بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۶ / شماره ۲ / سال ۱۳۹۹: ۱۹۳-۲۰۵
DOI: 10.22034/ijpp.2020.46905

مقاله پژوهشی

تعیین تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های قارچ *Pyrenophora graminea*، عامل لکه نواری جو در شمال غرب ایران

بیتا باباخانی[۱]، عبداله احمدپور[۲] و محمد جوان نیکخواه[۱*]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۳)

چکیده

لکه نواری جو با عامل *Pyrenophora graminea* یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های جو محسوب می‌شود. در طی سال زراعی ۱۳۹۵، ۱۲۱ جدایه *P. graminea* از مزارع جو استان‌های آذربایجان‌غربی (میاندوآب)، آذربایجان‌شرقی (میانه)، اردبیل (برجلو) و زنجان (خرمدره) جداسازی شد. پس از شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌ها با آغازگرهای اختصاصی گونه، آغازگرهای تیپ آمیزشی بر اساس نواحی منطقه حفاظت شده α از ایدیومورف *MAT-1* و منطقه HMG از ایدیومورف *MAT-2* طراحی گردید و فراوانی ایدیومورف-های تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های *P. graminea* به روش Multiplex PCR مورد مطالعه قرار گرفت. از مجموع ۱۲۱ جدایه، ٥٦ جدایه دارای تیپ آمیزشی *MAT-1* و ٦٥ جدایه دارای تیپ آمیزشی *MAT-2* در کل جمعیت‌ها بودند. در بین شش جمعیت مورد آزمایش، در جمعیت-های خرمدره مزرعه (۱) و میاندوآب به ترتیب جدایه‌هایی با تیپ آمیزشی *MAT-1* و *MAT-2* از فراوانی بیشتری برخوردار بودند. با توجه به نتایج آزمون کای اسکوئر (X^2)، جمعیت‌های میانه، اردبیل (مزرعه ۱ و ۲) و خرمدره مزرعه (۲) نسبت به جمعیت‌های میاندوآب و خرمدره مزرعه (۱)، فاقد اختلاف معنی‌داری بودند. بنابراین، به نظر می‌رسد چهار جمعیت مربوطه دارای پتانسیل تولیدمثل جنسی بالاتری نسبت به جمعیت‌های میاندوآب و خرمدره مزرعه (۱) باشند. به علاوه، جدایه‌ها از همه جمعیت‌ها جهت ارزیابی وضعیت باروری جنسی آنها از طریق تلاقی متقابل با تیپ‌های آمیزشی مخالف مورد بررسی قرار گرفتند. پس از گذشت شش ماه سودوتسیوم‌ها تشکیل گردید اما فاقد آسک و آسکوسپور بالغ بودند.

کلیدواژه: ***Hordeum vulgare***، ایدیومورف، طراحی آغازگر، تولیدمثل جنسی، آسکوکارپ

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jnikkhah@ut.ac.ir

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. استادیار، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ایران.

Determination of mating type idiomorphs of *Pyrenophora graminea* isolates, the causal agent of barley leaf stripe in northwest of Iran

B. Babakhani[1], A. Ahmadpour[2], and M. Javan-Nikkhah[1*]

(Received: 17.4.2020; Accepted: 2.6.2020)

Abstract

Barley leaf stripe caused by the fungus *Pyrenophora graminea*, is one of the most important and devastating barley diseases in Iran. A total of 121 *P. graminea* isolates was recovered from cultivated barley in West Azerbaijan (Miyandoab region), East Azerbaijan (Miyaneh region), Ardebil (Ardebil region) and Zanjan (Khorramdareh region) provinces in 2016. After morphological and molecular identification, mating type primers were designed based on a conserved DNA binding (alpha domain) in *MAT-1* and the high mobility group (HMG) domain in *MAT-2*. Frequency of mating type idiomorphs of *P. graminea* isolates were done by Multiplex PCR. Among 121 isolates, 56 isolates amplified by MAT-1 primer and 65 isolates by MAT-2 primer. Frequencies of two mating types in Khorramdareh (1) and Miyandoab populations had an excess of the *MAT-1* and *MAT-2* alleles, respectively. According to the results of the Chi-square test (X^2), Miyaneh, Ardebil (1 and 2) and Khoramdareh (2) populations had not significant difference in compared with Khorramdareh (1) and Miyandoab populations. Therefore, these four populations have the highest potential for sexual reproduction than the two populations of Miyandoab and Khorramdareh (1). In addition, isolates from all of the populations were studied to evaluate the sexual fertility through directed crossing with opposite mating types. After six months, pseudothecia formed in media without mature asci and ascospores.

Keywords: ***Hordeum vulgare*, idiomorphs, Primer designing, Sexual reproduction, Ascocarp**

*Corresponding author's E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir
1. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Higher Education Center Shahid Bakeri Miyandoab, Urmia University

مقدمه

جنس *Pyrenophora* Fr. یک جنس تک نیایی بوده و در راسته Pleosporales و تیره Pleosporaceae قرار دارد. از این جنس تاکنون ۲۱۳ گونه و از فرم غیرجنسی آن *Drechslera* S. Ito، ۱۳۹ گونه در سایت Index Fungorum به ثبت رسیده است (www.indexfungorum org.). گونه‌های جنس *Pyrenophora* معمولا جزو بیمارگرهای گیاهی بوده و باعث خسارت در گیاهان گرامینه ای می‌شوند و عمدتاً به فرم غیرجنسی در طبیعت موجب بیماری می‌گردند (Ariyawansa *et al.* 2014, Si *et al.* 2019). بیماری لکه نواری جو با عامل *Pyrenophora graminea* S. Ito & Kurib. در بسیاری از مناطق جهان مثل شمال آفریقا، آسیا، استرالیا، اروپا و جنوب شرقی آمریکا خسارت شدید به بار می‌آورد (Mathre 1997). در ایران، این بیماری از استان‌های تهران، خوزستان، مازندران، اردبیل، آذربایجان غربی و شرقی، ایلام، لرستان و همدان گزارش شده است (Babadoost 1998, Patpour *et al.* 2006, Dokhanchi *et al.* 2020). لکه نواری جو، تا سال ۱۹۱۳ میلادی یک بیماری ناشناخته بود که بعداً توسط گوسو در کانادا گزارش گردید (Gussow 1913). به علاوه، عامل بیمارگر از روی گندم، چاودار، چچم، جوی دوسر، جوی وحشی و تعدادی از گیاهان گرامینه دیگر نیز گزارش شده است (Farr & Rossman 2020).

