مطالعه شدت بیماریزایی و تنوع مولکولی *Puccinia striiformis* f.sp.*tritici* (عامل بیماری زنگ زرد گندم) در ایران

حجت اله ربانی نسب*- محمود اخوت - محمد ترابی - مهرداد عباسی - جواد مظفری[1]

تاریخ دریافت:۸۶/۱/۱۹
تاریخ پذیرش:۸۷/۴/۲۳

چکیده

به منظور مطالعه فنوتیپ‌های بیماریزا و تنوع مولکولی عامل بیماری زنگ زرد گندم (*Puccinia striiformis* f.sp.Westend. *tritici* Eriks.) در ایران ۸۵ جدایه از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری و تکثیر شد. تعیین نژاد جدایه‌ها به روش جانسون و همکاران انجام گرفت. به‌علاوه جدایه‌ها به کمک آزمون AFLP و با استفاده از چهار ترکیب آغازگر بررسی شدند. مجموعا ۳۵ نژاد فیزیولوژیک شناسائی شد. نژاد 178E0A با هفت عضو فراوانترین نژاد و نژاد $^{+}$64E241A با ۵ عضو در رتبه بعدی قرار گرفت. برای اغلب ژنهای مقاومت موجود در ارقام استاندارد بیماریزایی دیده شد. روی ارقام تجاری حاوی ژنهای مقاومت *Yr*5 ، *Yr*3 و *Yr*1 (به استثنای چهار جدایه) بیماریزایی مشاهده نشد. بیماریزایی برای ژنهای *Yr*2، *Yr*24،*Yr*7 و *Yr*A تقریباً در همه جای کشور مشاهده شد که در صورت تایید نهایی این ژنها باید از برنامه به نژادی کنار گذاشته شوند. در آزمون AFLP به‌طور متوسط، به ازای هر ترکیب آغازگر ۷۸ باند شناسائی شد که به‌طور میانگین۳۱ درصد آنها پلی مورفیک بودند . بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار NTSYS در سطح ضریب شباهت ۷۷ درصد کل جدایه‌ها در ۹ گروه اصلیA، B، C ، D، E، F، G، H و I و ۱۰گروه تک جدایه ای جای گرفتند. بین مناطق جغرافیائی و گروههای انگشت نگاری AFLP ارتباط قابل توجهی وجود داشت. هر چند بین نژادها و این گروهها ارتباط مشخصی مشاهده نشد. نتایج نشان داد شباهت ژنتیکی اکثر جمعیت‌ها با جمعیت غرب و شمال غرب (شامل استانهای ایلام، همدان، کرمانشاه و اردبیل) بیشتر از ۶۵ درصد است. بر این اساس که احتمالاً جریانات مدیترانه ای و سودانی در نقل و انتقال اسپورها در ایران نقش داشته است و شرایط مناسب و وقوع جریان ژنی باعث نزدیکی ژنتیکی جمعیت‌ها به یکدیگر شده است.

واژه‌های کلیدی: گندم، زنگ زرد ، بیماریزایی، تنوع ژنتیکی، AFLP، نژاد

مقدمه

زنگ زرد گندم یکی از مهمترین و خسارت‌زاترین بیماریهای گندم در بسیاری از مناطق جهان است (۲۴). از طرف دیگر کشت ارقام حساس، تغییر پذیری در عامل بیماریزا و وجود شرایط اقلیمی مناسب باعث بروز همه گیری[2] ویران کننده این بیماری می شود. عامل بیماری به‌وسیله یوردینیوسپورهای دیکاریوتیک هوازاد منتشر می‌شود. مناسبترین روش کنترل موثر زنگ زرد گندم

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد دانشگاه تهران، محقق بازنشسته مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ،محقق مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و محقق مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر
*- نویسنده مسئول Email:hrabbani wsr@yahoo.com

2 - Epidemy

استفاده از ارقام مقاوم است. در بسیاری از موارد، استفاده از ژنهای مقاومت اختصاصی به عنوان یک روش کنترل، موفقیت آمیز نبوده است چرا که جمعیت بیمارگر به سرعت دچار دگرگونی شده و در عرض چند سال قادر خواهد بود بر ژنهای مقاومت معرفی شده غلبه نمایند(۱۰، ۲۲ و ۲۳). بنابراین اطلاعات بیشتری در خصوص ساختار ژنتیکی جمعیت‌های موجود مورد نیاز است تا بتوان تاثیرات این مقاومت‌ها را ارزیابی و یا پیش بینی کرد.

در تحقیق حاضر ارتباط بین نژادهای فیزیولوژیک و گروههای انگشت نگاری DNA و همچنین مناطق جغرافیائی و ارقام گندم میزبان مورد توجه قرار گرفت. نژادها بر اساس نوع آلودگی که بر روی گروهی از ژنوتیپ‌ها یا لاین‌های تک‌ژنی انتخابی ایجاد می‌نمایند و به نام ارقام افتراقی معروف هستند، شناسائی می‌شوند.هانگر فورد و اونز (۱۴) اولین گزارش را از وجود واریته‌های اختصاصی *P. striiformis* بر اساس اختصاص یافتگی روی جنس گندم و سایر گندمیان ارائه نمودند. هر چند آلیسون و آیسنبک (۷) اولین کسانی بودند که وجود نژادهای *P.striiformis* f.sp. *tritici* را بر اساس اختصاص یافتگی روی ارقام گندم بیان نمودند.

در ایران از سال ۱۳۴۲ مطالعه روی نژادهای فیزیولوژیک زنگها آغاز گردید (۲۱) و در سال ۱۳۴۶ دو بیوتیپ 20A و 25A گزارش شد که گستردگی وسیعی در ایران داشته و اکثر همه گیری‌ها در اثر این بیوتیپ‌ها به وجود می آمد. بامدادیان (۸) هشت نژاد و بیوتیپ به اسامی 14/8، 14/8A، 19، 2D، 20A و 25A را از نقاط مختلف کشور گزارش نمود. و ی همچنین بیوتیپ جدیدی از زنگ زرد به نام 96E16 را از روی ارقام پرمحصول آزادی و قدس گزارش نمود (۹). نژادهای تعیین شده زنگ زرد گندم طی سالهای ۱۳۷۲و ۱۳۷۳ با استفاده از سیستم پیشنهادی جانسون و همکاران (۱۵) نشان دهنده تنوع بیماریزایی عامل بیماری در نقاط مختلف کشور بوده و برای اکثر ژنهای مقاومت بیماریزایی مشاهده شده است. هرچند که برای برخی از ژنهای مقاومت بالا فراوانی بیماریزایی بسیار پایین بوده است (۱). در سال زراعی ۷۶-۷۵ برای ژنهای *Yr*A, *Yr*25,*Yr*24, *Yr*10, *Yr*9, *Yr*7, *Yr*6, *Yr*4, *Yr*2 و *Yr*SD بیماریزایی گزارش شده بیماریزایی برای *Yr*4 برای اولین بار در کشور دیده شد(۲). در سال زراعی ۷۸-۷۷ برای ژنهای *Yr*SD, *Yr*24,*Yr*23, *Yr*22, *Yr*19, *Yr*9, *Yr*8, *Yr*7, *Yr*2, *Yr*1 و *Yr*A بیماریزایی گزارش شد و برای ژنهای *Yr*SP, *Yr*CV, *Yr*ND, *Yr*10, *Yr*5, *Yr*4, *Yr*3 بیماریزایی مشاهده نشد. بیماریزایی برای ژن *Yr*1 برای اولین بار در گلخانه به ثبت رسید. این وضعیت توسط لاین ایزوژنیک *Yr*1/6*Arozet-S نیز تایید شد (۳). طی تعیین نژاد ۱۰ جدایه زنگ زرد از نقاط مختلف کشور برای ژنهای *Yr*SU, *Yr*ND, *Yr*CV, *Yr*24, *Yr*23, *Yr*22, *Yr*19, *Yr*9, *Yr*8, *Yr*7,*Yr*6, *Yr*2 و *Yr*A بیماریزایی گزارش گردید. بیماریزایی برای ژنهای *Yr*24, *Yr*23, *Yr*22, *Yr*9, *Yr*7,*Yr*6, *Yr*2 و *Yr*A در همه جدایه‌ها مشترک بود(۲۰). درسال زراعی ۷۹-۷۸ برای ژنهای *YrND, YrSu,YrCV, Yr*A, *Yr*25, *Yr*10, *Yr*9,*Yr*8, *Yr*7, *Yr*6, *Yr*4,*Yr*3, *Yr*2 و *Yr*SD بیماریزایی گزارش شد. مانند سالهای قبل بیشترین فراوانی بیماریزایی برای ژنهای *Yr*9, *Yr*7, *Yr*6, *Yr*2 و *Yr* A گزارش گردید(۴). برای ژنهای *Yr*A, *Yr*24, *Yr*10, *Yr*9,*Yr*8, *Yr*7,*Yr*6, *Yr*2 و *YrND* در سال زراعی ۸۱-۸۰ بیماریزایی گزارش شده و بیشترین فراوانی بیماریزایی برای ژنهای *Yr*24, *Yr*9, *Yr*7, *Yr*6, *Yr*2 و *Yr* A بود (۵). درتعیین نژاد ۱۱ جدایه زنگ زرد از سال زراعی ۸۴-۸۳ برای ژنهای *Yr*A, *YrSu,YrCV,YrSD,Yr*27, *Yr*24, *Yr*10, *Yr*9, *Yr*7,*Yr*6, *Yr*2 و *YrND* بیماریزایی گزارش شده، بیشترین فراوانی بیماریزایی برای ژنهای *Yr*24, *Yr*9, *Yr*7, *Yr*6, *Yr*2 و *Yr* A مشاهده شد(۶) . در گذشته تعیین تنوع ژنتیکی قارچ‌ها منحصراً به کمک تعیین نژاد و بر پایه استفاده از گروهی از

