مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۳، شماره ۱، ۱۳۹۱ (۶۱-۴۷)

مطالعه تنوع ژنتیکی و وضعیت باروری جنسی در جدایه های قارچ *Magnaporthe grisea* به دست آمده از علف های هرز تیره Poaceae و برنج

مینو برگ نیل[۱]، محمد جوان نیکخواه[۲*]، سید محمود اخوت[۳] و کیوان غضنفری[۴]
۱، ۲، ۳، ۴ دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشیار، استاد و کارشناس گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت؛ ۹۰/۱/۲۴ – تاریخ تصویب؛ ۹۰/۹/۲)

چکیده

تعیین تنوع ژنتیکی قارچ جدا شده از روی علفهای هرز به کمک واکنش PCR که در دانستن نوترکیبی‌های ژنتیکی احتمالی در جمعیت‌های قارچ بسیار مفید خواهد بود، برای اولین بار در ایران انجام شد. جدایه های قارچ *Magnaporthe grisea* جدا شده از روی برخی علف های هرزگرامینه و برنج جهت تعیین تیپ آمیزشی به کمک واکنش PCR و تنوع ژنتیکی به کمک نشانگر RAPD-PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با استفاده از سه آغازگر تصادفی I ، D و H قطعات DNA در ۴۲ جدایه با طول ۲۲۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز تکثیر شدند. با انجام تجزیه خوشه ای و مقایسه داده‌ها بر اساس ضریب شباهت دایس ، چهار دودمان کلونی A، B، C و D با ۲۰ هاپلوتیپ شناسایی شدند. شباهت ۲۰ درصدی دودمان کلونی A شامل جدایه های بدست آمده از *Digitaria* sp. و چند علف هرز نامشخص با دودمان‌های کلونی B ، C و D شامل جدایه های برنج و *Setaria* sp. ، خویشاوندی دور دودمان A را با کلون‌های دیگر نشان می‌دهد. ۴۸ جدایه خالص جهت تعیین تیپ آمیزشی، با هشت جدایه استاندارد هرمافرودیت بارور روی محیط غذایی در آزمایشگاه تلاقی داده شدند. در میان جدایه های *Setaria* sp. و سوروف، *Mat1-1* و در میان جدایه های *Digitaria* sp. ، تیپ آمیزشی *Mat1-2* تیپ آمیزشی غالب بود. تیپ آمیزشی جدایه‌های برنج نیز *Mat1-1* تشخیص داده شد. جدایه‌های علف های هرز خصوصاً جدایه‌های حاصل از*Setaria* sp. دارای باروری بالایی بودند به طوری که جدایه‌های *Setaria* sp. همگی تولید آسکوسپور نمودند. همچنین تیپ آمیزشی ۳۴ جدایه با استفاده از واکنش PCR و بکارگیری دو جفت آغازگر اختصاصی L_1، L_2 ، T_1 و T_2 تعیین شد و نتایج حاصل از آزمایش‌های تلاقی در این تحقیق را تأیید نمود.

واژهای کلیدی: PCR، RAPD-PCR، الل های *Mat*، دودمان کلونی.

مقدمه

بلاست برنج مهمترین بیماری برنج است که در ایران و بسیاری از نقاط دنیا خسارت زیادی را به محصول وارد می‌کند. از بهترین روش‌های مدیریت بیماری کاربرد ارقام مقاوم است ولی دیده شده است که مقاومت پس از چند سال از بین رفته است. قارچ عامل بیماری از نظر ژنتیکی بسیار تغییرپذیر است و ایجاد نژادهای بیماری‌زا و گروههای ژنتیکی جدید می‌نماید که نژادهای بیماری‌زای جدید ممکن است بر مقاومت میزبان غلبه کند و در طی چند سال باعث شکسته شدن مقاومت رقم یا ارقام مقاوم معرفی شده، شود. عوامل متعددی در ایجاد تنوع ژنتیکی و نوترکیبی در قارچ ها دخالت دارند

* نویسنده مسئول: محمد جوان نیکخواه تلفن: ۰۹۱۲۲۶۰۰۷۳۵ E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

که یکی از آن‌ها تولیدمثل جنسی است (Zeigler, 1998). به علت هاپلوئید بودن، برای بروز تولیدمثل جنسی در قارچ‌های هتروتالیک واجد توان تولیدمثلی و تشکیل پریتسیوم و آسکوسپور، به وجود افراد سازگار جنسی در جمعیت قارچ ها که تیپ آمیزشی متفاوت دارند، نیاز می باشد (Leslie & Summerell, 2006; Zeigler, 1998). اصطلاح Mating –type به مفهوم تیپ آمیزشی برای افراد مختلف قارچی بکار می‌رود که سازگاری جنسی داشته باشند و بتوانند با هم آمیزش کنند. تیپ آمیزشی در این قارچ توسط جایگاه ژنی *Mat* کنترل می‌شود که دارای دو آلل *Mat1-1* و *Mat1-2* می‌باشد (Metzenberg & Glass, 1990). لازمه بروز تولیدمثل جنسی موفقیت‌آمیز که منتهی به تشکیل پریتسیوم و آسکوسپورها گردد اینست که دو فرد که هر یک دارای یکی از آلل‌های فوق باشند با هم تماس پیدا کنند. در صورت وجود دو نوع تیپ آمیزشی با فراوانی بیشتر و با نسبتهای نزدیکتر در جمعیت قارچ امکان وقوع تولیدمثل جنسی افزایش می‌یابد. البته تاکنون تشکیل پریتسیوم *M. grisea* در طبیعت مشاهده نشده است. قارچ (anamorph: *Magnaporthe Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.) *grisea* (Hebert) Barr علاوه بر برنج از بیش از ۵۰ گونه از گیاهان تیره Poaceae نیز جداسازی شده است (Ou, 1985). بطور مثال *Cenchrus echinatus*، *Cynodon dactylon*، *Eragrostis* sp. و *Cyperus brevifolius* اولین بار توسط Borromeo *et al*. (1993) به عنوان میزبان های این قارچ شناخته شدند. اولین گزارش از وجود *Pyricularia grisea* روی گیاه *Lolium perenne* (Perennial ryegrass) از پنسیلوانیا در سال ۱۹۹۲ بود (LandSchoot & Hoyland, 1992). با بررسی تیپ‌های آمیزشی در جمعیت قارچ آلوده کننده علفهای هرز، امکان تلاقی بین جدایه‌های حاصل از علفهای هرز با هم و با جدایه‌های آلوده کننده برنج و بروز نوترکیبی جنسی و افزایش تنوع ژنتیکی مشخص می‌شود. Viji & Uddin (2002) ۳۱۲ جدایه بیمارگر گیاه *Lolium perenne* و ۶۲ جدایه بیمارگر گیاه *Stenotaphrum secundatum* را با جدایه‌های استاندارد تلاقی دادند. از ۳۱۲ جدایه آلوده کننده *L. perenne*، ۱۳۹ جدایه پریتسیوم تشکیل دادند و تمام جدایه‌ها نر بارور و دارای تیپ آمیزشی *Mat1-2* بودند. از ۶۲ جدایه *S. secundatum*، ۱۹ جدایه در تلاقی با جدایه‌های استاندارد پریتسیوم تشکیل دادند که از بین آنها ۱۵ جدایه دارای تیپ آمیزشی *Mat1-1* و چهار جدایه دارای تیپ آمیزشی *Mat1-2* بودند.

Metzenberg & Glass (1990) اصطلاح ایدیومورف (Idiomorph) را برای تعیین فرم‌های متناظر یک جایگاه ژنی که موقعیت کروموزومی یکسانی را اشغال کرده‌اند اما شباهتی در توالی بازهای DNA و پروتئین‌های کد شده توسط آنها وجود ندارد، پیشنهاد کردند. همچنین این ایدیومورف‌ها ممکن است دارای اندازه‌های متفاوت و یا شامل بیش از یک ژن باشد (Turgeon *et al*., 1993).

Couch & Kohn (2002) با انجام PCR-RFLP در ناحیه ژن های اکتین، بتا-توبولین و کالمودولین در مورد چندین جدایه *M. grisea* جمع‌آوری شده از میزبان های مختلف و مقایسه آنها پیشنهاد کردند این گونه شامل دو گونه متفاوت *M. grisea* و *M. oryzae* می باشند. آنها *M. grisea* را در مورد جدایه‌های مربوط به *Digitaria* sp. و *M. oryzae* را در مورد جدایه های مربوط به برنج و سایر گرامینه های کشت شده در نظر گرفتند. آنها نشان دادند که جدایه‌های مربوط به *Digitaria* sp. از جدایه‌های مربوط به برنج، *Lolium perenne*، *Setaria* sp.، *Eleusine coracana*، *Eragrostis curvula* متمایز می‌باشند. Rathour *et al*. (2004) با انگشت نگاری به روش RAPD با استفاده از ۵ آغازگر تصادفی، تنوع ژنتیکی وسیعی را در بین ۴۸ جدایه قارچ *M. grisea* که از مناطق برنج کاری منطقه هیمالیای شمال غربی هند جداسازی شده بودند، مشاهده نمودند.

