واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت بررسی پتانسیل ژنتیکی تولید داکسی‌نیوالنول و نیوالنول در جدایه‌های قارچ *Fusarium culmorum* گندم در استان آذربایجان‌غربی

PCR Reaction for Surveying the Genetic Potential of Deoxynivalenol and Nivalenol Production of the Wheat *Fusarium culmorum* Isolates in the West Azarbayjan Province

آزاد لاوا[۱*]، محمد سالاری[۲]، سیدکاظم صباغ[۳] و سعیده سپهری‌کیا[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۱۲

چکیده

بلایت فوزاریومی سنبله یکی از مهم‌ترین بیماری‌های غلات در جهان به‌شمار می‌آید. قارچ‌های *Fusarium culmorum* و *F. graminearum* مهم‌ترین عوامل ایجادکننده این بیماری می‌باشند. این قارچ‌ها دانه‌ها را توسط مایکوتوکسین‌ها آلوده نموده و منجر به کاهش کمی و کیفی محصول می‌گردند. در این بررسی تعداد ۹۸ جدایه *F. culmorum* جداسازی شده از مزارع استان آذربایجان‌غربی، با استفاده از کلیدهای شناسایی و جفت آغازگر اختصاصی گونه C51F/C51R شناسایی گردیدند. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، توانایی تولید نیوالنول (NIV) و داکسی‌نیوالنول (DON) توسط جدایه‌های *F. culmorum* مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن *Tri7* با استفاده از جفت آغازگرهای Tri7F/Tri7R و MinusTri7F/MinusTri7R مورد ردیابی قرار گرفت. با استناد به نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تعداد ۵۹ جدایه به‌عنوان جدایه‌های دارای پتانسیل تولید تیپ شیمیایی DON و ۳۹ جدایه به‌عنوان جدایه‌های دارای پتانسیل تولید تیپ شیمیایی NIV معرفی گردیدند. با توجه به یافته‌های این تحقیق تیپ شیمیایی DON به‌عنوان تیپ شیمیایی غالب شناسایی گردید. در این تحقیق برای اولین‌بار در کشور، تیپ‌های شیمیایی تولید شده توسط قارچ *F. culmorum* مورد بررسی قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: تیپ شیمیایی، تریکوتسین، PCR، *Tri7*، آذربایجان‌غربی

۱. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۳. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۴. مربی گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل
*: نویسنده مسوول Email: azad_lava64@yahoo.com

مقدمه

بلایت خوشه گندم یا فوزاریوز سنبله (FHB) یکی از بیماری‌های مخربی است که هر ساله میلیون‌ها دلار خسارت به غلات کشت‌شده در سراسر جهان وارد می‌نماید *ویس* (Wiese,1987). این بیماری به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در مناطق مرطوب و نیمه‌مرطوب جهان به‌شمار می‌آید. اهمیت این بیماری زمانی‌که مرحله گلدهی و تکامل دانه با بارندگی و یا رطوبت نسبی بالا همراه باشد، بسیار افزایش می‌یابد *پری* و همکاران (Parry *et al.*, 1995).

فوزاریوز سنبله گندم، منجر به کاهش تولید محصول در مزرعه، کاهش کیفیت دانه و آلودگی دانه با مایکوتوکسین‌ها می‌گردد *گوسامی* و *کیستلر* (Goswami and Kistler, 2004). آلودگی محصولات انباری توسط مایکوتوکسین‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد *ویندلس* (Windels, 2000). قارچ‌های *Fusarium graminearum* و *F. culmorum* گونه‌های غالب ایجادکننده این بیماری در گندم می‌باشند *پری* و همکاران (1995). آرایه *F. graminearum* در مناطق گرم و مرطوب مانند ایالات‌متحده غالب می‌باشد، درحالی‌که *F. culmorum* در مناطق خنک‌تر مانند نواحی غربی، مرکزی و شرقی اروپا به‌عنوان یکی از گونه‌های غالب جنس فوزاریوم معرفی گردیده است گوسامی و کیستلر (2004). غالب‌بودن گونه‌های قارچی تحت تاثیر شرایط اقلیمی قرار دارد که در این میان دما مهم‌ترین نقش را ایفا می‌نماید *پری* و همکاران (1995). قارچ *F. culmorum* متعلق به گروه Discolor می‌باشد. اعضای این گروه، فوزاریوم‌های غلات نیز نامیده می‌شوند، که به‌جز برخی از موارد خاص تولید میکروکنیدی نمی‌نمایند و عمدتاً براساس مورفولوژی ماکروکنیدی‌ها شناسایی می‌گردند *بوث* (Booth, 1975).

