مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره سوم (پیاپی ۸)، پاییز ۱۳۸۹
صفحات ۲۰۲ ـ ۱۹۴

Original Article

بررسی تفاوت‌های ژنتیکی پاتوتایپ‌های زنگ قهوه‌ای گندم ایران بر اساس تعیین توالی ناحیه ITS1

علیرضا نیازمند*[1]، شهاب حاج منصور[2]

[1]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی، [2]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیماری شناسی گیاهی

چکیده:

سابقه و هدف: بیماری زنگ قهوه‌ای (زنگ برگی) گندم یکی از بیماری‌های مهم گندم است که توسط قارچ *Puccinia triticina Erikson* ایجاد می‌شود. در سال‌های اخیر توالی‌یابی نواحی مختلف DNA ریبوزومی به ویژه ناحیه ITS1 به منظور بررسی تفاوت‌های ژنتیکی پاتوتایپ‌های عوامل بیماریزای زنگ‌های مختلف گندم مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی تشابهات و تفاوت‌های موجود بین پاتوتایپ‌های عوامل بیماریزای زنگ قهوه‌ای گندم در مناطق مختلف جغرافیایی ایران بر اساس توالی یابی ناحیه ITS1 از DNA ریبوزومی بود.

مواد و روش‌ها: در ابتدا DNA یوریدینیوسپورهای پاتوتایپ‌های عامل بیماری زنگ قهوه ای گندم استخراج گردید. سپس از تکنیک PCR و پرایمرهای ITS5 و Rust2 به منظور تکثیر ناحیه ITS1 استفاده شد. محصولات PCR تعیین توالی شدند و شماره دسترسی آن‌ها در بانک ژن ثبت گردید. با استفاده از نرم افزارهای MEGA4 و DNA MAN هم‌ترازی توالی‌ها و مقایسه توالی‌های تکرار شونده در طول ناحیه ITS1 انجام گرفت.

یافته ها: بررسی توالی‌های ITS1 تکثیر شده جدایه‌ها نشان دهنده تفاوت ۱/۲-۰ درصدی بین آن‌ها بود. این تفاوت‌ها شامل نواحی جهش یافته، حذف و اضافه شده و نیز اندازه متفاوت ناحیه تکثیر شده در بین توالی‌های مورد بررسی بود. همچنین مشخص گردید که ناحیه ITS1 زنگ قهوه‌ای گندم از تعدادی نواحی تکرار شونده بازی تشکیل شده است. این نواحی از نظر تعداد واحدهای تکرار شونده و همچنین ترتیب بازها در بین جدایه‌های مختلف، متفاوت گزارش شدند.

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر با وجود تفاوت در طیف بیماریزایی و جغرافیایی جدایه‌های مورد بررسی، توالی‌های مربوط به ناحیه ITS1 دارای تفاوت اندکی با یکدیگر بودند. از آن‌جایی که هیچ گونه ارتباط منطقی بین تفاوت‌های موجود در ناحیه ITS1 جدایه‌ها و تفاوت میان پاتوتایپ و فنوتیپ جدایه‌ها مشاهده نشد، بنابراین توالی‌یابی این ناحیه از DNA ریبوزومی نمی‌تواند به عنوان یک مارکر جهت تشخیص پاتوتایپ‌های قارچ عامل بیماری زنگ قهوه ای گندم مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: زنگ قهوه‌ای گندم، توالی یابی، ITS1

دریافت مقاله: مهر ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: آبان ۱۳۸۹

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی
تلفن: ۰۹۱۷۷۱۰۴۸۷۰
پست الکترونیک: niazmnad2003@yahoo.com

مقدمه

بیماری زنگ قهوه‌ای (زنگ برگی) گندم یکی از بیماری‌های مهم گندم (*Triticum aestivum* L.) است که توسط قارچ *Puccinia triticina Erikson* (اخیراً نام علمی *Puccinia persistens ssp. Triticina* برای آن انتخاب شده است) ایجاد می‌شود (۱). این بیماری به عنوان یک عامل کاهش دهنده محصول گندم در بسیاری از نقاط جغرافیایی جهان شناخته شده است (۴-۲). میزان کاهش محصول ناشی از این بیماری متفاوت بوده و از مقادیر بسیار کم تا بالای ۵۰٪ گزارش گردیده است. این میزان به زمان آلودگی، مرحله رشد و مقاومت ارقام گندم وابسته می‌باشد (۵). در کشور مصر میزان کاهش محصول گندم ناشی از این بیماری بیش از ۵۰٪ گزارش گردیده است (۶). در ایران این بیماری به صورت اندمیک مشاهده شده و هر ساله در مناطقی از شمال، جنوب و غرب موجب خسارت زیادی می‌گردد.

