام	Mat1-1
۳	Kon6*	1	دم‌زرد	Mat1-1
۴	Lat1	1	بی‌نام	Mat1-1
۵	Sht1	1	هاشمی	Mat1-1
۶	Sht5	1	بی‌نام	—
۷	Sil2	1	بی‌نام	—
۸	Soa1	1	دم سیاه	Mat1-1
۹	Zir1	1	حسن سرای	Mat1-1
۱۰	Mal3	2	بی‌نام	—
۱۱	Phn1	2	دم سیاه	Mat1-1
۱۲	Soa4*	2	بی‌نام	Mat1-1
۱۳	Mal2	3	بی‌نام	Mat1-1
۱۴	Phn4	3	بی‌نام	—
۱۵	Phn6	3	بی‌نام	Mat1-1
۱۶	Rat5	3	بی‌نام	—
۱۷	Rat6	3	بی‌نام	—
۱۸	Rod2	3	طارم	—
۱۹	Shm1	3	طارم	Mat1-1
۲۰	Shn1	3	بی‌نام	Mat1-1
۲۱	Sht2	3	بی‌نام	—
۲۲	Sht25*	3	بی‌نام	—
۲۳	Soa2	3	بی‌نام	Mat1-1
۲۴	To11	3	دم قرمز	Mat1-1
۲۵	Zib1	3	بی‌نام	Mat1-1
۲۶	Zir2	3	حسن سرای	—
۲۷	Lon1	4	حسنی	—
۲۸	Lon2	4	طارم	Mat1-1
۲۹	Mal1	4	بی‌نام	Mat1-1
۳۰	Phn3	4	دم سیاه	Mat1-1
۳۱	Rat3	4	بی‌نام	—
۳۲	Rat11*	4	حسن سرای	—
۳۳	Rat31	4	بی‌نام	—
۳۴	Sht6	4	بی‌نام	Mat1-1
۳۵	Soa3	4	بی‌نام	Mat1-1

* جدایه‌های نماینده (آزمایشگر)

تیپ‌های آمیزشی برای برنج در گذشته توسط برگنیل (۲۰۰۷) تعیین شده است.
- اطلاعات در دسترس نیست.

درب‌دار منتقل شد و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محیط اتاق قرار داده شد. سپس به هر یک از لوله‌ها ۲۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم با pH ۴/۸ اضافه شد و پس از مسدود کردن درب لوله‌ها، محتویات آن توسط ورتکس^۱

درون هاون‌های حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم میسلیم ساییده شده ۱/۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده (۴۰۰ میلی‌مول Tris-HCl با pH ۸، ۶۰ میلی‌مول EDTA با pH ۸، ۱۵۰ میلی‌مول NaCl، یک درصد SDS) اضافه گردید و پس از حل کردن میسلیم ساییده شده درون بافر، این مخلوط به درون لوله‌های پلاستیکی ۱/۵ میلی‌لیتری

1. Vortex

et al., 2000)

ERIC:

1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

2I 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

BOX:

1A-1R5'-CTACGGCAAGGCGACGACGCTGACG-3'

تکثیر DNA در یک ماشین ترموسایکلرمدل Gp001 ساخت شرکت Corbett Research کشور استرالیا انجام گردید (جدول ۲).

برنامه حرارتی واکنش PCR برای آغازگرهای ERIC و BOX در ۳۵ چرخه به صورت: ۹۵ درجه سلسیوس، ۵ دقیقه، یک چرخه؛ ۹۴ درجه سلسیوس، ۳ ثانیه، ۹۲ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه، ۴۹ درجه سلسیوس، یک دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس، ۵ دقیقه؛ ۷۲ درجه سلسیوس، ۱۰ دقیقه، یک چرخه تنظیم گردید. برای مشاهده محصول PCR، الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۲۵٪ انجام گردید. بعد از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، عکسبرداری با استفاده از دستگاه ژل-دایکومنتیشن ساخت شرکت Isogen کشور استرالیا مدل Imago انجام شد و زیر نور ماوراء بنفش از آن عکسبرداری به عمل آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

ابتدا جدایه‌ها بر اساس مشاهده شباهت الگوی DNA روی ژل گروه‌بندی و جدایه‌های مشابه مجدداً روی یک ژل کنار هم الکتروفورز شدند تا شباهت آنها از نظر انگشت‌نگاری DNA تأیید شود و تعداد بندهای یکسان جدایه‌های مشابه معلوم گردد. اندازه هر یک از بندهای DNA برای تمام جدایه‌ها تعیین گردید و تمام قطعات DNA قابل ارزیابی بین ۴۰۰-۲۵۰۰ جفت باز

به مدت چند ثانیه کوتاه، کاملاً مخلوط گردید. محلول حاصل به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. محلول رویی به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر منتقل شد. محلول فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکل به نسبت ۲۵-۲۴-۱ به میزان ۴۰۰ میکرولیتر به هر یک از لوله‌ها اضافه شد و سپس لوله‌ها را با شدت وارونه کرده و تکان داده شد و محلول شیری رنگی حاصل شد. سپس هر یک از لوله‌ها به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، به آهستگی فاز رویی را برداشته و به هر یک هم حجم محلول، کلروفرم خالص اضافه شد و با تکان شدید، محلول شیری رنگی مجدداً حاصل شد. سپس به مدت سه دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ گردید و به محلول رویی هم حجم آن ایزوپروپیل الکل سرد اضافه گردید. لوله‌ها به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰g سانتریفوژ شدند و ته لوله‌ها رسوب سفیدی تشکیل شد. فاز رویی رسوب دور ریخته شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰٪ سرد به آنها اضافه شد و لوله‌ها به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۱۰۰۰g سانتریفوژ گردیدند. پس از خشک شدن DNA و تبخیر الکل، رسوب DNA در ۳۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی‌مول Tris-HCl، یک میلی‌مول EDTA) یا آب دیونیزه استریل حل شد و محلول به دست آمده در دمای ۲۰°C نگهداری شد (Liu *et al.*, 2000).

