نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ص. ۲۱۴-۲۰۸

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 2, Summer 2013, P. 208-214

تعیین تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین و آنالیز ساختار جمعیت جدایه‌های *Fusarium graminearum* در استان گلستان

مصطفی عابدی تیزکی[۱]- سید کاظم صباغ[۲*]

تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۷/۱۶
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۱۲/۲۱

چکیده

فوزاریوز سنبله (Fusarium head blight: FHB) یا اسکب گندم یکی از بیماری‌های مخربی است که به دلیل تولید زهرابه قارچی تریکوتسین در خوشه، سبب کاهش قابل توجه کیفیت غلات کشت شده در سراسر جهان می‌شود. تیپ B تریکوتسین‌ها شامل نیوالنول (NIV)، دی اکسی نیوالنول (DON)، ۳-استیل دی اکسی نیوالنول (3-AcDON) و ۱۵-دی اکسی نیوالنول (15-AcDON) بعنوان مهمترین زهرابه‌های تولیدی جدایه‌های *Fusarium graminearum* محسوب می‌شود. به منظور تعیین تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین در جدایه‌های *F. graminearum*، در سال زراعی ۱۳۸۹-۱۳۸۸ از مناطق عمده کشت گندم در استان گلستان در دوره تشکیل و تکامل خوشه، نمونه‌برداری به عمل آمد. پس از شناسایی جدایه‌ها با استفاده از خصوصیات ریخت شناسی، تعداد ۱۰۰ جدایه با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی گونه (Fg16F/Fg16R) به عنوان گونه *F. graminearum* مورد تائید قرار گرفت. در این جدایه‌ها وجود ژن موثر در تولید تریکوتسین (*Tri7*) با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی (Tri7F/Tri7R) ردیابی شد. از بین ۱۰۰ جدایه بررسی شده در مناطق نمونه برداری شده، تعداد ۷۲ جدایه بعنوان تیپ تولیدکننده NIV و ۲۸ جدایه بعنوان تیپ تولیدکننده DON شناخته و همچنین دو جمعیت 7C1 و 6A5 شناسایی شد که جمعیت 7C1 (سویه ۷) بیشترین پراکنش را در مناطق نمونه برداری داشت.

واژه‌های کلیدی: ردیابی ژن *Tri7*، زهرابه‌های قارچی، NIV، DON

مقدمه

فوزاریوز سنبله (Fusarium head blight: FHB) یا اسکب گندم یکی از بیماری‌های مخربی است که هر ساله میلیون‌ها دلار خسارت به غلات کشت شده در سراسر جهان وارد می‌کند. ضررهای ناشی از این عوامل قارچی تنها به کاهش در تولید محصولات دامی و کشاورزی خلاصه نمی‌شود، بلکه با توجه به هزینه اجرایی برنامه‌های کنترلی مربوط به سموم قارچی، هزینه‌های عمومی کلانی را بر جامعه تحمیل می‌کند (۳۰). تاکنون ۲۱ گونه فوزاریوم از ۲۵ کشور جهان به طور مستند بعنوان عامل بیماری بلایت سنبله گندم گزارش شده است (۴ و ۲۱). قارچ *Fusarium graminearum* Schwabe (*Gibberella zea*) گونه غالب فوزاریوز سنبله گندم در جهان محسوب می‌شود. طبق آمار سازمان جهانی غذا (FAO) سالانه حدود ۲۵ درصد محصولات زراعی جهان توسط زهرابه‌های قارچی مختلف آلوده می‌شوند (۹). فوزاریوز سنبله، یکی از بیماری‌های مهم گندم در استان گلستان (بویژه گنبد و گرگان) و مازندران به شمار می‌رود (۱ و ۲). هر ساله به علت کشت ارقام حساس مانند تجن و شرایط مساعد جوی مناسب در این مناطق خسارات ناشی از این بیماری بسیار قابل توجه بوده است (۲). گونه‌های عامل بلایت سنبله گندم بویژه *F. graminearum* سهم مهمی در تولید زهرابه‌های قارچی و آلودگی غلات دارند. یکی از ویژگی‌های مهم این قارچ تولید زهرابه‌های مختلف خطرناکی از جمله تریکوتسین‌ها می‌باشد (۲۳). تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع تریکوتسین گزارش شده است که این زهرابه‌های قارچی بر اساس ساختمان شیمیایی به چهار تیپ عمده (A-D) تقسیم می‌شوند (۲۳). تیپ B تریکوتسین‌ها بواسطه گروه کتو در موقعیت کربن-۸ از تیپ A تریکوتسین تمییز داده می‌شود و یکی از خطرناکترین زهرابه‌هایی می‌باشد که برای انسان و دام مضر هستند. از این تیپ تریکوتسین‌ها می‌توان به دی اکسی نیوالنول (DON)، نیوالنول (NIV) و مشتقات استیلی آنها (۳- استیل دی

