

## تنوع ژنتیکی *Ustilago hordei* عامل بیماری سیاهک پنهان جو در استان خوزستان با استفاده از نشانگرهای RAPD

محمد رضا اصلاحي<sup>۱\*</sup>، فاطمه طباطبایی<sup>۲</sup>، ناصر صفایی<sup>۳</sup> و مسعود شمس بخش<sup>۳</sup>

\*- نویسنده مسئول: مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان (mr\_eslahi@yahoo.com)

۲ و ۳ - کارشناس ارشد و دانشیاران گروه بیماری شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۳۰

### چکیده

بیماری سیاهک پنهان جو توسط قارچ *Ustilago hordei* (Pers.) Lagerh. ایجاد می‌شود. این بیماری باعث کاهش محصول در واحد سطح شده و یکی از عوامل محدود کننده تولید جو در ایران به شمار می‌رود. در سال زراعی ۸۸-۱۳۸۲، ۱۴۴ جدایه *U. hordei* از ۳۶ منطقه کشت و کار جو در استان جمع‌آوری شد و تنوع ژنتیکی ۱۰۰ جدایه با نشانگر مولکولی RAPD بررسی شد. از میان ۱۴ آغازگر استفاده شده، چهار آغازگر بر اساس تکثیر موفقیت آمیز، تکرارپذیری و تولید قطعات چندشکلی دی.ان.ا انتخاب شدند. چهار آغازگر RAPD در مجموع توانستند ۷۱ لوکوس با قابلیت امتیاز دهی را شناسایی و تکثیر کنند که ۸۸/۷۳ درصد آن‌ها (۶۳ لوکوس) چندشکل بودند. بیشترین چندشکلی توسط آغازگر OPA 04 (۱۹ لوکوس) و کمترین چندشکلی توسط آغازگر OPA 10 (۱۱ لوکوس) حاصل شد. بالاترین مقدار PIC مربوط به آغازگر OPA 18 معادل ۰/۳۳ و کمترین آن مربوط به آغازگرهای OPA 03 و OPA 10 برابر ۰/۲۹ بود. از میان آغازگرهای استفاده شده، آغازگرهای OPA 04 و OPA 18 که مقدار MI بالاتری را به خود اختصاص دادند، می‌توانند برای مطالعه جدایه‌های *U. hordei* با استفاده از نشانگر RAPD در سطح وسیع بکار گرفته شوند. تجزیه خوشه‌ای الگوهای بانندی حاصل از مجموع چهار آغازگر با استفاده از روش یو.پی.جی.ام.ا و ضریب تشابه جاکارد، در سطح تشابه ۶۶ درصد جدایه‌ها را در ۱۱ گروه انگشت نگاری قرار داد. این پژوهش، اولین مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *U. hordei* با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد.

کلید واژه ها: انگشت نگاری، جو، *Ustilago hordei*، ضریب تشابه جاکارد، نشانگر مولکولی

### مقدمه

تولید جو به شمار می‌رود (نیمان و بامدادیان، ۱۹۶۷). در سال‌های ۱۳۶۹ تا ۱۳۷۱ آلودگی مزارع کرج و زابل بین صفر تا ۹۰ درصد گزارش شده است (سالاری و همکاران ۱۳۷۲). این بیماری یکی از بیماری‌های مهم جو در استان لرستان بوده و در ۶۲/۵ درصد از مزارع مورد بررسی دیده شده است (درویش نیا، ۱۳۸۳).

نشانگرهای ژنتیکی یکی از ابزارها و تکنیک‌های ژنتیک جمعیت هستند. پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه

بیماری سیاهک پنهان جو توسط بازیدیومیست *Ustilago hordei* (Pers.) Lagerh. ایجاد می‌شود (فیشر و هولتون، ۱۹۵۷). این بیماری در بیشتر از ۸۲٪ مزارع جو کانادا گزارش و منجر به کاهش عملکرد ۰/۲ تا ۰/۸ درصد محصول شده است (توماس و منزیز، ۱۹۹۷). در ایران هم، یکی از عوامل محدود کننده

آلودگی حدود ۵۰ درصد مشاهده گردید. این بیماری در طی سالیان اخیر به علت حساسیت ارقام و عدم ضد عفونی بذر به فراوانی در استان خوزستان مشاهده می‌شود (اصلاحی، مشاهدات شخصی). یکی از مناسب‌ترین و بهترین راه‌های کنترل این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم است و یکی از پیشنهادها توسعه ارقام مقاوم علیه این بیماری بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت این بیمارگر از طریق مطالعه تنوع ژنتیکی می‌باشد. از این رو در پژوهش حاضر تنوع ژنتیکی جدایه‌های *U. hordei* با استفاده از نشانگرهای رپید در استان خوزستان بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه برداری

طی سال زراعی ۱۳۸۸-۱۳۸۷ از مناطق مختلف شهرستان‌های استان خوزستان، گیاهان جو آلوده به سیاهک پنهان جمع‌آوری شدند و پس از ثبت مشخصات مزرعه، منطقه و تاریخ نمونه‌برداری در پاکت‌های کاغذی قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شدند.

