

پویایی قارچ *Pyricularia oryzae* در دو مرحله بلاست برگ و گردن خوشه برنج، بر اساس ارزیابی ساختار ژنتیک جمعیت‌ها در سطح‌های برگ، پنجه و مزرعه

فاطمه سلیمی^۱، محمد جوان نیکخواه^{۲*}، فریدون پاداشت دهکایی^۳، علیرضا علیزاده^۴، حسن سلطانلو^۵ و ساره یوسفی راد^۶
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. استادیار، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت
۴. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۵ و ۶. دانشیار و دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گرگان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۹)

چکیده

به منظور ارزیابی پویایی قارچ *Pyricularia oryzae* در دو مرحله بلاست برگ و گردن خوشه برنج، ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها برای ۱۴۲ جدایه در یک مزرعه و در سه سطح با استفاده از نشانگر مولکولی SSR و پنج ترکیب آغازگر مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های مورد پژوهش از دو مرحله بلاست برگ و بلاست گردن خوشه و در سه سطح جمع‌آوری شدند. در سطح اول جدایه‌های به‌دست‌آمده از دو مرحله بلاست برگ و بلاست گردن خوشه از یک مزرعه، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح دوم به جدایه‌های دو جمعیت برگ و گردن خوشه که از پنجه‌های یک بوته برنج به‌دست‌آمده بودند، تعلق داشتند و سطح سوم بررسی را نیز جدایه‌های سه جمعیت جدا شده از سه لکه مجزا در سطح یک برگ از یک بوته برنج به خود اختصاص دادند. بر اساس فنوگرام تنوع ژنتیکی رسم شده، تمامی ۱۴۲ جدایه بررسی شده تشابه ژنتیکی ۸۹ تا ۱۰۰ درصد را نشان دادند. برآوردهای ژنتیکی در سه سطح مورد بررسی به ترتیب میانگین جریان ژنی ۵۷/۶۲، ۱۰/۶۸ و ۴/۷۸۳ را بین جدایه‌های بررسی شده نشان دادند. ردیابی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی ۱۴۲ جدایه با روش Multiplex PCR نشان داد که همه جدایه‌ها دارای ایدیومورف *MAT1-I* هستند. این برآمد نشان‌دهنده عدم رخداد تولیدمثل جنسی و بیان‌کننده این است که تکثیر جمعیت‌های قارچ در سطح مزارع برنج در استان گیلان فقط به صورت غیرجنسی رخ می‌دهد. تنوع ژنتیکی کم و شباهت ژنتیکی زیاد جمعیت‌های عامل بیماری بلاست برنج در استان گیلان نیز این استنتاج را تایید می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: بلاست برنج، تیپ آمیزشی، جریان ژنی، نشانگر مولکولی.

Dynamic of *Pyricularia oryzae* at the two stages, leaf, and panicle neck blast based on the assessment of population structure at leaf, tiller, and field levels

Fatemeh Salimi¹, Mohammad Javan-Nikkhah^{2*}, Fereydon Padasht Dehkayi³, Alireza Alizadeh⁴, Hassan Soltanlou⁵ and Sareh Yousefirad⁶

1, 2. Ph. D. Candidate and Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran

3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Iranian Rice Research Institute, Rasht, Iran

4. Assistant Professor, Department of Plant protection, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

5, 6. Associate Professor and Ph. D. Candidate, Department of Agronomy and Plant Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

(Received: Jul. 2, 2017 - Accepted: Apr. 18, 2018)

ABSTRACT

In order to assess the dynamic of *Pyricularia oryzae* at leaf and panicle neck blast stages, population genetic structures of the 142 isolates were investigated in a rice field and at three levels using SSR markers and five primer pair combinations. All the isolates were collected from the two-leaf and panicle stages at three levels. In the first level, isolates collected from leaf and panicle neck blast stages in the rice field were analyzed. In the second level, isolates belonged to the leaf and panicle neck populations were collected from tillers of the same rice hill and analyzed. In the third level, the investigated isolates belonged to three populations and were obtained from three distinct leaf spots from the same rice leaf in a rice tiller. Based on constructed dendrogram for all of the 142 isolates, genetic similarity varied from 89 to 100% among the isolates. Population genetic estimations at the three studied levels showed that the amount of gene flow was 57.62, 10.68, and 4.783, respectively between the isolates. Detection of mating type idiomorphs of the studied isolates using multiplex PCR showed that all the isolates had *Mat1-I* idiomorph. This indicates the absence of sexual reproduction within the *M. oryzae* populations in rice fields in Guilan province and the fungus reproduces only in an asexual way. Low genetic variation and high genetic similarity among the populations of the causal agent of rice blast disease in Guilan province confirm this result.

Keywords: Gene flow, Mating type, Molecular markers, Rice blast.

* Corresponding author E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

مقدمه

از میان بیماری‌های برنج، بلاست بیشترین خسارت را در سطح جهانی به این محصول وارد کرده و از این رو این بیماری از اهمیت اقتصادی فراوانی دارد (Kumar *et al.*, 2007; Noguchi *et al.*, 1999). عامل بیماری بلاست برنج، یک قارچ همی‌بیوتروف و هتروتال از شاخه آسکومیکوتا است که *Pyricularia oryzae* نام دارد (Couch & Kohn, 2002). در ایران این بیماری برای اولین بار حدود پنجاه سال پیش در استان گیلان گزارش شده است (Sharif & Ershad, 1966) و امروزه نیز یکی از بیماری‌های بومی در منطقه‌های کشت برنج با خسارت بالغ بر ۳۰ درصد تولید محصول است (Moumeni & Leung, 2003). رشد جمعیت جهانی و تغییرهای آب و هوایی رخداد خسارت ناشی از آفت‌ها و بیماری‌های گیاهی را محتمل‌تر ساخته و مدیریت این مهم بدون به‌کارگیری مبارزهٔ شیمیایی و پذیرش خطرات سلامت تغذیه‌ای و اقتصادی ممکن نیست (Estoup & Guillemaud, 2010). امروزه جهت کنترل بیماری‌های گیاهی در سامانه‌های کشاورزی از روش‌های تلفیقی مانند کشت رقم‌های مقاوم، به‌کارگیری روش‌های زراعی و سموم قارچ‌کش استفاده می‌شود که کاربرد هر یک با محدودیت‌هایی روبرو است (McDonald & Linde, 2002; Noguchi *et al.*, 2007). بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ با در نظر گرفتن توانایی تغییرپذیری ژنتیکی بالای آن، برای موفقیت در تولید رقم‌های مقاوم در برابر ظهور نژادهای جدیدی که در اثر سازوکارهای مختلف تغییرپذیری در عامل بیماری‌زا ایجاد می‌شوند و دستیابی به روش‌های مناسب در مدیریت بیماری و کمک به برنامه‌های بازسازی‌ای و نزدیک شدن به مقاومت پایدارتر در میزبان ضروری است (McDonald & Linde, 2002; Noguchi *et al.*, 2007; Javan-Nikkhah *et al.*, 2004). اصلاح موفقیت‌آمیز رقم‌های برنج نیز برای دستیابی به مقاومت پایدار در برابر بیمارگر، بدون شناخت دقیق از میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بیمارگر با مشکل روبرو می‌شود (McDonald *et al.*, 1997; Ou, 1985). بیشتر پژوهش‌ها در زمینهٔ ژنتیک قارچ‌ها روی

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها متمرکز شده‌اند. تاکنون پژوهش‌های بی‌شماری در زمینهٔ بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیک جمعیت‌های قارچ *P. oryzae* در منطقه‌های مختلف و سطح‌های متفاوت در بیشتر منطقه‌های برنج‌خیز انجام شده است (Kumar *et al.*, 1999; Tharreau *et al.*, 2009; Don *et al.*, 1999; Tosa *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; George *et al.*, 1998; Javan-Nikkhah *et al.*, 2004; Piotii *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2006, 2007, 2012; Motlagh *et al.*, 2015). داده‌های به‌دست‌آمده از سایر پژوهش‌ها در مقیاس‌های وسیع‌تر جغرافیایی و ابزارهای متفاوت مولکولی در منطقه‌های مختلف کشت برنج در ایران نیز نشان می‌دهند که تنوع ژنتیکی زیادی در بین جدایه‌های این قارچ وجود دارد (Javan-Nikkhah *et al.*, 2004; Hemmati, 2004; Motlagh *et al.*, 2015).

نشانگر ریز ماهواره به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی ساختار ژنتیک جمعیت‌های قارچ *P. oryzae* توسط محققین بسیاری مورد استفاده قرار گرفته است و بر پایهٔ نتایج به‌دست‌آمده، این نشانگر به‌عنوان یک ابزار مؤثر در بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی پیشنهاد شده است (Motlagh *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2012).

