

## التباين الوراثي والتوزيع الإقليمي لمجتمع فطر الصدأ المخطط (الأصفر) *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* على القمح في سورية باستخدام المؤشرات الجزيئية للدنا (AFLP) خلال موسمي 2006 و 2007

شعلة خاروف<sup>(1)</sup> و محمد فواز العظمة<sup>(1)</sup>  
و عمر يحيياوي<sup>(2)</sup> و مايكل باوم<sup>(2)</sup>

### الملخص

جمعت 96 عزلة من الفطر المسبب لمرض الصدأ المخطط (الأصفر) *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* من مناطق مختلفة لزراعة القمح الطري والقاسي في سورية. وُحِّلت 52 عزلة بعد أن عُرِّفت بوصفها سلالات وراثياً بتقانة التعدد الشكلي لأطوال قطع الدنا المضخمة (AFLP) Amplified Fragment Length Polymorphism. بلغت نسب تباين مجتمع الفطر بين المحافظات 10% في حين كانت 90% ضمن المحافظة الواحدة. عند استخدام التحليل التجميعي توزعت السلالات إلى أربع مجموعات وفقاً لنسبة القرابة الوراثية فيما بينها. تضمنت المجموعة الأولى سلالات تنتمي إلى مناطق جغرافية متقاربة في وسط وشمال سورية (إدلب، حماة، حلب وتل حديا)، وكانت نسبة القرابة الوراثية فيها 35,3%. بلغت نسبة القرابة الوراثية ضمن المجموعة الثانية 15,3%، وهي تضم سلالات من مناطق جغرافية مختلفة (درعا ودير الزور والرفقة). تنتمي إلى المجموعة الثالثة سلالات من إدلب والحسكة وحلب فقط، وبلغت نسبة القرابة الوراثية فيها 22,3%. وكانت درجة القرابة في المجموعة الرابعة الممثلة بسلالات من منطقة طرطوس وحمص واللاذقية، 38,9%. أكدت النتائج توافق نتائج تعريف السلالات اعتماداً على رد فعل الأصناف التفريقية مع اختبارات المادة الوراثية بطريقة المؤشرات الجزيئية للدنا (AFLP).

الكلمات المفتاحية: قمح، صدأ مخطط (أصفر)، سلالات فيزيولوجية، المؤشرات الجزيئية للـ DNA، AFLP، سورية.

<sup>(1)</sup> كلية الزراعة جامعة دمشق، الهيئة العامة للتقانة الحيوية دمشق، سورية.

<sup>(2)</sup> المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)

**Genetic variation and regional distribution of  
wheat stripe (yellow) rust  
*Puccinia striiformis* f. sp *tritici*  
using DNA molecular markers ( AFLP)**

**S. Kharouf<sup>(1)</sup> ; F. Azmeh<sup>(1)</sup>;  
M. Baum<sup>(2)</sup> and A. Yahyaoui<sup>(2)</sup>**

**ABSTRACT**

96 isolates of yellow (stripe) rust of wheat *Puccinia striiformis* f.sp *tritici* collected from durum and bread wheat fields in Syria during 2006 and 2007 seasons were studied. 52 isolates were identified as races using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) molecular markers. The total genetic variation of the samples was calculated and partitioned by Analysis of Molecular Variance (AMOVA). The total variance was (10%) among the geographic origins, while most of the variance (90%) occurred within the groups of the same geographic origins. Multi dimensional scale analysis (MSD) and genetic dendrogram showed that the Syrian yellow rust races were clustered in four groups. Discriminate analysis did not show a well defined geographic pattern of the genetic diversity in yellow rust. This fact could be explained by the dissemination mechanism of rust uridinospores by dominant wind currents. The four sub-groups were scattered in the regions.

The first group: contained races from Idleb, Hama, Aleppo and Tal hadya it was belonged to close sub-regions. The genetically distant was 35.3%.

The second group: contained races from Dra'a, Deirazzor and Raqqa the genetically distant was 15.3%.

The third group: contain races from Idleb, Hasakah and Aleppo the genetically distant was 22.3%.

The fourth group: contained races from Homs, latakia and Tartous the genetically distant was 38.9%. Confirmed the results agree with the results of races depending on the reaction of differential varieties with tests of genetic materials in a manner of molecular markers AFLP

**Key word:** Wheat, Stripe (yellow) rust, Races, DNA molecular markers (AFLP), Syria

<sup>(1)</sup>Damascus University Faculty of Agriculture and National Commission of Biotechnology (G.C.B.T),  
Damascus, Syria

<sup>(2)</sup>ICARDA, P.O. Box 5466, Aleppo, Syria

## المقدمة

يعدُّ الصدأ المخطط (الأصفر) Yellow or Stripe Rust المتسبب عن الفطر *Puccinia striiformis* West f. sp. *tritici* من أهم أمراض الصدأ التي تصيب القمح في المناطق الباردة والرطبة (Johnson, 1988). ينتشر هذا المرض في سورية في مناطق زراعة القمح كلها وخاصة في الحقول المروية، وتتركز شدة الإصابة وأضرار المرض بشكل خاص على أصناف القمح الطري Bread wheat (خاروف، 2004). تعدُّ مسببات الأمراض الفطرية من أهم الكائنات الدقيقة التي تُرست باستخدام التقانات الحيوية الجزيئية (Chen et al., 1993)، وتحتمل مسببات فطور الصدأ المرتبة الأولى من الأهمية (Flor, 1959)، والصدأ الأصفر على القمح من أهم الأمراض الناتجة عن فطر *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Westend. (PST). حيوي التغذية وهو فطر إجباري التطفل، ولا يمكن تمييزه فوق أوساط صناعية (Stubbs et al., 1986)، وبذلك تصعب دراسة التباين الوراثي للصدأ من المشيجة نظراً إلى تغلغلها الوثيق داخل أنسجة العائل (Enjalbert et al., 2005 and Vallavieille Pope et al., 2000) الأمر الذي أدى إلى توجيه الدراسات الجزيئية إلى الأبوغ اليوريدينية ذات النواتين (McIntosh et al., 2005). وبسبب الظهور السريع لأنماط مرضية شرسة جديدة، فإن أصناف القمح المنتخبة ذات المقاومة النوعية للسلاسل السائدة تصبح غالباً قابلة للإصابة خلال سنوات قليلة بعد نشرها على مساحات واسعة (Steele et al., 2001) (Stubbs, 1985) (Justesen and Hovmoller, 2002) وهذا ما حدث في موسم 2009-2010 على عدد من الأصناف المنتخبة من القمح الطري ولاسيما الصنف شام 8. ويعزى انتشار أبوغ الصدأ إلى هجرتها محمولة بواسطة الرياح (Gassner & Straib, 1932)، الأمر الذي ساعد في كسر مقاومة أصناف حاملة لمورثات المقاومة نفسها في بلدان مختلفة (Hovmoller and Justens, 2007)، وقد أظهرت نتائج الدراسات الجزيئية للفطر PST، العلاقة بين النمط الممرض Path type والتنوع الجزيئي (Van' T et al., 2002)، وتعدّ تقانة التعدد الشكلي لقطع الدنا المضخمة AFLP من أهم هذه الطرائق، لأنها تقدم فهماً أكبر لديناميكية مجتمع فطر الصدأ الأصفر. (Repally, F. 1979)