#### خالص سازی قارچ عامل بیماری

خالص سازی بیمارگر با استفاده از روش تک اسپور کردن انجام شد. برای تک اسپور نمودن از روش مخطط کردن سوسپانسیون بسیار رقیق قارچ بر روی محیط کشت آب-آگار<sup>۶</sup> دو درصد (بیست گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) حاوی ۲۵۰ پی پی ام آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل استفاده شد. بیست و چهار ساعت پس از کشت، اکثر تلیوسپورها با تولید پرومیسلیوم و اسپوریدی جوانه زدند. پس از انتقال تک تلیوسپورها به محیط کشت سیب زمینی- دکستروز-آگار<sup>۷</sup> حاوی ۲۵۰ پی پی ام آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، تشکک‌های پتری به مدت یک هفته در دمای اتاق نگهداری شدند. پس از رشد اسپورها یکی از کلنی‌ها انتخاب و بر روی محیط سیب زمینی- دکستروز-آگار حاوی آنتی‌بیوتیک به

مولکولی، بررسی چند شکلی توالی‌های دی.ان.ا را امکان پذیر ساخته است. این توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی، از طریق شبکه‌های رایانه‌ای در دسترس قرار می‌گیرند. کار با توالی‌های دی.ان.ا نه تنها آسان‌تر از کار با خصوصیات فنوتیپی است بلکه می‌توان با استفاده از انواع محاسبات و تکنیک‌های آماری بر روی داده‌های حاصل از توالی دی.ان.ا، ارزیابی دقیقی جهت دستیابی به تنوع ژنتیکی موجود، انجام داد (کوک و دانکن<sup>۱</sup>، ۱۹۹۷).

نشانگرهای رپید<sup>۲</sup> بدلیل مبتنی بودن بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و استفاده آسان، نشانگرهای عمومی هستند (ویلیامز و همکاران<sup>۳</sup>، ۱۹۹۰). چون واکنش رپید می‌تواند با استفاده از مقادیر اندکی از بیومس قارچ انجام شود، بنابراین، این ویژگی آن را به ابزاری ایده‌آل برای قارچ‌های بیوتروف اجباری مانند سفیدک‌ها و زنگ‌ها تبدیل کرده است. هر آغازگر رپید به طور بالقوه قادر به تکثیر تعدادی قطعه (۱ تا ۱۰ قطعه و حتی بیشتر) از جایگاههای مختلف ژنوم در یک واکنش پی.سی.آر می‌باشد (وایو و پاول<sup>۴</sup>، ۱۹۹۲). از قطعات تکثیر یافته، ممکن است چندین باند پلی مورفیک و تعدادی باند نومورفیک بدست آید. چندشکلی حاصل شده در نتیجه اختلاف در توالی یک یا هر دو جایگاه اتصال آغازگر می‌باشد که در این حالت از اتصال آغازگر به جایگاه جلوگیری می‌شود (ویلیامز و همکاران<sup>۵</sup>، ۱۹۹۰).

طی مشاهدات و بررسی‌های انجام شده در سال زراعی ۸۸-۱۳۸۷ در شهرستان‌های مختلف استان خوزستان، این بیماری با فراوانی بالایی در مزارع جو دیده شد. در مزارع برخی شهرستان‌ها مانند رامشیر، رامهرمز و شوش آلودگی بالای ۸۰ درصد و در شهرهای دیگری همچون مسیر خرمشهر و اهواز به طور میانگین

1-Cooke & Duncan

2-Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)

3-Williams *et al*

4-Wauyh & Powel

5-Williams *et al*

6- Water- Agar

7 - Potato dextrose Agar

گردید. رسوب حاصل تا زمان استخراج دی.ان.ا در اولترا فریزر در دمای ۷۰- درجه سلیسیوس نگهداری شد.

### استخراج دی.ان.ا

به منظور استخراج دی.ان.ا از روش صفایی و همکاران (۱۳۸۴) و در مورد جدایه‌هایی که پلی ساکارید زیادی تولید می‌کردند و حالت چسبنده و لزج داشتند از روش بیکرن و همکاران<sup>۱</sup> (۱۹۹۲) استفاده شد.

### بررسی کمیت و کیفیت دی.ان.ا استخراج شده

برای بررسی کیفیت دی.ان.ا استحصالی از ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد و برای تعیین غلظت دی.ان.ا استخراج شده و بررسی وضعیت آن از نظر همراه بودن آن با پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها از دستگاه اسپکتوفتومتر ساخت شرکت اپندورف آلمان استفاده گردید.

### بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی ریید

واکنش پی.سی.آر برای نشانگر ریید در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر بافر پی.سی.آر (۱۰X)، ۰/۴ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر دئوکسی نوکلوتیدها (۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر آغازگر (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مزاز (۵ واحد در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر دی.ان.ای (۲۰ نانو گرم در میکرولیتر) و ۱۲/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر مطابق روش صفایی و همکاران (۱۳۸۴) انجام گرفت.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۲</sup> با استفاده از نشانگر ریید، ابتدا ۱۴ آغازگر تصادفی ده نوکلئوتیدی (سیناژن، تهران) که مشخصات آن‌ها در جدول ۲ ذکر شده، روی ۱۵ جدایه مورد بررسی قرار گرفتند و از میان آن‌ها چهار آغازگر OPA 03، OPA 04، OPA 10 و OPA 18 به دلیل تکثیر موفقیت‌آمیز، تکرار پذیری و

صورت خطوط موازی کشت داده شد. کلنی‌های حاصل از رشد این تک کلنی‌ها، جدایه‌های خالصی بودند که برای ادامه کار انتخاب شدند.

### انتخاب جدایه‌های مورد مطالعه

در مجموع ۱۴۴ جدایه از ۳۶ منطقه مختلف کشت جو در استان خوزستان جداسازی شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ریید، ۱۰۰ جدایه با توجه به پراکنش جغرافیایی انتخاب شدند (جدول ۱).

### تهیه بیومس از قارچ عامل بیماری

به منظور استخراج دی.ان.ا از جدایه‌ها، زیست توده بیمارگر به دو روش تهیه شد. در روش اول، پس از خالص‌سازی جدایه‌ها، هر جدایه بر روی محیط سیب زمینی- دکستروز- آگار حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به صورت موازی کشت داده شد. چهار روز بعد، توده قارچی به کمک یک قاشقک سترون از روی محیط جمع‌آوری و داخل میکروتیوپ‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری سترون قرار داده و در دمای ۷۰- درجه سلیسیوس ذخیره شد.

