مجله دانش گياه‌پزشكي ايران
دوره ۴۰، شماره ۱، ۱۳۸۸ (۸۴-۷۳)

بررسي ساختار جمعيت *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr بدست آمده از علف هرزهاي تيره **Poaceae** بر اساس شناسايي گروه‌هاي سازگاري رويشي و نشانگر مولكولي **rep-PCR**

پرستو مطلبي[۱]، محمد جوان نيكخواه[۲]*، سيد محمود اخوت[۳]، خليل بردي فتوحي‌فر[۴] و كيوان غضنفري[۵]
۱، ۲، ۳، ۴، ۵، دانشجوي كارشناسي ارشد، دانشيار، استاد، استاديار و كارشناس پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران
(تاريخ دريافت: ۸۷/۱۱/۲۹- تاريخ تصويب: ۸۸/۱/۲۵)

چكيده

چهل جدايه تک اسپور ***Magnaporthe grisea***، به منظور شناسايي گروه‌هاي سازگاري رويشي و تعيين تنوع ژنتيكي بر اساس انگشت نگاري **DNA** به روش **rep-PCR** در اين تحقيق استفاده شدند. جدايه‌ها در سال‌هاي ۱۳۸۲-۱۳۸٤ از تعدادي علف هرز تيره گرامينه شامل علف انگشتي (***Digitaria sanguinalis***)، ارزن دم روباهي (***Setaria italica***)، سوروف (***Echinochloa crus-galli***) و علف هرز نامعلوم جمع‌آوري گرديدند و در كلكسيون قارچ‌شناسي پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران نگهداري شدند. براي شناسايي گروه‌هاي سازگاري رويشي، جهش يافتگان ***nit*** در محيط حداقل حاوي ٦%- ۵% كلرات جداسازي و آزمون‌هاي مكمل سازي جهش يافته‌هاي ***nit*** در تمام حالات ممكن روي محيط حداقل انجام شد. سه گروه سازگاري رويشي **VCG1**، **VCG2** و **VCG3** در بين جدايه‌ها تشخيص داده شدند. گروه **VCG1** با ۲۹ جدايه، گروه غالب بود. براي تعيين تنوع ژنتيكي و شناسايي دودمان‌هاي كلوني پراكنده در جمعيت قارچ، از دو آغازگر بر اساس توالي نوكلئوتيدهاي قطعه **ERIC** و **BOX** طراحي شده، استفاده گرديد. قطعات **DNA** با طولي بين ٤۲۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز تكثير شدند. شش دودمان كلوني در بين جدايه‌ها شناسايي و با حروف **A**، **B**، **C**، **D**، **E** و **F** مشخص شدند. دودمان كلوني **A** با فراواني حدود ٦۲/۵ % دودمان كلوني غالب را تشكيل داد. اين تحقيق نشان داد بر خلاف نتايج گروه‌هاي سازگاري رويشي كه جدايه‌هاي حاصل از ارزن دم روباهي و علف انگشتي با هم تشكيل هتروكاريون دادند، در تعيين تنوع ژنتيكي به روش مولكولي از يكديگر با ٤۰ % شباهت تفكيک شدند. هر دو روش نشان داد كه تنوع ژنتيكي كمي در درون جمعيت قارچ در روي علف‌هاي هرز وجود دارد.

واژه‌هاي كليدي: ***Pyricularia grisea***، جهش يافتگان ***nit***، **DNA** تكرار شونده، دودمان كلوني.

مقدمه

قارچ *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr [آناморف: *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.] يك آسكوميست هتروتاليك از رده Sordariomycetes و خانواده Magnaporthaceae مي‌باشد (Lumbsch & Huhndorf, 2007). اين قارچ تاكنون به عنوان عامل بيماري بلاست روي برنج و لكه برگي روي تعدادي از علفهاي هرز تيره گرامينه گزارش شده است (Valent, 1997; Couch &

* نويسنده مسئول: محمد جوان نيكخواه تلفن: ۰۹۱۲-۴۵۴۹۰۶۸ E-mail:jnikkhah@ut.ac.ir

(Kohn, 2002). اولین گزارش از وقوع *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. روي علف هرز *Lolium perenne* به صورت لکه خاکستري از پنسیلوانیا در سال ۱۹۹۲ بود (Landschoot & Hoyland, 1992). تاکنون چندین روش کنترل براي این بیماري معرفي گردید که یکي از بهترین روش‌ها معرفي ارقام مقاوم برنج به بلاست مي‌باشد. اما مدیریت بلاست از طریق اصلاح ارقام مقاوم، به علت شکست مقاومت تحت شرایط مزرعه، موفقیت محدودي داشته است (Ou, 1985; Ziegler, 1998). عوامل متعددي در ایجاد تغییرات ژنتیکي قارچ‌ها دخالت دارند و تحقیقات نشان داده‌اند که قارچ *M. grisea* از نظر ژنتیکي تغییرپذیر است و با تولید نژادهاي بیماري‌زاي جدید قادر به شکستن مقاومت میزبان در طي چند سال بعد از بوجود آمدن رقم مقاوم مي‌گردد (Hebert, 1971). به همین دلیل شناسایي و طبقه‌بندي و بررسي تنوع ژنتیکي جدایه‌هاي حاصل مي‌تواند ابزار مفیدي براي کمک به ایجاد لاین‌هاي مقاوم در مقابل همه ژنوتیپ‌هاي قارچ در هر منطقه محسوب گردد. سازگاري رویشي و تشکیل هتروکاریون در اثر تلاقي میسلیوم‌هاي جدایه‌هاي سازگار یکي از عوامل بروز تغییر در قارچ‌ها است. گروه‌هاي سازگاري رویشي[1]، حاصل تشکیل هتروکاریون پایدار در جمعیت قارچ‌ها هستند و هتروکاریون‌ها نتیجه‌ي پیوند (آناستوموز) بین هیف‌ها مي‌باشند و فقط جدایه‌هایي که داراي آلل‌هاي یکسان در تمام لوکوس‌هاي *vic*[2] باشند قادر به تشکیل هتروکاریون پایدار هستند و در یك گروه سازگاري رویشي قرار مي‌گیرند (Leslie, 1993). Genovesi & MaGill (1976) و همچنین Crowford *et al.* (1986) با تلاقي دادن جهش یافتگان[3] اکسوتروف ایجاد شده در اثر نور ماوراي بنفش در قارچ *M. grisea* تعداد نسبتاً زیادي از فنوتیپ‌هاي نوترکیب را مشاهده کردند و نتیجه گرفتند که ژن‌هاي *vic* ممکن است در قارچ فعال نبوده و علت اصلي بروز پدیده نوترکیبي را پاراسکشوالیسم[4] دانستند. در آزمایش‌هاي دیگري که با استفاده از جهش‌یافتگان اکسوتروف خود به خودي قارچ *M. grisea* انجام گردید، Correll *et al.* (2000) در ایالت ارکانزاس و Javan-Nikkhah (2002) در ایران نتایجي در خصوص فعال بودن ژن‌هاي *vic* در قارچ *M. grisea* بدست آوردند.

روش‌هاي مولکولي مبتني بر DNA بر اساس انگشت نگاري DNA نیز به خوبي براي مطالعه تنوع ژنتیکي جمعیت قارچ بکار رفته و نتایج سودمندي بدست آمده است (Levy *et al.*, 1993; Kachroo *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1999;).

