

بررسی پراکنش و تنوع ژنتیکی آلودگی اسیومی زرشک و اهمیت آن در بیماری زنگ زرد گندم در استان لرستان*

فرشته مهدی‌نیا^{۱*}، حسین علایی^۲، ابراهیم صداقتی^۲ و علی دهقانی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۳)

چکیده

زنگ‌های گندم از جمله زنگ زرد و سیاه از مهمترین عوامل بیماریزای قارچی گندم در جهان و ایران می‌باشند که با تولید نژادهای جدید ناشی از جهش یا نوترکیبی جنسی غالباً باعث بروز اپیدمی‌های شدید و کاهش عملکرد محصول میشوند. در این پژوهش پراکنش و تنوع ژنتیکی آلودگی اسیومی بوته‌های زرشک و ارتباط آنها با زنگ زرد گندم مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۹۵ نمونه از اندام‌های آلوده اسیومی زرشک از رویشگاه‌های طبیعی بوجود، دورود، ازنا و الیگودرز جمع‌آوری گردید. مایه‌زنی گیاهچه‌های گندم با اسیوسپوره‌های برگ‌های آلوده زرشک در شرایط گلخانه و مزرعه انجام شد. نتایج آزمون بیماریزایی نشان داد که جدایه‌های اسیومی قادر به تولید یوردینیوسپوره‌های زنگ زرد گندم (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) و زنگ سیاه گندم (*P. graminis* f. sp. *tritici*) روی ارقام حساس می‌باشند. برای شناسایی مولکولی جدایه‌ها، دی‌ان‌ای ژنومی جدایه‌های اسیومی زرشک با استفاده از آغازگرهای ناحیه‌ی rDNA تکثیر و تعیین توالی گردید. بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های اسیومی با تکثیر ناحیه‌ی IGS1-rDNA در ۱۳۴ جدایه انجام شد. نتایج بررسی‌های مولکولی با تأیید نتایج آزمون بیماریزایی نشان داد که بوته‌های زرشک میتوانند میزبان اسیومی زنگ زرد و زنگ سیاه گندم در استان لرستان باشند. تکثیر ناحیه‌ی IGS1 در جدایه‌های منطقه‌ی ازنا و الیگودرز بیشتر بصورت ۳ بانندی بترتیب با فراوانی ۱۵ و ۲۱ جدایه بود. در منطقه دورود بیشتر بصورت پنج بانندی (۲۶ جدایه) و در بروجرد بصورت دو بانندی (۱۰ جدایه) مشاهده شد و نشان داد که تنوع ژنتیکی بین اسیوسپوره‌های مناطق نمونه‌برداری شده وجود دارد.

کلیدواژه: *Puccinia striiformis*، میزبان واسط، IGS1-rDNA، زرشک، زنگ نواری

* بخشی از رساله کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به گروه بیماری‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه دانشگاه ولیعصر (عج)، رفسنجان

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

۱. دانشجویی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج)، رفسنجان.

۲. استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان.

۳. عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان

Distribution and genetic diversity of aecial infection on barberry and its importance to wheat yellow rust disease in Lorestan Province*

F. Mehdinia^{1*}, H. Alaei², E. Sedaghati², and A. Deghani³

(Received: 28.12.2014; Accepted: 23.5.2016)

Abstract

Wheat rusts including stripe and stem rusts are the most important fungal diseases in the world and Iran as frequently causes natural epidemics and significant yield losses due to rapid development of new races in life cycle resulted from mutation or sexual recombination. In this research, distribution and genetic diversity of aecial infection on barberry bushes and their relation to wheat yellow rust was studied. A total of 95 samples of infected leaves to aecial stage on barberry bushes were collected from Borujerd, Dorud, Azna and Aligudarz regions. To identify the rust species, *in vivo* and *in vitro* pathogenicity test were conducted by artificial inoculation of wheat seedlings using collected aeciospores from each region. The results showed the production of urediniospores of *P. striiformis* f. sp. *tritici* (yellow rust) as well as *P. graminis* f. sp. *tritici* (black rust) in inoculated wheat seedlings. Molecular detection and sequencing of the rDNA regions of representative aecial isolates on Barberry were done. Genetic diversity of 134 aecial isolates was also studied by amplification of IGS1-rDNA region. The Results also confirmed the pathogenicity test and showed that barberry could be the aecial host of yellow and black rusts in Lorestan province. The IGS-rDNA amplification of aecial isolates from Azna and Aligudarz showed most a production of three bands with a frequency of 15 and 21 isolates respectively. In Dorud samples was with five bands (26 isolates) as well as in Broujerd samples with two bands (10 isolates) in which showed a genetic variation among aecial isolates collected from sampling regions in Lorestan province.

Keywords: *Puccinia striiformis*, alternate host, IGS1-rDNA, Berberis, Stripe rust

* A Part of MSc. Thesis of the First Author, Submitted to College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran.

** Corresponding author's E-mail: fmehdinia@yahoo.com

1. Former M.Sc. Student of Plant Pathology, Vali-Ee-Aasr Univ. of Rafsanjan, Iran

2. Assistant Prof. of Plant Pathology, Vali-Ee-Asr Univ. of Rafsanjan, Iran.

3. Faculty Member, Agricultural and Natural Resources Research Center, Iran.

مقدمه

و همکاران (Jin et al. 2010) بر اساس مطالعات آزمایشگاهی *In vitro* برای اولین بار بوته های زرشک را به عنوان میزبان واسط زنگ زردگندم گزارش کردند. امروزه میزبان واسط بودن بوته های زرشک در بعضی از مناطق توسط محققین مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است (Jin 2011, Zhao et al. 2013, Rodriguez-Algaba et al. 2015b, Wang et al. 2014) ولی با توجه به بررسی های انجام شده هنوز مطالعه ای در این خصوص در مناطق مهم گندم کاری ایران صورت نگرفته است.

در ایران طبق نظر گیاه شناسان پنج گونه وحشی زرشک شامل زرشک معمولی (*Berberis vulgaris*)، زرشک راست خوشه (*B. orthobotrys*)، زرشک خراسانی (*B. khorasanica*)، زرشک زالزالکی (*B. crataegina*) و زرشک زرافشانی (*B. integerrima*) وجود دارد (Kafi & Balandary 2001). در دنیا میزبانهای واسط زنگ زرد گونه‌های مختلف زرشک از قبیل *B. chinensis*, *B. koreana*, *B. holstii*, *B. vulgaris* و نیز هیبرید بین گونه‌ای میان *B. koreana* × *B. thunbergii* گزارش شده است که اغلب این گونه‌ها در برابر زنگ ساقه گندم دارای مقاومت بالایی هستند. زنگ زرد نیز به عنوان زنگ ماکروسپیکلیک و دگر پایه محسوب می‌گردد. با توجه به حضور چرخه‌ی جنسی *P. striiformis* f.sp. *tritici* روی زرشک، این گیاه می‌تواند نقش اساسی در ترکیبات جدید بیماری‌زایی این قارچ ایفا کند. با توجه به تنوع بالای ژنتیکی در این زنگ به نظر می‌رسد که علاوه بر جهش و هیبریداسیون رویشی، نوترکیبی جنسی نیز عامل اصلی این تنوع ژنتیکی باشد. تا کنون بیش از ۴۰ ژن مقاومت به زنگ زرد (Yr) شناخته شده است. استفاده از ژن‌های مقاومت اختصاصی به عنوان یک روش کنترل مناسب برای زنگ زرد، موفقیت آمیز نبوده است چرا که جمعیت بیمارگر به

زنگ های غلات شامل زنگ سیاه (*Puccinia graminis* Pers:Pers f. sp. *tritici* Erikss.& E. Henn.)، زنگ قهوه ای (*P. striiformis* (P. *tritricina* Erikss.)) و زنگ زرد (*P. striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Erikss) به عنوان عوامل اصلی و مهم محدودکننده تولید گندم در سراسر جهان و ایران به شمار می‌روند (Abbasi et al. 2004, Singh et al. 2011, Singh et al. 2015). زنگ زرد گندم یکی از مهم‌ترین مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در بسیاری از مناطق ایران از جمله استان لرستان است که موجب کاهش عملکرد محصول می‌گردد (Rabaninasab et al. 2008b, Afshari 2010, Safavi 2015).

کشت ارقام حساس، تغییر پذیری در عامل بیماری‌زا و وجود شرایط اقلیمی مناسب باعث بروز اپیدمی های ویران کننده این بیماری می‌شود. زنگ زرد علاوه بر گندم به چاودار و ۱۸ جنس از گندمیان حمله می‌کند و بسیاری از باریک برگ‌های (چمن‌های) چند ساله از منابع مهم نگهداری قارچ عامل محسوب می‌شوند و احتمالاً می‌توانند به عنوان منبع اینوکولوم برای مناطق و کشتزارهای گندم دریافت کننده بعدی به شمار روند بطوریکه مهاجرت فصلی یوردینیوسپورها از دشت به ارتفاعات و بالعکس توسط محققین گزارش شده است (Hovmøller et al. 2002, Ma et al. 2010, Hovmøller et al. 2015).

