Archive of SID

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۸ (ص ۷۳-۶۱)

Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 50, No 1, Spring & Summer 2019 (61-73)
DOI: 10.22059/ijpps.2018.235101.1006790

معرفی گونه‌های قارچ *Fusarium* همراه بذر برنج در استان‌های فارس و خوزستان

وحید خسروی[1]، محمد جوان‌نیکخواه[2*]، حسین صارمی[2]، شهرام نعیمی[3] و رسول زارع[4]

۱. دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج و مربی مؤسسهٔ تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل

۲. استاد، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳. استادیار بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

٤. استاد بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۳/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۱۹)

چکیده

در جریان بازدید از شالیزارهای برنج استان‌های فارس و خوزستان در مرحلهٔ سفت شدن دانه، ٤۲ نمونه بذر گردآوری شد. برای جداسازی *Fusarium* از نمونه‌ها، بذرها روی محیط غذایی اختصاصی فوزاریوم (Pepton-PCNB-Agar, PPA) به دو روش ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱درصد و بدون ضدعفونی کشت و در انکوباتور (اتاقک رشد) با دمای ۱±۲۵ درجهٔ سلسیوس و نور متناوب (روشنایی و تاریکی) نگهداری شدند. ۲٦ جدایه بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی روی محیط‌های کشت PDA، CLA و SNA و استفاده از منابع معتبر شناسایی شد. همچنین ارزیابی فیلوژنیک (تبارزایی) ۱۸ و ٦ جدایهٔ منتخب بر اساس توالی ناحیهٔ ژنی TEF1-α و توالی نوکلئوتیدی ناحیهٔ ITS انجام گرفت. نتایج نشان داد، جدایه‌های *Fusarium* مورد بررسی، متعلق به دو گونهٔ مرکب FIESC (*Fusarium incarnatum*-equiseti species complex) و GFSC (*Gibberella fujikuroi* species complex)، به ترتیب با فراوانی۵۰ و ٤٦ درصد بودند. *F. fujikuroi* در استان فارس و *F. semitectum* در استان خوزستان بیشترین فراوانی را داشتند. در این تحقیق دو گونهٔ *F. fujikuroi* و *F. andiyazi* متعلق به گونهٔ مرکب GFSCبر اساس توالی ژن *TEF1-α*، در دو کلاد مجزا تفکیک شدند. توالی‌یابی ناحیهٔ ژنی TEF1-α برای تفکیک و شناسایی اعضای گونهٔ مرکب GFSC مفید است اما توالی ناحیهٔ ITS نتوانست این گونه‌ها را شناسایی و از همدیگر تفکیک کند. تک جدایهٔ *F. merismoides* که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی شناسایی شد، توسط توالی ژن *TEF1-α* شناسایی نشد اما در درخت فیلوژنیک رسم‌شده بر اساس توالی ناحیهٔ ITS از جنس *Fusarium* تفکیک و به جنس *Fusicolla* و گونهٔ *F. acetilerea* منتقل شد.

واژه‌های کلیدی: بذرزاد، بیمارگر، فلور قارچی، فیلوژنی.

Fusarium species associated with rice seed in Fars and Khuzestan provinces, Iran

Vahid Khosravi[1], Mohammad Javan-Nikkhah[2*], Hosein Saremi[2], Shahram Naeimi[3] and Rasoul Zare[4]

1. Ph.D. Candidate, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources,University of Tehran, Karaj, Iran, and Instructor of Rice Research Institute, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Amol, Iran
2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources,University of Tehran, Karaj, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biological Control Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
4. Professor, Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

(Received: Jun. 7, 2017 - Accepted: Jun. 9, 2018)

ABSTRACT

During survey of rice fields in Fars and Khuzestan provinces at mature grain stage, 42 seed samples were collected. *Fusarium* isolates were obtained from these samples by planting seeds on selective *Fusarium* medium (Pepton-PCNB-Agar, PPA) by two methods *i.e.*; surface sterilization by sodium hypochlorite (NaClO 1%) and without disinfection. Cultivated samples were kept in incubator at 25±1° C and intermittent light (12 hours of light and 12 hours of darkness). Morphological identification of 26 purified *Fusarium* isolates was performed on the WA, PDA, CLA and SNA. Phylogenetic relationships of 18 isolates on the basis of *TEF1-α* gene region and ITS1-5.8S-ITS2 region sequences were investigated. The results revealed that *Fusarium* isolates belonged to two species complexes FIESC (*Fusarium incarnatum*-equiseti species complex, 50%) and GFSC (*Gibberella fujikuroi* species complex, 46%). *Fusarium fujikuroi* species in Fars and *F. semitectum* species in Khuzestan were most frequent. Two species *F. fujikuroi* and *F. andiyazi* belonging to the GFSC species complex were identified in two separate clades in phylogentic tree based on *TEF1-α*. On the basis of *TEF1-α* gene, *F. merismoides* was not identified, but the ITS region sequence was identified as *Fusicolla acetilerea* and differentiated this species from *Fusarium* species in the phylogenetic tree.

Keywords: Mycobiota, seedborne, phylogeny, pathogen.

* Corresponding author E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

برنج به عنوان یکی از غلات مهم و ارزشمند، غذای اصلی بیش از ۶۰ درصد مردم جهان را تشکیل می‌دهد. شالی‌کاران پنج استان مازندران، گیلان، خوزستان، گلستان و فارس با تولید ۹۴/۲ درصد شلتوک کشور به ترتیب مقام‌های اول تا پنجم تولید شلتوک را دارند (Ahmadi *et al*., 2015). یکی از جنبه‌های مهم کیفیت بذر علاوه بر درصد جوانه‌زنی و خلوص بالا، عاری بودن از عوامل بیمارگر بذرزاد است (Diekmann, 1993). قارچ‌های همراه با بذر برنج، باعث کاهش توان جوانه‌زنی بذر، مرگ نشای برنج در خزانه، ایجاد بیماری‌هایی مانند پوسیدگی طوقه و ریشهٔ برنج، تولید زهرابه‌های قارچی که ممکن است به انسان و حیوانات اهلی آسیب بزنند و کاهش وزن هزاردانهٔ بذر شوند (Neergaard, 1986). بیش از ۸۰ گونهٔ قارچی همراه با بذرهای برنج معرفی شده است که حدود ۲۰ گونه، بیمارگر روی برنج هستند. البته همهٔ آن‌ها باعث بروز بیماری‌های قابل توجه در شالیزارها نمی‌شوند و راندمان (بازدهٔ) انتقال آن‌ها هم مشخص نیست (Mew & Gonzales 2002).