اکثر قریب به اتفاق مطالعاتي که براي تجزیه و تحلیل جمعیت قارچ *M. grisea* در نقاط مختلف دنیا انجام شده بر اساس انگشت‌نگاري DNA به کمك نشانگر RFLP بر پایه توالي نوکلئوتیدي تکرار شونده MGR586 بوده است (Zeigler *et al.*, 1998). Farman (2002) با استفاده از روش RFLP و انگشت‌نگاري با کاوشگرهاي MGR586، RETRO5 وMAGGY نشان داد که جدایه‌هاي *P. grisea* که تولید لکه خاکستري روي *Lolium perenne* مي‌کنند از جدایه‌هاي بدست آمده از گیاهان علف انگشتي، ارزن دم روباهي یا برنج متمایزند. George *et al.* (1998) با الگو قرار دادن توالي تکرار شونده Pot2، نشانگر مولکولي rep-PCR[5] مبتني بر قطعه DNA تکرار شونده را به عنوان جایگزیني مناسب براي RFLP جهت انگشت‌نگاري DNA جدایه‌هاي قارچ و تنوع ژنتیکي آن‌ها معرفي کردند. تاکنون چندین مطالعه در زمینه شناخت ساختار جمعیت قارچ *M. grisea* با الگو قرار دادن توالي Pot2 به کمک نشانگر rep-PCR در نقاط مختلف دنیا انجام شده است (George *et al.*, 1998; Correll *et al.*, 2000; Prabhu *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2006). در ایران، Javan-Nikkhah *et al.* (2004) جدایه‌هاي قارچ *M. grisea* بدست آمده از برنج را با الگو قرار دادن توالي Pot2 و بر اساس نشانگر مولکولي rep-PCR مورد بررسي قرار دادند. Bargnil (2007) جدایه‌هاي قارچ *M. grisea* بدست آمده از تعدادي علف هرز تیره گرامینه را بر اساس نشانگر مولکولي RAPD مورد بررسي قرار داد. Vera Cruz *et al.* (1996) به کمك آغازگرهاي طراحي شده از روي توالي DNA تکرار شونده به نام‌هاي REP، ERIC و BOX در نشانگر rep-PCR استرین‌هاي عامل بیماري سوختگي باکتریائي برنج[6] را مورد مطالعه قرار دادند. علاوه بر

1. Vegetative Compatibility Groups
2. Vegetative incompatibility
3. Mutants
4. Parasexualism

5. Repetitive element-based PCR
6. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

باكتري‌ها، در سال‌هاي اخير از نشانگر rep-PCR به كمك آغازگرهاي طراحي شده از روي توالي‌هاي نوكلئوتيدي فوق در مطالعه تنوع ژنتيكي قارچ‌ها بخوبي استفاده شده است. Jedryczka *et al.* (1999) در لهستان جدايه‌هاي قارچ *Leptosphaeria maculans* را مورد تجزيه و تحليل قرار داده و جدايه‌هاي توليدكننده توكسين را از جدايه‌هايي كه قادر به توليد توكسين نبودند، بر اساس انگشت‌نگاري DNA آن‌ها با نشانگر فوق تفكيك نمودند. McDonald *et al.* (2000) نيز گونه‌هاي *Tilletia* را بر اساس انگشت‌نگاريDNA در نشانگر rep-PCR با هم مورد مقايسه قرار دادند و ارتباط فيلوژنتيك آن‌ها را نشان دادند.

عمده‌ترين اهداف اين تحقيق شناسايي گروه‌هاي سازگاري رويشي، انگشت‌نگاري DNA و شناسايي دودمان‌هاي كلوني[1] در بين جدايه‌هاي *M. grisea* به دست آمده از تعدادي علف هرز تيره گرامينه بود.

مواد و روش‌ها

جدايه‌هاي *M. grisea*

در اين تحقيق از ۴۰ جدايه تک اسپور شده قارچ *M. grisea* كه در سالهاي ۱۳۸۲-۱۳۸٤ از علفهاي هرز شامل علف انگشتي (*Digitaria sanguinalis*)، ارزن دم روباهي (*Setaria italica*)، سوروف (*Echinochloa crus-galli*) و تعدادي علف هرز نامعلوم كه در كلكسيون قارچ شناسي بخش بيماري شناسي گياهي، پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران نگهداري مي شوند، استفاده گرديد (جدول ۱).

شناسايي گروه‌هاي سازگاري رويشي در جدايه‌هاي *M. grisea*

به منظور جداسازي جهش‌يافتگان *nit*[2] (فاقد قدرت استفاده از نيترات)، حلقه‌هاي كوچك آگار واجد ميسليوم به قطر سه تا پنج ميلي‌متر از حاشيه پرگنه چهار تا پنج روزه قارچ روي محيط غذايي PDA جدا و به تشتك‌هاي پتري هشت سانتي‌متري حاوي محيط غذايي حداقل[3] كه ۵۰-۶۰ گرم در ليتر كلرات پتاسيم ($KClO_3$) به آن اضافه شده بود، منتقل شدند. تركيب محيط حداقل بصورت زير بود (Harp & Correll, 1998): دكستروز، ۱۰ گرم؛ K_2HPO_4، ۱ گرم؛ KH_2PO_4، ۱ گرم؛ $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۵ گرم؛ $CaCl_2.H_2O$، ۰/۱ گرم؛ $NaNO_3$، ۲ گرم؛ محلول B-Complex vitamin، ۱۰ ميلي‌ليتر؛ محلول Trace element، ۰/۲ ميلي ليتر؛ محلول سولفات آهن، ۰/۲ ميلي‌ليتر و يک ليتر آب ديونيزه با هم مخلوط شدند. پس از ۱۴ الي ۱۸ روز در دماي ۲۵ °C درون انكوباتور در تاريكي، ميسليوم‌هاي رشديافته موسوم به سكتور[4] كه از پرگنه اوليه روي محيط حاوي كلرات پتاسيم منشعب شدند و داراي رشد اكسوتروف بودند، از حاشيه پرگنه جدا گرديدند و به محيط حداقل منتقل و به مدت يك هفته در شرايط انكوباتور ۲۵ °C نگهداري شدند. قطاع‌هايي كه داراي رشد غيرمتراكم بوده و پرگنه گسترده بدون ميسليوم هوايي و يا با ميسليوم هوايي كم به عنوان جهش‌يافتگان *nit* X در نظر گرفته شدند (Correll *et al.*, 1987). اين جهش يافتگان نسبت به منبع ازت اكسوتروف هستند.

تعيين تيپ فنوتيپي جهش‌يافتگان ***nit***

خصوصيات فنوتيپي جهش‌يافتگان *nit* بر اساس ارزيابي نحوه رشد هر يك از آن‌ها روي محيط‌هاي افتراقي حاوي يكي از چهار منبع ازت شامل محيط غذايي نيترات مذكور در بالا، محيط غذايي نيتريت حاوي محيط غذايي حداقل با ۰/۲ گرم در ليتر نيتريت سديم، محيط غذايي هيپوگزانتين حاوي محيط غذايي حداقل با ۰/۲ گرم در ليتر هيپوگزانتين و در نهايت محيط غذايي آمونيوم حاوي محيط غذايي حداقل با ۱ گرم در ليتر تارتارات آمونيوم مي‌باشد، ارزيابي گرديد و جهش‌يافتگان *nit* در سه گروه فنوتيپي با نام‌هاي *nit* 1 (يك جهش در جايگاه ژني ساختماني آنزيم احياكننده نيترات)، *nit* 3 (يك جهش در جايگاه ژني تنظيمي اختصاصي مسير مصرف نيترات) و بالاخره *Nit* M (حداقل يك جهش در پنج جايگاه ژني مؤثر درساخت كوفاكتور داراي موليبدن كه لازمه فعاليت آنزيم احياءكننده نيترات است) قرار گرفتند (Landschoot & Hoyland, 1992).