Shivayogi *et al*. (2002) با استفاده از ۳۰ آغازگر تصادفی، ۲۷ جدایه قارچ *M. grisea* را انگشت نگاری کرده، آنها را در سه دودمان کلونی قرار دادند. در ایران Javan-Nikkhah (2002) ۲۲۱ جدایه تک اسپور شده قارچ *M. grisea* را که از دو استان گیلان و مازندران جمع‌آوری شده بودند، بر اساس انگشت‌نگاری DNA به کمک نشانگر rep-PCR و بر اساس تجزیه کلاستر، این جدایه‌ها را به پنج گروه انگشت‌نگاری تفکیک نمود. به علت عدم وجود اطلاعات کامل در زمینه وضعیت جنسی

قارچ جدا شده از علفهای هرز در شمال کشور مطالعه این موضوع ضروری به نظر می‌رسد. نتایج بدست آمده از این تحقیق اطلاعات جدیدی را در مورد ساختار ژنتیکی قارچ روی علف های هرز به ما می‌دهد. در صورت تلاقی جدایه‌های برنج با جدایه‌های علف‌های هرز، با دانستن ساختار ژنتیکی جدایه‌های علفهای هرز و همچنین ساختار ژنتیکی جدایه‌های برنج در هر منطقه می‌توان نوترکیبی‌های ژنتیکی ایجاد شده احتمالی را تعیین و بررسی نمود و با استفاده از این اطلاعات، ارقام مقاوم پایدار در برابر نوترکیبی‌های ژنتیکی ایجاد شده در قارچ را در هر منطقه تولید، معرفی و عرضه کرد. همچنین در صورت وجود تفاوت ژنتیکی بین جدایه‌های جدا شده از برنج و جدایه های بدست آمده از میزبان‌های غیربرنج می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های حاصل از میزبان‌های غیربرنج نمی‌توانند به برنج حمله کنند و اپیدمی بوجود آورند و میزبان غیربرنج، میزبان تناوبی این قارچ محسوب نخواهد شد.

هدف از این تحقیق آن است که ساختار جمعیت قارچ *M. grisea* روی علفهای هرز توسط نشانگر RAPD-PCR تعیین گردد و ساختار جمعیت جدایه‌های این قارچ حاصل از علف‌های هرز مختلف با هم و با برنج مقایسه گردد و میزان شباهت و تفاوت ژنتیکی آنها مشخص شود تا امکان تلاقی بین جدایه‌های علفهای هرز با هم و با برنج را پیش‌بینی نمود. همچنین تعیین پراکنش آلل‌های تیپ آمیزشی با انجام تلاقی‌ها بین جدایه‌های علف های هرز و جدایه‌های استاندارد و همچنین به کمک واکنش PCR مدنظر است تا به کمک آن امکان تلاقی بین جدایه‌های علف های هرز با هم و با جدایه‌های برنج و نوترکیبی ژنتیکی حاصل از تولیدمثل جنسی مشخص شود و از طریق تلاقی جدایه‌های علف‌های هرز با جدایه‌های استاندارد وضعیت باروری جدایه‌های علف‌های هرز بررسی شود.

مواد و روش ها

جداسازی و نگهداری جدایه‌ها

در ایران مهمترین مناطق کشت برنج در درجه اول استانهای گیلان و مازندران هستند که حدود ۸۰٪ از محصول برنج کشور در این دو استان کشت می شود (Javan-Nikkhah, 1996).

۴۸ جدایه *M. grisea* (جدول ۱) از برگهای آلوده برنج، کراب گراس (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop)، سه تاریا (*Setaria* sp.(L.) P-Beauv.)، سوروف (*Echinochloa colonum* (L.) Link) و چندین علف هرز نامشخص واجد نشانه های بیماری از مزارع مختلف استان های گیلان و مازندران جمع‌آوری شدند. برای جداسازی جدایه‌ها، قطعات برگی آلوده به مدت ۱۵ دقیقه زیر آب شیر برای شستشوی سطحی قرار داده شدند.

سپس به مدت یک دقیقه جهت ضدعفونی سطحی در محلول هیپوکلریت رقیق شده ۱۰ درصد (۰/۵ درصد کلر فعال)، سپس جهت زدودن محلول هیپوکلریت سدیم درون آب مقطر سترون قرار گرفتند.

نمونه‌های ضدعفونی شده روی کاغذ خشک کن سترون خشک گردیدند و سپس درون تشتک‌های پتری روی محیط کشت آب آگار ۱/۵ درصد و به مدت سه تا پنج روز در دمای ۲۵ ˚C -۲۶ ˚C زیر نور دایم فلورسنت قرار داده شدند.

در صورت تولید کنیدیوم ها روی قطعات برگی، آن قطعات روی محیط آب آگار ۱/۵ درصد روی یک خط کشیده شدند. پس از ۲۴ ساعت،تک کنیدیوم های جوانه زده به تشتک های حاوی محیط کشت سیب زمینی – دکستروز- آگار (PDA) منتقل شدند. سپس جدایه ها روی کاغذ صافی سترون و خشک در دمای ۲۰ ˚C- نگهداری شدند(Javan-Nikkhah, 2002).

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های قارچ *Magnaporthe grisea* بدست آمده از علفهای هرز و برنج مورد آزمایش در این تحقیق

جدایه	میزبان	محل نمونه‌برداری	تاریخ نمونه‌برداری	تیپ آمیزشی
Set 1	***Setaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Set 2	***Setaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Set 3	***Setaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**

ادامه جدول ۱- مشخصات جدایه‌های قارچ *Magnaporthe grisea* بدست آمده از علفهای هرز و برنج مورد آزمایش در این تحقیق

Set 4	***Setaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Set 6	***Setaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Set 7	***Setaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Set 8	***Setaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Set 9	***Setaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Dig 1	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Dig 2	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Dig 4	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۲	***Mat*1-2**
Dig 5	***Digitaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Dig 9	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Dig 10	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Dig 11	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Dig 12	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۲	***Mat*1-2**
Dig 13	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Dig 14	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۲	***Mat*1-2**
Dig 15	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۲	***Mat*1-2**
Dig 16	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۲	***Mat*1-2**
Dig 17	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Dig 18	***Digitaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Dig 19	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۳	نامعین
Dig 20	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۲	***Mat*1-2**
Dig 21	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۲	***Mat*1-2**
Dig 22	***Digitaria* sp.**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Dig 23	***Digitaria* sp.**	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Unk 1	علف هرز نامعین	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Unk 2	علف هرز نامعین	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-1**
Unk 3	علف هرز نامعین	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Unk 4	علف هرز نامعین	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Unk 5	علف هرز نامعین	صومعه سرا	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Unk 6	علف هرز نامعین	جاده اسالم	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Unk 7	علف هرز نامعین	جاده اسالم	۱۳۸۳	***Mat*1-2**
Set 5	***Setaria* sp.**	ارطه (قادیکلا) – جاده ساری – بیشه سر	۱۳۸۴	***Mat*1-2**
Ech 1	***Echinochloa* sp.**	نور	۱۳۸۴	***Mat*1-1**
Dig ۳	***Digitaria* sp.**	نوشهر – ابتدای جاده آب پری	۱۳۸۴	***Mat*1-2**
Dig ۶	***Digitaria* sp.**	کردی کلا	۱۳۸۴	***Mat*1-2**
Dig ۷	***Digitaria* sp.**	کردی کلا (از ساری به چالوس نرسیده)	۱۳۸۴	***Mat*1-2**
Dig ۸	***Digitaria* sp.**	نور	۱۳۸۴	***Mat*1-1**
Ric ۱	**Rice**	شیرگاه – چاکسر	۱۳۸۱	***Mat*1-1**
Ric۲	**Rice**	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور	۱۳۸۱	***Mat*1-1**
Ric ۳	**Rice**	سلمان شهر	۱۳۸۱	***Mat*1-1**
Ric ۴	**Rice**	جاده محمودآباد – کاپیک	۱۳۸۱	***Mat*1-1**
Ric ۵	**Rice**	جاده چمستان به نور	۱۳۸۱	***Mat*1-1**
Ric ۶	**Rice**	نامشخص	۱۳۸۱	***Mat*1-1**
Ric ۷	**Rice**	آمل	۱۳۸۱	***Mat*1-1**
Ric ۸	**Rice**	نامشخص	۱۳۸۱	***Mat*1-1**