قارچ مولد بیماری زنگ قهوه‌ای گندم دارای پاتوتایپ‌های بسیاری در ایران و سایر نقاط جهان می‌باشد. مبنای تعیین این پاتوتایپ‌ها، تلقیح مصنوعی جدایه‌های این قارچ بر روی ارقام استانداردی است که دارای ژن‌های مقاومت (*Lr* genes) به این بیماری می‌باشند. بررسی واکنش‌های متقابل این ارقام با قارچ مولد بیماری می‌تواند تعیین کننده فاکتورهای بیماری‌زایی موجود در قارچ عامل بیماری باشد. بر همین اساس پاتوتایپ قارچ با توجه به فرمول غیربیماریزایی/ بیماریزایی بر روی ژن‌های مقاومت تعیین می‌گردد. در بسیاری از نقاط ایران و جهان مطالعات زیادی به منظور تعیین پاتوتایپ‌های عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم در حال انجام است. بررسی‌ها نشان می‌دهند که جمعیت‌های متفاوتی از پاتوتایپ‌های این قارچ در کشورهای مختلف در حال فعالیت و ایجاد بیماری بر روی گیاه گندم می‌باشند (۱۴-۷). این امر بیانگر این نکته است که جمعیت‌های مختلف این قارچ از لحاظ ژنتیکی متنوع هستند. فهم دقیق و عمیق از ساختار ژنتیکی جمعیت پاتوژن تأثیرات عمیقی بر کارایی روش‌های کنترل دارد. هر چند تحقیقات زیادی در خصوص بیماری زنگ گندم در بسیاری از نقاط جهان در حال انجام است، اما شناسایی کامل ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این پاتوژن در مناطق جغرافیایی بزرگ (کشور و قاره)، کوچک (مزرعه، گیاه و حتی یک جوش) و شرایط آب و هوایی مختلف ضروری می‌باشد (۱۵). در سال‌های اخیر به کارگیری مارکرهای مولکولی به منظور بررسی تفاوت‌های ژنتیکی موجود میان جمعیت‌های مختلف قارچ‌های بیماریزای گیاهی به طور وسیعی گسترش یافته است. موضوع بسیاری از این تحقیقات بررسی ژن های ریبوزومی بوده است (۱۹-۱۶).

در اغلب یوکاریوت‌ها، DNA ریبوزومی (rDNA) دارای واحدهای تکراری از ژن‌هایی است که ژن‌های RNAهای ریبوزومی یعنی ژن‌های ۱۸S، ۵/۸S و ۲۸S راکد می‌نمایند. این نقاط ژنومی توسط فاصله اندازهایی به نام‌های ITS (Internal Transcribed spacer) و IGS (Intergenic spacer) از هم جدا می‌شوند. DNA ریبوزومی مشتمل بر سه قسمت ۱۸S، ۵/۸S و ۲۸S است. این قسمت‌ها از نظر تکاملی نواحی با ثبات بالا و دارای تغییرات اندک در طول تکامل می‌باشند. در دو طرف ژن ۵/۸S فاصله گذارهایی با نام‌های ITS1 و ITS2 قرار دارند. این بخش‌ها سریع‌ترین مناطق در حال تکامل DNA ریبوزومی هستند که اختصاصی گونه است و اغلب بین جمعیت ها، افراد و حتی در درون یک سلول منفرد نیز متفاوت می‌باشند. امروزه نواحی IGS و ITS منابع مهمی در به دست آوردن اطلاعات مربوط به شناسایی بسیاری از گونه‌های قارچی محسوب می‌شوند (۲۰). از مارکرهای ITS برای شناسایی گونه‌های قارچی کاملاً مشابه با یکدیگر استفاده شده است (۲۱ و ۲۲). چند شکلی مشاهده شده در این نواحی می‌تواند بیانگر تفاوت‌های درون و یا بین گونه‌ای قارچ‌ها باشد. چند شکلی در این نواحی در رابطه با ۹ نژاد از زنگ سیاه گندم *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* و ۶ نژاد از زنگ جو *Puccinia hordei* گزارش گردیده است (۲۳ و ۲۴).

تعیین توالی نواحی ITS1، ۵/۸S و ITS2 جدایه‌های جمع‌آوری شده قارچ *P. graminis* از نقاط مختلف ایران، اروپا، آمریکا و نیز از میزبانان مختلف نشان داده است که علاوه بر وجود چند شکلی طولی میان جدایه ها در این نواحی، تفاوت هایی نیز از نظر محتوای نوکلئوتیدی توالی‌ها وجود دارد (۲۵). اخیراً توالی یابی این نواحی ژنتیکی مورد توجه محققین قرار گرفته است. انجام این تحقیقات کمک بسیار زیادی به فهم تفاوت‌های ژنتیکی موجود بین پاتوتایپ‌ها و افراد موجود در جمعیت‌های این پاتوژن‌ها نموده

جدول ۱: فنوتایپ‌های بیماری‌زایی و فرمول بیماری‌زایی/ غیربیماری‌زایی جدایه‌های زنگ قهوه‌ای.

