شناسایی مولکولی و تشخیص ژن کدکننده دی اکسی نیوالنول در جدایه‌های *Fusarium graminearum* عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم در ایران

رویا رضائیان دلوئی[۱]، سعید رضایی[۲]، منصوره میرابوالفتحی[۳]، حمیدرضا زمانی‌زاده[۲] و محمد رضوی[۳]

چکیده

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی گندم در ایران و سایر نقاط جهان می‌باشد. عامل اصلی این بیماری *Fusarium graminearum* شناخته شده که گندم را در طی دوره گل‌دهی آلوده کرده و نه تنها باعث کاهش محصول می‌گردد، بلکه با تولید زهرابه قارچی، موجب مسمومیت در انسان و دام نیز می شود. در این مطالعه ۶۰ جدایه *F. graminearum* جداشده از مزارع گندم آلوده از استان‌های مختلف ایران مورد بررسی قرار گرفتند. تشخیص مولکولی جدایه‌ها بر اساس روش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Fg16F/Fg16R برای این گونه انجام و تعلق کلیه جدایه‌ها به گونه *F. graminearum* مورد تأیید قرار گرفت. در کلیه جدایه‌ها یک باند ۴۲۰ جفت بازی تکثیر شد که در سایر گونه‌های نزدیک از جمله *F. culmorum* مشاهده نگردید. جدایه‌ها برای تشخیص ژن کدکننده زهرابه دی اکسی نیوالنول با استفاده از آغازگر اختصاصی Tri13F/Tri13DONR مورد آزمایش قرار گرفتند. تنها در ۳۶ جدایه یک قطعه ۲۲۸ جفت بازی تکثیر گردید. با توجه به این که روش‌های مرسوم بسیار وقت‌گیر و غیراختصاصی هستند، استفاده از آغازگرهای ویژه گونه برای تشخیص سریع کشت‌های مشکوک به *F. graminearum* برای تعیین گونه قارچ عامل بیماری به طور مستقیم دربافت آلوده و تعیین ترکیب زهرابه‌های تولیدی آن از اهمیت خاصی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: FHB، آغازگر اختصاصی گونه، زهرابه، توکسین،DON

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱/۲۵

۱- دانش آموخته دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- اعضای هیأت علمی گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد علوم و تحقیقات

۳- اعضای هیات علمی بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران

***مسئول مکاتبات:** E-mail: royarezaeian@yahoo.com

مقدمه

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله یکی از بیماری‌های مهم گندم می باشد که همه ساله خسارات کمی و کیفی زیادی به این محصول وارد می کند و نه تنها در ایران بلکه در همه دنیا به عنوان یک بیماری مهم مطرح بوده و بین ۳۰ تا ۷۰ درصد عملکرد گندم را کاهش می‌دهد (Parry *et al.,* 1995; McMullen *et al.*, 1997; Windels, 2000). این بیماری از سال‌ها قبل در ایران وجود داشته و از بیماری‌های مهم گندم در مناطق شمالی ایران از جمله مازندران و گرگان به شمار می‌رود (Golzar, 1993; Forootan *et al.*, 1993; Babadoost, 1995). این بیماری توسط ۱۸ گونه فوزاریوم ایجاد می‌شود (Parry *et al.*, 1995)، ولی در بسیاری از کشورها از جمله ایران *F. graminearum*، *F. avenaceum* و *F. culmorum* به عنوان گونه‌های غالب گزارش شده‌اند (Golzar, 1993; Forootan *et al.*, 1993). عامل اصلی این بیماری در ایران و سایر نقاط جهان *Fusarium graminearum* Schwabe با فرم جنسی *Gibberella zeae* (Schwein) Petch می‌باشد (Parry *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 2007). این قارچ به صورت دوره‌ای همه‌گیری‌هایی را باعث شده و علاوه بر تولید زهرابه‌های قارچی خطرناک برای انسان و دام، منجر به خسارت اقتصادی فراوان به علت کاهش کمی و کیفی محصول نیز می‌گردد (Jennings *et al.*, 2004; Nicholson *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). در مطالعه انجام شده به وسیله جانسون و همکاران (Johanson *et al.*, 1995) خسارت اقتصادی ناشی از آلودگی گندم به بیماری فوزاریومی سنبله در آمریکا و تجمع زهرابه DON در محصول، حدود ۸۶ میلیون دلار برآورد گردید (Johanson *et al.*, 1995).