انگشت‌نگاری DNA بر اساس روش rep-PCR

برای تکثیر قطعات DNA، از دو نوع آغازگر که بر اساس توالی دو قطعه تکرار شونده در ژنوم به نام ERIC و BOX ساخت شرکت MWG-Research کشور آلمان با توالی نوکلئوتیدی زیر استفاده گردید (MacDonald

جدول ۲- مقادیر حجمی هر یک از مواد به کار رفته در ترکیب مخلوط واکنش rep-PCR

غلظت	حجم در یک واکنش (میکرولیتر)	مواد به کار رفته در واکنش
-	۶/۷	آب
-	۲	بافر ۱۰x PCR
۶/۲۵ (میلی مولار)	۲/۵	MgCl ₂
۱ (میلی مولار)	۲	dNTPs
۷/۵ (پیکومولار)	۱/۵	آغازگرها
۲/۵ (واحد)	۰/۵	آنزیم Taq DNA Polymerase
۱/۵٪	۰/۳	DMSO
۵ (نانوگرم)	۳	DNA ژنومی
	۲۰	کل

انکوباتور 25°C نگهداری شدند. قطعاتی که دارای رشد غیرمتراکم بوده و پرگنه گسترده بدون میسلیوم هوایی و یا با میسلیوم هوایی کم به عنوان جهش‌یافتگان *nit X* در نظر گرفته شدند و این جهش‌یافتگان نسبت به منبع ازت اکسوتروف هستند (Correll et al., 1987).

تعیین تیپ فنوتیپی جهش‌یافتگان *nit*

خصوصیات فنوتیپی جهش‌یافتگان *nit* بر اساس ارزیابی نحوه رشد هر یک از آنها روی محیط‌های افتراقی حاوی یکی از چهار منبع ازت شامل محیط غذایی نیترات مذکور در بالا، محیط غذایی نیتريت حاوی محیط غذایی حداقل با 0.2 گرم در لیتر نیتريت سدیم، محیط غذایی هیپوگزانتین حاوی محیط غذایی حداقل با 0.2 گرم در لیتر هیپوگزانتین و در نهایت محیط غذایی آمونیوم حاوی محیط غذایی حداقل با 1 گرم در لیتر تارتارات آمونیوم می‌باشد، ارزیابی گردید و جهش‌یافتگان *nit* در سه گروه فنوتیپی با نام‌های *nit 1* (یک جهش در جایگاه ژنی ساختمانی آنزیم احیاکننده نیترات)، *nit 3* (یک جهش در جایگاه ژنی تنظیمی اختصاصی مسیر مصرف نیترات) و بالاخره *Nit M* (حداقل یک جهش در پنج جایگاه ژنی مؤثر در ساخت کوفاکتور دارای مولبدین که لازمه فعالیت آنزیم احیاءکننده نیترات است) قرار گرفتند (Landschoot & Hoyland, 1992).

تلاقی جهش‌یافتگان *nit* هر جدایه با یکدیگر

پس از تعیین تیپ فنوتیپی جهش‌یافتگان، *nit*‌های به دست آمده از هر جدایه روی محیط حداقل تلاقی داده شدند. به این صورت که حلقه‌های آگار چهار تا پنج میلی‌متری واجد میسلیوم از هر جهش یافته به فاصله دو سانتی‌متر از هم، روی محیط حداقل درون تشتک‌های پتری 8 cm قرار گرفتند و برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. از آنجا که تشکیل هتروکاریون بین *nit 1* و *Nit M* سریع‌تر انجام می‌شود، ترجیحاً تلاقی‌ها به صورت *Nit M* \times *nit 1* گردید و در صورت عدم حضور *Nit M*، بین *nit 1* و *nit 3* و در صورت عدم حضور *nit 1* بین *Nit M* و *nit 3* انجام شد. تشتک‌ها در درون انکوباتور در دمای 25°C در تاریکی به مدت 14 روز نگهداری شدند. در صورت ایجاد تلاقی و رشد پروتوتروف (رشد تیپ وحشی) در محل برخورد میسلیوم‌های جهش‌یافته، آن جدایه به عنوان خودسازگار انتخاب و برای آزمون‌های

تعیین شدند. وجود یا عدم وجود هر یک از بندها به صورت اعداد یک و صفر (یک برای وجود آن و صفر برای عدم وجود آن) در یک سیستم دوتایی برای هر یک از جدایه‌ها تعیین و ثبت گردید و جدول ماتریکس دوتایی برای داده‌ها ایجاد شد و از آن برای ایجاد ماتریکس شباهت بین جدایه‌ها (وقتی تمام جدایه‌ها به صورت دو به دو با هم مقایسه شوند) بر اساس ضریب دایس^۱ استفاده شد (Yap & Nelson, 1996).

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای^۲ به کمک روش UPGMA^۳ در نرم افزار کامپیوتری NTSYSpc-2.02e انجام شد و فنوگرام^۴ رسم گردید.

شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی در جدایه‌های

P. grisea

به منظور جداسازی جهش‌یافتگان *nit*^۵ (فاقد قدرت استفاده از نیترات)، حلقه‌های کوچک آگار واجد میسلیوم به قطر سه تا پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه چهار تا پنج روزه قارچ روی محیط غذایی PDA جدا و به تشتک‌های پتری هشت سانتی‌متری حاوی محیط غذایی حداقل^۶ که 50 گرم در لیتر کلرات پتاسیم (KClO_3) به آن اضافه شده بود، منتقل شدند. ترکیب محیط حداقل به صورت زیر بود (Harp & Correll, 1998):

دکستروز، 10 گرم؛ K_2HPO_4 ، 1 گرم؛ KH_2PO_4 ، 1 گرم؛ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 0.5 گرم؛ $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، 0.1 گرم؛ NaNO_3 ، 2 گرم؛ محلول B-Complex vitamin، 10 میلی‌لیتر؛ محلول Trace element، 0.2 میلی‌لیتر؛ محلول سولفات آهن، 0.2 میلی‌لیتر و یک لیتر آب دیونیزه با هم مخلوط شدند. پس از 14 الی 18 روز در دمای 25°C درون انکوباتور در تاریکی، میسلیوم‌های رشد یافته موسوم به سکتور که از پرگنه اولیه روی محیط حاوی کلرات پتاسیم منشعب شدند و دارای رشد اکسوتروف بودند، از حاشیه پرگنه جدا گردیدند و به محیط حداقل منتقل و به مدت یک هفته در شرایط

1. Dice's coefficient
2. Cluster analysis
3. Unweighted pair group method with arithmetic average
4. Phenogram
5. Nitrate non-utilizing
6. Minimal medium

نتایج

شناسایی دودمان‌های کلونی و هاپلوتیپ‌های آنها با ارزیابی الگوی DNA جدایه‌ها روی ژل و مقایسه مشاهده‌ای آنها (شکل ۲)، تشکیل ماتریکس شباهت با استفاده از ضریب دایس، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای، چهار گروه انگشت‌نگاری DNA یا دودمان کلونی در بین ۳۵ جدایه تعیین گردید (شکل ۳). این نتیجه از تجزیه و تحلیل ۴۵ قطعه DNA تکثیر شده به طول ۴۰۰-۲۵۰۰ جفت باز در جدایه‌های مختلف به دست آمد. تجزیه کلاستر با استفاده از هاپلوتیپ‌ها^۴ انجام و در دندروگرام حاصل چهار کلاستر مشخص گردید که هر یک نشان‌دهنده یک گروه انگشت‌نگاری بود. برای تعریف هر گروه انگشت‌نگاری سطح شباهت ۸۰٪ در الگوی DNA معیار قرار گرفت. به این ترتیب بر اساس تعریف Levy *et al.* (1991, 1993) هر یک از گروه‌های انگشت‌نگاری یک دودمان کلونی محسوب و با حروف A، B، C و D مشخص شدند. در هر یک از دودمان‌های کلونی به ترتیب ۱۶، ۷، ۱ و ۱ هاپلوتیپ شناسایی گردید. هر هاپلوتیپ شامل مجموعه‌ای از جدایه‌ها است که ۱۰۰٪ با هم شباهت داشته باشند. علاوه بر

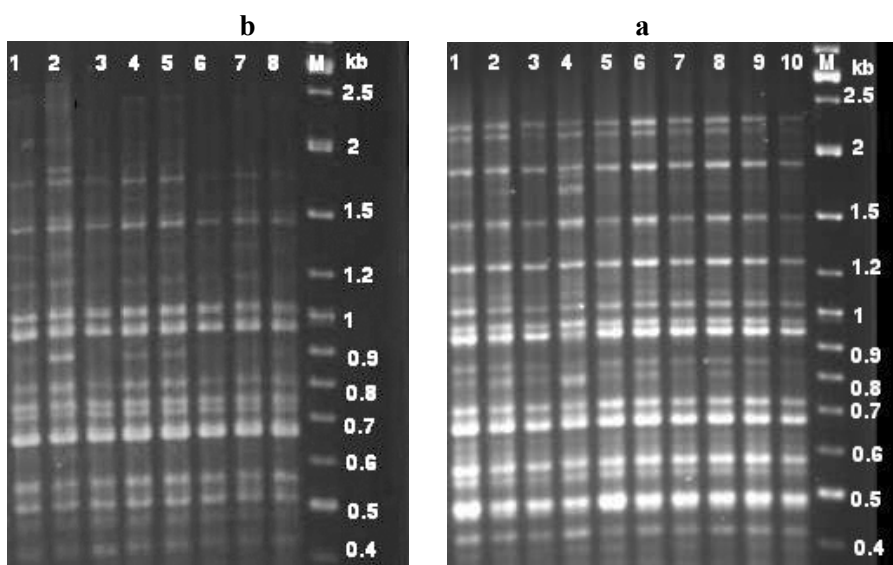
مکمل‌سازی^۱ نگهداری شد و در صورت عدم رشد پروتوتروف، آن جدایه به عنوان خودناسازگار^۲ انتخاب و از آزمون‌های مکمل‌سازی حذف گردید.

