ردیابی تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین در جدایه‌های قارچ *Fusarium graminearum* در گندم‌های استان سیستان و بلوچستان

Detection of Trichothecene Chemotypes of *Fusarium graminearum* Isolates in Wheats of Sistan va Baluchestan Province

پیام محمودی[۱]، سیدکاظم صباغ[۲*] و مهتا مظاهری[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۷/۰۱

چکیده

قارچ *Fusarium graminearum* عامل مهم بیماری فوزاریوز سنبله گندم در سرتاسر جهان است. این قارچ مجموعه‌ای از تریکوتسین‌ها از قبیل دی‌اکسی نیوالنول (DON)، نیوالنول (NIV)، را تولید می‌کند که برای سلامتی انسان و حیوان مضر هستند. به‌منظور ردیابی ژن‌های مؤثر در تولید تریکوتسین در جدایه‌های *Fusarium graminearum* در استان سیستان و بلوچستان، نمونه‌گیری از مزارع گندم در سال‌های زراعی ۱۳۹۰-۱۳۸۹ انجام گرفت. پس از کشت و خالص‌سازی نمونه‌ها، با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر برای گونه‌های فوزاریوم، ۲۹۳ جدایه فوزاریوم متعلق به هشت گونه فوزاریوم جداسازی و شناسایی شد. از بین جدایه-های شناسایی شده فوزاریوم، گونه *F. graminearum* بیشترین فراوانی (۶۸/۸٪) را در بین گونه‌های دیگر داشت. پس از شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های *F. graminearum*، تعداد ۱۶۸ جدایه با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی (Fg16F/Fg16R) این گونه شناسایی تکمیلی شده و مورد تأیید قرار گرفتند. در این جدایه‌ها، وجود سه ژن *Tri13*، *Tri5* و *Tri7* با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی این ژن‌ها ردیابی شد. دو تیپ شیمیایی NIV و DON در بین جدایه‌های *F. graminearum* با جفت آغازگرهای اختصاصی این ژن‌ها شناسایی شد. نتایج واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی نشان داد که تمام جدایه‌های آزمایش شده واجد ژن های مؤثر در تولید تریکوتسین می‌باشند. بنابراین ردیابی ژن‌های مؤثر در تولید تریکوتسین با استفاده از جفت آغارگرهای اختصاصی مذکور می‌تواند در تعیین جدایه‌های فوزاریوم تولیدکننده تریکوتسین جایگزین روش‌های شیمیایی پرهزینه و زمان‌بر گردد.

واژه‌های کلیدی: تریکوتسین، *Fusarium graminearuw*، نیوالنول، دی‌اکسی‌نیوالنول، تیپ شیمیایی

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل

۲. استادیار گروه گیاه‌پزشکی و پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

۳. استادیار ژنتیک مولکولی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل

*: نویسنده مسوول Email: Sk.sabbagh@uoz.ac.ir

* این مقاله بخشی از پایان‌نامه نویسنده اول با راهنمایی نویسنده دوم (نویسنده مسئول) می‌باشد که در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل (بیوسنتر) انجام شده است.

مقدمه

F. graminearum Schwabe گونه غالب فوزاریوز سنبله گندم در جهان، به‌ویژه در مناطق معتدل آسیا، اروپا و آمریکا به‌شمار می‌رود *جونز* (Jones, 2000). *F. graminearum* به‌عنوان گونه‌ی غالب در استان گلستان شناخته شده است عبادی تیزکر؛ صباغ (Abedi-Tizaki and Sabbagh, 2012). این قارچ مجموعه‌ای از تریکوتسین‌ها شامل نیوالنول (Nivalenol) ، دی اکسی نیوالنول (Deoxynivalenol) و مایکوتوکسین استروژنیک زرالنون (Zearalenone) را تولید می‌کند *کیمورا* و همکاران (Kimura *et al.*, 2003). تریکوتسین‌ها در بیماری‌زایی *F. graminearum* در گیاهان مؤثرند و کاهش قدرت جوانه‌زنی بذر، بلایت گیاهچه، کاهش پروتئین دانه، تخریب گرانول‌های نشاسته، تأثیر در کیفیت دانه و آرد حاصل از بذور آلوده در ارتباط با تریکوتسین‌های تولید شده توسط قارچ *F. graminearum* گزارش شده است *پانی* و همکارن (Parry *et al.*, 2007). این توکسین‌ها در پروسه‌های مختلف تهیه‌ی مواد غذایی حالت طبیعی خود را از دست نمی‌دهند و پایدار می‌باشند *امرتاق* (Omurtag, 2008). تریکوتسین‌ها با جلوگیری از سنتز پروتئین در سلول‌های یوکاریوتیکی برای سلامتی انسان نیز مضر می‌باشند *مول* و همکاران (Mule *et al.*, 2005). در موارد شدید علائم به‌صورت افزایش ضربان قلب، اختلال در اعمال عضلانی قلب، بزرگ شدن و فیبروزه شدن قلب بروز می‌کند. همچنین مصرف طولانی مدت تریکوتسین‌ها در سیستم اعصاب مرکزی، خونریزی مننژها را ایجاد می‌کند *فورود و ادز* (Foroud and Eudes, 2009).

