

فیلوژنی و تنوع ژنتیکی گونه مرکب *Fusarium graminearum* مرتبط با سوختگی فوزاریومی خوشه گندم در دشت مغان*

دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۰ / پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۱

کسری شریفی: دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
 رسول زارع: استاد پژوهش، بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
 حمیدرضا زمانی‌زاده: استادیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران (h zamani@srbiau.ac.ir)

منصوره میرابولفاتی: استادیار پژوهش، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
 سعید رضائی: استادیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

چکیده

خصوصیات فیلوژنتیکی ۳۷ جدایه متعلق به گونه مرکب *F. graminearum*، جدا شده از خوشه گندم با علائم بیماری سوختگی فوزاریومی از مناطق مختلف کشت گندم در دشت مغان، استان اردبیل تعیین شد. بخشی از ژن‌های translation elongation factor 1-alpha (*TEF*)، reductase (*RED*) و UTP-ammonia ligase (*URA*) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر، تعیین توالی و با الگوریتم تحلیل امساکی تجزیه شد. همه سویه‌های گونه مرکب *F. graminearum* متعلق به *F. graminearum* sensu stricto بودند. نتایج فیلوژنی نشان‌دهنده وجود همگنی ژنتیکی در بین جدایه‌های گونه مرکب *F. graminearum* بود. به منظور ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت قارچ *F. graminearum* s.s. از نشانگر ISSR استفاده شد. پنج آغازگر واجد چندشکلی زیاد و تکرارپذیری بالا برای تکثیر DNA جدایه‌ها استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌ها، با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام و ژنوتیپ‌ها را در سطح تشابه ۸۲٪ به چهار گروه مجزا تفکیک کرد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان‌دهنده، بیشترین تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت *F. graminearum* s.s. (۹۷٪) و کمترین در بین جمعیت‌ها (۳٪) بود. شناسایی فیلوژنتیکی و آگاهی از تنوع ژنتیکی عامل اصلی بیماری FHB، در تعیین روند تکامل بیمارگر و استراتژی‌های مدیریت بیماری مفید خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: آغازگرهای ریزماهواره، سوختگی خوشه، *ISSR*، *URA*، *TEF*، *RED***Phylogeny and genetic diversity of *Fusarium graminearum* species complex associated with Fusarium head blight of wheat in Moghan plain (Iran)**

Received: 09.04.2017 / Accepted: 12.08.2017

Kasra Sharifi: PhD Student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Rasoul Zare: Research Prof., Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Hamid Reza Zamanizadeh: Prof., Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (h zamani@srbiau.ac.ir)

Mansoureh Mirabolfathy: Research Prof., Department of Plant Diseases, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Saeed Rezaee: Assistant Prof., Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Summary

Thirty-seven isolates of *Fusarium graminearum* species complex obtained from wheat heads with Fusarium head blight symptoms were selected and used for phylogenetic studies. They were collected from different localities of Moghan plain (Ardebil province, Iran). Partial sequences of translation elongation factor 1-alpha (*TEF*), putative reductase (*RED*) and UTP-ammonia ligase (*URA*) genes were amplified using specific primers and sequences were analyzed using Maximum Parsimony method. Almost all strains of *F. graminearum* species complex belonged to *F. graminearum* sensu stricto. The results indicated homogeneity within *F. graminearum* species complex. Inter-simple sequence repeat markers (ISSR) were employed to study the genetic structure of *F. graminearum* s.s. populations collected from five localities in Moghan plain. The ISSR markers were generated by five primers and data analysed using UPGMA method with Jaccard's coefficient. Cluster analysis showed that all isolates were divided into four clades with 82% similarity level. The analysis of molecular variation indicated that most of the gene diversity (97%) was distributed within populations, whereas 3% of the variation was found among populations. Phylogenetic species identification and genetic diversity knowledge of major agent of FHB disease will be useful in defining the risk of pathogen evolution as well as benefiting disease management strategies.

Keywords: Microsatellite markers, *RED*, *TEF*, *URA*, wheat scab

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول به راهنمایی دکتر حمیدرضا زمانی‌زاده و دکتر رسول زارع ارائه شده به دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران

مقدمه

28S rDNA تجزیه و تحلیل فیلوژنی نمودند. نتایج این تحقیق، بسیاری از ابهامات موجود در این گروه را روشن کرد، به طوری که از ۴۵ گونه تشخیص داده شده، ۲۳ گونه جدید بودند. در اوایل دهه ۲۰۰۰ میلادی مفهوم گونه فیلوژنتیکی با امکان پذیر شدن استفاده از توالی یابی چند جایگاه ژنی در قارچها تقویت شد (Taylor et al. 2000). در این راستا، بررسی‌های متعددی در خصوص گروه FGSC نیز صورت گرفت، به طوری که پژوهش‌های دهه اخیر نشان می‌دهد که این گروه گونه‌ای متشکل از ۱۵ گونه فیلوژنتیکی است (O'Donnell et al. 2004, Sarver et al. 2011). مهم‌ترین و بیش‌ترین یافته‌های اخیر مربوط بررسی‌های فیلوژنتیکی مبتنی بر آزمون‌های multilocus genotyping (MLGT) است. این گونه‌ها شامل *F. meridionale* T. Aoki et al.، *F. austroamericanum* T. Aoki et al.، *F. boothii* O'Donnell et al.، *F. acaciae-mearnsii*، *F. mesoamericanum* T. Aoki et al.، *F. asiaticum* O'Donnell et al.، *F. aethiopicum*، *F. graminearum* s. str. Schwabe، *F. cortaderiae* O'Donnell et al.، *F. ussurianum* T. Aoki et al.، *F. gerlachii* T. Aoki et al.، *F. louisianense* Gale et al.، *F. vorosii* B. Toth et al.، *F. brasiliicum* T. Aoki et al. و *F. nepalense* T. Aoki et al. می‌باشد (Gilbert & Haber 2013, O'Donnell et al. 2008, Sarver et al. 2011, Yang et al. 2008). براساس بررسی فیلوژنتیکی FGSC قارچ *F. graminearum* sensu stricto تنها عضو این گروه، گونه‌ای غالب در میان سایر گونه‌های مرتبط با بیماری FHB گندم در استان‌های گلستان و مازندران در ایران شناخته شده است (Sharifi et al. 2016).

مطالعه تغییرات ژنتیکی جمعیت در قارچها توسط نشانگرهای مولکولی اطلاعات دقیق و گسترده‌ای را در اختیار محققان قرار داده است. شناخت کافی از انتشار و تنوع ژنتیکی یک بیمارگر در درون جمعیت، به عنوان شاخص مهمی از تغییرپذیری بیمارگر و احتمالاً پایداری نسبی مقاومت گیاه در برابر بیماری می‌تواند اطلاعات مفیدی در راستای مدیریت موفق بیماری فراهم آورد (Keesing et al. 2006). انگشت‌نگاری DNA یکی از روش‌های دقیق و کارآمد در مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها است. روش مبتنی بر تکثیر نواحی بین توالی‌های تکرار شونده ساده یا (Inter simple sequence repeats) ISSR

گندم یکی از اصلی‌ترین محصولات کشاورزی جهت تامین نیاز غذایی در ایران محسوب می‌شود. در سال ۱۳۹۴، سطح برداشت گندم در کشور حدود ۵/۷ میلیون هکتار برآورد شده است. سطح زیر کشت گندم در استان اردبیل حدود ۳۶۳ هزار هکتار است که بیش از صد هزار هکتار از آن مربوط به دشت مغان است (Anonymous 2016).

یکی از بیماری‌های مهم گندم، سوختگی فوزاریومی خوشه (Fusarium head blight) یا FHB است. بیماری سوختگی خوشه گندم یک بیماری ویرانگر غلات دانه ریز محسوب می‌شود که موجب کاهش ۷۰-۳۰ درصدی عملکرد شده و دانه‌های تولید شده از سنبله بیمار، آلوده به زهرابه‌های قارچی مهمی مانند تریکوتسین‌ها (Trichothecenes) و زرالنون (Zearalenone) می‌شود که برای سلامت انسان و دام بسیار خطرناک هستند (McMullen et al. 2012). این بیماری در ایران، از استان‌های اردبیل (دشت مغان)، خوزستان، گلستان، مازندران و هرمزگان گزارش شده (Babadoost 1995, Golzar 1997, Zare & Ershad 1998) که تا به حال خسارت کمی و کیفی قابل توجهی در مزارع گندم بویژه مناطق گلستان، مازندران و دشت مغان به این محصول وارد نموده است.

عوامل بیماری سوختگی خوشه متعلق به گونه‌هایی از جنس فوزاریوم هستند که در بسیاری از کشورها *Fusarium culmorum*، *F. graminearum* Schwabe species complex، *F. avenaceum* و *F. sambucinum* Fuckel (W.G. Sm.) Sacc. (Fr.) Sacc. و قارچ *Microdochium majus* (Wollenw.) Glynn & S.G. Edward، عوامل اصلی به شمار می‌روند (Bottalico & Perrone 2002, Gilbert & Haber 2013). مهم‌ترین عامل این بیماری در جهان (FGSC) *F. graminearum* species complex (O'Donnell et al. 2008, Sella et al. 2014) و در ایران قارچ‌های FGSC و *F. culmorum* معرفی شده است (Davari et al. 2013, Sharifi et al. 2016).