در مطالعه گسترده‌ای در چین ۲۴۵۰ نمونه از خوشه گندم از ۲۱ منطقه جمع‌آوری و ۱۸ گونه فوزاریوم جدا و تشخیص داده شد که ۹۵ درصد نمونه‌ها *F. graminearum* بودند (Wang, 1996). گونه‌های فوزاریوم به طور معمول با استفاده از مشخصات مورفولوژیک شکل رویشی، فرم غیرجنسی و جنسی و دیگر ویژگی‌هایی که غالباً قراردادی است، شناسایی می‌گردند. این روش‌ها معمولاً وقت گیر و غیر اختصاصی هستند (Leslie and Summerell, 2006). استفاده از آغازگرهای Fg16F/Fg16R که بر اساس توالی ژنی ناحیه ITS از ژنوم *F. graminearum* طراحی گردیده است امکان تشخیص دقیق و سریع‌تر عامل بیماری‌زا را فراهم می‌سازد. محصولات تولید شده با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی می‌تواند قطعات مختلف از ۴۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز تولید نماید (Nicholson *et al.*, 1998). کارتر و همکاران (Carter *et al.*, 2000, 2002) و ادانیل و همکاران (O'Donnell *et al.*, 2000) گزارش کردند که *F. graminearum* دارای لاین‌ها و گروه‌های مختلف می‌باشد. تکثیر قطعات DNA جدایه‌های *F. graminearum* با آغازگر اختصاصی Fg16F/Fg16R تولید پنج محصول مختلف می‌کند. استفاده از جفت آغازگر فوق نه تنها در تشخیص مولکولی گونه *F. graminearum* به طور کاملاً اختصاصی عمل می‌کند بلکه با کمک آن می‌توان جمعیت‌های *F. graminearum* را نیز تعیین نمود. جمعیت‌های مختلف *F. graminearum* می‌تواند با نواحی مختلف جغرافیایی و زهرابه تولیدی مرتبط باشد (Carter *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2004).

گونه *F. graminearum* علاوه بر بیماریزایی در گیاه و کاهش محصول، می‌تواند منجر به آلودگی دانه به زهرابه‌های فوزاریومی[1] شود (Snijders, 1990; McMullen *et al.*, 1997; Langseth *et al.*, 1999; Bottalico and Perrone, 2002). زهرابه‌های قارچی مهمی که توسط این قارچ در غلات دانه ریز ایجاد می‌شود شامل 8-ketotrichothecen هایی نظیر دی اکسی نیوالنول[2] و نیوالنول[3] و مشتقات آن‌ها از جمله 15-AcDON[4]، 3-AcDON[5] و 4-AcNIV[6] می‌باشند (Miller *et al.*, 1991; Waalwijk *et al.*, 2003; Llorens *et al.*, 2006). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بیشتر ترکیبات تولید شده DON و NIV می‌باشند که تولید آن در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت می‌باشد (Ward *et al.*, 2002). گونه‌های تولید کننده NIV از کشورهای مختلف آفریقا، آسیا و اروپا گزارش شده است (Lee *et al.*, 2001; Jennings *et al.*, 2004) در حالی که گونه‌های تولید کننده DON از سراسر دنیا گزارش شده

[1] Fusarium toxins
[2] Deoxynivalenol (DON)
[3] Nivalenol (NIV)
[4] 15-Acetyldeoxynivalenol (15-AcDON)
[5] 3-Acetyldeoxynivalenol (3-AcDON)
[6] 4-Acetylnivalenol (4-AcDON)