ارقام افتراقی استوار بود. گر چه این روش مزایا و معایب خاص خود را داشت ولی در جای خود به عنوان بهترین و مهمترین روش برای تعیین تفاوت ژنتیکی جمعیت‌های قارچ محسوب می‌شد. با ابداع روشهای مولکولی مبتنی بر DNA، شناسائی ژنوتیپ قارچ‌ها دچار تحول گردید. تحقیقات نشان داده است روش انگشت نگاری DNA ، ابزاری قدرتمند برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ‌ها می‌باشد. با استفاده از این تکنیک جمعیت‌های متعددی از قارچ عامل زنگ زرد گندم در نقاط مختلف دنیا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و ابهامات آزمایشهای بیماریزایی برطرف گردیده است. این روش توانایی محققین را در گروهبندی ژنوتیپ‌های قارچ مزبور به‌طور فزاینده‌ای بالا برده است. عیب اساسی تکنیک‌های مولکولی پر هزینه بودن آنها می‌باشد، لذا گرچه نتایج حاصل از این تکنیک‌ها به علت تجزیه و تحلیل DNA بسیار به واقعیت نزدیک است ولی هزینه زیاد، به‌کارگیری آنها را دچار محدودیت می‌کند.

نشانگر AFLP[1] به عنوان یک نشانگر مولکولی DNA و مبتنی بر PCR کاربرد زیادی در مطالعات مولکولی داشته است. نشانگر AFLP برای مطالعه جمعیت‌های قارچی با تنوع ژنتیکی پائین بسیار مناسب است چرا که مارکرهای تکرار پذیر کافی فراهم می‌نماید(۱۳). در سالهای اخیر با توسعه روش‌های مبتنی بر DNA، بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های زنگ زرد گندم و مطالعه تنوع ژنتیکی *P. striiformis* f.sp. *tritici* توسط دانشمندان مختلف انجام شده است. چن و همکاران(۱۱) جزء اولین کسانی بودند که از مارکرهای مولکولی برای تعیین ساختار جمعیت قارچ عامل بیماری زنگ زرد گندم استفاده نمودند.آنها در بررسی ۱۱۵ جدایه، پلی مورفیسم DNA را بین نژادها نشان دادند. با تجزیه و تحلیل نتایج RAPD[2] و کلاستر بندی آنها جدایه‌های بیماریزا روی ژن مقاومت *Yr1* از جدایه‌های غیربیماریزا روی ژن مقاومت *Yr1* متمایز شدند. آنها یک ارتباط ضعیف اما مهم بین بیماریزایی و گروههای RAPD شناسایی نمودند. این نتایج همچنین نشان داد که که پلی مورفیسم DNA مستقل ازبیماریزایی است.

لوریس و همکاران (۱۷) تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *P. striiformis* f.sp. *tritici* را در طی اپیدمی‌های طبیعی به کمک نشانگر AFLP و چهار ترکیب آغازگر مطالعه نمودند. در این تحقیق ۶۷ مارکر پلی مورفیک برای ۲۴۷ جدایه آزمایش شده ردیابی گردید. در این مطالعات هیچ ارتباطی بین الگوی AFLP و پاتوتیپ‌ها وجود نداشت. هافمولر و همکاران (۱۳) مهاجرت اوردینیوسپورهای *P.striiformis* f.sp.*tritici* را در شمال غرب اروپا بین کشورهای دانمارک، فرانسه، انگلستان و آلمان بر اساس نشانگر AFLP بررسی کردند. مجموعاً ۲۸ باند پلی مورفیک AFLP ردیابی و بر این اساس ۲۰ گروه فنوتیپی AFLP شناسایی شد. آنالیز تنوع AFLP نشان داد که قارچ به فراوانی بین انگلستان،آلمان، فرانسه و دانمارک مهاجرت می‌نماید. استیل و همکاران (۲۲) با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP و به کمک شش ترکیب آغازگر بر اساس *Pst*I-*Mse*I تنوع ژنتیکی *P.striiformis* f.sp.*tritici* را بررسی نموده تئوری جهش گام به گام و تکامل بیمارگر به دنبال اولین جهش را تایید نمود. جوستسن و همکاران (۱۶) تنوع ژنتیکی *P. striiformis* f.sp.*tritici* را در دانمارک با ارزیابی شدت بیماریزائی و نشانگر AFLP بررسی نمودند. در این بررسی به کمک ۲۱ ترکیب آغازگر *Pst*I/*Mse*I، ۲۸ نشانگر AFLP شناسایی شده که ۱۶ فنوتیپ AFLP را در بین ۷۶ جدایه آشکار ساخت. نتایج با رفتار یک بیمارگر کاملا غیرجنسی که توسط اسپورهای هوازاد در یک منطقه جغرافیائی وسیع پخش می‌شود همخوانی داشت.

در تحقیق حاضر علاوه بر تعیین نژاد جدایه‌های ایرانی قارچ عامل زنگ زرد با استفاده از ارقام استاندارد جهانی و

1 - Amplified Fragment Length Polymorphism
2 - Random Amplified Polymorphic DNA

اروپائی، تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از تکنیک AFLP و ارتباط بین نژادهای فیزیولوژیک و گروههای انگشت نگاری DNA مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در سال زراعی۸۵-۸۴، مجموعاً ۸۵ جدایه *P. striiformis* f.sp. *tritici* از مناطق شیوع زنگ زرد گندم شامل استانهای فارس، خوزستان، خراسان (شمالی و رضوی)، گلستان، مازندران، تهران، قزوین، همدان، ایلام، کرمانشاه، اردبیل و شهرستان ایرانشهر جمع آوری شد(جدول ۱). به محض وصول نمونه‌ها به گلخانه در اولین فرصت نسبت به مایه زنی مصنوعی نمونه‌ها اقدام شد. در کلیه مراحل تکثیر، گندم رقم بولانی به عنوان رقم حساس مورد استفاده قرار گرفت. عمل مایه زنی با مالیدن برگهای آلوده به سطوح برگ گیاهچه‌ها انجام گرفت. معمولا ۱۲-۱۰ روز بعد از مایه زنی اولین علائم به شکل لکه‌های رنگ پریده در سطح برگهای تلقیح شده نمایان شدند و ۳ تا ۴ روز بعد اسپورها تولید شده و قابل جمع آوری بودند. پس از خشک کردن اسپورها در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل و قرار دادن آنها در تیوب‌های پلاستیکی ویژه، تیوب‌ها تا زمان استفاده در فریزر با دمای $-80^{0}C$ نگهداری شدند.

