آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۲، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۳
Archive of SID

مقایسه تنوع ژنتیکی و بیماریزایی جدایه‌های *Fusarium culmorum* عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در منطقه ورامین*

بهنام پوزشی میاب[۱]✉، محمد رضوی[۲]، حمید رضا زمانی زاده[۱]، رسول زارع[۲] و سعید رضائی[۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیماری شناسی گیاهی، تهران، ایران؛ ۲- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، ایران
(تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۲؛ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۲)

چکیده

قارچ *Fusarium culmorum* یکی از عوامل اصلی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم می‌باشد. در این تحقیق تنوع ژنتیکی و اختلاف بیماریزایی ۴۹ جدایه *F. culmorum* که از طوقه و ریشه گندم مزارع سه بخش ورامین جمع آوری شده بود، با استفاده از هشت جفت آغازگر ریزماهواره‌ای تک ژنگاه انجام و شاخص چند شکلی ژنگاهی با داده‌های SSR محاسبه شد. آزمون قدرت تهاجمی روی رقم حساس گندم بولانی در شرایط گلخانه ای مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج آنالیز داده ها نشان داد که تمامی ژنگاه‌های ریز ماهواره‌ای دارای چند شکلی بوده و دارای ۲ تا ۶ آلل با میانگین ۳/۷۵ آلل برای هر ژنگاه بودند. تجزیه خوشه‌ای داده‌های SSR، ۴۹ ژنوتیپ مختلف را در پنج گروه تقسیم‌بندی کرد و شاخص چند شکلی ژنگاهی ۴۴ چندشکلی ژنگاه را در بین ۴۹ جدایه مشخص کرد. در کل سطح بالای تنوع ژنتیکی (۰/۵۲۸) در تمام جدایه‌های *F. culmorum* مشاهده شد و جدایه های بخش ورامین تشابه ژنتیکی کمتری نسبت به جدایه های بخش های جوادآباد و پیشوا داشتند. تفاوت بیماریزایی بین جدایه ها معنی‌دار و جدایه‌های بخش ورامین از لحاظ بیماریزایی نسبت به جدایه‌های دو بخش دیگر از قدرت بیماریزایی بیشتری برخوردار بودند. ارتباط معنی‌داری بین تنوع ژنتیکی و شدت بیماریزایی جدایه‌ها مشاهده نگردید. تمایز تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌های بخش ورامین از دیگر بخش‌های شهرستان ورامین، احتمال وقوع ژنوتیپ‌های جدید با بیماریزایی بیشتر را در این بخش تقویت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ژنتیک جمعیت، واریانس مولکولی، هاپلوتیپ.

Comparison of genetic diversity and pathogenicity among *Fusarium culmorum* isolates, the causal agent of wheat root and crown rot disease in Varamin fields

B. POUZESHIMIAB[1]✉, M. RAZAVI[2], H. R. ZAMANIZADEH[1], R. ZARE[2] and S. REZAEE[1]

1- Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; **2-** Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

Abstract

Fusarium culmorum, is one of the most important causal agents of crown rot of wheat in Iran. Simple sequence repeats or microsatellite (SSR) and virulence assays were used to investigate genetic variability among 49 isolates of *F. culmorum* collected from wheat fields in three districts of Varamin. Eight pairs of single-locus microsatellite markers were used to analyze the genomic DNA of isolates. The result of analysis showed that all loci were polymorphic and the numbers of alleles ranged between two to six with an average of 3.75 per locus. Cluster analysis of SSR data revealed that 49 isolates clustered into five distinct groups. The index of multilocus association was calculated using SSR data and 44 multilocus haplotypes were detected among 49 isolates. The results of this study indicated that a there was a high level of genetic diversity (0.528) among the isolates examined, and genetic similarity among Varamin isolates was less than those obtained from Pishva and Javad-abad regions. In addition, pathogenicity of the isolates was tested on a bread wheat cv. Bolani under greenhouse conditions. A significant difference for pathogenicity was found among the isolates. Comparison of the means showed that the isolates of Varamin districts were more pathogenic than Javad-abad and Pishva districts. The significant difference in the genetic diversity and pathogenicity of the Varamin's isolates in comparison to the other districts suggests that there is a potential for the occurrence of new genotypes with greater virulence in this district. The statistically no correlation was observed between molecular variation and pathogenicity.
Key words: : Molecular variance, Haplotypes, Population genetics.

---

*بخشی از رساله‌ی دکترای تخصصی نگارنده اول

✉ **Corresponding author: Pouzeshi2@gmail.com**

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

قارچ *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. بیمارگری خاکزاد با پراکنش جهانی است که می‌تواند عامل پوسیدگی طوقه و ریشه و همچنین بلایت سنبله (head blight) در غلات دانه ریز مخصوصاً گندم و جو باشد (Scherm *et al.* 2013). قارچ *F. culmorum* توکسین‌های تریکوتسین و زرالنون را تولید می‌کند که همراه با مایکوتوکسین‌های دیگر، در آمریکای شمالی و اروپا شیوع دارد (Desjardins, 2006). *F. culmorum* بیشتر در مناطق معتدل و سرد اروپا و استان‌های فلاتی کانادا اهمیت دارد (Leslie and Summerell, 2006). در منطقه Pacific North-West آمریکا در گندم زمستانه تجاری، ۳۵ درصد کاهش عملکرد ناشی از پوسیدگی طوقه گزارش شده است (Smiley *et al.* 2005b).

پوسیدگی طوقه و ریشه گندم از مناطق مختلف کشت گندم در ایران گزارش شده است و زیان اقتصادی قابل توجهی را در اغلب مناطق کشت گندم ایران از جمله استان‌های گلستان، آذربایجان شرقی، اردبیل، تهران و زنجان (Saremi *et al.* 2007; Pouzeshimiab *et al.* 2012) کرمانشاه، لرستان (Safaee *et al.* 2012) و فارس (Ravanlou and Banihashemi, 1999) داشته است. تنوع فنوتیپی بالایی از نظر شکل پرگنه، تولید رنگدانه و تولید اسپور در بین جدایه‌های *F. culmorum* گزارش شده است (Puhalla, 1981). همچنین تنوع زیادی از نظر قدرت تهاجمی، نوع و مقدار تولید مایکوتوکسین‌ها نیز بین جدایه‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی بوده است (Akinsanmi *et al.* 2006).