تریکوتسین‌ها گروه اصلی مایکوتوکسین‌هایی هستند که توسط گونه‌های مختلف فوزاریوم از جمله *F. culmorum* و *F. graminearum* تولید می‌شوند *بنت و کلیچ* (Bennet and klich, 2003). تریکوتسین‌ها از نظر ساختاری جزو مشتقات سسکویی‌ترپن‌ها (Sesqueiterpens) محسوب می‌شوند. این ترکیبات موجب بروز اختلالات رشدی در سلول‌های یوکاریوتی می‌گردند. ازجمله این موارد، می‌توان به بروز اختلال در تولیدمثل پستانداران و جلوگیری از رشد گیاهچه و تولیدمثل در گیاهان اشاره نمود *مک‌لافلین* و همکاران (McLaughlin *et al.*, 1997).

میزان سمیت تریکوتسین‌ها به توانایی جلوگیری آن‌ها از فعالیت پپتیدیل ترانسفراز ریبوزوم‌های ۶۰s بستگی دارد. تاکنون چهار نوع تریکوتسین A، B، C و D شناسایی شده‌اند. تریکوتسین‌های نوع C و D توسط گونه‌های مولد بلایت فوزاریومی تولید نمی‌گردند *سوداکین* (Sudakin, 2003). تریکوتسین‌های نوع B که توسط یک گروه کتو در کربن شماره هشت شناسایی می‌گردند، حاوی توکسین‌های مهمی مانند DON، NIV و مشتقات استیلی آن‌ها می‌باشند. قابل‌توجه است که تیپ B تریکوتسین‌ها حاوی خطرناک‌ترین مایکوتوکسین‌ها برای انسان و دام می‌باشد *کیمورا* و همکاران، *الکساندر* و همکاران (Kimura *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2009).

ژن‌های سنتزکننده تریکوتسین‌ها (Tri) در یک خوشه ژنی (Gene cluster) متمرکز شده‌اند که شامل: ژن‌های تریکوداین سنتئاز (*Tri5*)، اکسیژناز P450 (*Tri4* و *Tri11*)، استیل-ترانسفراز (*Tri13* و *Tri7*)، فاکتورهای نسخه‌برداری (*Tri6* و *Tri10*)، پمپ انتشار توکسین (*Tri12*) و دو پروتئین فرضی ناشناخته (*Tri8* و *Tri9*) می‌باشند. دیگر ژن‌های استیل ترانسفراز مانند *Tri101* در این خوشه‌ژنی به صورت ناپیوسته هستند *لی* و همکاران (Lee *et al.*, 2002).

پیشرفت تکنیک‌های مولکولی برای ردیابی تریکوتسین‌های DON و NIV و مشتقات استیلی آن‌ها، مطالعه بیوشیمیایی و آنالیز این ترکیبات را در غلات و تغذیه دام و طیور تسهیل نموده است *دسیاردینس* و همکاران (Desjardins *et al.*, 2000). یکی از روش‌های مولکولی که با استفاده از آن می‌توان به تعیین تیپ‌های شیمیایی پرداخت، کاربرد PCR مبتنی بر طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های سنتزکننده تریکوتسین می‌باشد، که در کم‌ترین زمان ممکن به ردیابی مایکوتوکسین‌ها پرداخته و هزینه‌های کم‌تری در مقابل روش‌های متداول مانند کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی گازی دارد *نیکولسون* و همکاران (Nicholson *et al.*,1998). در این تحقیق به‌منظور شناسایی تکمیلی جدایه‌های *F. culmorum* از جفت آغازگر C51F/C51R و جهت بررسی پتانسیل تولید تیپ‌های شیمیایی DON و NIV از جفت آغازگرهای Tri7F/Tri7R و MinusTri7F/MinusTri7R استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها

نمونه‌برداری در خرداد ماه سال زراعی۱۳۹۰-۱۳۸۹ که مصادف با تشکیل و تکامل خوشه‌های گندم می‌باشد، از مزارع استان شامل: ارومیه، مهاباد، میاندواب، خوی، تکاب و ماکو صورت گرفت. قسمت‌های مختلف خوشه شامل پوشینک‌های می‌باشد، از مزارع ارومیه، مهاباد، میاندواب، خوی، تکاب و ماکو

صورت گرفت. قسمت‌های مختلف خوشه شامل پوشینک‌های دانه، قطعاتی از محور سنبلچه و خوشه به‌طور جداگانه با هیپوکلریت سدیم دو درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی گردیدند. سپس سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند و روی محیط‌کشت معمولی سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) و اختصاصی Nash and Snyder کشت گردیدند *نیرنبرگ* (Nirenberg, 1976). نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط نور متناوب ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی قرار گرفتند و خالص‌سازی جدایه‌ها از طریق تک‌اسپورکردن و نوک‌ریسه روی محیط‌کشت‌های آب آگار دو درصد حاوی استرپتومایسین، برگ میخک آگار (CLA) و Synthetic Nutrient Agar (SNA) انجام گرفت نیرنبرگ (1976). سپس جدایه‌های *F. culmorum* از طریق بررسی خصوصیات مورفولوژی کنیدی‌ها و شکل پرگنه‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند *بورگس* و همکاران، *نلسون* و همکاران (Burgess *et al.*, 1994 ; Nelson *et al.*, 1983).

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB

جدایه‌های شناسایی شده *F. culmorum* در محیط‌کشت مایع PDB (Potato Dextrose Broth) کشت داده شدند و به‌مدت یک هفته بر روی دستگاه روتاری شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. توده میسلیومی تولید شده در محیط‌کشت PDB از طریق اسکالپل جمع‌آوری شد و توسط ازت مایع در هاون چینی پودر گردید. مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (شامل: CTAB: 2%، NaCL: 1/4 M، EDTA: 20 mM و Tris: 100 mM, PH=8) بر روی هیف‌های پودر شده اضافه شد. سپس محتویات داخل هاون (حاوی هیف قارچ و بافر استخراج) به تیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری انتقال داده شد. لازم به‌ذکر است که تمام این مراحل در حمام یخ انجام گرفت. برای از بین‌بردن چربی‌ها و پروتئین‌ها مقدار ۱ میکرولیتر مرکاپتواتانول (2-Mercaptoethanol) به تیوب‌ها اضافه شد و سپس تیوب‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و هر ۵ دقیقه یک بار به‌خوبی تکان داده شدند.

به هر تیوب ۵۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به نسبت ۱:۲۴ (برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول، مقدار ۹۶ میلی‌لیتر کلروفرم و ۴ میلی‌لیتر ایزوآمیل الکل مخلوط شدند) اضافه شد و چند بار (۲۵-۲۰ بار) تیوب‌ها به آرامی وارونه شدند تا مخلوط شیری‌رنگ شد. سپس تیوب‌ها در دور rpm ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی به آرامی برداشته شد و به تیوب جدید منتقل گردید و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) یا ۲ برابر حجم آن اتانول سرد ۹۶٪ اضافه شد.

تیوب‌ها به‌مدت ۱۰ ثانیه به آرامی وارونه شدند و سپس ۱-۰/۵ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آب‌گیری کامل DNA، تیوب‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. در مرحله‌ی بعد ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ سرد به آرامی در تیوب ریخته شد به‌طوری‌که رسوب تشکیل شده ته تیوب کنده نشود. سپس در تیوب‌های حاوی اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۲ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰rpm برای شستشوی DNA سانتریفیوژ شدند. پس از شستشوی DNA، اتانول را خارج کرده و تیوب‌ها را وارونه گذاشته تا در محیط خشک شود. در نهایت برای حل‌کردن DNA، ۵۰ میکرولیتر بافر TE به تیوب‌ها اضافه کرده و پس از حل‌شدن DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند *نیکولسون* و همکاران (1997).

