

## تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Rhynchosporium secalis* عامل بیماری اسکالد جو در استان ایلام

خشنود نوراللهی<sup>۱</sup> و علی علیخانی<sup>۲</sup>

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه ایلام؛ ۲- دانشجوی سابق بیماری شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی دانشگاه ایلام  
(تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۲؛ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۳)

### چکیده

اسکالد یا کچلی جو یکی از بیماری‌های متداول جو در اکثر مناطق دنیا می‌باشد. برای تعیین تنوع ژنتیکی در جدایه‌های *Rhynchosporium secalis* از گیاهان آلوده جو در مزارع مختلف استان شامل ایلام، آسمان آباد، سرابله، شباب، ایوان و سیروان که لکه‌های قهوه‌ای مایل به زرد با حاشیه قهوه‌ای در قسمت‌های هوایی برگ و ساقه داشتند، نمونه برداری شد. ۴۷ جدایه با استفاده از محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار برای اهداف این مطالعه به دست آمد. برای مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌ها، از نشانگرهای ریزماهواره استفاده شد. تعداد آلل ۴۲ در بین همه جدایه‌ها در اثر پنج جفت آغازگر ریزماهواره مشخص شد. تعداد آلل‌ها برای هر نشانگر بین ۷ تا ۱۲ عدد بود. شاخص نشانگر در آغازگرهای مورد مطالعه از ۱/۸ تا ۶/۷ متغیر بود. میزان تشابه ژنتیکی جدایه‌ها بر اساس ضریب دایس از صفر تا ۱ متغیر بود. با رسم دندروگرام جدایه‌ها در فاصله ۰/۵۴ شانزده گروه تشخیص داده شد. در فنوگرام حاصل از گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس روش الحاق مجاور ۱۷ گروه تشخیص داده شد. دانش تنوع ژنتیکی در *R. secalis* سطوح مختلفی از اطلاعات را برای مدیریت منابع ژرپلاسم فراهم می‌کند. نتایج به دست آمده از این مطالعه در اصلاح ارقام مقاوم و گسترش اقدامات قرنطینه‌ای مفید است.  
واژه‌های کلیدی: جو، تنوع ژنتیکی، *Rhynchosporium secalis*، ریزماهواره.

### Genetic diversity of *Rhynchosporium secalis* isolates causal agent of barley scald in Ilam province

KH. NOUROLLAHI<sup>1</sup> and A. ALIKHANI<sup>2</sup>

1- Assistant professor of plant protection department, Ilam University 2- Former M. Sc student of plant pathology, plant protection department, Ilam University

### Abstract

One of the most important diseases of barley is scald in the world. In order to determine genetic diversity of *Rhynchosporium secalis* isolates, barley plants with yellowish brown spots with brown margin, especially on leaves and stems were collected from different regions of Ilam province including: Ilam, Asemanabad, Srableh, Shabab, Ivan and Sirvan. 47 isolates obtained from infected samples using potato dextrose agar for the purposes of this study. To study the genetic diversity of the isolates, microsatellite markers were used. A set of five microsatellite primer pairs revealed a total of 42 alleles in *R. secalis* isolates in all isolates. The number of alleles varied from 7 to 12 for each marker. The number of marker index (MI) in all primers varied from 1.8 to 6.7 and genetic similarity based on Dice coefficient was zero to one. Phonogram revealed 16 distinct groups in 0.54 similarity distance, but based on neighbor joining 17 groups were determined. Knowledge of genetic diversity in *R. secalis* provides different levels of information which is important in the management of germplasm resources. Results from this study will be useful in breeding for barley resistant cultivars and developing necessary quarantine regulations.

**Key words:** Barley, Genetic diversity, *Rhynchosporium secalis*, SSR.

## مقدمه

بیماری اسکالد جو در اکثر نقاط دنیا به خصوص در مناطق خنک و نیمه مرطوب متداول است، در همه گیری‌های شدید ۳۰ تا ۴۰ درصد کاهش محصول برآورده شده است، اما در ارقام حساس می‌تواند تا ۱۰۰ درصد خسارت بزند. کاهش محصول به سبب کاهش وزن دانه رخ می‌دهد، در آلودگی‌های شدید ممکن است تعداد دانه‌ها در هر خوشه و تعداد خوشه‌ها در هر بوته کاهش یابد (Mather, 1985). سوختگی برگ‌ها یا اسکالد در هر جا که محصول جو رشد می‌کند وجود داشته و چندین میلیون هکتار از مزارع جو در قاره آفریقا، غرب و مرکز آسیا از جمله ایران، قاره اقیانوسیه، قاره اروپا و قاره آمریکا را آلوده می‌کند (Abang et al., 2006). اهمیت اقتصادی محصول جو باعث انجام مطالعات زیادی در مورد تنوع ژنتیکی قارچ *Rhynchosporium secalis* شده است. نشانگرهای مولکولی مانند ایزوآنزیم‌ها (Burdon et al., 1997)، RFLP<sup>۱</sup> (McDonald et al., 1999)، AFLP<sup>۲</sup> (Bouajila et al., 2007) و RAPD<sup>۳</sup> (Goodwin, 1992) جهت اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در این قارچ مورد استفاده قرار گرفته‌اند. *R. secalis* یک بیماری‌گر به شدت تغییر پذیر است و جمعیت‌های آن قادرند به سرعت در واکنش به انتخاب القاء شده توسط یک دسته ژن مقاومت اصلی در جو یا قارچکش‌ها تغییر کنند، این حالت می‌تواند منجر به غیر مؤثر شدن مقاومت این ارقام تجاری در سطح وسیع و در طی فصول رشدی گردد (Oxley et al., 2003; Newton et al., 2001). جدایه‌های حاصل از جمعیتی از قارچ *R. secalis* اغلب از نظر بیماری‌زایی (Goodwin et al., 1994)، نسبت اسپوردهی، مورفولوژی، رنگ پرگنه، اندازه کینیدیوم (McDonald et al., 1989)، پاسخ به شرایط غذایی، حساسیت به قارچکش‌ها (Cooke et al., 2004; Newton et al., 2001) و پروفیل مولکولی

(Williams et al., 2003; Kari and Griffiths, 1993) متنوع است.

