مطالعه تنوع پاتوتایپ‌ها و فاکتورهای بیماری‌زایی قارچ *Puccinia triticina* Eriksson عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم در ایران*

STUDY ON PATHOTYPES DIVERSITY AND VIRULENCE FACTORS OF *Puccinia triticina* ERIKSSON, THE CAUSAL AGENT OF WHEAT BROWN RUST IN IRAN

علیرضا نیازمند[1]**، فرزاد افشاری[2]، مهرداد عباسی[3] و سعید رضایی[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۹/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۶/۲۴)

چکیده

بیماری زنگ قهوه‌ای (برگی) گندم که توسط قارچ *Puccinia triticina* Eriksson به وجود می‌آید، یکی از بیماری‌های مهم گندم است که در بسیاری از مناطق گندم‌کاری ایران با شدت‌های مختلف دیده می‌شود. در طی سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ نمونه‌های برگی آلوده به این بیماری از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری شد. در مجموع پاتوتایپ ۵۱ جدایه با فرمول بیماری‌زایی/ غیر بیماری‌زایی تعیین شد. در برخی از مناطق فنوتیپ‌های بیماری‌زایی مشابه TKTT، PKTT، PJTT، PHRR، PKRT، PHRT، PGTT و TCTT مشاهده گردید و بقیه جدایه‌ها دارای فنوتیپ بیماری‌زایی منحصر به فرد بودند. از میان جدایه‌های سال۱۳۸۶، جدایه‌های مریوان I و اهواز II دارای بیشترین قدرت (توان) بیماری‌زایی و جدایه گرگان II دارای کمترین قدرت بیماری زایی بود. از میان جدایه‌های جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۷ بیشترین قدرت بیماری‌زایی مربوط به جدایه‌های بروجرد I و اردبیل I و کمترین توان بیماری‌زایی مربوط به جدایه اهواز II بود. در سال ۱۳۸۶ برای ژن‌های *Lr9*، *Lr25* و *Lr28* و در سال ۱۳۸۷ برای ژن‌های *Lr9*، *Lr19*، *Lr25* و *Lr28* بیماری‌زایی دیده نشد. بر اساس دندروگرام ترسیم شده و با در نظر گرفتن خط برش در سطح ۰/۷۶، در سال ۱۳۸۶، جدایه‌های مورد بررسی در هشت گروه و در سال ۱۳۸۷، در شش گروه متمایز قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: گندم، زنگ قهوه‌ای، قدرت (توان) بیماری‌زایی، فنوتیپ بیماری‌زایی، ژن مقاومت، دندوگرام

---

*: بخشی از پایان نامه دکتری نگارنده اول، ارائه شده به بخش بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: niazmand2003@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۲. دانشیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

۳. دانشیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

مقدمه

بیماری زنگ قهوه‌ای گندم که توسط قارچ *Puccinia triticina* Eriksson ایجاد می‌شود و اخیراً نام علمی *Puccinia persistens* ssp. *triticina* برای آن مشخص گردیده (Abbasi *et al.* 2005)، یکی از بیماری‌های مهم گندم از نظر گستردگی در جهان است که در بسیاری از مناطق جغرافیایی دنیا سبب کاهش تولید محصول گندم گردیده است (Saari & Prescott 1985; Roelfs *et al.* 1992; Marasas *et al.* 2004; Kolmer 2005). میزان کاهش محصول از مقادیر بسیار کم تا ۲۰٪ بر حسب زمان آلودگی، مرحله رشد و میزان مقاومت ارقام گندم متفاوت است (Chester 1946). در سال ۲۰۰۷ در اثر بیماری زنگ قهوه‌ای گندم در ایالت کانزاس آمریکا، کاهش محصول گندم به میزان ۱۴٪ گزارش گردید (Appel *et al.* 2007).

در ایران این بیماری به صورت اندمیک بوده و هر ساله در مناطق شمالی، جنوبی و غرب ایران مشاهده شده و باعث ایجاد خسارت می‌گردد. مؤثرترین شیوه مبارزه با این بیماری به کارگیری ارقام مقاوم است اما جهت یافتن ارقام مقاوم، ابتدا لازم است که منابع مقاومت به بیمارگر شناسایی گردیده و سپس از آنها در برنامه‌های اصلاحی گندم استفاده گردد (Afshari 2008). تا کنون بیش از ۶۰ ژن مقاومت (*Lr*) به بیماری زنگ قهوه‌ای گندم به تنهایی و یا در ترکیب با سایر ژن‌های مقاومت شناسایی شده که بر اساس فرضیه ژن برای ژن، باعث اعطای مقاومت اختصاصی ارقام گندم به پاتوتایپ‌های این قارچ می‌شوند (McIntosh *et al.* 2007).

جمعیت‌های مختلف قارچ *Puccinia triticina* از لحاظ بیماری‌زایی برای ژن‌های مقاومت دارای تنوع زیادی هستند. فراوانی فاکتورهای بیماری‌زایی برای ژن‌های مقاومت در بین جدایه‌های مختلف این قارچ در سال‌های مختلف متفاوت بوده و از کمتر از ۵٪ تا بیش از ۶۰٪ گزارش گردیده است (Kolmer 2005). میزان بالای تنوع در فاکتورهای بیماری‌زایی در بین جمعیت‌های مختلف این قارچ، باعث گردیده که دست‌یابی به ارقام گندمی که طی سالیان متمادی بتوانند مقاومت خود را حفظ نمایند، مشکل باشد. از طرف دیگر این موضوع سبب شده که محققین هر ساله جمعیت‌های مختلف این قارچ را از لحاظ فاکتورهای بیماری‌زایی مورد بررسی قرار دهند تا بتوانند از وضعیت بیماری‌زایی جمعیت‌های مختلف این قارچ اطلاعات کافی داشته و در صورت تغییر در فاکتورهای بیماری‌زایی، راه کار مناسبی در جهت مبارزه با این بیماری و معرفی ارقام مقاوم جدید را اتخاذ نمایند (Kolmer 2005).

در زمینه تعیین نژاد و فاکتورهای بیماری‌زایی زنگ قهوه‌ای، تحقیقات وسیعی در بسیاری از نقاط جهان انجام شده است. لاین‌های تقریباً ایزوژن (Near isogenic) تهیه شده با استفاده از گندم حساس رقم تاچر (Thatcher) که ارقام افتراقی برای شناسایی ژن‌های مقاومت عامل زنگ برگی گندم هستند، برای اولین بار توسط دیک (P.L. Dyck) توسعه یافتند (McIntosh *et al.*1995). این ارقام که تحت نام ارقام افتراقی نیز نامیده می‌شوند، جهت تجزیه و تحلیل‌های مربوط به تفاوت‌های بیماری‌زایی موجود در جمعیت‌های قارچ *P. triticina*، ژنتیک بیماری زنگ قهوه‌ای گندم و ارتباطات ژنتیکی بین میزبان و بیمارگر، استفاده می‌شوند.

