

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Pyrenophora graminea*

عامل بیماری لکه نواری جو با استفاده از نشانگر ISSR

خشنود نوراللهی^{۱*} و معصومه شهبازی^۲

۱. استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

۲. کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۲)

چکیده

لکه نواری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های جو در استان ایلام است که قارچ *Pyrenophora graminea* آن را ایجاد می‌کند. برای تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *P. graminea* از گیاهان آلوده جو در مزارع مختلف استان ایلام که زخم‌های قهوه‌ای‌رنگ نواری در اندام‌های هوایی داشتند، به‌طور تصادفی نمونه‌برداری صورت گرفت. در نهایت ۶۹ جدایه از نمونه‌های آلوده با استفاده از محیط کشت سیب‌زمینی - دکستروز - آگار به‌دست آمد. برای آزمون بیماری‌زایی عامل بیماری به دلیل تولید نشدن اسپور کافی در محیط کشت مصنوعی از روش ساندریجی برای آلوده‌سازی بذرها استفاده شد. برای مطالعه تنوع ژنتیکی در جدایه‌ها از هشت نشانگر ISSR مخصوص قارچ *P. graminea* استفاده گردید. تعداد کل ۱۷۱ آلل در بین همه جمعیت‌ها در اثر آغازگر بین ریزماهواره مشخص شدند. تعداد آلل‌ها برای هر نشانگر از ۱۶ تا ۳۰ عدد متغیر بودند. گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس و روش UPGMA انجام گرفت و بر این اساس سیزده گروه مشخص شد. مقایسه پارامترهای مربوط به تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها نشان داد که جمعیت دره‌شهر ($h=0/32$) دارای بالاترین تنوع ژنتیکی است. کوچک‌ترین فاصله ژنتیکی به مقدار ۰/۰۱۹ بین جمعیت‌های آسمان‌آباد و سیروان مشاهده گردید. بر اساس فنوگرام به‌دست‌آمده برای جمعیت‌ها، دو گروه جمعیت نشان داده شد. یک گروه شامل جمعیت دره‌شهر و گروه بعدی شامل جمعیت‌های ایوان، آسمان‌آباد، سیروان و چرداول بود. تجزیه واریانس مولکولی برای مقایسه تنوع ژنتیکی داخل و بین جمعیت‌ها نشان داد که بیشترین تنوع مربوط به داخل جمعیت‌ها به مقدار ۹۴ درصد است و میزان تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها بسیار کم است و این میزان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها را می‌توان با مقدار بالای جریان ژنی به مقدار ۴/۵۷۶ بین جمعیت‌ها توجیه کرد.

واژه‌های کلیدی: آغازگرهای بین ریزماهواره، جو، ساختار ژنتیکی، *Pyrenophora graminea*

مقدمه

ضروری است. از محصولات کشاورزی که در این ارتباط از اهمیت بسزایی برخوردارند، دو محصول گندم و جو به‌ترتیب در تأمین مواد غذایی مردم و تعلیف دام نقش

با توجه به روند افزایش جمعیت، تأمین مواد غذایی به‌ویژه تولید مواد اولیه صنایع غذایی برای مردم امری

مدیریت موفق بیماری فراهم آورد (McMullen & Adhikari, 2009). در زمینه تنوع ژنتیکی در جهان مطالعات مختلفی صورت گرفته است و نشانگرهای مولکولی مختلفی در بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها به کار گرفته شده است. جوهر و عربی (Jawhar & Arabi, 2006)، تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. graminea* را با استفاده از نشانگر IGS-RFLP بررسی کردند و این نشانگر را به عنوان ابزاری مفید برای بررسی تنوع ژنتیکی معرفی کردند. Zein et al. (2010)، در سوریه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. graminea* را با استفاده از IRAP و ITS-RFLP مطالعه کردند. باندها در این دو نشانگر به ترتیب ۸۵ و ۷۷ درصد چندشکلی نشان داد و نسبت شاخص نشانگر IRAP بالاتر از ITS-RFLP گزارش شد. Bayraktar & Akan (2012)، خصوصیات ژنتیکی ۴۵ جدایه از قارچ *P. graminea* را با استفاده از نشانگرهای RFLP و ISSR مطالعه کردند و همچنین واکنش چند رقم جو به بیماری لکه نواری را در شرایط گلخانه‌ای بررسی کردند. تجزیه و تحلیل با نشانگر RFLP الگوهای باندهای یکسانی را نشان داد. تجزیه و تحلیل با نشانگر ISSR نیز تنوع کمی را بیان کرد و جدایه‌ها را با ۱۲ درصد تفاوت در چهار گروه قرار داد. نشانگرهای Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) یا نواحی بین ریزماهورهای یا بین توالی تکراری ساده برای این مطالعه انتخاب گردیدند. ISSR توالی‌های تکثیرشده نواحی از DNA اند که بین توالی‌های دو ریزماهوره قرار دارند. در این روش از قطعات تکراری SSR همراه با بازهای انتخابی در انتهای آنها به عنوان آغازگر استفاده می‌شود. آغازگرهای ISSR معمولاً چندشکلی بالایی نشان می‌دهند (Chawla, 2002) و مزایای فراوانی دارند که عبارتند از: تکرارپذیری بالای آن نسبت به بسیاری از نشانگرها، بررسی و آنالیز هم‌زمان تعداد زیادی جایگاه در سطح ژنوم، میزان دقت بالای این نشانگر و قابلیت اتکا و اطمینان بیشتر نسبت به نشانگرهای دیگر، تنوع بالا، هزینه پایین در مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی به علت استفاده از تعداد آغازگرهای کمتر نسبت به دیگر نشانگرها، بی‌نیازی از آنزیم‌های برشی، سرعت و سهولت اجرا به خاطر استفاده از مقادیر بسیار کم DNA، انجام دادن تنها با

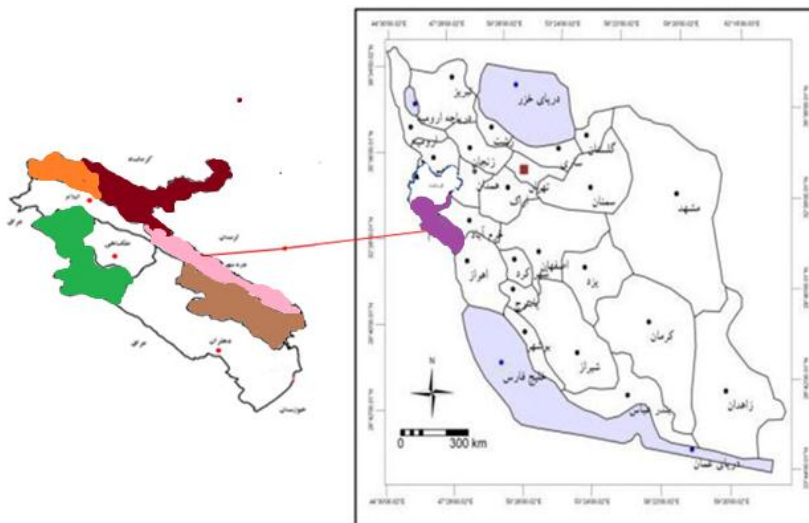
ویژه‌ای دارند. جو برای مصرف غذای حیوانات، صنایع مالت‌سازی، آب‌جو بدون الکل، تهیه نان جو و مصارف سوپ به کار می‌رود (Bahmanya, 1994). همچنین جو یک جزء با ارزش برای تناوب محصولات است و به عنوان گونه مدل در تجزیه‌های ژنتیکی و مولکولی استفاده می‌شود (Chakraborty, 2011). بیماری لکه نواری (Leaf strip) یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های جو است (Statkeviciute, 2003). این قارچ در طول برگ و غلاف برگ‌های مسن نوارهای زرد رنگ تولید می‌کند، که در انتهای فصل قهوه‌ای می‌شوند و برگ‌ها در طول لکه نواری شکاف خورده و پاره می‌گردند. گیاهان آلوده کوتاه می‌ماند و خوشه‌های طبیعی تولید نمی‌کنند. عامل بیماری قارچ Ito & Kurib، *Pyrenophora graminea* با فرم غیرجنسی *Drechslera graminea* Ito & Kurib است (Babadost, 1998). این بیماری در بسیاری از مناطق جهان مثل آفریقا، آمریکا، آسیا، استرالیا و اروپا خسارت شدید به بار می‌آورد (Rachdowang, 1999). در ایران این بیماری از استان‌های تهران، خوزستان، مازندران، اردبیل، آذربایجان غربی و ایلام گزارش شده است (Babadost, 1998). به دلیل سطح زیر کشت بالای جو در کشور و اهمیت گیاه جو، انتشار وسیع جغرافیایی و قدرت بقای قارچ *P. graminea*، بیماری لکه نواری یکی از تهدیدهای جدی برای این محصول محسوب می‌شود و از طرفی مطالعات کافی درباره این بیماری در استان ایلام و به‌طور کلی در کشور صورت نگرفته است. لذا لازم است مطالعاتی در زمینه شناسایی عامل بیماری و بررسی تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری صورت گیرد تا روش‌های کنترل بیماری با اطمینان بیشتری به کار گرفته شوند. یکی از بهترین روش‌های کنترل این بیماری استفاده از ارقام جو مقاوم به این بیماری است (Nielsen, 2002). با بررسی تنوع ژنتیکی این بیماری در مناطق مختلف و اطلاع از روابط ژنتیکی قارچ عامل بیماری می‌توان ارقام مقاوم به این بیماری را شناسایی و معرفی کرد. شناخت کافی از نحوه انتشار بیماری و مطالعه تنوع ژنتیکی بیمارگر در جدایه‌ها به عنوان شاخصی از تغییرپذیری بیمارگر و پایداری مقاومت گیاه در برابر بیماری می‌تواند اطلاعات مفیدی را در جهت

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به منظور جمع‌آوری نمونه‌های آلوده به بیماری لکه نواری جو، طی فصل زراعی ۹۱-۱۳۹۰، از مناطق کشت جو در مناطق مختلف استان ایلام از جمله ایوان، چرداول، سیروان، دره‌شهر، آبدانان و مهران در اردیبهشت ماه تا اواخر خرداد ماه بسته به شرایط آب‌وهوایی منطقه در زمان ظهور سنبله و از گیاهان مشکوک به آلودگی که علائم لکه نواری بر روی برگ، ساقه و خوشه آنها نمایان بود، بازدید به عمل آمد و نمونه‌برداری به صورت تصادفی صورت گرفت (شکل ۱). نمونه‌های آلوده در داخل پاکت‌های کاغذی مجزا قرار گرفتند و پس از ثبت مشخصات لازم برای بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند. از میان نمونه‌های جمع‌آوری شده، سه تا چهار نمونه از همه اندام‌های گیاهی جو برای جداسازی عامل بیماری انتخاب شد.