تلاقي جهش‌يافتگان ***nit*** هر جدايه با يكديگر

پس از تعيين تيپ فنوتيپي جهش‌يافتگان، *nit*‌هاي بدست آمده از هر جدايه روي محيط حداقل تلاقي داده شدند. به اين صورت كه حلقه‌هاي آگار چهار تا پنج

1. Clonal lineages
2. Nitrate non-utilizing
3. Minimal medium
5. Sector

ميلي‌متري واجد ميسليوم از هر جهش يافته به فاصله ۲ سانتي‌متر از هم، روي محيط حداقل درون تشتک‌هاي پتري cm ۸ قرار گرفتند و براي هر جدايه سه تکرار در نظر گرفته شد. از آنجا که تشکيل هتروکاريون بين *nit* 1 و *Nit* M سريع‌تر انجام مي‌شود، ترجيحاً تلاقي‌ها به صورت *nit* 1× *Nit* M گرديد و در صورت عدم حضور *Nit* M، بين *nit* 1 و *nit* 3 و در صورت عدم حضور *nit* 1، بين *Nit* M و *nit* 3 انجام شد. تشتکها در درون اينکوباتور در دماي ۲۵ °C در تاريکي به مدت ۱٤ روز نگهداري شدند. در صورت ايجاد تلاقي و رشد پروتوتروف (رشد تيپ وحشي) در محل برخورد ميسليوم‌هاي جهش‌يافته، آن جدايه به عنوان خودسازگار انتخاب و براي آزمون‌هاي مکمل‌سازي[1] نگهداري شد و در صورت عدم رشد پروتوتروف، آن جدايه به عنوان خوداناسازگار[2] انتخاب و از آزمون‌هاي مکمل‌سازي حذف گرديد.

تعيين گروه‌هاي سازگاري رويشي (VCGs)

در اين مرحله جهش‌يافتگان *nit* تهيه شده از جدايه‌هاي مختلف علف هرز همانند روش قبل روي محيط حداقل درون تشتکهاي پتري cm ۸ با هم تلاقي داده شدند. در اينجا نيز ترجيحا تلاقي‌ها بين *nit* M از يک جدايه با *nit* 1 از جدايه ديگر انجام شد و در صورت عدم حضور *nit* M، بين ساير *nit* ها تلاقي‌ها صورت گرفت. فرآيند به هم رسيدن ميسليوم‌ها و تشکيل هتروکاريون بطور روزانه تا ۱۸ روز ارزيابي گرديد. جدايه‌هايي که جهش يافتگان *nit* آن‌ها قادر به تشکيل هتروکاريون و رشد پروتوتروف در ناحيه تلاقي ميسليوم ها بود، در يک گروه سازگاري رويشي قرار گرفتند براي اين منظور براي هر گروه سازگاري يک جدايه نماينده[3] انتخاب گرديد. جدايه نماينده جدايه‌اي بود که بيشترين تلاقي را با ساير جدايه‌هاي هر گروه انجام داد. هر آزمايش تلاقي سه مرتبه تکرار گرديد.

تعيين تنوع ژنتيکي جدايه‌هاي *M. grisea* بر اساس rep-PCR

آماده سازي ميسليوم و استخراج DNA

جهت تهيه ميسليوم کافي براي استخراج DNA، حلقه‌هاي ميسليومي چهار تا شش ميلي‌متري تهيه و به تعداد چهار حلقه در محيط عصاره مخمر قرار داده شد. براي تهيه‌ي محيط عصاره مخمر، دو گرم عصاره مخمر و ۱۰ گرم دکستروز در يك ليتر آب مقطر حل گرديد (Prabhu *et al.*, 2002) و پس از قرار دادن چهار حلقه ميسليومي داخل هر ظرف ارلن ۱۰۰ ميلي ليتري، آن‌ها به مدت پنج تا هفت روز بر روي شيکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقيقه در دماي اتاق (دماي ۲٤-۲۸ درجه سانتي‌گراد) قرار گرفتند. براي جداسازي ميسليوم از محيط مايع، از پمپ خلاء و قيف بوخنر استفاده شد. در نهايت، شيشه‌هاي پني‌سيلين حاوي ميسليوم فارچ در فريزر با دماي ۲۰- درجه سانتي‌گراد قرار گرفتند. استخراج DNA بر اساس روش فنل- کلروفرم (Liu *et al.*, 2000) انجام گرديد. درون هاون‌هاي حاوي ۲۰۰ ميلي‌گرم ميسليوم ساييده شده ۱/۵ ميلي‌ليتر بافر ليزکننده (٤۰۰ ميلي‌مول Tris-HCl با pH ۸ ، ٦۰ ميلي‌مول EDTA با pH ۸ ، ۱۵۰ ميلي‌مول NaCl ، ۱ درصد SDS) اضافه گرديد و پس از حل کردن ميسليوم ساييده شده درون بافر، اين مخلوط به درون لوله‌هاي پلاستيکي ۱/۵ ميلي‌ليتري درب‌دار منتقل شد و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقيقه در محيط اتاق قرار داده شد. سپس به هر يك از لوله‌ها ۲۵۰ ميکروليتر استات پتاسيم با pH ٤/۸ اضافه شد و پس از مسدود کردن درب لوله‌ها، محتويات آن توسط ورتکس[4] به مدت چند ثانيه کوتاه، کاملاً مخلوط گرديد. محلول حاصل به مدت ۲ دقيقه با سرعت ۱۰۰۰۰g سانتريفوژ شد. محلول رويي به لوله‌هاي ۱/۵ ميلي‌ليتري ديگر منتقل شد. محلول فنل – کلروفرم – ايزوآميل الکل به نسبت ۲۵-۲٤-۱ به ميزان ٤۰۰ ميکروليتر به هر يك از لوله‌ها اضافه شد و سپس لوله‌ها را با شدت وارونه کرده و تکان داده شد و محلول شيري رنگي حاصل شد. سپس هر يك از لوله‌ها به مدت ۵ دقيقه با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتريفوژ گرديد. پس از سانتريفوژ، به آهستگي فاز رويي را برداشته و به هر يك هم حجم محلول، کلروفرم خالص اضافه شد و با تکان شديد، محلول شيري رنگي مجدداً حاصل شد. سپس به مدت ۳ دقيقه با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتريفوژ گرديد و به محلول رويي هم حجم آن ايزوپروپيل الکل سرد اضافه گرديد. لوله‌ها به مدت ۵ دقيقه با سرعت ۱۳۰۰۰g سانتريفوژ شدند و ته لوله‌ها رسوب سفيدي تشکيل شد.

1. Complementary tests
2. Heterokaryon Self-Incompatible
3. Tester
4. Vortex

فاز رويي رسوب دور ريخته شد. سپس ۳۰۰ ميكروليتر اتانل ۷۰ % سرد به آن‌ها اضافه شد و لوله‌ها به مدت ۲ دقيقه با سرعت ۱۱۰۰۰g سانتريفوژ گرديدند. پس از خشك شدن DNA و تبخير الكل، رسوب DNA در ۳۰ ميكروليتر بافر TE (۱۰ ميلي‌مول Tris-HCl، يك ميلي‌مول EDTA) يا آب ديونيزه استريل حل شد و محلول بدست آمده در دماي ۲۰- °C نگهداري شد (Liu *et al.*, 2000).

انگشت نگاري **DNA** بر اساس روش **rep-PCR**

براي تكثير قطعات DNA، از دو نوع آغازگر كه بر اساس توالي دو قطعه تكرار شونده در ژنوم به نام ERIC و BOX ساخت شركت MWG-Research كشور آلمان با توالي نوكلئوتيدي زير استفاده گرديد (McDonald *et al.*, 2000).

ERIC: 1R 5′-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3′
2 I 5′-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3′
BOX : 1A–1R 5′-CTACGGCAAGGCGACGACGCTGACG-3′

تكثير DNA در حجمي معادل ۲۰ ميكروليتر از مخلوط واكنش PCR شامل۶/۷ ميكرو ليتر آب ديونيزه، ۵ ميكرومول از هر يك از آغازگرها؛ حدود ۵ نانوگرم DNA ژنومي؛ ۱ ميلي‌مول از هر يك از dNTPs (dATP، dTTP، dCTP و dGTP)؛ ۲/۵ واحد آنزيم Taq DNA Polymerase در ۲ ميكروليتر بافر ۱۰x PCR (۱۰x PCR buffer) ساخت شركت سيناژن، انجام گرديد. تكثير DNA در يک ماشين ترموسايكلرمدل Gp001 ساخت شركت Corbett Research كشور استراليا انجام گرديد.