جنس *Fusarium* از قارچ‌های آسکومیست است که به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای گیاهان، حیوانات و انسان‌ها و تولیدکنندهٔ متابولیت‌های ثانویه که باعث مسمومیت ناشی از مصرف غذای آلوده توسط انسان‌ها و حیوانات دیگر می‌شود، شناخته شده است. اعضای این جنس از قارچ‌های متداول بوده و به‌عنوان بیمارگر، قارچ‌های درون‌رُست (endophyte) و گندرو از بسترهای مختلف در همهٔ نقاط جهان گزارش شده‌اند (Leslie & Summerell, 2013). شناسایی اعضای جنس *Fusarium*، از زمانی که این جنس برای اولین بار توصیف شده است تاکنون دشوار بوده است. مفاهیم گونه‌های مورفولوژیکی (ریخت‌شناختی)، بیولوژیکی (زیستی) و فیلوژنیک (تبارزایی) همگی در توصیف گونه‌ها مورد استفاده بوده‌اند و گونه‌هایی که می‌توانند با حداقل دو تا از این مفاهیم شناسایی شوند، صحت شناسایی‌شان بسیار قوی‌تر از آن‌هایی است که تنها بر اساس یک مفهوم شناسایی شده‌اند (Leslie & Summerell, 2013). روش‌های مولکولی مختلفی مانند DNA چندشکلی تکثیرشدهٔ تصادفی (RAPD)، چندشکلی طولی قطعه‌های تکثیرشده (AFLP) و غیره تا روش‌های جدیدتر مانند DNA microarrays، بارکدگذاری DNA و pyrosequencing برای ارزیابی‌های مولکولی *Fusarium* معرفی شده‌اند. مناطق هدف در ژنوم (ژنگان) که می‌توانند کاندیدای بالقوه برای تولید کاوشگر بوده، و برای بررسی فیلوژنی گونه‌های *Fusarium* قابل استفاده باشند نیز معرفی شده‌اند (Nayaka *et al*., 2011). ژن *TEF1-α* که یک بخش ضروری از ماشین ترجمهٔ پروتئین را کد می‌کند یک ابزار شناسایی تک جایگاه (single-locus) در فوزاریوم است. زیرا چندشکلی توالی زیادی را در مقایسه با بخش‌های غنی اینترونی ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین مانند کالمودولین، بتاتوبولین و هیستون H3، در میان گونه‌های مرتبط و نزدیک نشان می‌دهد. همچنین کپی‌های غیر راست‌نسخه (ارتولوگ) این ژن در جنس *Fusarium* شناسایی نشده‌اند و آغازگر عمومی برای آن طراحی شده است که در بررسی‌های فیلوژنیک جنس *Fusarium* کارایی دارد (Geiser *et al*. 2004). این ژن به‌طور گسترده برای تشخیص گونه‌های جنس *Fusarium* پذیرفته شده است (Benali *et al*., 2011). توالی این ژن در پایگاه داده‌های GenBank و پایگاه داده‌های تخصصی *Fusarium* (*Fusarium*-ID) در دسترس است (Geiser *et al*., 2004). در تحقیق دیگری روی فوزاریوم‌های بذرزاد برنج، از پنج نمونه بذر برنج از ایران، فقط گونهٔ *F.moniliforme* با درصد پایین مشاهده شد (Nath *et al*., 1970). گونه‌های *Fusarium* بذرزاد برنج، توسط محققان زیادی از کشورهای مختلف، ازجمله از سری‌لانکا (Jeyanandarajah & Seneviratne, 1991)، اندونزی (Supriama *et al*., 1980)، ایتالیا (Saponaro *et al*., 1986)، مالزی (Zianun & Nik, 1977)، پاکستان (Butt *et al*., 2011) و بنگلادش (Islam *et al*., 2012) گزارش شده‌اند. Amatullia *et al*. (2010)، ۱۴۶ جدایهٔ *Fusarium* را از گیاه برنج آلوده به بیماری باکانی و همچنین بذرهای برنج در ایتالیا جداسازی کردند. جدایه‌ها بر اساس توالی ژن *TEF1-α* شناسایی و

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری‌زایی آن‌ها بررسی شد. در آزمون بیماری‌زایی فقط جدایه‌های *F. fujikuroi* بیماری باکانی را با شدت‌های متفاوت ایجاد کردند. تجزیه‌وتحلیل فیلوژنیک بر اساس توالی *TEF1-α* درختی ترسیم نمود که گونه‌های *Fusarium* را در گروه‌های مختلف با ارزش اعتبارسنجی بالا جدا نمود. گونهٔ مرکب *G. fujikuroi* طیف قابل ملاحظه و گسترده‌ای از زهرابه‌های قارچی را تولید می‌کند که مواد غذایی و علوفه را در سرتاسر جهان آلوده کرده و می‌تواند منجر به انواع بیماری‌ها در انسان و حیوانات گردند. به‌ویژه *F. fujikuroi* با تولید مونیلیفورمین، بوریسین و فومونیزین، *F. verticillioides* با تولید فومونیزین و *F. proliferatum* با تولید فومونیزین، بوریسین و فوزاپرولیفرین اهمیت بیشتری در این زمینه دارند (Amatullia *et al*., 2010). شناسایی مولکولی جدایه‌های گونهٔ مرکب *G. fujikuroi* به‌دست‌آمده از برنج، نیشکر و ذرت بر اساس توالی ژن *TEF1-α* در مالزی انجام گرفت (Hsuan *et al*., 2011). پنج گونهٔ، *F. sacchari*، *F. fujikuroi*، *F. proliferatum*، *F. andiyazi* و *F. verticillioides* شناسایی شدند. در درخت فیلوژنیک رسم‌شده، جدایه‌های هرگونه در یک کلاد مجزا قرار گرفتند. نتایج این یافته‌ها همچنین نشان داد، فقط استفاده از صفات ریخت‌شناختی برای شناسایی گونه‌های درون گونهٔ مرکب *G. fujikuroi*، به تعیین گونه‌های نادرست منجر خواهد شد. نمونه‌های بذر برنج ده کشور آسیایی از نظر آلودگی به گونهٔ مرکب *G. fujikuroi* (GFSC)، ویژگی‌های مولکولی و بیماری‌زایی بررسی شدند (Jeon *et al*., 2013). صرف‌نظر از منشأ جغرافیایی، میزان جداسازی GFSC از بذر، ۳درصد تا ۸۰درصد بود. چهار گونهٔ *F. fujikuroi*، *F.concentricum*، *F.proliferatum* و *F. verticillioides* همراه با بذر برنج یافت شدند، که *F. fujikuroi* گونهٔ غالب بود. در تجزیه‌وتحلیل فیلوژنیک توالی‌های DNA، هیچ رابطه‌ای بین گونه‌ها، جدایه‌ها و منشأ جغرافیایی آن‌ها پیدا نشد. در مطالعه‌ای میزان آلودگی شالیزارهای لنجان اصفهان به بیماری پوسیدگی طوقه بین ۱۲/۲-۹/۱ درصد گزارش و میزان آلودگی بذرهای گردآوری‌شده از مزارع مختلف به قارچ عامل بیماری بین ۲۰-۲/۵ درصد تعیین شد (Damadzadeh & Hassanpoor, 1987). Padasht (1993)، میانگین آلودگی بذرها از شالیزارهای گیلان به قارچ *F. fujikuroi* در رقم خزر برابر با ۱۲/۶ و حداکثر آن ۳۱ درصد و میانگین آن در رقم بینام، ۵/۵ و حداکثر ۲۷ درصد گزارش نمود. همچنین در این تحقیق بذرزاد بودن قارچ اثبات شد و قارچ عامل بیماری از جنین بذرهای آلوده جداسازی شد. نتایج بررسی‌های Khosravi (1999) نشان داد، ۱۷/۵ درصد بذرهای برنج مازندران به گونه‌های مختلف فوزاریوم آلوده بودند. Darvishnia *et al*. (2006)، ۱۲۰۰ جدایهٔ فوزاریوم از گیاهان تیرهٔ گندمیان ۲۳ استان کشور را جدا کردند که بیشترین فراوانی مربوط به *F. verticillioides* و *F. proliferatum* و کمترین فراوانی مربوط به *F. sporotrichioides* و *F. buharicum* بود. عوامل قارچی بیماری تغییر رنگ خوشهٔ برنج در استان مازندران بررسی و نتایج نشان داد، سه جنس *Bipolaris*، *Alternaria* و *Fusarium* عوامل اصلی ایجاد بیماری هستند و بیشترین فراوانی را هنگام جداسازی از بذرهای تغییر رنگ یافته داشتند (Khosravi *et al*., 2014). با توجه به اهمیت برنج در امنیت غذایی کشور و اهمیت جنس *Fusarium* که در بالا بیان شد، شناسایی گونه‌ها، فراوانی و پراکنش آن‌ها در اکوسیستم (بوم‌نظام) شالیزارهای کشور برای مدیریت بیماری‌های ناشی از گونه‌های بیماری‌زا در شالیزارها، قرنطینهٔ داخلی و خارجی و جلوگیری از تولید زهرابه‌های قارچی ناشی از گونه‌های تولیدکنندهٔ آن‌ها ضروری است. هدف از این تحقیق شناسایی و تعیین دامنهٔ گسترش گونه‌های *Fusarium* همراه با بذر به‌دست‌آمده از خوشه‌ها در هنگام برداشت برنج بر اساس تلفیق ارزیابی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی و نیز تعیین فراوانی هر یک از گونه‌ها، در استان‌های فارس و خوزستان است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از شالیزارهای مناطق مختلف استان‌های فارس و خوزستان در مرحلهٔ سفت شدن دانه در سال ۱۳۹۲، بازدید و نمونه‌برداری انجام شد. از نقاط مختلف هر شالیزار ۵۰-۲۰ خوشه به‌طور تصادفی برداشت شد و در پاکت کاغذی قرار گرفت و پس از ثبت مشخصات

www.SID.ir

Archive of SID

شامل رقم، محل و تاریخ نمونه‌برداری به آزمایشگاه منتقل شدند. شلتوک‌ها از خوشه‌ها جدا شده و برای ادامهٔ مطالعات در شرایط خشک و خنک نگهداری شدند.