یک PCR و آشکارسازی محصولات PCR با الکتروفورز بر روی ژل‌های آگارز ۱/۲ تا ۱/۵ درصد نسبت به نشانگرهای مشابه از قبیل AFLP و RFLP، بی‌نیاز از داشتن اطلاعات قبلی از ژنوم (Chawla, 2002; Culley, 1999). با وجود پیشرفت علم بیوتکنولوژی، گزارش بسیار کمی در به‌کارگیری این علم در زمینه این بیماری در سرتاسر کشور به‌ویژه استان ایلام وجود دارد و می‌توان از ظرفیت آن در جهت کنترل این بیماری استفاده کرد. تعیین تنوع ژنتیکی یکی از اهداف مهم این طرح برای رسیدن به ارقام مقاوم به عنوان مهم‌ترین عامل در جهت کنترل این بیماری است. بنابراین تحقیقات گسترده برای مطالعه تنوع ژنتیکی ضروری بوده و هدف از این پژوهش شناسایی و ارزیابی روابط ژنتیکی جمعیت‌های عامل بیماری لکه نواری جو با استفاده از نشانگر ISSR است.



شکل ۱. موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری شده روی نقشه ایران

سدیم) در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی - دکستروز - آگار (PDA) کشت داده شدند. تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری گردیدند. پرگنه قارچ بعد از ۳-۵ روز ظاهر شد. پرگنه‌های تشکیل شده در محیط کشت به محیط‌های جدید PDA منتقل و در شرایط فوق تا پنج روز نگهداری شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک ریشه صورت گرفت. پتری‌ها در انکوباتور در دمای

جداسازی قارچ *P. graminea*

ابتدا در آزمایشگاه نمونه‌های آلوده از قسمت‌های مختلف گیاه شامل ساقه، برگ و بذر آلوده به منظور حذف آلودگی‌های سطحی زیر جریان ملایم آب به مدت ۱۵ دقیقه شست‌وشو داده شدند. بافت‌های آلوده سپس به قطعات کوچک‌تر به طول تقریبی یک سانتی‌متر از حد فاصل بافت سالم و آلوده تقسیم شدند. نمونه‌ها پس از ضدعفونی سطحی با اتانول ۹۶ درصد و محلول وایتکس (دارای ۱ درصد ماده فعال هیپوکلریت

شدند. برای انجام آزمون بیماری‌زایی از گلدان‌هایی به قطر ۱۵ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر استفاده گردید که تا ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر با خاک سترون پر شده بودند. سپس بذرهای آلوده در سطح خاک گلدان‌ها قرار داده شدند و مجدداً خاک سترون تا ارتفاع ۱۸ سانتی‌متری اضافه گردید. پس از قرار گرفتن گلدان‌ها به مدت ۴ هفته در شرایط گلخانه در دمای ۲۵-۱۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰-۸۰ درصد، علائم بیماری روی گیاهان ظاهر شد.

استخراج DNA جدایه‌ها

برای تهیه توده میسلیوم مورد نیاز برای استخراج DNA، از محیط کشت مایع سیب‌زمینی (PDB) سترون‌شده به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات استریتومایسین استفاده شد. استخراج DNA به روش CTAB دوپل و دوپل (Doyle & Doyle, 1990) با اندکی تغییرات صورت گرفت. بررسی کیفیت نمونه‌های DNA از طریق الکتروفورز انجام گرفت. همچنین غلظت DNA توسط دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین گردید.

بررسی تنوع ژنتیکی *P. graminea* با استفاده از

نشانگر ISSR

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۱ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

برای تشخیص تنوع ژنتیکی در جدایه‌های قارچ *P. graminea* از هشت آغازگر ISSR اختصاصی که چندشکلی بالایی داشتند استفاده شد (Bayratkar & Akan, 2010). غلظت DNA در جدایه‌های *P. graminea* با استفاده از اسپکتروفوتومتر تا حد ۲۵ ng/ul تنظیم گردید. واکنش PCR اختصاصی با استفاده از هشت آغازگر به نام‌های ISSR1، ISSR2، ISSR3، ISSR4، ISSR5، ISSR6، ISSR7 و ISSR8 برای نشان دادن تنوع در نمونه‌ها انجام گرفت (جدول ۱). واکنش PCR در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ میلی‌مولار تریس pH=۸/۳، ۵۰ میلی‌مولار KCl به مقدار ۲/۵ میکرولیتر (50mM) $MgCl_2$ ۰/۹ میکرولیتر، (10mM) dNTPs ۱ میکرولیتر، آغازگرها با غلظت ۱۰۰ پیکومولار

۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد با تناوب نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی برای تشکیل پرگنه خالص نگهداری شدند (Freeman, 2005). از آنجا که این قارچ در محیط‌های مصنوعی قادر به تولید اسپور به میزان فراوان نیست و شکل ظاهری اسپورها در تشخیص قارچ عامل بیماری نقش مهمی دارد، از روش اتافک مرطوب برای تولید اسپورها استفاده شد. این روش بدین صورت است که پس از سترون کردن پتری در آن، کاغذ صافی سترون درون پتری قرار داده شد و مقداری آب مقطر سترون به آن اضافه گردید (مقدار آب مقطر به اندازه‌ای بود که فقط کاغذ صافی مرطوب شد). سپس قطعات گیاهی که از حد فاصل بافت آلوده و سالم جمع‌آوری شده از مزرعه تهیه شده بودند، روی لام سترون و روی کاغذ صافی قرار داده شدند و به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از یک هفته اسپورهای قارچ تولید شدند.

آزمون بیماری‌زایی

اثبات بیماری‌زایی در شرایط گلخانه در دمای ۲۵-۱۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰-۸۰ درصد انجام گرفت. درباره قارچ عامل بیماری به دلیل تولید نشدن اسپور کافی در شرایط آزمایشگاه، از روش ساندویچی برای آزمون بیماری‌زایی و آلوده‌سازی بذرها استفاده شد (Jamshidi et al., 2009). در این روش حلقه‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از محیط کشت حاوی جدایه‌های خالص شده قارچ در مرکز پتری محتوی PDA قرار داده شدند و در دمای ۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند تا جدایه‌ها سطح محیط کشت را بپوشانند. از طرف دیگر یک روز قبل از مایه‌زنی، تعدادی بذر جو با محلول وایتکس ضدعفونی شدند و پس از سه بار شست‌وشو با آب مقطر دو بار سترون، بذرها در درون پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب سترون نگهداری شدند. بعد از این عمل، بذرها بین دو لایه محیط کشت PDA حاوی ریشه قرار داده شدند و تشتک‌های پتری حاوی این بذور مایه‌زنی‌شده به مدت ۲۰ روز در انکوباتور در شرایط تاریکی و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به منظور فعالیت قارچ روی بذرها نگهداری

۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، توسعه آغازگرها^۲ در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و توسعه نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید تا باندهای حاصل از واکنش پدیدار شوند. برای رنگ‌آمیزی ژل از محلول سیف استین (safe stain) و برای مشاهده باندهای DNA از دستگاه ژل اسکن (Gel Scan) مدل INTAS استفاده شد.

به مقدار ۱ میکرولیتر، Taq DNA polymerase (500 unit) ۰/۲ میکرولیتر، DNA ژنومی با غلظت ۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر به مقدار ۲/۵ میکرولیتر، آب مقطر سترون ۱۷/۲ میکرولیتر و در یک برنامه حرارتی شامل ۳۳ سیکل چرخه در ترموسایکلر مدل Biorad به صورت واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه، واسرشت‌سازی^۱ در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها^۲ بسته به نوع آغازگرها از ۴۴ تا

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای ISSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pyrenophora graminea*

اندازه مورد انتظار آل‌ها	5'-3'	نام آغازگر
۱۰۰-۱۲۰۰	DDB CCACCACCACCACCA	ISSR1
۷۵-۱۰۰۰	GAGAGAGAGAGAGAT	ISSR2
۱۲۵-۱۲۰۰	ACACACACACACACAYA	ISSR3
۱۰۰-۵۷۴	AGAGAGAGAGAGAGAGT	ISSR4
۲۱۴-۱۰۰۰	GAGAGAGAGAGAGAGAC	ISSR5
۲۱۴-۱۰۰۰	ATGATGATGATGATGATG	ISSR6
۵۰-۱۰۰۰	DVDAAGAAGAAGAAGAAG	ISSR7
۵۰-۱۰۰۰	BDBACAACAACAACAACA	ISSR8

Y = Pyrimidine; D = G, A, or T; B = C, G, or T; V = A, C, or G

محتوای اطلاعات چندشکلی PIC (Polymorphic Information Content)

محتوای اطلاعات چندشکلی نشان‌دهنده میزان چندشکلی یک نشانگر است که می‌تواند از صفر تا یک متغیر باشد. هر چه این عدد بزرگ‌تر باشد، بیانگر فراوانی زیاد چندشکلی برای جمعیت تحت مطالعه است (Mohammadi & Prasanna, 2003) برای بررسی قدرت تفکیک نشانگرها، محتوای اطلاعاتی چندشکلی هر نشانگر با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شد.

$$PIC = 1 - \sum p^2 - q^2$$

در این رابطه p تعداد افرادی که باند دارند به تعداد کل افراد است و q نیز از (1-p) به دست می‌آید.