تهیه توده میسلیوم و استخراج DNA

به ازای هر جدایه سه حلقه میسلیومی پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه در حال رشد روی PDA به درون شیشه‌های ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط مایع که شامل ۱۰ گرم دکستروز و دو گرم عصاره مخمر در یک لیتر آب مقطر بود (Prabhu *et al*., 2002) منتقل شد. سپس روی شیکر دورانی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت پنج تـا هفـت روز در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا تولید انبوهی از میسلیوم نمایند. سپس با استفاده از پمپ خلاء، قیف بوخنر و

کاغذ صافی تمیز، میسلیوم خالص برای هر جدایه به دست آمد. استخراج DNA با استفاده از ۲۰۰ میلی گرم میسلیوم تازه استخراج شده به روش Rapid mini-preparation (Liu *et al*., 2000) انجام گردید. پس از استخراج و خشک شدن DNA، رسوب DNA در آب دیونیزه سترون حل شد و محلول بدست آمده در دمای ۲۰- °C نگهداری شد. برای اطمینان از موفقیت عمل استخراج DNA و تعیین غلظت آن، پنج میکرولیتر از محلول DNA با سه میکرولیتر بافر نمونه (gel loading buffer) مخلوط گردید و از ژل آگارز یک درصد عبور داده شد.

تکثیر DNA به روش RAPD-PCR

جهت تکثیر DNA ژنومی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ده آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی A، B، C، D، E، F، G، H، I و J ساخت شرکت MBI Fermentas کشور آلمان (جدول ۲) مورد آزمایش قرار گرفتند. تکثیر DNA در حجمی معادل ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR که شامل ۰/۲ میلی مول از نوکلئوتیدها ، ۱/۵ واحد آنزیم Smar *Taq* DNA Polymerase، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$، ده نانو گرم DNA نمونه، ۹ میکرومول از هریک از آغازگرهای I و H و۷ میکرومول از آغازگر D، ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10x PCR و ۱۶/۷ میکرولیتر آب دیونیزه سترون بود، انجام شد. تکثیر در یک ماشین ترموسایکلر مدل GP001 ساخت شرکت Corrbett Research استرالیا انجام گرفت.

جدول ۲- توالی ده آغازگر الیگونوکلئوتیدی جهت ایجاد الگوی باندی تکثیری چند شکلی تصادفی DNA

آغازگر	توالی آغازگر ´5 به ´3
A	5´-GGTCTCCTAG-3´
B	5´-CGGAGAGCGA-3´
C	5´-CCGGCATAGA-3´
D	5´-TGGGCTCGCT-3´
E	5´-ACTTGTGCGG-3´
F	5´-CCCACTGACG-3´
G	5´-CTGAGGAGTG-3´
H	5´-GGTCAACCCT-3´
I	5´-GCGGGAGACC-3´
J	5´-CCTCACCTGT-3´

برنامه حرارتی برای واکنش PCR و تکثیر قطعاتDNA در ۳۵ چرخه شامل ۹۴ °C ، چهار دقیقه، یک چرخه جهت واسرشت سازی اولیه و ۳۵ چرخه شامل ۴۵ ثانیه واسرشته سازی در ۹۴ °C، ۳۰ ثانیه مرحله اتصال در ۴۲ °C، ۹۰ ثانیه مرحله توسعه در ۷۲ °C، پنج دقیقه مرحله توسعه نهایی در ۷۲ °C تنظیم گردید. جهت مشاهده محصولات واکنش PCR الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد درون بافر 1x TBE با ولتاژ ۸۰ انجام گرفت. جهت تخمین اندازه قطعات DNA تکثیر شده، از نشانگر اندازه DNA (gene ruler^{TM} DNA ladder Mix (Fermentas SM0333) استفاده شد و جهت رنگ‌آمیزی باندهای DNA ژل درون اتیدیوم بروماید قرار گرفتند. سپس درون آب مقطر شستشو شد و با دستگاه Gel-Documentation مدل (B & L IMAGO System) مشاهده و ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی

ارزیابی باندهای DNA انجام گردید و جدول داده ها بر اساس حضور و عدم حضور هر بند DNA به صورت به ترتیب یک و صفر تکمیل گردید. از جدول داده ها در نرم‌افزار کامپیوتری NTSYS Pc-2.02e برای ایجاد

ماتریس شباهت بین جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس (Dice coefficient) استفاده شد. ضریب دایس به صورت $dij = \frac{b+c}{2a+(b+c)}$ می‌باشد که در آن i و j دو فرد می‌باشند که شباهت بین آنها محاسبه می‌شود. a = تعداد باندهای مشترک در هر دو فرد b = تعداد باندهایی که در فرد i وجود داشته و در فرد j وجود ندارند. C = تعداد باندهایی که در فرد j وجود داشته و در فرد i وجود ندارد. بر اساس نتیجه ماتریس شباهت، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به روش UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Average) در همین نرم افزار انجام و دندروگرام رسم گردید.

بررسی سازگاری جنسی و تعیین وضعیت باروری جدایه ها

در این آزمایش از هشت جدایه هرمافرودیت استاندارد (جدول۳) استفاده گردید. این جدایه‌ها توسط دکتر نوتگم (Dr. Notteghem) از مـــرکز تحقیقات Laboratory of Plant Pathology, Institute de Recherches en Agronomie Iropicale در فرانسه در اختیار قرار گرفت.

جدول ۳- مشخصات جدایه های استاندارد *Magnaporthe grisea* به کار رفته در آزمایش‌های تعیین تیپ آمیزشی

نام جدایه	میزبان	منشأ جغرافیایی	تیپ آمیزشی
KA_9	***Eleusine coracana***	اوگاندا	***Mat*1-2**
TH_{16}	***Hordeum vulgare***(جو)	تایلند	***Mat*1-2**
TH_{12}	***Hordeum vulgare***(جو)	تایلند	***Mat*1-1**
Br_{48}	**unknown**	نامشخص	***Mat*1-1**
Guy_{11}	**Rice**	فرانسه	***Mat*1-2**
Br_{114-5}	**unknown**	نامشخص	***Mat*1-2**
KA_3	***Eleusine coracana***	اوگاندا	***Mat*1-1**
KA_7	***Eleusine coracana***	هند	***Mat*1-1**

جهت انجام تلاقی ها بین جدایه‌های استاندارد و جدایه‌های علف‌های هرز، از محیط کشت آرد برنج – آگار (Rice flour agar) که به اختصار به آن RFA گفته می‌شود، استفاده شد. برای تهیه این محیط، ابتدا ۳۰ گرم کاه خشک برنج در آب مقطر به مدت چند ساعت خیسانده شد.

جدول ۴- فراوانی جدایه‌های قارچ *Magnaporthe grisea* در هر یک از چهار دودمان کلونی شناسایی شده بین ۴۲ جدایه در ارزیابی نهایی بااستفاده از سه آغازگر I ، D و H

دودمان کلونی	تعداد جدایه	فراوانی جدایه‌ها (٪)	تعداد هاپلوتیپ‌های شناسایی شده
A	۲۹	۶۹/۰۵	۱۱
B	۷	۱۶/۶۷	۴
C	۵	۱۱/۹	۴
D	۱	۲/۳۸	۱

سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر در اتوکلاو سترون شد و پس از گرفتن عصاره آن، ۱۴ گرم آرد برنج، ۲/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۵ گرم آگار به آن افزوده شد و سپس در اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه سترون شد. تلاقـــی ها با کنار هم قرار دادن حلقه های آگار واجد میسلیوم تازه با فاصله سه سانتی متر از هم روی محیط RFA که از حاشیه های پرگنه های در حال رشد قارچ روی PDA بریده شده بود در تشتک های پتری نه سانتی متری انجام شد. (Notteghem & Silue, 1992).

