Crop Biotech.
Autumn (2015) 11: 15-27.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره یازدهم، پائیز ۱۳۹۴ (۲۷-۱۵)

جداسازی، شناسایی و مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoen. عامل بیماری لکه‌سوختگی گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی

اسرین آقه‌میری[۱]، رحیم مهرابی[۲*]، رضا طالبی[۳]
۱. دانش‌آموخته مقطع کارشناسی‌ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران
۲. استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/٤/٤- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۷/۲۸)

Isolation, characterization and genetic diversity analysis of *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch of wheat using molecular markers

Asrin Aghemiri[1], Rahim Mehrabi[2*], Reza Talebi[3]
1. M.Sc. Department of Microbilogy, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran
2. Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. 3. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran.
(Received: June 22, 2015 - Accepted: Oct. 20, 2015)

چکیده

بیماری لکه‌سوختگی گندم توسط *Bipolaris sorokiniana* ایجاد شده و در بسیاری از مناطق جهان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم مطرح است. اطلاعات درباره ساختار ژنتیکی بیمارگرها از اهمیت فراوانی برای انتخاب استراتژی مناسب در کنترل بیماری برخوردار می‌باشد. در این تحقیق از نمونه-های جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و گلستان در مجموع تعداد ٤٦ جدایه با موفقیت جدا، خالص و شناسایی شد. آزمایش‌های بیماری‌زایی نیز نشان داد که عامل بیماری قادر به ایجاد علایم تیپیک لکه‌سوختگی روی رقم حساس بولانی است. بررسی تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری با استفاده از ۱۷ نشانگر ISSR و RAPD نشان داد که از تعداد ۱۷۹ باند تکثیر شده ۹۸ باند آن چندشکل بودند. میانگین باندهای تولید شده توسط این نشانگرها ۱۰/٤ باند و میانگین باندهای پلی‌مورف ٥/٦ با ازای هر نشانگر محاسبه شد. میانگین ارزش PIC برای نشانگرهای مورد استفاده ۰/۳۲ بوده که بیشترین PIC مربوط به نشانگر UBC874 از نوع ISSR با ارزش ۰/٤۱ و کمترین آن مربوط به نشانگر OPF2 از نوع RAPD با میزان ۰/۱۸ محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از الگوهای باندی نشان داد که جمعیت‌های این قارچ از تنوع بالایی برخوردار می‌باشند. بر اساس تجزیه bootstrap جمعیت‌های قارچی مورد مطالعه با فاصله ژنتیکی زیادی ۷ گروه متمایز را تشکیل می‌دهند. تمایز بالای گروه‌های متعلق به مناطق مختلف جغرافیایی از یکدیگر نشان می‌دهد که تفاوت ژنتیکی بالایی بین جمعیت‌های قارچی در مناطق مختلف وجود دارد که بیانگر سازگاری جمعیت‌های قارچی در شرایط اقلیمی متفاوت است.

واژه‌های کلیدی: گندم، لکه‌سوختگی، نشانگرهای مولکولی، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ISSR و RAPD.

Abstract

The spot blotch disease caused by *Bipolaris sorokiniana* is one of the most important diseases of wheat worldwide. The knowledge about genetic structure of fungal pathogens is important to design appropriate strategy to control the disease. In this study, a total of 46 samples were isolated, purified and characterized from samples collected from Mazandaran and Golestan provinces. Pathogenicity tests showed that isolates were able to cause typical spot blotch symptoms on Bulani as the susceptible cultivar. Genetic diversity analysis of isolates using 17 ISSR and RAPD markers showed that out of 179 amplified bands, 98 were polymorphic. The average of amplified bands for each marker was 10.4, while the average of polymorphic bands was calculated 5.6 for each marker. The average PIC value was 0.32 ranging from the highest PIC value (0.41) for the ISSR marker, UBC874, to the lowest PIC value (0.18) for the RAPD marker, OPF2. Cluster analysis of banding pattern data showed that populations of this fungus had a high genetic diversity. Based on bootstrap analysis the isolates were differentiated with a high genetic distance to seven distinct groups. Highly distinct clusters belonging to different geographic regions revealed that there were high genetic differences between fungal populations indicating that fungal populations might be adapted to different climate regions.

Keywords: Wheat, Spot blotch, Molecular markers, Genetic diversity, ISSR and RAPD markers

* نویسنده مسئول: رحیم مهرابی
E-mail: Rahim.Mehrabi@gmail.com

مقدمه

گندم مهمترین گیاه زراعی دنیاست که حدود ۶-۵ هزار سال قبل از میلاد مسیح در خاورمیانه بوجود آمده است. در ایران گندم مهمترین محصول استراتژیک بوده که بیشترین سطح زیر کشت و میزان مصرف را به خود اختصاص داده است. گندم نان (*Triticum aestivum*) در بین گونه‌های تیره گندمیان (*Poaceae*) دارای سازگاری بالایی است، به طوری که این محصول از فنلاند در نیمکره‌ی شمالی تا آرژانتین در نیمکره جنوبی کشت می‌گردد. نتیجتاً این محصول بیشترین سطح زیر کشت را در سراسر دنیا به عنوان یک محصول تجاری به خود اختصاص داده است.

با افزایش روز افزون جمعیت، نیاز غذایی بشر روز به روز در حال افزایش بوده و تغذیه این جمعیت یکی از نگرانی‌های مهم بشر امروزی است. امکان افزایش تولید گندم از طریق افزایش سطح زیر کشت به دلیل محدودیتی که در آب و خاک زراعی وجود دارد کم است. بنابراین بیشترین تمرکز روی افزایش عملکرد در واحد سطح و اصلاح کیفیت آن می‌باشد. آفات و بیماری‌ها عوامل زیستی هستند که نقش بزرگی در کاهش محصول گندم دارند. در میان عوامل بیماریزای گندم، قارچ‌ها از اهمیت فراوانی برخوردارند به طوریکه غالب بیماری‌های مهم از دسته عوامل بیماری‌زای قارچی می‌باشند. در بین این عوامل لکه برگی‌های گندم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. طی بازدیدهای دو سال گذشته از مناطق شمالی کشور بیماری لکه سوختگی (Spot blotch) با شدت بالا و بصورت همه‌گیر در اکثر مزارع گندم مشاهده شده است. عامل این بیماری قارچ نکروتروف *Bipolaris sorokiniana* با فرم جنسی *Cochliobolus sativus* بوده که در بسیاری از مناطق جهان به عنوان یکی از مهمترین بیماری‌های گندم مطرح است. از نظر تاریخچه، این قارچ اولین بار از روسیه و متعاقب آن از آمریکای شمالی آمریکا گزارش شد (Sivansean, 1987).

