

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت و وضعیت تولید مثلی قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* عامل بیماری لکه خرمایی برگ گندم در شمال ایران

حسن مومنی^۱، محمد جوان نیکخواه^{۲*}، محمد رضوی^۳ و محمدرضا نقوی^۴
۱، ۲ و ۴ به ترتیب دانشجوی سابق دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشیار گروه گیاه پزشکی و استاد گروه بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳، دانشیار موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور
(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۱۴ - تاریخ تصویب: ۹۲/۳/۶)

چکیده

بیماری لکه خرمایی با عامل *Pyrenophora tritici-repentis* یکی از مهمترین بیماریهای لکه برگی گندم است که از نظر اقتصادی خسارت قابل توجهی در دنیا وارد می کند. از میان ۱۶۳ جدایه قارچ که از دو استان گلستان و مازندران جمع آوری شدند ۵۸ جدایه برای بررسی ساختار ژنتیکی قارچ انتخاب گردید. این تعداد جدایه نماینده که بیانگر واقعی جمعیت باشند، بر اساس سه معیار شامل نتایج حاصل از انگشت نگاری DNA جدایه ها با نشانگر مولکولی rep-PCR و با استفاده از آغازگر Box، مناطق جمع آوری جدایه ها و مزارع نمونه برداری شده، انتخاب گردید. انتخاب جدایه های نماینده به نحوی انجام شد که تمام مناطق نمونه برداری را پوشش دهد. جهت ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت های قارچ عامل بیماری از نشانگر مولکولی rep-PCR استفاده شد. بدین منظور سه پرایمر BOX، ERIC و REP به کار رفت. داده های حاصل از مرحله انتخاب جدایه های نماینده که با کمک پرایمر BOX انجام شده بود، به همراه داده های بدست آمده با دو پرایمر ERIC و REP جهت ارزیابی ساختار ژنتیکی زیرجمعیت های قارچ در ایران بکار رفت. بررسی بین شش زیرجمعیت قارچ در کشور شامل A(a)، A(b)، A(c)، A(d)، A(e) و A(f) نشان داد که ۷۳٪ از تنوع کل مربوط به تنوع موجود درون زیرجمعیت ها و ۲۷٪ مربوط به تنوع بین آنها بود. میانگین تنوع ژنی ۳۱۴۷/ برآورد گردید. دندروگرام بدست آمده بر اساس روش UPGMA با کمک ضریب Dice نشان داد که ارتباطی بین گروه بندی نژادی و مولکولی جدایه ها وجود ندارد، ولی جدایه های زیرجمعیت های قارچ که متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف بودند، در گروه های مجزا قرار گرفتند. بررسی وضعیت تولید مثلی جنسی قارچ نشان داد که ۵۴٪ جدایه های مورد بررسی تولید سودوتسیوم به همراه آسک و آسکوسپور کردند. ۱۷٪ از جدایه ها فقط تولید سودوتسیوم و ۲۹٪ هیچگونه ساختار تولید مثل جنسی تولید نکردند. علاوه بر ژن MAT و برخی فاکتورهای ژنتیکی مستقل، عناصر غذایی و میزان رطوبت نیز بر تولید فرم جنسی قارچ موثرند.

واژه های کلیدی: لکه خرمایی، گندم، rep-PCR، تلمورف

مقدمه

لکه خرمایی برگ گندم که به عنوان لکه زرد یا سوختگی زرد برگی نیز مشهور است یکی از مهمترین بیماری های لکه برگی است که توسط قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs

(anamorph: *Dreschlera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker ایجاد می شود. این بیماری در مناطق عمده کشت گندم نان (*Triticum aestivum* L.) و گندم دوروم (*T. durum* L.) در سراسر دنیا وجود دارد (Strelkov & Lamari, 2003) و موجب کاهش زیادی

بررسی آنها تفاوت مشخصی بین جدایه های جمع آوری شده از مناطق مختلف دیده نشد.

محققین متعددی پیرامون فاکتورهای موثر بر تولید مثل جنسی قارچ *P. tritici-repentis* در محیط آزمایشگاه و مزرعه مطالعه کرده اند (Pfender et al., 1988). لپوینت و همکاران (Lepoint et al., 2010).

(تنوع ژنتیکی گروههای سازگار جنسی قارچ-*P. tritici-repentis* و نیز ژن های تولیدکننده توکسین این قارچ را مورد مطالعه قرار دادند. ضمناً یکی دیگر از اهداف مطالعه آنها اثبات طبیعت هموتالیک بودن بیمارگر بود. بررسی آنها روی ۸۸ استرین جمع آوری شده از اروپا، شمال و جنوب آمریکا، شمال آفریقا و مرکز و جنوب آسیا نشان داد که ۶۰٪ استرین ها مستقل از منشا جغرافیایی تولید سودوتسیوم محتوی آسکوسپور کردند. نامبردگان مناطق کد کننده *MAT1-1* و *MAT1-2* در قارچ را شناسایی نمودند. بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از لوکوس *MAT* جدایه ها را در دو گروه مجزا قرار داد که مستقل از منشا جغرافیایی یا نژادی بود.

این بیماری در سالهای اخیر در نواحی گندم کاری شمال کشور بخصوص استان گلستان شیوع زیادی داشته (Momeni et al., 2011) و هیچگونه تحقیق مدونی درباره ساختار ژنتیکی این قارچ در کشور و نیز وضعیت تولید مثلی آن انجام نشده است. هدف از این تحقیق بررسی ساختار ژنتیکی قارچ عامل بیماری لکه خرمایی گندم در کشور و آگاهی از قابلیت باروری جنسی جدایه های عامل بیماری بود.

مواد و روش ها

نمونه برداری، جداسازی قارچ، تولید انبوه کنیدی و تعیین نژاد قارچ

نمونه برداری در یک دامنه جغرافیایی برابر با ۳۵۰-۳۰۰ کیلومتر در استانهای گلستان و مازندران انجام گرفت (جدول ۲). جداسازی قارچ و تولید کنیدی براساس روش پیشنهادی (Lamari & Bernier 1989b) و با استفاده از پروتوکل منتشر شده توسط مرکز تحقیقات زلی در استرالیا (Jones, 2010) انجام گرفت. کلیه جدایه ها در قالب یک جمعیت کلی به نام A قرار گرفتند و با توجه به فاصله جغرافیایی، جدایه ها در شش

در عملکرد محصول می شود. این کاهش عملکرد به دلیل کاهش سطح فتوسنتز کننده برگ می باشد که نهایتاً مانع پرشدن دانه و موجب کاهش وزن دانه ها می گردد. این بیماری همچنین چروکیدگی بذر و کاهش تعداد دانه در سنبله را موجب می گردد (De Wolf et al., 1998).

طبق تقسیم بندی اولیه جدایه های *P. tritici-repentis* در ۴ پاتوتیپ عمده قرار گرفتند، که این تقسیم بندی بر اساس توانایی جدایه ها در ایجاد نکروز یا کلروز و یا هر دو در یک سری از کولتیوارهای افتراقی شامل Lamari, Glenlea و Salamouni و 6B-365 بود (Lamari & Bernier, 1989a). بعداً پاتوتیپ های دیگری نیز از نقاط مختلف دنیا براساس توانایی تولید نژادهای جدید بیماریزا گزارش گردید و جدایه های قارچ عامل بیماری لکه خرمایی در ۸ نژاد گروه بندی شدند (Lamari et al., 2003).