## هدف البحث

دراسة التباين الوراثي في مجتمع الفطر المسبب للصدأ الأصفر في سورية باستخدام المؤشرات الجزيئية الدناوية DNA molecular markers، وعلاقته بالتنوع الجغرافي لسلاسل الفطر باستخدام تقانة AFLP

## مواد البحث وطرقه

### جمع العزلات الحقلية وإكثارها:

جمعت عينات من أوراق قمح مصابة بالصدأ الأصفر إصابة طبيعية من أصناف القمح القاسي والطري، شمل المسح الحقلية كلاً من حقول المزارعين و مراكز البحوث العلمية الزراعية مثلت كافة المناطق البيئية السورية كلها خلال موسم الدراسة 2006 - 2007. وأحضرت العينات إلى مخبر أمراض القمح في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، عُزلت الأبواغ اليوريدينية وأكثر على بادرات الصنف Morocco بوصفه قابلاً عاماً (شديد الحساسية) للمرض *general susceptible* والمزروع في أصص بلاستيكية صغيرة مملوءة بخليط معقم من تربة طينية ورمال وبيتموس بنسبة 1:1,3:2,7 على التوالي، وبعد الإنبات مباشرة أضيف محلول مالايك هيدرازيد بتركيز 0.25 غ/ل إلى ماء السقاية، واستخدمت أبواغ يوريدينية أخذت من بثر مفردة في أعداء بادرات الصنف القابل. ثم نميت البادرات المعدة ضمن ظروف متحكم بها من حرارة ( $10 \pm 2$ °س) ورطوبة نسبية (70-80%) ونظام إضاءة متناوب (16 ساعة إضاءة 8 ساعات ظلام) ضمن حاضنة مخصصة لهذه الغاية لمدة 24 ساعة نقلت بعدها إلى حاضنة أخرى درجة حرارتها ( $15 \pm 02$ °س) وضمن ظروف الرطوبة والإضاءة سابقة الذكر نفسها. وبعد 17 يوماً من العدوى بُدئ بجمع الأبواغ اليوريدينية وإعادة إكثارها من جديد بالطريقة السابقة الذكر نفسها، وذلك للحصول على الكمية الكافية من الأبواغ اليوريدينية للعمل عليها باستخدام المؤشرات الجزيئية ولتعريف السلالات فيزيولوجية، وقد بلغ عدد السلالات المعرفة 52 سلالة، وذلك حسب ما هو مبين في النتائج ممثلة للـ 96 عزلة.

### عزل الـ DNA واستخلاصه وتضخيمه: حفظ السلالات بطريقة التجميد (freeze drying)

عُزل الـ DNA حسب الطريقة الموصوفة في مخبر التقانات الحيوية في المركز الدولي للبحوث العلمية الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا) وذلك حسب الخطوات التالية، وُزن 20 – 50 مغ من الأبواغ اليوريدينية المحفوظة في مجمدة درجة حرارتها - 80°س من كل عزلة على حدة. ثم وضعت في أنابيب إندروف بلاستيكية في المجمدة المحضرة مسبقاً على وضعية التجميد، وتركت الأنابيب فيها مدة 48 ساعة. بعد تمام عملية التجميد، أضيف إلى كل أنبوب 50 مغ رملاً ناعماً جداً خاصاً بالاستخلاص، ثم وضعت في كل أنبوب كرتان معدنيتان لسحق الأبواغ اليوريدينية الفطر بالهزاز طحناً ناعماً، ثم نقلت إلى أنابيب بلاستيكية سعة 2 مل. إذ استخدم محلول الاستخلاص  $\times 1.5$  CTAB (1M Tris-HCL, 5M NaCl, 0.5M EDTA, CTAB).

أخذ 100 مغ من مسحوق الأبواغ اليوريدينية الفطرية كل عزلة وحدها وأضيف إليها 1 مل من محلول الاستخلاص وذلك ضمن حمام مائي عند 65-60 س، وترك الأنايب في الحمام المائي مدة 60 دقيقة. أضيف بعد ذلك إلى كل منها 1 مل من المزيج Iso-amyl-alcohol + Chloroform (24:1 حجم)، ثم حركت الأنايب بلطف حتى تشكل مستحلب. ثفلت الأنايب بعد ذلك مدة 10 دقائق بسرعة 10000 دورة/دقيقة. استخلصت الطبقة العلوية التي تحتوي على DNA الفطر ونقلت إلى أنابيب أخرى سعة 1.5 مل، ثم أضيف إلى كل منها 1 مل من مادة إيزوبروبانول (Iso-propanol) البارد (-20 س) تركيزها 100%، ثم ثفلت كما سبق لمدة 5 دقائق. تم التخلص بعد ذلك من الرشاحة وبقي الراسب وهو عبارة عن كتلة الـ DNA. غسلت كتلة DNA بالإيثانول البارد (-20 س) بتركيز 75%، وكررت عملية الغسيل عدة مرات إلى أن أصبح لونها أبيض ناصعاً. وضعت الأنايب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي للتخلص من الإيثانول وترسيب كتلة DNA. تركت الكتلة لتجف عند حرارة المختبر، وذلك بإبقاء الأنبوب مفتوحاً. أضيف إلى كل أنبوب 100 ميكرو لتر من مادة TE (1M Trisma base, 0.5M EDTA)، ووضع في البراد حتى اليوم التالي حيث وضعت عند 4 س على جهاز للتحريك بسرعة 500 دورة/دقيقة وذلك حتى تمام ذوبان كتلة DNA. أضيف أنزيم RNase لاستخلاص RNA بتركيز 10 ميكرو غرام/مل وبمعدل 0.3 ميكرو لتر إلى كل أنبوب، ثم وضعت الأنايب بعد ذلك في حمام مائي درجة حرارته 37 س مدة 30 دقيقة. أضيف بعد ذلك أسيتات الصوديوم بتركيز 3 مول وبمعدل 1 ميكرو لتر/10 ميكرو لتر من مادة TE. أضيف 1 مل من الإيثانول النقي 100% والمبرد (-20 س) إلى كل أنبوب، وثلقت كما سبق مدة 5 دقائق للتخلص من الإيثانول، غسلت كتلة DNA بعد ذلك بالإيثانول 75% ثم جففت عند درجة حرارة المختبر ومن ثم أضيف لها بعد ذلك 100 ميكرو لتر من مادة TE إلى كل أنبوب مع التحريك حتى تمام ذوبانها. قُدر تركيز DNA ونقاوته باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV عند طول موجه 260 نانو متراً. استخدمت مادة TE لمعايرة الجهاز وتمديد DNA. وعُدَّ الحمض النووي نقياً عندما راوحت قراءة الجهاز بين 1.8-2.