تعیین نژاد به روش جانسون و همکاران (۱۵) و با اصلاحات پیشنهادی و لینگز و مکینتاش (۲۳) صورت گرفت. به منظور تعیین نژاد جدایه‌ها، از ارقام استاندارد افتراقی جهانی و اروپایی به‌علاوه ارقام تکمیلی استفاده گردید. پس از مایه زنی ارقام استاندارد با اسپورهای به‌دست آمده از هر جدایه، یادداشت برداری بر اساس روش مک نیل و همکاران (۱۹) در دو نوبت ۱۴ و ۱۷ روز بعد از مایه زنی انجام شد. گروهبندی بیماریزایی و غیر بیماریزایی هر جدایه بر اساس روش جانسون و همکاران (۱۵) و استابز (۲۲) صورت گرفت که در این روش تیپ‌های آلودگی ۹-۷ به عنوان بیماریزایی و ۶-۰ به‌عنوان غیر بیماریزایی در نظر گرفته شدند.

برای استخراج DNA با ساییدن اسپورها[1] داخل بافر استخراج و به کمک ترکیب فنل-کلروفورم-ایزوآمیل الکل تخریب دیواره سلولی انجام گرفت. پانزده میلی گرم یوردینیوسپور به تیوب‌های ۲ml اضافه و به اندازه حجم اسپور خرده سنگ‌های استریل سیلیکون به تیوب اضافه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر بافر استخراج شامل Tris-Hcl (۱۰۰ میلی مولار)، EDTA (۲۰ میلی مولار) و Nacl (۰/۸ مولار) به تیوب‌ها اضافه شد. پس از اضافه کردن یک میکرولیتر مرکاپتوانول با استفاده از یک دسته‌هاون کوچک[2] پلاستیکی استریل اسپورها داخل لوله سائیده شدند. مجددا ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به تیوب‌ها اضافه شده و پس از یک ورتکس ۳۰ ثانیه‌ای، تیوب‌ها در ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت نگهداری شدند. سپس DNA طی چندین مرحله سانتریفوژ به روش لوریس و همکاران (۱۷) استخراج و برای حذف RNA، ۲ میکرولیتر RNAse به این محلول اضافه و به مدت یک ساعت در دمای $37^{0}C$ نگهداری شد. DNA استخراج شده در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

آزمون AFLP با روش لوریس و همکاران (۱۷) با اندکی تغییر انجام گردید. برای این واکنش از آنزیم‌های برشی[3] *Eco*RI و *Mse*I ساخت شرکت Biolabs استفاده شد. واکنش جوش با اضافه شدن توالی‌های دو رشته‌ای آداپترهای[4] *Eco*RI و *Mse*I که متناظر با محل‌های برش[5] *Eco*RI و *Mse*I هستند به محلول قطعات برشی انجام گردید. واکنش PCR اولیه[6] به کمک آغازگرهای

1 - Grinding method
2 - mini-pestle
3 - Restriction Enzymes
4 - Adapters
5 - Restriction Sites
6 - Pre-amplification PCR

*Eco*RI+0 (5′GTAGACTGCGTACCAATTC 3′) و *Mse*I+0 (5′ GACGATGAGTCCTGAGTAA 3′) صورت پذیرفت. جهت تکثیر DNA از ترموسایکلر مدل Bio-Rad استفاده گردید. واکنش PCR انتخابی[1] به کمک چهار آغازگر *Eco*RI+2 به نامهای *Eco*RI+AG (5′GACTGCGTACCAATTC**AG** 3′)، *Eco*RI+AC (5′GACTGCGTACCAATTC**AC** 3′)، *Eco*RI+GC (5′GACTGCGTACCAATTC**GC** 3′) و *Eco*RI+GT (5′GACTGCGTACCAATTC**GT** 3′) و چهار آغازگر *Mse*I+2 به نامهای *Mse*I+AC (5′GATGAGTCCTGAGTAA**AC** 3′)، *Mse*I+AG (5′GATGAGTCCTGAGTAA**AG** 3′)، *Mse*I+AA (5′GATGAGTCCTGAGTAA**AA** 3′) و *Mse*I+GT (5′GATGAGTCCTGAGTAA**GT** 3′) انجام شد.

چهار ترکیب پرایمری A، B، C و D به ترتیب *Eco*RI+GC - *Mse*I+AA، *Eco*RI+AC - *Mse*I+AG، *Eco*RI+GT - *Mse*I+GT و *Eco*RI+AG - *Mse*I+AC در این تحقیق استفاده شدند. قطعات DNA محصولات واکنش PCR انتخابی روی ژل تفکیک کننده پلی اکریل آمید[2] ۶/۵ درصد بررسی شدند. مدت الکتروفورز (Sequigen Bio-Rad) برای تمام نمونه‌ها ۲ ساعت با ولتاژ ۱۸۰۰، شدت جریان ۲۰۰ میلی آمپر و ۷۵ وات بود. رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید با نیترات نقره[3] بر طبق قرارداد Promega با تغییراتی انجام شد.

پس از ظهور ژل باندهای واضح و تکرار پذیر حد فاصل ۱۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز به عنوان نشانگر در نظر گرفته شدند. برای باندهای هم ردیف وزن مولکولی نشانگر، عدد ۱ و عدم وجود آن عدد ۰ اختصاص داده شد و با استفاده از نرم افزار Excel ثبت شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS 2.11 و به روش UPGMA و بر اساس ضریب SM انجام گرفت. همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها با محوریت جمعیت‌ها به کمک نرم افزار Popgene 3.1 و به روش UPGMA بر اساس ضریب Nei انجام شد.

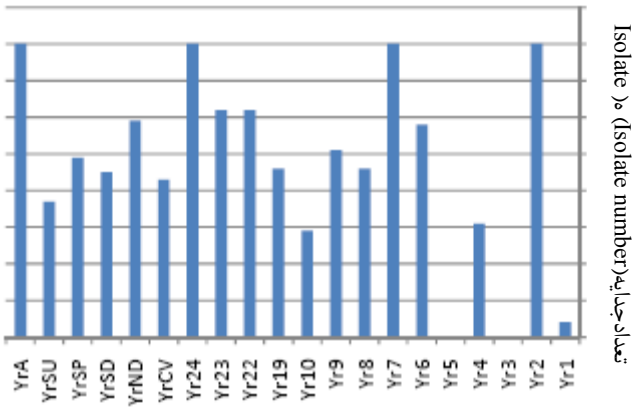
نتایج و بحث

در این تحقیق برای ژنهای *Yr1*، *Yr2*، *Yr4*، *Yr6*، *Yr7*، *Yr8*، *Yr9*، *Yr10*، *Yr19*، *Yr22*، *Yr23*، *Yr24*، *Yr* SD، *Yr* ND، *Yr* SU، *Yr* CV، *Yr* SP و *Yr*A ویرولانس دیده شد(جدول۱). برای ژنهای *Yr5* و *Yr3* موجود در ارقام تجاری ویرولانس دیده نشد(شکل ۱). بیشترین بیماریزایی برای ژنهای *Yr2*، *Yr4*، *Yr7* و *Yr24* مشاهده گردید (شکل۱). مجموعا ۳۵ نژاد فیزیولوژیک شناسایی شد که نژاد 178EOA با هفت عضو فراوانترین نژاد بود. نژاد $^{+}$64E241A با ۵ عضو در رتبه بعدی قرار گرفت. اکثر جدایه‌ها بر روی ژن مقاومت *Yr1*در رقم Chinese 166 بیماریزایی نداشته و فقط جدایه‌های Safi3 Ahvz.H, Ilam و Ghazvin نسبت به این ژن بیماریزایی نشان دادند. بر روی ژن *Yr2* که به صورت ژن مقاومت تک ژنی در رقم Heines Kolben وجود دارد، حدود ۹۴ درصد جدایه‌ها بیماریزایی نشان دادند. رقم Heines PEKO که دارای ژنهای مقاومت *Yr2* و *Yr6* است نسبت به ۳۷ جدایه حساسیت نشان داد. با توجه به عکس العمل حساسیت رقم تکمیلی Kalyansona با ژن *Yr2* به همین جدایه، بیماریزایی برای ژن *Yr2* و *Yr6* محرز شد.

