آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۶، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۷

بررسی تیپ‌های آمیزشی قارچ *Mycosphaerella graminicola* عامل بیماری سپتوریوز برگ گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی و اهمیت آن در ایران

Study on mating types of *Mycosphaerella graminicola* causative agent of septoria leaf blotch of wheat using molecular markers and its importance in Iran

سولماز کمیجانی[1]*، محمد رضوی[2]، حشمت اله امینیان[1] و حسن رضا اعتباریان[1]
پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور
(تاریخ دریافت: آبان ۱۳۸۶؛ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۷)

چکیده

به منظور بر رسی احتمال وجود تیپ‌های آمیزشی فرم جنسی قارچ *Mycosphaerella graminicola* و پراکندگی و اهمیت آن در ایران از هفت استان کشور شامل استان‌های مازندران، گلستان، خوزستان، فارس، اردبیل (مغان)، ایلام و کرمانشاه که کانون‌های مهم بیماری بودند، در سال ۱۳۸۴ برگ‌های آلوده جمع آوری و ۵۸ جدایه انتخاب و DNAی آن‌ها استخراج شد. بررسی وجود تیپ‌های آمیزشی قارچ در ایران با استفاده از Multiplex PCR و دو جفت آغازگر MAT 1-1 و MAT 1-2 انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که ۲۹ جدایه از تیپ آمیزشی نوع اول (MAT1-1) بودند که باندهایی به اندازه ۳۴۰ جفت باز تولید نمودند و ۲۹ جدایه از تیپ آمیزشی نوع دوم (MAT1-2) بودند که باندهایی به اندازه ۶۶۰ جفت باز تولید نمودند. هر دو تیپ آمیزشی در تمامی‌مناطق مورد بررسی شناسایی گردید. با بررسی نسبت ایدیومورف‌های بدست آمده در جمعیت جدایه‌های مورد بررسی، هر دو تیپ آمیزشی از فراوانی یکسان بر خوردار بودند و دارای نسبت ۱:۱ بودند و استفاده از فرمول Chi-square

* Corresponding author: komijani_solmaz@yahoo.com

نیز این نتایج را تأیید نمود. نتایج به دست آمده دال بر تشکیل فرم جنسی قارچ *Septoria tritici* در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Septoria tritici*، ایدیومورف، Multiplex PCR.

Abstract

In order to study presence, distribution and importance of mating types of the fungus *Mycosphaerella graminicola* (Fückel) J. Schröt in Cohn (anamorph *Septoria tritici* Roberge in Desmaze.) causative agent of septoria leaf blotch, fifty eight isolates were collected randomly from wheat fields of Golestan, Mazandaran, Ardabil, Ilam, Khozestan, Kermanshah and Fars provinces of Iran, during 2005. DNA was extracted based on standard protocols. Multiplex PCR was conducted using two mating type primers viz MAT 1-1 and MAT 1-2. Results showed that 29 isolates produced MAT 1-1 idiomorph with 340 bp molecular weight and 29 isolates produced MAT 1-2 idiomorph with 660 bp molecular weight. Both idiomorphs were detected in all locations. Chi-square analysis showed that two mating types have 1:1 ratio and strongly suggests that sexual reproduction of the fungus occurs in Iran. The pathogen with both sexual and asexual reproductions will have potential to overcome rapidly the race specific resistance sources. Therefore, it would be desirable to use cultivars with race non specific resistance genes.

Key word: *Septoria tritici*, plant diseases, idiomorphs, Multiplex PCR.

مقدمه

بیماری سپتوریوز برگ گندم که توسط گونه قارچ *Septoria tritici* Rob. ex Desm. ایجاد می‌شود یکی از بیماری‌های مهم گندم می‌باشد که باعث کاهش تولید گندم در واحد سطح می‌گردد و در بسیاری از نقاط دنیا خسارت قابل توجهی به محصول گندم وارد می‌کند (Shaner *et al*., 1975). این بیماری در صورت مساعد بودن شرایط آب و هوایی باعث ایجاد خسارت شدید در محصول گندم می‌گردد. میزان خسارت حاصل از این بیماری تحت شرایط مناسب از ۲۵ تا ۵۰ درصد در ارقام حساس گندم گزارش شده است (Shipton *et al*., 1971; King *et al*., 1983).

