# بررسی مولکولی جمعیت جدایه‌های گونه کمپلکس *Fusarium graminearum* گندم استان اردبیل

# Molecular Studys of *Fusarium graminearum* Species Group Isolated from of Wheat at Ardabil Province in Iran

سجاد میان‌آبی[۱]، منصوره میرابوالفتحی[۲*] و مریم غایت زمهریر[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۲۷


## چکیده

یکی از بیماری‌های مهم گندم بیماری بلایت فوزاریومی سنبله می‌باشد که همه ساله خسارت کمی و کیفی زیادی به این محصول وارد می‌کند. گونه‌های غالب عامل این بیماری در بسیاری از کشورها *Fusarium graminearum*، *F. avenaceum* و *F. culmorum* است. آلودگی به *F. graminearum* می‌تواند منجر به آلودگی دانه به مایکوتوکسین‌های deoxynivalenol (DON)، 3-acetyldeoxynivalenol (3-ac DON)، 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON)، nivalenol (NIV) و zeralenone (ZEA) شود. نظر به آلودگی بالای گندم محصول سال ۱۳۹۰ استان اردبیل به *F. graminearum* و مایکوتوکسین DON بررسی جمعیت جدایه‌های گندم این گونه کمپلکس قارچی در استان اردبیل هدف این تحقیق بود. در اجرای این تحقیق در سال ۱۳۹۰ در فصل برداشت گندم از مزارع و محل‌های جمع‌آوری محصول گندم مناطق مختلف استان اردبیل شامل: پارس‌آباد مغان، گرمی، بیله‌سوار، نمین و اصلاندوز نمونه‌برداری و با کشت نمونه‌ها در محیط‌کشت‌های مناسب جدایه‌های فوزاریوم از آنها حاصل شد. با بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک تعداد ۳۲۱ جدایه گونه کمپلکس *F. graminearum* تشخیص شد. جهت تأیید بررسی‌های مورفولوژیک از یک جفت پرایمر اختصاصی تشخیص این گونه استفاده شد که در تعداد ۳۲۱ جدایه باند ۴۵۰ جفت بازی تولید نمود و تشخیص مولکولی گونه *F. graminearum* به اثبات رسید. برای تعیین جایگاه فیلوژنتیک جدایه‌های گونه کمپلکس *F. graminearum* حاصل از گندم استان اردبیل از آغازگرهای اختصاصی که برای قسمتی از توالی ژن آمونیا لایگیز۲ (CTPS2) طراحی شده‌اند و با تکثیر قطعاتی با طول متفاوت، اجزای این گونه مرکب را از هم تفکیک می‌کنند، استفاده شد، همچنین توالی نوکلئوتیدی قطعات تولید شده در چهار جدایه تعیین گردید. نتایج حاصل از PCR با آغازگرهای ژن آمونیا لایگیز۲ در تعداد ۲۸۷ جدایه تولید باندهای ۳۱۱bp و ۱۶۲bp را نمود، که توسط جدایه‌های گونه فیلوژنتیک *Fusarium asiaticum* تولید می‌شود. به این ترتیب ۸۹/۴ درصد جدایه‌ها متعلق به گونه *F. asiaticum* و ۱۰/۶ درصد آنها از سایر اجزا گروه گونه مرکب *F. graminearum* بودند. توالی نوکلئوتیدی ژن آمونیا لایگیز۲ جدایه‌ها نیز مؤید تشخیص گونه‌ی *F. asiaticum* و تفکیک آن از سایر اجزای گونه مرکب *F. graminearum* بود. نتایج این تحقیق نشان داد که با کاربرد آغازگرهای عمومی و اختصاصی در مدت زمان کوتاهی گونه *F. graminearum* و گونه‌های فیلوژنتیک این گونه مرکب قابل تشخیص هستند. به‌نظر می‌رسد آلودگی بالای گندم اردبیل به DON توسط گونه *F. asiaticum* ایجاد می‌شود.


**واژه‌های کلیدی:** گندم، اردبیل، *Fusarium asiaticum*، *Fusarium graminearum* complex species

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا ورامین، ورامین
۲. استاد بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران
۳. استادیار بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران
*: نویسنده مسوول Email: mmirab2000@yahoo.com

**مقدمه**

تولید کل غلات جهان ۱/۸ میلیارد تن است که بیشترین میزان آن (حدود ۵۰۰ تا ۶۰۰ میلیون تن) به گندم اختصاص دارد. گندم از نظر سطح زیرکشت و تولید سالانه نیز در درجه اول اهمیت قرار دارد. سطح زیرکشت گندم ایران در سال ۱۳۹۱ بیش از ۶/۵ میلیون هکتار بوده که استان اردبیل با سطح زیرکشت ۳۴۵۳۴۵ هزار هکتار و میزان تولید بیش از ۷۴۰ هزار تن یکی از مراکز مهم تولید گندم در کشور می‌باشد (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۲).

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله (*Fusarium* head blight = FHB یا Scab یک بیماری ویرانگر است که گندم و سایر غلات دانه ریز را آلوده می‌کند و در همه دنیا به‌عنوان یک بیماری مهم مطرح بوده که بین ۳۰ تا ۷۰ درصد عملکرد گندم را کاهش می‌دهد *زانگ* و همکاران؛ *دیانا* و همکاران؛ *نوی* و همکاران (Zhang *et al.*, 2012; Diana *et al.*, 2012; Ndoye *et al.*, 2012). در سال ۱۹۹۶ به‌علت آلودگی شدید ایالت‌های ایلی نویز، ایندیانا، میشگان و اوهایو به بیماری، میزان خسارت ناشی از بیماری ۱۰۰ میلیون دلار گزارش گردید ، *مک مولن* و همکاران (McMullen *et al.*, 1997). در سال ۲۰۰۲ در Montana گندم بهاره حدود ۴۵/۴ میلیون دلار (۸٪) خسارت دید *کوک* (Cook, 2002). بیماری در مناطق معتدله و نیمه‌حاره‌ای مرطوب شیوع می‌یابد *یانگ* و همکاران (Yang *et al.*, 2008) و اغلب هرجا بارندگی، رطوبت بالا و شبنم سنگین با دوره گلدهی و پر شدن دانه گندم همزمان شود، مناسب‌ترین شرایط برای ایجاد آلودگی و توسعه بیماری فراهم می‌شود، *مک مولن و همکاران* (1997).