وجود نژادهای فیزیولوژیک زنگ قهوه‌ای اولین بار توسط *ماینز و جکسون* (Mains & Jackson 1923) بر اساس آلوده‌سازی دو رقم کانارد (Kanard) و ماکالف (Makalof) اعلام شد و بعداً نیز نژادهای دیگری از این قارچ گزارش گردید. در سال ۱۹۸۶ استفاده از ارقام

مونوژنیک با ژن‌های *Lr1*، *Lr2a*، *Lr2c*، *Lr3*، *Lr3ka*، *Lr9*، *Lr11*، *Lr16*، *Lr17*، *Lr24*، *Lr26* و *Lr30* برای تعیین نژاد و تعیین فاکتورهای بیماری‌زایی زنگ قهوه‌ای پیشنهاد گردید و تعیین نژادهای فیزیولوژیک در یک سیستم نام‌گذاری یکسان بر اساس فرمول بیماری‌زایی/ غیربیماری‌زایی (Avirulence/Virulence) تصویب شد، هم‌چنین جهت تعیین فنوتیپ‌های بیماری‌زایی جدایه‌ها، از روش پیشنهادی توسط *لانگ و کولمر* (Long & Kolmer 1989) استفاده گردید. در این سیستم ۱۲ لاین تقریباً مونوژنیک با ژن‌های *Lr*، *Lr2*، *Lr2c*، *Lr3*، *Lr3ka*، *Lr9*، *Lr11*، *Lr16*، *Lr17*، *Lr24*، *Lr26* و *Lr30* در سه دسته گروه‌بندی شده که هر دسته شامل چهار گیاه حامل ژن مقاومت بوده و تیپ آلودگی برای هر رقم ثبت می‌شود. بیماری‌زایی و غیر بیماری‌زایی به ترتیب با حروف (H) و (L) ثبت می‌گردد. بعد از آن یک دسته چهار تایی از لاین‌های افتراقی دارای ژن‌های *LrB*، *Lr10*، *Lr14a* و *Lr18* نیز به دسته لاین های افتراقی قبلی اضافه گردید. ترکیبات بیماری‌زایی و یا غیر بیماری‌زایی روی این ۱۶ لاین افتراقی به وسیله چهار کد حرفی (از B تا T) مشخص می‌گردد. در سایر نقاط جهان که بیماری‌زایی و یا غیر بیماری‌زایی روی سایر لاین‌های افتراقی دارای اهمیت است، لاین‌ها و یا ارقام افتراقی بیشتری به این فهرست اضافه می‌شود (Long & Kolmer 1989).

در آمریکا سالیانه به طور متوسط ۷۰ پاتوتایپ از عامل بیماری زنگ قهوه‌ای شناسایی می‌گردد (Kolmer *et al.* 2007). تحقیقات مشابهی در کشورهایی هم چون کانادا از سال ۱۹۳۱ (Johnson 1956, Kolmer 1991a, 1991b)، استرالیا از سال ۱۹۲۰(Waterhouse 1952) و مکزیک (Singh 1991, Singh *et al.* 2004) در حال انجام است. طی سال‌های ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴ تعداد ۲۶ پاتوتایپ این قارچ در شمال سوریه و جنوب ترکیه شناسایی گردیده است (Kassem *et al.* 2006). هم‌چنین ۲۸ پاتوتایپ زنگ قهوه‌ای گندم طی سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ در سوریه گزارش گردیده است (Yahyaoui *et al.* 2006). در اسلواکی شکسته شدن مقاومت ژن‌های *Lr2c*، *Lr3a*، *Lr11*، *Lr17*، *Lr21*، *Lr23* و *Lr26* گزارش گردید (Hanzalova *et al.* 2008). در آلمان گزارش شد که کلیه پاتوتایپ‌های مورد آزمایش دارای بیماری‌زایی روی گیاهان حامل ژن‌های *Lr1*، *Lr2a*، *Lr2b*، *Lr15*، *Lr17* و *Lr20* بودند (Lind & Gultyeava 2006). در تحقیق انجام گرفته در کشور روسیه روی ساختار جمعیتی قارچ *P. triticina* در طی سال ۲۰۰۷ تعداد ۷۹ فنوتیپ بیماری‌زایی برای این قارچ گزارش گردید (Gultyaeva *et al.* 2010). در بررسی‌های انجام گرفته روی ساختار جمعیتی قارچ‌های عامل بیماری زنگ قهوه‌ای و سیاه گندم در گرجستان مشخص گردید که فنوتیپ‌های FHTSL، FHTTL و PHTTL به عنوان فراوان‌ترین فنوتیپ‌های بیماری‌زای قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم در این منطقه بودند (Sikharulidze *et al.* 2010).

در ایران بامدادیان طی سال‌های ۱۹۷۲- ۱۹۶۸ با استفاده از هشت رقم استاندارد، سه پاتوتایپ زنگ قهوه‌ای را گزارش نمود (Bamdadian 1973). *مهدیان و همکاران* (Mahdian *et al.* 1999) بیماری‌زایی روی گیاهان حامل ژن‌های *Lr2a*، *Lr2b*، *Lr2c*، *Lr3*، *LrB* و *Lrb* را گزارش نمودند. *ترابی و همکاران* (Torabi *et al.* 2001) در بررسی جدایه‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران عدم بیماری‌زایی برای گیاهان حامل ژن‌های *Lr9* و *Lr19* و بیماری‌زایی برای ژن‌های *Lr10* و *Lr13* را گزارش نمودند. *افشاری و همکاران* (Afshari *et al.* 2005) با استفاده از

۳۷ لاین تقریباً ایزوژنیک زنگ قهوه‌ای گندم، عدم بیماری‌زایی برای گیاهان حامل ژن‌های *Lr9*، *Lr18*، *Lr19*، *Lr25*، *Lr28*، *Lr29*، *Lr34*، *Lr35*، *Lr36* و *Lr37* را گزارش نمودند. کلیه جدایه‌های مورد آزمایش در تحقیق *رفیعی و همکاران* (Rafeie *et al.* 2007) روی گیاهان حامل ژن‌های *Lr3bg*، *Lr3*، *Lr14b*، *Lr20*، *Lr22a*، *Lr22b*، *Lr30* و *Lr34* بیماری‌زایی داشتند. *افشاری* (۲۰۰۸) با آزمایش ۲۰ جدایه زنگ قهوه‌ای گندم جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران روی ۴۰ لاین افتراقی، عدم بیماری‌زایی را برای ژن‌های *Lr2a*، *Lr9*، *Lr14a*، *Lr19*، *Lr23*، *Lr25*، *Lr26*، *Lr28*، *Lr29*، *Lr32* و *Lr36* گزارش نمود که نشان‌دهنده تنوع بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای در کشور است.