تریکوتسین‌ها به دو کلاس A و B تقسیم می‌شوند که در کلاس B، توکسین‌های قارچی مهم و خطرناکی نسبت به کلاس A قرار دارند. قارچ *F. graminearum* قادر به تولید تریکوتسین‌های نوع B ازجمله نیوالنول (NIV)، دی‌اکسی‌نیوالنول (DON) و مشتقات استیلی آن‌ها مانند ۴- استیل نیوالنول (4-AcNIV)، ۳- استیل‌دی‌اکسی‌نیوالنول (3-AcDON) و ۱۵- استیل دی‌اکسی‌نیوالنول (15-AcDON) می‌باشند *کیمورا* و همکاران (2003). ژن‌های سنتزکننده تریکوتسین‌ها (Tri) در یک خوشه یا کلاستر ژنی (حداقل ۱۰ ژن) متمرکز شده‌اند که شامل: ژن‌های سنتتاز تریکوداین (*Tri5*)، اکسیژناز P450 (*Tri11*, *Tri4*)، استیل‌ترانسفراز (*Tri13*, *Tri7*)، فاکتورهای نسخه‌برداری (*Tri6*, *Tri10*)، پمپ انتشار توکسین (*Tri12*) و دو پروتئین فرضی ناشناخته (*Tri8*, *Tri9*) می‌باشند دیگر ژن‌های استیل‌ترانسفراز مانند *Tri101* در این خوشه ژنی به‌صورت ناپیوسته هستند *لی* و همکاران (Lee *et al.*, 2002).

چندلر و همکاران (Chandler *et al.*, 2003) جدایه‌های *F. graminearum* را براساس قطعات منومرفیکی تکثیر شده با آغازگرهای Fg16 به گروه‌های جمعیتی مختلفی تقسیم کردند. این گروه‌بندی که به‌نام آنالیز SCAR نیز معروف می‌باشد نوعی شناسایی گونه‌های *F. graminearum* براساس طول قطعه تکثیر شده از ۴۲۰ تا ۵۲۰ جفت باز می‌باشد. براساس این اطلاعات، چندلر و همکاران (2003) بین گروه‌های RAPD، SCAR و Lineag در جدایه‌های *F. graminearum* ارتباط برقرار کردند. جدایه‌های *F. graminearum* بررسی شده در چین به دو گروه به‌نام: سویه ۷ (Lineag 7)، گروه RAPD C، گروه SCAR 1 (7C1) و سویه ۶ (Lineag 6)، گروه PAPD A، گروه SCAR 5 (6A5) تقسیم شدند. قابل توجه است که ساختار جمعیتی 7C1 و 6A5 نیز در آمریکای شمالی و نپال نیز گزارش شده است *جی* و همکاران (Ji *et al.*, 2007). کاتالیز اولین مرحله شروع تریکوتسین به‌وسیله‌ی آنزیم تریکوداین سنتتاز، که توسط ژن *Tri5* کد می‌شود صورت می‌پذیرد و این ترکیب نقش حد واسط در بیوسنتز تریکوتسین را دارد که منجر به فرآیند سیلیسی شدن تریکوداین از فارنزیل پیروفسفات می‌گردد *دسجاردینس* و همکاران (Desjardins *et al.*, 1996). بنابراین ژن *Tri5* به‌عنوان یک مارکر ژنی برای القای تولید تریکوتسین توسط قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد *مرهج* و همکاران (Merhej *et al.*, 2011). به‌علاوه تعدادی از روش‌های PCR بر طبق توالی‌های ژن *Tri7* و *Tri13* گسترش یافته‌اند که می‌توان با استفاده از آن‌ها به ردیابی و شناسایی تیپ‌های شیمیایی مختلف DON و NIV در میان جدایه‌های تولیدکننده تریکوتسین نوع B پرداخت *تات* و همکاران (Toth *et al.*, 2004). بررسی‌های صورت گرفته در کشورهای حوزه مدیترانه فراوانی تیپ شیمیای DON را نسبت به تیپ شیمیایی NIV نشان می‌دهد *لوگریکو* و همکاران (Logrieco *et al.*, 2003). مطالعاتی که بر روی تیپ‌های شیمیایی *F. graminearum* در مناطق مختلف جهان ازجمله آفریقا، آسیا و اروپا صورت گرفته است نشان می‌دهد که تیپ‌های شیمیایی DON و NIV در این مناطق وجود دارند اما تنها تیپ شیمیایی DON در آمریکای شمالی ردیابی و شناسایی شده است *تالاس* و همکاران (Talas *et al.*, 2011).

