بررسی تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های مختلف گونه‌های فوزاریوم، عوامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم با استفاده از روشهای مولکولی و آزمونهای بیماریزایی

محمد رضوی[1*]، احسان ساری[2] و رسول زارع[3]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲۵)

چکیده

طی سال‌های ۸۹-۱۳۸۸ از مزارع گندم ۸ استان کشور شامل تهران، اصفهان، اردبیل، گلستان، مازندران، مرکزی، قزوین و زنجان در مرحله پر شدن دانه بازدید و از بوته‌های آلوده به پوسیدگی طوقه و ریشه نمونه برداری شد. شناسایی گونه‌های فوزاریوم با بهره‌گیری از هر دو روش مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از نشانگر اختصاصی (SCAR) گونه‌ها صورت گرفت و مجموعا ۱۲ گونه فوزاریوم شناسایی گردیدکه عبارت بودند از: *F. culmorum*، *F. pseudograminearum*، *F. proliferatum*، *F. equiseti*، *F. nygamai*، *F. solani*، *F. pseudonygamai*، *F. sambucinum*، *F. acuminatum*، *F. lateritium*، *F. oxysporum* و *F. verticillioides*. گونه *F. culmorum* با بیش از ۸۰ جدایه (با ۳۲٪ فراوانی) به عنوان گونه غالب شناسایی شد و گونه *F. pseudograminearum* دومین میزان فراوانی (۱۸٪) را به خود اختصاص داد. بررسی تنوع ژنتیکی تعداد ٦٤ جدایه گونه غالب (*F. culmorum*) با استفاده از ۸ جفت مارکرهای ریزماهواره (Simple SSR =Sequence Repeat) نشان داد که تنوع ژنتیکی زیادی (۰/۸۱) در کل جمعیت جدایه‌ها وجود داشت که ۱۱٪ آن بین جمعیتهای مختلف و ۸۹٪ در داخل جمعیتها توزیع شده بود. تعداد آلل در مکانهای مختلف ریزماهواره بین ۷ تا ۲۲ بود. همچنین تفاوت معنی داری بین جدایه‌ها از نظر قدرت تهاجمی وجود داشت. جدایه‌هایی که بیشترین قدرت تهاجمی را داشته و از مناطق جغرافیایی مختلف بودند را می‌توان در شناسایی منابع مقاومت گندم به پوسیدگی طوقه و ریشه با عامل *F. culmorum* استفاده نمود.

کلیدواژه: گونه‌های فورازیوم، پوسیدگی طوقه و ریشه، گندم، تنوع ملکولی

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mrazavi39@yahoo.ca

۱. دانشیار پژوهش، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

2. Research Associate, Aquatic and Crop Resource Development Portfolio, National Research Council, Saskatoon, Canada

۳. استاد پژوهش، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

Genetic diversity of *Fusarium* species, causal agents of wheat root and crown rots using molecular markers and pathogenicity tests

M. Razavi[1*], E. Sari[2], and R. Zare[3]

(Received: 19.7.2016; Accepted: 15.12.2016)

Abstract

During 2009-10, wheat fields in eight provinces of Iran including Tehran, Esfahan, Ardabil, Golestan, Mazandaran, Markazi, Qazvin and Zanjan were surveyed and samples were collected from plants showing crown rot disease symptoms. *Fusarium* species were identified based on morphological features and molecular markers (SCAR). Twelve *Fusarium* species including *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. equiseti*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. pseudonygamai*, *F. sambucinum*, *F. acuminatum*, *F. lateritium* and *F. verticillioides* were identified. *F. culmorum* was the dominant species and had the highest (32%) frequency, followed by *F. pseudograminearum* (18%). Genetic diversity of 64 representative isolates of *F. culmorum* was studied using eight Simple Sequence Repeat (SSR) markers. There was a high level (0.81) of genetic diversity within the total population, where 89% of the variability was distributed within populations and 11% among populations. Number of alleles was between 7 to 22. In addition, there was significant difference among isolates in their aggressiveness. Isolates with a high level of aggressiveness from different geographical areas can be used for screening resistance to *F. culmorum*.

Keywords: Fusarium species, crown rot, wheat, molecular variability

* Corresponding author's E-mail: mrazavi39@yahoo.ca

1. Research associate professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
2. Research Associate, Aquatic and Crop Resource Development Portfolio, National Research Council, Saskatoon, Canada.
3. Research professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

مقدمه

پوسیدگی‌های ریشه و طوقه گندم از جمله بیماریهای مهم گندم بوده و انتشار جهانی دارند. اهمیت آن بیشتر از آن جهت است که قارچهای متنوعی این بیماریها را ایجاد می‌کنند. از جمله مهمترین این قارچها گونه‌های *Fusarium pseudograminearum*، *F. culmorum*، *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*، *Rhizoctonia solani*، *Bipolaris sorokiniana* و گونه‌های *Pythium* می‌باشند. در این میان گونه‌های فوزاریوم به دلیل تنوع گونه‌هایی که در بیماری نقش دارند و گسترش جهانی بیماری از اهمیت نسبی برخوردارند. خسارت بیماری تا میزان حداکثر ۷۵ درصد در ایالات متحده آمریکا (Rovira, 1990) و گاهی تا ۱۰۰ درصد در استرالیا (Southwell *et al.*, 2003) گزارش شده است. این بیماری در ایران نیز از بیماری‌های مهم و خسارت زای گندم محسوب شده و در اغلب مناطق گندم خیز کشور علایم بیماری گزارش شده است. خسارت ناشی از این بیماری قابل توجه بوده ولی به دلیل تغییرات خسارت بیماری از سالی به سال دیگر و وابستگی خسارت به شرایط محیطی، تاکنون آمار دقیقی از خسارت بیماری در دست نیست. با توجه به ماهیت خاکزی بودن عامل بیماری، روشهای شیمیایی نه تنها پر هزینه و غیر اقتصادی بوده بلکه کارائی چندانی هم نشان نداده است. عمده روشهای مبارزه شیمیایی بر فومیگاسیون خاک با استفاده از ترکیباتی چون متیل بروماید بوده که از نظر زیست محیطی بسیار زیان آور هستند. در این بین بهره گیری از مقاومت ارقام جهت کنترل بیماری بدلیل نه تنها ممانعت از صدمات زیست محیطی مبارزه شیمیایی، بلکه بدلیل کنترل آسان و اقتصادی بیماری مورد توجه محققان قرار گرفته است. با در نظر گرفتن اینکه شناخت دقیق از تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری پیش زمینه هر گونه روش مدیریتی اتخاذ شده بر علیه آن می‌باشد، ضروری است با شناخت دقیق تنوع قارچ عامل بیماری در هر منطقه به اتخاذ روشهای مدیریتی پرداخت. هدف از اجرای این تحقیق شناسایی گونه‌های مهم فوزاریوم دخیل در ایجاد پوسیدگی طوقه و ریشه گندم با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی، مولکولی، تعیین گونه غالب و بررسی تنوع ژنتیکی و انجام آزمایشات بیماریزایی در داخل گونه غالب بود تا پاتوتیپهایی که در اکثر مناطق کشور از فراوانی بالا تری برخوردار بوده و دارای قدرت تهاجمی بالاتری بودند شناسایی شده تا در تولید ارقام مقاوم مورد استفاده قرار گیرند.