در ایران این بیماری ابتدا در سال ۱۳۵۶ توسط ارشاد از روی گندم در منطقه دشت ناز ساری گزارش شد *ارشاد* (Ershad, 2008). *بابادوست* وقوع بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم را در سال ۱۳۷۲ از منطقه مغان گزارش کرد *بابادوست* (Babadoost, 1995). بیماری فوزاریومی سنبله گندم یکی از بیماری‌های مهم گندم در مناطق گرم و مرطوب ایران به‌حساب می‌آید. مزارع گندم مازندران، گرگان و گنبد، *گلزار؛ گلزار* و همکاران (Golzar, 1989; Golzar *et al.*, 1998) و مغان *صفایی* و همکاران (Safaei *et al.*, 2005) از جمله مناطق آلوده کشور به‌شمار می‌روند. شرایط جوی مناسب (رطوبت و دما)، وجود زادمایه قارچ بیمارگر و کشت ارقام حساس به بیماری خسارات جبران‌ناپذیری بر محصول گندم این مناطق وارد آورده است. فروتن و همکاران میزان آلودگی ارقام را در مزارع شمال کشور بالغ بر ۷۰ درصد برآورد نمودند و بیان کردند که رقم فلات در آن سال با سطح زیرکشت ۵۰ درصد در استان مازندران و گرگان بیشترین آلودگی را داشته است *فروتن* و همکاران (Forootan *et al.*, 1993).

این بیماری توسط ۱۸ گونه فوزاریوم ایجاد می‌شود *زانگ* و هم*کاران* (2012) ولی در بسیاری از کشورها *Fusarium graminearum*، *F. avenaceum* و *F. culmorum* به‌عنوان گونه‌های غالب گزارش شده‌اند. گونه *F. graminearum* علاوه‌بر بیماریزایی و کاهش محصول گندم، می‌تواند منجر به آلودگی دانه به فوزاریوتوکسین‌ها ازجمله deoxynivalenol (DON)، 3-acetyldeoxynivalenol (3-ac DON)، 15-acetyldeoxynivalenol (15-acDON)، nivalenol (NIV) و zeralenone (ZEA) شود *بوتالیکو* (Bottalico 1998)؛ *لانست* و همکاران (Langseth *et al.*, 1999)، *مک مولن* و همکاران (1997). در بررسی‌های گسترده در چین طی سال‌های ۱۹۸۰-۱۹۷۶ تعداد ۲۴۵۰ نمونه از سنبله گندم از ۲۱ استان و شهر جمع‌آوری و ۱۸ گونه فوزاریوم جدا و تشخیص داده شد که در ۹۵ درصد نمونه‌ها گونه غالب *F. graminearum* بود *وانگ* (Wang, 1996). گلزار قارچ *F. graminearum* را به‌عنوان عامل بلایت سنبله گندم در مناطق گرگان و گنبد گزارش نمود *گلزار* (1989). گونه‌های جدا شده از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع گندم سه گونه *F. graminearum*،*F. culmorum*، *F. semitectum* بودند که گونه *F. graminearum* گونه غالب گزارش گردید *گلزار* (Golzar, 1993). *زمانی‌زاده و خرسندی* (Zamani-Zadeh and Khorsandi, 1995). ۹۹ نمونه گندم آلوده به این بیماری را از استان مازندران بررسی نمودند. در این مطالعه هشت گونه فوزاریوم جدا شد که دو گونه *F. graminearum* و *F. culmorum* به‌عنوان گونه‌های غالب معرفی شدند و قابلیت توکسین‌زایی ۱۹ جدایه مختلف از این گونه‌ها مورد آنالیزهای شیمیایی و آزمایش‌های بیولوژیکی قرار گرفت. *هراتیان* و همکاران (Haratian *et al.*, 2008) از جفت آغازگر اختصاصی ژن Tri5 (HA TriF/ HA TriR) جهت تشخیص جدایه‌های *F. graminearum* استفاده کردند. این جفت آغازگر در جدایه‌های *F. graminearum* یک قطعه ۲۶۰ جفت بازی را تکثیر می‌نماید. *رضاییان دلویی* و همکاران (Rezaeian dalouei *et al.*, 2011) برای ردیابی ژن کدکننده داکسی‌نیوالنول در ۶۰ جدایه *F. graminearum* جدا شده از مزارع گندم مناطق مختلف کشور از آغازگرهای Tri13F/ Tri13DONR استفاده نمودند و توانستند ژن موردنظر را در ۳۶ جدایه مورد بررسی ردیابی نمایند.

تنوع ژنتیکی بالایی در گونه مرکب *F. grmineaurm* نشان داده شده است *زلر* و همکاران؛ *بورلاکوتی* و همکاران؛ *کاروجیا* و همکاران؛ *شامل* و همکاران؛ *گال* و همکاران (Zeller *et al.*, 2003; Burlakoti *et al.*, 2008; Karugia *et al.*, 2009; Schmale *et al.*, 2011; Gale *et al.*, 2002).

*ادونل* و همکاران (O'Donnell *et al.*, 2008) با استفاده از تکنیک MLGT در بین ۳۱ جدایه فوزاریومی جدا شده از گندم‌های آلوده به FHB که اعضای گونه کمپلکس *F. graminearum* بودند، ۲۲ گونه مولکولی یافت نمودند که گونه *F. asiaticum* دارای بیشترین فرآوانی بود.

*زانگ* و همکاران (Zhang *et al.*, 2010) با استفاده از تکنیک VNTR، ۱۱۰۶ جدایه به‌دست آمده از چهارده منطقه کشت جو، را بررسی نمودند و نشان دادند که گونه *F. asiaticum* در مناطق عمده کشت غلات در چین گسترش پیدا کرده است.

در این بررسی از ژن آمونیا لایگیز۲ برای تفکیک گونه‌های مولکولی مختلف *F. graminearum* همراه با FHB گندم در استان اردبیل استفاده گردید.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

در دهه آخر خرداد سال ۱۳۹۰ از محصول گندم ۳۶ مزرعه واقع در مناطق مختلف استان اردبیل شامل: پارس‌آباد مغان، گرمی، بیله‌سوار، نمین، اصلاندوز، جعفرآباد، ملاکنده و کوهدشت در هنگام برداشت محصول به‌صورت تصادفی نمونه-برداری و در پاکت‌های کاغذی جمع‌آوری شد (جدول ۱).

