جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد شانزدهم، ویژه‌نامه ۲، ۱۳۸۸
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

ارتباط بین نشانگرهای RAPD و حساسیت پایه‌ای به تریفلومیزول در جدایه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی طوقه برنج

علی حسین‌نژاد[۱]، *دوستمراد ظفری[۲] و فریدون پاداشت‌دهکایی[۳]
[۱] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، [۲] دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان،
[۳] مربی پژوهشی گروه گیاهپزشکی، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۲٤

چکیده

سه گونه *Fusarium fujikuroi*، *F. proliferatum* و *F. verticillioides* به‌عنوان عامل پوسیدگی طوقه برنج در مناطق مختلف معرفی شده‌اند. جهت پیگیری ایجاد مقاومت به قارچ‌کش جدید در جدایه‌های قارچ عامل بیماری، یافتن حساسیت پایه‌ای، قبل از کاربرد در سطح مزرعه الزامی می‌باشد. تنوع ژنتیکی به‌عنوان یکی از عوامل اصلی تفاوت در حساسیت پایه‌ای به قارچ‌کش‌ها شناخته شده است. در این پژوهش، حساسیت پایه‌ای ٤٦ جدایه قارچ‌های عامل بیماری به قارچ‌کش تریفلومیزول در محیط‌کشت PSA حاوی غلظت‌های مختلف از ماده مؤثره این قارچ‌کش مورد مطالعه قرارگرفت و سپس EC_{50} و MIC قارچ‌کش برای هرکدام از جدایه‌ها محاسبه شد. ۲۱ جدایه منتخب، متعلق به سه جمعیت آمیزشی (گونه) مختلف، جهت بررسی‌های مولکولی با استفاده از نشانگرهای RAPD مقایسه شدند. نتایج نشان داد که جدایه‌های مختلف براساس هم‌پوشانی حدود اطمینان ۹۵ درصد EC_{50}، در ٤ گروه قرار گرفته و تنها دو جدایه، حساسیت کمتری نسبت به این قارچ‌کش داشتند. در دندروگرام به‌دست آمده از نشانگرهای RAPD، جدایه‌های با EC_{50} بالاتر، حساس‌ترین و کم‌ترین حساسیت جدایه‌ها، تفاوت بیشتری با سایرجدایه‌ها نشان دادند. جدایه‌های *F. fujikuroi* نیز از لحاظ شاخص MIC تمایز جالب‌توجهی نشان دادند. تفاوتی که با استفاده از نشانگرهای RAPD در بین جدایه‌ها مشاهده شد، اثبات کرد که تفاوت در حساسیت پایه‌ای به تریفلومیزول، ناشی از تنوع ژنتیکی است.

واژه‌های کلیدی: حساسیت پایه‌ای، تریفلومیزول، *Fusarium*، RAPD

مقدمه

سه گونه *Fusarium fujikuroi*، *F. proliferatum* و *F. verticillioides* به‌عنوان عامل پوسیدگی طوقه برنج[۱] در مناطق مختلف معرفی شده‌اند (دسجاردینز و همکاران، ۲۰۰۰). در دهه ۷۰ شمسی با تهیه و کشت ارقام اصلاح‌شده به‌خصوص رقم خزر، این بیماری به سرعت در سطح استان گیلان گسترش یافت (پاداشت‌دهکایی و همکاران، ۱۹۹٦). عباس‌زاده (۲۰۰۵) نشان داد که سه جمعیت آمیزشی A (*F. verticillioides*)، C (*F. fujikuroi*) و D (*F. proliferatum*) از

* مسئول مکاتبه: zafari_d@yahoo.com

1- Rice Bakanae Disease and Foot Rot

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

گونه‌های کمپلکس *Gibberella fujikuroi*[1] عامل پوسیدگی طوقه برنج در گیلان می‌باشند. ادانل و همکاران (۱۹۹۸) و نیز استین‌کمپ و همکاران (۲۰۰۰) مطالعاتی را درباره روابط فیلوژنتیک[2] (خویشاوندی) گونه‌های مختلف این کمپلکس انجام داده‌اند. همچنین بررسی‌های لسلی و همکاران (۲۰۰٤) روی جمعیت‌های آمیزشی این کمپلکس، نزدیک بودن دو گونه *F. fujikuroi* و *F. proliferatum* را نشان داده است.

جهت پیگیری ایجاد مقاومت به قارچ‌کش جدید در جدایه‌های قارچ عامل بیماری، یافتن حساسیت پایه‌ای، قبل از کاربرد در سطح مزرعه الزامی می‌باشد. تنوع ژنتیکی به‌عنوان یکی از عوامل اصلی تفاوت در حساسیت پایه‌ای به قارچ‌کش‌ها شناخته شده است (برنت، ۱۹۸۸؛ گیسی و استاهل چک، ۱۹۸۸؛ هویت، ۱۹۹۸؛ راسل، ۲۰۰۳). قارچ‌کش‌های بازدارنده متیل‌زدایی[3] (DMI) یکی از گروه‌های مهم قارچ‌کش‌ها می‌باشند که حساسیت پایه‌ای جدایه‌های قارچ‌های مختلف نسبت به آنها در مطالعات هسیانگ و همکاران (۱۹۹۷) و نیز کولر و همکاران (۱۹۹۷)، قبل از کاربرد در مزرعه بررسی شده است. کولر (۱۹۸۸) نیز مروری بر مطالعات انجام شده درباره نحوه عمل و مقاومت به این گروه از قارچ‌کش‌ها انجام داده است. همچنین هاماموتو و همکاران (۲۰۰۰) ایجاد مقاومت به قارچ‌کش‌های مختلف این گروه را در شرایط آزمایشگاه مورد مطالعه قرار داده‌اند.

امروزه از تکنیک‌های مولکولی جهت شناسایی جدایه‌های مقاوم به قارچ‌کش‌ها استفاده می‌شود. چنانکه کونها و ریزو (۲۰۰۳) یک روش تشخیصی را برای شناسایی جدایه‌های مقاوم *Helmintosporium solani* به قارچ‌کش‌های گروه بنزیمیدازول[4]، با استفاده از PCR-RFLP بر روی ژن بتاتوبولین معرفی نمودند. فابریتیوس و همکاران (۱۹۹۷) نیز توانستند آلل‌ها و لوکوس‌های بدون حساسیت به متالاکسیل[5] را در جدایه‌های *Phytophtora infestans*، با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD[6] و RFLP[7] شناسایی نمایند. از سوی دیگر، یورمن و همکاران (۲۰۰۰) نیز تا اندازه‌ای توانستند جدایه‌های *Botrytis cinerea* حساس و مقاوم به تیوفانات متیل[8] و وینکلوزولین[9] را با استفاده از نشانگرهای RAPD تفکیک نمایند. همچنین با استفاده از نشانگرهای مولکولی، مطالعاتی جهت بررسی تنوع در جمعیت‌های گونه‌های مختلف *Fusarium* انجام شده است. چنانکه هوانگ و همکاران (۱۹۹۷) و دامادزاده (۲۰۰۳) از نشانگرهای RAPD جهت بررسی تنوع در جمعیت *F. moniliforme* استفاده نمودند. رابیو و همکاران (۲۰۰۹) دو ژن و ارتباط نشانگرهای RAPD با آنها را در مقامت به *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* در نخودی که از لقاح بین رقم حساس و مقاوم به‌دست آمده بود مورد بررسی قرار دادند. بایراکتار و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از نشانگرهای RAPD و SSR تنوع ژنتیکی در جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* جدا شده از نخود در ترکیه را مورد مطالعه قرار دادند. کارتر و همکاران (۲۰۰۸) تعداد ۱۷۲ جدایه *Fusarium fujikuroi* از برنج و سوروف درکالیفرنیا جمع‌آوری و با کمک نشانگر AFLP و روش‌های دیگر مانند VCG مورد مطالعه قرار دادند. جدایه‌ها در هر دو روش به ٦ گروه شبیه تقسیم شدند.