جداسازی قارچ‌های جنس *Fusarium* از بذرهای برنج و تعیین درصد آلودگی

شصت عدد بذر به‌طور تصادفی از هر نمونه انتخاب شد و به دو روش با ضدعفونی و بدون ضدعفونی سطحی روی محیط غذایی اختصاصی فوزاریوم Peptone PCNB Agar (PPA = Nash-Snyder Medium) کشت شد. در روش ضدعفونی سطحی، ابتدا بذرها زیر شیر آب به مدت سی دقیقه شسته و آنگاه با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم (NaClO) به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. نمونه‌های بذری سه بار با آب مقطر سترون شسته شده و لای کاغذ صافی سترون خشک شدند. بذرها در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت اختصاصی کشت و در انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجهٔ سلسیوس و نور متناوب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. همچنین در روش بدون ضدعفونی، بذرها بدون انجام ضدعفونی سطحی، ولی همانند روش بالا کشت شدند. بررسی تشتک‌های پتری از روز هفتم پس از کشت، شروع و درصد آلودگی بذرها ثبت شد. قارچ‌های به‌دست‌آمده به روش تک اسپور و یا نوک ریسه خالص شدند. برای نگهداری طولانی‌مدت قارچ‌ها از روش نگهداری قارچ روی کاغذ صافی سترون و ماسه‌بادی استفاده شد (Nelson *et al*., 1983; Leslie & Summerell, 2006). برای شناسایی جدایه‌های *Fusarium* در سطح گونه از محیط‌های کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA)، برگ میخک-آگار CLA (Carnation leaf Agar) و محیط مصنوعی آگاردار ضعیف SNA (Synthetic Nutrient-poor Agar) استفاده شد.

شناسایی ریخت‌شناختی

ویژگی‌های ماکروسکوپی هر یک از جدایه‌های *Fusarium* از نظر شکل، رنگ پرگنه (سطح رویی و تحتانی)، شکل حاشیهٔ پرگنه و میانگین رشد روی محیط غذایی PDA، در دمای ۱± ۲۵ درجهٔ سلسیوس در تاریکی و ویژگی‌های میکروسکوپی آن‌ها نیز با تهیهٔ اسلاید میکروسکوپی روی بسترهای آب مقطر و کاتن‌بلو+ لاکتوفنل بررسی شد. با تهیهٔ نمونه‌های میکروسکوپی، وضعیت وجود و یا عدم وجود میکروکنیدیوم، شکل و نحوهٔ تولید آن‌ها به‌صورت زنجیری و یا سرهای دروغی، نوع فیالید (منوفیالید و پلی‌فیالید) روی محیط SNA در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۱ درجهٔ سلسیوس، همچنین تشکیل ماکروکنیدیوم، شکل و اندازهٔ آن‌ها، تشکیل کلامیدوسپور روی محیط CLA در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۱ درجهٔ سلسیوس بررسی شد. سپس با استفاده از کلیدهای شناسایی گونه‌های جنس *Fusarium* شناسایی گونه‌ها انجام شد (Gerlach & Nirenberg, 1982; Nelson *et al*., 1983; Leslie & Summerell, 2006).

بررسی مولکولی

از پرگنهٔ هفت روزه جدایه‌های *Fusarium* روی محیط غذایی PDA برای تهیهٔ میسلیوم و استخراج DNA به روش Zhong & Steffenson (2001) و Pordel (2014) استفاده شد. به‌منظور شناسایی مولکولی و تجزیه‌وتحلیل فیلوژنیک جدایه‌های این تحقیق، بخشی از ناحیهٔ ژنی *TEF1-α* در ۱۸ جدایهٔ منتخب (جدول۲) با استفاده از ترکیب آغازگرهای EF1T (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') و EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') به ترتیب به‌عنوان آغازگرهای مستقیم (forward) و معکوس (reverse) تکثیر و تعیین توالی شد (O'Donnell *et al*., 1998; Geiser *et al*., 2004). همچنین نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای، از تک جدایهٔ کند رشد از گروه *Fusarium* مانند (*Fusarium*-like clade) به‌همراه چندگونه *Fusarium* از جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق (جدول ۲) با استفاده از ترکیب آغازگرهای ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) به ترتیب به‌عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس تکثیر و تعیین توالی شد (White *et al*., 1990). واکنش PCR در

www.SID.ir

Archive of SID

مخلوطی به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر آب دیونیزهٔ سترون، ۲/۵ میکرولیتر بافر10X PCR ، ۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، یک واحد *Taq* DNA پلیمراز و ۳ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰-۵ نانوگرم انجام شد و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر با ۳۵ چرخه در شرایط واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۸۵ ثانیه، واسرشت در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۶۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Zhang *et al*., 2011; Heidarian *et al*., 2013). برای ارزیابی محصول PCR، از ژل آگارز ۱ درصد با بافر TBE 1X در یک میدان الکتریکی با ولتاژ ۹۰ ولت در دستگاه الکتروفورز استفاده شد. خالص‌سازی و تعیین توالی توسط شرکت بایونیر کره جنوبی انجام گرفت. در مرحلهٔ بعد، برای اطمینان از درستی توالی‌های به‌دست‌آمده از هر جدایه و تأیید شناسایی ریخت‌شناختی گونه‌های *Fusarium*، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (Biological Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al*. 1997) با توالی‌های موجود در GenBank و پایگاه اطلاعاتی FUSARIUM-ID v. 1.0 (Geiser *et al*., 2004; O'Donnell *et al*., 2012) مقایسه شدند. توالی‌های معتبر با بیشترین همانندی از هر پایگاه اطلاعاتی برای شناسایی جهت هم‌ردیف سازی (alignment) و برآورد روابط فیلوژنیک دریافت و ذخیره شدند. توالی‌ها با استفاده از گزینهٔ Muscle هم‌ردیف شدند (Edgar, 2004) و با دقت رؤیت و اصلاحات لازم انجام گرفت. روابط فیلوژنی میان جدایه‌های مورد بررسی همراه با توالی تعدادی دیگری از جدایه‌های گرفته‌شده از بانک ژن با نرم‌افزار Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v 5.0) MEGA5.0 (Tamura *et al*., 2011) به‌روش حداکثر درستنمایی (Maximum- Likelihood) و روش اتصال همسایه (Neighbor-joining) تجزیه و تحلیل و درخت فیلوژنیک رسم شد. اعتبار شاخه‌ها با انجام اعتبارسنجی (Bootstrap) در ۱۰۰۰ تکرار سنجش و ارزش اعتبار بیشتر از ۵۰درصد روی درخت فیلوژنی نشان داده شد. گونهٔ *Trichoderma harzianum* به‌عنوان آرایهٔ گروه خارجی (outgroup) انتخاب شد (Kvas *et al*. 2009). توالی‌های مربوط به ۱۸ جدایهٔ مورد بررسی در بانک داده‌های ژنی NCBI ثبت و شماره‌های دستیابی آن‌ها اخذ شد (جدول ۲).

نتایج و بحث

شناسایی ریخت‌شناختی گونه‌های *Fusarium*

از مجموع ۲۶ جدایهٔ *Fusarium* به‌دست‌آمده از ۴۶ نمونهٔ بذر مورد بررسی، گونه‌های *F. semitectum*، *F. fujikuroi*، *F. andyazi* و *Fusarium merismoides* شناسایی شدند و به‌ترتیب ۴۶/۱، ۴۶/۱، ۳/۹ و ۳/۹ درصد فراوانی داشتند (جدول۱). گونهٔ *F. semitectum*، به گونهٔ مرکب FIESC (*Fusarium incarnatum*-*equiseti* species complex) و گونه‌های *F. fujikuroi* و *F. andyazi* به گونهٔ مرکب GFSC (*Gibberella fujikuroi* species complex) تعلق دارند. تک جدایهٔ *F. merismoides* که براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی شناسایی شد (Nelson *et al*., 1983; Leslie & Summerell, 2006)، در بررسی مولکولی از جنس *Fusarium* جدا و به‌عنوان *Fusicolla acetilerea* شناسایی شد و بسیار کند رشد بود. میزان رشد قارچ روی محیط کشت PDA و دمای ۱±۲۵ درجهٔ سلسیوس و تاریکی بعد از ۵ و ۱۶ روز به‌ترتیب ۱/۸ و ۴/۸ سانتی‌متر بود. پرگنهٔ قارچ بدون میسلیوم هوایی و یا میسلیوم هوایی خیلی ضعیف و کمی داشت و پرگنهٔ لزج، براق، مخمرمانند و به رنگ شرابی بود (شکل ۴). قارچ روی محیط کشت PDA و SNA تولید اسپوردوشیوم فراوان و تودهٔ لزج اسپوری (pionnotes) نمود که مملو از ماکروکنیدیوم‌هایی با سه دیوارهٔ عرضی و به ابعاد ۵-۴×۳۶-۲۵ میکرومتر بودند. همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، درصد آلودگی نمونه‌های بذر دو استان به گونه‌های *Fusarium* قابل توجه است. از نظر درصد نمونه‌های بذر آلوده و میزان آلودگی آن‌ها به *Fusarium*، بذرهای استان فارس آلودگی بیشتری داشتند. گونهٔ

