

تشخیص مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی *Fusarium graminearum* عامل بلایت سنبله گندم*

Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of
Fusarium graminearum, the causal agent of wheat head blight

ناصر صفایی،** عزیزاله عزیزاده، عباس سعیدی، حشمت‌اله رحیمیان، گرهارد آدم
گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، بخش تحقیقات غلات،
موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران و مرکز
ژنتیک کاربردی، دانشگاه علوم کشاورزی وین

پذیرش ۱۳۸۳/۱۲/۵

دریافت ۱۳۸۲/۱۲/۶

چکیده

در این پژوهش ۸۸ جدایه *Fusarium* جمع‌آوری شده از نواحی شمالی، جنوبی و شمال‌غربی ایران که از لحاظ مورفولوژیکی *F. graminearum* شناسایی شده بودند با استفاده از آغازگر اختصاصی این گونه بررسی شدند. نتایج حاصل از بررسی آغازگرهای ویژه گونه *F. graminearum* نشان داد که به راحتی می‌توان یک باند ۳۳۲ bp را فقط در این گونه تکثیر نمود. چنین بانندی در سایر گونه‌های نزدیک از جمله *F. pseudograminearum* و *F. culmorum* مشاهده نشد. بر این اساس از مجموع ۸۸ جدایه مورد مطالعه ۷۲ جدایه به عنوان * بخشی از رساله دکتری نگارنده اول، ارائه شده به دانشگاه تربیت مدرس و نتیجه طرح

تحقیقاتی مشترک بین جمهوری اسلامی ایران و جمهوری اتریش

** مسئول مکاتبه

F. graminearum تشخیص داده شد. این جدایه‌ها با استفاده از ۸ آغازگر تصادفی برای آنالیز RAPD مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد که از میان ۸ آغازگر مورد مطالعه دو آغازگر OPA10 و OPA07 به صورت تکرارپذیری پلی مورفیک بودند. نتایج حاصل از آنالیز خوشه‌ای با آغازگر OPA07 نشان داد که در سطح تشابه ۸۵ درصد جدایه‌ها به ۱۵ گروه تقسیم می‌شوند. گروه‌های اول، چهارم، پنجم، ششم، نهم، یازدهم به ترتیب ۱۸، ۴، ۱۸، ۸، ۲۲، ۵ و ۱۰ درصد جدایه‌ها را در بر گرفتند. سایر گروه‌ها تنها یک عضو داشتند که در سطح تشابه ۹۰ درصد تعداد گروه‌ها به ۲۹ افزایش یافت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل RAPD با استفاده از آغازگر OPA10 جدایه‌ها را در سطح تشابه ۸۵ درصد به ۹ گروه تقسیم کرد. گروه اول، دوم، سوم، ششم و هفتم به ترتیب ۲۴، ۲۶، ۲۲، ۱۴، ۳ و ۳ درصد از جدایه‌ها و سایر گروه‌ها تنها یک عضو داشتند. در سطح تشابه ۹۰ درصد جدایه‌ها به ۱۹ گروه تقسیم شدند. این دو آغازگر توانستند جدایه‌های مربوط به نواحی شمال‌غربی را از سایر جدایه‌ها متمایز کنند. جدایه‌های مربوط به استانهای شمالی و جنوبی کشور به صورت پراکنده در سایر زیر خوشه‌ها (subclusters) قرار گرفتند. این اولین مطالعه جدایه‌های ایرانی *F. graminearum* با استفاده از آغازگر ویژه گونه و بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های تایید شده این گونه در سطح مولکولی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آغازگر اختصاصی گونه، تنوع ژنتیکی، بلایت فوزاریومی سنبله گندم، *graminearum*
Fusarium، RAPD-PCR، ایران

مقدمه

بیماری بلایت فوزاریوم سنبله گندم (Fusarium Head Blight =FHB) یکی از بیماری‌های مهم گندم در مناطق مرطوب و نیمه‌مرطوب جهان بشمار می‌رود. این بیماری بین ۳۰ تا ۷۰ درصد عملکرد گندم را کاهش می‌دهد (Parry et al. 1995, Arthur, 1891). Windels 2000, McMullen et al. 1997). بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم از سالها پیش در ایران وجود داشته و یکی از بیماری‌های مهم گندم در مناطق مازندران و گرگان بشمار