۱و۲- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی (بیوسنتر)، دانشگاه زابل
(*- نویسنده مسئول: Email: sk.sabbagh@uoz.ac.ir)

اکسی نیوالنول (3-AcDON)، ۱۵- استیل دی اکسی نیوالنول (15-AcDON) و ۴-استیل نیوالنول (4-AcNIV) اشاره کرد. تیپ شیمیایی NIV نسبت به DON برای انسان و دام سمی‌تر می‌باشد (۳۲)، اگرچه ممکن است تیپ شیمیایی DON نسبت به NIV خاصیت گیاه سوزی بیشتری داشته باشد (۱۴). این زهرابه‌های قارچی با جلوگیری از سنتز پروتئین در سلول‌های یوکاریوتیکی برای انسان و دام مضر می باشند. اغلب تیپ B تریکوتسین‌ها در ارتباط با بیماری فوزاریوز سنبله گندم (FHB) گزارش شده‌اند که آلودگی و کلونیزه شدن خوشه‌ها توسط پاتوژن FHB نه تنها موجب کاهش عملکرد محصول می‌گردد بلکه سبب کاهش کیفیت دانه به دلیل تولید زهرابه‌هایی مانند DON در خوشه نیز می‌گردد (۹). قابل توجه است که تولید زهرابه توسط عامل این بیماری بین ۳۰ تا ۷۰ درصد عملکرد گندم را کاهش می‌دهد و همچنین در بیماری‌زایی گیاهان نیز نقش دارد (۹). تریکوتسین‌ها از طریق یک سری مسیرهای پیچیده شامل اکسیژناسیون، ایزومراسیون و استریفیکاسیون سنتز می‌شوند. ژن‌های سنتزکننده تریکوتسین‌ها (*Tri*) در یک خوشه‌ژنی (حداقل ۱۰ ژن) متمرکز شده‌اند که شامل: ژن‌های سنتتازتریکودایِن (*Tri*5)، اکسیژناز P450 (*Tri*4, *Tri*11)، استیل ترانسفراز (*Tri*3, *Tri*7)، فاکتورهای نسخه‌برداری (*Tri*6, *Tri*10)، پمپ انتشارتوکسین (*Tri*12) و دو پروتئین فرضی ناشناخته (*Tri*8, *Tri*9) می‌باشند (۲۰). مطالعات گسترده‌ای روی خوشه‌ژنی تریکوتسین‌ها در گونه‌های مختلف فوزاریوم صورت گرفته است. لی و همکاران (۲۰) و بروان و همکاران (5) ژن‌های *Tri*13 و *Tri*7 ازکلاستر بیوسنتز تریکوتسین گونه‌های فوزاریوم را مورد شناسایی قرار دادند و پی بردند که این ژن‌ها مسئول تبدیل تریکوتسین DON به NIV (*Tri*13) و استیلی‌شدن NIV به 4-AcNIV (*Tri*7) می‌باشند. ژن Tri7 برای استیلاسیون کربن-۴ (C-4) زهرابه قارچی toxin T-2 در قارچ *F. sporotrichioides* مورد نیاز می‌باشد در حالی‌که این ژن در قارچ *F. graminearum* غیرعملکردی است (۶). جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی NIV، ژن‌های عملکردی *Tri*7 و *Tri*13 را دارا می‌باشند در حالی‌که نسخه‌های غیرعملکردی هر دو ژن در جدایه‌های تولیدکننده DON وجود دارد (۸). ژن غیرعملکردی *Tri*7 قادر به سنتز NIV می‌باشد اما مشتقات استیلی این تیپ شیمیایی مانند ۴- استیل نیوالنول (4- AcNIV) سنتز نمی‌شود اما در جدایه‌هایی با ژن‌های غیرعملکردی Tri13 هیچ یک از توکسین NIV و 4- AcNIV سنتز نمی‌شود با این حال تیپ شیمیایی DON در این جدایه‌ها ساخته می‌شود (۸). مطالعه بیوسنتز خوشه ژنی تریکوتسین نشان داده است که همه جدایه‌های تولیدکننده 3-AcDON، فاقد ژن Tri7 می‌باشند اما این ژن در جدایه‌های تولیدکننده NIV و 15- AcDON وجود دارد (۸). لی و همکاران (۲۰) پی بردند که بعضی از جدایه‌های تولیدکننده DON ممکن است دارای ژن غیرعملکردی *Tri*13 باشند در حالی‌که ژن عملکردی *Tri*7 آنها کامل است و همچنین پیشنهاد شده است که به دنبال نقص در ژن‌های *Tri*13 و *Tri*7، آنها هیچ فعالیتی نخواهند داشت (۸). در صورت فقدان فشار انتخابی در عملکرد ژن Tri7، این ژن ممکن است جهش یافته و غیرعملکردی شود. شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه غیرفعال شدن ژن *Tri*7 به دنبال نقص در ژن عملکردی *Tri*13 اتفاق می‌افتد (۸). جدایه‌های *F. graminearum* بر اساس گروه‌های RAPD، SCAR (sequence charactrised amplified region) و دودمان با توجه به توالی ژن ها گروه‌بندی می‌شوند که این گروه بندی ها با شرایط جغرافیایی، نوع میزبان، شدت بیماری‌زایی و تولید زهرابه‌های قارچی مرتبط می باشند. وارد و همکاران (۳۶)، ۸ سویه از نظر شرایط جغرافیایی در جدایه‌های *F. graminearum* تعریف کردند و پیشنهاد شد که این سویه‌ها ارتباط خاصی با تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین ندارند. کارتر و همکاران (۱۰ و ۱۱) جدایه‌های *F. graminearum* را بر اساس قطعات تک شکلی تکثیر شده با آغازگرهای Fg16 به گروه‌های جمعیتی مختلفی تقسیم‌بندی کردند. این گروه بندی که بنام آنالیز SCAR نیز معروف می‌باشد نوعی شناسایی گونه‌های *F. graminearum* بر اساس طول قطعه تکثیر شده از ۴۲۰ تا ۵۲۰ جفت باز می‌باشد. پیشرفت تکنیک‌های مولکولی از جمله روش‌های PCR مبتنی بر طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های سنتزکننده زهرابه‌های قارچی، ردیابی و آنالیز تریکوتسین-هایی مانند DON، NIV در غلات و همچنین محصولات تولیدی برای تغذیه دام و طیور را تسهیل کرده است (۱۳). لذا این تحقیق به منظور بررسی تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین و ردیابی ردیابی ژن Tri7 در بین جدایه‌های *F. graminearum* در استان گلستان صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی جدایه‌های گونه *Fusarium graminearum*