در ایران پوسیدگی ریشه و طوقه گندم به دلیل اهمیت اقتصادی کشت گندم و خسارت قابل توجه آن مورد توجه فراوان قرار گرفته است (Mansouri, 1995؛ Zare and Ershad 1997؛ Ravanlou and Banihashemi1998؛ Safaee *et al.* 2000؛ Kazemi 2002.). در بررسی انجام شده در استان لرستان از میان ۱۰۹ جدایه قارچی ۴۸ جدایه متعلق به ۱۳ گونه فوزاریوم *Fusarium chlamydosporum*، *F. proliferatum*، *F. equiseti*، *F. subglutinans*، *F. lateritium*، *F. sambucinum*، *F. reticulatum*، *F. avenaceum*، *F. solani*، *F. moniliforme*، *F. acuminatum* و *F. semitectum* بودند (Darvishnia *et al.* 1998). در بررسی بهرامی کمانگر و همکاران (Bahrami Kamangar *et al.* 2006) درباره سبب شناسی پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در استان کردستان نیز جدایه‌های فوزاریوم به عنوان عوامل بیماری جداسازی شدند. در سایر کشورهای منطقه نیز بیماری حائز اهمیت بوده و در تحقیقی که اخیراً منتشر شده، گونه *Fusarium culmorum* بیشترین فراوانی را در میان

قارچهای جداسازی شده از ریشه و طوقه گندم در ترکیه به خود اختصاص داده است (Tunali *et al.* 2008).

در استرالیا نمونه برداری از ۴۰۹ مزرعه نشان داد که *Fusarium pseudograminearum* تقریباً از تمامی مزارع واقع در کوئینزلند و نیوساوس ولز جداسازی شد. اگر چه در مناطق مذکور *F. culmorum* به ندرت جداسازی شده بود، در مناطق با بارندگی بالاتر از ۵۰۰ میلی متر واقع در ویکتوریا این گونه غالب جدایه‌ها را شامل می‌شد که بر اهمیت شرایط اقلیمی بر گسترش گونه‌های فوزاریوم تاکید دارد (Backhouse *et al.*, 2004). گزارشات متعدد از وجود بیماری و خسارت آن در ایالات متحده آمریکا در دست است. برای مثال گزارشات زیادی از وقوع بیماری در ایالت نبراسکا وجود دارد (Klein and Wegulo 2006). گونه‌های *Fusarium acuminatum*، *F. equiseti* و *F. solani* غالب جدایه‌های بیماریزا در می سی سی پی را به خود اختصاص دادند (Gonzalez and Trevathan 2000). در بررسی خسارت بیماری در ایالات متحده آمریکا، حدود ۳۵ درصد و معادل ۱۵۵۰ کیلوگرم در هر هکتار کاهش عملکرد گزارش شده است (Smiley *et al.* 2005). در این بررسی *Fusarium pseudograminearum*، *F. culmorum* و *F. avenaceum* مهمترین گونه‌های فوزاریوم عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم بودند.

در سالهای اخیر علاوه بر شناسایی مورفولوژیکی گونه‌های فوزاریوم عموماً مبتنی بر کلیدهای سینوپتیک (Synoptic Keys)، شناسایی به روشهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز مورد توجه فراوان قرار گرفته است (Akinsanmi *et al.* 2004; Backhouse *et al,* 2004; Guo *et al.* 2008). این تکنیکها که مبتنی بر آغازگرهای اختصاص گونه‌ها هستند، در مواقعی تشخیص مورفولوژیکی را تسهیل می‌کنند. برای مثال دو گونه *F. graminearum* و *F. pseudograminearum* به روش مورفولوژیکی به سختی قابل تمیز هستند در حالیکه با بهره گیری از آغازگرهای اختصاصی و تکنیک (SCAR) به راحتی و در مدت زمانی کوتاه قابل تفکیک هستند (Aoki and O'Donnel 1999). این نشانگرها اکنون برای برخی از گونه‌ها در اختیار بوده و عموماً برای تایید شناسایی مورفولوژیکی مورد استفاده قرار گرفته است.

تنوع ژنتیکی فوزاریوم‌های عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم به طور مکرر و در مناطق مختلف جغرافیایی دنیا مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه Miedaner و همکاران (۲۰۰۱) جدایه‌های منسوب به دو گونه *Fusarium pseudograminearum* و *F. culmorum* که از کشورهای آلمان، مجارستان، کانادا و روسیه جداسازی شدند، به روش RAPD بررسی شد و تنوع قابل توجهی میان جدایه‌های جمع آوری شده از آلمان، کانادا و مجارستان مشاهده شد. اگر چه جدایه‌های مربوط به روسیه از تنوع محدودی بر خوردار بودند. در مطالعه Bogale و همکاران (۲۰۰۶) به سه روش AFLP، SSR و تعیین توالی، تعداد ۳۲ جدایه فوزاریوم بررسی شد که هر سه روش ایزوله‌ها را به سه گروه ژنتیکی مشابه تقسیم بندی کردند. در گزارش Scott and Chakraborty (2008) تعداد ۴۰ جدایه قارچی گونه‌های *Fusarium graminearum* و *F. pseudograminearum* به روش SSR بررسی و در تعداد ۱۱ مکان ژنی پلی مورفیسم مشاهده نمودند. در بررسی مشابه توسط Naef and De´fago (2006) تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. graminearum* با بهره گیری از تعداد ۸ پرایمر مربوط به نشانگر SSR بررسی شد که نتایج جریان ژنی (Gene flow) میان جمعیت جدایه‌های ساپروفیت روی بقایای ذرت و جمعیت بیماریزا روی گندم به فاصله ۱۰۰ کیلومتری از همدیگر را نشان داد.

همچنین در بررسی ریزماهواره‌های گونه *F. culmorum*، Giraud و همکاران (۲۰۰۲) چند شکلی در تعداد ۸ جایگاه ژنی را گزارش کردند، به طوریکه حداکثر ۱۳ آلل متنوع در جمعیت مورد آزمون مشاهده شد.

بررسی‌های قبلی بیانگر این است که تنوع ژنتیکی بالای قارچها عموماً با تنوع زیاد در قدرت بیماریزایی همراه بوده است (Miedaner *et al.* 2001). در بررسی Miedaner و همکاران (۲۰۰۱) تنوع در ویرولانس جدایه‌های *Fusarium graminearum* و *F. culmorum* بررسی شد و نتایج نشان داد اگر چه تنوع بالایی از هر دو منظر ژنتیکی و بیماریزایی میان جدایه‌ها مشاهده شد، جدایه‌هایی که به روش RAPD در یک گروه ژنتیکی قرار گرفتند، از قدرت ویرولانسی متفاوتی در آزمون استاندارد ارایه شده روی چاودار برخوردار بودند. در بررسی دیگر به وسیله Akinsanmi و همکاران (۲۰۰۴) در مورد ویرولانس جدایه‌های فوزاریوم روی گندم رقم حساس Kenedy، نتایج نشان داد جدایه‌های *F. crookwellense* بیشترین و جدایه‌های *F. acuminatum* کمترین مقدار بیماریزایی را به خود اختصاص دادند. در این بررسی دامنه وسیعی از تنوع میان جدایه‌های *F. pseudograminearum*، *F. graminearum* و *F. crookwellense* مشاهده شد که بیانگر این است که جدایه‌های یک گونه از نظر ویرولانس تفاوت قابل توجهی داشته و صفت ویرولانس، صفت مرتبط به گونه نبوده بلکه از جدایه‌ای به جدایه دیگر تفاوت می‌کرد. همچنین بررسی‌ها نشان داد که کشت متوالی گندم سبب افزایش قدرت ویرولانس جدایه‌ها می‌شود (Akinsanmi *et al.*, 2004). مطالعات قبلی در تهیه ارقام مقاوم به فوزاریوم‌های عامل بلایت خوشه گندم موید اهمیت هر دو عامل تنوع ژنتیکی و بیماریزایی عامل بیماریزا در تولید ارقام مقاوم به بیماری است (Miedaner *et al.*, 2008).