با وجود اهمیت قابل توجه این قارچ هم از لحاظ بیماری شناسی و هم توکسین شناسی، اطلاعات مناسب و کافی در خصوص ساختار جمعیتی و تنوع ژنتیکی آن در سطح مولکولی وجود ندارد. برای تخمین تنوع ژنتیکی ۱۸ جدایه جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور هلند، از مارکر random amplified polymorphic (RAPD) ، استفاده شده است (Nijs *et al.* 1997). در بررسی اخیر تنها دو ژنوتیپ در بین جدایه‌ها شناسایی شد. جهت آنالیز جمعیت این قارچ، مکان‌های ژنی 28S, nrDNA, IGS, تکثیر و RFLP شد و تنوع بالایی (۴۷/۷٪) در داخل جمعیت‌های جهانی *F. culmorum* پیدا شد (Miedaner *et al.* 2001) . از مارکر ISSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۷۵ جدایه *F. culmorum* استفاده شده که ۵۹ ژنوتیپ مختلف قارچ را داخل هفت شاخه (کلاد) گروه‌بندی کردند (Mishra *et al.* 2003). با استفاده از آنالیز PCR Rep-(Repetitive element palindromic PCR)، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی (۵۲/۳٪) در بین ۱۴ جدایه *F. culmorum* جمع آوری شده از مناطق مختلف ترکیه، حاصل شده است (Gürel *et al.* 2010). هشت نشانگر ریز ماهواره‌ای برای *F. culmorum* طراحی شده و با استفاده از آنها تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های جدایه‌های *Fusarium graminearum* و *F. culmorum* جمع آوری شده از مناطق مختلف فرانسه بررسی شده است (Giraud *et al.* 2002) بررسی‌های متعددی در زمینه قدرت بیماری‌زایی بین گونه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گندم انجام شده است. بیماری‌زایی ۲۴ جدایه *Fusarium pseudograminearum*، *F. culmorum* و *Bipolaris sorokiniana* در گندم توسط Smiley *et al.* (2005a) در شرایط مزرعه ارزیابی شد و تفاوت معنی داری از لحاظ بیماری‌زایی در هر سه گونه مشاهده شد، ولی بیماریزایی *F. pseudograminearum* بیشتر بود. بیماریزایی پنج جدایه از گونه‌های *F. pseudograminearum*، *F. culmorum* و *F. graminearum* روی دو رقم گندم بهاره و دو رقم گندم دوروم توسط Dyer *et al.* (2009) در مدت دو سال در مزرعه بررسی شد. که از نظر بیماریزایی تفاوت معنی‌داری بین گونه‌ها مشاهده شد و جدایه‌های *F. pseudograminearum* بیشترین مقدار پوسیدگی طوقه را نشان دادند.

در مورد بیماریزایی جدایه‌های *F. culmorum* اطلاعات کمی وجود دارد. بیماریزایی ۷۵ جدایه *F. culmorum* جمع آوری شده از مناطق مختلف دنیا مقایسه شده که از نظر شدت بیماریزایی اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌های مناطق مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده شده است (Mishra *et al.* 2003). بین جدایه‌های *F. culmorum* منطقه ورامین نیز مقایسه بیماریزایی شده است (Pouzeshimiab *et al.* 2012).

هدف از این بررسی تعیین میزان تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های *F. culmorum* جمع آوری شده از مزارع گندم سه بخش ورامین، شناسایی هاپلوتیپ غالب چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی در داخل و بین جمعیت‌ها بود که به این منظور از مارکرهای SSR، طراحی شده Giraud *et al.* (2002) استفاده شد. هدف از مقایسه بیماریزایی جدایه‌ها، شناسایی جدایه‌هایی با قدرت تهاجمی بالا بود که در تحقیقات آتی بتوان از آنها در جهت شناسایی منابع مقاومت به بیماری پوسیدگی ناشی از *F. culmorum* در منطقه ورامین استفاده نمود.

روش بررسی

نمونه‌برداری: این بررسی در طول فصل زارعی ۹۱-۱۳۹۰ در سه بخش مرکزی (ورامین)، جواد آباد و پیشوا شهرستان ورامین انجام شد. مزارع گندم در مرحله رسیدن گندم به صورت تصادفی به فاصله تقریباً ۱۵ کیلومتری از هم انتخاب شدند. در هر مزرعه به صورت زیگزاگ، از پنج نقطه به فاصله ۱۰۰ متر از همدیگر، نمونه برداری گردید. در هر نقطه، گیاهانی که علایم سفید شدن سنبله را نشان می دادند، جمع آوری و به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی، بخش تحقیقات بیماری های گیاهی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور منتقل و در آزمایشگاه، یک بخش از بافت آلوده طوقه و زیر طوقه جدا و تا زمان جداسازی قارچ، در پاکت‌های کاغذی، در چهار درجه سلسیوس نگهداری شد.

شناسایی مرفولوژیکی گونه های *Fusarium*: نمونه‌های جمع آوری شده زیر آب شیر شستشو شده و سپس دو قطعه از بافت آلوده طوقه و ریشه جدا شد. این قطعات در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سپس دو بار با آب مقطر سترون آبشویی و روی کاغذ صافی سترون خشک شدند. قطعات روی محیط کشت‌های PDA (Potato Dextrose Agar) و PPA (Peptone PCNB Agar) کشت و در ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی به مدت ۷-۵ روز نگهداری گردیدند. برای خالص سازی گونه های قارچی به دست آمده، همه جدایه ها تک اسپور شده و دوباره روی PDA، SNA (Synthetic Nutrient-poor Agar) و CLA (Carnation-leaf Agar) کشت شدند (Leslie and Summerell, 2006). محیط کشت‌های PDA در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و محیط کشت‌های CLA و SNA در ۲۵ درجه سلسیوس زیر نور نزدیک فرابنفش به مدت ۴-۱ هفته نگهداری شدند. مرفولوژی و رنگ پرگنه هر جدایه از روی محیط کشت PDA یادداشت گردید. ویژگی‌های مورفولوژی هر یک از جدایه‌ها همچون اندازه ماکروکنیدیوم‌ها، میکروکنیدیوم‌ها، یاخته‌های کنیدی زا و کلامیدوسپورها با استفاده از کشت‌های رشد یافته در CLA و SNA بررسی شد. گونه‌های فوزاریوم بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیکی توصیف شده Leslie and Summerell (2006) شناسایی شدند. برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌ها از روش به کار رفته توسط Scott and Chakraborty (2010) استفاده گردید. ۴۹ جدایه *F. culmorum* که بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیک تشخیص داده شده بودند، برای مطالعات تنوع ژنتیکی و بیماریزایی انتخاب گردیدند.

استخراج DNA و شناسایی مولکولی جدایه‌ها: DNA جدایه‌ها با استفاده از روش Möller *et al.* (1992) استخراج و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. تأیید مولکولی جدایه‌های *F. culmorum* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی *F. culmorum*، Fc OIR/ Fc OIR (Nicholson *et al.* 1998) انجام شد. غلظت‌های محلول واکنش و چرخه حرارتی PCR نیز مطابق توصیف Akinsanmi *et al.* (2004) انجام گرفت.

واکنش زنجیره پلی‌مراز: ۴۹ جدایه *F. culmorum* بدست آمده از مناطق مختلف جغرافیایی شهرستان ورامین با استفاده از هشت مارکر SSR (جدول ۱) تعیین ژنوتیپ شدند

www.SID.ir

Archive of SID

(Giraud *et al.* 2002). غلظت‌های محلول واکنش و چرخه حرارتی PCR نیز مطابق روش Giraud *et al.* (2002) انجام گرفت. دمای جفت شدن بسته به نوع آغازگرها انتخاب شد (جدول ۱). الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده همراه با ۵ میکرولیتر نشانگر استاندارد DNA فاژ لامبدا (100bp Ladder Plus) روی ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد به مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۲۰۰ ولت انجام شد. جهت مشاهده قطعات DNA در ژل، رنگ آمیزی نیترات نقره با روش کمی تغییر یافته An *et al.* (2010) انجام گردید. اندازه قطعات تکثیر یافته توسط هر جفت آغازگر با استفاده از برنامه GEL v2/17/89 (Thompson, 1989) محاسبه شد. قطعات با وزن مولکولی مختلف به عنوان آلل های مختلف برای هر ژنگاه در نظر گرفته شدند. برای جدایه‌هایی که هیچ فرآورده‌ای تولید نکردند، آلل نول (null) منظور شد (شکل ۲).

