

مقایسه تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium culmorum* عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در منطقه ورامین\*

بهنام پوزشی میاب<sup>۱</sup>✉، محمد رضوی<sup>۱</sup>، حمید رضا زمانی زاده<sup>۱</sup>، رسول زارع<sup>۲</sup> و سعید رضائی<sup>۱</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیماری شناسی گیاهی، تهران، ایران؛ ۲- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، ایران (تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۲؛ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۲)

## چکیده

قارچ *Fusarium culmorum* یکی از عوامل اصلی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم می‌باشد. در این تحقیق تنوع ژنتیکی و اختلاف بیماری‌زایی ۴۹ جدایه *F. culmorum* که از طوقه و ریشه گندم مزارع سه بخش ورامین جمع آوری شده بود، با استفاده از هشت جفت آغازگر ریزوماهواره‌ای تک ژنگاه انجام و شاخص چند شکلی ژنگاهی با داده‌های SSR محاسبه شد. آزمون قدرت تهاجمی روی رقم حساس گندم بولانی در شرایط گلخانه ای مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج آنالیز داده ها نشان داد که تمامی ژنگاه‌های ریزوماهواره‌ای دارای چند شکلی بوده و دارای ۲ تا ۶ آلل با میانگین ۳/۷۵ آلل برای هر ژنگاه بودند. تجزیه خوشه‌ای داده‌های SSR، ۴۹ ژنوتیپ مختلف را در پنج گروه تقسیم‌بندی کرد و شاخص چند شکلی ژنگاهی ۴۴ چندشکلی ژنگاه را در بین ۴۹ جدایه مشخص کرد. در کل سطح بالای تنوع ژنتیکی (۰/۵۲۸) در تمام جدایه‌های *F. culmorum* مشاهده شد و جدایه‌های بخش ورامین تشابه ژنتیکی کمتری نسبت به جدایه‌های بخش‌های جوادآباد و پیشوا داشتند. تفاوت بیماری‌زایی بین جدایه‌ها معنی‌دار و جدایه‌های بخش ورامین از لحاظ بیماری‌زایی نسبت به جدایه‌های دو بخش دیگر از قدرت بیماری‌زایی بیشتری برخوردار بودند. ارتباط معنی‌داری بین تنوع ژنتیکی و شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها مشاهده نگردید. تمایز تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌های بخش ورامین از دیگر بخش‌های شهرستان ورامین، احتمال وقوع ژنوتیپ‌های جدید با بیماری‌زایی بیشتر را در این بخش تقویت می‌کند. **واژه‌های کلیدی:** ژنتیک جمعیت، واریانس مولکولی، هاپلو تیپ.

## Comparison of genetic diversity and pathogenicity among *Fusarium culmorum* isolates, the causal agent of wheat root and crown rot disease in Varamin fields

B. POUZESHIMIAB<sup>1</sup>✉, M. RAZAVI<sup>2</sup>, H. R. ZAMANIZADEH<sup>1</sup>, R. ZARE<sup>2</sup> and S. REZAAEE<sup>1</sup>

1- Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; 2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

### Abstract

*Fusarium culmorum*, is one of the most important causal agents of crown rot of wheat in Iran. Simple sequence repeats or microsatellite (SSR) and virulence assays were used to investigate genetic variability among 49 isolates of *F. culmorum* collected from wheat fields in three districts of Varamin. Eight pairs of single-locus microsatellite markers were used to analyze the genomic DNA of isolates. The result of analysis showed that all loci were polymorphic and the numbers of alleles ranged between two to six with an average of 3.75 per locus. Cluster analysis of SSR data revealed that 49 isolates clustered into five distinct groups. The index of multilocus association was calculated using SSR data and 44 multilocus haplotypes were detected among 49 isolates. The results of this study indicated that there was a high level of genetic diversity (0.528) among the isolates examined, and genetic similarity among Varamin isolates was less than those obtained from Pishva and Javad-abad regions. In addition, pathogenicity of the isolates was tested on a bread wheat cv. Bolani under greenhouse conditions. A significant difference for pathogenicity was found among the isolates. Comparison of the means showed that the isolates of Varamin districts were more pathogenic than Javad-abad and Pishva districts. The significant difference in the genetic diversity and pathogenicity of the Varamin's isolates in comparison to the other districts suggests that there is a potential for the occurrence of new genotypes with greater virulence in this district. The statistically no correlation was observed between molecular variation and pathogenicity.

**Key words:** Molecular variance, Haplotypes, Population genetics.

\*بخشی از رساله‌ی دکترای تخصصی نگارنده اول

## مقدمه

قارچ *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. بیماریزایی خاکزاد با پراکنش جهانی است که می‌تواند عامل پوسیدگی طوقه و ریشه و همچنین بلایت سنبله (head blight) در غلات دانه ریز مخصوصاً گندم و جو باشد (Scherm et al. 2013). قارچ *F. culmorum* توکسین‌های تریکوتسین و زراننون را تولید می‌کند که همراه با مایکوتوکسین‌های دیگر، در آمریکای شمالی و اروپا شیوع دارد (Desjardins, 2006). *F. culmorum* بیشتر در مناطق معتدل و سرد اروپا و استان‌های فلاتی کانادا اهمیت دارد (Leslie and Summerell, 2006). در منطقه Pacific North-West آمریکا در گندم زمستانه تجاری، ۳۵ درصد کاهش عملکرد ناشی از پوسیدگی طوقه گزارش شده است (Smiley et al. 2005b).

پوسیدگی طوقه و ریشه گندم از مناطق مختلف کشت گندم در ایران گزارش شده است و زیان اقتصادی قابل توجهی را در اغلب مناطق کشت گندم ایران از جمله استان‌های گلستان، آذربایجان شرقی، اردبیل، تهران و زنجان (Saremi et al. 2007; Pouzeshimiab et al. 2012) کرمانشاه، لرستان (Safaei et al. 2012) و فارس (Ravanlou and Banihashemi, 1999) داشته است. تنوع فنوتیپی بالایی از نظر شکل پرگنه، تولید رنگدانه و تولید اسپور در بین جدایه‌های *F. culmorum* گزارش شده است (Puhalla, 1981). همچنین تنوع زیادی از نظر قدرت تهاجمی، نوع و مقدار تولید مایکوتوکسین‌ها نیز بین جدایه‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی بوده است (Akinsanmi et al. 2006). با وجود اهمیت قابل توجه این قارچ هم از لحاظ بیماری شناسی و هم توکسین شناسی، اطلاعات مناسب و کافی در خصوص ساختار جمعیتی و تنوع ژنتیکی آن در سطح مولکولی وجود ندارد. برای تخمین تنوع ژنتیکی ۱۸ جدایه جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور هلند، از مارکر random amplified polymorphic (RAPD)، استفاده شده است (Nijs et al. 1997). در بررسی اخیر تنها دو ژنوتیپ در بین