شماره	فنوتایپ‌های بیماریزا	فرمول بیماری‌زایی / غیربیماری‌زایی (ژن های *Lr*)	مناطق
۱	TKTT	**10+27+31,9,10+,19,25,28,29,36,23+**/b,1,2a,2c,3a,2b,3bg,3ka,10,14a,11,12,13,14b,15,16,17,18,20,21,22a,22b,23,24,26,30,32,33,34,35,37	مریوان I
۲	PKTT	**10+27+31,2a,9,10+,19,20,25,28,29,33,36,23+**/b,1,2b,2c,3,3bg,3ka,10,11,12,13,14a,14b,15,16,17,18,22b,21,22a,23,24,26,30,32,34,35,37	مریوان II
۳	PJTT	**10+27+31,2a,9,10+,19,23,23+,25,26,28,29,36**/b,1,2b,2c,3,3bg,3ka,10,11,12,13,14a,14b,15,16,17,18,20,21,22a,22b,24,30,32,33,34,35,37	همدان I
٤	PKTT	**10+27+31,2a,9,10+,19,20,25,28,29,33,36,23+**/b,1,2b,2c,3,3bg,3ka,10,11,12,13,14a,14b,15,16,17,18,22b,21,22a,23,24,26,30,32,34,35,37	همدان II
٥	FFTQ	**10+27+31,1,2a,9,13,14a,15,16,18,19,25,28,29,34,36**/b,2b,2c,3,3bg,3ka,10,10+,11,12,14b,17,20,21,22a,22b,23,23+,24,26,30,32,33,35,37	اسلام آباد
٦	PGJR	**10+27+31,2a,2b,3ka,9,10+,13,14a,19,21,24,25,26,28,30,33,36**/b,1,2c,3,3bg,10,11,12,15,14b,16,17,18,20,22a,22b,23,23+,29,32,33,35,37	بروجرد I
۷	TJTS	**10+27+31,2b,9,10+,15,18,19,21,23,23+,25,26,28,29,33,34,36**/b,1,2a,2c,3,3bg,3ka,10,11,12,13,14a,14b,16,17,20,22a,22b,24,30,32,35,37	بروجرد II
۸	MHTT	**10+27+31,2a,2b,2c,9,15,19,21,23+,24,25,28,29,34,36**/b,1,3,3bg,3ka,10,10+,11,12,13,14a,14b,16,17,18,20,22a,22b,23,26,30,32,33,35,37	اردبیل I
۹	THRK	**10+27+31,b,9,15,17,19,22a,24,25,28,29,32,34,36,37**/1,2a,2b,2c,3,3bg,3ka,10,10+,11,12,13,14a,14b,16,18,20,21,22b,23,23+,26,30,33,35	اردبیل II
۱۰	MBRH	**10+27+31,b,2a,2c,9,10+,12,13,14a,15,16,17,19,21,23,23+,24,25,26,28,29,32,36**/1,2b,3,3bg,3ka,10,11,14b,18,20,22a,22b,30,33,34,35,37	اهواز I
۱۱	TKTT	**10+27+31,9,10+,19,25,28,29,36,23+**/b,1,2a,2c,3,2b,3bg,3ka,10,14a,11,12,13,14b,15,16,17,18,20,21,22a,22b,23,24,26,30,32,33,34,35,37	اهواز II
۱۲	FGST	**10+27+31,1,2a,2b,3bg,9,10+,13,19,21,22b,23,23+,24,25,26,28,29,30,32,34,35,36,37**/b,2c,3,3ka,10,11,12,14a,14b,15,16,17,18,20,22a,33	قراخیل I
۱۳	PKQT	**10+27+31,2a,9,10+,17,19,21,23,23+,25,28,29,30,33,34,36**/b,1,2b,2c,3,3bg,3ka,10,11,12,13,14a,14b,15,16,18,20,22a,22b,24,26,32,35,37	قراخیل II
۱٤	PKRT	**10+27+31,2a,9,10+,13,15,17,19,21,,23+,25,28,29,34,36**/b,1,2c,2b,3,3bg,3ka,10,11,12,14a,14b,16,18,20,22a,22b,23,24,26,30,32,33,35,37	کرج I
۱٥	PKHT	**10+27+31,2a,3ka,9,10+,17,19,20,23+,25,28,32,34,36,39**/b,1,2b,2c,3,3bg,10,11,12,13,14a,14b,16,18,22a,22b,23,24,26,29,30,32,33,35,37	کرج II
۱٦	PJTT	**10+27+31,2a,9,10+,19,23,23+,25,26,28,29,36**/b,1,2b,2c,3,3bg,3ka,10,11,12,13,14a,14b,15,16,17,18,20,21,22a,22b,24,30,32,33,34,35,37	گرگانI
۱۷	BBLN	**10+27+31,1,2a,2b,2c,3,3bg,9,10,10+,11,12,13,14b,15,16,17,18,19,21,22b,23,23+,24,25,26,28,29,30,32,33,34,36**/b,3ka,14a,20,22a,35,37	گرگانII
۱۸	TCTT	**10+27+31,9,10+,14b,16,19,21,24,25,28,29,36,23+**/b,1,2a,2b,2c,3,3bg,3ka,10,11,12,13,14a,15,17,18,20,22a,22b,23,26,30,32,33,34,35,37	مشهد
۱۹	PKTT	**10+27+31,2a,9,10+,19,20,25,28,29,33,36,23+**/b,1,2b,2c,3,3bg,3ka,10,11,12,13,14a,14b,15,16,17,18,22b,21,22a,23,24,26,30,32,34,35,37	زرقان
۲۰	PHTQ	**10+27+31,2a,9,10+,14a,15,18,19,23,23+,24,25,28,29,34,35,36**/b,1,2c,2b,3,3bg,3ka,10,11,12,13,14b,16,17,26,20,21,22a,22b,30,32,33,37	مغان

است. در مطالعه حاضر سعی شده است که تشابه‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی بین پاتوتایپ‌های مختلف عوامل بیماریزای زنگ قهوه‌ای گندم در مناطق مختلف جغرافیایی ایران بر اساس توالی یابی ناحیه ITS1 از DNA ریبوزومی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