تعیین گروه‌های سازگاری رویشی (VCGs)

در این مرحله جهش‌یافتگان *nit* تهیه شده از جدایه‌های مختلف برنج همانند روش قبل روی محیط حداقل درون تشتک‌های پتری هشت سانتی‌متری با هم تلاقی داده شدند. در اینجا نیز ترجیحاً تلاقی‌ها بین *nit M* از یک جدایه با *nit 1* از جدایه دیگر انجام شد و در صورت عدم حضور *nit M*، بین سایر *nit* ها تلاقی‌ها صورت گرفت. فرآیند به هم رسیدن میسلیموم‌ها و تشکیل هتروکاریون به طور روزانه تا ۱۸ روز ارزیابی گردید. جدایه‌هایی که جهش‌یافتگان *nit* آنها قادر به تشکیل هتروکاریون و رشد پروتوتروف در ناحیه تلاقی میسلیموم‌ها بود، در یک گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند برای این منظور برای هر گروه سازگاری یک جدایه نماینده^۳ انتخاب گردید. جدایه نماینده جدایه‌ای بود که بیشترین تلاقی را با سایر جدایه‌های هر گروه انجام داد. هر آزمایش تلاقی سه مرتبه تکرار گردید.

1. Complementary tests
2. Heterokaryon Self-Incompatible
3. Tester

4. Haplotypes

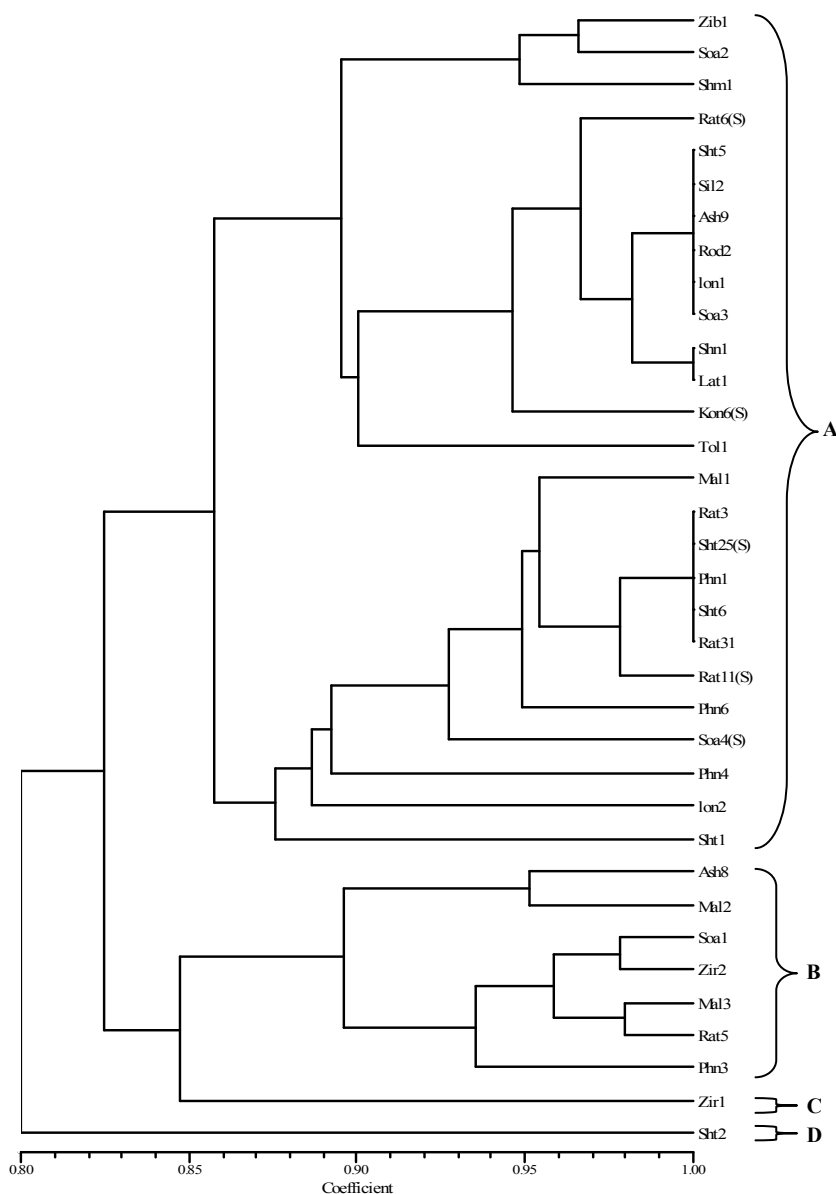


شکل ۲- الگوی DNA تکثیر شده به روش rep-PCR برای جدایه‌های *P. grisea* جدا شده از برنج روی ژل آغاز ۱/۲۵ درصد. (a) با استفاده از آغازگر ERIC که در آن تنها شماره ۴ جدایه Sht2 است که در دودمان کلونی D قرار گرفت و با ۸۰٪ ضریب تشابه از سایر دودمان‌ها تفکیک شد. (b) با استفاده از آغازگر BOX که در آن شماره ۲ مربوط به جدایه Sht2 است. حرف M در بالای شکل‌ها بیان‌کننده نشانگر اندازه قطعه DNA است و اعداد در حاشیه نشان‌دهنده اندازه قطعات DNA به صورت کیلوباز (kb)

جدول ۳- گروه بندی جدایه های *Pyricularia grisea* روی برنج در گروه های سازگاری رویشی (VCG) و وضعیت پراکندگی آنها در دودمان های کلونی چهار گانه

گروه* VCG	تعداد جدایه	تعداد جدایه در دودمان های کلونی چهار گانه**				فراوانی (%)
		A	B	C	D	
VCG1	۹	۶	۲	۱	—	۲۵/۷۱
VCG2	۳	۲	۱	—	—	۸/۵۸
VCG3	۱۴	۱۰	۳	—	۱	۴۰
VCG4	۹	۸	۱	—	—	۲۵/۷۱
جمع	۳۵	۲۶	۷	۱	۱	۱۰۰

* اسم هر گروه سازگار رویشی به روش آزادانه با یک شماره همراه شده است.
 ** دودمان های کلونی در همین تحقیق بر اساس نشانگر مولکولی rep-PCR شناسایی شده اند.