با توجه به توکسین مهلک این قارچ به‌کارگیری ابزار مناسب برای ردیابی و شناسایی توکسین‌های تولیدی ضروری می‌باشد.

با وجود استفاده از روش‌های مختلف ردیابی مایکوتوکسین از جمله کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی گازی، به‌دلیل هزینه زیاد و وقت‌گیر بودن نتوانسته‌اند کارآیی لازم را در ردیابی مایکوتوکسین‌ها داشته باشند *لی* و همکاران (Lee *et al.*, 2001). در مقابل استفاده از روش مولکولی PCR مبتنی بر طراحی آغازگرهای اختصاصی، شناسایی گونه و تعیین تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین در قارچ *F. graminearum* را با صرف زمان و هزینه بسیار کمتری تسهیل نموده است. با توجه به اینکه تاکنون هیچ‌گونه بررسی در رابطه با شناسایی قارچ *F. graminearum*، تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین (NIV, DON) و ردیابی ژن‌های مؤثر در تولید این توکسین‌ها (*Tri5, Tri7, Tri13*) در استان سیستان و بلوچستان صورت نگرفته بود؛ لذا این تحقیق جهت بررسی این موارد انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها

در سال زراعی ۱۳۹۰-۱۳۸۹ از مناطق عمده کشت گندم در استان سیستان و بلوچستان ازجمله زابل، زاهدان، ایرانشهر، خاش و سراوان در دوره تشکیل و تکامل خوشه‌ها (فروردین و اردیبهشت) بازدید به‌عمل آمد. نمونه‌برداری به‌طور تصادفی و تقریباً ۳۰ خوشه آلوده از هر مزرعه و مجموعاً ۶۰۰ نمونه جمع‌آوری گردید.

از قسمت‌های مختلف خوشه شامل پوشینک‌های دانه و قطعاتی از محور سنبلچه و خوشه به‌طور جداگانه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه بر حسب ضخامت بافت ضدعفونی و پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل روی محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) و Nash and Snyder کشت گردیدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور متناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند *نلسون* و همکاران (Nelson *et al.*, 1983). خالص‌سازی جدایه‌ها براساس روش *نیرنبرگ* (Nirenberg, 1981) از طریق تک اسپور کردن و نوک ریسه روی محیط‌کشت‌های آب- آگار دو درصد حاوی استرپتومایسین، برگ میخک- آگار (CLA) و SNA انجام گرفت. سپس جدایه‌های فوزاریوم از طریق خصوصیات مورفولوژی کنیدی‌ها و شکل پرگنه‌ها توسط کلیدهای شناسایی معتبر مورد شناسایی قرار گرفتند *نلسون* و همکاران (1983).

استخراج DNA

پس از کشت جدایه‌های قارچی *F. graminearum* در محیط PDB و انکوباسیون آن‌ها در دمای ۲۵°C به‌مدت یک هفته بر روی دستگاه تکان‌دهنده دورانی (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه)، استخراج DNA به روش CTAB صورت پذیرفت *نیکلسون* و همکاران (Nicholson *et al.*, 1997).