حدود ۶۵ نژاد فیزیولوژیکی برای این زنگ شناسایی شده است. بوته‌های زرشک با نام علمی *Berberis spp.* L. به‌عنوان میزبان واسط برای بیماری‌های قارچی زنگ سیاه گندم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند، ولی اهمیت و نقش آن برای بیماری زنگ زرد گندم با عامل *P. striiformis* f.sp. *tritici* تا سال ۲۰۱۰ ناشناخته بود. جین

سرعت دچار دگرگونی شده و در عرض چند سال قادر خواهد بود بر ژن‌های مقاومت معرفی شده غلبه نمایند (Steele et al. 2001). بنابراین داشتن اطلاعات بیشتر در خصوص ساختار ژنتیکی جمعیت‌های موجود و ارتباط بین این جمعیت و میزبان واسط ضروری است تا بتوان تاثیر این مقاومت‌ها را ارزیابی و یا پیش بینی کرد. در گذشته تعیین تنوع ژنتیکی قارچ‌ها منحصراً به کمک تعیین نژاد و بر پایه‌ی استفاده گروهی از ارقام افتراقی استوار بود. گرچه این روش مزایا و معایب خاص خود را دارد ولی در جای خود به عنوان بهترین و مهم‌ترین روش برای تعیین تفاوت ژنتیکی جمعیت‌های قارچ محسوب می‌شود.

امروزه با ابداع روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR، شناسایی ژنوتیپ و پاتوتایپ‌های قارچ‌ها از جمله زنگها دچار تحول گردید. روش انگشت‌نگاری DNA، ابزاری قدرتمند برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ‌های زنگ می‌باشد که توسط محققین مختلفی روی جمعیت‌های متعددی از قارچ‌های عامل زنگ زرد، زنگ سیاه و زنگ قهوه‌ای غلات (Chen et al. 1993, Autrique et al. 2003, Keiper et al. 1995, Gomez et al. 2006) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. برای شناخت عمیق از اپیدمیولوژی، ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی در بیمارگرهای قارچی لازم است از یک نشانگر ژنتیکی مناسب استفاده کرد. واحدهای تکراری DNA ریپوزومی (rDNA) به‌عنوان یک فاکتور مناسب برای شناسایی و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی بسیاری از گونه‌های قارچی از جمله قارچ‌های زنگ استفاده شده‌اند بطوریکه چند شکلی بین‌گونه‌ای و گاهی اوقات حتی درون‌گونه‌ای را ردیابی می‌کند (Simon & Weiß 2008, Alaei et al. 2009b, De Backer et al. 2012, Alaei et al. 2011). وانگ و همکاران (Wang et al. 2012)

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری

نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش طی ماه‌های تیر تا مهر سال ۱۳۹۱ از بوته‌های زرشک آلوده به مرحله

جدول ۱ - موقعیت جغرافیایی نمونه های استفاده شده در این پژوهش و نتایج آزمون بیماری زایی آلودگی ایسومی برگ زرشک روی گیاهچه های گندم

Table 1. Location of the samples used in this study and the results of pathogenicity test of aecium bearing barberry leaf samples on wheat seedlings.

Date (2012)	Location	Isolate Code	# of Sample	Height (m)	Longitude Latitude	Pathogenicity test	
						<i>Pst</i>	<i>Pgt</i>
01/07	Dorud Choobdar Olia	CH1-CH10	10	2021	<u>49 53 19 18</u> 33 37 30 01	+	-
09/07	Aligudarz Sad road	A1-A10	10	1804	<u>49 39 34 03</u> 33 02 42 08	+	+
09/07	Aligudarz KizanDare	A11-A15	5	1889	<u>49 37 36 05</u> 33 02 02 07	+	+
09/07	Aligudarz KizanDare	A16-A20	5	2209	<u>49 55 27 06</u> 33 01 12 05	+	+
29/07	Dorud Chamnar	M21-M25	5	1638	<u>49 11 45 03</u> 33 23 05 01	+	-
29/07	Dorud Daryab	D1-D10	10	1647	<u>49 11 57 08</u> 33 25 39 04	+	-
04/08	Azna Darband	M1-M20	20	1720	<u>49 25 23 01</u> 33 27 12 04	+	-
08/08	Dorud ChoobdarOlia	CH11-CH30	20	2030	<u>49 08 19 08</u> 33 37 35 01	+	-
22/09	Borujerd Dehghah	B1-B10	10	1955	<u>49 44 28 06</u> 33 39 02 02	+	-

Puccinia striiformis f. sp. *tritici* (*Pst*)

Puccinia graminis f. sp. *tritici* (*Pgt*)

Positive (+) assay for Uredinia formed by inoculating wheat with aeciospores; negative (-).

اسلایدهای میکروسکوپی از برشهای عرضی جوش ها با استفاده از تیغ جراحی در محلول رنگ آمیزی لاکتوفنل (Sinclair & Dhingra 1995) تهیه شد و با میکروسکوپ نوری ((Olympus BH2) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های یوریدیوسپور از زنگ سیاه گندم (*P. graminis* f.sp. *tritici*) و زنگ قهوه ای گندم (*P. triticina*) از بخش تحقیقات غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، تهیه شد. یک نمونه زنگ زرد گندم (*P. striiformis* f.sp. *tritici*) جمع آوری شده در سال ۱۳۸۷ از استان همدان نیز از هرباریوم آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان تهیه گردید. یک جدایه ی زنگ زرد جدا شده از علف هرز جو دره *Hordeum spontaneum* L. در منطقه الیگودرز و یک

ایسومی در مناطق مختلف رویشگاه های طبیعی استان لرستان شامل ارتفاعات شهرهای بروجرد، دورود، ازنا و الیگودرز جمع آوری شد (جدول ۱). در هر منطقه به صورت تصادفی تعدادی بوته انتخاب شد و از اندام های آلوده به مرحله ایسومی بالغ زنگ روی شاخ و برگ از جهت های مختلف بوته ها به صورت تصادفی نمونه تهیه گردید. نمونه ها در کیسه های کاغذی قرار داده شد و به آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی استان لرستان، شهر خرم آباد منتقل و در شرایط دمای اتاق خشک شدند و سپس در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس برای استفاده های بعدی نگهداری شد. ریخت شناسی جوش ها و وجود مراحل مختلف زنگ روی نمونه ها توسط استریومیکروسکوپ بررسی شد.

مه‌پاشی گردید. سپس مخلوط اسیوسپورها با حامل پودر تالک به نسبت ۴:۱ توسط گردپاش دستی به طور یکنواخت روی سطح برگ‌ها پاشیده شد. پس از انجام گردپاشی مجدداً سطح برگ‌ها با سوسپانسیون آب و سورفکتانت Tween 20 مه‌پاشی شد. گلدان‌های مایه‌زنی شده درون ظروف پلاستیکی درپوش‌دار (اکواریومی) با رطوبت نسبی در حد اشباع (بیش از ۹۵ درصد) قرار داده شد و در شرایط تاریکی با دمای ۱۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به گلخانه با شرایط دمایی ۲۰-۱۴ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی انتقال داده شدند.

آزمایشات مزرعه‌ای در مزرعه تحقیقاتی بخش بیماری شناسی گیاهی مرکز تحقیقات استان لرستان، شهر خرم‌آباد انجام شد. بدین منظور زمینی به مساحت ۱۲ متر مربع با قطعات یک متر مربع در نظر گرفته شد و در هر قطعه ارقام بولانی، موروکو و الوند و ترکیبی از سه رقم فوق در چهار قسمت کشت گردید. مایه‌زنی گیاهچه‌ها با اسیوسپورهای جمع‌آوری شده از مناطق بروجرد، دورود، ازنا و الیگودرز در مرحله دو برگی انجام شد. برای هر جدایه دو تکرار در نظر گرفته شد. مایه‌زنی قطعات با جدا کردن آنها با پوشش پلاستیکی به صورتی انجام شد تا از اختلاط آلودگی تیمارها و شاهد سالم جلوگیری شود و همچنین رطوبت نسبی بالا برای ایجاد آلودگی فراهم باشد. ۱۶ روز پس از مایه‌زنی گیاهچه‌های گندم با اسیوسپورهای برگ زرشک، نمونه‌های برگ آلوده به یوردینوسپورهای زنگ جمع‌آوری شد. اسلایدهای میکروسکوپی از اسپورهای قارچ در لاکتوفنل تهیه و بوسیله میکروسکوپ نوری (Olympus BH2) مورد بازبینی قرار گرفت.

نمونه از گندمیان آلوده به مرحله تلومی زنگ سیاه که در سایه‌انداز و اطراف بوته‌های زرشک آلوده به زنگ روییده بودند و همچنین نمونه زنگ سیاه گندم از مزارع بروجرد و نمونه زنگ زرد گندم از مزارع دورود برای انجام کارهای مولکولی جمع‌آوری و در این پژوهش استفاده شد.