#### اختبار AFLP:

جرى أولاً اختبار سبع توليفات Combination من المرئسات (primers):  $P16+M$ ،  $P17$ ،  $P16+M88$ ،  $P16+M183$ ،  $P16+M269$ ،  $P16+M88$ ،  $P24+M$ ،  $P20+M88$ ،  $P17+M$ ،  $P24+M301$  التي استخدمت في هذا الاختبار، وذلك بتجريب هذه المرئسات وتطبيقها على 10 سلالات من الفطر. واختيرت المرئسات التي أعطت حزمًا ذات أشكال متعددة شكلياً Polymorphic، وهما المرئسيان  $P16+M17$ ،  $P16+M88$ ، واستبعدت باقي المرئسات.

### 1- مرحلة هضم (تقطيع) الدنا : DNA Digestion

استخدم لهذا الغرض خليط من الأنزيمات (EcorI + MseI)، بمعدل 0.8 ميكرو لتر إلى كل 1.3 ميكرو لتر من DNA الفطر (تركيز 80 نانو غراماً/ميكرو لتر) مع إضافة 2 ميكرو لتر من محلول التفاعل، ثم أكمل الحجم إلى 10 ميكرو لتر بإضافة 5.9 ميكرو لتر ماءً عالي النقاوة خاص باختبار AFLP. حضنت الأنابيب عند 37°س في حاضنة مدة 4 ساعات، ثم عند 70°س في حمام مائي مدة 15 دقيقة، ومن ثم وضعت مباشرة في الثلج عدة دقائق.

### 2- مرحلة الإلتحام: Ligation of adapters

أضيف 6.9 ميكرو لتر من محلول الإلتحام (Adapter ligation solution) مع 0.4 ميكرو لتر من أنزيم التفاعل (T4) بحيث أصبح الحجم النهائي في كل أنبوب 20 ميكرو لتر، واستخدم جهاز الطرد المركزي لخلط المواد السابقة، ثم وضعت الأنابيب عند درجة حرارة المخبر مدة 2 ساعة. مُدَّت العينات إلى خمسة أضعاف حجمها باستخدام مادة (TE buffer : TE10 mm Tris – base 1 mm EDTA, PH 8.0) الخاصة باختبار AFLP.

### 3- مرحلة ما قبل التضخيم: Preamplification Reaction

أخذ 2 ميكرو لتر من الناتج الممدد في المرحلة السابقة وأضيف إليه 16 ميكرو لتر من خليط مكون من مرئستين مع 2 ميكرو لتر من محلول PCR الخاص باختبار AFLP. كما أضيف 0.15 ميكرو لتر من أنزيم Taq. خلطت تلك المواد ثم أجري تفاعل PCR (20 دورة) إذ جرى في كل دورة رفع درجة الحرارة إلى 95°س مدة 30 ثانية يتم خلالها انفصال سلسلتي DNA، يتبعها انخفاض درجة الحرارة إلى 56°س مدة 1 دقيقة، و72°س مدة 1 دقيقة أيضاً، فيجري خلالها التلاحم المرئسات مع قطع DNA. مُدَّد بعد ذلك تمديد الناتج إلى خمسة أضعاف الحجم باستخدام (TE).

### 4- مرحلة اختيار مضخات AFLP : Selective AFLP amplification

أخذ في هذه المرحلة 2,5 ميكرو لتر من ناتج التخفيف في المرحلة السابقة وأضيف إليها 4.16 ميكرو لتر ماءً مقطراً على مرحلتين، كما أخذ 1 ميكرو مول من محلول PCR الخاص باختبار AFLP. استخدم في هذه المرحلة كل من التسوليفتن للمرئستين: P16+ و M88 و M17، استخدم 0.09 ميكرو لتر من الأول و 2.25 ميكرو لتر من الثاني وأضيف 0.079 ميكرو لتر من أنزيم Taq. أجري تفاعل PCR على برنامجين تكون الأول من 13 دورة، إذ رفعت درجة الحرارة في كل دورة إلى 94°س مدة 30 ثانية ثم خفضت إلى 65°س مدة 30 ثانية (معدل انخفاض الحرارة 0.7°س/دورة) ثم رفعت إلى 72°س مدة 60 ثانية. أما البرنامج الثاني فتضمن 23 دورة حيث وصلت درجة الحرارة

في كل دورة إلى 94 س مدة 30 ثانية وانخفضت إلى 56 س مدة 30 ثانية ثم رفعت إلى 72 س مدة 60 ثانية.

### فصل جزيئات الدنا المضخمة على هلام أكريلاميد:

فصلت جزيئات DNA على هلام من أكريلاميد باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي العمودي. حُضِرَ أولاً لوحا زجاج القالب الذي سيصب منه الهلام، وضعت على الزجاج التي سيلتصق بها الهلام مادة تساعد على الالتصاق (Bind-silane) وضعت على الأخرى مادة تمنع الالتصاق (Sigmacote). ثم وضعت الزجاجتان فوق بعضهما بعد وضع أشرطة بلاستيكية بسماكة 0.4 مم، وذلك على الطرفين الطويلين والطرف السفلي فقط.

### تحضير الهلام:

حضر 1 لتر من محلول مكون من 420 غ من اليوريا، 150 مل من أكريلاميد تركيز 40% و 100 مل من مادة TBE  $\times 10$ ، ثم خلطت تلك المواد جيداً. أخذ 65 مل من المحلول السابق ضمن كأس (بيشر) وأضيف إليه 245 ميكرولتراً من بيروسلفات الأمونيوم بتركيز 25% ثم أضيف 45 ميكرولتراً من مادة TEMED المبلعمة. صُبَّ المحلول الناتج في القالب ضمن لوح الزجاج، وضع مشط بلاستيكي من الأعلى مع مراعاة أن تكون الأسنان باتجاه الأعلى، ترك القالب حتى تبلمر الهلام بشكل جيد، ثم ثبت بشكل جيد على جهاز الرحلان الكهربائي، وأضيف المحلول المنظم TBE  $\times 1$  إلى الحوضين العلوي والسفلي لجهاز الرحلان. نزع المشط من الأعلى وغسل مكانه جيداً باستخدام المحلول المنظم ذاته، مرر تيار كهربائي باستطاعة 70 واطاً حتى وصول درجة الحرارة إلى 50 س. وحُضِرَت هذه الفترة العينات بمعدل 10 ميكرولتراً أضيف إليها 10 ميكرولتراً من مادة Stop sequencing. أُجِري تفاعل PCR وفق برنامج التفكيك على درجة حرارة 94 س مدة 5 دقيقة، ثم وضعت العينات مباشرة في الثلج لإيقاف عملية التفكيك. قطع التيار الكهربائي عن جهاز الرحلان عند وصول درجة الحرارة إلى 50 س، ثم غسل مكان المشط مرة ثانية بمحلول TBE، ووضع المشط بحيث لامست أسنانه الهلام. حقنت العينات ضمن الحفر التي أحدثتها أسنان المشط في الهلام، مع العلم أن الحفرتين الأولى والأخيرة من الهلام حقن فيهما شاهد (Marker) وهو قطعة من DNA معروفة الوزن الجزيئي. بعد انتهاء الحقن مرر التيار الكهربائي في الجهاز باستطاعة 70 واطاً وحرارة 50 س مدة ساعتين.