در این بررسی، با توجه به ثبت قارچ‌کش تریفلومیزول[10] توسط ایزدیار و همکاران (۲۰۰۰) جهت مبارزه با پوسیدگی طوقه برنج و عدم مصرف قبلی آن در مزارع استان گیلان، هدف از این مطالعه بررسی حساسیت پایه‌ای جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری به قارچ‌کش یاد شده و همچنین استفاده از نشانگرهای RAPD و ارتباط این نشانگرها با حساسیت پایه‌ای به قارچ‌کش تریفلومیزول تعیین شد.

1- *Gibberella Fujikuroi* Species Complex
2- Phylogenetic
3- Demethylation Inhibitor Fungicides
4- Benzimidazole
5- Metalaxyl
6- Randomly Amplified Polymorphic DNA
7- Restriction Fragment Length Polymorphism
8- Thiopanate-Methyl
9- Vinclozolin
10- Triflumizole

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی مورفولوژیک جدایه‌های قارچ عامل بیماری: در این بررسی از ٤٦ جدایه قارچ عامل بیماری که توسط عباس‌زاده (۲۰۰۵) در سال ۱۳۸۳ از مزارع مختلف استان گیلان جمع‌آوری و بیماری‌زایی آنها اثبات شده بود، استفاده گردید. جمع‌آوری نمونه‌ها از مزارعی که رقم خزر در آنها کشت می‌شد، در اولویت قرار داشت. به‌منظور خالص‌سازی، از محیط کشت‌های آب- آگار[1] و سیب‌زمینی دکستروز آگار[2] و روش تک‌اسپور استفاده شد.

با توجه به تعریف گونه بیولوژیک، یکی از راه‌های شناسایی جدایه‌ها در گونه‌های *Gibberella fujikuroi* species complex، تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌ها از طریق تلاقی با جدایه‌های استاندارد است (سامرل و همکاران، ۲۰۰۳). تیپ آمیزشی ٤۳ جدایه از جدایه‌های استفاده شده، توسط عباس‌زاده (۲۰۰۵) و لطفی‌میری (۲۰۰٦) تعیین شده بود. همچنین بررسی‌های تکمیلی مورفولوژی با استفاده از محیط کشت‌های PDA، CLA[3] و SNA[4] و شرح گونه‌های گرلاخ و نیرنبرگ[5] (۱۹۸۲) و نیرنبرگ و ادانل (۱۹۹۸) برروی ٤٦ جدایه مورد بررسی نشان داد که این جدایه‌ها متعلق به سه جمعیت آمیزشی A (*F. verticillioides*)، C (*F. fujikuroi*) و D (*F. proliferatum*) از گروه *Gibberella fujikuroi* species complex می‌باشند.

آزمایش‌های حساسیت به قارچ‌کش: قارچ‌کش تریفلومیزول (قارچ‌کش سیستمیک از گروه ایمیدازول‌ها[6]) با نام تجاری تریفمین[7] و به‌صورت امولسیون ۱۵EC (ساخت شرکت نیپون سودا[8]) مورد استفاده قرار گرفت. ایمیدازول‌ها جزو قارچ‌کش‌های بازدارنده متیل‌زدایی و ممانعت‌کننده سنتز ارگوسترول[9] می‌باشند. در این آزمایش‌ها از محیط کشت PSA (سیب‌زمینی سوکروز آگار[10]) استفاده شد. جهت ساختن این محیط کشت ابتدا ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی خرد شده به‌مدت ۰/۵ ساعت در آب مقطر جوشانده، و سپس عصاره آن صاف شده و با اضافه کردن ۲۰ گرم ساکارز ساخت شرکت مرک[11] آلمان و ۱۷/۵ گرم آگار گرانوله[12] ساخت شرکت BBL، حجم آن با استفاده از آب مقطر به ۱ لیتر رسانده شد. بعد از همگن‌سازی، با حجم ۹ میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش تقسیم شده و اتوکلاو گردید. سپس محیط کشت PSA موجود در لوله‌ها را ذوب کرده و با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف قارچ‌کش در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد، غلظت‌های ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۸، ۰/۲۵، ۱، ۵، ۸، ۱۲، ۱٦، ۲۰، ۲٤، ۲۸ و ۳۲ میلی‌گرم در لیتر از ماده مؤثره قارچ‌کش به‌دست آمد.

بعد از به‌دست آوردن غلظت‌های مختلف، محیط‌های کشت حاوی قارچ‌کش در پتری‌دیش‌ها ریخته شدند. پس از سفت شدن محیط کشت، قرص‌های میسیلیومی به قطر ۷ میلی‌متر از حاشیه در حال رشد کشت ٤ روزه جدایه‌های مختلف در ۳ پتری‌دیش مختلف به‌صورت وارونه روی محیط کشت گذاشته شد. در هر ظرف پتری، ٤ جدایه مختلف در ٤ گوشه پتری قرار داده، و درب پتری‌دیش‌ها مسدود شده و در انکوباتور با دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سپس شعاع رشد پرگنه جدایه‌های مختلف تعیین گردیده و درصد بازدارندگی رشد هر جدایه نسبت به شاهد آن (در پتری که قارچ‌کش به آن اضافه نشده) با رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی رشد} = \frac{\text{شعاع رشد پرگنه تیمار قارچ‌کش} - \text{شعاع رشد پرگنه شاهد}}{\text{شعاع رشد پرگنه شاهد}} \quad (۱)$$

1- Water-Agar
2- Potato Dextrose Agar (PDA)
3- Carnation Leaf Agar
4- Synthetic Nutrient Agar
5- Gerlach & Nirenberg
6- Imidazole
7- Trifmine
8- Nipon Soda
9- Ergosterol Biosynthesis Inhibitor
10- Potato Sucrose Agar
11- Merck
12- granulated Agar

جدایه‌هایی که در غلظت‌های ذکر شده قادر به رشد بودند، در غلظت‌های بالاتر آزمایش شدند. بعد از محاسبه درصد بازدارندگی در غلظت‌های مختلف، EC_{50} قارچ‌کش (غلظتی از قارچ‌کش که از ۵۰ درصد رشد میسیلیومی جلوگیری می‌کند) با استفاده از Probit Analysis Version 5.1 و نیز شاخص MIC[1] (حداقل غلظتی از قارچ‌کش که به‌طور کامل از رشد میسیلیومی قارچ جلوگیری می‌کند) برای هر جدایه محاسبه شد.

