شماره	کد مؤسسه	کد استان

(۱)

بسمه تعالی

وزارت کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

طرح تحقیقاتی

۱- عنوان طرح:(به فارسی و انگلیسی)

اثر متقابل درون گونه‌ای در *Fusarium graminerum* عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم (FHB) بر روی ژنوتیپ‌های مختلف گندم

Intraspecific interaction of *Fusarium graminearum* group II populations on different wheat genotypes

الف: اجرای این طرح در جلسه مورخ شورای تات استان مورد تأئید قرار گرفت.

دبیر شورای تات استان

ب: اجرای این طرح در جلسه مورخ شورای تحقیقات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کمیته فنی

مورد تأئید قرار گرفت.

رئیس شورای تحقیقات مؤسسه

ج: اجرای این طرح در جلسه مورخ کمیسیون بررسی و هماهنگی طرح‌های تحقیقاتی مطرح و برای بار.... مورد تصویب قرار گرفت.

رئیس کمیسیون بررسی و هماهنگی طرح‌های تحقیقاتی

کد طرح:

شماره	کد مؤسسه	کد استان

بسمه تعالی

وزارت کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

طرح تحقیقاتی

۱- عنوان طرح: (به فارسی و انگلیسی)

اثر متقابل درون گونه‌ای در *Fusarium graminearum* عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم (FHB) بر روی ژنوتیپ‌های مختلف گندم

Intraspecific interaction of *Fusarium graminearum* group II populations on different wheat genotypes

۲- نوع تحقیق: کاربردی ☑ توسعه‌ای ☐ بنیادی ☐

۳- پیش‌بینی کاربرد نتایج طرح: منطقه‌ای ☐ ملّی ☐ بین‌المللی ☐

۴- مشخصات مجری مسئول، مشاور، هماهنگ‌کننده و سایر مجریان:

نام و نام خانوادگی	سمت در طرح	آخرین درجه تحصیلی	رشته تحصیلی	سمت و مرتبه علمی	واحد متبوع	محل خدمت	امضاء
عزیزاله علیزاده	هماهنگ کننده	دکترا	بیماری‌شناسی گیاهی	دانشیار	اصلاح بذر- واحد پاتولوژی	کرج	
ناصر صفائی	مجری مسئول	کارشناس ارشد	بیماری‌شناسی گیاهی	دانشجوی دکتری	دانشگاه تربیت مدرس	تهران	
حشمت اله رحیمیان	سایر مجریان	دکترا	بیماری‌شناسی گیاهی	استاد	دانشگاه ساری	ساری	
فاطمه خلقتی بناء	سایر مجریان	کارشناسی ارشد	بیماری‌شناسی	پژوهشگر	اصلاح بذر - واحد پاتولوژی	کرج	

در مورد طرح‌های مشترک و یا مشاور دانشگاهی و غیره امضاء مورد نیاز است.
برای طرح‌های مستقل نیاز به امضاء نیست

۵- تاریخ شروع و مدت اجرای طرح

تاریخ شروع طرح	مدت اجرای طرح	
	ماه	سال
۱۳۷۹	فروردین	۴

۶- محل (های) اجرای طرح: کرج

۷- چکیده (خلاصه طرح):

در این تحقیق، با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی، جدایه‌ها مارک‌دار شده و سپس تعامل آنها بر روی ژنوتیپ‌های مختلف بررسی می‌گردد. تشخیص ایزوله‌ها، با استفاده از روش PCR انجام می‌گیرد. سپس ژنوتیپ‌های غالب پانوژن با سایر ژنوتیپ‌ها مقایسه می‌گردند و مشخصات افتراقی ژنوتیپ‌های غالب تعیین می‌شود

۸- طرح‌های اجرا شده و در دست اجرای مجری مسئول این طرح از ۵ سال پیش تاکنون:

ردیف	عنوان طرح تحقیقاتی	سمت در اجرای طرح	سال شروع	سال پایان	تاریخ ارائه گزارش نهایی
۱					
۲					
۳					

۹- مشخصات کاردان‌ها و تکنسین‌های همکار در طرح:

ردیف	نام و نام‌خانوادگی	مدرک تحصیلی	واحد متبوع	محل خدمت	ملاحظات
۱	فریبا پورپناهی	دیپلم	پاتولوژی غلات	کرج	
۲	عاتکه بکائی	لیسانس	پاتولوژی غلات	کرج	

۱۰- هدف تحقیق:

تهیه مارکر مناسب جهت ردیابی جدایه‌های *F. graminearum* و مطالعه ساختار جمعیت‌های آن بوسیله این مارکرها به منظور روشن شدن بخشی از پیچیدگی‌های عامل این بیماری و تشخیص سریع عامل بیماری با روش PCR

۱۱- ضرورت و اهمیت اجرای طرح

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم (Fusarium Head Blight) یکی از بیماریهای مهم گندم در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب جهان بشمار می رود (Schroeder and Christensen, 1963). اپیدمی این بیماری در سال ۱۸۹۰ میلادی از ایالات متحده امریکا توسط آرتور گزارش شده است (Arthur, 1891). درسالهای اخیرنیز وقوع چندین اپیدمی جدید از ایالات متحده امریکا گزارش گردیده است (Tuite *et al.*, 1995). در سال ۱۹۸۰ میلادی وقوع بیماری در مناطق شمالی کانادا باعث ۳۰ تا ۷۰ درصد کاهش عملکرد گندم بهاره گردید (Martin and Johnston, 1982). بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم یکی ازمهمترین عوامل کاهش عملکرد گندم درکشور چین شناخته شده است. بخش اعظم مناطق آلوده در حاشیه رود یانگ تسه قرار دارد. دراپیدمی های شدید کاهش عملکرد محصول بین ۲۰ تا ۴۰ درصد بوده است (Wang and Miller, 1987). بر اساس گزارش های ارائه شده در کشورهای لهستان، هلند، انگلستان، چک و اسلواکی، روسیه، اتریش، آفریقای جنوبی، برزیل، اروگوئه و مکزیک نیز بیماری بلایت فوزاریومی سنبله از اهمیت خاصی برخوردار است (Snijders, 1995 ;Reis, 1995 ;Mesterhazy, 1987 ;Sutton, 1982). بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم از سال ها پیش در ایران وجود داشته است (بامدادیان و ترابی، ۱۳۶۲) و یکی ازبیماریهای مهم گندم در مناطق مازندران (فروتن وهمکاران، ۱۳۷۲) وگرگان وگنبد (گلزار ۱۳۶۸) بشمار می رود. در سالهای اخیر تغییرات شرایط جوی در مناطق مذکور و کشت ارقام حساس به طور وسیع و همچنین وجود اینوکولوم بیماری موجب شد که خسارات چشمگیری برمحصول گندم وارد آید. اپیدمی شدیدی ازاین بیماری نیز در سال زراعی ۷۵-۱۳۷۴ دراستان های هرمزگان و فارس مشاهده گردید (علیزاده وترابی، اطلاعات منتشر نشده).