هدف از انجام این تحقیق تعیین پاتوتایپ‌های عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم (*P. triticina*) تعدادی از جدایه‌های جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۶ که تعیین پاتوتایپ نشده بودند و هم‌چنین تمام جدایه‌های جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۷ از مناطق مختلف ایران بود. هم‌چنین فراوانی فاکتورهای بیماری‌زایی جدایه‌ها روی گیاهان حامل ژن‌های مقاومت (*Lr*)، شباهت‌ها و تفاوت‌های مابین جدایه‌ها از لحاظ فاکتورهای بیماری‌زا / غیر بیماری‌زا و فنوتیپ بیماری‌زایی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در بهار سال‌های زراعی ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷به دلیل وجود شرایط خشک‌سالی در کشور امکان جمع‌آوری تعداد زیادی نمونه از مناطق مختلف فراهم نگردید لذا نمونه-برداری به صورت تصادفی از تک بوته‌های آلوده در مزارع انجام پذیرفت. در مجموع تعداد ۳۶ جدایه (۲۴ جدایه در سال زراعی ۱۳۸۶ و ۱۲ جدایه درسال زراعی ۱۳۸۷) بر اساس مناطق پراکندگی و شرایط آب و هوایی جمع‌آوری شدند. در سال زراعی ۱۳۸۶ جمع‌آوری نمونه‌ها از مناطق اهواز (۲ نمونه)، قراخیل (۴ نمونه)، بروجرد (۲ نمونه)، اردبیل (۲ نمونه)، مشهد (۱ نمونه)، زرقان (۱ نمونه)، گرگان (۳ نمونه)، اسلام آباد (۱ نمونه)، مریوان (۲ نمونه)، کرج (۳ نمونه)، مغان (۱ نمونه) و همدان (۲ نمونه) انجام پذیرفت. در سال ۱۳۸۷ نمونه‌هایی از مزارع آلوده گندم مناطق اردبیل (۲ نمونه)، قراخیل (۲ نمونه)، بروجرد (۲ نمونه)، اهواز (۲ نمونه)، ساری (۱نمونه)، زرقان (۱ نمونه)، مشهد (۱نمونه) و کرج (۱ نمونه) جمع‌آوری گردید. جهت تکثیر و خالص‌سازی، نمونه‌های برگی و خشک شده گندم آلوده به زنگ قهوه‌ای هر یک از جدایه‌ها به طور مجزا و به ابعاد مناسب بریده شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت داخل تشتک‌های محتوی کاغذ صافی واتمن و آب مقطر استریل و در دمای ۴ $^{\circ}$C داخل یخچال قرار داده شدند. سپس یوردینیوسپورهای مرطوب توسط گوش پاک‌کن و یا قلم‌مو از روی نمونه‌های برگی جمع‌آوری گردیدند و روی برگ‌های اول گیاهچه‌های ۱۰-۷ روزه رقم حساس بولانی که در گلدان‌هایی به قطر ۱۰ سانتی‌متر حاوی دو قسمت کود برگ، دو قسمت خاک مزرعه و یک قسمت ماسه رودخانه که قبلاً سترون گردیده بودند، مایه‌زنی شدند. جهت کاهش رشد گیاهچه‌ها، به خاک گلدان‌های هشت روزه به میزان ۸۰ میلی‌لیتر محلول مالئیک هیدرازید به غلظت ۲/۲ گرم در ۱۰ لیتر آب اضافه گردید. گلدان‌های مایه‌زنی شده به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی کامل و در دمای ۱۹$^{\circ}$C-۱۸ و رطوبت نسبی ۱۰۰٪ قرار گرفتند. سپس گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های مایه‌زنی شده به گلخانه با دمای ۲۴$^{\circ}$C-۲۲ و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی،

جدول ۱. ژن‌های مقاومت و لاین‌های افتراقی گندم مورد استفاده جهت تعیین پاتوتیپ‌های زنگ قهوه‌ای

Table 1. *Lr* genes and tested wheat standard differential genotypes

شماره . No	نام لاین‌های افتراقی Differential genotypes	ژن‌های مقاومت Resistance genes
1	Thatcher	*Lr22b****
2	TC*6/CENTENARIO (RL6003)	*Lr1*
3	TC*6/WEBSTER (RL6016)	*Lr2a*
4	TC*6/CARINA(RL6019)	*Lr2b*
5	TC*6/LOROS(RL6047)	*Lr2c*
6	TC*6/DEMOCRAT(RL6002)	*Lr3*
7	TC*6/ANIVERSARIO(RL6007)	*Lr3ka*
8	BAGE/8*TC(RL6042)	*Lr3bg*
9	TRANSFER/6*TC(RL6010)	*Lr9*
10	TC*6/EXCHANGE(RL6004)	*Lr10*
11	HUSSAR(W976)	*Lr11*
12	EXCHANGE/6*TC(RL6011)	*Lr12*
13	MANITUOU	*Lr13*
14	SELKIRK/6*TC(RL6013)	*Lr14a*
15	TC*6/MARIA ESCOBAR(RL6006)	*Lr14b*
16	TC*6/KENYA1483(RL6052)	*Lr15*
17	TC*6/EXCHANGE(RL6005)	*Lr16*
18	KLEIN LUCERO/6*TC(RL6008)	*Lr17*
19	TC*7/AFRICA43(RL6009)	*Lr18*
20	TC*7/TR(RL6040)	*Lr19*
21	THEW(W203)	*Lr20*
22	TC*6/RL5406(RL6043)	*Lr21*
23	TC*6/RL5404(RL6044)	*Lr22a****
24	LEE310/6*TC(RL6012)	*Lr23*
25	TC*6/AGENT(RL6064)	*Lr24*
26	TC*?/TRANSEC	*Lr25*
27	TC*6/ST-1-25(RL6078)	*Lr26*
28	GATCHER(W3201)	*Lr10, Lr27+,Lr31**
29	CS2D-2M	*Lr28*
30	TC*6/CS7AG#11(RL6080)	*Lr29*
31	TC*6/TERENZ10(RL6049)	*Lr30*
32	TCLR32(RL5497)	*Lr32*
33	TC*6/PI58548(RL6057)	*Lr33*
34	TC*6/PI58548(RL6058)	*Lr34*
35	RL5711	*Lr35*
36	E84018 (NEP/AE.SPELTOIDES.2-9-w…	*Lr36*
37	TC*6/VPM(RL6081)	*Lr37*
38	TC*6//CARINA(RL6051)	*Lrb*
39	GAZA(W277)(DURUM)	*Lr23+***
40	Altar 84 (Drum)	*Lr10+***

*: لاین محتوی چندین ژن مقاومت **: + لاین دارای ژن‌های اضافه ***: ژن‌های مقاومت در مرحله گیاه کامل

*: Wheat line with multiple resistant gene **: + Wheat line with additive resistant gene ***: Adult Plant resistant gene

شدت نور در حدود ۱۲۰۰۰ لوکس و رطوبت نسبی ۵۰ درصد منتقل گردیدند. در جهت تهیه تک جوش (پاستول)، پس از گذشت ۱۰-۸ روز و ظهور جوش‌ها، یک تک جوش انتخاب شد و سپس با استفاده از یک تیغ سترون این تک جوش از برگ جدا گردید، جهت جلوگیری از انتشار یوریدینیوسپورها از سایر جوش‌ها، بقیه قسمت‌های برگ توسط چسب نواری پوشیده شده بودند. قطعات برگی محتوی این تک جوش‌ها را در زیر هود به لوله‌های شیشه‌ای سترون انتقال یافته و به هر لوله مقدار ۲۰ میلی‌متر آب مقطر استریل و دو قطره Tween 20 اضافه شد.