در هر تشتک، یک حلقه میسلیومی از یک جدایه علف هرز با تیپ آمیزشی نامعلوم در وسط تشتک و دو حلقه میسلیومی از دو جدایه استاندارد با دو تیپ آمیزشی معلوم در دو طرف آن با فاصله تقریبی سه سانتی‌متر قرار داده شد. تشتک‌های حاوی RFA ابتدا به مدت پنج الی هفت روز برای رسیدن میسلیومها به هم در دمای ۲۷ $^{\circ}C$ درون انکوباتور قرار گرفتند و سپس به انکوباتوری با دمای ۲۲- ۲۰ $^{\circ}C$ که دارای نور سفید فلورسنت دایمی بود، منتقل شدند و به مدت یک ماه در این شرایط قرار گرفتند. پس از ۳۰ روز، محل تلاقی هر دو جدایه ی در کنار هم قرار داده شده جهت تشکیل پریتسیوم مورد بررسی قرار گرفت. جهت ارزیابی وجود یا عدم وجود آسک و آسکوسپور در پریتسیوم‌ها با استفاده از یک سوزن استریل و زیر هود (در شرایط استریل) تعدادی پریتسیوم از محیط کشت برداشته شد، درون آب مقطر سترون شستشو داده شد و درون یک قطره "لاکتوفنل کاتن بلو" روی لام میکروسکوپ قرار گرفت. روی آن لامل گذاشته شد و با کمی فشار روی آن پریتسیوم‌ها شکسته شدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

در این آزمایش‌ها، ویژگی هایی از قبیل تشکیل یا عدم تشکیل پریتسیوم، محل تشکیل پریتسیومها، شکل ظاهری پریتسیوم و وجود یا عدم وجود آسک و آسکوسپور ارزیابی شد.

جدول ۵- هاپلوتیپ‌های شناسایی شده در هر یک از دودمانهای کلونی قارچ *Magnaporthe grisea* در ۴۲ جدایه مورد آزمایش با به کارگیری سه آغازگر I ، D و H در ارزیابی نهایی داده‌ها

a) هاپلوتیپ‌ها	۲) تعداد (درصد) جدایه‌های تشکیل دهنده هاپلوتیپ‌ها در هر یک از دودمان‌های کلونی			
	A	B	C	D
۱	۷ (۲۴/۱۴)	۴ (۵۷/۱۴)	۱ (۲۰)	۱ (۱۰۰)
۲	۳ (۱۰/۳۴)	۱ (۱۴/۲۹)	۲ (۴۰)	--
۳	۷ (۲۴/۱۴)	۱ (۱۴/۲۹)	۱ (۲۰)	--
۴	۲ (۶/۹)	۱ (۱۴/۲۹)	۱ (۲۰)	--
۵	۱ (۳/۴۵)	--	--	--
۶	۱ (۳/۴۵)	--	--	--
۷	۳ (۱۰/۳۴)	--	--	--
۸	۲ (۶/۹)	--	--	--
۹	۱ (۳/۴۵)	--	--	--
۱۰	۱ (۳/۴۵)	--	--	--
۱۱	۱ (۳/۴۵)	--	--	--

تعیین تیپ آمیزشی جدایه های قارچ *M. grisea* به روش PCR

در این آزمایش جهت تکثیر ایدیومورف‌های *Mat1-1* و *Mat1-2* از دو جفت آغازگر ۲۴ نوکلئوتیدی ساخت شرکت MWG Biotech معرفی شده توسط Tredway *et al.* (2003) استفاده شد(جدول ۶).

جفت آغازگرهای L_1 و L_2 هومولوگ ایدیومورف *Mat1-1*، یک قطعه DNA به اندازه ۵۵۲ جفت باز و جفت آغازگرهای T_1 و T_2 هومولوگ ایدیومورف *Mat1-2*، یک قطعه DNA به اندازه ۳۹۰ جفت باز را تکثیر می کنند. تکثیر DNA در حجمی معادل ۲۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR انجام گردید. مقادیر وزنی هر یک از مواد شامل ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۵ واحد آنزیم Smar Taq DNA Polymerase ، ۱/۷۵ پیکومول از آغازگرهای L_1، L_2، T_1 و T_2 و ۰/۲ میلی‌مول از dNTP Mix در بافر 10X PCR (۲ میکرو لیتر) ساخت شرکت سیناژن در ۱۴/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل بود. همچنین ۱۰ نانو گرم از سوسپانسیون DNA مورد نظر نیز در این مخلوط مورد استفاده قرار گرفت. برنامه حرارتی برای واکنش PCR شامل مراحل واسرشته سازی اولیه در ۹۴ $^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه بود که با ۳۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته سازی در ۹۴ $^{\circ}C$، یک دقیقه

مرحله اتصال در ۶۰ $^{\circ}C$ و یک دقیقه مرحله توسعه در ۷۲ $^{\circ}C$ و یک مرحله توسعه نهایی در ۷۲ $^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه ادامه یافت. مشاهده محصول واکنش PCR به طریقی که قبلاً ذکر شد، انجام گرفت.

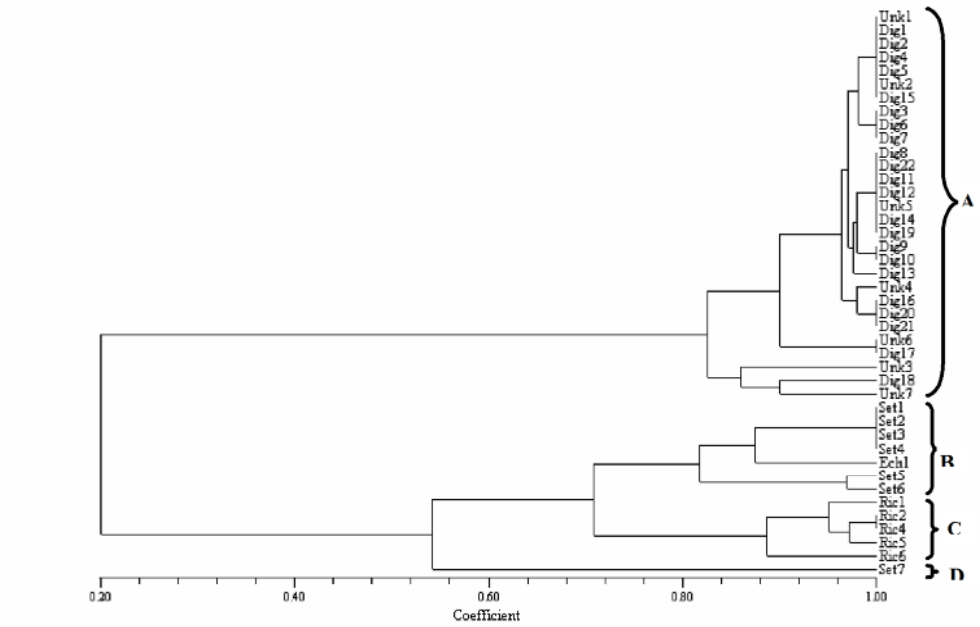
جدول ۶- نام و توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای L_1، L_2، T_1 و T_2

نام آغازگر	توالی آغازگر
L_1	5′-ATGAGAGCCTCATCAACGGCAACG-3′
L_2	5′-ACAGGATGTAGGCATTCGCAGGAC-3′
L_3	5′-ACAAGGCAACCATCTTGGACCCTG-3′
L_4	5′-CCAAAACAAAGAGTGCCATCAAGC-3′

نتایج

تنوع ژنتیکی جدایه ها

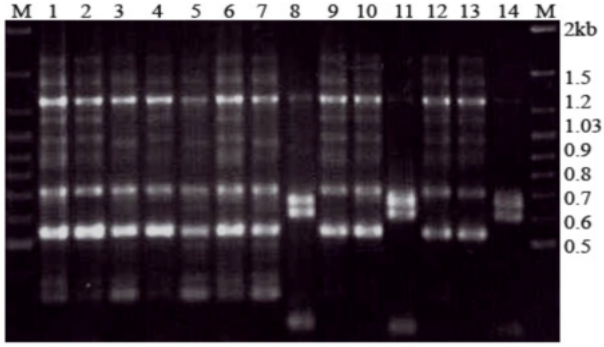
از ۴۸ جدایه استفاده شده در این تحقیق، تکثیر DNA در شش جدایه نامطلوب و باندهای DNA غیر قابل ارزیابی بودند. بنابراین، ۴۲ جدایه در بررسی های نهایی در نظر گرفته شدند. آغازگرهای D، I و H که الگوی تکثیر DNA مطلوبی را از بین ده آغازگر نشان دادند جهت آنالیز ۴۲ جدایه حاصل از برنج و علف‌های هرز انتخاب شدند. آغازگرهای I و D نسبت به آغازگر H چندشکلی بالاتری را در بین جدایه‌ها نشان دادند. مجموع باندهای DNA چندشکلی تکثیر شده قابل ارزیابی توسط هر سه آغازگر I، D و H برای ۴۲ جدایه ، ۴۸ باند با اندازه های بین ۲۲۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز بود. تجزیه خوشه ای ۴۲ جدایه با مقایسه ۴۸ باند DNA چندشکلی ایجاد یک دندروگرام کرد که در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- دندروگرام ایجاد شده برای ۴۲ جدایه *Magnaporthe grisea* بدست آمده از برنج، کراب گراس، سه تاریا و سوروف و هفت جدایه علف هرز ناشناخته با بکارگیری روش UPGMA برای ۴۸ باند DNA چند شکلی تکثیر شده تصادفی (RAPD) با سه آغازگر D، H و I. چهار دودمان کلونی شناسایی شده با حروف انگلیس A-D نشان داده شده اند.