آزمایش‌های مولکولی: قبل از استخراج DNA، جدایه‌های مختلف در محیط کشت PDA کشت داده شدند. سپس به محیط کشت مایع MYP[2] با فرمول ۷ گرم عصاره مالت، یک گرم پپتون سویا، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۱ لیتر آب مقطر منتقل گردیدند. محیط مایع با استفاده از کاغذ صافی روی پمپ خلأ صاف شده و میسیلیوم‌های به‌دست آمده تا زمان استخراج DNA، در فریزر نگهداری شدند. برای استخراج DNA از روش اصلاح شده موری و تامپسون (۱۹۸۰) استفاده شد. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش الکتروفورز[3] ژل آگارز[4] استفاده گردید. سپس غلظت تمام نمونه‌ها به ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد. ۵ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه در داخل میکروتیوب‌های مخصوص PCR ریخته شده و به یخچال منتقل گردید. بلافاصله محلول پایه با فرمول 1x بافر PCR، ۲/۵ mM کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۰/۲ mM مخلوط dNTPs، pmol ۵۰ آغازگر تصادفی، ۳ واحد (unit) آنزیم Taq DNA پلیمراز تهیه شده و ۴۵ میکرولیتر از آن به هر میکروتیوب حاوی DNA اضافه گردید.

برای انجام آزمایش‌های PARD از آغازگرهای شرکت متابیون[5] و آنزیم *Taq* DNA پلیمراز ساخت شرکت سیناژن[6] استفاده شد. زمان و دمای لازم جهت انجام مراحل مختلف PCR به‌صورت ٤ دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت اولیه و ٤۰ چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۳٦ درجه سانتی‌گراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب جهت واسرشت، اتصال و گسترش و همچنین یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، جهت گسترش نهایی تنظیم گردید. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز[7] (PCR) در دستگاه ترموسایکلر[8] شرکت Techn مدل TC-512 انجام شد.

آغازگرهای تصادفی استفاده شده شامل J-11 با توالی 5'- ACT CCT GCG A -3'، R-11 با توالی 5'- GTA GCC GTC T -3'، R-14 با توالی 5'- CAG GAT TCC C -3'، R-15 با توالی 5'- GGA CAA CGA G -3'، R-16 با توالی 5'- CTC TGC GCG T -3' و R-19 با توالی 5'- CCT CCT CAT C -3' بودند.

جهت الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده، ۸ میکرولیتر محصول PCR با ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری[9] مخلوط گردیده و در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE، به‌مدت ۲/۵ ساعت با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت بارگیری شدند. سپس، ژل جهت رنگ‌آمیزی به‌مدت ۳۰ الی ٤۵ دقیقه در داخل محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نگهداری شده و پس از قرار گرفتن در دستگاه Gel document، عکس‌برداری شد. پس از انجام آزمایش RAPD، وجود یا نبود باند با اعداد ۱ و صفر برای هر جدایه مشخص گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار NT SYS V.2.2 و با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA[10] و ضرایب تشابه جاکارد[11] و دایس[12] انجام شد.

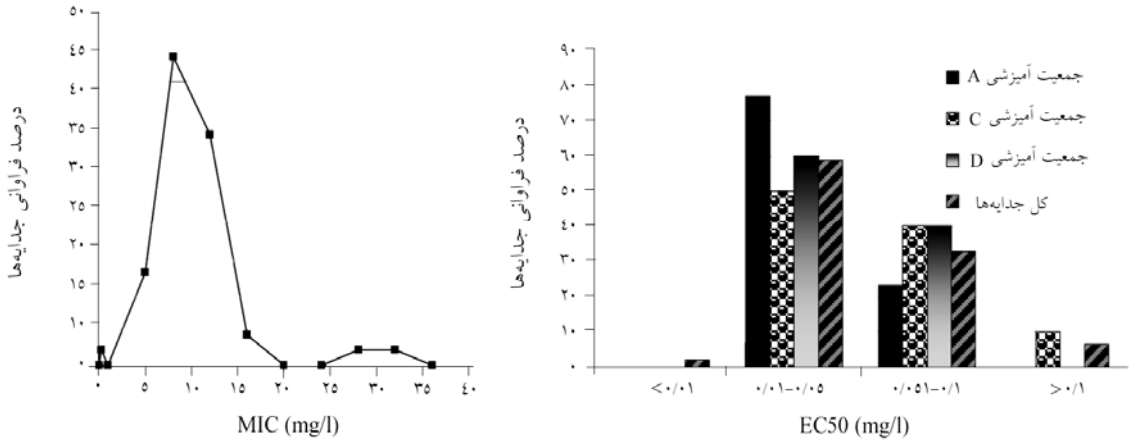
نتایج و بحث

بررسی حساسیت پایه‌ای: MIC و EC_{50} جدایه‌های مختلف به‌ترتیب بین ۳۲-۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر و

1- Minimum Inhibitory Concentration
2- Malt Yeast Pepton
3- Electrophoresis
4- Agaros
5- Metabion
6- Cinnagen
7- Polymerase Chain Reaction
8- Termocycler
9- Loading Dye
10- Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Mean
11- Jaccard
12- Dice

۰/۶۴۲–۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر از ماده مؤثره تریفلومیزول در نوسان بود (شکل ۱). تنها یک جدایه (جدایه Gf-207) در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر، بازداری ۱۰۰ درصد داشت. تنها دو جدایه Gf-213 و Gf-217 دارای MIC بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بودند. از سوی دیگر، جدایه Gf-207 با EC_{50} برابر با ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر دارای کمترین EC_{50} بود، در حالی‌که ۳ جدایه دارای EC_{50} بالاتر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بودند. جدایه‌های Gf-213 و Gf-217 به‌ترتیب با EC_{50} برابر با ۰/۶۴۲ و ۰/۲۱۹ میلی‌گرم در لیتر کمترین حساسیت را نسبت به این قارچ‌کش داشتند. جدایه با کم‌ترین حساسیت (Gf-213)، ۱۲۸ برابر حساسیت کمتری نسبت به حساس‌ترین جدایه (Gf-207) داشت. همچنین به‌دلیل استفاده نکردن قبلی از قارچ‌کش تریفلومیزول در مزارع استان گیلان، این اطلاعات به‌عنوان حساسیت پایه‌ای جدایه‌های قارچ‌های عامل بیماری به قارچ‌کش تریفلومیزول محسوب می‌شوند. همچنین جدایه‌های مختلف براساس هم‌پوشانی حدود اطمینان ۹۵ درصد EC_{50} (به‌دست آمده از Probit analysis ver 5.1) نیز به ٤ گروه تقسیم شدند. جدایه‌های Gf-213، Gf-217 و Gf-207 به‌ترتیب در گروه‌های A، B و D و سایر جدایه‌ها در گروه C قرار گرفتند (جدول ۱).