در دهه ۱۹۹۰، مفهوم گونه فیلوژنتیکی با توجه به یافته‌های ژنتیک مولکولی در خصوص قارچها به طور علمی از سوی محققان مختلف در کنار مفهوم گونه‌های مورفولوژیکی و بیولوژیکی مطرح شد (Koufopanou et al. 1997). اودونل و همکاران (O'Donnell et al. 1998) جدایه‌های مربوط به *Gibberella fujikuroi* species complex را با استفاده از جایگاه‌های ژنی mitochondrial small subunit (mtSSU) rDNA β -tub

شناسایی عوامل اصلی بیماری صحه می‌گذارد. بررسی تنوع ژنتیکی عامل اصلی این بیماری اطلاعات مفیدی در جهت مشخص شدن ساختار ژنتیکی جمعیت این بیمارگر در منطقه ارایه خواهد کرد. تعیین و تبیین استراتژی‌های مدیریت بیماری شناخت از عوامل و پراکنش و عملکرد آن‌ها در کشور است. لذا، بررسی فیلوژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت وابسته به گروه گونه‌ای FGSC از اولویت و اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد.

روش بررسی

– جدایه‌ها

از میان ۲۴۳ جدایه FGSC به دست آمده از خوشه‌های گندم آلوده به بیماری FHB، تعداد ۳۷ جدایه با توجه به توزیع جغرافیایی و خصوصیات مورفولوژیکی (از جمله شکل و رنگ پرگنه‌ها) انتخاب و در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفت. جدایه‌ها از پنج منطقه اصلاندوز، اسلام‌آباد، پارس‌آباد، تازه‌کند و بیله‌سوار واقع در دشت مغان (جدول ۱) انتخاب شدند.

یکی از نشانگرهای کاربردی براساس به کارگیری توالی ریزماهورها به عنوان آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به منظور تکثیر نشانگرهای چندآلی می‌باشد. این روش ساده، سریع و سودمند و با قابلیت تکرارپذیری بالا است (Muthu Kumar & Sharma 2011). مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت *F. graminearum* براساس نشانگر ISSR نشان از تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای در جدایه‌های بررسی شده در کشورهای آرژانتین (Consolo et al. 2015) و کانادا (Mishra et al. 2004) داشت و توانست جریان ژنی درون و بین جمعیت‌ها را به خوبی مشخص نماید. این نشانگر قادر به تفکیک گونه‌های فیلوژنتیکی از یکدیگر است. بر این اساس، دو گونه فیلوژنتیکی *F. boothii* و *F. graminearum* s.s. در درون جمعیت گونه مرکب FGSC تفکیک شد (Gai & Gao 2017).

اهمیت گندم در بین محصولات کشاورزی و خسارت مالی و بهداشتی ناشی از بیماری FHB در این محصول بر

جدول ۱- منشأ جغرافیایی جدایه‌های *Fusarium graminearum* species complex به دست آمده از خوشه گندم مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Geographical origin of *Fusarium graminearum* species complex isolates obtained from wheat heads used in this study

Isolate code	Geographic origin	Population area	Sample size
MF1	Aslanduz, Aslanduz, Moghan, Ardabil, Iran	Aslanduz	6
MF2	Boran, Aslanduz, Moghan, Ardabil, Iran		
MF3	Boran, Aslanduz, Moghan, Ardabil, Iran		
MF4	Garagabag, Aslanduz, Moghan, Ardabil, Iran		
MF5	Garagabag, Aslanduz, Moghan, Ardabil, Iran		
MF6	Garagabag, Aslanduz, Moghan, Ardabil, Iran		
MF7	Islamabad Jadid, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran	Islamabad	13
MF8	Islamabad Jadid, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF9	Islamabad Jadid, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF10	Islamabad Jadid, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF11	Ultan, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF12	Ultan, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF13	Ultan, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF14	Ultan, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF15	Ultan, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF16	Shahrak, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF17	Shahrak, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF18	Shahrak, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF19	Shahrak, Islamabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF20	Majidabad, Parsabad, Moghan, Ardabil, Iran	Parsabad	6
MF21	Majidabad, Parsabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF22	Majidabad, Parsabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF23	Iranabad, Parsabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF24	Iranabad, Parsabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF25	Parsabad, Parsabad, Moghan, Ardabil, Iran		
MF26	Abbasabad, Tazehkand, Moghan, Ardabil, Iran	Tazehkand	6
MF27	Firuzabad, Tazehkand, Moghan, Ardabil, Iran		
MF28	Firuzabad, Tazehkand, Moghan, Ardabil, Iran		
MF29	Firuzabad, Tazehkand, Moghan, Ardabil, Iran		
MF30	Firuzabad, Tazehkand, Moghan, Ardabil, Iran		
MF31	Tazehkand, Tazehkand, Moghan, Ardabil, Iran		
MF32	Jafarabad, Bilehsavar, Moghan, Ardabil, Iran	Bilehsavar	6
MF33	Jafarabad, Bilehsavar, Moghan, Ardabil, Iran		
MF34	Jafarabad, Bilehsavar, Moghan, Ardabil, Iran		
MF35	Babak, Bilehsavar, Moghan, Ardabil, Iran		
MF36	Babak, Bilehsavar, Moghan, Ardabil, Iran		
MF37	Bilehsavar, Bilehsavar, Moghan, Ardabil, Iran		

- ریخت‌شناسی جدایه‌ها

پس از خالص‌سازی جدایه‌های انتخابی به روش تک‌اسپور کردن، جدایه‌ها به تشتک پتری حاوی محیط کشت سترون شده سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA, Merck, Germany) طبق توصیه شرکت سازنده و محیط کشت مصنوعی آگاردار ضعیف SNA (synthetic nutrient-poor agar) حاوی یک گرم KH_2PO_4 ، یک گرم KNO_3 ، ۰/۵ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۲ گرم KCl ، ۰/۲ گرم Glucose و ۲۰ گرم Sucrose و ۱۰ روز در زیر نور نزدیک ماوراء بنفش (black light) و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند (O'Donnell 1996). شکل پرگنه و طول و عرض ماکروکنیدیوم‌های شش سلولی ارزیابی شد (Aoki & O'Donnell 1999).

- تکثیر و آماده‌سازی میسلیوم جدایه‌ها

جدایه‌ها در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری دارای ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع YM (yeast medium broth) سترون حاوی ۲٪ D-Glucose، ۳٪ Malt extract، ۳٪ Yeast extract و ۵٪ Peptone، کشت داده شدند (O'Donnell 1996). ظرف ارلن در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت هفت روز نگهداری و روزانه چهار بار به آرامی به صورت دورانی حرکت داده شد. میسلیوم جدایه‌ها با استفاده از گاز سترون از محیط کشت جدا، با آب مقطر سترون دو بار شسته و در شرایط سترون خشک شد. میسلیوم خشک شده جدایه‌ها در هاون چینی سترون با استفاده از ازت مایع تبدیل به پودر شد. پودر میسلیوم جدایه‌ها به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و تا استخراج DNA ژنومی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

- جداسازی DNA ژنومی

حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر میسلیوم آماده شده از هر جدایه برای جداسازی DNA کل به روش CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) استفاده شد (Huang et al. 2000). در نهایت به رسوب حاصل، مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر سترون اضافه و پس از حل شدن رسوب در آب، تیوب‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای ارزیابی کیفیت DNA هر نمونه، مقدار سه میکرولیتر از DNA در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفوز و ژل زیر نور ماوراءبنفش مشاهده و از لحاظ کیفیت و کمیت نسبی DNA مورد بررسی قرار گرفت.

- تکثیر ژن‌های *RED*، *TEF* و *URA* و توالی‌یابی

قسمتی از ژن‌های *(RED)* putative reductase و *(TEF)* translation elongation factor 1- α و *(URA)* ligase با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) تکثیر شدند (O'Donnell et al. 2000). برای تکثیر منطقه ژنی هر یک از ژن‌های مذکور در واکنش ۳۰ میکرولیتری، از ترکیب سه میکرولیتر 10X PCR Buffer، MgCl_2 با غلظت ۱/۸ میلی‌مولار، dNTPs با غلظت ۰/۶ میلی‌مولار، ۰/۸ میکرومول از هر آغازگر، حدود ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۰/۴ میکرولیتر *Taq* DNA polymerase (5 U/ μl) (خریداری همه مواد از شرکت سیناکلون) و آب دو بار تقطیر سترون جهت رسانیدن محلول به حجم مورد نظر، برنامه حرارتی مختص هر ژن در دستگاه ترموسایکلر (ساخت شرکت Bio-Rad آمریکا) صورت گرفت (O'Donnell 1996). چرخه حرارتی برای تکثیر ژنگاه *RED* شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و به دنبال آن ۲۵ چرخه دمایی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها ۵۸ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، توسعه آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و توسعه نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هشت دقیقه (Suga et al. 2008) و برای تکثیر ژنگاه‌های *TEF* و *URA* از برنامه حرارتی واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت شش دقیقه و ۲۵ چرخه دمایی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و توسعه نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد (Kristensen et al. 2007). محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید تا باندهای حاصل از واکنش از نظر کیفیت و کمیت بررسی شود. محصول PCR خالص‌سازی شده، توسط شرکت ماکروژن (Macrogen) کره جنوبی توالی‌یابی شد.