ساختار ژنتیکی جمعیت قارچ توسط فریزن و همکاران (Friesen et al., 2005) در مجموعه ای از جدایه های قارچ که از آمریکای شمالی، آمریکای جنوبی و اروپا جمع آوری شده بود، مورد بررسی قرار گرفت و برای این منظور از نشانگر مولکولی AFLP استفاده کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که گروه بندی ژنتیکی و جغرافیایی مشخصی بین نژادهای این قارچ وجود نداشت و نتیجه گیری نمودند که جمعیت قارچ در طبیعت ترجیحاً "دگرگشن بوده و ظهور و گسترش این جمعیت یا به تازگی صورت گرفته یا یک جریان ژنی مداوم جهانی از این قارچ احتمالاً از طریق جابجایی بذر بین قاره ها وجود داشته است (Friesen et al., 2005). لیزووا و همکاران (Leisova et al., 2008) ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی ۱۰۰ جدایه *P. tritici-repentis* را که عمدتاً از جمهوری چک جمع آوری شده بود با کمک نشانگرهای AFLP بررسی کردند. واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که ۹۸/۱٪ از واریانس ژنتیکی درون جمعیت های یک منطقه (محلی) و ۱/۹٪ از این واریانس بین جمعیتها اتفاق می افتد. میرونینکو و همکاران (Mironenko et al., 2007) از نشانگر مولکولی RAPD جهت مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه های *P. tritici-repentis* استفاده کردند. در

اپندروف آلمان استفاده شد. برای تعیین کیفیت DNA و اطمینان از سلامت DNA استخراج شده نمونه ها پس از استخراج توسط الکتروفورز افقی بررسی شدند.

انجام واکنشهای rep-PCR با کمک پرایمر REP و ERIC .BOX

از میان ۱۶۳ جدایه قارچ که از دو استان گلستان و مازندران جمع آوری شدند، ۵۸ جدایه برای بررسی ساختار ژنتیکی قارچ انتخاب گردید. این تعداد جدایه نماینده که بیانگر واقعی جمعیت باشند، بر اساس سه معیار شامل نتایج حاصل از انگشت نگاری DNA جدایه ها با نشانگر مولکولی rep-PCR و با استفاده از آغازگر Box، مناطق جمع آوری جدایه ها و مزارع نمونه برداری شده، انتخاب گردید. انتخاب جدایه های نماینده به نحوی انجام شد که تمام مناطق نمونه برداری را پوشش دهد. واکنشهای rep-PCR با کمک پرایمرهای REP، BOX و ERIC (جدول ۱) برای ۵۸ جدایه قارچ که از دو استان گلستان و مازندران جمع آوری شده بودند، انجام شد.

زیر جمعیت شامل A(a)، A(b)، A(c)، A(d)، A(e) و A(f) واقع شدند، به طوریکه هر زیر جمعیت از زیر جمعیت بعدی حداقل ۳۰ کیلومتر فاصله دارد. زیر جمعیت A(e) شامل نمونه های استان مازندران است و سایر زیرجمعیت ها از استان گلستان می باشند. تعیین نژادهای قارچ در مطالعات قبلی با کمک ارقام افتراقی و طبق روش لاماری و همکاران (Lamari et al., 2003) انجام شده و نوع نژاد هر جدایه مشخص بود (Momeni et al., 2013).

تولید میسلیوم قارچ و استخراج DNA

تولید میسلیوم قارچ در محیط Fries' Medium (Dhingra & Sinclair, 1986) صورت گرفت. توده میسلیومی به مدت ۷۲ ساعت فریز درای شده و سپس تا زمان استخراج در فریزر ۸۰- نگهداری گردید. برای استخراج DNA از جدایه های قارچی از کیت استخراج استفاده شد (Wizard® Genomic DNA purification kit Technical manual # TM 050(Promega corp, Madison, WI)). به منظور بررسی کمیت و خلوص DNA از دستگاه بیوفوتومتر مدل ۶۱۳۱ ساخت شرکت

جدول ۱ - توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنشهای rep-PCR (Versalovic et al., 1994)

نام پرایمر	توالی پرایمر
BOX-Air	5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'
ERIC1	5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'
ERIC2	5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'
REP1	5'-III CGI CGI CAT CIG GC -3'
REP2	5'-ICG ICI TAT CIG GCC TAC -3'

بررسی قابلیت تولید فرم جنسی قارچ و ارزیابی قابلیت بیماریزی آن

۴۸ جدایه از ۵۸ جدایه ای که برای ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت های قارچ استفاده شد، جهت ارزیابی قابلیت تولید مثل جنسی استفاده شدند. بدین منظور از دو روش استفاده شد. یکی روش فرایزن و همکاران (Friesen et al. 2003) با کمک برگ ذرت بود و روش دیگر با کمک برگ گندم بود که کارایی بیشتری داشت (Momeni et al., 2011).

در روش دوم پلاگ هایی از محیط کشت فعال قارچ در محیط ۷۸/V8/CaCo₃ روی محیط کشت آب آگار (WA) ۲٪ حاوی قطعات برگ گندم سترون شده قرار گرفت و تحت شرایط نوری و دمایی خاص شامل ۱۲ ساعت نور فلئورسنت و ۱۲ ساعت نور near UV در دمای ۲۲°C

مواد و ترکیبات لازم برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری rep-PCR شامل ۲/۵ یونیت از آنزیم Tag DNA Polymerase (Fermentaz, 5U/μl)، ۲/۵ میلی مولار MgCl₂، ۱۲/۵ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۱۰۰ میکرومولار از هر dNTPs، 1 X از بافر PCR و ۵۰ نانوگرم DNA الگو بود که طی بهینه سازی مکرر به دست آمد. شرایط واکنش های rep-PCR شامل یک سیکل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۲ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل که هر سیکل بصورت مجزا خود متشکل از سه مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۳۶ °C به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۳ دقیقه بود. مرحله سوم شامل یک سیکل بسط نهایی در دمای ۷۲ °C سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.

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

نرم افزار دیگری که برای محاسبه واریانس مولکولی (AMOVA) مورد استفاده قرار گرفت GenAlEx6.1 (Peakall and Smouse, 2006) بود.

PhiPT به عنوان شاخصی برای واریانس مولکولی است که نشان دهنده ارتباط بین افراد درون یک جمعیت را نسبت به کل جمعیت نشان می دهد، از فرمول $PhiPT = AP / (WP + AP)$ محاسبه گردید که در آن AP (Among Populations) میزان تنوع بین جمعیتها و WP (Within Populations) میزان تنوع درون جمعیت ها را نشان می دهد. ماتریس فاصله ژنتیکی (Genetic Distance Matrix) بین تمام جدایه های مورد بررسی در این تحقیق بدست آمد.

تجزیه خوشه ای (Cluster analysis)

نرم افزاری که برای تجزیه خوشه ای در این تحقیق استفاده شد NTSYSpc-2.02e بود. تجزیه خوشه ای بر اساس روش UPGMA (Unweighted Pair-Groups Methods of Arithmathic Average) انجام شد. ماتریس مشابهت با کمک ضریب تشابه دایس (Dice coefficient) (Dice, 1945) در منوی تشابه یا similarity نرم افزار و در قسمت SimQual به دست آمد. از ماتریس مشابهت در منوی Clustering نرم افزار و در قسمت SAHN (Sequential, Agglomerative, Hierarchical and Nested) (Sneath & Sokal, 1973) کلاستر مربوط به جدایه های مورد بررسی در این تحقیق بدست آمد.

نتایج

نتایج rep-PCR با کمک پرایمرهای BOX ، ERIC و REP

محصولات واکنشهای rep-PCR با کمک پرایمرهای BOX ، ERIC و REP روی ژل آگارز الگوهای باندهای متفاوتی ایجاد کردند (شکل ۱). مشخصات کامل جدایه های مورد استفاده در این تحقیق به همراه نتایج مربوط به بررسی تولید فرم جنسی قارچ در جدول ۲ آمده است.