پژوهش‌های مربوط به تنوع ژنتیکی و اصلاح رقم‌های برنج برای ایجاد مقاومت پایدار در برابر بیماری بلاست، بیشتر بر اساس بررسی جمعیت‌های قارچی در مرحلهٔ بلاست برگی است، در حالی که بیشتر خسارت بیماری بلاست برنج در مرحلهٔ بلاست گردن خوشه بوده و پژوهش‌های پیشین درجه‌های متفاوتی از مقاومت در میزبان را در مرحلهٔ بلاست برگی و بلاست گردن خوشه نشان داده‌اند (Bonman *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2009). همچنین به منظور بررسی ارتباط میان مرحلهٔ بلاست برگی و بلاست گردن خوشه در زمینه‌های مختلف زیست‌شناسی جمعیت میزبان و بیمارگر و سازگاری قارچ بیمارگر با بافت میزبان پژوهش‌هایی انجام شده است. نهایتاً بررسی کیفیت آلودگی، دوره کمون، حجم اسپوری و مساحت لکه در هر دو مرحله از طریق تجزیه و تحلیل‌های تک متغیره و چند

با توجه به خسارت زیاد عامل بیماری، بررسی ساختار ژنتیکی در سطح‌های جغرافیایی بزرگ و کوچک می‌تواند در درک میزان تنوع ژنتیکی و همچنین شناخت منشأ تنوع در جمعیت‌های موردبررسی بسیار سودمند باشد. پژوهش‌های پیشین نیز نشان‌دهنده وقوع تغییرهای ژنتیکی در قارچ عامل بیماری در مرحله بیماری‌زایی هستند. از این‌روی بررسی ساختار ژنتیک جمعیت‌ها در سطح جغرافیایی کوچک در تخمین میزان تنوع ژنتیکی در این سطح و مقایسه آن با میزان تنوع ژنتیکی در سطح‌های بزرگ‌تر جغرافیایی می‌تواند بسیار مفید و مؤثر باشد. همچنین با توجه به چند چرخه‌ای بودن عامل بیماری‌زا در طول یک فصل زراعی، تعیین میزان تنوع ژنتیکی در بین مرحله‌های مختلف بیماری می‌تواند در شناخت پویایی ژنتیکی جمعیت‌های بیمارگر، شناخت منشأ تنوع ژنتیکی و تعیین ارتباط ژنتیکی بین جمعیت‌های بیمارگر در مرحله‌های مختلف بیماری‌زایی بسیار مؤثر باشد. در سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی متعددی به منظور بررسی ساختار ژنتیک جمعیت‌های قارچ‌های بیمارگر استفاده می‌شود. در پژوهش‌های امروزی، نشانگر مولکولی SSR با توجه به دقت زیاد، سادگی، فراهم کردن نتیجه‌های قابل‌اعتماد و تکرارپذیری بالا، سریع بودن، قدرت تمایز بسیار خوب، هم بارز بودن و قدرت زیاد در نشان دادن چند شکلی در ژنوم، بر سایر روش‌های متداول انگشت‌نگاری DNA ارجحیت دارد. از این‌روی در این پژوهش از این نشانگر به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در بین جدایه‌های مربوط به جمعیت‌های قارچ عامل بلاست برنج در سطح‌های مختلف در مرحله‌های مختلف چرخه بیماری (بلاست برگی و بلاست خوشه) استفاده شد. به این منظور تنوع ژنتیکی جمعیت‌های عامل بیمارگر در یک مزرعه در دو مرحله رشدی (برگ و خوشه) برنج در یک فصل، جمعیت‌های یک پنجه برنج در دو مرحله رشدی (برگ و خوشه) در یک فصل و جمعیت‌های به‌دست‌آمده از لکه‌های مختلف واقع در سطح یک برگ مورد مقایسه قرار گرفتند. این پژوهش برای رسیدن به اهداف زیر انجام شد:

۱- بررسی تغییرهای ژنتیکی قارچ عامل بلاست در

متغیره نشان داده است که جدایه‌های حاصل از مرحله بلاست برگی در مقایسه با مرحله بلاست گردن خوشه کم‌آزادتر هستند. این نتیجه‌ها پیشنهاد می‌کنند که جدایه‌های مهاجم‌تر در مرحله برگی شانس ایجاد بیماری در سایر مرحله‌های رشدی (فنولوژی) میزبان را دارند (Ghatak *et al.*, 2013).

Xue *et al.* (2012) نیز برای درک بهتر چگونگی وقوع جهش‌ها در ژنوم قارچ عامل بلاست برنج در مرحله آلودگی، توالی ژنی دو جدایه مزرعه‌ای از یک مزرعه را با ژنوم یک جدایه توالی‌یابی شده مورد مقایسه قرار دادند. اگرچه چارچوب کلی ژنوم‌های موردبررسی مشابه بود، ولی تعداد خانواده‌های ژنی که در روابط گیاه و بیمارگر دخیل بودند، در جدایه‌های مزرعه‌ای فراوانی بیشتری داشتند. در بررسی میزان شباهت و تفاوت ژنوم‌ها، بیشترین میزان تنوع در ژن‌های درگیر در آلودگی دیده شد. در هر ژنوم تعداد زیادی جایگاه عناصر مشابه ترانسپوزون‌ها وجود دارد که کمتر از ۳۰ درصد این جایگاه‌ها حفاظت شده‌اند و در میان جدایه‌های مختلف تنوع بالایی دارند. در این پژوهش مشخص شد که نزدیک به ۲۰۰ ژن تحت تأثیر ترانسپوزون‌ها قرار گرفته بودند.

از آنجایی‌که قارچ عامل بلاست برنج یک آسکومیست هتروتال است، تیپ آمیزشی و سازگاری جنسی در این قارچ با ژن‌های موجود در یک جایگاه ژنی به نام *MATI* کنترل می‌شود. این جایگاه ژنی دارای دو ایدیومورف متناظر به نام‌های *MATI-1* و *MATI-2* است. اگرچه تولیدمثل جنسی این قارچ در طبیعت دیده نشده است، اما احتمالاً یکی از عوامل بروز تغییرات ژنتیکی در این قارچ است (Kang *et al.*, 1994). بررسی وضعیت باروری جنسی با ردیابی و تعیین فراوانی آلل‌های تیپ آمیزشی به کمک PCR می‌تواند یک برآورد از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها باشد. در ایران، میزان باروری جنسی جدایه‌های استان‌های مازندران و گیلان در تلاقی با جدایه‌های آزمایشگر استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه‌های پژوهش‌های فوق حاکی از عدم وجود تیپ آمیزشی *MATI-2* در جدایه‌های به‌دست‌آمده از برنج در ناحیه‌های موردبررسی (گیلان و مازندران) است (Hemmati *et al.*, 2004; Mousanezhad *et al.*, 2004).

بوته جمع‌آوری شدند. این بوته‌ها جهت تکرار نمونه‌برداری در مرحله خوشه نیز علامت‌گذاری شدند. به‌منظور بررسی لکه‌های روی سطح یک برگ، نمونه‌برداری از برگ‌گی که حداقل دارای سه لکه مشخص و مجزا بود، صورت پذیرفت. بر این اساس، چندین برگ انتخاب شدند تا حداقل جدایه‌های لازم به دست آیند. بدین ترتیب برگ‌های سبزی که دارای لکه‌های مشخص، مجزا، تازه و اسپوردار بودند، جمع‌آوری شدند.

جمع‌آوری نمونه‌ها در مرحله بلاست گردن خوشه

در مرحله بلاست گردن خوشه نیز نمونه‌برداری در دو سطح انجام گرفت. همانند مرحله قبل، نمونه‌برداری به‌طور تصادفی و در یک حرکت زیگزاگی با الگوی مشابه نمونه‌برداری در مرحله برگ‌گی انجام شد، به‌طوری‌که نمونه‌برداری از گردن خوشه بوته‌های دارای علائم بلاست خوشه در فاصله‌های دو متری در مزرعه انجام شد.

به‌منظور بررسی در سطح یک بوته و در مرحله بلاست گردن خوشه، نمونه‌برداری از گردن خوشه‌های بوته آلوده‌ای که در مرحله بلاست برگ‌گی از آن نمونه‌برداری و متعاقباً علامت‌گذاری شده بود، انجام شد.

جداسازی، خالص‌سازی، نگهداری و شناسایی جدایه‌ها

ابتدا قطعات برگ‌گی و گردن خوشه‌های دارای علائم به مدت ۱۵ دقیقه با جریان آرام آب شیر شسته شدند. جهت ضدعفونی سطحی، نمونه‌ها به مدت یک دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم رقیق‌شده (حاوی ۱/۵ درصد کلر فعال) قرار داده شدند. پس از ضدعفونی و آبگیری، قطعات برگ و خوشه‌های آلوده روی یک کاغذ صافی مرطوب و استریل و درون تشتک‌های پتری شیشه‌ای ده سانتی‌متری قرار گرفتند. به‌منظور تشکیل کنیدیوم‌های قارچ روی لکه‌ها، تشتک‌های پتری درون آنکوباتور با دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از گذشت ۲۴-۷۲ ساعت، توده کنیدیوم‌های خاکستری تشکیل‌شده بر سطح لکه‌ها و گردن خوشه با سوزن استریل به محیط آب آگار ۲ درصد حاوی ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین منتقل و برای به دست آوردن کشت خالص پس از سه تا چهار روز تک‌کنیدی‌های جوانه‌زده درون تشتک‌های پتری حاوی

یک جمعیت منطقه‌ای در دو مرحله رشدی (برگ و خوشه) برنج در سطح یک مزرعه در یک فصل زراعی.

۲- ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بلاست به‌دست‌آمده از یک پنجه برنج در دو مرحله مختلف رشدی (برگ و خوشه) در یک فصل زراعی.

۳- ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بلاست به‌دست‌آمده از سه لکه در سطح یک برگ برنج در مرحله بلاست برگ‌گی.