طراحی آغازگرهای مولکولی

برای شناسایی تکمیلی جدایه‌ها، از جفت آغازگرهای اختصاصی *F. culmorum* (C51F/C51R) استفاده گردید نیکولسون و همکاران (1998). برای ردیابی ژن *Tri7* از جفت آغازگرهای Tri7F/Tri7R و MinusTri7F/MinusTri7R استفاده گردید *چندلر* و همکاران (Chandler *et al.*, 2003) (جدول ۱).

واکنش PCR

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ترموسایکلر (Eppendorph, Germany) انجام شد. برای انجام PCR غلظت DNA، $MgCl_2$، dNTP، آغازگرها و آنزیم *Taq* پلی‌مراز برای حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق جدول ۲ تعیین و بهینه شد جی و همکاران (Ji *et al.*, 2007). هر آزمایش شامل یک کنترل مثبت (یک واکنش PCR با DNA ژنومی یک جدایه *F. culmorum* شناخته شده) و یک کنترل منفی (یک واکنش PCR شامل تمام مواد موردنیاز جهت انجام واکنش، اما بدون DNA ژنومی) انجام گرفت.

برنامه دمایی واکنش PCR جهت استفاده از جفت آغازگر اختصاصی گونه *F. culmorum*

جهت شناسایی تکمیلی جدایه‌های *F. culmorum* که با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی شده بودند از جفت آغازگر اختصاصی گونه *F. culmorum* یعنی

C51F/C51R استفاده گردید. شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل یک واسرشت سازی در دمای ۹۴°C به‌مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در دمای ۶۱°C به‌مدت یک دقیقه، مرحله بسط به‌مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و بسط نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C در نظر گرفته شد نیکولسون و همکاران (1998).

واکنش PCR جهت بررسی پتانسیل تولید تیپ‌های شیمیاییNIV و DON با استفاده از جفت آغازگرهای Tri7F/Tri7Rو MinusTri7F/MinusTri7R

جهت ردیابی ژن *Tri7* و بررسی پتانسیل تولید تیپ‌های شیمیایی NIV و DON، در جدایه‌های *F. culmorum* از جفت آغازگرهای Tri7F/Tri7R و MinusTri7F/MinusTri7R استفاده گردید. Tri7F/Tri7R در جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی NIV تولید قطعات ۴۳۶ جفت بازی می‌کند، در حالی‌که در جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی DON با استفاده از این آغازگر محصول PCR تولید نمی‌گردد. شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای این جفت آغازگر شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به‌مدت دو دقیقه و سپس ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل یک مرحله واسرشت‌سازی به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، مرحله اتصال در دمای ۶۲°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و بسط نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C تنظیم گردید *چندلر* و همکاران (2003).

جفت آغازگر MinusTri7F/MinusTri7R در واکنش با جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی DON تولید باند ۴۸۳ جفت بازی می‌نماید، درحالی‌که در جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی NIV با استفاده از این آغازگر محصول PCR تولید نمی‌گردد. شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای این جفت آغازگر شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به‌مدت ۲ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل یک مرحله واسرشت‌سازی به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، مرحله اتصال در دمای ۵۸°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲°C به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C تنظیم گردید چندلر و همکاران (2003).