است (Yao and Lu, 2000; Desjardins *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Haratian *et al.*, 2008; Burlakoti *et al.*, 2008; Prodi *et al.*, 2009). زمانی زاده و خرسندی (Zamanizadeh and Khorsandi, 1995) در مطالعه انجام شده بر روی نمونه‌های دانه گندم جمع آوری شده از مناطق شمالی ایران آلودگی قابل توجهی به توکسین های DON، 3-AcDON و ZON[1] ناشی از *F. graminearum* را گزارش نمودند. هراتیان و همکاران (Haratian *et al.*, 2006) به‌منظور توانایی ژنتیکی تولید تریکوتسین ۵۷ جدایه *F. graminearum* را با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن *Tri6* مورد بررسی قرار دادند. آلودگی دانه به این زهرابه‌ها می‌تواند خطری جدی برای انسان و یا حیوانات اهلی که از گندم در جیره غذایی آنها استفاده می‌شود، باشد. تحقیق حاضر با هدف تعیین هویت جدایه‌های ایرانی قارچ عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم با استفاده از آغازگر ویژه گونه و بررسی ژن کدکننده زهرابه دی اکسی نیوالنول با استفاده از آغازگر اختصاصی انجام گرفت.

مواد و روش ها

جدایه های قارچ *F. graminearum*

در این مطالعه ٦٠ جدایه از قارچ *F. graminearum* جدا شده از استان‌های گلستان، مازندران، هرمزگان، اردبیل، فارس و کرمان از مجموعه قارچ‌های مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی ایران مورد استفاده قرار گرفت. این جدایه ها از گندم آلوده به بلایت فوزاریومی جداسازی و به روش برگس و همکاران (Burgess *et al.*, 1994) و لزلی و سومرل (Leslie and Summerell, 2006) بر اساس خصوصیات ظاهری پرگنه از جمله نحوهٔ رشد و رنگ پرگنه، شکل ماکروکنیدی، نوع فیالید، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور و میکروکنیدی، تشکیل فرم جنسی و تعداد و ابعاد پرتسیوم، آسک، آسکوسپور انجام شده بود.

انبوه‌سازی میسلیوم و استخراج DNA ژنومی از جدایه‌های قارچی

پس از کشت جدایه‌ها روی محیط کشت PDA[2] به مدت ۳ تا ۵ روز، به‌وسیله چوب پنبه سوراخ کن سه قطعه محیط کشت حاوی قارچ به قطر ۰/٤ میلی متر به ارلن حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB[3] انتقال داده شده و به مدت ١٤ روز روی دستگاه تکان‌دهنده[4] با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در شرایط معمولی آزمایشگاه نگهداری گردید. برای جدا کردن میسلیوم‌های قارچ از محیط کشت، محتوی هر ارلن روی یک ورقه کاغذ صافی واتمن شماره ۱ واقع در قیف بوخنر متصل به پمپ خلاء ریخته شد. بخش مایع محیط کشت توسط پمپ خلاء خارج شد و توده میسلیومی روی کاغذ صافی باقی ماند. سپس میسلیوم از کاغذ صافی جدا و در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای استخراج DNA قارچی، ابتدا میسلیوم یخ زده درون ازت مایع به مدت ۲۸ ساعت در دستگاه لیوفیلیزر[5] قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد. میسلیوم خشک شده درون هاون چینی همراه با ازت مایع به منظور پودر شدن به آرامی ساییده شد. استخراج DNA مطابق روش تغییر یافته ریدر و برودا (Reader and Broda, 1985) انجام شد. بدین منظور مقدار ۲۵ میلی‌گرم از پودر میسلیومی درون بافر استخراج (100 mM Tris-HCL, pH 8.0; 100 mM EDTA; 250 mM Nacl) درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و کمی ورتکس[6] شد تا کاملاً مخلوط شود. مقدار ۵۰ میکرولیتر SDS[7] ۱۰٪ به هر میکروتیوب اضافه شده و لوله‌ها درون یک قالب آبی قرار گرفته و سپس به مدت ۳۰ دقیقه درحمام آب گرم با دمای ٦٥ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در این مدت به آرامی جهت جلوگیری از شکستگی DNA به لوله ها ضربه زده شد. به محلول فوق ۲۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم (pH=4.8) اضافه گردید و لوله‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. برای جداکردن DNA محلول از رسوب حاصله، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور و ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از فاز مایع را برداشته و به میکروتیوب جدید حاوی ۱ میلی لیتر اتانول خالص سرد (حدود ٤ درجه سلسیوس) انتقال داده شد تا رسوب ایجاد گردد. محلول به دست آمده در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب باقی‌مانده با اتانول ۷۰٪ جهت حذف مواد اضافی شستشو داده شد. سپس در پوش لوله‌ها