### تلوين الهلام:

فُرغ المحلول المنظم من حوضي الجهاز ثم أخذ القالب وفصل لوح الزجاج حيث بقي الهلام ملتصقاً على اللوح الخاص ووضع في محلول حمض الخل النقي لتثبيت الحزم

الظاهرة. استخدمت نترات الفضة لتلوين الهلام كما استخدم محلول التطهير (كربونات الصوديوم + سيوسلفات) وذلك لإظهار حزم DNA (Bands). ثم استخدم محلول حمض الخل النقي مرة ثانية لتثبيت حزم DNA. صُوِّر الهلام بالأشعة فوق البنفسجية ونقلت الصورة إلى الحاسب لتحضيره للقراءة.

### قراءة الهلام وتحليل النتائج

صُحِّمَت DNA بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) أُجريت هذه التفاعلات في هذه التقنية تبعاً للطرائق الموصوفة من قبل (Zabeau and Vos 1993)، والمعدلة من قبل (Poowell *et al.*, 1997). بعد ذلك قُرئ وسط الفصل باستخدام ألواح مضيئة لتوضيح الحزم، شبيهة بالمستخدمة في قراءة الصور الشعاعية. رمزت النتائج بطريقة الترميز الثنائي (Binary code)، إذ يرمز الرقم (1) إلى وجود الحزم، في حين يرمز الرقم (0) إلى غياب الحزم ضمن المجال 100 - 1500 bp زوج نيكوليتيدات، وحفظت النتائج في ملف Excel. حُلَّت النتائج بواسطة برنامج Power Marker V3 -25 الذي يعمل في بيئة Windows على الحاسب الشخصي. حُسب الاختلاف الوراثي بالاعتماد على:

(1) دليل التنوع لشانون (Shannon diversity index).

(2) دليل الاختلاف الوراثي لني (Nei's gene diversity).

حُسبت المسافات الوراثية (Genetic Distance)، ومعامل الارتباط المصفوفي (Correlation Coefficients Matrix)، لإنجاز التحليل العنقودية من النوع PCoA (Principal Co-ordinates Analysis) باستخدام البرنامج (Power marker V3.25) (Liu and Muse 2005) واعتماداً على المسافة بين السلالات حسب (Nei, 1973)، وتراوح قيم هذا المؤشر بين (0 و 1)، حُسبت المسافة الإجمالية بين السلالات على المستوى نفسه، كما حُسبت النسبة المئوية للتباين الجزئي للفطر بالنسبة إلى علاقة الممرض بالشكل الإمراضي، وحُسبت النسبة المئوية للتباين الجزئي (AMOVA) Analysis of Molecular Variance) للتباين بين سلالات مجتمع الفطر (جدول 2)، إذ حُسبت النسبة المئوية للتباين بين سلالات الفطر ضمن كل منطقة. كما حُسب مؤشر متوسط التنوع الجيني (Average Gene Diversity) لسلالات الفطر في حقول القمح القاسي والطري، ورُسِّمَت شجرة القرابة الوراثية Tree (الشكل 1).

### النتائج والمناقشة

أظهر اختبار كل من التوليفتين  $P16+M88$  و  $P16+M17$ ، تضاعفاً جيداً وواضحاً وأنتجتا عدداً من الحزم (العصابات) وقد أنتج التوافق الأول من التوليفة ( $P16+M17$ )



ما مجموعه 75 مؤشراً متبايناً شكلياً (Polymorphic markers)، في حين أنتج التوافق الثاني 72 مؤشراً متبايناً شكلياً.

وأظهرت النتائج لدى اختبار 52 عزلة وحيدة البوغة (Single spore isolates) من الفطر المسبب لمرض الصدأ الأصفر *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici* التي عُرقت إلى السلالات التي عددها 52 سلالة توزعت في أربع مجموعات، مع المرئسات أنّ كلاً من المرئستين *Pst1*, *Mse1* حزاماً متعددة شكلياً Polymorphic، ولذا اختيرتا مع نيوكلوتيديين باستخدام تركيبين (*P16+ M88*, *P16+ M17*) (*Pst1+ CC*, ) (*Mse1+ CC*) و (*Mse1+ GC*, *Pst1+ CC*) من أجل اختبار AFLP. وبيّن الجدول 1 التتابع النيوكلوتيدي للمرئستين. سُجّلت خصائص المؤشرات بحساب دليل الاختلاف الوراثي (Genetic Diversity Index)، الذي يعرف أيضاً بمتوسط PIC (Polymorphism Information Content) محتوى معلومات التعدد الشكلي (Hammer et al., 2001) (شكل 1)، حيث يحسب عدد الأليلات في الموقع الواحد مع تكرار نسبي في المجتمع المدروس. (Liu and Muse 2005)، وبحساب متوسط PIC وُجد أنه يساوي 31,51%، أي لا يوجد اختلاف كبير بين المواقع المدروسة. أظهرت النتائج لدى قراءة الهلام باستخدام برنامج Adobe Photoshop CS أن التركيب (*Pst1+ CC*, *Mse1+ CC*) نتج عنه 278 حزمة (شكل 3).

وأعطى التركيب الثاني (*Pst1+ CC*, *Mse1+ GC*) 302 حزمة (شكل 4). أظهر جدول تحليل البيانات AMOVA (جدول 2) أن نسبة التباين في مجتمع الفطر بين المحافظات (المواقع المدروسة) كانت قليلة 10%، أما ضمن المحافظة الواحدة فكانت كبيرة وسجلت تبايناً نسبته 90%، في حين بلغت مكونات التباين ( Variance Components) 2.5% و 97.51%، على التوالي. وساعد التحليل العنقودي (باستخدام برنامج UPGMA مشاركة مع تحليل PCoA) في تحديد القرابة الوراثية بين السلالات المدروسة، كما أظهرت النتائج أن تحليل PCoA والتحليل العنقودي UPGMA كانت متلائمة مع بعضها بعضاً بصورة كبيرة (شكل 1)، إذ ساعد استخدام التحليل العنقودي مع تحليل AMOVA في تجميع معلومات كافية عن البيانات الجزئية. كما سهل إجراء تحليل AMOVA إظهار التباين بين المجتمعات، واحتمال تشابه بعض المجموعات (Lessa, 1990). ويشير الشكل (2) إلى أن مجموعات التحليل العنقودي احتوت على مجتمعات الفطر من مناطق جغرافية مختلفة. وتبيّن في الوقت ذاته وجود مورثات متماثلة مع أن مواقع جمعها كانت متباعدة جغرافياً وهذا يتوافق مع دراسات سابقة، (Hovmoller and Justesen, 2001)، (Newton et al., 1985)، من جانب آخر، فإن سلالات فطر الصدأ الأصفر المأخوذة من موقع واحد توزعت في مجموعات مختلفة، ومعظم السلالات التي أظهرت تشابهاً كبيراً كانت من مناطق جغرافياً متباعدة. هذا يدل