الکتروفورز محصولات PCR

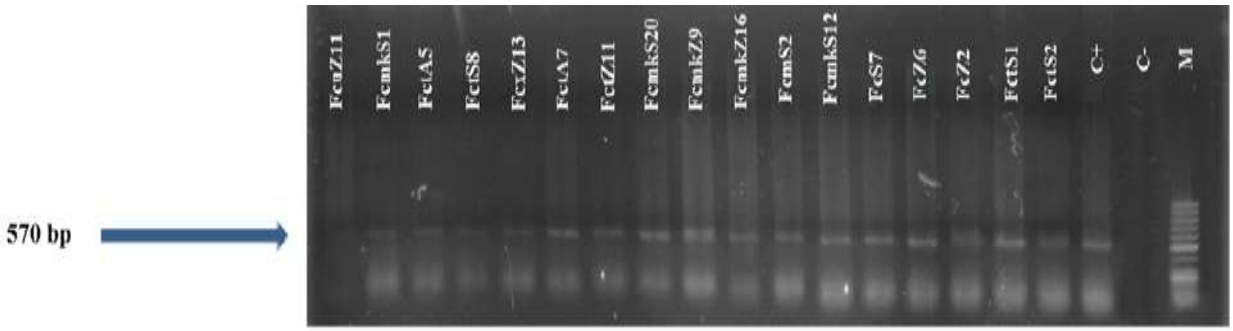
محصولات PCR به‌طور جداگانه بر روی ژل ۱/۲ درصد آگارز الکتروفورز شدند. رنگ‌آمیزی محصولات PCR با اتیدیوم بروماید صورت گرفت و سپس عکس‌برداری تحت نور UV با استفاده از دستگاه ژل داک (Bio-RAD, USA) انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی تکمیلی جدایه‌های *F. culmorum* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی C51F/C51R

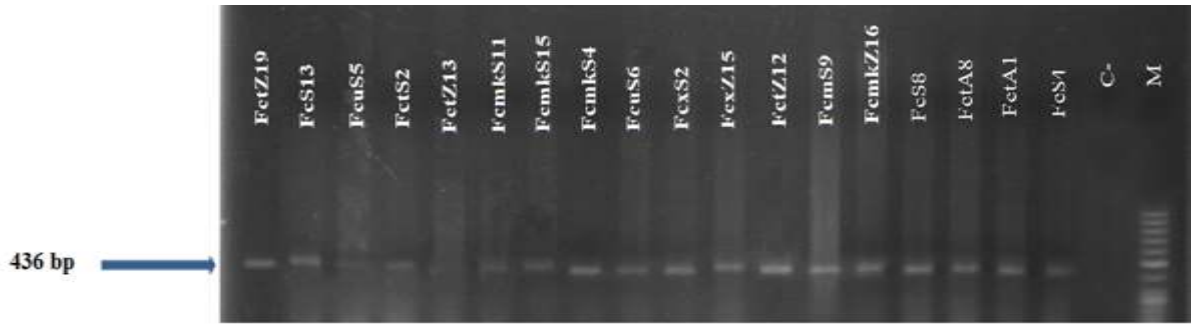
استفاده از میکروسکوپ و کلیدهای قارچ‌شناسی، روش‌های متداول برای شناسایی گونه‌های مختلف فوزاریومی می‌باشند. استفاده از این روش‌ها جهت شناسایی گونه‌های قارچ فوزاریوم، با توجه به متنوع‌بودن خصوصیات مورفولوژیکی آن‌ها، زمان‌بر بوده و شناسایی صحیح آن‌ها نیازمند مهارت و تجربه کافی می‌باشد *لسیل* و همکاران، *یودر و کریستانسون* (Lessiele *et al*., 2006 ; Yoder and Chrisitanson, 1998). تکنیک‌های مولکولی در مقایسه با این روش‌ها، دقیق و سریع بوده و استفاده از این تکنیک‌ها در بیماری‌شناسی گیاهی نیاز به افراد ماهر و با تجربه بالا ندارد *مک کارتنی* و همکاران (McCartney *et al*., 2003).

با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای شناسایی معتبر *بورگس* و همکاران، *نلسون* و همکاران (1983, 1994) تعداد ۹۸ جدایه *F. culmorum* از مزارع گندم استان آذربایجان‌غربی شناسایی گردید. تمامی جدایه‌ها مجدداً با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی C51F/C51R مورد شناسایی قرار گرفتند. محصول PCR با استفاده از این جفت آغازگر تولید قطعات ۵۷۰ جفت بازی می‌نماید. ۹۸ جدایه مورد بررسی تولید قطعات ۵۷۰ جفت بازی نمودند، بنابراین صحت شناسایی جدایه‌های *F. culmorum* با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی تأیید گردید (شکل ۱).