[1] Zearalenone (ZON)
[2] Potato Dextrose Agar, Himedia Labratories Co., India
[3] Potato Dextrose Broth, Himedia Labratories Co., India
[4] Shaker Incubator, Pars Azma Co., Iran
[5] Freeze Dryer/Lyophilizer, IlshinBioBase Co., Korea
[6] Vortex, Kiagen, Iran
[7] Sodium Dodecyl Sulfate

جهت خشک شدن کامل باز گذاشته شد. رسوب خشک شده در هوا در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE[1] (10mM Tris-HCL, pH 8.0; 1 mM EDTA) حل گردید. بررسی حضور یا عدم حضور و نیز تعیین عدم شکستگی DNA استخراج شده با الکتروفورز آنها روی آگارز ۱٪ انجام شد. برای بررسی کیفیت و کمیت DNA از دستگاه اسپکتروفوتومتر[2] استفاده گردید. نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸ تا ۲ گویای کیفیت مناسب DNA در نظر گرفته شد. در انتها جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد.

تشخیص مولکولی جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از آغازگرهای ویژه گونه[3]

از آغازگرهای ویژه گونه *F. graminearum* با نام‌های Fg16F/Fg16R طراحی شده توسط توسط نیکولسون و همکاران (Nicholson *et al.*, 1998) استفاده گردید (جدول۱). واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت مخصوص[4] و دستگاه ترموسایکلر[5] انجام شد. هر آزمایش شامل یک کنترل مثبت (DNA ژنومی یک جدایه شناخته شده) و یک کنترل منفی (فاقد DNA ژنومی) بود. برنامه حرارتی بهینه سازی شده شامل یک مرحله پنج دقیقه ای در ۹۴ درجه سلسیوس برای آغاز واکنش، ۳۰ چرخه (۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۵۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه) و در پایان یک مرحله طویل شدن رشته در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در جدول ۲ آمده است. محصول به دست آمده از این واکنش روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز گردید.

تشخیص ژن کد کننده دی اکسی نیوالنول در جدایه‌های *F. graminearum*

در این بررسی ۶۰ جدایه *F. graminearum* از نظر توانایی تولید زهرابه دی اکسی نیوالنول مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور از جفت آغازگر اختصاصی Tri13F/Tri13DONR طراحی شده به وسیله چاندلر و همکاران (Chandler *et al.*, 2003) بر اساس توالی ژنی *Tri13* مسؤول تولید انواع تریکوتسین[6] در *F. graminearum*، استفاده گردید. (جدول۱). با استفاده از جفت آغازگر فوق فقط در جدایه های *F. graminearum* تولید کننده DON در یک واکنش زنجیره‌ای پلی مراز یک قطعه ۲۲۸ جفت بازی تکثیر می‌شود. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت و دستگاه ترموسایکلرفوق الذکر انجام شد. برنامه حرارتی برای جفت آغازگر Tri13F و Tri13DONR شامل یک مرحله پنج دقیقه ای در ۹۴ درجه سلسیوس برای آغاز واکنش و سپس ۳۵ چرخه (۹۴ درجه سلسیوس برای یک دقیقه، ۵۸ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای یک دقیقه) انجام گرفت. در پایان یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز گردید.

نتایج و بحث

استفاده از آغازگرهای ویژه گونه جهت شناسایی مولکولی جدایه‌ها

تعلق کلیه جدایه‌های مورد بررسی به گونه *Fusarium graminearum* با روش مولکولی مورد تأیید قرار گرفت. آغازگر اختصاصی که جهت تشخیص مولکولی جدایه‌های *F. graminearum* استفاده شد، باند مورد انتظار به اندازه ۴۲۰ جفت باز را روی ژل آگارز در تمام جدایهها ایجاد کرد و صحت عملکرد آن برای جدایه های مناطق مختلف ایران به اثبات رسید (شکل۱). نتایج به دست آمده با مطالعه نیکولسون و همکاران (Nicholson *et al.*, 1998) مطابقت داشت.