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌های گیاهی آلوده

در این تحقیق طی سال‌های ۸۹-۱۳۸۸ از مزارع گندم ۸ استان کشور شامل تهران، اصفهان، اردبیل، گلستان، مازندران، مرکزی، قزوین و زنجان در مرحله پر شدن دانه از طوقه و ریشه‌های آلوده به صورت تصادفی نمونه برداری، و در پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند. در هنگام نمونه برداری مشخصات کامل نمونه شامل محل جمع آوری، تاریخ نمونه برداری و نام جمع آوری کننده ثبت، سپس به آزمایشگاه منتقل گردیدند و با توجه به منطقه جمع آوری کد گذاری شدند.

جداسازی و خالص‌سازی قارچ عامل بیماری

از حد فاصل بافت سالم و قسمت‌های تغییر رنگ یافته ریشه و طوقه، قطعاتی به اندازه ۵-۳ میلیمتر جدا و پس از شستشو با آب معمولی، با مایع سفید کننده تجاری (وایتکس) ۱۰٪ حاوی ۰/۵٪ ماده موثره هیپوکلریت سدیم به مدت ۲-۱ دقیقه ضدعفونی گردیدند. متعاقبا قطعات در سه مرحله دیگر به ترتیب به مدت ۱، ۲ و ۳ دقیقه با آب مقطر سترون آبکشی شدند و روی کاغذ صافی خشک شدند. سپس تعداد ۵-۴ قطعه از هر نمونه، روی محیط کشت عصاره سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) و محیط کشت اختصاصی (Nash and Snyder 1962) حاوی قارچ کش PCNB کشت داده شدند. ظروف پتری در دمای ۱ ±۲۴ درجه سلسیوس و دوره متناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به مدت ۴-۵ روز نگهداری شدند (Tunali *et al.*, 2008).

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای SCAR مورد استفاده در تشخیص مولکولی گونه‌های *Fusarium culmorum* و *Fusarium pseudograminearum*

Table 1. Characteristics of SCAR primers used for molecular diagnosis of *Fusarium culmorum* and *Fusarium pseudograminearum*

Species	Primer	Sequence	Annealing temp.	Reference
Fusarium culmorum	Fc OIF	5'-atg gtg aac tcg tcg tgg c	66.8	(Nicholson *et al.*, 1998)
	Fc OIR	5'-ccc ttc tta cgc caa tct cg	64.7	
Fusarium pseudograminearum	Fpl-1	5'-cgg ggt agt ttc aca ttt ccg	67.2	(Aoki and O'Donnell 1999)
	Fpl-2	5'-gag aat gtg atg acg aca ata	57.5	

خالص‌سازی با روش تک اسپور روی محیط کشت آب آگار ۲٪ انجام گرفت (Nelson *et al.*, 1983). از کلنی‌های ایجاد شده در آب مقطر سترون، سوسپانسیون رقیق اسپور تهیه و روی محیط آب آگار ۲ ٪ نازک پخش شد. تشتک‌های پتری به مدت ۲۴-۱۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند، سپس زیر میکروسکوپ یک کنیدیوم جوانه زده همراه آگار بریده و به محیط کشت PDA منتقل شد. جدایه‌ها برای انجام مراحل بعدی در محیط کشت SNA و در دمای ۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم خصوصیات مورفولوژیکی مانند نوع فیالید (مونوفیالید یا پلی فیالید)، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، شکل ماکروکنیدیوم‌ها، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم، نحوه قرار گرفتن میکروکنیدیوم (در سرهای دروغین یا به صورت زنجیره‌ای یا به هر دو صورت) و رنگ پرگنه‌ها استفاده گردید (Leslie and Summerell 2006).

شناسایی مولکولی گونه‌های قارچ عامل بیماری

جهت حصول اطمینان از صحت شناسایی مورفولوژیکی به خصوص در مورد گونه‌هایی که به راحتی از دید مورفولوژیکی قابل تمیز نیستند، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر گونه توسط دستگاه ترموسایکلر (iCycler, BioRad, USA) بر اساس روش Akinsanmi و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد. به این منظور، از PCR و آغازگرهای اختصاصی Fp 1-1 و Fp 1-2 برای تشخیص *F. pseudograminearum* و از Fc OIF و Fc OIR برای تشخیص *F. culmorum* استفاده شد. مشخصات کامل این آغازگرها در جدول ۱ قید شده است. لازم به ذکر است این پرایمرها توسط شرکت سیناژن ساخته شدند.

بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های گونه غالب با استفاده از مارکرهای ریز ماهواره ای

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ابتدا DNA جدایه‌های مختلف قارچی به روش Raeder and Broda (1985) استخراج شد سپس به منظور تکثیر نواحی مرتبط یا ریز ماهواره‌ها واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگرهای SSR به روش Scott and Chakraborty (2008) انجام شد. در این بررسی از 8 جفت آغازگر استفاده شد (Giraud *et al.* 2002).

ابتدا با استفاده از تعداد محدودی از جدایه‌ها دمای بهینه اتصال شدن هر کدام از آغازگرها با استفاده از روش Gradient PCR که بین دمای ۵۰ تا ۵۸ درجه سلسیوس در نوسان بود تعیین، سپس جفت آغازگرهایی که قادر به تکثیر مکانهای ریزماهواره بودند برای بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیتهای گونه غالب انتخاب شدند. سپس

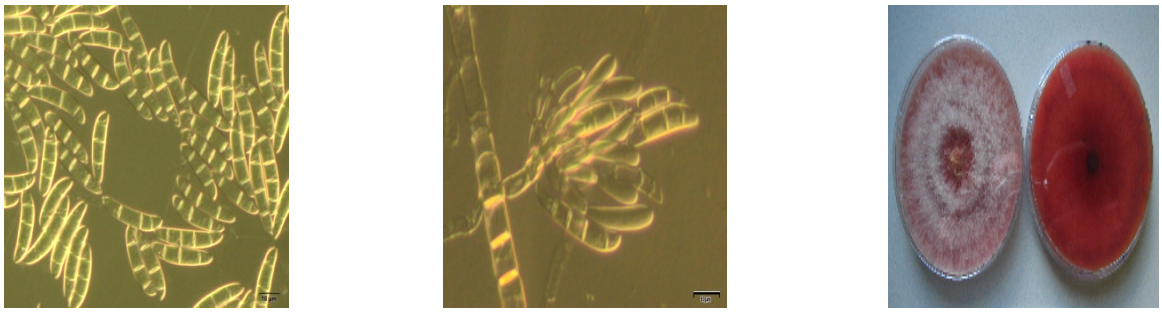
الکتروفورز محصولات PCR در ژل پلی اکریل آمید ۸٪ انجام شد. برای انجام الکتروفورز از سیستم ژل عمودی استفاده گردید. برای تهیه ژل، مقادیر ۱۰/۵ میلی لیتر آب مقطر سترون، ۵/۳ میلی لیتر اکریل آمید ۳۰٪، ۴ میلی لیتر بافر TBE 5X، ۲۰۰ میکرولیتر APS ۱۰% و ۱۰ میکرولیتر TEMED در یک ارلن تهیه شده و سریعا" در قالب شیشه‌ای ریخته شد. پس از آماده شدن ژل، ۷ میکرولیتر از محصولات PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردیده و در چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۲۰۰ ولت الکتروفورز شد. برای ارزیابی اندازه قطعات محصول PCR از سایز مارکر ۵۰ bp استفاده شد. جهت مشاهده قطعات DNA در ژل، رنگ آمیزی نیترات نقره بکار رفت، سپس ژل حاصل به مدت ۴ ساعت خشک و اسکن شد (Razavi and Hughes 2004).