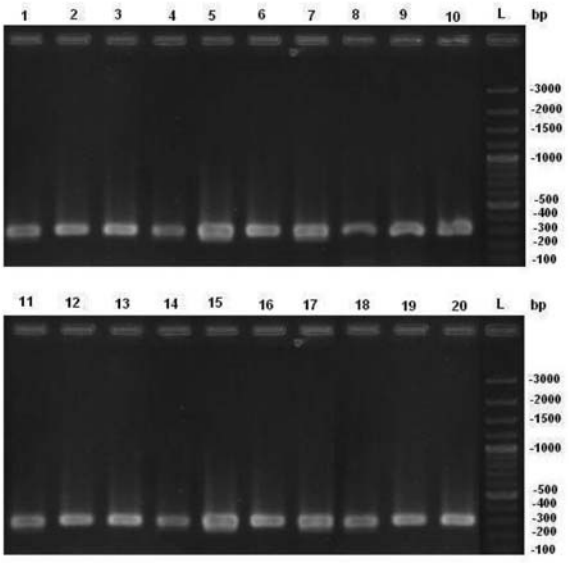
الف) انتخاب نمونه‌ها: در ابتدا ۲۰ جدایه *P. triticina* متفاوت از نظر جغرافیایی و پاتوتایپی (که در مطالعات قبلی تعیین پاتوتایپ شده بودند) انتخاب گردیدند (۱۴). این جدایه ها مربوط به مناطق اردبیل، اسلام آباد، اهواز، بروجرد، زرقان، قراخیل ساری، کرج، گرگان، مشهد، مریوان، مغان و همدان بودند (جدول ۱).

ب) استخراج *DNA*: مقدار ۰/۲ گرم پودر یوریدینیوسپور از هر جدایه به طور مجزا در لوله های ۱/۵ سی‌سی استریل ریخته شد. سپس ۰/۱ گرم پودر کاربراندوم اتوکلاو شده به لوله‌ها اضافه گردید. لوله‌ها درون هاون چینی بزرگ قرار گرفته و مقدار ۱ لیتر ازت مایع به آن اضافه شد. پس از انجماد یوریدینیوسپورها، لوله‌ها سریعاً از ازت مایع خارج و به‌کمک یک مته معمولی حدود ۲۰ تا ۳۰ ثانیه ساییده شدند. در این مطالعه به جای نوک مته فلزی معمولی، از یک تیپ (sampler) ۱/۵ سی‌سی اتوکلاو شده که نوک آن با شعله کاملاً مسدود شده بود استفاده گردید. بقیه مراحل استخراج DNA بر مبنای روش توصیه شده توسط ریدر و برودا انجام گرفت

(۲۶). با این تفاوت که پس از افزودن بافر به تیوپ‌های محتوی اسپورهای ساییده شده، تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه به وسیله شیکر با حداکثر دور مخلوط گردیدند.

ج) *ITS1 PCR*: از پرایمرهای (ITS5) 5'-dGGA AGT AAA AGT CTG TAA CAA GG-3' و (Rust2) 5'-dTTT CAC TGT GTT CTT CAT C-3 به منظور تکثیر ناحیه ITS1 استفاده گردید. این آغازگرها تکثیر ناحیه‌ای را در فاصله انداز بین ژن‌های ۱۸S و ۵/۸S در DNA ریبوزومی به نام ITS1 بر عهده دارند.

واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر PCR buffer (10×)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (1.5 mM)، ۱ میکرولیتر dNTPs (5 pM)، ۲ واحد (۰/۳ میکرولیتر) آنزیم *Taq* DNA Polymerase، ۲ میکرولیتر (۵۰ پیکومول) از هر آغازگر و ۳ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) از نمونه DNA انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳/۵ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز یک درصد منتقل و پس از الکتروفورز به‌وسیله دستگاه ژل داک (Gel Documentation) مورد بررسی قرار گرفت. سپس این محصولات مستقیماً برای تعیین توالی استفاده شدند.



شکل ۱: محصولات PCR ناحیه ITS1 بیست جدایه قارچ *Puccinia triticina*.

د) تجزیه و تحلیل داده ها: برای شناسایی توالی‌های تکثیر شده ITS1، این توالی‌ها به کمک نرم‌افزار NCBI Blast Search مورد بررسی قرار گرفتند. پس از آماده سازی توالی‌ها، هم ترازی آن‌ها با کمک نرم افزار MEGA4 انجام گرفت. به منظور بررسی واحدهایی از بازهای تکرار شده در طول ناحیه ITS1 از هر جدایه و مقایسه این واحدهای تکرار شده با یکدیگر از نرم افزار DNA MAN استفاده شد. به‌کمک این نرم افزار موقعیت و تعداد بازهای تکرار شده در طول توالی هر جدایه تعیین گردید. توالی‌های تکثیر شده در بانک ژن به شماره JN120312 تا JN120331 به ثبت رسیدند.