- تکثیر مناطق ISSR

پس از آزمایش‌های اولیه، غلظت مواد شیمیایی و چرخه‌های حرارتی مورد نیاز برای تکثیر نواحی بین توالی‌های تکرار شونده ساده (ISSR) تعیین و بهینه گردید. از میان ۱۵ آغازگر، پنج آغازگر که بیشترین تعداد باندهای چندشکل (polymorphic) و تکرارپذیری را داشتند انتخاب شدند (جدول ۳). ترکیبات مورد استفاده در آزمون PCR برای ۲۰ میکرولیتر مخلوط نهایی شامل دو میکرولیتر 10X PCR Buffer، MgCl_2 با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، dNTPs با غلظت ۰/۴ میلی‌مولار، ۰/۸

سلسیوس به مدت دو دقیقه و توسعه نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت شش دقیقه تعیین گردید (Mishra *et al.* 2004). محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ رنگ شده با اتیدیوم بروماید در دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۸۵ ولت به مدت دو ساعت، الکتروفورز شد. محاسبه وزن مولکولی قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر اندازه به نام Kplus DNA ladder 100bp- 10Kb (ساخت شرکت سیناکلون) تعیین و ژل الکتروفورز توسط دستگاه آشکارساز زیر نور ماوراءبنفش عکسبرداری شد.

میکرومول آغازگر، حدود ۲۰ نانومول DNA ژنومی و دو واحد Taq DNA polymerase (U) تولید شرکت Ampliqon دانمارک (خریداری شده از شرکت زیست فناوری پیشگام) و آب دو بار تقطیر سترون جهت رسانیدن محلول به حجم مورد نظر بود. چرخه حرارتی برای واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه و به دنبال آن ۳۳ چرخه دمایی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگرها ۵۲-۴۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، توسعه آغازگرها در دمای ۷۲ درجه

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر و توالی یابی جایگاه های ژنی *URA* و *RED*، *TEF*

Table 2. Primers used for amplification and sequencing of *TEF*, *RED* and *URA* genes in this study

Locus	Gene product	Length of PCR product ^a	Primer	Sequence (5'-3') ^b	Use			Reference
					F/R ^c	PCR	Sequence	
<i>EF-1a</i>	translation elongation factor 1- α	~650	EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	F	*		O'Donnell <i>et al.</i> (2000)
			EF2	GGARGTACCAGTSATCATG	R	*		
			EF3-N	GTAAGGAGGASAAGACTCAC	F		*	
			EF22T	AGGAACCCCTTACCGAGCTC	R		*	
<i>RED</i>	putative reductase	~990	RED1d	TCTCAGAAAAGACGCATATATG	F	*	*	O'Donnell <i>et al.</i> (2000)
			RED1F	CAGAAAAGACGCATATATGTTT	R	*	*	
<i>URA</i>	ammonia ligase	~570	URA11	GAGTATGCCCGCAACGTCATG	F	*	*	O'Donnell <i>et al.</i> (2004)
			URA16	AATTATCTCATCGAGACATCC	R	*	*	

^a base pair (bp)

^b R= A/G; S= C/G

^c F/R= forward/reverse

جدول ۳- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش ISSR

Table 3. ISSR primers used in this study

Primer	Sequence 5'-3'	SP	NSB	NPB	PPB	PIC	MI	Reference
UBC825	(AC) ₈ T	500-3000	12	4	33.3	0.12	0.16	(Mishra <i>et al.</i> 2004)
UBC828	(TG) ₈ A	500-2500	8	5	62.5	0.39	1.22	(Mishra <i>et al.</i> 2004)
UBC846	(CA) ₈ RT	700-2000	7	6	85.7	0.25	1.29	(Mishra <i>et al.</i> 2004)
UBC850	(GT) ₈ YC	200-2000	8	8	100.0	0.35	2.8	(Mishra <i>et al.</i> 2004)
AYS3	(ACCA) ₄ GC	500-3000	10	5	50.0	0.19	0.48	(Albayrak <i>et al.</i> 2016)

SP: Size of product (bp); NSB: Number of scored band; NPB: Number of polymorphic band; PPB: Percentage of polymorphic band; PIC: Polymorphism information contents; MI: Marker index

SP. اندازه باند، NSB. تعداد باندهای شمارش شده، NPB. تعداد باندهای چندشکل، PPB. درصد باندهای چندشکل، PIC. محتوای اطلاعات چندشکلی، MI. مقیاس نشانگر

- تجزیه داده های فیلوژنتیکی

فیلوژنتیکی ترسیم شد. درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA نسخه ۷ و الگوریتم تحلیل امساکي (maximum parsimony)، با استفاده از جستجوی ابتکاری (heuristic) و گزینه TBR (Tree Bisection Reconnection) صورت گرفت (Tamura *et al.* 2013). همچنین، تجزیه فیلوژنتیکی براساس الگوریتم حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) با استفاده از روش تامورا-نی (Tamura-Nei) انجام شد (Tamura & Nei 1993). اعتبارسنجی شاخه های درخت

تایید هویت توالی های تکثیر شده به کمک موتور جستجوی BLAST (Biological Local Alignment Search Tool) مورد بررسی قرار گرفت. بعد از آماده سازی توالی ها، رج بندی توالی ها با کمک نرم افزار MEGA نسخه ۷ انجام شد. برای بررسی نحوه ارتباط فیلوژنتیکی توالی های نواحی *TEF*، *RED* و *URA* مربوط به جدایه های مغان با یکدیگر و با تعدادی از توالی های معتبر به دست آمده از تکثیر همان ژن ها، مربوط به جدایه های (جدول ۴) ثبت شده در بانک ژن (NCBI) درخت

NTSYS-pc نسخه 2.02e (Rohlf 1998) محاسبه شد. برای تعیین تشابه بین جدایه‌ها تجزیه خوشه‌ای با استفاده از برنامه SHAN و روش UPGMA (Unweighted Pair Grouping by Mathematical Average) صورت گرفت. فواصل بین جدایه‌ها و مناطق نمونه‌برداری، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی یا PCoA (Principal Coordinate Analysis) و آزمون منتل (Mantel test) برای تعیین همبستگی تشابه حاصل از تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx (Peakall & Smouse 2012) انجام شد. در ادامه تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای محاسبه معنی‌دار بودن واریانس بین و داخل جمعیت *F. graminearum* s.s. صورت گرفت. از نرم‌افزار POPGENE برای محاسبه فواصل بین و داخل جمعیت‌ها به کمک ضریب تشابه نئی (Nei) استفاده شد. همچنین، تعداد آل‌ها (N_a)، آل‌های موثر (N_e)، تنوع ژنتیکی نئی (H)، مقیاس اطلاعات Shannon (I)، تنوع ژنتیکی کل (H_t)، تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها (H_s)، مقیاس تنوع نئی داخل جمعیت‌ها (G_{st}) و جریان ژنی بین جمعیت‌ها (N_m) محاسبه گردید (Yeh et al. 2000).

فیلوژنتیکی با الگوریتم Bootstrap Analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت.

- تجزیه داده‌های تنوع ژنتیکی

امتیازدهی داده‌های حاصل از انگشت‌نگاری ISSR به صورت حضور باند (۱) و یا عدم حضور باند (۰) در نرم‌افزار Excel وارد شد. ویژگی‌های تولید باند از جمله تعداد باندهای تشکیل شده یا NSB (Number of Scored Bands)، تعداد باندهای چندشکل یا NPB (Number of Polymorphic Bands) و درصد باندهای چندشکل یا PPB (Percentage of Polymorphic Bands) محاسبه شد. قدرت تفکیک نشانگرها با استفاده از محتوای اطلاعات چندشکلی یا PIC (Polymorphism Information Content) و شاخص نشانگری یا MI (Marker Index) هر نشانگر با استفاده از روابط زیر تعیین شد:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2, MI = PIC \times EMR, EMR = n_p \left(\frac{n_p}{n} \right)$$

در این رابطه‌ها، P_i فراوانی آل i ام، n_p تعداد باندهای چندشکل و n تعداد کل باندها می‌باشد (Powell 1996).

ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard's coefficient) در برنامه SIMQUAL با نرم‌افزار

جدول ۴- منشاء جغرافیایی و میزبان جدایه‌های *Fusarium* spp. استفاده شده در مطالعه تجزیه فیلوژنتیکی

Table 4. Geographical origin and hosts of *Fusarium* spp. strains used in the phylogenetic analysis