در سال زراعی ۱۳۸۹-۱۳۸۸ از مناطق عمده کشت گندم در استان گلستان از جمله گرگان، کردکوی، بندرگز، گنبد، مینودشت، کلاله و آزادشهر در دوره تشکیل و تکامل خوشه (از اوایل تا اواخر اردیبهشت) بازدید به عمل آمد. نمونه‌برداری بطور تصادفی و حداقل ۲۰ خوشه آلوده از هر مزرعه و مجموعا ۶۵۰ نمونه جمع‌آوری گردید. قابل ذکر است که در این بررسی نمونه‌برداری از ارقام رایج گندم منطقه از جمله تجن، زاگرس و کوهدشت صورت گرفت. قسمت‌های مختلف خوشه شامل پوشینک‌های دانه و قطعاتی از محور سنبلچه و خوشه بطور جداگانه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه بر حسب ضخامت بافت ضدعفونی و پس از سه بار

شستشو با آب مقطر سترون روی محیط کشت‌های سیب زمینی دکستروز- آگار (PDA) و Nash & Snyder کشت گردیدند و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و نور متناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند (۲۸). خالص‌سازی جدایه‌ها از طریق تک اسپور کردن و نیز با استفاده از نوک‌ریسه روی محیط کشت‌های آب آگار (WA) دو درصد حاوی استرپتومایسین انجام گردید. جهت بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، جدایه ها در محیط کشت‌های CLA و SNA تحت شرایط نوری و دمایی مناسب کشت داده شدند (۲۸). سپس جدایه‌های فوزاریوم ازطریق خصوصیات مرفولوژی کنیدی‌ها و شکل پرگنه‌ها توسط کلیدهای شناسایی معتبر (۵ و ۷) مورد شناسایی قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی

به منظور تولید میسلیوم‌های انبوه فوزاریوم برای استخراج DNA از محیط کشت Potato Dextrose Broth (PDB) استفاده شد. بدین منظور جدایه‌ها به مدت یک هفته بر روی محیط کشت PDB کشت داده شدند و سپس با استفاده از لوپ سترون میسلیوم‌ها جمع-آوری و استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام گرفت (۲۶).