آنالیز تنوع ژنتیکی: قطعات تکثیر یافته به صورت دستی نمره دهی شد (۱) برای وجود باند و (۰) برای عدم وجود آن، و ماتریکس دو تایی ایجاد و برای آنالیز استفاده گردید. قطعات با وزن مولکولی یکسان به عنوان یک ژنگاه در نظر گرفته شد و داده‌ها برای آنالیز آماری ترکیب شدند. برای تعیین تعداد ژنوتیپ‌ها با ژنگاه‌های جداگانه (Multi Locus Genotypes) از نرم افزار GENCLONE v2.0 استفاده گردید (Arnaud-Haond and Belkhir, 2007). تعداد آلل‌های مختلف هر ژنگاه داخل هر مکان و داخل کل جمعیت‌ها محاسبه شد. تنوع ژنی جمعیت با استفاده از فرمول Nei (1973) تخمین زده شد.

$$h = 1 - \sum_{i}^{n} Pi^2$$

در تخمین ژنی هر ژنگاه، صفرها (بدون باند) هم برای همان آلل در نظر گرفته شد. تنوع ژنی جزء به جزء جمعیت‌ها هم (Nei, 1987) با استفاده از نرم افزار POPGENE v1.31 انجام شد (Yeh *et al.* 2000). در POPGENE ضریب تأثیر اختلاف ژنی (Gst)، میانگین هتروزیگوتی داخل جمعیت (Hs)، هتروزیگوتی قابل انتظار کل (Ht) و تخمین جریان ژنی (Nm) محاسبه گردید.

تجزیه تحلیل واریانس مولکولی (Analysis of Molecular Variance): به منظور ارزیابی میزان اختلاف جمعیت‌ها، آنالیز واریانس مولکولی، با استفاده از نرم افزار Peakall GenAlEx and Smouse (2012) انجام شد. میزان اختلاف بین جمعیت‌ها و تنوع ژنتیکی داخل و بین جمعیت‌ها با استفاده از GenAlEx تعیین کیفی شد. ارزش Φ_{PT} (analogue of FST fixation index) برای تنوع ژنتیکی و درصد چند شکلی ژنگاه‌ها (P %) برای هر جمعیت با استفاده از GenALEx محاسبه شد. جریان ژنی نسبی بین جمعیت‌ها به وسیله Nm آماری $N_m = [(1/\Phi_{PT}) - 1]/ 2$، در نرم افزار POPGEN تخمین زده شد. به علاوه، تشابه ژنتیکی و فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار POPGEN، محاسبه شد.

قرابت ژنتیکی جدایه‌ها: ماتریس همانندی از (۰،۱) ایجاد گردید و این اطلاعات در ضریب Nei and Li (1979) استفاده شد و دندروگرام با روش UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages) با استفاده از نرم افزار NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 2000) بازسازی شد.

مقایسه بیماری‌زایی: آزمایش در شرایط گلخانه‌ای بر اساس طرح کاملاً تصادفی با داده‌های چند مشاهده‌ای با سه تکرار و چهار مشاهده در هر واحد آزمایشی صورت گرفت. تمام جدایه‌های *F. culmorum* بدست آمده از سه بخش شهرستان ورامین برای مقایسه قدرت بیماری‌زایی آنها، مورد آزمایش قرار گرفتند. ابتدا جدایه‌ها در محیط SNA حاوی سه تکه کاغذ واتمن به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر، کشت و در ۲۵ درجه سلسیوس و زیر نور نزدیک فرابنفش به مدت دو هفته نگهداری شدند. اسپوردوکیوم‌های تولید شده در اطراف این کاغذها را برداشته و سوسپانسیونی از این اسپورها با آب مقطر سترون تهیه شد. تعداد اسپور در واحد حجم با لام هموسیتومتر شمارش شد و نهایتاً تعداد 10^7 کنیدیوم در میلی‌لیتر از این سوسپانسیون برای هر جدایه تهیه شد. هنگام

www.SID.ir

Archive of SID

آغشته کردن بذور، غلظت ۰/۱ درصد توئین۲۰، به این سوسپانسیون اضافه شد. بذور گندم رقم بولانی برای این آزمایش انتخاب شد و در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و سه بار با آب مقطر سترون، آب شویی شد. چهار بذر گندم در داخل پتری به سوسپانسیون کنیدیوم هر جدایه اضافه شد و بعد از ۲-۱ دقیقه در داخل گلدان به قطر ۲ سانتی‌مترحاوی خاک پاستوریزه، کشت و به مدت پنج هفته در گلخانه با شرایط دمایی ۲± ۲۲ درجه سلسیوس و نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری گردیدند. برای مقایسه قدرت تهاجمی جدایه‌ها ابتدا بر اساس میزان تغییر رنگ ساقه از طوقه تا اولین گره و با استناد به مقیاس ارائه شده توسط Gargouri-Kammoun *et al.* (2009) ارزیابی شدند. برای تعیین وزن خشک بوته ها به دو بخش ریشه و اندام هوایی تقسیم و در آون ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد، سپس توزین نمونه‌ها با ترازوی Sartorius مدل GC-16035-OCE با دقت ۰/۰۰۰۱ انجام گرفت. تجزیه داده‌های حاصل از سه فاکتور اندازه گیری، وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه و شدت بیماری در نرم افزار SPSS v.20 انجام گردید.

نتیجه و بحث

شناسایی مولکولی جدایه‌ها: پس از انجام الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵درصد باندهایی به وزن ۵۷۰ جفت باز(bp) مربوط به *F. culmorum* تشکیل گردید، که با نتایج بدست آمده توسط Akinsanmi *et al.* (2004) همخوانی داشت (شکل ۱). نتایج حاصله تأییدی بر شناسایی مرفولوژیکی تمام جدایه‌های *F. culmorum* بود.

آنالیز تنوع ژنوتیپی: از مجموع ۱۷۶ جدایه قارچی به دست آمده از شهرستان ورامین، ۷۵ جدایه با استفاده از ویژگی‌های مرفولوژیکی و مولکولی به عنوان *F. culmorum* شناسایی شد. از تعداد ۷۵ جدایه *F. culmorum*، ۴۹ جدایه که نماینده‌های مکان‌های مختلف کشت گندم در شهرستان ورامین (بخش‌های مرکزی، جواد آباد و پیشوا هرکدام به ترتیب با ۱۲، ۱۹ و ۱۸ جدایه) برای بررسی تنوع ژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۲).

تعداد آلل‌های تکثیر شده هر ژنگاه بین ۲ (F7) تا ۶ (F10) آلل و میانگین آن‌ها ۳/۷۵ آلل بود و اندازه قطعات بین (bp) ۳۶۰-۱۰۵ بود (جدول ۱). در کل ۳۰ آلل در بین هشت ژنگاه آنالیز شده SSR شناسایی شد. درصد چند شکلی ژنگاه در بین جمعیت‌های تمام بخش‌های شهرستان ورامین ۱۰۰ درصد بود (جدول ۲). بین ۴۹ جدایه، ۴۴ ژنوتیپ چند ژنگاه مختلف مشخص شد (MLG) که از این تعداد ۱۷، ۱۷ و ۱۰ ژنوتیپ به ترتیب به بخش‌های پیشوا، جواد آباد و ورامین متعلق بودند. در جمعیت‌های بخش پیشوا دو جدایه (P11 با V11) متعلق به هاپلوتیپ مشابه بودند و در بخش‌های جواد آباد و ورامین جفت جدایه‌های J18 با J3، J15 با V4، V9 با V3 و V1 با J19 متعلق به هاپلوتیپ‌های مشابه بودند (جدول ۲). بیشترین تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص شانون و تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های جواد آباد و کمترین آن در بین جدایه‌های پیشوا مشاهده شد. میانگین تنوع جمعیتی (۰/۵۲۸) و شاخص شانون (۰/۹۲۴) برای کل جمعیت‌ها بالا بود (جدول ۲). تنوع ژنی در یکایک جمعیت‌ها مشخص شد و بیشترین هترزیگوتی کل (Ht) در ژنگاه F10 و کمترین آن در ژنگاه F9 مشاهده گردید. میانگین تنوع ژنی در بین کل جمعیت‌ها (Ht) ۰/۵۶۴۱ بود که مقدار ۰/۵۲۸۱ آن داخل جمعیت‌های بخش‌ها (Hs) اتفاق افتاده بود (جدول ۳).

آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که ۹۷ درصد تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها و ۳ درصد تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های بخش‌ها توزیع شده بود (جدول ۴) و ارزش Φ_{PT} (P= ۰/۲۱۹، Φ_{PT}= ۰/۰۲۱) برای تنوع ژنتیکی، معنی‌دار بود. به عبارتی تفاوت معنی‌داری از لحاظ ژنتیکی در داخل جمعیت‌های سه بخش وجود داشت (جدول ۴).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای استفاده شده در هشت ژنگاه ریز ماهواره‌ای برای ۴۹ جدایه *Fusarium culmorum* در شهرستان ورامین

Table 1. Primer information of eight microsatellite loci among the 49 isolates of *Fusarium culmorum* in Varamin

آغازگر **Primer**	واحد تکرار شونده **Repeat motif**	توالی آغازگر (۵′–۳′) **Primer sequences (5′–3′)**	اندازه باند **Size (bp)**	دمای اتصال **Annealing temp.(°C)**	تعداد آلل **Number of alleles**
F1	(TG)8	GAC AAG CAA GCG ATA GGA AA CTT GAT AGC ACG GAC CGA CG	175-200	51	3
F3	(CA)11	CAT ATT CAA CCG ACC CAC AA TTG AAT GAT AAG GGC GAC GG	190-210	53	4
F4	(GT)11	CTT TTT CCC GGC TCC ATT TT GCT TTC CCT GCT CGA TCG GG	110-145	53	4
F6	(AC)15	TAT TTC GTG CAA GGA CTT GG CTT GGT CCC TGG ATA TCG AA	105-140	51	4
F7	(GT)7	TGA CAA GCA AGC GAT AGG AA GAG TGG AGT TTC GAT ATC GC	215-245	52	2
F9	(AC)13	CGA GCT AAT GGT GGC AGG AT AAC ACC AAA ACG GCT CAT CG	150-210	50	3
F10	(AAG)28	AAG CGC CAA CAG AGA TGA CGA GAC TGC CGA AAC ACC GAA A	110-205	55	6
F11	(GT)9	CAG TCT TGG TCG CTC ATC AG CAG GTT GGC ACG CTT CTT AA	280-360	52	4

جدول ۲- تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مزارع در سه بخش از شهرستان ورامین شامل: تعداد ژنوتیپ‌های چند ژنگاه، چند شکلی جدایه‌ها، میانگین و SE کل ژنگاه‌ها برای هر یک از جمعیت‌ها و میانگین و SE کل ژنگاه‌ها و جمعیت‌ها

Table 2. Genetic diversity of field populations of *Fusarium culmorum* in three parts of Varamin including: MLG, polymorphic loci, Mean and SE over loci for each population and Grand Mean and SE over Loci and populations

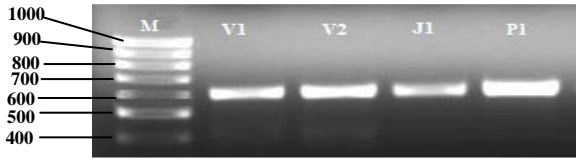
Pop	**N**	**MLG**	**P %**		**Na**	**Ne**	**I**	**h**	**Uh**
Pishva	18	17	100	Mean	3.250	2.222	0.868	0.495	0.525
				SE	0.491	0.271	0.139	0.068	0.072
Javad-abad	19	17	100	Mean	3.500	2.613	1.009	0.574	0.606
				SE	0.327	0.369	0.114	0.048	0.051
Varamin	12	10	100	Mean	3.125	2.381	0.893	0.515	0.563
				SE	0.479	0.345	0.143	0.068	0.074
Total	49	44	100	Mean	3.292	2.405	0.924	0.528	0.565
St. Dev					0.244	0.186	.074	.035	.037

N: تعداد جدایه ها؛ MLG: تعداد ژنوتیپ های چند ژنگاه قابل تشخیص؛ P%: درصد چند شکلی ژنگاه‌ها؛ Na: تعدادآلل‌ها؛ Ne: تعداد آلل مؤثر (Ne = 1 /(∑ Pi²))؛ I: ضریب شاخص شانون [I= -1* ∑ (pi * Ln (pi))]؛ h: تنوع ژنتیکی (= 1 − ∑ Pi²)، که pi فراوانی i امین آلل برای جمعیت و ∑ Pi² جمع مربع فراوانی آللی جمعیت است، Uh: تنوع نااریب= h * (N / (N-1)) .

N: Number of isolates, Number of distinct multilocus genotypes (MLG) detected, P%: Percentage of polymorphic loci Na: Number. of different alleles, Ne: Number of effective alleles = 1/ ∑ Pi²), I: Shannon's information index = -1* ∑(pi * Ln (pi)), h: Diversity = 1 - ∑ Pi² , Where pi is the frequency of the allele for the population and ∑ Pi² is the sum of the squared population allele frequencies. Uh: Unbiased Diversity = (N / (N-1)) * h.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- الگوی باندی تکثیر شده برای جدایه‌های *Fusarium culmorum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه. M نشانگر bp ۱۰۰ به عنوان نردبان ژنومی، V، J و P به ترتیب مربوط به جدایه‌های ورامین، جواد آباد و پیشوا

Fig. 1. Identity of putative *Fusarium culmorum* isolates by PCR amplification with the *F. culmorum* specific primer pairs. V, J and p: Varamin, Javad-abad and Pishva respectively; M, 100-bp Ladder as the DNA size marker

جدول ۳- آنالیز تنوع ژنی Nei در یکایک جمعیت‌ها

Table 3. Nei's analysis of gene diversity in subdivided populations

Locus	Sample Size	Ht	Hs	Gst	Nm*
F1	49	0.5329	0.5119	0.0394	12.1922
F 3	46	0.5582	0.5353	0.0410	11.6808
F 4	48	0.5768	0.4927	0.1458	2.9298
F 6	47	0.5549	0.4790	0.1369	3.1536
F7	49	0.4999	0.4691	0.0616	7.6195
F 9	48	0.3287	0.3198	0.0269	18.0771
F 10	48	0.7791	0.7541	0.032	15.0616
F 11	49	0.6826	0.6627	0.0292	16.6284
Mean	48	0.5641	0.5281	0.0639	7.3210
St. Dev		0.0173	0.0171		

Ht: هتروزیگوتی کل قابل انتظار؛ Hs: میانگین هتروزیگوتی داخل جمعیت؛ Gst: G-statistics (G_{st} =HT- HS/HT)، Nm: تخمین جریان ژنی از طریق Gst، به عنوان مثال (Nm= 0.5(1 - Gst)/Gst).

HT: Total expected heterozygosity; Hs: Average within population heterozygosity; Gst: G-statistics= H_T- H_S/H_T; Nm = estimate of gene flow from Gst. E.g., Nm = 0.5(1 - Gst)/Gst.

فاصله و تشابه ژنتیکی جدایه‌ها: نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که جدایه‌ها در پنج گروه اصلی قرار داشتند. گروه‌های A تا E به ترتیب دارای ۱۳، ۱۶، ۹، ۶ و ۵ جدایه بودند (شکل ۳) و جدایه‌های هر بخش در هر پنج گروه قرار داشتند. گروه B با ۱۶ جدایه بیشترین تعداد را داشت، که از این تعداد ۸ جدایه متعلق به پیشوا، ۵ جدایه متعلق به جواد آباد و ۳ جدایه متعلق به ورامین بود. خوشه بندی جدایه‌ها بر اساس اطلاعات SSR یک الگوی تنوع ژنتیکی را نشان داد ولی به مقدار کمی به مناطق جغرافیایی جدایه‌ها مربوط بود.