شیشه‌ها را کمی تکان داده تا یک سوسپانسیون یکنواخت از اسپورها با سایر مواد به دست آمد. به دلیل حجم کم مایه تلقیح، سوسپانسیون به دست آمده با استفاده از یک نازل سترون و با به کارگیری یک دستگاه کمپرسور با فشار پاشش حدود ۱/۵ اتمسفر روی رقم حساس بولانی محلول‌پاشی گردید. از اسپورهایی که به این نحو تکثیر گردیدند، جهت مایه‌زنی لاین‌های افتراقی استفاده گردید. از ۳۹ لاین تک ژنی و یک لاین دارای سه ژن مقاومت (*Lr27+*، *Lr10* و *Lr31*) جهت تعیین پاتوتایپ‌های جدایه‌های جمع‌آوری شده استفاده گردید (جدول ۱). گیاهچه‌های مایه‌زنی شده لاین‌های استاندارد به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط تاریکی و دمای ۱۸°C و رطوبت نسبی ۱۰۰٪ قرار گرفتند. سپس گیاهچه‌ها به گلخانه‌های با دمای ۲۴-۲۲°C انتقال یافتند. پس از گذشت ۱۴-۱۲ روز از تلقیح، یادداشت‌برداری تیپ آلودگی به روش *ماکینتاش و همکاران* (McIntosh *et al*. 1995) در مقیاس صفر تا چهار صورت گرفت. تیپ‌های آلودگی ۰ تا ۲ به عنوان مقاوم یا غیر بیماری‌زا و تیپ‌های آلودگی ۳ و ۴ به عنوان حساس یا بیماری‌زایی در نظر گرفته شدند. تعیین پاتوتایپ‌ها و فنوتیپ‌های جدایه‌ها بر اساس سیستم نام‌گذاری *لانگ و کولمر* (۱۹۸۹) صورت پذیرفت.

درصد فراوانی فاکتورهای بیماری‌زایی از تقسیم تعداد جدایه‌هایی که روی گیاه حامل یک ژن مقاومت خاص بیماری‌زایی داشتند بر تعداد کل نمونه‌های مورد بررسی و توان بیماری‌زایی هر جدایه بر اساس تعداد فاکتورهای بیماری‌زایی آن جدایه محاسبه شد.

به منظور بررسی احتمال تغییر در بیماری‌زایی عامل زنگ قهوه‌ای گندم پس از ورود به میزبان، تعدادی از جدایه‌های زنگ قهوه‌ای سال ۱۳۸۷، روی لاین‌های تک ژنی تک پاستول و خالص گردیده و مجدداً تعیین پاتوتایپ و فنوتیپ شدند. این گروه از جدایه‌ها از مناطق ساری (۳ جدایه)، مشهد (۲ جدایه)، بروجرد (۳ جدایه)، اردبیل (۲ جدایه)، اهواز (۲ جدایه)، زرقان (۲ جدایه) و قراخیل ساری (۱ جدایه) انتخاب گردیدند (جدول ۴).

با به‌کارگیری نرم افزار NTSYS-pc نسخه (2.02e) و با به‌کارگیری روش کلاستر (UPGMA) دندروگرام مربوط به تشابه جدایه‌ها از لحاظ بیماری‌زایی و یا عدم بیماری‌زایی روی گیاهان حامل ژن‌های مقاومت، با به کارگیری ضریب جاکارد ترسیم گردید. به منظور ترسیم این دندروگرام‌ها یک ماتریکس از بیماری‌زایی و عدم بیماری‌زایی جدایه‌ها برای هر ژن مقاومت (*Lr*) روی ارقام استاندارد (عدد ۰ برای عدم بیماری‌زایی و عدد ۱ برای بیماری‌زایی) تشکیل گردید و سپس دندروگرام‌های مربوطه ترسیم شدند.

نتیجه

۱- فنوتیپ بیماری‌زایی

نتایج حاصل از تعیین فرمول بیماری‌زایی/ غیربیماری‌زایی (Avirulence/virulence formula) و فنوتیپ‌های بیماری‌زایی (Virulence phenotypes) جدایه‌ها مورد بررسی طی سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ در جداول ۲ الی ۴ ارائه شده است. در این تحقیق در مجموع ۵۱ پاتوتایپ و تعداد ۳۸ فنوتیپ بیماری‌زایی شناسایی گردید.

در سال زراعی ۱۳۸۶ جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مریوان I و اهواز II (TKTT) هم‌چنین جدایه‌های مناطق مریوان II و همدان II و زرقان (PKTT)، همدان I و گرگان I (PJTT)، گرگان III و قراخیل VI (PHRR) دارای فنوتیپ بیماری‌زایی یکسان بوده و بقیه جدایه‌ها دارای فنوتیپ منحصر به فرد بودند.

در سال زراعی ۱۳۸۷ در میان جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تشابه فنوتیپ بیماری‌زایی مشاهده نگردید و هر منطقه دارای یک فنوتیپ بیماری‌زایی مخصوص به خود بود. فنوتیپ بیماری‌زایی جدایه بروجرد I مربوط به سال ۱۳۸۷ با جدایه‌های مریوان I و اهواز II مربوط به سال زراعی ۱۳۸۶ یکسان بودند (TKTT).

در رابطه با فنوتیپ بیماری‌زایی جدایه‌های خالص شده روی لاین‌های استاندارد، جدایه‌های اهواز II/۸۷ و قراخیل/۸۷ با فنوتیپ بیماری‌زایی (PJTT) دارای تشابه بوده و بقیه جدایه‌ها از یکدیگر متمایز بودند. هم‌چنین جدایه‌های خالص شده روی لاین‌های استاندارد از لحاظ فنوتیپی با جدایه‌های اولیه خود متفاوت بودند که احتمال وجود تغییراتی در نمونه‌ها دور از انتظار نیست.

۲- توان بیماری‌زایی جدایه‌ها

همان طوری که در جداول ۲ الی ۴ مشاهده می‌شود از میان جدایه‌های سال۱۳۸۶، جدایه‌های مریوان I و اهوازII با داشتن فاکتور بیماری‌زایی برای گیاهان حامل ۳۱ ژن مقاومت، دارای بیشترین توان (قدرت) بیماری‌زایی و جدایه گرگان II با داشتن فاکتور بیماری‌زایی برای ۷ ژن مقاومت دارای کمترین توان بیماری‌زایی بودند.