Archive of SID

می‌رود (Babadoost 1995, Forootan *et al.* 1993, Golzar 1993). در سالهای اخیر تغییرات جوی در مناطق مذکور و کشت ارقام حساس به صورت وسیع و همچنین وجود اینوکولوم بالای عامل بیماری در منطقه موجب شده که خسارت چشم‌گیری به محصول گندم وارد شود. بروز اپیدمی شدید این بیماری در سال زراعی ۷۵-۱۳۷۴ در بخش‌های کوچکی از استانهای هرمزگان، فارس و بوشهر موجب کاهش محصول به میزان ۷۵٪ شد (Alizadeh and Torabi, unpublished data) عامل این بیماری *Fusarium graminearum* Schwabe با فرم جنسی *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch گونه غالب آن در ایران و سایر نقاط جهان می‌باشد (Babadoost 1995, Forootan *et al.* 1993, Golzar 1993, Bamdadian & Torabi 1983) گونه *F. graminearum* قبلاً دو جمعیت تحت عنوان گروه‌های I و II را شامل می‌شد. براساس مطالعات آوکی و اودونل (Aoki & O'Donnel 1999) گروه I تحت عنوان گونه جدید *F. pseudograminearum* توصیف شده و گروه II گونه *F. graminearum* عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم می‌باشد. این بیمارگر به صورت دوره‌ای اپیدمی‌هایی را باعث می‌شود و منجر به خسارت‌های اقتصادی به جهت کاهش کمی و کیفی محصول می‌گردد. خسارت کیفی به دلیل تولید فیتوتوکسین‌های مضر برای حیوانات و انسان می‌باشد (Berora & Dersjardins and Parry *et al.* 1995, Tuite *et al.* 1990, Bechtel *et al.* 1985 Milandenor, 1974 Hohn, 1997). مهمترین فیتوتوکسین‌های تولید شده توسط این بیمارگر زرالینون و تریکوتسین‌هایی نظیر DON است (Ichinoe *et al.* 1983). از آنجایی که مبارزه زراعی و شیمیایی نمی‌تواند به اندازه مطلوب بیماری را مهار نماید، به اصلاح برای مقاومت توجه زیادی می‌شود و در واقع ارقام مقاوم بهترین روش مبارزه با این بیماری به حساب می‌آیند (Parry *et al.* 1995, Bai & Shaner 1994, Milus & Parsons 1994; Snijders 1990) (van Ginkel *et al.* 1996). از طرف دیگر یافته‌های مربوط به ژنتیک جمعیت قارچ برای درک بهتر منشاء اپیدمی‌ها و کمک به توسعه ارقام اهمیت زیادی دارد. نشانگرهای ملکولی ابراز مفیدی برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچهای بیمارزای گیاهی می‌باشند. کاربرد نشانگرهای DNA برای مطالعه دینامیک جمعیت پاتوژنهای گیاهی، سطحی از دقت را که قبلاً در دسترس نبود فراهم آورده است و تجزیه و تحلیل بیولوژی جمعیت پاتوژنهای گیاهی را متحول ساخته است (Milgroom and Fry 1997; McDermott and McDonald, 1993).

توسعه نشانگرهای رپید (Random Amplified Polymorphic DNA=RAPD) یک ابزار مفیدی را برای مطالعه تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای فراهم آورده است (Williams *et al.* 1990, Peever & Milgroom 1994). آنالیز RAPD برای مطالعه خصوصاً گونه‌های فوزاریوم مفید است (Nelson *et al.* 1997). این روش نشانگرهایی را فراهم آورده است که مطالعه جمعیت در گونه‌هایی نظیر *F. oxysporum* که میزبان اختصاصی دارند (host-specific) اما از لحاظ مورفولوژیکی غیر قابل تشخیص از یکدیگرند آسانتر می‌کند. مثلاً نشانگرهای RAPD این امکان را فراهم آورده است که ۱۲ فرم مخصوص این گونه را بتوان از یکدیگر متمایز کرد (Crowhurst *et al.* 1995). در *F. oxysporum* f. sp. *pisi* نژادهای ۱، ۵، ۶ از نژاد ۲ با نشانگر RAPD تفکیک شدند (Grajal-Martin *et al.* 1993). جدایه‌های نژاد A، ۳ و ۴ مربوط به *F. o. f.sp. vasinfectum* با استفاده از نشانگر RAPD در سه کلاستر مختلف قرار گرفتند (Assigbetse *et al.* 1994). مطالعات قبلی نشان داده است که جمعیت‌های *F. graminearum* متعلق به نواحی جغرافیایی مختلف با آنالیز RAPD از هم تفکیک می‌شوند (Dusabenyagasani 1996). در مطالعات تکمیلی، دوزابنیازونی و همکاران (Dusabenyagasani *et al.* 1999) ۷۲ جدایه *F. graminearum* بررسی شد و با هشت آغازگر RAPD مشخص گردید که همه جدایه‌های مورد مطالعه از نظر ژنتیکی متفاوتند. علاوه بر این، بخش عمده تنوع ژنتیکی (بیش از ۹۰٪) مربوط به تنوع درون ناحیه‌ای (within-region variation) می‌باشد.

با وجود مطالعات گسترده، هنوز بسیاری از جنبه‌های این بیماری مهم گندم از جمله تعاملات درون گونه‌ای در جمعیت‌های مختلف این بیمارگر ناشناخته است و روشن‌ترین شاهد این ادعا اذعان پژوهشگران به ناتوانی در کنترل این بیماری می‌باشد (Mesterhazy 1997). برای مبارزه با هر بیماری شناخت بیمارگر به ویژه ساختار جمعیت آن ضروری است و یکی از دلایل عمده عدم توفیق در کنترل یک بیماری ناشی از عدم درک ساختار ژنتیکی جمعیت‌های عامل بیماری می‌باشد (McDonald 1997, Martin & English 1997). بنابراین ضرورت دارد که مطالعات بیشتری در زمینه شناسائی جمعیت‌های این بیمارگر و روابط آنها با یکدیگر انجام گیرد.

تاکون در ایران مطالعاتی در ارتباط با تنوع ژنتیکی *F. graminearum* عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم با استفاده از نشانگرهای آیزو آنزیمی (Safavi Someeh Oliaee 1999)، گروههای سازگار رویشی (VCGs) (Naseri et al. 2001)، نشانگر RAPD (Golzar et al. 1999) و نشانگرهای بیوشیمیایی (Safaie et al. 2001) انجام گرفته است. این مطالعه به منظور شناسایی جدایه‌های ایرانی *Fusarium* با استفاده از آغازگرهای ویژه گونه *F. graminearum* و بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های ایرانی این گونه در نواحی شمال، شمال غربی و جنوب ایران انجام گردیده است.