عکس العمل حساسیت رقم Lee از ارقام استاندارد افتراقی جهانی با ژن *Yr7* نسبت به اکثر نژادها، نشان دهنده بیماریزایی برای ژنهای *Yr23* و *Yr22* نیز می باشد(۱۱). بنا به اظهار نظر استابز (۲۲) برای ژن *Yr7* در مقیاس جهانی بیماریزایی مشاهده شده است. این اظهار نظر بر اساس تحقیقات ایشان و عکس العمل رقم Lee به *P.striiformis*

1 - Selective PCR
2 - Polyacrylamide denaturing gel
3 - Silver staining

f.sp.*tritici* استوار است. لذا می توان چنین نتیجه گیری کرد کـه بـرای دو ژن *Yr*23 و *Yr*22 نیـز در مقیـاس جهـانی بیماریزایی وجود دارد. علاوه بر رقم Lee، ژن مقاومـت *Yr*7 به همراه یک ژن ناشناخته دیگر در رقـم Riechersberg 42 از ارقام استاندارد افتراقی اروپایی دیده می شود.

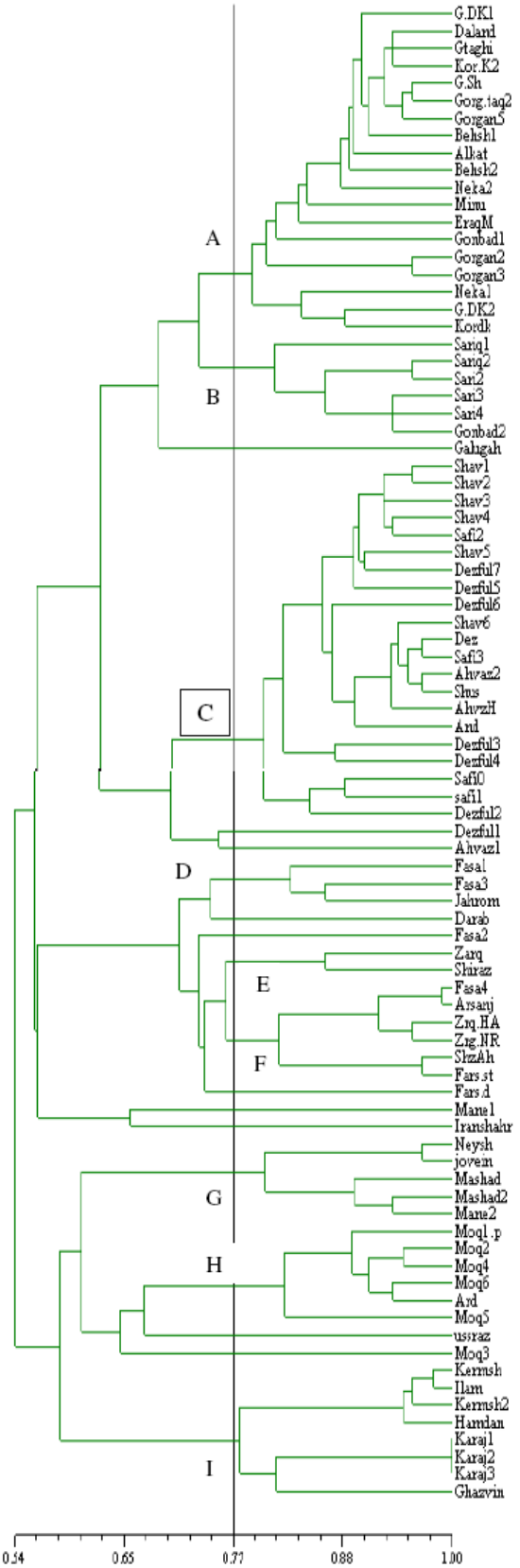


شکل۱- فراوانی جدایه‌های بیماریزا روی ژنهای *Yr*

برای ژن *Yr*8 در بسیاری از مناطق کشور ویرولانس مـشاهده شد. ویرولانس برای این ژن قبلاً در سالهای زراعی۷۸-۷۷ و ۷۹-۷۸ نیز گزارش شـده اسـت(۳ و ۴). ژنوتیـپ Copmair علاوه بر *Yr*8 دارای ژن مقاومت *Yr*19 نیز می‌باشد. بنـابراین ویرولانس بر روی این ژنوتیپ موید ویرولانس بر *Yr*19 نیـز می‌باشد. آزمون AFLP باندهای مناسبی روی ژل پلی اکریل آمید تولید نمود (شکل ۲). بر اساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیـل داده‌هـا بـا نـرم افـزار NTSYS، در سـطح ضـریب شباهت ۷۷ درصد، کل جدایه‌ها در ۹ گروه اصـلی A، B، C، D، E، F، G، H و I و همچنین ۱۰گروه تک جدایه ای جای گرفتند(شکل ۲). بین مناطق جغرافیایی و گروههای انگشت نگاری AFLP ارتباط قابل توجهی وجـود داشـت. هـر چنـد بین نژادها و گروههـای AFLP ارتبـاط برجسته ای مـشاهده نـشد. درگـروه A عـلاوه بـر جدایـه‌هـای اسـتان گلـستان، جدایه‌هایی از استان مازندران نیـز وجـود داشـت. ۱۹ جدایـه موجود در این گـروه، متعلـق بـه ۱۳ نـژاد فیزیولوژیـک و از روی ۷ رقـم مختلـف گنـدم جمـع آوری شـده بودنـد. در اعضای این گروه بیماریزایی نسبت به ژنهای مقاومـت *Yr*4 و *Yr*SU کمتـرین فراوانـی را داشـتند. نژادهـای فیزیولوژیـک موجـود در ایـن گـروه در سـایر گروههـای انگـشت نگـاری AFLP نیز وجود دارد. بنابراین بر اساس نتایج به‌دست آمـده نتوانـستیم بـین گروههـای AFLP و نژادهـای فیزیولوژیـک ارتباطی برقرار نماییم.

گروه B نیز جدایه‌های مازندران و گلستان را شامل می شود که به ۵ نژاد مختلف تعلق دارند. وجود نژادهای‌های مشترک در این دو گروه وکم بودن تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های ایـن دو استان احتمالاً به علت افزایش امکان تبادلات ژنتیکی بـین جدایه‌های استانهای مذکور است. بـه عبـارت دیگـر جریـان ژنی باعث یکدست شدن ژنوتیپ‌هـا در ایـن دو اسـتان شـده است. شرایط آب و هوایی تقریباً مشابه و ارقام گندم شبیه بـه هم از دلایل دیگر وجـود جمعیـت‌هـای تقریبـاً مـشابه عامـل زنگ زرد است.

به علت فراوانی کم بیمـاریزایی نـسبت بـه *Yr*4 و *Yr*SU بـه نظر می رسد استفاده از ایـن ژنهـای مقاومـت بـه‌عـلاوه *Yr*1، *Yr*3 و *Yr*5 در ارقام قابل کـشت در کمربنـد شـمالی کـشور مفید باشد.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از نتایج AFLP به کمک نرم افزار NTSYS به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه SM

در گروه C، ۲۱ جدایه استان خوزستان جای گرفتند. این جدایه‌ها متعلق به ۱۳ نژاد فیزیولوژیک مختلف بوده و از روی ۸ رقم متفاوت گندم جمع آوری شده بودند. اصلی ترین نژاد فیزیولوژیک شناسایی شده در این گروه 178EOA- است که به غیر از جدایه ایرانشهر در گروههای دیگر وجود نداشت. نکته دیگر عدم بیماریزایی ۹ جدایه این گروه برروی ارقام استاندارد جهانی و برخی ارقام تکمیلی است. از ویژگی‌های مشترک جدایه‌های این گروه فراوانی نسبتاً کم بیماریزایی نسبت به ژنهای مقاومت *Yr*4، *Yr*10، *Yr*CV و *Yr*SP است بنابراین استفاده از این ژنهای مقاومت به‌علاوه *Yr*1، *Yr*3 و *Yr*5 در ارقام قابل کشت در خوزستان باید مورد توجه قرار گیرد. جدایه‌های استان فارس تنوع ژنتیکی بالایی داشته و سه گروه جداگانه D، E و F و سه شاخه انفرادی را در خود جای داده اند. در گروه D سه جدایه، از روی سه رقم مختلف از منطقه فسا و جهرم جمع آوری شده و از سه نژاد متفاوت بودند. اعضای این گروه روی ژنهای *Yr*SU و *Yr*SP ، *Yr*1، *Yr*3 و *Yr*5 بیماریزا بودند. دو جدایه گروه E از لحاظ نژاد با جدایه‌های گروه D متمایز بودند. گروه F با بیشترین جدایه، از روی ۵ رقم مختلف جمع آوری و در آزمون تعیین نژاد تحت پنج نژاد مختلف شناسایی شدند. در این گروه برای ژنهای *Yr*4، *Yr*10، *Yr*SU، *Yr*1، *Yr*3 و *Yr*5 بیماریزایی مشاهده شد. در مجموع ۱۴ جدایه استان فارس جمع آوری شده روی متعلق هشت رقم گندم به ۱۳ نژاد مختلف تعلق داشتند.