وحسب كل الدراسات المرجعية أن سلالات الفطر المنقولة هوائياً عبر المسافات البعيدة أنها موجودة في أكثر من مكان (Hovmoller *et al.*, 2001) ولم تتجمع مجتمعات الفطر التي تنتمي إلى منطقة واحدة مع بعضها في العنقود ذاته، إذ تجمعت السلالات في أربع مجموعات رئيسية كالآتي:

**المجموعة الأولى:** ضمت سلالات تنتمي إلى مناطق متقاربة جغرافية: ادلب، حماة، حلب وتل حديا بوصفها منطقة مستقلة، وكانت نسبة القرابة الوراثية فيها 35,3% فقط وفقاً لقيم Bootstrap. وتمثلت هذه المجموعة في كل من السلالات 14E150، 20E0، 230E150، 114E16، 82E16، 6E20، 0E0، 32E0، 0E14، 2E0، 6E16، 4E2، 0E18، 102E160، 196E98، 0E28، 4E40، 128E65، 6E0، 6E30، 6E30، 142E130، 14E6، 198E150، 38E6، 164E22، 230E222، 38E150.

**المجموعة الثانية:** بلغت نسبة القرابة الوراثية فيها 15,3%، وقد وضحت سلالات تنتمي إلى مناطق جغرافية مختلفة من درعا ودير الزور والرقعة، وهي السلالات 198E4، 134E16، 230E150، 4E0، 36E6، 4E2، 116E56، 4E32، 78E30، 38E6.

**المجموعة الثالثة:** وضحت سلالات من منطقة إدلب والحسكة وحلب وبقراية وراثية 22.3% وشملت السلالات 230E150، 0E0، 6E150، 6E36، 2E0، 6E30، 230E222.

**المجموعة الرابعة:** من طرطوس وحمص واللاذقية، وكانت درجة القرابة 38,9%، وتمثلت فيها السلالات 230E150، 0E0، 38E150، 6E0، 4E0، 6E16، 230E222.

يوضح الشكل (1) أن بعض السلالات قريبة وراثياً من بعضها بعضاً، مثل سلالات منطقة اللاذقية وسلالات المجموعة الأولى، إذ بلغت نسبة القرابة بينهما 92%، وهي تتبع إلى مناطق جغرافية مختلفة. ويؤكد جدول تحليل التباين ANOVA ما سبق ذكره مع هذه التحاليل، إذ كانت نسبة الاختلاف بين المحافظات منخفضة (10%)، في حين كانت عالية ضمن المحافظة الواحدة (90%) (شكل 1)، وهذا يدل على قرابة عالية بين السلالات من مواقع مختلفة جغرافياً وبيئياً، كتقارب سلالات حلب والحسكة، وتقارب سلالات حلب وطرطوس، وحماة وتل حديا، كما يؤكد ذلك الشكل (2). ويمكن أن يعزى ذلك إلى انتقال أبواغ الفطر هوائياً، وعبر مسافات كبيرة جداً (Chen, 2005b)، وربما تؤدي المسارات الهوائية الاعتيادية في موسم الإصابة خلال فصل الربيع (Mamluk *et al.*, 1990) دوراً مهماً في هذا التقارب الوراثي بين السلالات في المحافظات حيث تكون الرياح غربية وتتجه شرقاً بصورة عامة. وقد مكنت تقانة AFLP من تحديد التنوع الوراثي في

مجتمع فطر الصدا الأصفر المعزول من حقول القمح القاسي والطري من مناطق مختلفة جغرافياً في سورية. وقد وجدنا 147 موضعاً متعددًا شكلياً باستخدام توليفتي المرئس المذكور أنفاً أي ما نسبته (97.5%)، وهي مهمة لتوقع الحركة الوبائية للفطر، لكنها لا تجيب عن الأسئلة الأكثر تخصصاً عن حركية مجتمعات الكائن الممرض ضمن الحقول (Chen, 2005a). في دراستنا، وجدنا أن في معظم متغيرات AFLP في منطقة إلب كانت نادرة، وأظهرت عدة مؤشرات نادرة. بينما أعطت منطقة تل حديا ومنطقة الغاب، وهي الأكثر تعرضاً لخطر أوبئة الصدا الأصفر في سورية، عدداً أكبر من المتغيرات فيما بينها، ومن المحتمل أن منطقة تل حديا. متأثرة مباشرة بالمجتمع الشمالي. في حين منطقة حلب وإلب هي في موقع متوسط، ويحتمل أنها تحت تأثيرات تراكمية مختلفة. ويعزى هذا التباين في التنوع الوراثي للسلاسل بين تل حديا والغاب إلى تنفيذ العدوى الاصطناعية سنوياً في تل حديا باستخدام سلالات جمعت من المناطق السورية المختلفة، كما يعزى أيضاً إلى احتمال تطور سلالات جديدة في هذا المعقد لسلاسل مجتمع الفطر في تل حديا نظراً إلى زراعة أنماط وراثية عديدة من القمح لها أطياف قابلية مختلفة تجاه الممرض. حدد تحليل UPGMA وجود 10 مجموعات بمستوى تشابه يبلغ 69.73%. في المناطق الشمالية، واحد منها جمع 11 نموذجاً مختلفاً، بما فيها النموذج 0، وبلغت ما مجموعه 90% من السلالات. قد تكون هناك حاجة لدراسة أكثر تفصيلاً لهذه النقطة للخروج باستنتاجات أكثر نوعية حول البنية الوراثية للبؤر المرضية، (Enjalbert *et al.*, 2002). وفي دراستنا، شاهدنا فقط نمطين وراثيين من الفطر شديدي الشراسة متجمعة في ذرية مفردة. وكانت بمستوى تشابه يبلغ (88.7%) من النمط الممرض 230E150، 230E222.

هذه النتائج تقودنا إلى استنتاج أن مؤشرات AFLP لدينا كانت غير متعلقة بالشراسة وذلك ما بينته شجرة القرابة الوراثية، (Dendrogram) لسلاسل الفطر، حسب (Liu K., and Muse S.V., 2005) (شكل 1).