www.SID.ir

Archive of SID

F. semitectum فراوانی بیشتری روی بذر برنج در استان خوزستان نسبت به فارس داشت اما فراوانی گونهٔ *F. fujikuroi*در استان فارس نسبت به خوزستان بیشتر بود. شرایط متفاوت اقلیمی دو استان می‌تواند در این تفاوت دخیل باشد. همچنین عواملی مانند ویژگی‌های خاک، دخالت انسان و مدیریت زراعی و رقم برنج تحت کشت منطقه نیز، در تنوع فلور (گیاهان) قارچی بذر یا خاک و از جمله گونه‌های *Fusarium* دخالت دارند (Karlsson *et al.*, 2016; Leslie & Summerell, 2006; Mew & Gonzales, 2002). در آزمون سلامت بذر انجام‌گرفته روی بیش از پانصد هزار نمونه بذر برنج، بیشترین فراوانی گونه‌های *Fusarium* شناسایی‌شده مربوط به گونه‌های *F.moniliforme* و *F. semitectum* بود (Mew & Gonzales, 2002). همچنین Jeon *et al.* (2013) نمونه‌های بذر برنج ده کشور آسیایی را از نظر آلودگی به گونهٔ مرکب *Gibberella fujikuroi*، ویژگی‌های مولکولی و بیماری‌زایی بررسی کردند. صرف‌نظر از منشأ جغرافیایی، میزان جداسازی GFSC از بذر، بین ۳درصد تا ۸۰درصد بود. چهار گونه شامل *F. fujikuroi*، *F. concentricum*، *F. proliferatum* و*F. verticillioides* همراه با بذر برنج شناسایی شدند، که *F. fujikuroi* گونهٔ غالب بود.

تجزیه‌وتحلیل‌های فیلوژنیک

تکثیر ناحیهٔ ژنی *TEF1-α* در ۱۸ جدایهٔ منتخب منجر به تولید محصولاتی شد که طول توالی نوکلئوتیدی آن‌ها بین ۶۹۵-۶۸۰ جفت باز متغیر بود. در درخت فیلوژنیک ترسیم‌شدهٔ دو گروه اصلی شناسایی شد. با توجه به درخت ترسیم‌شده به‌روش حداکثر درستنمایی بر اساس توالی ناحیهٔ *TEF1-α* گونه‌های متعلق به کمپلکس گونه‌ای GFSC (*Gibberella fujikuroi* species complex)، با مقدار اعتبارسنجی ۹۵ درصد تشکیل گروه تک‌نیایی دادند (شکل ۱). دو گونهٔ شناسایی‌شده متعلق به گونهٔ مرکب GFSC در دو کلاد مجزا از همدیگر تفکیک شدند. طول توالی نوکلئوتیدی ژن *TEF1-α* تکثیرشده در هشت جدایهٔ *F. fujikuroi* به‌دست‌آمده از بذر برنج فارس و خوزستان، بین ۶۸۰-۶۸۷ جفت باز متغیر بود و میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد بررسی با جدایه‌های مرجع ۱۰۰-۹۹درصد است. این هشت جدایه با مقدار اعتبارسنجی ۶۰درصد با جدایه‌های مرجع گونهٔ *F. fujikuroi* شامل FN252407، جداشده از بذر برنج نپال، JN092356 و JN092354 جداشده از بذر برنج ایتالیا گروه تک نیایی تشکیل می‌دهد. در تحقیق Heidarian *et al.* (2013)، طول توالی نوکلئوتیدی ناحیهٔ *TEF1-α*در نه جدایهٔ *F. fujikuroi* به‌دست‌آمده از برنج مازندران و گیلان بین ۶۶۷-۶۷۹ جفت باز متغیر بود. هم‌نیای کلاد *F. proliferatum* تشکیل گروه خواهری با کلاد *F. fujikuroi* را داد (شکل ۱). هر دو گونه از لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناختی شباهت زیادی با هم دارند و در بیشتر اوقات تشخیص و تفکیک آن‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی مشکل است. از نظر روابط خویشاوندی (فیلوژنیک)، این دو گونه بسیار به هم نزدیک و مرتبط هستند (O'Donnell *et al.*, 1998; Peterson & Logrieco, 1991)، اگرچه کاریوتیپ آن‌ها متفاوت است (Xu *et al.*, 1995). بنابراین برای شناسایی و تفکیک دقیق آن‌ها مقایسهٔ توالی‌های DNA اجتناب‌ناپذیر است (Leslie & Summerell, 2006). کلادهای *F. verticillioides* و *F. andyazi* تشکیل گروه خواهری دادند. گونهٔ *F. verticillioides* از لحاظ ریخت‌شناختی بسیار شبیه گونهٔ *F. andiyazi* است اما تشکیل کلامیدوسپور دروغی نمی‌دهد و تفکیک آن‌ها از هم مشکل است.

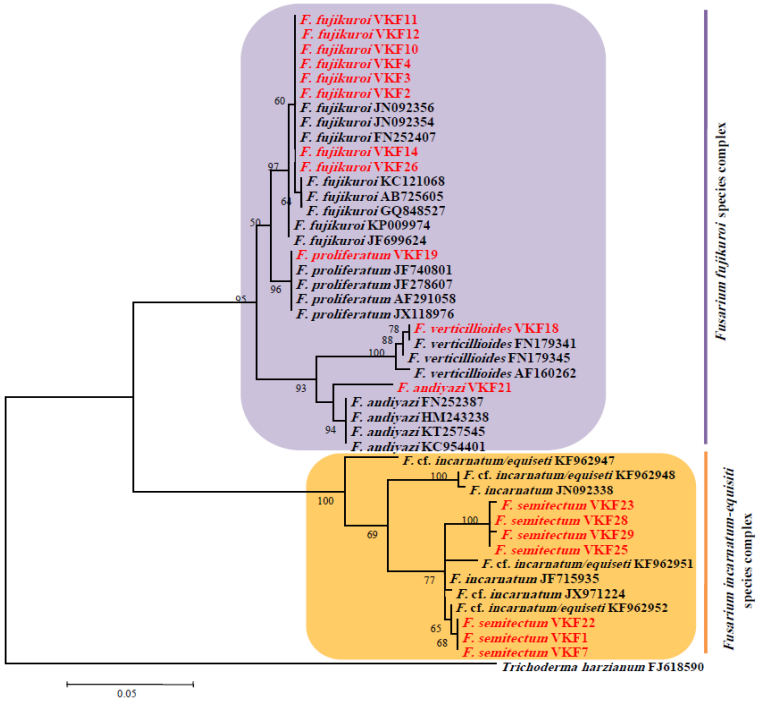
جدول ۱. فراوانی *Fusarium* بذرزاد برنج در استان‌های فارس و خوزستان

Table 1. Frequency of rice seedborne *Fusarium* in Fars and Khuzestan provinces

	No. of seed samples	No. of isolates	Infected seed samples (%)	Detection levels (%)	*F. fujikuroi* (%)	*F. semitectum* (%)	*F. andyazi* (%)	*Fusicolla acetilerea* (%)
Fars	16	16	31.25	0-14	68.75	25	-	6.25
Khuzestan	26	10	26.9	0-5	10	80	10	-
Total	42	26	28.6	-	46.1	46.1	3.9	3.9

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. درخت فیلوژنیک ترسیم‌شده بر اساس توالی بخشی از ژن *TEF-1α* به روش حداکثر درست نمایی (Maximum-Likelihood) با درجهٔ اعتبارسنجی ۱۰۰۰ تکرار (Bootstrap). اعداد اعتبارسنجی بیش از ۵۰ در بالای هر شاخه نشان داده شده است. گونهٔ *Trichoderma harzianum* به‌عنوان گروه خارجی (outgroup) و مقیاس نشان‌دهندهٔ ۰/۰۵ جایگزینی به ازای هر نوکلئوتید است. توالی‌های دارای نام گونه و شماره ثبت از بانک ژن استخراج شده‌اند.