Isolate code	Species	Geographic origin	Host	Reference
NRRL34207	<i>F. acaciae-meansii</i>	Australia	soil	Sarver et al. (2011)
NRRL26752	<i>F. acaciae-meansii</i>	South Africa	<i>Acacia meansii</i>	Starkey et al. (2007)
NRRL46718	<i>F. aethiopicum</i>	Gugsa Womberma, Ethiopia	wheat	O'Donnell et al. (2008)
NRRL46726	<i>F. aethiopicum</i>	Bure, Ethiopia	wheat	O'Donnell et al. (2008)
NRRL13818	<i>F. asiaticum</i>	Japan	barley	Ward et al. (2002)
NRRL6101	<i>F. asiaticum</i>	Japan	barley	Ward et al. (2002)
NRRL2903	<i>F. austroamericanum</i>	Brazil	polypore	O'Donnell et al. (2000)
NRRL36957	<i>F. austroamericanum</i>	Paysandu, Uruguay	wheat	Ward et al. (2008)
NRRL26916	<i>F. boothii</i>	South Africa	corn	Ward et al. (2002)
NRRL29105	<i>F. boothii</i>	Kaski, Nepal	corn	Ward et al. (2002)
NRRL31238	<i>F. brasiliicum</i>	Brazil	corn	Sarver et al. (2011)
NRRL31281	<i>F. brasiliicum</i>	Brazil	oats	Sarver et al. (2011)
NRRL25805	<i>F. cerealis</i>	Columbia	soil	Ward et al. (2002)
NRRL31171	<i>F. cortaderiae</i>	Brazil	barley	Sarver et al. (2011)
NRRL34577	<i>F. cortaderiae</i>	unknown	unknown	Ward et al. (2008)
NRRL25475	<i>F. culmorum</i>	Denmark	barley	Ward et al. (2002)
NRRL29298 ^a	<i>F. dactylidis</i>	Oceania, New Zealand	cocksfoot	Aoki et al. (2015)
NRRL29380 ^a	<i>F. dactylidis</i>	Oregon, USA	grass	Aoki et al. (2015)
NRRL38380	<i>F. gerlachii</i>	unknown	unknown	Starkey et al. (2007)
NRRL38405	<i>F. gerlachii</i>	unknown	unknown	Starkey et al. (2007)
NRRL38369	<i>F. graminearum</i>	Louisiana, USA	wheat head	Starkey et al. (2007)
NRRL13383	<i>F. graminearum</i>	Iran	corn	Ward et al. (2002)
NRRL28063	<i>F. graminearum</i>	Michigan, USA	corn	Ward et al. (2002)
NRRL28439	<i>F. graminearum</i>	Rotterdam, Netherlands	leather leaf	Starkey et al. (2007)
NRRL29169	<i>F. graminearum</i>	Kansas, USA	wheat	Ward et al. (2002)
NRRL6394	<i>F. graminearum</i>	Hungary	millet	Sarver et al. (2011)
NRRL54196	<i>F. louisianense</i>	Louisiana, USA	wheat	Sarver et al. (2011)
NRRL54197	<i>F. louisianense</i>	Louisiana, USA	wheat	Sarver et al. (2011)
NRRL28723	<i>F. meridionale</i>	Lalitpur, Nepal	corn	Ward et al. (2002)
NRRL29010	<i>F. meridionale</i>	Transkei, South Africa	soil	Ward et al. (2002)
NRRL25797	<i>F. mesoamericanum</i>	Honduras	banana	Ward et al. (2002)
NRRL29148	<i>F. mesoamericanum</i>	USA	grape	Ward et al. (2002)
NRRL54220	<i>F. nepalense</i>	Lamjung, Nepal	rice	Sarver et al. (2011)
NRRL54222	<i>F. nepalense</i>	Nepal	rice	Sarver et al. (2011)
NRRL28062 ^a	<i>F. pseudograminearum</i>	Darling Downs, Australia	barely	Ward et al. (2002)
NRRL45665	<i>F. ussuriianum</i>	Jewish Autonomous, Russia	wheat	Yli-Mattila et al. (2009)
NRRL45795	<i>F. ussuriianum</i>	Kamen-Rybolov, Russia	wheat	Yli-Mattila et al. (2009)
NRRL37605	<i>F. vorosii</i>	Ipolydamas, Hungary	wheat head	Starkey et al. (2007)
NRRL45790	<i>F. vorosii</i>	Ussuriysk, Russia	wheat	Starkey et al. (2007)

^a Strains used as outgroups

^a جدایه‌های استفاده شده به عنوان گروه خارجی

نتیجه

- ساختار فیلوژنتیکی FGSC

در مجموع، ۳۷ جدایه *F. graminearum* species complex (FGSC) با توجه به مناطق جدایه‌ها و مشخصات ریخت‌شناسی از جمله شکل و سرعت رشد پرگنه و اندازه ماکروکنیدی‌ها انتخاب شدند (جدول ۱). برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، سه ژن *URA* و *RED*، *TEF* به ترتیب توالی‌های به طول ۶۴۴، ۹۹۱ و ۵۵۷ جفت باز توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر و رج‌بندی شد. در مجموع، ۷۶ توالی مربوط به ژن‌های مذکور شامل جدایه‌های انتخاب شده از پنج منطقه مغان و ۳۹ توالی از پایگاه NCBI به عنوان مرجع مورد تجزیه فیلوژنتیکی قرار گرفتند. نتایج خوشه‌بندی توالی‌ها نشان داد شاخه (clade) *Graminearum* با اعتبارسنجی ۹۹٪ براساس ترکیب نواحی ژنی *URA* و *RED*، *TEF* از گونه‌های *F. culmorum* و *F. cerealis* و آرایه outgroup جدا شد. همه جدایه‌های دشت مغان به همراه توالی‌های مرجع (NRRL29169، NRRL38369، NRRL28063، NRRL28439 و NRRL13383) با اعتبارسنجی ۹۴٪ از بقیه گونه‌ها تفکیک و در گروه مونوفیلیتیک مربوط به گونه *F. graminearum* s.s. قرار گرفتند (شکل ۱). بین توالی‌های مربوط به جدایه‌های مغان و توالی‌های مرجع تشابه بالایی (۹۹/۵٪) وجود داشت. در توالی‌های مربوط به جایگاه‌های ژنی *TEF* (جایگزینی A با G در نوکلئوتید شماره ۳۲۵) در ۱۳ جدایه، *RED* (جایگزینی G با A در نوکلئوتید شماره ۷۸۶) در ۱۲ جدایه و *URA* (جایگزینی A با T) در چهار جدایه تفاوت‌های تک‌نوکلئوتیدی در مقایسه با یکدیگر و توالی‌های مرجع مشاهده شد.

- ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت *F. graminearum* s.s.

تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *F. graminearum* s.s. در پنج منطقه از دشت مغان با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR مورد بررسی قرار گرفت. تعداد پنج آغازگر از بین ۱۵ آغازگر مورد آزمایش در واکنش ISSR-PCR به همراه DNA جدایه‌های *F. graminearum* s.s. باندهای قابل مقایسه تولید نمودند. تعداد کل باندهای تکثیر شده با پنج آغازگر ۴۵ و تعداد کل باندهای چندشکل ۲۸ بود. آغازگر UBC850 بیشترین درصد باند چندشکل (۱۰۰٪) و شاخص نشانگری (۸۰/۱۶) را در بین آغازگرهای مورد استفاده داشت (جدول ۳).

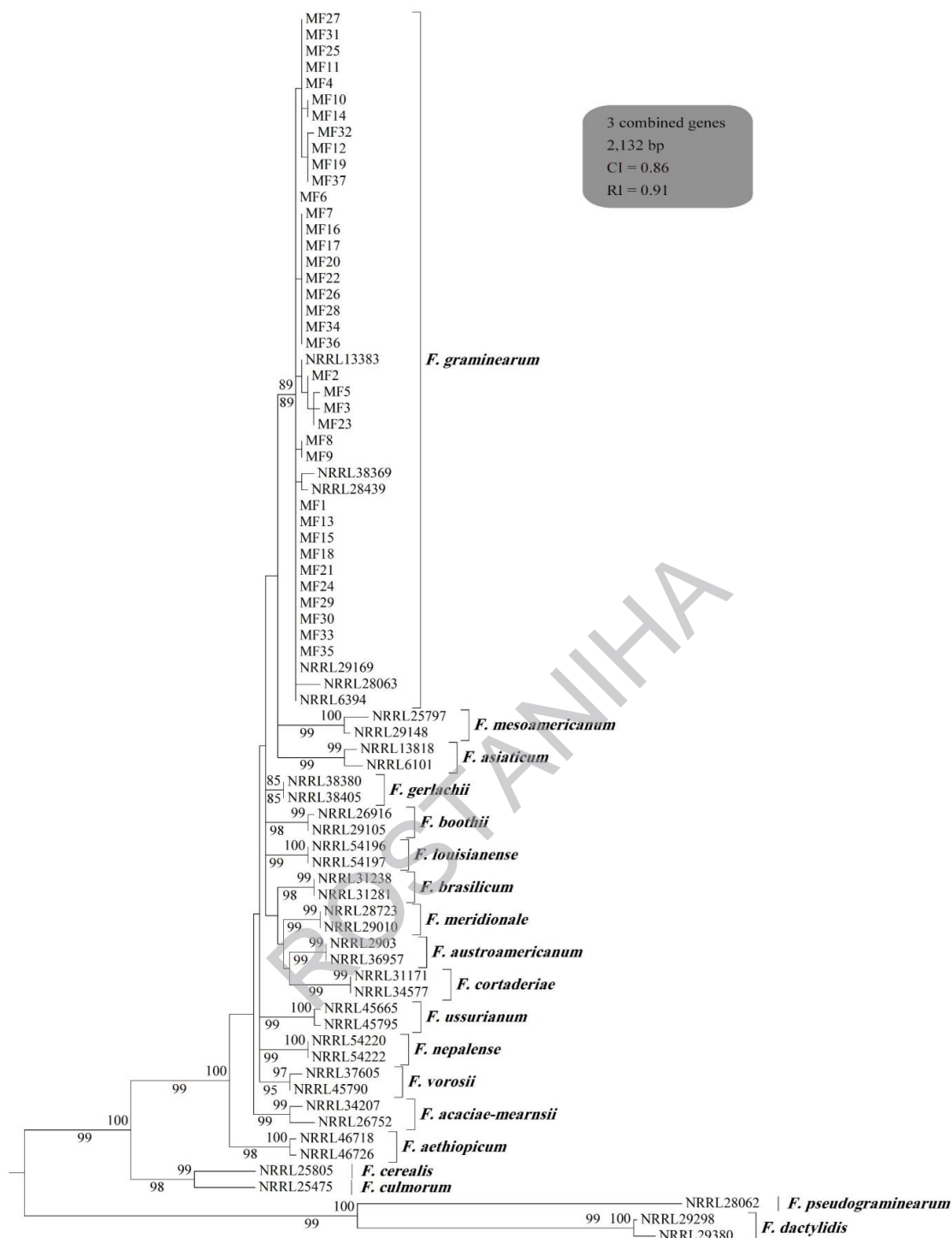
برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت *F. graminearum* s.s. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA و ضریب