لکه سوختگی در بسیاری از مناطق مورد کاشت گندم در جهان نیز وجود داشته و موجب کاهش محصول می‌گردد. در سال‌های اخیر بدلیل استفاده از ارقام مقاوم به زنگ، بیماری لکه‌سوختگی به عنوان یکی از عوامل مهم محدود کننده تولید در مناطق کشت گندم در آسیا در کشورهایی مانند هند، پاکستان و آسیای مرکزی به وسعت بیش از ۱۲ میلیون هکتار مشاهده شده است و از نظر جهانی وسعت آلودگی مزارع کشت گندم به این بیماری به حدود ۲۵ میلیون هکتار بالغ می‌شود (Nagarajan and Kumar, 1998; Acharya *et al.,* 2011; Ruckstuhl, 1998; Singh *et al*., 1998). این میزان آلودگی حدود ۱۲٪ از کل کشت گندم در جهان می‌باشد (Minotto *et al.,* 2014). کشت بی‌رویه ارقام حساس به این بیماری و عوامل دیگری نظیر فراوانی بیشتر گندم در برنامه‌های تناوب، کم توجهی به مدیریت بقایای گیاهی، افزایش مصرف کودهای ازته و مقاومت به قارچکش های سیستمیک نیز در گسترش روزافزون بیماری و بروز همه‌گیری‌ها بی‌تاثیر نبوده است. در چین بدلیل جایگزینی ارقام بومی با ارقام تجاری پر محصول مقاوم به زنگ این بیماری به عنوان یکی از عوامل تهدید کننده تولید گندم گزارش شده است (Chang and Wu, 1998). در کشورهای آمریکای شمالی مانند کانادا و ایالات متحده، آمریکای جنوبی مانند برزیل و با شدت کمتری در برخی از کشورهای اروپایی گسترش پیدا است (Mehta *et al*., 1992; Acharya *et al.,* 2011; Kwasna, 1995).

ظرفیت تخریبی این بیمارگر و مقدار محصول کاهش یافته ناشی از این بیماری براساس گزارش‌های اعلام شده از مناطق مختلف دنیا متغیر می‌باشد (Acharya *et al.,* 2011). در نواحی گرم جنوب آسیا میزان کاهش محصول بیشتر است. به طور متوسط در جنوب آسیا، ۲۰ درصد محصول در اثر بیماری‌های لکه برگی از بین می‌روند (Sharma

et al., 2006). میزان خسارت ناشی از لکه‌سوختگی در جنوب آسیا از ۴ تا ۳۸ درصد و ۲۵ تا ۴۳ درصد به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ گزارش شده است (Sharma *et al*., 2006). در نپال شدت این بیماری به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ تا ۱۰۰ درصد و ۷۰ درصد برآورد شده است (Sharma and Duveiller, 2007). این بیمارگر همچنین باعث ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد خسارت در کشورهایی مانند اسکاتلند، کانادا ، برزیل می‌شود (Murray *et al*., 1998).

اطلاعات درباره ساختار ژنتیکی قارچ‌ها می‌تواند در کمک به انتخاب استراتژی‌های مناسب در کنترل بیماری بسیار موثر باشد. به عنوان مثال در زمانی که عامل بیماریزا از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار باشد، استفاده از ارقام مقاومی که حاوی یک ژن با اثر بزرگ باشند مناسب نمی‌باشد چرا که فشار انتخاب بر روی یک جمعیت با تنوع ژنتیکی بالا منجر به شکستن سریع مقاومت می‌گردد (McDonald and Linde, 2002). به طور کلی نشانگرهای مولکولی یکی از ابزارهای پرکاربرد جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین گونه‌های موجودات از جمله گونه‌های قارچی می‌باشند. از آن‌جمله پرکاربردترین آنها می‌توان به نشانگرهای ISSR، AFLP، SSR و RAPD اشاره نمود. در نشانگرهای RAPD آغازگرهای کوتاه می‌توانند با نواحی مختلف DNA ژنومی جفت شده و سبب تکثیر قطعات متنوع DNA شوند. نشانگر RAPD به دلیل ارزانی و سادگی یکی از پرکاربردترین نشانگرهای مولکولی می‌باشد که جهت پی‌بردن به اختلاف ژنتیکی بین گونه‌ها و جمعیت‌های قارچی در موارد بسیاری استفاده شده است. از بین روش‌های مختلفی که در تعیین تنوع ژنتیکی بیمارگرهای گیاهی استفاده شده است می‌توان از نشانگر rep-PCR نیز نام برد. از این نشانگر بیشتر برای تعیین تنوع ژنتیکی پروکاریوت‌ها استفاده شده است. از این روش برای تمایز جدایه‌های بیمارگرهای قارچی از جمله *Fusarium oxysporum* و *Mycosphaerella graminicola* نیز استفاده شده است (Edel *et al*., 1995; Komijani *et al*., 2010).

تنوع ژنتیکی قارچ *B. sorokiniana* در ابتدا به وسیله پلی‌مورفیسم ایزوزایم‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Terekhova and Rochev, 1989; Valim-Labres *et al*. 1997). سپس روش‌های مبتنی بر نشانگرهای DNA مانند RAPD، PCR-PFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌های قارچ مورد بررسی قرار گرفت (de Moura Nascimento and Van Der Sand, 2008; de Oliveira *et al*., 2002; Fordyce and Meldrum, 2001; Mironenko and Bulat, 2001). استفاده از روش AFLP نشان داد که این روش برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب‌تر از روش RAPD می‌باشد (Majer *et al*., 1996; Powell *et al*., 1996). به دلیل تکرارپذیری بالاتر و تولید نشانگرهای بیشتر این روش برای بررسی تنوع ژنتیکی بسیاری دیگر از قارچ‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Zhong and Steffenson, 2002). روش RAPD بدلیل سادگی و کم هزینه بودن و سرعت آن در بسیاری از مطالعات ژنتیکی نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Arabi and Jawhar, 2007). مارکرهای مولکولی مورد استفاده در این تحقیق تاکنون برای بررسی تنوع ژنتیکی عامل بیماری لکه‌سوختگی گندم مورد استفاده قرار نگرفته است. از آنجائیکه اطلاعات در خصوص تفاوت‌های بیماریزایی و تنوع ژنتیکی عامل بیماری از پیش نیازهای تهیه ارقام مقاوم می‌باشد، ضروری است ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این بیمارگر نیز جهت معرفی و استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل مناسب هر منطقه مشخص شود. بنابراین تحقیق حاضر با هدف جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی عامل بیماری لکه‌سوختگی و همچنین بررسی ساختار ژنتیکی عامل بیماری لکه‌سوختگی با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی عامل بیماری

