دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۵، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (ص۳۷-۲۹)

مطالعهٔ تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Fusarium verticillioides* عامل بیماری پوسیدگی ریشهٔ برنج با استفاده از نشانگر SSR

خشنود نوراللهی[1*]، زینب حقی[2] و علی اشرف مهرابی اولادی[3]
۱، ۲و۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیاران، دانشگاه ایلام، ایران.
(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۷ - تاریخ تصویب: ۹۳/۶/۲۵)

چکیده

بیماری پوسیدگی ریشهٔ ناشی از *Fusarium verticillioides* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج در ایلام است. برای تعیین تنوع ژنتیکی بیمارگر در شالیزارهای استان ایلام، تعداد ۵۶ نمونهٔ آلوده از مزارع شهرستان‌های مختلف جمع‌آوری شد. پس از کشت، خالص‌سازی و شناسایی جدایه‌ها، آزمون مولکولی با استفاده از پنج جفت آغازگر ریزماهواره انجام گرفت. از آغازگرهای ریزماهواره ۲۶ آلل در جدایه‌ها تکثیر شد. میانگین تعداد آلل در هر جایگاه ۵/۲ است، بیشترین تعداد به میزان ۴۰ آلل در جایگاه‌های ژنی 5H08 و 5H09 و کمترین تعداد به میزان ۲۴ در جایگاه 5H12 مشاهده شد. شاخص چندشکلی نشانگرها در آغازگر 5H07 با ۰/۳۷ بیشترین و آغازگر 4H18 با ۰/۱۴ کمترین مقدار را دارا بودند. توزیع مقادیر PIC به‌طور میانگین برای کل نشانگرها ۰/۲۵ بود. براساس دندروگرام در سطح تشابه ۸ درصد، جدایه‌ها در ۱۰ گروه قرار گرفتند. نتایج تجزیهٔ واریانس مولکولی نشان داد که ۹۸ درصد از تنوع ژنتیکی در بین کلیهٔ جدایه‌ها و تنها ۲ درصد آن به مناطق مختلف جغرافیایی اختصاص دارد. بنابراین بین جدایه‌ها از مناطق مختلف شباهت ژنتیکی زیادی وجود داشت. شباهت ژنتیکی بالا را می‌توان به مهاجرت ژن یا ژنوتیپ در اثر عوامل مختلف نسبت داد.

واژه‌های کلیدی: برنج، تنوع ژنتیکی، *Fusarium verticillioides*، SSR.

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) از قدیمی‌ترین گیاهانی است که پس از گندم بیشترین سطح زیر کشت اراضی جهان را به خود اختصاص داده است و نقش چشمگیری در تغذیهٔ مردم جهان و ایران دارد (Padasht *et al*., 1987). بیماری باکانهٔ برنج به‌طور گسترده در برنج‌کاری‌های مناطق حاره و معتدلهٔ جهان پراکنده است و به نام‌های مختلف باکانه (Bakanae)، قدکشیدگی، سرسفیدی در کشورهای مختلف معروف است (Sun & Synder,1981; Booth, 1971). بیماری پوسیدگی ریشهٔ برنج به‌وسیلهٔ *Fusarium moniliformes* Sheldon ایجاد می‌شود (Sheldon, 1904). این گونه در کلید شناسایی Gerlach & Nirenberg (1982) به *F. verticillioides* Nirenberg تغییر نام یافته است. این بیماری در سال ۱۹۱۹ نیز در تایوان مشاهده شد و اولین بار توسط فوجی کوری از ژاپن گزارش شد (Nirenberg, 1981). قارچ *F. moniliforme* در ایران ابتدا توسط Sharif & Ershad (1966) از استان‌های گیلان و مازندران روی برنج گزارش شد (Okhovvat, 1999). این بیماری اولین بار در اواخر سال ۱۳۴۳ توسط Ebrahim nasab (1963) در دهستان شالگوراب از توابع شهرستان فومن مشاهده شد و میزان خسارت آن را در مزرعه ۸-۵ درصد تخمین زده شد. گیاهان آلوده در مزرعه و خزانه نسبت به گیاهان سالم بلندترند (Saremi *et al*., 2008).

این بیماری در برنج موجب پوسیدگی ریشه می‌شود و مهم‌ترین علائم آن به‌صورت پوسیدگی و از بین رفتن ریشهٔ گیاه، سفید شدن خوشه‌ها و پوکی دانه ظاهر می‌شود. مرگ گیاهچه در مرحلهٔ اولیه، کاهش و خشک شدن برگ‌ها در اواخر آلودگی صورت می‌گیرد. دانه‌ها هنگام بلوغ خالی و عقیم می‌شوند (Karov *et al*. 2009). این قارچ میکوتوکسین‌هایی تولید می‌کند که سلامت انسان و دام را تهدید می‌کند (Aghili *et al*.,