مایه‌زنی اسیوسپورهای زرشک روی گیاهچه‌های گندم

به منظور اثبات بیماری‌زایی اسیوسپورها بر روی گندم و بررسی نتایج آلودگی آنها به بیماری زنگ سیاه (ساقه) *P. graminis f.sp. tritici* و یا زنگ زرد (نواری) گندم *P. striiformis f.sp. tritici* مایه‌زنی مصنوعی گیاهچه‌ها بر اساس روش شرح داده شده در شرایط گلخانه و مزرعه (Safavi & Afshari 2012) با اندکی تغییر انجام شد. از ارقام گندم الوند، بهار، بولانی و موروکو استفاده شد. رقم بهار بولانی از گندم‌های بومی ایران می‌باشد که تاکنون ژن مقاومت به زنگ زرد در آن شناخته نشده است و به عنوان رقم حساس مورد استفاده قرار گرفت. رقم موروکو هم به عنوان رقم حساس به زنگ سیاه و زرد گندم در این آزمایش استفاده گردید. آزمایشات گلخانه‌ای در گلخانه‌ی بخش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه ولی عصر (عج) انجام شد. جوانه‌زنی بذور گندم در ظروف پتری با نگهداری در دمای ۲۰-۱۸ درجه سلسیوس انجام شد. تعداد ۲۰-۳۰ عدد بذر جوانه‌زده به صورت متراکم در گلدان‌های ۱۵ سانتی‌متری حاوی خاک استریل (خاک، ماسه، خاک‌برگ و کود پوسیده به نسبت ۳:۳:۱) کاشته شد و در دمای ۲۰-۱۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد نگهداری شد (Elahinia 2010). مایه‌زنی گیاهچه‌ها در مرحله یک برگی انجام شد. ابتدا سطح برگ گیاهچه‌ها با سوسپانسیون آب مقطر استریل همراه با یک قطره سورفکتانت Tween 20 در هر لیتر توسط آب‌پاش دستی

شناسایی مولکولی بیمارگر

استخراج دی.ان.ای

از تک جوش‌های اسیومی روی برگ‌های زرشک و سایر نمونه‌های زنگ گندم به روش ستیل تری متیل آمونیوم بروماید دو درصد (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) طبق روش تغییر یافته موری و تامپسون (Murray & Thompson 1980) استخراج دی.ان.ای انجام شد. برای استخراج دی.ان.ای، مقدار ۳۰-۲۰ میلی گرم با خراش از قسمت‌های یک جوش اسیوسپور از برگ‌های آلوده بونه‌های زرشک و یا یوریدوسپورهای زنگ گندم داخل لوله های ۲ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل قرار داده شد و در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد (Alaei et al. 2009b). ۵۰ میکرولیتر بافر استخراج (۱۰۰ میلی مولار تریس اسید کلریدریک، ۸ pH، ۱/۴ مولار کلرید سدیم، ۲۰ میلی مولار Na-EDTA، یک درصد حجمی بتا-مرکاپتواتانول و دو درصد CTAB) به اسیوسپورها اضافه شد. به اندازه حجم اسپورها خرده شیشه های (glass beads) استریل با قطر ۰/۵ میلی متر به لوله ها اضافه گردید. با استفاده از یک دسته هاون کوچک فلزی استریل اسپورها داخل لوله سائیده شدند. مجدداً ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به تیوب‌ها اضافه شده و تیوب‌ها به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شد. سوسپانسیون اسپور به به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در این مدت لوله‌ها چند بار تکان داده شدند. سپس ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوآمیل‌الکل (۷/۷ v/v) به سوسپانسیون حاصل اضافه و بعد از چند دقیقه ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ

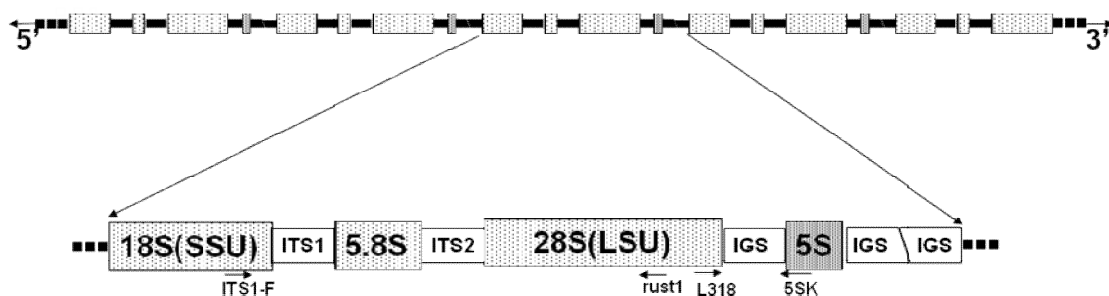
شدند. فاز رویی (حاوی دی.ان.ای) به لوله های جدید حاوی ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد منتقل گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس دی.ان.ای نمونه ها طی چندین مرحله سانتریفوژ به روش علایی و همکاران (Alaei et al. 2009b) استخراج گردید و به مدت یک شب در دمای یخچال و سپس تا انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

بررسی تنوع ژنتیکی آلودگی اسیومی زرشک با تکثیر

ناحیه IGS1-rDNA

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی مرحله اسیومی زنگ روی زرشک و ارتباط آنها با زنگ های گندم شامل زنگ سیاه (*P. graminis* f.sp. *tritici*)، زنگ زرد (*P. tritici* f.sp. *striiformis*) و زنگ قهوه‌ای گندم (*P. tritici* f.sp. *tritici*)، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر نواحی ITS و IGS از دی.ان.ای ریبوزومی (شکل ۱) با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی ITS1F/rust1 و L318/5Sk به ترتیب شرح داده شده توسط گاردس و برانز (Gardes & Bruns 1993) و روس آمسالگ (Roose-Amsaleg et al. 2002) با کمی تغییرات انجام شد.

آغازگرها با توالی‌های نوکلئوتیدی -5' ITS1F (3'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) (Gardes & Bruns 1993) و -5' Rust1 (3'-GCTTACTGCCTTCCTCAATC) (Liu et al. 1993) و نیز جفت آغازگر -5' L.318 (3'-GCTACGATCCACTGAGGTTTC) (Kim et al. 1992) و -5' 5SK (3'-CTTCGCAGATCGGACGGGAT) (Wolters & Erdmann 1988) توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی ساخته و تهیه شد. به منظور اطمینان از شناسایی جدایه‌ها، تکثیر و تعیین توالی ناحیه ITS از دی.ان.ای ریبوزومی با



شکل ۱- نقشه کلی ژنوم RNA ریبوزومی و جایگاه آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Fig. 1. Schematic overview of the ribosomal RNA gene clusters including the location of the primers used in this study

سی ثانیه) و در نهایت ۱۰ دقیقه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول حاصل از واکنش PCR روی ژل آگارز یک ونیم درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. نقوش الکتروفورزی حاصل زیر نور ماورای بنفش مشاهده گردید و از نتایج به دست آمده، توسط دستگاه (Uvidoc) Gel Documentation عکس برداری و ثبت گردید.

خالص سازی محصول PCR و تعیین توالی ناحیه‌ی rDNA

محصولات PCR حاصل از آغازگرهای ITS1F/Rust1 و L318/5SK (فقط برای تک باند اول) با ارسال به شرکت دنا زیست مشهد به ترتیب برای نواحی ITS-rDNA و IGS1-rDNA از روی ژل آگارز برش داده شد و با استفاده از کیت Axyprep PCR Cleanup Kit مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده، خالص سازی شدند. برای تعیین توالی ناحیه‌ی تکثیر شده، نمونه‌ها به انستیتوی ملی بیوتکنولوژی کشاورزی کره‌ی جنوبی فرستاده شدند. توالی‌های به دست آمده ابتدا با نرم افزار BioEdit مورد بازبینی قرار گرفت. سپس توالی‌ها در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ارائه شدند. توالی‌ها براساس بالاترین درصد شباهت با

استفاده از آغازگرهای ITS1F/rust1 در جدایه‌های زنگ سیاه، زنگ زرد و زنگ قهوه‌ای گندم و همچنین دو جدایه از اسیب‌سپورهای زنگ روی زرشک انجام شد. تکثیر ناحیه IGS1 از دی.ان.ای ریبوزومی با استفاده از آغازگرهای L318/5SK در ۱۳۴ جدایه مرحله اسیب‌زنی زرشک و همچنین جدایه‌های زنگ سیاه، زنگ زرد و زنگ قهوه‌ای گندم انجام شد. مخلوط هر واکنش PCR (۵۰ میکرولیتر) شامل بافر 1x PCR (۱۰ میلی‌مولار تریس-اسیدکلریدریک و ۵۰ میلی‌مول کلرید پتاسیم ۹pH)، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۲ میکرومولار از هر یک از آغازگرها و ۱/۲۵ واحد آنزیم *Taq DNA Polymerase* به همراه پنج میکرولیتر از نمونه دی.ان.ای استخراج شده بود. تمام مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از شرکت سیناژن تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر C-1000 (Bio Rad, USA) با شرایط تکثیر بصورت پنج دقیقه و اسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۴۰ چرخه در ۹۴ درجه سلسیوس (یک دقیقه)، دمای اتصال ۵۵ درجه سلسیوس (یک دقیقه) (برای جفت پرایمر L318/5SK) و ۴۴ درجه سلسیوس (یک دقیقه) (برای جفت پرایمر ITS1F/rust1)، ۷۲ درجه سلسیوس (سه دقیقه و

توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و تطبیق داده شدند.