از میان جدایه‌های جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۷ بیشترین توان بیماری‌زایی مربوط به جدایه‌های بروجرد I و اردبیل I بود که توانایی غلبه بر ۳۱ ژن مقاومت را داشته و کمترین توان بیماری‌زایی مربوط به جدایه اهواز II با توانایی غلبه بر ۲۱ ژن مقاومت بود.

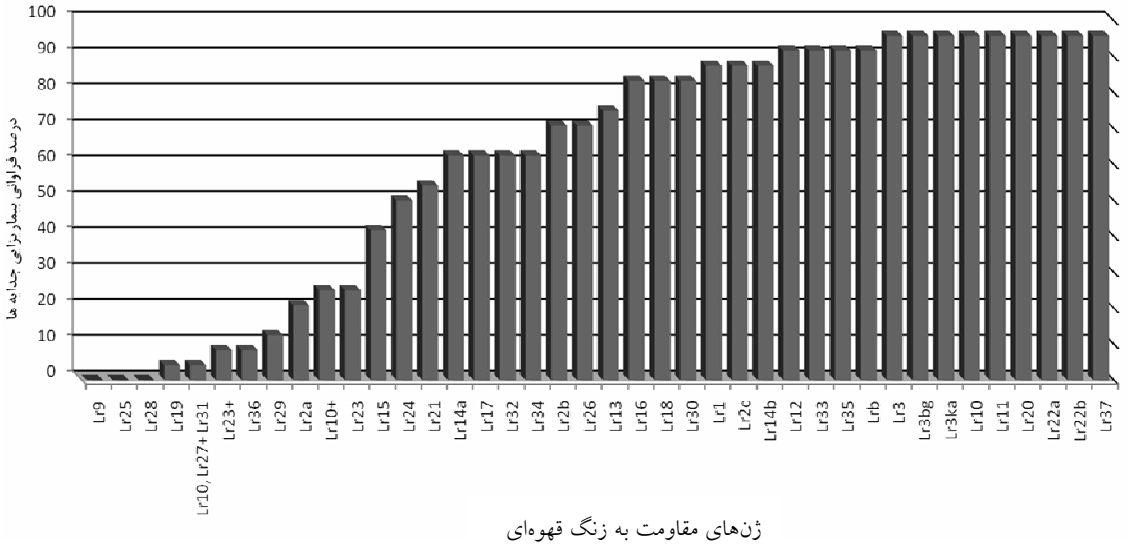
از میان جدایه‌های خالص شده روی لاین‌های استاندارد، جدایه‌های ساری I/۸۷، زرقان II/۸۷ و بروجرد III/۸۷ با توان بیماری‌زایی روی گیاهان حامل ۲۳ ژن مقاومت دارای کمترین توان بیماری‌زایی و جدایه اردبیل II/۸۷ با توان بیماری‌زایی روی گیاهان حامل ۳۱ ژن مقاومت دارای بیشترین توان بیماری‌زایی بودند.

۳- درصد فراوانی فاکتورهای بیماری‌زایی جدایه‌ها

درصد فراوانی فاکتور بیماری‌زایی برای ژن‌های مقاومت زنگ قهوه‌ای گندم در سال‌های زراعی ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. در سال ۱۳۸۶ بیشترین درصد فراوانی فاکتور بیماری‌زایی برای گیاهان حامل ژن‌های *Lr13*، *Lr3bg*، *Lr3ka*، *Lr10*، *Lr11*، *Lr20*، *Lr22a*، *Lr22b* و *Lr37* بود. فاکتور بیماری‌زایی برای گیاهان حامل ژن‌های *Lr9*، *Lr25* و *Lr28* در این سال مشاهده نگردید. در سال ۱۳۸۷ بیشترین درصد فراوانی فاکتور بیماری‌زایی جدایه‌های جمع‌آوری شده برای ژن‌های *Lr10*، *Lr12*، *Lr20*، *Lr22a*، *Lr22b*، *Lr35*، *Lr37* و *Lrb* بود و فاکتور بیماری‌زایی برای گیاهان حامل ژن‌های *Lr9*، *Lr19*، *Lr25* و *Lr28* دیده نشد.

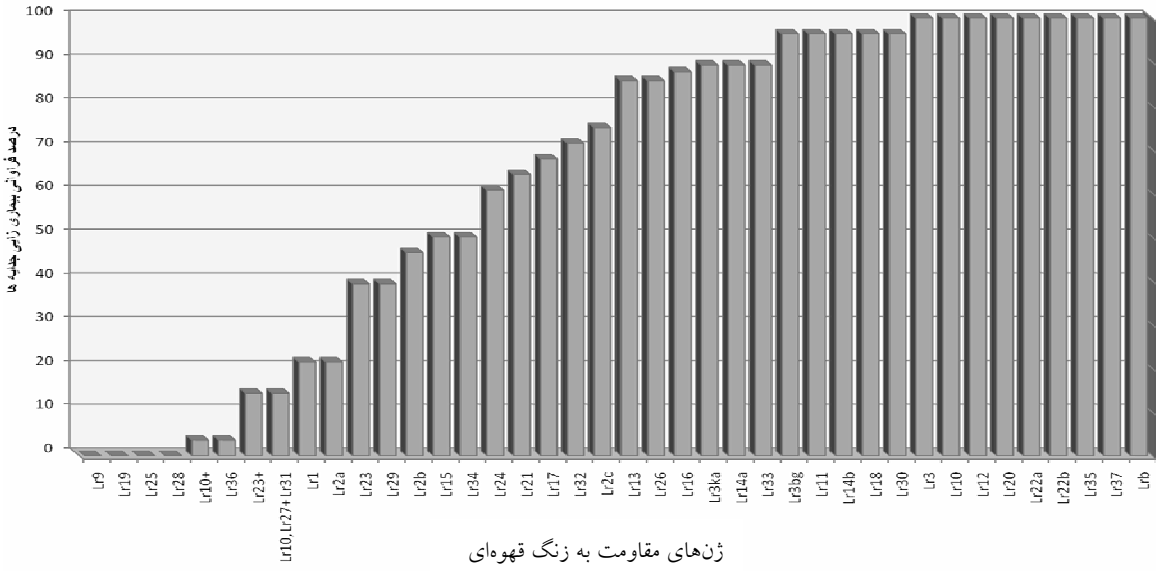
۴- تنوع و تشابه جدایه‌ها بر اساس آنالیز کلاستر