ضمن بازدید از مناطق کشت گندم در استان‌های مازندران وگلستان، نمونه‌های برگی آلوده گندم دارای علایم لکه‌سوختگی جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل شد. برای جداسازی قارچ ابتدا قطعات برگی دارای علایم مذکور بوسیله هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۲-۳ دقیقه ضد عفونی شد. قطعات برگ سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشوی سطحی داده شد و در نهایت در داخل تشتک پتری دارای کاغذ صافی مرطوب و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از ظاهر شدن کنیدیوفور و کنیدی قارچ عامل بیماری، کنیدی‌های قارچ از روی برگ بوسیله لوپ آزمایشگاهی جمع‌آوری شده و بر روی محیط کشت آب-آگار پراکنده شد. بعد از حدود ۵-۸ ساعت یکی از کنیدی‌های جوانه زده از روی محیط کشت آب-آگار بوسیله اسکالپل استریل جدا و به محیط کشت PDA منتقل شد.

آزمون بیماری‌زایی

اثبات بیماری‌زایی برای تعداد ۵ جدایه که به صورت تصادفی انتخاب شدند، انجام شد. آزمایش‌های بیماری‌زایی با استفاده از مایه‌زنی در مرحله‌ی گیاهچه‌ای روی رقم حساس بولانی انجام شد. برای تهیه‌ی زادمایه قارچ از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) استفاده شد. جهت تولید کنیدی قارچ، محیط کشت‌ها به مدت ۸ روز در دمای ۲۲ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی قرار گرفتند. سپس آب مقطر استریل بر روی تشتک پتری اضافه شده تا میسلیوم‌ها کاملاً پوشانده شوند و کنیدی‌ها به وسیله یک بورس شستشو و آزاد شدند. سوسپانسیون کنیدی حاصل، به غلظت ۵۰۰۰ کنیدی در میلی‌لیتر تنظیم شده و سپس حدود ۱۰-۵ قطره روغن توبین ۲۰ (Tween 20) به هر لیتر سوسپانسیون قارچ اضافه و برای مایه‌زنی استفاده شد. مایه زنی با استفاده از اسپری کردن گیاهچه‌های ۱۵-۱۰ روزه با سوسپانسیون اسپور قارچ انجام شد. گیاهچه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط رطوبتی اشباع در تاریکی قرار گرفته و درنهایت در زیر سرپوش‌های پلی‌اتیلنی شفاف در دمای ۲±۲۰ درجه سلسیوس با ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند.

استخراج DNA

برای استخراج DNA، ابتدا بافر استخراج [Tris-HCl pH=8 (100mM), EDTA (50mM), NaCl (500mM), 2β-mercaptoethanol (2%), SDS (1%)] تهیه گردید. میسلیوم جدایه‌ها به میزان ۰/۱ گرم به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر انتقال داده شده و سپس در ازت مایع پودر شدند. به تیوب‌ها بلافاصله پس از خرد شدن ۶۰۰ میکرولیتر بافر استخراج اضافه شد (Mehrabi *et al.,* 2014). نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شده و سپس ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) به تیوب‌ها اضافه شده و پنج دقیقه به آرامی نمونه‌ها در دمای اتاق به هم زده شدند. سانتریفیوژ اول با ۱۲۰۰۰ rpm و به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردیده، فاز رونشین به تیوب جدید منتقل گشته و استات سدیم ۵ مولار (pH=5.2) به نسبت یک دهم حجم بافر استخراج به نمونه اضافه شد. بعد از اضافه شدن استات سدیم، ایزوپروپانول سرد (به مقدار هم‌حجم) به تیوب اضافه شد. سپس سانتریفیوژ دوم با ۱۲۰۰۰rpm و ۵ دقیقه انجام شده که در این مرحله DNA به صورت رسوب نازکی در ته تیوب قرار گرفتند. شستشوی رسوب DNA با اتانول ۷۰٪ انجام و نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شدند. رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای RAPD و ISSR در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش با استفاده از بافر PCR (1X)، آغازگرهای مورد نظر هر کدام به میزان ۲۰۰ نانومولار، یک واحد آنزیم تگ پلیمراز، dNTPs به میزان ۲ میلی‌مولار، کلرید منیزیم با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار و DNA به میزان ۱۰ نانوگرم انجام شد. برنامه حرارتی PCR به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و ۳۵–۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال بسته به نوع آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و در خاتمه یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه تنظیم شد.

برای انجام الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده PCR از ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد استفاده شد. از هر یک از تیوب‌های PCR مقدار ۶ میکرولیتر از محلول واکنش به همراه ۲ میکرولیتر از بافر نمونه‌گذاری (۰/۰۲۵ درصد بروموفنل بلو، ۰/۲۵ درصد زیلن سیانول و ۴۰ درصد سوکروز) در داخل چاهک ریخته و بارگزاری شد. برای الکتروفورز از ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت به مدت مورد نیاز استفاده شده و پس از پایان کار ژل داخل ظرف اتیدیوم بروماید با غلظت ۱–۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته و رنگ‌آمیزی شد. عکسبرداری با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتر انجام شد. تصاویر حاصل از رنگ آمیزی ژل، با توجه به حضور یا عدم حضور باندهای تکثیر شده ارزیابی و نمره‌دهی انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی

داده‌های مربوط به نشانگرهای مولکولی به صورت الگوهای نواری صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازدهی شدند. برای رسم دندروگرام ابتدا ماتریس تشابه با روش DICE تشکیل و سپس دندروگرام با استفاده از روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYSpc 2.0 رسم شد (Rohlf, 1998). برای اطمینان از صحت خوشه‌بندی و ثبات آماری گروه‌های تشکیل شده در دندروگرام مبتنی بر UPGMA از تکنیک Bootstrapping داده‌ها با ۱۰۰۰ تکرار و فاصله اطمینان ۹۹ درصد از نرم‌افزار WinBoot استفاده شد (Yap and Nelson, 1996).