با بررسی جمعیت‌های قارچ *R. secalis* در پنج کشور نتیجه گرفتند که بیش از ۴۰ درصد تغییرات وسیع RFLPs در *R. secalis* در یک مترمربع از نواحی نمونه‌برداری شده دیده شد و بیش از ۶۰ درصد تغییرات در یک مزرعه جو دیده شد، همچنین بیشترین تنوع جمعیتی *R. secalis* در شمال اروپا نسبت به شرق اروپا که منشأ اصلی میزبان جو در اروپا می‌باشد دیده شده است (Zaffarano et al., 2006). با استفاده از نشانگرهای RFLPs تعداد ۲۵۶ جدایه از قارچ *R. secalis* مورد ارزیابی قرار گرفت و این تعداد جدایه، به ۲۱۴ گروه ژنوتیپی مجزا تقسیم شدند (McDonald et al., 1999). با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD تعداد ۶۳ جدایه از قارچ *R. secalis* از مناطق مختلف در کشور سوریه بدست آمده و به ۱۸ هاپلوטיפ تقسیم شدند و نتیجه‌گیری شده است که ارتباطی بین میزان تنوع ژنتیکی و منشأ جغرافیایی قارچ وجود ندارد و این دو مستقل از هم می‌باشند (Arabi et al., 2008).

ترکیب آزمون بیماری‌زایی با نشانگرهای مولکولی به عنوان یک ابزار سودمند و بالقوه جهت پاسخگویی به سولات متعدد در خصوص ژنتیک جمعیت‌های *R. secalis* می‌باشد (McDonald and Linde, 2002). اثرات رانش ژن<sup>۴</sup> و نوترکیبی روی تنوع جمعیت بیماری‌گرها براساس آنالیز ژنتیکی بیماری‌زایی، ایزوزیم‌ها، رنگ پرگنه، rDNA و RFLPs در تعدادی از جدایه‌های *R. secalis* گزارش شده است و نتایج نشان داده که ساختار ژنتیکی بیماری‌گر و میزبان، متأثر از تغییرات در ژن بیماری‌زایی بیماری‌گر و ژن مقاومت میزبان است (McDermott et al., 1989). بیماری‌گرهایی که زاد مایه آن‌ها بتوانند در طی مسافت‌های طولانی منتشر شوند، می‌توانند قابلیت پخش شدن در نواحی جغرافیایی جدید را داشته باشند (Linde et al., 2009). در شرایط اقلیمی متغیر، جمعیت بیماری‌گر نیازمند به قرار گرفتن در شرایط مهاجمی بالاتر است تا بتوانند

۱-Restriction fragment length polymorphism

۲-Amplified fragment length polymorphism

۳-Random Amplified Polymorphic DNA

۴-Genetic drift

تا بتوان به کمک آن مدل‌های مطمئنی برای تعیین میزان بیماریزایی این بیمارگر و میزان تغییرپذیری آن ارائه کرد و نهایتاً در راستای تغییرپذیری بیمارگر، به ارقام مقاوم و پایدار دست یافت.

### روش بررسی

**نمونه برداری، جداسازی و آزمون بیماریزایی:** در سال ۱۳۹۱، نمونه‌برداری از اواخر فروردین تا اواسط خرداد بسته به شرایط آب و هوایی منطقه از اندام‌های هوایی گیاهان آلوده به بیماری اسکالد<sup>۲</sup> یا سوختگی برگی جو در اغلب مناطق استان ایلام از جمله، آسمان‌آباد، سرابله، شباب، ایوان، سیروان و ایلام صورت گرفت. این نمونه‌ها همراه با مشخصات آنها در پاکت‌های کاغذی نگهداری و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌های آلوده برای انجام آزمایش‌های بعدی بمدت یک‌ماه در یخچال در دمای ۴°C تا ۵°C نگهداری شدند. برای جداسازی قارچ، ابتدا بافت‌های گیاهی آلوده از حدواسط بافت آلوده و سالم به قطعات نیم تا یک سانتی‌متری تقسیم شدند. پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده (۱٪ ماده فعال) به مدت ۲-۱ دقیقه و سپس در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه، با آب مقطر سترون سه بار شستشو داده شدند، سپس این قطعات را با کاغذ صافی سترون خشک کرده و تعداد ۳-۵ قطعه از هر نمونه روی محیط کشت عصاره سیب زمینی دکستروز آگار<sup>۳</sup> منتقل گردیدند. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۱۶°C به مدت دو هفته در تاریکی نگهداری شدند. برای نگهداری قارچ عامل بیماری، کشت خالص هر یک از جدایه‌ها به روش تک‌اسپور کردن به دست آمد (جدول ۱). برای انجام آزمون بیماریزایی، ابتدا پنج عدد بذر درگلدان‌های حاوی خاک و ماسه به نسبت ۳:۱ کاشته شدند. بعد از اینکه گیاهچه‌ها به سن دو هفته‌ای رسیدند، گیاهان با سوسپانسیون اسپور با غلظت  $2 \times 10^6$

بقا یابد و لازمه این حالت داشتن تنوع ژنتیکی بالا جهت سازگاری با این شرایط است (Bouajila et al., 2007). شرایط فیزیکی محیط نقش مهمی را در ساختار جمعیت‌های *R. secalis* بازی می‌کند (Abang et al., 2006). دانش ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند در پیش‌بینی تعیین ریسک نسبی بوجود آمده توسط بیمارگرهای مختلف مورد استفاده قرار گیرد (Linde et al., 2009). مدل‌هایی برای تعیین میزان خطرناک بودن جمعیت‌های بیمارگر توسط McDonald and Linde (2002) ارائه شد و بیمارگرهایی که بالاترین میزان خسارت را داشتند دارای سیستم تولید مثلی پیچیده‌ای بودند. پتانسیل بالا برای جریان ژنی اندازه جمعیت موثر بزرگ و بروز جهش‌های زیاد در تنوع ژنتیکی بیمارگرها موثرند. برای بررسی تنوع ژنتیکی می‌توان از انواع نشانگرها استفاده کرد، نشانگرهای<sup>۱</sup> DNA دارای قدرت تمایز بیشتری نسبت به نشانگرهای مورفولوژیک و پروتئینی هستند، در میان نشانگرهای DNA، نشانگرهای ریزماهواره به دلیل چندشکلی بالا، توارث پذیری، همباز بودن و فراوانی، نشانگرهای ایده‌آلی برای دامنه وسیعی از کاربردها از جمله تهیه نقشه ژنتیکی، گزینش به کمک نشانگر، مطالعات ژنتیک جمعیت و تکامل آن، انگشت نگاری ژنتیکی، تجزیه و تحلیل تبار آن و تعیین میزان تغییرات تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما هستند (Kolliker et al., 2001).