### کشت نمونه‌ها و جداسازی *Fusarium*

از هر نمونه تعداد ۴۰ بذر به‌طور تصادفی جدا و پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت‌سدیم ۵/. درصد در محیط‌کشت‌های NashSnyder، PDA، PDA+streptomycin-250mg/L کشت و با استفاده از محیط‌های کشت SNA، PDA وCLA جدایه‌های فوزاریوم از سایر قارچ‌ها تفکیک گردید.

### تشخیص مرفولوژیک جدایه‌های *Fusarium*

جدایه‌های *Fusarium* به‌دست آمده با روش تک‌اسپور خالص و پس از آن با بررسی شکل پرگنه و میزان رشد در ۲۵ درجه سلسیوس در محیط‌کشت PDA و همچنین ویژگی‌های فیالید، ماکروکنیدیوم، کلامیدوسپور و تشکیل *پریتسیوم* در محیط CLA تعیین گونه و جدایه‌های *F. graminearum* از سایر گونه‌ها تفکیک شد *لزلی و سامرل؛ گرلاخ و نایرنبرگ؛ نلسون* و همکاران (Leslie and Sammerell 2006; Gerlach and Nirenberg, 1982; Nelson *et al.*, 1983).

### تولید تلومورف جدایه‌های *Fusarium*

به‌منظور تولید فرم جنسی قارچ از محیط CLA استفاده شد. جهت تهیه این محیط‌کشت از تکه‌های کوچک برگ میخک سترون استفاده شد. جهت سترون‌کردن برگ‌ها ابتدا برگ‌ها را در آب جاری شستشو داده سپس به‌مدت ۳ ساعت در آون ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از آن در الکل ۷۰٪ به‌مدت ۲ دقیقه نگهداری شد و بعد روی کاغذ صافی سترون در زیر هود سترون به قطعات کوچک تقسیم شد. بعد از سترون نمودن محیط‌کشت آب- آگار، (۱/۵ درصد) ۱۶تا ۱۸ میلی‌لیتر از آن به هر تشتک پتری حاوی چند قطعه برگ میخک سترون اضافه شد. یک قطعه به ابعاد ۳×۳ میلی‌متر از هر کشت ۵ روزه هر جدایه در مجاورت برگ‌های میخک قرار داده شد. سپس جدایه‌های کشت داده شده در محیط CLA در معرض نور Near UV با تناوب نوری ۱۲ ساعت Near UV و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شد. پس از ۷ تا ۱۲ روز تشکیل پریتسیوم روی قطعات برگ میخک با استفاده از استرئوسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.

## بررسی مولکولی جدایه‌های Fusarium با استفاده از PCR

### استخراج DNA

به‌منظور تهیه مقادیر زیاد هیف قارچ، تعداد پنج قطعه به ابعاد ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه پرگنه جوان (۳ تا ۵ روزه) هر جدایه از محیط PDA به یک فلاسک حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع potato dextrose broth (PDB) سترون انتقال یافت. فلاسک‌های مذکور به‌مدت ۱۰ روز در انکوباتور با دمای ۲۲ درجه سلسیوس به‌صورت ساکن قرار داده شد. پس از ۱۰ روز توده‌های میسلیومی قارچ که به شکل توده‌های سفید تا هلوئی رنگ فضای داخل فلاسک را پر نموده بود با استفاده از قیف و کاغذ صافی از محیط‌کشت مایع جدا شد، و پس از شستشوی توده هیف با آب مقطر سترون، در مدت ۲۴ ساعت در معرض هوا در هود سترون خشک شد و سپس یک تا دو میلی‌گرم از میسلیوم خشک شده درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و با استفاده از مقادیر بسیار کمی نیتروژن مایع و یک میله پلاستیکی پودر گردید، پودر حاصل در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. استخراج DNA جدایه‌های *F. gramineaum* براساس روش *سامبروک و راسل* (Sambrook and Russell, 2001) انجام شد. برای اطمینان از

کیفیت DNA استخراج شده، ۵µl از هر نمونه DNA با ۲µl بافر بارگذاری (Loading Dye) مخلوط و در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. الکتروفورز تحت ولتاژ ۷۰ ولت و در مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از انجام الکتروفورز، ژل تحت نور ماوراء بنفش، در دستگاه مستندساز ژل (UV Doc) مشاهده گردید. همچنین به‌منظور بررسی خلوص و کمیت DNA از دستگاه اسپکتوفتومتر (Perkin Elmer, USA) استفاده شد.

**واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)**

ابتدا برای تأیید تشخیص مرفولوژیک جدایه‌های گروه *F. graminearum* از آغازگرهای طراحی شده توسط *نیکلسون* و همکاران (Nicholson *et al.*, 1998) (جدول ۲) استفاده شد. این جفت آغازگر تولید باند ۴۵۰ جفت بازی را می‌کنند. پرایمرها از طریق شرکت سینا ژن تهیه شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در حجم کل نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مواد و ترکیبات مورد استفاده در هر واکنش PCR به شرح زیر بود:

buffer PCR 2.5µl، $MgCl_2$ 0.5µl، dNTP mix 1µl، از هر جفت آغازگر، Taq DNA polymerase 0.2µl، DNA نمونه 1µl که در نهایت با اضافه کردن 17.8µl آب دیونیزه حجم محلول به ۲۵µl رسید.

چرخه دمایی مورد استفاده جهت PCR قارچ *F. graminearum* به شرح زیر بود:

بازشدن اولیه دو رشته DNA از هم در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه در یک چرخه انجام شد و سپس ۳۵ چرخه: مرکب از ۱ دقیقه دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه دمای ۵۳ درجه سلسیوس و ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود.