جدایه‌ها شناسایی شد. جهت آنالیز جمعیت این قارچ، مکان های ژنی IGS, nrDNA, 28S, تکثیر و RFLP شد و تنوع بالایی (۴۷/۷٪) در داخل جمعیت‌های جهانی *F. culmorum* پیدا شد (Miedaner et al. 2001). از مارکر ISSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۷۵ جدایه *F. culmorum* استفاده شده که ۵۹ ژنوتیپ مختلف قارچ را داخل هفت شاخه (کلاد) گروه‌بندی کردند (Mishra et al. 2003). با استفاده از آنالیز PCR Rep- (Repetitive element palindromic PCR)، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی (۵۲/۳٪) در بین ۱۴ جدایه *F. culmorum* جمع آوری شده از مناطق مختلف ترکیه، حاصل شده است (Gürel et al. 2010). هشت نشانگر ریز ماهواره‌ای برای *F. culmorum* طراحی شده و با استفاده از آنها تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های جدایه‌های *Fusarium graminearum* و *F. culmorum* جمع آوری شده از مناطق مختلف فرانسه بررسی شده است (Giraud et al. 2002) بررسی‌های متعددی در زمینه قدرت بیماری‌زایی بین گونه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گندم انجام شده است. بیماری‌زایی ۲۴ جدایه *Fusarium pseudograminearum*، *F. culmorum* و *Bipolaris sorokiniana* در گندم توسط Smiley et al. (2005a) در شرایط مزرعه ارزیابی شد و تفاوت معنی داری از لحاظ بیماری‌زایی در هر سه گونه مشاهده شد، ولی بیماری‌زایی *F. pseudograminearum* بیشتر بود. بیماری‌زایی پنج جدایه از گونه‌های *F. pseudograminearum*، *F. culmorum* و *F. graminearum* روی دو رقم گندم بهاره و دو رقم گندم دوروم توسط Dyer et al. (2009) در مدت دو سال در مزرعه بررسی شد. که از نظر بیماری‌زایی تفاوت معنی‌داری بین گونه‌ها مشاهده شد و جدایه‌های *F. pseudograminearum* بیشترین مقدار پوسیدگی طوقه را نشان دادند.

در مورد بیماری‌زایی جدایه‌های *F. culmorum* اطلاعات کمی وجود دارد. بیماری‌زایی ۷۵ جدایه *F. culmorum* جمع آوری شده از مناطق مختلف دنیا مقایسه شده که از نظر شدت بیماری‌زایی اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌های مناطق مختلف

کشت‌های PDA (Potato Dextrose Agar) و PPA (Peptone PCNB Agar) کشت و در ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی به مدت ۵-۷ روز نگهداری گردیدند. برای خالص سازی گونه های قارچی به دست آمده، همه جدایه ها تک اسپور شده و دوباره روی PDA، SNA (Synthetic Nutrient-poor Agar) و CLA (Carnation-leaf Agar) کشت شدند (Leslie and Summerell, 2006). محیط کشت‌های PDA در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و محیط کشت‌های CLA و SNA در ۲۵ درجه سلسیوس زیر نور نزدیک فرابنفش به مدت ۴-۱ هفته نگهداری شدند. مرفولوژی و رنگ پرگنه هر جدایه از روی محیط کشت PDA یادداشت گردید. ویژگی‌های مورفولوژی هر یک از جدایه‌ها همچون اندازه ماکروکنیدیوم ها، میکروکنیدیوم‌ها، یاخته‌های کنیدی زا و کلامیدوسپورها با استفاده از کشت‌های رشد یافته در CLA و SNA بررسی شد. گونه‌های فوزاریوم بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی توصیف شده (Leslie and Summerell, 2006) شناسایی شدند. برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌ها از روش به کار رفته توسط Scott and Chakraborty (2010) استفاده گردید. ۴۹ جدایه *F. culmorum* که بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی تشخیص داده شده بودند، برای مطالعات تنوع ژنتیکی و بیماریزایی انتخاب گردیدند.

#### استخراج DNA و شناسایی مولکولی جدایه‌ها: DNA

جدایه‌ها با استفاده از روش (Möller et al., 1992) استخراج و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. تأیید مولکولی جدایه‌های *F. culmorum* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی *F. culmorum* Fc OIR/ Fc OIR (Nicholson et al., 1998) انجام شد. غلظت‌های محلول واکنش و چرخه حرارتی PCR نیز مطابق توصیف (Akinsanmi et al., 2004) انجام گرفت.

#### واکنش زنجیره پلی‌مراز: ۴۹ جدایه *F. culmorum* بدست

آمده از مناطق مختلف جغرافیایی شهرستان ورامین با استفاده از هشت مارکر SSR (جدول ۱) تعیین ژنوتیپ شدند

مشاهده شده است (Mishra et al., 2003). بین جدایه‌های *F. culmorum* منطقه ورامین نیز مقایسه بیماریزایی شده است (Pouzeshimiab et al., 2012).

هدف از این بررسی تعیین میزان تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های *F. culmorum* جمع آوری شده از مزارع گندم سه بخش ورامین، شناسایی هاپلو تیپ غالب چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی در داخل و بین جمعیت‌ها بود که به این منظور از مارکرهای SSR، طراحی شده (Giraud et al., 2002) استفاده شد. هدف از مقایسه بیماریزایی جدایه‌ها، شناسایی جدایه‌هایی با قدرت تهاجمی بالا بود که در تحقیقات آتی بتوان از آنها در جهت شناسایی منابع مقاومت به بیماری پوسیدگی ناشی از *F. culmorum* در منطقه ورامین استفاده نمود.

#### روش بررسی

##### نمونه برداری: این بررسی در طول فصل زارعی

۹۱-۱۳۹۰ در سه بخش مرکزی (ورامین)، جواد آباد و پیشوا شهرستان ورامین انجام شد. مزارع گندم در مرحله رسیدن گندم به صورت تصادفی به فاصله تقریباً ۱۵ کیلومتری از هم انتخاب شدند. در هر مزرعه به صورت زیگزاگ، از پنج نقطه به فاصله ۱۰۰ متر از همدیگر، نمونه برداری گردید. در هر نقطه، گیاهانی که علائم سفید شدن سنبله را نشان می دادند، جمع آوری و به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی، بخش تحقیقات بیماری های گیاهی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور منتقل و در آزمایشگاه، یک بخش از بافت آلوده طوقه و زیر طوقه جدا و تا زمان جداسازی قارچ، در پاکت‌های کاغذی، در چهار درجه سلسیوس نگهداری شد.

##### شناسایی مورفولوژیکی گونه های *Fusarium* نمونه‌های

جمع آوری شده زیر آب شیر شستشو شده و سپس دو قطعه از بافت آلوده طوقه و ریشه جدا شد. این قطعات در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۳ دقیقه ضد عفونی سطحی شده و سپس دو بار با آب مقطر سترون آبشویی و روی کاغذ صافی سترون خشک شدند. قطعات روی محیط

هتروزیگوتی قابل انتظار کل (Ht) و تخمین جریان ژنی (Nm) محاسبه گردید.

#### تجزیه تحلیل واریانس مولکولی (Analysis of

**Molecular Variance**): به منظور ارزیابی میزان اختلاف جمعیت‌ها، آنالیز واریانس مولکولی، با استفاده از نرم افزار Peakall GenAIEx and Smouse (2012) انجام شد. میزان اختلاف بین جمعیت‌ها و تنوع ژنتیکی داخل و بین جمعیت‌ها با استفاده از GenAIEx تعیین کیفی شد. ارزش  $\Phi_{PT}$  (analogue of FST fixation index) برای تنوع ژنتیکی و درصد چند شکلی ژنگاه‌ها (P) برای هر جمعیت با استفاده از GenALEX محاسبه شد. جریان ژنی نسبی بین جمعیت‌ها به وسیله  $N_m = [(1/\Phi_{PT}) - 1] / 2$ ، در نرم افزار POPGEN تخمین زده شد. به علاوه، تشابه ژنتیکی و فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار POPGEN، محاسبه شد.

#### قربت ژنتیکی جدایه‌ها: ماتریس همانندی از (۰،۱)

ایجاد گردید و این اطلاعات در ضریب Nei and Li (1979) استفاده شد و دندروگرام با روش UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages) با استفاده از نرم افزار NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 2000) بازسازی شد.