نتایج و بحث

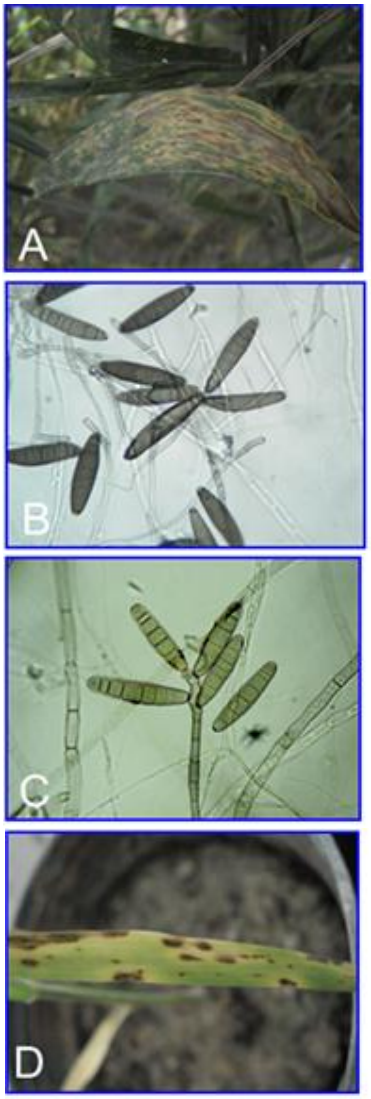
از نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و گلستان در مجموع تعداد ۴۶ جدایه با موفقیت جداسازی و خالص شد (جدول ۱ و شکل ۲). جداسازی قارچ *B. sorokinia* از اکثر نمونه‌های برگی دال بر پراکندگی گسترده و آلودگی بالای مزارع گندم به این بیماری داشت. مشخصات مورفولوژیکی جدایه‌های مذکور بر اساس کلید معتبر (Sivansean, 1987) با گونه *B. sorokinia* تطابق کامل داشت (شکل ۱). به طور خلاصه پرگنه قارچ برروی محیط کشت PDA تولید یک لایه میسلیوم خاکستری تا قهوه‌ای تیره می‌نماید. کنیدی‌فورهای تولید شده به صورت منفرد و یا در دستجات با تعداد کم تشکیل شده و به طور عمودی، غیرمنشعب، صاف، دیواره‌دار به رنگ قهوه‌ای نیمه تیره به طول حدود ۲۰۰µm می‌باشد. کنیدی‌ها به صورت جانبی از سوراخ‌های زیر دیواره‌های عرضی کنیدی‌فورها تولید شده و قهوه‌ای تیره با سطح صاف غالباً ۶ تا ۱۰ سلولی و به اندازه µm ۲۸–۱۷x۱۲۰–۴۰ می‌باشند (شکل ۱). جوانه‌زنی کنیدی‌ها از دو سوی سلول‌های انتهایی صورت می‌پذیرد.

نتایج آزمایشات بیماری‌زایی روی رقم حساس بولانی نشان داد که عامل بیماری لکه‌سوختگی قادر به ایجاد علایم تیپیک بیماری می‌باشد (شکل ۱–D). علایم اولیه بیماری بعد از گذشت ۴۸ ساعت به صورت رنگ پریدگی موضعی بوده که با گذشت زمان تبدیل به لکه‌های کلروزه با مرکز تیره‌تر شده که به

جزایر سبز (Green Islands) معروف می‌باشند. مناطق کلروزه با گذشت زمان تبدیل به لکه‌های نکروز شده و در نهایت با پیوستن لکه‌های نکروز و کلروز تمام سطح برگ دچار سوختگی شده که از علایم تیپیک بیماری است (شکل ۱).

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های مورد استفاده قارچ *Bipolaris sorokiniana* عامل بیماری لکه‌سوختگی گندم در این تحقیق

شماره	کد جدایه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
1	CS1	36.61933	53.24681
2	CS3	36.48911	52.77124
3	CS4	36.88089	53.71210
4	CS6	36.56344	52.81258
5	CS9	36.48911	52.77124
6	CS10	36.61064	53.23323
7	CS11	36.48911	52.77124
8	CS20	36.92252	54.89301
9	CS24	36.56344	52.81258
10	CS25	36.88089	53.71210
11	CS26	36.56344	52.81258
12	CS27	36.81921	54.21454
13	CS38	36.81921	54.21454
14	CS40	36.56344	52.81258
15	CS41	36.75509	53.27770
16	CS48	36.48911	52.77124
17	CS55	37.24875	55.4.349
18	CS56	36.69734	53.60535
19	CS65	37.06875	55.13168
20	CS70	36.75509	53.27770
21	CS71	36.61064	53.23323
22	CS72	36.74614	53.36384
23	CS73	37.06875	55.13168
24	CS74	36.69734	53.60535
25	CS78	36.90236	54.43356
26	CS80	36.90236	54.43356
27	CS88	36.93818	54.43816
28	CS97	36.89954	54.76540
29	CS100	37.06875	55.13168
30	CS112	36.73686	53.26813
31	CS123	36.73686	53.26813
32	CS125	36.89954	54.76540
33	CS126	36.89954	54.76540
34	CS131	36.58764	52.86815
35	CS162	37.12995	55.21752
36	CS165	36.88611	54.69540
37	CS168	37.24875	55.4.349
38	CS177	36.89954	54.76540
39	CS198	36.67955	53.41348
40	CS203	36.61517	52.94956
41	CS219	36.92252	54.89301
42	CS220	36.88089	53.71210
43	CS228	36.81921	54.21454
44	CS257	36.69734	53.60535
45	CS265	36.69734	53.60535
46	CS277	36.92252	54.89301

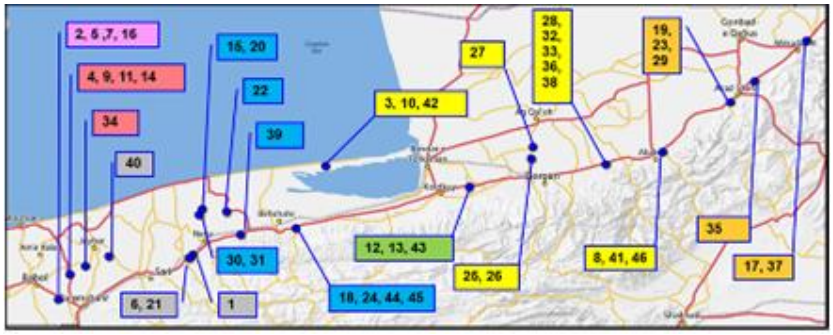


شکل ۱. علایم بیماری لکه‌سوختگی مشاهده شده در مزرعه (A). کنیدی‌های قارچ عامل بیماری (B). کنیدی‌های تولید شده از سوراخ‌های جانبی کنیدی‌فور در شرایط آزمایشگاهی (C). لکه‌های نکروتیک با هاله کلروتیک ناشی از قارچ *Bipolaris sorokiniana* در آزمون بیماری‌زایی ۷ روز پس از مایه‌زنی در شرایط گلخانه‌ای.