نسبت چندگانۀ مؤثر (EMR)

بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی با قطعات مختلف در یک گونه بوده که از رابطه زیر محاسبه می‌شود.

$$EMR = \text{تعداد باندهای چندشکل} \times \text{درصد چندشکلی}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌های *P. gramineas* ابتدا باندهای واضح در تصاویر ژل‌ها مشخص شدند. سپس داده‌ها به صورت حضور باند (۱) یا نبود باند (۰) وارد نرم‌افزار Excel شدند. ماتریس تشابه بین جفت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس با نرم‌افزار NTsys ver 2.02 محاسبه گردید. همچنین تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها با روش UPGMA، روش اتصال مجاور (Neighbor joining) و آزمون مانتل با نرم‌افزار NTSYS ver. 2.02 ترسیم شد (Rohlf, 1998). همچنین تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای جدایه‌ها با نرم‌افزار DARwin 5.0158 محاسبه گردید (Perrier, 2007). برای آنالیز مربوط به جمعیت‌ها از نرم‌افزارهای GenALEX ver 6.501 و POPGENE, ver.1.31 استفاده گردید. همچنین معیارهای برآورد و مقایسه کارایی نشانگر مطابق زیر به دست آمد.

شاخص نشانگر (MI)

برای به دست آوردن شاخص نشانگر تعداد نوارهای چندشکل با قطعات مختلف در شاخص محتوای چندشکلی ضرب شد (Kumar et al., 2009).

نتایج و بحث

از کشت نمونه‌هایی با علائم لکه‌های قهوه‌ای‌رنگ و نوری در برگ، ساقه و بذر گیاه جو ۶۹ جدایه به دست آمد. تعداد جدایه‌های حاصل به تفکیک منشأ جغرافیایی

در جدول ۲ آورده شده است. جدایه‌ها به صورت میسیلیوم‌های سفید و سپس به رنگ خاکستری مایل به آبی تا سبز زیتونی رشد کردند. قطر پرگنه‌ها پس از قرار گرفتن به مدت ۵ روز در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به ۸ سانتی‌متر رسید. جدایه‌ها هیچ نوع اسپور غیرجنسی تولید نکردند و تنها با قرار دادن نمونه‌های گیاهی در محیط اتاکنک مرطوب قادر به تولید اسپور شدند. کنیدیوم‌ها استوانه‌ای و راست با ۷-۵ دیواره عرضی، نیمه‌روشن و به رنگ زرد قهوه‌ای بودند.

جدول ۲. مشخصات جدایه‌های *Pyrenophora graminea* از جو در مناطق مختلف استان ایلام

منطقه نمونه‌برداری	تعداد جدایه‌ها	کد جدایه‌ها
دره‌شهر	۱۸	D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, D13, D14, D15, D16, D17, D18
ایوان	۱۲	A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12
چرداول	۱۲	SH1, SH2, SH3, SH4, SH5, SH6, SH7, SH8, SH9, SH10, SH11, SH12
سرابله	۱۲	C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12
حمیل	۴	H1, H2, H3, H4
آبدانان	۵	AB1, AB2, AB3, AB4
مهران	۵	M1, M2, M3, M4, M5
آسمان‌آباد	۱۱	AS1, AS2, AS3, AS4, AS5, AS6, AS7, AS8, AS9, AS10, AS11

که آغازگر ISSR1 با ۳۰ باند بیشترین تعداد آلل را به خود اختصاص داد و آغازگر ISSR4 با ۱۵ باند کمترین تعداد آلل را داشت. میانگین تعداد آلل‌ها توسط نشانگرها ۲۱/۴ بود. تعداد باندها در آغازگرها از ۱۶ تا ۳۰ باند و اندازه باندها بین ۱۲۰۰-۵۰ جفت باز متغیر بود (جدول ۴). نمونه‌ای از الگوی بانندی حاصل از آغازگرها در شکل ۲ آورده شده است. در تحقیقی که Bogacki et al. (2010) در استرالیا روی قارچ *P. graminea* انجام دادند، تعداد باندهای چندشکل برای بهترین آغازگر ۲۰ بود. در تحقیق مشابهی که بر روی نوترکیبی قارچ *P. teres* توسط نشانگر RAPD در جنوب آفریقا صورت گرفت، تعداد کل جایگاه‌ها ۶۵ و تعداد جایگاه‌های چندشکل ۵۴ گزارش گردید (Campbell et al., 2002). در این مطالعه درصد چندشکلی برای همه آغازگرها ۱۰۰ درصد مشاهده شد. در تحقیقات مشابه که در سوریه و استرالیا صورت گرفت، درصد چندشکلی باندها به ترتیب ۷۶/۳۰ و ۸۸/۱۲۵ ذکر شده است (Arabi & Jawhar, 2007; Bogacki et al., 2011).

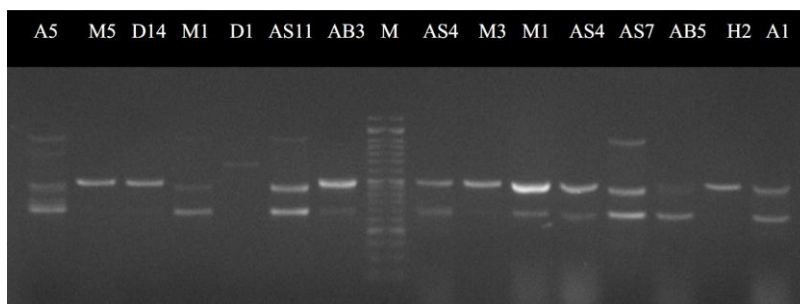
سپس به منظور تسهیل در بررسی و آنالیز ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *P. graminea* تعدادی از جدایه‌ها در پنج جمعیت دره‌شهر، ایوان، چرداول، آسمان‌آباد و سرابله قرار داده شدند (جدول ۳).

جدول ۳. مشخصات جمعیت‌های قارچ *Pyrenophora graminea* به دست آمده از مناطق نمونه‌برداری شده

نام جمعیت	تعداد جدایه‌ها	ردیف
دره‌شهر	۱۶	۱
ایوان	۱۰	۲
چرداول	۸	۳
آسمان‌آباد	۱۱	۴
سرابله	۱۲	۵
-	۵۷	جمع کل

توزیع فراوانی آلل‌ها و محاسبه چندشکلی نشانگرهای ISSR

از جایگاه‌های ISSR که در این مطالعه استفاده شده است، ۱۷۱ آلل مختلف در همه جایگاه‌های ژنی مشاهده گردید



شکل ۲. باندهای DNA حاصل از PCR تکثیر توسط آغازگر ISSR2 در قارچ *Pyrenophora graminea* (ستون M به عنوان ladder 1kb و اندازه هر باند ۱۰۰bp و بقیه ستون‌ها جدایه‌ها هستند.)

توسط نشانگر ITS-RFLP، ۰/۳۶ بود (Zein *et al.*, 2010) نسبت چندگانۀ مؤثر که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در یک ژرم‌پلاسم است، برای هشت آغازگر ISSR بین ۱۵ تا ۳۰ متغیر بود و میانگین آن ۲۱/۴ بود. مقدار محاسبه‌شده شاخص نشانگر در آغازگرهای تحت مطالعه از ۱/۵ تا ۸/۱ متفاوت بود. بیشترین مقدار شاخص نشانگر برای آغازگرهای ISSR1 و ISSR3 گزارش گردید. متوسط شاخص نشانگر برای نشانگرهای تحت مطالعه ۳/۵۷ بود که نشان‌دهندۀ قدرت تفکیک زیاد این آغازگرها است. در تحقیقی که Zein *et al.* (2010)، در سوریه در زمینۀ استفاده از سیستم‌های نشانگری IRAP و ITS-RFLP در بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *P. graminea* انجام دادند، شاخص نشانگر ۲/۴۱ گزارش شد.