**مقایسه بیماری‌زایی:** آزمایش در شرایط گلخانه‌ای بر اساس طرح کاملاً تصادفی با داده‌های چند مشاهده‌ای با سه تکرار و چهار مشاهده در هر واحد آزمایشی صورت گرفت. تمام جدایه‌های *F. culmorum* بدست آمده از سه بخش شهرستان ورامین برای مقایسه قدرت بیماری‌زایی آنها، مورد آزمایش قرار گرفتند. ابتدا جدایه‌ها در محیط SNA حاوی سه تکه کاغذ واتمن به ابعاد  $1 \times 1$  سانتی‌متر، کشت و در ۲۵ درجه سلسیوس و زیر نور نزدیک فرابنفش به مدت دو هفته نگهداری شدند. اسپوردوکیوم‌های تولید شده در اطراف این کاغذها را برداشته و سوسپانسیون از این اسپورها با آب مقطر سترون تهیه شد. تعداد اسپور در واحد حجم با لام هموسیستمتر شمارش شد و نهایتاً تعداد  $10^7$  کنیدیوم در میلی لیتر از این سوسپانسیون برای هر جدایه تهیه شد. هنگام

(Giraud et al. 2002). غلظت‌های محلول واکنش و چرخه حرارتی PCR نیز مطابق روش Giraud et al. (2002) انجام گرفت. دمای جفت شدن بسته به نوع آغازگرها انتخاب شد (جدول ۱). الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده همراه با ۵ میکرولیتر نشانگر استاندارد DNA فز لاامبدا (100bp Ladder Plus) روی ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد به مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۲۰۰ ولت انجام شد. جهت مشاهده قطعات DNA در ژل، رنگ آمیزی نیترات نقره با روش کمی تغییر یافته (An et al. 2010) انجام گردید. اندازه قطعات تکثیر یافته توسط هر جفت آغازگر با استفاده از برنامه GEL v2/17/89 (Thompson, 1989) محاسبه شد. قطعات با وزن مولکولی مختلف به عنوان آلل‌های مختلف برای هر ژنگاه در نظر گرفته شدند. برای جدایه‌هایی که هیچ فرآورده‌ای تولید نکردند، آلل نول (null) منظور شد (شکل ۲).

#### آنالیز تنوع ژنتیکی: قطعات تکثیر یافته به صورت دستی

نمره دهی شد (۱) برای وجود باند و (۰) برای عدم وجود آن، و ماتریکس دو تایی ایجاد و برای آنالیز استفاده گردید. قطعات با وزن مولکولی یکسان به عنوان یک ژنگاه در نظر گرفته شد و داده‌ها برای آنالیز آماری ترکیب شدند. برای تعیین تعداد ژنوتیپ‌ها با ژنگاه‌های جداگانه (Multi Locus Genotypes) از نرم افزار GENCLONE v2.0 استفاده گردید (Arnaud-Haond and Belkhir, 2007). تعداد آلل‌های مختلف هر ژنگاه داخل هر مکان و داخل کل جمعیت‌ها محاسبه شد. تنوع ژنی جمعیت با استفاده از فرمول Nei (1973) تخمین زده شد.

$$h = 1 - \sum_i P_i^2$$

در تخمین ژنی هر ژنگاه، صفرها (بدون باند) هم برای همان آلل در نظر گرفته شد. تنوع ژنی جزء به جزء جمعیت‌ها هم (Nei, 1987) با استفاده از نرم افزار POPGENE v1.31 انجام شد (Yeh et al. 2000). در POPGENE ضریب تأثیر اختلاف ژنی (Gst)، میانگین هتروزیگوتی داخل جمعیت (Hs)،

ورامین (بخش‌های مرکزی، جواد آباد و پیشوا هرکدام به ترتیب با ۱۲، ۱۹ و ۱۸ جدایه) برای بررسی تنوع ژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۲).

تعداد آل‌های تکثیر شده هر ژنگاه بین ۲ (F7) تا ۶ (F10) آل و میانگین آن‌ها ۳/۷۵ آل بود و اندازه قطعات بین (bp) ۱۰۵-۳۶۰ بود (جدول ۱). در کل ۳۰ آل در بین هشت ژنگاه آنالیز شده SSR شناسایی شد. درصد چند شکلی ژنگاه در بین جمعیت‌های تمام بخش‌های شهرستان ورامین ۱۰۰ درصد بود (جدول ۲). بین ۴۹ جدایه، ۴۴ ژنوتیپ چند ژنگاه مختلف مشخص شد (MLG) که از این تعداد ۱۷، ۱۷ و ۱۰ ژنوتیپ به ترتیب به بخش‌های پیشوا، جواد آباد و ورامین متعلق بودند. در جمعیت‌های بخش پیشوا دو جدایه (P11 با V11) متعلق به هاپلوتیپ مشابه بودند و در بخش‌های جواد آباد و ورامین جفت جدایه‌های J18 با J3، J15 با V4، V9 با V3 و V1 با J19 متعلق به هاپلوتیپ‌های مشابه بودند (جدول ۲). بیشترین تعداد آل‌های مؤثر، شاخص شانون و تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های جواد آباد و کمترین آن در بین جدایه‌های پیشوا مشاهده شد. میانگین تنوع جمعیتی (۰/۵۲۸) و شاخص شانون (۰/۹۲۴) برای کل جمعیت‌ها بالا بود (جدول ۲). تنوع ژنی در یکایک جمعیت‌ها مشخص شد و بیشترین هتروزیگوتی کل (Ht) در ژنگاه F10 و کمترین آن در ژنگاه F9 مشاهده گردید. میانگین تنوع ژنی در بین کل جمعیت‌ها (Ht) ۰/۵۶۴۱ بود که مقدار ۰/۵۲۸۱ آن داخل جمعیت‌های بخش‌ها (Hs) اتفاق افتاده بود (جدول ۳).

آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که ۹۷ درصد تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها و ۳ درصد تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های بخش‌ها توزیع شده بود (جدول ۴) و ارزش  $\Phi_{PT}$  (۰/۲۱)  $P=0/219$ ، برای تنوع ژنتیکی، معنی‌دار بود. به عبارتی تفاوت معنی‌داری از لحاظ ژنتیکی در داخل جمعیت‌های سه بخش وجود داشت (جدول ۴).

آغشته کردن بذور، غلظت ۰/۱ درصد توئین ۲۰، به این سوسپانسیون اضافه شد. بذور گندم رقم بولانی برای این آزمایش انتخاب شد و در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و سه بار با آب مقطر سترون، آب شویی شد. چهار بذر گندم در داخل پتری به سوسپانسیون کنیدیوم هر جدایه اضافه شد و بعد از ۲-۱ دقیقه در داخل گلدان به قطر ۲ سانتی‌متر حاوی خاک پاستوریزه، کشت و به مدت پنج هفته در گلخانه با شرایط دمایی  $22 \pm 2$  درجه سلسیوس و نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری گردیدند. برای مقایسه قدرت تهاجمی جدایه‌ها ابتدا بر اساس میزان تغییر رنگ ساقه از طوقه تا اولین گره و با استناد به مقیاس ارائه شده توسط (Gargouri-Kammoun et al. 2009) ارزیابی شدند. برای تعیین وزن خشک بوته‌ها به دو بخش ریشه و اندام هوایی تقسیم و در آن ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد، سپس توزین نمونه‌ها با ترازوی Sartorius مدل GC-16035-OCE با دقت ۰/۰۰۰۱ انجام گرفت. تجزیه داده‌های حاصل از سه فاکتور اندازه‌گیری، وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه و شدت بیماری در نرم افزار SPSS v.20 انجام گردید.