در روش‌های مولکولی امکان تشخیص دقیق و سریع‌تر عوامل بیماریزای گیاهی وجود دارد. تا به حال روش‌های مولکولی متفاوتی برای تشخیص انواع فوزاریوم‌های عامل بیماری در غلات دانه ریز از جمله *F. culmorum* و *F. graminearum* (Nicholson *et al.*, 1998)، *F. poae* (Parry *et al.*, 1995)، *F. avenaceum* (Turner *et al.*, 1998) و *M. nivale* var. *majus* and *nivale* (Nicholson *et al.*, 1996) معرفی شده است. استفاده از آغازگرهای Fg16F/Fg16R فقط در گونه *F. graminearum* تولید

[1] Tris-HCL EDTA
[2] UV-Vis Spectrophotometer - Nanodrop® , Abnova Co., Taiwan
[3] Species specific primer
[4] AccuPower™ PCR Premix (Bioneer, Korea)
[5] Techne Co., England
[6] Trichothecene

قطعه مورد نظر را می‌کند و در هیچ کدام از سایر گونه‌های فوزاریوم عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم قطعه مورد نظر تکثیر نمی‌گردد (Nicholson *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2002). نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابق مطالعه کارتر و همکاران (Carter *et al.*, 2000) نشان داد که کلیه جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه جزو گروه ۱ می‌باشند.

تشخیص ژن کد کننده دی اکسی نیوالنول درجدایه‌های *F. graminearum*

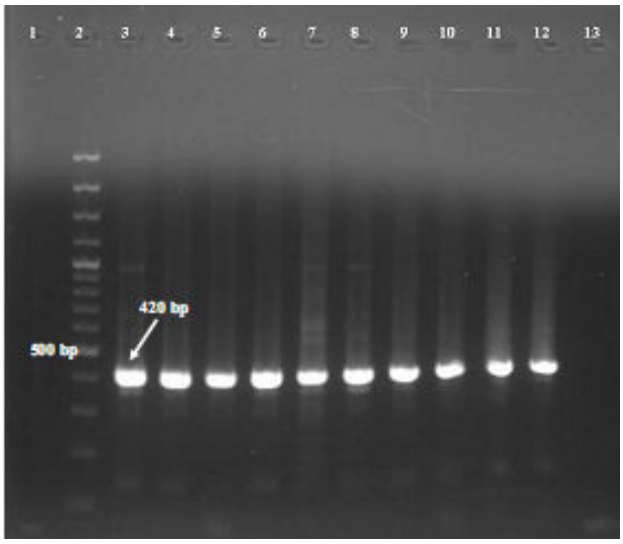
گونه *F. graminearum* نه تنها باعث بیماریزایی در گندم و کاهش محصول می‌گردد بلکه می تواند دانه را به انواع تریکوتسین‌ها آلوده سازد (Bottalico and Perrone, 2002). بررسی جدایه‌های ایرانی *F. graminearum* عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که در ٦٠ درصد جدایه‌ها (٣٦ جدایه) یک قطعه ۲۲۸ جفت بازی در DNA ژنومی تکثیر می‌گردد (شکل ۲). بیشترین تعداد جدایه های واجد DON به استان های گلستان، فارس و کرمان تعلق داشتند. در خصوص استفاده از ژن *Tri13* برای تشخیص تریکوتسین‌ها در جدایه‌های *F. graminearum* مطالعات مختلفی انجام شده است (Lee *et al.*, 2001; Brown *et al.* 2002; Jennings *et al.* 2004; Ji *et al.*, 2007). لی وهمکاران (Lee *et al.*, 2001) و بران و همکاران (Brown *et al.*, 2002) گزارش کردند که توالی ژنی در ژن *Tri13* در جدایه های *F. graminearum* تولیدکننده دی اکسی نیوالنول (DON) دارای سه منطقه حفاظت شده حذفی ۱۷۸، ٦١ و ٣٧ جفت بازی نسبت به جدایه های تولید کنندهٔ نیوالنول (NIV) می‌باشند. بدین ترتیب گونه‌های تولید کننده DON قادر به تولید NIV یا مشتق استیله آن (4-AcNIV) نمی‌باشند زیرا دارای یک ژن *Tri13* غیر فعال بوده و ژن *Tri7* در آنها حذف یا تجزیه شده است. آغازگر Tri13F/Tri13DONR مورد استفاده در این مطالعه بر اساس همین ویژگی در جدایه‌های *F. graminearum* طراحی شده است. جدایه‌های تولیدکننده زهرابه دی اکسی نیوالنول می‌توانند قطعات مشخص و اختصاصی تولید کنند. این مسأله نشان می‌دهد که زهرابه‌ها دارای یک ساختار حفاظت شده در توالی ژن *Tri13* می‌باشند (Chandler *et al.*, 2003). نتایج به دست آمده از انجام واکنش‌های PCR با مطالعات قبلی در خصوص تشخیص زهرابه مذکور تطابق دارد (Carter *et al.*, 2002; Chandler *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2008).