طراحی آغازگرهای مولکولی

برای شناسایی تکمیلی جدایه‌ها از جفت آغازگرهای اختصاصی گونه *F. graminearum* (Fg16) استفاده شد (جدول ۱). جفت آغازگرهای اختصاصی گونه (Fg16) علاوه‌بر شناسایی اختصاصی گونه‌های *F. graminearum*، برای تعیین ساختار جمعیتی این جدایه‌ها نیز استفاده شدند. برای ردیابی ژن‌های سنتز کننده تریکوتسین ازجمله *Tri13*، *Tri5* و *Tri7* و تعیین تیپ‌های شیمیایی مختلف در جدایه‌های قارچی *F. graminearum*، از آغازگرهای طراحی شده برای هر ژن استفاده شد (جدول ۱) . تمامی این آغازگرها به سفارش شرکت آرین ژن گستر در کشور آلمان توسط شرکت Metabion ساخته شد.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 1: Characteristic of Primers used in this study

آغازگر Primer	اندازه قطعه (bp) Fragment size (bp)	توالی'۳-'۵ Sequence	منبع Reference
Fg16F Fg16R	400-500	CTCCGGATATGTTGCGTCAA GGTAGGTATCCGACATGGCAA	Nicholson *et al.*, 1998
Tri13F Tri13R	234 - 415	TACGTGAAACATTGTTGGC GGTGTCCCAGGATCTGCG	Waalwijk *et al.*, 2003
Tri7F Tri7R	458-535	TGCGTGGCAATATCTTCTTCTA TGTGGAAGCCGCAGA	Chandler *et al.*, 2003
Tri5F Tri5R	545	AGCGACTACAGGCTTCCCTC AAACCATCCAGTTCTCCATCTG	Nicholson *et al.*, 2004

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ترموسایکلر (Eppendorph, Germany) انجام شد. برنامه حرارتی برای این آغازگرهای مربوط به ژن‌ها شامل یک مرحله ۲ دقیقه‌ای در ۹۴°C، ۳۵ چرخه ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، ۵۵°C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲°C برای ۳۰ ثانیه انجام شد و در آخر یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲°C برای ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر Fg16F/Fg16R با یک برنامه حرارتی شامل یک مرحله ۵ دقیقه‌ای در ۹۴°C و سپس ۳۰ چرخه متوالی شامل برنامه زمانی: ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، ۵۷°C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲°C برای ۶۰ ثانیه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C برای ۵ دقیقه انجام گرفت. محصولات PCR به‌طور جداگانه بر روی ژل ۱/۲ درصد آگارز الکتروفورز شدند. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ترموسایکلر (Ependrof, Germany) انجام شد. غلظت مواد واکنش PCR شامل ۵۰ ng از DNA ژنومی، mM 1.5 (100 Tris–HCl, 15 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl pH 8) 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.75U ،µl 10×buffer DNA *Taq* polymerase و 0.4 µM از هر آغازگر بود (Roche Co., Germany) (). هر آزمایش شامل یک کنترل منفی (یک واکنش PCR با همه مواد واکنش بدون DNA ژنومی) بود جی و همکاران (Ji *et al.*, 2007). هر آزمایش شامل یک کنترل مثبت (یک واکنش PCR با DNA ژنومی یک جدایه شناخته شده) و یک کنترل منفی (یک واکنش PCR شامل همه معرف‌ها اما بدون DNA ژنومی) انجام گرفت. کنترل مثبت شامل یک گونه *F. graminearum* شناسایی شده و به تأیید رسیده از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه خرم‌آباد تهیه شد.

واکنش PCR اختصاصی گونه (Fg16) *F. graminearum* و تعیین ساختار جمعیت آن

شناسایی گونه‌های *F. graminearum* از نظر مولکولی با جفت آغازگرهای اختصاصی Fg16F/Fg16R صورت گرفت. برنامه حرارتی آغازگر Fg16 برای انجام واکنش PCR شامل: یک مرحله ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴°C برای آغاز واکنش PCR و سپس ۳۰ چرخه که هر چرخه شامل سه مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۷°C برای ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲°C برای ۶۰ ثانیه انجام گرفت. در پایان یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C برای ۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

واکنش PCR جهت ردیابی تریکوداین با آغازگر Tri5

آغازگر Tri5F/Tri5R در تمام جدایه‌های تولیدکننده‌ی تریکوتسین، تولید قطعه‌ی ۵۴۵ جفت بازی می‌کند. برنامه‌ی PCR شامل یک مرحله ۹۴°C برای ۷۵ ثانیه جهت آغاز واکنش PCR، سپس ۳۰ چرخه که هر چرخه شامل یک مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۴°C برای ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۰°C برای ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲°C برای ۴۵ ثانیه انجام شد و در پایان یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲°C برای ۲۵۵ ثانیه در نظر گرفته شد.

