

آنالیز مولکولی جدایه‌های قارچ *Fusarium culmorum* عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم با استفاده از نشانگر SSRخشنود نوراللهی^{۱*} و فرهاد غلامی^۲

۱ و ۲. دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ایلام، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۴)

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم برآمده از *Fusarium culmorum* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در استان ایلام است. برای تعیین گوناگونی ژنتیکی بیمارگر در مزرعه‌های گندم استان ایلام، شمار ۶۶ نمونه آلوده از مزرعه‌های شهرستان‌های گوناگون استان جمع‌آوری شد. پس از کشت، خالص‌سازی و شناسایی جدایه‌ها، آزمون مولکولی با به‌کارگیری پنج جفت آغازگر ریز ماهواره انجام شد. از آغازگرهای ریز ماهواره ۲۵ آلل در جدایه‌ها تکثیر شد. میانگین تعداد آلل در هر جایگاه ۵/۲ مشاهده شد. شناسه چندشکلی نشانگرها در آغازگر F3 با ۰/۴۰۹ بیشترین و در آغازگر F11 با ۰/۱۷۹ کمترین مقدار را دارا بود. بر پایه خوشه‌بندی جدایه‌ها و با به‌کارگیری الگوریتم پیوست مجاور و نرخ همانندی جاکارد، در سطح همانندی ۵۰ درصد جدایه‌ها در ۱۸ گروه جدا از هم قرار گرفتند. نتیجه‌های تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۷۸ درصد از تنوع ژنتیکی در میان همه جدایه‌ها و تنها ۲۲ درصد آن به منطقه‌های گوناگون جغرافیایی اختصاص دارد؛ بنابراین میان جدایه‌ها از منطقه‌های گوناگون همانندی ژنتیکی فراوانی وجود دارد. همانندی ژنتیکی بالا را می‌توان به مهاجرت ژن یا ژن‌مانه (ژنوتیپ) در اثر عامل‌های گوناگون نسبت داد.

واژه‌های کلیدی: گندم، تنوع ژنتیکی، *Fusarium culmorum*، SSR.**Molecular analysis of *Fusarium culmorum* isolates caused by crown and root rot of wheat by the SSR marker**Khoshnood Nourollahi^{1*} and Farhad Gholami²

1, 2. Associate Professor and Former M. Sc. Student, Department of Plant Protection, Ilam University, Iran

(Received: Dec. 31, 2017 - Accepted: Aug. 26, 2018)

ABSTRACT

Crown and root rot caused by *Fusarium culmorum* is one of the most important wheat diseases in Ilam. In order to determine genetic diversity, 66 samples were collected from wheat farms in different regions of Ilam province. The molecular test was carried out with a set of five pairs of SSR primers after purification and identification of the isolates. The SSR primers amplified a total of 25 alleles. The average allele number was 5.2 per each primer. The polymorphism index content value was the highest in primers F3 with 0.409 and the lowest in primers F11 with 0.179. Cluster analysis using the Neighbor-Joining method and Jaccard's coefficient in 50% similarity level divided the isolates into 18 groups. Results of AMOVA showed 78% of the genetic diversity related to isolates and 22% related to different geographical regions. Therefore, there is a high genetic similarity between isolates from different geographic regions. High genetic similarity can be attributed to the emigration of gene or genotype as a result of various factors.

Keywords: *Fusarium culmorum*, genetic diversity, SSR, Wheat.

* Corresponding author E-mail: k.nourollahi@ilam.ac.ir

مقدمه

مایکوتوکسین‌های زیان‌بخش می‌تواند در زراعت غله‌ها زیان‌های فراوانی به بار آورد. این قارچ توکسین‌های تریکوتسین، داکسی نیوال انول و زرانول را تولید می‌کند که همراه با مایکوتوسین‌های دیگر، در آمریکای شمالی و اروپا گسترش دارند (Desjardins, 2006). پوسیدگی‌های طوقه و ریشه از جمله بیماری‌های بااهمیتی هستند که هر ساله به گیاه گندم و فرآورده‌های آن زیان وارد می‌نماید، به همین دلیل در بیشتر نقطه‌های جهان پوسیدگی‌های طوقه و ریشه چه از جنبهٔ رده‌بندی عامل بیماری و چه از دید بیماری‌زایی قارچ‌های همراه، مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Smiley & Whittaker, 2004; Draper, 2000).

دربارهٔ بیماری‌زایی جدایه‌های *F. culmorum* داده‌های کمی وجود دارد. بیماری‌زایی ۷۵ جدایهٔ *F. culmorum* جمع‌آوری‌شده از بخش‌های گوناگون جهان مورد هم‌سنجی قرار گرفت و از نظر شدت بیماری‌زایی اختلاف معنی‌داری میان جدایه‌های گوناگون مشاهده شده است (Mishra et al., 2003). مطالعهٔ گوناگونی ژنتیکی و ساختار جمعیت قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی برای دستیابی به رقم‌های مقاوم و تناوب زراعی در راستای مدیریت و کاهش زیان بیماری ضروری است. دانستن دگرگونی‌ها ژنتیکی در قارچ‌های بیمارگر برای آماده کردن رقم‌های مقاوم دارای ارزش است. ردیابی این دگرگونی‌ها با روش‌های سنتی نیازمند هزینه کردن بسیار و از دست رفتن زمان خواهد بود. به‌کارگیری روش‌های مولکولی در آشکار ساختن گوناگونی ژنتیکی میان جمعیت‌های بیمارگر موجب کسب داده‌های مربوط به وقوع نو ترکیبی در زمینهٔ ژنتیکی آن‌ها می‌شود (McDonald, 1997).

تاکنون از نشانگرهای مختلفی برای بررسی گوناگونی ژنتیکی قارچ‌ها به‌ویژه *F. culmorum* استفاده شده است. در پژوهش اکنون از نشانگر ریزماهواره SSR در ایران برای بررسی گوناگونی ژنتیکی این قارچ در گندم استفاده شده است. نشانگر SSR قطعه‌های کوچکی از DNA هستند که در موتیف ۶-۱ بازی یک تکرار پشت سرهم را تشکیل می‌کنند (Datta et al., 2011). در حال حاضر، نشانگرهای ریزماهواره به دلیل پوشش مناسب ژنومی

گندم یکی از بارزترین گیاهان زراعی به شمار می‌آید و زراعت آن از همه گیاهان ساده‌تر، دارای تطابق بیشتر با شرایط آب و هوایی گوناگون و از طرفی دیگر خوراک اولیه و اصلی مردم جهان است (Khodabandeh, 2005). بیماری پوسیدگی طوقه و ریشهٔ گندم از منطقه‌های گوناگون کشت گندم در ایران گزارش شده است و زیان‌های قابل‌توجهی را در استان‌های آذربایجان شرقی، تهران، گلستان، زنجان و اردبیل (Saremi et al., 2007; Pouzeshimiab, 2012) کرمانشاه، لرستان (Safaei et al., 2012) و فارس (Ravanlou & Banihashemi, 1999) داشته است.