حيث كانت نتائج Bootstrap للسلاسل 11.33%، والمسافة الوراثية بين النمط الممرض والآخر 4.1%، بينما كان عدد الأليلات 68.23%، ومن خلال هذه الأرقام، يدل على أن المسافة الوراثية قليلة جداً بالنسبة إلى مقارنة النمط الممرض عن الآخر. من المفترض أيضاً أن شمال سورية يتأثر بصورة مباشرة بمجتمع الفطر في تركيا عن طريق الهجرة بالرياح إذ إن مسافة الهجرة للأبواغ اليوريدينية لهذا الفطر يمكن أن تصل حتى 800 كم (Mamluk *et al.*, 1995)، ويمكن اشتقاق التباين الوراثي المشاهد في مجتمعات المنطقة الشمالية من مادة تلقيح متميزة وراثياً، وهي ذات مصدر رئيسي (النموذج 0)، ونماذج أخرى تنشأ من هجرة طويلة، أو بقاء محلي عبر فصل الصيف. وقد وجدنا فقط نمطين مرضيين سائدين في عيناتنا كلها من مختلف المناطق 0E0،

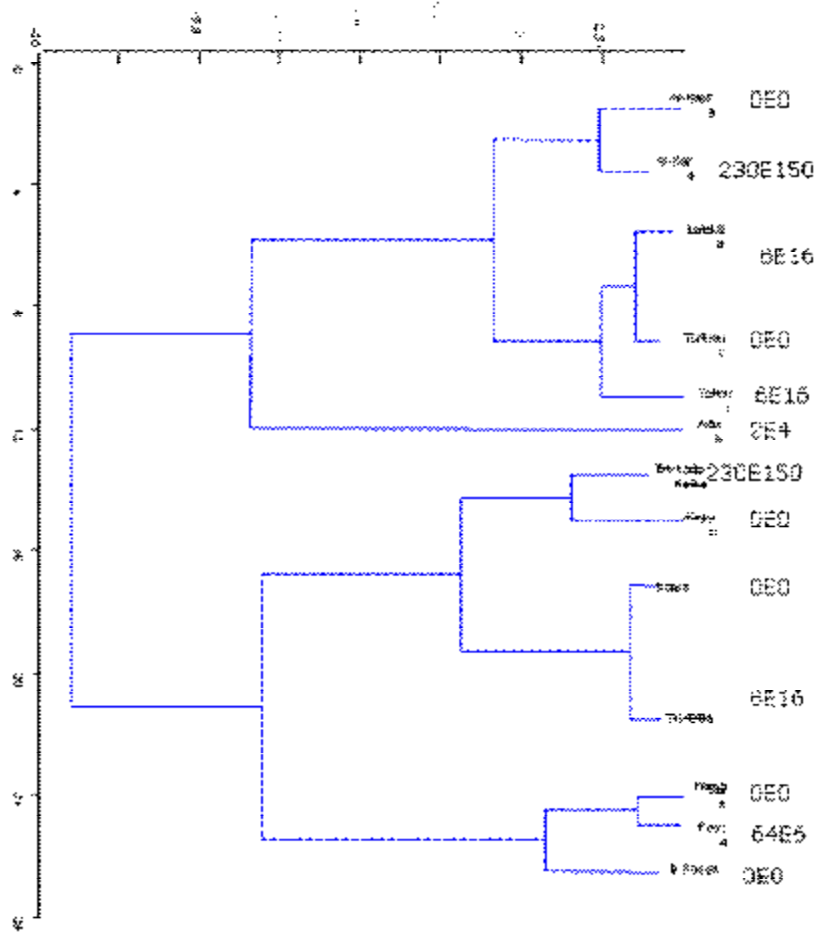
6E16 (Enjalbert *et al.*, 2002)، يمكن أن نصل إلى خلاصة مهمة من دراستنا، وهي أن مجتمعات *P. striiformis* f. sp. *tritici* يمكن أن تعدّ متشابهة على المستوى الحقلّي على امتداد مناطق شمال سورية. هذا ويجب أخذه بالحسبان من أجل تطوير استراتيجيات التربية لمقاومة المرض في أصناف القمح (McDonald and Martinez, 1991).

الجدول (1) التسلسل الآزوتي للمرئسات الموجهة المستخدمة في طور التضخيم الأولي في اختبار التوليفتين (AFLP (P16+ M17، P16+ M88)

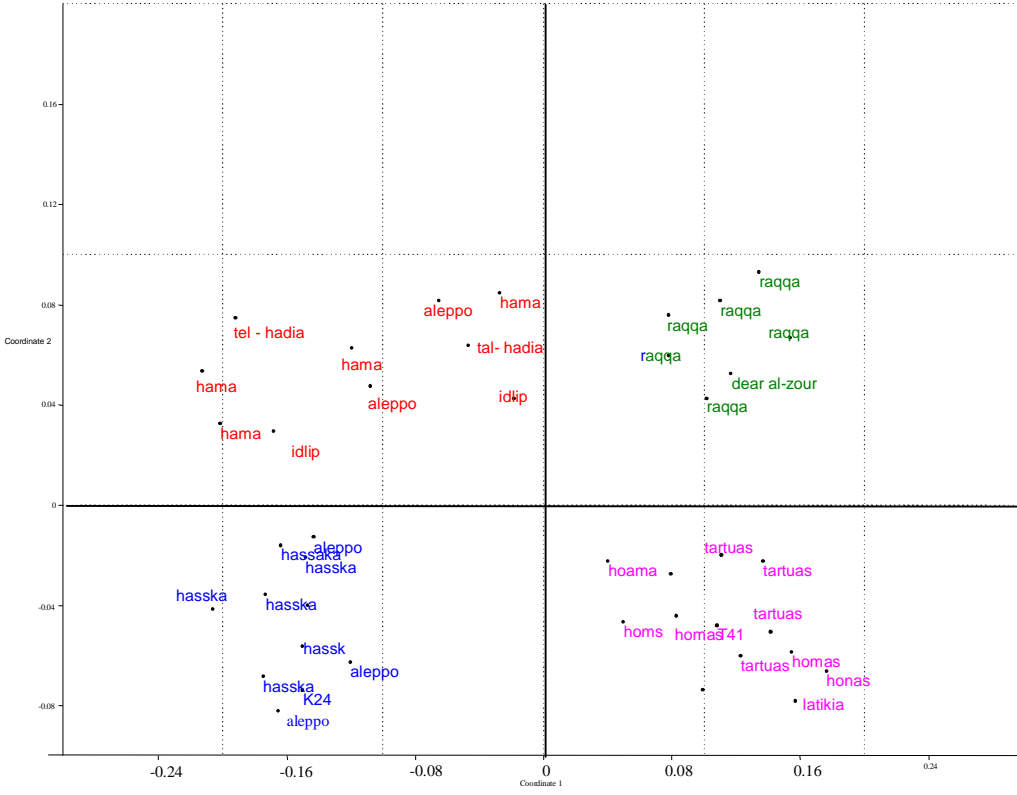
المرئسات المستخدمة	التتابع النيوكليوتيدي
<i>Pst</i> 0	5`GACTGCGTCCATGCAG
<i>Pst</i> 1+ CC	5`GACTGCGTCCATGCAG CC
<i>Mse</i> 1 +CG	5`GATGAGTCCTGAGTAA CG
<i>Mse</i> 0	5`GATGAGTCCTGAGTAA
<i>Pst</i> 1+ CC	5`GACTGCGTCCATGCAG CC
<i>Mse</i> 1+ GC	5`GATGAGTCCTGAGTAA CG

الجدول (2) تحليل التباين الجزيئي للسلاطات في مجتمع فطر الصدأ الأصفر بين المواقع المدروسة في سورية.