۱۲۸ برابر تفاوت بین EC_{50} حساس‌ترین جدایه (Gf-207) و جدایه با کمترین حساسیت (Gf-213) در حساسیت پایه‌ای به قارچ‌کش‌های بازدارنده متیل‌زدایی غیرطبیعی نیست. هسیانگ و همکاران (۱۹۹۷) در بررسی حساسیت پایه‌ای جدایه‌های *Sclerotinia homoecarpa* به فناریمول[1] (از گروه قارچ‌کش‌های بازدارنده متیل‌زدایی)، دامنه EC_{50} بین ۰/۵۲۲–۰/۰۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر را به‌دست آوردند که ۱۷٤ برابر تفاوت، بین جدایه با کمترین حساسیت و حساس‌ترین جدایه وجود داشت. در بررسی حساسیت پایه‌ای *Venturia inaequalis* به فناریمول و میکلوبوتانیل[2]، پراکندگی پیوسته در حساسیت به جدایه‌ها وجود داشته و جدایه‌های با حساسیت کم، با فاکتور بالای ۱۰۰ از جدایه‌های حساس جدا می‌شدند (کولر و همکاران، ۱۹۹۷).



شکل ۱– درصد فراوانی جدایه‌های دارای MICها و EC_{50}های مختلف. با توجه به استفاده نکردن قبلی از قارچ‌کش، این نمودارها به‌عنوان نمودار حساسیت پایه‌ای عوامل بیماری به تریفلومیزول محسوب می‌شود.

1- Fenarimol
2- Myclobutanyl

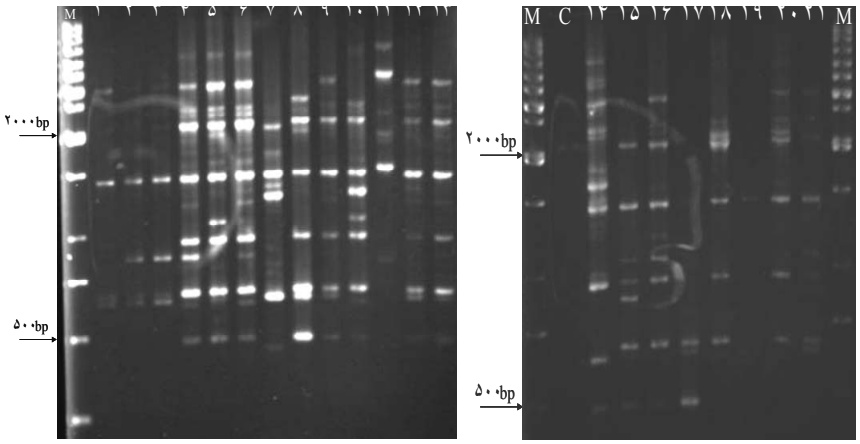
جدول ۱- گروه‌بندی جدایه‌ها براساس هم‌پوشانی حدود اطمینان ۹۵ درصد EC_{50} در آزمایش‌های حساسیت به قارچ‌کش تریفلومیزول.

گروه	تعداد جدایه	EC_{50} (mg/l)	حدود اطمینان ۹۵ درصد EC_{50}
A	۱	۰/٦٤٢	۰/٤٧٦-۰/۸۳۵
B	۱	۰/۲۱۹	۰/۱٥٤-۰/۳۰۱
C	٤۳	۰/۰۱۲-۰/۱۰٥	(۰/۰۰۷۹-۰/۰۱۸) -(۰/۰۷۳-۰/۱٥۰)
D	۱	۰/۰۰٥	۰/۰۰۳۷-۰/۰۰٦۸

هاماموتو و همکاران (۲۰۰۰)، نیز EC_{50} و MIC بین ۰/۱۵-۰/۰۵ و ۵-۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر را برای جدایه‌های حساس و همچنین بین ۲/۵-۱/٦ و بیشتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را برای جدایه‌های مقاوم *Penicillium digitatum* به تریفلومیزول به‌دست آوردند. با توجه به نتایج بررسی‌های انجام شده در نقاط مختلف دنیا، به‌نظر می‌رسد که جمعیت مورد بررسی در این پژوهش، جمعیت حساس به تریفلومیزول می‌باشد و دو جدایه Gf-213 و Gf-217 با EC_{50}های ۰/٦٤۲ و ۰/۲۱۹ میلی‌گرم در لیتر که تفاوت زیادی با سایر جدایه‌ها نشان می‌دادند، جدایه‌های با حساسیت کم به تریفلومیزول محسوب می‌شوند. تصور می‌شود با توجه به استفاده نکردن از قارچ‌کش‌های گروه DMI در مزارع نمونه‌برداری شده، این جدایه‌ها به‌طور طبیعی حساسیت پایین‌تری به تریفلومیزول داشته باشند.

عموماً پذیرفته شده که یک جمعیت کوچک از ژنوتیپ‌های مقاوم، به‌طور طبیعی در جمعیت‌های عامل بیماری، قبل از اولین کاربرد قارچ‌کش وجود دارد (کولر، ۱۹۸۸). همچنین کولر (۱۹۸۸) تأکید می‌کند که بیشتر اطلاعات به‌دست آمده از عوامل بیماری‌زای مختلف در مورد DMIها از توسعه مقاومت مزرعه‌ای پشتیبانی نمی‌کند. در چنین مواردی، تنوع مشاهده شده، نشان‌دهنده پراکندگی حساسیت پایه‌ای است تا تغییرات مقاومتی. بهتر است که در مورد شهرستان‌های رودسر و املش (محل جمع‌آوری دو جدایه با حساسیت پایین‌تر) قبل از استفاده از قارچ‌کش‌های گروه DMI بررسی گسترده‌تری صورت گیرد تا در صورت لزوم، این قارچ‌کش‌ها با مدیریت دقیق‌تری در این مناطق استفاده شوند.

نتایج آزمایش‌های مولکولی و ارتباط نشانگرهای RAPD و حساسیت پایه‌ای: در مجموع، ٦ آغازگر در آزمایش RAPD استفاده شدند که آغازگر R-11 با تعداد ۲۱ باند، کمترین تعداد باند و آغازگر R-14 با ۳٤ باند (شکل۲) بیشترین تعداد باند را داشتند. در مجموع از ٦ آغازگر، ۱٤٦ باند با طول ٦۰۰۰-۲٥۰ جفت‌باز به‌دست آمد.