شکل ۳- فنوگرام ایجاد شده بر اساس روش UPGMA در نرم افزار کامپیوتری NTSYS PC-2.02e برای ۳۵ جدایه فارچ *P. grisea* جدا شده از برنج که نشان دهنده چهار دودمان شناسایی شده به روش rep-PCR با استفاده از دو آغازگر ERIC و BOX می باشد. این دندروگرام با تجزیه و تحلیل ماتریس دوتایی که با مقایسه الگوی DNA تکثیر شده جدایه های فوق به دست آمده بود، ایجاد گردید. هر کلاستر شامل جدایه هایی با $\geq 80\%$ شباهت در الگوی DNA است که یک دودمان کلونی نامیده می شود.

تشابه حدود ۸۲٪ از دودمان کلونی A و با ضریب تشابه حدود ۸۵٪ از دودمان کلونی C تفکیک شد.

دودمان‌های کلونی C و D: این دودمان‌ها جمعیت بسیار کوچکی را در بین جدایه‌های به دست آمده از برنج تشکیل و هر یک با دارا بودن فراوانی ۲/۸۶٪ در مجموع ۵/۷۲٪ از کل ۳۵ جدایه را به خود اختصاص دادند (جدول ۴). در دودمان C و D هر یک به ترتیب یک هاپلوتیپ مشخص شناسایی گردید. دو دودمان کلونی C و D از یکدیگر با ضریب تشابه ۸۰٪ تفکیک شدند. به طوری که دودمان کلونی D از سایر دودمان‌های شناسایی شده با ۸۰٪ ضریب تشابه جدا گردید.

تمامی ۳۴ جدایه به دست آمده از برنج در سه دودمان کلونی A، B و C بیش از ۸۵٪ از جهت الگوی DNA تکثیر شده به هم شباهت داشتند. تنها دودمان کلونی D با جدایه Sht2 با ۸۰٪ ضریب تشابه از سایر دودمان‌ها تفکیک شد.

ارزیابی فنوتیپ جهش‌یافتگان *nit*

بر اساس نحوه رشد جهش‌یافتگان روی محیط‌های افتراقی نیتروژن‌دار، از ۳۵ جدایه به دست آمده از برنج به ترتیب ۴۳/۳۳ درصد از جهش‌یافتگان از نوع *nit 1* و ۱۵ درصد از نوع *nit 3* و ۴۱/۶۷ درصد از نوع *Nit M* بودند.

تمامی جدایه‌ها به دلیل تشکیل هتروکاریون به عنوان جدایه‌های خود سازگار شناسایی شدند. برای ۳۵ جدایه، جهش یافته هر جدایه با جهش یافته سایر جدایه‌ها تلاقی داده شد و بعد از ۱۸ روز هتروکاریون تشکیل شده به طور واضح قابل ارزیابی بود (شکل ۱). جدایه‌ها در چهار گروه سازگاری رویشی شامل VCG1، VCG2، VCG3 و VCG4 قرار گرفتند (جدول ۱). در این میان، چهار جدایه که دارای تلاقی بیشتر با سایر

آن، جدول ۳ پراکندگی جدایه‌های گروه‌های سازگاری رویشی را در چهار دودمان کلونی نشان می‌دهد که در آن اکثریت جدایه‌های VCG3 در دودمان کلونی A قرار گرفتند.

فراوانی دودمان‌های کلونی

فراوانی جدایه‌های قارچ *P. grisea* در هر یک از چهار دودمان شناسایی شده در جدول ۴ آمده است.

دودمان کلونی A: این دودمان با دارا بودن حدود ۷۴/۲۸٪ از ۳۵ جدایه آزمایش شده بزرگترین دودمان را از نظر فراوانی در بین جدایه‌های به دست آمده از برنج تشکیل داد (جدول ۴). این دودمان بیشترین تنوع هاپلوتیپ‌ها را در بین سایر دودمان‌های شناسایی شده نشان داد، به طوری که ۱۶ هاپلوتیپ مشخص در بین جدایه‌های آن شناسایی شدند. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده، کلاستر بزرگ متعلق به این دودمان است. جدایه‌های این دودمان کلونی شامل ۱۰ جدایه از VCG3، ۸ جدایه از VCG4، ۶ جدایه از VCG1 و ۲ جدایه از VCG2 می‌باشد. هاپلوتیپ A₅ در این دودمان غالب بود که شش جدایه برنج را شامل می‌شد. دو هاپلوتیپ A₆ و A₁₀ به ترتیب هر یک دارای دو عضو و ۵ عضو و سایر هاپلوتیپ‌ها تک عضوی بودند.

دودمان کلونی B: این دودمان از نظر فراوانی بعد از دودمان A قرار گرفت و دارای ۷ جدایه بود و ۷ هاپلوتیپ مشخص در آن شناسایی شد. در بین ۳۵ جدایه، حدود ۲۰٪ از جدایه‌ها در این دودمان کلونی قرار گرفتند (جدول ۴).