روش بررسی

جمع‌آوری، جدا و خالص‌سازی عامل بیماری

تعداد ۸۸ جدایه از قارچ *F. graminearum* از استانهای گلستان، مازندران، فارس و آذربایجان شرقی جمع‌آوری و جداسازی شد (جدول ۱). برای خالص‌سازی جدایه‌ها از همه آنها کشت‌های تک‌اسپور تهیه شد. یک قطره از این سوسپانسیون روی محیط آب-آگار (WA) مخطط شد. اسپورها بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه جوانه زدند. تک‌اسپورهای جوانه‌زده به پتری حاوی محیط PDA منتقل شد. ریشه‌ها از حاشیه اسپور جوانه‌زده به لوله‌های حاوی محیط کشت منتقل و پس از رشد قارچ لوله‌ها در یخچال نگهداری شدند. تشخیص جدایه‌ها با استفاده از مراجع (Nelson et al. 1983, Burgess et al. 1994) انجام گرفت.

جداسازی DNA ژنومی

برای تهیه توده میسلیم، سطح کشت جدایه‌ها به وسیله اسکالپل خراشیده و میسلیم حاصل به لوله اپندورف منتقل و با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شد. یک قطره توین-۲۰ (۱۰٪) با غلظت نهایی ۰/۰۵ درصد اضافه شده و با استفاده از میکروپیت یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به هر تشتک PDA (۹ سانتیمتری) که روی سطح آن یک ورقه سلوفان استریل قرار داشت، منتقل و دو تا سه روز در دمای ۲۵ °C نگهداری شد. ریشه‌ها از سطح کاغذ سلوفان به وسیله اسکالپل جمع‌آوری، در میان کاغذ صافی خشک شده و سپس به لوله اپندورف منتقل و در نیتروژن مایع قرار گرفتند. نمونه‌ها (حدود ۱ گرم) در هاون چینی با

نیترژن مایع به صورت پودر در آمدند و در ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (DNA salt solution) شامل تریس HCl ۱۰۰ میلی مولار pH = 7.5-8 EDTA ۵ میلی مولار و کلرید سدیم ۴/۱ مولار) سوسپانسیون شدند. به سوسپانسیون مذکور یک میکرولیتر RNase A اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵°C نگهداری و سپس روی یخ قرار گرفت. ۰/۴ میلی لیتر مخلوط فنل: کلروفرم: آیزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) (Fluka) به نمونه اضافه شد و پس از مخلوط کردن ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفوژ شده فاز رویی به یک اپندورف جدید منتقل گردید. مجدداً نمونه‌ها ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفوژ شدند و فاز رویی به یک لوله جدید منتقل گردید. DNA با ۷/ حجم ایزوپروپانول سرد مای اطاق رسوب داده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. پس از حذف ایزوپروپانول و تبخیر باقیمانده الکل، نمونه‌ها در ۲۰۰ میکرولیتر آب حل شدند.

جدول ۱- جدایه‌های فوزاریوم جدا شده از سنبله‌های آلوده به بلایت سنبله جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران

Table 1. Fusarium isolates recovered from infected wheat ears from different areas of Iran

Isolates/جدایه	Location/محل جمع‌آوری	332 bp band*
Fg-1 NORTHERN PARST	نواحی شمالی	+
Fg-2 ARAGHI MAHALEH, GORGAN	عراقی محله، گرگان	+
Fg-3 GORGAN	گرگان	+
Fg-4 MOHAMAD ABAD, GORGAN	محمدآباد، گرگان	+
Fg-5 DASHTE NAZ, SARI	دشت‌ناز، ساری	+
Fg-6 SOUTHERN PARTS	نواحی شمالی	+
Fg-7 GHARAKHIL, GHAEM SHAHR	قراخیل، قائمشهر	+
Fg-8 GORGAN	گرگان	-
Fg-9 JIROFT	جیرفت	+
Fg-10 MOHAMAD ABAD, GORGAN	محمدآباد، گرگان	+
Fg-11 MOHAMAD ABAD, GORGAN	محمدآباد، گرگان	-

Fg-12	JIROFT	جیرفت	-
Fg-13	UNKNOWN	نامعین	-
Fg-14	SOUTHERN PARTS	نواحی جنوبی	-
Fg-15	GORGAN	نواحی شمالی	+
Fg-16	JIROFT	جیرفت	+
Fg-17	JIROFT	جیرفت	+
Fg-18	SARTAGH, BANDAR GAZ	بندرگز	+
Fg-19	ORTHERN PARTS	نواحی شمالی	+
Fg-20	MOHAMAD ABAD, GORGA	محمدآباد، گرگان	+
Fg-21	MAZANDARN	مازندران	+
Fg-22	GORGAN	گرگان	+
Fg-23	TIRTASH	تیرتاش	-
Fg-24	UNKNOWN	نامعین	-
Fg-25	GORGAN	گرگان	+
Fg-26	GHARAKHIL, GHAEM SHAHR	قراخیل، قائمشهر	+
Fg-27	MOHAMAD ABAD, GORGA	محمدآباد، گرگان	+
Fg-28	GORGAN	گرگان	+
Fg-29	GORGAN	گرگان	+
Fg-30	GHARAKHIL, GHAEM SHAHR	قراخیل، قائمشهر	-
Fg-31	MOHAMAD ABAD, GORGA	محمدآباد، گرگان	-
Fg-32	SOUTHERN PARTS	نواحی جنوبی	+
Fg-33	SOUTHERN PARTS	نواحی جنوبی	+
Fg-34	GORGAN	گرگان	+
Fg-35	NORTHERN PARTS	نواحی شمالی	+