قارچ *P. graminea* یک گونه هتروتال بوده و برای تولیدمثل جنسی نیازمند هر دو تیپ آمیزشی می‌باشد (Rau *et al.* 2007). قارچ عامل بیماری به صورت غیرجنسی تکثیر می‌یابد و فرم جنسی آن فقط در دانمارک در سال ۱۹۷۲ در بقایای باقی مانده محصول (کلش) مشاهده گردیده است (Smedgard-Petersen 1978). یکی از نیروهای تکاملی موثر بر ژنتیک جمعیت قارچ‌ها نوترکیبی جنسی می‌باشد. نوترکیبی جنسی طی فرآیند تولیدمثل جنسی بین دو هسته هاپلوئید که تشکیل یک هسته دیپلوئید به نام زیگوت را می‌دهند، رخ می‌دهد. این پدیده باعث بروز ژنوتیپ‌های جدید و افزایش سطح تنوع ژنتیکی در یک جمعیت می‌گردد. سیستم آمیزشی در ارتباط با تولیدمثل جنسی مطرح می‌باشد و می‌تواند به صورت دگرباروری (Outcrossing) منجر به ایجاد ترکیبات جدید از ژن طی تولیدمثل جنسی گشته و یا از طریق خودباروری (Inbreeding) موجب حفظ ترکیب ژنتیکی قدیمی گردد و یا مخلوطی از هر دو سیستم بروز نماید. سیستم آمیزشی روی تنوع ژنوتیپی تأثیر می‌گذارد ولی الزاماً بر روی تنوع فنوتیپی تأثیرگذار نیست (Milgroom 1996, 2015, McDonald & Linde 2002 a, b). با این حال، نقش مرحله جنسی و آسکوسپورها در زیست‌شناسی قارچ عامل بیماری لکه نواری جو ناشناخته مانده است (Smedgard-Petersen 1978, Rau *et al.* 2007, Si *et al.* 2019, Dokhanchi *et al.* 2020).

رائو و همکاران (Rau *et al.* 2007) روی تیپ‌های آمیزشی *P. teres* Drechsler (عامل لکه توری جو) و *P. graminea* بصورت ترکیبی و ارتباط بین دو گونه مطالعاتی بر اساس استرین‌های موجود از کانادا، آلمان، استرالیا، ایتالیا، چین و تونس انجام دادند. ساختار مکان ژنی هر دو ایدیومورف *MAT* در قارچ *P. graminea* تقریبا مشابه *P. teres* f. *maculata* است (Rau *et al.* 2007). این ارتباط نزدیک به وسیله درجه بالایی از شباهت (بیش از ۹۸ درصد) مشاهده شده در تمام قسمت-های هر دو منطقه رمزدهنده و غیر رمزدهنده مکان ژنی تائید شده است. با این حال، علیرغم شباهت چشمگیر این

دو گونه، برخی تفاوت‌های نوکلئوتیدی بین *P. graminea* و *P. teres* f. *teres* در مناطق رمزدهنده مکان ژنی یافت شد. فیکسور و همکاران (Ficsor *et al.* 2014) روی گونه های مختلف *Pyrenophora* در مجارستان مطالعه کردند و تیپ‌های آمیزشی مربوط به گونه‌های *P. graminea*، *P. teres* f. *teres* و *P. teres* f. *maculata* را ردیابی گردید.

تعیین وضعیت باروری و تیپ‌های آمیزشی موجود در جمعیت قارچ عامل لکه نواری جو در یک منطقه می‌تواند بیانگر تنوع ژنتیکی قارچ در منطقه بوده و امکان وقوع نوترکیبی ژنتیکی را از طریق تولیدمثل جنسی مشخص نماید. در پژوهش حاضر، آغازگرهای اختصاصی برای تعیین تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های قارچ *P. graminea* طراحی گردید و شرایط واکنش برای انجام یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بهینه‌سازی و توزیع تیپ‌های آمیزشی تعیین گردید. همچنین امکان القای مرحله جنسی این قارچ در شرایط آزمایشگاه از طریق تلاقی متقابل با تیپ‌های آمیزشی مخالف بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و جداسازی جدایه‌های قارچی

نمونه‌برداری از مزارع جو در استان‌های آذربایجان غربی (میاندوآب)، آذربایجان شرقی (میانه)، اردبیل (برجلو)، زنجان (خرمدره) در سال زراعی ۱۳۹۵ به روش سلسله مراتبی انجام شد (McDonald *et al.* 1999, Linde *et al.* 2002). از برجلو و خرمدره دو مزرعه و میاندوآب و میانه یک مزرعه آلوده به بیماری انتخاب شدند. در این روش، از ۶-۸ محل داخل مزرعه که حدود ۱۰ متر با همدیگر فاصله داشتند، نمونه‌برداری صورت گرفت. در هر محل نمونه‌برداری، ۴-۸ گیاه آلوده با فاصله حدود یک متر از یکدیگر انتخاب گردید و از هر کدام یک نمونه برگی دارای علایم بیماری لکه نواری جمع‌آوری شد. در واقع، هر جدایه نماینده یک گیاه آلوده در مزارع مذکور می‌باشد. اندام‌های گیاهی جمع‌آوری شده هر کدام در پاکت‌های کاغذی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت جداسازی قارچ، ابتدا بخش‌هایی از بافت‌های آلوده زیر جریان ملایم شیر آب به مدت ده دقیقه شسته شد و به مدت یک دقیقه در محلول رقیق شده هیپوکلریت سدیم (فرم تجاری) یک درصد (نیم درصد کلر فعال) ضد عفونی سطحی گردیدند. پس از رطوبت‌گیری نمونه‌ها توسط کاغذ صافی سترون، قطعات تقریبی به اندازه یک سانتی مترمربع از قسمت‌های آلوده به همراه نواحی سالم بافت گیاهی به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های کشت آب-آگار (WA) دو درصد (۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) و سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) (۴۰ گرم PDA تجاری شرکت مرک در یک لیتر آب مقطر) و دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل گردیدند. قارچ‌های رشد کرده روی محیط کشت WA دو درصد به روش تک اسپور خالص‌سازی شدند. برای نگهداری جدایه‌ها، از روش کاغذ صافی سترون و لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت PDA استفاده شد. در مجموع ۱۲۱ جدایه از استان‌های آذربایجان‌غربی، آذربایجان‌شرقی، اردبیل و زنجان در سال زراعی ۱۳۹۵ جداسازی و خالص‌سازی گردیدند.