تشابه جاکارد (Jaccard's similarity coefficient) انجام شد. با توجه به ضریب کوفنتیک بالای به دست آمده (۰/۸۵)، برازش خوشه‌بندی خوب ارزیابی شد که با توجه به نتایج خوشه‌بندی تعداد ۳۱ هاپلوטיפ (haplotype) از ۳۷ جدایه به دست آمد، به طوری که بیشترین سطح تشابه (۱۰۰٪) در بین جدایه‌های MF13 و MF16 هر دو متعلق به منطقه اسلام‌آباد، MF8 و MF21 به ترتیب جدا شده از اسلام‌آباد و پارس‌آباد، MF22 و MF27 به ترتیب متعلق به مناطق پارس‌آباد و تازه‌کند، سه جدایه MF12، MF14 (جدا شده از اسلام‌آباد) و MF24 (جدا شده از پارس‌آباد) و دو جدایه MF28 و MF29 به دست آمده از تازه‌کند مشاهده شد. درخت ترسیم شده، ژنوتیپ جدایه‌ها را در سطح تشابه ۸۲٪ به چهار گروه مجزا تفکیک کرد. بر این اساس، گروه اول و دوم، هر یک ۲/۷٪ و گروه‌های سوم و چهارم به ترتیب ۷۰/۳٪ و ۱۸/۹٪ جدایه‌ها را در خود جای دادند (شکل ۲).

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *F. graminearum* s.s. با استفاده از تنوع ژنی نئی و شاخص تنوع شانون محاسبه شد (جدول ۵). بر این اساس، ترتیب تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به صورت: اصلاندوز < بیله‌سوار < اسلام‌آباد < پارس‌آباد < تازه‌کند تعیین شد. بیشترین و کمترین درصد جایگاه‌های ژنی چندشکل (PPB) به ترتیب مربوط به جمعیت‌های اسلام‌آباد و تازه‌کند بود. جمعیت اسلام‌آباد بیشترین و جمعیت تازه‌کند کمترین تعداد آلل‌ها را داشتند. بیشترین و کمترین آلل‌های موثر به ترتیب مربوط به اصلاندوز (۱/۳۲) و پارس‌آباد (۱/۲۱) بود. تنوع ژنتیکی داخل جمعیت (Hs) و تنوع ژنتیکی کل (Ht) به ترتیب ۰/۱۵ و ۰/۱۷ برآورد شد. تفاوت بین جمعیت‌ها (Gst)، ۰/۱۵ و به عبارت دیگر حدود ۱۵ درصد تعیین شد (جدول ۵).

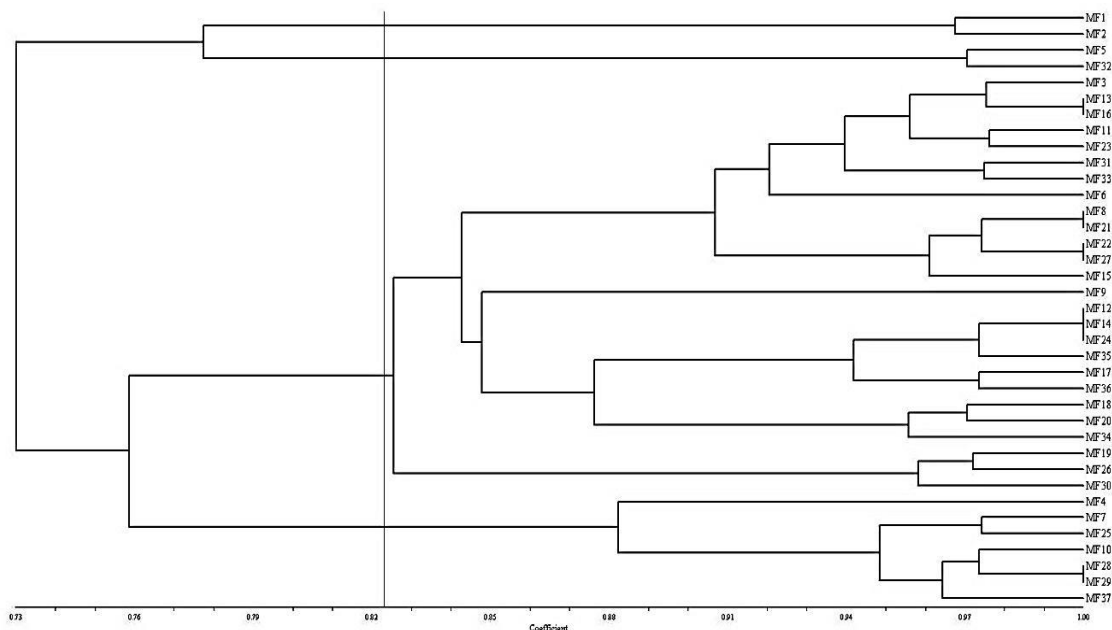
برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی داخل و بین جمعیت‌ها، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) انجام شد. نتایج نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها و بین جمعیت‌ها به ترتیب ۳ و ۹۷٪ بود (شکل ۳).

براساس جدول تجزیه واریانس مولکولی داخل و بین جمعیت‌ها (جدول ۶)، الگوی توزیع مولکولی مبتنی بر نشانگر ISSR اختلاف درونی جمعیت‌ها نسبت به اختلاف بین جمعیت‌ها بسیار زیاد است. لذا، گروه‌بندی صورت گرفته برای جدایه‌ها بر مبنای شباهت آن‌ها صورت گرفته و درخت ترسیم شده از الگوی مناسبی برخوردار بود.



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی رسم شده مبتنی بر مکان‌های ژنی *TEF*، *RED* و *URA*، شامل ۲/۱ کیلو باز رج‌بندی‌شده توالی DNA به روش تحلیل امساک (MP) با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری. در این درخت، قارچ‌های *F. pseudograminearum* و *F. dactylidis* به عنوان گروه خارجی قرار داده شده و اعتبارسنجی‌های کمتر از ۶۰ درصد حذف شده است. مقادیر مربوط به درجه اعتبارسنجی روش حداکثر درست‌نمایی (ML) در زیرشاخه‌ها نشان داده شده است.

Fig. 1. Parsimony tree inferred from combined datasets of partial *TEF*, *RED* and *URA* genes comprising 2.1 kb of aligned DNA sequence data rooted with sequences of *F. pseudograminearum* (NRRL28062) and *F. dactylidis* (NRRL29380, NRRL29298). Bootstrap values of 60% or more are shown above branches based on 1000 bootstrap repeats. Maximum likelihood bootstrap values are indicated under nodes.



شکل ۲- خوشه‌بندی ۳۷ جدایه *F. graminearum* s.s. به روش UPGMA مربوط به پنج جمعیت مورد مطالعه.

Fig. 2. UPGMA dendrogram clustering pattern for 37 individuals belonging to five populations of *F. graminearum* s.s.

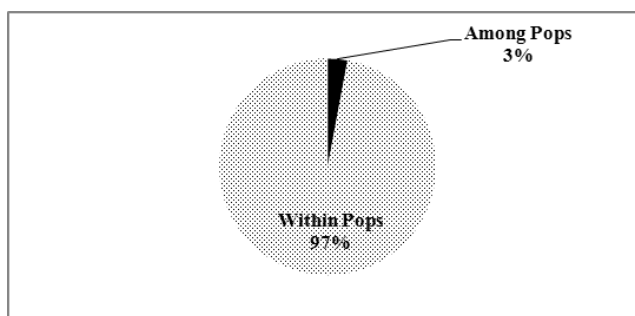
جدول ۵- تنوع ژنتیکی بین و داخل پنج جمعیت *F. graminearum* s.s.

Table 5. Genetic diversity within five populations of *F. graminearum* s.s.

Population	N _a	N _e	H	I	PPB (%)	H _t	H _s	G _{st}	N _m
Aslanduz	1.41	1.32	0.17	0.25	40.91				
Islamabad	1.48	1.22	0.14	0.22	47.73				
Parsabad	1.39	1.21	0.13	0.20	38.60				
Tazehkand	1.32	1.24	0.13	0.19	31.82				
Bilehsavar	1.45	1.26	0.16	0.24	45.45				
Average	1.61	1.27	0.17	0.27	40.90				
Total	-	-	-	-	-	0.17	0.15	0.15	2.86

N_a, observed number of alleles; N_e, effective number of alleles; H, Nei's gene diversity; I, Shannon's information indices; PPB, percentage of polymorphic bands; H_t, total genetic diversity; H_s, genetic diversity within populations; G_{st}, the relative magnitude of genetic differentiation among populations; N_m, estimate of gene flow among populations.