از آنجاکه تاکنون اطلاعی از ساختار جمعیتی قارچ عامل بیماری در ایران در دست نمی‌باشد، در این تحقیق با استفاده از روش‌های مولکولی نسبت به بررسی تنوع ژنتیکی این قارچ اقدام شد. نتایج بررسی حاصل از الگوی باندی نشانگرهای ISSR نشان داد که از مجموع ۱۱۲ باند تولید شده، تعداد ۶۴ باند

(۵۶/۸٪) پلی‌مورف بوده و بقیه باندها مونومورف می‌باشند (جدول۳). کمترین تعداد باند حاصل برای نشانگر UBC801 با ۸ باند و بیشترین باند حاصل برای نشانگر UBC828 با ۱۴ باند ثبت شد. میانگین تعداد باند حاصل برای نشانگرهای ISSR ۱۱/۲ بوده در حالی که میانگین باندهای چندشکل برای این نوع نشانگر ۶/۴ برای هر آغازگر ثبت شد. میانگین ارزش PIC برای نشانگرهای ISSR ۰/۳۴ بوده که بیشترین PIC مربوط به نشانگر UBC874 با ارزش ۰/۴۱ و کمترین آن مربوط به نشانگر UBC815 با میزان ۰/۲۸ محاسبه شد (جدول ۳).

نتایج بررسی حاصل از الگوی باندی نشانگرهای RAPD نیز نشان داد که از مجموع ۶۷ باند تولید شده، تعداد ۳۴ باند (۵۰/۳٪) پلی‌مورف بوده و بقیه باندها مونومورف بودند. کمترین تعداد باند حاصل برای نشانگر OPE1 با ۷ باند و بیشترین باند حاصل برای نشانگر OPB7 و OPA2 با ۱۱ باند ثبت شد. میانگین تعداد باند حاصل برای نشانگرهای RAPD ۹/۶ بوده در حالی که میانگین باندهای چندشکل برای این نوع نشانگر ۴/۹ برای هر نشانگر بود. میانگین ارزش PIC برای نشانگرهای RAPD ۰/۳ بوده که بیشترین PIC مربوط به نشانگر OPA2 با ارزش ۰/۳۶ و کمترین آن مربوط به نشانگر OPF2 با میزان ۰/۱۸ محاسبه شد (جدول ۳).



شکل ۲. مختصات مکان‌های نمونه‌برداری از مزارع گندم از استان‌های مازندران و گلستان. شماره جدایه‌ها در مستطیل‌ها آورده شده است. رنگ زمینه مستطیل‌ها بر اساس آزمون تجزیه کلاستر انتخاب شده و جدایه‌های همرنگ متعلق به یک گروه ژنتیکی می‌باشند.

جدول ۲. نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Bipolaris sorokiniana* عامل بیماری لکه‌سوختگی گندم

نوع نشانگر	نام آغازگر	توالی('3-'5)	دمای اتصال
ISSR	UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48 °C
	UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	44 °C
	UBC816	CACACACACACACACAT	48 °C
	UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	52 °C
	UBC828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	52 °C
	UBC880	GGA GAG GAG AGG AGA	50 °C
	UBC874	CCCTCCCTCCCTCCCT	54 °C
	UBC822	TCTCTCTCTCTCTCTCA	48 °C
	UBC801	ATA TAT ATA TAT ATA TT	48 °C
	UBC878	GGA TGG ATG GAT GGAT	48 °C
RAPD	OPA1	CAGGCCCTTC	36 °C
	OPA2	TGCCGAGCTG	39 °C
	OPF2	GAGGATCCCT	39 °C
	OPC2	GTGAGGCGTC	36 °C
	OPD6	ACCTGAACGG	38 °C
	OPB7	GGTGACGCAG	38 °C
	OPE1	CCCAAGGTCC	36 °C

جدول ۳. شاخص‌های مولکولی اندازه‌گیری شده برای نشانگرهای مورد استفاده

نوع نشانگر	نام آغازگر	تعداد باندهای تکثیر شده	تعداد باندهای چند شکل	درصد چندشکلی	ارزش محتوای چند شکلی
ISSR	UBC807	13	6	46	0.36
	UBC822	12	7	58	0.35
	UBC816	10	5	50	0.29
	UBC815	9	5	55	0.28
	UBC818	12	7	58	0.37
	UBC828	14	8	57	0.39
	UBC880	9	5	55	0.26
	UBC874	14	9	64	0.41
	UBC801	8	5	62	0.34
	UBC878	11	7	63	0.38
RAPD	OPA1	10	6	60	0.34
	OPC2	10	5	50	0.28
	OPB7	11	6	54	0.33
	OPA2	11	6	54	0.36
	OPE1	7	4	57	0.21
	OPF2	10	4	40	0.18
	OPD6	8	3	37	0.14

در مجموع دو نشانگر ISSR و RAPD تعداد ۱۷۹ باند تولید کرده که ۹۸ باند آن چندشکل بودند. میانگین باندهای تولید شده توسط این نشانگرها ۱۰/۴ باند و میانگین باندهای پلی‌مورف ۵/۶ به ازای هر نشانگر محاسبه شد. میانگین ارزش PIC برای نشانگرهای مورد استفاده ۰/۳۲ بوده که بیشترین PIC مربوط به نشانگر UBC874 از نوع ISSR با ارزش ۰/۴۱ و کمترین آن مربوط به نشانگر OPF2 از نوع RAPD با میزان ۰/۱۸ محاسبه شد (جدول ۴).