جدول ۱: توالی جفت آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص اختصاصی گونه *F. graminearum* و تشخیص *F. asiaticum* در clade ژنتیکی این گونه براساس ژن آمونیا لایگیز ۲

Table 1: The primer sequences and the sizes of the polymerase chain reaction (PCR) fragments used to identify the *F.* isolates and *F. asiaticum graminearum*

| Species<br>گونه | Primer name<br>نام آغازگر | Sequence (5' to 3')<br>توالی | Size (bp)<br>اندازه | Reference<br>ماخذ |
|---|---|---|---|---|
| *F. graminearum* | Fg16F<br>Fg16R | CTCCGGATATGTTGCGTCAA<br>GGTAGGTATCCGACATGGCAA | 400-500 | (Nicholson *et al.*, 1998) |
| *F. graminearum* clade | FgCTPSf024<br>FgCTPSrR306 | TCGGAAGAGTTTTCTGCC´<br>CCTTGGTCATCCATAGAG | 311 | (Yang *et al.*, 2008) |
| *F. asiaticum* | Fg6CTPSf177<br>FgCTPSrR306 | GTCTCACTTCAAGCCA<br>CCTTGGTCATCCATAGAG | 162 | (Yang *et al.*, 2008) |

برای تفکیک گونه *F. asiaticum* در خوشه (clade) ژنتیکی گونه مرکب *F. graminearum*، از آغازگرهای ویژه گونه‌های فیلوژنتیکی این گونه مرکب که توسط *یانگ* و همکاران (Yang *et al.*, 2008) طراحی شده بود، استفاده گردید (جدول ۲). این آغازگرها براساس توالی ژن آمونیا لایگیز۲ طراحی شده‌اند و براساس وجود تفاوت در معدودی نوکلئوتید ژن آمونیا لایگیز۲ قادرند جدایه‌های گونه فیلوژنتیکی *F. asiaticum* را با تکثیر قطعه‌ای با اندازه ۱۶۲bp از سایر گونه‌های مختلف خوشه فیلوژنتیک *F. graminearum* تفکیک نمایند.

هر واکنش PCR در حجم کل نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مواد و ترکیبات جهت PCR به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت:

buffer PCR 2.5µl، $MgCl_2$ 0.5µl، dNTP mix 1µl، از هر جفت آغازگر 1µl، آنزیم Taq DNA polymerase 0.2µl و DNA نمونه 1µl که در نهایت با اضافه کردن 17.8µl آب دیونیزه حجم محلول به 25µl رسانده شد.

چرخه دمایی مورد استفاده جهت این واکنش PCR به شرح: باز شدن اولیه دو رشته DNA از هم در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه در یک چرخه و ۳۵ چرخه به‌صورت ۱ دقیقه بازشدن اولیه دو رشته در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال پرایمرها به DNA در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۳ دقیقه انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط دستگاه ترموسایکلر Bio-RAD مدل i Cycler ساخت کشور آمریکا انجام شد.

در نهایت محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد و با اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی گردید. براساس طول قطعات مختلف فرآورده‌های حاصل از واکنش فوق، جدایه‌های مختلف از نظر ژنتیکی تفکیک گردیدند (*یانگ* و همکاران، 2008).

### تعیین توالی قطعات ۳۱۱ و ۱۶۲ جفت بازی

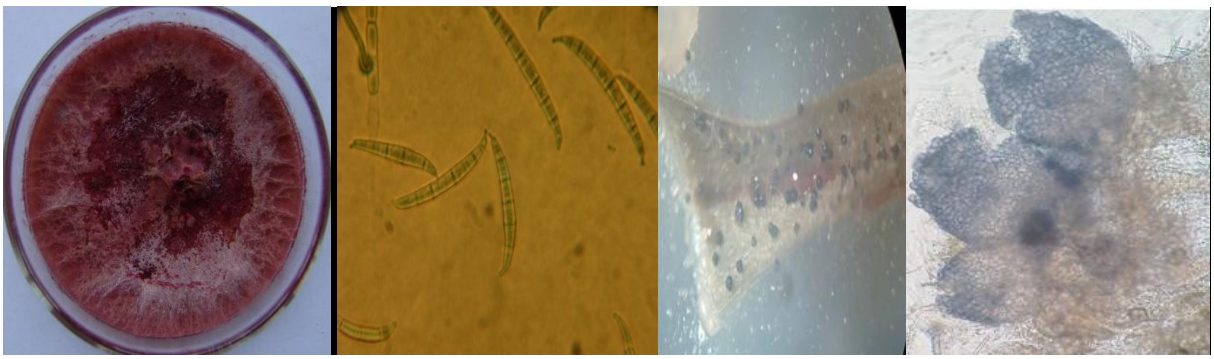
به‌منظور تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات ژن آمونیا لایگیز۲ محصول PCR که با کاربرد آغازگرهای اختصاصی تفکیک اجزای خوشه ژنی گونه مرکب *F. graminearum* تکثیر شده بودند، جدایه‌های Fg 137، Fg 189، Fg 226 و Fg301 انتخاب شد، سه جدایه اول به‌عنوان نماینده از گونه *F. asiaticum* انتخاب شد که در آنها علاوه‌بر تولید قطعه ۳۱۱ جفت بازی با جفت پرایمر FgCTPSrR306-FgCTPS f024، قطعه ۱۶۲ جفت بازی که مؤید گونه *F. asiaticum* است نیز با جفت پرایمر FgCTPSrR306-Fg6CTPS 177 تکثیر شده بود، در حالیکه در جدایه Fg301 قطعه ۱۶۲ جفت بازی با جفت پرایمر FgCTPSrR306-Fg6CTPS 177 تولید نشده و فقط قطعه ۳۱۱ جفت بازی با جفت پرایمر FgCTPS f024-FgCTPSrR306 تولید شده بود. چهار جدایه مذکور با دو جفت پرایمر FgCTPSrR306-FgCTPS f024 و Fg6CTPS 177-FgCTPSrR306 مطابق روش و چرخه دمایی ذکر شده برای تکثیر ژن آمونیا لایگیز۲ تکثیر و از وجود قطعات ۳۱۱ و ۱۶۲ جفت بازی در ژل آگارز اطمینان حاصل شد. محصول PCR جدایه Fg301 با آغازگر FgCTPSf024 و سه جدایه Fg 137، Fg 189، Fg 226 با آغازگر Fg6CTPSf177 تکثیر و توالی آنها توسط شرکت فزاپژوه با استفاده از روش Sanger method و دستگاه ABI3730XL ساخت کشور آمریکا تعیین توالی گردید.