در گروه G پنج جدایه استان‌های خراسان شمالی و رضوی متعلق به چهار نژاد بوده و از روی سه رقم جمع آوری شده بودند. از ویژگی‌های مشترک جدایه‌های این گروه عدم بیماریزایی نسبت به ژنهای مقاومت *Yr*8 و *Yr*19 است.

درگروه H جدایه‌های استان اردبیل قرار دارند. شش جدایه مورد بررسی از روی شش رقم مختلف گندم جمع آوری و شش نژاد فیزیولوژیک برای آنها شناسایی شد. فقط جدایه Moq5 از منطقه مغان برای ژن *Yr*10 بیماریزایی داشت.

گروه I جدایه‌های متعلق به کرج، قزوین و استانهای غربی را شامل شد. هشت جدایه مربوط به این گروه از روی چهار رقم گندم جمع آوری و شش نژاد برای آنها شناسایی شد. از ویژگی‌های مشترک جدایه‌های این گروه فراوانی نسبتاً کم بیماریزایی نسبت به ژنهای مقاومت *Yr*4، *Yr*SD و *Yr*CV است.

جدایه گلوگاه (Galugah) یک شاخه جداگانه به خود اختصاص داد. هر چند این جدایه از روی رقم تجن که برای سایر جدایه‌ها یا استانهای گلستان و مازندران مشترک است، جمع آوری شده بود ولی نژاد آن منحصر به فرد است. جدایه Dezful 1 نیز در سطح شباهت ۷۷٪ در شاخه جداگانه ای قرار گرفت. این جدایه از روی گندم رقم دوروم که یک رقم تتراپلوئید است جمع آوری شده بود. این جدایه برروی اکثر ژنهای مقاومت ارقام افتراقی بیماریزایی بسیار کمی داشته و نژاد آن +4E15A شناسایی شد.

جدایه Ahvaz 1 نیز در شاخه جداگانه ای قرار گرفت. این جدایه در سطح شباهت ۷۵ درصد کاملاً شبیه به جدایه Dezful 1 بود هر چند از لحاظ رقم گندم و نژاد با آن کاملاً متفاوت است. جدایه Darab که به لحاظ جغرافیایی تفاوت قابل توجهی با سایر جدایه‌های استان فارس داشت در یک شاخه مجزا قرار گرفت. این جدایه از روی رقم داراب۲ که ویژه مناطق گرمسیری است جمع آوری شده بود. مبدا این رقم منطقه داراب است که در سال ۱۳۵۹ معرفی شده است. جدایه Fasa2 که از لحاظ نژاد فیزیولوژیک مشترکاتی با جدایه‌های گلستان، استانهای غربی و مازندران داشت نیز در شاخه مجزا جای گرفت. جدایه Mane 1 که از منطقه مانه و سملقان در استان خراسان شمالی جمع آوری شده است، در یک شاخه انفرادی دیده می شد. این جدایه از روی جو رقم و الفجر جمع آوری شده است.

جدول ۱- مشخصات جدایه های *P.striifarmis f.sp.tritici* مورد بررسی شامل نام جدایه، رقم میزبان، محل جمع آوری، نژادهای فیزیولوژیک، فنوتیپ نژادها و گروه AFLP

Isolate	Cultivar	Location	Race	Race Phenotype*																				AFLP Group
G.DK1	Tajan	Golestan	66E169A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	-	ND	-	-	SU	A	A
Daland	Tajan	Golestan	130E263A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	-	-	22	23	-	CV	-	-	SP	-	A	A
Gtaghi	Zagros	Golestan	150E40A+	-	2	-	-	-	-	7	-	9	10	-	22	23	-	CV	ND	-	-	-	A	A
Kor.K2	Zagros	Golestan	166E232A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	-	-	24	CV	-	SD	SP	SU	A	A
G.sh	Tajan	Golestan	174E254A+	-	2	-	-	-	6	7	-		10	-	22	23	24	CV	ND	SD	-	-	A	A
Gorg.taq2	Tajan	Golestan	71E206A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	-	ND	-	SP	-	A	A
Goragan5	Gorgan	Golestan	134E52A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	-	-	SP	-	A	A
Behsh1	Zagros	Mazandaran	174E254A+	-	2	-	-	-	-	7	8	-	10	19	22	23	24	CV	ND	SD	SP	-	A	A
Alkat	Zagros	Mazandaran	70E254A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	ND	-	SP	SU	A	A
Behsh2	Tajan	Mazandaran	192E191A+	-	2	-	4	-	6	7	8	-	10	19	22	23	24	CV	ND	SD	-	-	A	A
Neka2	Zagros	Mazandaran	64E241A+	-	2	-	4	-	-	-	8	-	10	19	22	23	24	CV	ND	SD	SP	-	A	A
Mlnu	Atila	Golestan	230E72A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	10	-	22	23	24	-	ND	SD	SP	-	A	A
EraqM	Atila	Golestan	166E254A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	ND	SD	SP	-	A	A
Gonbad1	Atila	Golestan	132E48A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	10	-	-	-	24	-	ND	SD	SP	-	A	A
Gorgan2	Falat	Golestan	166E223A+	-	2	-	4	-	6	-	8	9	-	19	-	-	-	CV	-	SD	SP	-	A	A
Gorgan3	Moroko	Golestan	70E254A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	-	-	24	CV	ND	-	SP	SU	A	A
Neka1	ZagrosM	Mazandaran	64E241A+	-	2	-	4	-	-	-	-	9	10	-	22	23	24	CV	ND	SD	SP	-	A	A
G.DK2	Tajan	Golestan	66E169A+	-	-	-	-	-	6	7	8	9	10	19	22	23	24	-	ND	SD	SP	-	A	A
Kordk	Tajan	Golestan	70E132A+	-	2	-	-	-	6	-	-	-	-	-	22	23	24	-	-	-	-	SU	A	A
Sariq1	Bulani	Mazandaran	166E232A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	-	ND	-	SP	SU	A	B
Sariq2	Zagros	Mazandaran	166E254A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	ND	SD	SP	-	A	B
Sari2	Zagros	Mazandaran	158E223A+		2	-	4	-	6	7	8	9	-	19	-	-	-	CV		SD	SP	-	A	B
Sari3	Shirudi	Mazandaran	192E191A+		2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	ND	SD	-	-	A	B
Sari4	Atila	Mazandaran	66E169A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24		ND	-	-	SU	A	B
Gonbad2	Rasul	Golestan	132E48A+	-	2	-	-	-	6	7	-	9	-	-	-	-	24	CV	ND	-	-	-	A	B
Shav1	Kavir	Khuzestan	132E48A+	-	2	-	-	-	6	7	-	9	10	-	-	-	-	CV	ND	-	-	-	A	C
Shav2	Kavir	Khuzestan	178E0A+	-	2	-	-	-	-	7	-	9	-	-	22	23	24	-	-	SD	-	SU	A	C
Shav3	Kavir	Khuzestan	134E140A+	-	2	-	-	-	6	7	-	9	-	-	22	23	24	-	-	SD	-	SU	A	C
Shav4	Dez	Khuzestan	178E0A+	-	2	-	-	-	-	7	-	9	-	-	22	23	24	-	-	SD	-	SU	A	C
Safi2	Dez	Khuzestan	70E132A+	-	2	-	-	-	6	7	-	-	-	-	22	23	24	-	-		-	SU	A	C
Shav5	Fung	Khuzestan	178E0A+	-	2	-	-	-	-	7	-	9	-	-	22	23	24	-	-	SD	-	SU	A	C
Dezful7	Chamran	Khuzestan	64E241A+	-	2	-	4	-	-	7	8	-	10	19	22	23	24	CV	ND	SD	SP	-	A	C
Desful5	Kavir	Khuzestan	166E232A+	-	2	-	4	-	6	-	8	9	-	19	-	-	24	-	-	SD	SP	-	A	C
Desful6	Mahali	Khuzestan	0E15A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	-	-	-	-	24	-	ND	-	-	-	A	C
Shav6	Dez	Khuzestan	4E15A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	-	-	-	-	24	-	ND	-	-	-	A	C
Dez	Chamran	Khuzestan	178E0A-	-	2	-	-	-	-	7	-	9	-	-	22	23	24	-	-	SD	-	SU	-	C
Safi3	Dez	Khuzestan	247E255A+	-	2	-	4	-	6	7	8	9	10	19	22	23	24	CV	ND	SD	SP	SU	A	C
Ahvaz2	Marun	Khuzestan	179E251A+	-	2	-	4	-	-	7	8	-	10	19	-	-	24	CV	ND	SD	SP	SU	A	C
Shush	Dez	Khuzestan	70E132A+	-	2	-	-	-	6	7	8	-	-	19	22	23	24	-	-	-	-	SU	A	C
AhvzH	Dez	Khuzestan	247E255A+	-	2	-	4	-	6	7	8	9	10	19	22	23	24	CV	ND	SD	SP	SU	A	C
And	Dez	Khuzestan	0E6A+	-	2	-	-	-	6	7	-	-	-	-	-	-	24	-	-	-	-	SU	A	C
Dezful3	Bulani	Khuzestan	64E90A-	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	-	-	24	-	ND	-	SP	SU	-	C
Dezful4	Durum	Khuzestan	178E0A+	-	2	-	-	-	-	7		9	-	-	22	23	24	-	-	SD	-	SU	A	C
Safi0	Karkhe	Khuzestan	166E218A+	-	2	-	-	-	-	7	8	9	-	19	22	23	24	-	ND	SD	SP	-	A	C
Safi1	Chamran	Khuzestan	178E0A+	-	2	-	-	-	-	7		9	-	-	22	23	24	-	-	SD	-	SU	A	C
Desful2	Kavir	Khuzestan	70E0A+	-	2	-	-	-	-	7	-		-	-	22	23	24	-	-	-	-	-	A	C
Galugah	Tajan	Golestan	179E251A+	-	2	-	4	-	-	7	8	-	10	19	-	-	24	CV	ND	SD	SP	-	A	Single 1
Desful1	Dez	Khuzestan	4E15A+	-	2	-	-	-	6	7	-	9	-		-	-	24	-	-	-	-	-	A	Single2
Ahvaz1	Dez	Khuzestan	134E52A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	-	-	-	SU	A	Single3
Fasa1	Atila	Fars	166E159A+	-	2	-	4	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	-	ND	SD	-	-	A	D
Fasa3	Shiraz	Fars	150E40A+	-	2	-	-	-	-	7	-	9	10		22	23	24	CV	ND	-	-	-	A	D
Jahrom	Marvdasht	Fars	134E140A+	-	2	-	-	-	6	-	-	9	-		22	23	24	-	ND	-	-	-	A	D
Darab	Darab	Fars	66E66A+	-	-	-	-	-	-	7	-	9	-		22	23	24	-	-	-	SP	SU	A	Single4
Fasa2	Atila	Fars	64E241A+	-	2	-	4	-	-	7	8		10	19	22	23	24	CV	ND	SD	SP	-	A	Singl5
Fasa4	Falat	Fars	166E218A+	-	2	-	-	-	-	7	8	9	-	19	22	23	24	-	ND	SD	SP	-	A	F
Arsanj	Chamran	Fars	170E235A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	-	-	SP	-	A	F
Zrq.HA	Shiraz	Fars	230E254A+	-	2	-	4	-	6	7	8	9	10	19	22	23	24	CV	ND	SD	SP	-	A	F
Zrq.NR	Darab2	Fars	166E218A+	-	2	-	-	-	-	7	8	9	-	19	22	23	24	-	ND	SD	SP	-	A	F
ShiAh	Star	Fars	70E0A+	-	2	-	-	-	-	7	-		-	-	22	23	24	CV	ND	SD	-	-	A	F
Fars.st	Star	Fars	70E254A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	ND	-	SP	SU	A	F