قارچ *Fusarium culmorum* یک بیمارگر خاکزاد با پراکنش جهانی است که می‌تواند عامل پوسیدگی طوقه و ریشه و همچنین بلایت سنبله (Head blight) در غله‌های دانه‌ریز بخصوص گندم و جو باشد (Scherm et al., 2013). *F. culmorum* بیشتر در بخش‌های معتدل اروپا و استان‌های فلاتی کانادا اهمیت دارد (Leseli & Summerell, 2006). گزارش‌های نخستین نشان می‌دهند که *F. culmorum* به‌عنوان عامل بنیادی بیماری بلایت فوزاریومی در منطقهٔ مدیترانه است و به‌ویژه در سال‌های با شرایط خوب در طول مراحل رشد گل و پر شدن دانه رخ می‌دهد (Crozza et al., 2002; Fakhfakh et al., 2011). این بیماری در گندم موجب پوسیدگی طوقه و ریشه می‌شود و مهم‌ترین نشانه‌های آن به‌صورت دگرگونی رنگ و قهوه‌ای شدن ریشه، ساقه، دگرگونی رنگ در میانگره‌ها، عدم تکامل جوانه و خوشه سفیدی با دانه‌های چروکیده پدیدار می‌شود (Ribichich et al., 2000).

گوناگونی رخ‌مانه‌ای (فنتویی) بالایی از نظر ساختن رنگ‌دانه، شکل پرگنه و تولید اسپور در میان جدایه‌های *F. culmorum* گزارش شده است (Puhalla, 1981). همچنین گوناگونی فراوانی از نظر توان ته‌اجمی، نوع و مقدار تولید مایکوتوکسین‌ها در میان جدایه‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق گوناگون جغرافیایی بوده است (Akinsmani et al., 2006). قارچ *F. culmorum* به‌دلیل توانایی تولید

ژنتیکی جمعیت‌ها با میانگین ۰/۴۷ میان ۰/۳۵۵ و ۰/۵۶۱ متغیر بود (Pozeshimiab *et al.*, 2012). در پژوهش دیگری روی ۴۹ جدایه *F. culmorum* جمع‌آوری شده از ورامین با به‌کارگیری هشت نشانگر ریزماهوره SSR، پنج گروه گوناگون ژنتیکی با میانگین ۳/۷۵ آلل در هر ژنگاه آشکار گردید (Pozeshimiab *et al.*, 2014).

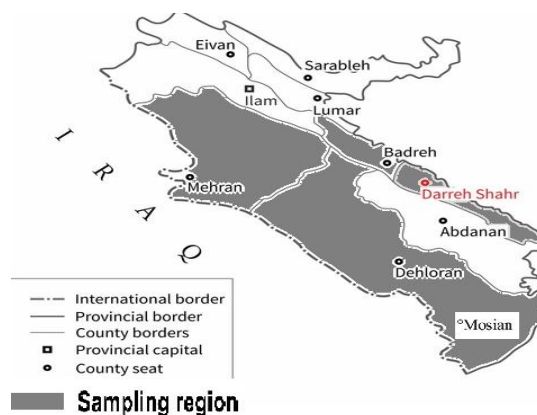
هدف از انجام این پژوهش بررسی گوناگونی ژنتیکی جدایه‌های مختلف *F. culmorum* به‌عنوان عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در بخش‌های گوناگون کشت گندم در استان ایلام به کمک نشانگر مولکولی SSR است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در سال زراعی ۱۳۹۳-۱۳۹۴ نمونه‌برداری در مزرعه‌های گندم بخش‌های گوناگون استان ایلام از جمله مهران، دهلران، دره‌شهر و موسیان انجام شد (شکل ۱). مزرعه‌های گندم در مرحله رسیدن گندم به‌طور تصادفی به فاصله پنج کیلومتر از هم گزینش شدند. در هر مزرعه به‌صورت زیگزآگ، از چهار نقطه به فاصله ۱۰۰ متر از همدیگر، نمونه‌برداری شد. در هر نقطه گیاهانی که نشانه‌های سفید شدن سنبله‌ها را نشان می‌دادند، جمع‌آوری و به آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه ایلام منتقل و در آزمایشگاه نمونه‌های آلوده تا هنگام جداسازی قارچ، در پاکت‌های کاغذی در چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

و تکرارپذیری بالا از مناسب‌ترین و کامل‌ترین ابزارهای مولکولی در بررسی گوناگونی ژنتیکی میان ژن‌مانه‌های بسیار نزدیک به هم به شمار می‌آیند. در بخش‌های گوناگون جهان برای بررسی گوناگونی ژنتیکی این قارچ از نشانگرهای مولکولی متفاوتی استفاده شده است. برای برآورد گوناگونی ژنتیکی ۱۸ جدایه جمع‌آوری شده از بخش‌های گوناگون کشور هلند، از نشان‌گر RAPD استفاده شده است (De Nijs *et al.*, 1997). در این بررسی تنها دو نوع ژن‌مانه در میان جدایه‌ها شناسایی شد. در بررسی دیگری گوناگونی ژنتیکی میان جمعیت‌های *Fusarium graminearum* و *F. culmorum* جمع‌آوری شده از بخش‌های گوناگون فرانسه با به‌کارگیری هشت ریزماهوره طراحی شده برای *F. culmorum* مورد بررسی قرار گرفته است (Giraud *et al.*, 2002). در پژوهشی دیگر، برای بررسی گوناگونی ژنتیکی ۷۵ جدایه *F. culmorum* از نشان‌گر ISSR استفاده شده است که ۵۹ ژن‌مانه گوناگون قارچ در هفت شاخه گروه‌بندی شدند (Mishra *et al.*, 2003). با به‌کارگیری rep-PCR، سطح بالایی از گوناگونی ژنتیکی (۵۲/۳ درصد) در میان ۱۴ جدایه *F. culmorum* جمع‌آوری شده از بخش‌های گوناگون ترکیه گزارش شد (Gurel *et al.*, 2010). در ایران گوناگونی ژنتیکی ۸۸ جدایه *F. culmorum* جمع‌آوری شده از بخش‌های شمال و شمال غربی با به‌کارگیری هشت نشانگر ریزماهوره SSR، مورد بررسی قرار گرفت و ۳۳ آلل در میان جدایه‌ها تشخیص داده شد و همچنین گوناگونی