N_a. تعداد آل‌های مشاهده شده، N_e. تعداد آل‌های موثر، H. تنوع ژنتیکی نی، I. شاخص شانون، PPB. درصد باندهای چندشکل، H_t. تنوع ژنتیکی کل، H_s. تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها، G_{st}. مقدار تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها، N_m. جریان ژنی بین جمعیت‌ها



شکل ۳- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بین و داخل جمعیت‌ها به ترتیب ۳ و ۹۷٪.

Fig. 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that 3% of genetic variation is among populations and 97% within populations.

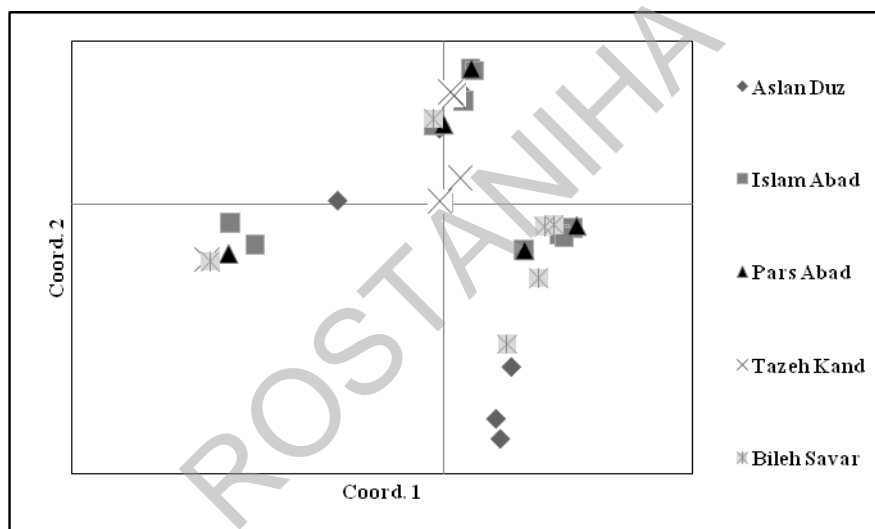
جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) پنج نشانگر ISSR مربوط به جمعیت‌های *F. graminearum* s.s.

Table 6. Analysis of molecular variance (AMOVA) for five ISSR markers among of *F. graminearum* s.s. populations

Source of variations	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	Variance components	Percentage of total variance
Among populations	4	18.21	4.55	0.11	3
Within populations	32	119.79	3.74	3.74	97
Total	36	138.00	-	3.86	100

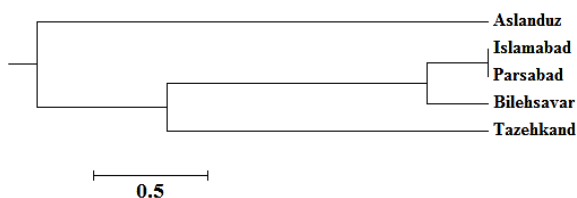
درخت ارتباط ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر پایه اندازه ناریبی نئی (Nei's Unbiased Measures) به روش UPGMA ترسیم شد (شکل ۵). پنج جمعیت مورد بررسی به سه گروه جمعیتی، یعنی جمعیت اصلاندوز، جمعیت تازه‌کند و مجموع جمعیت‌های اسلام‌آباد، پارس‌آباد و بیل‌سوار تقسیم شدند. جمعیت اصلاندوز فاصله زیادی نسبت به دیگر جمعیت‌ها نشان داد و پس از آن جمعیت متعلق به تازه‌کند نسبت به سه جمعیت اسلام‌آباد، پارس‌آباد و بیل‌سوار اختلاف ژنتیکی بیشتری داشت.

به منظور بررسی الگوی پراکنش جدایه‌ها در مناطق پنج‌گانه و استحکام یا اعتبارسنجی درخت تنوع ژنتیکی، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام و نتایج تجزیه خوشه‌ای بررسی شد، به طوری که جدایه‌های پنج منطقه در سه گروه اصلی هم‌مختصات قرار گرفتند و بر این اساس، تنوع ژنتیکی ۶۱٪ تعیین شد (شکل ۴). اغلب جدایه‌های منطقه بیل‌سوار در پلات دوم و بیشتر جدایه‌های تازه‌کند در پلات سوم قرار گرفتند. جدایه‌های مربوط به منطقه اسلام‌آباد در هر سه پلات پراکنده بودند.



شکل ۴- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی دو بعدی پنج جمعیت مربوط به جدایه‌های *F. graminearum* s.s.

Fig. 4. Two-dimensional plot of principal coordinate analysis (PCoA) showing clustering of individual samples belonging to five populations of *F. graminearum* s.s.



شکل ۵- درخت فاصله ژنتیکی بین پنج جمعیت *F. graminearum* s.s. براساس UPGMA مبتنی بر نئی (Nei 1972).

Fig. 5. UPGMA dendrogram based on Nei's (1972) unbiased measures of genetic distance among five populations of *F. graminearum* s.s.

بحث

است. همچنین، دشت مغان در یک محدوده جغرافیایی و اقلیمی خاص قرار گرفته است. این منطقه از شمال به رود ارس و جمهوری آذربایجان، از غرب به شهرستان کلیبر در استان آذربایجان شرقی، از شرق به جمهوری آذربایجان و از جنوب و جنوب غربی به شهرستان‌های بيله سوار و گرمی محدود می‌شود. شرایط مساعد برای بروز بیماری در شمال و شرق این منطقه (کشور آذربایجان) مهیا است. براساس داده‌های هواشناسی دوره ۱۶ ساله و روش‌های ارزیابی دومارتن (De Martonne 1942) و آمبرژه (Emberger 1930)، اقلیم این منطقه سرد و نیمه‌خشک است. میانگین کمینه، بهینه و بیشینه دمای مغان به ترتیب ۳/۳۷، ۱۴/۹۹ و ۲۷/۵۲ درجه سلسیوس و مجموع بارش سالانه حدود ۲۵۹ میلی‌متر تعیین شده است (Naseri 2007). محدوده جغرافیایی و شرایط اقلیمی این منطقه، یافته‌های این پژوهش را مبنی بر معرفی *F. graminearum* s.s. به عنوان تنها عامل بیماری تایید می‌کند. وانگ و همکاران (Wang et al. 2011) براساس داده‌های هواشناسی ۳۰ ساله، نشان دادند که پراکنش گونه‌های فیلوژنتیکی مربوط به FGSC تابع شرایط اقلیمی مناطق انتشار است. جدایه‌های *F. graminearum* s.s. برای استقرار و انتشار نیازمند دمای میانگین سالانه کمتر از ۱۵ درجه سلسیوس هستند درحالی که جدایه‌های *F. asiaticum* در مناطق با اقلیم گرم‌تر گسترده‌اند. تحقیقات دهه اخیر نشان‌دهنده غالبیت گونه فیلوژنتیکی *F. graminearum* s.s. در گروه گونه‌ای FGSC به عنوان عامل اصلی بیماری سوختگی فوزاریومی خوشه گندم در جهان است (Aoki et al. 2012, O'Donnell et al. 2004, Starkey et al. 2007, Ward et al. 2008) هرچند *F. asiaticum*، گونه غالب در آسیای شرقی در مناطق کشت برنج با اقلیم گرم و مرطوب معرفی شده است (Yang et al. 2008, Zhang et al. 2012).

تغییرپذیری خصوصیات ریخت‌شناسی اغلب قارچ‌ها در شرایط مختلف نور، دما و مواد غذایی از دهه‌های قبل مورد توجه بوده و در خصوص FGSC نیز مصداق دارد. تنوع در شکل، رنگ و سرعت رشد پرگنه و طول و عرض ماکروکنیدی‌های سوبه‌های یک گونه، اتکا به مؤلفه‌های ریخت‌شناسی را در شناسایی و طبقه‌بندی این گروه گونه‌ای کم‌رنگ می‌نماید (Geiser et al. 2013). اودونل و همکاران (O'Donnell et al. 2004) در مقایسه نتایج فیلوژنتیکی براساس جایگاه‌های ژنی (MAT (mating-type) با ۱۱ جایگاه ژنی نشان دادند که نتایج دو روش با هم سازگار و منطبق هستند، ولی داده‌های ریخت‌شناسی از جمله طول و