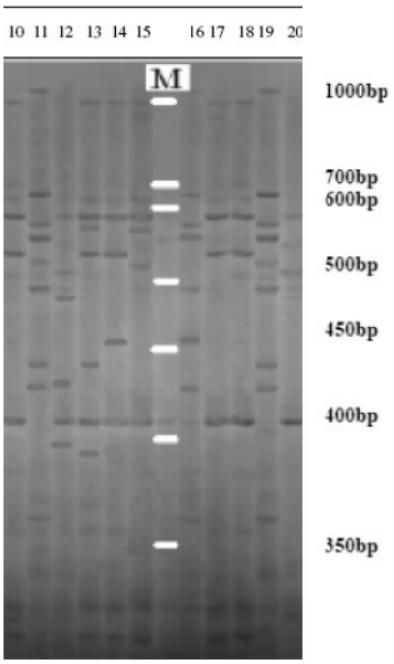
ادامه جدول ۱

Isolate	Cultivar	Location	Race	Race Phenotype*																				AFLP Group
Zarq	Chamran	Fars	179E251A+	-	-	-	4	-	-	7	8	9	10	19	-	-	24	CV	ND	-	SP	SU	A	E
Shiraz	Shiraz	Fars	38E62A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	ND	SD		-	A	E
Fars.d	Falat	Fars	180E79A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	10	-	-	-	24	-	ND	SD	SP	-	A	single6
Mane1	Vallaj*	Khorasan	132E48A+	-	2	-	-	-	6	7	-	9	-	-	-	-	24	CV	ND	-	-	-	A	Single7
Iranshahr	Line	Baluchestan	178E0A-	-	2	-	-	-	-	7	8	9	-	19	22	23	24	-	-	SD	-	SU	-	Single8
Neysh	Roshan	Khorasan	222E79A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	10	-	22	23	24	-	ND	SD	SP	-	A	G
Jovein	Navid	Khorasan	150E40A+	-	2	-	-	-	-	7	-	9	10	-	22	23	24	CV	ND	-	-	-	A	G
Mashad	Navid	Khorasan	198E239A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	-	-	-	-	24	CV	ND	-	SP	SU	A	G
Mashad2	Toos	Khorasan	222E79A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	10	-	22	23	24	-	ND	SD	SP	-	A	G
Mane2	Navid	Khorasan	130E263A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	-	-	22	23		CV	-	-	SP	SU	A	G
Moq1.p	Alvand	Ardebil	192E239A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	-	-	-	-	24	CV	ND	-	SP	SU	A	H
Moq2	Shahriar	Ardebil	230E254A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	ND	SD	SP	SU	A	H
Moq4	Falat	Ardebil	130E263A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	-	-	22	23	24	CV	-	-	SP	SU	A	H
Moq6	Sabalan	Ardebil	166E223A+	-	2	-	4	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	-	ND	SD	SP	-	A	H
Ard	Sabalan	Ardebil	192E239A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	-	-	-	-	24	CV	ND	-	SP	SU	A	H
Moq5	Falat	Ardebil	180E179A+	-	2	-	4	-	6	7	-	9	10	-	-	-	24	-	ND	SD	SP	-	A	H
Moq3	Bulani	Ardebil	66E66A+	-		-	-	-	-	7	-	9	-	-	22	23	24	-	-	-	SP	SU	A	Single10
Kermsh	Pishtaz	Kermanshah	71E206A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	10	19	22	23	24	-	ND	SD	SP	-	A	I
Ilam	Shiraz	Ilam	87E90A-	-	2	-	-	-	-	7	8	9	10	19	22	23	24	-	ND	-	SP	SU	-	I
Kermsh2	Shiraz	Kermanshah	179E251A+	-	-	-	4	-	-	7	8	9	10	19	-	-	24	CV	ND	-	SP	SU	A	I
Hamadan	Alvand	Hamadan	64E241A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	10	19	22	23	24	-	ND	-	-	SU	A	I
Karaj1	Bulani	Tehran	134E140A+	-	2	-	-	-	6	7	-	9	-	-	22	23	24	-	ND	-	-	-	A	I
Karaj2	Bulani	Tehran	34E72A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	ND	SD	-	-	A	I
Karaj3	Bulani	Tehran	34E72A+	-	2	-	-	-	6	7	8	9	-	19	22	23	24	CV	ND	SD	-		A	I
Ghazvin	Alvand	Ghazvin	87E90A-	-	2	-	-	-	-	7	8	9	10	19	22	23	24	-	ND		SP	SU	-	I