Fg-36	NORTHERN PARTS	نواحی شمالی	+
Fg-37	NODEH MALEK, GORGAN	نوده ملک، گرگان	+
Fg-38	DASHTE NAZ, SARI	دشت ناز، ساری	+
Fg-39	GORGAN	گرگان	+
Fg-40	SOUTHERN PARTS	نواحی جنوبی	+
Fg-41	DASHTE NAZ, SARI	دشت ناز، ساری	+
Fg-42	DASHTE NAZ, SARI	دشت ناز، ساری	+
Fg-43	SORKHON KALATEH, GORGAN	سرخه کلاته، گرگان	+
Fg-44	NORTHER PARTS	نواحی شمالی	+
Fg-45	DASHTE NAZ, SARI	دشت ناز، ساری	+
Fg-46	GORGAN	گرگان	+
Fg-47	NORTHERN PARTS	نواحی شمالی	+
Fg-48	GORGAN	گرگان	+
Fg-49	NORTHERN PARTS	نواحی شمالی	+
Fg-50	NORTHERN PARTS	نواحی شمالی	+
Fg-51	GORGAN	گرگان	-
Fg-52	NORTHERN PARTS	نواحی شمالی	+
Fg-53	GHARAKHIL, GHAEMSHAHR	قراخیل، قائمشهر	+
Fg-54	DASHTE NAZ, SARI	دشت ناز، ساری	+
Fg-55	GORGAN	گرگان	+
Fg-56	ARAGHI MAHALEH, GORGAN	عراقی محله، گرگان	-
Fg-57	KAMAL ABAD, GORGAN	کمال آباد، گرگان	+
Fg-58	SOUTHERN PARTS	نواحی جنوبی	+

Fg-59	GHARAKHIL, GHAEMSHAHR	قراخیل، قائمشهر	+
Fg-60	GORGAN	گرگان	+
Fg-61	GORGAN	گرگان	+
Fg-62	DASHTE NAZ, SARI	دشت ناز، ساری	+
Fg-63	ROSTAM KOLA, BEHSHAHR	رستم کلا بهشهر	+
Fg-64	TAGHI ABAD, GORGAN	تقی آباد گرگان	+
Fg-65	ARAGHI MAHALEH, GORGAN	عراقی محله، گرگان	+
Fg-66	ARAGHI MAHALEH, GORGAN	عراقی محله، گرگان	-
Fg-67	MAZANDARAN	مازندران	+
Fg-68	GORGAN	گرگان	+
Fg-69	SOUTHERN PARTS	نواحی جنوبی	+
Fg-70	JIROFT	جیرفت	+
Fg-71	GORGAN	گرگان	+
Fg-72	DASHTE NAZ, SARI	دشت ناز، ساری	-
Fg-73	DASHTE NAZ, SARI	دشت ناز، ساری	-
Fg-74	PARS ABAD, MOGHAN	پارس آباد مغان	-
Fg-75	MAZANDARAN	مازندران	+
Fg-76	PARS ABAD, MOGHAN	پارس آباد مغان	+
Fg-77	PARS ABAD, MOGHAN	پارس آباد مغان	+
Fg-78	PARS ABAD, MOGHAN	پارس آباد مغان	+
Fg-79	PARS ABAD, MOGHAN	پارس آباد مغان	+
Fg-80	PARS ABAD, MOGHAN	پارس آباد مغان	+
Fg-81	MAZANDARAN	مازندران	+
Fg-82	MOGHAN	مغان	+

Table 1. (continued)

جدول ۱- (ادامه)

Fg-83	UNKNOWN	نامعین	+
Fg-84	UNKNOWN	نامعین	+
Fg-85	TIRTASH	تیرتاش	+
Fg-86	TIRTASH	تیرتاش	+
Fg-87	UNKNOWN	نامعین	+
Fg-88	UNKNOWN	نامعین	+

شناسایی با استفاده از آغازگرهای ویژه گونه (species specific primers)

برای شناسایی تکمیلی جدایه‌ها از آغازگرهای ویژه گونه *F. graminearum* که توسط شیلینگ و همکاران (Schilling *et al.* 1996) طراحی شده است استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲ - فهرست آغازگرهای ویژه گونه *F. graminearum* (*) و آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز RAPD (**)

Table 2. List of species specific primers for *F. graminearum* and primers used for RAPD analysis

نام آغازگر	توالی
UBC85F410*	5'GCAGGGTTTGAATCCGAGAC-3'
UBC85R410*	5'-AGAATGGAGCTACCAACGGC-3'
OPA07**	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA10**	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA12**	5'-TCGGCGATAG-3'
OPA16**	5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA17**	5'-GACCGCTTGT-3'
OPA20**	5'-GTTGCGATCC-3'
OPB12**	5'- CCTTGACGCA-3'
OPC05**	5'- GATGACCGCC-3'

* Schilling *et al.* (1996) ** Dusabenyagasani *et al.* (1999).

واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد (جدول ۳). هر آزمایش شامل کنترل مثبت DNA یک جدایه شناخته شده) و کنترل‌های منفی (یک واکنش PCR بدون DNA و DNA ژنومی *F. pseudograminearum* و *F. culmorum*) بود. برنامه PCR شامل ۳۰ چرخه 94°C برای ۱ دقیقه 61°C برای یک دقیقه و 72°C برای ۲ دقیقه بود. در آغاز، واکنش برای یک دقیقه در 94°C قرار گرفت. در آخر واکنش، یک مرحله طویل شدن رشته در 72°C برای ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.

بررسی نشانگر RAPD

در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با بهره‌گیری از نشانگر RAPD از هشت آغازگر استفاده شد (جدول ۲). برای تعیین بهترین دمای اتصال آغازگر به قالب از PCR گرادیان استفاده شد.