توالی‌های به دست آمده از تکثیر جایگاه‌های ژنی *TEF*، *URA* و *RED* توانست به خوبی جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌های دشت مغان را در میان گروه گونه‌ای FGSC مشخص نماید. توالی‌های مرکب از این سه ژن با اعتبارسنجی ۹۴٪ قادر به تفکیک گونه فیلوژنتیکی *F. graminearum* s.s. از بقیه اعضای گروه گونه‌ای FGSC بود. تکثیر و توالی‌یابی مکان‌های ژنی *TEF*، *URA* و *RED* قابلیت بسیار بالا در تفکیک گونه‌های فیلوژنتیکی FGSC دارد (O'Donnell et al. 2004, Starkey et al. 2007). در حال حاضر، طبقه‌بندی مبتنی بر چند ژن از جایگاه ویژه در مطالعه ساختار و فیلوژنتیک جانداران به خصوص قارچ‌ها و شبه‌قارچ‌ها دارد (Wijayawardene et al. 2016). قرار گرفتن همه جدایه‌های FGSC به دست آمده از خوشه‌های گندم با علائم بیماری FHB در یک آرایه (taxon) نشان‌دهنده وجود یک ساختار همگن ژنتیکی در بین جدایه‌های FGSC در دشت مغان است. مطالعه فیلوژنتیکی گروه گونه‌ای FGSC براساس توالی‌یابی چند ژنی در شمال ایران (استان‌های گلستان و مازندران) نیز نتایج مشابه را نشان داد (Sharifi et al. 2016). ملیح‌پور و همکاران (Malihpour et al. 2012) جدایه‌های جمع‌آوری شده از کشورهای کانادا، مکزیک و ایران را براساس توالی‌یابی مکان ژنی *Tri101* (3-O-acetyltransferase) بررسی فیلوژنتیکی کردند. نتایج حاصل با نتایج تحقیق حاضر مشابه بود و همه جدایه‌های ایرانی جدا شده از استان گلستان و دشت مغان و برخی جدایه‌های مربوط به کانادا و مکزیک در گروه مربوط به گونه *F. graminearum* s.s. قرار گرفتند. وجود ساختار یکنواخت در جدایه‌های منسوب به FGSC در ایران را می‌توان به برخی عوامل از جمله مکان جغرافیایی پراکنش بیماری که در منطقه خاص و محدود جغرافیایی حاشیه خزر واقع شده نسبت داد. استان گلستان از شمال به کشور ترکمنستان، از شرق به استان خراسان شمالی و از غرب به استان مازندران و این استان از شمال به دریای خزر و از غرب به استان گیلان و بالاخره از جنوب به رشته کوه‌های البرز محدود می‌شود. شرایط اقلیمی مساعد برای بروز بیماری در نواحی جنوبی کشور ترکمنستان و استان خراسان شمالی وجود ندارد، به طوری که بیماری در مناطق شمالی و شمال شرقی شهرستان گنبدکاووس به ندرت مشاهده می‌شود. از طرفی، هم‌جواری استان مازندران با استان گیلان که کشت گندم در آن بسیار محدود می‌باشد (حدود ۱۰۰۰۰ هکتار)، این محدودیت را تشدید کرده

اصلی بین جمعیت‌ها به شمار می‌آید که در صورت نبود آن، تفاوت در فراوانی آلل‌ها در جایگاه‌های ژنی خنثی (*neutral loci*) در درون جمعیت حاصل و باعث افزایش تمایز ژنتیکی جدایه‌ها بین جمعیت‌ها می‌شود (McDonald 1997). جنسی آن (*Gibberella zeae*) در شرایط مساعد به راحتی صورت می‌گیرد. اندام‌های جنسی به صورت پریتسیوم در کاه و کلش غلات و بقایای گیاهی تشکیل و آسکوسپورها در شرایط مساعد انتشار می‌یابد (Cavinder et al. 2012). آسکوسپورها نقش اصلی در انتشار داشته و به عنوان زادمایه اولیه بیماری شناخته می‌شود. این نوع از زادآوری باعث ایجاد نوترکیبی ژنتیکی و به دنبال آن تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ می‌شود. تحقیقات نشان داده است که حدود ۲۰۰ میلیون آسکوسپور *F. graminearum* s.s. در طول روز در هر هکتار از مزارع گندم منتشر می‌شود. این هاگ‌ها قادرند از منبع آلودگی تا شعاع ۱۰۰۰ متری منتشر شوند (Prussin et al. 2014). وجود تنوع ژنتیکی درون جمعیت و یکنواختی نسبی آن در بین جمعیت‌ها را می‌توان به ترتیب ناشی از نحوه زادآوری جنسی و جابجایی آسان هاگ‌ها در فواصل مکانی زیاد نسبت داد. تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ، موجب ظهور ژنوتیپ‌های جدید در منطقه شده و متعاقباً لقاح بین ژنوتیپ‌ها باعث تولید هاپلویت‌های جدید در منطقه می‌شود. تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت یک قارچ بیمارگر باعث سازگاری آن به شرایط اقلیمی، شکستن مقاومت میزبان، بروز مقاومت نسبت به قارچ‌کش‌ها و بعضاً شکل‌گیری جمعیت مخرب می‌شود.

به طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عامل اصلی بیماری سوختگی فوزاریومی خوشه گندم (FGSC) متشکل از یک گونه فیلوژنتیکی (*F. graminearum* s.s.) با ساختار ژنتیکی هموزن است. علی‌رغم یکنواختی جدایه‌ها، تنوع تکنوکلوئیدی در توالی‌های تکثیر شده مربوط به *TEF*، *RED* و *URA* به ترتیب در حدود ۳۵، ۳۲ و ۱۰٪ از سویه‌ها قابل مشاهده است. مطالعه ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت *F. graminearum* s.s. در دشت مغان نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا در درون جمعیت‌ها است ولی بین جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی بسیار اندک مشاهده می‌شود. این تنوع اهمیت به سزایی در آمادگی این قارچ برای بروز تغییرات احتمالی ژنتیکی در آینده دارد و این امر هشدار جدی برای اصلاح‌کنندگان ارقام گندم و گیاه‌پزشکان در ایران است.

عرض ماکروکنیدی و شکل پرگنه نتوانست گونه‌ها را از هم متمایز کند. نتایج تحقیقات اخیر شریفی و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان‌دهنده وجود تنوع در خصوصیات ریخت‌شناسی جدایه‌های به دست آمده از شمال ایران است، هر چند همه جدایه‌ها متعلق به گونه *F. graminearum* s.s. بودند. لذا، به نظر می‌رسد داده‌های ریخت‌شناسی می‌تواند به عنوان اطلاعات اولیه و صرفاً در شناسایی مقدماتی کاربرد داشته و برای بررسی ارتباط افراد، استفاده از روش‌های مولکولی به خصوص مبتنی بر توالی‌یابی چند مکان ژنی الزامی می‌نماید.

نتایج پروژه حاضر نشان داد که نشانگر ISSR در تجزیه تنوع ژنتیکی جمعیت *F. graminearum* s.s. عامل بیماری FHB، از قابلیت خوبی برخوردار است، به طوری که پنج آغازگر مورد استفاده، ۶۵ درصد (میانگین) چندشکلی قابل تکرار نشان دادند. از مزایای مهم این نشانگر سادگی و تکرارپذیری روش، عمومی بودن آغازگرها، تحمل دامنه زیاد کمیت DNA هدف و امکان تجزیه و تحلیل رایانه‌ای با استفاده از نرم‌افزارهای متنوع است (Ng & Tan 2015). این نشانگر توانست تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی را در داخل جمعیت *F. graminearum* s.s. دشت مغان نشان دهد ولی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها اندک بود. نتایج تنوع ژنتیکی مورد بررسی در جمعیت‌های قارچ *F. graminearum* s.s. در کانادا نیز نتایج مشابهی را دربر داشت. در این مطالعه، تنوع بین جمعیت‌های سه منطقه براساس نشانگرهای ISSR بررسی شد که تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۲/۷۷ درصد و درون جمعیت‌ها ۹۱/۷۸ درصد برآورد شد (Mishra et al. 2004). همچنین زلر و همکاران (Zeller et al. 2003) با بررسی تنوع ژنتیکی *F. graminearum* بر مبنای نشانگر AFLP نشان دادند که تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها در مقایسه با تنوع داخل جمعیت‌ها بسیار اندک است. با توجه به پایین بودن تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها و بالا بودن تنوع در درون جمعیت می‌توان گفت: افراد مناطق مختلف شباهت ژنتیکی زیادی به یکدیگر دارند. علت این تشابه در بین جمعیت‌ها را می‌توان به عوامل تاثیرگذار بر تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها از جمله جریان ژنی، شرایط اقلیمی، بعد مسافت بین جمعیت‌ها و تبادل مواد گیاهی نسبت داد هرچند بین چهار منطقه اسلام‌آباد، پارس‌آباد، بيله‌سوار و تازه‌کند و اصلاندوز اختلاف وجود دارد. این شکاف ژنتیکی بین جمعیت‌ها را می‌توان به فاصله مکانی یا قرار گرفتن منطقه اصلاندوز در موقعیت خاص جغرافیایی و اقلیمی نسبت داد. جریان ژنی یکی از علل تشابه

سپاسگزاری

۹۳۰۳۲۷۳۹ تامین شده است. نگارندگان از کمک‌های ارزشمند آقای مهندس ابوالقاسم قاسمی (استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور) صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

بخشی از هزینه‌های پژوهش حاضر، توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در قالب پروژه شماره