قارچ‌های بیماریزای گیاهی از نظر ژنتیکی و راه‌های تعامل با سایر میزبان‌ها دارای تنوع بالایی می‌باشند، برای فهم نقشی که بیمارگرها در شکل‌گیری ساختار ژنتیکی و جمعیت‌های میزبان‌شان دارند، دانستن تنوع ژنتیکی این بیمارگرها و ایجاد روابط تکاملی بین بیمارگر و میزبان‌های آنها مورد نیاز می‌باشد (Burdon and Silk, 1997). هدف از انجام این تحقیق بررسی تنوع و تغییرات ژنتیکی قارچ عامل بیماری اسکالد جو با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بود

<sup>۲</sup>-Scald

<sup>۳</sup>-PDA

<sup>۱</sup>-Deoxyribonucleic acid

گلدان‌ها به صورت یک روز در میان آبیاری شده و گیاهچه‌ها به مدت یک ماه در این شرایط نگهداری شدند. بعد از گذشت یک ماه نشانه‌های بیماری روی اندام‌های گیاهان ظاهر شدند. در نهایت با بررسی نشانه‌های بیماری اثبات بیماریزایی از طریق اصول کخ، صورت گرفت.

اسپور در میلی لیتر در آب مقطر سترون از محیط کشت ۲۰ روزه قارچ با مه‌پاش دستی و بطور یکنواخت تا ریزش اولین قطره از سطح برگ محلولپاشی شدند. برای حفظ رطوبت بعد از مایه زنی، هریک از گلدان‌ها به مدت ۴۸ ساعت با کیسه‌های نایلونی پوشانده شدند، سپس پوشش پلاستیکی برداشته شد.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های قارچ *R. secalis* مورد استفاده در کارهای مولکولی

Table 1. Characteristic of *R. secalis* isolates used for molecular studies

ردیف	کد جدایه	محل نمونه برداری	استان	شهرستان
Row	Isolation code	Sampling region	province	twon
1	IL1	Mishkhas	Ilam	Ilam
2	IL2	Mishkhas	Ilam	Ilam
3	IL3	Mishkhas	Ilam	Ilam
4	IL4	Mishkhas	Ilam	Ilam
5	IL5	Mishkhas	Ilam	Ilam
6	IL6	Mishkhas	Ilam	Ilam
7	A1	Gadameh	Ilam	Aseman abad
8	A2	Gadameh	Ilam	Aseman abad
9	A3	Mohammadgholi	Ilam	Aseman abad
10	A4	Saidnazari	Ilam	Aseman abad
11	A5	Fatmieh	Ilam	Aseman abad
12	A6	Fatmieh	Ilam	Aseman abad
13	A7	Fatmieh	Ilam	Aseman abad
14	A8	Janjan	Ilam	Aseman abad
15	A9	Janjan	Ilam	Aseman abad
16	A10	Janjan	Ilam	Aseman abad
17	CH1	Sarableh	Ilam	Sarableh
18	CH2	Sarableh	Ilam	Sarableh
19	CH3	Sarableh	Ilam	Sarableh
20	CH4	Sarableh	Ilam	Sarableh
21	CH5	Sarableh	Ilam	Sarableh
22	CH6	Shabab	Ilam	Shabab
23	CH7	Shabab	Ilam	Shabab
24	CH8	Shabab	Ilam	Shabab
25	CH9	Bagheleh	Ilam	Shabab
26	CH10	Bagheleh	Ilam	Shabab
27	CH11	Bagheleh	Ilam	Shabab
28	CH12	Bagheleh	Ilam	Shabab
29	CH13	Bagheleh	Ilam	Shabab
30	CH14	Bagheleh	Ilam	Shabab
31	CH15	Jobsorkh	Ilam	Sarableh
32	CH16	Jobsorkh	Ilam	Sarableh
33	S1	Lomar	Ilam	Sirvan
34	S2	Lomar	Ilam	Sirvan
35	S3	Lomar	Ilam	Sirvan
36	S4	Lomar	Ilam	Sirvan
37	S5	Lomar	Ilam	Sirvan
38	S6	Lomar	Ilam	Sirvan
39	I1	Ivan	Ilam	Ivan
40	I2	Ivan	Ilam	Ivan
41	I3	Ivan	Ilam	Ivan
42	I4	Satian	Ilam	Ivan
43	I5	Satian	Ilam	Ivan
44	I6	Satian	Ilam	Ivan
45	I7	Satian	Ilam	Ivan
46	I8	Satian	Ilam	Ivan
47	I9	Satian	Ilam	Ivan

## آزمایش‌های مولکولی:

(Forward, Reverse) هر کدام به مقدار ۱ میکرولیتر، Taq DNA polymerase (250 unit) با غلظت ۲۵۰ واحد به مقدار ۰/۲ میکرولیتر، DNA ژنومی به مقدار ۲/۵ میکرولیتر، آب مقطر سترون ۱۷/۴ میکرولیتر در یک برنامه حرارتی توسط ترموسایکلر مدل بیورد<sup>۴</sup> در ۳۵ چرخه بصورت (واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۴ دقیقه، واسرشت سازی در ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای بین ۵۲-۵۵/۵°C به مدت ۱ دقیقه، توسعه در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و توسعه نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه) انجام شد.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** به منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌های *R. secalis* ابتدا باندهای واضح در تصاویر ژل‌ها مشخص شدند. سپس داده‌ها به صورت حضور (۱) و یا عدم حضور باند (۰) وارد نرم افزار Excel شدند. ماتریس تشابه بین جفت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس<sup>۵</sup> با نرم افزار NTSYS version 2.02 محاسبه گردید. همچنین تجزیه خوشه‌ای<sup>۶</sup> جدایه‌ها با روش UPGMA و با نرم افزار NTSYS version 2.02 ترسیم شد. به منظور تشخیص تنوع ژنتیکی پارامترهایی از جمله: میانگین تنوع ژنی، میزان چندشکلی، میانگین تعداد آلل مشاهده شده و متوسط تعداد آلل موثر در هر جایگاه ژنی، محاسبه گردید. همه اطلاعات بالا از طریق نرم افزار GenAlEx version 6.501 به دست آمد.

## نتیجه و بحث

**مشخصات قارچ *Rhynchosporium secalis*:** در این مطالعه تعداد ۴۷ جدایه از مزارع مختلف استان ایلام جداسازی، شناسایی و خالص سازی شدند که همه این جدایه‌ها متعلق به گونه *R. secalis* بودند (جدول ۱).