با بکار گیری این آغازگرها چهار دودمان کلونی (clonal lineage) یا گروه انگشت نگاری (fingerprinting group) به نـام هـای A، B، C و D در بین ۴۲ جدایه مشخص شد. فراوانی جدایه‌های واقع در هر یک از چهار دودمان کلونی شناسایی شده در جدول ۴ نشان داده شده است. یک نمونه آنالیزی الگوی بانـدی

RAPD بدست آمده با آغازگر I در شکل ۲ به نمایش در آمده است.



شکل۲- چند شکلی باندهای DNA تکثیر شده در ۱۴ جدایه *Magnaporthe grisea* با آغازگر I . شماره های ۱۱ و ۱۴ جدایه های بدست آمده از *Setaria* می باشد. ستون ۸ جدایه حاصل از سوروف می باشد و سایر لاین ها جدایه های بدست آمده از کراب گراس و علف های هرز نا معلوم می باشد.

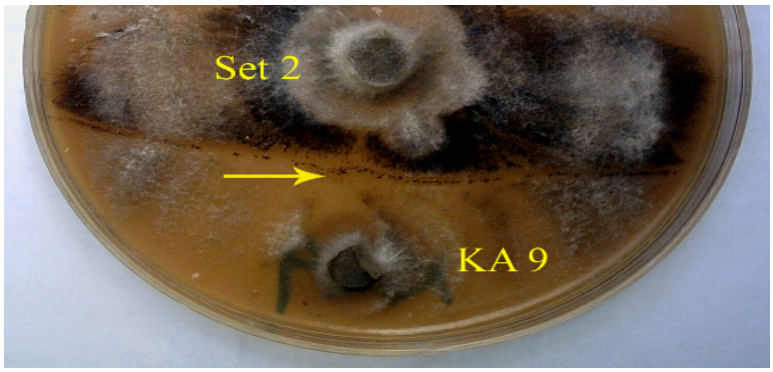
هاپلوتیپ‌های شناسایی شده در هر یک از گروههای انگشت نگاری در ارزیابی نهایی داده‌ها در جدول ۵ نشان داده شده است. در گروه انگشت نگاری A یازده هاپلوتیپ شناسایی شد. نتایج نشان می دهد که جدایه های *M. grisea* بدست آمده از کراب گراس و تعدادی از گرامینه های ناشناخته بسیار به هم شبیه بودند و در گروه انگشت نگاری A گروه بندی شدند (شکل۱). شباهت بین جدایه های این دودمان کلونی با هم بیش از ۸۰٪ بود و تفاوت ژنتیکی قابل توجهی مشاهده نگردید. جدایه های بدست آمده از سه تاریا و یک جدایه حاصل از سوروف در دودمان کلونی B دسته بندی شدند و شباهت بین آنها نیز بیش از ۸۰٪ تشخیص داده شد که شامل چهار هاپلوتیپ بود. گروه انگشت نگاری C شامل چهار جدایه حاصل از برنج و چهار هپلوتیپ و دودمان کلونی D از یک جدایه سه تاریا تشکیل شده بود.

سازگاری جنسی و وضعیت باروری جدایه ها

رفتار تولیدمثلی جدایه های بدست آمده از علفهای هرز و برنج با بکارگیری جدایه های استاندارد قارچ *M. grisea* با تیپ آمیزشی شناخته شده، شناسایی شد. پریتسیوم های بالغ حدود یک ماه بعد از تلاقی جدایه های با تیپ آمیزشی متفاوت مشاهده شدند و ۳۹ جدایه از ۴۰ جدایه علف هرز تشکیل پریتسیوم دادند. تشکیل پریتسیوم‌ها در ۲۵ جدایه در تلاقی با جدایه‌های استاندارد هرمافرودیت با تیپ آمیزشی *Mat1-1* و در ۱۴ جدایه در تلاقی با جدایه‌های استاندارد با تیپ آمیزشی *Mat1-2* مشاهده گردید و در مورد یک جدایه، در هیچ یک از تلاقی‌ها با جدایه‌های استاندارد پریتسیومی تشکیل نشد. در میان جدایه های بدست آمده از کراب گراس و گرامینه های ناشناخته تیپ آمیزشی *Mat1-2* غالب بود در حالی که در میان جدایه های بدست آمده از سه تاریا تیپ آمیزشی *Mat1-1* غالب بود. تیپ آمیزشی جدایه های بدست آمده از علفهای هرز و سایر ویژگی های آنها در جدول ۱ به نمایش در آمده است. در تمام تلاقی ها که پریتسیوم تشکیل شد، پریتسیوم‌ها در سمت جدایه‌های استاندارد تشکیل شدند که نمایانگر نر بارور بودن آنهاست و ماده باروری یا هرمافرودیسم در این جدایه ها مشاهده نگردید.(شکل ۳) میزان باروری در جدایه‌های علف‌های هرز بررسی شده در این تحقیق متفاوت بود. به طوری که در تلاقی برخی از جدایه‌ها با جدایه‌های استاندارد نواری بسیار متراکم از پریتسیوم‌ها مشاهده شد در حالی که بعضی دیگر از جدایه‌های علف های هرز در تلاقی ها تعداد کمی پریتسیوم تشکیل دادند.

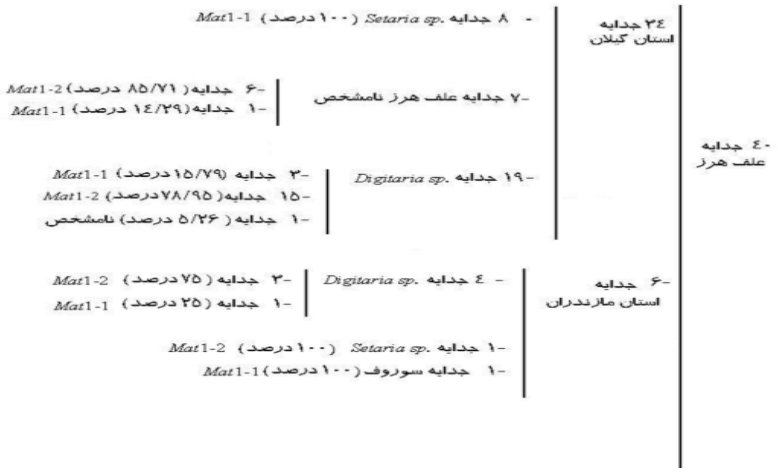
تشکیل پریتسیوم‌ها به صورت متراکم در بیشتر جدایه های حاصل از سه تاریا با جدایه استاندارد KA9 و تشکیل آسکوسپور بیشتر در تلاقی های بین جدایه های علفهای هرز و KA9، Guy11 و Br114-5 مشاهده گردید. در کل، ۱۶ جدایه در تلاقی با یک یا چند جدایه استاندارد تولید آسکوسپور کردند که تمام جدایه های

بدست آمده از *Setaria* در تلاقی های بارور مختلف تولید آسکوسپور کردند.