محتوای اطلاعات چندشکلی، نسبت چندگانۀ مؤثر و شاخص نشانگر در نشانگرهای ISSR

در جدول ۴ داده‌های به‌دست‌آمده از آغازگرهای مختلف آمده است. بیشترین شاخص محتوای چندشکلی با ۰/۲۷ مربوط به ISSR1 و کمترین میزان شاخص محتوای چندشکلی با میزان ۰/۱۰ مربوط به نشانگر ISSR4 است. برای هشت آغازگر توزیع مقادیر PIC به‌طور میانگین ۰/۱۶ بود (جدول ۴). (Rau *et al.*, 2008)، در ایتالیا نیز که برای بررسی تنوع جدایه‌های *P. teres* از نشانگرهای AFLP استفاده کردند، مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی را ۰/۲۷ گزارش کردند. در تحقیق دیگری در سوریه که درباره‌ی استفاده از سیستم‌های نشانگری در بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *P. graminea* صورت گرفت، میزان محتوای اطلاعات چندشکلی توسط نشانگر IRAP، ۰/۳۸ بود و

جدول ۴. داده‌های به‌دست‌آمده از آغازگرهای ISSR استفاده‌شده برای جدایه‌های *Pyrenophora graminea*

ردیف	نام آغازگر	تعداد آل‌های تکثیری	شاخص محتوای چندشکلی	شاخص نشانگر	نسبت چندگانۀ مؤثر
۱	ISSR1	۳۰	۰/۲۷	۸/۱	۳۰
۲	ISSR2	۲۹	۰/۱۳	۳/۷۷	۲۹
۳	ISSR3	۲۷	۰/۱۵	۴/۱۰	۲۷
۴	ISSR4	۱۵	۰/۱۰	۱/۵	۱۵
۵	ISSR5	۱۷	۰/۲۲	۳/۷۴	۱۷
۶	ISSR6	۲۱	۰/۱۵	۳/۱۵	۲۱
۷	ISSR7	۱۶	۰/۱۲	۱/۹۲	۱۶
۸	ISSR8	۱۶	۰/۱۴	۲/۲۴	۱۶
	-	۱۷۱	۱/۲۸	۲۸/۵۲	۱۷۱
	-	۲۱/۴	۰/۱۶	۳/۵۷	۲۱/۴

بود. بیشترین شباهت ژنتیکی بین جدایه‌های C10 و C6 از شهرستان سیروان با فاصله ژنتیکی ۰/۱۱ و کمترین شباهت بین جدایه‌های A3, D13, D5, D4 و

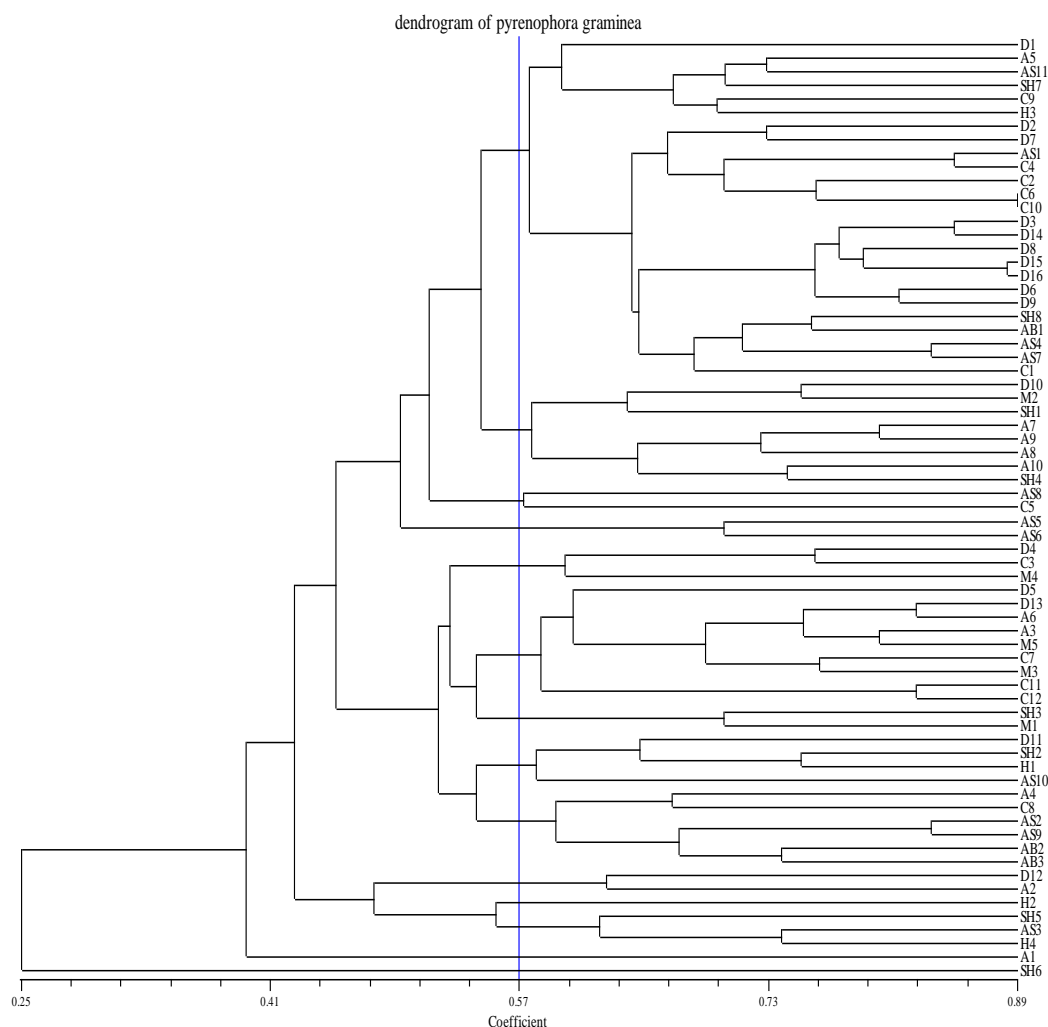
بررسی میزان تشابه جدایه‌ها بر اساس نشانگر ISSR تشابه ژنتیکی جدایه‌ها بر اساس ضریب دایس صورت گرفت و میزان تشابه ژنتیکی از ۰/۱۱ تا ۱/۰۰ متغیر

آن همبستگی بین ماتریس تشابه با فاصله به عنوان ورودی تجزیه خوشه‌ای و تجزیه خوشه‌ای با ضریب کوفنتیک بالاتر به عنوان خروجی آنالیز است. ضریبی که دارای بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک باشد به عنوان بهترین روش تجزیه و تحلیل معرفی می‌شود. ضریب کوفنتیک عددی بین صفر و یک است که هر چه این مقدار بیشتر باشد، نشان‌دهنده برازش بهتری است. نتایج این تحقیق نشان داد که ماتریس تشابه دایس و الگوریتم UPGMA با داشتن بالاترین ضریب کوفنتیک بهترین روش تجزیه و تحلیل جدایه‌های تحت مطالعه است. در رسم دندروگرام جدایه‌ها با ضریب تشابه دایس و روش UPGMA، جدایه‌ها در فاصله ژنتیکی ۰/۸۹-۰/۲۵ قرار داشتند (شکل ۳).

A6 از شهرستان دره‌شهر و SH6 از شهرستان چرداول با فاصله ژنتیکی ۱/۰۰ بود. میانگین فاصله ژنتیکی ۰/۵۵ بود. میانگین تشابه در مطالعه مشابه که توسط نشانگر IRAP بر روی قارچ *P. graminea* صورت گرفت، ۰/۳۴ گزارش شده است (Zein et al., 2010).

آزمون مانتل

آزمون مانتل برای بررسی وجود همبستگی بین اجزای ماتریس‌ها به کار می‌رود. آزمون مانتل برای انتخاب بهترین ماتریس تشابه و همچنین بهترین الگوریتم برای رسم دندروگرام جدایه‌ها بر اساس ضریب کوفنتیک انجام گرفت. یکی از روش‌های مقایسه کارایی الگوریتم‌های مختلف تخمین ضریب همبستگی کوفنتیک است که در

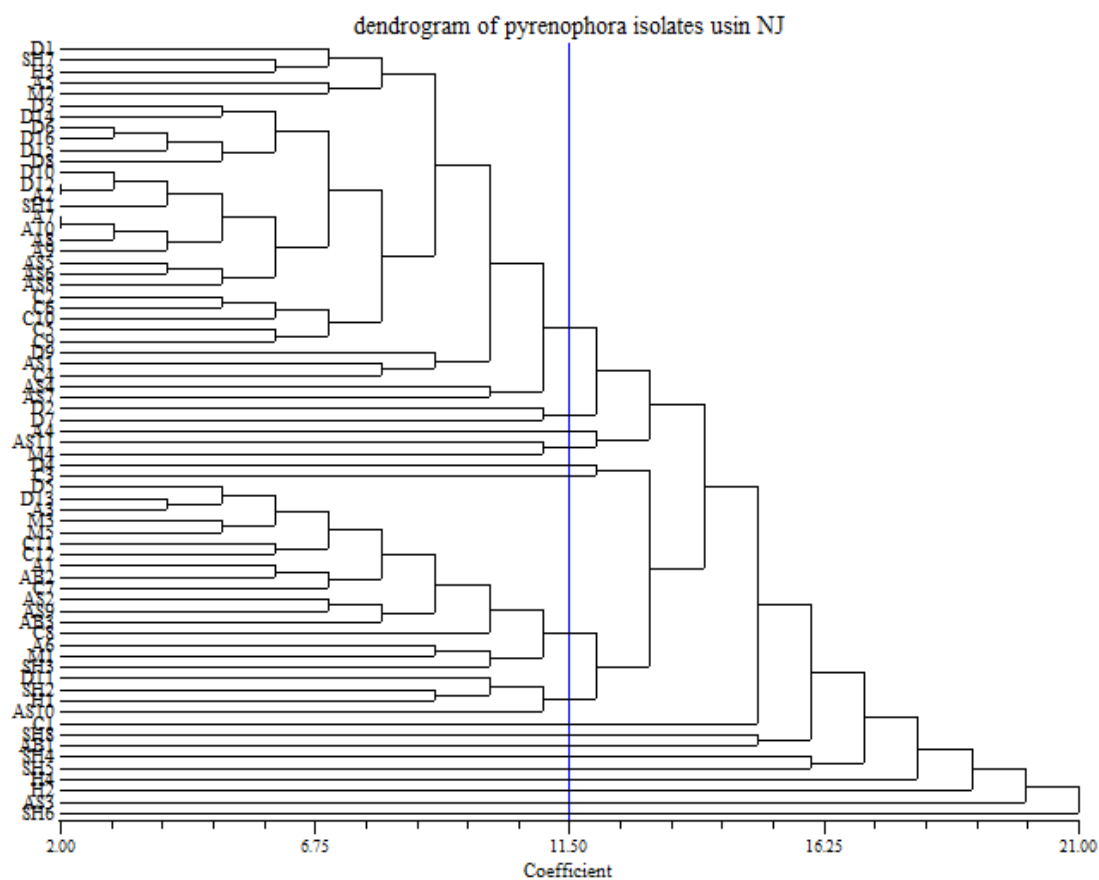


شکل ۳. دندروگرام ایجادشده به وسیله UPGMA از ضریب دایس بر اساس داده‌های حاصل از هشت آغازگر در جدایه‌های *Pyrenophora graminea*.