### نتیجه و بحث

نمونه‌های گندم جمع‌آوری شده و مناطق مورد نمونه‌برداری در استان اردبیل در دهه سوم خرداد سال ۱۳۹۰ به شرح جدول ۱ می‌باشد.

### شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌ها

تعداد ۳۲۱ جدایه *F. graminearum* (جدول ۳) جداسازی شده از محصول گندم استان اردبیل براساس ویژگی‌های مورفولوژیک به شرح: رنگ پرگنه از صورتی تا قرمز، از نظر سرعت رشد، در مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تشتک پتری نه سانتیمتری را پر نمود. در بین جدایه‌های مورد بررسی میکروکنیدیوم مشاهده نگردید. ماکروکنیدیوم‌ها نسبتاً باریک، خمیده تا تقریباً راست بودند. نوک ماکروکنیدیوم تیز و سلول پایه آن پاشنه‌ای شکل بود. اغلب ماکروکنیدیوم‌ها ۵-۶ بندی و ابعاد آنها (۵/۶-۴)۴/۵×(۶۴- ۴۱/۶)۵۴/۴ میکرومتر بود. در همه جدایه‌ها پریتسیوم به فراوانی در محیط CLA تشکیل شد (شکل ۱)که با ویژگی‌های مورفولوژی توصیف شده برای *Gibberella zeae* Schwein تطبیق داشت *پرورا* (Pereyra, 2000). ویژگی‌های مورفولوژی جدایه‌های گندم اردبیل نیز، با ویژگی‌های توصیف شده برای گونه *F. graminearum* تطبیق داشت *لزلی و سامرل* (2006).

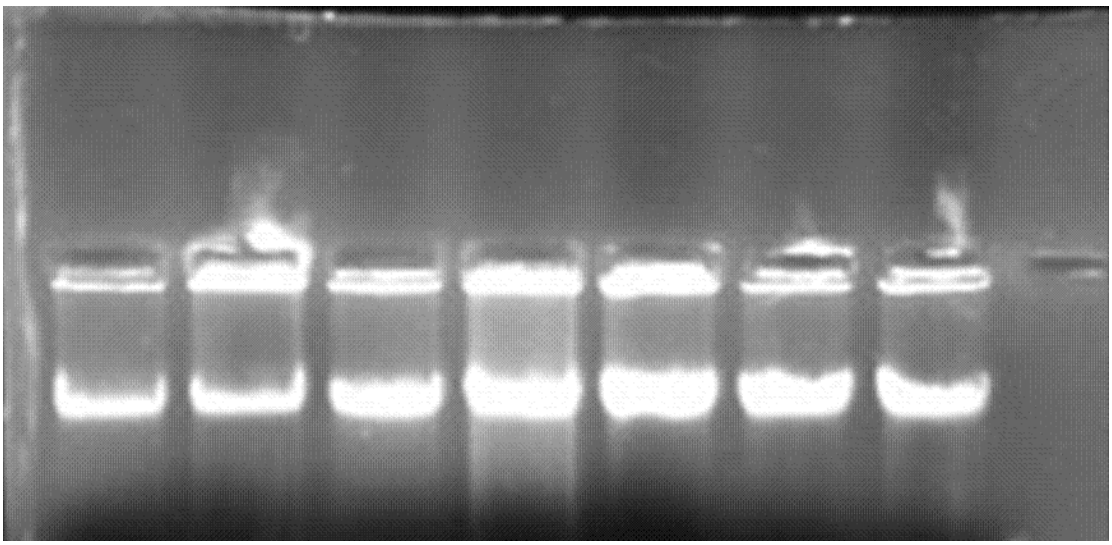


شکل ۱: جدایه *F. graminearum*: گندم اردبیل: (A) الگوی رویش در محیط PDA، (B) اشکال ماکروکنیدی، (C) پریتسیوم‌های تشکیل شده در سطح برگ میخک

Fig. 1: *F. graminearum* isolate of Ardabil: (A) growth pattern on PDA, (B) Macroconidia, (C) Perithecia formed in CLA medium

جدول ۲: نمونه‌های گندم جمع‌آوری شده و مناطق مورد نمونه‌برداری استان اردبیل در سال ۱۳۹۰
Table2: Wheat samples were collected from different areas of Ardabil province in 2011

| Area code<br>کد محل | Location<br>محل | No<br>شماره | Area code<br>کد محل | Location<br>محل | No<br>شماره |
|---|---|---|---|---|---|
| AM 19 | Parsabad | 19 | AM 1 | Bilesavar | 1 |
| AM 20 | Nasirpour farm | 20 | AM 2 | Parsabad | 2 |
| AM 21 | Qarayaqlou farm | 21 | AM 3 | Eslamabad Jadid | 3 |
| AM 22 | Eslamabad Jadid | 22 | AM 4 | Qeshlag haj avaz | 4 |
| AM 23 | Jafarabad | 23 | AM 5 | Esmaiilkande | 5 |
| AM 24 | Karimnejad farm | 24 | AM 6 | Takale | 6 |
| AM 25 | Kouhdasht | 25 | AM 7 | Sadeghian farm | 7 |
| AM 26 | Bilesavar | 26 | AM 8 | Cheraghi farm | 8 |
| AM 27 | Jafarabad | 27 | AM 9 | Khlil yadaii farm | 9 |
| AM 28 | Jafarabad | 28 | AM 10 | Namdare Shaii farm | 10 |
| AM 29 | Oultan | 29 | AM 11 | Rohkande | 11 |
| AM 30 | Molakande | 30 | AM 12 | Iran Abad | 12 |
| AM 31 | Namin | 31 | AM 13 | Bilesavar | 13 |
| AM 32 | Germi, Mouran | 32 | AM 14 | Majid abad | 14 |
| AM 33 | Germi, Markazi | 33 | AM 15 | Sefr Marzi | 15 |
| AM 34 | Germi, Angout | 34 | AM 16 | Eslamabad Jadid | 16 |
| AM 35 | Germi, parzand | 35 | AM 17 | Takalechi | 17 |
| AM 36 | Aslandouz | 36 | AM 18 | Qeshlag haj avaz | 18 |