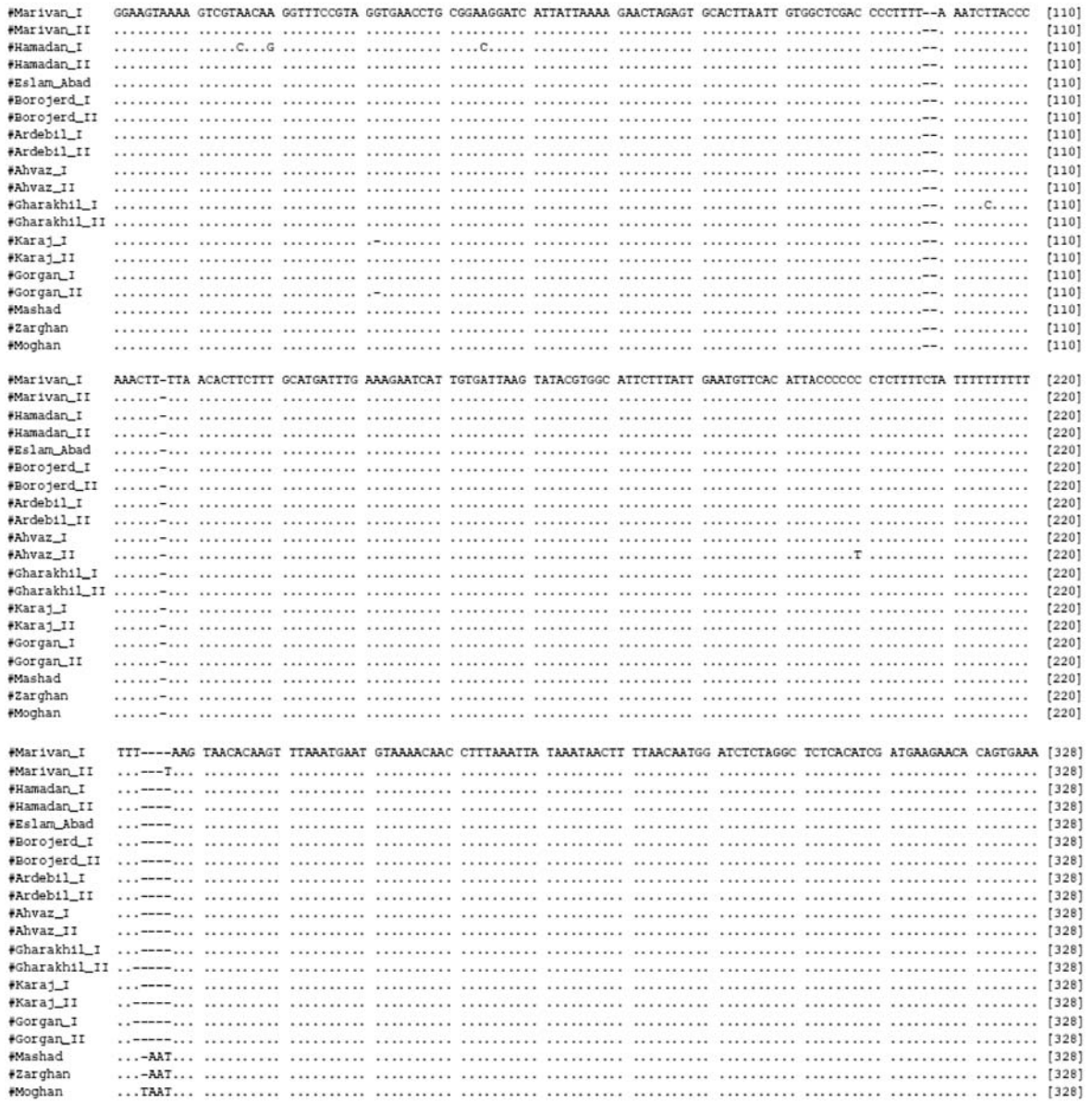
نتایج

الف) تکثیرناحیه *rDNA ITS1*: حاصل تکثیر این ناحیه ژنومی از تمامی جدایه‌های مورد بررسی تولید باندهایی در حدود ۳۲۱ جفت بازی بود (شکل ۱). وجود این باندهای یکسان در مورد تمامی جدایه‌ها بیانگر عدم وجود چند شکلی طولی جدایه‌های مورد بررسی در این ناحیه از DNA می‌باشد.

ب) تجزیه و تحلیل توالی‌های جدایه ها: پس از تعیین توالی قطعات تکثیر شده توسط PCR، با کمک نرم افزار Blast Search NCBI تکثیر ناحیه ITS1 قارچ *P.triticina* مورد تأیید قرار گرفت.

هم‌ترازی جفت بازی از توالی‌های ITS1 مربوط به جدایه‌های مورد بررسی نشان دهنده ۱/۲-۰ درصد تفاوت بین آنها بود. این تفاوت ها شامل وجود نواحی جهش یافته، حذف و یا اضافه شده در بین توالی‌های مورد بررسی بود (شکل و جدول ۲). همچنین به دلیل وجود نواحی حذف و اضافه شده تفاوت‌هایی از نظر طول رشته تکثیر شده در میان جدایه‌های مورد بررسی مشاهده گردید. به طوری که جدایه‌های مریوان II با طول رشته ۳۲۲ جفت بازی، قراخیل II، کرج Iو II، گرگان I با طول رشته ۳۲۰ جفت بازی، گرگان II با طول رشته ۳۱۹ جفت بازی، مشهد و زرقان با طول رشته ۳۲۴ جفت بازی و جدایه مغان با طول رشته ۳۲۵ جفت بازی از سایر جدایه‌ها که دارای طول رشته ۳۲۱ جفت بازی بودند متفاوت گزارش شدند.

جدایه‌های همدان در موقعیت های ۱۶، ۲۰ و ۴۵ به ترتیب دارای باز های C، G و C، اهواز II در موقعیت ۱۹۷ دارای باز T و قراخیل I در موقعیت ۱۰۳ دارای باز C بودند. این امر نشان دهنده وجود جهش در این نواحی می باشد. جدایه مغان نسبت به سایر جدایه‌ها فاقد نقاط حذف شده بود اما در سایر جدایه‌های مورد بررسی یک ناحیه حذف شده در موقعیت بازهای ۲۲۱ تا ۲۲۴ وجود داشت. در مورد جدایه های قراخیل II، کرج II و گرگان I و II این نواحی حذف شده در موقعیت باز های ۲۲۰ تا ۲۲۴ مشاهده گردید. همچنین در جدایه‌های گرگان I و کرج I یک ناحیه حذف شده نیز در موقعیت باز ۳۲ دیده شد. جدایه کرج I دارای ناحیه حذف شده در موقعیت باز های ۲۲۲ تا ۲۲۴ بود. جدایه‌های مشهد و زرقان تنها دارای یک ناحیه حذف شده در موقعت باز ۲۲۱ بودند. جدایه مغان در موقعیت بازهای ۲۲۱ تا ۲۲۴ به ترتیب دارای باز های T، A، C و T بود. جدایه‌های مشهد و زرقان در موقعیت باز های ۲۲۲ تا ۲۲۴ به ترتیب دارای بازهای A، C و T بودند. جدایه مریوان II در موقعیت باز ۲۲۱ دارای یک باز T بود. این میزان تفاوت در بین توالی‌های ناحیه ITS1 نشان‌دهنده اختلاف‌های بسیار اندک در این ناحیه از جدایه های مورد بررسی می باشد.