نتایج و بحث

پراکنش و شناسایی گونه‌های زرشک آلوده به زنگ در مناطق نمونه برداری شده

در این پژوهش در مجموع ۹۵ نمونه آلودگی ایسیومی روی بوته‌های زرشک *Berberis spp.* از رویشگاه‌های طبیعی استان لرستان جمع‌آوری گردید. اگر چه در بعضی از مناطق مورد مطالعه از جمله گهر دورود و نوژیان و همچنین در ارتفاعات بالا، بوته‌های زرشک عاری از آلودگی ایسیومی زنگ بودند ولی در بیشتر مناطق کوهستانی نمونه برداری شده، رویشگاه‌های طبیعی بوته‌های زرشک دارای آلودگی شدید ایسیومی زنگ بود که در اکثر موارد در شیب جنوبی کوه‌ها قرار داشتند. آلودگی بوته‌های زرشک به مرحله‌ی ایسیومی زنگ سیاه از ارتفاع ۶۵۰ متر تا ۲۳۸۰ متر از سطح دریا توسط عباسی و همکاران (Abbasi et al. 2002) مشاهده گردیده است. پراکندگی گونه‌های مختلف زرشک تا ارتفاع ۳۵۰۰-۳۰۰۰ متری از سطح دریا گزارش شده است (Tiwari et al. 2012). تنها مکان رویشگاه طبیعی زرشک در منطقه بروجرد روستای دهگاه با ارتفاع حدود ۱۹۵۵ متر از سطح دریا بود که بوته‌های زرشک در این ناحیه در دامنه‌ی کوه‌ها و در فاصله‌ی چند کیلومتری از مزارع کشت‌زارهای گندم بود. در بازدید از مزارع گندم این ناحیه زنگ سیاه گندم مشاهده شد. در نواحی کوهستانی الیگودرز با آب و هوایی معتدل و زمستان‌های سرد و برف‌گیر فاصله‌ی بوته‌های زرشک تا مزارع گندم حدوداً ۵۰-۶۰ کیلومتر بود و در سال ۱۳۹۲ آلودگی به زنگ زرد گندم به صورت لکه‌ای در مزارع گندم مشاهده شد. در نواحی کوهستانی دورود با شرایط آب و هوایی معتدل با

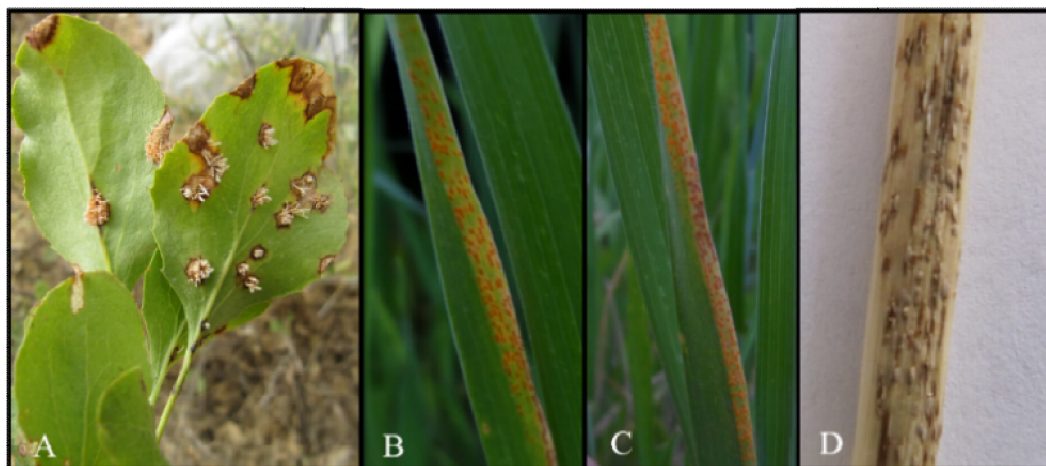
زمستان‌های سرد و ارتفاع بیش از ۲۰۰۰ متر از سطح دریا، اکثراً رویشگاه‌های بوته‌های زرشک در مجاورت مزارع گندم قرار داشتند و در مزارع زنگ زرد مشاهده شد. رویشگاه‌های طبیعی بوته‌های زرشک از نا نیز در منطقه‌ای کوهستانی با شرایط آب و هوایی معتدل و زمستان‌های سرد در مجاورت مزارع و کشت‌زارهای گندم بود و در سال ۱۳۹۲ آلودگی زنگ زرد گندم مشاهده شد. گونه‌های غالب زرشک در ارتفاعات دورود و ازنا *B. vulgaris* و ارتفاعات بروجرد و الیگودرز *B. integerrima* بودند. اسپرموگونیم‌های تشکیل شده، در بوته‌های زرشک زیر اپیدرمی و کروی بوده، معمولاً در سطح فوقانی برگ و گاهی در سطح زیرین برگ‌های زرشک روی لکه‌های قهوه‌ای رنگ به صورت دستجات مشخص تشکیل می‌شوند. رنگ اسپرموگونیم‌ها از عسلی تا قهوه‌ای تیره متغیر است. ایسیوم‌ها به صورت گروهی در قسمت زیرین برگ و به ندرت در سطح فوقانی برگ تشکیل شده و حالت فنجانی تا استوانه‌ای دارند. علاوه بر سطح برگ، دمبرگ، میوه و دم میوه‌های زرشک نیز توسط دستجات ایسیدی آلوده می‌گردند. تشکیل ایسیوم‌ها روی میوه باعث عدم رسیدن میوه‌ها، خشک شدن خوشه‌ها، چروکیدگی و تیره‌رنگی میوه‌ها و بالاخره ریزش آن‌ها می‌گردد (بدون نمایش داده). وقوع آلودگی زنگ روی بوته‌های زرشک بسته به ناحیه نمونه برداری از عدم آلودگی تا صد درصد آلودگی متغیر بود. بیشترین میزان آلودگی‌های ایسیومی مربوط به بوته‌های زرشک منطقه‌ی دهگاه بروجرد (بیش از ۷۵ درصد بوته‌ها با سطح آلودگی شدید) و کمترین میزان آلودگی در ناحیه کیزان‌دره و جاده سد الیگودرز (کمتر از ۲۵ درصد بوته‌ها با سطح آلودگی پائین) بود. آلودگی‌های ایسیومی در منطقه الیگودرز محدود به نقاط نکروده در سطح برگ با تک ایسیوم‌های سفید رنگ و بندرت روی

شاخه‌ها قابل مشاهده بود. میزان آلودگی بوته‌ها در مناطق دربند ازنا ۲۵ درصد و در چوبدر علیا و چمنار دورود حدود ۵۰ درصد با سطح آلودگی متوسط مشاهده شد. تعداد جوش‌های اسیومی روی برگ در نواحی مختلف نمونه برداری متفاوت بود از تک جوش‌های اسیومی تا تعداد زیاد بطوریکه بخش زیادی از سطح برگ را گرفته بود (بدون نمایش داده). اسیوم‌های بالغ دارای پریدیوم سفید رنگ، که ارتفاع آن تا ۲/۴ میلی‌متر می‌رسید. اسیوسپورها غالباً چند وجهی دارای دیواره‌ی بی‌رنگ با ضخامت حدود یک میکرومتر و به‌صورت دسته‌های زنجیری و پشت‌سره‌م می‌باشند. ضخامت دیواره در قسمت رأس یا متمایل به رأس اسپور بیش از طرفین بود. دیواره‌ی اسیوسپورها به‌طور ظریف زگیل‌دار است و بعضاً در بین زگیل‌های ظریف و یک‌دست زگیل‌های درشت با اندازه‌های متفاوت به چشم می‌خورند که با نتایج عباسی (Abbasi 2001) مطابقت داشت. در تمامی نمونه‌های بررسی شده تفاوتی در اندازه و رنگ اسیوسپورها قابل مشاهده نبود (بدون نمایش داده). در طول بررسی‌های میدانی شناسایی گونه‌های *Puccinia* spp. بر اساس ریخت‌شناسی اسیوم روی بوته‌های زرشک امکان‌پذیر نبود.