در روش دوم، ابتدا یک کشت تازه از جدایه‌ها بر روی محیط سیب زمینی- دکستروز- آگار تهیه شد و پس از گذشت چهار روز، به کمک یک لوپ سترون یک کلنی از جدایه برداشته و به فلاسک‌های حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط مایع سیب زمینی- دکستروز (۲۰۰ گرم سیب زمینی و ۲۰ گرم دکستروز در یک لیتر آب مقطر) مایه زنی شد. فلاسک‌ها به مدت دو روز یا کمتر روی دستگاه شیکر انکوباتور در دمای ۲۲ درجه سلیسیوس با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه قرار داده شدند.

پس از گذشت این مدت، ۱۵ میلی لیتر از محتویات هر فلاسک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلیسیوس با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن فاز رویی به منظور حذف بیشتر پلی ساکاریدها، ۲۰-۱۵ میلی لیتر آب مقطر سترون به هر نمونه اضافه و یکبار دیگر با همان شرایط سانتریفوژ

1- Bakkeren *et al*

2- Polymerase chain reaction

جدول ۱- مشخصات ۱۰۰ جدایه *Ustilago hordei* مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر ریپید در استان خوزستان

جدایه	نام منطقه	کد	نام منطقه
D8	دشت آزادگان سیدعمر	G1	باغملک تنگ کرد
D9	دشت آزادگان شاکریه	G2	باغملک تنگ کرد
D11	دشت آزادگان شاکریه	G3	باغملک تنگ کرد
D12	دشت آزادگان شاکریه	G5	باغملک چال محمد حسین
R2	رامشیر آزاده	G6	باغملک چال محمد حسین
R3	رامشیر آزاده	G8	باغملک چال محمد حسین
R4	رامشیر آزاده	G9	باغملک دلی
R6	رامشیر چم اسحاق	G10	باغملک دلی
R7	رامشیر چم اسحاق	G13	باغملک قلعه تل
R9	رامشیر حاجی فلک	G16	باغملک قلعه تل
R10	رامشیر حاجی فلک	G17	باغملک مال آقا
R12	رامشیر حاجی فلک	G19	باغملک مال آقا
R13	رامشیر صیوان	G20	باغملک مال آقا
R15	رامشیر صیوان	B1	بهبهان جایزان
R16	رامشیر صیوان	B2	بهبهان جایزان
Z1	رامهرمز سلطان آباد	B3	بهبهان جایزان
Z3	رامهرمز سلطان آباد	B4	بهبهان جایزان
Z4	رامهرمز سلطان آباد	B5	بهبهان دودانگه
Z5	رامهرمز مریچه	B7	بهبهان دودانگه
Z7	رامهرمز مریچه	B8	بهبهان دودانگه
Z8	رامهرمز مریچه	B10	بهبهان سرچولکی
Z10	رامهرمز هاشم آباد	B11	بهبهان سرچولکی
Z11	رامهرمز هاشم آباد	B12	بهبهان سرچولکی
S1	شوش الوان	B13	بهبهان شرویی
S2	شوش الوان	B15	بهبهان شرویی
S3	شوش الوان	K2	خرمشهر ام اسود
S5	شوش شاوور	K3	خرمشهر ام اسود
S7	شوش شاوور	K4	خرمشهر ام اسود
S10	شوش شهرک مدنی	K5	خرمشهر ام الخرجین
S11	شوش شهرک مدنی	K6	خرمشهر ام الخرجین
S12	شوش شهرک مدنی	K9	خرمشهر تجریه
S13	شوش هفت تپه	K10	خرمشهر تجریه
S15	شوش هفت تپه	K11	خرمشهر تجریه
S16	شوش هفت تپه	K13	خرمشهر دیم ابن النجم
M1	مسجد سلیمان سه راهی لالی	K14	خرمشهر دیم ابن النجم
M2	مسجد سلیمان سه راهی لالی	K16	خرمشهر دیم ابن النجم
M3	مسجد سلیمان سه راهی لالی	K18	خرمشهر شریعه

نام منطقه	کد	نام منطقه	جدایه
خرمشهر شریعه	K19	هفتکل امام صفی	H1
خرمشهر شریعه	K20	هفتکل امام صفی	H2
خرمشهر کفیشه	K21	هفتکل امام صفی	H3
خرمشهر کفیشه	K22	هفتکل رگیوه	H6
خرمشهر کفیشه	K23	هفتکل رگیوه	H8
خرمشهر مکسر	K26	هفتکل سرتیوک	H10
خرمشهر مکسر	K27	هفتکل سرتیوک	H11
خرمشهر مکسر	K28	هفتکل کندک	H13
دشت آزادگان جلیزیه شرقی	D1	هفتکل کندک	H14
دشت آزادگان جلیزیه شرقی	D2	هفتکل کندک	H16
دشت آزادگان جلیزیه شرقی	D4	هفتکل گزین	H18
دشت آزادگان سیدعامر	D5	هفتکل گزین	H19
دشت آزادگان سیدعامر	D6	هفتکل گزین	H20

جدول ۲- فهرست توالی آغازگرهای RAPD استفاده شده در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰۰ جدایه U. hordei از استان خوزستان\*

منبع	توالی	آغازگر
More et al., 2001	5'-TGCCGAGCTG-3'	OPA 02
More et al., 2001	5'-AGTCAGCCAC-3'	OPA 03
Sharma et al., 2005	5'-AATCGGGCTG-3'	OPA 04
Sharma et al., 2005	5'-GAAACGGGTG-3'	OPA 07
More et al., 2001	5'-GGGTAACGCC-3'	OPA 09
Sharma et al., 2005	5'-GTGATCGCAG-3'	OPA 10
Sharma et al., 2005	5'-CAATCGCCGT-3'	OPA 11
Sharma et al., 2005	5'-TCTGTGCTGC-3'	OPA 14
Sharma et al., 2005	5'-AGGTGACCGT-3'	OPA 18
Pascual et al., 2000	5'-TTCCCCGTC-3'	OPB 13
Weber et al., 2005	5'-CTCACCGTCC-3'	OPC 09
Pascual et al., 2000	5'-GTGACATGCC-3'	OPD 03
Pascual et al., 2000	5'-TCTGGTGAGG-3'	OPD 04
Weber et al., 2005	5'-GAGTGGTGAC-3'	OPL 19

\*: آغازگرهایی که پررنگ تر نشان داده شدند برای ادامه مطالعات بررسی تنوع جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

ژنتیکی با استفاده از چهار آغازگر نشانگر رپید انتخاب شدند.