گونه های (Teleomorph *Gibberella zeae*) *Fusarium graminearum* Schwabe, group II به همراه *F. culmorum* گونه‌های غالب ایجاد کننده بیماری بلایت فوزاریومی سنبله می باشند (Parry *et al.*, 1995). این قارچها قادرند فیتوتوکسین هایی از مشتقات تریکوتسین ها تولید نماید (Desjardins and Hohn, 1997; Wang and Miller, 1988). تریکوتسین ها (Trichothecenes) به چهار گروه عمده تقسیم می شوند که مهمترین آنها تیپ های A و B می باشند. سنتز این دو تیپ تریکوتسین ویژگی گونه های خاصی از *Fusarium* است. یک ویژگی مشترک اکثر گونه های *Fusarium* توانایی سنتز Zearalenone می باشد. تریکوتسین های تیپ A شامل توکسین T-2، HT-2 (NEO) neosolaniol و diacetoxyscirpenol (DAS) و تیپ B شامل deoxynivalenol (DON)، 3-acetyl DON، 15-acetyl DON، nivalenol (NIV) و Fusarenon (FX) می باشند (D'Mello *et al.*, 1998) توکسینهای عمده *F. graminearum* NIV، DON، ACDON 3 (از دسته تریکوتسین ها) و توکسین های

استروژنیک Zearalenol و Zearalenone می باشد (Wang and Miller, 1988). تلاشهایی برای شناسایی ژنهای کد کنندهٔ تریکوتسین ها انجام شده است. تاکنون ۱۰ ژن دخیل درسنتز آنها تعیین شده است (Hohn *et al.*, 1999; Desjardins *et al.*, 1996). ویرولانس موتانهایی که با تخریب ژنهای بیوسنتز توکسین تریکوتسین بدست آمده‌اند، کاهش می یابد(Proctor *et al.*, 1995). این کاهش ویرولانس در آزمایشات مزرعه ای نیز به اثبات رسیده است(Desjardins *et al.*, 1996) و با بازگرداندن ژنهای فعال به موتانهای مذکور ویرولانس مجدداً به حالت اولیه برگشته است (Proctor *et al.*, 1997). علاوه بر این تلاشهایی برای یافتن نحوه کنترل بیوسنتز توکسین انجام گرفته است و فعال کننده نسخه برداری (transcriptional activator) ژنهای دخیل در بیوسنتز تریکوتسین‌ها مشخص شده اند(Hohn *et al.*, 1999). این بیماری علاوه بر تأثیر برروی عملکرد، به دلیل تولید فیتوتوکسین های مربوطه کاهش کیفیت آرد و همچنین بیماریهای دامی و انسانی ناشی از مصرف آرد آلوده نیز قابل توجه می باشد. این توکسین ها دردانه های انبار شده سالها به صورت پایدار باقی می مانند. در سال ۱۹۷۴ میلادی بر اساس مطالعات انجام شده مشخص گردید که در گندمهای آلوده به *F. graminearum* میزان پروتئین و گلوتن و نیز کیفیت نانوایی آرد کاهش می یابد(Berova and Mladenov, 1974). از سوی دیگر آلودگی دانه گندم توسط *F. graminearum* به مقدار زیادی کیفیت گندم برداشت شده را از طریق تأثیر بر ذرات نشاسته و پروتئین های ذخیره ای و همچنین تخریب دیواره های سلولی تغییر می دهد. همین امر موجب کاهش جوانه زنی بذر گندم می گردد (Parry *et al.*, 1995).

علل و عوامل متعددی منجر به توسعه این بیماری شده است که به اختصار به آنها اشاره می شود. یکی از خصوصیات گونه های *Fusarium* عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم قدرت رشد ساپروفیتی بر روی بقایای میزبان و غیرمیزبان می باشد. لذا بقایای گیاهی اصلی ترین منبع اینوکلوم (inoculum source) به شمار می رود (Sutton, 1982). مطالعاتی که بر روی تناوب ذرت و گندم صورت گرفته نشان داد که استفاده از این نوع تناوب منبع بزرگی از اینوکلوم قارچ را فراهم آورده و توسعه اپیدمی بلایت سنبله راسبب می گردد(Tusa et al,. 1981; Teich and Nelson, 1984). از سوی دیگر علف های هرز پهن برگ و گراسها، میزبان های ثانویه مناسبی بوده و منابع قابل توجهی از اینوکلوم را بوجود می آورند. تاکنون جداسازی گونه های مختلف *Fusarium* از پانزده گونه علف هرز گزارش شده است (Jenkinson and Parry, 1994). غالباً اینوکلوم به شکل کنیدی، قطعات هیفی و یا کلامیدوسپورها می‌باشد. درشکل جنسی (*G. zeae*) اسکوسیورها نیز منبع مهمی از اینوکولوم به حساب می آیند (Suty and Mauler - Machnik, 1996; Parry *et al.*, 1995). به دلیل عدم توانایی *F. graminearum* در آلودگی سیستمیک میزبان، آلودگی نواحی طوقه و ریشه نقشی در توسعه FHB ندارد(Clement and Parry, 1998). از جمله فاکتورهای مهم در انتشار پروپاگول های عامل بیماری، باد وباران می باشد. بارش بیش از اندازه باران در سالهای ۱۹۸۴ و ۱۹۸۵ در مانیتوبای کانادا آلودگی بالایی از سنبله های گندم را به همراه داشت (Abramson *et al.*, 1987; Clear and Abramson 1986). بارندگی همزمان و بعد از دوره گلدهی منجر به اپیدمی‌های خطرناکی می شود (Parry *et al.*, 1995). بر اساس مطالعات انجام شده پرچم‌ها محل آلودگی اولیه هستند. در سال ۱۹۷۴ دوترکیب کلرید کولین وهیدروکلرید بتائین از پرچم‌های گندم استخراج گردید (Strange *et al.*, 1974). بر این اساس مشاهده شد که در حضور این دو ترکیب ریسه ها بیشتر توسعه پیدا می کنند، اما جوانه زنی اسپور تحت تأثیر قرارنمی گیرد. دو ترکیب مذکور را می توان از پاله آ، گلوم، محور اصلی سنبله و دانه نیز به راحتی جداکرد، اما غلظت آنها در پرچم خیلی بالاتر است (Pearce *et al.*, 1976). از آنجایی که دوره اصلی حساسیت گندم طی دوره گلدهی است لذا قارچ عموماً در هرفصل زراعی به یک چرخه آلودگی ختم می‌شود (Bai and Shaner, 1994). مطالعات بیشترنشان داده است که آلودگی تنها در زمان گلدهی نیست و تا زمان رسیدن سنبله هم ادامه می یابد (Rintelen, 1995). دوره کمون بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم در شرایط گلخانه ای ۳-۲ روز می باشد (Bai *et al.*, 1991; Bai *et al.*, 1989 Wang *et al.*, 1982). درشرایط مزرعه ای طول این دوره ۵-۴ روز می باشد (Xiao et al, 1989).