وجود داشتند. در این زمینه در سوریه برای بررسی خصوصیات ژنتیکی قارچ *P. teres* مطالعه‌ای انجام گرفت و جدایه‌های این قارچ در دوازده گروه قرار گرفتند (Arabi & Jawar, 2007). در تحقیق مشابه دیگری در برزیل در زمینه تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Drechslera tritici-repentis* نتایج تجزیه خوشه‌ای ارتباطی با توزیع جغرافیایی مناطق نشان نداد (Santos & Van Der Stand, 2002).

همچنین دندروگرام حاصل از گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌ها بر اساس الحاق مجاور برای نشان دادن ارتباط ژنتیکی بین آنها نشان داد که جدایه‌ها در فاصله ژنتیکی ۲۱-۲ قرار داشته و در فاصله ۱۱/۵۰، ۱۷ گروه تشخیص داده شد (شکل ۴). این دندروگرام نتایج دندروگرام بالا که این قارچ دارای تنوع ژنتیکی بوده و این تنوع ارتباطی با مناطق جغرافیایی ندارد را تأیید می‌کند.

در فاصله ۰/۵۷ سیزده گروه تشخیص داده شد. این گروه‌ها عبارتند از: گروه یک با ۲۵ جدایه از مناطق نمونه‌برداری شده به جزء آبدانان و مهران، گروه دو با هشت جدایه از مهران، دره‌شهر، ایوان و چرداول، گروه سه با دو جدایه از چرداول و سیروان، گروه چهار با دو جدایه از چرداول، گروه پنج با سه جدایه از دره‌شهر، سیروان و مهران، گروه شش با یازده جدایه از دره‌شهر، ایوان، مهران، سیروان و چرداول، گروه هفت با چهار جدایه از دره‌شهر، حمیل و سیروان، گروه هشت با شش جدایه از ایوان، سیروان، چرداول و آبدانان، گروه نه با دو جدایه از دره‌شهر و ایوان، گروه ده شامل یک جدایه از حمیل، گروه یازده شامل سه جدایه از چرداول، آسمان آباد، گروه دوازده شامل یک جدایه از ایوان و گروه سیزده شامل یک جدایه از چرداول بود. نتایج دندروگرام تطابق چندانی با توزیع جغرافیایی جدایه‌ها نداشت و در این گروه‌ها جدایه‌ها از مناطق مختلف

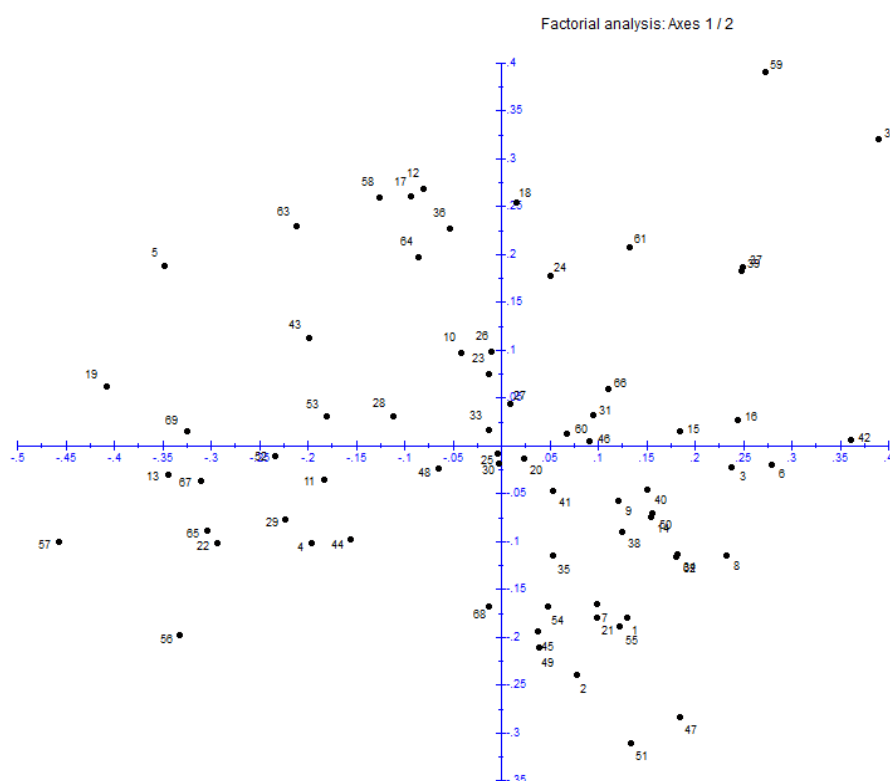


شکل ۴. دندروگرام ایجادشده به وسیله الحاق مجاور بر اساس داده‌های حاصل از هشت آغازگر در جدایه‌های *Pyrenophora graminea*

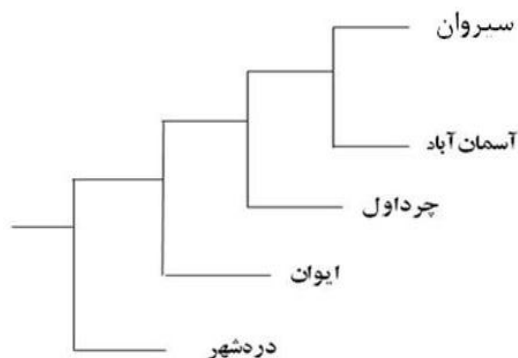
دره شهر و گروه دوم شامل چهار جمعیت شامل ایوان، چرداول، آسمان آباد و سیروان بود. بر این اساس کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های آسمان آباد و سیروان بوده و خود این جمعیت‌ها کمترین فاصله را با چرداول داشته‌اند. بنابراین چهار گروه جمعیتی شامل گروه اول دره شهر، گروه دوم ایوان، گروه سوم چرداول و گروه چهارم سیروان و آسمان آباد در یک دسته قرار گرفته‌اند. در این دندروگرام یک شکاف مشهود بین دسته جمعیتی ایوان، چرداول، آسمان آباد و سیروان با دره شهر وجود دارد (شکل ۶).

برای بررسی نحوه پراکنش جدایه‌های تحت مطالعه، از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای تکمیل تجزیه خوشه‌ای استفاده شد (شکل ۵). پراکنش جدایه‌ها در همه محورهای مختصات معرف تنوع ژنتیکی بالای جدایه‌ها است.

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *P. graminea*
دندروگرام بین جمعیت‌ها نشان داد که جمعیت‌ها به‌طور کلی در دو گروه مشخص قرار گرفته‌اند. گروه اول شامل



شکل ۵. نمودار دوبعدی تجزیه به مختصات اصلی ارتباط ژنتیکی جدایه‌های *Pyrenophora graminea*

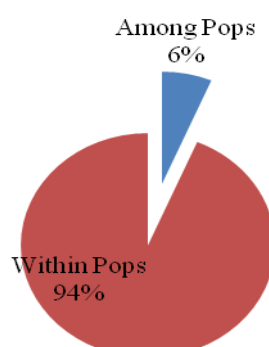


شکل ۶. دندروگرام ارتباط ژنتیکی جمعیت‌های *Pyrenophora graminea* بر اساس UPGMA

موفق عمل کرده است و جمعیت‌ها در دندروگرام حاصل از افراد متفاوتی تشکیل شده‌اند. در مطالعه مشابهی که روی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *P. teres* در سال ۲۰۱۰ در استرالیا انجام گرفت، تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۹ درصد و تمایز ژنتیکی درون جمعیت‌ها ۹۱ درصد گزارش شد (Bogacki *et al.*, 2011). از طرفی پایین بودن واریانس افراد موجود بین گروه‌ها نشان‌دهنده این است که افرادی که در گروه‌های مختلف قرار گرفته‌اند از لحاظ ژنتیکی به هم نزدیک‌اند.