این بیماری اولین بار توسط Desmaziers (1842) از فرانسه گزارش گردید و پس از آن از

سایر نقاط دنیا گزارش شد. این بیماری در ایران اولین بـار توسـط Petrak & Esfandiari (1941) تحت نام *Septoria graminum* Desm. گزارش شد و بعد از آن Sharif & Ershad (1966) وجـود آن را از سایر مناطق گندم خیز کشور گزارش کردند (Torabi 1979). در سال‌های اخیر اسـتفاده از ارقام زود رس و نیمه پاکوتاه مکزیکی گندم با خاصیت کود پذیری بالا و عملکـرد مطلـوب ولی حساس به بیماری فوق موجـب انتـشار گـسترده و جهـانی ایـن بیمـاری گردیـده اسـت (Eyal *et al.* 1973; Shearer & Wilcoxson, 1978). یکـی از راه‌هـای توصـیه شـده بـرای کنتـرل بیماری، استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. به منظـور اصـلاح و انتخـاب ارقـام مقـاوم، آگـاهی از وضعیت تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های قارچ عامـل بیمـاری و همچنـین نـوع تولیـدمثـل (جنسی یا غیر جنسی) قارچ از اهمیت زیادی برخـوردار اسـت (McDonald *et al*., 1995). فـرم جنسی قارچ عامل بیماری *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt in Cohn می‌باشد که اولین بار توسط Sanderson (1972) در نیوزلند شناسـایی شـد، سـپس از کـشورهـای اسـترالیا، برزیـل، هلنـد، انگلـیس وآمریکـا (Eyal *et al*., 1987) و اخیـرا از کانـادا (Hoorne *et al*., 2002) گزارش گردید. بر اساس تحقیقات انجام شده در کشور هایی که فرم جنسی قارچ وجـود دارد آسکوسپورهای هوا زاد منبع اولیه زاد مایه بیماری می‌باشد و وجود فرم جنسی نقش مهمـی در ایجاد تنوع ژنتیکـی و پیـدایش نـژادهـای جدیـد دارد. Jürgens *et al*., (2006) بـا بکـار گیـری نشانگرهای RFLP تنوع ژنتیکی قارچ *M. graminicola* را در جمعیت‌های جمـع آوری شـده از ایران، آرژانتین و استرالیا بر رسی و با نتایج تحقیقات قبلی جمعیت‌هـای جمـع آوری شـده از سایر کشورها مقایسه نمودند. نتایج این بر رسی نشان داد که جمعیت جدایه های جمـع آوری شده از ایران نسبت به جمعیت جدایه های اسرائیل از تنـوع ژنتیکـی کمتـری برخـوردار بـود. نامبردگان نتیجه‌گیری نمودند که احتمالاً نمونه‌ها از مزارع آزمایشی که بطـور مـصنوعی اسـپور پاشی شده بودند جمع‌آوری گردیده بودند. اما جمعیت‌هـای جمـع آوری شـده از مـزارع غیـر آزمایشی در آرژانتین دارای تنوع ژنتیکی مشابهی با جمعیت‌های قبلی مورد بررسی در اروپـا و آمریکای شمالی بودند. همچنین جمعیت‌های جمع آوری شده از استرالیا دارای تنـوع ژنتیکـی زیادی بودند. نامبردگان با انجام آنالیز همبستگی بین مکان‌هـای ژنـی (Multilocus association test) نشان دادند که در جمعیت استرالیا نوترکیبی جنسی اتفاق می‌افتد.

با توجه به اهمیت زیاد و خسارت زا بودن این بیماری در استان‌های مختلف کشور و با توجه به اینکه اطلاع از نحوه تولید مثل قارچ در اتخاذ استراتژی‌های مناسب جهت مدیریت بیماری ضروری است، در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای اثبات وجود فرم جنسی قارچ در ایران صورت گرفت. Haghdel & Banihashemi (2005) توانستند فرم جنسی این قارچ را از استان فارس جداسازی کنند ولی آسکوسپورهای جداسازی شده قادر به تندش و ایجاد بیماری نبودند.