ارزیابی اولیه Nei از تشابه ژنتیکی و فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) نشان داد که بیشترین تشابه ژنتیکی بین جدایه‌های پیشوا و جواد آباد بود (۰/۹۳۶۱) و بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۶۴۷) را جمعیت‌های جوادآباد و ورامین داشتند (جدول ۵).

جدول ۴- آنالیز واریانس مولکولی جدایه‌های *Fusarium culmorum* گندم ورامین

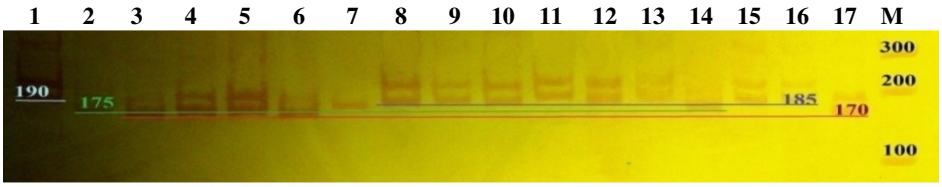
Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Fusarium culmorum* isolates of Varamin

Source	Df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	2	6.430	3.215	0.065	3%
Within Pops	46	104.105	2.263	2.263	97%
Total	48	110.535		2.328	100%
Stat	Value	P(rand >= data)			
Φ_{PT}	0.021	0.219			

راهنما: ΦPT = AP / (WP + AP) = AP / TOT

AP = Est. Var. Among Pops، WP = Est. Var. Within Pops، احتمال شاخص ثابت، که به طور معنی‌داری بیشتر از صفر می‌شود.

Φ_{PT} = AP / (WP + AP) = AP / TOT, Key: AP = Est. Var. Among Pops, WP = Est. Var. Within Pops probability of the fixative index, being significantly greater than 0.



شکل ۲- نمایش چند شکلی DNA در بین ۱۷ جدایه *Fusarium culmorum* که توسط جفت آغازگر F10 ریزماهواره تکثیر شده است. چاهک‌های شماره ۱-۶ از پیشوا؛ ۷-۱۲ از جواد آباد؛ ۱۳-۱۷ از ورامین؛ M نشانگر bp ۱۰۰ بعنوان نردبان ژنومی

Fig. 2. Representative DNA polymorphism among 17 isolates of *Fusarium culmorum* detected by microsatellite primer pair F10. Lanes: isolates 1-6 of Pishva; 7-12 of Javad-abad; 13-17 of Varamin; M, 100-bp Ladder as the DNA size marker

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- برآورد اصلی Nei از تشابه ژنتیکی (اعداد بالای ستاره‌ها) و فاصله ژنتیکی (اعداد پایین ستاره‌ها) جدایه‌های *Fusarium culmorum* در سه بخش شهرستان ورامین

Table 5. Nei's original measures of genetic identity (above diagonal) and genetic distance *Fusarium culmorum* isolates in three district of Varamin (below diagonal)

Pop.ID	Pishva	Javad-abad	Varamin
Pishva	****	0.9361	0.8769
Javad-abad	0.0661	****	0.8481
Varamin	0.1314	0.1647	****

ارزیابی بیماریزایی جدایه‌ها: تجزیه واریانس بیماریزایی تمام جدایه‌های هر سه بخش شهرستان ورامین در مورد فاکتورهای رشدی گیاه (وزن خشک ریشه و ساقه و شدت بیماری) معنی دار بودن هر سه فاکتور را در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد (جدول ۶). مقایسه بیماریزایی در بین جدایه‌های بخش‌های مختلف نشان داد که در هر سه فاکتور، صفات مورد اندازه‌گیری اکثر جدایه‌های مربوط به ورامین بیماریزایی بالاتری داشتند. به طوریکه در بین جدایه‌های این بخش‌ها، اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۷).

مقایسه میانگین‌های بیماری‌زایی بر اساس آزمون دانکن (Duncan's test) در سطح احتمال ۵ درصد، در سه فاکتور مورد آزمون در کلیه جدایه‌ها نشان داد که جدایه‌های J14، J15 و J16 از بخش جواد آباد، جدایه‌های P1، P3 و P9 از بخش پیشوا و جدایه‌های V2 و V5 از بخش ورامین بیماریزایی بالاتری دارند (جدول ۷).

نتایج تجزیه خوشه‌بندی بر اساس بیماری‌زایی پنج گروه نشان داد که گروه B با ۲۹ جدایه بیشترین و گروه D با ۲ جدایه کمترین تعداد را داشت. یک الگوی تنوع بیماریزایی در این خوشه‌بندی مشاهده گردید، ولی همانند گروه بندی مولکولی کمتر به مناطق جغرافیایی مربوط بود (شکل ۴).

در این بررسی هشت مارکر تک ژنگاهی ریز ماهواره‌ای برای مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *F. culmorum* جمع آوری شده از سه بخش شهرستان ورامین مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح بالایی از تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها (۰/۵۲۸) بود و اینکه همه هشت ژنگاه در بین ٤٩ جدایه دارای چند شکلی بودند (جدول ۲). این سطح بالای تنوع ژنتیکی مشابه مطالعات Gürel *et al.* (2010) بود که در بین ١٤ جدایه *F. culmorum* که از مناطق مختلف ترکیه جمع آوری شده بود، تنوع ژنتکی بالایی را پیدا کردند.

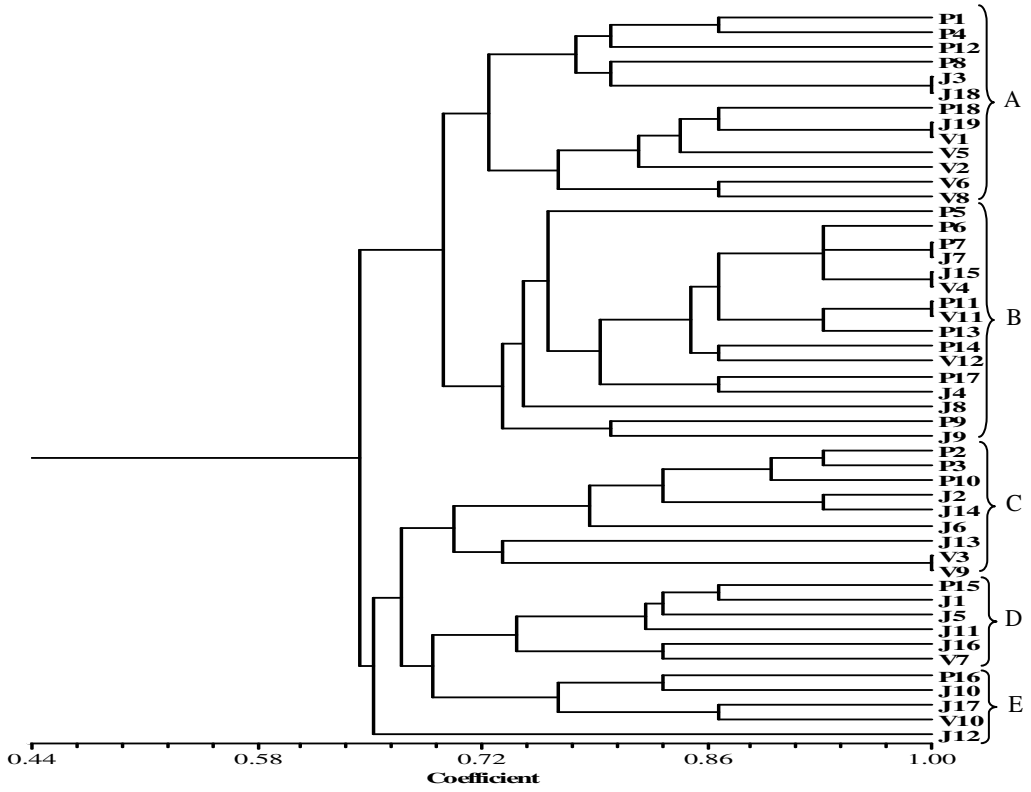
در این مطالعه چند شکلی آلل برای هشت ژنگاه، بین ۲-۶ آلل برای هر ژنگاه بود (جدول ۱). این چند شکلی تقریباً با تحقیق Giraud *et al.* (2002) همسان بود که چند شکلی را در هشت ژنگاه ریز ماهواره با تعداد ۲-۶ آلل برای هر ژنگاه گزارش کردند. از آنجایی که میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریزماهواره، مناسب بودن هر ژنگاه را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (Röder *et al*. 1998)، بنابراین، آغازگرهایی با تعداد آلل بیشتر برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب‌تر می‌باشند.