برای کنترل این بیماری از روشهای مختلفی استفاده شده است که شامل کنترل زراعی، کنترل بیولوژیکی، سمپاشی و استفاده از ارقام مقاوم می باشد (Parry *et al.*, 1995). گزارشاتی از کنترل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم به کمک قارچ کش ها موجود است، اما در هیچ موردی بیماری بطور کامل کنترل نشده است. در آزمایشات گلخانه ای استفاده از قارچکشهای tebuconazole و prochloraz مؤثر واقع شده است (Hutcheon and Jordan, 1992). قارچکش propiconazole نیز در آلودگی های طبیعی مزرعه، بیماری را به خوبی کنترل می نماید. به نظر می رسد مناسب ترین کنترل بیماری زمانی است که triadimafon و propiconazole دو روز بعد از تلقیح بکار روند (Parry *et al.*, 1995). مطالعات اخیر نشان داده است که tebuconazole مؤثر ترین قارچکش بوده است (Mesterhazy, 1997). در این بیماری مناسب ترین و مقرون به صرفه ترین روش کنترل استفاده از ارقام متحمل یا نسبتاً مقاوم توصیه شده است(Campbell and Lipps, 1998; Dill - Macky, 1997; Parry *et al.*, 1995). گندم در یک دوره خیلی کوتاه زمانی

ادامه بند ۱۱

یعنی زمان ظهور پرچمها (anthesis) بسیار حساس است. *F. graminearum* برای آلودگی ۷۲-۳۶ ساعت رطوبت مداوم و دمای بالای C ° ۲۵ نیاز دارد. به دلیل اینکه لاینهای در حال اصلاح از لحاظ زمان ظهور پرچمها با یکدیگر فرق دارند لذا مقدار آلودگی بستگی به بلوغ گیاه، الگوی بارندگی و دما دارد. ارتفاع گیاه، وجود ریشک و مقدار باز شدن گلچه ها نیز بر روی پیشرفت بیماری اثر دارد (Mesterhazy, 1995; Bai and Shaner, 1994) علاوه بر این نحوه ارزیابی نیز در مطالعات مربوط به ارقام مقاوم از اهمیت خاصی در جهت رسیدن به نتایج صحیح تر، برخوردار است(Campbell and Lipps, 1998). از طرف دیگر مقاومت به FHB دارای چهار جزء است: مقاومت درمقابل شروع آلودگی (Typel) مقاومت در مقابل توسعه پاتوژن در بافتهای میزبان (Schroeder and Christensen, 1963) (Typell) توانایی تجزیه DON (Type III) (Miller and Arnison, 1986) و مقاومت ناشی از تحمل غلظت های بالای DON (Type IV) (Wang and Miller, 1988). لازم به یادآوری است که علاوه بر مقاومت به بیماری آلودگی نهایی محصول به فیتوتوکسینهای این قارچ نیز باید مورد توجه قرار گیرد (D'Mello *et al.*, 1998). با توجه به مطالعات فوق کنترل FHB هنوز به عنوان یک مسئله حل نشده در سرتاسردنیا می‌باشد(Mesterhazy, 1997). مطالعات نشان داده است که اغلب کولتیوارهای تجارتی گندم نسبت به FHB حساس یا خیلی حساس هستند و توسعه ارقام مقاوم تر به بیماری نیز به کندی پیش می رود. لذا برخی از پژوهشگران به دنبال حفاظت از ارقام موجود در مقابل بیماری با استفاده از قارچکشها می باشند (Parry *et al.*, 1997; Mesterhazy, 1997). هر چند کاربرد قارچکشها درمواردی مشکل آفرین می شود (D'Mello *et al.*, 1998).

با توجه به آنچه گفته شد به نظر می‌رسد کنترل این بیماری نیازمند مطالعات عمیق تری در ارتباط با عامل بیماری از لحاظ ساختار ژنتیکی جمعیت، بیولوژی جمعیت و نیز ارائه راه حل های جدید می باشد. تنوع ژنتیکی جدایه های ایرانی *F. graminearum* با استفاده از نشانگرهای ایزوآنزیمی و تعیین گروههای سازگار رویشی (VCG) بررسی شده و چنانکه انتظار می رفت این پاتوژن از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است (صفوی ۱۳۷۶، ناصری و علیزاده ۱۳۷۸). اما ارتباط بین جمعیت ها و تعامل افراد بایکدیگر تاکنون مطالعه نشده است. دراین تحقیق ضمن شناسایی گونه ها بااستفاده ازتکنیک مبتنی بر (Polymerase Chain Reaction) PCR و پرایمرهای اختصاصی هر گونه و پرایمر اختصاصی *F. graminearum* Group II با استفاده از تکنیک تولید پروتوپلاست وترانسفورماسیون آنها با ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک ها جدایه ها را نشاندار کرده و به این ترتیب تعامل آنها بر روی ژنوتیپ های مختلف میزبان ردیابی و بررسی می شود. در این بررسی ها ژنوتیپ غالب تعیین و ویژگیهای آن تعیین می شود. با تعیین این ویژگیها، استراتژی استقرار آن بروی میزبان روشن می گردد و این گام بسیار مهمی در روشن شدن وضعیت ارتباط میزبان - پاتوژن و تعامل جمعیت های پاتوژن بایکدیگر می‌باشد. بر اساس منابع موجود تاکنون چنین تحقیقی در مورداین بیماری انجام نشده است.