با توجه به اینکه قارچ عامل بیماری دارای سیستم سازگاری هتروتالیسم دوقطبی است و برای تشکیل فرم جنسی حضور دو تیپ آمیزشی (mating types) سازگار ضروری است، بنابراین اثبات وجود هر دو تیپ آمیزشی در منطقه دلیل محکمی‌بر احتمال وجود تولید مثل جنسی قارچ و در پی آن وقوع تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت‌های قارچ عامل بیماری در کشور است. با توجه به اینکه بر رسی و شناسایی تیپ‌های آمیزشی قارچ عامل بیماری با روش‌های مرسوم سنتی در شرایط آزمایشگاهی بسیار دشوار است لذا مطالعات کمتری در این زمینه صورت گرفته است. خوشبختانه در سال‌های اخیر محققین اروپایی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی توانستند ژن‌های مسئول هرکدام از تیپ‌های آمیزشی قارچ عامل بیماری را شناسایی نموده و نشانگرهای مولکولی اختصاصی برای تشخیص و ردیابی آن‌ها معرفی نمایند (Waalwijk *et al.*, 2002). دراین بررسی تلاش گردید با بکارگیری نشانگرهای مولکولی معرفی شده احتمال وجود تیپ‌های آمیزشی قارچ عامل بیماری و فراوانی آن‌ها در مناطق مهم گندم خیز کشور بررسی گردد.

روش بررسی

۱- جمع آوری نمونه های گیاهی آلوده به قارچ *M. graminicola* : برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *M. graminicola*، در مناطق مهم گندم خیز کشور، در بهار سال ۱۳۸۴ نمونه‌های دارای علائم بیماری از کانون‌های آلوده شامل استان‌های مازندران، گلستان، خوزستان، فارس، اردبیل (مغان) ایلام و کرمانشاه جمع‌آوری و در پاکت‌های کاغذی که روی هر کدام مشخصات هر نمونه شامل محل جمع‌آوری، تاریخ نمونه برداری، رقم میزبان، و نام جمع آوری کننده ثبت

شده بود، قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. ابتدا نمونه‌ها بـه مـدت یـک هفتـه در شرایط معمولی آزمایشگاه (حرارت ۲۰ ± ۲ ºC) قرار داده شدند تا کاملاً خـشک شـوند سـپس برای انجام آزمایشات بعدی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری گردیدند. در این بررسی از استان‌های مازندران، گلستان، خوزستان، فارس، اردبیل (مغان) و ایلام از هر کـدام ۹ نمونه که از مناطق مختلف جغرافیایی آن استان جمع آوری شده بـود انتخـاب گردیـد ولـی از استان کرمانشاه بدلیل پایین بودن سطح آلودگی فقط چهار نمونه دریافت شد. در ایـن بررسـی مجموعا تعداد ۵۸ جدایه در آزمایشات منظور گردید.

۲- **جداسازی و خالص سازی قارچ عامل بیماری از نمونه هـای دارای علائـم:** بـرای جـدا سـازی قـارچ عامـل بیمـاری در آزمایـشگاه، بـرگ‌هـای آلـوده بـه سـپتوریوز زیـر استریومیکروسکوپ بازدید و از لکه‌هایی که دارای پیکنیدیوم قارچ عامل بیماری بودند قطعاتی به ابعاد ۵-۴ سانتی‌متر بریده شد. قطعات بریده شده هر برگ بصورت جداگانه روی یک عـدد لام با گیره متصل شدند و سپس جهت شستـشوی آلـودگی سـطحی و گـرد و غبـار از سـطح برگ‌ها، حداقل نیم ساعت زیر آب جاری داخل بشر قـرار داده شـدند. سـپس زیـر هـود و در شرایط سترون نمونه های تمیز شده جهت ضد عفونی سطحی بمـدت ۳-۲ دقیقـه در محلـول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد (وایتکس تجاری ۵٪) قرار داده شدند. سپس نمونـه‌هـا سـه بـار توسط آب مقطر سترون شستشو داده شدند و بعد هر ۴-۳ قطعه بـرگ در یـک تـشتک پتـری حاوی محیط کشت آب آگـار قـرار داده شـدند. بعـد از ۲۴-۱۶ سـاعت قطعـات برگـی زیـر استریومیکروسکوپ بررسی شدند و از پیکنیدیوم‌هایی که تولید اوز کرده بودند با کمک سوزن سترون، پیکنیدیوسپورهای قارچ عامل بیماری به محیط کشت آب آگار (۱۵ گرم آگار در یـک لیتر آب) WA یا محـیط کـشت (YMDA (Yeast Malt Dextrose Agar (آب مقطرسـترون یـک لیتـر Malt extract 4 g; Dextrose 4 g; Agar 15 g و Yeast extract 4g) حـاوی ۲۰۰ ppm استرپتومایسین انتقال داده شدند (Eyal *et al*., 1987).برای خالص‌سازی قارچ عامل بیمـاری، بـا استفاده از لوپ سترون از پرگنه های تشکیل شده در محیط کشت YMDA قـسمتی برداشـته و بصورت خطوط موازی کشت داده شد. بعد از گذشت ۴-۳ روز از خطوطی کـه پرگنـه‌هـا بـه صورت مجزا رشد نموده بودند یک تک پرگنه انتخاب و بـه محـیط YMDA انتقـال داده شـد.