بیشترین تعداد آلل در ژنگاه F10 با ۶ آلل یافت شد (جدول۱)، که با تحقیق Giraud *et al.* (2002) که ۹ آلل را در این ژنگاه پیدا کردند، تقریباً همخوانی داشت. این ژنگاه که بیشترین (۰/۷۷۹۱، جدول۳) تنوع ژنوتیپی را در بین نشانگرها نشان داد به علت بالا بودن آلل ها و پایین بودن فراوانی آلل قابلیت تفکیک بهتری دارد. چند شکلی تعدادی از آلل ها در ژنگاه F4 و F6 به علت یک یا دو نوکلئوتید بود. bp ۱-۲ اختلاف بین آللی ممکن است به دلیل داخل شدن یا حذف نوکلئوتید در طول نسخه برداری از DNA صورت بگیرد (Razavi and Hughes, 2004). در این مطالعه، بعضی از آغازگرها در بعضی از جدایه‌های *F. culmorum* هیچ محصولی نداشتند. در بعضی موارد جهش در مکان‌های اتصال آغازگر، باعث عدم تکثیر قطعات DNA می‌گردد (Owen *et al.* 1998).

آنالیز واریانس مولکولی جدایه‌ها نشان داد که ۹۷ درصد تنوع در داخل جمعیت‌ها بوده و تنها ۳ درصد در بین جمعیت‌ها توزیع شده بود (جدول ۴).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- گروه بندی ۴۹ جدایه *F. culmorum* بر اساس داده‌های ریز ماهواره با روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه Nei and Li

Fig. 3. UPGMA analysis of isolates of 49 *F. culmorum* isolates based on combined SSR data by UPGMA and using Nei and Li's similarity coefficient

جدول ۶- آنالیز واریانس (ANOVA) شدت بیماری، وزن خشک ریشه و وزن خشک اندام‌های هوایی رقم بولانی مربوط به ۴۹ جدایه *Fusarium culmorum*

Table 6. Analysis of variation (ANOVA) of disease severity, root dry weight and foliage dry weight of Bolani cultivar inoculated for 49 isolates of *Fusarium culmorum*

F test	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات Mean Square	منابع تغییرات (C.O.V)	
4.513×	49	1.480	Treatment تیمار	شدت بیماری[1] **disease severity**
	106	.328	Error خطا	
4.744×	49	.002	Treatment تیمار	وزن خشک ریشه[2] **dry root weight**
	106	.000	Error خطا	
3.838×	49	020	Treatmentتیمار	وزن خشک اندام‌های هوایی[3] **dry shoot weight**
	106	.005	Error خطا	

[1]C.V.: 40/68 [2]C.V.: 33/22 [3]C.V.: 29/93

* Significant difference at 1% level * اختلاف معنی دار در سطح ۱٪

www.SID.ir

Archive of SID

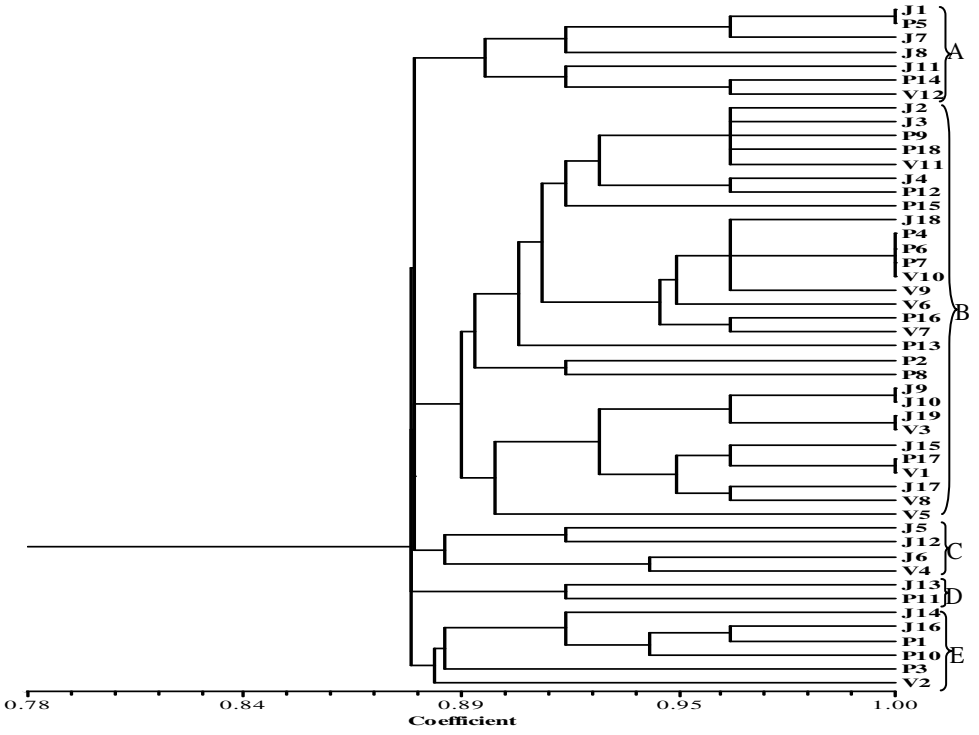
جدول ۷- مقایسه میانگین شدت بیماری رقم بولانی مایه زنی شده با جدایه‌های مختلف *Fusarium culmorum* جمع آوری شده از سه بخش ورامین بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪

Table 7. Comparison of means of disease severity of Bolani cultivar inoculated with *Fusarium culmorum* isolates of three districts of Varamin based on Duncan's test at 5% probability level

جدایه Isolate[a]	میانگین شاخص بیماریزایی Pathogenecity Index	گروه بیماریزا Pathotype group
P3	3.2200	a
P9, J14	2.9700	ab
V2	2.8333	abc
P1, J16	2.7767	abcd
V5	2.6667	abcde
P15	2.6100	abvdef
V6, V11, J15	2.5533-2.4967	abcdefg
V1, P17, J17, J9, V8, J19, J10, V3, P10	2.3600-2.0833	abcdefgh
J6, V10, P18, P6, P4, P16, P12, V7, J18, V4, V9, P7, J4	2.0533-1.8300	bcdefghi
P11, J13, J3	1.7500	cdefghi
P5, J8, J7	1.6667	defghi
P14, J1	1.5533	efghi
P13, V12	1.5000-1.4700	fghi
P8, J2, P2	1.3867-1.2200	ghi
J12, J6	1.2200	hi
J11	0.9167	ij
Check	0.0000	j

[a]; P, J, V: Pishva, Javad-abad, Varamin districts, respectively

[a] P، J و V به ترتیب بخش‌های پیشوا، جواد آباد و ورامین



شکل ۴- گروه بندی ۴۹ جدایه *F. culmorum* بر اساس بیماریزایی با روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه Nei and Li

Fig. 4. UPGMA analysis of isolates of 49 *F. culmorum* isolates based on pathogenicity data by UPGMA and using Nei and Li′s similarity coefficient

www.SID.ir

Archive of SID

پارامترهای ژنتیکی دیگری همچون شاخص اطلاعاتی شانون (I= ۰/۹۲٤) نیز، وجود تنوع ژنی بالا را داخل ژنوتیپ ها نشان داد (جدول ۲).