شکل ۳- تشکیل پریتسیوم در سمت جدایه استاندارد *Magnaporthe grisea* KA9 در تلاقی با جدایه ایرانی Set 2

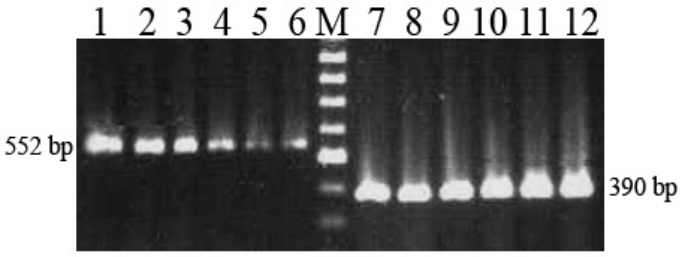
آسکوسپورهای بالغ تولید شده در تلاقی‌های بارور، چهار سلولی و دوکی بودند. در اغلب تلاقی‌ها پریتسیوم‌ها دارای گردن بلند به رنگ قهوه‌ای تیره بود و گردن‌ها به طور عمودی و تقریباً موازی با هم از درون آگار خارج شده بودند. در تعدادی از تلاقی‌ها، پریتسیوم‌هایی با گردن کوتاه و قهوه‌ای روشن تشکیل شد که معمولاً این شکل پریتسیوم‌ها در مقایسه ظاهری با گروه قبل تراکم کمتری در محیط کشت داشتند. در بعضی از پریتسیوم‌ها، دو گردن روی یک پایه پریتسیوم مشاهده شد. وجود ۲ گردن روی پایه پریتسیوم در جدایه‌های Dig 22 ، Dig 5 ، Dig 23 ، Dig 4 و Dig 11 مشاهده شد. جدایه‌های استاندارد KA9، TH12 و Br48 سه جدایه ای بودند که در تلاقی آنها با جدایه‌های علف هرز، نوار متراکمی از پریتسیوم‌ها تشکیل شد. TH16 در غالب تلاقی‌ها با جدایه‌های علف‌های هرز پریتسیوم تشکیل نداد. شایان ذکر است که جدایه‌هایی که در تلاقی با جدایه‌های استاندارد با تیپ آمیزشی *Mat1-1* که از قبل تعیین شده است، تشکیل پریتسیوم دادند خود دارای تیپ آمیزشی *Mat1-2* هستند و جدایه‌هایی که در تلاقی با جدایه‌های استاندارد با تیپ آمیزشی *Mat1-2* تشکیل پریتسیوم دادند خود دارای تیپ آمیزشی *Mat1-1* هستند، زیرا افرادی با تیپ آمیزشی سازگار (مخالف) می توانند با هم تولیدمثل جنسی انجام دهند و پریتسیوم تشکیل دهند. تیپ آمیزشی جدایه های برنج نیز با انجام تلاقی ها *Mat1-1* تعیین شد. در شکل ۴ فراوانی الل های تیپ آمیزشی *M. grisea* مرتبط با میزبان و مکان جغرافیایی ارائه شده است.



شکل ۴- فراوانی آلل‌های تیپ آمیزشی *Magnaporthe grisea* مرتبط با هر میزبان و مکان جغرافیایی

تعیین تیپ آمیزشی به روش PCR

جفت آغازگرهای L_1 و L_2 ایدیومورف *Mat1-1* را با وزن ۵۵۲ جفت باز و جفت آغازگر T_1 و T_2 ایدیومورف *Mat1-2* را با وزن ۳۹۰ جفت باز تکثیر کردند و در هر جدایه یک ایدیومورف تیپ آمیزشی تکثیر شد (شکل ۵). در پنج جدایه بدست آمده از کراب گراس و یک جدایه از علف هرز نامشخص با برنامه حرارتی مذکور و آغازگرها هیچ تکثیری صورت نگرفت و محصولی تولید نشد. نتایج ارزیابی تیپ آمیزشی به روش PCR، نتایج تعیین تیپ آمیزشی حاصل از تلاقی جدایه‌ها را تأیید می‌کند، تیپ آمیزشی یک جدایه بدست آمده از کراب گراس تعیین نشد زیرا این جدایه در واکنش PCR هیچ محصولی تولید نکرد و در آزمایش‌های تلاقی نیز هیچ پریتسیومی تشکیل نگردید.



شکل ۵- الگوی تکثیر ایدیومورف تیپ‌های آمیزشی *Mat*1-1 و *Mat*1-2 در چند جدایه علف هرز قارچ *Magnaporthe grisea* به کمک آغازگرهای L_1 و L_2 و T_1 و T_2 و روش PCR. شماره‌های 12، 11، 10، 9، 8، 7، 6، 5، 4، 3، 2 و 1 به ترتیب جدایه‌های Dig15، Br114-5، Dig14، Dig5، Dig20، Dig16، KA3، KA7، Set3، Set6، Set8 و Set2 می باشند. gene ruler^{TM} DNA ladder Mix = M. جدایه‌های KA_3 و KA_7 کنترل‌های مثبت برای ایدیومورف تیپ آمیزشی *Mat*1-1 و جدایه Br_{114-5} کنترل مثبت برای ایدیومورف تیپ آمیزشی *Mat*1-2 می‌باشند.

بحث

با پیشرفت بیولوژی مولکولی و امکان مطالعه دقیق ساختار ژنتیکی در قارچها و انواع میکروارگانیزمها، زمینه‌های لازم برای شناسایی تنوع ژنتیکی در درون افراد یک گونه بخوبی فراهم شده است.

انگشت نگاری DNA جدایه‌های قارچ از اوایل دهه ۹۰ آغاز گردید (Levy *et al.*, 1991) و امکان مقایسه جدایه‌های قارچ را در سطح مولکول‌های DNA و گروهبندی آنها در گروههای با زمینه ژنتیکی مشابه ایجاد نمود. انگشت نگاری DNA قارچ *M. grisea* در ابتدا به کمک کاوشگر MGR 586 که از روی توالی نوکلئوتیدی یک عنصر انتقالی تکرار شونده در ژنوم قارچ تحت همین نام طراحی شده بود با استفاده از تکنیک مولکولی RFLP آغاز شد، طی چند سال اخیر تنوع ژنتیکی جمعیت انبوهی از این قارچ در کشورهای مختلف مقایسه گردید (Levy *et al.*, 1991; Zeigler, 1998; Kato *et al.*, 2000). نشانگر RAPD-PCR که توسط Williams *et al.* (1990) ابداع گردید، در تحقیقات متعددی مورد استفاده قرار گرفته است(Rathour *et al.*, 2004).

نشانگر RAPD-PCR برای بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های قارچی بکار می‌رود که این تکنیک ابزار مفید و قابل اطمینان برای بررسی‌های ژنتیکی می‌باشد. در یک تحقیق که توسط Huff *et al.* (1994) انجام گرفت نتایج حاصل از تحقیقات آنها که با نشانگر RAPD-PCR انجام شده بود نتایج کارهای محققان دیگر را که از تکنیک‌ها و روش استخراج DNA متفاوت استفاده کرده بودند، تأیید کرد. آنها با انگشت نگاری DNA به کمک نشانگر RAPD-PCR و با استفاده از چهار آغازگر تصادفی ساختار جمعیت ۳۵ جدایه *M. poae* را بررسی کردند و تنوع ژنتیکی وسیعی را بین مکانهای مختلف نمونه برداری مشاهده کردند.

در مقایسه با سایر نشانگرها، استفاده از این نشانگر نیازی به اطلاعات ژنتیکی مولکولی قبلی در مورد ارگانیسم موردنظر ندارد و همچنین یک تکنیک ساده،

ارزان و سریع می‌باشد (Rathour *et al*., 2004). در نشانگر RAPD-PCR تعداد قطعات DNA تکثیر شدهٔ زیادی تولید می شود که این خصوصیت در تعیین تنوع ژنتیکی و مقایسه جدایه‌ها بسیار مفید می‌باشد. در این تحقیق نیز نشانگر RAPD-PCR جهت بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *M. grisea* جدا شده از علف های هرز و برنج بکار رفته است. با استفاده از این نشانگر تفاوت عمده جدایه‌های حاصل از کراب گراس(*Digitaria* sp.) با جدایه‌های حاصل از برنج، سوروف وسه تاریا به خوبی مشخص شده است و این نشانگر، نشانگر خوبی برای تمایز این دو گروه جدایه‌ها از هم بود که این نتیجه، نتایج حاصل از کارهای Couch & Kohn (2002) را که با روش PCR-RFLP انجام داده بودند، تأیید کرد. آنها اظهار داشتند که به نظر می‌رسد اساساً ارتباط اختصاصی میزبان و قارچ گروههای متمایزی را درون گونه، جمعیت ها و دودمانهای کلونی *M. grisea* می‌تواند بیان کند که در این تحقیق نیز این نتیجه با توجه به دندروگرام حاصل مشاهده می شود. در تجزیه خوشه ای حاصل از داده های الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز محل نمونه برداری در مقایسه و گروهبندی جدایه‌ها در نظر گرفته نشد زیرا فراوانی جدایه‌های مازندران بسیار کمتر از جدایه‌های گیلان بود و در دودمان های کلونی به طور نامنظمی پراکنده بودند و معیار خوبی برای گروهبندی محسوب نمی‌شدند و آنچه در گروهبندی و مقایسه‌ها مدنظر قرار گرفت نوع میزبان بود. در گروه انگشت نگاری A شامل ۲۲ جدایه علف هرز کراب گراس و هفت جدایه علف هرز نامشخص تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای مشاهده نشد ولی این گروه با بقیه گروهها که شامل جدایه‌های سه تاریا ، برنج و یک جدایه سوروف بودند تفاوت ژنتیکی بسیار زیادی داشت و تنها در حد ۲۰ درصد شباهت داشتند که این مسأله خویشاوندی دور جدایه‌های کراب گراس را با جدایه‌های برنج و سه تاریا می‌تواند نشان دهد که همین نتیجه در کارهای Kato *et al.* (2000) بدست آمد ولی جدایه‌های برنج وسه تاریا که در دودمان کلونی B و C گروهبندی شدند بیش از ۷۰ درصد شباهت ژنتیکی داشتند و خویشاوندی بیشتری را نشان می دهند. فقط جدایه Set7 (گروه انگشت نگاری D) در حد ۵۵ درصد شباهت ژنتیکی با دودمان‌های کلونی B و C داشت که نشانگر این مطلب است که این جدایه تحت تاثیر عوامل محیطی و درونی دچار تغییرات بیشتر شده و در خط تکاملی جداگانه قرار می گیرد. در بین جدایه‌های برنج با هم و در بین جدایه‌های سه تاریا با هم تنوع ژنتیکی زیادی مشاهده نشد البته در این تحقیق بین جدایه‌های سه تاریا با هم و جدایه‌های برنج با هم تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به جدایه‌های کراب گراس با هم مشاهده شد.