واکنش PCR جهت تعیین تیپ‌های شیمیایی با آغازگرهای Tri7 و Tri13

در این تحقیق جفت آغازگرهای Tri7F/Tri7R و Tri13F/Tri13R برای ردیابی ژن *Tri7* و *Tri13* و تأیید وجود تیپ‌های شیمیایی NIV و DON در بین جدایه‌های *F. graminearum* استفاده شد. برنامه حرارتی واکنش PCR برای آغازگر Tri13F/Tri13R مطابق با برنامه حرارتی آغازگر Fg16 می‌باشد. برنامه حرارتی آغازگر Tri7F/Tri7R شامل یک مرحله ۲ دقیقه‌ای در ۹۴°C برای آغاز واکنش PCR، سپس ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل یک مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۵°C برای ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲°C برای ۳۰ ثانیه انجام شد و در پایان یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲°C برای ۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

الکتروفورز محصولات PCR

محصولات PCR به‌طور جداگانه بر روی ژل ۱/۲ درصد آگارز الکتروفورز شدند. رنگ‌آمیزی محصولات PCR با اتیدیوم بروماید صورت گرفت و سپس عکس‌برداری تحت نور UV در دستگاه ژل داک (Bio-RAD, USA) انجام شد.

بحث و نتایج

شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های فوزاریوم

در این بررسی جمعاً ۲۹۳ جدایه فوزاریوم متعلق به ۸ گونه از مزارع گندم استان سیستان و بلوچستان در مرحله خوشه‌دهی جداسازی و شناسایی شد. از بین این تعداد جدایه شناسایی شده که همگی از عوامل بلایت خوشه محسوب می‌شوند، گونه

F. graminearum بیشترین فراوانی (۶۸/۶٪) را در بین گونه‌های دیگر داشت (جدول ۲).

جدول ۲: گونه‌های فوزاریوم جداسازی شده از مزارع گندم استان سیستان و بلوچستان
Table 2: *Fusarium* species isolated from wheat field of Sistan and Bluchestan province

گونه‌های فوزاریوم *Fusarium* species	تعداد جدایه‌ها N. of isolates	درصد فراوانی Abundance%
F. graminearum	201	68.8
F. equiesti	32	10.9
F. acuminatum	24	8.9
F. proliferatum	17	5.8
F. culmorum	12	4.09
F. poae	4	1.3
F. sporotrichioides	2	0.6
F. solani	1	0.4
Total isolates	293	

شناسایی تکمیلی جدایه‌های *F. graminearum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه (Fg16) و تعیین ساختار جمعیت آن

از تعداد ۲۰۱ جدایه *F. graminearum* شناسایی شده توسط روش‌های مورفولوژی، تعداد ۱۶۸ جدایه برای شناسایی توسط PCR با استفاده از آغازگر Fg16F/Fg16R مورد استفاده قرار گرفتند. تمام جدایه‌های مورد بررسی تولید قطعات منومرفیکی حدود ۵۲۰-۴۲۰ جفت بازی کردند (شکل ۱). نتایج واکنش PCR با این آغازگرها، روش مورفولوژیکی در رابطه با شناسایی گونه‌های *F. graminearum* را تأیید کرد و ثابت شد که جدایه‌های شناسایی شده از طریق خصوصیات مورفولوژیکی، گونه *F. graminearum* می‌باشند. نتایج واکنش PCR با آغازگر Fg16 نیز نشان داد که جدایه‌های شناسایی شده دارای تیپ‌های ساختاری جمعیتی مختلفی می‌باشند. در این تحقیق با استفاده از این آغازگر دو جمعیت 7C1 (تولیدکننده قطعات ۴۲۰ جفت باز) و 6A5 (تولیدکننده قطعات ۵۲۰ جفت باز) در بین جدایه‌های *F. graminearum* شناسایی شد.