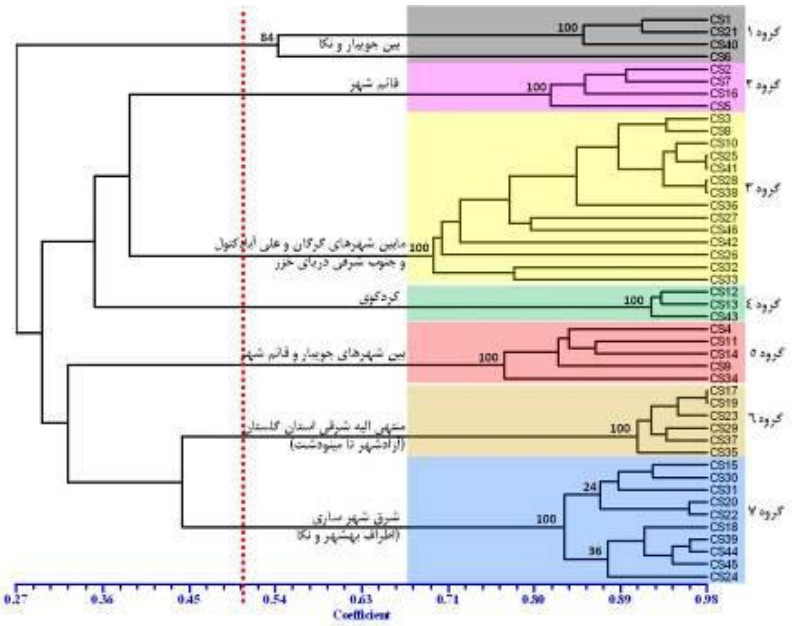
جدول ۴. مقایسه شاخص‌های مولکولی اندازه‌گیری شده برای نشانگرهای مورد استفاده

نشانگر	ISSR	RAPD	ISSR/RAPD
مجموع تعداد باندهای تکثیر شده	112	67	179
مجموع تعداد باندهای چند شکل	64	34	98
میانگین تعداد باندهای تکثیر شده	11.2	9.6	10.4
میانگین تعداد باندهای چند شکل	6.4	4.9	5.6
میانگین درصد چندشکلی	56.8	50.3	53.5
میانگین ارزش محتوای چندشکلی	0.34	0.3	3.2

مقایسه نتایج دو نوع نشانگر ISSR و RAPD نشان داد که در مجموع نشانگرهای ISSR به میزان متوسط ۱/۶ باند به ازای هر آغازگر نسبت به نشانگر RAPD تعداد باند بیشتری تولید می‌نماید. علاوه براین درصد باندهای چندشکل در نشانگرهای ISSR به میزان ۶/۵٪ بیشتر از نشانگر RAPD بوده که حاصل آن ارزش PIC بالاتر نشانگر ISSR در مقایسه با نشانگر RAPD می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های لکه‌سوختگی گندم کارایی بالاتری نسبت به نشانگر RAPD دارند.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الگوهای باندی

حاصل از تلفیق مجموع ۱۷ نشانگر ISSR و RAPD جدایه‌ها را به هفت گروه تقسیم نمود (شکل ۲ و ۳). در گروه اول ۴ جدایه از منطقه مرکزی استان مازندران (بین جویبار و نکا) قرار گرفتند. گروه دوم نیز ۴ جدایه را در برگرفت که همگی از منطقه قائم‌شهر بودند. گروه سوم با ۱۴ جدایه بزرگترین کلاستر را تشکیل داد که جدایه‌هایی مابین شهرهای گرگان و علی‌آبادکتول و همچنین سه جدایه از جنوب شرقی دریای خزر را شامل می‌شدند. در گروه چهارم تنها سه جدایه از منطقه کردکوی قرار گرفتند. گروه پنجم با ۵ جدایه بین شهرهای جویبار و قائم‌شهر قرار گرفتند. تعداد ۶ جدایه نیز در گروه ششم قرار گرفتند که از منتهی الیه شرقی استان گلستان (آزادشهر تا مینودشت) جدا شده بودند. گروه هفتم نیز ۱۰ جدایه را در بر می‌گرفت که شامل جدایه‌های متعلق به شرق شهر ساری (اطراف بهشهر و نکا) بودند (شکل ۲ و ۳). تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری در مناطق مختلف جهان نیز گزارش شده است. تعداد ۶۰ جدایه از برزیل با استفاده از نشانگر URP مورد بررسی قرار گرفت که جدایه‌ها را به ۲۳ گروه تقسیم نمود، اما گروه‌بندی بر اساس داده‌های مولکولی از پراکنش جغرافیایی تبعیت نکرد (Mann *et al.,* 2014a). روش AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های این قارچ از ایالت داکوتای شمالی و دیگر ایالت‌های آمریکا و همچنین جدایه‌های دیگر کشورها مورد استفاده قرار گرفته است (Zhong and Steffenson 2002). این روش اخیراً برای بررسی تنوع ژنتیکی ۹۳ جدایه *B. sorokiniana* از کانادا و دیگر نقاط جهان مورد استفاده قرار گرفته است (Gazvini and Tekauz, 2010). Fajulo و همکاران (۲۰۱۳) از کتابخانه ژنومی قارچ *B. sorokiniana* تعداد ۸۵ نشانگر SSR طراحی کرده که از این میان تنها ۱۵ نشانگر چند شکل بودند (Fajulo *et al.,*2013). Arabi و Jawhar (۲۰۰۷) با استفاده از روش RAPD تعداد ۲۱ جدایه *B. sorokiniana* را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که جدایه‌های این قارچ از تنوع بالایی برخوردار هستند (Arabi and Jawhar, 2007).



شکل ۳. تجزیه کلاستر حاصل از تلفیق داده‌های مربوط به نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD. دندروگرام با استفاده از روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYSpc 2.0 رسم شد و با استفاده از نرم‌افزار WinBoot صحت خوشه‌بندی با روش Bootstrap محاسبه شد.