شکل ۲: هم‌ترازی توالی‌های ناحیه ITS1 جدایه‌های مورد بررسی زنگ قهوه ای گندم.

جدول۲: تفاوت های موجود بین جدایه‌های مورد بررسی از نظر اندازه رشته، موقعیت و نوع بازهای جهش یافته، حذف و اضافه شده.

ردیف	نام جدایه	اندازه رشته (جفت باز)	موقعیت و نوع باز جهش یافته	موقعیت بازهای حذف شده	موقعیت و نوع باز اضافه شده
۱	مریوان I	۳۲۱	-	۲۲۱- ۲۲٤	-
۲	مریوان II	۳۲۲	-	۲۲۲- ۲۲٤	(T)۲۲۱
۳	همدان I	۳۲۱	(C) ٤٥ ، (G) ۲۰ ، (C) ۱٦	۲۲۱- ۲۲٤	-
٤	همدان II	۳۲۱	-	۲۲۱- ۲۲٤	-
٥	اسلام آباد	۳۲۱	-	۲۲۱- ۲۲٤	-
٦	بروجرد I	۳۲۱	-	۲۲۱- ۲۲٤	-
۷	بروجرد II	۳۲۱	-	۲۲۱- ۲۲٤	-
۸	اردبیل I	۳۲۱	-	۲۲۱- ۲۲٤	-
۹	اردبیل II	۳۲۱	-	۲۲۱- ۲۲٤	-
۱۰	اهواز I	۳۲۱	-	۲۲۱- ۲۲٤	-
۱۱	اهواز II	۳۲۱	(T) ۱۹۷	۲۲۱- ۲۲٤	-
۱۲	قراخیل I	۳۲۱	(C) ۱۰۳	۲۲۱- ۲۲٤	-
۱۳	قراخیل II	۳۲۰	-	۲۲۰- ۲۲٤	-
۱٤	کرج I	۳۲۰	-	۲۲۲ ،۳۲- ۲۲٤	-
۱٥	کرج II	۳۲۰	-	۲۲۰- ۲۲٤	-
۱٦	گرگانI	۳۲۰	-	۲۲۰- ۲۲٤	-
۱۷	گرگانII	۳۱۹	-	۲۲۰ ،۳۲- ۲۲٤	-
۱۸	مشهد	۳۲٤	-	۲۲۱	(T)۲۲٤ ،(C)۲۲۳ ،(A)۲۲۲
۱۹	زرقان	۳۲٤	-	۲۲۱	(T)۲۲٤ ،(C)۲۲۳ ،(A)۲۲۲
۲۰	مغان	۳۲٥	-	-	(T)۲۲٤ ،(C)۲۲۳ ،(A)۲۲۲ ،(T)۲۲۱

بررسی توالی‌های ITS1 تکثیر شده جدایه‌ها از نظر بازهای تکرار شده در طول رشته، نشان داد که ناحیه ITS1 زنگ قهوه‌ای گندم از تعدادی نواحی تکرار شده بازی تشکیل شده است. این نواحی تکرار شونده در تمام جدایه‌های مورد بررسی وجود داشتند و از نظر تعداد واحدهای تکرار شونده و همچنین ترتیب بازها در بین جدایه‌های مورد بررسی تفاوت‌هایی مشاهده گردید (جدول ۲).

در اکثر جدایه‌های مورد بررسی تعداد واحدهای باز تکرار شونده ۲۷ واحد بود. به جز جدایه همدان I که دارای ۲۵ واحد بازی، جدایه‌های قراخیل I و II، کرج II و گرگان I که دارای ۲۶ واحد تکرار شونده باز و جدایه‌های مریوان II، کرج I و مغان که دارای ۲۸ واحد تکرار شونده باز بودند.

در این مطالعه بزرگ‌ترین واحد تکرار شونده، دارای ۱۱ جفت باز بود که در تمامی جدایه‌های مورد بررسی مشاهده گردید. جدایه‌های مریوان II و مغان دارای یک واحد اضافی از بازهای تکرار شونده (TTTTTTT) نسبت به سایر جدایه‌های مورد بررسی بودند. همچنین جدایه‌های گرگان I و II، کرج II و قراخیل II فاقد بازهای تکرار شونده (TTTTTTT) بودند. سایر واحدهای تکرار شونده بازها در تمامی جدایه‌های مورد بررسی یکسان بودند. هر چند این واحدهای بازی تکرار شونده از نظر موقعیت قرار گیری در بین جدایه‌های مورد بررسی تفاوت‌هایی با یکدیگر داشتند. بنابراین به طور کلی می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که ناحیه ITS1 قارچ *P. triticina* از قسمت‌هایی تشکیل شده است که دارای واحدهایی از بازهای تکرار شونده و نواحی دیگری که دارای توالی‌های اختصاصی و غیر تکراری می‌باشند.