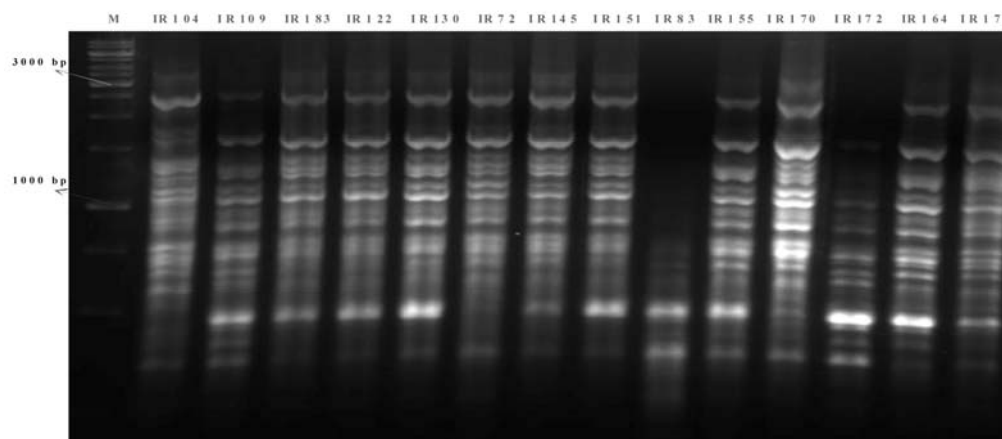
نگهداری شد. پس از دو هفته سودوتسیومهای تیره با ابعاد ۲۵۰-۲۰۰ میکرومتر روی بافت برگ تشکیل گردیدند. قرار دادن پتری ها به مدت دو هفته دیگر تحت تیمار ۴ °C بر کارایی روش افزوده و موجب بلوغ آسکوسپورها شد. آزمون بیماریزایی بر اساس مایه زنی سوسپانسیون آسکوسپورهای قارچ با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی لیتر آب روی ارقام حساس گندم بولانی و تجن انجام شد. گیاهچه های گندم در مرحله ۲-۳ برگی مایه زنی شدند و سپس به مدت ۴۸ ساعت زیر اتاقکی با پوشش پلاستیکی سیاه در گلخانه، تحت دمای ۲۲°C قرار گرفتند. سپس پوشش پلاستیکی از روی گیاهچه ها برداشته شده و گیاهچه های مایه زنی شده همچنان در شرایط دمایی ذکر شده و تناوب نوری ۱۶ ساعت (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. شش روز پس از مایه زنی، علایم ظاهری بیماری روی برگ بررسی شد.

تجزیه و تحلیل داده ها

تنوع ژنتیکی (Genetic Diversity)

تنوع ژنتیکی درون هر زیرجمعیت و برای کل جدایه های مورد بررسی در این تحقیق توسط POPGENE Version 1.31 بدست آمد. تنوع ژنتیکی برای کل جمعیت و تنوع ژنتیکی درون هر جمعیت به ترتیب به عنوان H_t و H_s نامیده می شود. تنوع ژنتیکی از طریق فرمول $H = (1 - \sum p_i^2)$ محاسبه گردید، که در آن p_i فراوانی آلل i در هر لوکوس است (Nei, 1973).

فاصله ژنتیکی بین جمعیت ها و درون جمعیت ها نیز با کمک POPGENE محاسبه گردید و بر اساس فاصله ژنتیکی نئی (D_s) و بر اساس UPGMA دندروگرام بین جمعیت های مختلف بدست آمد که با کمک نرم افزار TREEVIEW v.1.6.6 (Page, 2007) قابل مشاهده است. در ضمن میزان جریان ژنی از دیگر فاکتورهای محاسبه شده توسط این نرم افزار بود. جریان ژنی که با N_m (Number of migrants) نشان داده می شود از طریق فرمول $N_m = 0.5(1 - G_{ST}) / G_{ST}$ (McDermott and McDonald, 1993) محاسبه گردید که G_{ST} ضریبی از تفرق ژنی است. شاخص شانن نیز به عنوان یک معیار اندازه گیری تنوع ژنی توسط این نرم افزار محاسبه گردید.



شکل ۱- نقوش الکتروفورزی DNA در ۱۴ جدایه متعلق به جمعیت ایرانی قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* با استفاده از پرایمر BOX. ستون اول سمت چپ سایز نشانگر 1kb (فرمنتاز) است، جدایه ها به ترتیب از چپ به راست شامل IR104، IR109، IR183، IR122، IR130، IR72، IR145، IR151، IR83، IR155، IR170، IR172، IR164 و IR175 می باشند.

جدول ۲- مشخصات جدایه های *Pyrenophora tritici-repentis* مورد استفاده در واکنشهای rep-PCR و بررسی تولید فرم جنسی قارچ

Isolate	Province(Location)	Farmer's field	Phenotype (Race)	Population and subpopulations	Pseudothecia , Asci and Ascospores	Pseudothecia	No sexual structure
IR 1	Golestan (Gorgan)	M1	1	A(a)	+		
IR 3	Golestan (Gorgan)	M1	1	A(a)	+		
IR 7	Golestan (Gorgan)	M2	1	A(a)			+
IR 9	Golestan (Gorgan)	M2	1	A(a)			+
IR 13	Golestan (Gorgan)	M3	1	A(a)	+		
IR 16	Golestan (Gorgan)	M3	1	A(a)	+		
IR 17	Golestan (Aghala)	M4	1	A(a)			+
IR 22*	Golestan (Kalaleh)	M6		A(b)			
IR 24	Golestan (Kalaleh)	M6	1	A(b)		+	
IR 26	Golestan (Kalaleh)	M6	1	A(b)		+	
IR 28	Golestan (Kalaleh)	M7	1	A(b)	+		
IR 30	Golestan (Kalaleh)	M7	1	A(b)	+		
IR 32	Golestan (Kalaleh)	M7	1	A(b)	+		
IR 33	Golestan (Kalaleh)	M7	1	A(b)		+	
IR 37	Golestan (Galikesh)	M8	1	A(b)	+		
IR 43	Golestan (Galikesh)	M8	2	A(b)			+
IR 44	Golestan (Galikesh)	M8	1	A(b)	+		
IR 46	Golestan (Galikesh)	M9	1	A(b)			+
IR 51	Golestan(Minoodasht)	M10	1	A(c)			+
IR 53*	Golestan (Minoodasht)	M10		A(c)			
IR 55	Golestan (Minoodasht)	M10		A(c)	+		
IR 65	Golestan (Gonbad)	M11	1	A(c)		+	
IR 66	Golestan (Gonbad)	M12	1	A(c)	+		
IR 70	Golestan (Gonbad)	M13	1	A(c)	+		
IR 72	Golestan (Gonbad)	M14	1	A(c)	+		
IR 73	Golestan (Azadshahr)	M15	1	A(c)	+		
IR 76	Golestan (Azadshahr)	M15	2	A(c)			+
IR 82*	Golestan (Azadshahr)	M16		A(c)			
IR 83	Golestan (Azadshahr)	M16	2	A(c)			+
IR 92	Golestan (Khanbebin)	M17	1	A(d)	+		
IR 95	Golestan (Aliabade-Katool)	M18	1	A(d)		+	
IR 97	Golestan (Aliabade-Katool)	M18	2	A(d)			+
IR 103*	Golestan (Aliabade-Katool)	M18		A(d)			
IR 104*	Golestan (Aliabade-Katool)	M18		A(d)			
IR 109*	Golestan(Taghiabad)	M19		A(d)			
IR 114	Golestan(Taghiabad)	M20	1	A(d)	+		
IR 122	Mazandaran(Behshahr)	M21	1	A(e)	+		
IR 126*	Mazandaran(Behshahr)	M21		A(e)			
IR 127	Mazandaran(Behshahr)	M21	1	A(e)		+	
IR 130	Mazandaran(Behshahr)	M21	1	A(e)	+		
IR 135	Mazandaran (Neka)	M22	1	A(e)			+
IR 141	Mazandaran (Sari)	M25	1	A(e)			+
IR 142*	Mazandaran (Sari)	M25		A(e)			
IR 145	Mazandaran (Sari)	M25	1	A(e)			+
IR 148	Mazandaran(Ghaemshahr)	M26	1	A(e)	+		