۴- ردیابی و تعیین فراوانی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی به روش PCR.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به‌منظور بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بلاست برنج، مزرعه‌ای با اندازه تقریبی ۵۰۰ مترمربع، با آگاهی داشتن از عدم انجام سم‌پاشی در آن، واقع در منطقه برنج‌خیز صیقلان ورزول در حومه شهر رشت در حاشیه جاده سراوان به فومن، به‌منظور پایش و نمونه‌برداری انتخاب شد. این مزرعه از اطراف توسط مزارع برنج با وسعت حدود پنج هکتار احاطه شده بود. برای پوشش دهی کل جمعیت بیمارگر در سطح مزرعه، جمع‌آوری نمونه‌های آلوده با توجه به زیست‌شناسی بیمارگر و فنولوژی میزبان در طی دو مرحله در تاریخ‌های ۱۳۹۰/۴/۱۵ و ۱۳۹۰/۵/۱۹، به ترتیب در مرحله‌های بلاست برگ‌گی و بلاست گردن خوشه با الگوی زیر انجام شد.

گردآوری نمونه‌ها در مرحله برگ‌گی

به‌منظور بررسی در سطح یک مزرعه، نمونه‌برداری از برگ‌های بوته‌های دارای علائم بلاست برگ‌گی در مزرعه به‌طور تصادفی با الگوی حرکت زیگزاگی انجام شد. بدین صورت که در مسیر حرکت زیگزاگی در خط وسط طولی مزرعه به ازای هر دو متر، یک برگ سبز از یک بوته برنج که دارای لکه‌های مشخص، مجزا، تازه و اسپوردار بود، انتخاب و جمع‌آوری شد.

به‌منظور بررسی در سطح یک بوته، یک بوته با علائم شدید بلاست برگ‌گی به‌طور تصادفی انتخاب و چندین برگ دارای لکه‌های مشخص، مجزا، تازه و اسپوردار از آن

MgCl₂ و بافر PCR بود، استفاده شد. سرانجام، سه میکرولیتر DNA از هر جدایه قارچی با غلظت ۳۰-۲۰ نانوگرم در هر میکرولیتر به میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری منتقل و ۱۷ میکرولیتر از مخلوط واکنش (شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط آماده پی‌سی‌آر، یک میکرولیتر از هر آغازگر و ۳ میکرولیتر آب دیونیزه سترون به درون هر میکروتیوب اضافه شد و مخلوط کل به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به مدت کوتاه سانتریفیوژ شد. تمامی مرحله‌های بالا به‌منظور تهیه مخلوط واکنش روی یخ انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Peqlab (CLEMENS, Germany) تحت برنامه حرارتی زیر انجام شد.

یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه؛ ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه؛ اتصال آغازگرها در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه؛ بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه. به‌منظور مشاهده اولیه محصول PCR، از الکتروفورز دی‌ان‌ای روی ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. با توجه به مزیت نسبی ژل پلی‌اکریل‌امید نسبت به ژل آگارز در نشان دادن چندشکلی، از ژل پلی‌اکریل‌امید جهت بررسی محصول PCR و تفکیک باندها استفاده شد. در این پژوهش از دستگاه ژل اسکن مدل Real Time Gel Scan 2000, Cobbert, Australia موجود در آزمایشگاه ژنتیک گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان استفاده شد (شکل‌های ۲ و ۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار رایانه‌ای NTSYS pc version 2.10 انجام شد و بر اساس الگوریتم UPGMA (unweight pair group method with arithmetic average) و ضریب شباهت SM (Simple matching) فنوگرام تنوع ژنتیکی رسم شد.

محیط غذایی سیب‌زمینی- دکستروز- آگار [PDA] (عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۱۷ گرم دکستروز و ۱۷ گرم آگار و یا ۳۹ گرم پودر تجاری این محیط غذایی در یک لیتر آب مقطر) حاوی ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین منتقل شدند. تشتک‌های پتری درون آنکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از گذشت هفت روز، پرگنه‌های خالص قارچی روی محیط‌های غذایی ظاهر شدند. در مجموع تعداد ۱۴۲ جدایه از قارچ عامل بلاست برنج در دو مرحله بلاست برگی و بلاست خوشه جداسازی و خالص‌سازی شد.

بررسی و شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی در محیط‌های غذایی آب-آگار ۲ درصد (WA) و PDA انجام شد. جدایه‌های قارچی پس از دو الی سه روز رشد در محیط غذایی PDA، به محیط غذایی WA منتقل شدند و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی به مدت هفت تا ده روز قرار گرفتند. شناسایی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی نظیر ویژگی‌های پرگنه، کنیدیوم و کنیدیوفور و با مراجعه به منابع معتبر انجام شد (Ellis, 1971, 1976; McKenzie *et al.*, 2010).

آماده‌سازی مسیلیوم و استخراج DNA

به‌منظور تهیه مسیلیوم موردنیاز جهت استخراج DNA ژنومی، محیط غذایی مایع سیب‌زمینی-دکستروز (PDB) (عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی خردشده و ۱۷ گرم دکستروز در یک لیتر آب مقطر) استفاده شد. استخراج DNA قارچ بر اساس روش Liu *et al.* (2009) انجام شد.

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با روش SSR

به‌منظور ارزیابی تنوع و ارتباط ژنتیکی جدایه‌ها، از پنج جفت آغازگر که بر مبنای نواحی کناری بخش تکرارشونده SSR ژنوم قارچ طراحی شده‌اند (جدول ۱)، استفاده شد (Suzuki *et al.*, 2006, 2007; Tharreau *et al.*, 2009). برای این هدف، از مخلوط آماده پی‌سی‌آر (PCR master mix) ساخت شرکت سیناژن که شامل dNTPs، آنزیم Taq DNA Polymerase،

جدول ۱. ترکیب جفت آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر انتخابی جایگاه‌های ریز ماهواره در جدایه‌های *Pyricularia oryzae*

Table 1. Primer pair combinations used for selective amplification of microsatellite loci in *Pyricularia oryzae* isolates

Primer locus	Primer sequence (5'→3')	Expected size (bp)
Pyrms43-44 4(864)	F:(FAM)_TCAGTAGGCTTGAATGAAAAA R:CTTGATTGGTGGTGGTGTG	205-233
Pyrms47-48 4(781)	F:(HEX)_TCACATTTGCTTGCTGGAGT R:AGACAGGGTTGACGGCTAAA	164-196
Pyrms99-100 5(718)	F:(NED)_CACCACTTTATGGCGCAGT R:ACCTAGGTAGGTATACATGTTGTT	178-222
Pyrms101-102 6(50)	F:(FAM)_CTGCGTTCAACATGCCTCTA R:CTTAGATCTGCGGTATCAGCA	177-205
Mgms13/V Sct.5.190/231851	F:6_FAM_GGAATGATCACACGACGAA R:TTGTCCTACCGGCAAAAAGA	182-226

ردیابی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی به روش Multiplex PCR

تعداد ۱۴۲ جدایه از *P. oryzae* به دست آمده از مرحله‌های بلاست برگی و گردن خوشه، به منظور شناسایی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی با استفاده از روش Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به دمای اتصال مشابه آغازگرهای تکثیرکننده ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی و متفاوت بودن طول ناحیه تکثیرشونده توسط هر آغازگر، شگرد Multiplex برای صرفه‌جویی در زمان استفاده شد. بدین منظور از آغازگرهای L1 و L2 (Tredway *et al.*, 2003) جهت تکثیر یک قطعه ۵۵۲ جفت بازی (ایدیومورف *MATI-1*) و آغازگرهای T1 و T2 جهت تکثیر یک قطعه ۳۹۰ جفت بازی (ایدیومورف *MATI-2*) استفاده شد (جدول ۲). برنامهٔ حرارتی واکنش PCR برای آغازگرهای T1 و T2، L1 و L2 به صورت زیر تنظیم شد. یک چرخهٔ واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس، به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس به مدت یک دقیقه؛ اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه؛ بسط در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت یک دقیقه و یک چرخهٔ بسط نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه.

نتایج

بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بر اساس منابع شناسایی معتبر (Ellis, 1971, 1976; McKenzie *et al.*, 2010) همهٔ ۱۴۲ جدایهٔ قارچی به دست آمده از

تجزیه و تحلیل ژنتیک جمعیت‌های قارچ عامل بلاست برنج تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی درون هر جمعیت و برای کل جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار POPGENE version 1.31 انجام شد. تنوع ژنتیکی برای کل جمعیت و تنوع ژنتیکی درون هر جمعیت به ترتیب به عنوان Ht و Hs نامیده می‌شود. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، درون جمعیت‌ها و میزان جریان ژنی (Nm) (Number of migrants) نیز با کمک نرم‌افزار POPGENE محاسبه شد. جریان ژنی از طریق معادلهٔ زیر محاسبه شد (McDermott & McDonald, 1993):

$$Nm = 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}$$

که G_{st} ضریبی از تفرق ژنی است. شاخص شانون به عنوان معیار اندازه‌گیری تنوع ژنی توسط این نرم‌افزار محاسبه شد که مقدارهای زیاد این شاخص بیانگر قدرت بیشتر جاگاه نشانگر در تفکیک نمونه‌ها است و به روش زیر محاسبه می‌شود:

$$H = - \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i$$

Pi فراوانی‌های آلی در یک جایگاه ژنی و $\ln Pi$ نیز یک عدد منفی و همواره کمتر از یک است. مقادیر عددی این شاخص با استفاده از نرم‌افزار Popgen 32 محاسبه شد (Shanon & Weaver, 1949).

تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) (Analysis of Molecular Variance)

نرم‌افزار GenAlEx 6.1 (Peakall & Smouse, 2006) برای محاسبهٔ واریانس مولکولی (AMOVA) در جهت تخمین توزیع تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و یا بین جمعیت‌ها استفاده شد.

از برگ و گردن خوشه در یک مزرعه، ۱۹ جدایه به دست آمده از برگ و گردن خوشه از یک بوته و ۲۱ جدایه به دست آمده از سه لکه روی یک برگ، دارای سطح تشابه ۸۹/۲ تا ۱۰۰ درصد هستند. همچنین ۱۰۲ جدایه به دست آمده از سطح یک مزرعه در مرحله برگی دارای سطح تشابه ۸۸/۸ تا ۱۰۰ درصد هستند. ۶۱ جدایه به دست آمده از سطح مزرعه در مرحله بلاست برگ دارای سطح تشابه ۸۸/۹ تا ۱۰۰ درصد و ۴۱ جدایه به دست آمده از سطح مزرعه در مرحله بلاست گردن خوشه که با فاصله یک ماه از بلاست برگی از مزرعه به دست آمده بودند، دارای سطح تشابه ۸۸/۵ تا ۱۰۰ درصد هستند، ۲۱ جدایه به دست آمده از سطح برگ در مرحله بلاست برگ دارای سطح تشابه ۸۸/۶ تا ۱۰۰ درصد هستند و ۱۹ جدایه به دست آمده از سطح بوته در دو مرحله بلاست برگ و بلاست گردن خوشه دارای سطح تشابه ۸۸/۵ تا ۱۰۰ درصد هستند. طبق فنوگرام‌های ترسیم شده، ارتباطی بین تنوع ژنتیکی و خاستگاه و یا مرحله جداسازی جدایه‌ها (بلاست برگ و خوشه) مشاهده نشد. شکل ۱، فنوگرام مربوط به تکثیر پنج جایگاه ریز ماهواره جدایه‌های قارچ عامل بلاست برنج در سطح جدایه‌های جدا شده از برگ و گردن خوشه در یک مزرعه را نشان می‌دهد.

گیاهان برنج دارای علائم بلاست در دو مرحله بلاست برگی و بلاست گردن خوشه به گونه *Pyricularia oryzae* تعلق داشتند. آزمون SSR برای ۱۰۲ جدایه به ترتیب شامل ۶۱ و ۴۱ جدایه در دو مرحله برگ و خوشه از سطح مزرعه، ۱۹ جدایه به ترتیب شامل ۱۲ و هفت جدایه در دو مرحله برگ و خوشه از سطح یک بوته برنج و ۲۱ جدایه جداسازی شده از سه لکه روی سطح یک برگ انجام شد.

تنوع و ارتباط ژنتیکی جدایه‌های *P. oryzae*

در مجموع تعداد ۸۶ باند DNA از نشانگر مولکولی SSR با استفاده از پنج ترکیب آغازگر برای کل ۱۴۲ جدایه تکثیر شد. تعداد باندهای تکثیر شده توسط هر آغازگر به طور جداگانه در جدول ۳ آمده است. جایگاه ریز ماهواره Pymrs43-44 با ۲۱ باند تکثیر شده، بیشترین چندشکلی را در بین جایگاه‌های ریز ماهواره تکثیر شده نشان داد. جایگاه‌های ریز ماهواره Pymrs101-102، Pymrs99-100، Pymrs47-48 و Mgms13/V/ نیز به ترتیب ۱۳، ۱۵، ۱۸ و ۱۹ باند چندشکلی را دارا هستند. بر پایه فنوگرام‌های ترسیم شده، تمامی ۱۴۲ جدایه *P. oryzae* مورد بررسی شامل ۱۰۲ جدایه به دست آمده

جدول ۲. جفت آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر انتخابی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در جدایه‌های *Pyricularia oryzae*

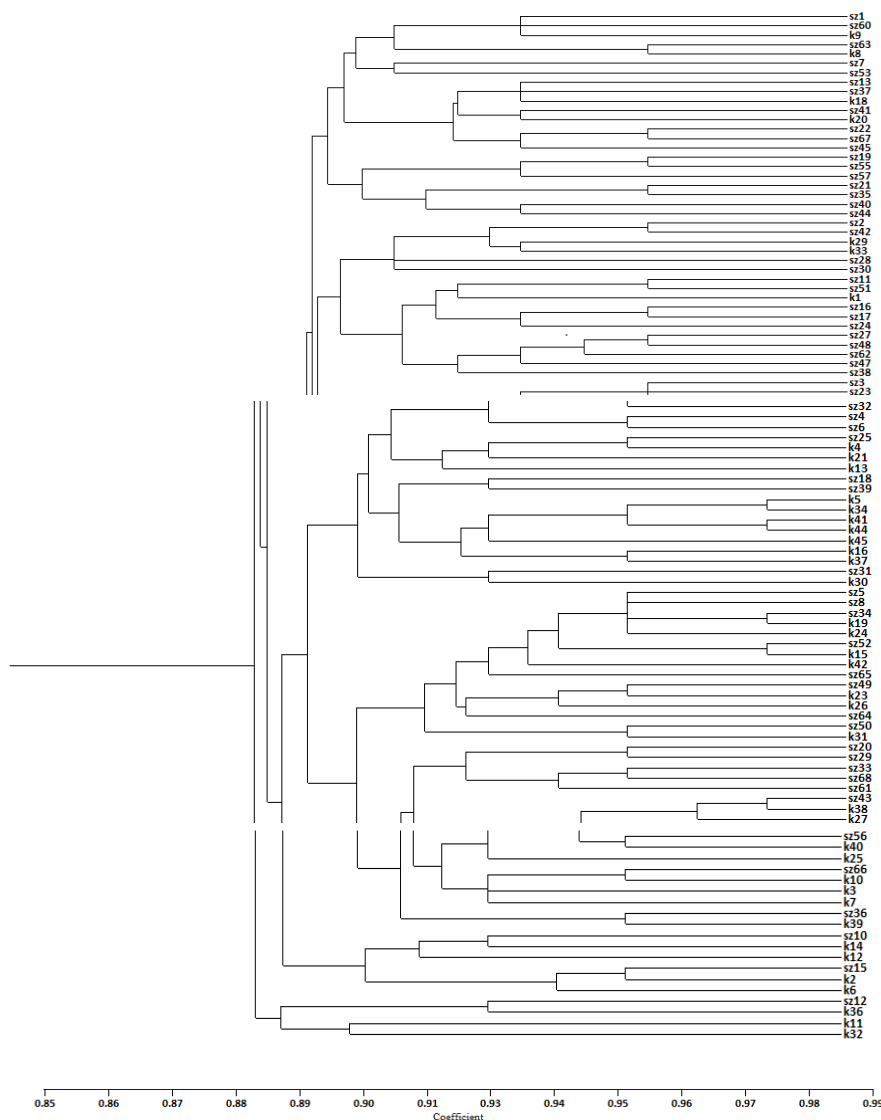
Primer locus	Idiomorph	Primer sequence (5'→3')	Expected size (bp)
L1	Mat 1-1	ATGAGAGCCTCATCAACGGCAACG	552
L2		ACAGGATGTAGGCATTTCGAGGAC	
T1	Mat 1-2	ACAAGGCAACCATCTTGGACCCTG	390
T2		CCAAAACACCGAGTGCCATCAAGC	

جدول ۳. تعداد باندهای DNA تکثیر شده توسط پنج جفت آغازگر با استفاده از نشانگر مولکولی SSR برای جدایه‌های

Pyricularia oryzae

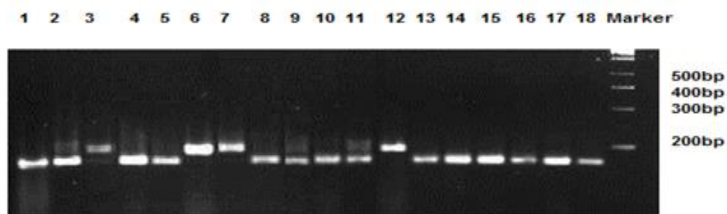
Table 3. The number of DNA bands amplified by five SSR primer pair combinations using SSR molecular markers from *Pyricularia oryzae* isolates

Number	Primer	Amplified DNA bands for locus.
1	Pymrs43-44 4(864)	21
2	Pymrs47-48 4(781)	13
3	Pymrs99-100 5(718)	15
4	Pymrs101-102 6(50)	18
5	Mgms13/V/ Sct.5.190/231851	19



شکل ۱. فنوگرام حاصل از انگشت‌نگاری SSR با استفاده از پنج آغازگر برای ۱۰۲ جدایهٔ *Pyricularia oryzae* به دست آمده از سطح یک مزرعه در دو مرحلهٔ بلاست برگ و گردن خوشه بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه SM.

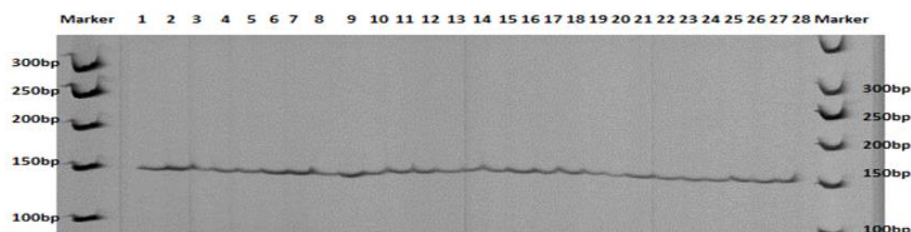
Figure 1. Phenogram of SSR fingerprinting of 102 *Pyricularia oryzae* isolates obtained from leaf and neck blast stages in the same field using UPGMA and SM similarity coefficient.