پرگنه‌های حاصل از رشد این تک پرگنه‌ها، قارچ‌های خالصی بودند که برای ادامه آزمایشات استفاده شدند.

۳- استخراج DNA جدایه‌های قارچ عامل بیماری: از هرجدایه خالص شده که در تشتک پتری حاوی YMDA کشت داده شده بود با اضافه کردن ۱cc آب مقطر سترون، سوسپانسیون اسپور تهیه گردید. سوسپانسیون مربوط به هر جدایه به ۴ پتری حاوی محیط YMDA منتقل گردید، بطوریکه تمام سطح محیط با سوسپانسیون آغشته شد. سپس در انکوباتور برای مدت ۴-۳ روز قرار گرفت. بعد از رشد میسلیوم‌ها و اسپورها به وسیلهٔ یک اسکالپل سترون زیر هود از سطح محیط جمع آوری و اسپورهای مربوط به هر جدایه در یک تشتک پتری قرار داده شد و برای مدت ۲۴ ساعت در فریزر (۲۰°C-) قرار گرفت. سپس تشتک‌های حاوی میسلیوم‌ها واسپورهای قارچ به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریزدرایر (مدل Christ- Alpha 1-4) قرار داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت که میسلیوم‌ها واسپورهای قارچ در داخل دستگاه فریزدرایر خشک شدند، هر جدایه بطور جداگانه در هاون چینی که قبلاً در فریزر °C ۲۰- قرار داده شده بود، کوبیده شد تا بصورت پودر در آمد. پودر بدست آمده از هر جدایه در میکروتیوب 1.5 ml سترون ریخته و در فریزر قرار داده شد و سپس طبق روش Raeder and Broda (1985) مراحل استخراج DNA انجام شد. DNA استخراج شده جدایه‌های قارچ *S. tritici* در فریزر °C ۲۰- نگهداری شدند. کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل Biophotometra Eppendorf AG 22331) ساخت کشور آلمان و ژل آگارز ۱٪ تعیین شد و غلظت DNA تمامی‌جدایه ها به 20ng/µl تنظیم شد.

۴- واکنش Multiplex PCR: برای اثبات وجود تیپ‌های آمیزشی قارچ عامل بیماری در داخل جمعیت‌های مورد بررسی از واکنش Multiplex PCR استفاده گردید. در این واکنش تواماً از دو جفت آغازگر MAT 1-1 و MAT 1-2 که توسط Waalwijk *et al.* (2002) معرفی گردیده بود استفاده شد. توالی این آغازگرها عبارت بودند از:

MAT 1-1: 5'-CCGCTTTCTGGCTTCTTCGCACTG-3' (Forward)
5'- TGGACACCATGGTGAGAGAACCT-3' (Reverse)
MAT 1-2: 5'- GGCGCCTCCGAAGCAACT-3' (Forward)
5'- GATGCGGTTCTGGACTGGAG-3' (Reverse)

که جفت آغازگر MAT 1-1 قادر بـه تکثیـر قطعـه‌ای از DNA بـه طـول ۳۴۰ bp و جفـت آغازگر MAT 1-2 قادر به تکثیر قطعه‌ای از DNA بطول حدود ۶۶۰ bp می‌باشد. این آغـازگرهـا توسط شرکت Fermentase آلمان (به نمایندگی شرکت فرآیند دانش) سنتز شد.در ایـن بررسـی برای بهینه‌سازی واکنش PCR با آغازگرهای Mating type آزمایش طبق روش Zhan *et al.* (2002) شروع شد و به منظور حصول نتیجه بهتر کمی تغییرات در غلظت مواد واکنش صورت گرفت. حجم کل محلول واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر بود که شامل: ۱۷/۸۰ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۱۲۵ میکرولیتر (مجموعاً ۰/۵ میکرولیتر) از هر دو جفـت آغـازگر (100 Pmol)، ۲ میکرولیتـر dNTP (10 mM)، ۲ میکرولیتـر بـافر 10X PCR، ۲ میکرولیتـر $MgCl_2$ (50 mM)، یـک واحـد (0.2 µl) آنزیم *Taq* DNA Polymerase و ۰/۵ میکرولیتر DNA نمونه (20 ng) بود.