ارزیابی‌های انجام شده در این مطالعه نشان داد که از آغازگرهای ویژه گونه برای تشخیص سریع نمونه‌های مشکوک به *F. graminearum* و تعیین گونه قارچ عامل بیماری به طور مستقیم در بافت آلوده می‌توان بهره گرفت. از این روش می‌توان حتی برای تشخیص گونه عامل بیماری در مراحل ابتدایی که هنوز علایم بیماری جندان قابل تشخیص نیست نیز استفاده کرد. هم‌چنین می‌توان بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توانایی تولید تریکوتسین‌ها را در *F. graminearum* بررسی کرد. به علاوه با این ارزیابی‌ها می‌توان اطلاعاتی درباره توزیع هاپلوتیپ‌های ژن *Tri13* به دست آورد که در مطالعات همه‌گیری‌شناسی کاربرد دارد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

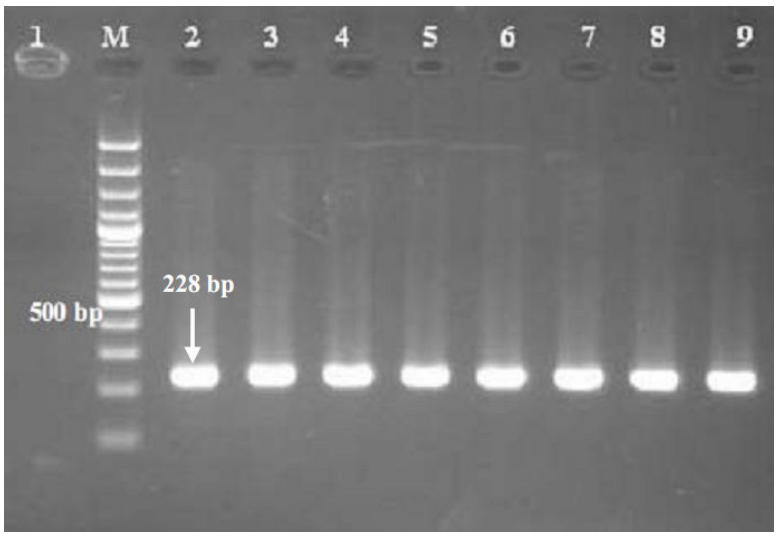
Table 1. Sequences of primers used in this study

Primer name	Sequence	Sizes (bp)	Reference
Fg16F	5'-CTCCGGATATGTTGCGTCAA-3'	420	25
Fg16R	5'-GGTAGGTATCCGACATGGCAA-3'		
Tri13F	5- CATCATGAGACTTGTKCRAGTTTGGG-3	228	6
Tri13DONR	5- GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG-3		



شکل۱- ژل آگارز محصولات PCR مربوط به تشخیص گونه *F. graminearum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه (قطعه مورد انتظار ٤۲۰ جفت بازی) : ۱ : کنترل منفی (فاقد DNA ژنومی) ، ۲ : مارکر 100bp ، ۳: کنترل مثبت (Fg170) ، ٤-۱۲ مربوط به جدایه‌های *F. graminearum* مناطق مختلف و ۱۳ مربوط به DNA قارچ *F. culmorum*

Figure. 1. PCR products amplified from genomic DNA of *F. graminearum* strains using species specific primer Fg16F/Fg16R (expected product 420 bp) lane1: negative control (DNA of *F. oxysporum*), lane 2: DNA marker, 100 bp, lane 3: positive control (Fg170), lanes 4-12: *F. graminearum* isolates, lane 13: DNA from *F. culmorum*



شکل۲- ژل آگارز محصولات PCR مربوط به حضور ژن کد کننده DON در جدایه های *Fusarium graminearum* : ۱: کنترل منفی، M: مارکر 100bp ، ۲ : کنترل مثبت، ۳-۹: مربوط به جدایه های *Fusarium graminearum* واجد ژن کد کننده DON.