شکل ۱. موقعیت جغرافیایی بخش‌های نمونه‌برداری شده روی نقشه استان ایلام
Figure 1. Geographical origins of sampling regions on the map of Ilam province

DNA، چند قطعه از محیط کشت دربرگیرنده میسلیوم جدایه‌های قارچی رشد داده شده روی محیط سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) به ظرف‌های ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتر دربرگیرنده ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع سیب‌زمینی-دکستروز (PDB) منتقل شد. ارلن‌ها دربرگیرنده قارچ برای زمانی برابر ۷-۱۰ روز در انکوباتور شیکردار (۱۳۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سلسیوس) قرار داده شدند. سپس میسلیوم به دست آمده با به‌کارگیری کاغذ صافی واتمن و پمپ خلأ جدا و با آب مقطر سترون شستشو داده شد تا باقی‌مانده محیط مایع از روی سطح آن شسته شود. بافت‌های میسلیومی قارچ در ویال‌های شیشه‌ای جمع‌آوری شده و در یخ‌زن در دمای ۲۰- درجه سلسیوس برای کاربردهای پس‌از آن نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی جدایه‌ها برابر روش بر پایه CTAB انجام شد (Doyle & Doyle, 1990). برای بررسی کیفیت و کمیت DNA، پنج میکرولیتر از محلول DNA با دو میکرولیتر بافر رنگ 6X (۲۵ درصد برموفنول بلو، ۲۵۰ درصد زایلن سیانول FF و ۳۰ درصد گلیسرول) آمیخته شد و در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. پدیدار شدن نوارهای DNA آشکار و واضح نشان‌دهنده این بود که DNA از لحاظ کیفی و کمی برای انجام آزمایش‌های بعدی مناسب است.

بررسی گوناگونی ژنتیکی قارچ *F. culmorum* با به‌کارگیری نشانگر ریزماهوره SSR برای انجام دادن واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) و آشکار ساختن گوناگونی ژنتیکی جدایه‌های *F. culmorum* با به‌کارگیری نشانگر ریزماهوره SSR، نخست پنج جفت آغازگر ریزماهوره اختصاصی که چندشکلی بالایی داشتند، به‌کار گرفته شدند (Giraud *et al.*, 2002) (جدول ۲). حجم واکنش PCR به اندازه ۲۵ میکرولیتر برای هر نمونه بود. ماده‌ها و ترکیب‌های استفاده شده دربرگیرنده بافر 10X PCR به اندازه ۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) به اندازه ۱/۵ میکرولیتر، dNTP ۱۰ میلی‌مولار به اندازه ۰/۹ میکرولیتر، از هر جفت آغازگر رفت‌وبرگشت با غلظت ۱۰ میکرومولار، به هر کدام به اندازه یک میکرولیتر

جداسازی و شناسایی قارچ *F. culmorum*

نخست ریشه‌های نمونه‌های جمع‌آوری شده با آب شستشو داده شدند و پس از گندزدایی سطحی با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد و شستشو با آب مقطر سترون روی کاغذ صافی خشک گردیدند و در پتری دیش‌های دربرگیرنده محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار تحت شرایط سترون کشت داده شدند. کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای زمانی برابر هفت روز در انکوباتور نگهداری شدند. پس از شکل‌گیری پرگنه قارچ عامل بیماری، پرگنه‌های تشکیل شده در محیط کشت به محیط‌های تازه PDA انتقال داده شدند. سپس جدایه‌های خالص به روش تک اسپور آماده شدند و در تشتک‌های پتری و لوله‌های آزمایش دربردارنده کشت PDA برای پژوهش‌های پس‌از آن نگهداری شدند. همچنین برای تولید ماکرو کنیدی و انگیزش اسپورزایی، از محیط کشت برگ میخک آگار و محیط کشت مواد غذایی ویژه (Special Nutrient Agar) دربرگیرنده پتاسیم هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) ۱ گرم، پتاسیم نترات (KNO_3) ۱ گرم، منیزیم سولفات ۷ آبه ($MgSO_4$) ۰/۵ گرم، گلوکز ۰/۲ گرم، ساکارز ۰/۲ گرم و آگار-آگار ۲۰ گرم استفاده گردید. بر پایه ریخت‌شناسی گونه‌های *Fusarium* ارائه شده در (Lesli & Summurel, 2006) جدایه‌های قارچ *F. culmorum* شناسایی شدند. برای تأیید بیماری‌زایی جدایه‌ها آزمون بیماری‌زایی انجام گرفت. با توجه به برتر بودن جدایه‌های قارچ *F. culmorum* کارهای مولکولی بر پایه این جدایه‌ها انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱. ویژگی‌های جدایه‌های به‌دست آمده از بخش‌های گوناگون

Table 1. Characterization of the isolates obtained from different regions

Sampling region	No. Isolates	Isolates Code
Dehloran	16	FCDs (1-16)
Mosian	18	FCDm (17-34)
Mehran	16	FCDm (35-50)
Darehshahr	16	FCDa (51-66)

استخراج DNA جدایه‌ها

برای تهیه میسلیوم جدایه‌های قارچی برای استخراج

قارچ با به کارگیری نرم افزار Gen Alex Ver.6.5 انجام گرفت.

نتایج و بحث

از کشت نمونه‌های ریشه گندم با نشانه‌های لکه‌های قهوه‌ای، شمار ۶۶ جدایه *F. culmorum* به دست آمد. این گونه قارچی در محیط کشت PDA رشد سریعی داشته و میسلیوم‌های پنبه‌ای که بیشتر زرد کم‌رنگ هستند تولید می‌کند. رنگ‌دانه‌های کلنی در آگار به صورت گلی، خاکستری تا قرمز تیره مشاهده می‌شود (Saremi, 2006). این گونه از لحاظ شکل فیالیدها پلی‌فیالید است. ماکروکنیدی‌ها به صورت فراوان روی اسپورودوشیوم‌های زرد طلایی و یا نارنجی به وجود می‌آیند. میکروکنیدی در این گونه تشکیل نمی‌شود. کلامیدوسپورها به صورت تک یا گاهی خوشه‌ای تولید می‌شوند ولی در برخی جدایه‌ها تولید نمی‌شوند (Saremi, 2006). پس از آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها و جداسازی دوباره آن‌ها از روی گیاهان آزمایش‌شده برابر اصل کخ، بیماری‌زایی جدایه‌ها مورد تأیید قرار گرفت. سپس این جدایه‌ها برای بررسی گوناگونی ژنتیکی به یاری نشانگر ریزوماهواره SSR گزینش شدند. به منظور بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *F. culmorum*، جدایه‌ها در چهار جمعیت دهلران، موسیان، مهران و دره شهر قرار داده شدند. بیشترین شمار نوار به میزان ۶۶ عدد در جایگاه ژنی F10 و F6 و کمترین شمار نوار به میزان ۵۹ عدد در جایگاه F11 قرار داشت. با بررسی مقدار شناسه چندشکلی نشانگرها (PIC) آغازگر F3 با ۰/۴۰۹، بیشترین و آغازگر F11 با ۰/۱۷۹، کمترین میزان چندشکلی را دارا بودند (جدول ۲). میانگین شمار آلل‌های مشاهده شده (Na) در میان جمعیت‌ها ۱/۲۷۰ بود. میانگین گوناگونی ژنی (H)، ۰/۱۹۰ بود که بیشترین میزان آن در جمعیت دهلران و کمترین میزان آن در جمعیت جدایه‌های مهران (۰/۱۴۰) دیده شد. میزان شناسه شانون در سراسر جمعیت‌ها برابر ۰/۲۹۴ بود که بیشترین آن در جدایه‌های جمعیت دهلران (۰/۳۷۰) و کمترین آن در جدایه‌های جمعیت دره شهر (۰/۲۲۱) دیده شد (جدول ۳).