*- ویروالنس به *Yr*A=A, *Yr*23=23, *YR*22=22, *Yr*19=19, *Yr*10=10, *Yr*9=9, *Yr*8=8, *Yr*7=7, *Yr*6=6, *Yr*5=5, *Yr*4=4, *Yr*3=3, *Yr*2=2, *Yr*1=1

" – " - عدم ویروالنس Yr24=24, *Yr*Su=SU, *Yr*SP=SP, *Yr*SD=SD, *Yr*ND=ND,*Yr*CV=CV,

تک جدایه Iranshahr متعلق به استان سیستان و بلوچستان که ازروی لاینهای آزمایشی مرکز تحقیقات کشاورزی بلوچستان جمع آوری شده بود، در سطح شباهت ۶۶ درصد با جدایه Mane 1 شباهت کامل داشت. در شهرستان ایرانشهر به علت شرایط آب و هوایی ویژه، ظهور زنگ زردگندم به ندرت اتفاق می‌افتد.



شکل۲- نقوش الکتروفورزی AFLP بر روی ژل پلی اکریل آمید بر اساس ترکیب آغازگر *Eco*RI + GT – *Mse*I + GT متعلق به ۱۱ جدایه *Puccinia stiiformis* f.sp. *tritici*

10- EraqM 11- Sariq1 12- Sariq2 13- Gorgan2 14- G Taqi 15- gonbad1
16- G.Sh 17- Kor.K2 18- Sari2 19- Gorgan3 20- Gorgan.Taq2

جدول ۲- شباهت و فاصله ژنتیکی* جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس ضریب Nei

Pop ID	Golestan	Fars	Khorasan	West/Nwest	Khuzestan	Mazandaran	Tehran/ Qazvin
Golestan	****	0.64	0.69	0.68	0.7	0.92	0.59
Fars	0.44	****	0.69	0.78	0.76	0.67	0.6
Khorasan	0.37	0.38	****	0.84	0.77	0.65	0.67
West/Nwest	0.38	0.25	0.17	****	0.77	0.66	0.74
Khuzestan	0.26	0.27	0.27	0.25	****	0.72	0.65
Mazandaran	0.08	0.4	0.43	0.41	0.32	****	0.56
Tehran/Qazvin	0.53	0.51	0.4	0.29	0.42	0.58	****

* Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

نژاد این جدایه در استان خوزستان نیز شناسایی شده است. جدایه Moq3 از روی رقم فوق العاده حساس بولانی جمع آوری شده بود، و در سطح ۶۵ درصد شباهت از سایر جدایه‌های استان اردبیل جدا شده و یک شاخه انفرادی را به خود اختصاص داده بود. بیماریزایی برای ژنهای *Yr2*، *Yr24*،*Yr7* و *YrA* تقریباً در همه جای کشور مشاهده شد که در صورت تایید نهایی این ژنها باید از برنامه به نژادی کنار گذاشته شوند.

نتایج AFLP با محوریت جمعیت‌ها به کمک نرم افزار Popgene3.1 به روش UPGMA و ضریب شباهت Nei بررسی شده وشباهت ژنتیکی و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه به شرح جدول ۲ می باشد.

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می دهد که شباهت ژنتیکی اکثر اعضای جمعیت‌ها با جمعیت غرب و شمال غرب (شامل استانهای ایلام، همدان، کرمانشاه و اردبیل) بیشتر از ۶۵ درصد است (جدول ۲) که احتمالا جریانات مدیترانه ای و سودانی در نقل و انتقال اسپورها در ایران نقش داشته است و می تواند با وجود شرایط مناسب نهایتا جریان ژنی به‌وقوع پیوسته باعث نزدیکی ژنتیکی جمعیت‌ها شده باشد.

با توجه به اینکه شباهت ژنتیکی جمعیت‌های مازندران با جمعیت‌های گلستان ۹۲ درصد است به نظر می رسد که این دو جمعیت یک دودمان کلونال را تشکیل دهند. وجود ارقام یکسان در این دو منطقه، شرایط آب و هوایی نزدیک به هم احتمالاً نقش جریان ژنی در کاهش تنوع ژنتیکی و به عبارت دیگر همسان سازی جمعیت‌ها را پررنگ نماید (جدول ۲).

در تحقیق حاضر ۹۷ جایگاه ژنی پلی مورفیک با به‌کارگیری چهار ترکیب پرایمری (۳۰/۹۷ درصد) پیدا شد که با نتایج AFLP برای سایر قارچها سازگار است (۱۸). تحقیقات نشان داده است که انتخاب جدایه‌ها، ترکیب آغازگرها و تعداد این ترکیب‌ها در نتایج آزمون AFLP تاثیر به سزایی دارد. مثلاًدر تحقیق لوریس و همکاران (۱۷) که ۲۴۷ جدایه *P.stiiformis* f.sp. *tritici* را مورد تحقیق قرار دادند ۱۸۹ جدایه، الگوی باندی کاملاًمشابه داشتند، چرا که جدایه‌ها فقط از چندین مزرعه و از روی یک رقم جمع آوری شده بودند. در شرایط مزرعه ای و به‌خصوص در ارقام هموژن تنوع قابل ملاحظه ای قابل انتظار نیست. در تحقیق حاضر جدایه‌ها از ۵۲ منطقه مختلف ایران مربوط به ۱۳ استان کشور و ۲۵ رقم متفاوت جمع آوری شده بودند. از طرفی وجود تنوع ژنتیکی پائین در داخل جمیعت‌ها نیز احتمال وقوع جریان ژنی را تحت تاثیر عوامل جوی مانند باد و انسان در فواصل نزدیک به هم پررنگ می نماید.

وجود تنوع ژنتیکی قابل قبول در جدایه‌های ایرانی بی تاثیر از جایگاه ایران به عنوان خاستگاه گندم و فراوانی خویشاوندان ژنتیکی میزبان نیست. وجود میزبانهای وحشی زنگ زرد گندم نیز یکی از فاکتورهای موثر در ژنتیک جمعیت زنگ زرد گندم می باشد. گودوین(۱۲) نشان داد که تنوع ژنتیکی *Phytophthora infestans* در مکزیک به

عنوان خاستگاه اولیه سیب زمینی، بسیار بیشتر از تنوع مشاهده شده در ایرلند، حتی پس از اپیدمی شدید بیماری است. با توجه به تنوع ژنتیکی مشاهده شده برای جمعیت‌های عامل زنگ زرد گندم ایران، اهتمام به کشت ارقام با ژنهای مقاومت متفاوت به‌ویژه در مناطقی که بین جدایه‌های بررسی شده در آن مناطق شباهت ژنتیکی بیشتری وجود داشت، می تواند از طغیان بیمارگر تاحد زیادی جلوگیری نماید. نتایج نشان می دهد که آزمون AFLP کارائی بسیار بالایی در تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌ها داشته است.