## نتیجه و بحث

**شناسایی مولکولی جدایه‌ها:** پس از انجام الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد باندهایی به وزن ۵۷۰ جفت باز (bp) مربوط به *F. culmorum* تشکیل گردید، که با نتایج بدست آمده توسط (Akinsanmi et al. 2004) همخوانی داشت (شکل ۱). نتایج حاصله تأییدی بر شناسایی مرفولوژیکی تمام جدایه‌های *F. culmorum* بود.

**آنالیز تنوع ژنوتیپی:** از مجموع ۱۷۶ جدایه قارچی به دست آمده از شهرستان ورامین، ۷۵ جدایه با استفاده از ویژگی‌های مرفولوژیکی و مولکولی به عنوان *F. culmorum* شناسایی شد. از تعداد ۷۵ جدایه *F. culmorum*، ۴۹ جدایه که نماینده‌های مکان‌های مختلف کشت گندم در شهرستان

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای استفاده شده در هشت ژنگاه ریز ماهواره‌ای برای ۴۹ جدایه *Fusarium culmorum* در شهرستان ورامین

**Table 1.** Primer information of eight microsatellite loci among the 49 isolates of *Fusarium culmorum* in Varamin

تعداد آلل Number of alleles	دمای اتصال Annealing temp.(°C)	اندازه باند Size (bp)	توالی آغازگر (۵'–۳') Primer sequences (5'–3')	واحد تکرار شونده Repeat motif	آغازگر Primer
3	51	175-200	GAC AAG CAA GCG ATA GGA AA CTT GAT AGC ACG GAC CGA CG	(TG)8	<b>F1</b>
4	53	190-210	CAT ATT CAA CCG ACC CAC AA TTG AAT GAT AAG GGC GAC GG	(CA)11	<b>F3</b>
4	53	110-145	CTT TTT CCC GGC TCC ATT TT GCT TTC CCT GCT CGA TCG GG	(GT)11	<b>F4</b>
4	51	105-140	TAT TTC GTG CAA GGA CTT GG CTT GGT CCC TGG ATA TCG AA	(AC)15	<b>F6</b>
2	52	215-245	TGA CAA GCA AGC GAT AGG AA GAG TGG AGT TTC GAT ATC GC	(GT)7	<b>F7</b>
3	50	150-210	CGA GCT AAT GGT GGC AGG AT AAC ACC AAA ACG GCT CAT CG	(AC)13	<b>F9</b>
6	55	110-205	AAG CGC CAA CAG AGA TGA CGA GAC TGC CGA AAC ACC GAA A	(AAG)28	<b>F10</b>
4	52	280-360	CAG TCT TGG TCG CTC ATC AG CAG GTT GGC ACG CTT CTT AA	(GT)9	<b>F11</b>

جدول ۲- تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مزارع در سه بخش از شهرستان ورامین شامل: تعداد ژنوتیپ‌های چند ژنگاه، چند شکلی جدایه‌ها،

میانگین و SE کل ژنگاه‌ها برای هر یک از جمعیت‌ها و میانگین و SE کل ژنگاه‌ها و جمعیت‌ها

**Table 2.** Genetic diversity of field populations of *Fusarium culmorum* in three parts of Varamin including: MLG, polymorphic loci, Mean and SE over loci for each population and Grand Mean and SE over Loci and populations

Uh	h	I	Ne	Na	P %	MLG	N	Pop
0.525	0.495	0.868	2.222	3.250	Mean	100	17	<b>Pishva</b>
0.072	0.068	0.139	0.271	0.491	SE			
0.606	0.574	1.009	2.613	3.500	Mean	100	17	<b>Javad-abad</b>
0.051	0.048	0.114	0.369	0.327	SE			
0.563	0.515	0.893	2.381	3.125	Mean	100	10	<b>Varamin</b>
0.074	0.068	0.143	0.345	0.479	SE			
0.565	0.528	0.924	2.405	3.292	Mean	100	44	<b>Total</b>
.037	.035	.074	0.186	0.244				<b>St. Dev</b>

N: تعداد جدایه‌ها؛ MLG: تعداد ژنوتیپ‌های چند ژنگاه قابل تشخیص؛ P%: درصد چند شکلی ژنگاه‌ها؛ Na: تعداد آلل‌ها؛ Ne: تعداد آلل مؤثر  
( $Ne = 1 / (\sum_{i=1}^n Pi^2)$ )؛ ضریب شاخص شانون  $I = -1 * \sum (pi * Ln (pi))$ ؛ تنوع ژنتیکی  $h = 1 - \sum_{i=1}^n Pi^2$ ؛ که فراوانی i امین آلل برای جمعیت و  
 $\sum_{i=1}^n Pi^2$  جمع مربع فراوانی آللی جمعیت است، Uh: تنوع نارایب  $Uh = (N / (N-1)) * h$ .

N: Number of isolates, Number of distinct multilocus genotypes (MLG) detected, P%: Percentage of polymorphic loci Na: Number. of different alleles, Ne: Number of effective alleles =  $1 / \sum_{i=1}^n Pi^2$ ), I: Shannon's information index =  $-1 * \sum (pi * Ln (pi))$ , h: Diversity =  $1 - \sum_{i=1}^n Pi^2$ , Where pi is the frequency of the allele for the population and  $\sum_{i=1}^n Pi^2$  is the sum of the squared population allele frequencies. Uh: Unbiased Diversity =  $(N / (N-1)) * h$ .

۳) و جدایه‌های هر بخش در هر پنج گروه قرار داشتند. گروه B با ۱۶ جدایه بیشترین تعداد را داشت، که از این تعداد ۸ جدایه متعلق به پیشوا، ۵ جدایه متعلق به جواد آباد و ۳ جدایه متعلق به ورامین بود. خوشه بندی جدایه‌ها بر اساس اطلاعات SSR یک الگوی تنوع ژنتیکی را نشان داد ولی به مقدار کمی به مناطق جغرافیایی جدایه‌ها مربوط بود.

ارزیابی اولیه Nei از تشابه ژنتیکی و فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) نشان داد که بیشترین تشابه ژنتیکی بین جدایه های پیشوا و جواد آباد بود (۰/۹۳۶۱) و بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۶۴۷) را جمعیت‌های جوادآباد و ورامین داشتند (جدول ۵).

جدول ۴- آنالیز واریانس مولکولی جدایه‌های *Fusarium culmorum*

گندم ورامین

**Table 4.** Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Fusarium culmorum* isolates of Varamin

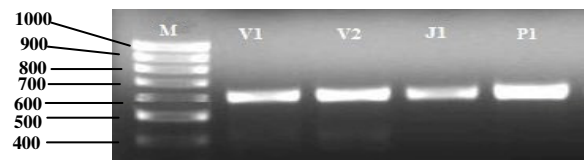
Source	Df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	2	6.430	3.215	0.065	3%
Within Pops	46	104.105	2.263	2.263	97%
Total	48	110.535		2.328	100%
Stat	Value	P(rand >= data)			
$\Phi_{PT}$	0.021	0.219			

AP = Est. Var. راهنما:  $\Phi_{PT} = AP / (WP + AP) = AP / TOT$

Among Pops، WP = Est. Var. Within Pops، احتمال شاخص ثابت، که به طور معنی‌داری بیشتر از صفر می‌شود.

$\Phi_{PT} = AP / (WP + AP) = AP / TOT$ , Key: AP = Est. Var.

Among Pops، WP = Est. Var. Within Pops probability of the fixative index, being significantly greater than 0.