Figure 1. Phylogenetic tree inferred from maximum likelihood analysis of the partial sequences of *TEF-1 α* gene. The scale bar shows 0.05 substitutions per site and bootstrap supports values from 1000 replicates shown at node. Only bootstrap support values of 50% or above are shown. The tree was rooted to *Trichoderma* harzianum. Sequences with species name and accession number are obtained from GenBank.

گونهٔ *F. verticillioides* توانایی تولید یاخته‌های متورم هیفی (ریسه‌ای) را دارد که تمایز آن‌ها از کلامیدوسپور دروغی سخت است (Leslie & Summerell, 2006). تک جدایهٔ *F. andiyazi* مورد بررسی در این تحقیق روی محیط کشت برگ میخک آگار تشکیل کلامیدوسپورهای دروغی مشخص را داد (شکل ۲) و همچنین با استفاده از توالی ژن *TEF-1α* در پایگاه داده‌های NCBI و FUSARIUM-ID شناسایی شد. این جدایه برای اولین بار از برنج در ایران گزارش می‌شود. همچنین نتایج این تحقیق با یافته‌های Heidarian *et al.* (2013) تطبیق دارد. گونه‌های متعلق به گونهٔ مرکب FIESC (*Fusarium incarnatum-equiseti* species complex)، با مقدار اعتبارسنجی ۱۰۰درصد تشکیل گروه تک نیایی مجزایی را دادند. اما بین اعضای FIESC تنوع دیده می‌شود و در دو گروه مجزا قرار گرفتند. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنیک با استفاده از توالی *TEF1-α* برای ۱۵ جدایهٔ *F. semitectum* از سبزی‌های مختلف نشان داد، جدایه‌ها از لحاظ فیلوژنیک متمایز بودند و به دو گروه تفکیک شدند، اگرچه ویژگی‌های ریخت‌شناختی آن‌ها بسیار مشابه بود. این جدایه‌ها بر اساس میزبان تفکیک نشدند. همچنین این بررسی نشان داد، جدایه‌های مورد بررسی بسیار متنوع بوده و متعلق به یک‌گونهٔ مرکب هستند (Latiffah *et al.*, 2013). تنوع زیستی گونه‌های فوزاریوم همراه با سنبله علف‌های هرز متعلق به تیرهٔ *Poaceae*، سنبله‌های گندمیان وحشی کشتزارهای غلات و اطراف آن‌ها در استان اردبیل بررسی و جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی‌یابی ژن *TEF-1α* شناسایی شدند (Davari *et al.*, 2013). در این تحقیق گونه‌های متعلق به شش گونهٔ مرکب شامل FIESC، FGSC (*Fusarium graminearum* species complex)، FTSC (*Fusarium tricinctum/ avenaceum/ acuminatum* species complex)، GFSC (*Gibberella*

www.SID.ir

Archive of SID

Fusarium) FOSC ،(*fujikuroi* species complex (*oxysporum* species complex و FSAMSC (*Fusarium sambucinum* species complex) به ترتیب با فراوانی ۶۸/۴، ۹/۵، ۹/۵، ۸/۱، ۱/۵ و ۱/۵ درصد شناسایی شدند. Petrovic *et al.* (2013) ۹۲ جدایه متعلق به شش گونهٔ *Fusarium* را از برنج *O. australiensis* در استرالیا جداسازی کردند. آرایه‌ها بر اساس صفات ریخت‌شناختی و فیلوژنیک (توالی ژن *TEF1-α*) محدود شدند و به‌عنوان گونه‌های مرکب *F. incarnatum-equiseti* species complex (۵۵٪)، *Gibberella fujikuroi* species complex (۲۷٪)، *F. longipes* (۱۴٪) و یک‌گونه فوزاریوم ناشناخته *Fusarium* sp. (۳٪) شناسایی شدند. گونهٔ *F. sacchari* گونهٔ غالب در کمپلکس GFSC بود، و به‌عنوان یک تولیدکنندهٔ قارچ‌زهر مایکوتوکسین‌ها (بوواریسین و فومونیزین) و عامل بیماری‌زا در نیشکر و ذرت خوشه‌ای گزارش شد. هیچ جدایه‌ای به‌عنوان *F. fujikuroi*، عامل بیماری باکانی برنج در جنوب شرق آسیا و دیگر مناطق تحت کشت برنج، شناسایی نشد. تکثیر نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای در شش جدایهٔ منتخب منجر به تولید محصولاتی شد که طول توالی نوکلئوتیدی آن‌ها بین ۵۱۷-۵۴۰ جفت باز متغیر بود. با توجه به درخت ترسیم‌شده به روش اتصال همسایه (Neighbor-joining) بر اساس توالی ناحیهٔ ITS گونه‌های جنس *Fusarium* مورد بررسی در این تحقیق با مقدار اعتبارسنجی ۷۰ درصد تشکیل گروه تک‌نیایی دادند. گونهٔ *F. fujikuroi* از دو گونهٔ *F. verticillioides* و *F. andyazi* تفکیک شد و در کلاد مجزا قرار گرفت اما در این درخت، گونه‌های *F. fujikuroi* و *F. proliferatum*و دو گونهٔ *F. verticillioides* و *F. andyazi* متعلق به گونهٔ مرکب GFSC از همدیگر تفکیک نشدند (شکل ۳). نتایج بالا با تحقیقات O'Donnell & Cigelnik (1997) و Heidarian *et al.* (2013) مطابقت دارد. تک جدایهٔ *F. merismoides* براساس توالی ناحیهٔ ژنی *TEF1-α* شناسایی نشد و از بقیهٔ گونه‌ها در درخت فیلوژنیک رسم شده تفکیک نشد و به‌همین دلیل از درخت ترسیم‌شده حذف شد. اما با استفاده از توالی ناحیهٔ ITS در پایگاه داده‌های NCBI به‌عنوان *Fusicolla acetilerea* شناسایی شد. طول توالی نوکلئوتیدی ناحیهٔ ITS تکثیرشده در تک جدایهٔ به‌دست‌آمده از بذر برنج فارس، ۵۴۰ جفت باز بود و میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد بررسی با جدایه‌های مرجع ۱۰۰-۹۹ درصد است. این جدایه با توجه به درخت ترسیم‌شده با روش اتصال همسایه (Neighbor-joining) براساس توالی ناحیهٔ ژنی ITS به‌همراه گونه‌های متعلق به جنس *Fusicolla* با مقدار اعتبارسنجی ۹۸درصد تشکیل گروه تک‌نیایی دادند و از گونه‌های جنس *Fusarium* تفکیک شدند و با آن تشکیل گروه خواهری را دادند (شکل ۳). گونهٔ *F. merismoides* توسط Safaee *et al.* (2000, 2012) از ریشهٔ گندم استان کرمانشاه گزارش شد. Khosravi *et al.* (2015) گونهٔ *F. merismoides* را بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی از روی بذر برنج گزارش نمودند. نتایج یک مطالعهٔ فیلوژنیک توسط Gräfenhan *et al.* (2011) و Lombard *et al.* (2015) نشان داد، جنس *Fusarium* در *Nectriaceae* تک‌نیا (monophyletic) نیست و از آن‌یک کلاد فوزاریوم مانند (*Fusarium*-like clade) پذیرش شد. تعداد کمی از گونه‌ها و دودمان‌های موجود در این کلاد فوزاریوم‌مانند براساس تجزیه‌وتحلیل فیلوژنیک و ریخت‌شناختی، به جنس‌های جدید، دوباره معرفی شده یا موجود مانند *Fusicolla*، *Dialonectria*، *Macroconia*، *Microcera*، *Atractium* و *Stylonectria* منتقل شده‌اند یا به‌طور موقت به‌عنوان *Fusarium* یا یکی از تلومورف‌های آن مانند *Nectria* و *Cosmospora* حفظ شدند (Triest *et al.*, 2016). Wafa (2016) تعداد ۱۳۶ جدایهٔ *Fusarium* از خاک‌های مانگرو (حرّا) در مالزی را با استفاده از روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی نمود. بیشترین فراوانی را گونه‌های *F.solani* و *F. semitectum* داشتند. همچنین یک جدایه از *F. merismoides* براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تجزیه‌وتحلیل فیلوژنیک ناحیهٔ ژنی ITS شناسایی شد. تک‌جدایهٔ مورد بررسی در این تحقیق، ویژگی‌های ریخت‌شناختی تیپیک بسیاری از گونه‌های فوزاریوم‌مانند را داشت و شناسایی بر اساس توالی ناحیهٔ ژنی ITS نیز این موضوع را تأیید نمود و از جنس *Fusarium* تفکیک شد و به‌عنوان گونهٔ *Fusicolla acetilerea* معرفی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