تشخیص مولکولی جدایه‌های مورد بررسی و تعیین ساختار جمعیت آنها

برای شناسایی تکمیلی جدایه‌های *F. graminearum* از جفت آغازگرهای اختصاصی گونه (Fg16F/Fg16R) استفاده شد (جدول-۱) (۲۷). این آغازگرهای اختصاصی تولید قطعات تک شکلی ۰/۵-۰/۴ کیلو باز از نواحی DNA در قارچ *F. graminearum* می‌کنند (۲۷). همچنین با این جفت آغازگر که بنام SCAR نیز معروف است برای تعیین ساختار جمعیت جدایه‌های مورد بررسی استفاده شد. این قطعات تکثیر شده دارای تیپ‌های مختلفی می‌باشند که عبارتند از: type 2: 0.51 Kb، Kb type 3: 0.54 kb type 4: 0.58 و Kb type 5: 0.52 Kb type 1: 0.42که هر کدام از این تیپ‌ها نشان دهنده یک ساختار جمعیتی در بین جدایه‌های *F. graminearum* می‌باشد.

تعیین تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین با استفاده از ردیابی ژن Tri7

برای ردیابی ژن *Tri7* و شناسایی جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی NIV و DON در جدایه‌های قارچی مورد بررسی، از آغازگرهای اختصاصی این ژن (Tri7F/Tri7R) استفاده شد (جدول ۱) (۸). این آغازگر در جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی NIV تولید قطعات ۴۶۳ جفت بازی می‌کند و در حالی‌که در جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی DON تولید قطعات بیش از ۵۳۵ جفت بازی می‌کند. در بررسی توانایی ژنتیکی تولید تریکوتسین و تعیین تیپ‌های شیمیایی در هر یک از جدایه‌ها، از جفت آغازگر Tri7F/Tri7R استفاده شد. برنامه حرارتی برای این آغازگر 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 نظرگرفته شد. محصولات PCR به طور 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 Tris–HCl, 1.5 µl 10 (100 15 mM MgCl2, 500 Mm KCl pH 8) ×، buffer 2 mM MgCl2, 0.2 mM dNTPs, 0.75U DNA Taq polymerase و 0.4 µM از هر آغازگر بود (Roche Co., Germany). هر آزمایش شامل یک کنترل مثبت (یک واکنش PCR با DNA ژنومی شناخته شده) و یک کنترل منفی (یک واکنش PCR با همه مواد واکنش بدون DNA ژنومی) بود. 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.

نتایج و بحث

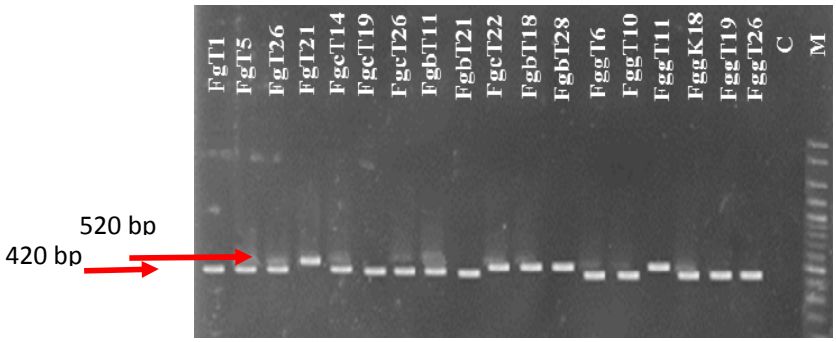
جدایه‌های شناسایی شده *F. garminearum*

شناسایی جدایه‌های فوزاریوم جدا شده از خوشه‌های آلوده در مناطق مختلف استان گلستان با استفاده از کلیدهای شناسایی و خصوصیات ریخت‌شناسی نظیر شکل و اندازه میکرو کنیدی، ماکروکنیدی، سلول‌های کنیدی زا و رشد پرگنه انجام گرفت و در نهایت تعداد ۱۶۶ جدایه *F. graminearum* با استفاده از خوصیات فوق تشخیص داده شد. شناسایی تکمیلی با استفاده از واکنش PCR و جفت آغازگرهای اختصاصی گونه (Fg16F/Fg16R) نشان داد که تعداد ۱۰۰ جدایه تولید قطعات تک شکلی در محدوده ۵۲۰-۴۲۰ جفت باز کردند (شکل۱). نتایج واکنش PCR با این آغازگرها، روش مورفولوژیکی در رابطه با شناسایی جدایه‌های *F. graminearum* را تائید کرد و ثابت شد که جدایه‌های شناسایی شده از طریق خصوصیات مورفولوژیکی گونه *F. graminearum* می‌باشند (جدول۲ و شکل۱). این ۱۰۰ جدایه برای مطالعات بعدی و

تعیین ساختار جمعیت مورد استفاده قرار گرفت.