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌های گونه *Pyrenophora graminea*

جهت بررسی خصوصیات ریخت‌شناختی و میکروسکوپی جدایه‌ها، قرص‌هایی به قطر پنج میلی متر از حاشیه در حال رشد پرگنه‌های مربوط به هر جدایه برداشته شد و به تشتک‌های حاوی محیط‌های کشت PDA، TWA

(Tap Water Agar+wheat straw) (آب شیر شهری و ۱۵-۲۰ گرم آگار حاوی ۳-۴ قطعه کاه سترون گندم)، V8 (V8 juice:150 ml, PDA:10 gr, Caco3: 3 gr, Agar:10 gr) و BSEDA (Barley Straw Extract Dextrose Agar medium) (کاه و کلش به مقدار ۵۰ گرم+۲۰ گرم دکستروز+۲۰گرم آگار+قطعات کاه و کلش ۵ سانتی‌متری) منتقل گردید. تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA تحت شرایط تاریکی (جهت بررسی ریخت‌شناسی پرگنه جدایه-ها) و تشتک‌های حاوی محیط‌های کشت TWA، V8 و BESA تحت شرایط NUV (Near Ultra Violet) متناوب (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شد و به مدت ۱۴-۱۰ روز نگهداری گردید (Sivanesan 1987). صفات مورد مطالعه شامل رنگ پرگنه، مشخصات کنیدیوم‌برها و کنیدیوم‌ها بود. حداقل ۵۰ عدد از هر کدام از اندام‌های زایشی قارچ (کنیدیوم‌بر و کنیدیوم) در چند نمونه میکروسکوپی بررسی و اندازه‌گیری شدند. نمونه‌های میکروسکوپی با بهره‌گیری از منابع معتبر (Ellis 1971, Sivanesan 1987, Ariyawansa *et al.* 2014; Marin-Felix *et al.* 2019) شناسایی و تعیین نام گردید. برای استخراج DNA، از روش ژانگ و استفنسون (Zhong & Steffenson 2001) استفاده شد.

برای شناسایی مولکولی جدایه‌های *P. graminea* از دیگر گونه‌های این جنس از جفت آغازگرهای اختصاصی PG2F (5'-CTTCTTAGCTGGGGCTACCGTC-3') و PG2R (5'-ACCGACTCGGGAAAAGAGCA-3') که توسط تیلور و همکاران (Taylor *et al.* 2001) طراحی شده بود استفاده شد. این جفت آغازگر قطعه‌ای به طول ۴۳۵ جفت باز را به صورت اختصاصی از جدایه‌های *P. graminea* تکثیر می‌نماید. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز (PCR) به مقدار ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس آماده (Taq 2X master mix Red 1.5 Mm, Amplicon company, Denmark) و حدوداً ۱۰ نانوگرم DNA و آب دیونیزه استریل تهیه گردید. تکثیر نواحی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر MJ Research (مدل PTC-200) و با اعمال حرارت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۸ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. پس از تکثیر ناحیه مورد نظر، محصول PCR در ژل آگارز یک درصد همراه با نشانگر اندازه DNA (Gene Ruler^{TM} DNA Ladder Mix) عبور داده شد، سپس با استفاده از دستگاه Gel Documentation مدل (B & L System) IMAGO عکسبرداری شد.

تعیین تیپ‌های آمیزشی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

تکثیر نواحی منطقه حفاظت شده α از ایدیومورف *MAT-1* و منطقه HMG از ایدیومورف *MAT-2* به ترتیب با استفاده از جفت آغازگرهای PgMAT1 و جفت آغازگرهای PgMAT2 انجام شد. آغازگرهای PgMAT1F (5'-TTAGCCACGCAACAAGCTGA-3') و PgMAT 1R (5'-ACTGGTGAAAGTCCTCGCTC-3') به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس مربوط به ایدیومورف *MAT-1* و آغازگرهای PgMAT2F (5'-GGACAGCCTTCCGCTTCTTT-3') و PgMAT2R (5'-TGTTCCAAGGCATGTTCCGA-3') به ترتیب

به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس مربوط به ایدیومورف *MAT-2* در روش Multiplex PCR طراحی و استفاده شدند. طراحی آغازگرهای مذکور به کمک Primer-Blast (Yeh *et al.* 2012) در سایت بانک ژن (NCBI) از روی ایدیومورف‌های *MAT-1* (شماره دسترسی DQ823062) و *MAT-2* (شماره دسترسی DQ823078) طراحی گردیدند. آغازگرهای مذکور توسط شرکت متابیون (Metabion Corp.) آلمان سنتز شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به صورت Multiplex PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس آماده (Taq 2X master mix Red 1.5 Mm, Amplicon company, Denmark)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۰/۵ پیکومول)، حدود ۱۰ نانوگرم DNA و آب دیونیزه سترون انجام گردید. تکثیر نواحی با اعمال حرارت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از تکثیر ناحیه مورد نظر، محصول PCR در ژل آگارز یک درصد همراه با نشانگر اندازه DNA (Gene Ruler^{TM} DNA Ladder Mix) عبور داده شد. فراوانی تیپ‌های آمیزشی در هر جمعیت محاسبه شد و با استفاده از آزمون کای اسکویر (χ^2)، انحراف نسبت فراوانی مشاهده شده از نسبت فراوانی مورد انتظار در صورت وقوع تولیدمثل جنسی (نسبت ۱:۱) محاسبه گردید.