شکل ۲: نتایج الکتروفورز DNA استخراج شده از جدایه‌های *F. graminearum* در ژل آگارز ۱/۲٪
Fig. 2: The results of *F. graminearum* DNA extraction in agarose gel 1.2%

**بررسی مولکولی جدایه‌های *Fusarium* با استفاده از PCR استخراج DNA ژنومی**

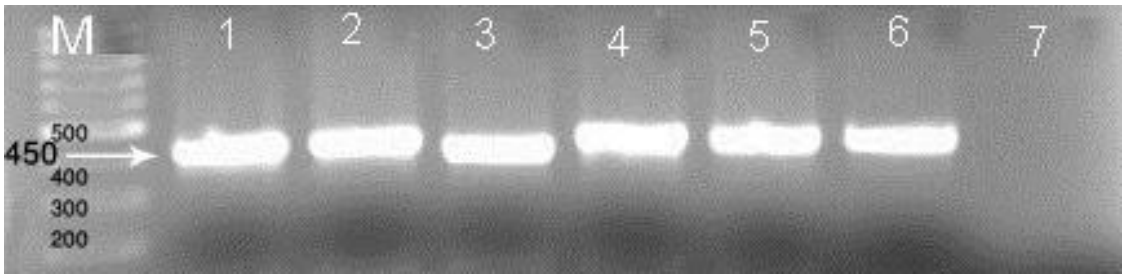
نتایج الکتروفورز DNA در ژل آگارز (شکل ۱) نشان داد که DNA استخراج شده با این روش از کیفیت خوبی برخوردار است. همچنین نتایج بررسی کمی نمونه‌های DNA با روش اسپکترومتر نشان‌دهنده‌ی خلوص و غلظت بالای نمونه‌های DNA بود.

**تشخیص جدایه‌های گروه *F. graminearum***

جفت آغازگر اختصاصی *F. graminearum نیکلسون* و همکاران (1998) در تمامی ۳۲۱ جدایه‌ای که با بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک *F. graminearum* تشخیص شده بود، قطعه حدود ۴۵۰ جفت بازی را تکثیر نمود و نشان داد که همه جدایه‌ها متعلق به گونه مرکب *F. graminearum* هستند (شکل ۲).

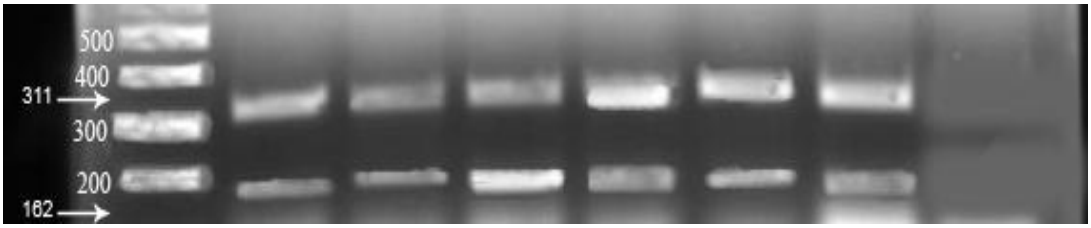
جفت آغازگر عمومی برای clade ژنتیکی گونه مرکب F. graminearum (FgCTPSf024 و FgCTPSrR306) نیز که براساس توالی ژن آمونیا لایگیز۲ برای تشخیص همه اجزای گروه *F. graminearum* طراحی شده است و در همه اجزا گروه گونه کمپلکس *F. graminearum* قطعه‌ای با اندازه ۳۱۱ جفت باز را تکثیر می نماید یانگ و همکاران (2008)، مطابق انتظار توانست در تمامی ۳۲۱ جدایه گندم اردبیل قطعه مذکور را تولید نماید. و به این ترتیب مشخص شد همه جدایه ها متعلق به گونه مرکب *F. graminearum* هستند.

برای شناسایی گونه فیلوژنی *F. asiaticum* از میان سایر گونه‌های فیلوژنتیک گونه مرکب *F. graminearum* از جفت آغازگر اختصاصی Fg6CTPSf177 و FgCTPSrR306 استفاده شد. این جفت آغازگر فقط قادر است در جدایه‌های *F. asiaticum* قطعه‌ای۱۶۲ جفت بازی را تکثیر نماید *(یانگ* و همکاران، 2008) که در این تحقیق در تعداد ۲۸۷ جدایه قطعه‌ای به طول ۱۶۲ جفت باز تکثیر شد (شکل ۳) و ثابت شد که ۸۹/۴ درصد جدایه‌های گونه *F. graminearum* پارس‌آباد مغان و مناطق تولید گندم اردبیل گونه *F. asiaticum* می‌باشند.




شکل ۳: محصول PCR شش جدایه *F. graminearum* گندم اردبیل (جدایه‌های Fg۲۵ ، Fg۲۸، Fg۳۴، Fg۳۶، Fg۴۸، Fg۵۹ درچاهک‌های ۱-۶)، یک جدایه *F. culmorum* (چاهک ۷) با جفت آغازگر اختصاصی Fg16F , Fg16R و سایز مارکر (M)

Fig. 3: PCR products of six *F. graminearum* isolates of Ardabil (Fg 25, Fg 28, Fg 34, Fg 36, Fg 48, Fg 59 isolates in wells 1-6) and one *Fusarium culmorum* (well 7) amplified with primers Fg16F and Fg16R