۱۲- سابقه تحقیق در داخل و خارج از کشور با ذکر نتایج (REVIEW OF LITERATURE)

بلایت فوزاریومی سنبله گندم (FHB) که یکی از بیماریهای مهم گندم در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب است (Parry *et al.*, 1995) هنوز کنترل آن در سرتاسر دنیا یک مسئله حل نشده است(McMullen *et al.*, 1997; Mesterhazy, 1997). یکی از ویژگیهای خاص عامل این دسته از بیماریها و از جمله عامل بیماری FHB که گونه غالب آن *F. graminearum* Group II می باشد، تولید فیتوتوکسین (Phytotoxin) است که در قدرت بیماریزایی (ویرولانس) آن دخالت دارد (Desjardins *et al.*, 1996; Desjardins and Hohn, 1997 ;Proctor *et al.*, 1997 ;Proctor *et al.*, 1995). اگر چه فعال کننده نسخه برداری (transcriptional activator) بیوسنتز تریکوتسین ها (که یک ترکیب پروتئین - روی محصول ژن *TRI6* می‌باشد) مشخص گردیده است (Hohn *et al.*, 1999) و نیز معلوم شده است که تولید این فیتوتوکسینها اغلب درارقام مقاوم کمتر و در ارقام حساس بیشتر می باشد (Mesterhazy, 1997; Chen *et al.*, 1996)، هنوز فاکتورهای گیاهی که تولید توکسین‌ها را در قارچ *F. graminearum* فعال می کند مشخص نشده است. چنین فاکتورهایی در برخی از پاتوژنهای مولد توکسین مانند *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* بررسی شده است (Li *et al.*, 1998). دربرخی از مطالعات انجام شده ترکیبات fungistatic طبیعی موجود در گیاه (گندم) موجب کاهش تسولید توکسین در *F. graminearum* شده است(Sidorov *et al.*, 1996). نشان داده شده است که در ارقام مقاوم فعالیت Ascorbic Acid (AsA) oxidase و AsA peroxidase نسبت به رقم حساس بالاتر است و ارقام حساس میزان اسکوربیک اسید (AsA) بیشتری دارند (Chen *et al.*, 1997). عصاره برگ دو رقم مقاوم گندم (Sumai 3 و Fan 9) فیتوتوکسین فوزاریوم را به ماده تجزیه کرد که هیچ اثری بر روی رشد بافت کلئوپتیل گندم نداشت و از جوانه زدن کنیدیهای *F. graminearum* نیز جلوگیری کرد (Yao *et al.*, 1996). علاوه بر این برخی از قارچکشها باعث کاهش تولید فیتوتوکسین‌ها در *F. graminearum* می شوند (مانند tebuconazole) (Mesterhazy, 1997) و برخی دیگر باعث افزایش تولید فیتوتوکسین ها می شوند

ادامه بند ۱۲-

(D'Mello *et al.*, 1998). فیتوتوکسین DON مانع سنتز پروتئین می شود. دررقم مقاوم Frontana این ممانعت انجام نمی گیرد و این احتمالاً به دلیل وجود یک موتاسیون در آنزیم peptidyl transferase می باشد. این فیتوتوکسین در ارقام مقاوم نمی تواند غشاء سیتوپلاسمی را مختل کند (Miller and Ewen, 1997). شناسایی یک ژن مقاومت به تریکوتسین (ژن *TRI'*) در *F. sporotrichioides* این امید را بوجود آورده است که بیان *TRI'* یا سایر ژنهای مقاومت به تریکوتسین موجود درمیکروارگانیسم ها، درگندم ممکن است به حل این مشکل کمک نماید (Hohn *et al.*, 1997).

در مطالعات آنزیمی انجام شده در پاتوژن (*F. graminearum* و *F. culmorum*) فعالیت هیدرولازها (بویژه xylanase و cellulase) در استرین های با قدرت بیماریزایی بالا، در آزمونهای درون شیشه ای (in vitro) زیاد بود. این نتایج درعصاره های بدست آمده از میزبان آلوده معکوس بود و این بخاطر فعالیت هیدرولازهای میزبان درهنگام دفاع می باشد (در اثر lignification). غلظت فروکتوز نیز در محل رخنه در ارقام مقاوم بیشتر بود. فعالیت باز دارنده های protease در ارقام مقاوم بیشتر از حساس گزارش شده است (Klechkorskay *et al.*, 1997). بررسی آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در ارقام مقاوم و حساس گندم نسبت به FHB نشان داد که قبل ازمایه زنی میزان SOD و CAT در ارقام مقاوم بیشتر از ارقام حساس و نسبتاً مقاوم است وبعد ازمایه زنی در رقم مقاوم SOD افزایش و CAT کاهش پیدا می کند. در این آزمایشات از رقم Wangshuibai به عنوان رقم مقاوم و ارقام Yangmai 4 و Ningmai 6 به ترتیب به عنوان ارقام نسبتاً مقاوم و حساس استفاده شده بود (Chen *et al.*, 1997) با وجود این مطالعات، هنوز بسیاری از جنبه های این بیماری مهم گندم ناشناخته است و روشن ترین دلیل آن اذعان پژوهشگران به ناتوانی در کنترل این بیماری می باشد (Mesterhazy, 1997). برای مبارزه با هر بیماری شناخت پاتوژن بویژه ساختارجمعیت آن ضروری است وعدم توفیق در کنترل یک بیماری ناشی از عدم درک ساختارژنتیکی جمعیت های عامل بیماری می باشد(McDonald, 1997; Martin and English, 1997). بنابراین ضرورت دارد که مطالعات بیشتری در زمینه شناسایی جمعیت های این پاتوژن و روابط آنها با یکدیگر انجام گیرد. تاکنون در ایران مطالعاتی در ارتباط با تنوع ژنتیکی *F. graminearum* عامل بلایت فوزاریومی سنبله گندم با استفاده از نشانگر های ایزوآنزیمی (صفوی ۱۳۷۶) و گروههای سازگار رویشی (VCGs) (ناصری و همکاران ۱۳۷۸) انجام گرفته است اما مطالعه ای بر روی تعامل جمعیت های مختلف انجام نگرفته است. لذا در این تحقیق پس از تعیین فنوتیپ‌های بیوشیمیایی جمعیت های *F. graminearum* در ایران این ویژگیها و مشخصات بیماریزایی جدایه ها مقایسه می گردد. در ادامه با استفاده از تکنیک تولید پروتوپلاست (protoplasting technique) ازتعدادی از جدایه ها با بیماریزایی مختلف پروتوپلاست تهیه و با روش ترانسفورماسیون (transformation) با پلازمید حاوی ژن مقاومت به هیگرومایسین B (hygromycin B) مارک دار می شود. این جدایه ها همراه با نشانگرهای بیوشیمیایی مذکور، به صورت مخلوط (mixed) برروی گیاه میزبان مایه زنی می شوند. بعد از استقرار، نمونه برداری انجام می گیرد و جمعیت (ژنوتیپ) غالب تعیین و مورد بررسی قرار می گیرد. این بررسی ها با استفاده از ویژگیهای بیوشیمیایی و ملکولی (RAPD) انجام می گیرد.