مایه‌زنی اسیوسپورهای زرشک روی گیاهچه‌های گندم

مایه‌زنی‌های اسیوسپورهای زرشک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان لرستان روی گیاهچه‌های گندم به منظور ردیابی زنگ سیاه و زنگ زرد گندم در شرایط گلخانه و مزرعه نتایج موفقیت‌آمیزی داشت (شکل ۲). در شرایط مزرعه بیش‌ترین علائم آلودگی زنگ روی دو رقم حساس گندم موروکو و بولانی مشاهده شد و هیچ‌گونه علائمی روی ارقام الوند و بهار مشاهده نشد. جوش‌های

یوردینیوسپور زنگ زرد پس از گذشت ۱۵-۱۸ روز از مایه زنی اسیوسپورهای زرشک منطقه‌ی ازنا، دورود و بروجرد مشاهده شد. اما با مایه‌زنی اسیوسپورهای منطقه‌ی الیگودرز هر دو نوع زنگ زرد گندم و زنگ سیاه گندم مشاهده شد. در تیمار شاهد هیچ‌گونه علائمی مبنی بر ایجاد آلودگی به زنگ مشاهده نشد. در گیاهچه‌های گندم مایه‌زنی شده حضور یوردینیوسپورهای زنگ زرد به همراه لکه‌های بافت مرده در برگ‌ها مشاهده شد. عامل زنگ زرد یا نواری به‌واسطه‌ی دارا بودن تلئوم‌ها و یوردینیوم‌هایی که غالباً روی نواری‌های مشخص سبززرد یا بافت مرده تشکیل می‌شوند و یوردینیوسپورهای با دیواره‌ی بی‌رنگ و منافذ تندشی‌غیرواضح از سایر گونه‌های زنگ گندم قابل شناسایی است. علائم نشان‌دهنده زنگ سیاه روی گندم‌های مایه‌زنی شده با اسیوسپورهای منطقه الیگودرز روی ساقه و غلاف ساقه گندم دیده شد (شکل ۲). جوش‌ها ابتدا بسته بوده و با رشد کافی، سبب تخریب اپیدرم می‌گردند و تولید توده‌های اسپوری حاوی یوردینیوسپور می‌کند که روی جوش‌ها قرمز رنگ یا قهوه‌ای مایل به خرمایی می‌باشند. یوردینیوسپورها غالباً مستطیلی کشیده و به رنگ قهوه‌ای دارچینی بودند. با توجه به نتایج مایه‌زنی گیاهچه‌های گندم با اسیوسپور در شرایط گلخانه و مزرعه و تولید یوردینیوسپورهای زنگ نواری گندم ۱۶ روز پس از مایه‌زنی می‌توان فرضیه میزبان واسط بودن گونه‌های زرشک *B. vulgaris* و *B. integerrima* را برای زنگ زرد گندم در استان لرستان پذیرفت. اگر چه در بعضی مناطق امریکا بدلیل شرایط اقلیمی خاص، فنولوژی رشد زرشک در شرایط طبیعی منطقه و از بین رفتن مرحله تلئومی زنگ زرد، بوته‌های زرشک نمی‌توانند در کامل شدن چرخه جنسی زنگ نقش داشته باشد (Wang & Chen 2015, Wang et al. 2015a) اما موضوع میزبان



شکل ۲- آلودگی ایسیومی در سطح زیرین برگ زرشک گونه *Berberis vulgaris* (A)؛ آلودگی برگ گندم به جوش های زنگ زرد *Berberis integerrima* (B) و *Berberis vulgaris* با ایسیوسپوره‌های *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* بعد از مایه‌زنی گیاهچه‌ها با ایسیوسپوره‌های *Berberis vulgaris* (B) و *Berberis integerrima* (C) در شرایط گلخانه؛ آلودگی ساقه گندم به جوش های زنگ سیاه *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* بعد از مایه‌زنی گیاهچه‌ها با ایسیوسپوره‌های *Berberis integerrima* (D).

Fig. 2. Aerial infection on the back of the leaves of *Berberis vulgaris* in the field (A); Uredinia of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* on wheat leaves after artificial inoculation with aeciospores collected from *Berberis vulgaris* (B) and *Berberis integerrima* (C) under controlled conditions; Stem rust, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* on wheat stem after artificial inoculation with aeciospores collected from *Berberis integerrima* under controlled conditions (D).

موفقیت انجام شد و در تمام جدایه‌ها یک باند با اندازه‌ی ۱۲۰۰ جفت بازی ایجاد گردید. تفاوتی بین باندهای جدایه‌های زنگ گندم و آلودگی ایسیومی زرشک با استفاده از این پرایمرها قابل مشاهده نبود (بدون نمایش داده). شناسایی ملکولی جدایه‌ها با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از توالی‌یابی آنها شامل یوردینیوسپوره‌های زنگ زرد *P. striiformis* f.sp. *tritici* گندم‌های مایه‌زنی شده با ایسیوسپوره‌های زرشک، یوردینیوسپوره‌های زنگ سیاه گندم *P. graminis* f.sp. *tritici*، یوردینیوسپوره‌های زنگ قهوه‌ای گندم *P. triticina* و جدایه‌ی ایسیوسپوری زنگ زرشک منطقه بروجرد، انجام شد و با استفاده از نرم‌افزار Clustal X و پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص شد که نمونه‌های ایسیوسپوری زنگ زرشک منطقه بروجرد با *P. striiformis* f.sp. *tritici* به‌عنوان ۸۷ درصد تشابه ۸۷ درصدی به‌عنوان *P. striiformis* f.sp. *tritici* با توالی‌های مرجع معتبر، منطبق می‌باشد (جدول

واسط بودن گونه‌های زرشک برای زنگ نواری گندم توسط بسیاری از محققین با انجام آزمون بیماری‌زایی در شرایط کنترل شده گزارش شده است (Jin et al. 2010, Jin et al. 2011, Zhao et al. 2013). بطوریکه آلودگی گیاهچه‌های گندم با ایسیوسپوره‌های زرشک منجر به تولید یوردینیوسپور زنگ نواری گندم و همچنین آلودگی گونه‌های مختلف زرشک با یوردینیوسپوره‌های زنگ نواری گندم در شرایط طبیعی نیز گزارش شده است (Rodriguez et al. 2014, Wang et al. 2015b).

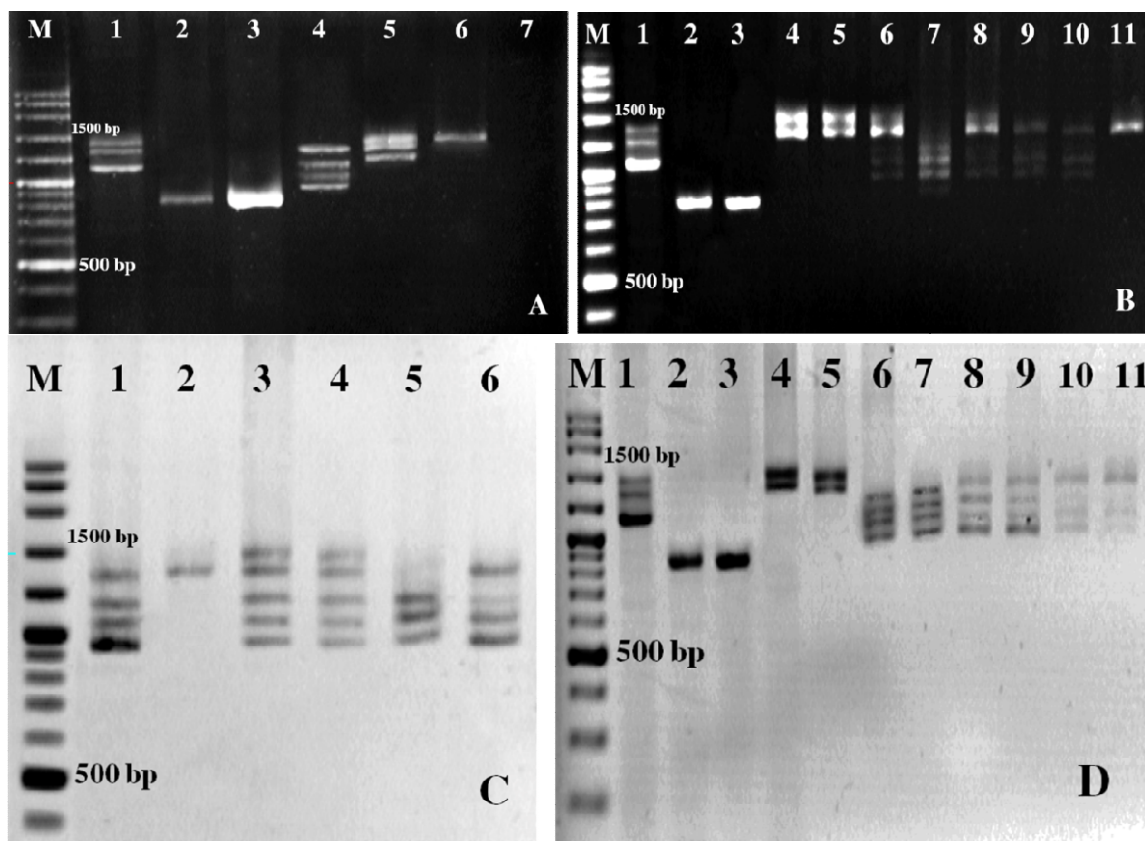
شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی آلودگی ایسیومی زرشک با تکثیر ناحیه IGS1-rDNA

تکثیر ناحیه‌ی ITS-rDNA در جدایه‌های زنگ زرد، زنگ سیاه و زنگ قهوه‌ای گندم و همچنین آلودگی ایسیومی زرشک، با آغازگرهای عمومی ITS1F/rust1 با