Taq DNA Polymerase (5u/μ) به اندازه ۰/۲ میکرولیتر، DNA ژنومی (۲۰ng/u) به اندازه ۲/۵ میکرولیتر و آب مقطر سترون ۱۵/۴ میکرولیتر در یک برنامه حرارتی برابر با دمای ذوب هر آغازگر، به صورت جداگانه انجام شد. برای دیدن فرآورده PCR، الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۹۰ ولت و برای زمانی برابر ۶۰ دقیقه انجام شد. برای این منظور، ۱/۵ گرم آگارز در ۱۰۰ میکرولیتر بافر (1X) TBE از راه گرما دادن حل شد. برای رنگ‌آمیزی ژل از محلول سیف آستین به اندازه سه میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آگارز پیش از انجام مراحل الکتروفورز استفاده شد. برای آشکار شدن نوارهای فرآورده PCR از دستگاه عکس‌برداری Gel Documentation مدل Intas استفاده شد.

تجزیه داده‌ها

به منظور تعیین میزان همانندی جدایه‌های *F. culmorum* نخست نوارهای آشکار در ژل‌ها مشخص شدند. سپس داده‌ها به صورت بودن نوار (۱) یا نبود نوار (۰) وارد نرم‌افزار Excel شدند. تجزیه خوشه‌ای به یاری نرم‌افزار NTSYS Version 2.02 و گروه‌بندی جدایه‌ها با به کارگیری نرخ همانندی جاکارد (Nie & Li, 1979)، بر پایه UPGMA و پیوست مجاور (Neighbor-joining) انجام گرفت. برای بررسی توان جداسازی نشانگرها، درون‌مایه اطلاعاتی چندشکلی (Polymorphic Information Content-PIC) هر نشانگر با به کارگیری نرم‌افزار Excel و برابر معادله زیر برآورد شد (Mohammadi, 2003):

$$PIC = 1 - \sum P^2 - q^2$$

در این معادله، P شمار کل افرادی که دارای نوار هستند به کل افراد است و q نیز از (1-q) به دست می‌آید. برای بررسی گوناگونی آلی در جدایه‌های مورد مطالعه از تجزیه به مختصات بنیادی (Principal Coordinate Analysis-PCOA) در راستای تکمیل تجزیه خوشه‌ای با به کارگیری نرم‌افزار NTSYS Version 2.02 انجام گرفت (Rohlf, 1990). همچنین تجزیه واریانس مولکولی داده‌ها برای آشکار ساختن میزان گوناگونی ژنتیکی درون و میان جمعیت‌های

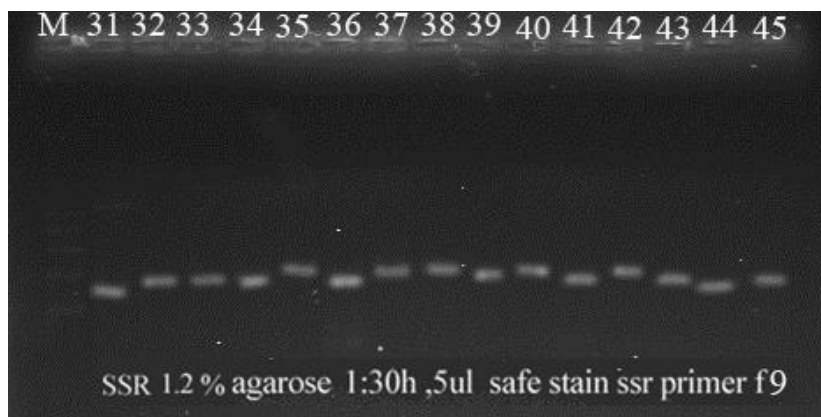
با هم‌سنجی فاصله ژنتیکی دوبه‌دوی جمعیت‌های قارچ *F. culmorum* آشکار شد که بیشترین فاصله ژنتیکی با میزان ۰/۱۰۹۶ میان جمعیت موسیان و دهلران دیده شد و کمترین فاصله ژنتیکی با میزان ۰/۰۵۳۴ در میان جمعیت‌های دره‌شهر و دهلران دیده شد سیروان مشاهده شد (جدول ۴).

میزان گوناگونی کل (Ht) و گوناگونی جمعیت‌ها (Hs) به‌ترتیب ۰/۲۴۱۴ و ۰/۱۹۰۳ به‌دست آمد. همچنین میزان جریان ژنی (Nm) ۱/۸۶۴۱ برآورد گردید. تمایز ژنتیکی (Gst) در این پژوهش ۰/۲۱۱۵ مشاهده گردید. میزان جریان ژنی در این پژوهش بالا است و این همانندی ژنتیکی بالا میان جدایه‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۲. ویژگی‌های آغازگرهای ریزماهوره مورد استفاده برای بررسی جدایه‌های *Fusarium culmorum*

Table 2. Characterization of SSR primers used in this study for *Fusarium culmorum* isolates

Primer	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	Band size	Annealing temperature	Frequency of polymorphic Alleles	PIC
F3	(CA)11	F: CATATTCAACCGACCCACAA R: TTGAATGATAAG GGCGACGG	200-250	53	3	0.409
F6	(AC)15	F: TATTTTCGTGCAAGGACTTGG R: CTTGGTCCCTGGATATCGAA	100-200	51	4	0.357
F9	(AC)13	F: CGAGCTAATGGTGGCAGGAT R: AACACCAAAACGGCTCATCG	100-500	50	8	0.239
F10	(AAG)28	F: AAG R: CGCCAACAGAGATGACGA R: GACTGCCGAAACACCGAAA	150-250	55	5	0.299
F11	(GT)9	F: CAGTCTTGGTTCGCTCATCAG R: CAGGTTGGCAGCTTCTTAA	300-400	52	5	0.179