ادامه جدول ۲- مشخصات جدایه های *Pyrenophora tritici-repentis* مورد استفاده در واکنشهای rep-PCR و بررسی تولید فرم جنسی قارچ

Isolate	Province(Location)	Farmer's field	Phenotype (Race)	Population and subpopulations	Pseudothecia , Asci and Ascospores	Pseudothecia	No sexual structure
IR 151	Mazandaran(Ghaemshahr)	M26	1	A(e)	+		
IR 152	Mazandaran(Ghaemshahr)	M26	1	A(e)	+		
IR 155	Golestan(Bandare-Torkaman)	M28	1	A(f)			+
IR 161*	Golestan (Kordkuy)	M30		A(f)			
IR 162	Golestan (Kordkuy)	M30	1	A(f)		+	
IR 163	Golestan (Kordkuy)	M30	1	A(f)		+	
IR 164	Golestan (Kordkuy)	M30	2	A(f)			+
IR 166	Golestan (Kordkuy)	M30	1	A(f)	+		
IR 170	Golestan (Kordkuy)	M31	1	A(f)	+		
IR 171	Golestan (Kordkuy)	M32	1	A(f)	+		
IR 172	Golestan (Kordkuy)	M32	1	A(f)	+		
IR 175*	Golestan (Kordkuy)	M35		A(f)			
IR 183	Golestan (Nookandeh)	M36	1	A(f)	+		

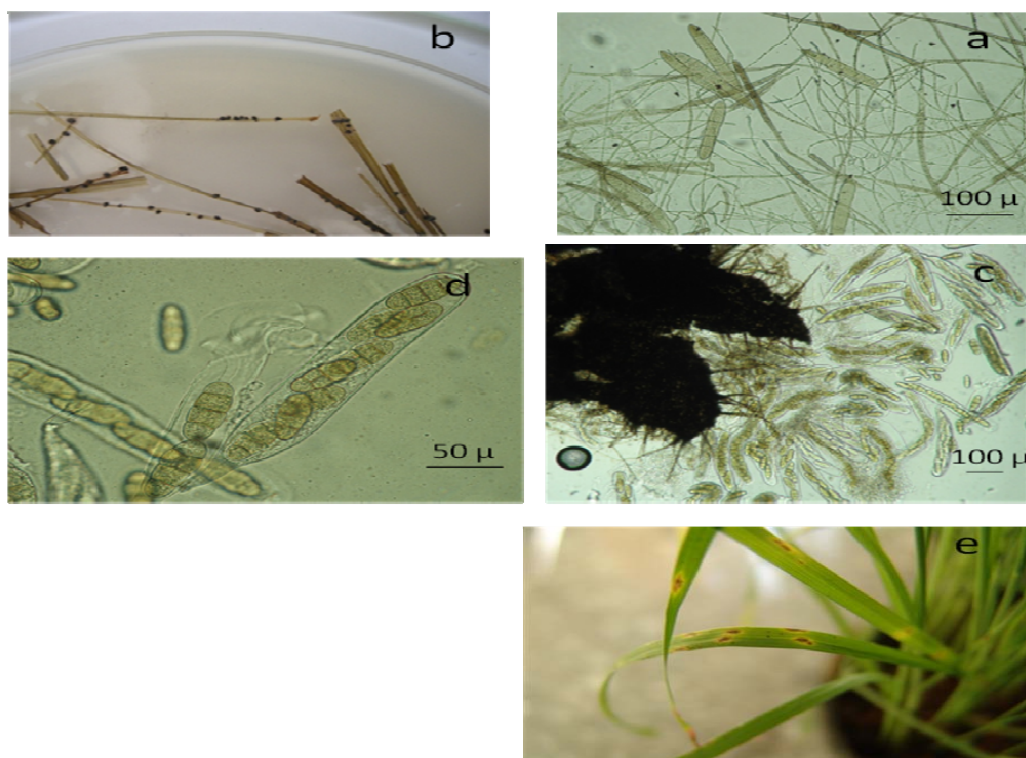
* این جدایه ها در واکنشهای rep-PCR استفاده شده اند ولی در بررسی تولید فرم جنسی استفاده نشده اند.

نتایج جداسازی قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* و

بررسی تولید فرم جنسی

پرگنه های هفت روزه قارچ در محیط V8-PDA به رنگ خاکستری تیره بودند. کنیدیوفورها در پایه متورم

به رنگ زرد تا قهوه ای با ابعاد $300-100 \times 7-8$ میکرومتر، کنیدیوم ها زرد و دارای ۵-۷ دیواره عرضی و به ابعاد $200-100 \times 14-18$ میکرومتر با سلول پایه مخروطی بودند (شکل ۲ a).



شکل ۲- مشخصات اندامهای بارده جنسی و غیر جنسی قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* و نشانه های بیماری لکه خرمایی حاصل از این قارچ. (a) کنیدیوم و کنیدیوفور. (b) تشکیل سودوتسیوم در محیط آب آگار (WA) ۲٪ حاوی قطعات برگ گندم. (c) خروج آسک از سودوتسیوم. (d) آسک و آسکوسپورها. (e) علائم ظاهری بیماری روی برگ گندم رقم بولانی.

قطعات برگ گندم استریل شده و نگهداری آنها در شرایط نوری و دمایی خاص شامل ۱۲ ساعت نور

با کشت پلاگ هایی از محیط کشت فعال V8- Caco3 روی محیط کشت آب آگار (WA) ۲٪ حاوی

۴۸ جدایه مورد بررسی این وضعیت اتفاق افتاد. ۱۴ (۲۹٪) جدایه از اینها هیچگونه ساختار جنسی قابل مشاهده ای تولید نکردند. در ۸ جدایه (۱۷٪) نیز با وجود تولید سودوتسیوم مشابه گروه اول ولی داخل آنها آسک و آسکوسپور مشاهده نشد (جدول ۲). آزمایشات در سه تکرار انجام شد. برخی از جدایه ها که روی برگ ذرت ساختار جنسی مشخصی تولید نکردند روی برگ گندم در محیط WA سودوتسیومهایی تولید کردند که فاقد آسک و آسکوسپور بودند. بررسی ساختار زیر جمعیت های قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* بررسی آنالیز این زیرجمعیت ها با کمک GenAlex6.1 نشان داد که عمده واریانس مربوط به واریانس درون جمعیت ها معادل ۷۳٪ و مقدار کمتری از واریانس کل مربوط به واریانس بین زیر جمعیت ها معادل ۲۷٪ است (جدول ۳).