آزمون تلاقی جنسی جدایه‌ها

بعد از تعیین تیپ آمیزشی هر جدایه به روش Multiplex PCR، جدایه‌ها با تیپ آمیزشی مخالف در مقابل یکدیگر کشت گردیدند. برای مشاهده فرم جنسی و بررسی وضعیت باروری جنسی جدایه‌های قارچ *P. graminea* از محیط کشت ساکس-آگار (Sack`s Agar) استفاده شد (Smedgard-Petersen 1978). این محیط کشت شامل ۱ گرم KNO_3، ۰/۵ گرم $Ca_3 (PO_4)_2$، ۰/۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۵ گرم NaCl، $FeCl_3$ به میزان جزئی (trace) و ۱۲ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر می‌باشد. بعد از تهیه محیط کشت، یک قطعه کاه جو سترون به طول ۵-۴ سانتی متر در مرکز تشتک‌های پتری قرار داده شد و در دو طرف آن دو قطعه برگ (به اندازه ۳-۴ سانتی متر) جو نیز قرار گرفت. یک قرص میسلیومی از حاشیه پرگنه هفت روزه رشد کرده بر روی محیط PDA برداشته شده و به صورت دو به دو در دو طرف کاه و برگ به فاصله مساوی از آن‌ها کشت گردیدند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۴ درجه سلسیوس تحت شرایط تاریکی و به مدت ۶-۸ ماه نگهداری شدند.

نتایج

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌ها

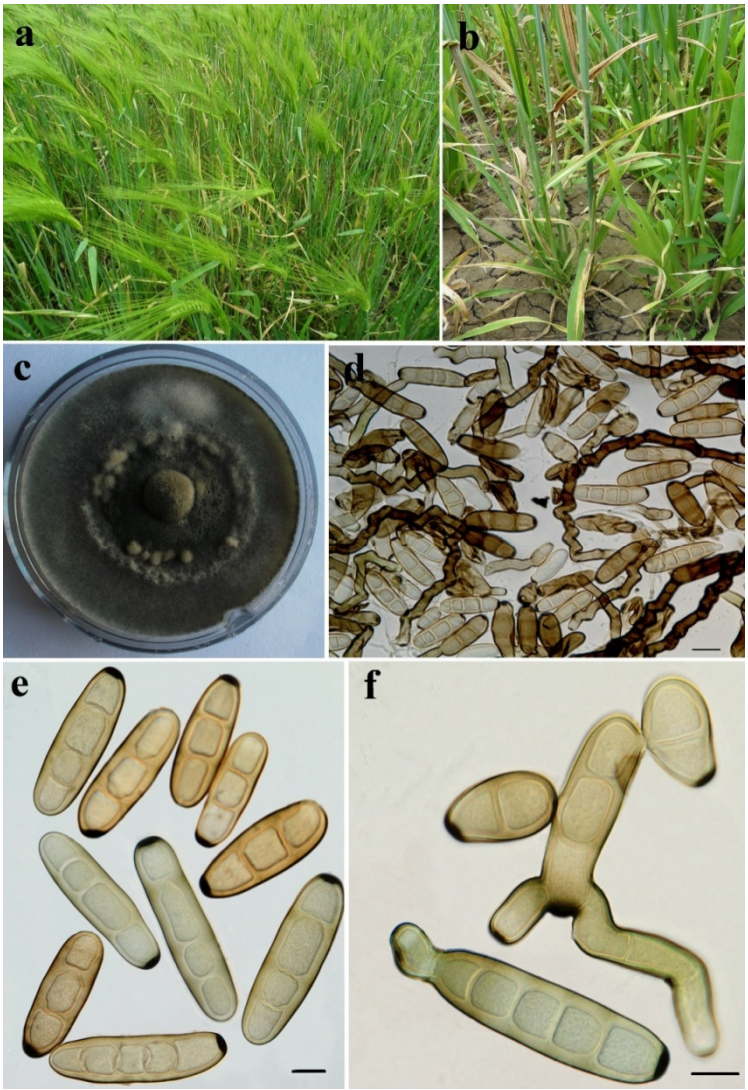
در این بررسی ۱۲۱ جدایه *P. graminea* از نمونه‌های جو دارای علائم بیماری لکه نواری جداسازی گردید (جدول ۱) (شکل ۱). مشخصات میکروسکوپی جدایه‌های به دست آمده، با مشخصات گونه *P. graminea* مطابقت داشت (Sivanesan 1987). پرگنه قارچ به رنگ سفید یا خاکستری روشن مشاهده شدند. کنیدیوم‌برها مستقیم و در انتها زانویی بوده که به صورت گروهی تشکیل می‌شوند و به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره با سلول پایه متورم بوده و تا طول ۲۲۰ و عرض ۹-۶ میکرومتر می‌باشند. کنیدیوم‌ها راست و بندرت اندکی خمیده، استوانه‌ای یا

جدول ۱. نسبت ***MAT-1*:*MAT-2*** در جدایه‌های ***Pyrenophora gramiane*** جمع‌آوری شده از مزارع جو در مناطق شمال غرب ایران

Table 1. *MAT-1/MAT-2* ratio in *Pyrenophora graminea* isolates from barley fields in northwest of Iran

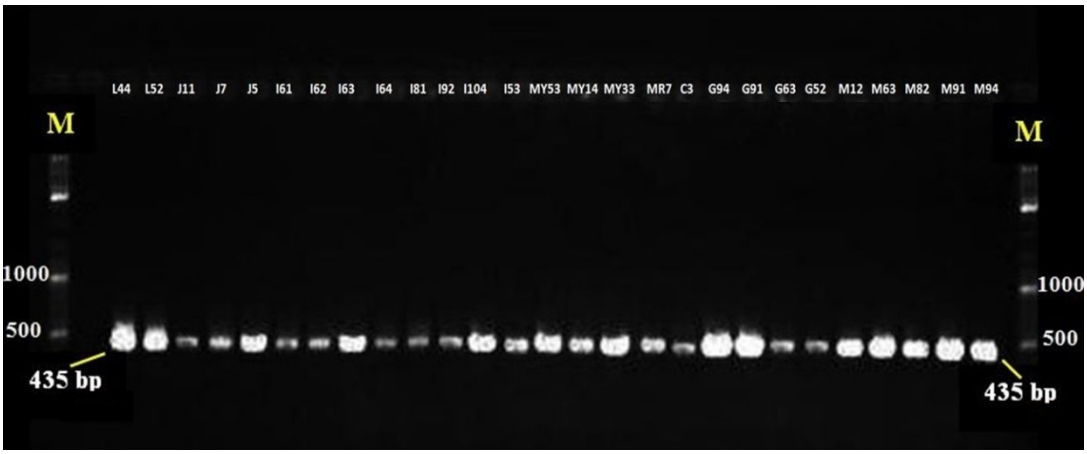
Sampling location	No. of isolates	*MAT-1*:*MAT-2* ratio	$\chi^{2\,a}$
Miyandoab (West Azarbaijan province)	24	4:20	10.67**
Miyane (East Azarbaijan province)	10	5:5	0
Ardabil Field 1 (Ardabil province)	22	13:9	0.73
Ardabil Field 2 (Ardabil province)	14	5:9	1.14
Khorramdareh Field 1 (Zanjan province)	32	22:10	4.5*
Khorramdareh Field 2 (Zanjan province)	19	7:12	1.31
Total	121	56:65	0.67

a: χ^2 value based on 1:1 ratio and 1 degree of freedom; (*) and (**): Statistical significance different at level of 0.05 and 0.01, respectively.