چهار آغازگر RAPD در مجموع توانستند ۷۱ لوکوس با قابلیت امتیاز دهی را شناسایی و تکثیر کنند. میانگین لوکوس‌ها به ازای هر آغازگر ۱۸ لوکوس بود که ۸۸/۷۳ درصد آنها (۶۳ لوکوس) چندشکل بودند و متوسط لوکوس چندشکل به ازای هر آغازگر تقریباً ۱۶ لوکوس بود. آغازگرهای مذکور باندهایی در محدوده ۲۰۰ تا ۴۵۰۰ جفت باز تکثیر نمودند. اطلاعات حاصل از آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۳ خلاصه شده است. بیشترین چندشکلی توسط آغازگر OPA 04 (۱۹ لوکوس) و کمترین چندشکلی توسط آغازگر OPA 10 (۱۱ لوکوس) حاصل شد و آغازگر OPA 04 بیشترین تعداد باند و آغازگر OPA 10 کمترین تعداد باند را تکثیر نمودند.

جدول ۳- نتایج حاصل از آغازگرهای RAPD، در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰۰ جدایه *U.hordei* از استان خوزستان

آغازگر	تعداد لوکوس تکثیر شده	تعداد لوکوس تک شکل	تعداد لوکوس چندشکل	درصد چندشکلی
OPA 03	۱۶	۱	۱۵	۹۳/۷۵
OPA 04	۱۹	۰	۱۹	۱۰۰
OPA 10	۱۶	۵	۱۱	۶۸/۷۵
OPA 18	۲۰	۲	۱۸	۹۰
کل	۷۱	۸	۶۳	۸۸/۱۲

تولید قطعات چند شکل و واضح انتخاب شدند و برای ادامه مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند.

تکثیر قطعات دی.ان.ا در ترموسایکلر ساخت شرکت اپندورف آلمان با سیکل‌های دمایی ۳ دقیقه ۹۲ درجه سلسیوس (۱ سیکل) ۱ دقیقه ۹۲ درجه، ۱ دقیقه ۳۰ درجه، ۲ دقیقه ۷۲ درجه (۳۵ سیکل) و ۵ دقیقه ۷۲ درجه (۱ سیکل) انجام شد. محصول واکنش در ژل آگارز ۱/۲ درصد در ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۱/۵ ساعت الکتروفورز شد.

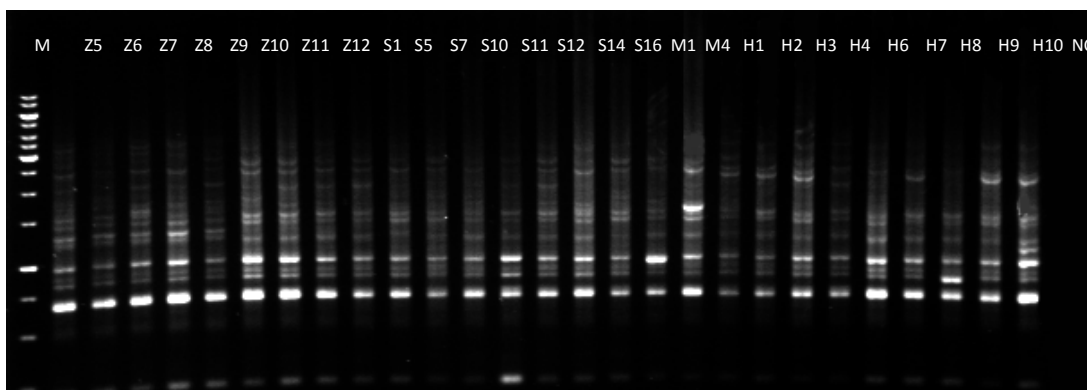
### تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تعیین ارتباط ژنتیکی بین جدایه‌ها، ژل بر اساس حضور یا عدم حضور باند به صورت اعداد یک و صفر (یک برای وجود باند و صفر برای عدم حضور باند) امتیازدهی شد. بر اساس وجود باندهای مشترک روی ژل ماتریس داده‌ها تشکیل شد و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد<sup>۱</sup>، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای<sup>۲</sup> به کمک روش یو.پی.جی.ام.ا<sup>۳</sup> در نرم افزار MVSP32 انجام شد. دندروگرام مربوط به هر آغازگر بطور جداگانه و همچنین دندروگرام مجموع آغازگرها رسم گردید. برای تجزیه خوشه‌ای داده‌ها، محاسبه ضریب کوفنتیک<sup>۴</sup>، تجزیه به مختصات اصلی و آزمون مانتل از نرم افزار (NTSYS-pc version 2.02) استفاده شد (رولف<sup>۴</sup>، ۲۰۰۰).

### نتایج و بحث

در طی فصل زراعی ۸۸-۱۳۸۷، صد و چهل و چهار جدایه از مناطق مختلف کشت جو در استان خوزستان جدا و خالص سازی شدند که از این تعداد، با توجه به پراکنش جغرافیایی، ۱۰۰ جدایه برای بررسی تنوع

- 1-Jaccard's Coefficient
- 2-Cluster Analysis
- 3-Unweighted Pair Group Method With Average Arithmetic
- 4-Rohlf



شکل ۱- قسمتی از الگوی بانندی فرآورده واکنش PCR جدایه‌های *U. hordei* با استفاده از آغازگر OPA 03. M: نشانگر مولکولی 1 Kb، NC: کنترل منفی ( مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آورده شده است).