سپس وزن مولکولی هرکدام از الل‌های مکان‌های ژنی حاوی ریز ماهواره با استفاده برنامه GEL ver2. (Thompson 1989) تعیین و فراوانی هر کدام از الل‌ها در جمعیت‌ها محاسبه شد سپس با استفاده از فرمول $H_T = 1- \Sigma Xi^2$ (Nei 1973) تنوع ژنی در کل جمعیت و در هر کدام از جمعیتهای شش گانه (۱- مازندران-گلستان، ۲- اردبیل،۳-قزوین-زنجان، ۴-تهران، ۵-مرکزی، ۶-اصفهان) محاسبه شد که در آن H_T میزان تنوع اللی در مکان ژنی مورد بررسی و Xi فراوانی هرکدام از الل‌های موجود در جمعیت می‌باشند. ضمنا میانگین تنوع اللی در داخل جمعیتها و در بین جمعیتها با استفاده از فرمولهای زیر محاسبه گردید: $H_T=H_S+D_{ST}$ و $G_{ST}=D_{ST}/H_T$ که در آن H_T تنوع اللی کل جمعیت یا جمعیتها، H_S میانگین تنوع اللی در داخل جمعیتها و D_{ST} تنوع اللی در میان جمعیتها و G_{ST} نسبت تنوع اللی در میان جمعیتها نسبت به تنوع کل جمعیت می‌باشد.

همچنین تعداد هاپلوتیپهای موجود در جمعیت با استفاده از روش Kolmer و همکاران (۱۹۹۵) تعیین شد. در این روش فرمول فنوتیپ مولکولی هر جدایه براساس داشتن قطعه‌ای از DNA بوده که بیشترین فراوانی را در زمان تکثیر با جفت آغازگر مربوطه داشته است. اگر جدایه‌ای حاوی قطعه DNAای باشدکه بیشترین فراوانی را در جمعیت داشته است عدد ۱، اگر حاوی قطعه DNAای باشدکه دومین فراوانی را داشته باشد عدد ۲ و اگر سومین فراونی را داشته باشد عدد ۳ را به خود اختصاص می‌دهد و به این روش فرمول فنوتیپ مولکولی (هاپلوتیپ) هر جدایه تعیین شد.

بررسی قدرت تهاجمی جدایه‌های گونه غالب

به منظور بررسی قدرت تهاجمی جدایه‌های گونه غالب ابتدا بذر گندم رقم حساس بولانی پس از ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ ٪ (از فرم تجاری ۵.۵٪ ماده موثره) به مدت دو دقیقه، در گلدانهای یک کیلویی حاوی خاک سترون رشد داده شده و در مرحله شروع پنجه زنی به وسیله مخلوط محیط گندم کلونیزه شده بوسیله هر کدام از جدایه‌های قارچ عامل بیماری و ورمیکولیت (نسبت ۱ به ۱۰) از طریق اضافه کردن مخلوط به سطح خاک گلدانها، مایه زنی شدند. سپس گلدانها به وسیله پاکتهای پلاستیکی که در قسمت فوقانی سوراخ شده بودند جهت حفظ رطوبت نسبی در عین تهویه پوشانده شدند. پس از ۴ هفته علایم بیماری با شاخص ۰ تا ۶ (۰= تعداد پنجه ۳ یا بیشتر بدون تغییر رنگ در طوقه، ۱= تعداد پنجه ۳ یا بیشتر با حدود ۱۰٪ قهوه‌ای شدن طوقه و بدون تغییر رنگ در ساقه‌ها، ۲= تعداد پنجه ۳ یا بیشتر با ۲۰٪ قهوه‌ای شدن طوقه و ۱/۳ ساقه‌ها تغییر رنگ یافته، ۳= تعداد پنجه ۲ یا ۳ با ۳۰٪ قهوه‌ای شدن طوقه و کمتر از



(c) (b) (a)

شکل ۱. خصوصیات مورفولوژیکی گونه *Fusarium culmorum* : (a) رنگ پرگنه قارچ در روی محیط کشت PDA پس از دو هفته، (b) طرز قرار گرفتن ماکروکنیدیها در روی مونوفیالید (c) ماکروکنیدیها

Fig. 1. Morphological characteristics of *Fusarium culmorum*. a. Colony color on PDA after two weeks, b. Macroconidia on monophialides, c. Macroconidia

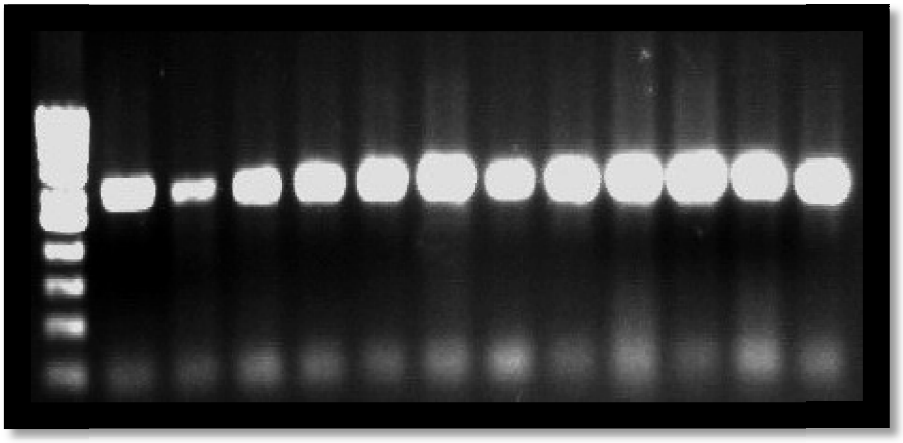
۵۰٪ ساقه‌ها تغییر رنگ یافته، ۴= تعداد پنجه ۱ یا ۲ با ۵۰٪ قهوه‌ای شدن طوقه و ۶۰٪ ساقه‌ها تغییر رنگ یافته، ۵= تعداد پنجه ۱ با ۷۰٪ قهوه‌ای شدن طوقه و ۷۰٪ ساقه‌ها تغییر رنگ یافته ۶= تعداد پنجه صفر (فقط ساقه اصلی) یا ۱۰۰-۹۰٪ قهوه‌ای شدن طوقه و ۱۰۰-۹۰٪ ساقه‌ها تغییر رنگ یافته) مبتنی بر اندازه لکه‌های روی پایه ساقه و شادابی کلی گیاه ارائه شده توسط Miedaner و همکاران (۲۰۰۱) با کمی تغییر ارزیابی شدند. آزمایش در شرایط گلخانه‌ای و در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار صورت گرفت. دادهای حاصل با اضافه نمودن عدد ۵/. و جذر گیری از عدد حاصل تبدیل، سپس با استفاده از روش Proc GLM و نرم افزار SAS ver 9.1 تجزیه واریانس شد. میانگین قدرت تهاجمی جدایه‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفت و جدایه‌هایی که از قدرت تهاجمی بالایی برخوردار بودند و به عنوان پاتوتیپ غالب بودند شناسایی شدند.

نتایج

نمونه برداری، جداسازی، خالص‌سازی و تشخیص گونه

از اوایل تا اواخر خرداد ۸۹-۱۳۸۸ گندم کاری‌های استانهای تهران، قزوین، گلستان، مازندران، اردبیل، زنجان، مرکزی و اصفهان بازدید و از هر استان چند ناحیه مهم کشاورزی انتخاب و در هر ناحیه چند مزرعه بررسی و نمونه برداری شد. در مجموع ۲۵۰ جدایه متعلق به جنس فوزاریوم جداسازی و خالص گردیدند. براساس خصوصیات مورفولوژیکی با استفاده از کلید مورفولوژیکی (Leslie and Summerell 2006) ۱۲ گونه متفاوت شناسایی شد که عبارتند از *F. culmorum*، *F. pseudograminearum*، *F. proliferatum*، *F. equiseti*، *F. nygamai*، *F. solani*، *F. pseudonygamai*، *F. sambucinum*، *F. acuminatum*، *F. lateritium*، *F. oxysporum* و *F. verticillioides*. در این بررسی گونه *F. culmorum* با بیش از ۸۰ جدایه (۳۲٪) به عنوان گونه غالب شناسایی شد و گونه *F. pseudograminearum* دومین میزان فراوانی (۱۸٪) را به خود اختصاص داد.