Figure. 2. PCR products of gene encoding DON in *F. graminearum*: lane 1: negative control, M: 100 bp DNA marker, lane 2: positive control (Fg170), lanes 3-9: DNA of DON producing *F. graminearum*.

جدول ۲- اجزای واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مطابق کیت **AccuPower^{TM} PCR Premix (Bioneer, Korea)**

Table 2. Concentration of reagents used in each PCR reaction according to AccuPower^{TM} PCR Premix kit (Bioneer. Korea)

Contents	Final concentration of reagents in 20 µl of PCR reactions
Taq DNA polymerase	1 U
dNTPs mix(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µM
Tris-HCL (pH 9.0)	10 mM
$MgCl_2$	1.5 mM
KCl	30 mM
Template DNA	50 ng/µl
Primer (each)	10 pmol
dd H_2O	Up to 20 µl

References منابع

Babadoost M (1995) Occurrence of *Fusarium* species in seeds of wheats in Azarbayjan-e-Sharqi province and Ardabil, Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 31: 88-100.

Bottalico A, Perrone G (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small grain cereals in Europe. European Journal of Plant Pathology 198: 611–624.

Brown DW, McCormick SP, Alexander NJ, Proctor RH, Desjardins AE (2002) Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. Fungal Genetic Biology 36:224–233.

Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D (1994) Laboratory Manual for *Fusarium* Research. Third edition. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia.

Burlakoti RR, Shaukat A, Secor GA, Neate SM, McMullen MP, and Adhikari TB (2008) Comparative mycotoxin profiles of *Gibberella zeae* populations from barley, wheat, potatoes, and sugar beets. Applied and Environmental Microbiology, 74(21): 6513-6520

Carter JP, Rezanoor HN, Desjardins AE, Nicholson P (2000) Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. Plant Pathology 49: 452-460.

Carter JP, Rezanoor HN, Holden D, Desjardins AE, Plattner RD, Nicholson P (2002) Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. European Journal of Plant Pathology 108: 573–583.

Chandler EA, Simpson DR, Thomsett MA, 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.

Chung WH, Ishii H, Nishimura K, Ohshima M, Iwama T, Yoshimatsu H (2008) Genetic analysis and PCR based identification of major *Fusarium* species causing head blight on wheat in Japan. Journal of General Plant Pathology 74: 364-374.

Desjardins AE, Jarosz AM, Platiner RD, Alexander NJ, Brown DW Jurgenson JE (2004) Patterns of Trichothecene production, genetic variability and virulence to wheat of *Fusarium graminearum* from smallholder farms in Nepal. Journal of Agricultural Food Chemistry 52: 6341-6346.

Forootan A, Ershad D, Dalili A, Bamdadian T, Gerami GH (1993) Occurrence of head blight of wheat in Mazandaran. Proceeding of the 11th Iranian Plant Protection Congress, Gilan University, Rasht.

Golzar H, (1993) Wheat head blight- etiology, infection and seed transmission. Iranian Journal of Plant pathology 25: 17-22.

Haratian M, Sharifnabi B, Alizadeh A, Safaie N (2006) Detection of genes involved in trichothecene production in Iranian isolates of *Fusarium graminearum* by PCR. Iranian Journal of Plant Pathology 42: 519-538.

Haratian M, Sharifnabi B, Alizadeh A, 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. Mycopathologia 166: 109-116.

Jennings P, Coates ME, Turner JA, Chandler EA, Nicholson P (2004) Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. Plant Pathology 53: 182– 190

Ji L, Cao K, Hu T, Wang S (2007) Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from China by PCR assay. Journal of Phytopathology 155: 505-512.

Johanson DD, Wilson WW Diersen M (1995) Quality uncertainty and grain merchandising risk: Vomitoxin in spring wheat. Agric. Econ. Rep. No. 33. North Dakota State University, Fargo.