هاپلوتیپ‌های شناسایی شده در این دودمان ۲، ۱، ۳ و ۱ به ترتیب از VCG1، VCG2، VCG3 و VCG4 بودند. با توجه به نتایج، این دودمان کلونی با حدود ۹۰ درصد شباهت ژنتیکی به دو زیر خوشه تفکیک شد که دارای ۲ و ۵ عضو شدند (شکل ۳). این دودمان با ضریب

جدول ۴- فراوانی جدایه‌های قارچ *P. grisea* به دست آمده از برنج در هر یک از چهار دودمان کلونی

شناسایی شده بین ۳۵ جدایه در ارزیابی نهایی با استفاده از دو آغازگر ERIC و BOX

دودمان کلونی	تعداد جدایه	فراوانی جدایه‌ها (%)	تعداد هاپلوتیپ‌های شناسایی شده
A	۲۶	۷۴/۲۸	۱۶
B	۷	۲۰	۷
C	۱	۲/۸۶	۱
D	۱	۲/۸۶	۱

(2000) علل مشابهی را برای عدم تنوع ژنتیکی زیاد قارچ در ایالت آرکانزاس بیان کرده‌اند. نتیجه حاصل بیانگر آنست که در کل میزان تنوع ژنتیکی قارچ نسبتاً کم است و با نتایج بررسی جدایه‌های قارچ *P. grisea* که در نقاط مختلف دنیا انجام شده (Suzuki *et al.*, 2006; Roumen *et al.*, 1997; Prabhu *et al.*, 2002; Piotti *et al.*, 2005; George *et al.*, 1998; Correll *et al.*, 2000) مشابهت دارد. در ایران، Javan-Nikkhah *et al.* (2004) جدایه‌های قارچ *P. grisea* به دست آمده از برنج را با الگو قرار دادن توالی Pot2 و براساس نشانگر مولکولی rep-PCR مورد بررسی قرار دادند که نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی کم در جدایه‌های *P. grisea* در ایران بود و با نتایج این تحقیق شباهت داشت. در مورد گروه‌های سازگاری رویشی به نظر می‌رسد تحول چندانی در آل‌های لوکوس *vic* جدایه‌های به دست آمده از برنج رخ نداده است و همانطور که مشاهده گردید در گروه VCG3 که گروه سازگاری رویشی غالب هم شناسایی گردید، تعداد زیادی از جدایه‌های به دست آمده از برنج قرار گرفتند. تنوع ژنتیکی کم درون جمعیت قارچ در روی برنج در این تحقیق می‌تواند در تأیید نتایج حاصل از تعداد کم گروه‌های سازگاری رویشی در خصوص وجود تکثیر غیرجنسی جدایه‌ها و احتمال کم یا فقدان تولیدمثل جنسی باشد. به طوری که حدود ۷۴/۲۸٪ از کل جدایه‌های جمع‌آوری شده فقط متعلق به دودمان کلونی A بود. در این تحقیق تنها یک جدایه Sht2 از سایر جدایه‌های به دست آمده از برنج متمایز گردید، به طوری که در گروه‌های سازگاری رویشی با سایر جدایه‌ها قرار گرفت ولی در انگشت‌نگاری DNA با حدود ۸۰ درصد شباهت ژنتیکی دودمان کلونی D را به خود اختصاص داد و از سایر جدایه‌ها تفکیک شد.

در این تحقیق به کمک محیط غذایی حاوی کلرات (کلرات پتاسیم) که جدایه‌های مقاوم به کلرات را از جدایه‌های حساس جدا می‌کرد، جدایه‌های جهش‌یافته‌ای که فاقد قدرت استفاده از منبع نیترات بودند، در ۳۵ جدایه *P. grisea* جدا شده از برنج به دست آمدند. در این میان VCG3 با ۱۴ جدایه که جدایه Sht25 به عنوان جدایه نماینده در این گروه

جدایه‌ها بودند و قادر بودند با بیشتر جهش یافتگان جدایه‌ها هتروکاریون تشکیل دهند به عنوان جدایه‌های نماینده جهت تعیین گروه‌های سازگاری رویشی انتخاب شدند. جدایه Sht25 همراه با ۱۳ جدایه بزرگترین گروه سازگاری رویشی را در برنج تشکیل دادند و به عنوان جدایه نماینده در VCG3 قرار گرفت. جدایه‌های Kon6 و Rat11 به عنوان جدایه‌های نماینده هر کدام همراه با هشت جدایه به ترتیب در VCG1 و VCG4 قرار داده شدند. در نهایت جدایه Soa4 به عنوان جدایه نماینده همراه با دو جدایه شامل Mal3 و Phn1 در VCG2 قرار گرفت. گروه VCG3 در بین جدایه‌های حاصل از برنج بیشترین فراوانی را نشان داد.

بحث

تحقیقات متعددی در مورد تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ *P. grisea* در نقاط مختلف دنیا و بخصوص کشورهای برنج‌خیز انجام شده است. با پیشرفت تکنولوژی مولکولی و امکان مطالعه دقیق ساختار ژنتیکی در قارچ‌ها و انواع میکروارگانیزم‌ها، زمینه‌های لازم برای شناسایی تنوع ژنتیکی در درون افراد یک گونه به خوبی فراهم شده است. انگشت‌نگاری DNA جدایه‌های قارچ *P. grisea* از اوایل دهه ۹۰ آغاز گردید (Levy *et al.*, 1991)، و امکان مقایسه جدایه‌های قارچ را در سطح DNA و گروه‌بندی آنها در گروه‌های ژنتیکی مشابه ایجاد نمود. در این تحقیق از نشانگر مولکولی rep-PCR با استفاده از آغازگرهای ERIC و BOX به منظور انگشت‌نگاری DNA جدایه‌های قارچ *M. grisea* به دست آمده از برنج و تعیین تنوع ژنتیکی آنها استفاده گردید. با استفاده از این نشانگر تفاوت عمده‌ای بین جدایه‌های حاصل از برنج مشاهده نشد و تمامی ۳۵ جدایه مورد آزمایش با بیش از ۸۵٪ شباهت در الگوی DNA تکثیر شده در چهار دودمان کلونی قرار گرفتند. دلیل کم بودن تنوع ژنتیکی مشاهده شده در گیلان را می‌توان در چند عامل جستجو کرد. کوتاه بودن فصل زراعی یکی از عواملی است که فرصت کافی برای بروز تغییرات ژنتیکی در قارچ را فراهم نمی‌آورد. احتمالاً عدم بروز تولیدمثل جنسی در جمعیت و تکثیر کلونال قارچ نیز یکی دیگر از عوامل تنوع کم است. Xia *et al.*