آنالیز تجزیه واریانس مولکولی^۱ (AMOVA) در جمعیت‌ها

بر اساس جدول تجزیه واریانس مولکولی داخل و بین جمعیت‌ها (جدول ۵) الگوی توزیع تنوع مولکولی برای نشانگر ISSR نشان می‌دهد که در حدود شش درصد از واریانس مولکولی به تفاوت بین جمعیت‌ها و ۹۴ درصد مربوط به تنوع داخل جمعیت‌هاست (شکل ۷). تمایز کمتر بین جمعیت‌ها نسبت به داخل جمعیت‌ها نشان‌دهنده این است که گروه‌بندی صورت‌گرفته برای جدایه‌ها در تفکیک جدایه‌ها بر اساس شباهت آنها



شکل ۷. تجزیه واریانس مولکولی مربوط به تنوع ژنتیکی در درون و بین جمعیت‌های *Pyrenophora graminea*

جدول ۵. تجزیه واریانس مولکولی برای جمعیت‌های قارچ *Pyrenophora graminea*

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس هر منبع به واریانس کل
بین جمعیت‌ها	۴	۴۳/۱۱۵	۱۰/۷۷۹	۰/۶۴
داخل جمعیت‌ها	۵۲	۳۱۷/۴۸۱	۶/۱۰۵	۹۴
کل	۵۶	۳۶۰/۵۹۶	۴۴۲/۸	۱۰۰

جدول ۶. تجزیه به مختصات اصلی جمعیت‌های

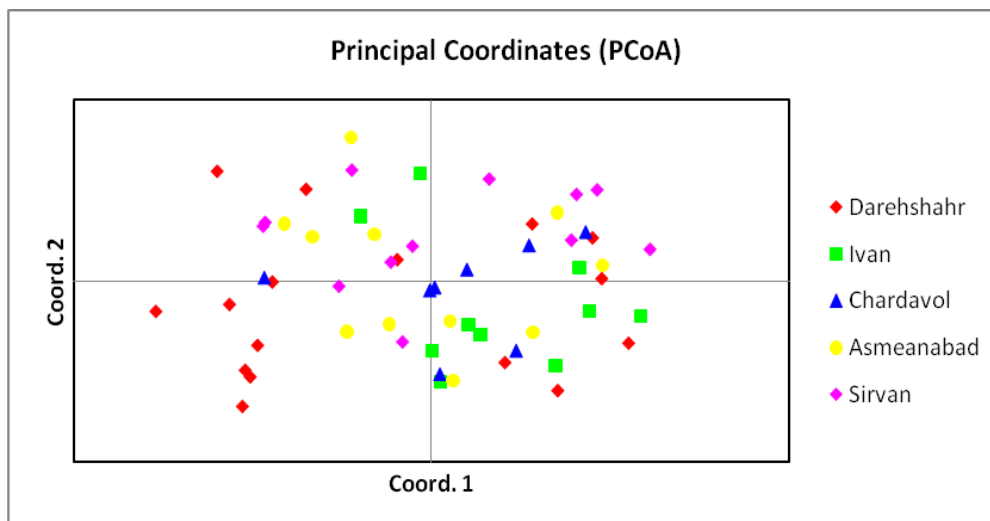
<i>Pyrenophora graminea</i>		
محور	درصد	درصد تجمعی
۱	۱۵/۴۲	۱۵/۴۲
۲	۱۰/۲۵	۲۵/۶۸
۳	۷/۱۹	۳۲/۸۶

بر اساس این جدول مجموع دو مؤلفه اول و دوم، ۲۵/۶۸ درصد از تغییرات را توجیه می‌کنند. مؤلفه اول ۱۵/۴۲ درصد از تغییرات را توجیه می‌کند و مؤلفه دوم ۱۰/۲۵ درصد از تغییرات باقی‌مانده که توسط مؤلفه اول توجیه نشده را توجیه می‌کند (شکل ۸).

تجزیه به مختصات اصلی PCoA و رسم نمودار جمعیت‌ها

پراکنش تجمعی جمعیت‌های تحت مطالعه با استفاده از شباهت ژنتیکی مبتنی بر نشانگر ISSR از روش تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ضریب دایس انجام گرفت و بر اساس محورهای اول و دوم حاصل از تجزیه به مختصات اصلی پراکنده‌ها تحت بررسی قرار گرفت و میزان این تغییرات توسط هر یک از این مؤلفه‌ها و درصد تجمعی محاسبه شد (جدول ۶).

1. Analysis of Molecular Variance



شکل ۸. نمودار دوبعدی تجزیه به مختصات اصلی ارتباط ژنتیکی جمعیت‌های *P. graminea*

مؤثر $1/512$ بود. بیشترین میزان شاخص تصحیح‌شده هتروژنی مربوط به جمعیت دره‌شهر با مقدار $0/342$ و کمترین میزان شاخص تصحیح‌شده مربوط به جمعیت ایوان با مقدار $0/312$ و میانگین میزان شاخص تصحیح‌شده هتروژنی $0/327$ بود. جمعیت دره‌شهر با $0/481$ و جمعیت چرداول با $0/414$ بیشترین مقدار شاخص اطلاعات شانون را در بین جمعیت‌ها داشتند و متوسط این شاخص برای جمعیت‌های تحت مطالعه $0/442$ بود.

اطلاعات تنوع ژنتیکی پنج جایگاه ISSR برای جمعیت‌ها اطلاعات حاصل از پنج جایگاه نشان می‌دهد که جمعیت دره‌شهر با $1/838$ و سیروان با $1/649$ بالاترین تعداد آلل و جمعیت آسمان‌آباد با $1/541$ کمترین تعداد آلل را داشتند و میانگین تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در جمعیت‌های تحت مطالعه $1/638$ بود (جدول ۷). بیشترین تعداد آلل‌های مؤثر مربوط به جمعیت دره‌شهر با $1/546$ و کمترین تعداد آلل‌های مؤثر مربوط به جمعیت چرداول با $1/460$ و متوسط تعداد آلل‌های

جدول ۷. تخمین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Pyrenophora graminea* بر اساس نشانگر ISSR

I	h	Ne	Na	اندازه جمعیت	جمعیت
0/481	0/321	1/546	1/838	16/000	دره‌شهر
0/420	0/281	1/481	1/595	10/000	ایوان
0/414	0/274	1/460	1/568	8/000	چرداول
0/440	0/301	1/532	1/541	11/000	آسمان‌آباد
0/456	0/309	1/540	1/649	12/000	سیروان
0/442	1/486	1/512	1/638	11/400	کل جمعیت‌ها

Na: تعداد آلل مشاهده شده، Ne: تعداد آلل مؤثر، I: شاخص اطلاعات شانون، h: تنوع ژنتیکی

سیروان مشاهده شد (جدول ۸). در تحقیقی که Domenico et al. (2005)، در آلمان برای بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی تیپ‌های آمیزشی^۱ جدایه‌های قارچ *P. teres* انجام دادند، فاصله ژنتیکی را بین $0/01-0/74$ با میانگین $0/29$ گزارش کردند.

اندازه فاصله ژنتیکی دوبه‌دوی جمعیت‌های قارچ *P. graminea* با مقایسه دوبه‌دوی جمعیت‌ها مشخص شد که بیشترین فاصله ژنتیکی با میزان $0/043$ بین جمعیت دره‌شهر با جمعیت‌های آسمان‌آباد و سیروان بود و کمترین فاصله ژنتیکی با میزان $0/019$ بین جمعیت‌های آسمان‌آباد و

جدول ۸. فاصله ژنتیکی بین زوج جمعیت‌های قارچ *Pyrenophora graminea*

سیروان	آسمان‌آباد	چرداول	ایوان	دره‌شهر	دره‌شهر
			۰/۰۰۰	۰/۰۴۰	دره‌شهر
		۰۰/۰۰۰	۰/۰۲۳	۰/۰۳۰	ایوان
	۰/۰۰۰	۰/۰۳۳	۰/۰۳۵	۰/۰۴۳	چرداول
۰/۰۰۰	۰/۰۱۹	۰/۰۳۲	۰/۰۴۲	۰/۰۴۳	آسمان‌آباد
					سیروان

توسعه بهترین روش مدیریت بیماری‌های گیاهی بسیار مهم و بااهمیت است. در همین راستا تنوع ژنتیکی *P. graminea* عامل بیماری لکه نواری جو با نشانگر ISSR بررسی شد. مطالعه حاضر اولین تلاش برای تعیین مشخصات ژنتیکی جدایه‌های *P. graminea* در ایران با کمک نشانگر ISSR است. آنالیز ISSR یک روش مبتنی بر PCR است که باعث تکثیر قطعات DNA که به صورت معکوس بین مناطق ریزماهوره قرار گرفته‌اند می‌شود و دارای مزایای فراوانی مرکب از مزایای RAPD و ریزماهوره است (Peever *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2002; Ratnaparkhe *et al.*, 1998). آنالیز ISSR به طور موفقیت‌آمیزی برای بیان تنوع ژنتیکی در سطوح بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای طیف وسیعی از قارچ‌های مختلف به کار رفته است (Rodrigues *et al.*, 2004; Chadha & Gopalakrishna, 2007; Gurjar *et al.*, 2009).

در این مطالعه تکنیک ISSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی این بیمارگر به کار گرفته شده است. میزان چندشکلی حاصل از نشانگر ISSR ۱۰۰ درصد بود. نتایج این تحقیق بیانگر این است که نشانگر ISSR نشانگر مناسبی برای مطالعات تنوع ژنتیکی در جدایه‌های قارچ *P. graminea* است. استفاده از نشانگرهای ISSR ما را قادر می‌کند که جدایه‌های *P. graminea* را در سطوح مولکولی به گروه‌های مختلف تقسیم کنیم. در این مطالعه تجزیه خوشه‌ای تنوع بالایی را در میان جدایه‌ها نشان داد. بر این اساس سیزده کلاستر تشخیص داده شد و جدایه‌های *P. graminea* از مناطق جغرافیایی مختلف به گروه‌های ژنتیکی مشخص در دندروگرام تقسیم شدند. در این مطالعه مشخص شد که جدایه‌های همه مناطق نمونه‌برداری تنوع ژنتیکی بالایی دارند و از بین جمعیت‌های تحت مطالعه جمعیت دره‌شهر بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان داد.