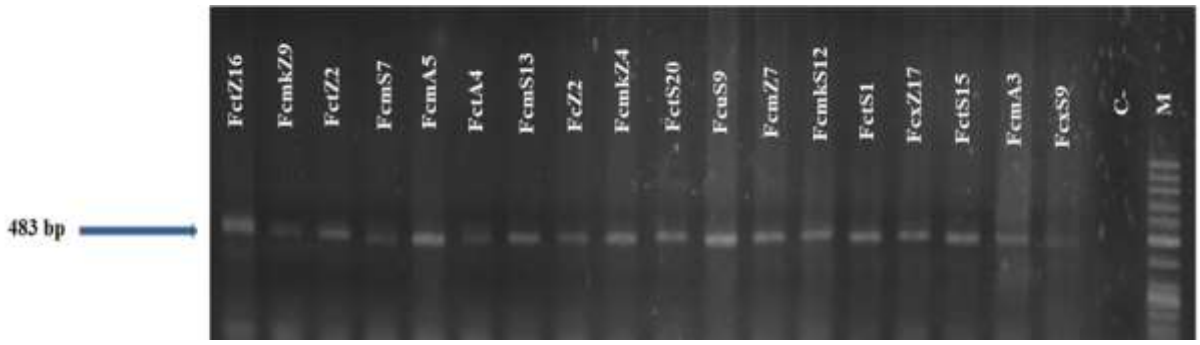
شکل ۱: تولید باند با استفاده از جفت آغازگر C51F/C51R. M نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، c- کنترل منفی، c+ کنترل مثبت

Fig.1: Amplification products (570bp) from primer set C51F/C51R. M: 100 bp ladder, -c: Negative control, c+: Positive control



شکل ۲: تولید باند ۴۳۶ جفت بازی توسط جدایه‌های تولیدکننده NIV با استفاده از جفت آغازگر Tri7F/Tri7R. M نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، c- کنترل منفی

Fig. 2: Amplification products (436bp) from primer set Tri7F/Tri7R specific to nivalenol chemotypes. M: 100 bp ladder, -c: Negative control



شکل ۳: تولید باند ۴۸۳ جفت بازی توسط جدایه‌های تولیدکننده DON با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی MinusTri7F/MinusTri7R. M نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، c- کنترل منفی

Fig. 3: Amplification products (483bp) from primer set MinusTri7F/MinusTri7R specific to deoxynivalenol chemotypes. M: 100 bp ladder, -c: Negative control

جفت آغازگر C51F/C51R توسط *نیکولسون* و همکاران (1998) طراحی گردید. تعداد ۶۰ جدایه *F. culmorum* در کشور فرانسه توسط *باکان* و همکاران (Bakan *et al.*, 2001) با استفاده از این جفت آغازگر شناسایی گردیدند. در تحقیقی مشابه، تعداد ۳۷ جدایه *F. culmorum* جداسازی شده از مزارع آمریکا و اروپا، با استفاده از این جفت آغازگر مورد شناسایی مجدد قرار گرفتند و نتایج شناسایی براساس خصوصیات مورفولوژیکی مورد تأیید قرار گرفت توث و همکاران (Toth *et al.*, 2004). استفاده از این جفت آغازگر جهت شناسایی جدایه‌های *F. culmorum* جداسازی شده از مزارع گندم کشور لهستان گزارش گردیده است *باتورو سیسنیوسکا و سوکرزینسکا* (Baturo-Ciesniewska and Suchorzynska, 2011).

بررسی پتانسیل تولید تیپ‌های شیمیایی DON وNIV توسط جفت آغازگرهای ردیابی‌کننده ژن *Tri7*

با استفاده از جفت آغازگر Tri7F/Tri7R تعداد ۳۹ جدایه *F. culmorum* تولید باند ۴۳۶ جفت بازی نمودند و به‌عنوان تولیدکننده تیپ شیمیایی NIV شناسایی گردیدند (شکل ۲) و ۵۹ جدایه دیگر با این جفت آغازگر محصول PCR تولید ننمودند. با استفاده از جفت آغازگر MinusTri7F/MinusTri7R مشاهده گردید که هیچ‌یک از ۳۹ جدایه شناسایی شده به‌عنوان تیپ شیمیایی NIV، محصول PCR تولید نکردند و تمامی ۵۹ جدایه باقیمانده تولید قطعات ۴۸۳ جفت بازی نمودند و به‌عنوان تولیدکننده تیپ شیمیایی DON شناسایی گردیدند (شکل ۳ و جدول ۳).