شکل ۱- الگوی بانندی تکثیر شده برای جدایه‌های *Fusarium*

*culmorum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه. M نشانگر ۱۰۰ bp به عنوان نردبان ژنومی، V، J و P به ترتیب مربوط به جدایه‌های ورامین، جواد آباد و پیشوا

**Fig. 1.** Identity of putative *Fusarium culmorum* isolates by PCR amplification with the *F. culmorum* specific primer pairs. V, J and p: Varamin, Javad-abad and Pishva respectively; M, 100-bp Ladder as the DNA size marker

جدول ۳- آنالیز تنوع ژنی Nei در یکایک جمعیت‌ها

**Table 3.** Nei's analysis of gene diversity in subdivided populations

Nm*	Gst	Hs	Ht	Sample Size	Locus
12.1922	0.0394	0.5119	0.5329	49	F1
11.6808	0.0410	0.5353	0.5582	46	F 3
2.9298	0.1458	0.4927	0.5768	48	F 4
3.1536	0.1369	0.4790	0.5549	47	F 6
7.6195	0.0616	0.4691	0.4999	49	F7
18.0771	0.0269	0.3198	0.3287	48	F 9
15.0616	0.032	0.7541	0.7791	48	F 10
16.6284	0.0292	0.6627	0.6826	49	F 11
7.3210	0.0639	0.5281	0.5641	48	Mean
		0.0171	0.0173		St. Dev

Ht: هتروزیگوتی کل قابل انتظار؛ Hs: میانگین هتروزیگوتی داخل

جمعیت؛ Gst: G-statistics =  $H_T - H_S/H_T$ ; Nm: تخمین جریان ژنی

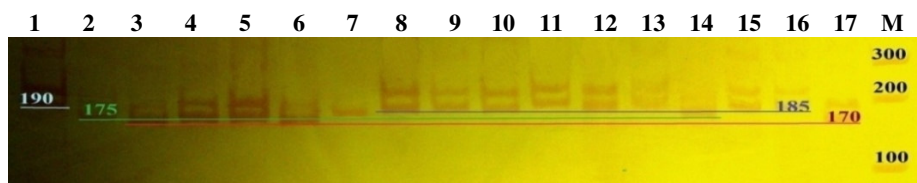
از طریق Gst، به عنوان مثال  $(Nm = 0.5(1 - Gst)/Gst)$ .

HT: Total expected heterozygosity; Hs: Average within population heterozygosity; Gst: G-statistics =  $H_T - H_S/H_T$ ; Nm = estimate of gene flow from Gst. E.g.,  $Nm = 0.5(1 - Gst)/Gst$ .

فاصله و تشابه ژنتیکی جدایه‌ها: نتایج تجزیه خوشه‌ای

نشان داد که جدایه‌ها در پنج گروه اصلی قرار داشتند. گروه‌های

A تا E به ترتیب دارای ۱۳، ۱۶، ۹، ۶ و ۵ جدایه بودند (شکل



شکل ۲- نمایش چند شکلی DNA در بین ۱۷ جدایه *Fusarium culmorum* که توسط جفت آغازگر F10 ریزماهوره تکثیر شده است.

چاهک‌های شماره ۱-۶ از پیشوا؛ ۷-۱۲ از جواد آباد؛ ۱۳-۱۷ از ورامین؛ M نشانگر ۱۰۰ bp بعنوان نردبان ژنومی

**Fig. 2.** Representative DNA polymorphism among 17 isolates of *Fusarium culmorum* detected by microsatellite primer pair F10.

Lanes: isolates 1-6 of Pishva; 7-12 of Javad-abad; 13-17 of Varamin; M, 100-bp Ladder as the DNA size marker

گرفت. نتایج نشان داد که سطح بالایی از تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها (۰/۵۲۸) بود و اینکه همه هشت ژنگاه در بین ۴۹ جدایه دارای چند شکلی بودند (جدول ۲). این سطح بالای تنوع ژنتیکی مشابه مطالعات (Gürel et al. 2010) بود که در بین ۱۴ جدایه *F. culmorum* که از مناطق مختلف ترکیه جمع آوری شده بود، تنوع ژنتیکی بالایی را پیدا کردند.

در این مطالعه چند شکلی آلل برای هشت ژنگاه، بین ۲-۶ آلل برای هر ژنگاه بود (جدول ۱). این چند شکلی تقریباً با تحقیق (Giraud et al. 2002) همسان بود که چند شکلی را در هشت ژنگاه ریز ماهواره با تعداد ۲-۶ آلل برای هر ژنگاه گزارش کردند. از آنجایی که میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریز ماهواره، مناسب بودن هر ژنگاه را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (Röder et al. 1998)، بنابراین، آغازگرهایی با تعداد آلل بیشتر برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب‌تر می‌باشند. بیشترین تعداد آلل در ژنگاه F10 با ۶ آلل یافت شد (جدول ۱)، که با تحقیق (Giraud et al. 2002) که ۹ آلل را در این ژنگاه پیدا کردند، تقریباً همخوانی داشت. این ژنگاه که بیشترین (۰/۷۷۹۱، جدول ۳) تنوع ژنوتیپی را در بین نشانگرها نشان داد به علت بالا بودن آلل‌ها و پایین بودن فراوانی آلل قابلیت تفکیک بهتری دارد. چند شکلی تعدادی از آلل‌ها در ژنگاه F4 و F6 به علت یک یا دو نوکلئوتید بود. ۱-۲ bp اختلاف بین آللی ممکن است به دلیل داخل شدن یا حذف نوکلئوتید در طول نسخه برداری از DNA صورت بگیرد (Razavi and Hughes, 2004). در این مطالعه، بعضی از آغازگرها در بعضی از جدایه‌های *F. culmorum* هیچ محصولی نداشتند. در بعضی موارد جهش در مکان‌های اتصال آغازگر، باعث عدم تکثیر قطعات DNA می‌گردد (Owen et al. 1998).

آنالیز واریانس مولکولی جدایه‌ها نشان داد که ۹۷ درصد تنوع در داخل جمعیت‌ها بوده و تنها ۳ درصد در بین جمعیت‌ها توزیع شده بود (جدول ۴).

جدول ۵- برآورد اصلی Nei از تشابه ژنتیکی (اعداد بالای ستاره‌ها) و فاصله ژنتیکی (اعداد پایین ستاره‌ها) جدایه‌های *Fusarium culmorum* در سه بخش شهرستان ورامین

**Table 5.** Nei's original measures of genetic identity (above diagonal) and genetic distance *Fusarium culmorum* isolates in three district of Varamin (below diagonal)

Varamin	Javad-abad	Pishva	Pop.ID
0.8769	0.9361	****	Pishva
0.8481	****	0.0661	Javad-abad
****	0.1647	0.1314	Varamin