فلئورسنت و ۱۲ ساعت نور near UV در دمای ۲۲°C، پس از دو هفته سودوتسیومهای تیره با ابعاد ۲۵۰-۲۰۰ میکرومتر روی بافت برگ تشکیل گردیدند (شکل ۲ b و c). آسکوسپورها تخم مرغی شکل و دارای سه دیواره عرضی مشخص و یک دیواره طولی و با ابعاد ۵۰-۴۰ × ۲۰-۱۶ میکرومتر بودند (شکل ۲ d). این مشخصات با مشخصات ارایه شده برای قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* در (Ellis, 1977)، (Sivanesan, 1987) و (Alcorn, 1988) کاملاً مطابقت داشت. شش روز پس از تلقیح گیاهان با آسکوسپورهای قارچ، علائم ظاهری بیماری روی برگ شامل لکه های مشخص نکروز و کلروز مشاهده شد (شکل ۲ e). قارچ عامل بیماری مجدداً از بافتهای آلوده جداسازی گردید. در تعدادی از جدایه ها سودوتسیوم سیاه رنگ قارچ تشکیل و در درون آن آسک و آسکوسپورهای بالغ تولید شد. در ۲۶ جدایه (۵۴٪) از

جدول ۳ - نتایج آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) برای شش زیر جمعیت قارچ *Pyrenophora tritici-repentis*

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	5	216.758	43.352	3.508	27%
Within Pops	52	504.156	9.695	9.695	73%
Total	57	720.914		13.204	100%

*: P value=0.001 and number of permutations is 999.

ایرانی قارچ را نشان می دهد. بیشترین میزان یکنواختی ژنتیکی معادل ۹۵۷۴/۰ و بین دو زیر جمعیت A(f) از گلستان و زیرجمعیت A(e) از مازندران می باشد. میزان فاصله بین این دو جمعیت از همه کمتر و برابر با ۰/۰۴۳۶ می باشد.

مقدار PhPT در این بررسی ۰/۲۶۶ محاسبه گردید. بر اساس آنالیز نئی (Nei, s, 1978) و بررسی تنوع ژنی میزان جریان ژنی (Nm) برابر با ۱/۰۴۷۱ و میزان Gst برابر با ۰/۳۲۳۲. محاسبه گردید. میزان تنوع ژنتیکی برای کل جمعیت (Ht) برابر با ۰/۳۱۷۴ محاسبه شد. جدول ۴ فاصله ژنتیکی و میزان یکنواختی بین زیرجمعیت های

جدول ۴ - شباهت ژنتیکی (بالای قطر میانی) و فاصله ژنتیکی (پایین قطر میانی) بین شش زیر جمعیت قارچ *Pyrenophora tritici-repentis*

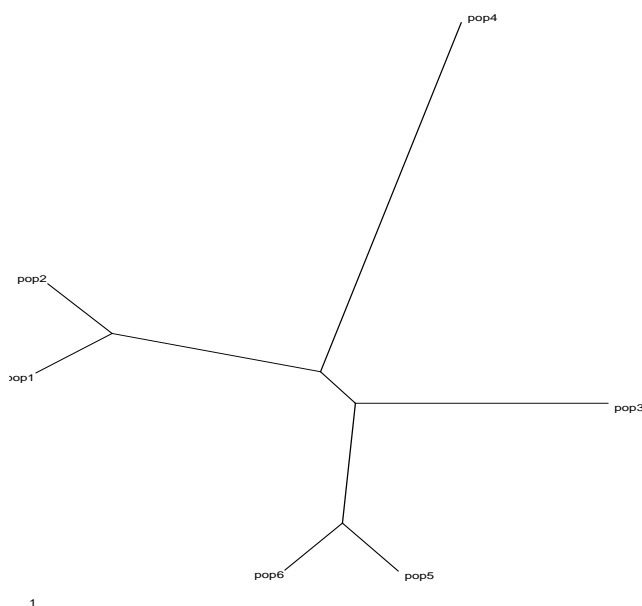
pop ID	A(a)	A(b)	A(c)	A(d)	A(e)	A(f)
A(a)	****	0.9541	0.8359	0.8313	0.8624	0.7533
A(b)	0.0470	****	0.9255	0.8339	0.9262	0.8473
A(c)	0.1793	0.0774	****	0.8045	0.9209	0.8422
A(d)	0.1848	0.1817	0.2175	****	0.8546	0.7575
A(e)	0.1480	0.0767	0.0824	0.1571	****	0.9574
A(f)	0.2832	0.1657	0.1717	0.2777	0.0436	****

جمعیت های به دست آمده در دو گروه دو تایی و دو تا بصورت منفرد قرار گرفتند. بر اساس این دندروگرام

دندروگرام فاصله ژنتیکی با روش UPGMA با کمک نرم افزار POPGENE Version 1.31 به دست آمد و زیر

گرفتند. دو زیرجمعیت سه و چهار نیز که به ترتیب زیرجمعیت های A(c) و A(d) هستند نیز بصورت منفرد قرار گرفتند (شکل ۳).

جمعیت های یک و دو که به ترتیب بیانگر زیرجمعیت های A(a) و A(b) می باشد باهم در یک گروه وزیرجمعیت های پنج و شش که به ترتیب زیرجمعیت های A(e) و A(f) هستند نیز باهمدیگر در یک گروه دیگر قرار



POP1=A(a) POP2= A(b) POP3= A(c) POP4= A(d) POP5= A(e) POP6= A(f)

شکل ۳ - دندروگرام حاصل بر اساس فاصله ژنتیکی نئی بین شش زیر جمعیت ایرانی قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* که با روش UPGMA ترسیم شده است.

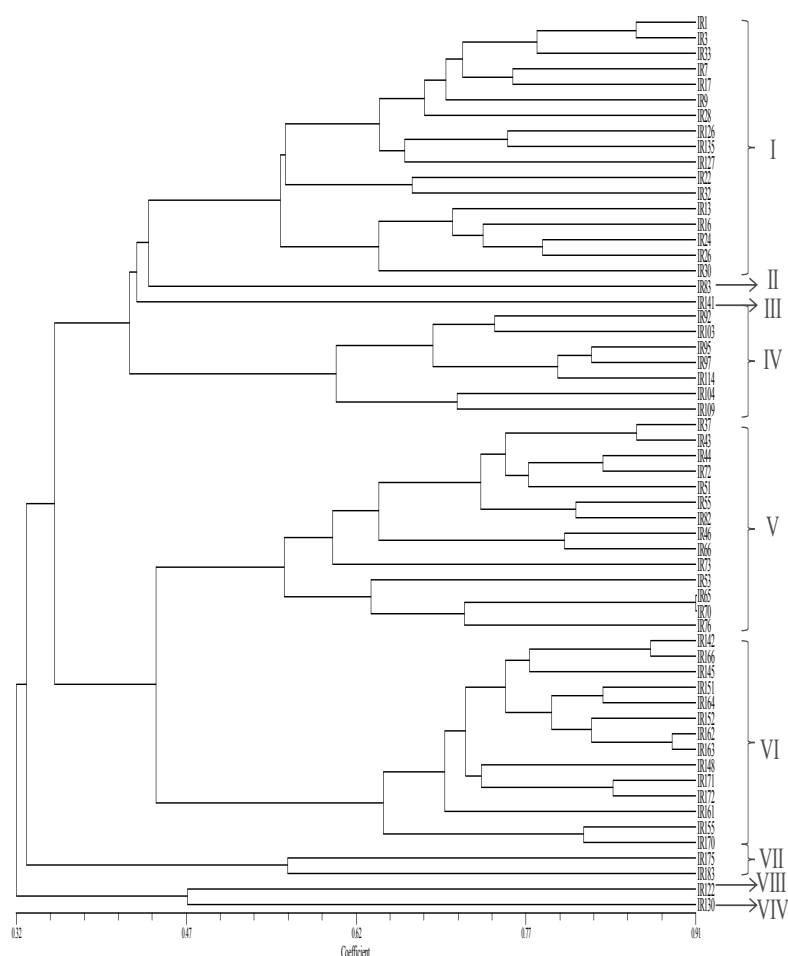
بصورت یک گروه مجزا در دندروگرام شکل ۳ قرار گرفت. به جز چهار جدایه IR37، IR43، IR44 و IR46 که همگی از منطقه گالیکش واقع در استان گلستان جمع آوری شده بودند و متعلق به زیر جمعیت A(b) هستند، سایر جدایه های واقع در کلاستر V متعلق به زیر جمعیت A(c) می باشد که در دندروگرام شکل ۳ نیز بصورت یک جمعیت مجزا قرار گرفته است. تمامی جدایه های واقع در کلاستر VI متعلق به زیرجمعیت های A(e) و A(f) هستند که بصورت یک گروه مجزا در دندروگرام قرار گرفتند. این دو زیر جمعیت یک گروه مجزا را در دندروگرام حاصل از بررسی های POPGENE به خود اختصاص دادند. کلاستر VII شامل دو جدایه متعلق به زیرجمعیت A(f) بود. البته این دو جدایه از دو منطقه متفاوت جمع آوری شد. جدایه IR175 از منطقه کردکوی و جدایه IR183 از منطقه نوکنده بود. هر چند جدایه های IR122 و IR130 هر دو