برنامه حرارتي واكنش PCR براي آغازگرهاي ERIC و BOX در ۳۵ چرخه به صورت: ۹۵ درجه سانتي‌گراد، ۵ دقيقه، يك چرخه؛ ۹۴ درجه سانتي‌گراد، ۳ ثانيه، ۹۲ درجه سانتي‌گراد، ۳۰ ثانيه، ۴۹ درجه سانتي‌گراد، ۱دقيقه، ۷۲ درجه سانتي‌گراد، ۵ دقيقه؛ ۷۲ درجه سانتي‌گراد، ۱۰ دقيقه، يك چرخه تنظيم گرديد. براي مشاهده محصول PCR، الكتروفورز با ژل آگارز ۱/۲۵% انجام گرديد. بعد از رنگ‌آميزي با محلول اتيديوم بروماید، عكس‌برداري با استفاده از دستگاه ژل - داكيومنتيشن (ساخت شركت ISOgen مدل Imago) انجام شد و زير نور ماوراء بنفش از آن عكسبرداري به عمل آمد.

تجزيه و تحليل داده‌ها

ابتدا جدايه‌ها بر اساس مشاهده شباهت الگوي DNA روي ژل گروه‌بندي و جدايه‌هاي مشابه مجدداً روي يک ژل كنار هم الكتروفورز شدند تا شباهت آن‌ها از نظر انگشت نگاري DNA تأييد شود و تعداد بندهاي يكسان جدايه‌هاي مشابه معلوم گردد. اندازه هر يک از بندهاي DNA براي تمام جدايه‌ها تعيين گرديد و تمام قطعات DNA قابل ارزيابي بين ۴۲۰-۳۰۰۰ جفت باز تعيين شدند. وجود يا عدم وجود هر يک از بندها به صورت اعداد يک و صفر (يک براي وجود آن و صفر براي عدم وجود آن) در يک سيستم دوتايي براي هر يک از جدايه‌ها تعيين و ثبت گرديد و جدول ماتريكس دوتايي براي داده‌ها ايجاد شد و از آن براي ايجاد ماتريكس شباهت بين جدايه‌ها (وقتي تمام جدايه‌ها به صورت دو به دو با هم مقايسه شوند) بر اساس ضريب دايس[1] استفاده شد (Yap & Nelson, 1996). تجزيه و تحليل خوشه‌اي[2] به كمک روش UPGMA[3] در نرم‌افزار كامپيوتري NTSYSpc-2.02e انجام شد و فنوگرام[4] رسم گرديد.

نتايج

ارزيابي فنوتيپ جهش‌يافتگان ***nit***

بر اساس نحوه رشد جهش‌يافتگان روي محيط‌هاي افتراقي نيتروژن‌دار، از ۴۰ جدايه بدست آمده از تعدادي علف هرز تيره گراميني به ترتيب ۴۵/۶۷ درصد از جهش‌يافتگان از نوع *nit* 1، ۱۴ درصد از نوع *nit* 3 و ۴۰/۳۳ درصد از نوع *Nit* M بودند. بر اساس تلاقي جهش يافتگان *nit* هر جدايه با يكديگر، تنها جهش‌يافتگان سه جدايه Unk3، Set4 و Set5 قادر به توليد هتروكاريون پس از تلاقي جهش‌يافتگان *nit* هر جدايه با هم، نبودند و با ايجاد منطقه مرگ سلولي به عنوان جدايه‌هاي خودناسازگار شناسايي شدند. ساير جدايه‌ها به دليل تشكيل هتروكاريون به عنوان جدايه‌هاي خود سازگار شناسايي شدند. به هر ترتيب در بين ۴۰ جدايه، ۳۷ جدايه براي تعيين گروه‌هاي سازگاري رويشي استفاده شد و سه جدايه فوق از تلاقي‌ها حذف شدند. براي ۳۷ جدايه

1. Dice's coefficient
2. Cluster analysis
3. Unweighted pair group method with arithmetic average
4. Phenogram

جدول ۱- جدایه‌هاي قارچ *M. grisea*، گیاه میزبان، تیپ آمیزشي و گروه‌هاي سازگاري رویشي در جمعیت آن

ردیف	جدایه	گروه VCG	گیاه میزبان	تیپ آمیزشي
۱	Dig1	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۲	Dig2	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۳	Dig3	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
٤	Dig4	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
٥	Dig5	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
٦	Dig6*	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۷	Dig8	1	علف انگشتي	*Mat*1-1
۸	Dig10	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۹	Dig12	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۱۰	Dig13	1	علف انگشتي	*Mat*1-1
۱۱	Dig14	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۱۲	Dig15	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۱۳	Dig16	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۱٤	Dig17	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۱٥	Dig18	1	علف انگشتي	*Mat*1-1
۱٦	Dig19	1	علف انگشتي	——
۱۷	Dig20	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۱۸	Dig21	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۱۹	Dig22	1	علف انگشتي	*Mat*1-2
۲۰	Dig23	1	علف انگشتي	*Mat*1-1
۲۱	Set7	1	ارزن دم روباهي	*Mat*1-1
۲۲	Set8	1	ارزن دم روباهي	*Mat*1-1
۲۳	Set9	1	ارزن دم روباهي	*Mat*1-1
۲٤	Unk1	1	نامشخص	*Mat*1-2
۲٥	Unk2	1	نامشخص	*Mat*1-1
۲٦	Unk4	1	نامشخص	*Mat*1-2
۲۷	Unk5	1	نامشخص	*Mat*1-2
۲۸	Unk6	1	نامشخص	*Mat*1-2
۲۹	Unk7*	1	نامشخص	*Mat*1-2
۳۰	Dig7*	2	علف انگشتي	*Mat*1-2
۳۱	Dig11	2	علف انگشتي	*Mat*1-2
۳۲	Ech1	2	سوروف	*Mat*1-1
۳۳	Set6	2	ارزن دم روباهي	*Mat*1-1
۳٤	Dig9*	3	علف انگشتي	*Mat*1-2
۳٥	Set1	3	ارزن دم روباهي	*Mat*1-1
۳٦	Set2	3	ارزن دم روباهي	*Mat*1-1
۳۷	Set3	3	ارزن دم روباهي	*Mat*1-1
۳۸	Set4	HSI	ارزن دم روباهي	*Mat*1-1
۳۹	Set 5	HSI	ارزن دم روباهي	*Mat*1-2
٤۰	Unk3	HSI	نامشخص	*Mat*1-2

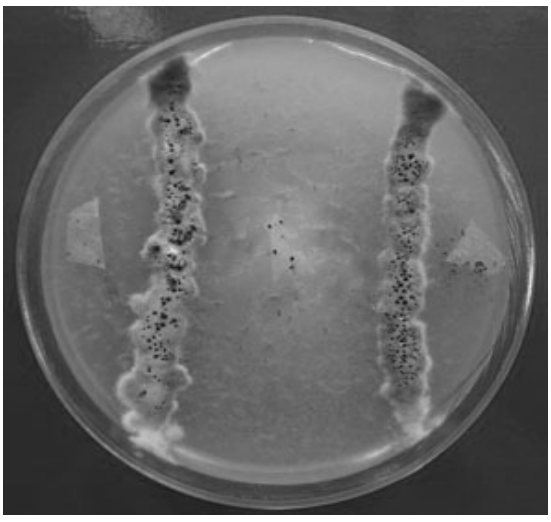
* جدایه‌هاي نماینده (تستر)، دو جدایه Dig6 و Unk7 به عنوان جدایه نماینده در VCG1 تعیین شدند.

HSI (Heterokaryon Self-Incompatibility) جدایه‌هاي خودناسازگار

تیپ‌هاي آمیزشي براي جدایه‌هاي به دست آمده از علف‌هاي هرز در گذشته توسط Bargnil (2007) تعیین شده است.

- اطلاعات در دسترس نیست.