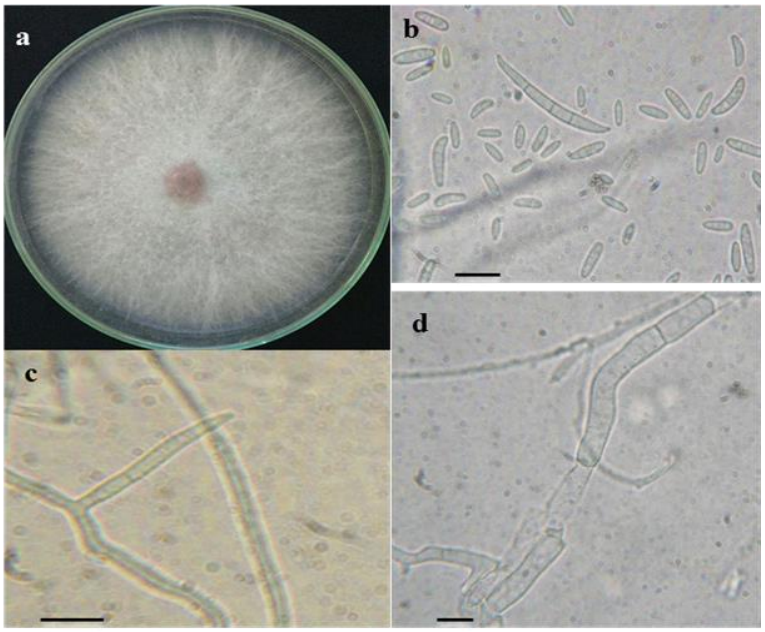
جدول ۲. مشخصات جدایه‌های *Fusarium* به‌دست‌آمده از بذر برنج روی خوشه در استان‌های فارس و خوزستان مورد استفاده برای ارزیابی رابطهٔ فیلوژنیک

Table 2. Characterization of *Fusarium* isolates recovered from rice seeds on panicle in Fars and Khuzestan provinces, included in phylogenetic analyses

Species	Isolate	Location	Host	NCBI Identities%	GenBank accession No. *EF-1 α*	GenBank accession No. ITS
	VKF2	Fars	rice seed	99-100	KY564222	-
	VKF3	Fars	rice seed	99-100	KY564223	-
	VKF4	Fars	rice seed	99-100	KY564224	-
	VKF10	Fars	rice seed	99-100	KY564225	-
Fusarium fujikuroi	VKF11	Fars	rice seed	99-100	KY564226	-
	VKF12	Fars	rice seed	99-100	KY564227	-
	VKF14	Fars	rice seed	99-100	KY564228	-
	VKF15	Fars	rice seed	100	-	MG732920
	VKF26	Khuzestan	rice seed	99-100	KY564232	-
F. verticillioides	VKF18	Khuzestan	rice seed	100	KY575978	MG732921
F. proliferatum	VKF19	Khuzestan	rice seed	100	KY575979	-
F. andyazi	VKF21	Khuzestan	rice seed	96-99	KY564229	MG732922
	VKF1	Fars	rice seed	95-99	KY575981	-
	VKF6	Fars	rice seed	99-100	-	MG732919
	VKF7	Fars	rice seed	97-99	KY575982	-
F. semitectum	VKF22	Khuzestan	rice seed	99	KY564230	-
	VKF23	Khuzestan	rice seed	98-99	KY575983	-
	VKF25	Khuzestan	rice seed	98	KY564231	-
	VKF28	Khuzestan	rice seed	99-100	KY575984	MG732923
	VKF29	Khuzestan	rice seed	98	KY564233	-
Fusicolla acetilerea	VKF5	Fars	rice seed	100	-	MG256500
	7ALH	Nepal	rice seed	99-100	FN252407	-
	F259	India	rice	99-100	KP009974	-
	M1150	Italy	rice seed	99-100	JN092354	-
	Augusto2	Italy	rice	99-100	KC121068	-
	CBS 221.76	Taiwan	rice	99-100	AB725605	-
F. fujikuroi	M3096	Italy	rice seed	99-100	JN092356	-
	PRC 2a	Philippines	rice	99-100	JF699624	-
	S6S	Italy	rice	99-100	GQ848527	-
	F13	Iran	rice	99-100	-	JQ363720.1
	LrBF9	China	red spider lily	99-100	-	MG543727.1
	PUF022	China	-	99-100	-	HQ165925.1
	NRRL 52719	-	-	99-100	JF740801	-
	LMSA 1.09.147	France	wheat seed	99-100	JF278607	-
F. proliferatum	NRRL 31071	Canada	wheat	99-100	AF291058	-
	CBS 131570	Iran	wheat	99-100	JX118976	
	PO1	Italy	maize kernels	99-100	-	EU151487.1
F. thapsinum	M-3790	USA	-	99-100	-	EF152433.1
	Lb2	Philippines	rice	98-99	JF715935	-
	F714	Spain	wheat	98-99	KF962952	-
	UOMS45	India	sorghum seed	98-99	JX971224	-
	F670	Spain	wheat	98-99	KF962951	-
	F767	Spain	wheat	99-100	KF962948	-
	E87	Italy	rice	99-100	JN092338	-
F. incarnatum/ equiseti species complex	F745	Spain	wheat	99-100	KF962947	-
	NRRL 52719	France	wheat seed	99-100	JF740801	-
	LMSA 1.09.147	France	wheat seed	99-100	JF278607	-
	NRRL 31071	USA	wheat pathogen	99-100	AF291058	-
	CBS 131570	USA	wheat pathogen	99-100	JX118976	-
	GIBI221	Colombia	plant	99-100	-	KX965656.1
	ASU3	Egypt	-	99-100	-	KT587650.1
	GIBI221	Colombia	plant	99-100	-	KX965656.1
F. equiseti	HS3	China	wheat	99-100	-	KY426410.1
	35 ALH	China	rice seed	99-100	FN179341	-
	31 ALH	China	rice seed	99-100	FN179345	-
F. verticillioides	NRRL22172	Germany	maize	99-100	AF160262	-
	VP2	Italy	maize kernels	99-100	-	EU151483.1
	NOVb1	Italy	maize kernels	99-100	-	EU151476.1
	30ALH	France	wheat seed	99-100	FN252387	-
	S09-8	Italy	rice	99-100	HM243238	-
F. andiyazi	RF258	South Korea	rice stem	99-100	KT257545	-
	CBS strain 134430	-	-	99-100	KC954401	KC954400.1
	4647	Spain	-	99-100	-	GU205409.1
	IR-1Sm-1-1-3	South Korea	plant	99-100	-	KP017770.1
F. oxysporum	KP10	Lithuania	pinus	-	-	DQ093759.1
F. merismoides var. *acetilereum*	F-223,908	Spain	-	99-100	-	EU860058.1
F. merismoides var. *violaceum*	F-167,589	Spain	-	99-100	-	EU860060.1
	F-254,178	Spain	-	99-100	-	EU860059.1
Fusicolla violacea	CBS 634.76; BBA 62461	Iran	San Jose scale	99-100	-	NR_137617.1
	BBA 63789	Japan	Polluted soil	99-100	-	NR_111603.1
	TVD_Fungal-Culture22	Canada	sand (tomato rhizosphere)	99-100	-	KF494020.1
Fusicolla acetilerea	TVD_Fungal-Culture20	Canada	sand (tomato rhizosphere)	99-100	-	KF494018.1
	TVD_Fungal-Culture19	Canada	sand (tomato rhizosphere)	99-100	-	KF494017.1
Fusicolla sp.	BCCM/IHEM 2040	Belgium	water	99-100	-	KJ125529.1
Trichoderma harzianum	BL3-7	Iran	rice	-	FJ618590	-
Sarocladium oryzae	CBS 180.74	-	-	-	-	AY566996.1
	CBS 361.75	-	-	-	-	AY566993.1
Bipolaris victoriae	CBS 327.64	USA	Barley	-	-	NR_147489.1