میزان جریان ژنی در جایگاه‌های تحت مطالعه

جریان ژنی فرایندی طبیعی است که طی آن ژن‌ها از جمعیتی به جمعیت دیگر منتقل می‌شوند. این فرایند به طور طبیعی در میان جوامعی که با هم سازگاری جنسی دارند روی می‌دهد. نتایج جدول جریان ژنی و جدول تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها نشان داد که میزان جریان ژنی با میزان تمایز ژنتیکی رابطه معکوس دارد. هنگامی که جریان ژنی بالا باشد، تمایز ژنتیکی در پایین‌ترین مقدار خود قرار می‌گیرد. در لوکوس‌های تحت بررسی در این پژوهش بیشترین جریان ژنی مربوط به جایگاه سه با مقدار ۱۸۹/۶۶۶۱ و کمترین میزان جریان ژنی مربوط به جایگاه شش و دوازده با مقدار ۱/۹۰۵۹ و متوسط جریان ژنی ۴/۵۷۶۱ و متوسط تمایز ژنتیکی در این تحقیق ۰/۰۹۸۵ است (جدول ۹). در تحقیق Bogacki *et al.* (2010)، در استرالیا بر روی جدایه‌های قارچ *P. graminea* ضریب تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۰/۰۳ گزارش شد. نتایج تحقیق مشابهی در زمینه مطالعه نوترکیبی قارچ *P. graminea* در سال ۲۰۰۲ در جنوب آفریقا ضریب تمایز ژنتیکی ۰/۱۴۹ را نشان داد (Campbell *et al.*, 2002).

این مطالعه برای اولین بار برای تعیین تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های *P. graminea* در استان ایلام واقع در غرب کشور انجام گرفته است. با بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده از ۹۰ درصد نمونه‌ها، قارچ *P. graminea* جداسازی و به عنوان عامل بیماری شناخته شد، زیرا لکه‌های قهوه‌ای‌رنگ روی برگ غلات را علاوه بر قارچ *P. graminea* باکتری *Xantomonas compestris* pv. *translucense* نیز می‌تواند ایجاد کند (Emami & Hassanzadeh, 2004). از این رو جداسازی قارچ *P. graminea* از ۹۰ درصد نمونه‌های جمع‌آوری شده، بیانگر اهمیت فوق‌العاده این بیماری در مزارع جو استان ایلام است.

تعیین مشخصات ژنتیکی بیمارگرهای گیاهی برای

جدول ۹. میزان جریان ژنی در جایگاه‌های تحت مطالعه

*Nm	Gst	Hs	Ht	تعداد جدایه‌ها	جایگاه
۵/۹۷۲۶	۰/۰۷۷۲	۰/۰۸۴۲	۰/۰۹۱۲	۵۷	۱
۱۳/۷۱۵۱	۰/۳۵۲	۰/۰۳۶۵	۰/۰۳۷۸	۵۷	۲
۱۸۹/۶۶۶۱	۰/۰۰۲۶	۰/۲۱۱۵	۰/۲۱۲۱	۵۷	۳
۴/۷۴۹۷	۰/۰۹۵۲	۰/۲۳۲۳	۰/۲۵۶۸	۵۷	۴
۳/۷۸۵۹	۰/۱۱۶۷	۰/۴۰۸۳	۰/۴۶۲۲	۵۷	۵
۱/۹۰۵۹	۰/۲۰۷۸	۰/۳۶۵۸	۰/۴۶۱۸	۵۷	۶
۳/۷۰۲۲	۰/۱۱۹۰	۰/۳۳۹۷	۰/۳۸۵۵	۵۷	۷
۱۰۵/۸۹۹۱	۰/۰۰۴۷	۰/۴۹۶۹	۰/۴۹۹۲	۵۷	۸
۲۲/۸۲۳۱	۰/۰۲۱۴	۰/۲۱۷۰	۰/۲۲۱۸	۵۷	۹
۴/۳۴۹۵	۰/۱۰۳۱	۰/۳۴۲۳	۰/۳۸۱۶	۵۷	۱۰
۳/۷۸۵۹	۰/۰۶۳۶	۰/۳۸۶۲	۰/۴۱۲۵	۵۷	۱۱
۱/۹۰۵۹	۰/۰۲۵۶	۰/۰۱۲۳	۰/۰۱۲۶	۵۷	۱۲
۳/۷۰۲۲	۰/۰۷۰۷	۰/۳۲۶۹	۰/۳۵۱۸	۵۷	۱۳
۲/۱۵۱۰	۰/۱۸۸۶	۰/۳۷۶۱	۰/۴۶۳۵	۵۷	۱۴
۷/۳۵۵۵	۰/۰۸۳۶	۰/۴۴۶۵	۰/۴۸۷۳	۵۷	۱۵
۱۹/۰۵۷۵	۰/۱۳۵۰	۰/۴۲۳۴	۰/۴۸۹۵	۵۷	۱۶
۶/۵۷۲۷	۰/۴۵۱۲	۰/۲۵۴۵	۰/۴۶۳۷	۵۷	۱۷
۲/۱۵۱۰	۰/۰۴۰۵	۰/۴۷۶۴	۰/۴۹۶۵	۵۷	۱۸
۵/۲۰۵۸	۰/۰۸۷۶	۰/۳۷۲۸	۰/۴۰۸۶	۵۷	۱۹
۸/۶۲۴۰	۰/۰۵۴۸	۰/۳۱۹۴	۰/۳۳۸۰	۵۷	۲۰
۲/۲۷۱۱	۰/۱۸۰۴	۰/۲۷۹۰	۰/۳۴۰۴	۵۷	۲۱
۲۸/۵۷۵۴	۰/۰۱۷۲	۰/۴۸۴۳	۰/۴۹۲۸	۵۷	۲۲
۱۷/۵۶۰۶	۰/۲۷۷	۰/۰۳۱۸	۰/۰۳۲۷	۵۷	۲۳
۱۳/۳۳۱۸	۰/۰۳۶۱	۰/۰۷۷۵	۰/۰۸۰۴	۵۷	۲۴
۱۶/۱۳۲۷	۰/۰۳۰۱	۰/۰۳۷۲	۰/۰۳۸۴	۵۷	۲۵
۲۰/۵۵۵۲	۰/۰۲۳۷	۰/۳۶۱۰	۰/۳۶۹۸	۵۷	۲۶
۱۲/۹۶۹۲	۰/۰۳۷۱	۰/۴۱۵۷	۰/۴۳۱۷	۵۷	۲۷
۳/۶۷۹۶	۰/۱۱۹۶	۰/۲۶۳۱	۰/۲۹۸۸	۵۷	۲۸
۳/۲۵۶۴	۰/۱۳۳۱	۰/۰۸۵۷	۰/۰۹۸۹	۵۷	۲۹
۲۳/۳۰۲۶	۰/۰۲۱۰	۰/۰۹۵۵	۰/۰۹۷۵	۵۷	۳۰
۱۳/۵۰۸۴	۰/۰۳۵۷	۰/۴۰۴۲	۰/۴۱۹۲	۵۷	۳۱
۸/۵۸۵۸	۰/۰۵۵۰	۰/۰۵۱۹	۰/۰۵۴۹	۵۷	۳۲
۲/۸۶۱۲	۰/۱۴۸۸	۰/۳۲۱۵	۰/۳۷۷۷	۵۷	۳۳
۱۷/۹۰۵۲	۰/۰۲۷۲	۰/۱۵۲۶	۰/۱۵۶۸	۵۷	۳۴
۱۸/۷۳۷۳	۰/۰۲۶۰	۰/۱۹۷۱	۰/۲۰۲۳	۵۷	۳۵
۲۳/۵۶۹۸	۰/۰۲۰۸	۰/۱۲۶۱	۰/۱۲۸۸	۵۷	۳۶
۷/۸۸۸۵	۰/۰۵۹۶	۰/۰۵۴۱	۰/۰۵۷۵	۵۷	۳۷
۴/۵۷۶۱	۰/۰۹۸۵	۰/۲۵۸۶	۰/۲۸۶۸	۵۷	میانگین

Gst = میزان تمایز ژنتیکی Nm^{*} = میزان جریان ژنی

سطوح پایینی از تنوع ژنی در میان همه پنج جمعیت شناسایی شد. با مقایسه دوبه‌دوی جمعیت‌ها مشخص شد

بیشترین تنوع ژنتیکی در این مطالعه در داخل جمعیت‌های منطقه‌ای وجود داشت و به همان نسبت

شود و انتشار فرم غیرجنسی قارچ با کمک عملیات زراعی و همچنین انتقال بذر به مناطق مختلف به توزیع فراوانی آلل‌ها کمک کند. به‌علاوه بذر آلوده در این بیماری می‌تواند به پایداری ژنوتیپ‌ها کمک کند و ممکن است عامل توزیع و تنوع ژنوتیپ‌ها در آخر فصل رشد در درون جمعیت‌های این بیماری شود. بنابراین یکنواختی ژنتیکی جدایه‌های *P. graminea* در بعضی از مناطق جغرافیایی ممکن است ناشی از درجاتی از نوترکیبی جنسی در شرایط مزرعه باشد. در این باره در یک مطالعه ارتباط ژنتیکی در بین جدایه‌های *P. graminea* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تخمین زده شد و میزان تشابه ژنتیکی از ۸۶/۸ درصد تا ۹۷/۶ درصد در میان جدایه‌ها مشاهده گردید (Bakonyi & Justesen, 2007).

در این مطالعه بینش ما نسبت به تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های *P. graminea* افزایش یافته است و بررسی‌های بیشتر این قارچ با تکنیک‌های مولکولی در به‌دست آوردن اطلاعات بیشتری در زمینه ساختار ژنتیکی این قارچ می‌تواند مفید باشد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی بالایی در بین جدایه‌ها مشاهده گردید و این نشان‌دهنده این است که پتانسیل ایجاد خسارت در مزارع جو وجود دارد. افزایش تنوع ژنتیکی جدایه‌ها در هر منطقه باعث افزایش پتانسیل سازگاری آن جدایه‌ها در مقابل تغییرات شرایط محیطی و روش‌های کنترل می‌گردد. این تنوع بالا به اصلاح‌کنندگان کمک می‌کند که واریته‌هایی که پتانسیل مقاومت دارند را مطابق با تنوع ژنتیکی قارچ برای رسیدن به ارقام با مقاومت پایدار آزمایش کنند. همچنین اقدامات و مقررات قرنطینه‌ای را برای جلوگیری از ورود جدایه‌های جدید از مناطق دیگر را به‌طور جدی در نظر بگیرند.