جدول-۱ آغازگرهای اختصاصی گونه F. graminearum و ژن موثر در تولید تریکوتسین Tri7

آغازگر(Primer)	توالی(Sequence)	اندازه قطعه (bp)	Reference
Fg16F	CTCCGGATATGTTGCGTCAA	420	Nicholson et al. (1998)
Fg16R	GGTAGGTATCCGACATGGCAA	520	Nicholson et al. (1998)
Tri7F	TGTGGAAGCCGCAGA	436	Chandler et al. (2003)
Tri7R	GATGGCCGCAAGTGGA	535	Chandler et al. (2003)



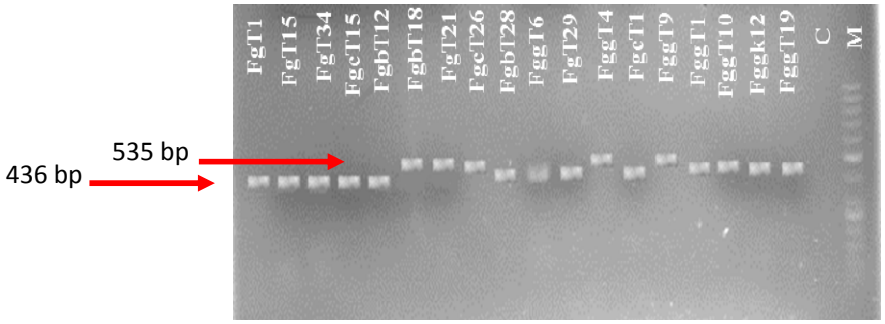
شکل -۱ باند ۵۲۰-۴۲۰ جفت بازی حاصل از PCR با استفاده از جفت آغازگر Fg16F/Fg16R در جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان گلستان. جدایه‌های تولیدکننده قطعات ۴۲۰ جفت بازی متعلق به جمعیت 7C1 و جدایه‌های تولیدکننده قطعات ۵۲۰ جفت بازی متعلق به جمعیت 6A5. C (کنترل منفی: فقط DNA ژنومی)، M (نشانگر bp ۱۰۰).

تعیین ساختار جمعیت جدایه‌های *F. graminearum*

در این تحقیق نتایج آنالیز SCAR برای تعیین ساختار جمعیتی نشان داد که هر دو جمعیت 7C1 (تولیدکننده باندهای ۴۲۰ جفت باز) و 6A5 (تولیدکننده باندهای ۵۲۰ جفت باز) در جدایه‌های مورد بررسی در مزارع گندم استان گلستان وجود دارند (شکل۱). جمعیت 7C1 (سویه ۷) بیشترین پراکنش را در مناطق نمونه‌برداری داشت بنابراین بعنوان جمعیت غالب در جدایه‌های مورد بررسی شناسایی گردید. در شهرستان گرگان، جمعیت 7C1، با ۱۹ جدایه از ۲۱ جدایه (۹۰/۴ درصد) بررسی شده بیشترین تعداد و همچنین در شهرستان گنبد، جمعیت 6A5، با۱۰ جدایه از ۲۲ جدایه (۵۴/۵ درصد) بررسی شده، جمعیت غالب را به خود اختصاص دادند. این نتایج با گزارشات جی و همکاران (۱۸) مبنی بر وجود جمعیت‌های 7C1 و 6A5 در چین به عنوان جمعیت‌های غالب مطابقت داشت. استان گلستان از نظر اقلیمی دارای تنوع خاصی می باشد که این تنوع اقلیمی تاثیر خاصی روی شیوع و شدت و در نتیجه ساختار جمعیتی قارچ *F. graminearum* می‌گذارد. با توجه به اینکه در این بررسی تنوع میزبانی خاصی وجود ندارد و تنها از گندم (ارقام مختلف) نمونه‌برداری به عمل‌آمده است با این وجود ساختار جمعیتی مختلفی در جدایه‌های مورد بررسی وجود دارد که این احتمالا به دلیل تنوع در شرایط اقلیمی، ارقام و سیستم کشت باشد که این عوامل بعنوان فاکتورهای مهم و تاثیرگذار روی پراکنش جغرافیایی جمعیت *F. graminearum* به حساب می‌آیند (۱۸).