برخی از ویژگیهای بیوشیمیایی در این پاتوژن قبلاً بررسی شده است (Klechkorskay *et al.*, 1997) و نتایج خوبی هم در برداشته است. دراین تحقیق مطالعات تکمیلی بر روی این ویژگیهای بیوشیمیایی انجام می گیرد. این مشخصات (biochemical phenotypes) نه تنها به عنوان نشانگر در بررسی های جمعیت بکار می روند به روشن شدن تکامل پاتوژن - میزبان نیز کمک می نمایند. لذا این بررسی ها از اهمیت خاصی برخور دارند.

برای انتقال ژن در قارچها عمدتاً سه روش وجود دارد. یکی تولید پروتوپلاست با هضم آنزیمی دیواره سلولی و سپس اضافه کردن DNA به پروتوپلاستها در حضور پلی اتیلن گلیکول (PEG) و یون کلسیم. در این روش با جوش خوردن پروتوپلاستها در حضور PEG و یون کلسیم DNA وارد سلول ها می شود. در روش دوم سلول قارچ در حضور Li^+، DNA را جذب می کند. روش دیگر electroporation است که سلول قارچ در معرض پالس الکتریکی قرارگرفته وتسوزاخی در دیواره سلولی و غشاء ایجاد شده و DNA به طور تصادفی جذب می شود (Hargreaves and Turner, 1992;Bennett and Lasure, 1991). ترانسفورماسیون با استفاده از پروتوپلاست معمول ترین روش برای انتقال ژن در قارچها و از جمله قارچهای بیماریزای گیاهی می باشد (Fincham, 1989; Peberdy and Ferenczy, 1985; Desjardins *et al.*, 1997; van Diepeningen *et al.*, 1998; Sivan *et al.*, 1992; Hargreaves and Turner, 1992). این روش انتقال ژن که به آن transformation گویند در قارچهای رشته ای اولین بار در سال ۱۹۷۹ در قارچ Neurospora crassa انجام شد(Hagreaves and Turner, 1992).

در *F. graminearum* عامل FHB ترانسفورماسیون بوسیله ناقل pUCH 2-8 که حامل ژن مقاومت به هیگرومایسین (hygBR) بوده برای تخریب ژن Tri 5 و جایگزینی مجدد آن بکار گرفته شده است (Desjardins *et al.*, 1996; Proctor *et al.*, 1995). همچنین برای ردیابی جدایه ها در مزرعه نیز ترانسفورمان مقاوم به هیگرومایسین B ایجاد شده است (Desjardins *et al.*,

ادامه بند ۱۲-

(1997) که در آزمایشات اخیر هدف ردیابی استرین پس از بازیابی توانایی تولید توکسین بوده است. استفاده از ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک ها و نیز برخی فنوتیپ‌های خاص برای ردیابی میکرو ارگانیسم ها در طبیعت بسیار معمول است (Harverson and Handelsman, (DeFlaun and Gerba, 1993 ,1991. پس از یافتن مارکرهای مناسب که یکی از اهداف این تحقیق است امکان ردیابی جدایه‌ها در طبیعت برای ما میسر می شود. بعنوان مثال پس ازاعمال یک روش کنترل، می توان سرنوشت پاتوژن را دنبال کرد و کاربردهای بسیار دیگری نیز در صورت موفقیت می توان از آن متصور شد که در اینجا از این دستاورد در جهت بررسی تعامل جمعیت ها بر روی ژنوتیپ های مختلف میزبان و مشخص کردن ژنوتیپ غالب در جمعیت ها استفاده می شود.

در بخش دوم این تحقیق جدایه های غالب با سایر جدایه ها از لحاظ برخی از ویژگیهای بیوشیمیایی (تولید آنزیم های خارج سلولی، ایزوآنزیم ها، تولید فیتوتوکسین) و ژنتیکی (وجود یا عدم وجود dsRNA، آنالیز با روش RAPD) مورد بررسی قرار می گیرند. شناسایی جدایه ها با استفاده از پرایمرهای ویژه گونه (species - specific primers) که برای دو گونه *F. graminearam* و *F. culmorum* طراحی شده است (Schilling *et al.*, 1996) انجام می گیرد.

۱۳- روش کامل اجرای تحقیق Materials and Methods (برای هر هدف روش تحقیق مربوط با ذکر متغیرهای ارائه شود):

۱- جمع آوری نمونه: با مسافرت به استانهای آلوده مازندران، گلستان و فارس نمونه های آلوده جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل می شوند. در آزمایشگاه نمونه ها مورد بررسی قرار گرفته و بافت های آلوده خوشه بر روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت و کلنی های قارچ پس از رشد با روش تک اسپور کردن خالص می شوند. کشت، جداسازی و خالص سازی *Fusarium* spp. بر اساس روشهای مرسوم انجام می گیرد (Burgess *et al.*, 1994).

۲- شناسایی گونه های *Fusarium* بر اساس کلید نلسون (Nelson *et al.*, 1983) انجام می گیرد.

۳- شناسایی با کمک پرایمرهای ویژه گونه (species - specific primers) و با کمک PCR:

با استفاده از ماشین PCR و پرایمرهای ویژه گونه که قبلاً برای سه گونه فوزاریوم (*F. avenaceum*، *F. culmorum* و *F. graminearum* group II) طراحی شده است (Schilling *et al.*, 1996) تشخیص گونه ها انجام می شود.

۴- بررسی بیماریزایی جدایه های *F. graminearum*:

مایه زنی به روش تزریق سوسپانسیون کنیدها به داخل گلچه ها انجام می گیرد. سپس نرخ سنبلچه های آلود. (infected spikelet rate) محاسبه می گردد (Zhuping, 1994). در این آزمایشات از دو رقم حساس (فلات) و مقاوم (Frontana) استفاده می شود. بررسی بیماریزایی جدایه ها در گلخانه و در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام می گیرد.

۵- تعیین فنوتیپ بیوشیمیایی جدایه ها

برای بررسی مصرف منابع نیتروژن از محیط جذب نیتروژن (Nitrogen assimilation medium) استفاده می شود. منابع مختلف نیتروژن (نیترات، نیتریت، اسید اوریک، هیپوزانتین و ...) به نسبت ۰/۲ درصد (w/v) به محیط مذکور اضافه و pH آن را روی ۴/۵ تنظیم می نماییم (Paterson and Bridge, 1994).

۶- رشد بر روی باز دارنده های رشد

توانایی رشد جدایه ها بر روی موادی که معمولاً باز دارنده رشد هستند به عنوان یک ابزار کمکی برای تفکیک جدایه های منفرد و جمعیت های قارچها بکار می رود (Paterson and Bridge, 1994). برای این منظور بازدارنده‌های رشد (crystal violet، methylen blue، Fast blue، Malachite green و ...) به محیط آگار دار اضافه می شود و رشد جدایه ها بررسی می گردد. در مواردی از روش diffusion plates نیز استفاده می شود (Paterson and Bridge, 1994).