شده، آغازگرهای OPA 04 و OPA 18 که مقدار MI بالاتری را به خود اختصاص دادند، می‌توانند برای مطالعه جدایه‌های *U. hordei* با استفاده از نشانگر RAPD در سطح وسیع بکار گرفته شوند.

تجزیه و تحلیل توام داده‌های حاصل از چهار آغازگر ریپید با روش یو.پی.جی.ام.۱ و ضریب تشابه جاکارد، ۱۰۰ جدایه منتخب را در سطح تشابه ۶۶ درصد، در ۱۱ گروه قرار داد (شکل ۲). گروه اول ۱۵ درصد جدایه‌ها را دربرداشت و جدایه‌هایی از شهرهای باغملک، دشت آزادگان، رامشیر، بهبهان، رامهرمز و شوش در این گروه قرار گرفتند. هر سه جدایه دودانگه از بهبهان و هر دو جدایه شاکریه از دشت آزادگان نیز در این گروه قرار گرفتند. گروه دوم که شامل ۴۳ درصد از جدایه‌ها بود به دو زیر گروه تقسیم می‌شد. زیر گروه اول شامل ۶۴ درصد از جدایه‌های رامشیر، ۵۰ درصد از جدایه‌های رامهرمز بود. دو جدایه از بهبهان، پنج جدایه از شوش و سه جدایه از باغملک نیز در این گروه قرار گرفتند. در این گروه، در سطح تشابه ۷۵ درصد هر چهار جدایه رامهرمز در کنار هم قرار گرفتند.

زیر گروه دوم این گروه شامل ۱۸ جدایه بود و هر سه جدایه امام صفی، هر دو جدایه رغیوه، هر دو جدایه سر تیوک در این گروه قرار گرفتند. شش جدایه از هفتکل به همراه یک جدایه از شوش در سطح تشابه ۷۵

آغازگر OPA03 ۱۶ باند و در دامنه ۲۰۰ تا ۴۰۰۰ جفت باز را تکثیر نمود. الگوی بانندی تعدادی از جدایه‌های این آغازگر در شکل ۱ آورده شده است. آغازگر OPA04 ۲۰ باند و در دامنه ۲۵۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز را تکثیر نمود. آغازگر OPA 10 در دامنه ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ جفت باز، ۱۶ باند را تکثیر نمود. آغازگر OPA18 ۲۰ باند و در دامنه ۳۰۰ تا ۴۵۰۰ جفت باز را تکثیر نمود.

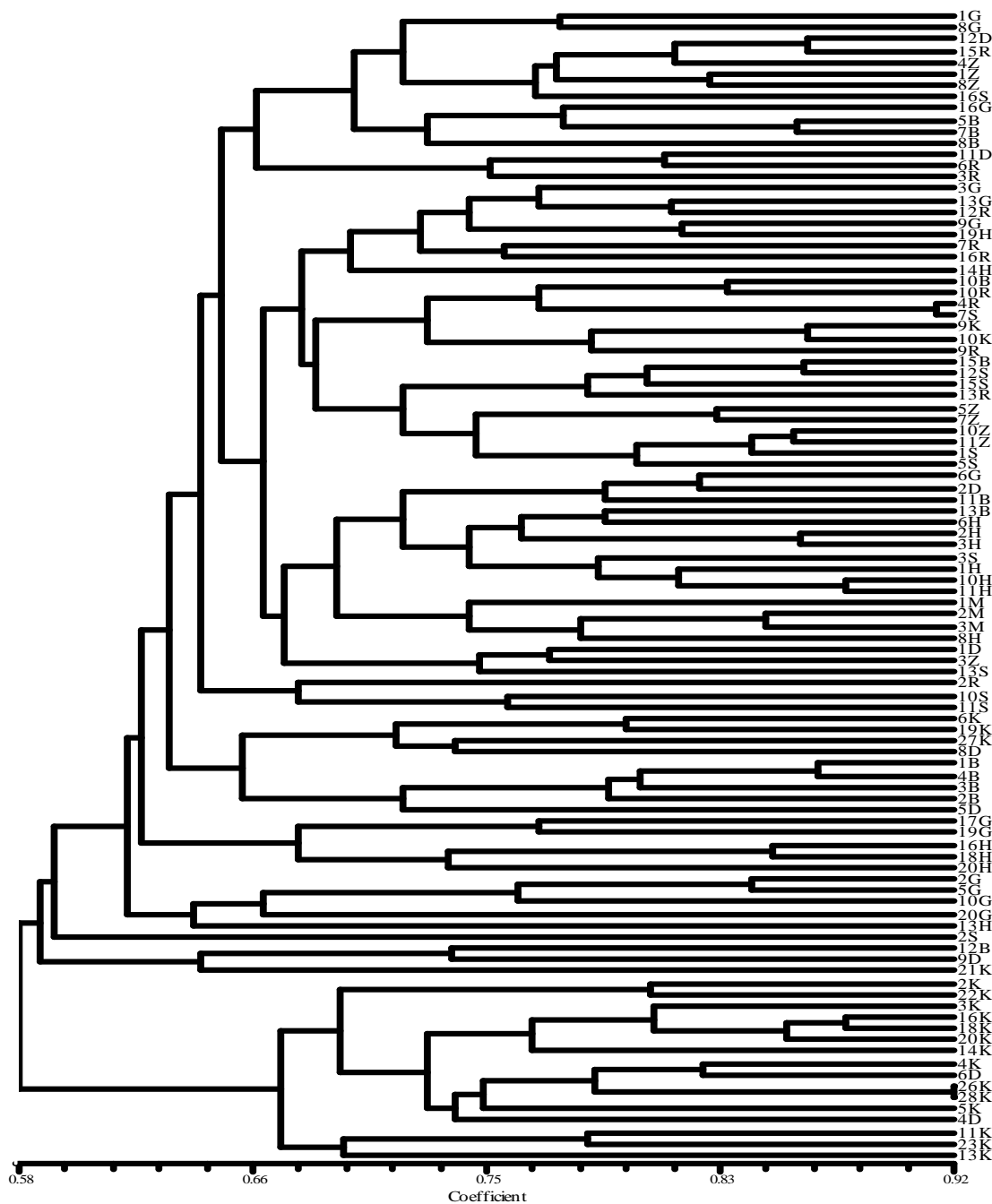
محتوای اطلاعات چندشکلی<sup>۱</sup> با استفاده از فراوانی آللی برای هر آغازگر به طور جداگانه محاسبه گردید. در نشانگر RAPD برای ۱۰۰ جدایه، بالاترین مقدار PIC مربوط به آغازگر OPA 18 معادل ۰/۳۳ و کمترین آن برابر ۰/۲۹ و مربوط به آغازگرهای OPA 03 و OPA 10 بود. با توجه به این که مقادیر PIC از صفر تا یک متغیر است هر چه این عدد بزرگ‌تر باشد، بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه ژنی در جمعیت مورد مطالعه است (کادها و گوپالاکریشنا، ۲۰۰۷). شاخص نشانگری که معیار کارایی نشانگر در تخمین چندشکلی می‌باشد، نیز برای تمام آغازگرها محاسبه شد. مقدار این شاخص برای ۱۰۰ جدایه بین ۱/۸۹ و ۶/۰۵ متغیر بود. از میان آغازگرهای استفاده