آزمایش، آزمایش Correll *et al.* (2000) و همچنین Javan-Nikkhah (2002) در خصوص فعال بودن ژنهای *vic* با تکیه به فرضیه‌ای می‌توان به این ترتیب توضیح داد که ممکن است تمام جدایه‌هایی که Genovesi & MaGill (1976) و Crawford *et al.* (1986) به کار بردند متعلق به یک گروه VCG باشند و لذا آنها نتوانستند درباره وجود موانع سازگاری رویشی در آن جدایه‌ها به نتیجه مشخص برسند. از طرف دیگر شاید تفاوت اصلاً به خود جهش‌یافتگان مربوط باشد. در آزمایش آنها از جهش‌یافتگان اکسوتروف ایجاد شده با اشعه ماوراء بنفش استفاده شد در حالی که در این آزمایش از جهش‌یافتگان اکسوتروف خودبخودی استفاده گردید. لذا ممکن است که اشعه ماوراء بنفش که در مطالعات آنها برای ایجاد جهش‌یافتگان در جدایه‌های *P. grisea* به کار رفته بجای تأثیر روی ژنهای بخصوص که برای تجزیه منبع غذایی فعال می‌شوند، روی لوکوس‌هایی که مربوط به موانع سازگاری رویشی در قارچ هستند، تأثیر گذاشته باشند. البته این در حد یک فرضیه است و باید بررسی شود.

سپاسگزاری

هزینه انجام این تحقیق با استفاده از اعتبارات معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران تأمین شده است. این تحقیق در آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شده است.

سازگاری رویشی تعیین شد، گروه غالب را تشکیل داد. در هر صورت ۳۵ جدایه آزمایش شده به طور مشخص در چهار گروه VCG قرار گرفتند. تعداد کم گروه‌های سازگاری رویشی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی کم در این جدایه‌ها می‌باشد. تعدادی از جدایه‌های به دست آمده از برنج دارای تیپ آمیزشی Mat 1-1 می‌باشند و در تعدادی هم تیپ آمیزشی مشخص نیست (Barnil, 2007)، اما وجود این آلل‌های تیپ آمیزشی نمی‌تواند منجر به تولیدمثل جنسی شود، زیرا وجود دو تیپ آمیزشی سازگار در جمعیت ضروری می‌باشد، در حالی که نر بارور بودن جدایه‌های بررسی شده (Barnil, 2007) احتمال وقوع تولیدمثل جنسی بین جدایه‌ها را غیرممکن می‌سازد و نتیجه آن تنوع ژنتیکی کم در جدایه‌ها و تعیین تعداد گروه‌های سازگاری رویشی محدود و معینی شد (Turgeon *et al.*, 1993). نتایج آزمایشات Genovesi & MaGill (1976) و Crawford *et al.* (1986) موانع سازگاری رویشی (ژنهای *vic*) در قارچ *P. grisea* را غیر فعال نشان داد. در حالی که در این آزمایش معلوم گردید این موانع به طور قوی در جمعیت قارچ فعال هستند و نتایج به دست آمده با نتایجی که Correll *et al.* (2000) در آزمایشی روی مجموعه‌ای از جدایه‌های جمع‌آوری شده قارچ در ایالت آرکانزاس و همچنین Javan-Nikkhah (2002) در ایران روی جمعیت قارچ به دست آورده بودند، مشابهت داشت. تفاوت نتایج قبلی در رابطه با موانع سازگاری رویشی در قارچ *P. grisea* را با نتایج به دست آمده در این

REFERENCES

- Barnil, M. (2007). *Study on population structure of fungus Magnaporthe grisea isolated from Poaceae weeds and determination of distribution of its mating type alleles by PCR*. M.Sc. dissertation. University of Tehran, Tehran, Iran. (In Farsi)
- Correll, J. C., Klittich, C. J. R. & Leslie, J. F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility Tests. *Phytopathology*, 77, 1640-1646.
- Correll, J. C., Harp, T. L., Guerber, J. C., Zeigler, R. S., Liu, B., Cartwright, R. D. & Lee, F. N. (2000). Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Phytopathology*, 90, 1396-1404.
- Couch, B. C. & Kohn, L. M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94, 683-693.
- Crawford, M. S., Chumley, F. G., Weaver, C. G. & Valent, B. (1986). Characterization of the heterokaryotic and vegetative diploid phases of *Magnaporthe grisea*. *Genetics*, 114, 1111-1129.
- Farman, M. L. (2002). *Pyricularia grisea* isolates causing gray leaf spot on perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in the United States: Relationship to *P. grisea* isolates from other host plants. *Phytopathology*, 92, 245-254.
- Genovesi, A. D. & MaGill, C. W. (1976). Heterokaryosis and parasexuality in *Pyricularia oryzae*