*تلفن: ۰۸۴۱۲۲۲۷۰۱۵
E-mail: nourollahi52@yahoo.com

(2010). بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه خسارت چشمگیری در برنج ایجاد کرده و با کاهش کمی محصول خسارت زیادی وارد می‌کند (Padasht *et al*., 1987). خاکزاد بودن قارچ عامل بیماری نیز موجب عدم کارایی سموم شیمیایی می‌شود (Aghili *et al*., 2010). افزایش سطح کشت برنج و عدم استفاده از ارقام مقاوم در مزارع آلوده به عامل بیماری، موجب گسترش بیماری می‌شود (Saremi, 2005). بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعهٔ ساختار جمعیت درون گونه‌های قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی به‌منظور دستیابی به ارقام مقاوم و تناوب زراعی در راستای کاهش بیماری یا مدیریت آن ضروری است. تغییرات ژنتیکی در قارچ‌های بیمارگر از جنبهٔ تهیهٔ ارقام مقاوم حائز اهمیت است. ردیابی این تغییرات با روش‌های سنتی مستلزم صرف هزینهٔ زیاد و از دست رفتن زمان خواهد بود. استفاده از روش‌های مولکولی در تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های بیمارگر موجب کسب اطلاعات مربوط به وقوع نوترکیبی در زمینهٔ ژنتیکی آنها می‌شود (McDonald, 1997). تاکنون از نشانگرهای مولکولی مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها به‌ویژه قارچ *F. verticillioides* استفاده شده است. در تحقیق حاضر برای اولین بار در ایران تنوع ژنتیکی این قارچ در برنج با استفاده از نشانگر ریزماهوارهٔ SSR بررسی شده است. نشانگرهای SSR قطعات کوچکی از DNA هستند که در موتیف ۶-۱ بازی یک تکرار پشت سرهم را تکثیر می‌کنند (Datta *et al*., 2011). در حال حاضر، نشانگرهای ریزماهواره به‌دلیل پوشش مناسب ژنومی و تکرارپذیری بالا یکی از مناسب‌ترین و کامل‌ترین ابزارهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های بسیار نزدیک به هم به‌شمار می‌آیند. در مورد تنوع ژنتیکی قارچ *F. verticillioides* عامل بیماری پوسیدگی ریشهٔ برنج به‌وسیلهٔ نشانگر مولکولی SSR مطالعات زیادی در نقاط مختلف جهان انجام نگرفته است. Damadzadeh (2003) جدایه‌های قارچ *F. moniliforme* عامل پوسیدگی طوقهٔ برنج را به کمک نشانگر مولکولی RAPD بررسی کرد و نشان داد که ضریب همبستگی معناداری بین مقدار رشد پرگنهٔ قارچ در ظرف پتری و تأثیرگذاری قارچ روی ارتفاع وجود دارد. در مطالعهٔ دیگری Mirzadi gohari *et al*., (2008) تنوع ژنتیکی گونهٔ *F. verticillioides* را با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی به‌دست آوردند. در این بررسی که روی ۴۴ جدایه صورت گرفت، ۲۱ جدایه در یک گروه VCG و بقیهٔ جدایه‌ها در سایر گروه‌های VCG قرار گرفتند. در سال ۲۰۰۹ تنوع ژنتیکی و سازگاری جمعیت قارچ *F. graminearum* روی برنج با استفاده از نشانگر AFLP در کره جنوبی بررسی شد و از استان‌های جنوبی و شرقی کره جنوبی لینکاژهای زیادی به‌دست آمد که نتایج نشان داد لینکاژ ۳ ممکن است یک برتری میزبانی نسبت به سایر پیوندها در برنج داشته باشد (Lee *et al*., 2009). بوگل (Bogle, 2006) ویژگی‌های مولکولی جدایه‌های فوزاریوم در اتیوپی را با استفاده از نشانگرهای AFLP، RAPD و SSR بررسی کرد. در بررسی با نشانگر SSR تعداد آلل‌های تکثیرشده از ۲ تا ۱۵ در هر پرایمر به‌دست آمد. تنوع مولکولی جدایه‌های پژمردگی آوندی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis* روی عدس در هند با استفاده از نشانگرهای SSR، RAPD و PCR- RFLP بررسی شد، براساس این مطالعه سه نشانگر مولکولی درجهٔ بالایی از تنوع ژنتیکی در جدایه‌ها را از خود نشان دادند (Datta *et al*., 2011). این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف عامل غالب بیماری پوسیدگی ریشهٔ برنج از مناطق مختلف برنج‌کاری در استان ایلام به کمک نشانگر مولکولی SSR انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در سال زراعی ۱۳۹۱-۱۳۹۰ نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی از ریشه‌های آلودهٔ برنج در مزارع مناطق برنج‌کاری استان ایلام از جمله دره‌شهر، شیروان، سرابله، لومار و تنگه‌قیر صورت گرفت. نمونه‌ها در پاکت‌های مقوایی گذاشته شده و پس از ثبت مشخصات گیاه بیمار، مزرعه، منطقه و تاریخ نمونه‌برداری، به‌منظور بررسی به آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی منتقل شدند.