جدول ۳- اجزای واکنش زنجیره‌ای (PCR) برای آغازگرهای ویژه گونه در یک واکنش ۲۰ میکرولیتری

Table 3. Components of Polymerase Chain Reaction (PCR) for species specific primers in a 20 μl reaction

مقدار (Quantity)	مواد (Materials)
۲۵ Pmol	پرایمر (forward)
۲۵ Pmol	پرایمر (reverse)
۲ μl	بافر PCR (10X)*
۲۵mM	MgCl ₂
۰/۲۵U	Taq DNA polymerase
۲/۵mM	dNTP mix
۲۰Ng	DNA

* Tris HCl میلی‌مولار (pH=8.8) KCl، ۵۰۰ میلی‌مولار (MBI-Fermentas)

برنامه PCR شامل دناتوره کردن در 94°C برای ۲ دقیقه، اتصال در 35°C برای ۴ دقیقه و طویل

شدن رشته جدید (extension) در 72°C برای ۲ دقیقه و سپس 45°C چرخه 94°C برای ۲۰ ثانیه 35°C برای ۱ دقیقه و 72°C برای ۲ دقیقه بود. واکنشها با ۷ دقیقه توسعه رشته جدید در دمای 72°C خاتمه داده شد. تمام آزمایشات سه بار تکرار شد. محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲ درصد تفکیک و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و باندها با اشعه ماورای بنفش، مرئی شدند. داده‌های RAPD با امتیاز دهی (scoring) به تمام باندها (عدد ۱ برای حضور و صفر برای عدم حضور) و با استفاده از ضریب تشابه نی (Nei, 1973) و نرم افزار NTSYS تجزیه و تحلیل گردید.

نتیجه و بحث

جمع‌آوری و جداسازی عامل بیماری

مشخصات ۸۸ جدایه *Fusarium* مورد بررسی شامل محل جمع‌آوری و گروه سازگار رویشی (VCG) آنها در جدول ۱ خلاصه شده است. جدایه‌های مورد بررسی که از مناطق جغرافیایی وسیعی جمع‌آوری گردیده بود، تنوع زیادی از نظر شدت بیماریزایی داشته و می‌توانند نماینده‌های مناسبی برای انجام مطالعات در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیت باشند. علاوه بر اینها ۳۴ جدایه دیگر که از سنبله‌های آلوده جدا شده بود در مطالعات مربوط به آنالیز RAPD بررسی شدند (جدول ۱).

شناسایی با استفاده از آغازگرهای ویژه گونه (species specific primers)

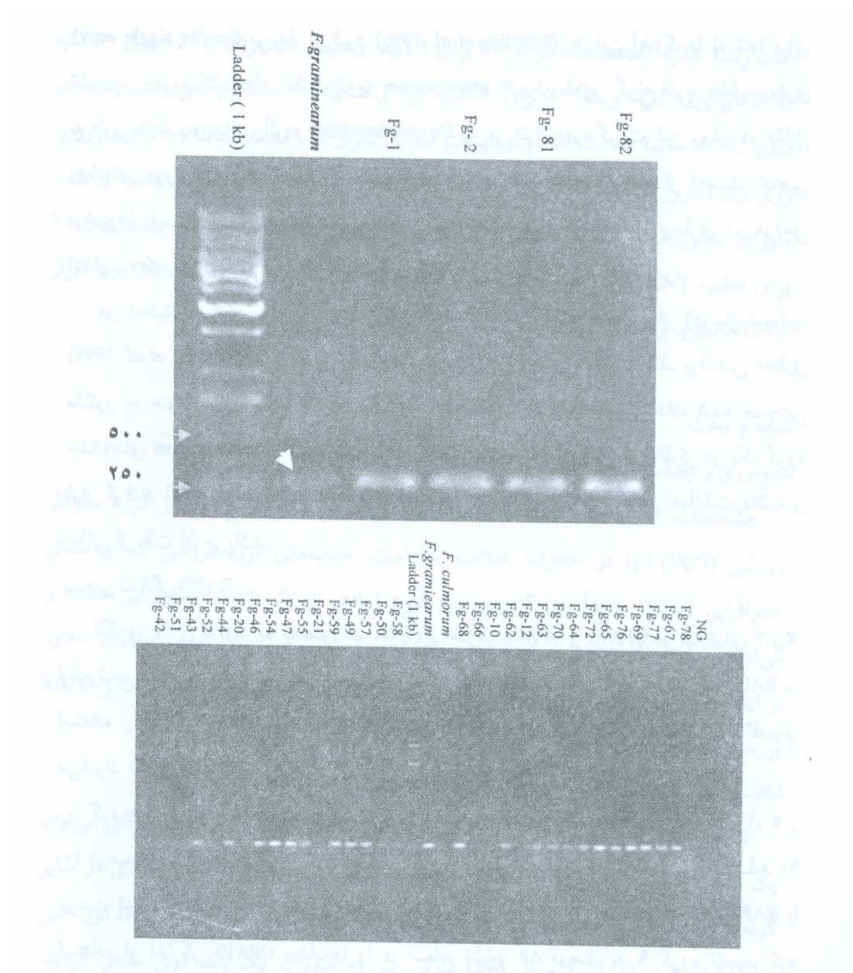
نتایج حاصل از بررسی آغازگر ویژه گونه *F. graminearum* نشان داد که به راحتی می‌توان یک باند اختصاصی ۳۳۲ bp را فقط در این گونه تکثیر نمود (شکل ۱). چنین بانندی در سایر گونه‌ها از جمله گونه *F. culmorum* و *F. pseudograminearum* مشاهده نشد. باند مذکور حتی در غلظت ۵ و ۰/۵ نانوگرم از DNA ژنومی نیز به صورت یک باند قوی ظاهر گردید. آغازگرهای به کار برده شده مربوط به یک (Sequence Characterized Amplified SCAR Region) بنام SCAR85 بوده و این ناحیه را تکثیر می‌کنند. تجزیه ساترن نشان داده است که در هیبریداسیون DNA ژنومی *F. graminearum* با پروب SCAR85 روی بلاتهای ساترن یک باند (سیگنال) مشاهده می‌شود. لذا به احتمال قوی SCAR85 به یک توالی با کپی پایین یا تکی