- Cavara. *Canadian Journal of Microbiology*, 22, 531-536.
8. George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S. & Leung, H. (1998). Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology*, 88, 223-229.
 9. Harp, T. L. & Correll, J. C. (1998). Recovery and characterization of spontaneous, selenate resistant mutants of *Magnaporthe grisea*, the rice blast pathogen. *Mycologia*, 90, 954-963.
 10. Hebert, T. T. (1971). The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*, 61, 83-87.
 11. Javan-Nikkhah, M. (2002). *Investigation on genetic diversity of populations of Magnaporthe grisea (Hebert) Barr, the rice blast fungus, using molecular, pathogenicity and vegetative compatibility characters in Guilan Province*. Ph.D. dissertation. University of Tehran, Tehran, Iran. (In Farsi).
 12. Javan-Nikkhah, M., McDonald, B. A., Banke, S. & Hedjaroude, G. A. (2004). Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* populations based on rep-PCR fingerprinting. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 909-919.
 13. Jedryczka, M., Rouxel, T. & Balesdent, M. H. (1999). Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 813-823.
 14. Kachroo, P., Leong, S. A. & Chattoo, B. B. (1994). Pot 2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Genetics and Genomes*, 245, 39-348.
 15. Kumar, J., Nelson, R. J. & Zeigler, R. S. (1999). Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. *Genetics*, 152, 971-984.
 16. Landschoot, P. J. & Hoyland, B. F. (1992). Gray leaf spot of perennial ryegrass turf in Pennsylvania. *Plant Disease*, 16, 1280-1282.
 17. Leslie, J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 127-151.
 18. Levy, M., Correa-victoria, F. J., Zeigler, R. S., XU, S. & Hamer, J. E. (1993). Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology*, 83, 1423-1427.
 19. Levy, M., Romao, J., Marchetti, M. A. & Hamer, J. E. (1991). DNA fingerprinting with dispersed repeated sequence resolve pathotype diversity in the rice blast fungus. *The Plant Cell*, 3, 95-102.
 20. Liu, D., Coloe, S., Baird, R. & Pedersen, J. (2000). Rapid Mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 471p.
 21. Lumbsch, H. T. & Huhndorf, S. M. (2007). Outline of Ascomycota. *Myconet*, 13, 1-58.
 22. McDonald, J. G., Wong, E. & White, G. P. (2000). Differentiation of *Tilletia* species by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease*, 84, 1121-1125.
 23. Ou, S. H. (1985). *Rice diseases*. (2nd ed.). Common Wealth Agric, Bureaux.
 24. Padmanabhan, S. Y. (1965a). Breeding for blast resistance in India. In: *the rice blast disease*. (pp. 203-221). Baltimore, Maryland, John Hopkins Press.
 25. Piotti, E., Rigano, M. M., Rodino, D., Rodolfi, M., Castiglione, S., Picco, A. M. & Sala, F. (2005). Genetic Structure of *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. isolates from Italian Paddy Fields. *Journal of Phytopathology*, 153, 80-86.
 26. Prabhu, A. S., Filippi, M. C., Aravjo, L. G. & Faria, J. C. (2002). Genetic and phenotypic characterization of isolates of *Pyricularia grisea* from the rice cultivars Epagri 108 and 109 in the state of Tocantins. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 566-573.
 27. Roumen, E., Levy, M. & Notteghem, J. L. (1997). Characterisation of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 363-371.
 28. Suzuki, F., Arai, M. & Yamaguchi, J. (2006). DNA fingerprinting of *Pyricularia grisea* by rep-PCR using a single primer based on the terminal inverted repeat from either of the transposable elements Pot2 and MGR 586. *Journal of Genetic Plant Pathology*, 72, 314-317.
 29. Tredway, L. P., Stevenson, K. L. & Burpee, L. L. (2003). Mating type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations from turfgrass in Georgia. *Plant Disease*, 87, 435-441.
 30. Turgeon, B. G., Christiansen, S. K. & Yoder, O. C. (1993). Mating type genes in Ascomycetes and their imperfect relatives. In: D.R. Reynolds and J.W. Taylor (Eds.), *the fungal holomorph*. (pp. 199-215). Mitotic meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics.
 31. Valent, B. (1997). The rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. In: G.C. Carroll and Tuzyhski P. (Eds.). *The Mycota*. (pp. 37-54). Springer-Verlag.
 32. Vera Cruz, C. M., Ardales, E. Y., Skinner, D. Z., Talag, J., Nelson, R. J., Louws, F. J., Leung, H., Mew, T. W. & Leach, J. E. (1996). Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analysis. *Phytopathology*, 86, 1352-1359.
 33. Xia, J. O., Correll, J. C., Lee, F. N., Ross, W. J. & Rhoads, D. D. (2000). Regional population diversity of *Pyricularia grisea* in Arkansas and the influence of host selections. *Plant Disease*, 84, 877-884.
 34. Yap, I. V. & Nelson, R. J. (1996). Winboot, a program for performing bootstrap analysis of binary data

- to determine the confidence limits of UPGMA- based dendrogram. IRRI Discussion Paper Series No. 14. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Manila, Philippines.
35. Zeigler, R. S. (1998). Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 249-275.
 36. Zeigler, R. S., Scott, R. P., Leung, H., Bordeos, A. A., Kumar, J. & Nelson, R. J. (1998). Evidence of the parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. *Phytopathology*, 87, 284-294.