شکل ۲- نتیجه RAPD با استفاده از آغازگر R-14 (چاهک بزرگ). M- 1Kb ladder (fermentas)، C- کنترل منفی، ۱- Gf-261، ۲- Gf-105، ۳- Gf-268، ٤- Gf-189، ٥- Gf-121، ٦-Gf-53، ۷- Gf-49، ۸- Gf-231، ۹- Gf-5، ۱۰- Gf-213، ۱۱- Gf-207، ۱۲- Gf-89، ۱۳- Gf-25، ۱٤- Gf-217، ۱٥- Gf-147، ۱٦- Gf-237، ۱۷- Gf-215، ۱۸- Gf-257، ۱۹- Gf-145، ۲۰- Gf-252، ۲۱- Gf-159 (ابتدا تمام جدایه‌ها در یک ژل بزرگ با هم مقایسه شده و سپس جهت عکس‌برداری با وضوح و کیفیت بالاتر به این دو ژل منتقل شدند).

همچنین روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه دایس در مورد دسته‌بندی و دندروگرام کل جدایه‌ها (r=۰/۹۵۲) و روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه جاکارد در مورد دسته‌بندی جدایه‌های داخل ۳ گونه *F. proliferatum*، *F. fujikuroi* و *F. verticillioides* (r=۰/۹۶۰، r=۰/۸۹۱ و r=۰/۹۹۶ برای ۳ گونه مختلف) دارای ضریب همبستگی کوفنتیک[1] بالاتری بودند و برای ترسیم دندروگرام مورد استفاده قرار گرفتند. در دندروگرام ترسیم شده برای کل جدایه‌ها، ۱۷ جدایه (با ضریب تشابه دایس) با شباهت بیش از ٦٥ درصد در دسته جداگانه‌ای از ٤ جدایه دیگر قرار گرفتند. ٤ جدایه Gf-49، Gf-215، Gf-217 و Gf-207 به‌ترتیب با کمتر از ٦٠، ٥٠، ٤٥ و ١٥ درصد شباهت از ١٧ جدایه یاد شده جدا شدند (شکل ٣). جهت مقایسه بهتر، برای جدایه‌های هر گونه، دندروگرام‌های جداگانه ترسیم گردید (شکل ٤). با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های مختلف، مشخصات به‌دست آمده از جدایه‌های مختلف در جدول ٢ جمع‌آوری شد.

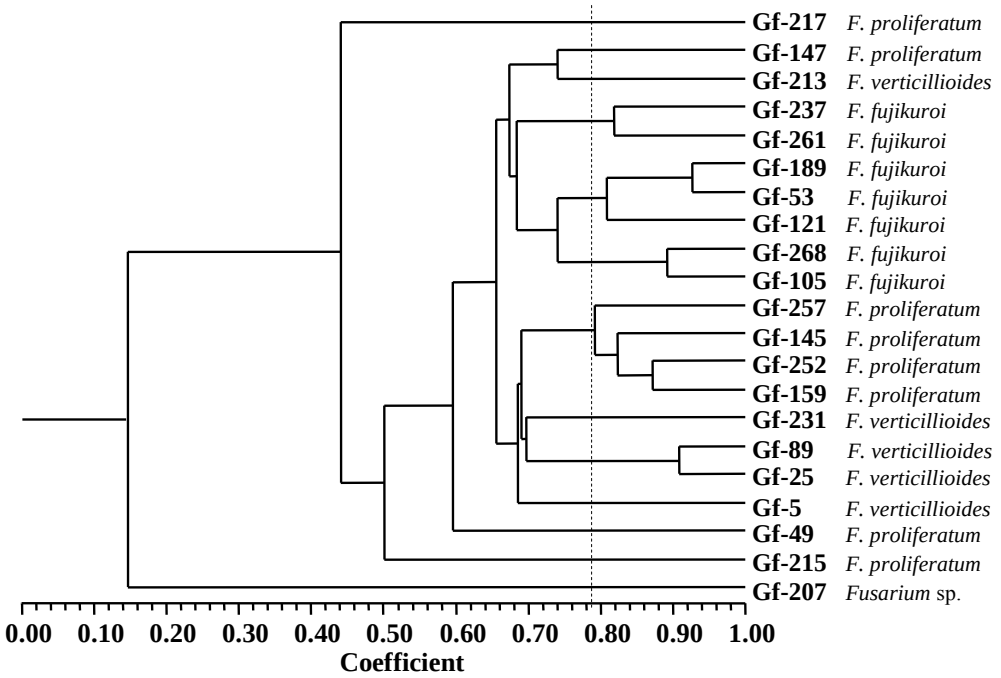
جدایه Gf-207 بیش‌ترین تفاوت را با سایر جدایه‌ها نشان داد. در ابتدا خصوصیات این جدایه از لحاظ مورفولوژی با گونه *F. verticillioides* شباهت نشان می‌داد. در یک آزمایش انجام شده با نشانگر PCR-RFLP و با استفاده از ٣ آنزیم *Cfo*I، *Hae*III و *Msp*I (داده‌ها نشان داده نشده)، این جدایه با سایر جدایه‌ها بیش از ٥٠ درصد تفاوت نشان می‌داد. در حالی‌که سایر جدایه‌ها با شباهت ١٠٠ درصد در یک گروه قرار گرفتند. دلیل نسبت دادن *Fusarium* sp. به این جدایه، نتایج نشانگر PCR-RFLP و همچنین هم‌خوانی آن با نتایج نشانگر RAPD است. همچنین این جدایه با EC_{50} برابر با ٠/٠٠٥ میلی‌گرم در لیتر نسبت به قارچ‌کش تریفلومیزول، در گروه جداگانه‌ای قرار گرفته و بیش‌ترین حساسیت را به این قارچ‌کش نشان داد. این جدایه از منطقه‌ای نزدیک شهر رودسر، جدا شده و بیماری‌زایی آن توسط عباس‌زاده (٢٠٠٥) مثبت گزارش شده است.

در بین جدایه‌هایی که به‌عنوان *F. proliferatum* شناسایی شدند، ٤ جدایه Gf-217، Gf-215، Gf-49 و Gf-147 که دارای EC_{50} بالاتر از ٠/٠٨٢ میلی‌گرم در لیتر هستند، از ٤ جدایه دیگر که با شباهت بیش از ٧٨ درصد باهم دسته‌بندی شده‌اند، متمایز می‌شوند. جدایه Gf-217 که از لحاظ مورفولوژی، خصوصیات گونه *F. proliferatum* را نشان می‌داد، بالاترین EC_{50} را در بین جدایه‌های این گروه دارا بود و از مزرعه‌ای در شرق گیلان (حوالی رودسر) جمع‌آوری شده بود. همچنین جدایه‌های دارای EC_{50} پایین‌تر، شباهت بیشتری دارند.