نتایج تجزیه خوشه ای

با رسم خط (cut off line) در دندروگرام شکل ۴ از محدوده ۵۳٪، چهار کلاستر اصلی (I، IV، V و VI)، یک کلاستر با دو جدایه (VII) و چهار کلاستر تک عضو (I، II، VIII و VIV) بدست آمد. به جز سه جدایه IR126، IR127 و IR135 متعلق به استان مازندران، تمامی جدایه های دیگر موجود در کلاستر I، متعلق به استان گلستان و زیر جمعیت های A(a) و A(b) بودند. این دو زیر جمعیت طبق دندروگرام شکل ۳ که از بررسی های POPGENE بدست آمد، بیشترین قرابت را نسبت به هم داشتند. کلاستر II شامل یک جدایه IR83 و متعلق به زیر جمعیت A(c) از استان گلستان بود. زیر جمعیت A(c) در دندروگرام شکل ۳ بصورت مجزا قرار گرفت. کلاستر III شامل یک جدایه به نام IR141 متعلق به زیر جمعیت A(e) از استان مازندران بود. کلاستر IV همگی متعلق به زیرجمعیت A(d) بودند. این زیر جمعیت نیز

قارچ در کشور (Momeni *et al.*, 2013) نبود. به عبارت دیگر گروهبندی نژادی مستقل از گروهبندی ژنتیکی قارچ بود. کلاسترهای II، IV، V و VI حداقل یک نماینده از نژاد دو در درون خود دارند ولی کلاسترهای I، III، VII، VIII و VIV جدایه ای از نژاد دو در درون خود نداشتند. بیشترین شباهت مشاهده شده بین دو جدایه IR70 و IR65 با ۹۱٪ شباهت، مشاهده گردید که هر دوی این جدایه ها متعلق به منطقه گنبد ولی از دو مزرعه متفاوت و متعلق به زیرجمعیت A(c) بودند.

از یک مزرعه (M21) واقع در منطقه بهشهر از استان مازندران جدا شده اند، ولی در دو کلاستر مجزا VIII و VIV قرار گرفتند. نتایج حاصل از آنالیز کلاستر با نتایج حاصل از تنوع ژنتیکی با کمک POPGENE مطابقت داشت. جدایی جغرافیایی تا حدودی بین جدایه های متعلق به زیرجمعیت های مختلف قارچ مشاهده شد و در کلاستر به دست آمده با استثنای جدایه های متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف بصورت مجزا قرار گرفتند. ولی این گروهبندی ژنتیکی جدایه ها قادر به تفکیک مشخص جدایه های متعلق به نژادهای غالب



شکل ۴- دندروگرام تشابه ژنتیکی بین ۵۸ جدایه قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* با استفاده از پرایمرهای BOX ' و ERIC و REP و روش گروه بندی UPGMA

فوق تنها امکان توسعه نژادهای محدودی را در منطقه فراهم کرده است (Momeni *et al.*, 2013). به عبارتی می توان گفت بیمارگر با وجود ارقام جدید و استاندارد فرصت سازگاری پیدا نکرده تا به توسعه و تنوع کافی دست پیدا کند. به عبارت دیگر فشار انتخاب ناچیز بوده

بحث

ارقام عمده ای که در مناطق شمالی کشور کشت می شوند حاصل تلاقی های با ارقام اصلاح شده سیمیت هستند که در بسیاری از موارد حساسیت بالایی به بیماری لکه خرمایی گندم دارند. به نظر می رسد ارقام

است. البته این قارچ از نظر تکاملی در مراحل جوان به سر میبرد زیرا طبق نظر فریزن و همکاران در دهه ۱۹۴۰ ژن تولید کننده توکسین A طی انتقال افقی از قارچ *Stagonospora nodorum* به این قارچ منتقل شده و سپس با کمک محموله های بذری در تمام قاره ها و مناطق گندم کاری کل دنیا پخش شده است (Friesen et al., 2005). کمتر بودن میزان تنوع جمعیت قارچ در کشورمان می تواند مرتبط با این موضوع باشد که هنوز قارچ فرصت سازگاری و بروز نژادهای جدید را نداشته است. بر اساس مطالعات پوجول و همکاران (۲۰۰۲) علاوه بر فشار انتخاب فاکتورهای بسیار زیاد دیگری نیز در بروز چندشکلی در جمعیت قارچ موثر است. از جمله اینها می توان به تعداد جدایه های مورد بررسی، جریان ژنی بین جمعیت ها، میزان سازگاری محیطی و سازگار شدن با یک میزبان جدید و همچنین مهاجرت اشاره کرد (Pujol viera et al., 2002).

تحت شرایط مساعد کنیدیهای قارچ می توانند ۱۰ تا ۲۰۰ کیلومتر (De wolf et al., 1998) جابجا شوند. علاوه بر این عامل بیماری لکه خرمایی گندم بذرزاد نیز می باشد و بنابراین مسافتهای طولانی نیز می تواند جابجا شود (Singh & Huges, 2006). لذا کمتر بودن میزان تنوع در تحقیق حاضر می تواند به دلیل جریان ژنی یا جریان ژنوتیپی بین زیرجمعیت های قارچ باشد. قرار گرفتن جدایه های عامل بیماری لکه خرمایی برگ گندم در کلاستر حاصل از نرم افزار NTSYS بر اساس مشابهت ژنتیکی مستقل از گروه بندی نژادی آنها بود ولی تاحدودی منطبق بر جدایی جغرافیایی زیر جمعیت های مورد بررسی بود هرچند این تفکیک بصورت کامل نبوده و استثناهای متعددی نیز در گروههای مختلف وجود داشت که به تفصیل در قسمت نتایج ذکر گردید. در مطالعه حاضر میزان تنوع قابل ملاحظه ای بین جدایه ها و جمعیت های مورد بررسی بدست آمد ولی در مقایسه با کارهای مشابه این مقدار کمتر بود (Aboukhaddour et al. 2011). تنوع ژنتیکی کل جمعیت مورد مطالعه ابوحدور و همکاران (2011) ۰/۳۸ بود ولی این مقدار برای جمعیت مورد مطالعه ما ۰/۳۱ بود. جدایه هایی که آنها در بررسی خود استفاده کردند از کشورهای مختلف بود و از نظر جغرافیایی