خصوصیات مورفولوژیکی گونه غالب *F. culmorum* در شکل ۱ نشان داده شده است. این گونه در محیط کشت CLA به فراوانی تولید ماکروکنیدی روی اسپورودوکیومهای نارنجی رنگ نمود و این ماکروکنیدیها بیضی شکل کشیده که عریض ترین قسمت آن در وسط، و



شکل ۲. تکثیر قطعه DNA به وزن bp ۵۷۰ با آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص جدایه‌های *Fusarium culmorum*

ستون اول سمت چپ مارکر استاندارد bp ۱۰۰ و ستونهای ۱۳-۲ جدایه‌های *Fusarium culmorum*

Fig. 2. Amplification of 570 bp DNA fragment using specific primers for diagnosing *Fusarium culmorum.* Left to right: lane 1: 100 bp DNA ladder and lane 2-13: isolates of *Fusarium culmorum*

پاشنه انتهایی توسعه نیافته و سلولهای انتهایی نسبتا گرد روی مونوفیالیدها تشکیل شدند. ماکروکنیدیها معمولا دارای ۳-۴ جداره عرضی سلولی و به طول تقریبی ۳۸-۳۵ میکرون و به عرض ۲/۷۵ میکرومتر بودند (شکل ۱).

به منظور اطمینان از تشخیص مورفولوژیکی جدایه‌های *F. culmorum* که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شدند در تمامی جدایه‌های متعلق به *F. culmorum* قطعه DNA به اندازه 570bp تکثیر شد (شکل ۲) و از بین این جدایه‌ها و با توجه به مناطق پراکنش آنها ۶۴ جدایه برای بررسی‌های تنوع ژنتیکی و بیماریزایی انتخاب گردیدند. مشخصات نمونه‌های متعلق به گونه *F. culmorum* جمع آوری شده از مناطق مختلف گندم کاری‌های کشور در جدول ۲ درج شده است.

جدول ۲. مشخصات نمونه‌های متعلق به گونه *Fusarium culmorum* جمع آوری شده از مناطق مختلف گندم‌کاری‌های ایران

Table 2. Characteristics of *Fusarium culmorum* isolates collected from different wheat growing areas of Iran

No	Isolate code	Date of sampling	Collector	Sampling location
1	22 Mazandaran (1)	-	M. Razavi	Sari
2	A2 (2)	06/2009	E. Sari	Markazi-Arak-Komijan road
3	M2 (2)	06/2009	M. Razavi	Ardabil-Parsabad Moghan
4	M31	06/2009	M. Razavi	Ardabil-Parsabad Moghan
5	A1 (2)	06/2009	E. Sari	Markazi-Arak-Tafresh road
6	22 Mazandaran (2)	06/2009	M. Razavi	Mazandaran-
7	15 (3)	06/2009	M. Razavi	Ghazvin-Abyek road
8	31 Mazandaran (1)	2009	M. Razavi	-
9	11 Gorgan	2009	M. Razavi	Golestan-Kordkoy
10	A1(3)	2009	E. Sari	Markazi-Arak-Tafresh road
11	I 4(1)	2009	M. Razavi	Ghazvin-Choobin dar
12	V5(2)	06/2009	M. Razavi	Tehran-Varamin
13	I 4 (2)	06/2009	M. Razavi	Ghazvin-Choobin dar
14	Z1(2)	06/2009	M. Razavi	Zanjan
15	15 Mazandaran	2009	M. Razavi	Mazandaran
16	ML1(3)	06/2009	M. Razavi	Alborz-Karaj-Malard

ادامه جدول ۲.

Table 2. Continued.

No	Isolate code	Date of sampling	Collector	Sampling location
17	S10(2)a	06/2009	E. Sari	Esfahan-Ziyar
18	S10(4)	06/2009	E. Sari	Esfahan-Ziyar
19	21 Mazandaran (1)	2009	M. Razavi	Mazandarn-
20	A1(4)	06/2009	E. Sari	Markazi-Arak-Tafresh road
21	11 (4)	06/2009	E. Sari	Ghazvin-Abyek road
22	S18(1)	06/2009	E. Sari	Esfahan- Zayanderood river bank
23	22 Mazandaran (3)	06/2009	M. Razavi	Mazandaran
24	M2(4)	06/2009	M. Razavi	Ardabil-Moghan Parsabad
25	ML3(4)	06/2009	M. Razavi	Alborz-Malard-Karaj
26	31 Mazandaran (2)	2009	M. Razavi	Mazandaran
27	V2(3)	2009	M. Razavi	Tehran-Varamin-Pishva
28	V7(4)	06/2009	M. Razavi	Tehran-Varamin
29	I6(1)b	06/2009	M. Razavi	Ghazvin-Choobindar
30	S9(4)	06/2009	E. Sari	Esfahan
31	S7(7)	06/2009	E. Sari	Esfahan-Ziyar
32	S10(2)	06/2009	E. Sari	Esfahan-Qome road
33	V5(1)a	06/2009	M. Razavi	Tehran-Varamin
34	V5(1)b	06/2009	M. Razavi	Tehran-Varamin
35	V5(3)	06/2009	M. Razavi	Tehran-Varamin
36	21 Mazandaran (2)	06/2009	M. Razavi	Mazandaran
37	M2(1)	06/2010	M. Razavi	Ardabil-Parsabad Moghan
38	I5(2)	06/2010	M. Razavi	Ghazvin-Choobindar
39	S9(3)	06/2009	E. Sari	Esfahan-Zayanderood river bank
40	Z1(2)	06/2009	E. Sari	Zanjan-Aladeh
41	38 Mazandaran	06/2009	M. Razavi	Mazandaran
42	S18(4)	06/2009	E. Sari	Esfahan- Qome road
43	S10(4)	06/2009	E. Sari	Esfahan-Ziyar
44	S5(2)	06/2009	E. Sari	Esfahan-Ziyar
45	V9(4)	05/2010	M. Razavi	Tehran-Varamin-Pishva
46	V9(2)	06/2009	M. Razavi	Tehran-Varamin
47	I1(1)	06/2010	M. Razavi	Ghazvin-Choobindar
48	S19(4)	06/2009	E. Sari	Esfahan-Qome Road
49	S12(1)	06/2009	E. Sari	Esfahan-Qome Road
50	3 Mazandaran	2009	M. Razavi	Mazandaran
51	A9(1)	06/2009	E. Sari	Markazi-Arak Komijan road
52	6 Mazandaran	2009	M. Razavi	Mazandaran
53	I6(1)a	06/2010	M. Razavi	Ghazvin-Choobindar
54	S12(4)	06/2009	E. Sari	Esfahan-Zayanderood river bank
55	M2(4)	06/2010	M. Razavi	Ardabil-Parsabad Moghan
56	V3(2)	06/2009	M. Razavi	Tehran-Varamin
57	11 Golestan	06/2009	M. Razavi	Golestan-Gorgan
58	I6(4)	06/2010	M. Razavi	Ghazvin-Choobindar
59	M2(4-1)	06/2010	M. Razavi	Ardabil-Parsabad Moghan
60	ML2(4)	06/2009	M. Razavi	Alborz-Karaj-Malard
61	I4(2)	06/2010	M. Razavi	Ghazvin Choobindar
62	S6(1)	06/2009	E. Sari	Esfahan-Ziyar
63	A1(1)	06/2009	E. Sari	Markazi-Arak- Tafresh road
64	ML2	06/2009	M. Razavi	Alborz-Karaj-Malard

جدول۳. دمای جفت شدن پرایمرها، وزن مولکولی اللهای تکثیر شده، تعداد اللهای تکثیر شده و تعداد جدایه‌های فاقد الـل در شـش مکـان ژنی حاوی ریز ماهواره

Table 3. Annealing temperature, molecular weight of amplified alleles, numbers of amplified alleles, and number of isolates with null alleles in six SSR loci

SSR loci	Annealing temperature (°C)	Range of fragment size (bp)	No. of alleles amplified	No. of isolates with null alleles
F1-R1	51	172-205 bp	7	0
F4-R4	53	122-156 bp	9	2
F6-R6	51	107-224 bp	16	4
F7-R7	52	206-236 bp	7	4
F10-R10	55	81-253 bp	22	2
F11-R11	52	238-408 bp	14	3

جدول ٤. میانگین تنوع اللی در داخل و بین جمعیتهای مختلف جدایه‌های ***Fusarium culmorum*** در شش مکان ژنی حاوی ریز ماهواره

Table 4. Mean of allelic diversity within and between populations of *Fusarium culmorum* at six SSR loci

SSR locus	Hs	D_{ST}	G_{ST}	H_T
F1-R1	0.641	0.100	0.135 (13.5%)	0.74
F4-R4	0.650	0.110	0.145 (14.5%)	0.76
F6-R6	0.810	0.095	0.105 (10.5%)	0.90
F7-R7	0.610	0.055	0.083 (8.3%)	0.66
F10-R10	0.840	0.086	0.092 (9.2%)	0.93
F11-R11	0.789	0.075	0.086 (8.6%)	0.86
Average	0.72	0.09	0.11 (11%)	0.81

Hs: Mean of allelic diversity within populations; D_{ST}:Mean of allelic diversity among populations; G_{ST}: Proportion of allelic diversity among populations to total allelic diversity of the population; H_T: Total allelic diversity of the population

بررسی تنـوع ژنتیکـی بـا اسـتفاده از مارکرهـای ریـز ماهواره‌ای

نتـایج بررسـی دمـای اتصـال ۸ جفـت آغـازگر ریـز ماهواره‌ای که بـا اسـتفاده از روش Gradient PCR انجـام شد نشان داد که این دما بین ۵۵-۵۱ درجـه سلسـیوس در نوسان بود (جدول ۲). آغازگرهای F3 , F9 نتایج رضـایت بخشی را تولید ننمودند بنابراین یادداشت برداری از نتـایج این آغازگرها انجام نگردید و در محاسبات منظور نشـدند. تعداد اللهای تکثیر شده و وزن مولکولی هر کـدام از اللهـا در جدول ۳ نشان داده شده است.

بیشترین میزان تنـوع ژنـی (۰/۹۳) توسـط آغازگرهـای F10-R10 و کمترین میـزان تنـوع ژنتیکـی (۰/۶۶) توسـط آغازگرهای F7-R7 و F1-R1 برآورد شـد. میـانگین کـل تنوع ژنتیکی جمعیت ۰/۸۱ بود که تنوع بسیار بالایی است. به طور میانگین ۸۹٪ این تنوع در داخل جمعیتهـای مـورد بررسی و تنها ۱۱٪ آنها بین جمعیتهای مختلف توزیع شـده بود (جدول ۴).

بررسی تعداد هاپلوتیپهای موجود در داخل جمعیت بـه روش کـولمر نشـان داد کـه هـر جدایـه متعلـق بـه یـک هاپلوتیپ مـی‌باشـد و هـیچ دو هاپلوتیـپ ۱۰۰٪ مشـابهی مشاهده نگردید و ایـن موضـوع تاییـدی بـر وجـود تنـوع ژنتیکی زیاد در بین جدایه‌های *F. culmorum* مورد بررسی در تمامی مکانهای مورد نمونه برداری می‌باشد.

جدول ۵. مقایسه میانگین قدرت تهاجمی جدایه‌های *Fusarium culmorum* در روی رقم حساس بولانی براساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ٪۵ در شرایط گلخانه در سال ۱۳۹۰

Table 5. Comparison of means of aggressiveness of *Fusarium culmorum* isolates on the susceptible cultivar Bolani based on Duncan's Multiple range test at 5% probability level in greenhouse conditions in 2011

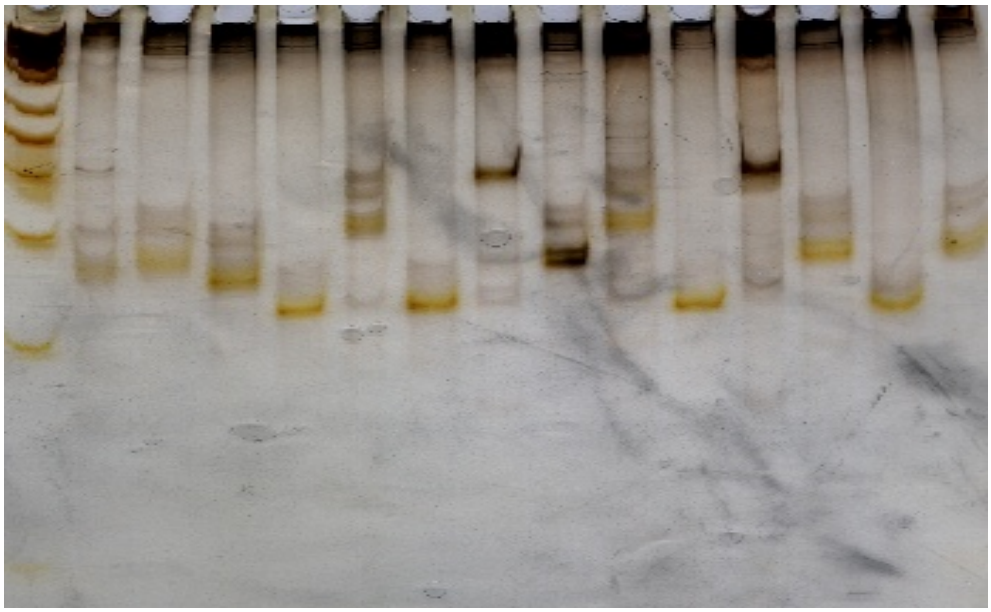
Isolate code	Mean of aggressiveness of isolates on Bolani cultivar (0-6 scale)	Isolate code	Mean of aggressiveness of isolates on Bolani cultivar (0-6 scale)	Isolate code	Mean of aggressiveness of isolates on Bolani cultivar (0-6 scale)
17	6 a	60	4.75 bcdef	59	3 jkl
48	6 a	8	4.75 bcdef	29	2.75 klm
63	6 a	64	4.75 bcdef	12	2.75 klm
45	6 a	38	4.5 cdefg	25	2.75 klm
52	5.75 ab	46	4.5 cdefg	11	2.75 klm
44	5.75 ab	62	4.5 cdefg	36	2.50 lmn
5	5.75 ab	1	4.25 efgh	14	2.50 lmn
13	5.75 ab	40	4.25 efgh	20	2.25 mno
22	5.5 abc	27	4 fghi	10	2.25 mno
30	5.5 abc	7	4 fghi	15	2 no
35	5.25 abcd	55	4 fghi	51	2 no
2	5.25 abcd	4	4 fghi	23	1.75 o
34	5.25 abcd	54	3.75 ghij	24	1.25 p
47	5 abcde	3	3.50 hijk	21	1 p
31	5 abcde	43	3.50 hijk	16	1 p
56	5 abcde	37	3.50 hijk	29	1 p
9	5 abcde	42	3.50 hijk	32	1 p
6	5 abcde	61	3.50 hijk	18	0.5 q
33	5 abcde	50	3.50 hijk	49	0 r
57	5 abcde	19	3.50 hijk	65	0 r
53	5 abcde	28	3.25 ijk		
41	5 abcde	58	3.25 ijk		

*There is no significant difference between means having the same letters

بررسی قدرت تهاجمی جدایه‌های گونه غالب (*F. culmorum*)