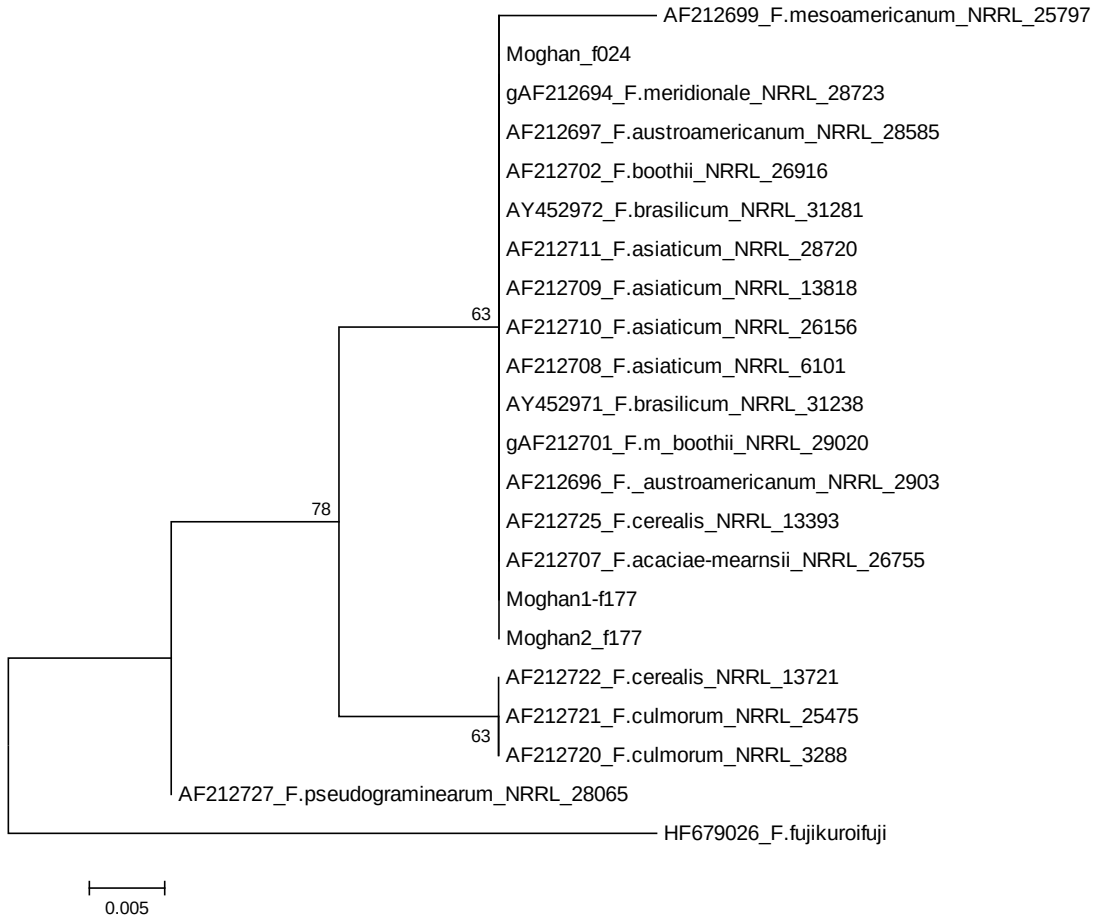



شکل ۴: تکثیر قسمت‌هایی از ژن آمونیا لایگیز۲ در شش جدایه *F. graminearum* گندم اردبیل (جدایه‌های Fg۲۵ ، Fg۲۸، Fg۳۴، Fg۳۶، Fg۴۸، Fg۵۹ درچاهک‌های ۱-۶) و یک جدایه *F. culmorum* (چاهک۷) با آغازگرهای FgCTPSf024، Fg6CTPSf177 و FgCTPSrR306 و سایز مارکر) (M و تکثیر اختصاصی قطعه ۱۶۲ بازی معرف گونه *F. asiaticum*

Fig. 4: PCR products of six *F. graminearum* isolates of Ardabil (Fg 25, Fg 28, Fg 34, Fg 36, Fg 48, Fg 59 isolates in wells 1-6) and one *Fusarium culmorum* (well 7) amplified with primers FgCTPSf024, Fg6CTPSf177 and FgCTPSrR306

## نتایج تعیین توالی قطعات ژن آمونیا لایگیز۲ جدایه‌های *F. graminearum* مغان

توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های Fg 137، Fg 189، Fg 226 و Fg301 که به‌ترتیب در سه جدایه اول با پرایمر Fg6CTPS 177 و در جدایه Fg301 با پرایمر FgCTPS f024 تکثیر شده بود در NCBI بلاست و با جدایه‌های دیگر مقایســـه و با ClustalW هم‌تراز (Align) شدند، سپس شجره فیلوژنی آن با مدل Neighbor- joining Tree در برنامه *تامورا* (Tamura, 2011) MEGA5 ترسیم شد (شکل ۵). همان‌طور که در دندروگرام ۵ مشاهده می‌شود همه اجزا خوشـــه *F. graminearum* به‌همراه جدایه‌های این تحقیق در یک گـــروه قرار گرفته و کاملاً متفاوت از گونه‌های *F. culmorum*، *F. cerealis* *F. pseudograminearum* و *F. meridonales* بوده و *F. fujikuroii* نیز خارج گروه واقع شد. در بررسی توالی نوکلئوتیدی سه جدایه اول در محل نوکلوتید 177 nt، باز تیمین به جای سیتوزین دیده شد که همین امر سبب کارآیی پرایمر Fg6CTPS177 و تولید قطعه ۱۶۲ جفت بازی در جدایه‌های *F. asiaticum* شد *یانگ* و همکاران (2008). در توالی نوکلئوتیدی ژن آمونیا لایگیز۲ جدایه Fg301 در محل نوکلئوتید nt177 باز سیتوزین مشاهده شد که همین امر سبب عدم‌تولید قطعه ۱۶۲ جفت بازی است. در محل نوکلئوتید ۳۰۶ هر سه جدایه Fg137، Fg189، Fg226 نیز باز سیتوزین مشاهده شد، که گویای تفکیک آن از گونه *F. meridionale* است و در گونه اخیر در این محل، باز تیمین به جای سیتوزین قرار دارد (*یانگ* و همکاران، 2008).




شکل ۵: دندروگرام جایگاه جدایه‌های *F. graminearum* گندم اردبیل (Moghan1-177, Moghan2-177, Moghan-f24) در گروه گونه مرکب *F. gramiearum* و گونه‌های دیگر فوزاریوم گندم

Fig. 5: Dendrogram of *F. graminearum* isolates from Ardabil (Moqan1-177, Moghan2-177 and Moqan-f24) in *Fusarium gramiearum* complex group.