<sup>۱</sup>-Polymorphic Information Content (PIC)

<sup>۲</sup>-Chadha and Gopalakrishna

اصلاحی و همکاران: تنوع ژنتیکی *ustilago horder* عامل بیماری سیاهک...

درصد در کنار هم قرار گرفتند. در این زیر گروه تنها یک جدایه از رامهرمز و باغملک وجود داشت. هر سه جدایه مسجد سلیمان نیز در این زیر گروه قرار گرفتند و دو جدایه از این سه جدایه با ۸۵ درصد تشابه ژنتیکی در کنار یکدیگر قرار گرفتند و در سطح تشابه ۷۴ درصد در کنار جدایه سوم قرار گرفتند.



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۱۰۰ جدایه *U. hordei* با استفاده از ترکیب چهار آغازگر RAPD



تجزیه خوشه‌ای الگوهای بانندی حاصل از مجموع چهار آغازگر رپید، در سطح تشابه ۶۶ درصد جدایه‌ها را در ۱۱ گروه و در سطح تشابه ۷۵ درصد در ۴۶ گروه انگشت‌نگاری قرار داد که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بسیار زیاد میان جدایه‌هاست. گرچه آغازگرهای استفاده شده توانستند وجود تنوع ژنتیکی را در میان جدایه‌های جمع‌آوری شده نشان دهند و جدایه‌های برخی مناطق را تفکیک کنند اما گروه‌های انگشت‌نگاری بدست آمده با استفاده از نشانگرهای رپید به طور کامل از نظر منشاء جغرافیایی قابل تفکیک نبودند. قرار گرفتن جدایه‌های مختلف از نظر منشاء جغرافیایی در یک گروه انگشت‌نگاری، وجود هر گونه ارتباط میان منشاء جغرافیایی و گروه‌بندی ژنتیکی بر مبنای انگشت‌نگاری دی.ان.ا را نفی کرد. عدم ارتباط میان جدایه‌ها و مناطق جغرافیایی را می‌توان به مهاجرت جدایه‌ها و اختلاط مداوم ژنوتیپ‌ها بین زیر جمعیت‌ها و تبادل ژنتیکی فراوان نسبت داد (اسلاتکین<sup>۲</sup>، ۱۹۸۷؛ رایت<sup>۳</sup>، ۱۹۳۱).

در سطح تشابه ۶۶ درصد، ۵۰ درصد جدایه‌های منطقه خرمشهر در یک گروه انگشت‌نگاری قرار گرفتند که حدود ۸۸ درصد جدایه‌های آن گروه را تشکیل دادند. این گروه شامل ۱۶ جدایه بود که ۱۴ جدایه به منطقه خرمشهر و دو جدایه آن به دشت آزادگان تعلق داشتند. شاید بتوان جدا شدن نیمی از جدایه‌های خرمشهر از جدایه‌های سایر مناطق با استفاده از نشانگر رپید را به فاصله جغرافیایی که خرمشهر با سایر مناطق دارد نسبت داد. همچنین وجود دو جدایه از دشت آزادگان در میان این جدایه‌ها ممکن است به دلیل نزدیکی این منطقه به خرمشهر و در نتیجه مهاجرت ژن و ژنوتیپ باشد. در واقع به دلیل ماهیت بذوراز بودن این بیمارگر، انتقال بذور از یک منطقه به مناطق دیگر نقش مهمی را در توزیع جغرافیایی این بیمارگر ایفا می‌کند. چون در اثر انتقال و جابجایی بذور به مناطق مختلف، مخلوطی از

گروه سوم سه درصد جدایه‌ها را به خود اختصاص داد که یک جدایه به رامشیر و دو جدایه به شوش تعلق داشت و هر دو جدایه شوش با تشابه ژنتیکی ۷۵ درصد در کنار هم قرار گرفتند. گروه چهارم که شامل ۹ درصد جدایه‌ها بود به دو زیر گروه تقسیم می‌شد. زیر گروه اول شامل سه جدایه از خرمشهر و یک جدایه از سید عامر بود و زیر گروه دوم شامل هر چهار جدایه جابیزان و یک جدایه از سید عامر بود که چهار جدایه جابیزان با ۸۸ درصد تشابه در کنار یکدیگر قرار گرفتند.