43-44

شکل ۲. الگوی DNA تکثیرشده توسط آغازگر Pyrms43-44 برای جدایه‌های *Pyricularia oryzae* در ژل آگاروز ۲ درصد. شماره‌های ۱ تا ۱۸ به ترتیب برای جدایه‌های k4, k5, k10, k18, k21, k16, k9, k6, k20, k39, k33, k37, k24, k31, k25, k40, k45, and k32 می‌باشند و M: نشان‌گر اندازه‌های DNA (100bp Gene ruler TM DNA Ladder Mix).

Figure 2. DNA pattern reproduced by primer Pyrms 43-44 for *Pyricularia oryzae* isolates in 2% agarose gel. Numbers 1 to 18 belong to k4, k5, k10, k18, k21, k16, k9, k6, k20, k39, k33, k37, k24, k31, k25, k40, k45, and k32 isolates, respectively and M: DNA size marker (100 bp Gene ruler TM DNA Ladder Mix).



شکل ۳. الگوی DNA تکثیر شده توسط آغازگر Mgms13/V برای جدایه‌های *Pyricularia oryzae* در ژل پلی اکریل آمید. شماره‌های ۱ تا ۲۷ به ترتیب برای جدایه‌های sz2, K10, sz3, sz61, sz49, K2, K13, K17, sz64, sz62, K8, K16, K20, sz5, sz1, sz40, sz7, sz27, sz16, sz30, sz34, K4, K19, sz20, sz42, K47, and K5 می‌باشند و M: نشانگر اندازه‌های DNA (100bp) (Gene ruler TM DNA Ladder Mix).

Figure 3. DNA pattern reproduced by the primer Mgms13/V for isolates of *Pyricularia oryzae* in polyacrylamide gel. Numbers 1 to 27 belong to sz2, K10, sz3, sz61, sz49, K2, K13, K17, sz64, sz62, K8, K16, K20, sz5, sz1, sz40, sz7, sz27, sz16, sz30, sz34, K4, K19, sz20, sz42, K47, and K5 isolates, respectively and M: DNA size marker (100 bp Gene ruler TM DNA Ladder Mix).

خوشه و مجموع جدایه‌های جمعیت‌های خوشه و برگ به ترتیب ۱۷، ۱۶/۸ و ۱۶/۹ برآورد شد. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر در جمعیت برگ، جمعیت خوشه و مجموع جدایه‌های جمعیت‌های خوشه و برگ به ترتیب ۱۲/۷۹، ۱۲/۶۶ و ۱۲/۷۳ تخمین زده شد. میانگین شاخص شانون نیز در جمعیت برگ، جمعیت خوشه و مجموع جدایه‌های جمعیت‌های خوشه و برگ به ترتیب ۲/۹۳ و ۲/۶۶ به دست آمد. همچنین تنوع ژنی (h) بر اساس ضریب Nei برای این دو جمعیت محاسبه شد و بر این اساس، مقدارهای تنوع ژنی در جمعیت برگ، جمعیت خوشه و مجموع جدایه‌های جمعیت‌های خوشه و برگ به ترتیب برابر ۰/۱۰۱، ۰/۰۹۷ و ۰/۰۹۲ برآورد شد. از میان ۸۶ آلل تکثیرشده و موردبررسی در پنج جایگاه ژنی، ۸۳/۳۳ درصد جایگاه‌های ژنی در میان همه جدایه‌های به‌دست‌آمده از برگ و گردن خوشه روی یک بوته برنج چند شکل بودند.

همچنین مقدارهای هتروزیگوسیتی (Ht)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (Hs)، Gst و جریان ژنی (Nm) برای کل جدایه‌های به‌دست‌آمده از یک مزرعه در دو مرحله برگ و خوشه محاسبه شد. میانگین مقدارهای هتروزیگوسیتی (Ht) ۰/۲۱ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در هر زیر جمعیت در کل جمعیت‌ها ۰/۲۰ تخمین شد. میانگین Gst نیز در بین جمعیت‌ها برابر با ۰/۱۳ برآورد شد و این نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در داخل این دو جمعیت کم است. میانگین جریان ژنی بین جدایه‌های دو جمعیت برگ و خوشه

آماره‌های محاسبه‌شده برای تجزیه و تحلیل ارتباط ژنتیکی و مقایسه جمعیت‌ها

در دو جمعیت به‌دست‌آمده از دو مرحله برگ و گردن خوشه در سطح یک مزرعه، بیشترین مقدارهای تنوع ژنی (h) و شاخص شانون (I) در میان پنج جایگاه SSR، به ترتیب برای جایگاه اول ژنی (Locus 1) با مقدارهای ۰/۹۴۸۷ و ۳ و کمترین مقدارهای این آماره‌ها برای جایگاه ژنی سوم (Locus 3) به ترتیب با مقدارهای ۰/۹۳۸۳ و ۲/۸۸۹۹ محاسبه شد.

در جمعیت‌های به‌دست‌آمده از دو مرحله برگ و گردن خوشه در سطح یک بوته برنج نیز بیشترین مقدارهای تنوع ژنی (h) و شاخص شانون (I) در میان پنج جایگاه SSR، برای جایگاه چهارم ژنی (Locus 4) و به ترتیب با مقدارهای ۰/۸۷۶۵ و ۲/۸۸ و کمترین مقدارهای برای جایگاه ژنی اول (Locus 1) با مقدارهای ۰/۸۴۵۷ و ۱/۹۲ محاسبه شد.

در بررسی سه جمعیت به‌دست‌آمده از سطح یک برگ، بیشترین مقدارهای برای تنوع ژنی (h) و شاخص شانون (I) در جایگاه ژنی سوم (Locus 3) به ترتیب با مقدارهای ۰/۸۶۴ و ۲/۰۹ و کمترین مقدارهای در جایگاه ژنی پنجم (Locus 5) با مقدارهای ۰/۸۵۴ و ۱/۹۷ محاسبه شد.

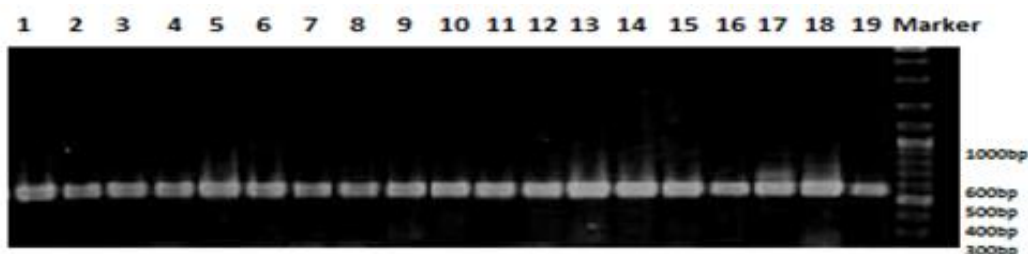
تجزیه و تحلیل ارتباط ژنتیکی و مقایسه دو جمعیت به‌دست‌آمده از برگ و گردن خوشه در یک مزرعه برنج میانگین آلل‌های مشاهده‌شده در جمعیت برگ، جمعیت

محاسبه ضریب Nei (Nei, 1973) و با استفاده از نرم‌افزار GenALEX version 6.1 و Popgen 3.2 به ترتیب ۰/۱۵۷ و ۰/۸۵۵ برآورد شد.

تجزیه و تحلیل ارتباط ژنتیکی و مقایسه دو جمعیت به دست آمده از برگ و گردن خوشه از یک بوته برنج میانگین آلل‌های مشاهده شده در جمعیت برگ، جمعیت خوشه و مجموع جدایه‌های جمعیت‌های خوشه و برگ به دست آمده از یک بوته برنج به ترتیب ۸/۶، ۸/۸ و ۸/۷ برآورد شد. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر نیز به ترتیب ۷/۰۵، ۶/۶۸ و ۶/۸۶ آلل محاسبه شد. میانگین شاخص شانون در این جمعیت‌ها به ترتیب مذکور در فوق ۲/۰۳، ۲/۰۱ و ۲/۰۲ بدست آمد. تنوع ژنی (h) محاسبه شده بر اساس ضریب Nei برای دو جمعیت برگ و خوشه در سطح یک بوته برنج، ۰/۸۵ تنوع ژنی را نشان داد. میانگین جریان ژنی بین جدایه‌های دو جمعیت برگ و گردن خوشه از یک بوته برنج در یک دوره یک‌ماهه نیز ۱۰/۶۸ تخمین زده شد.

در یک دوره یک‌ماهه بررسی، برابر با ۵۷/۶۲ تخمین زده شد که زیاد بودن این مقدار جریان ژنی نشان‌دهنده انتقال زیاد مواد ژنتیکی بین این دو جمعیت یعنی از مرحله برگ به مرحله خوشه است. به عبارتی آلودگی گیاه برنج در مرحله بلاست گردن به میزان زیادی توسط همان جمعیت ایجادکننده بلاست برگی انجام می‌شود.