محدوده وسیعتری را در بر می گرفت و لذا بیشتر بودن تنوع نسبت به تحقیق ما تا حدود زیادی قابل انتظار بود. یکی دیگر از دلایل کمتر بودن تنوع ژنتیکی در قارچ مورد مطالعه ما می تواند کم بودن امکان تولید فرم جنسی در جمعیت قارچ باشد که به طور طبیعی در مناطق شمالی کشور اتفاق می افتد. تولید فرم جنسی و بروز نوترکیبی جنسی به عنوان یک عامل اصلی در بروز تنوع ژنتیکی موثر است. زمانیکه فرم جنسی قارچ به اندازه کافی تشکیل نشود یا بقای کافی نداشته باشد اثر این نوترکیبی جنسی در بروز جمعیت های جدید و افزایش تنوع اندک بوده و می توان انتظار تنوع کمتری از جمعیت قارچ را داشت. قارچ هر دو نوع تولید مثل جنسی و غیرجنسی را داراست و به نظر می رسد کنیدیها در اشغال میزبانهای حساس موفق تر عمل کرده اند. طبق بررسی های بروجمن و همکاران (Bruggeman et al., 2003) در قارچ *Aspergillus nidulans* دو نوع اسپور تولید شده توسط قارچ از نظر نقش اکولوژیکی که ایفا می کنند فرق دارند و کنیدیها خیلی سریع میزبانهای قابل دسترس را اشغال می کنند در حالیکه تعداد آسکوسپورهایی که با تحمل استرسهای محیطی اجازه بقا پیدا می کنند کم است و در مورد قارچ *P. tritici-repentis* هر کدام از دوره های سرما به عنوان یک اثر Bottleneck عمل کرده که اجازه استقرار جمعیت های پایدار و جدید را کمتر فراهم می کند. در مطالعه ما تعداد قابل توجهی از جدایه ها فاقد قابلیت تولید آسک و آسکوسپور بالغ بودند (۴۶٪) که کمتر بودن تنوع ژنتیکی جمعیت مورد بررسی ما را نسبت به برخی از مطالعات دیگر توجیه می کند.

فریزن و همکاران (۲۰۰۵) نیز گروه بندی نژادی بین جدایه های مورد ارزیابی خود پیدا نکردند (Friesen et al., 2005) که منطبق بر یافته های این تحقیق است. شباهت ژنتیکی بین جدایه ای مورد مطالعه ما در این تحقیق که با کمک نشانگر مولکولی rep-PCR به دست آمده مستقل از گروه بندی نژادی (Momeni et al., 2013) آنهاست. این نتایج کاملاً قابل انتظار است زیرا نشانگر مورد استفاده در این تحقیق قسمتهای تکراری ژنوم قارچ را تکثیر می کند که بصورت پراکنده در ژنوم وجود دارند، در حالیکه گروه بندی نژادی بر اساس

جنسی یا آسکوسپور بالغ نکردند. طبق مطالعه آنها هیچگونه رابطه مستقیمی بین توالی لوکوس *MAT* و ظرفیت تولید تلمورف نیست. چراکه برای یک هاپلوتیپ *MAT* یکسان در جدایه هایی با توالی یکنواخت تولید تلمورف متغیر بود. این نشان می دهد که فاکتورهای ژنتیکی مستقلی جدا از ژن *MAT* در سیکل جنسی مداخله دارند. مطالعات آنها نشان داد که قارچ هموتال *P. tritici-repentis* می تواند از یک جد هتروتال نشات گرفته باشد. بنابراین با وجودیکه هردو ایدیومورف در کنار هم قرار دارند تا حدودی هتروتالیسم فیزیولوژیکی قابل تصور است. بر خلاف ژن *ToxA* که تعیین کننده نژاد ۲و۱ در جمعیت قارچ است و بسیار محافظت شده است، ژن *MAT* تنوع زیادی در جمعیت قارچ نشان داده و بنابراین از نظر جنسی رفتار متفاوتی نشان می دهند. علاوه بر طبیعت ژنتیکی قارچ فاکتورهای دیگری نیز در تولید فرم جنسی قارچ موثر هستند از جمله اینها عناصر غذایی از قبیل P، N و K می باشند. طبق بررسی های پفیندر و همکاران (1988) غلظت بالای نیتراژ از تولید آسکوسپور ممانعت می کند در حالیکه پسودوتسیوم ها همچنان به فروانی تولید می شوند (Pfender et al., 1988). رطوبت بالا نیز برای تولید آسکوکارب لازم است و عدم تامین مقدار رطوبت بالا مانع تشکیل تلمورف می شود (Pfender et al., 1998).

در بررسی هایی که توسط لپوپونت و همکاران (Lepoint et al., 2010) انجام شد، از ۸۸ جدایه مورد مطالعه آنها ۵۳ جدایه تولید پسودوتسیوم های محتوی آسکوسپورهای بارور نمودند، ۱۲ جدایه هم فقط پسودوتسیوم تولید کردند. در مطالعات آنها ارتباطی بین ظرفیت تولید پسودوتسیوم و منشا جغرافیایی جدایه ها یافت نشد. در این بررسی نیز چنین ارتباطی بین جدایه های مورد بررسی پیدا نگردید. طبق نتایج حاصل از این تحقیق ارتباط مشخصی بین تولید فرم جنسی قارچ و نژاد وجود ندارد. هر چند تمامی جدایه ها متعلق به نژاد دو شامل IR43، IR76، IR83، IR97 و IR164 هیچگونه ساختار جنسی مشخصی تولید نکردند ولی جدایه هایی از نژاد یک نیز وجود داشتند که فاقد قابلیت تولید ساختار جنسی مشخص بودند از جمله اینها می توان جدایه های IR7، IR9، IR17، IR46، IR51، IR135

لوکوس های اختصاصی در ژنوم قارچ است. از طرف دیگر طبق بررسی های شیلدر و برجستروم (۱۹۹۰) میزان ارتباط بین بیماریزایی نژادهای قارچ و نشانگرهای مولکولی در اغلب جمعیت هایی که بصورت جنسی تکثیر پیدا می کنند اندک است (Schilder & Bergstrom, 1990).

طبق نتایج بدست آمده از این تحقیق ۷۳٪ از واریانس ژنتیکی کل جمعیت مربوط به واریانس درون زیرجمعیت های تحت بررسی و فقط ۲۷٪ آن متعلق به واریانس بین زیرجمعیت ها بود. این یافته ها با بسیاری از نتایج بدست آمده توسط سایر محققین در سراسر دنیا تطابق دارد. در یک بررسی که توسط لیزووا و همکاران (2008) روی ساختار جمعیت و تنوع جدایه های نشات گرفته از جمهوری چک، اسلوواکی، روسیه، کانادا، آمریکا و آرژانتین انجام شده است، ۹۸/۱٪ واریانس ژنتیکی مربوط به درون جمعیت ها و فقط ۱/۹٪ از این واریانس مربوط به بین جمعیت ها بود (Leisová et al., 2008). در تحقیق ما میزان واریانس بین جمعیت ها بیشتر و به میزان ۲۷٪ بود که یکی از دلایل آن می تواند قرابت جغرافیایی زیرجمعیت ها باشد و دلیل دیگر تشابه نژادهای مورد بررسی است که محدود به دو نژاد یک و دو بودند. طبق یک بررسی دیگر میزان تنوع مشاهده شده درون جمعیت های قارچ *P. tritici-repentis* برابر با ۷۵٪ و مقدار تنوع بین جمعیت ها ۲۵٪ برآورد گردید (Mironenko et al., 2007). یعنی قسمت عمده تنوع مربوط به جدایه های واقع درون جمعیت ها بود که با نتایج بدست آمده از این تحقیق مطابقت دارد.