گروه پنجم هم شامل دو جدایه از باغملک و سه جدایه از هفتکل بود که با ۷۶ درصد تشابه ژنتیکی در کنار هم قرار گرفتند. گروه ششم ۴ درصد جدایه‌ها را به خود اختصاص داد که همگی به منطقه باغملک تعلق داشتند. گروه هفتم، هشتم و نهم فقط شامل یک جدایه بودند که به ترتیب به متعلق به مناطق کندک، الوان و کفیشه بودند. گروه نهم شامل دو جدایه از سرچولکی و شاکریه بود و گروه آخر هم ۱۶ درصد جدایه‌ها را در بر می‌گرفت که ۸۸ درصد این جدایه‌ها به منطقه خرمشهر تعلق داشتند و مابقی به دشت آزادگان تعلق داشتند. در این گروه دو جدایه از منطقه مکسر خرمشهر با ۱۰۰ درصد تشابه ژنتیکی در کنار یکدیگر قرار گرفتند.

در تحقیق حاضر برای اولین بار در ایران، از نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *U. hordei* استفاده شد. نشانگرهای مولکولی در زمان فقدان خصوصیات ریخت‌شناسی و بیماری‌زایی، مهمترین وسیله برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها می‌باشند. ویژگی‌های قابل استفاده در تفکیک تاکسونومیک سیاهک‌ها مانند اندازه اسپور، شکل، ریخت‌شناسی، نوع جوانه‌زنی و دامنه میزبانی، محدود می‌باشد. بنابراین به کارگیری تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر DNA در تعیین روابط میان این قارچ‌ها مفید است (منزیز و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۰۳).

تاکنون هیچ مطالعه‌ای برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های این بیمارگر انجام نشده است و لذا به دلیل عدم وجود اطلاعات پیرامون تنوع ژنتیکی جدایه‌های این بیمارگر، امکان مقایسه داده‌های حاصل با نتایج کارهای دیگران وجود ندارد. اما با این حال، دو پژوهش در مورد بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های موجود در راسته *Ustilaginales* انجام شده است. نتایج این پژوهش‌ها حاکی از آن است که نه تنها میان گونه‌های جنس *Ustilago* تنوع قابل ملاحظه‌ای وجود دارد، بلکه میان جدایه‌های هر گونه هم تنوع وجود دارد (بیکرن و همکاران ۲۰۰۰؛ منزیز و همکاران<sup>۴</sup>، ۲۰۰۳). منزیز و همکاران<sup>۵</sup> (۲۰۰۳)، روابط فیلوژنی هفت گونه *Ustilago* شامل *U. bullata*، *U. nigra*، *U. hordei kollerii*، *U. tritici*، *U. nuda* و *U. avenae* را با استفاده از نشانگرهای آ.اف.ال.پی<sup>۶</sup> و ای.اس.اس.ار<sup>۷</sup> بررسی کردند و پیشنهاد کردند که *U. hordei* و *U. nigra* مونوفیلیتیک هستند و باید یک گونه در نظر گرفته شوند.

بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰۰ جدایه *U. hordei* با نشانگر رپید نشان داد که به طور کلی میان تمام جدایه‌ها ۵۸ درصد تشابه و ۴۲ درصد تفاوت وجود دارد. همانطور که پیش‌تر هم گفته شد چون داده‌ای پیرامون بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های این بیمارگر وجود ندارد لذا نمی‌توان گفت که آیا این میزان شباهت میان جدایه‌ها زیاد است یا کم. اگر در پژوهش‌های بعدی، از نشانگرهای مولکولی دیگری هم استفاده گردد و نمونه‌برداری هم از سایر استان‌های کشور انجام گیرد، بدیهی است که با قاطعیت و شفافیت بیشتری می‌توان در مورد وضعیت تنوع ژنتیکی در این بیمارگر اظهار نظر کرد و همچنین با مقایسه نتایج کار، دید صحیح‌تری را

ژنوتیپ‌های موجود در مناطق مختلف را در کنار هم خواهیم داشت و بنابراین تفکیک بیمارگر از نظر مناطق جغرافیایی معنایی نخواهد داشت. ضمن اینکه منشاء ژرم پلاسم میزبان هم می‌تواند در شباهت‌ها و تفاوت‌های جدایه‌ها موثر باشد.

شاخص‌های EMR، MI و PIC برای نشانگر RAPD محاسبه گردید. علت بالا بودن شاخص نشانگری و نسبت چندگانه موثر نشانگر RAPD، وجود تعدادی زیادی جایگاه‌های ژنی چندشکل به ازای هر آغازگر است. نسبت چندگانه موثر با توجه به ژنوم و جدایه قارچ، تغییر می‌کند که البته با تغییر در تعداد و نوع آغازگرها نتایج متفاوتی بدست می‌دهد (پاول و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۹۶).

در بررسی تنوع ژنتیکی مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف (جمعیت)، از نظر میزان تنوع ژنتیکی میان مناطق و همچنین جدایه‌های درون آن‌ها تفاوت مشاهده شد. بطوری که در برخی مناطق، جدایه‌ها در چندین گروه انگشت نگاری قرار گرفتند و بنابراین تنوع بیشتری هم نشان دادند اما جدایه‌های بسیاری از مناطق هم در یک گروه انگشت نگاری قرار گرفتند و تنوع کمی را نشان دادند. میزان تنوع در بین افراد هر جمعیت یا منطقه زیاد و میزان تنوع میان جمعیت‌های مختلف اندک است (جدول ۴) که می‌توان علت آن را به عوامل موثر در تغییرات ژنتیکی از قبیل جهش و مهاجرت ژن یا ژنوتیپ در اثر عوامل مختلف نسبت داد. شباهت ژنتیکی قابل ملاحظه در میان جدایه‌های داخل مناطق مختلف بیانگر این مطلب است که این جدایه‌ها ممکن است از جمعیت اجدادی مشترک منشاء گرفته باشند و این نتیجه، وجود تبادل ژنتیکی را تایید می‌کند.