تجزیه واریانس قدرت تهاجمی جدایه‌های *F. culmorum* نشان داد که بین میانگین جدایه‌ها اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت اما بین تکرارهای مختلف تفاوت معنی داری وجود نداشت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که جدایه‌های شماره ۱۷، ۴۸، ۶۳، ۴۵، ۵۲، ۴۴، ۵، ۱۳، ۲۲، ۳۰، ۳۵، ۲، ۳۴، ۴۷، ۳۱، ۵۶، ۹، ۶، ۳۳، ۵۷، ۵۳ و ۴۱ با بیشترین قدرت تهاجمی (شدت بیماری ایجاد شده روی رقم حساس بولانی بین ۵ تا ۶ از مقیاس ۶-۰ بود) در یک گروه آماری (A) و جدایه‌های ۴۹، ۲۴، ۲۱، ۱۶، ۲۹، ۳۲ و ۱۸ به همراه شاهد باکمترین شدت بیماری (شدت بیماری ایجاد شده روی رقم حساس بولانی بین ۰ تا ۱/۲۵ از مقیاس ۶-۰ بود) در گروههای آماری P، Q و R قرار گرفتند. بقیه جدایه‌ها با داشتن قدرت بیماریزایی متوسط بین ۱/۷۵ تا ۵ در گروههای حد واسط قرار گرفتند (جدول ۵).

به طور کلی تفاوت قدرت تهاجمی بین جدایه‌ها بصورت تغییرات کمی بوده و بغیر از جدایه شماره ۴۹ که با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفت بقیه جدایه‌ها همگی روی رقم حساس گندم بولانی بیماریزا بودند ولی



شکل ۳. آللهای مختلف مارکر ریز ماهواره ای F6 -R6 در بین جدایه‌های *Fusarium culmorum*

ستون اول سمت چپ مارکر استاندارد 50 bp و ستونهای ۱۵-۲ جدایه‌های *Fusarium culmorum* (جدایه‌های شماره ردیف 63-49).

Fig. 3. Different alleles of F6-R6 SSR locus among *Fusarium culmorum* isolates. Left to right, lane 1: 50 bp DNA ladder, lanes 2-15: *Fusarium culmorum* isolates number 49-63.

شدت بیماری زایی آنها متفاوت بود. از بین جدایه‌هایی که قدرت بیماریزایی بالاتری داشتند و در گروه A قرار گرفتند می‌توان در شناسایی منابع مقاومت به پوسیدگی طوقه و ریشه گندم استفاده نمود.

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که گونه *F. culmorum* بیشترین فراوانی (۳۲٪) را در بین گونه‌های فوزاریوم جدا شده از طوقه و ریشه گندم در ایران را داشته و به عنوان گونه غالب محسوب می‌شود و بعد از این گونه *F. pseudograminearum* دومین میزان فراوانی (۱۸٪) را داشت. نتایج مشابهی در تحقیقات اخیری که در کشور ترکیه صورت گرفته به دست آمده و در آن، گونه *F. culmorum* بیشترین فراوانی را در میان قارچهای جداسازی شده از ریشه و طوقه گندم در ترکیه به خود اختصاص داده است (Tunali *et al.*, 2008). اما نتایج تحقیق حاضر با نتایج بررسی‌های صورت گرفته در استرالیا که نشان داد گونه که *F. pseudograminearum* تقریباً از تمامی مزارع واقع در کوئینزلند و نیوساوس ولز جداسازی شد مغایرت دارد. اگر چه در مناطق مذکور *F. culmorum* به ندرت جداسازی شده بود، در مناطق با بارندگی بالاتر از ۵۰۰ میلی متر واقع در ویکتوریا این گونه غالب ایزوله‌ها را شامل می‌شد که بر اهمیت شرایط اقلیمی بر گسترش گونه‌های فوزاریوم تاکید دارد (Backhouse *et al.* 2004). با توجه به اینکه ایالتهای کوئینزلند و نیوساوس ولز دارای آب و هوای گرم و مرطوب می‌باشد و بر اساس گزارشهای موجود گونه *F. pseudograminearum* بیشتر در مناطق با آب و هوای گرم شایع می‌باشد در تحقیق حاضر نیز در مناطق گرمسیر نظیر ورامین، مغان و گلستان اغلب نمونه‌های مربوط به *F. pseudograminearum* بودند اما

در بقیه استانها نظیر اصفهان، مازندران، مرکزی، قزوین و زنجان که دارای آب و هوای معتدل و سرد می‌باشند اغلب گونه *F. culmorum* جداسازی گردید. بنابراین با توجه به شرایط اقلیمی مناطق مورد بررسی غالبیت گونه *F. culmorum* دور از انتظار نمی‌باشد و این یافته بر اهمیت شرایط اقلیمی بر گسترش گونه‌های فوزاریوم تاکید دارد. همچنین نتایج مشابهی توسط اسمایلی و همکاران (Smiley 2005) از آمریکا گزارش شده است که در آن گونه‌های *F. pseudograminearum*، *F. culmorum* و *F. avenaceum* مهمترین گونه‌های فوزاریوم عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم بودند.

استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی برای تشخیص گونه‌های فوزاریوم اگرچه بسیار مفید است ولی این گونه بررسی‌ها نیازمند تجربه زیاد و اطلاعات تاکسونومیکی است و در بعضی موارد شناسایی گونه‌ها ی بسیار نزدیک *F. pseudograminearum* و *F. graminearum* با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی بسیار سخت می‌باشد. در تحقیق حاضر استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص و جدا نمودن گونه‌های *F. pseudograminearum* و *F. graminearum* و مآلا مطالعه تنوع ژنتیکی گونه غالب کارایی بسیار خوبی را نشان داد. در سالهای اخیر بهره گیری از آغازگرهای اختصاصی و تکنیک (SCAR) و همچنین مقایسه توالی ژنهای محافظت شده‌ای نظیر Translation Elongation Factor (TEF-1α)، Beta-tubulin و غیره جهت شناسایی گونه‌های مختلف فوزاریوم توسط محققین دیگر تاکید گردیده است (Aoki and O'Donnell 1999).

استفاده از مارکرهای ریز ماهواره‌ای در بررسی جمعیت جدایه‌های گونه غالب (*F. culmorum*) نشان داد که تنوع ژنتیکی بسیار زیادی (۸۹٪) در داخل جمعیتهای این گونه در مناطق مختلف کشور وجود دارد و تمایز بین جمعیتها بسیار کم (۱۱٪) می‌باشد همچنین در بین جدایه‌های مورد بررسی هاپلوتیپ مشابهی مشاهده نشد و تمامی جدایه‌ها از نظر ژنتیکی متفاوت بودند این موضوع بیانگر وجود مکانیزمهای زیاد ایجاد تغییرات ژنتیکی در داخل جمعیتهای این گونه می‌باشد. بر اساس منابع موجود اگرچه تاکنون فرم جنسی برای گونه *F. culmorum* گزارش نشده است ولی وجود تغییرات ژنتیکی زیاد نشان می‌دهد که احتمالا این گونه نیز به طریق جنسی تولید مثل می‌کند زیرا اگر صرفا به صورت غیرجنسی تولید مثل می‌نمود انتظار بر این بود که میزان تنوع ژنتیکی در داخل جمعیتها کمتر و در بین جمعیتهای مناطق مختلف جغرافیایی بیشتر بود لذا لازم است بررسی‌های دقیق تری در مورد بیولوژی قارچ عامل بیماری بویژه در مورد نحوه تولید مثل آن در طبیعت صورت گیرد.