با توجه به شیوع این بیماری در بسیاری از مناطق کشور و از آنجا که در هیچ یک از این مناطق تنوع ژنتیکی این بیمارگر مطالعه نشده است، پیشنهاد می‌گردد که مطالعات تعیین تنوع ژنتیکی قارچ *P. graminea* در سطح وسیع در کشور انجام گیرد تا بتوان با تلاش‌های گسترده و هدفدار از قبیل کاربرد ژن‌های مقاوم یا مخلوطی از واریته‌ها برای کنترل پایدار بیماری گام برداریم. همچنین لازم است که تحقیقات دیگری در زمینه‌های مختلف این بیماری صورت گیرد.

که بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت دره‌شهر با جمعیت‌های آسمان‌آباد و سیروان بود و کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های آسمان‌آباد و سیروان وجود دارد. دندروگرام فاصله ژنتیکی ترسیم‌شده نتایج مقایسه دوه‌دوی جمعیت‌های تحت مطالعه را تأیید کرد و جمعیت‌ها را به دو گروه کلی تقسیم کرد که گروه اول شامل جمعیت دره‌شهر و گروه دوم شامل چهار جمعیت دیگر بود. این شکاف ژنتیکی را شاید بتوان با توجه به بالا بودن مسافت جغرافیایی این جمعیت با چهار جمعیت دیگر توجیه کرد. جریان ژنی یکی از نیروهای تکاملی است که نقش بسیار مهمی در تنوع ژنتیکی یک جمعیت دارد. در غیاب جریان ژنی، ریزش ژنتیکی باعث تفاوت در فراوانی آلل‌ها در جایگاه‌های ژنی خنثی^۱ درون جمعیت می‌گردد و باعث افزایش تمایز جدایه‌ها در جمعیت‌ها می‌شود (McDonald, 1997). در جمعیت‌های تحت مطالعه در این تحقیق تمایز ژنتیکی پایینی وجود داشت. چندین عامل ممکن است عامل این تمایز پایین باشد. فاصله جغرافیایی میان جمعیت‌ها زیاد نبوده و همین فاصله ممکن است باعث نقل و انتقال بالای بیماری لکه نواری از طریق جابه‌جایی بقایای گیاهی آلوده و بذر آلوده گردد. مبادله بذر آلوده به این بیماری احتمالاً عمومی‌ترین عامل به حساب می‌آید و این بذور جو ممکن است دارای درجاتی از آلودگی باشند و باعث گسترش بیماری و استقرار آلودگی در مزارع شوند. قارچ *P. graminea* یک قارچ هتروتالیک است که دارای دو تیپ آمیزشی به نام‌های *Mat1-1* و *Mat1-2* است. برای تشکیل فرم جنسی، به این دو تیپ آمیزشی و فراهم آمدن شرایط محیطی مناسب نیاز است و در صورتی که هر دو تیپ آمیزشی و شرایط محیطی مناسب در هر منطقه وجود داشته باشند، اندام جنسی پریتسیوم تشکیل می‌شود. در این‌گونه مناطق که قارچ *P. graminea* دارای سیکل جنسی است، آسکوسپورها نقش زادمایه اولیه را داشته و در بیولوژی بیماری لکه نواری نقش مهمی خواهند داشت و همچنین باعث نوترکیبی ژنتیکی و به دنبال آن تنوع ژنتیکی می‌گردند. با توجه به دلایل بیان‌شده، ممکن است قارچ *P. graminea* به‌صورت جنسی و غیرجنسی تکثیر

REFERENCES

1. Arabi, M. I. E. & Jawhar, M. (2007). Heterogeneity in *Pyrenophora graminea* as revealed by ITS-RFLP. *Journal of Plant Pathology*, 89, 391-395.
2. Babadost, M. (1998). Barley Strip Disease (*Pyrenophora graminea* Itao and Kur.) Tabriz University publications. 32p.
3. Bakonyi, J. & Justesen, A. F. (2007). Genetic relationship of *Pyrenophora graminea*, *P. teres* f. sp. *aculata* and *P. teres* f. sp. *teres* assessed by RAPD analysis. *Journal of Phytopathology*, 155, 76-83.
4. Bahmnya, M. R. (1994). Cold cereal. Tehran University Institute of Publishing and Printing. 634p.
5. Bayratkar, H. & Akan, K. (2012). Genetic characterization of *Pyrenophora graminea* isolates and the reactions of some barley cultivars to leaf stripe disease under greenhouse conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 36, 329-339.
6. Bogacki, P., Keiper, F.J. & Oldach, K.H. (2011). Genetic structure of South Australian *Pyrenophora teres* populations as revealed by microsatellite analyses. *Fungal Biology*, 114, 834-841.
7. Campbell, F. & Lucas, A. (2002). Evidence of recombination between net- and spot-type populations of *Pyrenophora teres* as determined by RAPD analysis. *The British Mycological Society*, 106, 602-608.
8. Chadha, S. & Gopalakrishna, T. (2007). Comparative assessment of REMAP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*. *Current Science*, 93, 688-692.
9. Chakraborty, S. & Newton, A. C. (2011). Climate change, plant diseases and food security. An overview. *Plant Pathology*, 60(1), 2-14.
10. Chawla, H. S. (2002). Introduction to plant biotechnology, Technology & Engineering, 288p.
11. Culley, T. (1999). Population genetic analysis of ISSR data. Biology Protocoles. Extraído el 5 de octubre de 2009 del sitio web: <http://www.biology.uc.edu/faculty/culley/Protocols/Population%20Genetic%20Analysis%20of%20ISSR%20Data.pdf>.
12. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12, 13-15.
13. Freeman, J., Ward, E., Gutteridge, R. J. & Bateman, G. L. (2005). Methods for studying population structure, including sensitivity to the fungicide silthiofam, of the cereal take- all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Plant Pathology*, 54, 686-698.
14. Gurjar, G., Barve, M., Giri, A. & Gupta, V. (2009). Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. *Mycologia*, 101, 480-491.
15. Jamshidi, S., Ghaffari, A., Sadeghzadeh, M. & Mianaji, M. (2008). Assessment of barley seeds chemical treatments with some conventional fungicides on barley strip controlling. *Journal of New Agriculture Sciences*, 8, 17-25.
16. Jawhar, M. & Arabi, M. I. E. (2006). Genetic variability among *Pyrenophora graminea* isolates. *Australasian Plant Pathology*, 35, 279-281.
17. Kumar, M., Mishra, G. P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P. K. & Singh, S. B. (2009). Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3), 225-236.
18. McDonald, B. A. (1997). The population genetics of fungi. Tools and techniques. Symposium on population genetics of soilborne fungal Plant Pathogens. *Phytopathology*, 87(4), 448-453.
19. McMullen, M. & Adhikari, T. (2009). Fungal leaf Spot diseases of wheat tan spot. *Stagonospora nodorum* blotch and *Septoria tritici* blotch, Plant Disease Management. 1249(revised).
20. Mohammadi, S. A. & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant: Salien statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 1248-1235.
21. Nielsen, M. & Bent, J. (2002). Screening for resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in barley, Proceedings of the second international workshop on barley leaf blights. ICARDA Aleppo. Syria, 277-280.
22. Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
23. Peever, T. L., Ibanez, A., Akimitsu, K. & Timmer, L. W. (2002). Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 92, 794-802.
24. Perrier, X. & Jacquemoud-Collet, J. P. (2007). DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
25. Rachdowang, S. (1999). *PCR-based test for differentiating varieties of Gaeumannomyces graminis, the take-all pathogens*. Ph.D. thesis. Virginia polytechnic institute and state university. 184p.
26. Ratnaparkhe, M. B., Tekeoglu, M. & Muehlbauer, F. J. (1998). Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphism are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 515-519.

27. Rau, D., Attene, G., Brown, A. H. D., Nanni, L., Maier, F. J., Balmas, V., Saba, E., Schafer, W. & Papa, R. (2008). Diversity and evolution in the barley pathogen *Pyrenophora teres*. *Options Mediterraneans*, 81, 147-150.
28. Reddy, M. P., Sarla, N. & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17.
29. Rodrigues, K. F., Sieber, T. N., Grunig, C. R. & Holdenrieder, O. (2004). Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *Mycological Research*, 108, 45-52.
30. Rohlf, F. J. (1998). NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Exeter Software. Setauket.
31. Santos, A. M. & Vanderstand, M. (2002). Intra specific genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* as detected by random amplified polymorphic DNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 243-250.
32. Statkeviciute, G., Brazauskas, G. & Semaskiene, R. (2010). *Pyrenophora teres* genetic diversity as detected by ISSR analysis. *Zemdirbyste = Agriculture*, 97(9), 91-98.
33. Yeh, F.C., Yang, R.C. & Boyle, T. (1999). Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis (POPGENE), ver.1.31, <ftp://ftp.microsoft.com/softlib/MSLFILES/HPGL.EXE>.
34. Zein, I., Jawhar, M. & Arabi, M. (2010). Efficiency of IRAP and ITS-RFLP marker systems in accessing genetic variation of *Pyrenophora graminea*. *Genetics and Molecular Biology*, 33(2), 328-332.