شکل ۱. ***Pyrenophora graminea***. a-b) علایم بیماری لکه نواری جو در مزرعه، c) رنگ پرگنه، d) کنیدیوم‌برها، e-f) کنیدیوم‌ها (مقیاس d = ۲۰ میکرومتر، e-f = ۱۰ میکرومتر).

Fig 1. *Pyrenophora graminea*: a-b) disease symptoms in field, c) colony color, d) conidiphores, e-f) conidia (Bars d = 20 µm, e-f = 10 µm).



شکل ۲. الگوی باندهای تکثیر شده با جفت آغازگر اختصاصی PG2F/PG2R به درازای ٤٣٥ جفت باز در ژل آگارز یک درصد برای جدایه‌های *Pyrenophora graminea*. اعداد بالای شکل جدایه‌های مختلف قارچ هستند. M: نشانگر اندازه 1Kb DNA Ladder.

Fig 2. Pattern of amplified bands in *Pyrenophora graminea* isolates with specific primer PG2F/PG2R (435 bp) in 1% agarose gel. Numbers above the figure are fungus isolates (M: 1Kb DNA Ladder).

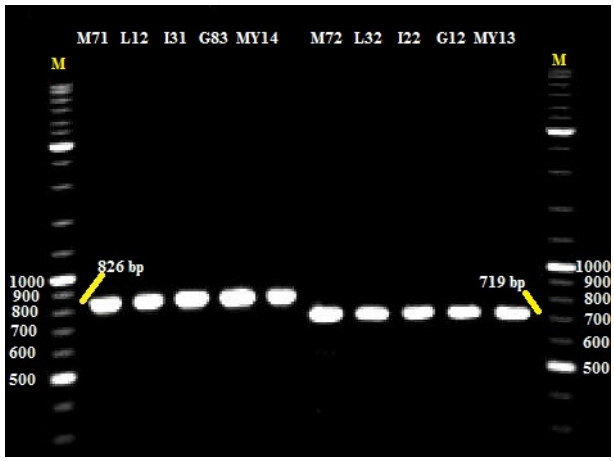
بیضوی، در دو انتها گرد، به رنگ قهوه‌ای روشن و به صورت منفرد یا زنجیری تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها دارای ۶-۱ دیواره عرضی کاذب بوده و با ابعاد ۲۱-۱۲ × ۷۸-۴۵ میکرومتر اندازه‌گیری شدند. این گونه دارای کنیدیوفور ثانویه می‌باشد (شکل ۱). نزدیک‌ترین گونه به *P. graminea* گونه *P. teres* می‌باشد. گونه اخیر به دلیل عدم تولید زنجیر کنیدیومی و داشتن کنیدیوم‌های دراز (تا ۱۲۰ میکرومتر) از *P. graminea* متمایز می‌گردد (Sivanesan 1987).

برای شناسایی مولکولی جدایه‌های *P. graminea* از دیگر گونه‌های جنس *Pyrenophora* و تایید شناسایی ریخت‌شناختی از جفت آغازگرهای اختصاصی PG2F و PG2R استفاده شد (Taylor *et al.* 2001). جفت آغازگر PG2F/PG2R قطعه‌ای به درازای ۴۳۵ جفت باز از جدایه‌های *P. graminea* تکثیر نمودند (شکل ۲). بدین ترتیب هویت جدایه‌های *P. graminea* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی و شناسایی ریخت‌شناختی تایید شد.

آغازگرهای مذکور براساس نشانگر مولکولی RAPD ('Random Amplification of Polymorphic DNA) طراحی شده‌اند (Taylor *et al.* 2001). براساس مطالعات تیلور و همکاران (Taylor *et al.* 2001) و دخانچی و همکاران (Dokhanchi *et al.* 2020)، آغازگرهای مذکور در سایر گونه‌های نزدیک (*P. teres* f. *teres*، *P. teres* f. *maculata*، *P. tritici-repentis* و *P. avenae*) به گونه *P. graminea* و جنس‌ها (*Alternaria*، *Bipolaris* و غیره) آزمایش شده است و تنها در جدایه‌های *P. graminea* تکثیر صورت می‌گیرد.

ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در جمعیت‌های قارچ

جفت آغازگر PgMAT1 قطعه‌ایی به درازای ۸۲۶ جفت باز و جفت آغازگر PgMAT2 قطعه ای به درازای ۷۱۹ جفت باز را به ترتیب برای ایدیومورف های *MAT-1* و *MAT-2* تکثیر کردند (شکل ۳). برای هر جدایه، باند DNA اختصاصی هر ایدیومورف تکثیر گردید و در هیچ



شکل ۳. الگوی باندهای تیپ‌های آمیزشی تکثیر شده در جدایه‌های *Pyrenophora graminea* با جفت آغازگرهای اختصاصی PgMAT-1 و PgMAT-2 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ایدیومورفهای تیپ‌های آمیزشی *MAT-1* و *MAT-2* به ترتیب ۸۲۶ جفت باز و ۷۱۹ جفت باز تکثیر گردید. اعداد بالای شکل جدایه‌های قارچ هستند. M: نشانگر اندازه 1Kb DNA Ladder.

Fig 3. Pattern of mating type amplicons in *Pyrenophora graminea* isolates amplified with specific MAT-1 and MAT-2 primers in 1.5% agarose gel. *MAT-1* and *MAT-2* idiomorphs amplified 826 and 719 bp, respectively. Numbers above the figure are fungus isolates (M: 1Kb DNA Ladder).