جداسازی و شناسایی قارچ *F. verticillioides*

ابتدا ریشهٔ نمونه‌های جمع‌آوری‌شده با آب شست‌وشو داده شدند و پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و شست‌وشو با آب مقطر سترون روی کاغذ صافی

خشک شدند و در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار تحت شرایط سترون کشت داده شدند. کشت‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت هفت روز در انکوباتور نگهداری شدند. پس از تشکیل پرگنهٔ قارچ عامل بیماری، پرگنه‌های تشکیل‌شده در محیط کشت به محیط‌های جدید PDA انتقال داده شدند. سپس جدایه‌های خالص به روش تک‌اسپور تهیه شد و در تشتک‌های پتری و لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت PDA به‌منظور انجام مطالعات بعدی نگهداری به‌عمل آمد. براساس کلید شناسایی Booth (1977) جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* شناسایی شدند. با توجه به غالب بودن جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* کارهای مولکولی براساس این جدایه‌ها صورت‌گرفت (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های به‌دست‌آمده از مناطق مختلف برنج‌کاری در استان ایلام

میزبان Host	مکان نمونه‌برداری Location	تعداد جدایه‌ها Isolates Number
Oryza sativa(برنج)	(Darehshahr)دره‌شهر	۸
"	(Shirvan)شیروان	۸
"	(Sarableh)سرابله	۶
"	(Tangghir)تنگه قیر	۸
"	(Lomar)لومار	۹

استخراج DNA جدایه‌ها

به‌منظور تهیهٔ میسلیوم قارچی برای استخراج DNA، مقدار کمی از میسلیوم جدایه‌های قارچی هفت‌روزهٔ رشدداده‌شده روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) به ظرف‌های ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع سیب‌زمینی- دکستروز (PDB) منتقل شد. ارلن‌های حاوی قارچ به مدت ۱۰-۷ روز در انکوباتور شیکردار (۱۳۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) قرار داده شدند. سپس میسلیوم به‌دست‌آمده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شمارهٔ یک و پمپ خلأ جدا شد و با آب مقطر سترون شست‌وشو داده شدند تا باقی‌ماندهٔ محیط مایع از روی سطح میسلیوم شسته شود. بافت‌های میسلیومی قارچ در ویال‌های شیشه‌ای جمع‌آوری شده و در فریزر در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی جدایه‌ها براساس پروتکل Doyel & Doyel CTAB (1990) با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای بررسی کیفیت و کمیت DNA پنج میکرولیتر از محلول DNA با دو میکرولیتر بافر رنگ 6x (۰/۲۵ درصد برموفنل بلو، ۰/۲۵۰درصد زایلن سیانول FFو ۳۰ درصد گلیسرول) مخلوط شد و در ژل آگارز یک درصد الکتروفوز شد.

بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *F. verticillioides* با استفاده از نشانگر ریزماهوارهٔ SSR

به‌منظور انجام دادن واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. verticillioides* با استفاده از نشانگر ریزماهوارهٔ SSR، ابتدا پنج جفت آغازگر ریزماهوارهٔ اختصاصی که چندشکلی بالایی داشتند، مورد استفاده قرار گرفتند (Ren *et al*., 2012) (جدول ۲). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر نمونه انجام گرفت. مواد و ترکیبات استفاده‌شده شامل بافر 10 X PCR به مقدار ۲/۵ میکرولیتر،(50mM) $MgCL_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، به مقدار ۱/۵ میکرولیتر، dNTP (10Mm) با غلظت ۱۰میلی‌مولار به مقدار ۰/۹ میکرولیتر، از هر جفت آغازگر (Forward, Reverse)، هر کدام به مقدار ۱ میکرولیتر Taq DNA polymerase (250 unit) با غلظت ۲۵۰ واحد به مقدار ۰/۲ میکرولیتر، DNA ژنوم (۲۰ ng/µl) به مقدار ۲/۵ میکرولیتر، آب مقطر سترون ۱۷/۴ میکرولیتر در یک برنامهٔ حرارتی مطابق با دمای ذوب هر آغازگر، به‌صورت جداگانه انجام گرفت.

برای مشاهدهٔ محصول PCR، الکتروفورز با ژل گارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۹۰ ولت و به مدت ۶۰ دقیقه صورت گرفت. برای این منظور ۱/۵ گرم آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE (1X) از طریق حرارت دادن حل شد. برای رنگ‌آمیزی ژل از محلول سیف‌استین به مقدار ۳ میکرولیتر در ۱۰۰ سی‌سی محلول آگارز و قبل از انجام مراحل الکتروفورز استفاده شد. برای مشخص شدن باندهای محصول PCR از دستگاه عکسبرداری Gel Documentation مدل Intas® استفاده شد.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای ریزماهوارهٔ مورد استفاده برای مطالعهٔ جدایه‌های *F. verticillioides*