Langseth A, Bernhoft A, Rundberget T, Kosiak B, Gereis M (1999) Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. Mycopathologia 144: 103–13.

Lee T, Oh D, Kim H (2001) Identification of deoxynivalenol and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. Applied and Environmental Microbiology 67:2966–2972.

Leslie JF, Summerell BA (2006) The fusarium laboratory manual. Ames: Blackwell Publishing, pp:176-179.

Li HP, Wu AB, Zhao CS, Scholten O, Loffler H, Liao YC (2005) Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. FEMS Microbiology Letter 243:505–511.

Llorens A, Hinojo1 MJ, Mateo R, Medina1 A, Valle-Algarra1 FM, Gonzalez-Jaen MT, Jimenez M (2006) Variability and characterization of mycotoxin-producing *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the IGS-rDNA region. Antonie van Leeuwenhoek 89: 465–478

McMullen M, Jones R, Gallenberg D (1997) Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. Plant Disease 81:1340–1348.

Miller JD, Greenhalgh R, Wang Y Lu M (1991) Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species, Mycologia 83: 121–130.

Nicholson P, Lees AK, Maurin N, Parry DW, Rezanoor HN (1996) Development of a PCR assay to identify and quantify Microdochium nivale var nivale and Microdochium nivale var. majus in wheat. Physiological and Molecular Plant Pathology 48:257–271.

Nicholson P, Simpson DR, Weston G, Rezanoor HN, Lees AK, Parry DW, Joyce D (1998) Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiological and Molecular Plant Pathology 53: 17– 37.

Nicholson P, Simpson DR, Wilson AH, Chandler E, Thomsett M (2004) Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. European Journal of Plant Pathology 110: 503-514.

O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK Casper HH (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proceeding of National Academy of Science USA97: 7905–7910.

Parry DW, Jenkinson P, McLeod L (1995) Fusarium ear blight (scab) in small grains-a review. Plant Pathology 44: 207–238.

Parry DW, Nicholson P (1996) Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plant Pathology 45:383–391.

Prodi A, Tonti S, Nipoti P, Pancaldi D, Pis A (2009) Identification of deoxynivalenol and Nivalenol producing chemotypes of *F. graminearum* isolates from durum wheat in a restricted area of northern Italy. Journal of Plant Pathology 91(3): 727-731

Qu B, Li HP, Zhang JB, Huang T, Carter J, Liao YC, Nicholson P (2008) Comparison of genetic diversity and pathogenicity of Fusarium head blight pathogens from China and Europe by SSCP and seedling assays on wheat. Journal of Plant Pathology 57: 642-651

Reader U, Broda P (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Applied Microbiology, 90: 901-908.

Snijders CHA (1990) Fusarium head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. Netherland Journal of Plant Pathology 96: 187-198.

Turner AS, Lees AK, Rezanoor HN, Nicholson P (1998) Refinement of PCR detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker for phonetic relatedness to *Fusarium tricinetum*. Plant Pathology 47: 278-288.

Waalwijk C, Kastelein P, de Vries I, Kerenyi Z, Van der Lee T, Hesselink T, Kohl J, Kema G (2003) Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. European Journal of Plant Pathology 10: 743–754.

Wang YZ (1996) Epidemiology and management of wheat scab in China in: Fusarium head scab: Global status and future prospects. Pages: 97-105.

Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E, O'Donnell K (2002) Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the tri-chothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic Fusarium. Proceeding of National Academy of Science, USA, 99: 9278–9283.

Windels CE (2000) Economic and social impacts of Fusarium head blight: changing farms and rural communities in the northern Great Plains. Phytopathology 90: 17–21.

Yao JB, Lu WZ (2000) Research advances in wheat breeding for scab resistance in China. Jiangsu Journal of Agricultural Science 16:242–248.

Yang L, van der Lee T, Yang X, Yu D, Waalwijk C. (2008) Fusarium populations on Chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles. Phytopathology 98(6): 719-727.

Zamanizadeh HR, Khorsandi H (1995) *Fusarium* spp. And their mycotoxins in wheat of Mazandaran province. Iranian Journal of Plant Pathology 23: 31-37.

Zhang JB, Li, HP, Dang FJ, Qu B, Xu YB, Zhao CS, Liao YC (2007) Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from Chinese Mycological Research 111: 967-975.