(et al. 2008b) بود. مقایسه نتایج به دست آمده از تعداد و اندازه‌ی باندهای تکثیر شده‌ی ناحیه‌ی IGS1 نشان داد که تنوع ژنتیکی بین اسیوسپوره‌های مناطق نمونه‌برداری شده وجود دارد (شکل ۳ و جدول ۲). تعداد باندهای بدست آمده در کل جدایه‌ها از تک بانندی تا حداکثر ۶ بانندی متغیر بود (جدول ۲). تکثیر ناحیه‌ی IGS1 در جدایه‌های اسیوسپور جمع آوری شده از منطقه‌ی ازنا و الیگودرز بیشتر بصورت ۳ بانندی بترتیب با ۱۵ و ۲۱ جدایه بود. درحالیکه در منطقه دورود بیشتر بصورت پنج بانندی (۲۶ جدایه) و در منطقه بروجرد بصورت دو بانندی (۱۰ جدایه) مشاهده شد (جدول ۲). ناحیه IGS نیز به عنوان بخشی از دی ان ای ریبوزومی دارای توالی‌های تکرار شونده داخلی و اختصاصی گونه است. این ناحیه نسبت به ITS اغلب دارای درجه بالاتری از تنوع درون و بین گونه‌ای در قارچها و کاملاً اختصاصی می باشد (Simon & Weiß 2008). گزارشهای متعددی در خصوص مطالعات IGS روی زنگها با تنوع بالا وجود دارد. کیم و همکاران (Kim et al. 1992) تنوع بالایی را در بین پاتوتیپ‌های عامل زنگ سیاه کندم *P. graminis* f. sp. *tritici* گزارش و الگوی بانندی یک تا ۶ محصول را به اندازه ۱/۰۲ تا ۱/۵۸ کیلو باز مشاهده نمودند. چند شکلی در ناحیه IGS1 شش پاتوتیپ قارچ *P. hordei* عامل زنگ قهوه ای جو (Jennings et al. 1997) و زنگ قهوه ای گندم (Niazmand et al. 2013) نیز گزارش شده است. وجود چند شکلی دو قطعه ای در ناحیه IGS1 زنگ زرد گندم نیز توسط ربانی نسب و همکاران (Rabaninasab et al. 2008b) در شش جدایه ایرانی و همچنین روس آمسالگ و همکاران (Roose-Amsaleg et al. 2002) در بین شش جدایه اروپایی گزارش نموده اند. مطالعه حاضر نیز نشان

۳). واحدهای تکراری دی ان ای ریبوزومی (rDNA) به عنوان یک مارکر مناسب برای شناسایی بسیاری از گونه‌های قارچی از جمله زنگها استفاده شده است (Szabo & Kolmer 2007, Alaei et al. 2009b). توالی‌های مربوط به ناحیه ITS با تعداد نسخه زیاد در داخل ژنوم و با تنوع مناسب بین گروه‌های مختلف قارچی غالباً با ثبات هستند و معمولاً برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی گونه‌های یک جنس و طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی و شناسایی گونه استفاده می شوند (Alaei et al. 2009a).

تکثیر ناحیه‌ی IGS1-rDNA در ۱۳۴ جدایه از آلودگی اسیومی زرشک به همراه جدایه‌های زنگ سیاه، زنگ قهوه‌ای و زنگ زرد گندم، با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی L318/5SK موفقیت‌آمیز بود. الگوی بانندی حاصل از تکثیر ناحیه‌ی IGS1 برای نمونه‌های زنگ زرد گندم (*P. striiformis* f.sp. *tritici*) بدست آمده از گیاهچه‌های آلوده توسط مرحله اسیومی تمام مناطق تولید سه باند به اندازه‌های ۱/۳۹، ۱/۳۲ و ۱/۱۳ کیلوبازی نمود که منطبق بر یافته‌های وانگ و همکاران (Wang et al. 2012) می باشد در حالیکه برای تمامی نمونه‌های زنگ سیاه گندم (*P. graminis* f.sp. *tritici*) و زنگ قهوه ای گندم (*P. triticina*) فقط یک باند حدود ۰/۸۳ کیلوبازی ردیابی شد. این نتایج مطابق با ربانی نسب و همکاران (Rabaninasab et al. 2008a)، کیم و همکاران (Kim et al. 1992) و نیازمند و همکاران (Niazmand et al. 2013) است. تکثیر ناحیه‌ی IGS1 برای نمونه‌های زنگ زرد علف هرز جودره *H. spontaneum* و نمونه زنگ زرد همدان تعداد دو باند به اندازه ۱/۱ و ۱/۳ کیلو باز مشاهده شد که منطبق بر یافته‌های ربانی نسب و همکاران (Rabaninasab



شکل ۳- الگوی بانندی حاصل از تکثیر ناحیه IGS1-rDNA جدایه‌های ایسیومی بوته‌های زرشک آلوده و بیمارگر زنگ زرد، زنگ سیاه و زنگ قهوه‌ای گندم روی ژل آگارز ۱/۵ درصد شامل: (M) نشانگر ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ (A1, B1, D1) *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*؛ (A2, B2, D2) *P. graminis* f. sp. *tritici*؛ (A3, B3, D3) *Puccinia triticina*؛ (D3 و B3) زنگ قهوه ای گندم *Puccinia triticina*؛ (D4-5, B4-5) جدایه‌های ایسیومی منطقه بروجرد؛ (D8-9, C1-6) جدایه‌های ایسیومی منطقه دورود؛ (D10-11, B9-11, A4-6) جدایه‌های ایسیومی منطقه ازنا و (D6-7, B6-8) جدایه‌های ایسیومی منطقه الیگودرز، (A7) آب دو بار تقطیر (کنترل منفی).

Fig. 3. PCR amplification of the IGS1-rDNA region in aecial isolates of infected barberry bushes and the pathogen of yellow rust, stem rust as well as brown rust of wheat on 1.5 % agarose gel including: (M) 100 bp DNA ladder ; (A1, B1, D1) *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ; (A2, B2, D2) *P. graminis* f. sp. *tritici* ; (A3, B3, D3) *Puccinia triticina*; (B4-5, D4-5) aecial isolates from Borujerd regions; (C1-6, D8-9) aecial isolates from Dorud regions; (A4-6, B9-11, D10-11) aecial isolates from Azna regions; (B6-8, D6-7) aecial isolates from Aligudarz regions; (A7) MiliQ water (negative control).

متنوع بودن این واحدهای تکراری در ناحیه ITS زنگ سفید داوودی *Puccinia horiana* توسط علایی و همکاران (Alaei et al. 2009b) گزارش شده است. دلیل دوم ممکن است به واسطه نوترکیبی میتوتیک کروماتید های خواهری و وضعیت جفت هسته ای ایسیوسپورها

از تنوع و چند شکلی در ناحیه IGS1 مرحله ایسیومی زنگ سیاه و زرد گندم میباشد که ممکن است ناشی از تنوع اختصاصی درون گونه ای در تعداد کپی های این واحدهای تکراری باشد بدین معنی که توالی های نوکلئوتیدی این واحدهای تکراری متفاوت می باشد.

جدول ۲- تعداد و اندازه باندهای DNA تکثیر شده ناحیه IGS1-rDNA در جدایه های اسیبومی زرشک

Table 2. Size and the number of DNA bands resulted in PCR amplification of IGS1-rDNA region in aecial isolates on barberry.

Location (Isolates)	observed Bands	# of isolates	Representative Isolate(s) code	Size (Kb)
Borujerd (15)	1	3	B1-2	1.3
	1	3	B8	0.83
	2	10	B3, B9, B10	1.3, 1.4
	3	2	B4-1	0.95,1, 1.3
Dorud (55)	1	7	CH3,CH15	1.34
	3	4	CH21	0.98-1.07-1.37
	4	18	CH4, CH18,CH17	0.94-1-1.15-1.34
	5	26	CH2	0.98-1.07-1.16-1.38-1.5
	6	1	CH30	0.98-1.07-1.1-1.38-1.5- 1.6
Azna (33)	1	7	M20	1.57
	3	15	M9, M13, M17, M21	1.26, 1.42, 1.69
	4	11	M6, M3	1.03, 1.13, 1.23, 1.4
Aligudarz (32)	1	2	A1-2	1.06
	1	2	A2-1	0.83
	2	6	A15	0.98-1.07
	3	21	A9	0.9-1.03-1.3
	4	3	A12, A13,	0.95-1.05-1.16-1.32

این الگوی بانندی و مشابهت (درصد مشابهت اشاره شده بسیار پایین است و نمی توان بطور قاطع اعلام نظر نمود). آن با جدایه های زنگ زرد گندم موجود در بانک ژن تأییدی بر نتایج حاصل از آزمون بیماری زایی است که بوته های زرشک می توانند به عنوان میزبان واسط زنگ زرد گندم معرفی شوند (جدول ۳). این نتایج با بررسی های میدانی در خصوص مشاهده بیماری زنگ زرد و سیاه گندم در مناطق نمونه برداری شده مطابقت دارد. با این وجود تحقیقات تکمیلی در این خصوص با کلون سازی تک تک باندهای حاصل در الگوهای متفاوت بانندی مشاهده شده و توالی یابی آنها و همچنین بررسی کامل چرخه زندگی زنگ با آزمون بیماری زایی در شرایط طبیعی روی زرشک که در حال انجام است ضروری به نظر می رسد. نمونه های دورود و ازنا از نظر الگوی بانندی

باعث ایجاد چند شکلی شده است و یا ممکن است به دلیل تنوع گونه ای زنگ زرد و سیاه گندم باشد که زرشک به عنوان میزبان واسط آنها می باشد.