نتایج آنالیز کلاستر جدایه‌ها به تفکیک سال، در شکل‌های ۳ و ۴ ارائه شده است. بر اساس دندروگرام ترسیم شده در سال ۱۳۸۶و با در نظر گرفتن خط برش در سطح ۰/۷۶، ۸ گروه برای جدایه‌های مورد بررسی ترسیم گردید. به نحوی که در گروه اول جدایه اهواز I، در گروه دوم که شامل بیشترین جدایه‌های مورد بررسی می‌شود، جدایه‌های اهواز II، مریوان I، گرگان I، زرقان، همدان II، مریوان II، بروجرد III، کرج I، کرج II، اردبیل I، مغان، گرگان III، قراخیل III، کرج III و اسلام آباد، در گروه سوم جدایه‌های اردبیل II و مشهد، در گروه چهارم جدایه قراخیل II، در گروه پنجم جدایه‌های بروجرد II و همدان I، گروه ششم قراخیل II، گروه هفتم بروجرد I و گروه



شکل ۱. درصد فراوانی بیماری‌زایی جدایه‌های زنگ قهوه‌ای گندم روی ژن‌های مقاومت سال ۱۳۸۶

Fig 1. Percent of virulence frequencies of collected isolates to wheat leaf rust in 2006

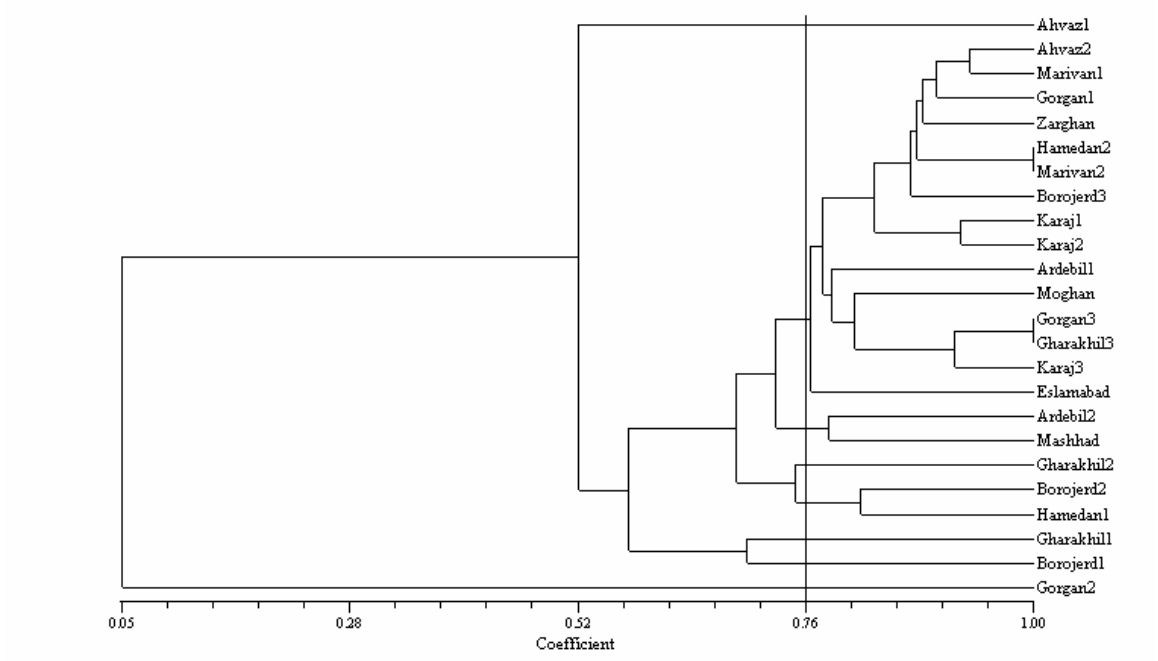


شکل ۲. درصد فراوانی بیماری‌زایی جدایه‌های زنگ قهوه‌ای گندم روی ژن‌های مقاومت سال ۱۳۸۷

Fig. 2. Percent of virulence frequencies of collected isolates to wheat leaf rust in 2007

هشتم گرگان II قرار گرفتند (شکل ۳).

در سال ۱۳۸۷ با در نظر گرفتن خط برش در سطح ۰/۷۶، جدایه‌های مورد بررسی در ۶ گروه قرار گرفتند. گروه اول که بیشترین تعداد جدایه‌ها را شامل می‌شود شامل زرقان و جدایه‌های خالص شده روی ارقام استاندارد (قراخیل I، زرقان I و II، بروجرد I، II و III، اهواز I و II) گروه دوم شامل مشهد، بروجرد I و II، جدایه‌های خالص شده روی ارقام استاندارد (مشهد II و اردبیل II) گروه



شکل۳. دندروگرام تشابه جدایه‌های زنگ قهوه‌ای گندم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران در سال ۱۳۸۶ بر اساس ضریب جاکارد و بیماری‌زایی و عدم بیماری‌زایی روی لاین‌های استاندارد

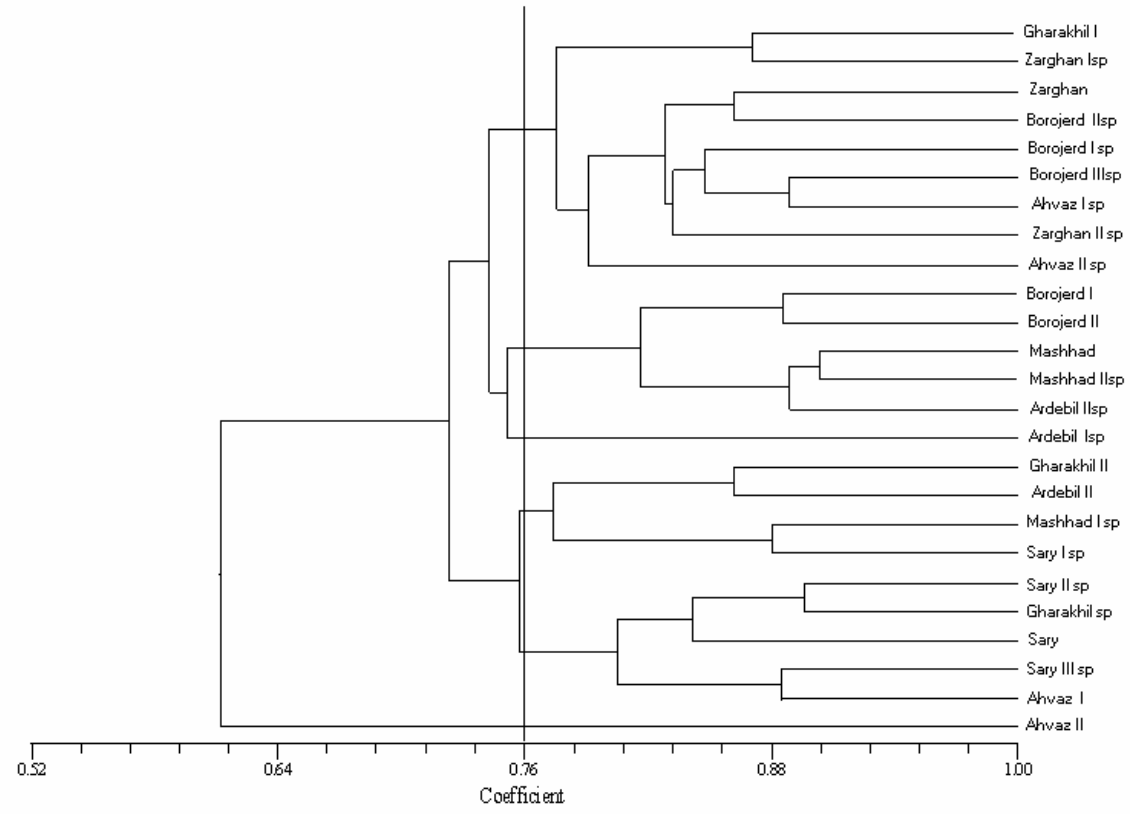
Fig. 3. Similarity dedrogram based on Jaccard coefficient of brown rust of wheat collected from different regions of Iran in 2006 based on virulence and avirulence on differential lines