شناسایی قارچ *R. secalis* براساس مشخصات ظاهری و

**استخراج DNA:** برای به دست آوردن میسلیم جهت استخراج DNA، از محیط کشت مایع سیب زمینی دکستروز<sup>۱</sup> استفاده گردید. مقدار ۱۵۰ میلی لیتر از این محیط کشت در ظرف ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد. سپس این ظروف به کمک ۱-۲ قطعه از میسلیم قارچ *R. secalis* مایه‌زنی گردیدند. ارلن‌ها را در درون انکوباتور در دمای حدود ۱۶°C به مدت ۲۵ روز قرار داده شدند. بعد از این مدت میسلیم به دست آمده به کمک کاغذ صافی سترون و دستگاه پمپ خلأ<sup>۲</sup> آگیری گردیدند. میسلیم جدایه‌ها به تفکیک در دمای ۲۰°C- برای استفاده‌های بعدی نگهداری شدند. جهت استخراج DNA قارچ از روش CTAB<sup>۳</sup> با اندکی تغییرات استفاده شد. جهت اطمینان از کیفیت استخراج DNA، از ژل ۰/۸ درصد و الکتروفورز استفاده گردید. برای مشاهده DNA استخراج شده، از دستگاه Gel Documentation مدل INTAS استفاده شد. این دستگاه با استفاده از نور ماوراءبنفش (UV) از ژل عکسبرداری کرده و تصویر آن در رایانه ذخیره شد.

بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *R. secalis* بر اساس

**نشانه‌های ریزوماهواره (SSR):** برای این منظور، ابتدا ۵ جفت آغازگر ریزوماهواره اختصاصی برای *R. secalis* خریداری گردید (جدول ۲). واکنش PCR اختصاصی با استفاده از پنج جفت آغازگر بصورت جداگانه برای نشان دادن تنوع در نمونه‌ها انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۳</sup> اختصاصی با استفاده از پنج آغازگر Rhyncho\_6، Rhyncho\_7، Rhyncho\_8، Rhyncho\_11 و Rhyncho\_13 و بطور جداگانه برای تمامی جدایه‌ها با حجم واکنش ۲۵ μL شامل: بافر PCR ۱۰x به مقدار ۲/۵ میکرولیتر، MgCl<sub>2</sub> (50mM) با غلظت ۵۰ میلی مولار، به مقدار ۱/۵ میکرولیتر، dNTP (10Mm) با غلظت ۱۰ میلی مولار به مقدار ۰/۹ میکرولیتر، از هر جفت آغازگر

۴-Biorad

۵-Dice coefficient

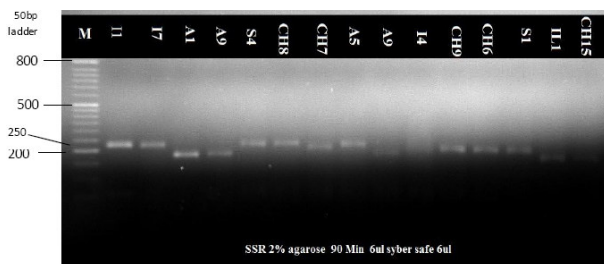
۶-Cluster Analysis

۱-Potato dextrose broth (PDB)

۲-Cetyl trimethyl ammonium bromide

۳-PCR

شدند، سپس پوشش پلاستیکی برداشته شد. گلدان‌ها به صورت یک روز در میان آبیاری شده و گیاهچه‌ها به مدت یک ماه در این شرایط نگهداری شدند. بعد از گذشت یک ماه نشانه‌های بیماری بر روی اندام‌های گیاهان ظاهر شدند. آلودگی بصورت لکه‌های بیضی تا مستطیلی شکل، برنگ سیاه و به مرور در مرکز خاکستری و در حاشیه سیاه مشخص گردید و با پیشروی آلودگی مرکز لکه‌ها خشک و به رنگ خاکستری روشن در آمدند که با یک حاشیه نکروزه احاطه گردیدند. در نهایت با جداسازی مجدد قارچ از نسوج دارای نشانه‌های بیماری، بیماری‌زایی از طریق اصول کخ، اثبات شد.



شکل ۲- باندهای DNA حاصل از PCR ناشی از تکثیر آغازگر

Rhyncho\_13 در قارچ *R. secalis*

Fig. 2. Amplification of PCR product of *R. secalis* with Rhyncho\_13

### تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی

#### توزیع فراوانی آلل‌ها در جایگاه‌های ریزماهوره: از

جایگاه‌های ریزماهوره‌ای که در این مطالعه استفاده شده است، ۴۲ آلل مختلف با متوسط ۸/۴ آلل در هر جایگاه زنی مشاهده گردید که در جایگاه‌های Rhyncho\_6، Rhyncho\_7، Rhyncho\_8، Rhyncho\_11 و Rhyncho\_13 به ترتیب هشت، هفت، هشت، هفت و دوازده آلل ردیابی و تکثیر گردیدند. بیشترین تعداد آلل (۱۲ آلل) در آغازگر Rhyncho\_13 دیده شد و کمترین تعداد آلل (۷ آلل) در آغازگرهای Rhyncho\_7 و Rhyncho\_11 مشاهده گردید.

مورفولوژیکی پرگنه<sup>۱</sup> در محیط کشت و ویژگی‌های میکروسکوپی مانند مشخصات کنیدیوم صورت گرفت (Sutton, 1980). کنیدیوم‌ها شفاف، بدون پایه، دو حجره‌ای، سیلندری تا بیضی شکل به اندازه (۲۰-۱۲ x ۴-۲) μm، دارای نوک کوتاه که روی سلول‌های استرومایی بارور به وجود می‌آمدند

**آزمون بیماری‌زایی:** برای این منظور ابتدا محیط کشت خالص قارچ تهیه گردید (شکل ۱). سپس به تشتک‌های حاوی پرگنه قارچ چند میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه شد و با چاقوی جراحی سترون سطح پرگنه را خراش داده تا کاملاً اسپورها از محیط کشت جدا شوند و پس از عبور از پارچه ململ، با استفاده از لام گلول شمار (Hemocytometer) غلظت اسپور با تراکم  $2 \times 10^6$  اسپور در میلی‌لیتر در آب مقطر سترون تهیه گردید.