نتایج بدست آمده از تکثیر ناحیه ی IGS1 در جدایه های اسیبوسپور نشان داد که در تمامی مناطق نمونه برداری شده الگوی باندهای بدست آمده در بعضی از جدایه ها مشابه به الگوی بانندی زنگ زرد گندم می باشد. در منطقه الیگودرز از ۳۲ جدایه ۶/۲۵ درصد الگوی بانندی مشابه زنگ سیاه و ۹۳/۷۵ درصد الگوی مشابه زنگ زرد را نشان دادند. در منطقه بروجرد، از میان ۱۵ جدایه ۲۰ درصد الگوی بانندی محدوده ی زنگ سیاه و ۸۰ درصد الگوی بانندی زنگ زرد را نشان دادند. در منطقه دورود در بین ۵۵ جدایه، ۱۰۰ درصد نمونه ها الگوی بانندی در محدوده ی زنگ زرد مشاهده شد. با توجه به توالی یابی بخشی از

جدول ۳- شناسایی مولکولی جدایه‌های استفاده شده با توالی یابی نواحی rDNA و راس شمار آنها همراه با میزان تشابه با گونه‌های موجود در بانک ژن

Table 3. Molecular identification of the isolates included in sequence analysis of rDNA region and their accession number as well as highest similarities with NCBI GenBank species.

Isolate name	# of bands and Size (Kb) in PCR amplification of rDNA regions		Accession number		GenBank isolate identification/ Identities	
	ITS	IGS	ITS	IGS	ITS	IGS
<i>P. striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	1 (1.2)	3 (1.13,1.32,1.39)	KR230394	KR230398	DQ417398 (100%)	FJ224381 (100%)
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	1 (1.2)	1 (~0.83)	KR230395	NP	EU014046 (93%)	NP
<i>P. triticina</i>	1 (1.2)	1 (~0.83)	KR230396	NP	DQ417419 (99%)	NP
Single aecium - Borujerd	1 (1.2)	2 (~1.3 , 1.4)	NP	KR230399	NP	AY117131 (87%) AY117126

NP = not performed

های بروجرد احتمالاً به علت افزایش امکان تبادلات ژنتیکی بین جدایه‌ها است. به عبارت دیگر جریان ژنی باعث یکدست شدن ژنوتیپ‌ها در این منطقه شده است. الگوی بانندی حاصل از نمونه زنگ زرد جمع‌آوری شده از مزارع گندم بروجرد مشابه الگوی بانندی حاصل از تکثیر بعضی از جدایه‌های ایسیوسپورمنطقه بروجرد بود که نشان می‌دهد بوته‌های زرشک منطقه بروجرد علاوه بر میزبانی زنگ سیاه میزبان زنگ زرد نیز می‌باشند. تعیین توالی ناحیه‌ی IGS1 نمونه‌ی منتخب از مرحله‌ی ایسیومی زنگ زرشک مناطق نمونه‌برداری بروجرد، میزبانی زنگ زرد را در بین بوته‌های زرشک این منطقه اثبات کرد. تنها مکان رویشگاه طبیعی زرشک در بروجرد منطقه دهگاه بود که در مکانی دره‌مانند واقع شده است و جهت وزش باد غالب در منطقه غربی می‌باشد. با توجه به شرایط اقلیمی منطقه طی سال‌های ۹۱ و ۹۲ به دلیل خشک‌سالی و کم‌آبی سطح زیر کشت گندم بسیار پائین و میزان آلودگی به زنگ نیز در منطقه کم بود ولی در سال‌های زراعی ۸۶-۱۳۸۵ گزارش

تکثیر ناحیه IGS1 شباهت‌های زیادی به هم دارند و با توجه به اطلاعات هواشناسی استان لرستان، دارای شرایط اقلیمی مدیترانه‌ای بوده و ارتفاع از سطح دریا در هر دو منطقه تقریباً مشابه است، جهت وزش باد غالب، جنوبی بوده که احتمال حرکت اسپورها را از مناطق ازنایا به سمت مناطق دورود افزایش می‌دهد و در واقع امکان مبادله‌ی اسپورها را افزایش داده است، با توجه به وجود ارتفاعات در این نواحی و همچنین سطح وسیع رویشگاه‌های بوته‌های زرشک و فاصله‌ی مکانی از هم تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌ها زیاد بود. علاوه بر این وجود کشت‌زارهای گندم در اطراف و نزدیک به محل رویشگاه‌های طبیعی بوته‌های زرشک می‌تواند دلایل اصلی تنوع زیاد در الگوی بانندی این مناطق باشد. تنوع ژنتیکی در محصول PCR ایسیوسپورهای منطقه بروجرد نسبت به سایر نواحی بسیار پایین بود و اکثر نمونه‌ها الگوی بانندی مشابه‌ای (دو بانندی) را نشان می‌دادند. وجود نژادهای های مشترک و کم بودن تنوع ژنتیکی بین جدایه

گندم داشته باشند.

زنگ زرد یا نواری گندم یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در سراسر دنیا است که مرحله یوردیوم دیکاریوتی نقش مهمی در ایجاد آلودگی و اپیدمی‌های شدید بازی می‌کند. با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش از آزمون بیماری‌زایی و تجزیه و تحلیل مولکولی آلودگی‌های ایسیومی جمع‌آوری شده از ارتفاعات لرستان، بوته‌های زرشک می‌توانند میزبان واسط زنگ زرد و زنگ سیاه گندم باشند که باعث ایجاد نژادهای جدید فیزیولوژیک با قدرت بیماری‌زایی متفاوت می‌شوند و با شکستن مقاومت ارقام گندم در اپیدمی نقش مهمی داشته باشند. این نتایج می‌تواند اهمیت و نقش مهم بوته‌های زرشک را در اپیدمی‌های زنگ زرد گندم در استان لرستان را مشخص نماید که با توجه به اهمیت اقتصادی محصول گندم می‌تواند تهدید جدی برای مزارع و تولید گندم باشد. یافته‌های این پژوهش می‌تواند جهت انجام تحقیقات بیشتر برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک و بررسی ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی زنگ زرد گندم حائز اهمیت باشد و درک ما را برای توسعه استراتژی‌های موثر در کنترل بهتر این بیماری افزایش دهد.

های متعددی در خصوص بروز بیماری زنگ سیاه از بروجرد وجود دارد که بروز زنگ سیاه در این منطقه سابقه نداشته و غیر معمول ارزیابی شده بود. تنوع ژنتیکی در نمونه‌های ایسیوسپور منطقه الیگودرز نسبتاً پایین ارزیابی شد و اکثر نمونه‌ها الگوی بانندی مشابه‌ای (سه بانندی) را نشان می‌دادند. زیرا میزان و سطح آلودگی بوته‌های زرشک در این منطقه بسیار پایین بود و به دلیل وجود ارتفاعات بالا بسیاری از بوته‌های زرشک فاقد آلودگی ایسیومی بودند. نتایج نشان داد که گونه‌های زرشک این منطقه میزبان زنگ سیاه و زنگ زرد گندم هستند. وجود شرایط آب و هوایی سرد و کوهستانی بودن منطقه با دامنه‌های برف‌گیر و وجود جهت وزش باد غالب جنوبی این نواحی از انتقال اسپور این منطقه با قسمت‌های دیگر نمونه‌برداری شده استان جلوگیری می‌کند. همچنین به دلیل کوهستانی بودن منطقه و عدم وجود کشت‌زارهای گندم در اطراف رویشگاه‌های طبیعی بوته‌های زرشک امکان تبادل ژنی در این منطقه پایین می‌باشد و وجود تنوع در ایسیوسپورها می‌تواند موثر از علف‌های هرز گندمیان باشد که در سایه‌انداز و اطراف بوته‌های زرشک روئیده بودند و به نظر می‌رسد چنین جوامع گیاهی می‌توانند نقش مهمی در تکامل و ایجاد نژادهای جدید زنگ سیاه و زنگ زرد

منابع

- Abbasi, M. 2001. Taxonomic investigation of *Puccinia* species parasitic on Poaceae in Iran. Ph.D. thesis, submitted to Tehran University Karaj 235 p.
- Abbasi, M., Hedjaroude, G., Scholler, M. and Goodwin, S. 2004. Taxonomy of *Puccinia striiformis* sl in Iran. *Rustaniha* 5: 199-224 (in Persian with English Summary).
- Abbasi, M., Hedjaroude, G. A., Ershad, D. and Termeh, F. 2002. On the taxonomy of *Puccinia graminis* Pers. and some remarks on the ecology of the rust in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 38: 71-76 (in Persian with English Summary).
- Afshari, F. 2010. Prevalent pathotypes of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 10: 67-78.
- Alaei, H., Baeyen, S., Maes, M., Höfte, M. and Heungens, K. 2009a. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 76: 136-145.