چرخه دمائی طبق روش Zhan *et al.* (2002) انجام شد که عبارت بود از: ۳۰ چرخه که هـر چرخه شامل سه مرحله واسرشـته سـازی (Denaturing) در ۹۴ ^{o}C بـه مـدت ۶۰ ثانیـه، اتـصال آغازگر (Annealing) در ۶۸ ^{o}C بمدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگرها (Extension) در ۷۲ ^{o}C به مـدت ۱ دقیقه و یک چرخه نهایی بسط آغازگرها (Final extension) در ۷۲ ^{o}C به مدت ۱۰ دقیقه بود.

محلول حاصل از واکـنش PCR روی ژل آگـاروز ۱ درصـد حـاوی اتیـدیوم بروماید در دستگاه الکتروفورز Bio-Rad با ولتاژ ۸۰V بـه مـدت ۶۰ دقیقـه الکتروفـورز شـد ضـمناً بـرای محاسبه وزن مولکولی قطعات تکثیر شده از نشانگر استاندارد ۱۰۰ bp استفاده گردید و سـپس نقوش الکتروفورزی حاصل زیر نور UV مشاهده گردید و نتایج بدست آمـده توسـط دسـتگاه Gel Documentation Uvi Doc (ساخت شرکت Uvi Tec انگلستان) عکس برداری و ثبت گردید.

۵- تجزیه داده های حاصل: به منظور قضاوت در مورد اینکه تولید مثل جنسی چه نقشی در جمعیت جدایه‌های *M. graminicola* جمع آوری شده از منـاطق مختلـف ایـران دارد ابتـدا فراوانی قطعات تکثیر شده DNA مربوط به هریک از تیپ‌های آمیزشـی (MAT 1-2, MAT 1-1) در کل جمعیت و همچنین در داخل جمعیت‌های هر اسـتان بطـور جداگانـه محاسـبه گردیـد. سپس با استفاده از فرمول χ^2 در مورد نسبت فراوانـی مـشاهده شـده هـر کـدام از تیـپ‌هـای آمیزشی نسبت به فراوانی مورد انتظار برای هر کدام از تیپ‌های آمیزشی در صورت وقوع فـرم جنسی قارچ قضاوت گردید. بر اساس این فرمول:

$$\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$$

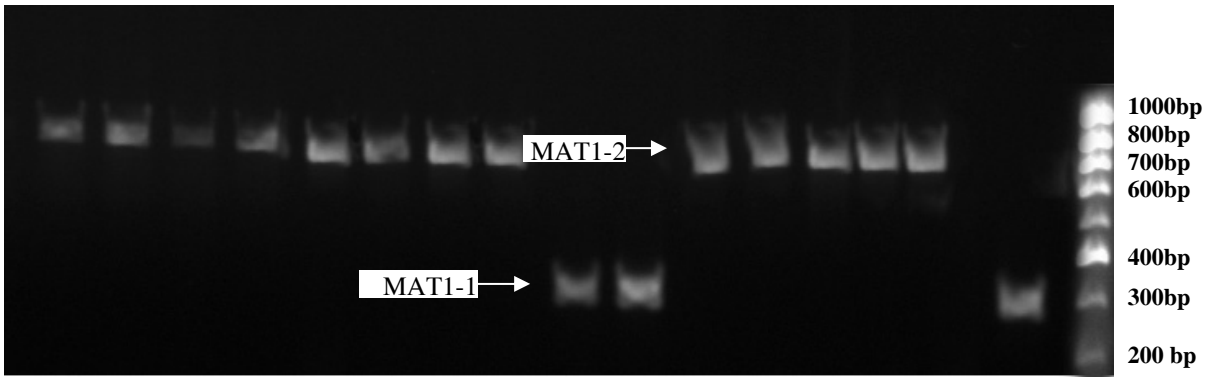
که در آن O فراوانی هر کدام از تیپ‌های آمیزشی مشاهده شده در داخل جمعیت مورد بررسی است و E فراوانی هر کدام از تیپ‌های آمیزشی مورد انتظار در صورت وقوع فرم جنسی در داخل جمعیت مورد بررسی است. با توجه به عدد χ^2 بدست آمده و مقایسه آن با عدد جدول χ^2 در سطح احتمال ۹۵٪ (با توجه درجه آزادی مربوطه) در مورد وقوع فرم جنسی قضاوت گردید.