باقي مانده، جهش یافته هر جدایه با جهش یافته سایر جدایه‌ها تلاقي داده شد و بعد از ۱۸ روز هتروکاریون تشکیل شده بطور واضح قابل ارزیابي بود (شکل۱). جدایه‌ها در سه گروه سازگاري رویشي شامل VCG1، VCG2 و VCG3 قرار گرفتند (جدول۱). در این میان، چهار جدایه که داراي تلاقي بیشتر با سایر جدایه‌ها بودند و قادر بودند با بیشتر جهش یافتگان جدایه‌ها هتروکاریون تشکیل دهند به عنوان جدایه‌هاي نماینده جهت تعیین گروه‌هاي سازگاري رویشي انتخاب شدند. جدایه‌هاي Dig6 و Unk7 همراه با ۲۷ جدایه بزرگترین گروه سازگاري رویشي را در علف‌هاي هرز تشکیل دادند و هر دو به عنوان جدایه نماینده در VCG1 قرار گرفتند. در بین ۲۷ جدایه، تعداد ۲۳ جدایه با هر دو جدایه Dig6 و Unk7 تشکیل هتروکاریون بطور واضح دادند و ۴ جدایه دیگر شامل Dig4 و Dig15 فقط با جدایه Dig6 و جدایه‌هاي Dig21 و Unk2 فقط با جدایه Unk7 تشکیل هتروکاریون دادند. جدایه‌هاي Dig7 و Dig9 از علف هرز علف انگشتي به عنوان جدایه نماینده هر کدام همراه با سه جدایه شامل جدایه‌هاي Dig11، Ech1 و Set6 درVCG2 و جدایه‌هاي Set1، Set2 و Set3 در VCG3 به ترتیب قرار داده شدند. گروه VCG1 در بین جدایه‌هاي حاصل از علف‌هاي هرز بیشترین فراواني را نشان داد.



شکل ۱- تشکیل هتروکاریون در اثر تلاقي جدایه Dig17 با جدایه Dig6 (نماینده) *M. grisea* در ناحیه تلاقي. جدایه نماینده در وسط و جدایه Dig17 در طرفین قرار دارند. با بروز این فنوتیپ جدایه Dig17 در گروه سازگاري رویشي VCG1 قرار مي‌گیرد.

شناسايي دودمان‌هاي كلوني و هاپلوتيپ‌هاي آن‌ها

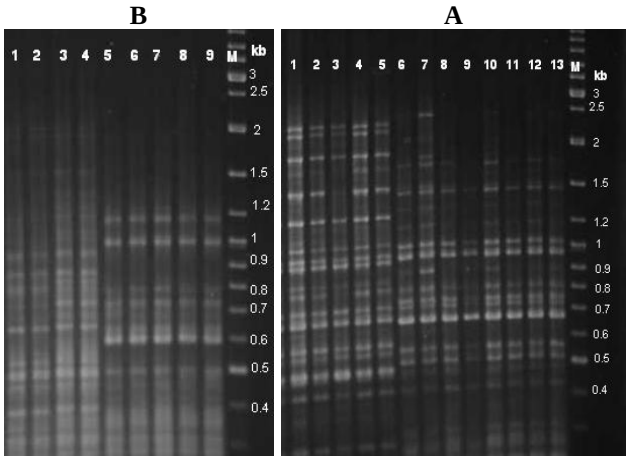
با ارزيابي الگوي DNA جدايه‌ها روي ژل و مقايسه مشاهده‌اي آن‌ها (شكل۲)، تشكيل ماتريكس شباهت با استفاده از ضريب دايس، تجزيه و تحليل خوشه‌اي، شش گروه انگشت‌نگاري DNA يا دودمان كلوني در بين ۴۰ جدايه تعيين گرديد (شكل۳). اين نتيجه از تجزيه و تحليل ۴۷ قطعه DNA تكثير شده به طول ۴۲۰- ۳۰۰۰ جفت باز در جدايه‌هاي مختلف بدست آمد. تجزيه كلاستر با استفاده از هاپلوتيپ‌ها انجام و در دندروگرام حاصل شش كلاستر مشخص گرديد كه هر يک نشان‌دهنده يک گروه انگشت‌نگاري بود. براي تعريف هر گروه انگشت‌نگاري سطح شباهت ۷۰% در الگوي DNA معيار قرار گرفت. به اين ترتيب بر اساس تعريف Levy *et al.* (1991, 1993) هر يک از گروه‌هاي انگشت‌نگاري يک دودمان كلوني محسوب و با حروف A، B، C، D، E و F مشخص شدند. در هر يک از دودمان‌هاي كلوني به ترتيب ۲۰، ۲، ۲، ۳، ۳ و ۵ هاپلوتيپ[1] شناسايي گرديد. هر هاپلوتيپ شامل مجموعه‌اي از جدايه‌ها است كه ۱۰۰%- ۹۵% با هم شباهت داشته باشند. علاوه بر آن، جدول ۲ پراكندگي جدايه‌هاي گروه‌هاي سازگاري رويشي را در شش دودمان كلوني نشان مي‌دهد كه در آن اكثريت جدايه‌هاي VCG1 در دودمان كلوني A قرار گرفتند.

فراواني دودمان‌هاي كلوني

فراواني جدايه‌هاي قارچ *M. grisea* در هر يك از شش دودمان شناسايي شده در جدول ۳ آمده است.

دودمان كلوني **A**: اين دودمان با دارا بودن حدود ۶۲/۵% از ۴۰ جدايه آزمايش شده بزرگترين دودمان را از نظر فراواني در بين جدايه‌هاي بدست آمده از تعدادي علف هرز تيره گراميني تشكيل داد (جدول۳). اين دودمان بيشترين تنوع هاپلوتيپها را در بين ساير دودمان‌هاي شناسايي شده نشان داد، بطوريكه ۲۰ هاپلوتيپ مشخص در بين جدايه‌هاي آن شناسايي شدند. همانطور كه در شكل ۳ نشان داده شده، كلاستر بزرگ متعلق به اين دودمان است. جدايه‌هاي اين دودمان كلوني شامل ۱۹ جدايه از علف هرز علف انگشتي و ۶ جدايه از علف هرز نامشخص مي‌باشد. هاپلوتيپ A_4 در اين دودمان غالب بود كه داراي دو جدايه Dig13 و Dig15 از علف هرز علف انگشتي و يک جدايه Unk2 از علف هرز نامشخص را شامل مي‌شد. سه هاپلوتيپ A_6، A_{10} و A_{13} به ترتيب هر يک داراي دو عضو و ساير هاپلوتيپها تک عضوي بودند.