Borromeo *et al*. (1993) با مقایسه جدایه‌های برنج و غیربرنج دریافتند که این دو گروه از هم متمایزند و جدایه‌های غیربرنج نمی‌توانند به عنوان اینوکلوم اولیه برای ایجاد بیماری نقش داشته باشند. آنها پس از مقایسه جدایه‌ها به روش RFLP هم شباهت جدایه‌های *Digitaria ciliaris* را با جدایه‌های برنج در حدود ۱۰ درصد بیان کردند که خویشاوندی دور این دو گروه را نشان می‌دهد که نتایج حاصل از کارهای کارهای Couch & Kohn (2002) و Borromeo *et al*. (1993) ، مشابه نتایج بدست آمده در این تحقیق می باشد. Borromeo *et al*. (1993) بیان کردند که به نظر می‌رسد جریان ژنی بین جمعیت‌های جدایه‌های بیمارگر برنج و بیمارگر علف هرز محدود باشد و این مسأله در طبقه‌بندی جدایه‌های شبه جنس *Pyricularia* که بیمارگر برنج هستند و جدایه‌هایی که بیمارگر علف هرز هستند مد نظر قرار گیرد و آنها را در دو گونه متمایز جای می دهد. این مساله ممکن است طبقه بندی فوق را که جدایه های آلوده کننده برنج را به عنوان *P. oryzae* و جدایه های آلوده کننده علف های هرز را به عنوان *P. grisea* عنوان کرده است، تایید کند. در این تحقیق سطح پایین تنوع ژنتیکی درون هر دودمان کلونی *M. grisea* مرتبط با هر میزبان ساختار جمعیت کلونال را در قارچ نشان می دهد و به نظر نمی رسد که تولیدمثل جنسی با فراوانی قابل ملاحظه ای در جمعیت رخ داده باشد. داشتن اطلاعات بیشتر در مورد ساختار جمعیت جدایه های آلوده کننده علفهای هرز و میزان تشابه آنها با جدایه های آلوده کننده برنج نیازمند بررسی جدایه های بیشتر می باشد. همچنین تحقیقات بیشتری در راستای تعیین اهمیت سایر عوامل تنوع

ژنتیکی از قبیل موتاسیون و جریان ژنی در جمعیت های *M. grisea* آلوده کننده علفهای هرز گرامینه ضروری می باشد.

تحقیقات نشان می‌دهد که وضعیت باروری در مناطق جغرافیایی مختلف و روی میزبان‌های مختلف، متفاوت است. بنابراین باروری در جدایه‌های مزرعه‌ای *M. grisea* از عقیمی کامل، ماده عقیمی تا باروری کامل تغییر می‌کند (Viji & Gnanamanickam, 1998). البته به طورکلی جدایه‌های غیر برنج نسبت به جدایه‌های حاصل از برنج از باروری بیشتری برخوردار بودند. همچنین فراوانی و وضعیت پراکنش دو نوع تیپ آمیزشی نیز در نقاط مختلف جهان و روی میزبان‌های متفاوت، متنوع بوده است به طوری که در بعضی مناطق هر دو تیپ آمیزشی (*Mat1-2* و *Mat1-1*) به نسبت‌های مختلف وجود داشته‌اند (Choi & Lee, 1994) و در بعضی مناطق و روی میزبانی دیگر تنها یک نوع تیپ آمیزشی در جدایه‌های بیمارگر غیر برنج موجود بوده است (Viji & Uddin, 2002). ترجیح میزبانی جدایه‌های *M. grisea* در هر منطقه، تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در جدایه‌های یک منطقه که در غیرفعال یا فعال شدن لوکوس های باروری نقش دارند، جابجایی جدایه های *M. grisea* با توانایی‌های جنسی متفاوت و تیپ‌های آمیزشی متفاوت در مناطق مختلف و عوامل دیگری موجب تفاوت در باروری‌ها و پراکنش تیپ‌های آمیزشی می‌گردد (Zeigler, 1998). درباره پراکنش آلل‌های تیپ آمیزشی و باروری جدایه‌های قارچ *M. grisea* روی علف های هرز در ایران تحقیقی انجام نگرفته است. لازم به ذکر است که با دانستن فراوانی آلل‌های تیپ آمیزشی و وضعیت باروری می‌توان احتمال وقوع تولیدمثل جنسی را در یک منطقه یا جمعیت پیش‌بینی یا برآورد نمود که از این مسأله می‌توان برای کنترل بلاست از طریق تولید ارقام مقاوم سود برد (Viji & Gnanamanickam, 1998).

در این تحقیق نتایج حاصل از تلاقی جدایه‌های ایرانی علف های هرز و جدایه‌های استاندارد با تیپ آمیزشی متفاوت و تشکیل پریتسیوم در اغلب تلاقی‌ها نشان داد که جمعیت قارچ *M. grisea* روی علفهای هرز از درصد باروری نسبتاً بالایی برخوردار است به طوری که از بین ۴۰ جدایه جدا شده از علف هرز، ۳۹ جدایه (۹۷/۵ درصد) در تلاقی با جدایه‌های استاندارد تولید پریتسیوم کردند و از این ۳۹ جدایه، ۱۶ جدایه توانایی تولید آسک و آسکوسپور داشتند که این رقم در مقایسه با تحقیقات Hemmati (2005) روی ۱۵۰ جدایه برنج و دو جدایه علف هرز *Digitaria* sp. و تحقیقات Viji & Gnanamanickam (1998) روی میزبان‌های غیربرنج رقم بالایی است. همچنین در این تحقیق تعداد پریتسیوم‌ها و آسکوسپورهای تشکیل شده در تلاقی‌های جدایه‌های *Setaria* sp. با جدایه‌های استاندارد در مقایسه با سایر جدایه‌ها بیشتر بود. این نتیجه توسط Kato *et al.* (2000) نیز بدست آمده بود. برخلاف نتایج تحقیقات Hemmati (2005) و Mousanejad *et al.* (2005) که *Mat1-1* تنها تیپ آمیزشی در بین جدایه‌ها ی *M. grisea* جدا شده از برنج در شمال ایران بودند، هر دو تیپ آمیزشی *Mat1-1* و *Mat1-2* در میان جدایه های غیر برنج در این تحقیق یافت شدند. غالب بودن تیپ آمیزشی *Mat1-2* در جدایه‌های حاصل ازکراب گراس و غالب بودن تیپ آمیزشی *Mat1-1* در جدایه‌های حاصل از سه تاریا می‌تواند ارتباط اختصاصی این جدایه‌ها با این تیپ آمیزشی را با میزبانشان نشان دهد که نمونه برداری های وسیع تری جهت اثبات این مطلب باید صورت گیرد. بر اساس این تحقیق به نظر می‌رسد که پراکنش آلل‌های تیپ آمیزشی به نوع میزبان و ارتباط اختصاصی میزبان و قارچ وابسته است و منطقه جغرافیایی در پراکنش آلل‌های تیپ آمیزشی جدایه‌های علف‌های هرز تأثیر چندانی نداشته است که این نتیجه توسط Tredway *et al.* (2003) نیز بیان شده بود.