یک از آن‌ها هر دو باند به طور همزمان مشاهده نشد. تعداد جدایه‌ها و تیپ‌های آمیزشی *MAT-1* و *MAT-2* در سال ۱۳۹۵ در جدول ۱ نشان داده شده است. در آذربایجان شرقی (شهرستان میانه)، اردبیل (مزرعه ۱ و ۲) و خرمدره مزرعه ۲ هر دو تیپ آمیزشی با فراوانی تقریبا یکسان در سطح مزرعه مشاهده گردید. جدایه‌هایی با تیپ آمیزشی *MAT-1* (۲۲ جدایه از ۳۲ جدایه) در جمعیت خرمدره مزرعه ۱ از فراوانی بیشتری در مقایسه با جدایه‌هایی با تیپ آمیزشی *MAT-2* (۱۰ جدایه) برخوردار بودند. در میاندوآب نیز جدایه‌هایی با تیپ آمیزشی *MAT-2* (۲۰ جدایه از ۲۴ جدایه) فراوانی بیشتری داشتند. در مجموع، نسبت تیپ آمیزشی *MAT-1*/*MAT-2* ۵۶:۶۵ (۱۲۱ جدایه) برای کل جدایه‌های آزمایش شده در این پژوهش به دست آمد (جدول ۱). حضور هر دو تیپ آمیزشی در یک مزرعه شانس تشکیل مرحله جنسی را افزایش می‌دهد که در جمعیت‌های میانه، اردبیل (مزرعه ۱ و ۲) و خرمدره (مزرعه ۲) با فراوانی نزدیک مشاهده شد و نتایج حاصل از آزمون کای اسکویر (χ^2) مشخص شد که نسبت فراوانی مشاهده شده از نسبت فراوانی مورد انتظار در صورت وقوع تولیدمثل جنسی انحراف نشان نمی‌دهند و نسبت تیپ‌های آمیزشی در این جمعیت‌ها ۱:۱ می‌باشد (جدول ۱).

نتایج آزمون تلاقی جدایه‌ها

بعد از تعیین تیپ آمیزشی هر جدایه با استفاده از واکنش Multiplex PCR، جدایه‌هایی با تیپ آمیزشی مخالف در مقابل یکدیگر در محیط کشت ساکس-آگار کشت گردیدند. پس از گذشت یک ماه، آسکوکارپ‌های سودوتسیومی اولیه روی کاه و کلش در محیط ساکس-آگار تشکیل شدند. اما سودوتسیوم‌ها بعد از گذشت ۶-۸ ماه بالغ نگردیدند و فاقد ساختارهای آسک و آسکوسپور بودند.

بحث

در این پژوهش، از تکنیک Multiplex PCR و آغازگرهای طراحی شده (MAT1F/R و MAT2F/R) برای مطالعه و تعیین دقیق‌تر و سریع‌تر تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های *P. graminea* از جو استفاده گردید. با توجه به هتروتال بودن قارچ مورد بررسی، وقوع تولیدمثل جنسی مستلزم حضور هر دو تیپ آمیزشی می‌باشد. در این پژوهش، هر دو تیپ آمیزشی در جمعیت‌های *P. graminea* ردیابی و شناسایی گردید. فراوانی ایدیومورف-

های تیپ آمیزشی ۱۲۱ جدایه از شش جمعیت میانـدوآب، میانه، خرمـدره (مزرعـه ۱ و ۲) و اردبیـل (مزرعـه ۱ و ۲) مورد بررسی قرار گرفت. هر دو تیپ آمیزشی در جمعیت‌های مزرعه‌ای جو به جز جمعیت‌های مزرعه‌ای میانـدوآب و خرمدره ۱ با فراوانی نزدیک مشاهده گردید (جـدول ۱). در جمعیت‌های مزرعه‌ای خرمدره ۱ و میاندوآب به ترتیب تیپ‌های آمیزشی *MAT-1* و *MAT-2* بیشتر بود و از نسبت ۱:۱ انحراف نشان دادند. در جمعیت میانه فراوانـی هـر دو تیپ آمیزشی برابر بود. با وجود فراوانی تقریبا نزدیـک هـر دو تیپ آمیزشی در برخی مناطق، می‌توان انتظار داشت کـه تشکیل تولیدمثل جنسی در قارچ *P. graminea* در شـرایط مزرعـه‌ای در ایـران محتمـل اسـت. مطالعـات دخـانچی و همکاران (Dokhanchi *et al.* 2020) نشان داد کـه هـر دو تیپ آمیزشی در جدایه‌های قارچ از مزارع جو (مزارع دیم، آبی و جوهای زمستانه و بهاره) استان آذربایجان شرقی بـه نسبت مساوی وجود دارند و در سطح یک برگ، مزرعـه و منطقه ردیابی گردیدنـد. در مطالعـه دخـانچی و همکـاران (Dokhanchi *et al.* 2020) از آغازگرهای اختصاصی گونه *P. teres* (Rau *et al.* 2005) جهـت ردیـابی تیـپ‌هـای آمیزشـی قـارچ *P. graminea* اسـتفاده شـده اسـت و آغازگرهای مذکور قادر به تمایز ایـن دو گونـه از یکـدیگر نبودنـد. در تحقیـق حاضـر، آغازگرهـای طراحـی شـده اختصاصی تیپ‌های آمیزشی گونه *P. graminea* می‌باشـند و در جستجوی بانک ژن قادر به تکثیر تیپ‌هـای آمیزشـی گونـه نزدیـک *P. teres* نبودنـد (داده‌هـا نشـان داده نشـده است). به دلیل عدم دسترسی به گونه اخیـر، امکـان انجـام آزمایش PCR وجود نداشت. آغازگرهای طراحی شـده در تحقیق حاضر می‌توانند در مطالعات ژنتیک جمعیـت قـارچ *P. graminea* مورد استفاده قرار گیرند.