ردیابی تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین در جدایه‌های *F. graminearum*

در این بررسی جفت آغازگر *Tri7*F/*Tri7*R برای ردیابی تیپ های شیمیایی NIV و DON و همچنین ردیابی ژن *Tri7* در بین جمعیت *F. graminearum* استفاده شد. نتایج واکنش PCR با این آغازگر نشان داد که هر دو تیپ شیمیایی NIV و DON در جدایه‌های مورد بررسی در مناطق مختلف استان گلستان وجود دارد (جدول۲). از ۱۰۰ جدایه بررسی شده، ۷۲ جدایه بعنوان تیپ‌های تولیدکننده NIV شناخته شدند که بیشترین پراکنش این نوع تیپ شیمیایی در مزارع گندم گرگان (۲۲/۲ درصد) مشاهده شد. در این بررسی ۲۸ جدایه نیز با این آغازگر بعنوان تیپ‌های تولیدکننده DON شناخته شدند که بیشترین پراکنش این زهرابه در مزارع گندم گنبد (۷/۳۵ درصد) مشاهده شد (جدول۲). محصول PCR با این آغازگر به ترتیب برای تیپ‌های شیمیایی NIV و DON، ۴۳۶ و ۵۳۵ جفت باز بود (شکل۲).



شکل -۲ باند ٤٣٦ و ٥٣٥ جفت بازی حاصل از PCR با استفاده از جفت آغازگر Tri7F/Tri7R در جدایه‌های جمع‌آوری شده در مناطق مختلف استان گلستان. جدایه‌های دارای باند ٤٣٦ جفت باز بعنوان جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی NIV و جدایه‌های دارای باند ٥٣٥ جفت باز بعنوان جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی DON می‌باشند، C (کنترل منفی، فقط DNA ژنومی)، M (نشانگر bp ٥٠).

تولید باندهای حاصل از این ژن با نتایج تحقیقات چاندلر و همکاران (۸) مطابقت داشت. این محققان از این ژن برای ردیابی تیپ‌های شیمیایی NIV و DON در جدایه‌های *F. graminearum*، *F. culmorum* و *F. cerealis* استفاده کردند. ژن Tri7 در مسیر سنتز تریکوتسین، آنزیم 4-O-acetyltransferas را کد می‌کند که یک آنزیم مهم برای اضافه کردن گروه استیل به کربن- ۳ در ساختار ۳- تریکوتسین‌ها به شمار می‌رود. *Tri7* یک ژن کاذب در جدایه‌های تولیدکننده تیپ شیمیایی 15-AcDON می‌باشد اما این ژن در جدایه‌های تولیدکننده 3-AcDON وجود ندارد (۱۹).

نتایج این بررسی نشان داد که دو جمعیت 7C1 و 6A5 به طور همزمان در بین جدایه‌های *F. graminearum* در مزارع گندم استان گلستان وجود دارد و همچنین تیپ‌های شیمیایی مختلفی از تریکوتسین از جمله NIV و DON در مناطق نمونه‌برداری وجود دارد که تیپ شیمیایی NIV، غالب می‌باشد. جمعیت 7C1 (سویه ۷) بیشترین پراکنش را در مناطق مختلف نمونه‌برداری داشت که تیپ شیمیایی غالب این جمعیت، NIV بود. با توجه به تنوع جمعیتی و تیپ‌های شیمیایی جدایه‌های بررسی شده، سیستم کشت یک فاکتور انتخابی برای تعیین ساختار تیپ شیمیایی در جمعیت جدایه‌های *F. graminearum* محسوب می‌شود (۱۲، ۱۶ و ۲۴). به هر حال گزارشات کمی در ایران مبنی بر پراکنش تیپ‌های شیمیایی گونه *F. graminearum* در مناطق و میزبان زراعی مختلف وجود دارد (۱۷).