سوم شامل جدایه خالص شده روی ارقام استاندارد (اردبیل I) گروه چهارم شامل قراخیل II و اردبیل II، جدایه‌های خالص شده روی ارقام استاندارد (مشهد I و ساری I) گروه پنجم شامل ساری و اهواز I، جدایه‌های خالص شده روی ارقام استاندارد (قراخیل، ساری I و II) و گروه ششم شامل جدایه اهواز II بود (شکل ۴). همانطوری که در این دندروگرام دیده می‌شود جدایه‌های زرقان و جدایه‌های خالص شده آن روی ارقام استاندارد (زرقان I و II) از گروه اول، جدایه مشهد و جدایه‌های خالص شده آن روی ارقام استاندارد (مشهد II) از گروه دوم و جدایه ساری و جدایه‌های خالص شده آن روی ارقام استاندارد (ساری I و II) از گروه پنجم، در یک گروه قرار گرفتند. سایر جدایه‌های خالص شده نسبت به جدایه‌های اولیه‌شان در گروه‌های متمایز از یکدیگر قرار گرفتند.

بحث

اگر چه این تحقیق به دلیل شرایط خشک‌سالی پیش‌آمده بیانگر وضعیت کل جمعیت قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم در ایران نیست ولی بررسی روی شباهت‌ها و تفاوت‌های بیماری‌زایی جدایه‌های مورد تحقیق تا حدود زیادی می‌تواند بیانگر وضعیت جمعیت‌های این قارچ در مناطق مختلف کشور باشد.

تشابه فنوتیپی برخی از جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، می‌تواند بیانگر یکسان بودن منشأ این جدایه‌ها باشد. این جدایه‌ها احتمالاً توسط عوامل جوی مانند باد از یک منطقه به منطقه دیگری انتقال یافته‌اند. در بسیاری از مناطق مورد تحقیق، جدایه‌های جمع‌آوری شده



SP = جدایه تک پاستول شده روی لاین‌های استاندارد

Sp: Single pustule isolate on standard lines

شکل۴. دندروگرام تشابه جدایه‌های زنگ قهوه‌ای گندم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران در سال ۱۳۸۷ بر اساس ضریب جاکارد و بیماری‌زایی و عدم بیماری‌زایی روی لاین‌های استاندارد

Fig. 4. Similarity dedrogram based on Jaccard coefficient of brown rust of wheat collected from different regions of Iran in 2007 based on virulence and avirulence on differential lines

در هر منطقه دارای فنوتیپ بیماری‌زایی منحصر به فرد بوده که این امر می‌تواند بیانگر تفاوت‌های بسیار زیاد میان جمعیت‌های این قارچ در مناطق مختلف ایران و وجود جمعیت‌های مختص به هر منطقه باشد. وجود جمعیت‌های منطقه‌ای برای این قارچ در کشورهایی چون کانادا و آمریکای شمالی نیز گزارش گردیده است (Kolmer 1999). پدید آمدن جمعیت‌های منطقه‌ای این قارچ می‌تواند مربوط به عواملی مثل معرفی فنوتیپ‌های بیماری‌زایی این قارچ به منطقه مورد نظر، نحوه زمستان‌گذرانی قارچ در این مناطق، انتشار یوریدینیوسپورها مابین این مناطق و مسأله جهش و انتخاب فنوتیپ‌های بیماری‌زایی به وسیله ژن‌های مقاومت اختصاصی در داخل این مناطق باشد (Kolmer 1999).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که تفاوت فنوتیپ بیماری‌زایی حتی در میان جدایه‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه نیز وجود دارد. این امر می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که نه تنها جمعیت‌های موجود این قارچ در مناطق مختلف دارای تفاوت در فنوتیپ بیماری‌زایی می‌باشند بلکه در یک منطقه هم جمعیت‌های مختلفی از این قارچ فعالیت می‌نمایند. وجود فنوتیپ‌های بیماری‌زایی

متفاوت این قارچ در بسیاری از نقاط جهان گزارش شده است. در کشور آمریکا هر ساله به طور متوسط بیش از ۷۰ فنوتیپ بیماری‌زایی گزارش می‌شود (Kolmer *et al.* 2007). در فرانسه هر سال ۵۰-۳۰ فنوتیپ بیماری‌زایی مورد شناسایی قرار می‌گیرند (Goyeau *et al.* 2006). در سال ۱۹۹۸ تعداد ۱۰۵ پاتوتایپ از قارچ *P. triticina* در کشورهای فرانسه، ایتالیا، بلغارستان، مجارستان و هلند شناسایی شدند که فقط تعداد کمی از این پاتوتایپ‌ها در میان این مناطق مشترک بودند (Mesterhazy *et al.* 2007). در مناطق مختلف سوریه نیز تنوع در ترکیب پاتوتایپ‌های این قارچ گزارش گردیده است (Yahyaoui *et al.* 2006).