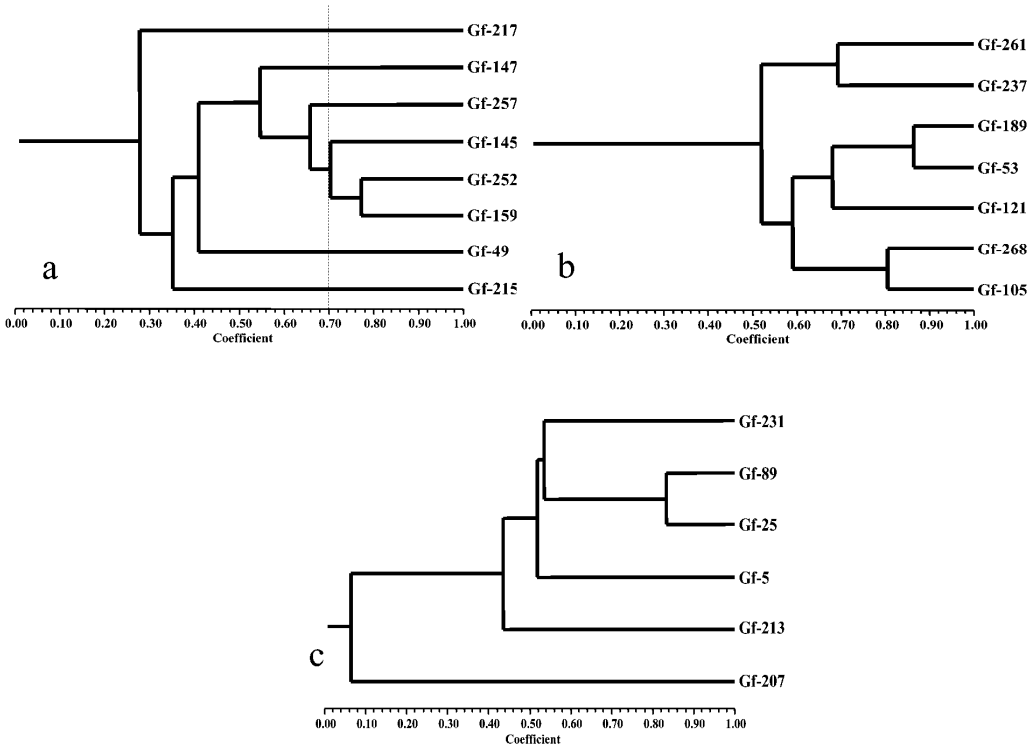
جهت مقایسه، جدایه Gf-207 که در ابتدا تصور می‌شد، دارای خصوصیات *F. verticillioides* است، برای ترسیم دندروگرام در کنار آنها قرار داده شد (شکل ٤). این جدایه با داشتن کمترین EC_{50}، تفاوت زیادی نیز از لحاظ مولکولی با سایر جدایه‌ها نشان داد. جدایه Gf-213 که دارای بالاترین EC_{50} در بین تمام جدایه‌ها بود، تفاوت بیشتری با سایرین نشان داد. همچنین جدایه Gf-5 که در بین جدایه‌های باقی‌مانده، EC_{50} کمتری داشت، تفاوت بیشتری با بقیه نشان داد.

آن‌گونه که در دندروگرام به‌دست آمده از نشانگر RAPD برمی‌آید، جدایه‌های دارای بالاترین و پایین‌ترین EC_{50} (در جدایه‌های *F. proliferatum* و *F. verticillioides*) تفاوت و تمایز بیشتری نسبت به سایر جدایه‌ها نشان دادند. به‌طورکلی نشانگر RAPD اثبات کرد که تفاوت مشاهده شده در EC_{50} جدایه‌های مختلف، منشأ ژنتیکی دارد.

1- Cophenetic Value



شکل ۳- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه دایس برای ۲۱ جدایه در نشانگر RAPD.



شکل ٤- دندروگرام ترسیم‌شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای جدایه‌هایی که از لحاظ مورفولوژی به‌عنوان *F. proliferatum* (a)، *F. fujikuroi* (b) و *F. vericillioides* (c) شناسایی شدند.

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های استفاده شده در بررسی‌های مولکولی.

جدایه	محل جمع‌آوری	گونه	EC_{50}(mg/l)	حدود اطمینان ۹۵ درصد EC_{50}
Gf-49	پسیخان رشت	*F. proliferatum*	۰/۰۸۲	۰/۰۵۶-۰/۱۱۸
Gf-145	شیخ‌محله صومعه‌سرا	*F. proliferatum*	۰/۰۳۹	۰/۰۲۳-۰/۰۶۱
Gf-147	ابتدای جاده رودبنه	*F. proliferatum*	۰/۰۹۳	۰/۰۶۱-۰/۱۳۶
Gf-159	سیاه‌درویشان صومعه‌سرا	*F. proliferatum*	۰/۰۱۵	۰/۰۱۰-۰/۰۲۳
Gf-215	آبکنار انزلی	*F. proliferatum*	۰/۰۹۸	۰/۰۶۹-۰/۱۳۸
Gf-217	کلان‌کلایه رودسر	*F. proliferatum*	۰/۲۱۹	۰/۱۵٤-۰/۳۰۱
Gf-252	پیش‌کنار سنگر	*F. proliferatum*	۰/۰۳۱	۰/۰۲۰-۰/۰٤۵
Gf-257	نوخاله صومعه‌سرا	*F. proliferatum*	۰/۰٦٦	۰/۰٤٤-۰/۰۹۵
Gf-53	جاده بین سنگر و شاقاجی	*F. fujikuroi*	۰/۱۰۵	۰/۰۷۳-۰/۱۵۰
Gf-105	لاکسار صومعه‌سرا	*F. fujikuroi*	۰/۰۲٦	۰/۰۱٦-۰/۰٤۱
Gf-121	طالش‌محله صومعه‌سرا	*F. fujikuroi*	۰/۰۵٤	۰/۰۳٦-۰/۰۷۷
Gf-189	آبکنار انزلی	*F. fujikuroi*	۰/۰۱۵	۰/۰۰۹-۰/۰۲٤
Gf-237	شاقاجی سنگر	*F. fujikuroi*	۰/۰۹۲	۰/۰٦۵-۰/۱۲۹
Gf-261	روستای شهرستان- سنگر	*F. fujikuroi*	۰/۰۱۸	۰/۰۱۱-۰/۰۲۹
Gf-268	سه‌راهی شفت-فومن	*F. fujikuroi*	۰/۰۵۰	۰/۰۳۲-۰/۰۷٤
Gf-5	طالم سه‌شنبه سنگر	*F. vericillioides*	۰/۰۱۷	۰/۰۱۱-۰/۰۲۵
Gf-25	بیجارکنار رشت	*F. vericillioides*	۰/۰۲۰	۰/۰۱۲-۰/۰۳۲
Gf-89	گوشلوندان فومن	*F. vericillioides*	۰/۰٤۰	۰/۰۲۷-۰/۰۵٦
Gf-213	زربیجار املش	*F. vericillioides*	۰/٦٤۲	۰/٤۷٦-۰/۸۳۵
Gf-231	تکرم شفت	*F. vericillioides*	۰/۰٤۹	۰/۰۳۱-۰/۰۷۳
Gf-207	کمربندی رودسر	*Fusarium* sp.	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳۷-۰/۰۰٦۸

* سه جدایه Gf-207، Gf-213 و Gf-217 تنها براساس خصوصیات مورفولوژی و سایر جدایه‌ها براساس مطالعه تیپ‌های آمیزشی عباس‌زاده (۱۳۸٤) و مطالعات تکمیلی مورفولوژی شناسایی شدند.