قارچ *F. culmorum* هوموتالیک است و هیچ مرحله جنسی برای آن شناخته نشده است و آنالیزهای جمعیتی نشان می‌دهد که احتمالاً نوترکیبی یک بخش مهمی از چرخه زندگی قارچ است (Toth *et al.* 2004). منابع ممکن برای ایجاد تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌های *F. culmorum*، موتاسیون، نوترکیبی غیر جنسی توسط آناستوموز، اثرات رقابتی یا جریان ژنی می‌باشد (Miedaner *et al.* 2008). تنوع معنی‌دار ژنوتیپ بین جمعیت‌های مزارع و یا نسبت‌های جهشی بالا می‌تواند، بطور مشابه تنوع ژنتیکی بالا را نتیجه دهد، مخصوصاً اگر فشارهای انتخابی وجود نداشته باشند (Scott and Chakraborty, 2010). بنابراین تنوع ژنی بالا بین استرین‌ها می‌تواند همراه با جهش در محل‌های چسبیدن آغازگر، ترتیب مجدد (re-arrangements) بخش‌های کروموزومی یا فرآیندهای نوترکیبی در ژنوم قارچ‌ها باشد (Mishra *et al.* 2003). اینکه نقش کدامیک از موارد ذکر شده بالا در تنوع ژنتیکی این قارچ بارزتر است، با کشف تلومورف *F. culmorum* به آسانی می‌تواند با نوترکیبی جنسی توضیح داده شود (Miedaner *et al.* 2001).

بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۶۴۷) بین جدایه‌های بخش جواد آباد و ورامین بود (جدول ۵). از آنجاییکه فاصله جغرافیایی چندانی بین این بخش‌ها وجود ندارد، این نتایج وقوع ژنوتیپ‌های جدید را در این منطقه پیشنهاد می‌کند. خاکزاد بودن قارچ عامل بیماریزا و اینکه اصولًا قارچ‌های خاکزاد هر کدام جایگاه‌های اکولوژیکی خاصی را اشغال می‌کنند، دلیل این نتیجه‌گیری است و همچنین وقوع ژنوتیپ‌های تازه می‌تواند به دلیل فرآیندهای فیلوژئوگرافیک (Carbone, 2001)، یا افزایش کشت گندم (Hambleton, 2002)، و یا نتیجه حرکت *F. culmorum* از چند گیاه میزبان به داخل این محصول باشد. جریان ژنی وقتی اتفاق بیافتد، می‌تواند چند شکلی تازه و ترکیبات ژنی تازه را در جمعیت باعث شود. در خصوص جمعیت‌های *F. culmorum* سه بخش شهرستان ورامین جریان ژنی بالایی (۷/۳۲۱، جدول ۳) مشاهده شد، اما اینکه این جریان ژنی نتیجه نوترکیبی ژنتیکی است یا جریان ژنوتیپی، یا تنها تبادل کل ژنوتیپ ها می‌باشد، مشخص نیست (Scott and Chakraborty, 2010).

قارچ *F. culmorum* بذرزاد است (Polley and Turner, 1995) و گیاهان دیگر هم میزبان این قارچ می‌باشند و به این صورت در بخش‌های مختلف شهرستان ورامین پخش می‌شود، و این می‌تواند، تشابه ژنتیکی بالای بین بخش‌های جوادآباد و پیشوا را توجیه کند (جدول ۵).

مقایسه میانگین بیماریزایی جدایه‌های *F. culmorum* در سه بخش شهرستان ورامین نشان داد که، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌های بخش ورامین از دیگر بخش‌ها وجود دارد. همچنین در گروه بندی مولکولی نیز، تعداد بیشتری از جدایه‌های ورامین (جدایه های V1، V2، V5، V6، و V8) در گروه جداگانه (A) قرار داشتند (شکل ۳) و اینکه تمام جدایه‌های مذکور، دارای بیماریزایی بالایی بودند (جدول ۷). از آنجایی که در بررسی ژنوتیپی و بیماریزایی، جدایه‌های ورامین از دو بخش دیگر جدا شدند (جدول ۷)، این نتیجه احتمال وقوع ژنوتیپ‌هایی با بیماریزایی بیشتر را در بخش ورامین، تقویت می‌کند.

نتایج مطالعه‌ای که توسط Miedaner *et al.* (2008) روی بیماری‌زایی جدایه‌های *F. graminearum* انجام شد نشان داد که، وقتی تلاقی دو جدایه با بیماریزایی بالا صورت می‌گیرد، نسبت به جدایه‌هایی که از نوترکیبی به وجود آمده‌اند، بیماری‌زایی بالاتری دارند. این نتایج پتانسیل بالای پاتوژن برای افزایش سطح بیماریزایی از طریق تلاقی جدایه‌ها، داخل منطقه جغرافیایی را نشان می‌دهد.

نتایج مقایسه گروه‌بندی مولکولی و بیماری‌زایی در کل جدایه‌ها، ارتباط ضعیفی بین تنوع بیماری‌زایی و مولکولی جدایه‌های *F. culmorum* را نشان داد. در مطالعه‌ای که توسط

www.SID.ir

Archive of SID

Mishra *et al.* (2003) در ۷۵ جدایه *F. culmorum* جمع آوری شده از مناطق مختلف اروپا و استرالیا انجام شد، از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری بین تنوع مولکولی و بیماریزایی جدایه‌ها مشاهده نگردید. بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که بین دو خصوصیت مذکور از نظر مولکولی ارتباطی وجود ندارد. در خصوص مشخص نمودن هاپلوتیپ غالب مناطق، به دلیل تنوع زیاد جدایه های *F. culmorum* (۴۴ هاپلوتیپ مجزا در بین ۴۹ جدایه، جدول ۲)، امکان مشخص نمودن آن وجود نداشت. نتایج مطالعه Mishra *et al.* (2003) نشان داد که تنوع بالایی در جدایه‌های *F. culmorum* وجود دارد، بطوریکه در بین ۷۵ جدایه ۵۹ هاپلوتیپ مجزا مشخص گردید.

در کل، همراه شدن شدت بیماریزایی با تنوع ژنوتیپی بالا در *F. culmorum*، نشان از پتانسیل بالای این قارچ در سازگار شدن با فشارهای انتخابی مختلف می‌باشد که بایستی در برنامه های اصلاحی مقاومت برای اطمینان از بقای مقاومت طولانی مدت ارقام و توسعه استراتژی‌های مدیریتی این بیماری در نظر گرفته شود. بنابراین، نظارت و ارزیابی دقیق جهت محدود کردن گسترش ژنوتیپ‌های جدید *F. culmorum*، در مناطق جدید، بایستی انجام شود. ساختار آمیزشی *F. culmorum* و نقش نوترکیبی در وقوع تنوع ژنتیکی هم، موضوع دیگری است که نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران که امکانات لازم جهت اجرای این پژوهش را فراهم نمودند، تشکر می‌شود. همچنین از زحمات آقایان مهندس ابوالقاسم قاسمی، دکتر حسن مومنی و سیروس کلانکی که در انجام این تحقیق مرا یاری کردند، قدردانی می‌گردد.