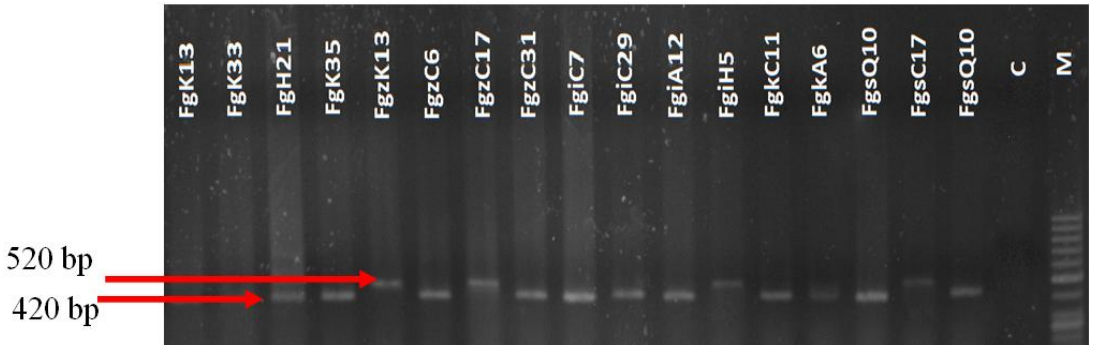
نتایج نشان می‌دهد که جمعیت 7C1 (۱۱۴ جدایه) بیشترین پراکنش را در مناطق نمونه‌برداری داشت بنابراین به‌عنوان جمعیت غالب در جدایه‌های *F. graminearum* مطرح شد. در بررسی که بر روی جدایه‌های *F. graminearum* در چین و نپال صورت گرفت نیز این دو جمعیت (7C1 و 6A5) غالب بودند جی و همکاران (Ji *et al.*, 2007). شرایط اقلیمی و جغرافیایی، سیستم کشت، نوع و منشأ میزبان تأثیر بسزایی بر روی ساختار جمعیتی جدایه‌های *F. graminearum* دارد *کارتر* و همکاران (Carter *et al.*, 2002). با توجه به اینکه در این بررسی تنوع میزبانی خاصی وجود ندارد و تنها از گندم (ارقام مختلف) نمونه‌برداری به عمل آمده است با این وجود ساختار جمعیتی مختلفی در بین جدایه‌های *F. graminearum* وجود دارد که احتمالاً به‌دلیل تنوع در شرایط اقلیمی، ارقام و سیستم کشت باشد.

استفاده از PCR برای بررسی پتانسیل تولید تریکوداین با استفاده از آغازگر Tri5

طی انجام واکنش‌های PCR با جفت آغازگر Tri5R/Tri5F، یک قطعه‌ی ۵۴۵ جفت بازی در DNA ژنومی تمام جدایه‌ها تکثیر شد (شکل ۲). جفت آغاز Tri5R/Tri5F براساس نواحی حفاظت شده ژن Tri5 در گونه‌های فوزاریوم طراحی شده‌اند. از آنجایی که *F. graminearum* هاپلوئید است و فقط یک کپی از این ژن را در ژنوم خود حمل می‌کند، بنابراین با هرگونه موتاسیونی در این ژن توانایی تولید تریکوتسین از بین می‌رود *نیسن* و همکاران (Niessen *et al.*, 2004). تکثیر قطعه ۵۴۵ جفت بازی با آغازگرهای مذکور در این بررسی به‌عنوان نشانگر در توانایی ژنتیکی تولید تریکوتسین در تمامی جدایه‌های *F. graminearum* ارزیابی شد که مطابق با تحقیقات *ادوارد* و همکاران (Edwards *et al.*, 2001) بود. طبق بررسی‌های *فیکت* و همکاران (Fekete *et al.*, 1997) نیز اثبات شده است که ژن Tri5 نشانگری در توانایی ژنتیکی تولید تریکوتسین می‌باشد. از تطابق به‌دست آمده از تکثیر این ژن در بررسی انجام شده با یافته‌های محققان مذکور می‌توان اظهار نمود که توانایی بل قوه ژنتیکی تولید تریکوتسین در تمام جدایه‌های *F. graminearum* استان سیستان و بلوچستان مورد بررسی در این تحقیق وجود دارد.