آغازگر Primer	تکرار توالی motif	توالی آغازگر Primer sequences(5′–3′)	
4H18	$(TTTC)_6$	F:TGATGCGGTCAAAGAATGG	R:ACTGGAGCAGATGAAGAGC
5H07	$(GAAA)_{16}$	F:GTAGCGGTTATGGTTCCCTC	R:CGTGATGCGATTCTGGTTG
5H08	$(CTTT)_6$	F:ACCAACTAACATCCCGAATC	R:CGTAAACTCAAACGCAAGG
9H09	(GT)18	F:ATCGGTGGTTTCTTGCTGC	R:GCTCCCAACTGCCTACCTACA
5H12	$(GAAA)_7$	F:GGCACCAACATTCCTGACG	R:AACCGCCTACAAGCACCA

تجزیهٔ داده‌ها

به‌منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌های *F. verticillioides* ابتدا باندهای واضح در تصاویر ژل‌ها مشخص شدند. سپس داده‌ها به‌صورت حضور باند (۱) یا عدم حضور باند (۰) وارد نرم‌افزارExcel شد. تجزیهٔ خوشه‌ای به کمک نرم‌افزار NTSYS version 2.02 و گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از ضریب شباهت جاکارد (Nei & Li, 1979)، و الگوریتم Neighbor joining انجام گرفت. برای بررسی قدرت تفکیک نشانگرها، محتوای اطلاعاتی چندشکلی (Polymorphic Information Content) PIC هر نشانگر با استفاده از نرم‌افزار Excel و مطابق با فرمول زیر محاسبه شد (Mohammadi 2003).

$$PIC=1-\sum p^2-q^2$$

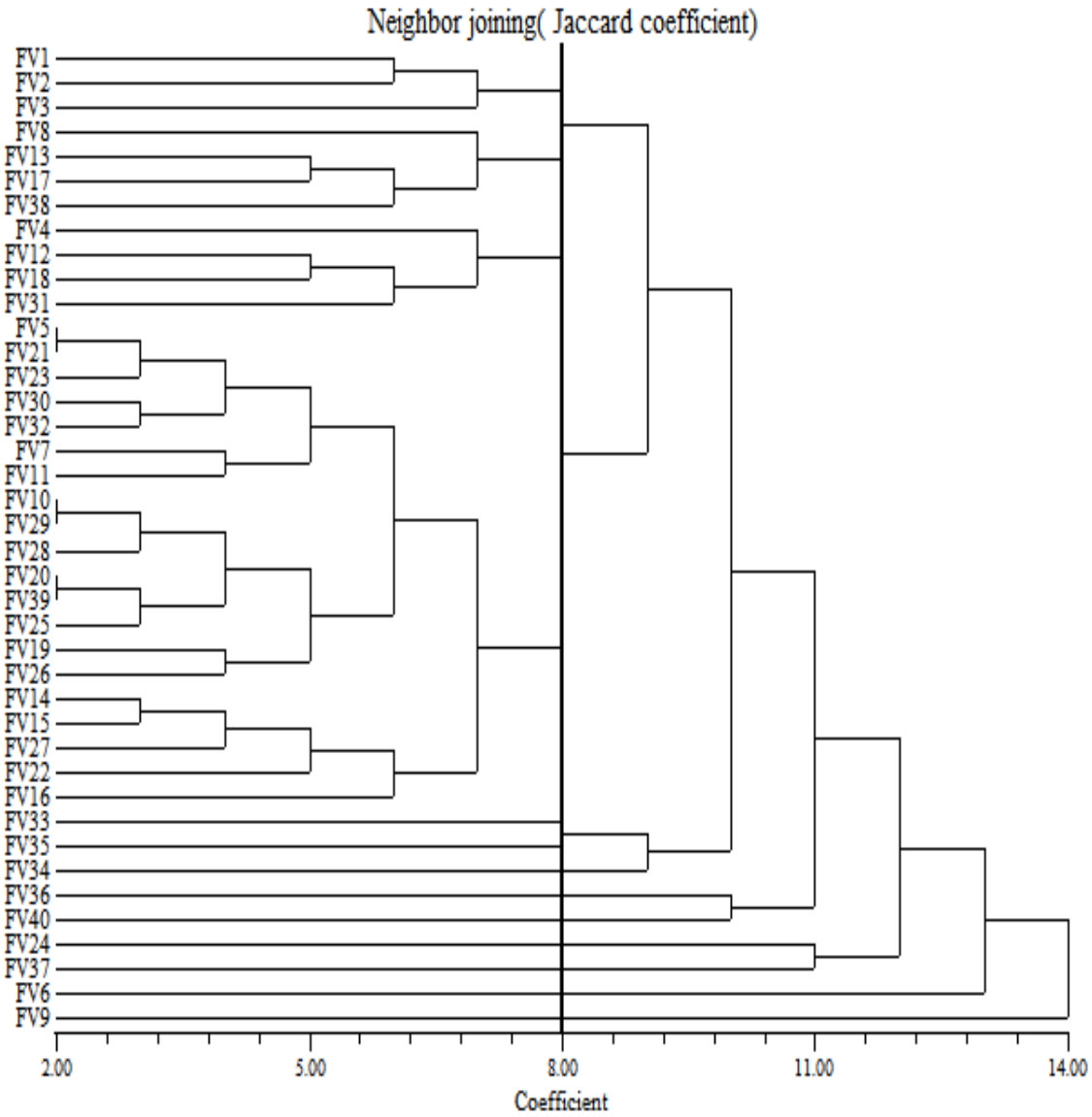
در این رابطه، p تعداد کل افرادی که دارای باند هستند به کل افراد است، و q نیز از (1-p) به‌دست می‌آید. برای بررسی تنوع آللی در جدایه‌های مورد مطالعه از تجزیه به مختصات اصلی (Principal Coordinate Analysis; PCoA) در جهت تکمیل تجزیهٔ خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYS version 2.02 انجام گرفت. به‌منظور تمایز بین گروه های اصلی به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های قارچ نیز تجزیهٔ واریانس مولکولی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Gen Alex ver.6.5 انجام گرفت.