۷- ترانسفورماسیون جدایه ها با ژن مقاومت به هیگرومایسین B

تعدادی از جدایه ها با فنوتیپ های خاص (مقاومت به بازدارنده های رشد، برخی ویژگیهای بیوشیمیایی) با استفاده از تکنیک تولید پروتوپلاست ژن مقاومت به هیگرومایسین B (hygBR) را دریافت می کنند. این تکنیک شامل مراحل زیر می‌باشد:

الف - تهیه پروتوپلاست:

ابتدا دیواره سلولی سوسپانسیون غلیظ اسپور (106 در میلی لیتر) *F. graminearum* بوسیله آنزیم NovoZyme 234 با غلظت ۱۵ mg/ml و زمان یک ساعت هضم می شود. این مرحله در محلول NaCl ۰/۷ مولار و دمای ۳۰°C انجام می شود. پروتوپلاست های حاصل با چهار لایه پارچه ململ فیلتر می شوند تا بقایای هضم نشده جدا شوند. پروتوپلاست ها بعد از شستشو با سانتریفوژ در محلولی شامل ۰/۶ M سوربیتول، Tris - HCl ۰/۰۱M و ۰/۰۱ M کلرید کلسیم، pH 7.5 = که به آن STC گویند بر روی یخ نگهداری می شود، برای نگهداری درازمدت می توان آنرا در دمای ۷۰- درجه نگهداری کرد (Sivan *et al.*, 1992).

ب - جذب DNA

برای ترانسفورماسیون پروتوپلاسمها از پروتکل شماره ۲ (protopast transformation) استفاده می شود (Horgreaves and Turner, 1992). کشت های باکتری E. coli حاوی پلازمید مقاومت به hygB از شرکت های مربوطه تهیه می شود.

ج - باز زایی (regeneration) و انتخاب ترانسفورمانها

پروتوپلاست ها بعد از ترانسفورماسیون به محیط باز زایی (regeneration medium) (دمای ۴۸°C) اضافه شده و بر روی پتری که قبلاً ۱۵ میلی لیتر از این محیط در آن ریخته شده و بسته است، ریخته می شود. بعد از ۴ ساعت به آن ۴۰۰ml از محلول هیگرومایسین (۸ mg هیگرومایسین B در هر میلی لیتر سوربیتول ۱ مولار) به طور یکنواخت اضافه می شود.

۸- مخلوطی از جدایه های مارک دار بر روی ژنوتیپ های مختلف گندم (Frontana، Atila، فلات، Wangshuibai،

ادامه بند ۱۳

3 # Sumai) مایه زنی می شود. به فاصله هر یک هفته از زمان مایه زنی تعداد ۱۰ خوشه به آزمایشگاه منتقل و قارچهای موجود بر روی آن جداسازی می شود. و با استفاده از ویژگی هر استرین مارک دار، درصد جدایه های مخلوط اندازه گیری می شود. این آزمایشات در گلخانه انجام می شود.

۹- با تعیین جدایه های غالب بر روی هر ژنوتیپ، تفاوت های آنها با سایر جدایه ها باکمک روشهای بیو شیمیایی (فعالیت آنزیمی، تولید فیتوتوکسین DON و 3AC DON) و مولکولی (RAPD، وجود dsRNA) ارزیابی می شود (Patterson and Bridge, 1994).

(لطفاً برای درج بقیه مطالب این بند از پشت صفحه استفاده شود)

۱۴- شرح وظایف مجریان (مذکور در بند ۴) به تفکیک:

نام و نام‌خانوادگی	سمت در طرح	وظایف محوله

۱۵- زمان‌بندی فعالیت‌های عمده طرح و زمان ارائه گزارش نهایی:

سال	تهیه مواد گیاهی	شناسایی نژادهای	تلاقی‌های برگشتی و تهیه نسل	بررسی میزان حساسیت	مونوتیپ سیتوشیمیایی	ترانسفورماسیون جدایه‌ها	پیدایش تکامل در جدایه‌ها	تعیین جدایه غالب در
۱۳۷۹	+	+	—	—	—	—	—	—
۱۳۸۰	—	—	+	+	+	+	—	—
۱۳۸۱	—	—	—	+	+	+	+	—
۱۳۸۲	—	—	—	—	—	—	+	+

۱۶- اعلام نظر مجری مسئول طرح در مورد لزوم (با ذکر زمان) همکاری کارشناس (آن) ترویج به منظور آشنایی با طرح و ترویج نتایج حاصل از اجرای آن:

نیاز نیست

۱۷- پیش‌بینی چگونگی انتقال نتایج حاصل از اجرای طرح به مراکز و مؤسسات آموزش کشاورزی کشور:

چاپ مقاله در مجلات پژوهشی

۱۸- منابع و مأخذ مورد استفاده:

۱- بامدادیان، ع، ترابی، م، (۱۳۶۲). بیماریهای مهم گندم و جو و نحوه یاداشت برداری از آنها، انتشارات مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، تهران، ۶۷ صفحه.

۲- فروتن، ع، ارشاد، ج، دلیلی، ع، بامدادیان، ع و گرامی، ق، (۱۳۷۲). شیوع بلایت خوشه گندم در مازندران، خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳- گلزار، ح، (۱۳۶۸). بیماریهای بلایت خوشه گندم، بررسی در مورد عامل بیماری، نحوه آلودگی و انتقال بوسیله بذر، بیماریهای گیاهی ۲۵: ۱۷-۲۲.

۴- صفوی، ص، (۱۳۷۶). بررسی الکتروفورزی ایزوآنزیم ها در جمعیت های نوزاریوم عامل بلایت خوشه گندم. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس.

۵- ناصری، ب.، علیزاده، ع. و سعید، ع. (۱۳۷۸). بررسی ساختار جمعیت در قارچ *Fusarium graminearum* با استفاده از گروه های سازگار رویشی VCGs و رابطه آن با بیماری زایی نسبی جدایه. مجله بیماریهای گیاهی. زیر چاپ.

6- **Abramson, D., Clear, R.M. and Nowicki, T.W.** (1987). *Fusarium* species and trichothecene mycotoxins in suspect samples of 1985 Manitoba wheat. Canadian Journal of Plant Science **61**: 611-9.

7- **Arthur, J.C.** (1891). Wheat scab. Indian Agricultural Experimental Station Bulletin **36**: 129-32.

8- **Bai, G.H. and Shaner, G.** (1994). Scab of wheat: Prospects for control. Plant Disease 78:760-766.

9- **Bai, G.H., Shaner, G., and Ohm, H.** (1991). Effect of moist period on response of wheat cultivars to infection by *Fusarium graminearum*. Phytopathology **81**: 1145-1146. (Abstr).