### ارزیابی بیماریزایی جدایه‌ها: تجزیه واریانس بیماریزایی

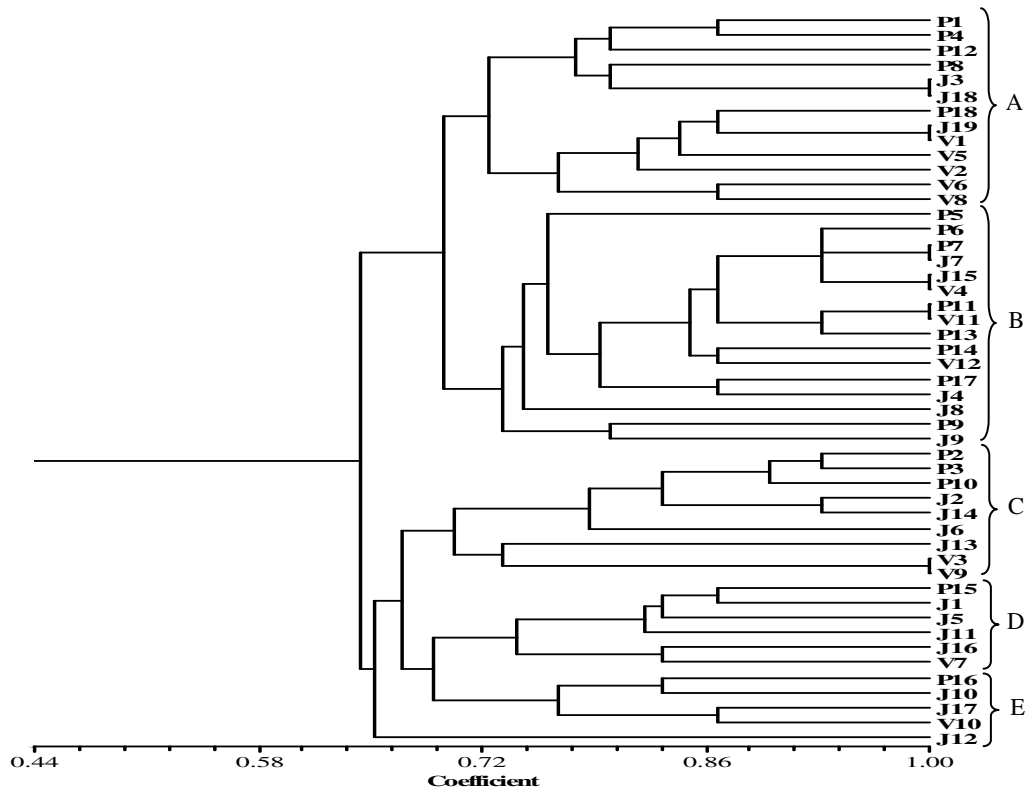
تمام جدایه‌های هر سه بخش شهرستان ورامین در مورد فاکتورهای رشدی گیاه (وزن خشک ریشه و ساقه و شدت بیماری) معنی دار بودن هر سه فاکتور را در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد (جدول ۶). مقایسه بیماریزایی در بین جدایه‌های بخش‌های مختلف نشان داد که در هر سه فاکتور، صفات مورد اندازه‌گیری اکثر جدایه‌های مربوط به ورامین بیماریزایی بالاتری داشتند. به طوریکه در بین جدایه‌های این بخش‌ها، اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۷).

مقایسه میانگین‌های بیماری‌زایی بر اساس آزمون دانکن (Duncan's test) در سطح احتمال ۵ درصد، در سه فاکتور مورد آزمون در کلیه جدایه‌ها نشان داد که جدایه‌های J14، J15 و J16 از بخش جواد آباد، جدایه‌های P1، P3 و P9 از بخش پیشوا و جدایه‌های V2 و V5 از بخش ورامین بیماریزایی بالاتری دارند (جدول ۷).

نتایج تجزیه خوشه‌بندی بر اساس بیماری‌زایی پنج گروه نشان داد که گروه B با ۲۹ جدایه بیشترین و گروه D با ۲ جدایه کمترین تعداد را داشت. یک الگوی تنوع بیماریزایی در این خوشه‌بندی مشاهده گردید، ولی همانند گروه بندی مولکولی کمتر به مناطق جغرافیایی مربوط بود (شکل ۴).

در این بررسی هشت مارکر تک ژنگاهی ریز ماهواره‌ای برای مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *F. culmorum* جمع آوری شده از سه بخش شهرستان ورامین مورد استفاده قرار





شکل ۳- گروه بندی ۴۹ جدایه *F. culmorum* بر اساس داده‌های ریز ماهواره با روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه Nei and Li

Fig. 3. UPGMA analysis of isolates of 49 *F. culmorum* isolates based on combined SSR data by UPGMA and using Nei and Li's similarity coefficient

جدول ۶- آنالیز واریانس (ANOVA) شدت بیماری، وزن خشک ریشه و وزن خشک اندام‌های هوایی رقم بولانی مربوط به ۴۹ جدایه *Fusarium culmorum*

Table 6. Analysis of variation (ANOVA) of disease severity, root dry weight and foliage dry weight of Bolani cultivar inoculated for 49 isolates of *Fusarium culmorum*

	منابع تغییرات (C.O.V)	میانگین مربعات Mean Square	درجه آزادی (df)	F test
شدت بیماری <sup>۱</sup> disease severity	تیمار Treatment	1.480	49	4.513*
	خطا Error	.328	106	
وزن خشک ریشه <sup>۲</sup> dry root weight	تیمار Treatment	.002	49	4.744*
	خطا Error	.000	106	
وزن خشک اندام‌های هوایی <sup>۳</sup> dry shoot weight	تیمار Treatment	.020	49	3.838*
	خطا Error	.005	106	

<sup>۱</sup>C.V.: 40/68      <sup>۲</sup>C.V.: 33/22      <sup>۳</sup>C.V.: 29/93

\* Significant difference at 1% level \*

اختلاف معنی دار در سطح ۱٪

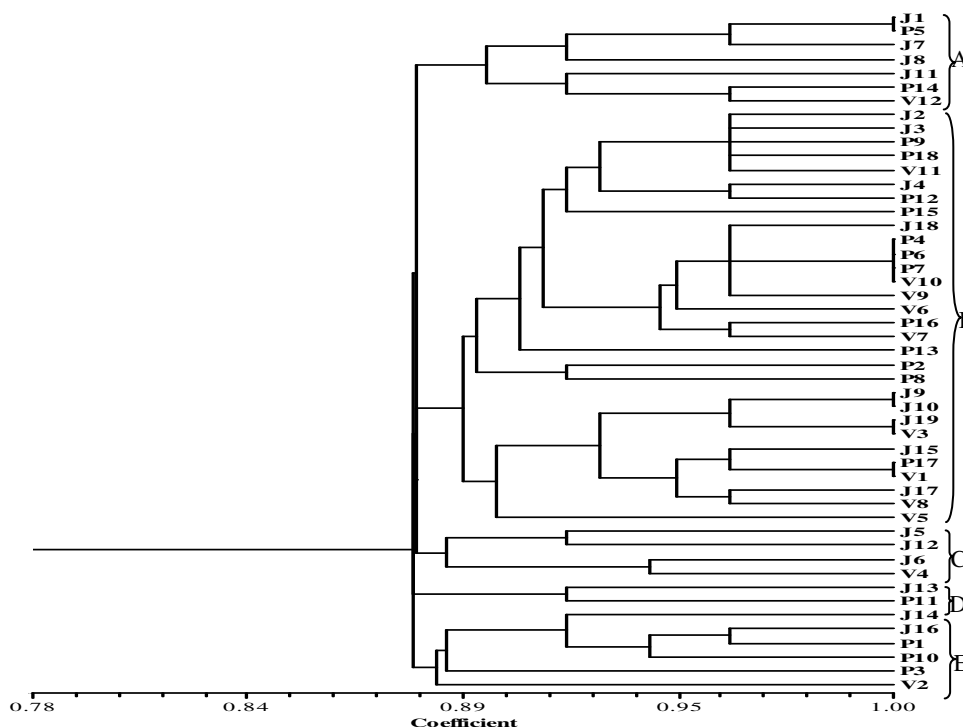
جدول ۷- مقایسه میانگین شدت بیماری رقم بولانی مایه زنی شده با جدایه‌های مختلف *Fusarium culmorum* جمع آوری شده از سه بخش ورامین بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪

**Table 7.** Comparison of means of disease severity of Bolani cultivar inoculated with *Fusarium culmorum* isolates of three districts of Varamin based on Duncan's test at 5% probability level