بنابراین تیپ شیمیایی DON با استفاده از جفت آغازگر Tri7F/Tri7R قابل‌ردیابی نمی‌باشد و با استفاده از این جفت آغازگر تنها می‌توان تیپ شیمیایی NIV را ردیابی نمود. ردیابی تیپ شیمیایی DON با استفاده از جفت آغازگر MinusTri7R/ MinusTri7F صورت پذیرفت اما این جفت آغازگر در ردیابی تیپ شیمیایی NIV فاقد کارآیی می‌باشد.

جدول ۱: آغازگرها، توالی نوکلئوتیدی و اندازه محصول تولیدی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 1: Primers and their nucleotide sequences and product sizes used in PCR reaction

آغازگر Primer	توالی Sequence 5´ - 3´	اندازه قطعه (bp) Product size	منبع Reference
C51F C51R	ATGGTGAACTCGTCGTGGC CCCTTCTTACGCCAATCTCG	570	Nicholson *et al.*, (1998)
Tri7F Tri7R	TGCGTGGCAATATCTTCTTCTA TGTGGAAGCCGCAGA	436 [a], - [b]	Chandler *et al.*, (2003)
MinusTri7F MinusTri7R	TGGATGAATGACTTGAGTTGACA AAAGCCTTCATTCACAGCC	483 [c], - [d]	Chandler *et al.*, (2003)

* a محصول PCR تولیدی توسط جدایه‌های تولیدکننده NIV. c محصول PCR تولیدی توسط جدایه‌های تولیدکننده DON. b و d عدم تولید محصول

a) PCR products only produced with DNA from isolates belonged to NIV, c) PCR products only produced with DNA from isolates belonged to DON, b and d) not yielded

جدول ۲: میزان مواد موردنیاز برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (حجم 25µL)

Table 2: Amount of Material needed for one PCR reaction

اجزای واکنش PCR PCR reaction	غلظت مواد پایه Stock concentration	غلظت نهایی Final concentration
آب مقطر دو بار تقطیر (H_2O)	-	-
بافر PCR با 15 میلی‌مولار کلرید منیزیم (PCR Buffer)	10X	1X
dNTP	10mM	0.2mM
آغازگر پیش‌ران (Forward primer)	20µM	0.4µM
آغازگر پس‌ران (Reverse primer)	20µM	0.4µM
Taq DNA polymerase	5unit/µL	0.75unit
الگو DNA Template DNA	25ng/µL	25ng/µL

جدول ۳: شناسایی قارچ *F. culmorum* و تیپ های شیمیایی آن با استفاده از واکنش PCR

Table 3: Identification of *F. culmorum* and its chemotypes by PCR assay

کدکشت Code	ارقام Cultivar	مناطق نمونه‌برداری Region	Fc51/Fc51 R	Tri7F/Tri7R		MinusTri7F/R	
				داکسی نیوالنول DON	نیوالنول NIV	داکسی نیوالنول DON	نیوالنول NIV
FcuS1	سرداری	ارومیه	+	-	-	+	-
FcuS5	سرداری	ارومیه	+	-	+	-	-
FcuS6	سرداری	ارومیه	+	-	+	-	-
FcuZ2	زرین	ارومیه	+	-	-	+	-
FcuZ11	زرین	ارومیه	+	-	-	+	-
FcxS1	سرداری	خوی	+	-	+	-	-
FcxS4	سرداری	خوی	+	-	-	+	-
FcxS7	سرداری	خوی	+	-	-	+	-
FcxZ13	زرین	خوی	+	-	-	+	-
FcxZ15	زرین	خوی	+	-	+	-	-
FcxZ17	زرین	خوی	+	-	-	+	-
FcS11	سرداری	مهاباد	+	-	-	+	-
FcS13	سرداری	مهاباد	+	-	+	-	-
FcS15	سرداری	مهاباد	+	-	-	+	-
FcZ1	زرین	مهاباد	+	-	-	+	-
FcZ2	زرین	مهاباد	+	-	-	+	-
FcZ9	زرین	مهاباد	+	-	+	-	-
FcmS2	سرداری	میاندواب	+	-	+	-	-
FcmA2	الوند	میاندواب	+	-	-	+	-
FcmA3	الوند	میاندواب	+	-	-	+	-
FcmZ9	زرین	میاندواب	+	-	-	+	-
FcmZ11	زرین	میاندواب	+	-	-	+	-
FcmkS4	سرداری	ماکو	+	-	+	-	-
FcmkS6	سرداری	ماکو	+	-	-	+	-
FcmkZ8	زرین	ماکو	+	-	+	-	-
FcmkZ1	زرین	ماکو	+	-	+	-	-
FctS5	سرداری	تکاب	+	-	-	+	-
FctS20	سرداری	تکاب	+	-	-	+	-
FctZ10	زرین	تکاب	+	-	-	+	-
FctZ12	زرین	تکاب	+	-	+	-	-
FctZ4	زرین	تکاب	+	-	+	-	-