شکل ۲. نواریهای DNA برآمده از PCR ناشی از تکثیر آغازگر F9 در قارچ *F. culmorum* (خط ۳۱-۴۵ نشان‌دهنده جدایه‌ها، M نشان‌دهنده Ladder)

Figure 2. Bands resulting from the amplification of the PCR product of *F. culmorum* with F9 (Line 31-45 isolates, M: Ladder size marker 1kb)

جدول ۳. برآورد گوناگونی ژنتیکی در جمعیت‌های قارچ *F. culmorum* بر پایه جایگاه ریز ماهوره

Table 3. Genetic diversity estimates for *F. culmorum* populations based on the microsatellite loci

Population	Na	Ne	I	H
Dehloran	1.680	1.390	0.370	0.238
Mosian	1.200	1.296	0.275	0.179
Mehran	1.00	1.211	0.221	0.140
Darehshahr	1.200	1.344	0.309	0.205
Mean	1.270	1.310	0.294	0.190

شمار آلل‌های مشاهده شده = Na، شمار آلل‌های مؤثر = Ne، نرخ شانون = I، گوناگونی ژنی = H

Na = The number of observed alleles, Ne = The number of effective alleles, I = Shannon Indicator, H = Gene variety.

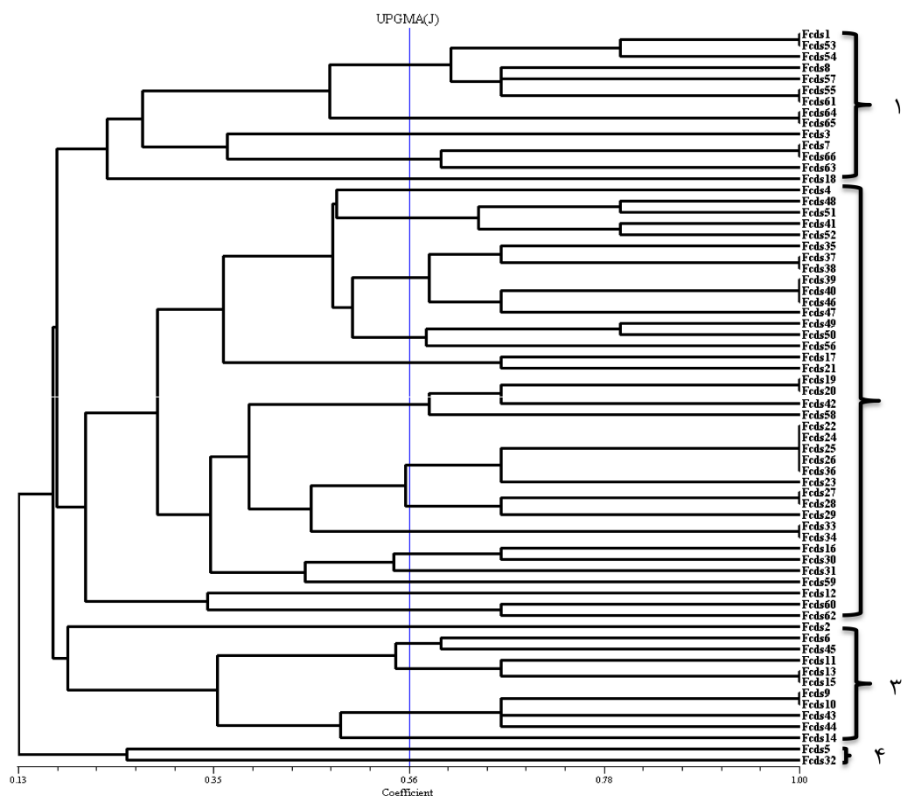
جدول ۴. فاصله ژنتیکی میان زوج جمعیت‌های *Fusarium culmorum*

Table 4. Genetic distance between pairs of *Fusarium culmorum* populations

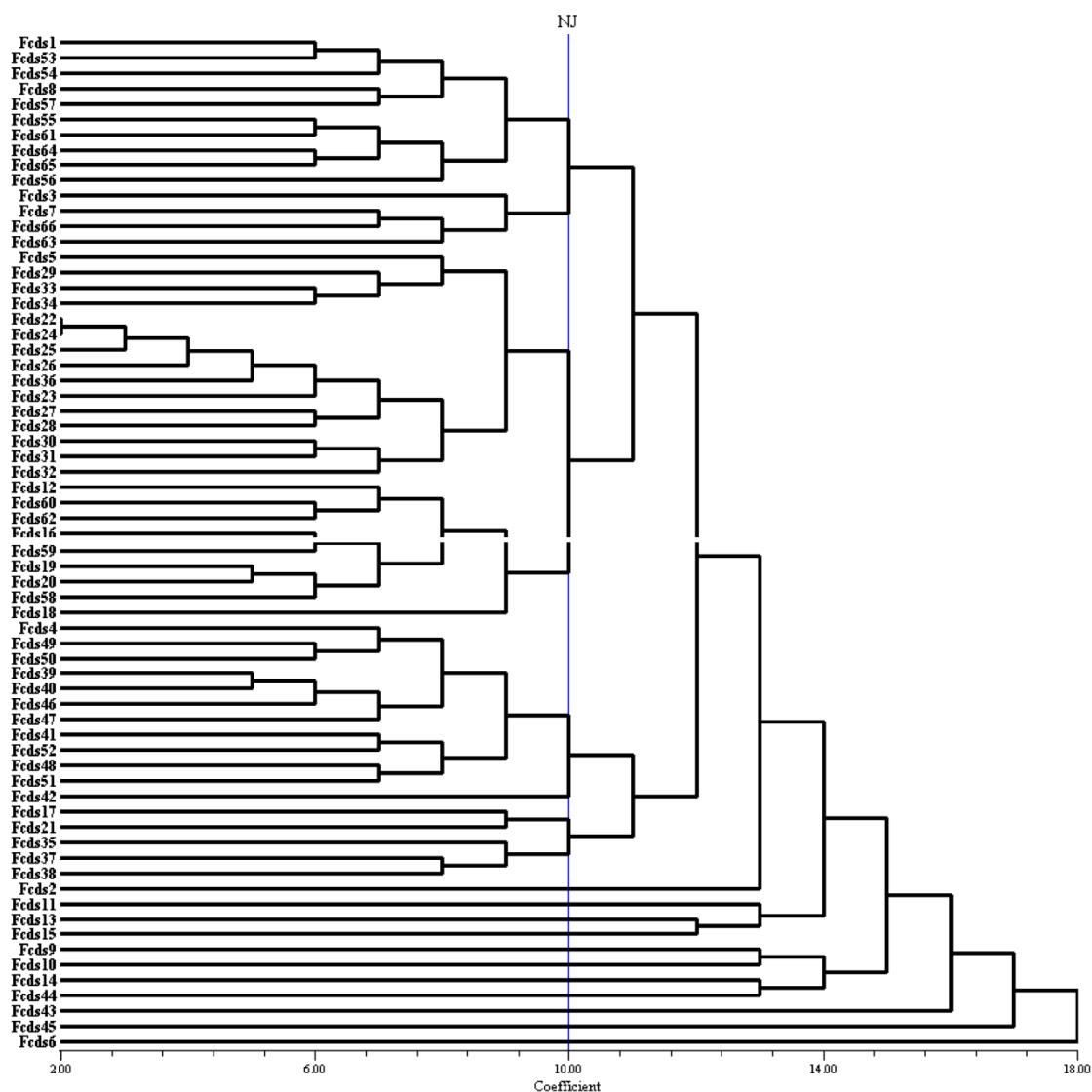
Population	Dehloran	Mosian	Mehran	Darehshahr
Dehloran				
Mosian	0.1096			
Mehran	0.0705	0.0965		
Darehshahr	0.0534	0.0947	0.0980	