در تحقیقی دیگر تعداد ۲۷ جدایه‌ی پلی‌اسپوریک و تعداد ۷۲ جدایه مونواسپوریک در ارزیابی بیماری‌زایی مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج نشان داد جدایه‌های پلی‌اسپوریک نسبت به جدایه‌های مونواسپوریک قدرت بیماری‌زایی بیشتری داشتند (Minotto *et al.,* 2014). به همین نحوه تعدادی از جدایه‌های مونواسپوریک با جدایه‌های پلی‌اسپوریک با استفاده از نشانگرهای URP برای بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت که نتایج نشان داد جدایه‌های مونواسپوریک شباهت بیشتری به هم داشتند. دندروگرام حاصل از تجزیه‌ی داده‌های مولکولی نیز نتوانست جدایه‌ها را بر اساس الگوی جغرافیایی تفکیک نماید (Mann *et al.,* 2014b). بررسی پراکنش جغرافیایی جدایه‌های *B. oryzae* نشان داد که همبستگی بین منشاء جغرافیایی و گروه‌بندی RAPD وجود ندارد (de Oliveira *et al*., 2002). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که همبستگی نسبی بین الگوی باندی AFLP با منشاء جغرافیایی برای برخی مناطق وجود دارد اما همبستگی بین الگوی AFLP و بیماری‌زایی بیشتر از همبستگی بین الگوی AFLP و منشاء جغرافیایی جدایه‌ها می‌باشد (Ghazvini and Tekauz, 2010). این محققین نشان دادند که گروه‌بندی مولکولی برای جدایه‌های با منشاء جغرافیایی همبستگی دارد. به عنوان مثال اکثر جدایه‌های متعلق به کشور لهستان در گروهی جدا قرار گرفتند. همبستگی پایین بین شباهت ژنتیکی و منشاء جغرافیایی برای جدایه‌های *B. sorokiniana* نیز گزارش شده است (Zhong and Steffenson, 2001). مشخص شده است که تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچی وابسته به چند فاکتور مهم از جمله سیکل جنسی، نرخ موتاسیون، جریان ژنی، مهاجرت و فشار انتخاب می‌باشد (McDonald, 1997). آگاهی از تنوع ژنتیکی بیمارگر می‌تواند منجر به فهم این موضوع شود که بیمارگر چگونه خود را با تغییرات محیطی سازگار می‌سازد (McDonald & Linde, 2002). همچنین بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بیمارگر گیاهی به منظور درک تکامل همزمان میزبان و بیمارگر در پاتوسیستم‌های گیاهی ضروری است (McDonald *et al*., 1989). از آنجا که این قارچ غالباً به صورت غیر جنسی تکثیر کرده و در طبیعت یافت می‌شود (Tinline 1961, 1988) احتمالاً تنوع موجود در جمعیت‌های این قارچ ناشی از عوامل دیگری همچون موتاسیون می‌باشد. Tinline (۱۹۶۱) گزارش نمود که موتاسیون در آسکوسپورهای *B. sorokiniana* قادر است استرین‌های جدیدی از قارچ که متفاوت به والد آن‌ها می‌باشد تولید نماید. همچنین نوترکیبی کروموزومی نسبت به موتاسیون ممکن است نقش موثرتری در تنوع ژنتیکی این قارچ داشته باشد (Tinline, 1961).

نتایج حاصل از تلفیق داده‌های مولکولی توانست جدایه‌ها را تا حد زیادی از لحاظ منشاء جغرافیایی متمایز نماید. نشانگرهای ISSR نواحی بین ریزماهواره‌ای را تکثیر می‌نمایند و از آنجا که این نواحی در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها و از جمله قارچ‌ها با فراوانی بالایی توزیع یافته‌اند، کاربرد این نوع نشانگرها می‌تواند در بررسی تنوع ژنتیکی کارایی زیادی داشته باشد. با بررسی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌ها و تجزیه Bootstrap مشخص شد که جمعیت‌های قارچی مورد مطالعه با تنوع بالا و با فاصله ژنتیکی زیادی ۷ گروه اصلی متمایز را تشکیل می‌دهند. مقادیر بالای Bootstrap دلیلی بر صحت گروه‌بندی جدایه‌ها در دندروگرام ترسیم شده می‌باشد (شکل ۲). تمایز بالای گروه‌ها از یکدیگر نشان می‌دهد که تفاوت ژنتیکی بالایی بین جمعیت‌های قارچی در مناطق مختلف وجود دارد. به بیان دیگر بین منشأ جغرافیایی و گروه ژنوتیپی جدایه‌ها ارتباط کاملاً محسوسی وجود دارد. بنابراین، به نظر می‌رسد در مناطق مختلف بر اساس شرایط اقلیمی و آب و هوایی، نوع ارقام مورد کشت و عملیات‌های زراعی

گروه‌های ژنتیکی مختلفی از قارچ عامل بیماری سازگار شده‌اند. عموماً مقاومت ژنتیکی مهمترین راهکار مبارزه با بیماری‌هاست. اما تنوع زیاد این قارچ می‌تواند یکی از عوامل محدود کننده مبارزه از طریق ارقام مقاوم بوده و به نظر می‌رسد پایداری مقاومت در چنین شرایطی کاهش یابد. با توجه به تنوع جمعیت‌های قارچ عامل بیماری در مناطق مختلف مورد بررسی، استفاده گسترده از یک رقم مقاوم نیز توصیه نمی‌شود چرا که خطر شکسته شدن مقاومت تهدیدی جدی محسوب می‌گردد. وجود تنوع زیاد سرعت ایجاد پاتوتیپ‌های بیمارگر را افزایش داده و می‌تواند در یک بازه زمانی کوتاه موجب شکستن مقاومت گردد. جریان ژنی بین جمعیت‌های قارچی یکی از عوامل مهمی است که نقش اساسی در تبادل ژنتیکی بین جمعیت‌های قارچی ایجاد کرده و موجب اختلاط ژنتیکی و در نتیجه عدم تمایز جمعیت‌ها از یکدیگر دارد. در غیاب جریان ژنی، فراوانی و نوع آلل-های موجود در یک جمعیت نسبت به آلل‌های موجود در جمعیت‌های هم‌جوار در طول زمان متمایزتر شده و در نتیجه موجب تفاوت ژنتیکی بالای جمعیت‌های هر منطقه می‌گردد. به نظر می‌رسد یکی از دلایل تمایز بالای جمعیت‌های قارچی عامل لکه‌سوختگی گندم در مناطق مختلف استان‌های مازندران و گلستان جریان ژنی پایین بین جمعیت‌های قارچ می‌باشد.

REFERENCES

Alam KB, Banu SP, Shaheed MA (1998) The occurrence and significance of spot blotch disease in Bangladesh. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J and McNab A (eds) Proc. Int. Workshop on *Helminthosporium* Disease of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot, CIMMYT, El Batan, Mexico, 9-14 February 1997, pp 63-66.

Arabi MIE, Jawhar M (2007) Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Cochliobolus sativus*. Aust. Plant Pathol. 36: 17-21.

Chang N, Wu Y (1998) Incidence and current management of spot blotch of wheat in China. In: *Helminthosporium* Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot (Duveiller, E., Dubin, H.J., Reeves, J. and McNab A., eds). Mexico, D.F., Mexico: CIMMYT, pp. 119-133.

de Moura Nascimento EJ, Van Der Sand ST (2008) Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana* isolates. World J Microbiol. Biotechnol. 24: 647-652.

de Oliveira AM, Matsumura AT, Prestes AM, Van Der Sand ST (2002) Intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates determined by random-amplified polymorphic DNA (RAPD). Genet. Mol. Res. 1: 350-358.

Edel V, Steinberg C, Avelange L, Laguerre G, Alabouvette C (1995) Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. Phytopathology. 85: 579-585.