شکل ۱- پرگنه قارچ *R. secalis* در محیط کشت PDA

Fig. 1. Colony of *R. secalis* in PDA medium

برای کشت گیاهان ابتدا پنج عدد بذرجو رقم محلی در گلدان‌های حاوی خاک و ماسه به نسبت ۳:۱ کاشته شدند. بعد از اینکه گیاهچه‌ها به سن دو هفته ای رسیدند، گیاهان با سوسپانسیون اسپور با غلظت  $2 \times 10^6$  اسپور در میلی لیتر در آب مقطر سترون از محیط کشت ۲۰ روزه قارچ با مه پاش دستی و بطور یکنواخت تا ریزش اولین قطره از سطح برگ اسپری شدند. برای حفظ رطوبت بعد از مایه زنی، هر یک از گلدان‌ها به مدت ۴۸ ساعت با کیسه‌های نایلونی پوشانده

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ریزوماهواره مورد استفاده برای مطالعه جدایه‌های *R. secalis*

آغازگر Primer	موتیف Motif	توالی (5'-3') sequence	اندازه size (bp)
Rhyncho_6	(GA)27	F <sup>1</sup> : CGTAGCCTTCGCGATAAGAG R <sup>2</sup> : TCCCTTCCTCTTCTTGTCAAC	212-244
Rhyncho_7	(TC)32	F: GTCGCCGTCATCATTAATC R: GAGTGTCTTGGTGTGGAGAGG	200-244
Rhyncho_8	[AA(GA)5]10	F: GCGGATAATATATCAGGCAGGA R: TCACCTCAACATTTGCCGTA	149-245
Rhyncho_11	(TCCACA)6	F: TGCCTTGTCTTGCTAATCC R: CGCTCTGTGTGGAGATGAAG	200-293
Rhyncho_13	(GA)29	F: GGTTTGGGTGAAGTGGGTAG R: CTGAGCTGGCGAGGAATTAG	152-220

1- Forward

2- Reverse

شاخص نشانگر<sup>۲</sup>: مقدار محاسبه شده شاخص نشانگر در آغازگرهای مورد مطالعه از ۱/۸ تا ۶/۷ متغیر بود. بیشترین مقدار شاخص نشانگر برای آغازگر Rhyncho\_13 بود. متوسط شاخص نشانگر برای نشانگرهای مورد مطالعه ۳/۳ می‌باشد که نشان دهنده قدرت تفکیک زیاد این آغازگرها است (جدول ۳).

#### بررسی میزان تشابه جدایه‌ها بر اساس نشانگر SSR:

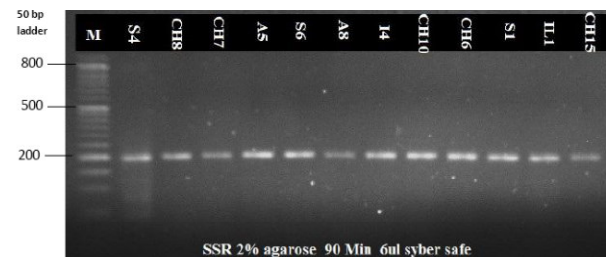
تشابه ژنتیکی جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس صورت گرفت و میزان تشابه ژنتیکی از صفر تا ۱/۰۰ متغیر بود. میانگین فاصله ژنتیکی ۰/۰۵۵ بود. بیشترین شباهت بین جدایه‌هایی با کد (I9 و IL2)، (I2 و CH12)، (CH6 و CH9) و (S1 و S4 و CH7) با فاصله ژنتیکی (صفر) بود و کمترین تشابه با فاصله ژنتیکی (۱) بین جدایه‌هایی با کد (A1 و IL1)، (IL2 و I6)، (IL3 و IL4)، (I6 و A3)، (A10 و CH15) دیده شد.

#### آزمون مانتل<sup>۳</sup>: آزمون مانتل برای بررسی وجود

همبستگی بین اجزای ماتریس‌ها به کار می‌رود.

#### بررسی چند شکلی باندهای حاصل از کاربرد

نشانگرهای SSR: در جدول ۲ آغازگرهای مختلف و ویژگی‌های آن‌ها آمده است. آغازگر Rhyncho\_13 با ۰/۵۶ دارای بیشترین میزان چندشکلی بود و در آغازگر Rhyncho\_11 کمترین میزان چند شکلی (۰/۲۶) مشاهده گردید. میزان چند شکلی نشان دهنده میزان چند شکلی یک نشانگر بوده و مقدار آن از صفر تا یک متغیر است.



شکل ۳- باندهای DNA حاصل از PCR با آغازگر Rhyncho\_7 در

قارچ *R. secalis*

Fig. 3. PCR product of *R. secalis* with Rhyncho\_7

#### نسبت چند گانه مؤثر<sup>۱</sup>: نسبت چندگانه مؤثر که بیانگر

تعداد جایگاه‌های ژنی چند شکل موجود در یک ژرم پلانسم بوده برای پنج آغازگر SSR بین ۷ تا ۱۲ با میانگین ۸/۴ بود.

۲- Marker index (MI)

۳-Mantel test

۱- Effective multiplex ratio (EMR)

جدول ۳- ویژگی‌های آغازگرهای استفاده شده برای جدایه‌های *R. secalis*Table 3. Characteristic of SSR primers used for studying of *R. secalis* isolates

آغازگر Primer	دمای اتصال Annealing temprature	اندازه آلل‌ها Alleles size	شاخص محتوای چندشکلی *PIC	شاخص نشانگر (MI)	نسبت چندگانه مؤثر (EMR)	تعداد آلل‌های تکثیر شده Number of alleles
Rhyncho_6	55.5	260-210	0.35	2.8	8	8
Rhyncho_7	54	225-190	0.31	2.2	7	7
Rhyncho_8	53.4	230-195	0.35	2.8	8	8
Rhyncho_11	54	260-150	0.26	1.8	7	7
Rhyncho_13	54.5	275-165	0.56	6.7	12	12
average	-	-	0.37	3.3	8.4	8.4

\* PIC: Polymorphism information content

رسم دندروگرام جدایه‌ها بر اساس الگوریتم الحاق مجاور<sup>۱</sup>: دندروگرام حاصل از گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگر SSR بر اساس ضریب تشابه دایس و روش الحاق مجاور برای نشان دادن ارتباط ژنتیکی بین جدایه‌ها ترسیم گردید. جدایه‌ها در فاصله ژنتیکی ۱۴-۲ قرار داشتند، در فاصله ۸، ۱۷ گروه تشخیص داده شد (شکل ۵).