بحث

در این پژوهش با وجود تفاوت در طیف بیماریزایی و جغرافیایی جدایه‌های مورد بررسی، توالی‌های مربوط به ناحیه ITS1 دارای تفاوت اندکی با یکدیگر بودند. مطالعات نشان داده است که تفاوت‌های درون و بین گونه‌ای، گونه‌های مختلف قارچی در این ناحیه اندک می‌باشد (۲۷). در رابطه با قارچ *P. boroniae* نیز گزارش گردیده است که چند شکلی اندکی در ناحیه ITS1 جدایه‌های این قارچ جمع‌آوری شده از مناطق مختلف آب و هوایی و از میزبانان مختلف بودند (۲۸). همچنین در طول سال‌های ۱۹۰۳ تا ۲۰۰۳ عدم وجود چند شکلی در ناحیه ITS1 جدایه‌های قارچ *P. horiana* از مناطق مختلف کشور بلژیک و نیز سایر کشورها به

اثبات رسیده است (۲۹). وجود تفاوت‌های زیاد در توالی ناحیه ITS1 جدایه‌های سه گونه *P. graminis*، *P. triticina* و *P. striiformis* گزارش شده است (۳۰). توالی ناحیه ITS1 در پاتوتایپ‌های مختلف قارچ *P. triticina* دارای مناطق جهش یافته، حذف و یا اضافه شده اندکی نسبت به یکدیگر بودند اما تفاوت‌های اندکی از نظر طولی در بین آن‌ها مشاهده گردید.

تفاوت‌های اندک در طول ناحیه ITS1 در بین جدایه‌های قارچ *P. boroniae* گزارش شده است. دلیل این تفاوت‌ها را شاید بتوان اختلاف در تعداد واحدهای تکرار شونده AT این قارچ دانست. همچنین در مورد این گونه قارچی وجود نقاط جهش یافته در ناحیه ITS1 مشخص شده است (۲۸). جدایه‌های قارچ *P. graminis* که از مناطق مختلف ایران، آمریکا و آلمان جمع‌آوری شده بودند نیز تفاوت در طول و محتوای بازهای آلی در ناحیه ITS1 را نشان داده‌اند (۲۵). تفاوت‌هایی از نظر تعداد واحدهای سه تایی تکرار شونده در ناحیه ITS1 درون و بین جدایه‌های قارچ *P. horiana* مشاهده شده است (۲۹).

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که توالی‌های ناحیه ITS1 در بین جدایه‌های مختلف قارچ عامل زنگ قهوه ای گندم، بسیار مشابه با یکدیگر می‌باشند. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گیری نمود که میزان تکامل درون گونه‌ای در این ناحیه بسیار اندک بوده است. با توجه به این نکته چنین به نظر می‌رسد که این ناحیه یک بخش حفاظت شده درون گونه‌ای بوده و جدایه‌هایی که تحت شرایط آب و هوایی مختلف و با توان بیماریزایی متفاوت مشغول فعالیت می‌باشند از لحاظ توالی‌های این ناحیه از DNA تفاوتی با یکدیگر ندارند.

نتیجه گیری

یافته‌های پژوهش جاری نشان داد که هیچ گونه ارتباط منطقی بین تفاوت‌های موجود در ناحیه ITS1 جدایه‌ها و تفاوت میان پاتوتایپ و فنوتایپ جدایه‌ها وجود نداشته است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که توالی یابی این ناحیه از DNA ریبوزومی نمی‌تواند به عنوان یک نشانگر جهت تشخیص پاتوتایپ‌های قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین یافتن توالی‌هایی از دیگر نواحی ژنومی این قارچ که بتواند بیانگر تفاوت‌های پاتوتایپی باشد ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Abbasy M, Ershad J, Hajarood G. Taxonomy of *Puccinia* recondita s. lat. causing brown rust on grasses in Iran. Iran J Plant Pathol. 2005; 4(41): 9-15. [In Persian].
2. Kolmer JA. Tracking wheat rust on a continental scale. Curr Opin Plant Biol. 2005; 8: 441-449.
3. Marasas CN, Smale M, Singh RP. The economic impact in developing countries of leaf rust resistance breeding in CIMMYT related spring bread wheat. Mexico, DF: International Maize and Wheat Improvement Center. 2004; 38P.
4. Roelfs AP, Singh RP, Saari EE. Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management. Mexico, DF: CIMMYT. 1992; 81P.
5. Chester KS. The nature and prevention of the cereal rusts as exemplified in the leaf rust of wheat. Waltham, MA: Chronica Botanica. 1946; 269P.
6. Abdel Hak TM, EL- Sherif NA, Bassiouny A, Shafik I A, EL Dauadi Y. Control of wheat leaf rust by systemic fungicides. Proceedings of the Fifth European and Mediberranean Cereal Rusts Conference. Bari, Italy, 1980; 255-266.
7. Hanzalova A, Huszar J, Bartos P, Herzova E. Occurrence of wheat leaf rust *Puccinia triticina* races and virulence changes in Slovakia in 1994-2004. J Biol. 2008; 63 (2): 171-174.
8. Kassem M, El-Ahmed A, Shafik HM, Nachit F. Identification of physiological races of *Puccinia triticina* Eriks, Wheat leaf rust in Northern Syria and South Turkey. Ninth Arab Congress of Plant Protection; 2006 19-23 November 2006; Damascus, Syria. 2006; 109.