Viji & Gnanamanickam (1998) نیز ارتباط با میزبان خاص را به عنوان یک فاکتور مهم در تعیین باروری جدایه‌های مزرعه‌ای *M. grisea* بیان کرده اند. تعدد جدایه های ماده بارور و هرمافرودیت در جمعیت های *M. grisea* مرتبط با سایر گرامینه ها به طور عمومی بیشتر از جمعیت های قارچ جدا شده از برنج است(Tredway *et al.*, 2003). اما در این تحقیق نیز همانند تحقیق Hemmati (2005) که نر باروری در جدایه‌های برنج مشاهده شده بود نر باروری در جدایه‌های علف های هرز نیز به اثبات رسید و

هرمافرودیسم و یا ماده باروری در هیچ جدایه مشاهده نگردید. تنها یک جدایه به علت عدم تشکیل پریتسیوم در تلاقی با همه جدایه‌های استاندارد عقیم تشخیص داده شد.

شایان ذکر است تولیدمثل جنسی می تواند در حضور حداقل یک والد ماده بارور یا هرمافرودیت و وجود افراد با تیپ آمیزشی سازگار به وقوع بپیوندد زیرا هتروتالیسم در قارچ *M. grisea* وجود دو هیف با دو تیپ آمیزشی سازگار که یکی از آنها قادر به تولید آسکوگونیوم و دیگری قادر به تولید آنتریدیوم باشد را ضروری می سازد. اگرچه در این تحقیق تیپ آمیزشی *Mat1-2* در تعداد زیادی از جدایه‌های علف هرز تشخیص داده شد، اما وجود این آلل تیپ آمیزشی سازگار با تیپ آمیزشی *Mat1-1* در جدایه‌های برنج نمی‌تواند منجر به تولیدمثل جنسی و افزایش تنوع ژنتیکی شود، اگرچه وجود دو تیپ آمیزشی سازگار در جمعیت ضروری می‌باشد. زیرا نر بارور بودن جدایه‌های علف های هرز بررسی شده در این تحقیق همانند جدایه‌های برنج بررسی شده توسط Hemmati (2005) وقوع تولیدمثل جنسی بین جدایه‌های علفهای هرز و جدایه‌های برنج را غیرممکن می سازد. بنابراین در صورت از دست رفتن بخشی از جنسیت یا تمام آن در جدایه‌های این قارچ وجود یا عدم وجود هر دو تیپ آمیزشی در یک جمعیت از اهمیت زیادی برخوردار نخواهد بود. غالب بودن یک تیپ آمیزشی و فقدان جدایه‌های ماده بارور و یا هرمافرودیت در جمعیت‌های بررسی شده در این تحقیق نیز نشان دهنده ساختار کلونال (غیرجنسی) جمعیت قارچ است که این موضوع توسط Tredway *et al.* (2003) نیز بیان شده بود. البته برای اطمینان بیشتر، انجام تحقیقات گسترده تری لازم است. امروزه می‌توان با استفاده از روشهای مولکولی دقیق از جمله واکنش PCR و آغازگرهای اختصاصی وجود و پراکندگی آلل‌های تیپ آمیزشی را در هر منطقه و هر جمعیت با دقت و سرعت بیشتری تعیین نمود. در این تحقیق نیز از واکنش PCR برای تعیین نوع تیپ آمیزشی جدایه‌های علف های هرز استفاده شد.

تعیین تیپ آمیزشی با استفاده از روش PCR مزایایی را نسبت به روش‌های سنتی تعیین تیپ آمیزشی از قبیل تلاقی های کنترل شده در محیط غذایی غیرزنده دارد. مثلاً تعیین وضعیت باروری و نوع تیپ آمیزشی یک جدایه با تیپ آمیزشی تعیین نشده به جدایه استاندارد مورد استفاده در تلاقی‌ها وابسته است. بنابراین، تعیین تیپ آمیزشی مستقل از عوامل باروری و سازگاری بین جدایه‌های استاندارد و جدایه‌های با تیپ آمیزشی نامشخص، با استفاده از روشهای مولکولی بسیار مفید می‌باشد. همچنین با استفاده از این روش می‌توان تیپ آمیزشی هر جدایه را با دقت و سرعت بیشتری تعیین نمود. با استفاده از این تکنیک تیپ آمیزشی ۳۴ جدایه مشخص شد (شکل ۵) ولی تیپ آمیزشی شش جدایه از این طریق تعیین نگردید. به نظر می‌رسد که ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در این جدایه‌ها از ایدیومورف‌های یافت شده در سایر جدایه‌های *M. grisea* متمایز شده‌اند (Tredway *et al.*, 2003). بنابراین لازم است که یک برنامه PCR جداگانه به طور اختصاصی برای این جدایه‌های متفاوت جهت تعیین تیپ آمیزشی آنها با اطمینان بالا و آغازگرهای دیگری طراحی شود.

REFERENCES

1. Borromeo, E. S. Nelson, R. J. Bonman, J. M. & Leung, H. (1993). Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia* infecting rice and weed hosts. *Phytopathology*, 83, 393-399.
2. Choi, W. B. & Lee, Y. H. (1994). Mating type alleles of *Magnaporthe grisea* in Korea. *Korean Journal of Plant Pathology*, 10, 249-253.
3. 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.
4. Hemmati, R. (2005). *Genetic structure of Magnaporthe grisea (Hebert) Barr, rice blast agent using PCR and mating type alleles distribution in Mazandaran province.* MS thesis. Tehran University, Iran. In Farsi
5. Huff, D. R. Bunting, T. E. & Plumley, K. A. (1994). Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of genetic variation in *Magnaporthe poae*. *Phytopathology,* 84, 1312-1316.

6. Javan-Nikkhah, M. (1996). The etiology of rice stem rot disease in Guilan province. Ms thesis. Tehran University, Karaj, Iran. 123 pp. In Farsi
7. Javan-Nikkhah, M. (2002). *Genetic diversity of the population of the agent of rice blast fungus, Magnaporthe grisea (Herbert) Barr,using molecular,pathogenicity & vegetative compatibility characteristics in Guilan province.* PhD dissertation, Tehran University, Iran. In Farsi
8. Kato, H. Yamamoto, M. Yamaguchi-ozaki, T. Kadouchi, H. Iwamoto, Y. Nakayashiki, H. Tosa, Y. Mayama, S. & Mori, N. (2000). Pathogenecity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphism of *Pyricularia* populations isolated from Graminae, Bambusideae and Zingiberaceae plants. *Plant Pathology*, 66, 30-47.
9. Landschoot, P. J. & Hoyland, B. F. (1992). Gray leaf spot of perennial ryegrass turf in Pennsylvania. *Plant Disease*, 76, 1280-1282.
10. Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. Pp, 388
11. Levy, M. Romao, J. Marchetti, M. A. & Hamer, J. E. (1991). DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *The Plant Cell*, 3, 95-102.
12. Liu, D. Coloe, S. Baird, R. and Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 471.
13. Metzenberg, R.L. and Glass, N.L. (1990). Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioassays*, 12, 53-59.
14. Mousanejad, S. Mohammadi Goltappeh, A. & Javan-Nikkhah, M. (2005). Fertility status and distribution of mating type alleles of the agent of rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* in Guilan province. *Iranian Journal of Plant Pathology,*40, 201- 220.
15. Notteghem, J. L. & Silué, D. (1992). Distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe grisea* populations pathogenic on rice. *Phytopathology*, 82, 421-424.
16. Ou, S. H. (1985). *Rice diseases* (2nd ed.). Common wealth Agricultural Bureaux. 380 Pp.
17. Prabhu, A. S. Filippi, M. C. Araujo, 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.
18. Rathour, R. Singh, B. M. Sharma, T. R. & Chauhan, R. S. (2004). Population structure of *Magnaporthe grisea* from north-western Himalayas and its implications for blast resistance breeding of rice. *Phytopathology*, 152, 304-312.
19. Shivayogi, S. Vaishali, M. G. Shashidhar, H. E. & Girish Kumar, K. (2002). Genetic analysis of rice blast fungus of southern carnataka using DNA markers and reaction of popular rice genotypes. Retrieved March 25, 2002, from: http://www.ias.ac.in/currsci/732. Pdf.
20. Tredway, L. P. Stevenson, K. L. and Burpee, L. L. (2003). Mating type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations from turfgrass in Georgia. *Plant Disease*, 87, 435-441.
21. Turgeon, B. G. Christiansen, S. K. and 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: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*.(pp. 199-215). CABI Publishing, Wallingford, UK.
22. Viji, G. & Gnanamanickam, S. S. (1998). Mating type distribution and fertility status of *Magnaporthe grisea* populations from various hosts in India. *Plant Disease,* 82, 36-40.
23. Viji, G. & Uddin, W. (2002). Distribution of mating type alleles and fertility status of *Magnaporthe grisea* causing gray leaf spot of perrenial ryegrass and augustinegrass turf. *Plant Disease*, 86, 827-832.
24. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R. Livak, K. J. Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531- 6535.
25. Zeigler, R.S. (1998). Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 249-75.