نتایج و بحث

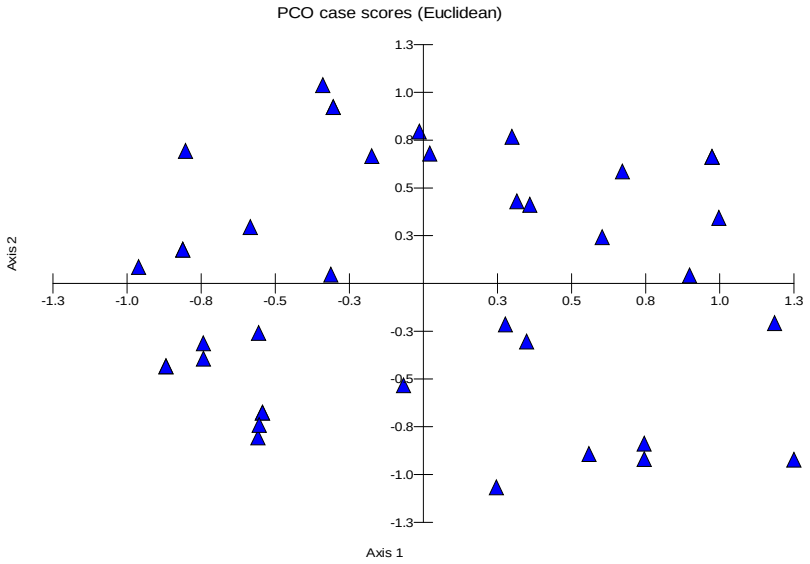
براساس کلید شناسایی Booth (1977) سه گونه قارچ *F. solani*، *F. verticillioides* و *F. oxysporum* شناسایی شد. با توجه به غالب بودن جدایه‌های قارچ *F. verticillioides* این جدایه‌ها برای بررسی تعیین تنوع ژنتیکی به کمک نشانگر ریزماهوارهٔ SSR انتخاب شدند.

در این تحقیق تنوع ژنتیکی قارچ *F. verticillioides* با به‌کارگیری آغازگرهای ریزماهوارهٔ SSR برای اولین بار در ایران بررسی شد. داده‌های حاصل از نشانگر به‌صورت وجود باند و نبود باند است. مجموع ۱۵۴ باند DNA مشاهده شد. مقدار آلل‌های تکثیرشده در آغازگرهای مختلف ۲۶ آلل محاسبه شد. میانگین تعداد باند در هر جایگاه ۵/۲ است. بیشترین تعداد باند ۴۰ عدد در جایگاه‌های ژنی 5H08 و 5H09، و کمترین تعداد باند ۲۴ در جایگاه 5H12 قرار به‌صورت وجود باند و نبود باند است. با بررسی مقدار شاخص چندشکلی نشانگرها (PIC) آغازگر 5H07 با ۰/۳۷ بیشترین و آغازگر 4H18 با ۰/۱۴ کمترین میزان چندشکلی را دارا بودند. درصد چندشکلی برای همهٔ آغازگرها ۱۰۰٪ مشاهده شد. برای کل نشانگرها توزیع مقادیر PIC به‌طور میانگین ۰/۲۵ بود. میزان تشابه ژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از الگوریتم‌هایی چون UPGMA و Neighbor Joining که برای تجزیهٔ خوشه‌ای به‌کار رفت، بررسی شد. الگوریتم Neighbor Joining گروه‌بندی مناسب‌تری نسبت به سایر الگوریتم‌ها نشان داد و مقدار ضریب همبستگی (Cophenetic) محاسبه‌شده برای این الگوریتم با ماتریس تشابه جاکارد r=۰/۸۲۹ است که برازش مناسبی بین دندروگرام و ماتریس تشابه را نسبت به سایر دندروگرام‌ها نشان داد و در نرم‌افزار NTSYS version 2.02 انتخاب این الگوریتم تأیید شد. جدایه‌ها در دندروگرام فاصلهٔ ژنتیکی در فاصلهٔ ۱۴-۲ براساس الگوریتم Neighbor Joining با ضریب تشابه ۸ درصد در ۱۰ گروه مجزا قرار گرفتند (شکل۱). این دندروگرام شامل ۱ گروه ۷ عضوی، ۱ گروه ۲۴ عضوی، ۱گروه ۳ عضوی، ۲ گروه ۲ عضوی و ۲ گروه ۱ عضوی است. در این دندروگرام بیشتر جدایه‌ها در یک گروه قرار گرفتند. در این دندروگرام جدایه‌های FV21 و FV5 از جمعیت تنگه قیر FV10 و FV29 از لومار و شیروان و همچنین