9. Long DL, Kolmer JA, Leonard KJ, Hughes ME. Physiologic specialization of *Puccinia triticina* on wheat in the United States in 2000. Plant Dis. 2002; 86(9): 981-986.
10. Lind V, Gultyaeva E. Virulence frequences of *Puccinia triticina* in Germany and the European regions of the Russian Federation. J Phytopathol. 2007; 155(1):13-21.
11. Bamdadian A. Physiologic races of *Puccinia recondita* in Iran (1968-1972). Cereal Rust Bull. 1973; 1: 45-47.
12. Torabi M, Nazari K, Afshari F. Genetics of pathogenicity of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, the causal agent of leaf rust of wheat. Iran J Agr Sci. 2001; 32: 635.
13. Afshari F, Torabi M, Kia S, Dadrezai T, Safavi SA, Chaichi M, et al. Monitoring of virulence factors of *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust in Iran during 2002-2004. Seed and Plant Improvement Journal. 2006; 21(4): 485-501. [In Persian].
14. Niazmand AR, Afshari F, Abbasi M, Rezaee S. Study on pathotype diversity and virulence factors of *Puccinia triticina Erikson*, the causal agent of wheat brown rust in Iran. Iran J Plant Pathol. 2010; 46(3): 187-202. [In Persian].
15. McDonald BA, Martinez JP. DNA restriction fragment lenght polymorphism among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph Septoria tritici) isolates collected from a single field. Phytopathology. 1990; 80(12): 1368-73.
16. Henson JM, French R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu Rev Phytopathol. 1993; 31: 81-109.
17. Egger KN. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. Can J Bot. 1995; 73(1): 1415-1422.
18. Ennos RA, McConnell KC. Using genetic markers to measure natural selection in populations of fungi. Can J Bot. 1995; 73: 302-310.
19. Bridge PD, Arora DK. Applications of PCR in Mycology. In: Bridge PD, Arora DK, Reddy CA, Elander RP (eds). Interpretation of PCR methods for species definition: CAB International. 1998; pp. 63-84.
20. Takamatsu S, Hirata T, Sato Y. Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae). Mycoscience. 1998; 39(4): 441-53.
21. Nazar RN, Hu X, Schmidt J, Culham D, Robb J. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium wilt* pathogens. Physiol Mol Plant Path. 1991; 39(1): 1-11.
22. Zambino PJ, Szabo LJ. Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. Mycologia. 1993; 85(3): 401-414.
23. Jennings JM, Newton AC, Buck KW. Detection of polymorphism in *Puccinia hordei* using RFLP and RAPD markers, differential cultivars and analysis of the intergenic spacer region of rDNA. J Phytopathol. 1997; 145(11-12): 511-519.
24. Kim WK, Zerucha T, Klassen GR. A region of heterogeneity adjacent to the 5S ribosomal RNA gene of cereal rusts. Curr Genet. 1992; 22(2): 101-105.
25. Abbasi M, Goodwin SB, Scholler M. Taxonomy, phylogeny, and distribution of *Puccinia graminis*, the black stem rust: new insights based on rDNA sequence data. Mycoscience. 2005; 46(4): 241-247.
26. Reader U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett Appl Microbiol. 1985; 1(1): 17-20.
27. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol. 1991; 66(4): 411-453.
28. Driessen S, O'Brien PA, Hardy GESJ. Diversity of *Puccinia boroniae* assessed by teliospore morphology and restriction fragment patterns of ribosomal DNA. Australas Plant Pathol. 2004; 33 (1): 77-82.
29. Alaei H, De Backer M, Nuytinck J, Maes M, Höfte M, Heungens K. Phylogenetic relationships of *Puccinia horiana* and other rust pathogens of Chrysanthemum x morifolium based on rDNA ITS sequence analysis. Mycol Res. 2009; 113 (6-7): 668-683.
30. Barnes CW, Szabo LJ. Detection and identification of four common rust pathogens of cereals and grasses using realtime polymerase chain reaction. Phytopathology. 2007; 97(6): 717-727.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 3, Sep. 2010

Determination of pathotype diversities of *Puccinia triticina* Erikson (causal agent of wheat brown rust) in Iran based on rDNA ITS1 sequencing

Ali Reza Niazmand[1], Shahab Haj Mansoor[2]

[1]Department of Plant Pathology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran,
[2]Department of Plant Pathology, Research and Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Wheat brown rust is one of the most important diseases caused by *Puccinia triticina* Erikson. In recent years, determination of Brown rust pathotypes based upon rDNA ITS1 sequencing has become more interested. The aim of this research was evaluation the similarities and differences ITS1 of ribosomal DNA between the brown rust pathotypes collected from different geographical and climatically parts of Iran.

Material and Methods: The DNA extraction was performed on urediniospore of collected sample. The ITS5 and Rust 2 primers were used for PCR amplification of rDNA ITS1 region, and the amplified products were sequenced directly. The accession numbers of isolate sequences were registered in GeneBank. Multiple sequence alignments and identification of tandem repeats were carried out by MPEG4 and DNA MAN softwares.

Results: The results showed %0-1.2 differences between ITS1 sequences. Different mutations, includingdeletion, insertion, number of tandem repeat and some differences in ITS1 length were observed in DNA sequences. .

Conclusion: Despite differences in pathotype, phenotype and geographical distributions of isolates, only limited differences were observed in ITS1 sequences. Because no logical correlation was observed between differences in pathotypes and ITS1 sequences, this rDNA region cannot be used as marker for determination of pathotypes of these fungi.

Keywords: Brown rust, Wheat, Sequencing, ITS1

Correspondence to: Ali Reza Niazmand
E-mail: niazmand2003@yahoo.com
Tel: 09177104870.
Journal of Microbial World 2010 3(3): 194-202