آنچه که از دندروگرام حاصل برداشت می‌شود اینست که گرچه بسیاری از جدایه‌ها مشابه<sup>۲</sup> هستند اما همانند<sup>۳</sup> نیستند.

3 - Identical

4 - Bakkeren *et al*5 - Menzies *et al*

6 - Amplified fragment length polymorphism

7- Inter-Simple Sequence Repeat

1 Powell *et al*

2- Similar

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) مربوط به شش جمعیت *U.hordei* با استفاده از نشانگر ریپید

منبع تغییرات	درجه آزادی df	میانگن مربعات MS	واریانس (درصد)	P -value
Among population	5	20.027	11%	0.010
Within population	52	9.391	89%	
Total	57		100%	

### سپاسگزاری

پژوهش حاضر با مساعدت و امکانات مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان و آزمایشگاه گروه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته است. بدین وسیله از زحمات و همکاری مسئولین هر دو بخش تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

نسبت به تنوع ژنتیکی این بیمارگر در این منطقه و همچنین در کشور بدست آورد. در عین حال، به نظر می‌رسد به دلیل مشاهده تنوع ژنتیکی میان برخی از جمعیت‌های قارچ، که می‌تواند در تعیین روابط متقابل بیمارگر و میزبان تاثیر گذار باشد، می‌بایست بررسی‌های دقیق و وسیعی پیرامون تنوع ژنتیکی این قارچ در اولویت قرار گیرد. در یک جمعیت بیمارگر هرچه تنوع ژنتیکی بیشتر باشد، احتمال ظهور مقاومت قارچ به قارچ کش مورد استفاده در برنامه مدیریت مبارزه قوی تر می‌شود. از طرف دیگر پایداری میزان مقاومت یا تحمل ارقام بدون اطلاع از ساختار ژنتیکی بیمارگر قابل پیش بینی نیست (مکدونالد<sup>۱</sup> ۱۹۹۷). بنابراین پژوهش در زمینه تنوع ژنتیکی این قارچ می‌تواند زمینه را برای مدیریت بهتر بیماری سیاهک پنهان جو فراهم آورد.

درک کنونی ما از میزان تنوع ژنتیکی موجود در این گونه محدود به بررسی جدایه‌های در دسترس بود. به هر حال کسب اطلاعات دقیق‌تر پیرامون تنوع ژنتیکی این قارچ، وابسته به ادامه تحقیق و استفاده از جدایه‌هایی از مناطق مختلف کشور و بکارگیری نشانگرهای مولکولی دیگر نیز می‌باشد.

## منابع

۱. درویش نیا، م. ۱۳۸۳. بررسی میزان آلودگی و پراکندگی بیماری‌های مهم قارچی جو در استان لرستان. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ص ۷۲.
۲. سالاری، م.، شریفی تهرانی، ع. و اخوت، م. ۱۳۷۲. بررسی چند قارچ کش بر روی قارچ *Ustilago hordei* عامل بیماری سیاهک سخت جو در مزرعه. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ص ۳۷.
۳. صفایی، ن.، عزیزاده، ع.، سعیدی، ع.، رحیمیان، ح. و آدام، گ. ۱۳۸۴. تشخیص مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی *Fusarium graminearum* عامل بلایت سنبله گندم. مجله بیماری‌های گیاهی، ۴۱: ۱۸۹-۱۷۱.
4. Bakkeren, G., Gibbard, B., Yee, A., Froeliger, E., Leong, S., and Kronstad, J. 1992. The *a* and *b* loci of *Ustilago maydis* hybridize with DNA sequences from other smut fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5: 347-355.
5. Bakkeren, G., Kronstad, J.W., and Lévesque, C.A. 2000. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia*, 92: 510-521.
6. Chadha, S., and Gopalakrishna, T. 2007. Comparative assessment of REMAP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*. *Current Science*, 93: 688-692
7. Cooke, D. E. L., and Duncan, J.M. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research*, 101: 667-677.
8. Fisher, G.W., and Holton, C.S. 1957. *Biology and control of the smut fungi*. The Ronald Press, New York. 622 p.
9. McDonald, B.A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87: 448-453.
10. Menzies, J.G., Bakkeren, G., Matheson, F., Procnunier, J.D., and Woods, S. 2003. Use of inter-simple sequence repeats and amplified fragment length polymorphisms to analyze genetic relationships among small grain-infecting species of *Ustilago*. *Phytopathology*, 93: 167-175.
11. More, A.J., Challen, M.P., Warner, P.J., and Ellitt, T.J. 2001. RAPD discrimination of *Agaricus bisporus* mushroom cultivars. *Applied in Microbiology and Biotechnology*, 55: 442-49.
12. Niemman, E., and Bamdadian, A. 1967. Die ustialgo barande der gerste in Iran. (Ustilago Smut on barely in Iran). *Entomologia Phytopathology Application*, 25: 7-9.

13. Pascual, C.B., Toda, T., Raymondo, A.D., and Hyakumachi, M. 2000. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathology*, 49: 108-18.
14. Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Setauket, NY, USA, Exeter Biological Software.
15. Sharma, M., Gupta, S.K., and Sharma, T.R. 2005. Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. *Phytopathology*, 153: 449-56.
16. Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 36: 787-92.
17. Thomas, P.L., and Menzies, J.G. 1997. Cereal smuts in Manitoba and Saskatchewan, 1989-95. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 161-165.
18. Wauyh, R., and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology*, 10: 186-191.
19. Weber, Z., Irzykowska, L., and Bocianowski, J. (2005). Analysis of mycelia growth rates and RAPD-PCR profiles in a population of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* originating from wheat plants grown from fungicide-treated seed. *Journal of Phytopathology*, 153: 318-24.
20. Williams, G.K., Kubelik, R., Livak, J., Rafalski, J., and Tingey, V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers is useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
21. Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16: 97-159.