فیکسـور و همکـاران (Ficsor *et al.* 2014) تیـپ‌هـای آمیزشی مربـوط بـه گونـه‌هـای *P. graminea*، *P. teres* f. *teres* و *P. teres* f. *maculata* در مجارسـتان را بررسـی کردنـد. در بـین سـه قـارچ، فراوانـی قـارچ *P. graminea* پایین‌تر بوده، که دلیل آن می‌تواند استفاده از قارچکش‌هـای پوششی بذر باشد که موجب کاهش سیستمیک شدن قـارچ در میزبان می‌گردد. نسبت ایدیومورف *MAT-1* به *MAT-2* در *P. graminea*، *P. teres* f. *maculata* و *P. teres* f. *teres* به ترتیـب ۵:۳، ۲:۱ و ۱:۲ بـود. در پـژوهش مـا نیـز تیپ‌های آمیزشی در جمعیت‌هـای مزرعـه‌ای خرمـدره ۱ و میاندوآب برابر نبودند. در مطالعـات دخـانچی و همکـاران (Dokhanchi *et al.* 2020) نیز فراوانی تیپ‌هـای آمیزشـی در جمعیت‌های اهر، هریس و جلفـا مسـاوی نبودنـد و در برخـی منـاطق (آذرشـهر، اسـکو و میانـه) تنهـا *MAT-2* شناسایی گردید. در این پژوهش، هر دو تیـپ آمیزشـی در شهرستان میانه (استان آذربایجان شرقی) به نسبت مسـاوی (۵:۵) مشـاهده شـد کـه بـا نتـایج دخـانچی و همکـاران (Dokhanchi *et al.* 2020) مطابقت نداشت و می‌تواند بـه دلیل نحوه نمونه‌برداری و تعداد کم جدایـه از یـک مزرعـه باشد. به هر حال، هر دو تیپ آمیزشی در همه جمعیت‌های پژوهش حاضر شناسایی و ردیابی گردید.

حضور هـر دو تیـپ آمیزشـی در یـک جمعیـت قـارچ بیانگر پتانسیل وقوع تولیدمثل جنسی در آن جمعیـت مـی‌باشد ولی بنا به دلایـل مختلـف از جملـه شـرایط محیطـی نامناسب، فراوانی تیپ‌های آمیزشی تحت تأثیر قرار گرفتـه و فراوانی آن‌ها یکسـان یـا نزدیـک نخواهـد بـود. در ایـن حالت ممکن اسـت انتخـاب از طریـق عوامـل مختلـف از جمله ارقام مقاوم و یا کاربرد قـارچ‌کـش‌هـا روی یکـی از ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی اعمـال شـده و سـبب تکثیـر بیش از حد یکی از تیپ‌های آمیزشی گشـته و فراوانـی آن نسـبت بـه تیـپ آمیزشـی مخـالف بیشـتر شـده اسـت

Milgroom 1996, 2015, McDonald & Linde 2002 a, b). ذکر این نکته ضروری است که قارچ‌ها ممکن است توانایی تولیدمثل جنسی را به خاطر عوامل متعددی از دست بدهند. جهش در ژن‌های کلیدی آمیزشی، عدم وجود شریک سازگار جنسی، شرایط محیطی نامناسب و از دست رفتن ماده باروری از عوامل مهم عدم توانایی تولیدمثل جنسی در قارچ‌ها ذکر شده است. به علاوه، ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در فرآیندهایی به غیر از آمیزش از قبیل ناسازگاری رویشی، بیماری‌زایی و فرآیند-های سلولی دخالت دارند (Pöggeler *et al.* 2006).

در بیماری‌شناسی گیاهی برای دستیابی به بهترین روش مدیریت بیماری، شناسایی فاکتورهایی که مهمترین نقش را در تحول بیمارگر دارند و اینکه چگونه این نیروهای تکاملی بر هم اثر متقابل دارند تا ترکیب ژنتیکی و پتانسیل تکاملی جمعیت‌های بیمارگر را رقم بزنند، مهم می‌باشد (Milgroom 1996, 2015, McDonald & Linde 2002 a, b). نوترکیبی جنسی یکی از نیروهای تکاملی موثر بر ژنتیک جمعیت قارچ‌ها می‌باشد. گزارش‌هایی از تنوع ژنوتیپی بالا و تمایز ژنتیکی کم به دلیل جریان ژنی زیاد بین جمعیت‌های قارچ *P. graminea* و تنوع در بیماری-زایی جدایه‌ها وجود دارد (Jawhar & Arabi 2006, Arabi & Jawhar 2007, Zein *et al.* 2010, Bayraktar & Akan 2012, Si *et al.* 2019).

با این حال، نقش مرحله جنسی و آسکوسپورها در زیست‌شناسی قارچ ناشناخته مانده است (Smedgard-Petersen 1978, Si *et al.* 2019, Dokhanchi *et al.* 2020).

در این پژوهش، هر دو تیپ آمیزشی در سطح یک مزرعه در همه مناطق نمونه‌برداری ردیابی گردید و پتانسیل باروری جنسی جدایه‌ها با تیپ آمیزشی مخالف بررسی شد. الگوی پراکنش تیپ‌های آمیزشی در سطح مزرعه نشان می‌دهد که هر دو تیپ آمیزشی در یک محل نمونه-برداری به فاصله یک متر از یکدیگر حضور دارند که با نتایج دخانچی و همکاران (Dokhanchi *et al.* 2020) مطابقت دارد. نتایج محققین مذکور نشان داد که هر دو تیپ آمیزشی در یک برگ گیاه نیز قابل ردیابی می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که شانس تلاقی زیادی بین جدایه‌هایی با تیپ آمیزشی مخالف در شرایط مزرعه در ایران وجود دارد. هر چند که در تحقیق حاضر پس از گذشت شش ماه از تلاقی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه، سودوتسیوم‌ها تشکیل شدند ولی بالغ نگردیدند و فاقد ساختارهای آسک و آسکوسپور بودند. این ممکن است به دلیل شرایط آزمایشگاه باشد که باروری ناقص مانده است و در طبیعت وضعیت می تواند متفاوت باشد و قارچ باروری نشان دهد. بطوریکه، فرم جنسی قارچ در کاه و کلش جو در مزرعه تحت شرایط محیطی دانمارک به وفور تشکیل می‌شود (Smedgard-Petersen 1977, 1978).

همچنین، گزارش‌هایی از آمیزش و تولیدمثل جنسی بین گونه‌های *P. teres* و *P. graminea* وجود دارد (Smedgard-Petersen 1977, 1978). سمدگارد-پترسن (Smedgard-Petersen 1978) تحقیقاتی جهت هیبرید کردن و آمیزش بین این دو گونه بر روی محیط کشت ساکس-آگار انجام داد و مشخص گردید این دو گونه قابلیت هیبرید شدن را داشته و تولید نتاج بارور و بیماریزا می‌نمایند. از بین ۹۶ آمیزش بین دو گونه، ۹۴ پروتوپریتسیوم، ۳۲ آسک و ۱۸ آسکوسپور تولید گردید. نتاج تولید شده دارای الگوها و علایم بیماریزایی مختلفی می‌باشند و در صورتی که تولیدمثل جنسی بین دو گونه مذکور در طبیعت نیز اتفاق بیفتد بایستی شیوه‌های کنترل بیماری به ویژه اصلاح ژنتیکی ارقام و شناسایی این دو

بیمارگر صرفا براساس علایم بیماری مورد توجه دوباره قرار گیرد (Smedgard-Petersen 1977, 1978). وقوع تولیدمثل جنسی و نوترکیبی در طبیعت و نقش و اهمیت آن در میزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *P. graminea* و اپیدمی‌های شدید بیماری، نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم کردن اعتبارات مالی این پژوهش کمال تشکر را دارند.