میزان همانندی ژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه با به‌کارگیری الگوریتم‌های UPGMA و پیوست مجاور بررسی شدند. جدایه‌ها بر پایه نرخ همانندی جاکارد (Jaccard) مورد بررسی قرار گرفتند. در این دندروگرام جدایه‌ها در سطح همانندی ۵۶ درصد و بر پایه شمار خوشه‌های به‌دست‌آمده در چهار گروه قرار گرفتند (شکل ۳). این دندروگرام شامل گروه یک با ۱۴ عضو، گروه دو با ۳۹ عضو، گروه سه با ۱۰ عضو و گروه چهار با دو عضو است. همچنین برای نشان دادن گوناگونی و تأیید گروه‌های مختلف در میان جدایه‌های منطقه‌های گوناگون، جدایه‌ها در دندروگرام دیگری بر پایه الگوریتم پیوست مجاور و فاصله ژنتیکی ۱۰ در ۱۸

گروه جدا قرار گرفتند (شکل ۲). این دندروگرام دربرگیرنده یک گروه ۱۰ عضوی، یک گروه چهار عضوی، یک گروه ۱۵ عضوی، یک گروه نه عضوی، یک گروه ۱۱ عضوی، یک گروه پنج عضوی و ۱۲ گروه تک عضوی است. در این دندروگرام Fcfs22 و Fcfs24 از جمعیت موسیان ۱۰۰ درصد همانندی ژنتیکی مشاهده شد. قرار گرفتن جدایه‌های یک منطقه جغرافیایی در دو گروه مستقل و جدایه‌های منطقه‌های گوناگون در یک گروه روشنگر این مطلب است که عامل منطقه جغرافیایی باوجود سودمند بودن در گروه‌بندی جدایه‌ها نمی‌تواند به‌عنوان فاکتور کامل مستقل در این زمینه مورد استفاده قرار گیرد، زیرا زیر فشار گزینشی میزبان و جهش ژنتیکی است.



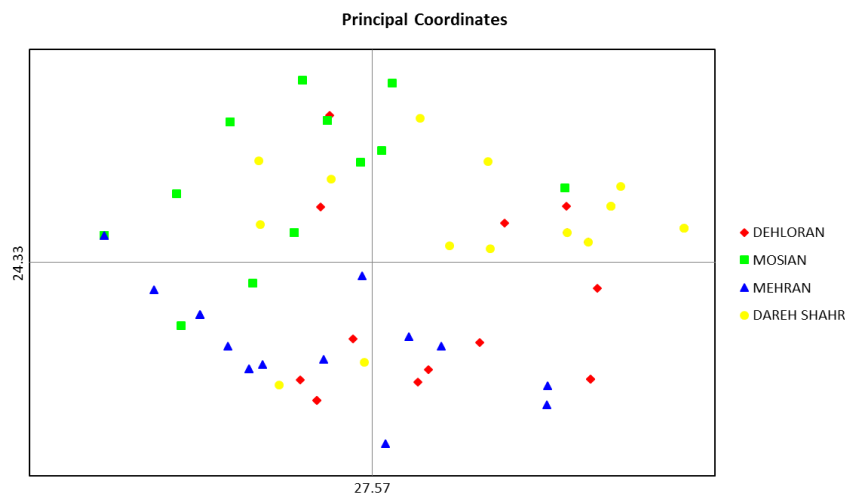
شکل ۳. خوشه‌بندی ژنتیکی جدایه‌های *F. culmorum* بر پایه نشانگر SSR به روش UPGMA
Figure 3. Genetic clustering of *F. culmorum* isolates based on SSR and the UPGMA method



شکل ۴. خوشه‌بندی ژنتیکی جدایه‌های *F. culmorum* بر اساس نشانگر SSR به روش پیوست مجاور
 Figure 4. Genetic clustering of *F. culmorum* isolates based on SSR and the Neighbor-joining method

یک و دو، ۵۱/۹ درصد از دگرگونی‌ها را توجیه می‌کنند. مؤلفه نخست ۲۴/۳۳ درصد از دگرگونی‌ها را توجیه می‌کند و مؤلفه دوم ۲۷/۵۷ درصد از دگرگونی‌ها باقی‌مانده که بدست مؤلفه نخست توجیه نشده را توجیه می‌کند (شکل ۵). پراکنش جمعیت‌ها در همگی محورهای مختصات معرف گوناگونی ژنتیکی بالای جدایه‌ها است. با آگاهی به برآیندهای برآمده از تجزیه خوشه‌ای بر پایه نرخ جاکارد و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی جدایه‌های بررسی شده می‌توان به این دست‌آورد رسید که نشانگر SSR روش سودمندی در بررسی گوناگونی ژنتیکی در جدایه‌های *F. culmorum* است.

تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) یک روش آماری چند متغیره همانند تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در مورد داده‌های کمی است که در گوناگونی ژنتیکی کاربرد فراوانی دارد. به نظر می‌رسد این روش در تمایز میان گروه‌های اصلی سودمند باشد، درحالی‌که تجزیه خوشه‌ای وضوح بیشتری میان جمعیت‌های نزدیک به هم را نشان می‌دهد (Abdel-Satar *et al.* 2003). بر پایه دو محور (بای پلات) از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی جدایه‌ها بررسی شدند. این نمودار پراکنش جمعیت‌ها را نشان می‌دهد و جدایه‌ها را می‌توان در چندین گروه به تفکیک مشاهده کرد. بر این پایه مجموع دو مؤلفه



شکل ۵. نمودار دوبعدی تجزیه به مختصات اصلی وابستگی ژنتیکی جدایه‌های *F. culmorum*
Figure 5. 2D Plot of principal coordinates analysis (PCO) of genetic relationships between *F. culmorum* isolates

(al., 2011). در پژوهشی دیگر و بررسی ۶۴ جدایه با به‌کارگیری نه جایگاه ریزماهوره، ۷۱ آلل تکثیر شد. در این پژوهش بیشترین گوناگونی ژنتیکی درون جدایه‌های منطقه‌ای دیده شد و به همان نسبت سطح‌های پایینی از گوناگونی ژنتیکی در میان چهار منطقه مورد مطالعه شناسایی شد (Bogle, 2006). ساختار ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی *F. culmorum* عامل پوسیدگی ریشه و بیماری بلایت گندم هنوز تجزیه و تحلیل نشده است (Meidaner et al., 2013). تجزیه و تحلیل DNA با به‌کارگیری نشانگر مولکولی RAPD (De Nijs et al., 1997) و چندشکلی قطعه‌های برش یافته طولی (RFLP) (Nicolson et al., 1993)، نشان داده است که گوناگونی ژنتیکی میان‌های در میان جدایه‌های *F. culmorum* وجود دارد. با این حال، تجزیه و تحلیل ISSR درجه بالایی از چندشکلی را در جدایه‌های *F. culmorum* نشان داده است (Mishra et al., 2003). با به‌کارگیری نشانگر RAPD گوناگونی ژنتیکی بالایی در جمعیت‌های *F. culmorum* روسیه مشاهده شده است (Meidaner et al., 2001). در این پژوهش برای بررسی گوناگونی ژنتیکی قارچ عامل پوسیدگی طوقه و ریشه گندم از نشانگر ریزماهوره SSR استفاده شد. از لحاظ جغرافیایی در میان جدایه‌ها، در جدایه‌های موسیان بیشترین گوناگونی ژنتیکی مشاهده شد. عامل‌های

برای بررسی سهم گوناگونی آلی (واریانس) درون و میان جمعیت‌ها تجزیه واریانس مولکولی با نرم‌افزار Gen Alex Ver. 6.5 انجام گرفت. نتیجه‌های جدول تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۷۸ درصد از گوناگونی ژنتیکی مشاهده شده در میان همگی جمعیت‌ها مشترک بوده و ۲۲ درصد از تجزیه واریانس مولکولی آلل‌های شناسایی شده ویژه جمعیت‌ها یا منطقه‌های گوناگون جغرافیایی بود. این نتیجه نشان می‌دهد که افراد درون جمعیت‌ها از لحاظ ژنتیکی نزدیک هستند. علت این همانندی ژنتیکی بالا را می‌توان به عامل‌های تأثیرگذار در دگرگونی‌های ژنتیکی از جمله جریان ژنی (Gen flow) نسبت داد. نتیجه‌ها نشان داد که سطح بالایی از گوناگونی ژنتیکی درون جمعیت‌ها بود و همه پنج ژنگاه در میان ۶۶ جدایه دارای چندشکلی بودند. این سطح بالای گوناگونی ژنتیکی در میان ۱۴ جدایه *F. culmorum* از بخش‌های گوناگون ترکیه مشاهده شده است (Gurel et al., 2010).

در بخش‌های گوناگون جهان پژوهش‌های مختلفی در این باره گزارش و سطح‌های مختلفی از گوناگونی نشان داده شده‌اند. گوناگونی ژنتیکی جمعیت قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* در میان ۵۰ جدایه از هند با به‌کارگیری نشانگر SSR در سال ۲۰۱۱ بررسی شد که ۲۶ آلل شناسایی شد (Datta et al., 2011).

مزارع شوند (Nourollahi & Shahbazi, 2015, 2014). خاکزاد بودن قارچ عامل بیماری‌زا و این‌که اصولاً قارچ‌های خاکزاد هرکدام جایگاه‌های بوم‌شناختی ویژه‌ای را اشغال می‌کنند، دلیل این نتیجه‌گیری است و همچنین رخداد ژن‌مانه‌های تازه می‌تواند به دلیل فرآیندهای فیلوژئوگرافیک (Carbone, 2001) یا افزایش کشت گندم (Hambelton, 2002) و یا نتیجه جنبش *F. culmorum* از چند گیاه میزبان به درون این محصول باشد. قارچ *F. culmorum* بذر زاد است (Polley & Turner, 1995) و گیاهان دیگر هم میزبان این قارچ هستند و به این صورت در بخش‌های گوناگون استان ایلام پخش می‌شود و این می‌تواند، همانندی ژنتیکی بالای میان جمعیت‌های دره‌شهر و دهلران (۰/۵۳۴) را توجیه کند. قارچ *F. culmorum* هموتالیک است و هیچ مرحله جنسی برای آن شناخته نشده است و آنالیزهای جمعیتی نشان می‌دهد که شاید نوترکیبی بخش برجسته‌ای از چرخه زندگی قارچ است (Toth et al., 2004).

ممکن برای ایجاد گوناگونی ژنتیکی بالا در جمعیت‌های *F. culmorum* می‌توانند جهش، نوترکیبی غیرجنسی یا جریان ژنی باشند (Miedaner et al., 2008). درباره چهار جمعیت *F. culmorum* نمونه‌برداری شده از استان ایلام جریان ژنی بالایی (۱/۸۶۴) مشاهده شد، اما این‌که این جریان ژنی دست‌آورد نوترکیبی یا جریان ژن‌مانه‌ای و جابجایی کل ژن‌مانه‌ها باشد، آشکار نیست (Scott & Chakraborty, 2010). بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۰۹۶) میان جمعیت‌های موسیان و دهلران بود (جدول ۴). در جمعیت‌های تحت بررسی در این پژوهش تمایز ژنتیکی پایینی وجود داشت. چندین عامل ممکن است عامل این تمایز پایین باشد. فاصله جغرافیایی میان جمعیت‌ها زیاد نبوده و همین فاصله ممکن است باعث نقل‌وانتقال بیماری از راه جابه‌جایی بقایای گیاهی آلوده و بذر آلوده گردد. مبادله بذر آلوده به این بیماری شاید مهم‌ترین عامل به حساب آید و این بذرها ممکن است دارای درجه‌هایی از آلودگی باشند و باعث گسترش بیماری و برپایی آلودگی در