10- **Bai, G.H., Zhou, C.F., Ge, Y.F., Qian, C.M., Chen, Z.D. and Yao, G.C.** (1989). A study on scab-resistance in new wheat cultivars and advanced lines. Jiangsu Agric. Sci. **7**: 20-22.

11- **Bennett, J.W. and Lasure, L.L.** (1991). More Gene Manipulations in Fungi. Academic Press, California.

12- **Berova, S. and Mladenov, M.** (1974). Effect of wheat ear and grain fusariosis on the chemical, technological and baking qualities of wheat. Rasteniev dni Nauki **11**: 125-33.

13- **Burgess, L. W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. and Backhouse, D.** (1994). Laboratory Manual For Fusarium Research. 3th ed. University of Sydey.

14- **Campbell, K.A.G. and Lipps, P.E.** (1998). Allocation of resources: Sources of variation in *Fusarium* head blight screening nurseries. Phytopathology **88**: 1078-86.

15- **Chen, L.F., Song, Y.L. and Xu, Y.G.** (1996). Variation in the concentrations of deoxynivalenol in the spikes of winter wheat infected by *Fusarium graminearum* Schw. Acta Phytopathologica Sinica **26**: 25-28.

16- **Chen, L.F., Song, Y.L., Xu, Y.G., Nie, L. and Xu, L.L.** (1997 a). Comparison for activities of superoxide dismutase and catalase between scab-resistant and susceptible wheat varieties. Acta. Phytopathologica Sinica

27: 209-213.

17- **Chen, L.F., Ye, M.B., Chen, Y.X., Xu, L.L. and Xu, Y.G.** (1997 b). The relationship between ascorbic acid and resistance of wheat to scab. Acta Phytop athologica Sinica **27**: 113-118.

18- **Clear, R.M. and Abromson, D.** (1986). Occurrence of *Fusarium* headblight and deoxynevalenol in two samples of Manitoba wheat in 1984. Canadian Plant Disease Survey **66**: 9-11.

19- **Clement, J.A. and Parry, D.W.** (1998). Stem-base disease and fungal colonisation of winter wheat grown in compost inoculated with *Fusanium culmorum, F. graminearum* and *Microdochium nivale*. European Journal of Plant Pathology **104**: 323-30.

20- **DeFlaun, M.F. and Gerba, C.P.** (1993). Monitoring recombinant DNA Microorganisms and viruses in soil. In: Soil Microbial Ecology. ed. Metting, F.B.Jr., pp. 131-150. Marcel Dekker, Inc. New York.

21- **Desjardins, A.E. and Hohn, T.M.**(1997). Mycotoxins in plant pathogenesis. Molecular Plant - Microbe Interactioin **10**: 147-152.

22- **Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G., McCormick, S.P., Shaner, G., Buechley, G. and Hohn, T.M.** (1996). Reduced virulence of trichothecene - nonproduing mutant of *Gibberella zeae* in wheat field tests. Molecular Plant - Microbe Interaction **9**: 775-81.

23- **Dill - Macky, R.** (1997). Fusarium head blight: Recent epidemics and research efforts in the upper midwest of the United States. In: Fusarium Head Seab: Global Status and Future Prospects. eds. Dubin, H.J., Gilchrist, L., Reeves, J. and McNAB, A., pp. 1-6. Mexico, D.F.: CIMMYT.

24- **D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Postel, D., Dijksma, T.P., Dujardin, A. and Placinta, C.M.** (1998). Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. European Journal of Plant Pathology **104**: 741-51.

25- **Fincham, J.R.S.** (1989). Transformation in fungi. Microbiological Review **53**: 148-170.

26- **Halverson, L.J. and Handelsman, J.** (1991). Stability of antibiotic - resistance markers in *Bacillus cereus* UW85.In: The Rhizosphere and Plant Growth. eds. Keister, D.L. and Cregan, P.B.,pp. 107. Kluwer Academic Publishers.

27- **Hargreaves, J. and Turner, G.** (1992). Gene transformation in plant pathogenic fungi. In: Moleculor Plant Pathology. A Practical Approach. Vol. 1. eds. Gurr. S.J., McPherson, M.J. and Bowles, D.J., pp. 79-97. IRL Press.

28- **Hohn, T.M., Krishna, P. and Proctor, R.H.** (1999). Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. Fungal Genetics and Biology **26**: 224-235.

29- **Hohn,T.M., McCormick, S.P., Alexander, N.J., Desjardins, A.E. and Proctor, R.H.** (1997). Function and biosynthesis of trichothecenes produced by *Fusarium* species. Review of Plant Pathology **77**: 1244. (Abstr.).

30- **Hutcheon, J.A. and Jordan, V.W.L.** (1992). Fungicide timing and performance for *Fusarium* control in wheat. In: Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases. Vol. 2. pp. 633-638. Farnham UK, BCPC Publication.

31- Jenkinson, P. and Parry, D.W. (1994). Isolation of Fusarium species from common broad-leaved weeds and their pathogenicity to winter wheat. Mycological Research 98: 776-80.

32- Klechkovskaya, H.A., Adamovskaya, V.G., Litvinenkio, N.A., Ignatova, S.A., Makhnovskaya, M.I., Khokhlov, A.N., Karpuk, Y.N. and Wolf, G.A. (1997). Control of Fusarium scab: Biochemical, genetic and ecological mechanisms. In: See 22.

33- Li, X. 2., Starratt, A.N. and Cuppels, D.A. (1998). Identification of tomato leaf factors that activate toxin gene expression in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000. Phytopathology 88: 1044-1100.

34- Martin, F.N. and English, J. T. (1997). Population genetics of soilborne fungal plant pathogens, Introduction. Phytopathology 87: 446-7.

35- Martin, R.A. and Johnston, H.W. (1982). Effects and control of *Fusarium* diseases of cereal grains in the Atlantic provinces. Canadian Journal of Plant Pathology 4: 210-6.

36- McDonald, B.A. (1997). The population genetics of fungi: Tools and techniques. Phytopathology 87: 448-53.

37- McMullen, M., Jones, R. and Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. Plant Disease 81: 1340-48.

38- Mesterhazy, A. (1987). Selection of headblight resistant wheats through improved seedling resistance. Plant Breeding 98: 26-6.

39- Mesterhazy, A. (1995). Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. Plant Breeding 114: 377-86.

40- Mesterhazy, A. (1997 a). Fungicide control of Fusarium scab and impact on toxin contamination. In: See 22.

41- Mesterhazy, A. (1997 b). Breeding for resistance to *Fusarium* head bight of wheat. In: See 22.

42- Miller, J.D. and Arnison, P.G. (1986). Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. Canadian Journal of Plant Pathology 8: 147-50.