منابع

Arabi M. and Jawhar M. 2007. Heterogeneity in *Pyrenophora graminea* as revealed by ITS-RFLP. Journal of Plant Pathology 89: 391–395.

Ariyawansa H.A., Kang J.C., Alias S.A., Chukeatirote E. and Hyde K.D. 2014. *Pyrenophora*. Mycosphere 5: 351–362.

Babadoost M. 1998. Barley Strip Disease (*Pyrenophora graminea* Itao and Kur.) Tabriz University Press, Tabriz, Iran. 32 p.

Bayraktar H. and Akan K. 2012. Genetic characterization of *Pyrenophora graminea* isolates and the reactions of some barley cultivars to leaf stripe disease under greenhouse conditions. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 36:329–339.

Dokhanchi H., Babai-Ahari A. and Arzanlou M. 2020. Distribution of mating type alleles in Iranian populations of *Pyrenophora graminea*, the causal agent of barley leaf stripe disease, using a multiplex PCR approach. European Journal of Plant Pathology 156: 343–354.

Ellis M.B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK. 608 p.

Farr D.F. and Rossman A.Y. 2020. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. http://nt.arsgrin.gov/fungaldatabases.

Ficsor A., Bakonyi J., Csosz M., Tomscanyi A., Varga G. and Toth, B. 2014. Occurrence of barley pathogenic *Pyrenophora graminea* species and their mating type in Hungary. Cereal Research Communication 42: 612–619.

Gussow H. T. 1913. Some disease of cereals. Page 194 in experimental farm reports for the year ending march 31. 1912; report of the Dominion Botanist. Appendix to the report of the Minister of Agriculture. Sessional paper No. 16, Ottawa, Canada.

Jawhar M. and Arabi M. I.E. 2006. Genetic variability among *Pyrenophora graminea* isolates. Australasian Plant Pathology 35: 279–281.

Linde C.C., Zhan J. and McDonald B.A. 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: From lesions to continents. Phytopathology 92: 946–955.

Marin-Felix Y., Hernández-Restrepo M., Iturrieta-González I. Garcia D., Gene J., Groenewald J.Z., Cai L., Chen Q., Quaedvlieg W., Schumacher R.K., Taylor P.W.J., Ambers C., Bonthond G., Edwards J., Krueger-Hadfield S.A., Luangsaard J.J., Morton L., Moslemi A., Sandoval-Denis M., Tan Y.P., Thangavel R., Vaghefi N., Cheewangkoon R. and Crous P.W. 2019. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. Studies in Mycology 94: 1–124.

Mathre D.E. 1997. Compendium of barley diseases. Second edition. APS press. 120 p.

McDonald B. A. and Linde C. 2002a. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. Euphytica 124: 163–180.

McDonald B. A. and Linde C. 2002b. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annual Review of Phytopathology 40: 349–379.

McDonald B.A., Zhan J., and Burdon J.J. 1999. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. Phytopathology 89: 639–645.

Milgroom M. G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. Annual Review of Phytopathology 34: 457–477.

Milgroom M. G. 2015. Recombination and randomly mating populations. pp. 147–84. In: M. G. Milgroom (Ed). Population biology of plant pathogens: genetics, ecology, and evolution. American Phytopathological Society Press, St. Paul. MN, USA.

Patpour M., Torabi M., Pouralibaba H. and Mardoukhi V. 2006. Responses of some promising dryland barley lines to leaf stripe disease caused by *Pyrenophora graminea* Ito & Kurib. Seed and Plant Improvement Journal 22: 201–213.

Pöggeler S., Nowrousian M. and Kück U. 2006. Fruiting-body development in ascomycetes. pp. 325–355. In: U. Kües. and R. Fischer. (Eds). The Mycota. Vol. I. Growth, differentiation and sexuality. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany.

Rau D., Attene G., Brown A.H.D., Nanni L., Maier F.J., Balmas V., Saba E., Schafer W. and Papa R. 2007. Phylogeny and evolution of mating-type gene from *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch disease. Current Genetic 51:377-392.

Rau D., Maier FJ., Papa R., Brown AHD., Balmas V., Saba E., Schafer W. and Attene G. 2005. Isolation and characterization of the mating-type locus of the barley pathogen *Pyrenophora teres* and frequencies of mating-type idiomorphs within and among fungal populations collected from barley landraces. Genome 48:855–869

Si E., Meng Y., X. Ma, B. Li, J. Wang P., Ren L., Yao K. Yang, Y. Zhang, X. Shang and H. Wang. 2019. Development and characterization of microsatellite markers based on whole-genome sequences and pathogenicity differentiation of *Pyrenophora graminea*, the causative agent of barley leaf stripe. European Journal of Plant Pathology 154: 227–241.

Sivanesan A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers No. 158. 261 p.

Smedgarden-Petersen V. 1978. Genetics of heterothallism in *Pyrenophora graminea* and *Pyrenophora teres*. Transactions of the British Mycological Society 70*:* 99–102.

Smedgard-Petersen V. 1977. Inheritance of genetic factors for symptoms and pathogenicity in hybrids of *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea*. Phytopathologische Zeitschrift 89: 193–202.

Taylor E.J.A., Stevens. E.A., Bates J.A., Morreal G., Lee D., Kenyon. D.M. and Thomas J.E. 2001. Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. Plant Pathology 50: 347–355.

Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S.and Madden T. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13: 134.

Zein I., Jawhar M. and Arabi M. I. E. 2010. Efficiency of IRAP and ITS-RFLP marker systems in accessing genetic variation of *Pyrenophora graminea*. Genetics and Molecular Biology 33: 328–332.

Zhong S. and Steffenson B.J. 2001. Genetic and molecular characterization of mating type genes in *Cochliobolus sativus*. Mycologia 93: 852–863.