جدایه‌های FV20 با FV39 از جمعیت‌های لومار و شیروان ۱۰۰٪ شباهت ژنتیکی مشاهده شد. قرار گرفتن جدایه‌های یک منطقهٔ جغرافیایی در دو گروه مستقل و جدایه‌های مناطق مختلف در یک گروه بیانگر این مطلب است که عامل منطقهٔ جغرافیایی با وجود مفید بودن در گروه‌بندی جدایه‌ها نمی‌تواند به‌عنوان فاکتور کامل و مستقل در این زمینه مورد استفاده قرار گیرد. نتایج این تحقیق با نتایج بررسی Rahjoo *et al.*, (2008) و میرزادی گوهری و همکاران (Mirzadi Gohari *et al.* 2008) که تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. verticillioides* را به‌ترتیب با استفاده از نشانگرهای AFLP و گروه‌های سازگار رویشی بررسی کردند، از این نظر مطابقت دارد.



شکل ۱. دندروگرام تشابه بین ۴۰ جدایهٔ *F. verticillioides* با استفاده از پنج آغازگر SSR به روش Neighbor joining و ضریب تشابه جاکارد



شکل۲. نمودار دوبعدی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی پراکنش جدایه‌های *F. verticillioides* براساس نشانگر SSR

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) روش آماری چندمتغیرهٔ مشابه با تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در مورد داده‌های کمی است که در تنوع ژنتیکی کاربرد زیادی دارد. به‌نظر می‌رسد این روش در تمایز میان گروه‌های اصلی مفید باشد، درحالی که تجزیهٔ خوشه‌ای وضوح بیشتری میان جمعیت‌های نزدیک به هم را نشان می‌دهد (Abdel-Satar *et al.* 2003). براساس دو محور (بای پلات) از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی جدایه‌ها بررسی شدند (شکل۲). این نمودار پراکنش جدایه‌ها را نشان می‌دهد و جدایه‌ها را می‌توان در چندین گروه به تفکیک مشاهده کرد. پراکنش جدایه‌ها در تمامی محورهای مختصات معرف تنوع ژنتیکی بالای جدایه‌هاست. این نتیجه با نتایج Abdel-Satar *et al.*, (2003) که بر روی چند گونه فوزاریوم صورت گرفته است، مطابقت دارد. با توجه به نتایج حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای براساس ضریب جاکارد و تجزیه به مؤلفه اصلی جدایه‌های بررسی‌شده می‌توان به این نتیجه رسید که نشانگر SSR روش مفیدی در بررسی تنوع ژنتیکی در جدایه‌های *F. verticillioides* است. برای بررسی سهم تنوع آللی (واریانس) درون و بین جمعیت‌ها تجزیهٔ واریانس مولکولی با نرم‌افزار Gen Alex ver. 6.5 انجام گرفت (جدول۳).

جدول ۳. نتایج تجزیهٔ واریانس مولکولی (AMOVA) داده‌های تجزیهٔ SSR مربوط به ۵ جمعیت *F. verticillioides* متعلق به پنج منطقهٔ جغرافیایی

منبع تغییرات	درصد واریانس	میانگین مربعات(MS)	مجموع مربعات ss	درجهٔ آزادی df	PhiPT
بین‌جمعیت‌ها	۲	۲/۷۲۶	۱۰/۹۰۳	۴	۰/۲۱۵
درون‌جمعیت‌ها	۹۸	۲/۲۸۷	۷۷/۷۶۹	۳۴	
کل	۱۰۰		۸۸/۶۶۸	۳۸	

نتایج جدول تجزیهٔ واریانس مولکولی نشان داد که ۹۸ درصد از تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده در بین کلیهٔ جدایه‌های جمعیت‌های مختلف مشترک و تنها ۲ درصد از واریانس مولکولی آلل‌های شناسایی‌شده مختص به جمعیت‌ها یا مناطق مختلف جغرافیایی است. این نتیجه حاکی از عدم تمایز معنادار جدایه‌های جمع‌آوری‌شده از جمعیت‌های مختلف است. به‌عبارتی بین جدایه‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف نمی‌توان اشتقاق ژنتیکی معناداری را گزارش کرد. از این نظر بیشترین شباهت را نشان دادند. علت این شباهت ژنتیکی بالا را می‌توان به عوامل تأثیرگذار در تغییرات ژنتیکی از جمله جریان ژنی (Gen flow) نسبت داد. در مناطق مختلف جهان مطالعات مختلفی در این مورد گزارش و سطوح مختلفی از تنوع نشان داده شده است. تنوع ژنتیکی در