در میان جدایه‌های قارچ جمع‌آوری شده از گندم مناطق مختلف ایران طی این دو سال، روی گیاهچه‌هایی که دارای ژن‌های مقاومت *Lr9*، *Lr25* و *Lr28* بودند، بیماری‌زایی دیده نشد. در سال ۱۳۸۶ بیماری‌زایی برای گیاهان حامل ژن *Lr19* دیده شد (احتمال اختلاط بذری ممکن است در این مورد نقش داشته باشد با این وجود لازم است با تأمین منابع مقاومت گیاهان حامل این ژن مجدداً تأیید گردد). در میان جدایه‌های مورد بررسی در سال ۱۳۸۷ بیماری‌زایی برای این ژن مشاهده نگردید. عدم وجود بیماری‌زایی برای ژن‌های *Lr9* و *Lr19* جدایه‌های ایرانی (Torabi *et al.* 2001) و برای ژن‌های *Lr9*، *Lr19*، *Lr25*و *Lr28* توسط سایر محققین ایرانی نیز گزارش شده است (Afshari 2008). در سال‌های اخیر در کشور مکزیک، جدایه‌هایی از پاتوتایپ‌های این قارچ شناسایی شده که روی ژن‌های *Lr9* و *Lr25* توانایی بیماری‌زایی را دارا بودند (Huerta-Espino *et al.* 2008). در غرب سیبری و شمال قزاقستان جدایه‌هایی از قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای شناسایی شدند که فاقد توانایی بیماری‌زایی برای ژن‌های *Lr9* و *Lr24* بودند (Strzmbicka *et al.* 2007). در سال۱۹۹۷، شکسته شدن مقاومت ارقام گندمی که دارای ژن مقاومت *Lr19* بوده و در منطقه ولگا کشور روسیه کشت می‌شدند گزارش گردید (Kovalenko *et al.* 2010). اخیراً در کشور روسیه بیماری‌زایی برای ژن *Lr9* نیز گزارش شده است (Gultyaeva *et al.* 2010). هم‌چنین عدم بیماری‌زایی برای ژن‌های *Lr9* و *Lr24* از کشور اسپانیا گزارش گردیده است (Del Olmo & Rubiales 2004). در بین جدایه‌های جمع‌آوری شده از مزارع و خزانه‌های گندم و تریتیکاله کشور مجارستان، هیچ کدام از جدایه‌ها توانایی بیماری‌زایی روی گیاهان حامل ژن های *Lr2a*، *Lr9*، *Lr19*، *Lr23*، *Lr24* و *Lr8* را نداشتند (Manninger 2006). با توجه به عدم بیماری‌زایی هیچ کدام از جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق برای ژن‌های *Lr9*، *Lr19*، *Lr25* و *Lr28* این ژن‌ها می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی کشور در صورتی که فاقد پیوستگی با ژن‌های نامطلوب زراعی باشند، به عنوان ژن‌های مؤثر و مفید در کنترل ژنتیکی عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم استفاده شوند. به عنوان مثال وجود ژن‌های مقاومت *Lr28*، *Lr36*، *Lr38*، *Lr41* و *Lr43* در ارقام گندم آمریکا باعث پدید آمدن یک مقاومت بسیار مؤثر برعلیه بیماری زنگ قهوه‌ای در آمریکا گردید (German *et al.* 2007).

دندروگرام ترسیم شده برای جدایه‌های جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۶ نشان می‌دهد که از میان جدایه‌های جمع‌آوری شده در این سال بیشترین تعداد جدایه‌ها در گروه دوم قرار می‌گیرند. این امر در رابطه با جدایه‌های جمع‌آوری شده سال ۱۳۸۷ نیز صادق بود و اکثر جدایه‌ها در گروه اول قرار گرفتند. این موضوع نشان می‌دهد که جدایه‌های اکثر مناطق دارای تشابه زیادی هستند هر چند

که این جدایه‌ها از مناطق آب و هوایی مختلفی جمع‌آوری گردیده بودند. وجود گروه‌های متمایز در این دندروگرام‌ها بیانگر وجود جدایه‌هایی منحصر به فرد در برخی از مناطق مورد بررسی است. با توجه به این نکات می‌توان این فرضیه را مطرح نمود که جمعیت قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم ترکیبی از جمعیت‌های مختلف است که شامل یک جمعیت اصلی دارای تشابه زیاد و جمعیت‌های محدود و متفاوت با جمعیت اصلی می‌باشند. وجود جمعیت‌های محدود و متفاوت شاید مربوط به ورود جمعیت‌های جدید به برخی از مناطق از طریق جریانات هوایی یا سایر عوامل ناشناخته، کاشت ارقام جدید در منطقه و یا مربوط به تغییرات ژنتیکی قارچ عامل بیماری باشد. بررسی این جمعیت‌های محدود و وضعیت افزایش جمعت آنها در طی چندین سال می‌تواند دارای اهمیت بسیار زیادی باشد. زیرا در برنامه‌ریزی‌های مربوط به اصلاح گندم می‌تواند مد نظر قرار گیرد.

همچنان که در دندروگرام جدایه‌های سال ۱۳۸۷ دیده می‌شود در اکثر موارد جدایه‌های خالص شده روی ارقام استاندارد و جدایه‌های اولیه‌شان در یک گروه قرار گرفتند. این امر می‌تواند بیانگر شباهت‌های بسیار زیاد (بیشتر از ۹۰٪) جدایه‌های خالص شده روی ارقام استاندارد نسبت به جدایه اولیه آنها باشد. هم‌چنین ممکن است مربوط به عدم ظهور برخی از ژن‌های بیماری‌زایی بیمارگر روی رقم استاندارد باشد که باعث ظهور چنین تفاوت‌های ناچیزی می‌گردد. عدم تشابه برخی از جدایه‌های خالص شده روی ارقام استاندارد نسبت به جدایه اولیه ممکن است مربوط به تغییرات ژنتیکی عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم پس از ورود به میزبان، به دلیل پدیده مخلوط شدن مواد ژنتیکی موجود در هسته‌های ریسه قارچ و پدید آمدن یک ترکیب ژنتیکی جدید برای یوریدینیوسپورهایی باشد که از این ریسه‌ها به وجود می‌آیند. این موضوع در رابطه با قارچ عامل بیماری زنگ زرد گندم گزارش شده است (Kang *et al.* 1994).

در نهایت چنین به نظر می‌رسد که با توجه به تنوع بسیار زیاد پاتوتایپ‌های این قارچ درون و مابین جمعیت‌های مناطق مختلف و گسترش بیماری زنگ قهوه‌ای گندم در زمستان ملایم ۱۳۸۸ در منطقه مغان و هم‌چنین گسترش این بیماری در بهار ۱۳۸۹ از استان خوزستان (افشاری، مکاتبات شخصی) لازم است که تحقیقات گسترده‌ای در رابطه با تعیین پاتوتایپ‌های این قارچ درون و مابین مناطق مختلف انجام پذیرد. با تعیین جمعیت پاتوتایپ‌های غالب در یک منطقه می‌توان برنامه‌ریزی‌های دقیق‌تری جهت معرفی ارقام مقاوم به زنگ قهوه‌ای گندم در هر منطقه را انجام داد. هم‌چنین با توجه به عدم هم‌سانی فنوتیپ بیماری‌زایی میان جدایه‌ها در طی دو سال چنین به نظر می‌رسد که تعیین پاتوتایپ‌های این قارچ باید به طور مداوم و هر ساله انجام پذیرد.

سپاسگزاری

از سرکار خانم زهره حسن بیات کارشناس محترم گلخانه‌های زنگ غلات و هم‌چنین مؤ سسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر که امکانات این تحقیق را فراهم نموده و صمیمانه در کلیه مراحل انجام این تحقیق با اینجانب همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (55-53) متن انگلیسی مراجعه شود.