در بررسی فرم جنسی عمده جدایه ها تولید سودوتسیوم محتوی آسک و آسکوسپور کردند. بقیه جدایه ها رفتار متفاوتی در تولید اندام های جنسی داشتند طوریکه ۱۷٪ جدایه ها فقط تولید سودوتسیوم و ۲۹٪ جدایه ها هیچگونه اندام جنسی تولید نکردند. استفاده از برگ گندم به جای ذرت موجب افزایش کارایی تولید فرم جنسی شد. طبق بررسی های فریزن و همکاران (2003) نیز درصدی از پسودوتسیوم های مورد آزمایش فاقد آسکوسپور بالغ بودند. این نتایج با نتایج لپوپونت و همکاران (2010) منطبق است. آنها نیز در بررسی خود به جدایه هایی برخوردند که تولید فرم

وقوع و شدت بیماری در مناطق مختلف دنیا مربوط به تغییر شیوه کشت و کار گندم از شیوه سنتی به کشاورزی محافظت شده و شخم صفر است (Rees *et al.*, 1982; Bockus & Shroyer, 1998). ما عملاً کشاورزی محافظت شده در مناطق شمالی کشور که محل شیوع و اپیدمی بیماری است نداریم، بنابراین برخی فرضیات در خصوص شیوع و گسترش بیماری می تواند کشت واریته های حساس گندم و کشت پی در پی گندم و از طرف دیگر تغییرات آب و هوایی در جهت مساعد شدن برای ظهور این بیمار گر باشد.

IR141، IR145 و IR155 را نام برد. تمامی جدایه هایی که تولید سودوتسیوم دارای آسک و آسکوسپور کردند و یا صرفاً تولید سودوتسیوم کردند متعلق به نژاد یک بودند. لیپوینت و همکاران (Lepoint *et al.*, 2010) نیز در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که تولید فرم جنسی توسط قارچ از توانایی قارچ در تولید توکسین که تعیین کننده نژاد است مستقل می باشد. عدم تولید ساختار جنسی می تواند یکی از دلایل پراکنش اندک و تنوع کمتر جدایه های نژاد دو مورد بررسی در این تحقیق ما در مقایسه با نژاد یک باشد. افزایش میزان

REFERENCES

1. Aboukhaddour, R., Cloutier S., Lamari, L. & Strelkov, S. E. (2011). Simple sequence repeats and diversity of globally distributed populations of *Pyrenophora tritici-repentis*, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33, 389-399.
2. Alcorn, J. L. (1988). The taxonomy of *Helminthosporium* species. *Annual Review of Phytopathology*, 26, 37-56.
3. Bockus, W.W. & Shroyer, J. P. (1998). The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 485-500.
4. Bruggeman J., Debets J. M., Wijngaarden P. J., Arjan J., de Visser G. M., Hoekstra R. F. (2003). Sex slows down the accumulation of deleterious mutations in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 164, 479-485.
5. De Wolf, E. D., Effertz, R. J., Ali, S. & Francel, L. J. (1998). Vistas of tan spot research. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20, 349-370.
6. Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. (1986). *Basic plant pathology methods*. (Pp.285-315) Boca Raton, FL: CRC Press.
7. Dice, L.R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26, 297-302.
8. Ellis, M. B. (1977). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. 608 pages.
9. Friesen, T. L., Ali, S., Stack, R. W., Francel, L. J., & Rasmussen, J. B. (2003). Rapid and efficient production of the *Pyrenophora tritici-repentis* teleomorph. *Canadian Journal of Botany*, 81, 890-895.
10. Friesen, T. L., Ali, S., Klein, K. K. & Rasmussen, J. B. (2005). Population genetic analysis of a global collection of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology*, 95, 1144-1150.
11. Jones, S. H. (2010). Protocol for Laboratory production of Yellow spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) spores for inoculum. Leslie Research Center, Toowoomba, Queensland Government, Department of Primary Industries. 11 pages.
12. Lamari, L. & Bernier, C. C. (1989a). Virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of differential host reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11, 284-290.
13. Lamari, L. & Bernier, C. C. (1989b). Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] based on lesion type. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11, 49 - 56.
14. Lamari, L., Strelkov, S. E., Yahyaoui, A., Orabi, J. & Smith, R. B. (2003). The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one to one relationship in tan spot of wheat. *Phytopathology*, 93, 391- 396.
15. Leisová, L., Hanzalová, A., & Kucera, L. (2008). Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP. *Journal of Plant Pathology*, 90, 233-245.
16. Lepoint, P., Renard, M. E., Legrève, A., Duveiller, E., & Maraite, H. (2010). Genetic diversity of the mating type and toxin production genes in *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology*, 100, 474-483.
17. McDermott, J. M., and McDonald, B. A. (1993). Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 353-373.
18. Mironenko, N., Timopheeva, E., Mikhailova, L., Kopahnke, D., Kramer, I. & Ordon, F. (2007). Intraspecific genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (*Drechslera tritici-repentis*

- [Died.] Shoem.) detected by random amplified polymorphic DNA assays. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 40, 431 – 440.
19. Momeni, H., Javan-Nikkhah, M., Razavi, M. & Naghavi, M. R. (2011). First report of the sexual stage of *Pyrenophora tritici-repentis* in Iran. In: *Proceeding of 8th International Symposium on Mycosphaerella and Stagonospora Diseases of Cereals*, 10-14 September, Mexico City, page 45.
 20. Momeni, H., Javan-Nikkhah, M., Razavi, M., Naghavi, M. R. (2013). Study on genetic structure of populations of *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of wheat tan spot based on molecular marker, evaluation of Teleomorph production and identification of pathogenic races. Ph. D dissertation. University of Tehran, Iran.
 21. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 70, 3321–3323.
 22. Page, R. D. M. (2007). Tree View: an application to display phylogenetic tree on personal computers. *Computer Application in Biosciences*, 12, 357- 358.
 23. 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.
 24. Pfender, W. F., Pacey, C. A. & Zhang, W. (1988). Saprophytic growth and pseudothecia production by *Pyrenophora tritici-repentis* in plant tissue held at controlled water potentials. *Phytopathology*, 78, 1205-1210.
 25. Pujol Vieira dos Santos, A. M., Santos Matsumura, A. T., & Van der Sand, S. T. (2002). Intraspecific genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* as detected by a random amplified polymorphic DNA analysis. *Genetic and Molecular Biology*, 25, 243–250.
 26. Rees, R. G., Platz, G. J. & Mayer, R. J. (1982). Yield losses in wheat from yellow spot: comparison of estimates derived from single tillers and plots. *Australian Journal of Agricultural Research*, 33, 899 – 908.
 27. Schilder, A. M. C. and Bergstorm, G. C. (1990). Variation in virulence within the population of *Pyrenophora tritici-repentis* in New York. *Phytopathology*, 80, 84–90.
 28. Singh, P. K. and Hughes, G. R. (2006). Inheritance of resistance to the chlorosis component of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* races 1 and 3. *Euphytica*, 152, 413–420.
 29. Sivanesan, A. (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *C. A. B International Mycological Institute, Mycological Papers*, No. 158.
 30. Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. (1973). Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco, CA: Freeman Press.
 31. Strelkov, S. E. & Lamari, L. (2003). Host-parasite interactions in tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25, 339–349.
 32. Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Molecular Cell Biology*, 5, 25-40.