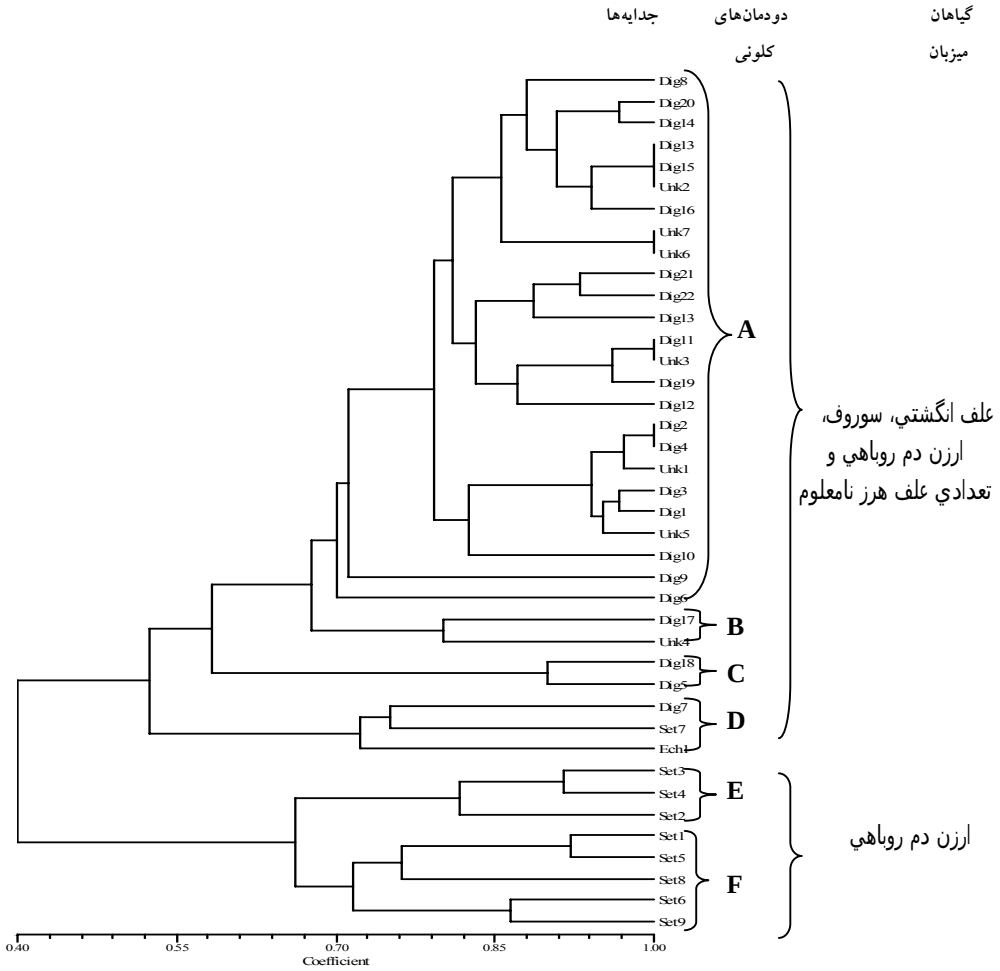
دودمان‌هاي كلوني **F** و **E**: اين دودمان‌ها از نظر فراواني بعد از دودمان A قرار گرفتند كه به ترتيب داراي پنج و سه جدايه بودند. در بين ۴۰ جدايه، حدود ۱۲/۵% از جدايه‌ها در دودمان كلوني F و حدود ۷/۵ % از جدايه‌ها در دودمان كلوني E قرار گرفتند (جدول۳). هاپلوتيپ‌هاي شناسايي شده در اين دودمان‌ها متعلق به جدايه‌هاي بدست آمده از علف هرز ارزن دم روباهي بودند. در مجموع به ترتيب ۵ و ۳ هاپلوتيپ مشخص در بين جدايه‌هاي اين دودمان‌ها شناسايي شدند. با توجه به نتايج، اين دو دودمان كلوني از ساير دودمان‌ها كه متعلق به جدايه‌هاي حاصل از علف هرز علف انگشتي، سوروف و علف هرز نامشخص بودند با حدود ۴۰ درصد شباهت ژنتيكي تفكيک شدند (شكل ۳).



شكل ۲- الگوي DNA تكثير شده به روش rep-PCR براي جدايه‌هاي M. grisea جدا شده ازتعدادي علف هرز تيره گراميني روي ژل آگارز ۱/۲۵ درصد. A) با استفاده از آغازگر ERIC كه در آن شماره‌هاي ۱-۵ مربوط به جدايه‌هاي بدست آمده از علف هرز ارزن دم روباهي و شماره‌هاي ٦-۱۳ مربوط به جدايه‌هاي بدست آمده از علف هرز علف انگشتي است. B) با استفاده از آغازگر BOX كه در آن شماره‌هاي ۱-٤ مربوط به جدايه‌هاي بدست آمده از علف هرز ارزن دم روباهي و شماره هاي۵-۹ مربوط به جدايه‌هاي بدست آمده از علف هرز علف انگشتي است. حرف M در بالاي شكل ها بيان كننده نشانگر اندازه قطعه DNA است و اعداد در حاشيه نشاندهنده اندازه قطعات DNA به صورت كيلوباز (kb)

1. Haplotype

دودمان کلوني **D**: در مقایسه با دودمان‌هاي فوق این دودمان داراي تنوع میزباني بیشتري بود، به طوریکه از مجموع ۴۰ جدایه، داراي یک جدایه از علف هرز علف انگشتي، یک جدایه از علف هرز ارزن دم روباهي و یک جدایه از علف هرز سوروف بود (شکل ۳). با وجود تعداد کم جدایه‌ها، سه هاپلوتیپ مشخص متعلق به سه میزبان مختلف با اسامي D_1، D_2 و D_3 در آن شناسایي شدند.



شکل ۳- فنوگرام ایجاد شده بر اساس روش UPGMA در نرم‌افزار کامپیوتري NTSYS PC-2.02e براي ٤٠ جدایه قارچ *M. grisea* جدا شده از تعدادي علف هرز تیره گرامینه که نشان‌دهنده شش دودمان شناسایي شده به روش rep-PCR با استفاده از دو آغازگر ERIC و BOX مي‌باشد. این دندروگرام با تجزیه و تحلیل ماتریس دوتایي که با مقایسه الگوي DNA تکثیر شده جدایه‌هاي فوق بدست آمده بود، ایجاد گردید. هر کلاستر شامل جدایه‌هایي با ≥۷۰ شباهت در الگوي DNA است که یك دودمان کلوني نامیده مي‌شود. تنها یک جدایه Set7 جدا شده از ارزن دم روباهي با بیش از ۷۰% شباهت در دودمان کلوني D قرار گرفت.

جدول ۲- گروه‌بندي جدایه‌هاي *Magnaporthe grisea* در گروه‌هاي سازگاري رویشي (VCG) و وضعیت پراکندگي آن‌ها در دودمان‌هاي کلوني شش گانه

گروه *VCG	تعداد جدایه	فراواني (%)	** تعداد جدایه در دودمان‌هاي کلوني شش گانه					
			A	B	C	D	E	F
VCG1	۲۹	۷۸/۳۸	۲۲	۲	۲	۱	–	۲
VCG2	۴	۱۰/۸۱	۱	–	–	۲	–	۱
VCG3	۴	۱۰/۸۱	۱	–	–	–	۲	۱
جمع	۳۷	۱۰۰	۲۴	۲	۲	۳	۲	۴

* نام هر گروه سازگار رویشي به روش آزادانه با یك شماره همراه شده است.

** دودمان‌هاي کلوني در همین تحقیق بر اساس نشانگر مولکولي rep-PCR شناسایي شده‌اند.

دودمان‌هاي كلوني **B** و **C**: اين دودمان‌ها جمعيت بسيار كوچكي را در بين جدايه‌هاي بدست آمده از علفهاي هرز تشكيل و هر يک با دارا بودن فراواني ۵% در مجموع ۱۰% از كل ۴۰ جدايه را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). در دودمان B دو هاپلوتيپ مشخص به اسامي B_1 از علف هرز علف انگشتي و B_2 از علف هرز نامشخص شناسايي گرديد. در دودمان كلوني C هر دو هاپلوتيپ به اسامي C_1 و C_2 از علف هرز علف انگشتي بودند، كه اين دو هاپلوتيپ مشخص بيش از ۸۵% از جهت الگوي DNA تكثير شده بهم شباهت داشتند.