References

AKINSANMI, O. A., D. BACKHOUSE, S. SIMPFENDORFER and S. CHAKRABORTY, 2006. Pathogenic variation of *Fusarium* isolates associated with head blight of wheat in Australia. Journal of Phytopathology 154: 513–521.

AKINSANMI, O. A., V. MITTER, S. SIMPFENDORFER, D. BACKHOUSE and S. CHAKRABORTY, 2004. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. Australian Journal Agricultural Research 55: 99-107.

AN, Z. W., L. L. XIEM, H. CHENG, Y. ZHOU, Q. ZHANG, X. G. M. HE, H. S. HUANG, 2009. A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. Analytical Biochemistry 391: 77–79.

ARNAUD-HAOND, S. and K. BELKHIR, 2007. Upgrade 2012. GENCLONE: A computer program to analyze genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. Molecular Ecology Notes 7: 15–17.

CARBONE, I. and L. M. KOHN, 2001. A microbial population species interface nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. Molecular Ecology 10: 947-967.

DESJARDINS, A. E. 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

DYER, A. T., R. JOHNSTON, H. C. HOGG and J. A. JONSTON, 2009. Comparison of pathogenicity of the *Fusarium* crown rot (FCR) complex (*F. culmorum*, *F. pseudograminearum* and *F. graminearum*) on hard red spring and durum wheat. European Journal Plant Pathology 125: 387–395.

GARGOURI-KAMMOUN, L., S. GARGOURI, S. REZGUI, M. TRIFI, N. BAHRI and M. R. HAJLAOUI, 2009. Pathogenicity and aggressiveness of *Fusarium* and *Microdochium* on wheat seedlings under controlled conditions. Tunisian Journal of Plant Protection 4: 135-144.

www.SID.ir

Archive of SID

GIRAUD, T., E. FOYRNIER, D. VAUTRIN, M. SOLIGNAC, E. VERCKEN, B. BAKAN and Y. BRYGOO, 2002. Isolation of eight polymorphic microsatellite loci using an enrichment protocol in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. Molecular Ecology Notes 2: 121-123.

GÜREL, F., G. ALBAYRAK, O. DIKEN, E. ÇEPNI and B. TUANALI, 2010. Use of Rep-PCR for genetic diversity analyses in *Fusarium culmorum*. Journal of Phytopathology 92: 781-787.

HAMBLETON, S., C. WALKER and L. M. KOHN, 2002. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. Canadian Journal of Plant Pathology 24: 309-315.

LESLIE, J. F. and B. A. SUMMERELL, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publish Ltd., UK, p 388.

MIEDANER, T., C. J. R. CUMAGUN and S. CHAKRABORTY, 2008. Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. Journal of Phytopathology 156: 129-139.

MIEDANER, T., A. G. SCHILLING and H. H. GEIGER, 2001. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. Journal of Phytopathology 149: 641–648.

MISHRA, P. K., R. T. V. FOX and A. CULHAM, 2003. Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. Annals of Applied Biology 143: 291-301.

MÖLLER, E. M., G. BAHNWEG, H. SANDERMANN and H. H. GEIGER, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. Nucleic Acids Research 20: 6115-6116.

NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist 106: 283-292.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 70: 3321–3323.

NEI, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press.

NEI, M. and W. H. LI, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76: 5267–5273.

NICHOLSON, P., D. R. SIMPSON, G. WINSTON, H. N. REZANOOR, A. K. LEES, D. W. PARRY and D. JOYCE, 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* cereals using PCR assays. Physiological and Molecular Plant Pathology 53: 17–37.

NIJS, M., J. S. LARSE, W. GAM, F. M. RAMBOUS, K. WERMARS, U. THRANE and S. H. W. NOTERMANS, 1997.Variations in RAPD patterns and secondary metabolite profiles within *Fusarium* species from cereals from various parts of Netherlands. Food Microbiology 14: 449-457.

OWEN, P. G., M. PEI, A. KARP, D. J. ROYLE and K. J. EDWARDS, 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Molecular Ecology 7: 1611–1612.

PEAKALL, R. and P. E. SMOUSE, 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. Bioinformatics 28: 2537-2539.

POLLEY, R. W. and J. A. TURNER, 1995. Surveys of stem base diseases and Fusarium ear diseases in winter wheat in England, Wales and Scotland, 1989-90. Annals of Applied Biology 126:45-49.

POUZESHIMIAB, B., M. RAZAVI, R. ZAREH, H. R. ZAMANIZADEH, S. REZAEE, D. SAFAEE and J. NICOL, 2012. Taxonomy and distribution of *Fusarium* spp. associated with root and crown rot of wheat in Iran. 1st International Crown Rot Workshop for Wheat Improvement 85: 31.

PUHALLA, J. E. 1981. Genetic considerations of the genus *Fusarium*. In *Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy 291-305. Eds Nelson, P.E. Toussoun, T.A.

www.SID.ir

Archive of SID

Cook R. J. Pennsylvania, USA: The Pennsylvania State University Press.

RAVANLOU, A. and Z. BANIHASHEMI, 1999. Taxonomy and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with root and crown rot of wheat in Fars Province. Iranian Journal of Plant Pathology 35: 37-45.

RAZAVI, M. and G. R. HUGHES, 2004. Microsatellite markers provide evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan. Genome 47: 789–794.

RÖDER, M. S., V. KORZUM, K. WENDEHAKE, J. PLASCHKE, M. H. TIXIER, P. LEROY and M. W. GANAL, 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics 149: 2007–2023.

ROHLF, F. J. 2000. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, New York, USA.

SAFAEE, D., H. YOUNESI and M. SHEIKHOLESLAMI, 2012. *Fusarium* species that root and crown root and crown rot of wheat in Kermanshah province. Iranian Journal of Plant Pathology 2: 89 -91.

SAREMI, H., A. AMMARELLOU and H. JAFARY, 2007. Incidence of crown rot disease of wheat caused by *F. pseudograminearum* as a new soilborn fungal species in North West Iran. Pakistan Journal of Biological Science 10: 3606-3612.

SCHERM, B., V. BALMAS, F. SPANU, G. PANI and G. DELOGU, 2013. *Fusarium culmorum*: the causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. Molecular Plant Pathology 14: 323-341.

SCOTT, J. B. and S. CHAKRABORTY, 2010. Genotypic diversity in *Fusarium pseudograminearum* populations in Australian wheat fields. Plant Pathology 59: 338–347.

SMILEY, R. W., J. A. GOURLIE, S. A. EASLEY and L. M. PATTERSON, 2005a. Pathogenicity of fungi associated with the wheat crown rot complex in Oregon and Washington. Plant Disease 89: 949-957.

SMILEY, R. W., J. A. GOURLIE, S. A. EASLEY, L. M. PATTERSON and R. G. WHITTAKER, 2005b. Crop damage estimates for crown rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. Plant Disease 89: 595–604.

THOMPSON, J. R. 1989. The program GEL ver. 2/17/89. 7105 Hana Rd., Edison, N.J.

TOTH, B., A. MESTERHAZY, P. NICHOLSON, J. TEREN and J. VARGA, 2004. Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. European Journal of Plant Pathology 110: 587-599.

YEH, F. C., R. YANG, T. J. BOYLE, Z. YE and J. M. XIYAN, 2000. POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada.

www.SID.ir