همپوشانی بعضی ویژگی‌های مرفولوژی ماکروکنیدیوم‌ها که از آنها برای تفکیک مرفولوژیک گونه‌های فیلوژنتیک این گونه مرکب استفاده می‌شود *یانگ* و همکاران (2008)؛ *استارکی* و همکاران (Starkey *et al.*, 2007)؛ *ادونل* و همکاران؛

(ODonnell *et al*., 2004) تفکیک اجزا این گونه را از یکدیگر مشکل و در مواردی غیرممکن می‌سازد، از این‌رو در همگی مطالعات انجام شده صفات مورفولوژیک مذکور به‌همراه مطالعات مولکولی مدنظر گرفته شده و یا فقط با بررسی فیلوژنی گونه مرکب مذکور انجام شده است *استارکی و همکاران* (2007)، ادونل و همکاران (2004). بنابراین تفکیک مرفولوژیکی *F. asiaticum* از سایر گونه‌های فیلوژنتیک گونه مرکب *F. graminearum* فقط با بررسی صفات مرفولوژیک عملی نیست. با استفاده از تکثیر ژن آمونیا لایگیز۲ می‌توان گونه *F. asiaticum* را از سایر گونه‌های *F. graminearum* تفکیک نمود. نتایج این تحقیق نشان داد که در حدود ده درصد جدایه‌های آلوده‌کننده گندم استان اردبیل متعلق به سایر اجزای گونه مرکب *F. graminearum* و ۹۰ درصد متعلق به گونه *F. asiaticum* است، این اولین گزارش از شناسایی مولکولی *F. asiaticum* در ایران و همه‌گیری آن در منطقه‌ای (اردبیل) که محصول گندم آن در سال نمونه‌برداری (۱۳۹۰) آلودگی بالایی به DON داشته است *میرابوالفتحی و کرمی اسبو* (Miraolfathy and Karami- Osboo, 2013)، می‌باشد. لازم به ذکر است که *درویش‌نیا* و همکاران (Darvishnia *et al*., 2006) گونه *F. asiaticum.* را براساس ویژگی‌های مورفولوژیک از ایران گزارش نموده‌اند (Darvishnia *et al*., 2006).

در دهه اخیر گونه *F. graminearum* به‌عنوان یک گروه فیلوژنتیک و مرکب از چندین گونه معرفی شده است *استارکی* و همکاران (2007)؛ *ادونل* و همکاران (2004) که شامل گونه‌های *F. austroamericanum*، *F. meridionale*، *F. boothii*، *F. mesoamericanum*، *F. acaciae-mearlisil*، *F. asiaticum*، *F. graminearum sensu stricto*، *F. cortaderiae*، *F. brasilicum* می‌باشد (*یانگ* و همکاران، 2008). برای تفکیک اجزا این گروه از مارکرهای مختلف مانند SCAR، AFLP، RFLP، RAPD و ژن آمونیا لایگیز۲ (*یانگ* و همکاران (2008) استفاده شده است.

بررسی‌های *ادونل* و همکاران (2004) و *استارکی* و همکاران (2007). نشان داد که گونه‌های اشتقاق یافته مربوط به نیمکره شمالی‌اند. در این میان برخی گونه‌ها نظیر *F. graminearum* senso strito همه جازی می‌باشند و در آسیا، آفریقا، اروپا، آمریکا و اقیانوسیه یافت شده‌اند درحالی‌که برخی گونه‌های دیگر مثل *F. asiaticum* فقط از آسیا گزارش شده است و تاکنون گزارشی از وجود آن در مناطق دیگر دریافت نشده است *زانگ* و همکاران (2012).

در سال‌های اخیر با مشخص شدن ژن‌های مولد تریکوتسن-ها در گونه *F. graminearum* و با ردیابی قسمت‌های مختلف این خوشه ژنی به احتمال تولید هر یک از تریکوتسن‌ها، چگونگی پراکنش جدایه‌های مولد تریکوتسن‌های مضر برای انسان و تولید توکسین در منطقه جغرافیایی خاص پی می‌برند *زانگ* و همکاران (2012)، گونه مرکب *F. graminearum*. تولید هر دو مایکوتوکسین داکسی‌نیوالنول (DON) و نیوالنون (NIV) را می‌کند و براساس دارا بودن ژن‌های مولد DON و NIV به دو کمو تایپ مولد این دو توکسین طبقه‌بندی شده است *وانگ* و همکاران (2011). برای ردیابی DON در محصول گندم عموماً از روش‌های آنالیز شیمیایی مانند HPLC، TLC و یا GC استفاده می‌شود *میرابوالفتحی* (Miraolfathy, 2010). با کشف گونه‌های مولکولی مشخص شد که گونه فیلوژنتیک *F.* stricto *graminearum* senso فقط تولید DON و گونه فیلوژنتیک *F. asiaticum* علاوه‌بر DON و مشتقات استیله آن تولید NIV نیز می‌کند *یانگ* و همکاران (2008). براساس گزارشات دانشمندان پراکنش گونه‌های گروه *F. graminearum* عامل بلایت خوشه گندم (FHB) وابسته به شرایط آب و هوایی و جغرافیایی متفاوت است. به‌طور مثال در مناطقی که دما بالای ۱۵ درجه سلسیوس باشد گونه غالب *F. asiaticum* است و در مناطق دارای دمای پایین‌تر از ۱۵ درجه سلسیوس گونه غالب *F. graminearum* senso strict می‌باشد (*یانگ* و همکاران، 2008).

گونه *F. asiaticum* در آسیا گونه غالب است و رابطه‌ای بین *F. asiaticum* و میزان تولید DON نیز یافت شده است *زانگ و همکاران* (2012).

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و مشخص شدن غالبیت گونه *F. asiaticum* در منطقه اردبیل، کشت وسیع گندم آبی به خصوص در منطقه پارس‌آباد مغان، و گزارش آلودگی بالای گندم این منطقه به DON (۴ppm) در سال ۱۳۹۰ *میرابوالفتحی و کرمی* (Mirabollfathi and Karami, 2012)، کشت پی‌درپی گندم و ذرت، شرایط آب و هوایی مساعد برای همه‌گیری بیماری مانند رطوبت بالا، دمای بالا و باران در زمان گلدهی، و همچنین کشت ارقام حساس گندم در این منطقه سبب ریسک بالای آلودگی گندم این منطقه به DON شده است، از این‌رو باید استراتژی مناسبی برای کاهش آلودگی تدوین و اجرا گردد.

**منابع:**

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۲۱-۲۳ متن انگلیسی مراجعه شود.