- Alaei, H., De Backer, M., Nuytinck, J., Maes, M., Höfte, M. and Heungens, K. 2009b. Phylogenetic relationships of *Puccinia horiana* and other rust pathogens of *Chrysanthemum* × *morifolium* based on rDNA ITS sequence analysis. *Mycological Research* 113: 668-683.
- Alaei, H., Mohammadi, A. H. and Dehghani, A. 2012. Molecular characterization of the rDNA-ITS sequence and a PCR diagnostic technique for *Pileolaria terebinthi*, the cause of pistachio rust. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 488-495.
- Autrique, E., Tanksley, S. D., Sorrells, M. E. and Singh, R. P. 1995. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. *Genome* 38: 75-83.
- Chen, X., Line, R. F. and Leung, H. 1993. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathology* 83: 1489-1497.
- Chen, X., Line, R. F. and Leung, H. 1995. Virulence and polymorphic DNA relationships of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* to other rusts. *Phytopathology* 85: 1335-1342.
- Dadrezai, S. T., Lababidi, S., Nazari, K., Goltapeh, E. M., Afshari, F., Alo, F., Shams-Bakhsh, M. and Safaie, N. 2013. Molecular genetic diversity in Iranian populations of *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust. *American Journal of Plant Sciences* 4: 1375.
- De Backer, M., Alaei, H., Van Bockstaele, E., Roldan-Ruiz, I., van der Lee, T., Maes, M. and Heungens, K. 2011. Identification and characterization of pathotypes in *Puccinia horiana*, a rust pathogen of *Chrysanthemum* × *morifolium*. *European Journal of Plant Pathology* 130: 325-338.
- Elahinia, S. 2010. Assessment of urediniospore germination of *Puccinia striiformis* at various temperatures on agar and detached leaves of wheat. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2: 41-47.
- Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes' application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gomez, D. R., Evans, K. J., Harvey, P. R., Baker, J., Barton, J., Jourdan, M., Morin, L., Pennycook, S. R. and Scott, E. S. 2006. Genetic diversity in the blackberry rust pathogen, *Phragmidium violaceum*, in Europe and Australasia as revealed by analysis of SAMPL. *Mycological Research* 110: 423-430.
- Hovmöller, M., Justesen, A. and Brown, J. 2002. Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in north-west Europe. *Plant Pathology* 51: 24-32.
- Hovmöller, M., Walter, S., Bayles, R., Hubbard, A., Flath, K., Sommerfeldt, N., Leconte, M., Czembor, P., Rodriguez-Algaba, J. and Thach, T. 2015. Replacement of the European wheat yellow rust population by new races from the centre of diversity in the near Himalayan region. *Plant Pathology*: DOI: 10.1111/ppa.12433.
- Jennings, J., Newton, A. and Buck, K. 1997. Detection of polymorphism in *Puccinia hordei* using RFLP and RAPD markers, differential cultivars, and analysis of the intergenic spacer region of rDNA. *Journal of Phytopathology* 145: 511-519.
- Jin, Y. 2011. Role of *Berberis* spp. as alternate hosts in generating new races of *Puccinia graminis* and *P. striiformis*. *Euphytica* 179: 105-108.
- Jin, Y., Szabo, L. J. and Carson, M. 2010. Century-old mystery of *Puccinia striiformis* life history solved with the identification of *Berberis* as an alternate host. *Phytopathology* 100: 432-435.
- Kafi, M. and Balandary, A. 2001. *Berberis* : production and processing. Zaban va Adab Press, Mashhad, Iran 209 (in Persian with English Summary).
- Keiper, F. J., Hayden, M. J., Park, R. F. and Wellings, C. R. 2003. Molecular genetic variability of Australian isolates of five cereal rust pathogens. *Mycological Research* 107: 545-556.
- Kim, W., Zerucha, T. and Klassen, G. 1992. A region of heterogeneity adjacent to the 5S ribosomal RNA gene of cereal rusts. *Current Genetics* 22: 101-105.
- Liu, Z., Szabo, L. J. and Bushnell, W. 1993. Molecular cloning and analysis of abundant and stage-specific mRNAs for *Puccinia graminis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 6: 84-84.
- Ma, J., Chen, X., Wang, M. and Kang, Z. 2010. Constructing physical and genomic maps for *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the wheat stripe rust pathogen, by comparing its EST sequences to the genomic sequence of *P. graminis* f. sp. *tritici*, the wheat stem rust pathogen. *Comparative and Functional Genomics* 2009: 1-13.
- Murray, M. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4326.
- Niazmand, A., Abbasi, M., Afshari, F., Rezaee, S. and Hajmansoor, S. 2013. Study of genetic diversity of

- Puccinia triticina* pathotypes, the causal agent of wheat leaf rust in Iran based on rDNA IGS1 sequencing. Iranian Journal of Plant Pathology 49: 157-169 (in Persian with English Summary).
- Rabanihasab, H., Okhovat, M., Abbasi, M., Torabi, M. and Mozafari, J. 2008a. The role of rDNA IGS1 in studying of genetic variability of yellow rust disease agent, *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*. Journal of Plant Protection 22: 61-70 (in Persian with English Summary).
- Rabanihasab, H., Okhovat, M., Torabi, M., Abbasi, M. and Mozafari, J. 2008b. Virulence and molecular diversity in *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* from Iran. Journal of Plant Protection 22: 47-60 (in Persian with English Summary).
- Rodriguez-Algaba, J., Walter, S., Sørensen, C. K., Hovmøller, M. S. and Justesen, A. F. 2014. Sexual structures and recombination of the wheat rust fungus *Puccinia striiformis* on *Berberis vulgaris*. Fungal Genetics and Biology 70: 77-85.
- Roose-Amsaleg, C., De Vallavieille-Pope, C., Brygoo, Y. and Levis, C. 2002. Characterisation of a length polymorphism in the two intergenic spacers of ribosomal RNA in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat yellow rust. Mycological Research 106: 918-924.
- Safavi, S. A. 2015. Effects of yellow rust on yield of race-specific and slow rusting resistant wheat genotypes. Journal of Crop Protection 4: 395-408 (in Persian with English Summary).
- Safavi, S. A. and Afshari, F. 2012. Identification of resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in some elite wheat lines. Journal of Crop Protection 1: 293-302 (in Persian with English Summary).
- Simon, U. K. and Weiß, M. 2008. Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. Molecular Biology and Evolution 25: 2251-2254.
- Sinclair, J. B. and Dhingra, O. D. 1995. Basic plant pathology methods. 2nd ed., CRC Press. USA. 434 p.
- Singh, R. P., Hodson, D. P., Huerta-Espino, J., Jin, Y., Bhavani, S., Njau, P., Herrera-Foessel, S., Singh, P. K., Singh, S. and Govindan, V. 2011. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. Annual Review of Phytopathology 49: 465-481.
- Singh, R. P., Hodson, D. P., Jin, Y., Lagudah, E. S., Ayliffe, M. A., Bhavani, S., Rouse, M. N., Pretorius, Z. A., Szabo, L. J. and Huerta-Espino, J. 2015. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: Continued threat to food security and prospects of genetic control. Phytopathology 105: 872-884.
- Steele, K., Humphreys, E., Wellings, C. and Dickinson, M. 2001. Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* by use of molecular markers. Plant Pathology 50: 174-180.
- Szabo, L. J. and Kolmer, J. A. 2007. Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus *Puccinia triticina*. Molecular Ecology Notes 7: 708-710.
- Tiwari, U. L., Adhikari, B. S. and Rawat, G. S. 2012. A checklist of berberidaceae in Uttarakhand, Western Himalaya, India. Check List 8: 610-616.
- Wang, M. and Chen, X. 2015. Barberry does not function as an alternate host for *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the US Pacific Northwest due to teliospore degradation and barberry phenology. Plant Disease 99:1500-1506.
- Wang, M. N., Wan, A. M. and Chen, X. M. 2015a. Barberry as alternate host is important for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* but not for *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the U.S. Pacific Northwest. Plant Disease 99: 1507-1516.
- Wang, Y., Hao, B., Zhang, Q., Tuo, E., Sun, G., Zhang, R., Jin, S., Zhu, M., Wang, Y. and Hsiang, T. 2012. Discovery of multiple IGS haplotypes within genotypes of *Puccinia striiformis*. Fungal Biology 116: 522-528.
- Wang, Z., Zhao, J., Chen, X., Peng, Y., Ji, J., Zhao, S., Lv, Y., Huang, L. and Kang, Z. 2015b. Virulence variations of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* isolates collected from *Berberis* spp. in China. Plant Disease: PDIS-12-14-1296-RE.
- Wolters, J. and Erdmann, V. A. 1988. Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. Nucleic Acids Research 16: r1-r70.
- Zhao, J., Wang, L., Wang, Z., Chen, X., Zhang, H., Yao, J., Zhan, G., Chen, W., Huang, L. and Kang, Z. 2013. Identification of eighteen *Berberis* species as alternate hosts of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and virulence variation in the pathogen isolates from natural infection of barberry plants in China. Phytopathology 103: 927-934.