نتیجه و بحث

نتایج آزمایش Multiplex PCR نشان داد که این روش قادر است به دقت تیپ‌های آمیزشی این قارچ را از همدیگر تفکیک نماید. در هر کدام از جدایه ها فقط یکی از ژن‌های مربوط به تیپ‌های آمیزشی تکثیر گردید. در جدایه هایی که حامل ژن MAT1-1 بودند، باندهایی به اندازه ۳۴۰ جفت باز تکثیر گردید و در جدایه‌هایی که حامل ژن MAT1-2 بودند، باندهایی به اندازه ۶۶۰ جفت باز تکثیر شد (شکل شماره ۱). در هیچکدام از جدایه‌ها هر دو ژن تواماً تکثیر نگردید و در هیچکدام از جدایه‌ها عدم تشکیل باند مشاهده نگردید.

در بین مجموع ۵۸ جدایه قارچ *M. graminicola* جمع آوری شده از کشور (شامل استان‌های گلستان، مازندران، ایلام، خوزستان، اردبیل، فارس و کرمانشاه) فراوانی یکسانی از هر کدام از ژن‌های مسئول تیپ‌های آمیزشی بدست آمد. ۲۹ جدایه حامل ژن MAT1-1 بودند و ۲۹ جدایه حامل ژن MAT1-2 بودند. نتایج حاصل از تست χ^2 برابر با صفر گردید که نشان می‌دهد فراوانی تیپ‌های آمیزشی مشاهده شده در جمعیت با فراوانی تیپ‌های آمیزشی مورد انتظار برابر بوده و عدد محاسبه شده (χ^2 = ۰،۰) در سطح احتمال ۹۵٪ با یک درجه آزادی، از عدد۳/۸۴ در جدول Chi – square (Steel *et al*., 1997) کوچک‌تر است و به احتمال ۹۵ درصد فراوانی تیپ‌های آمیزشی MAT1-1 و MAT1-2 در کل جمعیت قارچ *M. graminicola* از نسبت ۱:۱ برخوردار است. همچنین فراوانی هر کدام از تیپ‌های آمیزشی در داخل جمعیت *M. graminicola* در هر کدام از استان‌های مورد بررسی شامل استان‌های گلستان، مازندران، ایلام، خوزستان، اردبیل، فارس و کرمانشاه بر آورد گردید (جدول ۱). نتایج این بررسی نشان

داد که هر دو نوع تیپ‌های آمیزشی MAT1-1 و MAT1-2 در تمامی‌مناطق مورد بررسی وجود داشت. وجود هر یک از این ایدیومورف‌ها و فراوانی آن‌ها در داخل جمعیت قارچ، احتمال تشکیل فرم جنسی قارچ *S. tritici* را در ایران اثبات می‌کند و این یافته با نتایج بررسی‌های Haghdel & Banihashemi (2005) که توانستند فرم جنسی این قارچ را جداسازی کنند ولی نتوانستند بیماری‌زایی آسکوسپورهای جدا شده را اثبات نمایند مطابقت دارد. اما لازم است بررسی‌های بیشتری برای ردیابی آسکوکارپ‌های قارچ عامل بیماری در مناطق مختلف کشور بعمل آید.Waalwijk *et al.* (2002) با استفاده از نشانگرهای Mating type وجود تیپ‌های آمیزشی MAT 1-1 و MAT 1-2 را در جمعیت‌های *M. graminicola* جمع‌آوری شده از کشورهای سوریه، الجزیره، آرژانتین، دانمارک، آمریکا، سویس و هلند گزارش نمودند. Zhan *et al.* (2002) با استفاده از نشانگرهای Mating type با بررسی ۲۰۳۵ جدایه قارچ عامل بیماری جمع آوری شده از ۱۶ منطقه جغرافیایی مختلف نشان دادند که دو تیپ جنسی، فراوانی مشابهی داشته و توزیع یکسانی در میان جمعیت *M. graminicola* در طبیعت دارند. نامبردگان دو تیپ جنسی فوق الذکر را حتی در مقیاس کوچکتر از چند سانتی‌متر مربع در سطح یک برگ شناسایی نمودند.