نتیجه‌های تجزیه واریانس مولکولی AMOVA با استفاده از نرم‌افزار GenALEX version 6.1 در جدول ۴ درج شده است. این نتیجه‌ها نشان می‌دهند که تنوع درون دو جمعیت ۱۰۰ درصد از سهم کل تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها را شامل می‌شود، درحالی‌که تنوع ژنتیکی بین دو جمعیت در دو مرحله مختلف برگ و خوشه مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم تفکیک ژنتیکی دو جمعیت از هم است (جدول ۴ و شکل ۴). این ارزیابی نیز انتقال جمعیت قارچ از مرحله بلاست برگی به بلاست گردن خوشه را تأیید می‌کند. مقدارهای فاصله و شباهت ژنتیکی در بین دو جمعیت برگ و گردن خوشه در روی یک بوته برنج با



شکل ۴. الگوی DNA تکثیر شده با استفاده از روش Multiplex PCR برای ردیابی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی جدایه‌های *Pyricularia oryzae* در ژل آگاروز ۱ درصد. شماره‌های ۱ تا ۱۹ به ترتیب برای جدایه‌های sz1, sz5, sz13, sz25, sz11, sz40, k45, k31, sz38, sz60, k39, k33, sz33, sz34, sz47, sz6, sz15, B4, و C7 هستند و M: نشانگر اندازه‌ای DNA (100bp Gene ruler TM DNA Ladder Mix).

Figure 4. DNA pattern reproduced by Multiplex PCR for identification of mating type idiomorphs of *Pyricularia oryzae* isolates in 1% agarose gel. Numbers 1 to 19 belong to sz1, sz5, sz13, sz25, sz11, sz40, k45, k31, sz38, sz60, k39, k33, sz33, sz34, sz47, sz6, sz15, B4, and C7 isolates, respectively and M: DNA size marker (100bp Gene ruler TM DNA Ladder Mix).

جدول ۴. تجزیه واریانس مولکولی برای تخمین توزیع تنوع ژنتیکی درون و بین دو جمعیت به دست آمده از مرحله‌های بلاست برگ و گردن خوشه در سطح یک مزرعه

Table 4. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) to estimate the distribution of genetic variation among and within two *Pyricularia oryzae* populations obtained from leaf and neck blast stages within the same field

Source	Df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	1	4.176	4.176	0.000	%0
Within Pops	100	479.706	4.797	4.797	%100
Total	101	483.882		4.797	%100

Pops: Populations / Df: Degrees of Freedom / SS: Sums of Squares / MS: Mean Square / Est. Var.: Estimated Variance

بحث

پژوهش‌های فراوانی درباره بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بلاست برنج در کشور و سایر نقطه‌های جهان در سطح‌های مختلف انجام شده است (Kumar *et al.*, 1999; Tharreau *et al.*, 2009; Don *et al.*, 1999; Tosa *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; George *et al.*, 1998; Javanikkhah *et al.*, 2004; Piotii *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2006, 2007, 2012; Motlagh *et al.*, 2015). نتیجه‌های همه این پژوهش‌ها نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف قارچ عامل بلاست برنج در منطقه‌های مختلف جهان و در سطح‌های مختلف بررسی (در سطح یک قاره، کشور، منطقه) است. ولی با توجه به داده‌های موجود این اولین پژوهش درباره پویایی ژنتیک جمعیت‌های قارچ در سطح‌های مختلف درون یک مزرعه است. پژوهش حاضر در راستای ارزیابی پویایی ژنتیکی جمعیت‌های قارچ و مقایسه دو جمعیت به‌دست‌آمده از مرحله بلاست برگ و بلاست خوشه در دو سطح (سطح یک مزرعه و در سطح یک پنجه برنج) و مقایسه تنوع ژنتیکی جدایه‌های به‌دست‌آمده از سطح سه لکه مجزا روی یک برگ انجام شد. در بررسی ساختار ژنتیکی ۱۰۲ جدایه از دو جمعیت قارچ در مرحله بلاست برگ و بلاست گردن خوشه از یک مزرعه در یک فصل زراعی، نتیجه‌ها نشان دادند که این جدایه‌ها دارای تشابه ژنتیکی زیاد (۸۹ تا ۱۰۰ درصد) هستند. همچنین نتیجه‌های حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نیز نشان دادند که تنوع درون دو جمعیت ۹۹ درصد از سهم کل تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده برای دو جمعیت را شامل می‌شود و تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده بین دو جمعیت یک درصد است. از این‌رو نتیجه حاصل موید عدم تمایز و تفکیک جدایه‌ها بر اساس منشأ آن‌ها (مرحله برگ و گردن خوشه) است. فاصله ژنتیکی کم ولی شباهت ژنتیکی زیادی در مقایسه جمعیت‌های به‌دست‌آمده از برگ و گردن خوشه مشاهده شد. مقادارهای هتروزیگوتی، شاخص تنوع ژنی و شاخص شانون محاسبه‌شده برای

نتیجه‌های تجزیه واریانس مولکولی AMOVA نشان می‌دهند که تنوع درون دو جمعیت برگ و گردن خوشه از یک بوته برنج ۹۹ درصد از سهم کل تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها را شامل می‌شود، درحالی‌که تنوع ژنتیکی بین دو جمعیت مشاهده نشد که نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی این دو جمعیت باهم بود.

مقدارهای فاصله و شباهت ژنتیکی با محاسبه ضریب Nei و با استفاده از نرم‌افزارهای GenALEX version 6.1 و Popgen 3.2 در بین دو جمعیت برگ و گردن خوشه روی یک بوته برنج به ترتیب برابر ۰/۰۴۸ و ۰/۹۵۲ برآورد شدند.

تجزیه و تحلیل ارتباط ژنتیکی و مقایسه سه جمعیت به‌دست‌آمده از سه لکه مجزا در سطح یک برگ برنج میانگین آلل‌های مشاهده‌شده در جمعیت‌های A، B و C به ترتیب ۸/۸، ۸/۶، ۸/۴ و ۸/۶ برآورد شد. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر در جمعیت‌های A، B و C به ترتیب ۷/۴۶، ۷/۳۰، ۶/۶۸ و ۷/۱۵ آلل محاسبه شد. میانگین شاخص شانون در این جمعیت‌ها به ترتیب مذکور در فوق ۲/۰۷، ۲/۰۵، ۲/۰۰ و ۲/۰۴ به‌دست آمد. تنوع ژنی (h) براساس ضریب Nei برای جمعیت‌های A، B و C ۰/۸۵ تنوع ژنی را نشان داد.

میانگین جریان ژنی بین جدایه‌های سه لکه سطح برگ برنج ۴/۷۸۳ تخمین زده شد. نتیجه‌های تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان می‌دهند که تنوع درون دو جمعیت ۹۹ درصد از سهم کل تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها را شامل می‌شود، درحالی‌که تنوع ژنتیکی بین سه جمعیت به‌دست‌آمده از سه لکه مجزا مشاهده نشد که نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی جمعیت‌های مذکور است.

فراوانی ایدئومورف‌های تیپ آمیزشی

در این آزمون، برای تمامی جدایه‌ها یک قطعه ۵۵۲ جفت بازی تکثیر شد و بنابراین تیپ آمیزشی تمام جدایه‌ها به‌عنوان MAT1-1 تعیین شد (شکل ۵).

ژنتیکی مشابه هستند. این پدیده نیز می‌تواند نشان‌دهنده توانایی انتقال بیماری توسط کنیدیوم‌های بیماری‌زای قارچ از بافت برگی برنج به بافت گردن خوشه در یک بوته باشد.

در بررسی ساختار ژنتیکی سه جمعیت کوچک به‌دست‌آمده از سطح سه لکه برگی روی یک برگ در یک بوته و ۲۱ جدایه به‌دست‌آمده از سه لکه مجزا روی یک برگ، شباهت ژنتیکی بین آن‌ها ۸۸/۵ تا ۱۰۰ درصد محاسبه شد. همچنین هیچ ارتباطی بین گروه‌های انگشت‌نگاری DNA و منشأ جدایه‌ها از لکه‌های برگ مشاهده نشد. به‌طوری‌که جدایه‌های به‌دست‌آمده از لکه‌های مجزا در گروه‌های مشترک کنار یکدیگر قرار گرفتند. نتیجه‌های حاصل از تجزیه واریانس AMOVA نیز مؤید عدم تمایز ژنتیکی جدایه‌های به‌دست‌آمده از سه لکه برگی بلاست و عدم تفکیک جدایه‌ها بر اساس لکه‌ها بود. این نتیجه‌ها جریان بالای ژنوتیپی و انتقال کنیدی‌های بیمارگر در سطح‌های لکه‌های موجود در یک برگ را نشان می‌دهد.

در این پژوهش در ارزیابی هم‌زمان سه سطح موردبررسی، از بین جایگاه‌های تکثیرشده، جایگاه Pymrs43-44 بیشترین تعداد باندهای چند شکل و بیشترین مقدارهای محاسبه‌شده برای هتروزیگوسیتی، شاخص شانون و شاخص تنوع ژنی را داشت. از این‌رو می‌توان گفت این جایگاه توانایی بیشتری را در نشان دادن تنوع ژنتیکی از بین تمام جایگاه‌ها داشته است. این نتیجه‌ها با پژوهش Motlagh *et al.* (2015) نیز سازگاری داشت. Motlagh *et al.* (2015) از ۱۴ جایگاه ریز ماهواره برای بررسی ژنتیک جمعیت قارچ عامل بیماری بلاست برنج در استان گیلان استفاده نمودند. مشابه پژوهش حاضر، در بررسی ایشان نیز جایگاه Pymrs43-44 بیشترین محتوای جایگاه چندشکل (PIC=0.85)، تعداد آلل مشاهده‌شده (na=8) و تعداد آلل مؤثر (ne=3.76) و شاخص شانون (I=1.38) را داشت و به‌عنوان بهترین آغازگر در میان ۱۴ ترکیب مورد استفاده شناخته شد. بنابراین، این جایگاه به‌عنوان ابزار مناسبی برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این قارچ پیشنهاد می‌شود.