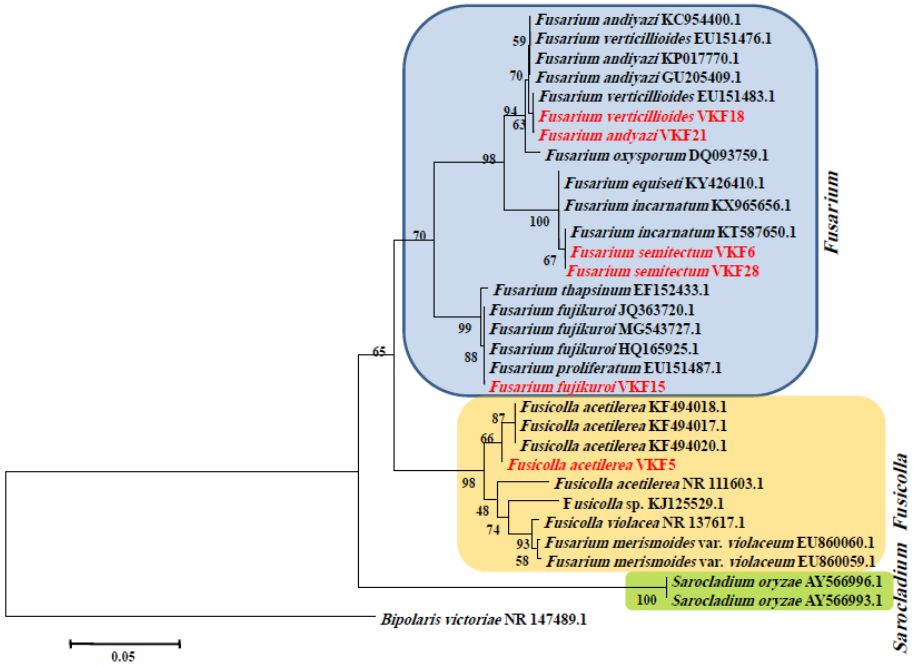
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. *Fusarium andiyazi*: a) پرگنه روی محیط کشت PDA پس از هشت روز، b-d) میکروکنیدیوم، ماکروکنیدیوم، فیالید و کلامیدوسپورهای دروغی در محیط برگ میخک آگار (مقیاس= ۱۰ میکرومتر).

Figure 2. *Fusarium andiyazi*: a) Colony after 8 days on PDA, b–c) Macroconidia, microconidia, phialide and pseudochlamydospores on CLA (Bar = 10 µm).

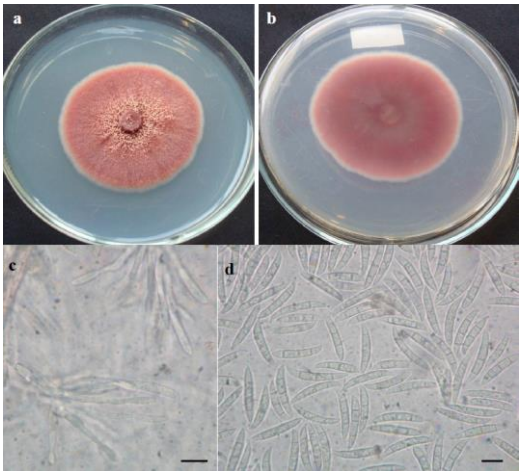


شکل ۳. درخت فیلوژنیک ترسیم‌شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیهٔ ITS با روش اتصال همسایه (Neighbor-joining) با درجهٔ اعتبارسنجی ۱۰۰۰ تکرار (Bootstrap). اعداد اعتبارسنجی بیش از ۵۰ در بالای هر شاخه نشان داده شده است. گونهٔ *Bipolaris victoria* به‌عنوان گروه خارجی (outgroup) و مقیاس نشان‌دهندهٔ ۰/۰۵ جایگزینی به ازای هر نوکلئوتید است. توالی‌های دارای نام گونه و شمارهٔ ثبت از بانک ژن استخراج شده‌اند.

Figure 3. Phylogenetic tree inferred from Neighbor-joining analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequences. The scale bar shows 0.05 substitutions per site and bootstrap supports values from 1000 replicates shown at node. Only bootstrap support values of 50% or above are shown. The tree was rooted to *Bipolaris victoriae*. Sequences with species name and accession number are obtained from GenBank.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. *Fusicolla acetilerea*: a-b) پرگنه از سطح رویی و زیری روی محیط کشت PDA پس از ۱۶ روز، c) کنیدیوفر و فیالید، d) ماکروکنیدیوم در محیط کشت PDA (مقیاس= ۱۰ میکرومتر).

Figure 4. *Fusicolla acetilerea*: a-b) Colony after 16 days on PDA (surface and reverse of colony, respectively), c) Conidiophore, phialide, and d. Macroconidia on PDA (Bar = 10 µm).

نتیجه‌گیری کلی

شناسایی اعضای جنس *Fusarium*، از هنگامی‌که این جنس برای اولین بار توصیف شده است تاکنون دشوار بوده است. مفاهیم گونه‌های ریخت‌شناختی، بیولوژیکی و فیلوژنیک همگی در توصیف گونه‌ها مورد استفاده بوده‌اند و گونه‌هایی که با حداقل دو مفهوم شناسایی می‌شوند، به‌طورکلی اعتبار بیشتری نسبت به آن‌هایی دارند که تنها بر اساس یک مفهوم شناسایی می‌شوند. براساس صفات ریخت‌شناختی و توالی‌یابی ناحیهٔ *TEF1-α*، از مجموع ۲۶ جدایهٔ *Fusarium* به‌دست‌آمده از نمونه‌های بذر مورد بررسی در استان‌های فارس و خوزستان، گونه‌های *F. semitectum*، *F. fujikuroi* و *F. andiyazi* شناسایی شدند. در این بررسی گونهٔ *F. fujikuroi* در استان فارس و گونهٔ *F. semitectum* در خوزستان بیشترین فراوانی را داشتند. توالی‌یابی ناحیهٔ ژنی *TEF1-α* برای تفکیک و شناسایی اعضای گونهٔ مرکب GFSCمفید است اما توالی ناحیهٔ ITS نتوانست این گونه‌ها را شناسایی و از همدیگر تفکیک کند. تک جدایهٔ *F. merismoides* که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی توسط Khosravi *et al.* (2015) از روی بذر برنج گزارش شد نتوانست بر اساس توالی ژن *TEF1-α* شناسایی و از بقیه گونه‌ها در درخت فیلوژنیکی رسم‌شده تفکیک گردد اما در درخت فیلوژنیکی رسم‌شده بر اساس توالی ناحیهٔ ITS از جنس *Fusarium* تفکیک و به جنس *Fusicolla* و گونه *F. acetilerea* منتقل شد. شناسایی درست این گونه‌ها و تشخیص زودهنگام آن‌ها روی بذر برنج، می‌تواند یک ابزار بسیار مفید برای درک اپیدمیولوژی (همه‌گیری شناسی) و استراتژی (راهبردی) توسعهٔ بیماری برای مدیریت بیماری باکانی، آلودگی به زهرابه‌های فوزاریوم و شناسایی گونه‌های اندوفیت (درون‌رست) مفید را فراهم نماید.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از گرنت شماره ۷۱۱۰۰۲۲/۶/۳۷ در گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران انجام شده است. از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به‌خاطر حمایت مالی این پژوهش قدردانی به عمل می‌آید.