43- Miller, J.D. and Ewen, M.A. (1997). Toxic effects of deoxynivalenol on ribosomes and tissues of the spring wheat cultivars Frontana and Casavant. Natural Toxns 5: 234-237.

44- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* Species, An Illustrated Manual For Identification The Pennsylvania State University Press.

45- Parry, D.W., Jenkinson, P. and McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. Plant Pathology 44: 207-38.

46- Parry, D.W., Jenkinson, P., Liggitt, J., Hilton, A. and Clement, J.A. (1997). Significance and control of *Fusarium* ear blight in winter wheat. In: See 22.

47- Paterson, R.R.M. and Bridge, P.D. (1994). Biochemical Techniques For Filamentous Fungi. CAB International.

48- Pearce, R.B., Strange, R.N. and Smith, H. (1976). Glycine, betaine and choline in wheat: distribution and relation to infection by *Fusarium graminearum*. Phytochemistry 15: 953-4.

49- **Peberdy, J.F. and Ferenczy, L.** (1985). Fungal Protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics. Marcell Dekker, New York.

50- **Proctor, R.H., Hohn, T.M. and McCormick, S.P.** (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* cause by disruption of trichothecene toxin biosynthetic gene. Molecular Plant - Microbe Interaction **8:** 593-601.

51- **Proctor, R.H., Hohn, T.M. and McCormick, S.P.** (1997). Restoration of wild-type virulence to *Tri 5* disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. Microbiology **143:** 2583-91.

52- **Reis, E.M.** (1990). Integrated disease management - The changing concepts of controlling head blight and spot blotch. In: Wheat For The Nontraditional Warm Areas., ed. Sauders, D.A., pp. 165-17. CIMMYT, Mexico.

53- **Rintelen, J.** (1995). On the time of infection by fusaria on wheat grains. Gesunde - Pflanzen **47:** 315-17. (CAB Abstr.).

54- **Schilling, A.G., Moller, E.M. and Geiger, H.H.** (1996). Polymerase chain reaction-based assay for species-specific detection of *Fusarium culmorum, F. graminearum* and *F. avenaceum*. Phytopathology **86:** 515-22.

55- **Schroeder, H.W. and Christensen, J.J.** (1963). Factors affecting the resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. Phytopathology **53:** 831-8.

56- **Sidorov, I.A., Sidorova, T.M., Ablova, I.B., Esaulenko, E.A. and Sokolov, M.S.** (1996). Pollution of winter wheat varieties differing in tolerance to *Fusarium graminearum* Schwabe by fusarium toxins and the ways of reducing it. Report 2. Formation of fungistatic compounds by winter wheat plants. Agrokhimiya (CAB Abstr.).

57- **Sivan, A., Stasz, T.E., Hemmat, M., Hayes, C.K. and Harrnan, G.G.** (1992). Transformation of *Trichoderma* spp. with plasmids conferring hygromycin B resistance. Mycologia **84:** 687-94.

58- **Snijders, C.H.A.** (1990). *Fusarium* headblight and mycotoxin contamination of wheat: a review. Netherlands Journal of Plant Pathology **96:** 187-98.

59- **Strange, R.N., Majer, J.R. and Smith, H.** (1974). The isolation and identificatiion of choline and betaine as two major components of anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum in vitro*. Physiological Plant Pathology **4:** 277-96.

60- **Sutton, J.C.** (1982). Epidemioogy of wheat headblight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology **4:** 195-209.

61- **Suty, A. and Mauler - Machnik, A.** (1996). *Fusarium* head blight on wheat - new findings on the epidemiology and control of *Gibberella zeae* the teleomorph of *Fusarium graminearum* with FolicurR. Pflanzenschutz - Nachrichten **49:** 55-70. (CAB Abstr.).

62- **Teich, A.H. and Nelson, K.** (1984). Survery of *Fusarium* headblight and possible effects of cultural practices in wheat fields in Lambton County in 1983. Canadian Plant Disease Survey **64:** 11-13.

63- **Tuite, J., Shaner, G. and Everson, R.J.** (1990). Wheat scab in soft red winter wheat in Indiana in 1986 and its relation to some quality measurements. Plant Disease **74:** 954-962.

64- **Tusa, C., Munteanu, I., Capetti, E., Pirvu, T., Bunescu, S., Sin, G.L., Nicolae, H., Tiamu, A., Caea, D., Romascanu, O. Stoika, V.** (1981). Aspects of the *Fusarium* attaks on wheat in Romania. Probleme de Protectia Plantelor **9:** 15-31.

65- **van Diepeningen, A.D., Debets, A.J.M. and Hoekstra, R.F.** (1998). Intra - and interspecies virus transfer in Aspergilli via protoplast fusion. Fungal Genetics and Biology **25:** 171-180.

66- **Wang, Y.Z. and Miller, J.D.** (1987). Screening techniques and sources of resistance to *Fusarium* head blight. In: Wheat Production Constraints in Tropical Evironments. pp. 239-250. Proc. Int. Conf. 1987. CIMMYT, Mexico.

67- **Wang, Y.Z. and Miller, J.D.** (1988). Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* headblight resistance. Journal of Phytopathology **122:** 118-25.

68- **Wang, Y.Z. Yong, X.N. and Xiao, Q.P.** (1982). The improvement of identification technique of scab resistance of wheat and the development of resistant sources. Sci. Agric. Sin. **5:** 67-77.

69- **Xiao, Q.P., Wu, Z.F. and Pen, L.X.** (1989). Dynamic observation of interaction between *Fusarium graminearum* causing wheat scab and varieties with different types of resistance. Jiangsu Agaric. Sci. Suppl. **1:** 69-71.

70- **Yao, Q.H., Liu, Z.Z. and Zeng, Y.S.** (1996). Detoxification of deoxynivalenol by scab resistant wheat and the bioactivities of the product. Acta Mycologica Sinica **15:** 59-64.

71- **Zhuping, Y.** (1994). Breeding For Resistance to Fusarium Head Blight of Wheat in the Mid - to Lower Yangtze River Valley of China. Wheat Special Report No. 27. Mexico, D.F.: CIMMYT.

جدول پیش بینی هزینه ها (اثر متقابل درون ...)

نوع هزینه	ریالی
جمع هزینه های پژوهشگران	۱۰,۰۰۰,۰۰۰
جمع هزینه های دستگاه ها و تجهیزات	۷۰,۰۰۰,۰۰۰
جمع هزینه های مواد مصرفی	۲۰,۰۰۰,۰۰۰
جمع هزینه های خدمات آزمایشگاهی	۱۰,۰۰۰,۰۰۰
جمع هزینه های متفرقه	۱۰,۰۰۰,۰۰۰
جمع کل	۱۲۰,۰۰۰,۰۰۰