شکل ۱- ایدیومورف های تکثیر شده MAT1-2 و MAT1-1 در Multiplex PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

Fig. 1- Amplified idiomorphs of MAT1-1 and MAT1-2 in multiplex PCR using specific primers

جدول ۱- فراوانی هر کدام از تیپ‌های آمیزشی *M. graminicola* در استان‌های گلستان، مازندران، ایلام، خوزستان، اردبیل، فارس و کرمانشاه

Table 1- Mating types frequency in the populations of *M. graminicola* in Golestan, Mazandaran, Kermanshah, Ilam, Khozestan, Ardabil and Fars provinces.

مناطق مورد بررسی **Locations**	فراوانی MAT1-1 **Frequencies**	فراوانی MAT1-2 **Frequencies**
Golestan	0.44	0.56
Mazandaran	0.11	0.89
Kermanshah	0.25	0.75
Ilam	0.22	0.78
Khozestan	0.78	0.22
Ardabil	0.67	0.33
Fars	0.89	0.11

Razavi & Hughes (2001; 2004) با استفاده از نشانگرهای میکروستلایت توانستند وجود فرم جنسی قارچ *S. tritici* را در کانادا پیش بینی کنند که تحقیقات بعدی سایر محققین (Hoorne *et al.*, 2002) صحت پیش‌بینی آن‌ها را به اثبات رسانید و فرم جنسی قارچ از ایالت مانیتوبا در کانادا گزارش گردید. Sommerhalder *et al.* (2006) توانستند تیپ‌های آمیزشی جنسی قارچ *Stagonospora nodorum* را شناسائی کنند. آن‌ها نسبت تیپ‌های آمیزشی قارچ را ۱:۱ بدست آوردند و وجود فرم جنسی قارچ را در مناطق مورد بررسی پیش‌بینی کردند.

وجود فرم جنسی در داخل جمعیت‌های قارچ باعث می‌شود که در هر بار چرخه جنسی در طی مراحل تقسیم میوز ترکیب جدیدی از ژن‌ها حاصل گردد که این پدیده منجر به ایجاد تنوع ژنتیکی بالایی می‌گردد و گاهی منجر به پیدایش ژنوتیپ‌هایی از بیمارگر می‌گردد که از قدرت بیماریزایی و تطابق بیشتری برخوردار هستند و می‌توانند سریعاً به مقاومت گیاه میزبان غلبه نمایند. بویژه احتمال پیدایش اینگونه ژنوتیپ‌ها در بیمارگرهایی بیشتر است که در چرخه زندگی خود هم به روش جنسی و هم غیر جنسی تکثیر پیدا می‌کنند (Mc Donald & Linde 2002). با توجه به اینکه قارچ *M. graminicola* هم به روش جنسی و هم غیر جنسی تکثیر پیدا

می‌کند و نتایج حاصل از این بررسی مؤید تشکیل فرم جنسی قارچ در ایران می‌باشد لذا احتمال پیدایش پاتوتیپ‌هایی که قدرت بیماریزایی بیشتری دارند در منطقه زیاد است که می‌تواند باعث شکسته شدن مقاومت ارقام گردد. بنابراین به منظور کنترل این بیماری از ارقام گندمی‌که دارای ژن‌های مقاوم غیر وابسته به نژاد (race non- specific resistance) و یا ارقامی‌که دارای چند ژن مقاوم هستند بایستی استفاده نمود.

سپاسگزاری

از مساعدت مالی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و همچنین مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی بویژه جناب آقای دکتر مردی قدردانی می‌گردد*.

منابع

DESMAZIERES, J. B. H. J. 1842. Neuvieme notice sur quelques plants Cryptogames. Ann. Sci. Nat. II 16: 91:118.

EYAL, Z., A. L. SCHAREN, J. M. PERESCOTT and M. VAN GINKEL, 1987. The septoria disease of wheat. Concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico, D. F. Mexico. 46 PP.

EYAL, Z., Z. AMIRI and I. WAHL, 1973. Physiologic specialization of *Septoria tritici*. Phytopathlogy 63:1087-1091.