هراتیان و همکاران (۱۷) در بررسی که روی تیپ‌های شیمیایی مختلف گونه *F. graminearum* در منطقه مازندران انجام دادند تیپ NIV را بعنوان تیپ شیمیایی غالب منطقه معرفی نمودند که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. در بررسی که روی جدایه‌های *F. graminearum* در چین و نپال صورت گرفت نیز این دو جمعیت (7C1 و 6A5) غالب بودند (۸ و ۱۸). نتایج این تحقیق با آنالیزهایی که روی جمعیت جدایه‌های *F. graminearum* (سویه ۶ و ۷) در چین صورت گرفت مطابقت دارد (۸، ۱۵، ۱۸ و ۲۹). به نظر می‌رسد که سویه ۷ جدایه‌های *F. graminearum* در اروپا و آمریکای شمالی، بیشترین جمعیت را در گندم و ذرت‌های بررسی شده دارد که تیپ شیمیایی غالب این جمعیت، 3-AcDON می‌باشد (۳، ۱۵، ۳۱، ۳۳ و ۳۵). بر اساس گزارشات موجود هر دو تیپ شیمیایی DON و NIV در سویه‌های ۶ و ۷ جدایه‌های *F. graminearum* در نپال وجود دارد (۳۶). در کره، ژاپن و بخش‌های دیگری از آسیا سویه ۶ بیشترین جمعیت را دارد که تیپ شیمیایی NIV در این مناطق غالب است. در آمریکای جنوبی (برزیل) سویه ۷ دارای تیپ شیمیایی 15-AcDON بوده در حالی‌که جمعیت سویه ۲ دارای تیپ شیمیایی NIV می‌باشد (۳۴). مطالعاتی که روی تیپ‌های شیمیایی *F. graminearum* در مناطق مختلف جهان از جمله 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 (۲۲). تیپ‌های شیمیایی DON و NIV بطور همزمان در اروپا و آمریکای جنوبی وجود دارد که تیپ شیمیایی DON نسبت به تیپ شیمیایی NIV در این مناطق غالب است در حالی‌که در آسیا از جمله کره و ژاپن تیپ شیمیایی NIV بیشتر شیوع دارد (۱۱ و ۲۰). در بررسی که در کشور چین روی تیپ‌های شیمیایی تریکوتسین صورت گرفت، جمعیت تولیدکننده زهرابه NIV سبت به DON غالب بود ولی این دو تیپ شیمیایی بطور همزمان در مناطق مختلف نمونه‌برداری ردیابی شدند (۱۸).

با توجه به نتایج بدست آمده، هر دو تیپ شیمیایی DON و NIV در سویه‌های ۶ و ۷ جدایه‌های *F. graminearum* در استان گلستان وجود دارند که تیپ شیمیایی غالب در بین این جمعیت‌ها، NIV می‌باشد. از آنجایی که تیپ شیمیایی NIV نسبت به DON برای انسان و دام سمی تر می‌باشد. با توجه به غالب بودن جدایه‌های متعلق به گونه *F. graminearum* در شهرستان‌های گرگان و گنبد، این دو منطقه بیشترین میزان تیپ‌های شیمیایی را دارا می باشد لذا باید اقدامات کنترلی مناسبی جهت کنترل و کاهش

زهرابه‌های مذکور در این مناطق صورت گیرد. لازم به ذکر است که در شهرستان‌های دیگر استان گونه‌های مختلفی از این جنس به غیر از گونه *F. graminearum* شناسایی شد که بعضی از آنها توانایی تولید توکسین را دارا می باشند. بنابراین ردیابی ژن‌های موثر در تولید تریکوتسین در جدایه‌های قارچی جنس فوزاریوم با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی می‌تواند در تعیین جدایه‌های فوزاریوم تولیدکننده تریکوتسین جایگزین روش‌های شیمیایی پر هزینه و زمان بر گردد.

سپاسگزاری

در پایان از زحمات سرکار خانم حمیده خواجه کارشناس پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل بخاطر مساعدت و راهنمایی‌های ارزنده در انجام کارهای مولکولی تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

۱- بابادوست م. ۱۳۷۴. گونه های فوزاریوم در بذور و گیاهان گندم در استان آذربایجان شرقی و اردبیل. مجله بیماری‌های گیاهی ۳۱: ۱۰۰-۸۸.

۲- گلزار ح. و ارشاد ج. ۱۳۷۲. بررسی پراکندگی فوزاریوز خوشه گندم در منطقه گرگان و گنبد و میزان حساسیت ارقام تجاری گندم. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، رشت، صفحه ۴۲.

3- Aude Naert K., Van Broeck R., Bekaert B., De Witte F., Heremans B., Messens K., Höfte M. and Haesaert G. 2009. Fusarium head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. European Journal of Plant Pathology, 125: 445-458.

4- Bottalico A. and Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxinsassociated with head blight in small-grain cereals in Europe. European Journal of Plant Pathology, 108: 611-624.

5- Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H. and Desjardins A.E. 2002. Inactivation of a cytochrome p-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. Fungal Genetics and Biology, 36: 224-233.

6- Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H. and Desjardins A.E. 2001. Genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. Fungal Genetics and Biology, 32: 121-133.

7- Burgess L.W., Summerell B.A., Bullock S., Gott K.P. and Backhouse D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research, 3rd ed. Sydney, University of Sydney Press.

8- Chandler E.A., Simpson D.R., Thomsett M.A. and Nicholson P. 2003. Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 62: 355-367.

9- Charmley L.L., Trenholm H.L., Prelusky D.A. and Rosenberg A. 1995. Economic losses and decontamination. Natural Toxicology, 3:199-203.