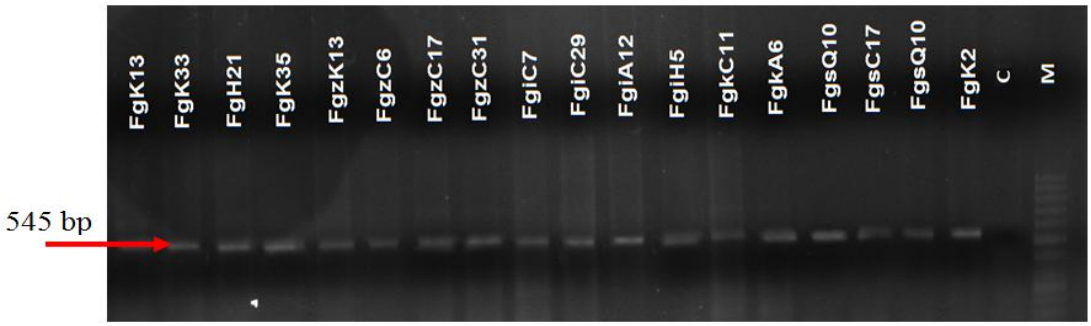
تعیین تیپ‌های شیمیایی DON و NIV در جمعیت *F. graminearum* با آغازگر Tri13

در این بررسی نتایج واکنش PCR با جفت آغازگر Tri13F/Tri13R نشان داد که هر دو جدایه تولیدکننده DON و NIV در بین جمعیت جدایه‌های *F. graminearum* وجود دارد. محصول PCR در جدایه‌های تولیدکننده تیپ‌های شیمیایی NIV و DON به‌ترتیب باندهای ۴۱۵ و ۲۳۴ جفت بازی بود (شکل ۳). از ۱۶۸ جدایه بررسی شده با این جفت آغازگر، ۶۲ جدایه تولیدکننده NIV و ۱۰۶ جدایه به‌عنوان تولیدکننده DON شناخته شدند. این نتایج نشان می‌دهد که تیپ غالب تریکوتسین در بین جمعیت *F. graminearum* در مزارع گندم استان سیستان و بلوچستان، تیپ شیمیایی DON می‌باشد. در این بررسی تکثیر باندهای ۴۱۵ و ۲۳۴ جفت بازی توسط آغازگر Tri13 با تحقیقات جی و همکاران (2007) مبنی بر تکثیر این قطعات در بین جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی NIV و DON مطابقت داشت.



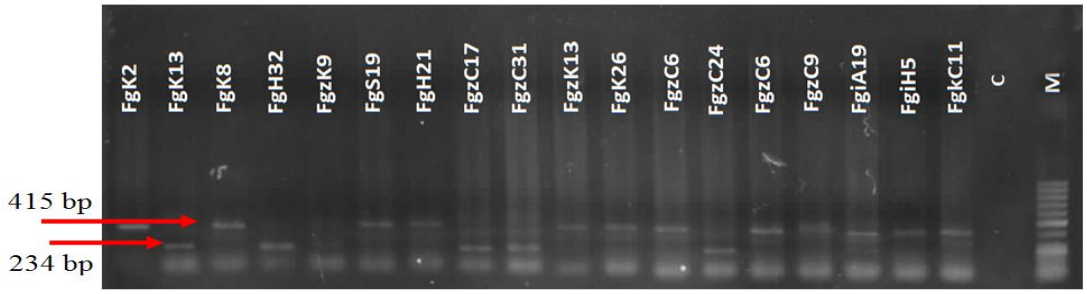
شکل ۱: محصولات PCR جمعیت‌های 7C1 (۴۲۰ جفت باز) و 6A5 (۵۲۰ جفت باز) با استفاده از جفت آغازگر Fg16F/Fg16R در ایزوله های *Fusarium graminearum*. M: نشانگر bp ۱۰۰، C: کنترل منفی

Fig. 1: PCR products of 7C1 (420 bp) and 6A5 (520 bp) populations by using Fg16F/Fg16R primer pair in *F. graminearum* strains. Lane M, 100-bp ladder marker; Lane C, negative control