جمعیت قارچ *F oxysporum.* f. sp. *Lentis* در میان ۵۰ جدایه از هند با استفاده از نشانگر SSR در سال ۲۰۱۱ بررسی شد که ۲۶ آلل شناسایی شد (Datta *et al*., 2011). در تحقیق Bogle (2006) در سال ۲۰۰۶ در بررسی ۶۴ جدایه با استفاده از ۹ جایگاه ریزماهواره ۷۱ آلل تکثیر شد. در این مطالعه بیشترین تنوع ژنتیکی در داخل جدایه‌های منطقه‌ای دیده شد و به همان نسبت سطوح پایینی از تنوع ژنتیکی در میان پنج منطقهٔ مورد مطالعه شناسایی شد. در بررسی Sahran & Naef (2008) در هند بین جدایه‌های مختلف فوزاریوم تنوع ژنتیکی زیادی مشاهده شد. نتیجهٔ تحقیق حاضر با بررسی رهجو و همکاران (Rahjoo *et al*. 2008) در زمینهٔ تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. verticillioides* عامل پوسیدگی بلال که نشان داد میزان تنوع درون هر جمعیت زیاد (۹۱ درصد) و بین جمعیت‌ها کم (۹ درصد) بود مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ عامل پوسیدگی ریشهٔ برنج از نشانگر ریزماهوارهٔ SSR استفاده شد. مزیت‌های این تشانگر کاربرد و تفسیر نتایج نسبتاً ساده، سیستم چندآللی و هم‌بارز بودن آن است و مزیت این نشانگر نسبت به نشانگرهای RAPD و PCR-RFLP اختصاصی بودن بالای آن و پلی‌مورفیسم بالا و قابلیت تکثیر (تکرارپذیری) خوب است (Naghavi *et al*, 2009).

با بررسی جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از دندروگرام ترسیم‌شده با ضرایب جاکارد و بین جدایه‌های مناطق مختلف شباهت ژنتیکی وجود دارد که این نتایج ارتباط شباهت ژنتیکی با منشأ جغرافیایی را رد می‌کند. از لحاظ جغرافیایی در این مطالعه مشخص شد که جدایه‌ها شباهت ژنتیکی زیادی دارند. در بین جدایه‌ها، در جدایه‌های لومار بیشترین تنوع ژنتیکی مشاهده شد.

جریان ژنی یکی از نیروهای تکاملی است که نقش بسیار مهمی در تنوع ژنتیکی یک جمعیت دارد. در غیاب جریان ژنی، ریزش ژنتیکی موجب تفاوت در فراوانی آلل‌ها در جایگاه‌های ژنی خنثی درون جمعیت و افزایش تمایز جدایه‌ها در جمعیت‌ها می‌شود. در جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق تمایز ژنتیکی کمی وجود دارد، چندین عامل ممکن است عامل این تمایز باشند: فاصلهٔ جغرافیایی میان جدایه‌ها زیاد نیست و همین فاصلهٔ جغرافیایی ممکن است سبب نقل و انتقال بیماری از طریق بذر آلوده، جابه‌جایی بقایای گیاهی و ادوات کشاورزی شود. با توجه به اینکه این بیماری بذرزاد است، می‌توان گفت مبادلهٔ بذور آلوده عمومی‌ترین عامل به‌حساب می‌آید، زیرا کشاورزان از بذر محصول برای کشت سال بعد استفاده می‌کنند. همین مسئله ممکن است با توجه به شرایط مناسب آب و هوایی برای بیماری موجب ایجاد خسارت شود. همچنین خاکزاد بودن عامل بیماری ممکن است دلیل آلودگی بیشتر باشد. اصلاح ارقام مقاوم یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل بیماری پوسیدگی ریشهٔ برنج است. برای بررسی روش‌های کنترل و تأثیر آنها دانستن اطلاعات تنوع ژنتیکی جمعیت بیمارگر بسیار مهم و حائز اهمیت است. همچنین اطلاع از تولیدمثل جنسی بیمارگر که سبب نوترکیبی و مبادلهٔ آلل‌ها، افزایش تنوع در جمعیت بیمارگر و همچنین موجب ایجاد پتانسیل سازگاری با شرایط محیطی و میزبان می‌شود، نقش مهمی دارد. بنابراین می‌توان با بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت این بیمارگر، با کاربرد ترکیب‌های مختلف ژن‌های مقاوم برای رسیدن به مقاومت پایدار گام برداشت. همچنین بررسی تنوع بیماری‌زایی و تعیین نژادهای غالب قارچ عامل بیماری در کشور، تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت قارچ *F. verticillioides* در یک مزرعه با استفاده از نشانگر SSR ، تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت قارچ *F. verticillioides* در دیگر مناطق شیوع بیماری و تعیین تیپ‌های جنسی قارچ برای اطلاع از وضعیت پایداری قارچ در محیط در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود.

REFERENCES

1. Abdel-Satar, M.A., Khalil, M.S., Mohmed, I.N., Abd-Elsalam, K.A. & Andverreet, J.A. (2003). Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. *African Journal of Biotechnology*, 2, 51-55.