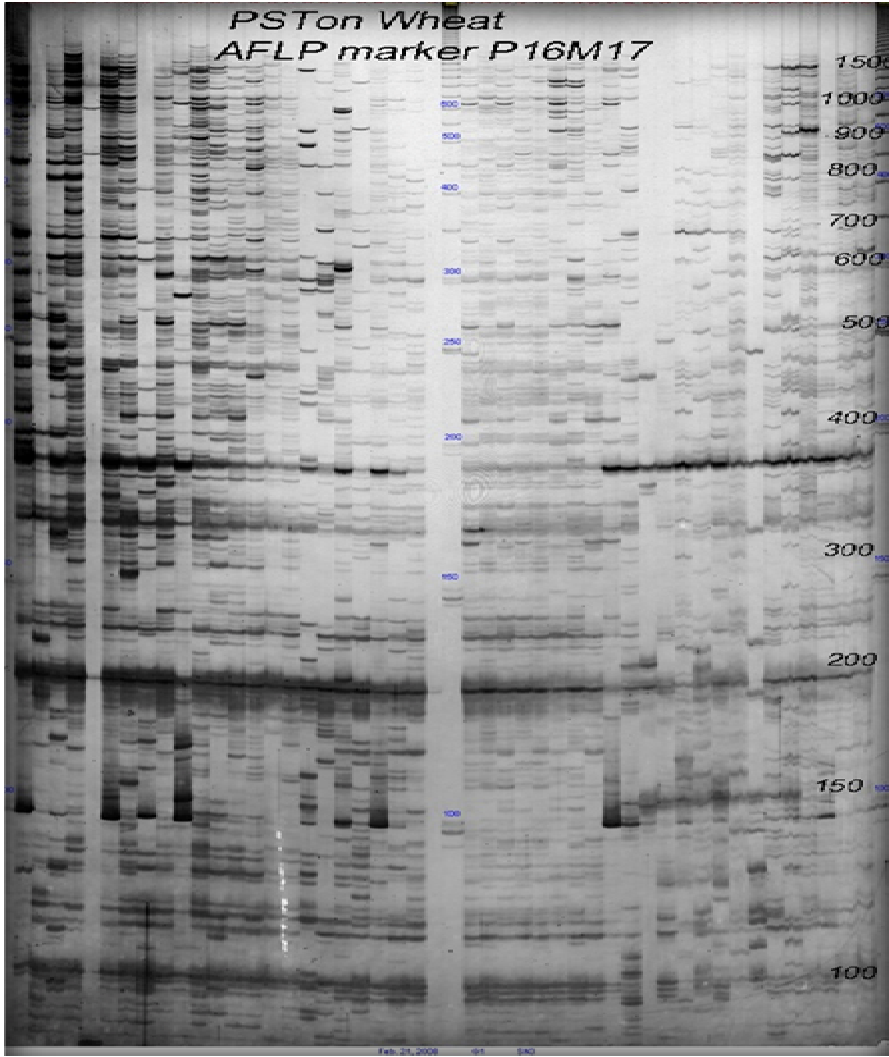
مصدر التباين	درجة الحرية	مجموع المربعات	مكونات التباين	نسبة التباين
بين المحافظات	10	507.602	50.760	%10
ضمن المحافظة الواحدة	85	2302.377	27.087	%90
المجموع	95	2809.979	77.847	



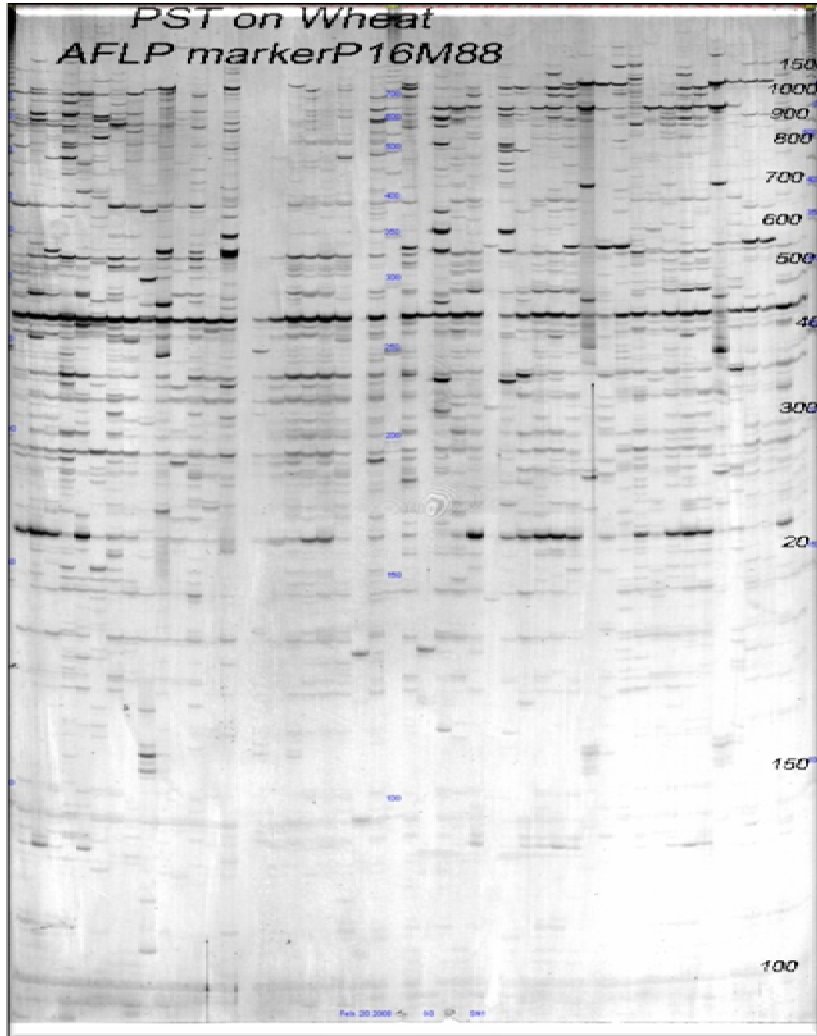
الشكل (1) شجرة القرابة الوراثية ( Dendrogram ) لسلاسل فطر الصدأ الأصفر على القمح (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) (حسب Liu K., and Muse S.V., 2005)