بررسی قدرت تهاجمی جدایه‌ها روی رقم حساس گندم (بولانی) نشان داد که بین جدایه‌ها اختلاف معنی داری وجود دارد و این تفاوتها به صورت کمی بودند. نتایج مشابهی از آلمان گزارش شده است به طوری که در بین جدایه‌های *F. culmorum* و *F. graminearum* از نظر قدرت تهاجمی تفاوتهای کمی وجود داشت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Miedaner *et al.* 2001). همچنین بررسی‌ها نشان داده است که کشت متوالی گندم سبب افزایش قدرت ویرولانس جدایه‌ها می‌شود (Akinsanmi *et al.*, 2004). احتمال می‌رود جدایه‌هایی که از قدرت بیماریزایی بالاتری برخوردار هستند از مزارعی نمونه برداری شده اند که چندین سال به طور متوالی گندم کشت گردیده اند و این موضوع نیاز به بر رسی‌های دقیق تری دارد.

با توجه به وجود تنوع ژنتیکی زیاد در سطح مولکولی و

تفاوت در قدرت تهاجمی جدایه‌ها لازم است در هر گونه برنامه به نژادی و اصلاحی مقاومت به *F. culmorum* از طیف زیادی از جدایه‌ها استفاده شود و ارقام مقاوم بایستی به طیف وسیعی از جدایه‌ها مقاوم باشند و در صورت استفاده از یک جدایه مقاومت ارقام به زودی شکسته می‌شود و این موضوع توسط سایر محققین در استرالیا و آمریکا نیز تاکید شده است (Bently *et al.* 2008) لذا از جدایه‌هایی که در این بررسی بیشترین قدرت تهاجمی را داشتند و از مناطق جغرافیایی مختلف بوده و از نظر ژنتیکی نیز متفاوت می‌باشند نظیر جدایه‌های شماره ۱۷، ۴۸، ۶۳، ۴۵، ۵۲، ۴۴، ۵، ۱۳، ۲۲، ۳۰، ۳۵، ۲، ۳۴، ۴۷، ۳۱، ۵۶، ۹، ۶، ۳۳، ۵۷، ۵۳ و ۴۱ می‌توان در شناسایی منابع مقاومت به پوسیدگی طوقه و ریشه با عامل *F. culmorum* استفاده نمود و انجام این تحقیق راه را برای شناسایی منابع مقاومت به این بیماری هموار می‌نماید.

منابع

Akinsanmi, O.A., Mitter, V., Simpfendorfer, S., Backhouse, D. and Chakraborty, S. 2004. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. Australian Journal of Agricultural Research 55: 99-107.

Aoki, T. and 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.

Backhouse, D., Abubakar, A.A., Burgess, T.L.W., Dennis, J.L., Hollaway, G.J., Wildermuth, G.B., Wallwork, H. and Henry, F.J. 2004. Survey of *Fusarium* species associated with crown rot of wheat and barley in eastern Australia. Australasian Plant Pathology 33: 255-261.

Bahrami Kamangar, S., Bostani, K., Kazemi, H. and Moradi, M. 2006. Etiology of root and foot rot in wheat farms of Kurdistan province. Proceedings of the 17th Iranian Plant Protection Congress 2-5 Sept. 2006, University of Tehran, Karaj, Iran, Page 23.

Bentley, A.R., Leslie, J.F., Liew, E.C.Y., Burgess, L.W. and Summerell, B.A. 2008. Genetic structure of *Fusarium pseudograminearum* populations from the Australian grain belt. Phytopathology 98: 250-255.

Bogale, M., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. and Steenkamp, E.T. 2006. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analysis. Fungal Diversity 23: 51-66.

Darvishnia, M., Alizadeh, A. and Mohammadi Goltapeh, E. 1998. Fusarium species and other fungi associated with crown and root rot of wheat in Lorestan province. Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress 23-27 Aug. 1998, , Karaj, Iran, Page 20.

Giraud, T., Fournier, E., Voutrin, D., Solignac, M., Vercken, E., Bakan, B. and Brygoo, Y. 2002. Isolation of eight polymorphic microsatellites loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. Molecular Ecology Notes 2: 121-123.

Gonzalez, M.S. and Trevathan, L.E. 2000. Identity and pathogenicity of fungi associated with root and crown rot of soft red winter wheat grown on the upper coastal plain land resource area of Mississippi. Journal of Phytopathology 148: 77-85.

Guo, X.W., Fernando, W.G.P. and Seow-Brock, H.Y. 2008. Population structure, chemotype diversity and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. Plant Disease 92: 756-762.

Kazemi, H. 2002. *Fusarium* species associated with root and crown of wheat in Tehran province. Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress 7-11 Sept. 2002, Razi University, Kermanshah, Iran, Page 22.

Klein, R.N. and Wegulo, S.N. 2006. Root and crown rot winter kill complex of winter wheat. Report published by University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Science.

Kolmer, J.A., Liu, J. Q. and Sies, M. 1995. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f. sp.

tritici in Canada. Phytopathology 85: 276-285.
Leslie, J.F. and Summerell, B.A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell, Iowa, USA. 388pp.
Mansouri, B. 1995. Soil borne diseases of wheat in Fars province. Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress 2-7 Sept. 1995, Karaj, Iran, Page 58.
Miedaner, T., Gumagun, C.J.R. and Chakraborty, S. 2008. Population Genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum and F. culmorum*. Journal of Phytopathology 156: 129-139.
Miedaner, T., Schilling, A.G. and Geiger, H.H. 2001. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. Journal of Phytopathology 149: 641-648.
Nash, S.M. and Snyder, W.C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot Fusarium in field soils. Canadian Journal of Botany 43: 939-945.
Naef, A. and De´fago, G. 2006. Population structure of plant-pathogenic *Fusarium* species in overwintered stalk residues from Bt-transformed and non-transformed maize crops. European Journal Plant Pathology 116:129–143.

Nelson, P.E., T.A. Toussoun and Marasas, W.F.O. 1983. Fusarium *Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.
Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 70: 3321-3323.
Raeder, P. and Broda, A. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters of Applied Microbiology 1: 17-20.
Ravanlou, A. and Banihashemi, Z. 1998. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with crown and root rot of wheat in Fars. Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress 23-27 Aug. 1998, , Karaj, Iran, Page 21.
Razavi, M. and Hughes, G.R. 2004. Microsatellite markers provide evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan.Genome 47: 789-794.
Rovira, A.D. 1990. The impact of soil and crop management practices on soil born root disease and wheat yield. Soil Use Management 6: 195-200.
Safaee, D., Hedjaroud, A., and Okhovvat, M. 2000. *Fusarium* spp. that cause root and crown rot of wheat in Kermanshah province irrigated fields. Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress 5-8 Sept. 2002, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, Page 216.
Scott, J.B. and Chakraborty, S. 2008. Identification of 11 polymorphic simple sequence repeat loci in the phytopathogenic fungus, *Fusarium pseudograminearum* as a tool for genetic studies. Molecular Ecology 8: 628-630.
Smiley, R.W., Gourlie, J.A., Patterson, S.A. and Whittaker, R.G. 2005. Crop damage estimates for crown rot of wheat and barley in Pacific Northwest. Plant Disease 89: 595-604.
Southwell, R.J., Moore, K.J., Manning, W. and Hayman, P.T. 2003. An outbreak of Fusarium head blight of durum wheat on the Liverpool. Plains in northern New South Wales in 1999. Australasian Plant Pathology 32: 465-471.
Thompson, J.R. 1989. The program GEL ver. 2/17/89. 7105 Hana RD., Edison, NJ, USA.
Tunali, B., Nicol, J.M., Hodson, D., Uckun, Z., Orhan, B., Erdurmus, D., Hekimhan, H., Aktas, H., Akbuduk, M.A. and Bagci, S.A. 2008. Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. Plant Disease 92: 1299-1306.
Zare, R. and Ershad, D. 1997. *Fusarium* species isolated from cereals in Gorgan area. Iranian Journal of Plant Pathology 33: 1–14.