جدایه Isolate <sup>a</sup>	میانگین شاخص بیماریزایی Pathogenicity Index	گروه بیماریزا Pathotype group
P3	3.2200	a
P9, J14	2.9700	ab
V2	2.8333	abc
P1, J16	2.7767	abcd
V5	2.6667	abcde
P15	2.6100	abvdef
V6, V11, J15	2.5533-2.4967	abcdefg
V1, P17, J17, J9, V8, J19, J10, V3, P10	2.3600-2.0833	abcdefgh
J6, V10, P18, P6, P4, P16, P12, V7, J18, V4, V9, P7, J4	2.0533-1.8300	bcdefghi
P11, J13, J3	1.7500	cdefghi
P5, J8, J7	1.6667	defghi
P14, J1	1.5533	efghi
P13, V12	1.5000-1.4700	fghi
P8, J2, P2	1.3867-1.2200	ghi
J12, J6	1.2200	hi
J11	0.9167	ij
Check	0.0000	j

<sup>a</sup>; P, J, V: Pishva, Javad-abad, Varamin districts, respectively

P, J, V به ترتیب بخش‌های پیشوا، جواد آباد و ورامین



شکل ۴- گروه بندی ۴۹ جدایه *F. culmorum* بر اساس بیماریزایی با روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه Nei and Li

**Fig. 4.** UPGMA analysis of isolates of 49 *F. culmorum* isolates based on pathogenicity data by UPGMA and using Nei and Li's similarity coefficient

و ترکیبات ژنی تازه را در جمعیت باعث شود. در خصوص جمعیت‌های *F. culmorum* سه بخش شهرستان ورامین جریان ژنی بالایی (۷/۳۲۱، جدول ۳) مشاهده شد، اما اینکه این جریان ژنی نتیجه نوترکیبی ژنتیکی است یا جریان ژنوتیپی، یا تنها تبادل کل ژنوتیپ‌ها می‌باشد، مشخص نیست (Scott and Chakraborty, 2010).

قارچ *F. culmorum* بذرزاد است (Polley and Turner, 1995) و گیاهان دیگر هم میزبان این قارچ می‌باشند و به این صورت در بخش‌های مختلف شهرستان ورامین پخش می‌شود، و این می‌تواند، تشابه ژنتیکی بالای بین بخش‌های جوادآباد و پیشوا را توجیه کند (جدول ۵).

مقایسه میانگین بیماریزایی جدایه‌های *F. culmorum* در سه بخش شهرستان ورامین نشان داد که، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌های بخش ورامین از دیگر بخش‌ها وجود دارد. همچنین در گروه بندی مولکولی نیز، تعداد بیشتری از جدایه‌های ورامین (جدایه‌های V1، V2، V5، V6 و V8) در گروه جداگانه (A) قرار داشتند (شکل ۳) و اینکه تمام جدایه‌های مذکور، دارای بیماریزایی بالایی بودند (جدول ۷). از آنجایی که در بررسی ژنوتیپی و بیماریزایی، جدایه‌های ورامین از دو بخش دیگر جدا شدند (جدول ۷)، این نتیجه احتمال وقوع ژنوتیپ‌هایی با بیماریزایی بیشتر را در بخش ورامین، تقویت می‌کند.

نتایج مطالعه‌ای که توسط Miedaner et al. (2008) روی بیماری‌زایی جدایه‌های *F. graminearum* انجام شد نشان داد که، وقتی تلاقی دو جدایه با بیماریزایی بالا صورت می‌گیرد، نسبت به جدایه‌هایی که از نوترکیبی به وجود آمده‌اند، بیماری‌زایی بالاتری دارند. این نتایج پتانسیل بالای پاتوژن برای افزایش سطح بیماریزایی از طریق تلاقی جدایه‌ها، داخل منطقه جغرافیایی را نشان می‌دهد.

نتایج مقایسه گروه بندی مولکولی و بیماری‌زایی در کل جدایه‌ها، ارتباط ضعیفی بین تنوع بیماری‌زایی و مولکولی جدایه‌های *F. culmorum* را نشان داد. در مطالعه‌ای که توسط

پارامترهای ژنتیکی دیگری همچون شاخص اطلاعاتی شانون ( $I = 0.924$ ) نیز، وجود تنوع ژنی بالا را داخل ژنوتیپ‌ها نشان داد (جدول ۲).

قارچ *F. culmorum* هوموتالیک است و هیچ مرحله جنسی برای آن شناخته نشده است و آنالیزهای جمعیتی نشان می‌دهد که احتمالاً نوترکیبی یک بخش مهمی از چرخه زندگی قارچ است (Toth et al. 2004). منابع ممکن برای ایجاد تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌های *F. culmorum*، موتاسیون، نوترکیبی غیر جنسی توسط آناستوموز، اثرات رقابتی یا جریان ژنی می‌باشد (Miedaner et al. 2008). تنوع معنی‌دار ژنوتیپ بین جمعیت‌های مزارع و یا نسبت‌های جهشی بالا می‌تواند، بطور مشابه تنوع ژنتیکی بالا را نتیجه دهد، مخصوصاً اگر فشارهای انتخابی وجود نداشته باشند (Scott and Chakraborty, 2010). بنابراین تنوع ژنی بالا بین استرین‌ها می‌تواند همراه با جهش در محل‌های چسبیدن آغازگر، ترتیب مجدد (re-arrangements) بخش‌های کروموزومی یا فرآیندهای نوترکیبی در ژنوم قارچ‌ها باشد (Mishra et al. 2003). اینکه نقش کدامیک از موارد ذکر شده بالا در تنوع ژنتیکی این قارچ بارزتر است، با کشف تلمورف *F. culmorum* به آسانی می‌تواند با نوترکیبی جنسی توضیح داده شود (Miedaner et al. 2001).

بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۶۴۷) بین جدایه‌های بخش جواد آباد و ورامین بود (جدول ۵). از آنجاییکه فاصله جغرافیایی چندانی بین این بخش‌ها وجود ندارد، این نتایج وقوع ژنوتیپ‌های جدید را در این منطقه پیشنهاد می‌کند. خاکزاد بودن قارچ عامل بیماریزا و اینکه اصولاً قارچ‌های خاکزاد هر کدام جایگاه‌های اکولوژیکی خاصی را اشغال می‌کنند، دلیل این نتیجه‌گیری است و همچنین وقوع ژنوتیپ‌های تازه می‌تواند به دلیل فرآیندهای فیلوژئوگرافیک (Carbone, 2001)، یا افزایش کشت گندم (Hambleton, 2002)، و یا نتیجه حرکت *F. culmorum* از چند گیاه میزبان به داخل این محصول باشد. جریان ژنی وقتی اتفاق بیفتد، می‌تواند چند شکلی تازه