الشكل (2) نتائج التحليل التجميحي للقرابة الوراثية بين سلالات فطر الصدأ الأصفر على القمح خلال موسمي 2006 و 2007 (حسب Haer et al., 2001)



الشكل (3) حزم DNA المضخمة باختبار AFLP لعزلات الصدا الأصفى باستخدام المرئستين (Pst1+ CC, Mse1 +CC) P16+ M 17



الشكل (4) حزم DNA المضخمة باختبار AFLP لعزلات الصدأ الأصفر باستخدام المرئستين (Pst1+ CC, Mse1+ GC) P16+ M88



## REFERENCES المراجع

- خاروف، شعلة 2004. وبالية مرض الصدأ الأصفر *Puccinia striiformis* West. f. sp. *tritici* القمح في سورية والتفضيل المضيفي بين نوعيه القاسي والطري ومقارنة المقاومة بين مرحلتى البادرة والنبات البالغ. رسالة ماجستير، جامعة دمشق، سورية، 157 صفحة .
- Chen. X. M., 2005a. Epidemiology and control of yellow rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat. *Neth. J. P. Path.* 78 :258-264.
- Chen X. M., 2005b. Genetic Analysis and Molecular Mapping of wheat Genes Conferring Resistance to the yellow rust on wheat and Barley yellow rust Pathogens. *Theor. Appl. Genet.* (2005) 95:111–118.
- Chen X. M., R. F. Line, and Leung H., 1993. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathology* 83:1489-1497.
- Enjalbert J., X. Duan, M. Leconte, M. S. Hovmoller, and de Vallavieille. Pope. 2005. Genetic evidence of local adaptation of wheat yellow rust *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* within France. *Molecular Ecology* (2005)14: 16 – 20.
- Enjalbert J, X. Duan, T. Giraud, D. Vautrin, C. de Vallavieille-Pope and M. Solignac, (2002) Isolation of twelve microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Ecology Notes*, 2, 563–565.
- Flor H. H., 1959. Genetic control and host parasite interactions in rust diseases. In: Holton CS et al (eds) *Plant pathology, problems and progress 1908–1958*, University of Wisconsin Press, Madison, Wisc., 137–144.
- Gassner G., and W. Straib, 1932. Die bestimmung der biologischen rassen des weizengelbrostes (*Puccinia glumarum* f. sp. *tritici* (Schmidt.) Erikss. und Henn.), *Arb. Biol. Reichsanst. Land Forstw.*, 20, 141–163.
- Hammer M., D. A. T. Harper, and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Paleontological Electronic* 4 (1) : 9.
- Haer., Stam P., and P. Lindhout 2001 Use of locus - specific AFLP markers to construct a high density molecular map in barley. *Theor. Appl. Genet.* 96: 376 – 384.
- Hovmoller M. S., and A. F. Justesen, 2007. Appearance of atypical *Puccinia striiformis* West f. sp. *tritici* phenotypes in north- western Europe. *Australian Journal of Agricultural Research*58; 518- 524
- Hovmoller M. S., and A. F. Justesen, 2002. Molecular marker in wheat yellow rust: II. Long – distance spread of clones in Northwest Europe. meeting the challenge of yellow rust in cereal crops 179-180.
- Hovmoller M. S., and A. F. Justesen, 2001. Molecular Marker in Wheat Yellow Rust: I. Genetic Diversity and Discussion of Their Usefulness in Survey Studies. Meeting the challenge of yellow rust in cereal crops:2002 pp 175-176.
- Justesen A.F, C. J. Bayles, and M. S. Hovmoller, 2002. The recent history of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Denmark as revealed by disease incidence and AFLP markers. *Plant Pathology*, 51, 13–23.
- Keiper F.J., M. J. Hayden, R.F. Park, and C. R. Wellings, 2003. Molecular genetic variability of Australian isolates of five cereal rust pathogens. *Mycological Research*, 107, 545–556.

- Johnson, R., 1988. Durable resistance to yellow rust in wheat and its implications in plant breeding .In breeding strategies for resistance to rusts of wheat. Simmonds, N. W. and Rajaram, S. Eds., CIMMTY. 151: 63- 75
- Lessa E. P., 1990. Multidimensional analysis of geographic genetic structure. Systematic Zoology. 39 : 242- 252.
- Liu K., and S.V. Muse, 2005. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics 21: 2128–2129.
- Mamluk 1995a. Variation in virulence in isolates of *Mycosphaerella wheat – graminicola* from six wheat growing geographical regions. Physiopathology
- Mamluk O. F., M. Al-Ahmed, and M. A. Makki, 1990. Current status of wheat diseases in Syria. Phytopathol. Mediterr. 29:143-150.
- Mc Donald B. A., and J. P. Martinez. 1991. DNA fingerprinting of the plant pathogenic fungus (*My cosphaenella graminicola*) anamorphic *Septoria tritici*) Exp. Mycol. 15 : 146 – 158.
- McIntosh R. A., K. M. Devos. J. Dubcovsky. W. J. Rogers, and C.F.Morris, 2005. Appels R, Anderson OD (2005) Catalogue of gene symbols for wheat: 2005supplement.<http://www.shigen.lab.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/>
- Nei M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321–3323.
- Newton A. C., C. E. Caten, and R. Johnson, 1985. Variation for Isozyme and double- a stranded RNA among isolates of *Puccinia striiformis* and two other cereal rusts Plant Pathology. 34: 234-247.
- Powell W., W. T. B. Thomas. E. Buird, P. Lawrence, A. Booth, B. Harrower J. W. McNical, and R. Waugh, 1997. Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. Heredity 79:48– 59.
- Repally, F. 1979: Yellow rust epidemiology. Annul. Rev. Phytopathol. 17: 59- 73
- Steele K. A., E. Humphreys, C. R. Wellings, and M. J. Dickinson, 2001. Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* by use of molecular markers. Plant Pathology, 50, 174–180.
- Stubbs, R.W., J. M. Prescott, and E. E. Dubin, 1986: Cereal diseases methodology manual international maize and wheat important center (CIMMYT) in cooperation with research institute for plant protection (IPO) wageningen the Nether land: pp.46
- Stubbs R.W. 1985. Stripe rust. Pages 61-101 in: The Cereal Rusts. Vol II. A. P. Roelfs and W. R. Bushnell, eds. Academic Press, London
- Van’ T., K. A. E. Slot, and W. Knogge, 2002. A dual role for microbial pathogen-derived effectors proteins in plant disease and resistance. Crit. Rev. Plant Sci. 21:229-271.
- Zabeau M., and P. Vos. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European patent Application number: 9240269.7. Publication number 0: 534 – 858 AL.

Received	2011/02/13	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2011/06/15	قبول البحث للنشر