توجه به این نکته ضروری است که آنچه در تحقیق حاضر به آن پرداخته شده است، مربوط به ۸۶ جدایه انتخابی از ۲۸۶ جدایه اولیه است که سعی شده حتی الامکان تفاوت‌های قابل ملاحظه ای با هم داشته باشند و از آزمون همزمان جدایه‌هائی که ویژگیهای بیماریزایی، جغرافیایی یا میزبانی یکسان داشتند اجتناب شود. هر چند نمونه برداری در طی یک فصل زراعی از نقاط مختلف ایران انجام شده است. بدیهی است که نژادهای به‌دست آمده و همچنین این گروههای AFLP نتیجه تکامل همزمان بیمارگر و میزبان طی سالیان متوالی بوده است. برای بیمارگرهایی مانند زنگ زرد گندم که تکامل میزبان – بیمارگر به علت تغییر متناوب ژنهای مقاوم گیاه میزبان بسیار قوی است، تکامل جمعیت می تواند همراه با جهش تصادفی ازغیر بیماریزایی به بیماریزایی باشد و به نظر می رسد که جمعیت‌های جدید محصول تک تک جهش‌هائی است که طی سالیان مختلف رخ داده است. سپس این جهش‌ها تحت فشار انتخابی میزبان قرار گرفته برخی با میزبان سازش پیدا نموده و منبع مایه تلقیح جدید می گردند. برخی از جهش یافته‌ها به کمک جریانات هوایی به مناطق دیگر منتقل شده و ممکن است مسیر تکاملی متفاوتی را نسبت به مایه تلقیح اولیه طی نمایند. به‌طور خلاصه نتایج این تحقیق ضمن تایید نشانگر AFLP به عنوان یک تکنیک بسیار قدرتمند در مطالعه ژنتیک جمعیت نشان داد که کشت ارقام متفاوت در سالهای گذشته در مناطق مختلف کشور در ژنتیک جمعیت بیمارگرها تاثیر گذاشته است و تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در ایران وجود دارد. هر چند تنوع زیاد شانس ایجاد یک نژاد خطرناک را بیشتر می نماید ولی از طرف دیگر پرهیز از کشت ارقام هموژن در تمام نقاط کشور، امکان شیوع اپیدمی‌های ویرانگر را به حداقل رسانده است.

سپاسگزاری

از آقای پروفسور ژن شن کانگ به خاطر کمک در انجام تحقیقات مولکولی و همچنین سرکارخانم معصومه طلایی و سرکار خانم زهره بیات به خاطر کمک در انجام تحقیقات گلخانه ای نهایت تشکر را داریم.

منابع

۱-واحد پاتولوژی غلات.۱۳۷۳. گزارش تحقیقات انجام شده در مورد زنگ زرد گندم ۱۳۷۳-۱۳۷۲. بخش تحقیقات غلات. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. کرج.

۲-واحد پاتولوژی غلات.۱۳۷۶. گزارش بیماریهای غلات، سال زراعی ۷۶-۷۵. بخش تحقیقات غلات. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. کرج.

۳-واحد پاتولوژی غلات.۱۳۷۸. گزارش بیماریهای غلات، سال زراعی ۷۸-۷۷. بخش تحقیقات غلات. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. کرج.

۴-واحد پاتولوژی غلات.۱۳۷۹. گزارش بیماریهای غلات، سال زراعی ۷۹-۷۸. بخش تحقیقات غلات. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. کرج.

۵-واحد پاتولوژی غلات.۱۳۸۰. گزارش بیماریهای غلات، سال زراعی ۸۱-۸۰ بخش تحقیقات غلات. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. کرج.

۶-واحد پاتولوژی غلات.۱۳۸۴. گزارش بیماریهای غلات، سال زراعی ۸۴-۸۳ بخش تحقیقات غلات. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. کرج.

7. Allison, C. and Isenbeck, K. 1930. Biologische specialisierung von *Puccinia glumarum tritici* Erikss. und Henn. Phytopathology Z. 2: 87–98.
8. Bamdadian, A. 1972. Physiologic races of Puccinia striiformis West. In Iran. In:The Proceeding of European and Mediterranean cereal rust Conference. Praha-Czecholvakia. pp. 90-95.
9. Bamdadian, A. 1984. Variation in pathogenicicty and evolution of *Puccinia striiformis* West, f.sp. *tritici.* pp. 153-156 in: Iran during 1980-1984. Proceeding of the 6 th European and Mediterranean cereal rust Conference.
10. Bayles, R. A., Flath, K., Hovmoller, M.S. and de Vallavieille-Pope, C. 2000. Breakdown of the Yr17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. Agronomie 20: 805-811.
11. Chen, X.M., Line, R.F., and Leung, H. 1993. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. Phytopathology 83: 1489–1497.
12. Goodwin, S. B, Spielman, L. J., Matuszak, J. M., Bergeron, S. N. and Fry, W. E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. Phytopathology 82, 955–61.
13. Hovmøller, M. S., Justesen, A. F. and Brown, J. K. M. 2002. Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in north-west Europe. Plant Pathology (London), 51: 24–32.
14. Hungerford, C. W. and Owens, C. E. 1923. Specialized varieties of *Puccinia glumarum* and hosts for variety *tritici*. J. Agriculture. Research. (Washington, D.C.), 25: 363–401.
15. Johnson, R., Stubbs, R.W., Fuchs, E. and Chamberlain, N. H. 1972. Nomenclature for physiologic races of *Puccinia striiformis* infecting wheat. Trans. Br. Mycology. Society 58: 475–480.
16. Justesen, A. F., Ridout, C. J. and Hovmøller, M. S. 2002. The recent history of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Denmark as revealed by disease incidence and AFLP markers. Plant Pathology (London), 51: 13–23.
17. Lorys, M., Villaréal, M. A., Lannou, C., de Vallavieille-Pope, C. and Neema, C. 2002. Genetic Variability in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Populations Sampled on a Local Scale during Natural Epidemics. Applied Environmental Microbiology 68(12): 6138–6145.
18. Majer, D. Mithen, R., Lewis, B. G., Vos, P. and Oliver, R. P. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. Mycological Research 100, 1107–11.
19. McNeal, F. H., Konzak, C.F., Smith, E. P., Tate, W.S., and Russel T.S. 1971. Uniform system for recording and processing cereal research data. United stae, Department of Agricultural Research Services, ARS, pp. 34-121.
20. Nazari, K. 1998. Evaluation of resisitance in bread wheat cultivars and advanced lines to wheat yellow rust at seedling and adult-plant stage and possible postulation of genotypes by gene for gene hypothesis. M.Sc. thesis. Tabriz University.
21. Niemann, E., Scharif, G. and Bamdadian, A. 1968. Die getreide roste in Iran. Wirtsbereich, untercheidung Bedeutung Bekampfung. Entomologie et Phythopathologie Appliquees. 27: 25-41.
22. Steele, K. A., Humphreys, E.,Wellings, C. R. and Dickinson, M. J. 2001. Support for the stepwise mutation model for pathogen evolution in Australian *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* by use of molecular markers. Plant Pathology, 50:174-180.
23. Stubbs, R. W. 1985. Stripe rust. *In* Cereal rusts. Vol. II. Disease, distribution, epidemiology, and control. *Edited by* A.P. Roelfs and W.R. Bushnell. Academic Press, New York. pp. 61–101.
24. Wellings, C. R. and McIntosh, R. A. 1990. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Australasia: pathogenic changes during the first 10 years. Plant Pathology, (Oxford), 39: 316–325.

Virulence and Molecular diversity in *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* from Iran

H.Rabbani –Nasab[*]- M. Okhovat- M.Torabi- M.Abbasi- J. Mozaffari[1]

Abstract

To study Virulence and molecular polymorphism variation of *Puccinia striiformis* Westend. f.sp.*tritici* Eriks. (Yellow rust disease agent) in Iran, 86 isolates were collected from all around the country. Race determination was carried out according to Johnson *et al*. (1972) method. In addition, isolates were analyzed by AFLP method by Four primer combinations . According to the results of race determination, 35 Physiological races were identified. Race 178E0A$^-$ with 7 members was the most frequent followed by Race 64E241A$^+$ with 5 members. Virulence was not detected on the commercial cultivars having *Yr*1(Except for 4 Isolates), *Yr*3, and *Yr*5 genes. Virulence for *Yr*2, *Yr*24, *Yr*7 and *Yr*A was detected in all around the country. In average for every Primer combination 78 bands were recorded that 30 percent of them were polymorphic. Analysis of data by NTSYS software grouped all isolates in 9 main groups as A, B, C, D, E, F, G, H and I, and 10 single isolates groups in 77% similarity coefficient. There was significant relationship between geographic origins and AFLP fingerprinting groups. However there were not certain relationship between races and these groups.
Genetic similarity between most of populations and West/Northwest population (contain Ilam, Hamadan, Kermanshah and Ardebil provinces) was more than 65% . This similarity may be because of Sudanian and mediteranian flows in transferring of spors from Northwest of Iran to North and Southwest of Iran and concluded to a gene flow.

Key words: Wheat, Yellow rust, Virulence, Molecular Polymorphism, AFLP, Race

*- Corresponding author Email: hrabbani wsr@yahoo.com
1- Contribution from Tehran University and Reserch of Plant Protection Institute of Country and Research of Seed and Plant breeding Institute Respectively