اما در جدایه‌های *F. fujikuroi* چنین ارتباطی دیده نشد. در این گروه، جدایه‌های Gf-261 و Gf-237 که با شباهت نزدیک به ۷۰ درصد از بقیه جدایه‌های این گروه جدا شده‌اند، از دو روستای مجاور هم در بخش سنگر شهرستان رشت جمع‌آوری شده‌اند. با وجود این‌که شاخص MIC نسبت به شاخص EC_{50} از اهمیت کمتری در بررسی حساسیت جدایه‌ها برخوردار است، اما به‌نظر می‌رسد که این جدایه‌ها ارتباط جالب‌توجهی را از این نظر نشان می‌دهند. هر دو جدایه Gf-189 و Gf-53 که با شباهت بالا در یک دسته قرار گرفته‌اند، دارای MIC ۸ میلی‌گرم در لیتر می‌باشند. جدایه Gf-121 که با وجود دسته‌بندی با دو جدایه قبلی، تفاوت بیشتری با آنها دارد، دارای MIC ۱۲ میلی‌گرم در لیتر است. دو جدایه Gf-105 و Gf-268 که با بیشترین شباهت در یک دسته قرار گرفته‌اند، دارای MIC ۱۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشند. همچنین دو جدایه Gf-261 و Gf-237 که باهم دسته‌بندی شده‌اند، به‌ترتیب دارای MIC ۵ و ۸ میلی‌گرم در لیتر بودند. اما در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تریفلومیزول، این دو جدایه ۸٤/۷ و ۸٤/٦ درصد، بازداری از رشد رویشی نشان دادند.

توسعه مقاومت در قارچ‌کش‌های گروه DMI، در نتیجه برهم‌کنش چند ژن مسئول مقاومت بوده و پلی‌ژنیک (چندژنی) است (هویت، ۱۹۹۸). به‌نظر می‌رسد، از آنجا که تعداد زیادی ژن در حساسیت و مقاومت به قارچ‌کش‌های گروه DMI نقش دارند، این عامل می‌تواند در ایجاد تنوع در حساسیت به قارچ‌کش نقش داشته باشد. از آن‌جا که جدایه‌های آزمایش شده در این بررسی، شباهت ۱۰۰ درصد باهم نداشته‌اند، می‌توان چنین

برداشت کرد که تنوع ژنتیکی در جدایه‌های قارچ‌های عامل بیماری می‌تواند در تنوع حساسیت به قارچ‌کش تریفلومیزول مؤثر باشد و این امر با انجام این پژوهش با نشانگر RAPD به اثبات رسیده است.

در بررسی یورمن و همکاران (۲۰۰۰)، برروی حساسیت جدایه‌های *Botrytis cinerea* به قارچ‌کش‌های تیوفانات‌متیل و وینکلوزولین، از نشانگر RAPD جهت ایجاد تمایز بین جدایه‌ها استفاده شد. جدایه‌های حساس به هر دو قارچ‌کش در بسیاری از موارد با همدیگر دسته‌بندی شدند. جدایه‌های مقاوم به یکی از قارچ‌کش‌ها و یا هر دو قارچ‌کش، معمولاً با سایر جدایه‌ها گروه‌بندی نشده و یا با جدایه‌های همان فنوتیپ گروه‌بندی می‌شدند.

در کنار هم قرار گرفتن جدایه‌های گونه‌های مختلف، در دندروگرام ترسیم شده برای تمام جدایه‌ها قابل بحث است. سه گونه مورد بررسی، در بخش *Liseola* قرار گرفته و جزو گونه‌های *Gibberella fujikuroi* species complex می‌باشند که شباهت بالای بین آنها از لحاظ مورفولوژی در بررسی‌هایی مانند گرلاخ و نیرنبرگ (۱۹۸۲) و نیرنبرگ و ادانل (۱۹۹۸) و از نظر متابولیت‌های ثانویه در تحقیقاتی مانند دسجاردینز و همکاران (۲۰۰۰) نشان داده شده است. لسلی و همکاران (۲۰۰٤) نیز جدایه‌هایی از *F. proliferatum* و *F. fujikuroi* را یافتند که قادر به تولیدمثل جنسی موفقیت‌آمیز با جدایه‌های نماینده جمعیت آمیزشی مقابل بودند. آنها این احتمال را مطرح کردند که این دو گونه در واقع، یک گونه می‌باشند. همچنین ادانل و همکاران (۱۹۹۸) تفاوتی در توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS-1، ITS-2 از ژن rDNA در بین این دو گونه نیافتند. بنابراین، جدایه‌های سه گونه مورد بحث ممکن است دارای شباهت‌های زیادی بوده و در کنار هم قرار گیرند. در این پژوهش، از ۵ آغازگر تصادفی که قبلاً توسط هوانگ و همکاران (۱۹۹۷) جهت تمایز VCGهای مختلف *F. moniliforme* (که هم‌اکنون به‌نام *F. verticillioides* تغییر یافته است) و نیز یک آغازگر تصادفی (J-11) که برای آنالیز جدایه‌های *F. moniliforme* توسط دامادزاده (۲۰۰۳) استفاده شده و نتایج بسیار خوبی را به‌دنبال داشته‌اند، استفاده گردید. استفاده از تعداد ٦ آغازگر نیز می‌تواند دلیلی بر قرار گرفتن جدایه‌های گونه‌های مختلف در کنار هم باشد. استفاده از توالی بعضی از نواحی مانند بتا توبولین در بررسی ادانل و همکاران (۱۹۹۸) و نیز MAT-1 و MAT-2 در بررسی استین کمپ و همکاران (۲۰۰۰) تفاوت‌هایی را در این گونه‌ها نشان داده است.

سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات برنج کشور، به‌خاطر فراهم آوردن امکانات بخش اول این تحقیق، از سرکار خانم محیا عباس‌زاده، به‌خاطر تهیه جدایه‌های استفاده شده و از جناب آقای دکتر مصطفی درویش‌نیا، به‌خاطر راهنمایی‌های ارزنده در شناسایی مورفولوژی جدایه‌ها، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمائیم.

منابع

1.Abbas-Zadeh, M. 2005. Study on the sexual fertility and determination the mating types of *Gibberella fujikuroi*, the cause of rice bakanae disease and foot rot. M.Sc. Thesis of Microbiology. Azad university of Lahijan, Iran, 122p. (In Persian)

2.Bayraktar, H., Dolar, F.S., and Maden, S. 2008. Use of RAPD and ISSR Markers in Detection of Genetic Variation and Population Structure among Fusarium oxysporum f. sp. ciceris Isolates on Chickpea in Turkey. J. Phytopathology, 156: 146-154.

3.Brent, J.B. 1988. Monitoring for fungicide resistance, P 9-11. In: Delp, C.J., Delp, B.R., Fort III, T.M., Morton, H.V., and smith, C.M. Fungicide Resistance in North America. APS press.