جایگاه‌های موردبررسی نیز نشان دادند که اگرچه تفاوت چندانی بین آماره‌های محاسبه‌شده برای دو جمعیت وجود ندارد، ولی این مقادارها به‌طور نسبی در مرحله بلاست برگی بیشتر از مقدارهای محاسبه‌شده در مرحله بلاست گردن خوشه هستند. همچنین مقدارهای بسیار جریان ژنی بین دو جمعیت (۵۷/۶۲) نیز تبادل مواد ژنتیکی بین دو مرحله بلاست برگ و خوشه را نشان می‌دهد که تأییدکننده نتیجه‌های حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و مقدارهای محاسبه‌شده برای آماره‌های هتروزیگوتی، شاخص تنوع ژنی، شاخص شانون، فاصله و شباهت ژنتیکی است. سرانجام این نتیجه‌ها نشان می‌دهند دو جمعیت برگ و خوشه به لحاظ ژنتیکی مشابه هستند. این نتیجه‌ها نمایانگر توانایی انتقال بیماری توسط کنیدیوم‌های بیماری‌زای قارچ از بافت برگی برنج به بافت گردن خوشه و توانایی بیماری‌زایی کنیدیوم‌های بیماری‌زا در بافت‌های مختلف یک گیاه برنج در طی مرحله‌های مختلف فنولوژی میزبان است.

در بررسی ساختار ژنتیکی دو جمعیت به‌دست‌آمده از مرحله بلاست برگ و بلاست گردن خوشه از یک بوته، دندروگرام تنوع ژنتیکی رسم شده بر اساس الگوی انگشت‌نگاری DNA جدایه‌ها نشان داد که این جدایه‌ها دارای سطح تشابه ۸۸/۵ تا ۱۰۰ درصد هستند. نتیجه‌های حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نیز مؤید عدم تمایز و تفکیک جدایه‌ها بر اساس منشأ جدایه‌ها (مرحله برگ و گردن خوشه) بود. مقدارهای محاسبه‌شده برای آماره‌های فاصله و شباهت ژنتیکی، هتروزیگوتی، شاخص تنوع ژنی و شاخص شانون محاسبه‌شده برای جایگاه‌های موردبررسی نیز نشان داد که تفاوت چندانی بین این آماره‌ها بین دو جمعیت برگ و خوشه وجود ندارد، ولی مشابه سطح بررسی قبلی، این مقدارهای نیز به‌طور نسبی در مرحله بلاست برگی بیشتر از مقدارهای محاسبه‌شده در مرحله بلاست گردن خوشه هستند. همچنین برآورد مقدار جریان ژنی بین دو جمعیت (۱۰/۶۸) نشان‌دهنده تبادل زیاد مواد ژنتیکی بین دو جمعیت به‌دست‌آمده از مرحله بلاست برگ و خوشه است. این نتیجه بیان می‌کند دو جمعیت برگ و خوشه به لحاظ

پژوهش‌هایی که در زمینه زیست‌شناسی جمعیت‌های این بیمارگر صورت پذیرفته است، کاهش اندک میزان تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده در مرحله بلاست گردن خوشه در مقایسه با بلاست برگ می‌تواند با قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های مرحله برگ در سایر مرحله‌های رشدی میزبان در ارتباط بوده و کاهش تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده ناشی از عدم موفقیت تعدادی از جدایه‌های مرحله برگ در بیماری‌زایی در مرحله گردن خوشه باشد. این نتیجه‌ها با پژوهش Keller et al. (1997) و Gatak et al. (2013) نیز هم‌خوانی دارد، چنانکه در پژوهش ایشان نیز مشخص شد میزان تنوع ژنتیکی و فراوانی آلل‌ها در مرحله بلاست برگ بیشتر از مرحله بلاست گردن خوشه است. این محققین ریزش ژنتیکی (عدم توانایی آلوده‌سازی جدایه‌های مرحله برگ روی خوشه) را به‌عنوان عامل تغییر در فراوانی آلل‌ها در جایگاه‌های ژنتیکی تکثیرشده در جمعیت‌های موردبررسی مؤثر دانسته‌اند (Keller et al., 1997; Gatak et al., 2013).

همچنین در یک پژوهش دیگر، تنوع ژنتیکی ۴۹ جدایه *P. oryzae* به‌دست‌آمده از مرحله بلاست برگ و بلاست خوشه از سطح یک مزرعه برنج با استفاده از یک جفت آغازگر Pot2 و فن rep-PCR موردبررسی قرار گرفته است (Salimi et al., 2014). نتیجه‌های این پژوهش نشان داد که در سطح تشابه ۷۹ درصد، جدایه‌ها در ده گروه انگشت‌نگاری قرار می‌گیرند. بر این اساس به‌طور مشابه هیچ ارتباطی میان گروه‌های انگشت‌نگاری و منشأ جدایه‌ها (برگ و یا خوشه) مشاهده نشد. نتیجه‌های بررسی ژنتیک جمعیت، شباهت ژنتیکی زیاد و فاصله ژنتیکی کم بین دو جمعیت برگ و خوشه به‌دست‌آمده از سطح یک مزرعه را نشان داد. همچنین مشابه پژوهش حاضر، میزان جریان ژنی زیادی بین دو جمعیت به‌دست‌آمده از برگ و خوشه مشاهده شد که نشان‌دهنده تبادلات ژنتیکی زیاد بین دو جمعیت بلاست برگ و خوشه است. از این‌روی نتیجه‌های این پژوهش، نتیجه‌های حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های به‌دست‌آمده در دو مرحله برگ و خوشه را با استفاده از یک جفت آغازگر Pot2 و تکنیک rep-PCR تأیید می‌کنند.

همچنین در پژوهش Suzuki et al. (2012) ۱۲ آغازگر ریز ماهواره برای بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی ۲۹۳ جدایه از قارچ *P. oryzae* که از ۱۶ استان در غرب ژاپن گردآوری شده بودند، استفاده شدند. نتیجه‌های این پژوهش سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌های موردبررسی و نرخ بالای تبادلات ژنی در بین جمعیت‌های منطقه‌های مختلف موردبررسی را نشان داد که می‌تواند به دلیل انتشار اسپورها و بذرها در برنج در بین منطقه‌های مختلف کشت برنج باشد. نتیجه‌های این پژوهش با پژوهش حاضر و سایر محققین (Javan-Nikkhah et al., 2004; Hemmati, 2004; Motlagh et al., 2015) نیز سازگاری دارد، به‌طوری در بررسی جمعیت‌های قارچ عامل بلاست برنج در ایران تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی مشاهده می‌شود.

کم بودن مقادیرهای تفاوت ژنتیکی، بالا بودن مقادیرهای شباهت ژنتیکی و نزدیک بودن آماره‌های هتروزیگوسیتی، تنوع ژنی و شاخص شانون به همراه مقادیرهای محاسبه‌شده برای تجزیه واریانس مولکولی AMOVA و جریان ژنی نشان‌دهنده مشابه بودن جمعیت‌های برگ و گردن خوشه در سطح یک مزرعه در این پژوهش است. از این‌روی می‌توان استنتاج نمود که جدایه‌های مرحله بلاست برگ منشأ آلودگی در مرحله بلاست گردن خوشه نیز هستند. فاصله زمانی کوتاه بین (حدود یک ماه) مرحله برگ و مرحله گردن خوشه، انتقال کنیدیوم‌های بیماری‌زا از برگ‌های آلوده به گردن خوشه برنج و حرکت بیمارگر در طی مرحله‌های مختلف فنولوژیک گیاه را در یک مزرعه را حتمی می‌سازد. سرانجام می‌توان نتیجه گرفت بیمارگرهای مرحله بلاست برگ منشأ آلودگی‌های ثانویه در مرحله‌های مختلف فنولوژی گیاه میزبان هستند. عدم سم‌پاشی در مزرعه موردپژوهش در طول فصل زراعی نیز باعث کاهش قدرت نیروهای تاثیرگذار در تنوع ژنتیکی و تسهیل انتقال آلودگی از سطح برگ به گردن خوشه در طول یک فصل زراعی است. بر اساس آماره‌های ژنتیکی محاسبه‌شده، میزان تنوع ژنتیکی در جدایه‌های به‌دست‌آمده در مرحله برگ بیشتر از میزان تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده در مرحله گردن خوشه در هر دو سطح بررسی‌شده (سطح یک بوته برنج و یک مزرعه) بود. با توجه به

نژادها و منشأ تغییرها در این قارچ صورت پذیرفته است، پدیده شبه جنسی (parasexualism) یا نوترکیبی غیرجنسی به‌عنوان مهم‌ترین عامل در بروز تغییرهای ژنتیکی قارچ عامل بلاست برنج در جهان شناخته شده است (Zeighler *et al.*, 1994). در کشور ما نیز با توجه به عدم ردیابی و شناسایی هر دو ایدیومورف تیپ آمیزشی و عدم مشاهده تولیدمثل جنسی در طبیعت به نظر می‌رسد وجود تنوع زیاد در رقم‌های مختلف برنج و مساعد بودن شرایط آب و هوایی برای تکثیر غیرجنسی و طبیعتاً بروز نوترکیبی غیرجنسی از طریق پدیده شبه جنسی در کنار سازگاری رویشی مهم‌ترین عامل‌ها در بروز تغییرهای ژنتیکی قارچ عامل بلاست برنج در شمال کشور محسوب می‌شوند.