جدول ۳- فراواني جدايه‌هاي قارچ *M. grisea* بدست آمده از تعدادي علف هرز تيره گراميني در هر يك از شش دودمان كلوني شناسايي شده بين ٤٠ جدايه در ارزيابي نهايي با استفاده از دو آغازگر ERIC و BOX

دودمان كلوني	تعداد جدايه	فراواني جدايه‌ها (%)	تعداد هاپلوتيپ‌هاي شناسايي شده
A	۲۵	٦۲/۵	۲۰
B	۲	۵	۲
C	۲	۵	۲
D	۳	۷/۵	۳
E	۳	۷/۵	۳
F	۵	۱۲/۵	۵

بحث

در اين تحقيق به كمك محيط غذايي حاوي كلرات (كلرات پتاسيم) كه جدايه‌هاي مقاوم به كلرات را از جدايه‌هاي حساس جدا مي‌كرد، جدايه‌هاي جهش‌يافته‌اي كه فاقد قدرت استفاده از منبع نيترات بودند، در ٤٠ جدايه *M. grisea* جدا شده از تعدادي علف هرز تيره گراميني بدست آمدند. در اين ميان VCG1 با ۲۹ جدايه كه دو جدايه آن شامل Dig6 وUnk7 به عنوان جدايه نماينده در اين گروه سازگاري رويشي تعيين شدند، گروه غالب را تشكيل داد و جدايه‌هاي اين گروه سازگاري رويشي از علف هرز علف انگشتي، ارزن دم روباهي و تعدادي علف هرز نامعلوم بود. در هر صورت ۳۷ جدايه از كل ۴۰ جدايه آزمايش شده بطور مشخص در سه گروه VCG قرار گرفتند. تعداد كم گروه‌هاي سازگاري رويشي نشان دهنده تنوع ژنتيكي كم در اين جدايه‌ها مي‌باشد. با وجود اينكه جدايه‌ها از ميزبان‌هاي متفاوتي جدا شدند ولي تعداد گروه‌هاي سازگاري رويشي محدودي در آن‌ها مشاهده شد. تنوع ژنتيكي كم درون اين جدايه‌ها و محدود بودن تعداد گروه‌هاي سازگاري رويشي در اين تحقيق نشان دهنده وجود تكثير غيرجنسي جدايه‌ها و احتمال كم يا فقدان توليدمثل جنسي مي‌باشد. جدايه‌هاي بدست آمده از علف‌هاي هرز تيره گراميني داراي تيپ آميزشي *Mat*1-1 و *Mat*1-2 (Bargnil, 2007) مي‌باشند، اما وجود اين آلل‌هاي تيپ آميزشي نمي‌تواند منجر به توليد مثل جنسي شود، زيرا وجود دو تيپ آميزشي سازگار در جمعيت ضروري مي‌باشد در حاليكه نر بارور بودن جدايه‌هاي بررسي شده (Bargnil, 2007) احتمال وقوع توليد مثل جنسي بين جدايه‌ها را غيرممكن مي‌سازد و نتيجه آن تنوع ژنتيكي كم در جدايه‌ها و تعيين تعداد گروه‌هاي سازگاري رويشي محدود و معيني شد (Turgeon *et al.*, 1993). نتايج آزمايشات Genovesi & MaGill (1976) و Crowford *et al.* (1986) موانع سازگاري رويشي در جدايه‌هاي قارچ *M. grisea* را غير فعال نشان داد. در حاليكه در اين آزمايش معلوم گرديد اين موانع بطور قوي در جمعيت قارچ فعال هستند و نتايج بدست آمده با نتايجي كه Correll *et al.* (2000) در آزمايشي روي مجموعه‌اي از جدايه‌هاي جمع‌آوري شده قارچ در ايالت اركانزاس و هم‌چنين Javan-Nikkhah (2002) در ايران روي جمعيت قارچ بدست آورده بودند، مشابهت داشت. تفاوت نتايج قبلي در رابطه با موانع سازگاري رويشي

در قارچ *M. grisea* با نتايج به دست آمده در اين آزمايش، آزمايش Correll *et al.* (2000) و هم‌چنين Javan-Nikkhah (2002) با تكيه به فرضيه‌اي مي‌توان به اين ترتيب توضيح داد كه ممكن است تمام جدايه‌هايي كه Crowford *et al.* (2000) به كار بردند متعلق به يك گروه VCG باشند و لذا آن‌ها نتوانستند درباره وجود موانع سازگاري رويشي در آن جدايه‌ها به نتيجه مشخص برسند. از طرف ديگر شايد تفاوت اصلاً به خود جهش‌يافتگان مربوط باشد. در آزمايش آن‌ها از جهش‌يافتگان اكسوتروف ايجاد شده با اشعه ماوراء بنفش استفاده شد در حاليكه در اين آزمايش از جهش‌يافتگان اكسوتروف خودبخودي استفاده گرديد. لذا ممكن است كه اشعه ماوراء بنفش كه در مطالعات آن‌ها براي ايجاد جهش‌يافتگان در جدايه‌هاي *M. grisea* بكار رفته بجاي تأثير روي ژن‌هاي بخصوص كه

براي تجزيه منبع غذايي فعال مي‌شوند، روي لوكوس‌هايي كه مربوط به موانع سازگاري رويشي در قارچ هستند، تأثير گذاشته باشند. البته اين در حد يك فرضيه است و بايد بررسي شود.

تحقيقات متعددي در مورد تنوع ژنتيكي جمعيت قارچ *M. grisea* در نقاط مختلف دنيا و بخصوص كشورهاي برنج‌خيز انجام شده است. با پيشرفت تكنولوژي مولكولي و امكان مطالعه دقيق ساختار ژنتيكي در قارچ‌ها و انواع ميكروارگانيزم‌ها، زمينه‌هاي لازم براي شناسايي تنوع ژنتيكي در درون افراد يك گونه به خوبي فراهم شده است. انگشت‌نگاري DNA جدايه‌هاي قارچ *M. grisea* از اوايل دهه ۹۰ آغاز گرديد (Levy *et al.*, 1991) و امكان مقايسه جدايه‌هاي قارچ را در سطح DNA و گروه‌بندي آن‌ها در گروه‌هاي ژنتيكي مشابه ايجاد نمود. در اين تحقيق از نشانگر مولكولي rep-PCR با استفاده از آغازگرهاي ERIC و BOX به منظور انگشت‌نگاري DNA جدايه‌هاي قارچ *M grisea*. بدست آمده از تعدادي علف هرز تيره گرامينه و تعيين تنوع ژنتيكي آن‌ها استفاده گرديد. با استفاده از اين نشانگر تفاوت عمده جدايه‌هاي حاصل از علف هرز علف انگشتي با جدايه‌هاي حاصل از ارزن دم روباهي مشخص شده است و اين تحقيق نشان داد كه rep-PCR نشانگر خوبي براي تمايز اين دو گروه جدايه‌ها از هم بود كه اين نتيجه، نتايج حاصل از كارهاي Couch & Kohn (2002) را كه با روش PCR-RFLP انجام داده بودند، تأييد كرد. به نظر مي رسد علت اين تفكيك ايجاد شده بين جدايه‌هاي به دست آمده از علف انگشتي و ارزن دم روباهي گونه زايي باشد و در واقع در طول ژنوم در جايگاه‌هاي ERIC و BOX در جدايه‌هاي حاصل از علف انگشتي تحول بيشتري رخ داده كه توانسته آن‌ها را از جدايه‌هاي بدست آمده از ارزن دم روباهي تفكيك كند. در حاليكه در مورد جدايه‌هاي حاصل از ارزن دم روباهي در جايگاه‌هاي ERIC و BOX تحول كمتري رخ داده و در نتيجه درصد تشابه آن‌ها به جدايه‌هاي بدست آمده از علف انگشتي كمتر است كه اين خود مي‌تواند به خاطر شرايط محيطي، موتاسيون و يا خود ميزبان باشد (Tredway *et al.*, 2003). در مورد گروه‌هاي سازگاري رويشي به نظر مي‌رسد تحول چنداني در آلل‌هاي لوكوس *vic* جدايه‌هاي بدست آمده از تعدادي علف هرز تيره گرامينه رخ نداده است. در نتيجه نتوانسته جدايه‌هاي علف‌هاي هرز را چندان از هم تفكيک كند و همانطور كه مشاهده گرديد در گروه VCG1 كه گروه سازگاري رويشي غالب هم شناسايي گرديد، جدايه‌هاي بدست آمده از علف‌هاي هرز مختلف قرار گرفتند. تنوع ژنتيكي كم درون جمعيت قارچ در روي علف‌هاي هرز در اين تحقيق مي‌تواند در تأييد نتايج حاصل از تعداد كم گروه‌هاي سازگاري رويشي در خصوص وجود تكثير غيرجنسي جدايه‌ها و احتمال كم يا فقدان توليدمثل جنسي باشد. بطوريكه حدود ۶۲/۵% از كل جدايه‌هاي جمع‌آوري شده فقط متعلق به دودمان كلوني A بود. Xia *et al.* (2000) علل مشابهي را براي عدم تنوع ژنتيكي زياد قارچ در ايالت اركانزاس بيان كرده اند. در اين تحقيق تنها يک جدايه Set7 از ساير جدايه‌هاي بدست آمده از علف هرز ارزن دم روباهي متمايز گرديد، به طوريكه در گروه‌هاي سازگاري رويشي با ساير جدايه‌ها قرار گرفت ولي در انگشت نگاري DNA با بيش از ۷۰ درصد شباهت ژنتيكي با جدايه Dig7 و Ech1، دودمان كلوني D را به خود اختصاص داد كه اين نتايج با نتايج بدست آمده توسط Bargnil (2007) مطابقت دارد. با توجه به اينكه علي‌رغم اختلافات ژنتيكي، تا به امروز تفاوتهاي مرفولوژيكي بين جدايه‌هاي بدست آمده از علف هرز علف انگشتي و ارزن دم روباهي گزارش نشده است و نتايج شناسايي گروه‌هاي سازگاري رويشي نيز در تأييد عدم تفاوت چندان بين آن‌ها است، مي‌توان گونه قديمي *M. grisea* را بعنوان يک گونه كمپلكس در نظر گرفت.