4.Carter, L.L.A., Leslie, J.F., and Webster, R.K. 2008. Population stracture of *Fusarium* Fujikuroi from California rice and water grass. Phytopathology, 98: 992-998.

5.Cunha, M.G., and Rizzo, D.M. 2003. Development of fungicide cross resistance in *Helmithosporium solani* populations from California. Plant Disease, 87: 798-803.

6.Damad-Zadeh, M. 2003. Identification of isolates of Fusarium moniliforme, the casual agent of rice foot rot disease, using RAPD technique. Seed and Plant J. Agricultural Research, 19: 227-243. (In Persian)
7.Desjardins, A.E., Manadhar, H.K., Plattner, R.D., Manadhar, G.G., Poling, S.M., and Maragos, C.M. 2000. *Fusarium* species from Nepalse rice production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. Applied and Enviromental Microbiology, 66: 1020-1025.
8.Fabrititius, A.L., Shattock, R.C., and Judeson, H.S. 1997. Genetic Analysis of Metalaxyl Insensitivity Loci in *Phytophtora infestans* Using Linked DNA Markers. Phytopathology, 84: 1021-1030.
9.Gerlach, W., and Nirenberg, H.I. 1982. The Genus *Fusarium*-A Pictorial Atlas. Mitt. Biol. Bundesanst, Land-Forstw, 406p.
10.Gisi, U., and Staehle-Csech, U. 1988. Resistance risk evaluation of new candidates for disease control, P 101-106. In: Delp, C.J., Delp, B.R., Fort III, T.M., Morton, H.V., and Smith, C.M. Fungicide Resistance in North America. APS Press.
11.Hamamoto, H., Hasegawa, K., Nakaune, R., Lee, Y.J., Makizumi, Y., Akutsu, K., and Hibi, T. 2000. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14α-demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. Applied and Enviromental Microbiology, 66: 3421-3426.
12.Hewitt, H.G. 1998. Fungicides in Crop Protection. CAB INTERNATIONAL, 221p.
13.Hsiang, T., Yang, L., and Barton, W. 1997. Baseline Sensitivity and cross-resistance to demethylation-inhibiting fungicides in Ontario isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. European J. Plant Phatology, 103: 409-416.
14.Huang, R., Galperin, M., Levey, Y., and Peri, T.R. 1997. Genetic diversity of *Fusarium moniliforme* detected by vegetative compatibility groups and RAPD markers. Plant Pathology, 46: 871-881.
15.Izadyar, M., Padasht-Dehkaei, F., and Damad-Zadeh, M. 2000. Effectiveness of some new fungicides in controling of rice Bakanae and foot rot disease by seed treatment. Program Report, Plant Pest and Dis. Res. Ins. of Iran, 43p. (In Persian)
16.Köller, W. 1988. Sterol demethylation inhibitors: mechanism of action and resistance, P 79-88. In: Delp, C.J., Delp, B.R., Fort III, T.M., Morton, H.V., and Smith, C.M. Fungicide Resistance in North America, APS Press.
17.Köller, W., Wilcox, W.F., Barnard, J., Jones, A.L., and Braun, P.G. 1997. Detection and Quantification of Resistance of *Venturia inaequalis* Populations to Sterol Demethylation Inhibitors. Phytopathology, 87: 184-190.
18.Leslie, J.F., Zeller, K.A., Wohler, M., and Summerell, B.A. 2004. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. European J. Plant Pathology, 110: 611-618.
19.Lotfi-Miri, F. 2006. study on the population structure of *Gibberella fujikuroi*, causal agent of rice bakanae disease and foot rot in Guilan province. M.Sc. Thesis of plant pathology. science and research campus, Islamic Azad university, Tehran, Iran, 136p.(In Persian)
20.Murray, M.G., and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8: 4321-4325.
21.Nirenberg, H.I., and O'Donnell, K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia, 90: 434-458.
22.O'Donnell, K., Cigelnik, E., and Nirenberg, H.I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia, 90: 465-493.
23.Padasht-Dehkaei, F., Sharifi-Tehrani, A., Hajarood, G., Izadyar, M., and Okhovvat, S.M. 1996. Study on the efficacy of some fungicides in controlling rice bakanae disease in Guilan province. Iranian Journal of Plant Pathology, 32: 268-277. (In Persian)
24.Rubio, J., Hajj-Moussa, E., Kharrat, M., Moreno, M.T., Millan, T., and Gil, J. 2009 Two genes and linked RAPD markers involved in resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *Ciceris* race 0 in chickpea. Plant Breeding, 2: 188-19.
25.Russel, P.E. 2003. FRAC Monograph, No 3: Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. Crop Life International, Brussels, 56p.
26.Steenkamp, E.T., Wingfield, B.D., Coutinho, T.A., Zeller, K.A., Wingfield, M.J., Marasas, W.F.O., and Leslie, J.F. 2000. PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4378-4382.
27.Summerell, B.A., Salleh, B., and Leslie, J.F. 2003. A utilitarian approach to Fusarium Identification. Plant Disease, 87: 117-128.
28.Yourman, L.F., Jeffers, S.N., and Dean, R.A. 2000. Genetic Analysis of Isolates of Borytis cinerea Sensitivity and Resistant to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. Phytopathology, 90: 851-859.

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 16(Special issue 2), 2009
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Relationship between RAPD markers and baseline sensitivity to triflumizole in *Fusarium* isolates, causal agents of rice bakanae disease and foot rot

A. Hosseinnezhad[1], *D.M. Zafari[2] and F. Padasht Dehkaei[3]
[1]Former M.Sc. Student, Dept. of Plant Protection, Bu Ali Sina University of Hamadan,
[2]Associate Prof., Dept. of Plant Protection, Bu Ali Sina University of Hamadan,
[3]Instructor Research, Dept. of Plant Protection, Rice Research Institute, Rasht

Abstract

Three species of *Fusarium verticillioides*, *F. fujikuroi* and *F. proliferatum*, have been considered as the causal agents of rice bakanae disease and foot rot in different regions. To detect resistance to new fungicide in fungal isolates of disease causal agent, identification of baseline sensitivity is necessary before its application in field level. Genetic variation has been identified as one of the major factors differing baseline sensitivity to fungicides. In this study, baseline sensitivity of 46 isolates to triflumizole was investigated in PSA medium amended with different concentrations of fungicide active ingredient, and EC_{50} and MIC of this fungicide were calculated for each isolate. Also 21 isolates, belong to 3 mating populations were selected for molecular studies using RAPD markers. The results showed that different isolates placed on 4 groups on the basis of overlapping 95% confidence limits for EC_{50} and only two isolates had less sensitivity to triflumizole. In constructed dendrogram by RAPD markers, isolates with higher EC_{50}, the most and the least sensitive isolates showed more difference with others. Also *F. fujikuroi* isolates showed markedly difference based on MIC value. The observed differences among isolates using RAPD markers confirmed that differences in baseline sensitivity to triflumizole rooted in genetic variation.

Keywords: Baseline sensitivity; Triflumizole; *Fusarium*; RAPD

* Corresponding Author; Email: zafari_d@yahoo.com