REFERENCES

1. Abdei-Satar, M. A., Khalil, M. S., Mohamed, I. N., Abdel-Salam, K. A. & Andverret, J. A. (2003). Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. *African Journal of Biotechnology*, 2, 51-55.
2. Akinsmani, O. A., Backhouse, D., Simpfendorfer, F. & Chakraborty, S. (2006). Pathogenic variation *Fusarium* isolates associated with head blight of wheat in Australia. *Journal of Phytopathology*, 154, 513-521.
3. Bogale, M. (2006). *Molecular characterization of Fusarium isolates from Ethiopia*, Ph.D. thesis, Pretoria University, Pretoria, South Africa.
4. Carbone, I. & Kohn, L. M. (2001). A microbial population species interface nested cladistics and coalescent inference with multilocus data. *Molecular Ecology*, 10, 947-967.
5. Corzza, L., Balmas, V., Santori, A., Vitale, S., Luongo, M. & Maccaroni, M. (2002). Head blight and foot rot of wheat in Italy. *Petria*, 12, 25-36.
6. Datta, S., Choudhary, R. G., Shamim, M. D., Singh, R. K. & Dhar, V. (2011). Molecular diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* inciting wilt disease in lentil (*Lens culinaris* Medik). (2011). *African Journal of Biotechnology*, 10, 7314.
7. Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium mycotoxines: chemistry, Genetics and biology*. APS press, st, Paul, Minnesota, USA.
8. De Nijs, M., Larsen, J. S., Gams, W., Rombouts, F. M. & Wernarsand, U. (1997). Variation in random amplified polymorphic DNA patterns and secondary metabolite profiles within *Fusarium* species from cereals from various parts of The Netherlands. *Food Microbiology*, 14, 449-457.
9. Draper, M. A. (2000). *Common root and crown rots of wheat in South Dakota*. Plant science Department South Dakota state University. (SDSU). 3PP.
10. FakhFakh, M. M., Yahyaoui, A., Rezzgui, S., Elias, E. M. & Daaloul, A. (2011). Identification and Pathogenicity assessment of *Fusarium* spp. Sampled from durum wheat fields in Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10(34), 6529-6539.
11. Giraud, T., Fournier, E., Vautrin, D., Solignac, M., Vercken, E., Bakan, B. & Brygoo, Y. (2002). Isolation of eight polymorphic microsatellite loci using enrichment protocol in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. *Molecular Ecology Notes*, 2, 121-123.

12. Gurel, F. G., Albayrak, O., Diken, E. & Tunlai, B. (2010). Use of REP-PCR for genetic diversity analyses in *Fusarium culmorum*. *Journal of phytopathology*, 92, 781-789.
13. Hambelton, S., Walker, C. & Kohn, L. M. (2002). Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. *Canadian Journal of plant pathology*, 24, 309-315.
14. Khodabandeh, N. (2005). *The cultivations of crops*. Sepehri Press. (in Farsi)
15. Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual* (P. 388). Iowa, Blackwell Publishing.
16. McDonald, B. A. (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87, 448.
17. Miedaner, T., Schllind, A. G. & Geiger, H. H. (2001). Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in population of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* sampled from wheat filed in different countries. *Journal of Phytopathology*, 149, 641-642.
18. Miedaner, T., Cumagun, C. J. R. & Chakraborty, S. (2008). Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 156, 129-139.
19. Miedaner, T., Caixeta, F. & Talas, F. (2013). Head-blighting populations of *Fusarium culmorum* from Germany, Russia, and Syria analyzed by Microsatellite markers show recombining structure. *European Journal of Plant Pathology*, 137(4), 743-752.
20. Mishra, P. K., Fox, R. T. V. & Cutham, A. (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.
21. Mohammadi, S. A. & Prassana, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant, salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 1235-1248.
22. Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106, 283-292.
23. Nei, M. & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of sciences, USA*, 76, 5267-5273.
24. Nicolson, P., Jenkinson, P., Rezanoor, H. N. & Parry, D.W. (1993). Restriction fragment length analysis of variation in *Fusarium* species causing ear blight of cereals. *Plant Pathology*, 42, 905-914.
25. Nourollahi, Kh., Haghi Z. & Mehrabi oladi, A. A. (2014). Study of genetic diversity of *Fusarium verticillioides* isolates the causal agent of crown and root rot in rice in Ilam province using SSR marker. *Iranian journal of plant protection science*, 45 (1), 29-37. (in Farsi)
26. Nourollahi, Kh. & Shahbazi, M. (2015). Study on genetic structure of *Pyrenophora graminea* populations the causal agent of barley leaf stripe disease using ISSR marker. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 46(1), 161-177. (in Farsi)
27. Polley, R. W. & Turner, J. A. (1995). Surveys of stem base diseases and *Fusarium* ear diseases in winter wheat England, Wales and Scotland, 1989-90. *Annals of Applied Biology*, 126, 45-49.
28. Pouzeshimiab, B., Razavi, M., Zamanizadeh, H. R., Zare, R. & Rezaee, S. (2014). Comparison of genetic diversity and pathogenicity among *Fusarium culmorum* isolates, the causal agent of wheat root and crown rot disease in Varamin fields. *Entomology and Phytopatology*, 82(1), 67-80. (in Farsi)
29. Pouzeshimiab, B., Razavi, M., Zare, R., Zamanizadeh, H. R., Rezaee, S., Safaee, D. & Nicol, J. (2012). Taxonomy and distribution of *Fusarium* spp. Associated with root and crown rot of wheat in Iran. In: *1st International crown rot Workshop for wheat Improvement, NSW, Australia*, 85, 31.
30. 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., Cook, R. J. Pennsylvania USA, The Pennsylvania State University Press.
31. Ravanlou, A. & Banihashemi, Z. (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.
32. Ribichich, K. F., Lopez, S. E. & Vegetti, A. C. (2000). Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Plant Disease*, 84(7), 794-802.
33. Rolhf, F. J. (1990). *NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariant analysis system*. Version 2.02. Applied Biostatistics. New York.
34. Safaee, D., Younesi, H. & Sheikholeslami, M. (2012). *Fusarium* species that root and crown rot of wheat in Kermanshah province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 2, 89-91.
35. Saremi, H. (2006). *Fusarium, biology, ecology and taxonomy*. Jihad Daneshgahi Press, 164 pp. (in Farsi)
36. Saremi, H., Ammarlou, A. & Jafary, H. (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.
37. Scherm, B., Balmas, V., Sponu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasqualis, M. & Migheli, Q. (2013). *Fusarium culmorum*, causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 14, 323-341.

38. Scott, J. B. & Chakraborty, S. (2010). Genotypic diversity in *Fusarium pseudograminearum* populations in Australian wheat fields. *Plant Pathology*, 59, 338-347.
39. Smiley, R. & Whittaker, R. (2004). *Lesion nematodes reduce yield in Annual spring wheat*. Columbia basin Agricultural research center annual report in cooperation with USDA. Agricultural research center. 10pp.
40. Toth, B., Mesterhazy, A., Nicolson, P., Teren, J. & Varga, J. (2004). Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 587-599.