REFERENCES

1. Ahmadi, K., Gholizadeh, H., Ebadzadeh, H., Hoseinpour, R., Hatami, F., Fazli, B., Kazemian, A. & Rafiei, M. (2015). *Agricultural Statistics Crop Year Book for 2013-2014*, Vol. 1. Ministry of Agriculture-Jahad Publishing, Planning and Economic Deputy, Information and Communication Technology Center. 169 pp. (in Farsi)
2. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Alian, S. A. (2005). *Study on vegetative compatibility and sexual fertility in populations of Gibberella fujikuroi, the causal agent of rice bakanae disease in Mazandaran province*. M. Sc. Thesis, University of Tehran. Iran. 77 pp. (in Farsi)
4. Amatulli, M. T., Spadaro, D., Gullino, M. L. & Garibaldi, A. (2010). Molecular identification of *Fusarium* spp. associated with bakanae disease of rice in Italy and assessment of their pathogenicity. *Plant Pathology*, 59, 839-844.
5. Aoki, T. & O'Donnell, K. (1999). Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia*, 91, 597-609.
6. Benali, S., Mohamed, B., Eddine, H. J. & Neema, C. (2011). Advances of molecular markers application in plant pathology research. *European Journal of Scientific Research*, 50(1), 110-123.
7. Bentley, S., Peggy, K. G. & Dale, J. L. (1995). Genetic variation among a worldwide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* analyzed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycological Research*, 99, 1375-1384.
8. Butt, A. R., Yaseen, S. I. & Javaid, A. (2011). Seed-borne mycoflora of stored rice grains and its chemical control. *TheJournal of Animal and Plant Sciences*, 21(2), 193-196.
9. Damadzadeh, M. & Hassanpoor, H. (1987). Rice foot rot and its chemical control in Esfahan. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 23, 49- 61.
10. Damadzadeh, M. (2003). Identification of isolates of *Fusarium moniliforme*, the causal agent of rice foot rot disease, using RAPD technique. *Journal of Nahal and Bazr*, 19(2), 227-244. (in Farsi)
11. Davari, M., Babai-Ahari, A., Arzanlou, M., Zare, R., Van Diepeningen, A. D. & de Hoog, G. S. (2013). Morphological and molecular characterization of three new *Fusarium* species associated with inflorescence of wild grasses for Iran. *Rostaniha*, 14(2), 124-134. (in Farsi)
12. Darvishnia, M., Alizadeh, A., Zare, R. & Mohammadi Goltapeh, E. (2006). Three new *Fusarium* taxa isolated from gramineous plants in Iran. *Rostaniha*, 7(2), 193-205. (in Farsi)
13. Diekmann, M. (1993). *Epidemiology and geophytopathology of selected seedborne disease*. ICARDA, ALEPPO, Syria. Pp 1-15.
14. Geiser, D. M., Jimenez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A. & O'Donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 473-479.
15. Gräfenhan, T., Schroers, H. J., Nirenberg, H. I. & Seifert, K. A. (2011). An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. Stud Mycol, 68, 79-113.
16. Heidarian, Z., Javan-Nikkhah, M., Fotouhifar, K. B. & Ahmadpour, A. (2013). Morphological and phylogenetic investigation on selected *Fusarium* species belong to *Gibberella fujikuroi* species complex in Iran. *Rostaniha*, 14(2), 163-174. (in Farsi)
17. Hsuan, H. M., Salleh, B. & Zakaria, L. (2011). Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia. *International Journal Molecular Science*, 12, 6722-6732.
18. Islam, M. S., Rahman, H., Pervez, Z., Mahmud, M. R. & Alam, A. (2012). Studies on seed borne fungi in rice cultivars grown in non saline Tidal Zones of Patuakhali and their effect on seed germination. *Bangladesh Research Publications Journal*, 6(3), 286-290.
19. Jeon, Y. A., Yu, S. H., Lee, Y. Y., Park, H. J., Lee, S., Sung, J. S., Kim, Y. G. & Lee, H. S. (2013). Incidence, molecular characteristics and pathogenicity of *Gibberella fujikuroi* species complex associated with rice seeds from Asian countries. *Mycobiology*, 41(4), 225-233.
20. Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M. B., Kolseth, A-K., Steinberg, C., Persson, P. & Friberg, H. (2016). Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 491-501.
21. Khosravi, V. (1999). *Investigation on important seedborne fungal diseases of dominant rice cultivars in Mazandaran region*. M.Sc. thesis. Tehran University, Iran. Pp. 102. (in Farsi)
22. Khosravi, V., Javan-Nikkhah, M., Saremi, H. & Naeimi, Sh. (2015). *Fusarium* species associated with rice seeds in Fars and Khuzestan provinces, Iran. In: Proceedings of *2nd Iranian Mycological Congress*, Tehran University, Karaj, Iran. 77. (Abst.)
23. Khosravi, V., Naeimi, S., Rostami, M., Bahrami, M., Zare, L. & Ghalandari, M. (2014). Study of the fungal causal agents of rice panicle discoloration in Mazandaran. In: Proceedings of *21st Iranian Plant Protection Congress*, 23-26 Aug., Urmia University, Iran. 100. (Abst.)
24. Kvas, M., Marasas, W. F. O., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. & Steenkamp, E. T. (2009). Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity*, 34, 1-21.
25. Latiffah, Z. NurulHuda, M. S. & Tengku Ahmad Akram, T. M. A. (2013). Characterization of *Fusarium semitectum* from Isolates Vegetable Fruits. *Sains Malaysiana*, 42(5), 629-633.
26. Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 388. pp.

www.SID.ir

Archive of SID

27. Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2013). An overview of *Fusarium*. In *Fusarium, Genomics, Molecular and Cellular Biology*, Brown D. W. & Proctor, R.H. (eds.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 1–9.
28. Lombard, L., van der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. (2015). Generic concepts in *Nectriaceae*. *Studies in Mycology*, 80, 189-245.
29. Mew, T. W. & Gonzales, P. (2002). *A Handbook of Rice Seedborne Fungi*. International Rice Research Institute, Science Publishers Inc. 83 pp.
30. Nayaka, S. C., Wulff, E. G., Udayashankar, A. C., Nandini, B. P., Niranjana, S. R., Mortensen, C. N. & Prakash, H. S. (2011). Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1625-1639.
31. Neergaard, P. (1986). *Seed Pathology*. S. Chand & Company Ltd. New Delhi. 466 pp.
32. Nelson, P. E., Toussoun, T. A. & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium Species: An Illastrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press. USA. 193 pp.
33. O'Donnell, K. & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 103-116.
34. O'Donnell, K., Cigelnik, E., Weber, N. S. & Trappe, J. M. (1997). Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia*, 89, 48-65.
35. O'Donnell, K., Cigelnik, E. & Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 465-493.
36. O'Donnell, K., Humber, R. A., Geiser, D. M., Kang, S., Park, B., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Johnston, P. R., Aoki, T., Rooney, A. P. & Rehner, S. A. (2012). Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. *Mycologia*, 104(2), 427-445.
37. Padasht, F. (1993). *Evaluation of rice foot rot disease (Gibberella fujikuroi) in Guilan*. M. Sc. thesis, University of Tehran. 123 pp. (in Farsi)
38. Peterson, S. W. & Logrieco, A. (1991). Ribosomal RNA sequence variation among interfertile strains of some *Gibberella* spp. *Mycologia*, 83, 397-402.
39. Petrovic, T., Burgess, L. W., Cowie, I., Warren, R. A. & Harvey, P. R. (2013). Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in Northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 773-788.
40. Pordel, A. (2014). *Systematic study on Magnaporthe species in southern Caspian Sea*. M.Sc. thesis. University of Tehran, Iran. 105 pp. (in Farsi)
41. Safaee, D., Hedjaroude, Gh. A. & Okhovvat, M. (2000). The first report of presence of *Fusarium merismoides* and *F.* cf. *udum* in Iran. Proceedings of *the 14th Iranian plant protection congress*, vol. II, 5–8 Sept., Esfahan, Iran: 1.
42. Safaee, D., Younesi, H. & Sheikholeslami, M. (2012). *Fusarium* species that cause root and crown rot of wheat in Kermanshah province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 48(2), 89 -91 (Short Article)
43. Saponaro, A., Puglia, A. P. & Montorsi, F. (1986). Some important seedborn pathogenic fungi on rice. (Abstr.) *Informatore Fitopatologico*, 36(1), 40.
44. Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. In: Proceedings of *the National Academy Sciences of the United States of America*, 109, 6241-6246.
45. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
46. Triest, D., Cremer, K. D., Denis Piérard, D. & Hendrickx, M. (2016). Unique Phylogenetic Lineage Found in the Fusarium-like Clade after Re-examining BCCM/ IHEM Fungal Culture Collection Material. *Mycobiology*, 44(3), 121-130.
47. Verstraete, F. (2008). EU legislation on mycotoxins in food and feed: overview of the decision-making process and recent and future developments. In *Mycotoxins*, Leslie, J.F., Bandyopadhyay, R. & Visconti, A., (eds.). CABI,Wallingford, Oxfordshire, UK., pp. 77-99.
48. Wafa, S. & Mohamed Zubi. (2016). *Occurrence and characterization of Fusarium spp. isolated from Mangrove soils*. Ph.D. thesis, Universiti Sains Malaysia. 168 pp.
49. Xu, J. R., Yan, K., Dickman, M. B. & Leslie, J. F. (1995). Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, 74-84.
50. Zhong, S. & Steffenson, B. J. (2001). Virulence and molecular diversity of *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*, 91, 469-476.

www.SID.ir