10- Carter J.P., Rezanoor H.N., Desjardins A.E. and Nicholson P. 2000. Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. Plant Pathology, 49: 452-460.

11- Carter J.P., Rezanoor H.N., Holden D., Desjardins A.E., Plattner R.D. and Nicholson P. 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum.* European Journal of Plant Pathology, 108: 573-583.

12- Desjardins A.E. 2006. *Fusarium* mycotoxins*:* chemistry, genetics and biology. APS Press, St. Paul, M.N.

13- Desjardins A.E., Manadhar H.K., Plattner R.D., Maragos C.M., Shrestha K. and McCormick S.P. 2000. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 1377-1383.

14- Eudes F., Comeau A., Rioux S. and Collin J. 2000. Phytotoxicité de huit mycotoxines associées à la fusariose de l'épi chez le blé. Canadian Journal of Plant Pathology, 22: 286-–292.

15- Gale L.R., Chen L.F., Hernick C.A., Takamura K. and Kistler H.C. 2002. Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in eastern China. Phytopathology, 92: 1315-1322.

16- Gang G., Miedaner T., Schuhmacher U., Schollenberger M. and Geiger H.H. 1998. Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. Phytopathology, 88: 879-884.

17- Haratian M., Sharifnabi B., Alizadeh A. and Safaie N. 2008. PCR analysis of the *Tri13* gene to determine

the genetic potential of *Fusarium graminearum* isolates from Iran to produce Nivalenol and Deoxynivalenol. Mycopathology, 166: 109-116.
18- Ji L., Cao K.L., Hu T. and Wang S. 2007. Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol Chemotypes of *Fusarium graminearum* Isolates from China by PCR Assay. Journal of Phytopathology, 155: 505-512.
19- Kimura M., Tokai T. and Takahashi-Ando N. 2007. Molecular genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis; pathways, genes and evolution. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 71: 2102-2123.
20- Lee T., Han Y.K., Kim K.H., Yun S.H. and Lee Y.W. 2002. *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. Applied and Environmental Microbiology, 68: 2148-2154.
21- Lemmens M., Burstmatyr H. and Ruckenbauer P. 1993. Variation in Fusarium head blight susceptibility of international and Austrian wheat breeding material. Die Bodenkultur, 44: 65-78.
22- Miedaner T., Reinbrecht C. and Schilling A.G. 2000. Association among aggressiveness, fungal colonization and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. Journal of Plant Diseases and Protection, 107: 124-134.
23- Mirocha C.J., Abbas H.K., Windels C.E. and Xie W. 1989. Variation in deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates. Applied and Environmental Microbiology, 55: 1315-1316.
24- Mudge A.M., Macky D., Dong R., Dardiner D.M., White R.G. and Manners J.M. 2006. A role for isolation of tichothecene mycotoxin by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* or barley and wheat. Mycopathology, 128: 19-23.
25- Nelson P.E., Toussoun T.A. and Marasa W.F.O. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. University Park, P.A., Pennsylvania State University Press.
26-Nicholson P, Rezanoor H.N., Simpson D.R. and Joyce D. 1997. Differentiation and quantification of the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis* using a PCR assay. Plant Pathology, 46: 842-856.
27- Nicholson P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W. and Joyce D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiological and Molecular of Plant Pathology, 53: 17-37.
28- Nirenberg H. 1976. Unterstructure uber die morphologische und biologische differnzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesansatlt fur Landund Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, 169: 11-17.
29- O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke B.K. and Casper H.H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineage of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97:7905-7910.
30- Parry D.W., Jenkinson P. and MacLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. Plant Pathology, 44: 207-238.
31- Reynoso M., Ramirez M.L., Torres A.M. and Chulze S.N. 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. International Journal of Food Microbiology, 145: 444-448.
32- Ryu J., Ohtsubo K., Izumiyama N., Nakamura K., Tanaka T., Yamamura H. and Ueno Y. 1988. The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice. Fundamental and Applied Toxicology, 11: 38-47.
33- Schmale D.G., Leslie J.F., Zeller K.A., Saleh A.A., Shields E.J. and Bergstrom G.C**.** 2006. Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. Phytopathology, 96: 1021-1026.
34- Scoz L.B., Astolfi P., Reartes D.S., Schmale D.G., Moraes M.G. and Del Ponte E.M. 2007. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Gibberella zeae* in Brazilian wheat. Plant Pathology, 58: 344-351.
35- Tóth B., Mesterházy A., Horváth Z., Bartók T., Varga M. and Varga J. 2005. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. European Journal of Plant Pathology, 113: 35-45.
36- Ward T.J., Bielawski J.P., Kistler H.C., Sullivan E. and O'Donnell K. 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 9278-9283.