تجزیه به مختصات اصلی<sup>۲</sup> در جدایه‌های *R. secalis* بر اساس نشانگر SSR: برای بررسی تنوع آلی در جدایه‌های مورد مطالعه، از تجزیه به مختصات اصلی در جهت تکمیل تجزیه خوشه‌ای انجام شد. تجزیه به مختصات اصلی روش آماری چند متغیره مشابه با تجزیه به مولفه‌های اصلی در مورد داده‌های کمی است که کاربرد زیادی در تنوع ژنتیکی دارد، در این روش برای نمایش نمودار دو بعدی پراکنش جدایه‌ها به کار می‌رود. نمودار پراکنش جدایه‌ها بر اساس تجزیه به مختصات اصلی که نحوه پراکنش آن در شکل ۵ به صورت دو بعدی آورده شده است. پراکنش جدایه‌ها در تمامی محورهای مختصات معرف تنوع ژنتیکی بالای جدایه‌ها می‌باشد.

آزمون مانتل جهت انتخاب بهترین ماتریس تشابه و همچنین بهترین الگوریتم برای رسم دندروگرام جدایه‌ها بر اساس ضریب کوفنتیک انجام شد. یکی از روش‌های مقایسه کارایی الگوریتم‌های مختلف تخمین ضریب همبستگی کوفنتیک می‌باشد که در آن همبستگی بین ماتریس تشابه یا فاصله به عنوان ورودی تجزیه خوشه‌ای و تجزیه خوشه‌ای با ضریب کوفنتیک بالاتر به عنوان خروجی آنالیز می‌باشد. تخمینی که دارای بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک باشد به عنوان بهترین روش تجزیه و تحلیل معرفی می‌شود. ضریب کوفنتیک عددی بین صفر و یک می‌باشد که هر چه این مقدار بیشتر باشد نشان دهنده برازش بهتری می‌باشد. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که ماتریس تشابه دایس و الگوریتم UPGMA با داشتن بالاترین ضریب کوفنتیک بهترین روش تجزیه و تحلیل جدایه‌های مورد مطالعه می‌باشد.

رسم دندروگرام جدایه‌های *R. secalis*: برای رسم دندروگرام از ماتریس تشابه دایس با روش UPGMA استفاده شد. جدایه‌ها در فاصله ژنتیکی ۱-۰/۰۵ قرار داشتند. در فاصله ۰/۵۴ شانزده گروه تشخیص داده شد. این گروه‌ها شامل ۷ گروه تک عضوی، ۴ گروه ۲ عضوی، یک گروه ۳ عضوی، یک گروه ۴ عضوی، یک گروه ۶ عضوی، یک گروه ۸ عضوی و یک گروه ۱۱ عضوی بودند (شکل ۴).

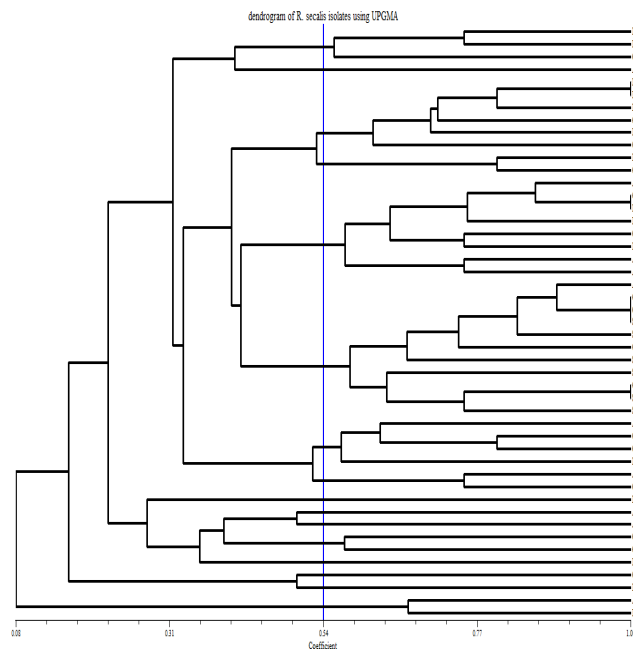
۱-Neighbour joining

۲-Principal Coordinates Analysis (PCO)



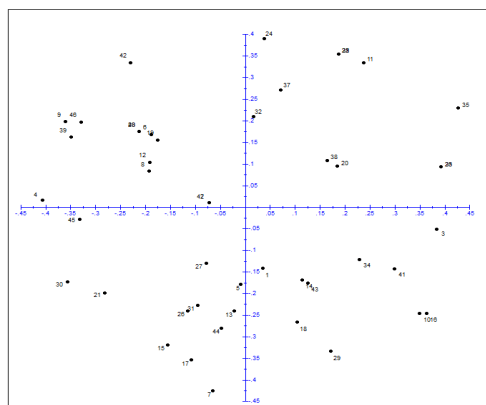
مختلف مانند استرالیا، نروژ، اتیوپی، سوئد و سوریه با استفاده از شاخص تنوع شانون مورد ارزیابی قرار گرفته است و نتیجه این مطالعات نشان داد که جمعیت‌های قارچ در این کشورها دارای تنوع ژنوتیپی بالایی می‌باشند و کمترین میزان تنوع ژنتیکی را در جمعیت‌های *R. secalis* مربوط به کشور سوریه برآورد شده است (Zaffarano *et al.*, 2006).

در این مطالعه مشخص شده است که جدایه‌ها در مناطق نمونه برداری شده از لحاظ جغرافیایی دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند. جدایه‌های آسمان‌آباد بیشترین تنوع را نسبت به دیگر جدایه‌ها از خود نشان دادند. تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. secalis* در مطالعات دیگری در مناطق مختلف جهان گزارش شده است. میزان تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌هایی از کشورهای



شکل ۴- دندروگرام ارتباط ژنتیکی بین جدایه‌های *R. secalis* با UPGMA

Fig.4. Dendrogram of genetic relationships between *R. secalis* isolates as reconstructed by UPGMA



شکل ۵- نمودار دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی ارتباط ژنتیکی جدایه‌های *R. secalis*

Fig. 5. 2D Plot of Principal Coordinates Analysis (PCO) of genetic relationships between *R. secalis* isolates

در خصوص منشأ تغییرات ژنتیکی بالا در *R. secalis* فرضیه‌های دیگری توسط محققین در دنیا ارائه گردیده که شامل تولید مثل جنسی (Salamati et al., 2000; Zaffarano et al., 2006) جهش‌های خودبخودی (McDonald et al., 1989; Williams et al., 2003)، و جریان ژنی (Goodwin et al., 1994)، می‌باشند. جریان ژنی یکی از منابع تکاملی است که نقش بسیار مهمی در تنوع ژنتیکی دارد. در بین جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق تمایز ژنتیکی کمی وجود داشت، چندین عامل ممکن است عامل این تمایز باشند؛ فاصله جغرافیایی میان مناطق زیاد نبوده حداکثر (۱۵۰ کیلومتر) و همین فاصله جغرافیایی ممکن است باعث نقل و انتقال بیماری کچلی جو از طریق جابجایی بقایای گیاهی آلوده، بذر آلوده و ادوات کشاورزی گردد.

مبادله بذور آلوده به این بیماری احتمالاً عمومی‌ترین عامل به حساب می‌آید، زیرا کشاورزان در این مناطق مورد نمونه برداری شده معمولاً از بذر محصول خود برای سال بعد استفاده می‌کنند و در این مناطق معمولاً هر ساله این بیماری وجود دارد و بسته به شرایط آب و هوایی شدت بیماری متفاوت است و ممکن است بذور را آلوده نمایند به همین دلیل معمولاً بذر حاصل از مزارع به این بیماری آلوده هستند، و از طرف دیگر ممکن است کشاورزان بذر مورد نیاز را جهت کاشت از مناطق دیگر خریداری کرده و این بذور جو ممکن است دارای درجاتی از آلودگی باشند و باعث گسترش بیماری و استقرار آلودگی در مزارع شوند. همچنین شرکت‌های خدماتی حمایتی هر ساله محصول خود را مانند دیگر محصولات کشاورزی از کشاورزان خریداری نموده و بذور را به عنوان بذور فرآوری و ضدعفونی شده دوباره در اختیار کشاورزان قرار می‌دهند و این عوامل باعث انتشار و مبادله بیماری می‌گردد. قارچ *R. secalis* به صورت غیرجنسی تکثیر شده و انتشار می‌یابد و معمولاً با کمک عملیات زراعی یاد شده و همچنین انتقال بذر به مناطق مختلف به توزیع فراوانی متفاوت آلودگی‌ها کمک می‌کند.

به علاوه بذر آلوده به بیماری کچلی جو می‌تواند به پایداری ژنوتیپ‌ها کمک کند. در این مطالعه تنوع ژنتیکی

مورفولوژی پرگنه، کنیدیوم‌ها، نسبت رشد پرگنه، اسپوردهی جدایه‌های قارچ *R. secalis* را که از جو و چاودار در روسیه جداسازی شده بود مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که در بین جدایه‌ها تنوع بالایی وجود دارد (Lebedeva, 2005). با استفاده از نشانگرهای RFLPs تعداد ۲۵۶ جدایه از قارچ *R. secalis* مورد ارزیابی قرار گرفت و این تعداد جدایه به ۲۱۴ گروه ژنوتیپی مجزا تقسیم شدند (McDonald et al., 1999)، در این مطالعه بیشترین تنوع ژنتیکی، در داخل جمعیت‌ها وجود داشت و سطوح پایینی از تنوع ژنی در بین شش جمعیت مورد مطالعه شناسایی شد، این مطالعه نشان داد که تمایز کمتری در میان جمعیت‌ها وجود دارد. با بررسی جمعیت‌های قارچ *R. secalis* که از ۳۱ مزرعه در پنج کشور جمع‌آوری شده بودند نتیجه گرفته شد که بیش از ۴۰ درصد تغییرات وسیع RFLPs در *R. secalis* در یک مترمربع از نواحی نمونه برداری شده دیده شده و بیش از ۶۰ درصد تغییرات در یک مزرعه جو مشاهده گردید (Zaffarano et al., 2006). در تونس بررسی جمعیت‌های قارچ در سه ناحیه جغرافیایی با استفاده از دو نشانگر مولکولی AFLP و SSR مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده گردید که میزان کمی تمایز در بین این جمعیت‌ها وجود دارد در صورتی که تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های مورد بررسی بین ۰/۹۸ - ۰/۹۶ بوده است (Bouajila et al., 2007). *R. secalis* یک بیمارگر به شدت متغیر است (Oxley et al., 2003; Newton et al., 2001). دو فرضیه در خصوص توصیف علل تنوع بالای ژنتیکی در قارچ بیان شده است، یکی چرخه‌های نوترکیبی شبه جنسی محدودی که ممکن است در جمعیت‌های قارچ ایجاد شود و دوم آسکوسپورهی حاصل از مرحله جنسی ناشناخته‌ای که قادرند در فواصل طولانی تا صدها کیلومتر منتشر شوند (Salamati et al., 2000). آنها مدعی شدند که *R. secalis* دارای یک فرم جنسی است و نقش مهمی را در اپیدمیولوژی و بیولوژی جمعیت قارچ بازی می‌کند، اگرچه مرحله جنسی *R. secalis* هنوز شناسایی نشده است (Zaffarano et al., 2006).

از مهم‌ترین روش‌های کنترل بیماری کچلی جو می‌باشد، برای اطمینان از صحت و پایداری روش‌های کنترل و تعیین قدرت بیمارگر، دانستن اطلاعات تنوع ژنتیکی از جدایه‌های بیمارگر بسیار مهم و کلیدی است.

## References

- ABANG, M. M., M. BAUM and S. CECCARELLI, 2006. Differential selection on *Rhynchosporium secalis* during parasitic and saprophytic phases in the barley scald disease cycle. *Phytopathology*, 96: 1214-1222.
- ARABI, M. L. E., M. JAWHAR and E. AL-SHEHADEH, 2008. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Rhynchosporium secalis*. *Journal of Plant Pathology*, 90: 179-184.
- BOUAJILA, A., M. A. ABANG, S. HAOUAS, S. UDUPA, S. REZGUI. M. BAUM and A. YAHYAOU, 2007. Genetic diversity of *Rhynchosporium secalis* in Tunisia as revealed by pathotype, AFLP, and microsatellite analyses. *Mycopathologia*, 163: 281-294.
- BURDON, J. J. and J. SILK, 1997. Sources and patterns of diversity in Plant-Pathogenic Fungi. *Phytopathology*, 87: 664-669.
- COOKE, L. R., T. LOCKE and K. D. LOCKLEY, 2004. The effect of fungicide programmes based on poxiconazole on the control and DMI sensitivity of *Rhynchosporium secalis* in winter barley. *Crop protection*, 23: 393-406.
- GOODWIN, S. B., R. K. WEBSTER and R. W. ALLARD, 1994. Evidence for mutation and migration as sources of genetic variation in population of *Rhynchosporium secalis*. *Phytopathology*, 94: 1047-1053.
- GOODWIN, S. B., R. W. ALLARD, S. A. HARDY and R. K. WEBSTER, 1992. Hierarchical structure of pathogenic variation among *Rhynchosporium secalis* populations in Idaho and Oregon. *Canadian Journal of Botany*, 70: 810-817.
- KARI, A. G. and E. GRIFFITHS, 1993. Components of partial resistance of barley to *Rhynchosporium secalis*: use of seedling tests to predict field resistance. *Annals of Applied Biology*, 123: 545-561.

بالایی در جدایه‌ها مشاهده گردید و این نشان می‌دهد که پتانسیل ایجاد خسارت در مزارع جو وجود دارد. همچنین تنوع ژنتیکی بالا در این مناطق زنگ خطری در جهت شکستن مقاومت ارقام مقاومی که توسط اصلاح کنندگان در جهت مدیریت منطقه‌ای بیماری کچلی جو استفاده می‌شوند، می‌باشد. افزایش تنوع ژنتیکی بیمارگر در هر منطقه باعث افزایش پتانسیل سازگاری آن بیمارگر در مقابل تغییرات شرایط محیطی و روش‌های کنترل می‌گردد و ورود چند جدایه با قدرت تهاجمی بالا به این مناطق، ممکن است باعث همه‌گیری و یا افزایش شدت بیماری گردد. اقدامات و مقررات قرنطینه‌ای برای جلوگیری از ورود جدایه‌هایی با تنوع بیشتر از مناطق دیگر از جمله کشورهای همسایه به داخل این جمعیت‌ها و یا جلوگیری از انتقال هر جدایه از این منطقه به دیگر نقاط کشور را باید با جدیت در نظر گرفته و این اقدامات را انجام داد.

نتایج حاصل از این تحقیق کمک به متخصصین اصلاح نباتات و بیماری‌شناسان گیاهی در جهت اصلاح ارقام جو می‌باشد تا اینکه گروه‌هایی با بیماری‌زایی بالا که در گذشته وجود نداشته است و می‌تواند خطر جدی برای تولید محصول جو در این مناطق باشند را شناسایی نمایند و از ورود آن‌ها جلوگیری شود. تا زمانیکه زمینه برای گسترش بین‌المللی بیمارگر از طریق ژرم پلاسماهای بین‌المللی وجود دارد توصیه می‌شود که با رعایت اقدامات قرنطینه‌ای محکم و جدی از ورود گروه‌های بیماری‌زایی جدید به داخل کشور جلوگیری شود. تنوع ژنتیکی بالا در جدایه‌های مورد مطالعه ممکن است در اثر جهش، یا ورود جدایه‌های دیگر با قدرت بیماری‌زایی متفاوت از نواحی دیگر و یا حتی از کشورهای همسایه به مناطق مورد تحقیق شود. جریان ژنی را به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌ها که می‌تواند باعث ورود آلل‌های جدید و مبادله این آلل‌ها بین مناطق گردد و موجب تولید ژنوتیپ‌های جدید بیماری و احتمالاً غلبه بر مقاومت ارقام و افزایش مقاومت قارچ به قارچ‌کش‌ها شود، را باید در مدیریت این بیماری جدی گرفت. استفاده از ارقام مقاوم یکی

- KOLLIKER, R., E. S. JONES, M. C. DRAYTON, M. P. DUPAL and J. W. FORSTER, 2001. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) marker for white clover (*Trifolium repens* L.). *Theoretical and Applied Genetic*, 102: 416-424.
- LEBEDEVA, L. 2005. Diversity of *Rhynchosporium secalis* (Oud.) J. J. Davis strains in morphological and cultural peculiarities. *Acta Agrobotanica*, 58: 45-50.
- LINDE, C. C., M. ZALA and B. A. MCDONALD, 2009. Molecular evidence recent founder populations and human-mediated migration in the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51: 454-464.
- MATHER, D. E. 1985. Compendium of barley diseases. The American Phytopathological Society, 249pp.
- McDERMOTT, J. M., B. A. MCDONALD, R. W. ALLARD, and R. K. WEBSTER, 1989. Genetic variability for pathogenicity, isozyme, ribosomal DNA and colony color variants in populations of *Rhynchosporium secalis*. *Genetics*, 122: 551-565.
- McDONALD, B. A. and C. LINDE, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary, potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 349-379.
- McDONALD, B. A., J. M. McDERMOTT, R. W. ALLARD and R. K. WEBSTER, 1989. Coevolution of host and pathogen population in the *Hordeum vulgare* *Rhynchosporium secalis* pathosystem. *Academic Science USA*, 86: 3924-3927.
- McDONALD, B. A., J. ZHAN and J. J. BURDON, 1999. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. *Phytopathology*, 89: 639-645.
- NEWTON, A. C., J. SEARLE, D. C. GUY, C. A. HACKETT and D. E. L. COOKE, 2001. Variability in pathotype, aggressiveness, RAPD profile, and rDNA ITS1 sequences of UK isolates of *Rhynchosporium secalis*. *Journal of Plant Disease*, 108: 446-458.
- OXLEY, S. J. P., L. R. COOKE, L. A. HUNTERK and P. C. MERCER, 2003. Management of *Rhynchosporium* in Different Barley Varieties and Cropping Systems, London: Home-Grown Cereals Authority, Project Report.
- SALAMATI, S., J. ZHAN, J. J. BURDON and B. A. MCDONALD, 2000. The genetic structure of field populations of *Rhynchosporium secalis* from three continents suggests moderate gene flow and regular recombination. *Phytopathology*, 90: 901-908.
- SUTTON, B. C. 1980. The Coleomycetes, Fungi imperfecti with pycnidia, Acervuli and Stromata. CMI. England. 696p.
- WILLIAMS, K., C. DONNELLA, L. SMYLSMOTT and H. WALWORK, 2003. Molecular variation in *Rhynchosporium secalis* isolates obtained from hotspots. *Australian Asian Plant Pathology*, 37: 257-262.
- ZAFFARANO, P. L., B. A. MCDONALD, M. ZALA and C. C. LINDE, 2006. Global hierarchical gene diversity analysis suggests the fertile crescent is not the center of origin of the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Phytopathology*, 96: 941-950.