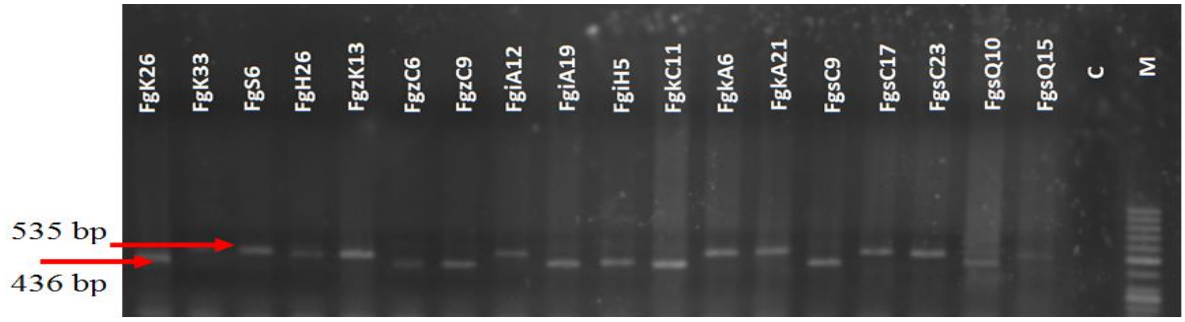
شکل ۲: باند ۵۴۵ جفت بازی (آنزیم کدکننده تریکوداین سنتتاز) حاصل از PCR با استفاده از جفت آغازگر *Tri5*R/*Tri5*F در تمام جدایه‌های *Fusarium graminearum*. M: نشانگر bp ۱۰۰، C: کنترل منفی

Fig. 2: PCR products of 545 bp (encoding trichodiene synthetase enzyme) by using Tri5R/Tri5F specific primer pair in all *Fusarium graminearum* isolates. Lane M, 100-bp ladder marker; Lane C, negative control



شکل ۳: محصولات PCR تیپ‌های شیمیایی DON (۴۱۵ جفت باز) و NIV (۲۳۴ جفت باز) با استفاده از جفت آغازگر Tri13F/Tri13R در ایزوله های *Fusarium graminearum*. M: نشانگر bp ۱۰۰، C: کنترل منفی

Fig. 3: PCR amplification of DON (234 bp) and NIV (415 bp) chemotypes by using Tri13F/Tri13R primer pair in *F. graminearum* strains. Lane M, 100-bp ladder marker; Lane C, negative control



شکل ۴: محصولات PCR تیپ‌های شیمیایی DON (۵۳۵ جفت باز) و NIV (۴۳۶ جفت باز) با استفاده از جفت آغازگر Tri7F/Tri7R در ایزوله های *Fusarium graminearum*. M: نشانگر bp ۱۰۰، C: کنترل منفی

Fig. 4: PCR amplification of DON (535 bp) and NIV (436 bp) chemotypes by using Tri7F/Tri7R primer pair in *F. graminearum* strains. Lane M, 100-bp ladder marker; Lane C, negative control

با توجه به اقلیم منطقه بروز بیماری فوزاریوز خوشه گندم به حالت اپیدمی نمی‌رسد و در چنین حالتی به‌علت اینکه بیماری از لحاظ کمی خسارت زیادی را به محصول وارد نمی‌کند و علائم مزرعه‌ای بیماری هم زیاد نیست، بنابراین تولیدکنندگان گندم کمتر توجهی به کیفیت محصول تولیدی خود می‌کنند. کم بودن خسارت کمی ناشی از بیماری فوزاریوز گندم دلیلی بر عدم‌حضور پاتوژن و تولید تریکوتسین نیست. عدم توجه به کیفیت محصول تولیدی توسط کشاورزان می‌تواند سلامت مصرف‌کنندگان فراورده‌های گندم را به خطر بیاندازد. با توجه به ردیابی تیپ‌های شیمیایی NIV و DON در گندم‌های استان سیستان و بلوچستان و سمی بودن این ترکیبات برای انسان و دام، توصیه می‌شود که از رقم‌های مقاوم‌تر برای کشت استفاده شود و برای ردیابی ژن‌های تریکوتوسین در گندم از روش‌های مولکولی استفاده شود؛ زیرا روش‌های مولکولی ارزان‌تر و کم هزینه‌تر هستند.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۸-۹ متن انگلیسی مراجعه شود.