2. Aghili, S.R., Khosravi, A.R., Shokohi, T., Salmanian, B., Shokri, H. & Nikaeen, O. (2010). Ability to fumonisin B_1 by *Fusarium* species, section *Liseola*, isolated form unpolished rice in Mazandaran, Iran. *World Journal of Zoology*, 5, 314.
3. Bogale, M. (2006). *Molecular characterization of Fusarium isolates from Ethiopia*. ph.D. dissertation. Pretoria university, Pretoria, South Africa.
4. Booth, C. (1971). *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, UK.
5. Damadzadeh, M. (2003). Identification of isolates of *Fusariummoniliforme* the causal agent of rice foot rot disease, using RAPD molecular markers. *Journal of Nahal & Bazr*, 2, 224-227. (In Farsi).
6. Datta, S., Choudhary, R. G., Shamim, M. ◌D., Singh, R.K. & Dhar, V. (2011). Molecular diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* inciting wilt disease in lentil. *African Journal of Biotechnology*, 10, 7314-7323.
7. Doyle, J J. & Doyle, J.L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12,13.
8. Ebrahim nasab, F. (1963). *Crown rot of rice*. EncyclopediaofPlant Protection, pests, diseases andweeds, (p. 572). (In Farsi).
9. Gerlach, W.&Nirenberg, H. (1982). The genus *Fusarium*: A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fur Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*.
10. Karov, K.I.M. & Mitrev, S. K. (2009). New parasitical fungus on rice in the republic of Macedonia. *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad*, 116, 175-182.
11. Lee, J.C., Chang, I.Y., Kim, H., Yun, S.H., Leslie, J.F.& Lee, Y. W. (2009). Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3289-3295.
12. Leslie, J.F., Zeller, K.A., Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A. & Ritieni, A. (2004). Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2254–2262.
13. McDonald, B.A. (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87, 448.
14. Mirzadi Gohari, A., Javan-Nikkhah, M., Hedjaroude, G.A., Abbasi, M., Rahjoo, V. & Sedaghat, N. (2008). Genetic diversity of *Fusarium verticillioides* isolates from maize in IRAN based on vegetative compatibility grouping. *Journal of Plant Pathology*, 90, 113-116.
15. Mohammadi, S.A. & Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant: Salientical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 1235-1248.
16. Morid, B. & Hajmansoor, Sh. (2012). Analysis of Iranian isolates of *Fusarium solani* using morphological, pathogenicity and microsatellite DNA marker characterization. *African Journal of Biotechnology*, 11, 474-482. (In Farsi).
17. Naghavi, M.R., Ghariazi, B., Hosseini Salkadeh, G. (2009*). Molecular markers*(3th.ed.). (pp.)Tehran, Tehran University Press, Tehran. (In Farsi).
18. Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 76, 379.
19. Nirenberg, H. (1976). Untersuchungen Uber die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion LiseolaMitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fur Landund Forstwirtschaft BBA. Berlin, Germany, Pers. Comm, 167, 111-117.
20. Nirenberg, H.I. (1981). A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Canadian Journal* of *Botany*, 59, 1599–1609.
21. Okhovvat, S.M. (1999). *Cereal Diseases (Barley, Wheat, Rice, Corn and Sorghum).*Tehran: Tehran University Publishing. (In Farsi).
22. Padasht, F., Sharifi-Tehrani, A., Hjavard, Gh.&Okhovvat, M. (1987).The investigation of effectiveness offungicidesin controllingfoot rotdiseaseof rice inGuilan province, *Iranian Journal of Plant Pathology*, 32, 276-268. (In Farsi).
23. Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Bihamta, M.R., Okhovvat, S.M., Mirzadi Gohari, A., Elamin, A & Klemsdal, S.S. (2008). Study of genetic variation in isolates of *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, the causal agent of *Fusarium* ear rot of corn using AFLP markers. *Journal of Nahal & Bazr*, 24, 447-457. (In Farsi).
24. Ren, X., Zhu, Z.D., Li, H.J., Duan C.X. & Wang X.M. (2012). SSR marker development and analysis of genetic diversity of *fusarium verticillioides* isolated from maize in china. *Scientia Agricultural Sinica*, 45, 52-66.
25. Saharan, M.S & Naef, A. (2008). Detection of genetic variation among Indian wheat head scab pathogens (*Fusarium* spp./isolates) with microsatellite markers. *Crop Protection*, 27, 1148-1154.

26. Saremi, H. (2005). *Biology, Ecology and Taxonomy of Fusarium*. Jahad daneshgahi Publication. (in Farsi).
27. Saremi, H., Ammarellou, A., Marefat, A. & Okhovvat, S.M. (2008). Binam a rice cultivar, resistant for root rot disease on caused by *Fusarium moniliforme* in northwest, Iran. *International Journal of Botany*, 4, 383-389.
28. Sheldon, J.L.(1904). A corn mold(*Fusarium moniliforme*), annual report :nebraska.
29. Sun, S.K. & Snyder, W.C. (1981). *The Bakanae disease of the rice plant in Fusarium disease, biology*. London: The Pennsylvania State University Press.