(low or single copy) مربوط می‌شود (Schilling *et al.* 1996). از این آغازگرها نه تنها برای تشخیص سریع کشت‌های مشکوک به *F. graminearum* برای تعیین گونه قارچ عامل بیماری به طور مستقیم در بافت آلوده (*in vivo* detection) نیز می‌توان بهره گرفت. این روش در مقابل روش‌های مورفولوژیکی مرسوم که بسیار وقت‌گیر و غیر اختصاصی‌اند، از اهمیت خاصی برخوردار است. از این روش می‌توان حتی برای تشخیص گونه عامل بیماری در مراحل ابتدایی - که هنوز علائم بیماری چندان قابل تشخیص نیست - نیز استفاده نمود. در تحقیق دیگری برای تشخیص این گونه براساس تکثیر بخشی از ژن بتا توبولین (Nicholson *et al.* 1998)، با همین جدایه‌ها، نتایج این پژوهش حمایت شد. براساس تحقیق مذکور به عنوان مثال جدایه Fg-12 یک غیر *F. graminearum* تشخیص داده شده همچنین جدایه‌های *F. graminearum* تایید شده در این تحقیق براساس پژوهش فوق‌الذکر در یک گروه قرار گرفتند (Serajazari *et al.* unpublished data) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشته و حاکی از دقت آن می‌باشد.

بررسی نشانگر RAPD

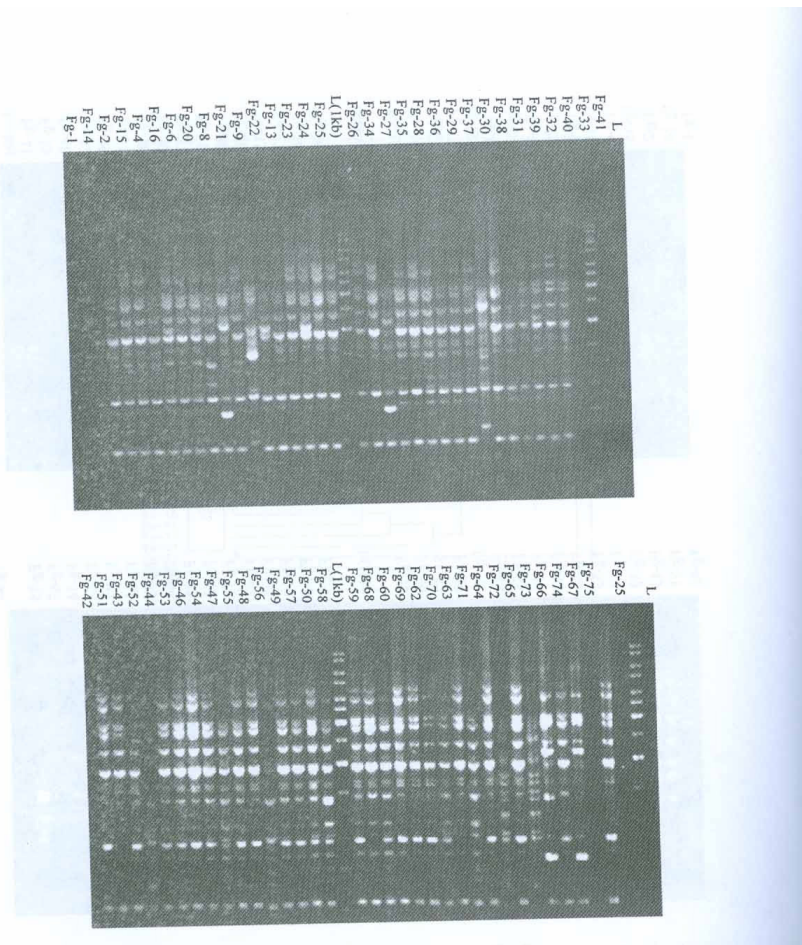
الگوی بانندی مربوط به محصولات PCR دو آغازگر OPA07 و OPA10 در شکل‌های ۲ و ۳ ارائه شده است. براساس تجزیه و تحلیل خوشه‌ای (cluster analysis) نتایج حاصل از RAPD با استفاده از آغازگر OPA07 نشان داد که در سطح تشابه ۸۵ درصد جدایه‌ها به ۱۵ گروه تقسیم می‌شوند (شکل ۴).

گروه‌های اول، چهارم، پنجم، ششم، نهم، دهم، یازدهم به ترتیب ۱۸، ۴، ۱۸، ۸، ۲۲، ۵ و ۱۰ درصد از جدایه‌ها را در بر گرفتند. سایر گروه‌ها تنها یک عضو داشتند. در سطح تشابه ۹۰ درصد تعداد گروه‌ها به ۲۹ گروه افزایش یافت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل RAPD با استفاده از آغازگر OPA10 جدایه‌ها را در سطح تشابه ۸۵ درصد به ۹ گروه تقسیم کرد (شکل ۵). گروه اول، دوم، سوم، ششم و هفتم به ترتیب ۲۴، ۲۶، ۱۴، ۳ و ۳ درصد از جدایه‌ها و سایر گروه‌ها تنها یک عضو داشتند. در سطح تشابه ۹۰ درصد جدایه‌ها به ۱۹ گروه تقسیم شدند.