در بررسی وضعیت باروری و پراکنش ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در سطح یک مزرعه برنج، تیپ آمیزشی تمامی جدایه‌ها به‌عنوان *MATI-1* شناسایی شد. نتیجهٔ پژوهش‌های محققین دیگر نیز نشان می‌دهد، فقط یک تیپ آمیزشی (*MATI-1*) در میان جمعیت‌های این قارچ در شمال ایران وجود دارد (Mousanejad *et al.*, 2005; Hemmati *et al.*, 2005; Zarrinnia *et al.*, 2011). بر اساس این نتیجه‌ها، می‌توان گفت احتمال وقوع تولید مثل جنسی این قارچ در شمال کشور ضعیف است و احتمالاً سایر عامل‌های تغییرپذیری باعث ایجاد تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های این قارچ در شمال کشور هستند. طی پژوهش‌های زیادی که در رابطه با تغییرپذیری

REFERENCES

- Bonman, J. M., Estrada, B. A. & Bandong, J. M. (1989). Leaf and neck blast resistance in tropical lowland rice cultivars. *Plant Disease*, 73, 388-390.
- Chen, D., Zeigler, R. S., Leung, H. & Nelson, R. J. (1995). Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. *Phytopathology*, 85, 1011-1020.
- Couch, B. C. & Khohn, M. L. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicate segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae* from *Magnaporthe grisea*. *Mycologia*, 94, 683-693.
- Don, L. D., Tosa, Y., Nakayashiki, H. & Mayama, S. (1999). Population structure of the rice blast fungus in Vietnam. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 65, 475-479.
- Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. *Commonwealth Mycological Institute*, 608 p, Kew, England.
- Ellis, M. B. (1976). More Dematiaceous Hyphomycetes. *Commonwealth Mycological Institute*, 507 p, Kew, England.
- Estoup, A. & Guillemaud, T. (2010). Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what?. *Molecular Ecology*, 19, 4113-4130.
- Fisher, R. A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection* (1st ed.). Clarendon Press, Oxford.UK.
- 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.
- Ghatak, A., Willocquet, L., Savary, S. & Kumar, J. (2013). Variability in aggressiveness of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) isolates originating from rice leaves and necks: a case of pathogen specialization?. *PLoS ONE*, 8(6), e66180.
- Hemmati, R., Javan-Nikkhah, M., Okovvat, S. M. & Ghazanfari, K. (2005). Study on genetic diversity of *Magnaporthe grisea* using PCR and determination of the mating type alleles distribution in Mazandaran province, Iran. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 70(3), 311-313.
- Javan-Nikkhah, M., McDonald, B. A. & Banke, S. (2004). Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* population based on rep-PCR fingerprinting. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 909-919.
- Kang, S., Chumley, F. G. & Valent, B. (1994). Isolation of the mating-type genes of the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea* using genomic subtraction. *Genetics*, 138, 289-296.
- Keller, S. M., McDermott, J. M., Pettway, R. E., Wolfe, M. S. & McDonald, B. A. (1987). Gene flow and sexual reproduction in the wheat glume blotch pathogen *Phaeosporaria nodorum* (anamorph *Stagonospora nodorum*). *Phytopathology*, 77, 353-358.
- Kumar, J., Nelson, R. J. & Zeigler, R. S. (1999). Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. *Genetics*, 152, 971-984.
- Levy, M., Romao, J., Marchetti, M. A. & Hamer, J. E. (1991). DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *Plant Cell*, 3, 95-102.

17. Liu, D., Coloe, S., Baird, R. & Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 471.
18. McDonald, B. A. & Linde, C. (2002). The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, 124, 163-180.
19. McDonald, B.A. (1997). The population genetics of fungi. Tools and techniques. *Phytopathology*, 87, 448-453.
20. Mckenzie, E. H. C., Park, D., Bellgard, S. E. & Johnston, P. R. (2010). A new species of *Pyricularia* (Hyphomycetes) on *cortoderia* (Poaceae) in Newzealand. *Mycosphere*, 1, 223-228.
21. Moumeni, A. & Leung, H. (2003). Genetic and molecular analysis of blast resistance in rice using RFLP, simple repeats and defense-related candidate gene markers. *Iranian Journal of Biotechnology*, 1, 47-54
22. Mousanejad, S., Mohammadi Goltapeh, E. & Javan-Nikkhah, M. (2004). Study on the fertility status and the distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe grisea*, causal agent of rice blast, in Guilan province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 40, 201-220.
23. Noguchi, M.T., Yasuda, N. & Fujita, Y. (2007). Fitness characters in parasexual recombinants of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 41, 123-131.
24. Ou, S. H. (1985). *Rice Disease* (2nd ed.). Commonwealth Agricultural Bureaux. 308 pp.
25. Peakall, R. & Smouse P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
26. Piotti, E., Rigano, M. M., Rodino, D., Rodolfi, M., Castiglione, S., Picco, A. M. & Sala, F. (2005). Genetic structure of *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. isolates from Italian paddy fields. *Journal of Phytopathology*, 153, 80-86.
27. Safari motlagh, M. R., Hbibi, F. & Ebadi, A. A. (2015). Genetic diversity of *Pyricularia grisea*, the causal agent of rice blast by SSR. *Acta Scientiarum Polonorum., Hortorum Cultus*, 14(1), 15-28.
28. Salimi, F., Javan-Nikkhah, M., Padasht Dehkayi, F. & Alizadeh, A. (2014). Genetic diversity of *Magnaporthe oryzae* isolates at the leaf and panicle neck stages in the same rice field. *21st Iranian Plant Protection Congress*. August, 23-26, Urmia University, Urmia, Iran. (in Farsi)
29. Sharif, Gh. & Ershad, J. (1966). *A list of infecting fungi on crops, trees and shrubs in Iran*. Institute of Pest and Disease Research of Iran, Tehran, Iran. (in Farsi)
30. Shannon, C. E. & Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication. *The University of Illinois*. Urbana, Chicago, London. pp. 3-24.
31. Silva, G. B., Prabhu, A. S., Filippi, M. C. C., Trindade, M. G., Araújo, L. G. & Zambolim, L. (2009). Genetic and phenotypic diversity of *Magnaporthe oryzae* from leaves and panicles of rice in commercial fields in the State of Goiás, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 34(2), 77-86.
32. Suzuki, F., Arai, M. & Yamaguchi, J. (2006). DNA fingerprinting of *Pyricularia grisea* by rep-PCR using single primers designed from the terminal inverted repeat of each of the transposable elements Pot2 and MGR586. *Journal of General Plant Pathology*, 72, 314-317.
33. Suzuki, F., Arai, M. & Yamaguchi, J. (2007). Genetic analysis of *Pyricularia grisea* population by rep-PCR during development of resistance to scytalone dehydratase inhibitors of melanin biosynthesis. *Plant Disease*, 91, 176-184.
34. Suzuki, F., Fuji, S., Koba, A., Nakajima, T. & Arai, M. (2012). Analysis of genetic diversity and population structure in *Pyricularia oryzae* collected from western Japan using SSR markers. *Japanese Journal of Phytopathology*, 78, 10-17.
35. Tharreau, D., Fudal, I., Andriantsimialona, D., Santoso, U., Tami, D., Fournier, E., Lebrun, M. H. & Notteghem, J. L. (2009). World population structure and migration of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. In: G. L. Wang, B. Valent, (eds.) *Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease*. (pp. 209-215). Dordrecht, the Netherlands, Springer.
36. Tosa, Y., Osue, J., Oh, H. S., Nakayashiki, H., Mayama, S. & Leong, S. A. (2005). Evolution of an avirulence gene, AVR 1-C O 3 9, concomitant with the evolution and differentiation of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 18: 1148-1160.
37. Tredway, L., Stevenson, P. K. L. & Burpee, L. L. (2005). Genetic Structure of *Magnaporthe grisea* populations associated with *St. augustinegrass* and tall fescue in Georgia. *Phytopathology*, 95(5), 463-471.
38. Xue, M., Yang, J., Li, Z., Hu, S., Yao, N. & Dean, R. A. (2012). Comparative analysis of the genomes of two field isolates of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Genetics*, 8, e1002869.
39. Zarrinnia, V., Javan-Nikkhah, M., Zamanizadeh, H. R., Mehrabi, R. & Khosravi, V. (2011). An investigation of the pathogenicity characteristics of *Magnaporthe grisea* isolates collected from different host plants from the family Poaceae and race determination of the pathogenic isolates. *Iranian Journal of Plant Protection*, 42, 179-190. (in Farsi)
40. Zeighler, R. S., Thome, J., Levy, M. & Correa-Victoria, F. (1994). Linage exclusion: A proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. In: R. S. Zeighler, S. A. Leong and P. S. Teng. *Rice Blast Disease*. (pp. 267-292). Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, UK.