Fajolu OL, Wadl PA, Vu AL, Gwinn KD, Scheffler BE, Trigiano RN, Ownley BH (2013) Development and characterization of simple sequence repeats for *Bipolaris sorokiniana* and cross transferability to related species. Mycologia. 105: 1164-1173.

Fordyce M, Meldrum S (2001) Verification of conventional pathotype screening for Australian isolates of *Cochliobolus sativus* using molecular fingerprinting. In: Proc of the 10th Australian Barley Technical Symposium, 16-20 September 2001. Canberra, Australia.

Ghazvini H, Tekauz A (2010) Molecular diversity in the barley pathogen *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*). Aust. Plant Pathol. 41: 283-293.

Komijani S, Razavi M, Aminian H (2010) Study on the genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola* cause of Septoria leaf blotch of wheat in Iran using SSR, Scar and rep-PCR markers. Iran. J. Plant. Pathol. 45: 287-300.

Kumar VP, Aggarwal R, Banerjee S, Gupta S, Sharma S, Bashyal BM Jindal M (2013) Basis of resistance in wheat genotypes to *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease. Indian

Phytopathol. 66: 150-154.

Kwasna H (1995) Ecology, taxonomy and nomenclature of Helminthosporia history and actual situation. In: Helminthosporia—Metabolites, Biology, Plant Diseases: *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserohilum* (Chelkowski J., ed.). Poznan, Poland: Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Science, pp. 27-60.

Majer D, Mithen R, Lewis BG, Vos P, Oliver RP (1996) The use of AFLP fingerprinting for the detection of variation in fungi. Mycol. Res. 100: 1107-1111.

Mann MB, Spadari CC, Feltrin T, Frazzon APG, Germani JC, Sand ST (2014a) Genetic variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates using URP-PCR. Trop. Plant Pathol. 39: 163-171.

Mann MB, Minotto E, Feltrin T, Milagre LP, Spadari C, Van Der Sand ST (2014b) Genetic diversity among monoconidial and polyconidial isolates of *Bipolaris sorokiniana*. Curr. Microb. 69: 874-879.

McDonald BA (1997) The population genetics of fungi: Tools and technique. Phytopathology. 87: 448-53.

Mcdonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 349-379.

McDonald BA, MCdermott JM, Goodwin SB, Allard RW (1989) The population biology of host-pathogen interaction. Annu. Rev. Phytopathol. 27: 77-94.

Mehrabi R, Torabi M, Rajabpour M, Karami N, Hosseini A, Ebrahimi A (2014) Molecular identification of *Cochliobolus sativus*, the causal agent of wheat spot blotch disease, using ITS sequencing and its phylogenetic relationships with other *Cochliobolus* Species. Seed Plant Improv. J. 30(2): 399-417.

Mehta YR, Riede CR, Campos LAC, Kohli MM (1992) Integrated management of major diseases in Brazil: An example for the Southern cone region of Latin America. Crop Prot. 11: 517-524.

Minotto E, Mann MB, Velez-Martin E, Feltrin T, Milagre LP, Spadari C, Van Der Sand ST (2014) Pathogenicity of monosporic and polysporic *Bipolaris sorokiniana* isolates to wheat seed and seedling under controlled conditions. Afr. J. Microbiol. Res. 8: 2697-2704.

Mironenko NV, Bulat SA (2001) Genetic structure of *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) populations isolated from different hosts as revealed by UP-PCR (RAPD-like) technique. J. Russ. Phytopathol. Soc. 2: 25–30

Murray TD, Parry DW, Cattlin ND (1998) In: A color handbook of diseases of small grain cereal crops. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Nagarajan S, Kumar J (1998) Foliar blights of wheat in India: germplasm improvement and future challenges for sustainable, high yielding wheat production. In: *Helminthosporium* Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot (Duveiller, E., Dubin, H.J., Reeves, J. and McNab A., eds). Mexico, D.F., Mexico: CIMMYT, pp. 52-58.

Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-238.

Rohlf FJ (1998) NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Stony book, New York, 31p.

Ruckstuhl M (1998) Population structure and epidemiology of *Bipolaris sorokiniana* in the rice–wheat cropping pattern of Nepal. In: *Helminthosporium* Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot (Duveiller, E., Dubin, H.J., Reeves, J. and McNab A., eds). Mexico, D.F., Mexico: CIMMYT, pp. 88-106.

Sharma RC, Duveiller E (2006) Spot blotch continues to cause substantial grain yield reductions under resourcelimited farming conditions. J. Phytopathol. 154: 482-488.

Sharma RC, Duveiller E (2007) Advancement toward new spot blotch resistant wheats in South Asia. Crop Sci. 47: 961-968.

Singh RV, Singh AK, Singh SP (1997) Distribution of pathogens causing foliar blight of wheat in India and neighbouring countries. In: Duveiller E, Dubin HJ, ReevesJ, McNab A (eds) Proc. Int. Workshop *Helminthosporium* blight of wheat: spot blotch and tan spot. 9-14 February 1997, CIMMYT El Batan,

Mexico, DF. pp. 59-62.

Singh RV, Singh AK, Singh SP (1998) Distribution of pathogens causing foliar blights of wheat in India and neighboring countries. In: *Helminthosporium* Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot (Duveiller, E., Dubin, H.J., Reeves, J. and McNab A., eds). Mexico, D.F., Mexico: CIMMYT, pp. 59-62.

Sivanesan A (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. CABI International Mycological Institute, Mycological paper. 158: 261 pp.

Terekhova VA, Rochev MV (1989) Comparative characterization of mycelial isozymes of *Bipolaris sorokiniana* Shoem. isolates of different origin. Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 44: 77–81.

Tinline RD (1961) *Cochliobolus sativus*. IV. Drug-resistant, color, and nutritionally exacting mutants. Can. J. Bot. 39: 1695-1704.

Tinline RD (1988) *Cochliobolus sativus*, a pathogen of wide host range. In: Ingram DS, Williams PH (eds) Advances in plant pathology, vol 6. Academic, London, pp 113-122.

Valim-Labres ME, Porto MD, Matsumura ATS (1997) Effects of host resistance on the isozymatic patterns of *Bipolaris sorokiniana* (Dematiaceae, Moniliales). Braz. J. Genet. 20: 541-545.

Yap IV, Nelson RJ (1996) Winboot, a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendrogram. International Rice Research Institute, Philippines, 32p.

Zhong S, Steffenson BJ (2001) Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology. 91: 469-476

Zhong S, Steffenson BJ (2002) Identification and characterization of DNA markers associated with a locus conferring virulence on barley in the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. Theor. Appl. Genet. 104: 1049-1054.