سپاسگزاري

هزينه انجام اين تحقيق با استفاده از اعتبارات معاونت محترم پژوهشي دانشگاه تهران تامين شده است. اين تحقيق در آزمايشگاه قارچ شناسي گروه گياهپزشكي پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران انجام شده است.

REFERENCES

1. Bargnil, M. (2007). *Study on population structure of fungus Magnaporthe grisea isolated from Poaceae weeds and determination of distribution of its mating type alleles by PCR*. M. Sc. dissertation. *University of Tehran*, Tehran, Iran. 87pp. (In Farsi).

2. Correll, J. C., Klittich, C. J. R. & Leslie, J. F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility Tests. *Phytopathology*, 77, 1640-1646.
3. Correll, J. C., Harp, T. L., Guerber, J. C., Zeigler, R. S., Liu, B., Cartwright, R. D. & Lee, F. N. (2000). Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Phytopathology*, 90, 1396-1404.
4. Couch, B. C. & Kohn, L. M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94(4), 683-693.
5. Crowford, M. S., Chumley, F. G., Weaver, C. G. & Valent, B. (1986). Characterization of the heterokaryotic and vegetative diploid phases of *Magnaporthe grisea*. *Genetics*, 114, 1111-1129.
6. Farman, M. L. (2002). *Pyricularia grisea* isolates causing gray leaf spot on perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in the United States: Relationship to *P. grisea* isolates from other host plants. *Phytopathology*, 92, 245-254.
7. Genovesi, A. D. & MaGill, C. W. (1976). Heterokaryosis and parasexuality in *Pyricularia oryzae* Cavara. *Canadian Journal of Microbiology*, 22, 531-536.
8. George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S. & Leung, H. (1998). Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology*, 88, 223-229.
9. Harp, T. L. & Correll, J. C. (1998). Recovery and characterization of spontaneous, selenate resistant mutants of *Magnaporthe grisea*, the rice blast pathogen. *Mycologia*, 90, 954-963.
10. Hebert, T. T. (1971). The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*, 61, 83-87.
11. Javan-Nikkhah, M. (2002). *Investigation on genetic diversity of populations of Magnaporthe grisea (Hebert) Barr, the rice blast fungus, using molecular, pathogenicity and vegetative compatibility characters in Guilan Province*. Ph. D. Thesis. *University of Tehran,* Tehran, Iran. (In Farsi).
12. Javan-Nikkhah, M., McDonald, B. A., Banke, S. & Hedjaroude, G. A. (2004). Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* populations based on rep-PCR fingerprinting. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 909-919.
13. Jedryczka, M., Rouexel, T. & Balesdent, M. H. (1999). Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 813-823.
14. Kachroo, P., Leong, S. A. & Chattoo, B. B. (1994). Pot 2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus Magnaporthe grisea. *Molecular Genetics and Genomes*, 245, 39-348.
15. Kumar, J., Nelson, R. J. & Zeigler, R. S. (1999). Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. *Genetics*, 152, 971-984.
16. Landschoot, P. J. & Hoyland, B. F. (1992). Gray leaf spot of perennial ryegrass turf in Pennsylvania. *Plant Disease*, 16, 1280-1282.
17. Leslie, J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 127-151.
18. Levy, M., Correa-victoria, F. J., Zeigler, R. S., XU, S. & Hamer, J. E. (1993). Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology*, 83, 1423-1427.
19. Levy, M., Romao, J., Marchetti, M. A. & Hamer, J. E. (1991). DNA fingerprinting with dispersed repeated sequence resolve pathotype diversity in the rice blast fungus. *The Plant Cell*, 3, 95-102.
20. Liu, D., Coloe, S., Baird, R. & Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 471p.
21. Lumbsch, H. T. & Huhndorf, S. M. (2007). Outline of Ascomycota. *Myconet*, 13, 1-58.
22. McDonald, J. G., Wong, E. & White, G. P. (2000). Differentiation of *Tilletia* species by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease*, 84, 1121-1125.
23. Ou, S. H. (1985). *Rice diseases*. (2nd ed.). Common Wealth Agric. Bureaux. 380 pp.
24. Padmanabhan, S. Y. (1965a). Breeding for blast resistance in India. In: *the rice blast disease*. Baltimore, Maryland; John Hopkins Press- pp 203-221.
25. Prabhu, A. S., Filippi, M. C., Aravjo, L. G. & Faria, J. C. (2002). Genetic and phenotypic characterization of isolates of *Pyricularia grisea* from the rice cultivars Epagri 108 and 109 in the state of Tocantins. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 566-573.
26. Suzuki, F., Arai, M. & Yamaguchi, J. (2006). DNA fingerprinting of *Pyricularia grisea* by rep-PCR using a single primer based on the terminal inverted repeat from either of the transposable elements Pot2 and MGR 586. *Journal of General Plant Pathology*, 72, 314-317.
27. Tredway, L. P., Stevenson, K. L. & Burpee, L. L. (2003). Mating type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations from turfgrass in Georgia. *Plant Disease*, 87, 435-441.
28. Turgeon, B. G., Christiansen, S. K. & Yoder, O. C. (1993). Mating type genes in Ascomycetes and their imperfect relatives. In: *the fungal holomorph: mitotic meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. D.R. Reynolds and J.W. Taylor, eds. Pp 199-215.
29. Valent, B. (1997). The rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. In: *the Mycota, G.C. Carroll and P. Tuzyhski, eds*, Berlin: springer-verlag. pp 37-54.

30. Vera Cruz, C. M., Ardales, E. Y., Skinner, D. Z., Talag, J., Nelson, R. J., Louws, F. J., Leung, H., Mew, T. W. & Leach, J. E. (1996). Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analysis. *Phytopathology*, 86, 1352-1359.
31. Xia, J. O., Correll, J. C., Lee, F. N., Ross, W. J. & Rhoads, D. D. (2000). Regional population diversity of *Pyricularia grisea* in Arkansas and the influence of host selections. *Plant Disease*, 84, 877-884.
32. Yap, I. V. & Nelson, R. J. (1996). *Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA- based dendrogram*. IRRI Discussion Paper Series No.14. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Manila, Philippines.
33. Zeigler, R. S. (1998). Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 249-275.
34. Zeigler, R. S., Scott, R. P., Leung, H., Bordeos, A. A., Kumar, J. & Nelson, R. J. (1998). Evidence of the parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. *Phytopathology*, 87, 284-294.