HAGHDEL, M. and Z. BANIHASHEMI, 2005. Survival and host range of *Mycosphaerella graminicola*, the causal agent of septoria leaf blotch of wheat. Iran. J. Plant Pathol. 41: 613-630.

HOORNE, C., L. LAMARI, J. GILBERT and G. M. BALANCE, 2002. First report of *Mycosphaerella graminicola*, the sexual state of *Septoria tritici*, in Manitoba, Canada. Can. J. Plant Pathol. 24:445-449.

***نشانی نگارندگان:** مهندس سولماز کمیجانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، ایران؛ دکتر محمد رضوی، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵، ایران؛ دکتر حشمت اله امینیان و دکتر حسن رضا اعتباریان، گروه گیاه‌پزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران.

JÜRGENS, T., C. LINDE and B. MCDONALD, 2006. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations from Iran, Argentina and Australia.Euro. J. Plant. Pathol. 115: 223-233.

KING, J. E., R. J. COOK and S. C. MELVILLE, 1983. A review of septoria disease of wheat and barley. Ann. Biol. 103: 345-373.

MCDONALD, B. A. and C. LINDE, 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. Euphytica 124: 163-180.

MCDONALD, B. A., R. E. PETTWAY, R. S. CHEN, J. M. BOEGER and J. P. MARTINEZ, 1995. The population genetics of *Septoria tritici* (teleomorph: *Mycosphaerella graminicola*). Can. J. Bot .73 (Suppl.1): 292-301.

PETRAK, F. and E. ESFANDIARI, 1941. Beiträge zur Kenntnis der iranischen plizflora. Ann. Mycol. 39:204-228.

RAEDER, U. and P. BRODA, 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Appl. Microbiol 90: 901-908.

RAZAVI, M. and G. R. HUGHES, 2001. Molecular analysis provides evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan. Can. J. Plant Pathol. 23: 204 (abstract).

RAZAVI, M. and G. R. HUGHES, 2004. Microsatellite markers provide evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan. Genome 47: 789-794.

SANDERSON, F. R. 1972. A Mycosphaerella species as the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. ex. Desm. New Zeland J. Bot. 10: 707-709.

SHANER, G., R. E. FINNEY and F. L. PATTERSON, 1975. Expression and effectiveness of resistance in wheat to septoria leaf blotch. Phytopathology 65: 761-766.

SHARIF, G. and D. ERSHAD, 1966. A list of fungi on cultivated plants, shrubs and trees of Iran. Ministry of Agriculture, Plant Pests and Diseases Research institute, Evin, Tehran.

SHEARER, B. L. and R. D. WILCOXSON, 1978. Variation in the size of macropycnidiospore, and pycnidia of *Septoria tritici* on wheat. Can. J. Bot. 56: 742-746.

SHIPTON, W. A., W. R. J. BOYD, A. A. ROSIELLE and B. I. SHEARER, 1971. The common septoria diseases of wheat. Bot. Rev. 37: 237-262.

SOMMERHALDER, R. J., B. A. MCDONALD and J. ZHAN, 2006. The frequencies and spatial distribution of mating types in *Stagonospora nodorum* are consistent with

recurring sexual reproduction. Phytopathology 96: 234-239.

STEEL, R. G. D., J. H. TORRIE and D. A. DICKEY, 1997. Principles and Procedures of Statistics A Biometrical Approach. 3rd ed. McGraw-Hill, 666 pp.

TORABI, M. 1979. Study on the biology and pathobiology of *Septoria tritici* on wheat in northern and southern parts of Iran. MSc. Thesis, Tehran University, 127 pp.

WAALWIJK, C., O. MENDES, E. C. P. VERSTAPPEN, M. A. WAARD and G. H. J. KEMA, 2002. Isolation and characterization of the mating type idiomorphs from the wheat septoria leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. Fung. Cenet. Biol. 35: 277-286.

ZHAN, G. H. J., C. KEMA, C. WAALWIJK and B. A. MCDONALD, 2002. Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to continents. Fung. Genet. Biol 36: 128-136.

Address of the authors: Eng. S. KOMIJANI, Dr. H. AMINIAN and Dr. H. R. ETEBARIAN, University of Tehran, Abouryhan Campus, Tehran, Iran; Dr. M. RAZAVI, Iranian Research Institute of Plant Protection, P. O. Box 1454, Tehran 19395, Iran.