References

- Albayrak, G., Yörük, E., Gazdağlı, A. & Sharifnabi, B. 2016. Genetic diversity among *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates based on ISSR markers. Archives of Biological Sciences 68(2): 333–343.
- Aoki, T. & O'Donnell, K. 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. Mycologia 91(4): 597–609.
- Aoki, T., Vaughan, M.M., McCormick, S.P., Busman, M., Ward, T.J., Kelly, A., O'Donnell, K., Johnston, P.R. & Geiser, D.M. 2015. *Fusarium dactylidis* sp. nov., a novel nivalenol toxin-producing species sister to *F. pseudograminearum* isolated from orchard grass (*Dactylis glomerata*) in Oregon and New Zealand. Mycologia 107 (2): 409–418.
- Aoki, T., Ward, T.J., Kistler, H.C. & O'Donnell, K. 2012. Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. Mycotoxins 62(2): 91–102.
- Anonymous. 2016. Agriculture Statistics: Crop Production. Ministry of Jihad-e Agriculture Publications, Information and Communication Center, Programming Deputy, Tehran, Iran, 163 pp.
- Babadoost, M. 1995. *Fusarium* species in wheat seeds and plants in East Azerbaijan and Ardabil provinces. Iranian Journal of Plant Pathology 31(1): 33–36.
- 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 108(7): 611–624.
- Cavinder, B., Sikhakolli, U., Fellows, K.M. & Trail, F. 2012. Sexual development and ascospore discharge in *Fusarium graminearum*. Journal of Visualized Experiments 61: 3895.
- Consolo, V.F., Ortega, L.M., Salerno, G., Astoreca, A.L. & Alconada, T.M. 2015. Genetic diversity of *Fusarium graminearum* sensu lato isolates from wheat associated with *Fusarium* Head Blight in diverse geographic locations of Argentina. Revista Argentina de Microbiologia 47(3): 245–250.
- Davari, M., Wei, S.H., Babay-Ahari, A., Arzanlou, M., Waalwijk, C., van der Lee, T.A.J., Zare, R., Gerrits van den Ende, A.H.G., de Hoog, G.S. & van Diepeningen, A.D. 2013. Geographic differences in trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* in the Northwest and North of Iran. World Mycotoxin Journal 6(2): 137–150.
- De Martonne, E. 1942. Nouvelle carte mondiale de l'indice d'aridité. Annales de Géographie 51(288): 242–250.
- Emberger, L. 1930. La végétation de la région méditerranéenne: essai d'une classification des groupements végétaux. Revue Générale de Botanique 42: 705–721.
- Gai, X.T. & Gao, Z.G. 2017. Diversity and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex from corn stalk and ear rot strains in NE China. Plant Pathology (In Press).

- Geiser, D.M., Aoki, T., Bacon, C.W., Baker, S.E., Bhattacharyya, M.K., Brandt, M.E., Brown, D.W., Burgess, L.W., Chulze, S., Coleman, J.J., Correll J.C., Covert S.F., Crous P.W., Cuomo C.A., Hoog, G.S., De Pietro, A.D., Elmer, W.H., Epstein, L., Frandsen, R.J.N., Freeman, S., Gagkaeva, T., Glenn, A.E., Gordon, T.R., Gregory, N.F., Hammond-Kosack, K.E., Hanson, L.E., Jimenez-Gasco, M.M., Kang, S., Kistler, H.C., Kuldau, G.A., Leslie, G.F., Logrieco, A., Lu, G., Lyse, E., Ma, L. McCormick, S.P., Migheli, Q., Moretti, A., Munaut, F., O'Donnell, K., Pfenning, L., Ploetz, R.C., Proctor, R.H., Rehner, S.A., Robert, V.A.R.G., Rooney, A.P., Salleh, B., Mercedes Scandiani, M., Scauflaire, J., Short, D.P.G., Steenkamp, E., Suga, H., Summerell, B.A., Sutton, D.A., Thrane, U., Trail, F., Diepeningen, A.V., VanEtten, H.D., Viljoen, A., Waalwijk, C., Ward, T.J., Wingfield, M.J., Xu, J., Yang, X., Yli-Mattila, T. & Zhang, N. 2013. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology* 103(5): 400–408.
- Gilbert, J. & Haber, S. 2013. Overview of some recent research developments in *Fusarium* head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 35(2): 149–174.
- Golzar, H., Foroutan, A. & Ershad, D. 1998. Studies on *Fusarium* species causing head blight of wheat and sources of resistance to *Fusarium graminearum* in Gorgan and Mazandaran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 34: 158–169.
- Huang, J., Ge, X. & Sun, M. 2000. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA. *BioTechniques* 28(3): 432–434.
- Keesing, F., Holt, R.D. & Ostfeld, R.S. 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters* 9(4): 485–498.
- Kristensen, R., Gauthier, G., Berdal, K.G., Hamels, S., Remacle, J. & Holst-Jensen, A. 2007. DNA microarray to detect and identify trichothecene and moniliformin producing *Fusarium* species. *Journal of Applied Microbiology* 102(4): 1060–1070.
- Koufopanou, V., Burt, A., & Taylor, J.W. 1997. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(10): 5478–5482.
- McDonald, B.A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87(4): 448–453.
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G. & Van Sanford, D. 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant Disease* 96(4): 1712–1728.
- Malihipour, A., Gilbert, J., Piercey-Normore, M. & Cloutier, S. 2012. Molecular phylogenetic analysis, trichothecene chemotype patterns and variation in aggressiveness of *Fusarium* isolates causing head blight in wheat. *Plant Disease* 96 (7): 1016–1025.
- Mishra, P.K., Tewari, J.P., Clear, R.M. & Turkington, T.K. 2004. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Annals of Applied Biology* 145(3): 299–307.
- Muthu Kumar, A. & Sharma, P. 2011. A study on corroboration between DNA markers (RAPD, ISSR, ITS) and biocontrol efficacy of *Trichoderma* species. *Fungal Genomics and Biology* 1: 1.

- Naseri, A. 2007. Evaluation of climate changes potential in Dashteh-Moghan. Proceedings of 2nd National Congress of Ecological Agriculture, 17–18 October 2007, Gorgan, Iran: 276–291 (In Persian).
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106(949): 283–292.
- Ng, W.L. & Tan, S.G. 2015. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Are we doing it right? *ASM Science Journal* 9(1): 30–39.
- O'Donnell, K. 1996. Progress towards a phylogenetic classification of *Fusarium*. *Sydowia* 48(1): 57–70.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. & Nirenberg, H.I. 1998. Molecular systematic and phylogeography of the *Giberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90(3): 465–493.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B.K. & Casper, H.H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(14): 7905–7910.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Aberra, D., Kistler, H.C., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjornstad, A. & Klemsdal, S.S. 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology* 45(11): 1514–1522.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C. & Aoki, T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology* 41(6): 600–623.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Bioinformatics* 28: 2537–2539.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J. Tingey, S. & Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2(3): 225–238.
- Prussin, A.J., Szanyi, N.A., Welling, P.I., Ross, S.D. & Schmale III, D.G. 2014. Estimating the production and release of ascospores from a field-scale source of *Fusarium graminearum* inoculum. *Plant Disease* 98(4): 497–503.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc 2.02. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, Applied Biostatistics, Setauket, New York.
- Sarver, B.A.J., Ward, T.J., Gale, L.R., Broz, K., Corby Kistler, H., Aoki, T., Nicholson, P., Carter, J. & O'Donnell, K. 2011. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology* 48(12): 1096–1107.
- Sella, L., Gazzetti, K., Castiglioni, C., Schäfer, W. & Favaron, F. 2014. *Fusarium graminearum* possesses virulence factors common to *Fusarium* head blight of wheat and seedling rot of soybean but differing in their impact on disease severity. *Phytopathology* 104(11): 1201–1207.
- Sharifi, K., Zare, R., Zamanizadeh, H.R., Mirabolfathy, M. & Rezaee, S. 2016. Identification of *Fusarium* species associated with *Fusarium* head blight of wheat in the

- North of Iran and phylogenetic analysis of the dominant species. *Rostaniha* 17(2): 173–187.
- Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, H.C., Geiser, D.M., Suga, H., Tóth, B., Varga, J. & O'Donnell, K. 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology* 44(11): 1191–1204.
- Suga, H., Karugia, G.W., Ward, T., Gale, L.R., Tomimura, K., Nakajima, T., Miyasaka, A., Koizumi, S., Kageyama, K. & Hyakumachi, M. 2008. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology* 98(2): 159–66.
- Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 512–526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. 2013. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S. & Fisher, M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31(1): 21–32.
- Wang, J.H., Ndoye, M., Zhang, J.B., Li, H.P. & Liao, Y.C. 2011. Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins* 3(8): 1020–1037.
- Ward, T.J., Bielawski, J.P., Kistler, H.C., Sullivan, E. & 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(14): 9278–9283.
- Ward, T.J., Clear, R.M., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D.E., Gilbert, J., Geiser, D.M. & Nowicki, T.W. 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology* 45(4): 473–84.
- Wijayawardene, N.N., Hyde, K.D., Wanasinghe, D.N., Papizadeh, M., Goonasekara, I.D., Camporesi, E., Bhat, D.J., McKenzie, E.H., Phillips, A.J., Diederich, P. & Tanaka, K. 2016. Taxonomy and phylogeny of dematiaceous *Coelomycetes*. *Fungal Diversity* 77(1): 1–316.
- 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.
- Yeh, F.C., Boyle, T., Yang, R.C., Ye, Z. & Mao, J.X. 2000. POPGENE Version 1.31, Microsoft Window Based Freeware for Population Genetic Analysis, Alberta, Canada: University of Alberta and Centre for International Forestry Research.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Aoki, T., Kistler, H.C. & O'Donnell, K. 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* 101(6): 841–52.
- Zare, R. & Ershad, D. 1997. *Fusarium* species isolated from cereals in Gorgan area. *Iranian Journal of Plant Pathology* 33(1): 1–14.

- Zeller, K.A, Bowden, R.L & Leslie, J.F. 2003. Diversity of epidemic populations of *Gibberella zea* from small quadrates in Kansas and North Dakota. *Phytopathology* 93(7): 874–880.
- Zhang, H., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Jin, Xu, J.S., Zheng, Y. & Feng, J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PLoS One* 7(2): e31722.

ROSTANIHA