## References

- AKINSANMI, O. A., D. BACKHOUSE, S. SIMPFENDORFER and S. CHAKRABORTY, 2006. Pathogenic variation of *Fusarium* isolates associated with head blight of wheat in Australia. *Journal of Phytopathology* 154: 513–521.
- AKINSANMI, O. A., V. MITTER, S. SIMPFENDORFER, D. BACKHOUSE and S. CHAKRABORTY, 2004. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Australian Journal Agricultural Research* 55: 99–107.
- AN, Z. W., L. L. XIEM, H. CHENG, Y. ZHOU, Q. ZHANG, X. G. M. HE, H. S. HUANG, 2009. A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Analytical Biochemistry* 391: 77–79.
- ARNAUD-HAOND, S. and K. BELKHIR, 2007. Upgrade 2012. GENCLONE: A computer program to analyze genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* 7: 15–17.
- CARBONE, I. and L. M. KOHN, 2001. A microbial population species interface nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. *Molecular Ecology* 10: 947–967.
- DESJARDINS, A. E. 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- DYER, A. T., R. JOHNSTON, H. C. HOGG and J. A. JONSTON, 2009. Comparison of pathogenicity of the *Fusarium* crown rot (FCR) complex (*F. culmorum*, *F. pseudograminearum* and *F. graminearum*) on hard red spring and durum wheat. *European Journal Plant Pathology* 125: 387–395.
- GARGOURI-KAMMOUN, L., S. GARGOURI, S. REZGUI, M. TRIFI, N. BAHRI and M. R. HAJLAOUI, 2009. Pathogenicity and aggressiveness of *Fusarium* and *Microdochium* on wheat seedlings under controlled conditions. *Tunisian Journal of Plant Protection* 4: 135–144.
- Mishra *et al.* (2003) در ۷۵ جدایه *F. culmorum* جمع آوری شده از مناطق مختلف اروپا و استرالیا انجام شد، از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری بین تنوع مولکولی و بیماریزایی جدایه‌ها مشاهده نگردید. بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که بین دو خصوصیت مذکور از نظر مولکولی ارتباطی وجود ندارد. در خصوص مشخص نمودن هاپلوتیپ غالب مناطق، به دلیل تنوع زیاد جدایه‌های *F. culmorum* (۴۴ هاپلوتیپ مجزا در بین ۴۹ جدایه، جدول ۲)، امکان مشخص نمودن آن وجود نداشت. نتایج مطالعه Mishra *et al.* (2003) نشان داد که تنوع بالایی در جدایه‌های *F. culmorum* وجود دارد، بطوریکه در بین ۷۵ جدایه ۵۹ هاپلوتیپ مجزا مشخص گردید.
- در کل، همراه شدن شدت بیماریزایی با تنوع ژنوتیپی بالا در *F. culmorum*، نشان از پتانسیل بالای این قارچ در سازگار شدن با فشارهای انتخابی مختلف می‌باشد که بایستی در برنامه‌های اصلاحی مقاومت برای اطمینان از بقای مقاومت طولانی مدت ارقام و توسعه استراتژی‌های مدیریتی این بیماری در نظر گرفته شود. بنابراین، نظارت و ارزیابی دقیق جهت محدود کردن گسترش ژنوتیپ‌های جدید *F. culmorum* در مناطق جدید، بایستی انجام شود. ساختار آمیزشی *F. culmorum* و نقش نو ترکیبی در وقوع تنوع ژنتیکی هم، موضوع دیگری است که نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران که امکانات لازم جهت اجرای این پژوهش را فراهم نمودند، تشکر می‌شود. همچنین از زحمات آقایان مهندس ابوالقاسم قاسمی، دکتر حسن مومنی و سیروس کلانکی که در انجام این تحقیق مرا یاری کردند، قدردانی می‌گردد.

- GIRAUD, T., E. FOYRNIER, D. VAUTRIN, M. SOLIGNAC, E. VERCKEN, B. BAKAN and Y. BRYGOO, 2002. Isolation of eight polymorphic microsatellite loci using an enrichment protocol in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. *Molecular Ecology Notes* 2: 121-123.
- GÜREL, F., G. ALBAYRAK, O. DIKEN, E. ÇEPNI and B. TUANALI, 2010. Use of Rep-PCR for genetic diversity analyses in *Fusarium culmorum*. *Journal of Phytopathology* 92: 781-787.
- HAMBLETON, S., C. WALKER and L. M. KOHN, 2002. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24: 309-315.
- LESLIE, J. F. and B. A. SUMMERELL, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publish Ltd., UK, p 388.
- MIEDANER, T., C. J. R. CUMAGUN and S. CHAKRABORTY, 2008. Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology* 156: 129-139.
- MIEDANER, T., A. G. SCHILLING and H. H. GEIGER, 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.
- MISHRA, P. K., R. T. V. FOX and A. CULHAM, 2003. Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology* 143: 291-301.
- MÖLLER, E. M., G. BAHNWEIG, H. SANDERMANN and H. H. GEIGER, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20: 6115-6116.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 70: 3321-3323.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- NEI, M. and W. H. LI, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76: 5267-5273.
- NICHOLSON, P., D. R. SIMPSON, G. WINSTON, H. N. REZANOOR, A. K. LEES, D. W. PARRY and D. JOYCE, 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53: 17-37.
- NIJS, M., J. S. LARSE, W. GAM, F. M. RAMBOUS, K. WERMARS, U. THRANE and S. H. W. NOTERMANS, 1997. Variations in RAPD patterns and secondary metabolite profiles within *Fusarium* species from cereals from various parts of Netherlands. *Food Microbiology* 14: 449-457.
- OWEN, P. G., M. PEI, A. KARP, D. J. ROYLE and K. J. EDWARDS, 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* 7: 1611-1612.
- PEAKALL, R. and P. E. SMOUSE, 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- POLLEY, R. W. and J. A. TURNER, 1995. Surveys of stem base diseases and *Fusarium* ear diseases in winter wheat in England, Wales and Scotland, 1989-90. *Annals of Applied Biology* 126:45-49.
- POUZESHIMIAB, B., M. RAZAVI, R. ZAREH, H. R. ZAMANIZADEH, S. REZAEI, D. SAFAEE and J. NICOL, 2012. Taxonomy and distribution of *Fusarium* spp. associated with root and crown rot of wheat in Iran. 1st International Crown Rot Workshop for Wheat Improvement 85: 31.
- PUHALLA, J. E. 1981. Genetic considerations of the genus *Fusarium*. In *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* 291-305. Eds Nelson, P.E. Toussoun, T.A.

- Cook R. J. Pennsylvania, USA: The Pennsylvania State University Press.
- RAVANLOU, A. and Z. BANIHASHEMI, 1999. Taxonomy and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with root and crown rot of wheat in Fars Province. Iranian Journal of Plant Pathology 35: 37-45.
- RAZAVI, M. and G. R. HUGHES, 2004. Microsatellite markers provide evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan. Genome 47: 789-794.
- RÖDER, M. S., V. KORZUM, K. WENDEHAKE, J. PLASCHKE, M. H. TIXIER, P. LEROY and M. W. GANAL, 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics 149: 2007-2023.
- ROHLF, F. J. 2000. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, New York, USA.
- SAFAEE, D., H. YOUNESI and M. SHEIKHOLESLAMI, 2012. *Fusarium* species that root and crown rot and crown rot of wheat in Kermanshah province. Iranian Journal of Plant Pathology 2: 89-91.
- SAREMI, H., A. AMMARELLOU and H. JAFARY, 2007. Incidence of crown rot disease of wheat caused by *F. pseudograminearum* as a new soilborn fungal species in North West Iran. Pakistan Journal of Biological Science 10: 3606-3612.
- SCHERM, B., V. BALMAS, F. SPANU, G. PANI and G. DELOGU, 2013. *Fusarium culmorum*: the causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. Molecular Plant Pathology 14: 323-341.
- SCOTT, J. B. and S. CHAKRABORTY, 2010. Genotypic diversity in *Fusarium pseudograminearum* populations in Australian wheat fields. Plant Pathology 59: 338-347.
- SMILEY, R. W., J. A. GOURLIE, S. A. EASLEY and L. M. PATTERSON, 2005a. Pathogenicity of fungi associated with the wheat crown rot complex in Oregon and Washington. Plant Disease 89: 949-957.
- SMILEY, R. W., J. A. GOURLIE, S. A. EASLEY, L. M. PATTERSON and R. G. WHITTAKER, 2005b. Crop damage estimates for crown rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. Plant Disease 89: 595-604.
- THOMPSON, J. R. 1989. The program GEL ver. 2/17/89. 7105 Hana Rd., Edison, N.J.
- TOTH, B., A. MESTERHAZY, P. NICHOLSON, J. TEREK and J. VARGA, 2004. Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. European Journal of Plant Pathology 110: 587-599.
- YEH, F. C., R. YANG, T. J. BOYLE, Z. YE and J. M. XIYAN, 2000. POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada.