

ارزیابی مزرعه ای و ملکولی مقاومت گندم های ایرانی به فوزاریوم سنبله گندم

نیازعلی سپهوند^{1*}، فرزاد حیدری²، عبدالحسین طوطیایی³، میترا سراج آذری³، جواد مظفری¹

¹ اعضای هیأت علمی پژوهشی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

² دانش آموخته دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

³ عضو هیأت علمی پیشین مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

چکیده

بیماری فوزاریومی سنبله گندم یکی از بیماری های مهم گندم در ایران است که در استان های مازندران، گلستان، اردبیل (مغان) و فارس از اهمیت بالایی برخوردار است. مهمترین عامل این بیماری قارچ *Fusarium graminearum* می باشد. ارزیابی اولیه، 3350 نمونه از گندم های نان بانک ژن گیاهی ملی ایران نسبت به فوزاریوم سنبله، تعدادی از آنها مقاومت نشان دادند. بیست و دو نمونه مقاوم به همراه یک شاهد مقاوم و یک شاهد حساس، در پاییز 1381 در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار در ایستگاه تحقیقات کشاورزی قراخیل ساری ارزیابی پیشرفته شدند. برای ارزیابی مقاومت به پنج جدایه قارچ فوزاریوم که بیماری زایی شدیدتری داشتند، در پنج مرحله مایه زنی افشانه ای پیش از غروب آفتاب با غلظت 3×10^4 ماکروکنیدی در میلی لیتر انجام شد. صفات مهم زراعی یادداشت برداری شدند. برای ارزیابی مقاومت نمونه ها در سه مرحله 10، 14 و 18 روز پس از آلودگی، شاخص آلودگی سنبله، شدت بیماری و درصد آلودگی دانه برای نمونه ها تعیین شد. سطح زیر منحنی پیشرفت آلودگی (AUPDC) محاسبه شد. نتایج نشان داد که تعدادی از نمونه ها در مقایسه با شاهد مقاوم از مقاومت مطلوبی برخوردار بودند. با گروه بندی (کلاستر بندی) نمونه ها نیز در یک گروه قرار گرفتند. برای به دست آوردن نشانگرهای (Simple Sequence Repeats) SSR پیوسته با مقاومت در نمونه ها، از ده جفت آغازگر استفاده شد. نتایج به دست آمده آزمایشگاهی نشان داد که نمونه های ذکر شده دارای تک باند اختصاصی مقاومت به بیماری بوده و آغازگرهای GWM234، GWM340 و GWM251 با بهینه سازی شرایط آزمایش و تعداد نمونه های بیشتر می توانند نمونه های مقاوم را از حساس تفکیک کنند.

واژه های کلیدی: فوزاریوم سنبله، گندم های ایران، نشانگر SSR، ارزیابی ملکولی

مقدمه

به بیماری و مهیا بودن شرایط جوی در مناطق شمالی کشور، خسارت ناشی از این بیماری بسیار چشمگیر بوده است (Malihipoor *et al.*, 2000; Golzar, 1989; Foroutan *et al.*, 1993).

روش‌های متداول اصلاح نباتات مبتنی بر انتخاب گیاهان در مزرعه یا شرایط محیط کنترل شده بر اساس فنوتیپ می‌باشد، اما در کنار روش‌های متداول، تکنیک‌های جدید مولکولی این امکان را فراهم می‌سازد که انتخاب مستقیماً در سطح DNA (ژنوتیپ) انجام گیرد و بنابراین باعث افزایش دقت بیشتر گزینش، صرفه‌جویی در زمان و احتمالاً ارزیابی‌های پرهزینه می‌گردد (Buerstmayer *et al.*, 2002).

هدف از این پژوهش مشخص نمودن ژنوتیپ‌های مقاوم و متحمل گندم ایرانی به بیماری فوزاریوم سنبله گندم به نحو پیشرفته در بین نمونه‌هایی بود که از پیش به صورت مشاهده‌ای ارزیابی و انتخاب شده‌اند و همچنین امکان دستیابی به نشانگرهای مولکولی چند شکلی توالی تکراری ساده^۳ که مرتبط با مقاومت به بیماری فوزاریوم سنبله در گندم‌های مورد ارزیابی بود. استفاده و بهره‌گیری از ذخایر توارثی داخلی از برنامه‌های اساسی و پایه‌های محکم کشاورزی پایدار هر کشور محسوب می‌شود. از آنجا که ایران از کشورهای غنی از نظر ذخایر توارثی تعدادی از محصولات مهم از جمله گندم است، ارزیابی اولیه و پیشرفته ذخایر ارزشمند گندم در ارتباط با

با توجه به افزایش رشد جمعیت و نیاز به تأمین امنیت غذایی، افزایش تولید در واحد سطح محصولات زراعی می‌تواند به عنوان یک راهبرد اساسی در حل مشکل تأمین غذا به شمار آید. در میان گیاهان زراعی، گندم با دارا بودن مواد غذایی باارزش مانند انواع پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی، حدود 25٪ کالری غذایی مردم جهان را تأمین می‌نماید (Salunkhe *et al.*, 1985).

با توجه به محدودیت‌های افزایش سطح زیرکشت گندم و پایین بودن میانگین عملکرد گندم در کشور افزایش عملکرد می‌تواند یکی از راه کارهای عملی برای پاسخگویی به نیازهای کشور باشد. از عواملی که باعث کاهش عملکرد در واحد سطح می‌گردند، می‌توان به تنش‌های غیر زیستی و تنش‌های زیستی مانند آفات و بیماری‌ها اشاره نمود. یکی از تنش‌های زنده، بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم یا FHB^۱ که عموماً تحت عنوان اسکب^۲ نامیده می‌شود، یکی از بیماری‌های مخرب در مناطق گرم و مرطوب کشت گندم در جهان می‌باشد (Bai and Shaner, 1994). بیماری فوزاریومی سنبله یکی از بیماری‌های مهم گندم در استان‌های مازندران، گلستان، زنجان، فارس و اردبیل (دشت مغان) به شمار می‌رود (Malihipoor *et al.*, 2000). در چند سال گذشته به علت وجود منابع آلودگی، کشت ارقام حساس

¹ Fusarium Head Blight

² Scab, White head, Pink scab, Head Scab, Wheat scab

³ Simple Sequence Repeats (Microsatellite)

و مشخص گردیدند. در خلال آزمایش های بیماری های گندم از میان توده های ارزیابی شده از کلکسیون گندم موجود در بانک ژن گیاهی ملی ایران، 22 توده یکنواخت و رقم با شاهد حساس فلات و شاهد مقاوم SUMAI3 گزینش شدند (جدول 1). توده های شناسایی شده در مزرعه آزمایشی ایستگاه قراخیل ساری، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران که برای ارزیابی، شرایط بسیار مطلوبی برای شیوع بیماری دارد ارزیابی شدند (شکل 1). توده های مورد ارزیابی با شاهد های حساس و مقاوم در دهم آذرماه سال 1381 در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار کشت شدند. هر واحد آزمایشی شامل سه خط دو متری بود. بذور به عمق کاشت 5 سانتی متر و در ردیف های با فاصله 30 سانتی متر از همدیگر کاشته شدند. عملیات کود پاشی به نسبت 90 کیلوگرم در هکتار اوره، 23 کیلوگرم در هکتار پتاس و 14 کیلوگرم در هکتار فسفر صورت گرفت. کنترل علف های هرز به صورت مکانیکی و شیمیایی به دفعات لازم در انتهای مرحله پنجه دهی به بعد انجام شد.

اهداف اصلاحی این محصول که بر طرف کننده مشکلات تولید است بایستی نسبت به ارقام و تلاقی های وارداتی در اولویت قرار گیرد. از سال 81-1376 با روش های ارزیابی حدود 3350 نمونه گندم از ذخایر موجود در بانک ژن در منطقه مساعد اپیدمی FHB در ایستگاه قراخیل مازندران، 55 نمونه به عنوان نمونه های مقاوم غربال شدند (Totiaei, 2003)، در حالی که تاکنون ارقام مقاوم به FHB در بین گندم های ایرانی شناسایی نشده است. دستیابی به چنین نمونه یا نمونه هایی گامی مهم و نوین برای پیشگیری از این بیماری خواهد بود. از سوی دیگر، بهره گیری از بیوتکنولوژی در تحقیقات و به ویژه ارزیابی های پیشرفته به عنوان یک ضرورت برای کشاورزی کاملاً محسوس است. تلاش در جهت دستیابی به نشانگر های اطلاعاتی¹ و سرانجام پیدا کردن نشانگر مولکولی پیوسته با مقاومت حرکتی نوین در برنامه های پایه ای اصلاح نباتات به حساب می آید.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

با بررسی مقاومت توده های انتخابی گندم های موجود در بانک ژن گیاهی ملی ایران به بیماری فوزاریوم سنبله گندم، از سال 81-1376 ارزیابی مشاهده ای حدود 3350 نمونه گندم از ذخایر موجود در بانک ژن در منطقه مساعد اپیدمی طبیعی در ایستگاه قراخیل مازندران 55 نمونه به عنوان مقاوم غربال شده

¹ - Informative markers



شکل 1- توده های کشت شده برای ارزیابی مقاومت به فوزاریوم سنبله گندم در ایستگاه تحقیقات کشاورزی قراخیل ساری.

Figure 1- Accessions cultivated for resistance evaluation to wheat Fusarium head blight in research station of Gharakhil, Sari.

جدول 1- توده های گندم مورد ارزیابی پیشرفته مقاومت به فوزاریوم سنبله و شماره ثبت آنها در بانک ژن گیاهی ملی ایران در ایستگاه قراخیل ساری.

منشاء	رقم/توده	ردیف	منشاء	رقم/توده	ردیف
Origin	Accession	No.	Origin	Accession	No.
RUSSIA	KC6267	13	IRAN	FALAT	1
RUSSIA	KC6273	14	IRAN	KC2131	2
CHINA	KC6301	15	CHINA	KC6158	3
CHINA	KC6303	16	RUSSIA	KC6430	4
CHINA	KC6343	17	CHINA	SUMAI3	5
AMERICA	KC6349	18	CHINA	KC6390	6
CHINA	KC6351	19	CHINA	KC6518	7
CHINA	KC6356	20	CHINA	KC6570	8
RUSSIA	KC6266	21	AMERICA	KC6002	9
GERMANY	KC6362	22	RUSSIA	KC6104	10
RUSSIA	KC6667	23	RUSSIA	KC6143	11
RUSSIA	KC6364	24	RUSSIA	KC6246	12

Table 1- Accessions cultivated for resistance evaluation to wheat Fusarium head blight in Gharakhil research station, Sari. Their origin and accession number in National Plant Gene Bank of Iran is shown.

ویژگی جدایه های قارچ فوزاریوم
 پنج جدایه قارچ فوزاریوم
 در این پژوهش از واحد بیماری‌های بخش
 تحقیقات غلات، مؤسسه تحقیقات اصلاح و
 تهیه نهال و بذر تهیه شد (جدول 2).

جدول 2- مشخصات جدایه های فوزاریوم، رقم گندم میزبان و محل جمع آوری آنها (Alizadeh et al., 1998).

شماره نمونه Sample No.	محل جمع آوری Collection Area	رقم گندم Cultivar	گونه <i>Fusarium</i> Isolates Species
162	دشت ناز (ساری)	گلستان	<i>F. graminearum</i>
163	دشت ناز (ساری)	گلستان	<i>F. graminearum</i>
170	سرخنکلاته (گرگان)	فلات	<i>F. graminearum</i>
174	عراقی محله (گرگان)	Kauz	<i>F. graminearum</i>
178	عراقی محله (گرگان)	یاوارس	<i>F. graminearum</i>

Table 1- *Fusarium* isolates characteristics; their wheat host cultivar, the area of collection and the sample no. (Alizadeh et al., 1998).

استفاده از کلیدهای تشخیص گونه‌های فوزاریوم
 (Nelson et al., 1983) انجام شد.

تهیه مایه تلقیح، آلودگی مصنوعی و
 ارزیابی بیماری

برای تهیه مایه تلقیح از روش وگنر
 استفاده شد (Wegener, 1992). در این روش
 در ارلن‌های به حجم 250 میلی‌لیتر مقدار 2/5
 گرم کاه گندم به اضافه 2/5 گرم کاه جو آسیاب
 شده به همراه 125 میلی‌لیتر آب مقطر ریخته
 شده و در اتوکلاو استریل شدند، عمل استریل
 کردن سه مرتبه تکرار گردید. قطعه کوچکی به
 قطر حدود 3-5 میلی متر از میسلیم‌های جدایه
 مورد نظر به همراه محیط کشت برداشته شده و
 در داخل ارلن‌ها ریخته شد. سپس ارلن‌ها در

جدایه های بالا در بین 50 نمونه مبتلا
 به بیماری که 30 نمونه از مناطق مختلف
 گرگان، مازندران، جیرفت و بندر عباس جمع
 آوری و مورد شناسایی قرار گرفتند و 20 جدایه
 دیگر قبلاً در واحد بیماری‌ها بخش تحقیقات
 غلات شناسایی شده بودند، بر اساس شدت
 بیماریزایی انتخاب شدند (Alizadeh et al.,
 1998). قارچ عامل بیماری از سنبله‌های گندم
 آلوده ارقام مختلف گندم با استفاده از محیط
 کشت PDA جداسازی شد. پس از جدا سازی،
 خالص سازی جدایه ها با روش تک اسپور و
 با استفاده از تکنیک مخطط کردن روی محیط
 آب و آگار 2٪ انجام شد. تشخیص جدایه‌ها با

نشان می‌دهد. برای تعیین این پارامتر از هر کرت 50 خوشه را به طور تصادفی انتخاب و تعداد خوشه‌های آلوده را شمارش و درصد آن را نسبت به کل خوشه‌ها (50 عدد) محاسبه نمودیم. دو روش برای ارزیابی در مزرعه وجود دارد. الف) اندازه‌گیری به روش مرکز تحقیقات بین‌المللی گندم و ذرت (سیمیت) (Ireta and Gilchrist., 1994). ب) روش تغییر یافته ژاپنی در مزرعه (Wilcoxon, et al., 1992).

روشی که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت در حقیقت تلفیقی از روش‌های یاد شده است که در آن شاخص بیماری از فرمول زیر مورد محاسبه قرار می‌گیرد. البته در این محاسبه 50 خوشه استفاده گردید.

$$DIX = \frac{\text{تعداد سنبله هر تیپ} \times \text{تیپ آلودگی}}{5 \times 50}$$

عدد 5 نشانه حداکثر تیپ آلودگی بوده و تقسیم سطح آلودگی هر تیمار بر حاصلضرب 5×50 درصد آلودگی سنبله یا شاخص بیماری DIX^1 را نشان می‌دهد که در آن: تیپ آلودگی $1 = 20\%$ خوشه آلوده، تیپ آلودگی $2 = 40\%$ خوشه آلوده، تیپ آلودگی $3 = 60\%$ خوشه آلوده، و تیپ آلودگی $4 = 80\%$ خوشه آلوده است.

ارزیابی نمونه‌ها با نشانگرهای

مولکولی

بذور نمونه‌ها در گلدان‌هایی به قطر 20 سانتی‌متر کشت و در گلخانه بانک ژن گیاهی

دمای 25-30 درجه سانتی‌گراد روی شیکر دورانی گذاشته شد. پس از گذشت حدود 96 ساعت اسپورهای فراوانی از جدایه مورد نظر به دست آمد. مایه تلقیح تهیه و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. غلظت سوسپانسیون کنیدی به 5×10^4 اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید. اندازه‌گیری قدرت تهاجم مایه تلقیح طبق روش لمن و همکاران (Lemmens et al., 1993) در آغاز و پایان دوره آلودگی نشان داد که توانایی تهاجم در طول دوره آلودگی ثابت بوده است. در خرداد 1382 آلودگی مصنوعی در زمانی که بیش از 50 درصد گیاهان هر کرت به مرحله گلدهی رسیده بودند، انجام شد و پس از دو روز دوباره تکرار شد. آلودگی توسط یک دستگاه سمپاشی موتوری پشتی و افشانه کردن 50 میلی‌لیتر از سوسپانسیون کنیدی یک روز در میان و در هنگام عصر، پیش از غروب آفتاب انجام شد. سیستم مه‌پاش رطوبت مورد نیاز را به مدت 20 ساعت پس از آلودگی فراهم نمود. در همان سال درصد پیشرفت بیماری، توسط شاخصی بر مبنای صفر درصد (بدون بیماری) تا 100 درصد (آلودگی کامل) 10، 14 و 18 روز پس از آلودگی ارزیابی شد.

درصد آلودگی سنبله

اگرچه محاسبه درصد آلودگی سنبله به تنهایی نشان دهنده سطح مقاومت یا حساسیت ژنوتیپ مورد نظر نیست ولی شدت اپیدمی را

¹ Disease Index

(Lader VIII) که به نسبت 8:2 با بافر مخلوط و نمونه های مورد نظر در چاهک های ژل آگارز 2 درصد در بافر TAE بارگذاری شد. قطر ژل مورد استفاده در این سیستم 0/6 سانتیمتر بود که با توجه به ابعاد بدنه اصلی دستگاه ابعاد ژل (25x30 سانتی متری) توان جریان برق 85-80 وات انتخاب شد و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت.

تجزیه آماری داده ها

تجزیه واریانس داده های صفات کمی با استفاده از نرم افزار SPSS و برای گروه بندی نمونه ها بر اساس روش UPGMA² از برنامه Winboot استفاده شد. برای مطالعه روابط بین توده ها و پارامترهای آن، تمام ژنوتیپ های مورد مطالعه به صورت یک توده منفرد مورد استفاده و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

ارزیابی مزرعه ای

در آزمایش های مزرعه ای، 8 صفت که احتمال همبستگی آنها با بیماری اسکب وجود داشت از میان صفات موجود در دستورالعمل ارزیابی صفات موجود در گندم (IPGRI) و همچنین بر اساس نتایج پژوهش های مرتبط، ارزیابی و یادداشت برداری شدند. نتایج تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی در جدول 6 نشان داده شده است.

ملی ایران در دمای 20 ± 2 درجه سانتی گراد مورد مراقبت قرار گرفتند. برگ های جوان گیاهچه های هر نمونه پس از 3 هفته برداشت و برای استخراج DNA استفاده شدند. استخراج DNA از برگ های جوان به روش CTAB تغییر یافته صورت گرفت. تهیه محلول های لازم و مراحل استخراج DNA به روش (Saghai maroof *et al.*, 1994) انجام شد. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دستگاه های اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. به این ترتیب که میزان جذب نور در طول موج های 280 و 260 نانومتر اندازه گیری و از نسبت 260/280 برای بررسی کیفیت DNA استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) با استفاده از دستگاه BioRad در حجم واکنش 25 میکرولیتر صورت گرفت. برنامه ریزی دستگاه با توجه به تفاوت دمای اتصال آغازگر صورت گرفت. ده سیکل اول حرارتی به صورت کاهش نزولی حرارت¹ برنامه ریزی گردید (Don *et al.*, 1999). آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش پس از بررسی روی تحقیقات انجام شده و پایگاه های اطلاعاتی گندم انتخاب و میزان چند شکلی آنها بر اساس مقالات Roder و همکاران (1998) و Plasche و همکاران (1996) انجام شد (جدول 3). نمونه های PCR شده به همراه یک نشانگر پلکانی

² Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average

¹ Touch down

، توالی، تعداد تکرار توالی ساده و دمای PCR جدول 3- لیست آغازگرهای مورد استفاده در آزمون اتصال آنها.

Designation	Left primer	Right primer	Repeat	An. Temp.
GWM18	TGGCGCCATGATTGCATTATCTTC	GGTGCTGAAGAACCTTATTAGG	(CA)17GA(TA)4	50 ^{oC}
GWM120	GATCCACCTTCTCTCTCTC	GATTATACTGGTGCCGAAAC	(CT)11(CA)18	60 ^{oC}
GWM219	GATGAGCGACACCTAGCCTC	GGGGTCCGAGTCCACAAC	(GA)35imp	60 ^{oC}
GWM234	GAGTCTGATGTGAAGCTGTTG	CTCATTGGGGTGTGTACGTG	(CT)16(CA)20	55 ^{oC}
GWM251	CAACTGGTTGCTACACAAGCA	GGGATGTCTGTTCCATCTTAG	(CA)28	55 ^{oC}
GWM340	GCAATCTTTTTTCTGACCACG	ACGAGGCAAGAACACACATG	(GA)26	60 ^{oC}
GWM389	ATCATGTCGATCTCCTTGACG	TGCCATGCACATTAGCAGAT	(CT)14(GT)16	60 ^{oC}
GWM400	GTGCTGCCACCACTTGC	TGTAGGCACTGCTTGGGAG	(CA)21	60 ^{oC}
GWM408	TCGATTTATTGGGCCACTG	GTATAATTCTGTTACAGCACGC	(CA)>22(TA)(CA)7(TA)9	55 ^{oC}
GWM577	ATGGCATAATTGGTGAATTG	TGTTTCAAGCCCACTTCTATT	(CA)14(TA)6	55 ^{oC}

Table 3- Applied primers for PCR multiplication, their sequence, the number of simple sequence repeats and annealing temperature.

شده است و صفتی قابل اندازه‌گیری در مزرعه و گلخانه برای گیاه کامل می‌باشد. مرحله رشد گیاه و سن برگ‌ها می‌توانند در تنوع این صفت نقش مهمی داشته باشد. طولانی‌ترین دوره کمون در برگ پرچم می‌باشد و به ترتیب قرار گرفتن برگ‌ها از بالا به پایین ساقه، این دوره کاهش می‌یابد. نتایج ارزیابی نشان داد که رقم Sumai#3 کمترین درصد آلودگی را در بین ارقام و توده‌ها دارد و توده‌های KC6667، KC2131، KC6430 و KC6246 کمترین میزان آلودگی را در هر مرحله از اسپورپاشی از خود نشان دادند (جدول 4). بر اساس آزمایش‌های Miedaner و همکاران (1998) نمونه‌های مقاوم دارای میزان آلودگی کمتر بوده و با داشتن ژنهای مقاوم، از آلودگی سریع میزبان جلوگیری می‌کنند. ژنوتیپ‌های یاد شده که کمترین میزان آلودگی را نشان دادند، می‌توان جزء نمونه‌های مقاوم نسبت به بیماری فوزاریومی سنبله گندم محسوب کرد. بررسی سطح زیر منحنی پیشرفت آلودگی در مزرعه در سه نوبت اسپورپاشی و

میانگین 6 صفت تفاوت خیلی معنی‌داری (در سطح 1٪) نشان دادند. صفات خوشه‌های آلوده، سنبلچه‌های آلوده و بذور آلوده از صفاتی هستند که اختلاف خیلی معنی‌داری داشتند. این صفات که مرتبط با واکنش نمونه‌ها در برابر قارچ فوزاریوم هستند نشان دهنده اختلاف در حساسیت و مقاومت نمونه‌ها و مؤثر بودن این صفات در ارزیابی است. در بین صفات یادداشت برداری شده تراکم خوشه و تعداد روزهای به خوشه رفتن در بین نمونه‌ها، اختلاف معنی‌داری نداشتند. صفات وزن هزار دانه، وضعیت ریشک و ارتفاع بوته از صفاتی بودند که در این تحقیق اختلاف خیلی معنی‌داری نشان دادند.

مقایسه اجزای مقاومت در آزمایش

مزرعه

دوره کمون بیماری

تنوع برای دوره کمون در گندم نسبت به تمام نژادهای مختلف قارچ فوزاریوم گزارش

به بیماری اسکب در ژنوتیپ‌های انتخابی از نمونه‌های مورد ارزیابی، در مرحله گیاه کامل: 25 درصد از توده‌ها دارای تیپ آلودگی 5، 12/5 درصد از نمونه‌ها دارای تیپ آلودگی 4، 33/3 درصد دارای تیپ آلودگی 3، 8/3 درصد تیپ آلودگی 2 و بقیه یعنی 20/8 درصد دارای تیپ آلودگی 1 بودند که نمونه‌های مقاوم در این گروه قرار داشتند.

نتایج تجزیه خوشه‌ای برای صفات

زراعی

به منظور اندازه‌گیری و تعیین فواصل ژنتیکی و نیز الگوپذیری تنوع در اجزاء مقاومت به فوزاریوم سنبله‌گندم، از روش تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. برای برآورد فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها از ضریب اقلیدسی استفاده شد. هر چه فاصله ژنتیکی بین دو دسته بیشتر باشد آن دو دسته از هم دورترند. در این آزمایش بر اساس شدت بیماری سطح زیر منحنی گسترش بیماری (جدول 5) که خود تحت تاثیر آلودگی و دوره نهان و درصد آلودگی خوشچه و دانه قرار دارند، در دسته‌ها و خوشه‌های مختلف قرار گرفتند. هنگامی که فاصله کوفنتیک¹ روی عدد 10 قرار گیرد در مرحله اول 4 گروه ایجاد گردید که در این گروه‌ها نمونه‌های مشابه با یکدیگر قرار داشتند ولی در عین حال نمونه‌های مقاوم و حساس در گروه‌های متمایز قرار نگرفتند. در این بررسی،

ارزیابی نشان داد که پیشرفت آلودگی نمونه‌های فوق سطح زیر منحنی کمی داشته و نسبت به بیماری مقاوم بودند (جدول 5) و با نتیجه درصد آلودگی سنبله مطابقت داشت. توسط Mesterhazy (1989) بازده ژنوتیپ گندم در مراحل مختلف و مکان‌های مختلف بررسی و نشان داد که میزان سرعت رشد بیماری روی یک رقم، علاوه بر نوع رقم و مراحل مختلف رشدی، تحت شرایط محیطی به ویژه دما و رطوبت و طول روز قرار می‌گیرد.

بر اساس نتایج می‌توان گفت که علاوه بر شاهد حساس فلات از نظر سرعت رشد آلودگی، توده‌های KC6349، KC6390 و KC6158 جزء حساس‌ترین ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی بودند (جدول 4)، زیرا پس از گذشت سه نوبت اسپورپاشی و ارزیابی، بیشترین درصد آلودگی را به خود اختصاص دادند. این نتایج با یافته‌های به دست آمده برای سطح زیر منحنی پیشرفت آلودگی در مزرعه در سه دوره ارزیابی (جدول 5) نیز همخوانی دارد و اهمیت انجام ارزیابی پیشرفته را پس از ارزیابی مشاهده‌ای نشان می‌دهد.

تیپ آلودگی

تیپ آلودگی، نتیجه نهایی اثر متقابل میزبان و عامل بیماری است و معمولاً تیپ آلودگی صفر مصون و تیپ آلودگی 5 آلودگی کامل و حساسیت گیاه می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده (جدول 4) در بررسی مقاومت

¹ - Cofenetic Value

نشانگرهای مولکولی نشان می‌دهند (Roder et al., 1998; Hang et al., 2002). به علاوه، روشن شده است که ریزماهورها در ارتباط با آن بخش از ژنوم‌ها می‌باشند که نواحی کم نسخه نامیده می‌شوند (Morgante et al., 2002). این نشانگرها به عنوان ابزاری توانمند جهت تمایز ژنوتیپ‌ها از یکدیگر و مطالعه تنوع ژنومیکسی در ژرم پلاسما شناخته شده‌اند (Donini et al., 1999; Chebotal et al., 2001). در مقایسه‌ای که توسط Jones و همکاران (1998)، بین سه نشانگر AFLP، RAPD و SSR از نظر قابلیت اعتماد و تکرارپذیری نتایج انجام دادند مشخص نمودند که نشانگرهای SSR بالاترین تکرارپذیری را در میان نشانگرهای دیگر به خود اختصاص می‌دهند. در این آزمایش برای تمایز بهتر چند شکلی قطعات ریزماهور با توجه به این که ژل آگارز 2٪ استفاده شد، بنابراین توانایی تفکیک در حد قابل قبولی بوده است (شکل 3). انتخاب آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش پس از بررسی‌های گوناگون روی پژوهش‌های انجام شده و پایگاه‌های اطلاعاتی گندم و در نهایت با توجه به میزان چند شکلی آنها بر اساس مقالات Roder و همکاران (1998) انجام شد. تجزیه و تحلیل استفاده از تعداد 10 جفت آغازگر مربوط به نشانگر ریزماهور روی نمونه‌های مورد بررسی، نتایج متفاوتی را نشان داد. نشانگر GWM18 در

تمایز گروه‌ها در فاصله کوفتیک 9 صورت گرفت که موجب گروه‌بندی ارقام در پنج گروه جدید، با ویژگی‌های درون گروهی مشابه و بین گروهی متفاوت از نظر واکنش به قارچ عامل بیماری گردید. در خوشه اول هفت ژنوتیپ، در خوشه دوم پنج ژنوتیپ، در خوشه سوم چهار ژنوتیپ و در خوشه چهارم نیز چهار ژنوتیپ و در خوشه پنجم چهار نمونه قرار گرفت. با توجه به دندروگرام (شکل 2)، ارقام گروه یک و دو نسبت به گروه‌های دیگر شباهت بیشتری با هم دارند در عین حال این گروه‌بندی نیز تفکیک و تمایز خوبی را در بین نمونه‌ها نشان می‌دهد. با توجه به شکل دندروگرام، توده‌های مقاوم و نیز مقاوم از نظر سرعت رشد بیماری در مزرعه، همگی در یک دسته قرار گرفته‌اند و می‌توان مواد آزمایشی مقاوم را برای انجام آزمایش‌های بعدی و برنامه‌های اصلاحی از بین این توده‌ها انتخاب نمود.

نتایج آزمایش‌های مولکولی

استفاده از نشانگرهای مولکولی به دلیل ماهیت ویژه آنها می‌تواند در هر مرحله‌ای از رشد و بدون تخریب کامل بافت‌های مفید گیاه صورت گیرد. تحقیقات گسترده‌ای با این هدف و با کاربرد نشانگرهای مختلف: آیزوزایم، AFLP، RAPD و SSR در گونه‌های متعدد انجام شده است. در مورد برخی گونه‌های گیاهی، مشخص شده است که نشانگرهای ریزماهور تنوع بیشتری در مقایسه با سایر

نیز فقط در یک نمونه فرآورده در واکنش چند زنجیره ای تولید نکرد. البته این نشانگر از نظر نحوه تمایز نمونه ها مانند نشانگر قبلی است ولی از نظر تعداد بازهای توالی تکرار ساده این نشانگر 16bp کوچکتر از نشانگر قبلی است. نشانگر GWM340 در تعداد 23 نمونه تولید باند کرد. باندهای به دست آمده به دو اندازه مختلف تولید و نمونه ها را تفکیک نمود که 6 نمونه و شاهد مقاوم دارای باند بزرگتر از باند تولید شده 17 نمونه دیگر بود. البته نتایج تجزیه و تحلیل فرآورده حاصل از سه نشانگر ریز ماهواره GWM234، GWM251 و GWM340 که فرآورده‌های متفاوت از نظر اندازه داشتند می توانند اطلاعات مفیدی را ارائه دهند. البته برای استفاده از این نشانگرها برای تمایز نمونه های مقاوم و حساس نیاز به آزمایش های بیشتری از نظر ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی به ویژه تعداد نمونه های زیادتر و نسل های در حال تفرق است.

استفاده از نشانگر GWM389 در تمام نمونه ها تولید باند کرد، البته این فرآورده‌ها در تمام نمونه‌ها یکسان و هیچ تفاوتی از نظر اندازه نداشتند. بنابراین، استفاده از این نشانگر اطلاعات مفیدی در تمایز بین نمونه را ارائه نمی دهد. نشانگر ریزماهواره GWM400 برای تمام نمونه ها تولید باند نمود و باندها از نظر اندازه دو نوع بودند و هر 12 نمونه یک نوع باند تولید کردند، ولی در عین حال شاهد های

تمام نمونه‌ها باند در چهار اندازه متفاوت تولید کرد که 13 نمونه دارای باند یکسان از نظر اندازه بودند. البته نشانگر GWM577 نیز باندهایی مشابه نشانگر پیشین تولید کرد، اگرچه از نظر توالی و تعداد بازهای تکرارهای ساده تفاوت دارند و نشانگر GWM18 باند کمی بزرگتر تولید می کند، به نظر می رسد که در بازهای غیر تکراری تفاوت داشته که آن اختلاف را جبران می کند (جدول 3). این دو نشانگر ریز ماهواره در ارتباط با تمایز بین نمونه های مقاوم و حساس در این پژوهش اطلاعات مفیدی ندادند. نشانگر GWM120 در عین تولید باند در همه نمونه ها در 19 نمونه با اندازه یکسان تولید کرد. فرآیند تکثیر در 5 نمونه دیگر دو نوع باند با اندازه های متفاوت بود که اطلاعات مفیدی در مورد مقاومت و حساسیت به دست نیامد. نشانگر GWM219 در همه نمونه ها تولید باند نمود که اندازه آن در تعداد 20 نمونه مساوی بود. باند تولیدی در 4 نمونه دیگر که متفاوت از نمونه های یاد شده بودند اندازه باند نیز یکسان بود که این نمونه‌ها در یک گروه مقاوم و یا حساس نبودند. با نشانگر GWM234 در یک نمونه تولید باند نشد و در سایر نمونه ها تولید باند کرد که 16 نمونه دارای باند مشابه که شاهد حساس نیز جزء این گروه است و 7 نمونه نیز دارای باند یکسان و بزرگتر از باند نمونه های قبلی است و شاهد مقاوم نیز در این گروه قرار دارد (شکل 3). نشانگر ریز ماهواره GWM251

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 1، شماره 1، پاییز 1388)

مقاوم و حساس تفاوتی نشان ندادند.

جدول 4- نتایج ارزیابی مقاومت به فوزاریوم سنبله توده های گندم بر اساس تیپ آلودگی و درصد آلودگی سنبله.

ردیف No.	شماره ثبت شده در بانک ژن Gene Bank accession number	تیپ آلودگی Infection type	درصد آلودگی سنبله spike Infection percent
1	Falat	5	98
2	KC2131	1	4
3	KC6158	5	96
4	KC6430	1	3
5	Sumai#3	1	2
6	KC6390	5	85
7	KC6518	5	80
8	KC6570	4	54
9	KC6002	3	30
10	KC6104	5	81
11	KC6143	3	27
12	KC6246	1	6
13	KC6266	3	48
14	KC6267	3	39
15	KC6273	3	33
16	KC6301	3	37
17	KC6303	3	40
18	KC6343	2	12
19	KC6349	5	90
20	KC6351	2	20
21	KC6356	4	58
22	KC6362	4	58
23	KC6667	1	5
24	KC6364	3	57

Table 4- The evaluation results of accessions cultivated for resistance to wheat Fusarium head blight on the basis of infected Rachis percent and Infection type in Gharakhil research station, Sari.

ارزشمندی برای استفاده در اصلاح گندم در کشور وجود دارد. طی تحقیقی Roder و همکاران (1998) با استفاده از 230 آغازگر موفق به شناسایی 279 مکان ژنی شدند که از میان 214 جایگاه ریز ماهواره به عنوان نشانگرهای مفید شناسایی گردیدند.

نشانگر GWM408 در 23 نمونه تولید 4 نوع باند با اندازه متفاوت نمود. این نشانگر اگرچه از نظر تنوع، باندهای گوناگون و متمایزی تولید کرد ولی در مورد تمایز نمونه‌های حساس و مقاوم در این تحقیق زیاد مفید نبود. استفاده از نشانگرهای SSR نشان داد که نمونه های مورد آزمایش دارای تنوع خوبی بوده و منابع

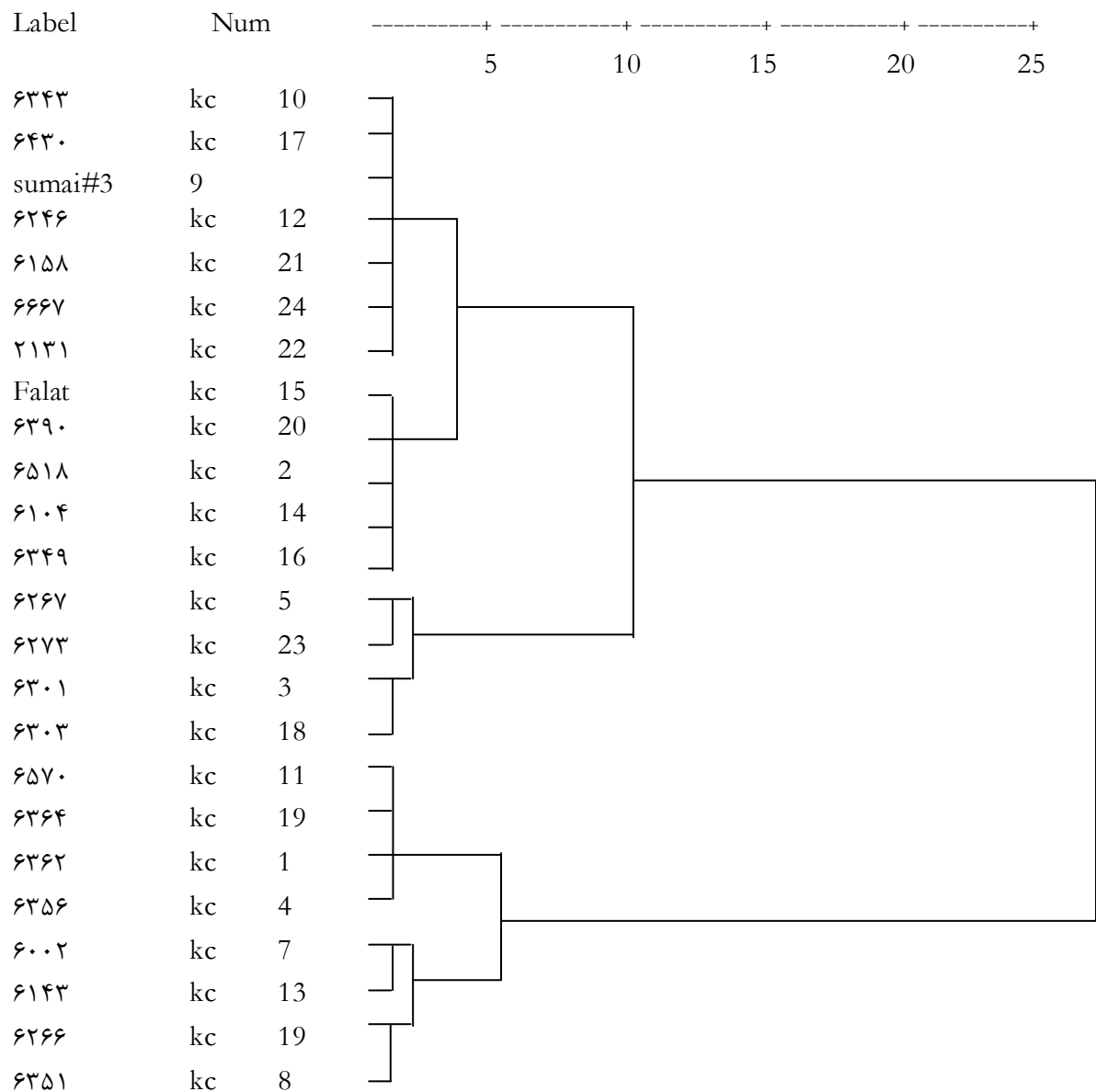
جدول 5 - سطح زیر منحنی پیشرفت آلودگی گندم‌های مورد ارزیابی در مزرعه در سه زمان مختلف 10 پس از افشانه کردن جدایه‌های مختلف فوزاریوم. (T3) و 18 روز (T2)، 14 (T1)

AUDPC	T3	T2	T1	KC	Number
1900	95	60	30	Falat	1
65	4	4	3	KC2131	2
1890	90	74	39	KC6158	3
40	2	2	0	KC6430	4
60	3	2	0	Sumai#3	5
1355	59	41	30	KC6390	6
867	59	45	29	KC6518	7
1530	78	65	43	KC6570	8
785	39	21	16	KC6002	9
770	37	24	8	KC6104	10
710	20	12	7	KC6143	11
50	3	2	2	KC6246	12
1530	59	40	24	KC6266	13
620	29	18	12	KC6267	14
460	25	12	6	KC6273	15
560	27	15	13	KC6301	16
767	34	24	13	KC6303	17
250	16	10	8	KC6343	18
1950	80	62	44	KC6349	19
505	25	51	9	KC6351	20
870	37	28	16	KC6356	21
915	36	31	18	KC6362	22
15	1	0	1	KC6667	23
850	47	21	13	KC6364	24

Table 5- AUPDC of wheat accessions evaluated in the field in 3 periods of 10 (T1), 14 (T2) and 18 (T3) days after spraying of different isolates of Fusarium.

تحقیق Roder و همکاران (1998) در تحقیق با ژنوتیپ‌های مورد بررسی و تعداد مشابه نشانگر ریز ماهواره می‌توان نتایج تحقیقات مختلف را مورد مقایسه قرار داد که در این آزمایش نیز نتایج مفیدی از نظر تنوع و وابستگی نشانگر به مقاومت و حساسیت ژنوتیپ‌ها به دست آمد.

مقایسه سطوح تنوع بین تحقیقات مختلف مشکل است زیرا هم تعداد الل‌های شناسایی شده در هر جایگاه، میزان تنوع ژنتیکی نمونه‌ها و هم به تعداد ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تحقیق بستگی دارد. با این حال آغازگرهای انتخاب شده علاوه بر نشان دادن تنوع آلی در



شکل 2 - تجزیه خوشه‌ای برای صفات اندازه‌گیری شده در مزرعه.

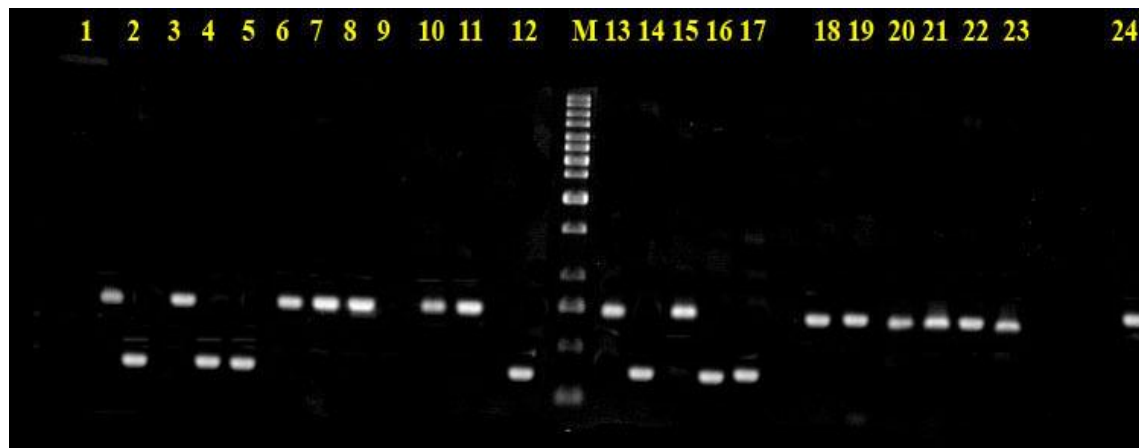
Figure 2- Cluster analysis of wheat for different traits evaluated in the field.

جدول 6- تجزیه واریانس گندم‌های مورد ارزیابی برای صفات بررسی شده در مزرعه.

میانگین مربعات (MS)								درجه آزادی	منابع تغییرات (S.O.V)
تعداد روز به خوشه رفتن Days to heading	تراکم خوشه Spike Density	وضعیت ریشک Awn/Awn less	ارتفاع بوته Plant height	وزن هزار دانه 1000 kernel weight	آلودگی بذر Grain Infection	آلودگی سنبلچه Infection Spikelet	خوشه های آلوده spikes Infection	Df	
4.55	4.76	75.4	4.75	0.976	6.7	0.1	4.5	2	تکرار repeat
17.2	0.035 ^{ns}	17199**	327.36**	76.01**	276.2**	1164.5**	2075.5**	23	تیمار treatment
3.85	0.276	3.22	3.39	0.361	103	1.6	3.9	46	اشتباه error
								71	کل total

^{ns} اختلاف غیر معنی دار و ** اختلاف خیلی معنی دار (در سطح 1 درصد)

Table 6. Analysis of variance evaluated wheat accessions for different traits in the field of Gharakhil station, Sari.



شکل 3- ژل آگارز 2% با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید، حاوی باندهای ریز ماهواره حاصل از به کارگیری آغازگر GWM234 در تکثیر PCR با استفاده از DNA نمونه‌های گندم مورد ارزیابی بترتیب: 1: 9، (KC6570) 8، (KC6518) 7، (KC6390) 6، (Sumai3) 5، (KC6430) 4، (KC6158) 3، (KC2131) 2، (Falat) (KC6273) 15، (KC6267) 14، (KC6266) 13، (KC6246) 12، (KC6143) 11، (KC6104) 10، (KC6002) 23، (KC6362) 22، (KC6356) 21، (KC6351) 20، (KC6349) 19، (KC6343) 18، (KC6303) 17، (KC6301) 16، (KC6264) 24، (KC6667)

Figure 3- Agarose Gel 2% Stained in Ethidium Bromide, the produced bands of microsatellites by 1 in PCR using extracted DNA of wheat accessions respectively; 234 application of primers GWM (KC6570) 8، (KC6518) 7، (KC6390) 6، (Sumai3) 5، (KC6430) 4، (KC6158) 3، (KC2131) 2، (Falat) (KC6273) 15، (KC6264) 14، (KC6266) 13، (KC6246) 12، (KC6143) 11، (KC6104) 10، (KC6002) 9، 23، (KC6362) 22، (KC6366) 21، (KC6351) 20، (KC6349) 19، (KC6343) 18، (KC6303) 17، (KC6301) 16، (KC6264) 24، (KC6667)

فهرست منابع

1. Alizadeh A, Saeidi A, Malihipoor A, Safaei N, Seraj M, Dehghan MA, Hashemi M, and Ebrahimnejad A (1998) National project of Fusarium head blight disease and methods of its' control in Iran. Agricultural College of University of Tarbiat Moddaress and Seed & Plant Improvement Institute.
2. Bai GH, Shaner G (1994) Scab of wheat: prospects for control. Plant Disease 78: 760-766.
3. Buerstmayr H, Lemmens M, Hartl L, Doldi L., Steiner B, Stierschneider M, and Ruckenbauer P (2002) Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). Theoretical and Applied Genetics 104-84-91.
4. Buerstmayr H, Fedak, G and Ruckenbauer, P (1999a) Back-cross reciprocal monosomic analysis of *Fusarium* head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics 98: 76-85.
5. Buerstmayr, H, Lemmens, M, Berlakovich, S and Ruckenbauer, P (1999b) Combining ability of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* (W.G.Smith) In the F1 of a seven parent diallel of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica; 110: 199-

206.

6. Cook, RJ (1993) *Fusarium* foot rot of wheat and its control in the Pacific Northwest. Plant Disease; 64: 1061-1066.
7. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Mattick JS, (1999) Touchdown PCR to circumvent Spurious Priming during Gene amplification. Nucleic Acid Research. 19: 4008, FAO production year book. (1996) So:235pp.
8. Foroutan A, Ershad J, Dalili A, Bamdadian T, Gerami Gh (1993) Wheat head blight epidemic in Mazandaran. 11th Plant disease congress of Iran University of Guilan. Rasht Iran.
9. Golzar H (1989) Wheat head blight disease Investigation on the Causal agent, methods of infection and contamination via seed. Plant Disease 25: 17-25.
10. Golzar H, Foroutan A, Ershad J (1998) Investigation on species of *Fusarium* the Causal agent of wheat head blight and searching for resistance sources for *F. graminearum* in Gorgan and Mazandaran. The journal of science and research of plant diseases experts society of Iran. Vol. 34. No. 3 & 4.
11. Ireta J, Gilchrist S, (1994) Wheat special report No. 21b. *Fusarium* Head Scab of Wheat. CIMMYT, Mexico.
12. Malihipoor A, Okhovat M, Alizadeh A (2000) Analysis of development of wheat *Fusarium* head blight disease in the controlled environment using the epidemiologic models. The journal of science and research of plant diseases experts' society of Iran 36 : 1-2.
13. Mesterhazy A, (1989) Progress in breeding of wheat and corn genotypes not susceptible to infection by *Fusarium*. In: J. Chelkowski (ed.), *Fusarium–Mycotoxins, Taxonomy, and Pathogenicity*, 357-386. Elsevier, Amsterdam.
14. Morgante M, Olivieri AM, (1993) PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. The Plant Journal 3: 175-182.
15. Nelson OE, Tousoun TA, Marasas WFO, (1983) *Fusarium* species: An Illustrated Manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.
16. Powell W, Machray GC, Provan JP, (1997) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Reviews: Trends of plant science: 215-221.
17. Roeder MS, Korzun V, Wendenhake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW, (1998) A microsatellite map of wheat. Genetics; 149:2007-2023.
18. Saghai maroof MA, Biyashevyan GP, Zhang Q, Allard RW, (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal location, population dynamics. The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 91:5466-4470.
19. Salunkhe DK, Kadam SS, Ausin A, (1985) Quality of wheat and wheat products. Metropolitan Book Co., New Delhi. 366.pp.
20. Sant VJ, Patanakar AG, Sarode ND, Ranjekar PK, Gupta VS, (1999) Potential of DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1217-1225.
21. Snijders CHA, (1990a) Genetic variation for resistance to *Fusarium* head blight in bread wheat. *Euphytica*; 50:171-179.
22. Totiaei A (2003) Evaluation of wheat landraces of National Plant Gene Bank of Iran to *Fusarium* head blight. National Plant Gene Bank of Iran, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj Iran.
23. Wegener M (1992) Optimierung Von Saatgutpillirungen mit mikrobiellen antagonistien zur biologischen Bekämpfung von *Fusarium culmorum* (W.G.S.M.) Sacc. In Weizen.

Diplomarbeit, Universtot Gottingen.

24. Wilcoxon RD, Busch RH, Ozmon EA, (1992) Fusarium head blight resistance in spring wheat cultivars. Plant Disease 76: 658-661.

Field and Molecular Evaluation of Resistance of Iranian Bread Wheats to Fusarium Head Blight

Niaz Ali Sepahvand^{*1}, Farzad Heidari², Abdolhosein Totiaei³, Mitra Seraj³ and Javad Mozafari¹

¹ Academic members of Seed & Plant Improvement Institute

² Previous M.Sc. Student of Islamic Azad University Campus of Karaj

³ Previous Academic members of Seed & Plant Improvement Institute

Abstract

Fusarium Head Blight is a critical wheat disease in Iran, particularly in the provinces of; Mazandaran, Golestan, Ardabil (Moghan) and Fars. The main casual agent of this disease is the fungus *Fusarium graminearum*. Primary evaluation of 3350 bread wheat accessions of National Plant Gene Bank of Iran to FHB, revealed that some of them were resistant. Twenty two resistant samples along with 1 resistant check and 1 susceptible check derived from primary selection were evaluated using RCBD with 3 replications surrounded by the spreader in Gharakhil Research Station, Sari in autumn 2002. Five severe casual isolates of Fusarium were used for the resistance evaluation. Five times of spray inoculation were applied on the samples just before sunset, in which the concentration of inocula was 3×10^4 macro conidia/ml.

The main agronomic traits were evaluated. The plant pathogen interaction characters, disease index, disease incidence and Fusarium damaged kernels were evaluated three times 10, 14 and 18 days after inoculation. Disease intensity area under the disease progress curve (AUDPC) was also calculated. The results revealed that several samples were resistant to disease compared to resistant check. Cluster analysis showed that the resistant accessions were grouped in the same cluster with the resistant check, Sumai#3. For achievement of markers linked to resistance, ten SSR primer pairs were applied. The samples produced different band patterns; however the primers GWM234, GWM251 and GWM340 were informative. They may be able to discriminate resistant samples through optimizing lab conditions and further trials.

Key words: *Fusarium Head Blight, Iranian Wheats, Resistant Wheat to Fusarium, SSR Marker.*

* Corresponding author: N. A. Sepahvand

Email: niazsepahvand@gmail.com