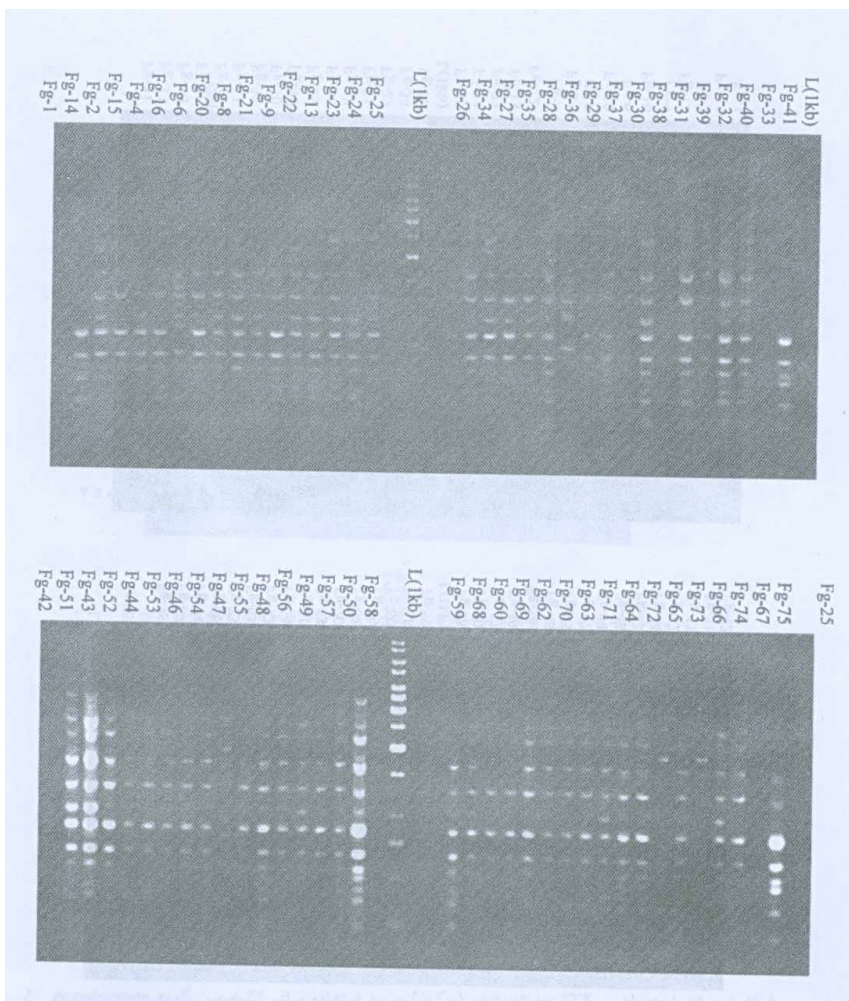
شکل ۱- باند اختصاصی ۳۳۲ جفت بازی (پیکان) مورد استفاده برای تشخیص گونه *F. graminearum* (بالا) و باند اختصاصی مذکور در تعدادی از جدایه‌های ایرانی (پائین) گونه مذکور، کنترل منفی (NG).

Fig. 1- Specific 332 bp band used for *F. graminearum* identification (up), the same band is shown in some Iranian isolates.



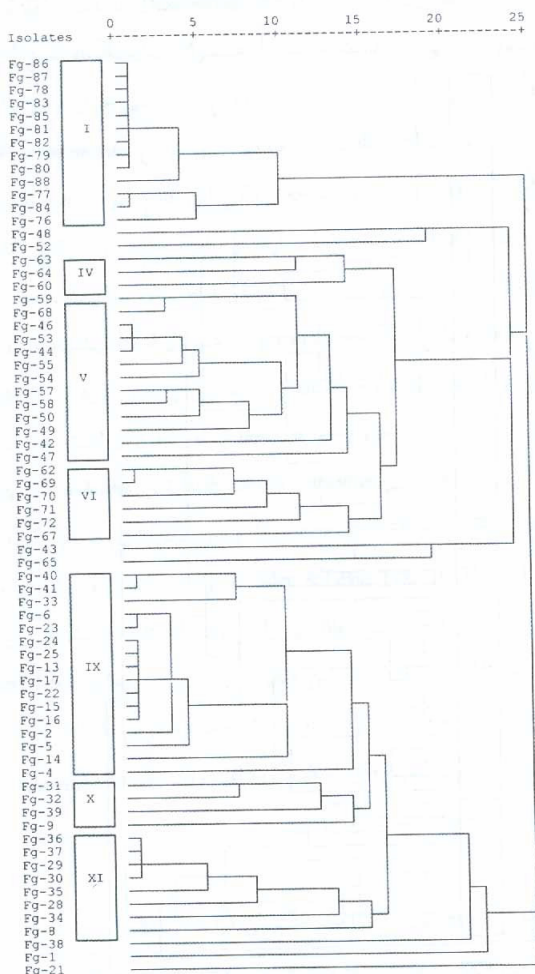
شکل ۲- الگوی بانندی مربوط به محصولات PCR (PCR products) آغازگر OPA07 در جدایه‌های *F. graminearum* جدا شده از چهار استان ایران.

Fig. 2. Electrophoretic patterns of PCR products using OPA07 primer in *F. graminearum* isolates collected from four provinces of Iran.



شکل ۳- الگوی بانندی مربوط به محصولات PCR (PCR products) آغازگر OPA10 در جدایه‌های *F. graminearum* جدا شده از چهار استان ایران.

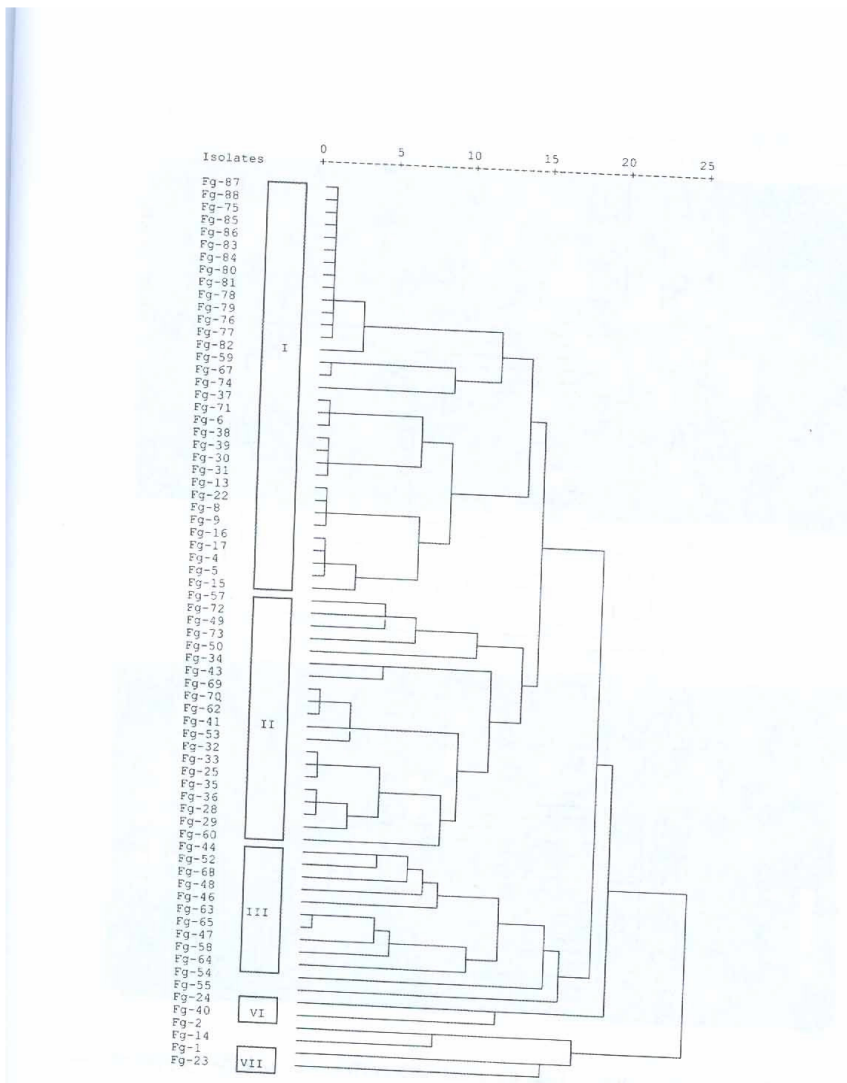
Fig. 3. Electrophoretic patterns of PCR products using OPA10 primer in *F. graminearum* isolates collected from four provinces of Iran.



شکل ۴- دندروگرام مربوط به داده‌های RAPD تکثیر شده بوسیله آغازگر OPA07 در جدایه‌های ایرانی

Fusarium graminearum

Fig. 4. Dendrogram from RAPD data of *Fusarium graminearum* isolates amplified by primer OPA07.



شکل ۵- دندروگرام مربوط به داده‌های RAPD تکثیر شده بوسیله آغازگر OPA10 در جدایه‌های ایرانی

Fusarium graminearum

Fig. 5. Dendrogram from RAPD data of *Fusarium graminearum* isolates amplified by primer OPA07.

دوزابیناگازانی و همکاران (Dusabenyagasani et al. 1999) با همین آغازگرها ۵۲ استرین *F. graminearum* را بررسی کردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در جمعیت‌های مورد بررسی آنها وجود دارد. همین نتایج در بررسی جدایه‌های ایرانی بدست آمد. وجود تعداد زیاد هاپلوتیپ (haplotype) در جمعیت‌های ایرانی *F. graminearum* نشان می‌دهد که نوترکیبی ژنتیکی نقش مهمی در چرخه زندگی این قارچ در نواحی جغرافیایی مختلف (گرگان، مازندران، اردبیل و جنوب) دارد و این نتایج با وقوع تلومورف قارچ (*Gibberella zeae*) بر روی بقایای ذرت و برنج در مناطق توسعه بیماری به ویژه در نواحی شمالی مطابقت دارد. به دلیل اینکه *F. graminearum* هموتال است، پیشنهاد شده که فرم جنسی فقط در بقا و فراهم آوردن اینوکولوم یکسان از لحاظ ژنتیکی نقش دارد (Cook 1981). با وجود این، دگرگشتی (crossing out) احتمالاً در *F. graminearum* فراوان است چرا که همین پدیده دگرگشتی در گونه‌های هموتال *Cryphonectria parasitica* و *Aspergillus nidulans* نیز رخ می‌دهد (Anagnostakis 1977, Croft & Jinks 1977). وجود دگرگشتی در این گونه در آزمایشگاه به اثبات رسیده است (Bowden & Leslie 1992 1997) ولی میزان آن در طبیعت معلوم نبوده و نیاز به مطالعات وسیعتری دارد. چنین مطالعاتی را می‌توان با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد استفاده در این تحقیق انجام داد. برای این منظور می‌توان نیمرخ‌های DNA (DNA profiles) پریتسیومهایی که از سنبله‌های مایه‌زنی شده با یک جفت استرین با باندهای RAPD ویژه را آنالیز DNA کرد و یا می‌توان نیمرخ‌های اسکوسپورهای درون یک تک پریتسیوم که در طبیعت تشکیل شده است را با هم مقایسه نمود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (69-73) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارنده: ناصر صفایی، عزیزاله علیزاده، عباس سعیدی، حشمت‌اله رحیمیان، گرهارد آدم
گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، بخش
تحقیقات غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، دانشکده
کشاورزی دانشگاه مازندران مرکز ژنتیک کاربردی، دانشگاه علوم کشاورزی
وین