بررسی‌های *چندلر* و همکاران (2003) نشان داد، در جدایه‌هایی از *F. culmorum* که با استفاده از MinusTri7F/MinusTri7R تولید محصول PCR می‌نمایند، ژن *Tri7* حذف گردیده است، بنابراین این جدایه‌ها با استفاده از جفت آغازگر Tri7F/Tri7R تولید محصول نمی‌نمایند. نتایج مشابهی از تحقیقات انجام شده بر روی تیپ‌های شیمیایی DON و NIV با استفاده از این دو آغازگر گزارش گردیده است کامون و همکاران، *باتورو سیسنیوسکا* و *سوکرزینسکا*، *توس* و همکاران (Kammoun *et al.*, 2010 ; Baturo-Ciesniewska and Suchorzynska, 2011 ; Toth *et al.*, 2004).

تعیین تیپ شیمیایی جدایه‌های مورد بررسی در مزارع استان آذربایجان غربی نشان داد که هر دو تیپ شیمیایی DON و NIV در مزارع استان تولید می‌گردند. براساس یافته‌های این تحقیق تیپ شیمیایی DON به‌عنوان تیپ شیمیایی غالب معرفی گردید. با توجه به ارقام به‌دست آمده ۶۰/۲ درصد جدایه‌ها دارای پتانسیل تولید تیپ شیمیایی DON و ۳۹/۷۹ درصد آن‌ها دارای پتانسیل تولید تیپ شیمیایی NIV بودند.

حضور هر دو تیپ شیمیایی DON و NIV در کشورهای ایتالیا، فرانسه، پرتغال و یوگسلاوی گزارش گردیده است، که در این کشورها تیپ شیمیایی غالب DON معرفی گردیده است *لوگریکو* و *همکاران* (Logrieco *et al.*, 2003). حضور هر دو تیپ شیمیایی DON و NIV در مزارع کشور لهستان گزارش گزارش گردیده استدر مزارع کشور انگلستان غالب‌بودن تیپ شیمیایی DON در میان جدایه‌های قارچ *F. culmorum* گزارش شده است جنینگز و همکاران (Jennings *et al.*, 2004).

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که استفاده از واکنش PCR و جفت آغازگر اختصاصی C51F/C51R جایگزین مناسبی برای شناسایی گونه *F. culmorum* براساس خصوصیات مورفولوژیکی می‌باشد. با توجه به یافته‌های این تحقیق تیپ شیمیایی DON به‌عنوان تیپ شیمیایی غالب شناسایی گردید. تیپ شیمیایی DON به‌عنوان یک عامل مؤثر در افزایش شدت بیماریزایی قارچ *F. culmorum* معرفی گردیده است هسبرگ و همکاران (Hestbjerg *et al.*, 2002). با توجه به این که شرایط آب و هوایی استان آذربایجان‌غربی برای فعالیت این گونه قارچی مساعد می‌باشد، بنابراین جهت کاهش‌دادن احتمال وقوع اپیدمی مطالعات تکمیلی در سطح استان موردنیاز می‌باشد.

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۷-۸ متن انگلیسی مراجعه شود.