

بررسی تنوع احتمالی موجود در منطقه ITS، DNA ریبوزومی جدایه‌های *Fusarium solani* سیب‌زمینی و ارتباط آن با بیماری‌زایی و منشاء جغرافیایی در استان‌های خراسان رضوی و شمالی

* ساره بقائی راوری^۱، ماهرخ فلاحتی رستگار^۲، بهروز جعفرپور^۲ و فرهاد شکوهی فر^۳

^۱ دانشجوی دکتری گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه تربیت مدرس، استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،

^۲ مربی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۸۴/۹/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۱

چکیده

اطلاعات اندک در ارتباط با تنوع ژنتیکی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی از مهمترین عوامل محدودکننده برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. این تحقیق در سال‌های زراعی ۸۴-۱۳۸۳ با بیست‌ودو جدایه *Fusarium solani* عامل پژمردگی و پوسیدگی خشک سیب‌زمینی که از مزارع و انبارهای سیب‌زمینی استان‌های خراسان رضوی و شمالی به‌دست آمده بود، انجام شد. جدایه‌های مذکور به روش آلوده‌سازی خاک، فرو بردن ریشه گیاهچه‌های رقم آگریا در سوسپانسیون اسپور، مایه‌زنی غده‌های این رقم با سوسپانسیون اسپور و مایه‌زنی غده‌ها با قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ، بیماری‌زایی اثبات گردید. به‌منظور مطالعه تنوع موجود در کلاستر ژنی DNA ریبوزومی بیست‌ودو جدایه استان‌های خراسان رضوی و شمالی و شش جدایه استان‌های تهران، همدان و اردبیل با استفاده از روش PCR-ribotyping، تفاوت طول مناطق ایترونی دربرگیرنده قطعه کوچک DNA ریبوزومی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، با استفاده از دو آنزیم *EcoRI* و *HaeIII* تنوع موجود در توالی این منطقه بررسی شد. نتایج نشان داد که همه جدایه‌های گرفته شده از غده رقم آگریا باعث پوسیدگی خشک و ۲۸ درصد از آنها سبب پوسیدگی نرم غده‌ها شدند و همچنین ۷۶ درصد جدایه‌ها علائم پژمردگی آوندی را در گیاهان رقم آگریا ایجاد کردند. با استفاده از تکثیر منطقه rDNA-ITS قارچ *F. solani*، جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه ITS تیپ ۱ و ITS تیپ ۲ تفکیک شدند. آنزیم *HaeIII* نسبت به *EcoRI*، چند شکلی بهتری را در تعداد و طول قطعات حاصل از هضم نشان داد. همچنین، در این بررسی مشخص شد که تکنیک PCR-ribotyping در تفکیک گروه‌ها، بین مناطق جغرافیایی و قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها ارتباطی را نشان نمی‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *Fusarium solani*، PCR-ریبوتایپینگ، سیب‌زمینی

مقدمه

بیماری‌های سیب‌زمینی در تمام مناطق زیر کشت سیب‌زمینی در کشور می‌باشد (راه‌خدایی و همکاران، ۲۰۰۲؛ شریفی و همکاران، ۲۰۰۰؛ مستوفی‌زاده قلمفرسا؛ بنی‌هاشمی، ۲۰۰۰). دانش کامل در رابطه با بیمارگرهای خاکزاد برای کاهش میزان خسارت در عملکرد سیب‌زمینی

بیماری پوسیدگی خشک و پژمردگی فوزاریومی با عامل قارچی *Fusarium solani* از پر خسارت‌ترین

*- مسئول مکاتبه: sbaghaee@yahoo.com

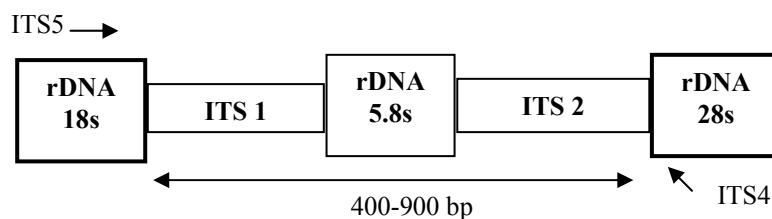
مهم می‌باشد. با وجود ابهامات موجود درباره نحوه واکنش میزبان نسبت به بیمارگرهای خاکزاد (نالیم، ۲۰۰۴)، راهکارهای زیادی چون سنجش میزان مایه تلقیح خاک قبل از کشت (ویل، ۲۰۰۱)، استفاده از قارچ‌کش‌ها، طراحی مدل‌های پیش‌آگاهی (لیو و کوشاپالا، ۲۰۰۲)، تأثیر عوامل آنتاگونیست در کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای مختلف (کسلر و همکاران، ۱۹۹۷)، تأثیر ترکیبات نمک روی اسپورزایی و جوانه‌زنی بیمارگرهای مختلف سیب‌زمینی (میلز و همکاران، ۲۰۰۴) و تناوب زراعی به‌منظور کاهش میزان خسارت، انجام پذیرفته است. در حال حاضر روش رایج مبارزه، استفاده از ارقام مقاوم است، با این حال مکانیزم‌های متفاوت ژنتیکی مقاومت ارقام سیب‌زمینی نسبت به این بیمارگرها و استقلال عمل جدایه‌های عامل بیماری (نصر اصفهانی و مرتضوی بک، ۲۰۰۴) از جمله مواردی است که نیاز به درک بیشتر ماده وراثتی ژنوم بیمارگر را همزمان با بررسی عکس‌العمل ارقام متفاوت سیب‌زمینی ضروری می‌سازد. در همین راستا، ابزار مولکولی بر پایه آنالیز DNA به‌عنوان یک راهکار در مقابل آزمون‌های بیوشیمیایی و شکل‌شناسی سنتی، به‌منظور بررسی بیوتایپ واریته‌های گونه‌های مختلف قارچ‌ها مورد استفاده می‌باشد (نالیم، ۲۰۰۴). ژن‌های DNA ریپوزومی جزء معمول‌ترین نشانگرهایی هستند که در بررسی روابط فیلوژنی مولکولی کاربرد دارند. کلاستر ژنی rDNA شامل تکرار متوالی سه منطقه اگزونی (18s-5.8s-28s) و دو منطقه ایترونی (ITS1 و ITS2) و لوکوس اصلی برای این نوع مطالعات است (برسیلیرو و همکاران، ۲۰۰۴) (شکل ۱). ژن‌های rDNA

بسیار ثابت بوده و تناوبی از مناطق حفظ شده و متنوع را درون ژنوم نشان می‌دهد. از سوی دیگر، آنالیز هضم قطعات ITS، پتانسیل این ابزار سیستماتیک را افزایش خواهد داد.

از این تکنیک در بررسی روابط فیلوژنی و جغرافیای زیستی مجموعه گونه‌ای *F. solani* (نالیم و همکاران، ۲۰۰۳)، طبقه‌بندی نژادهای فیزیولوژیک (گادت و همکاران، ۱۹۸۹)، تفکیک فرم‌های تخصص یافته *F. solani* (ادونیل و گری، ۱۹۹۵؛ لی و همکاران، ۲۰۰۰؛ لیورا و دکاستا، ۲۰۰۲) و یافتن آنزیم‌های برشی دارای قابلیت تمایز بین فرم‌های متفاوت تخصص یافته *F. solani* (سوگا و همکاران، ۲۰۰۰) استفاده شده است. برسیلیرو و همکاران (۲۰۰۴) نیز چندشکلی را حتی در توالی بسیار فشرده لوکوس rDNA جدایه‌های مختلف *F. solani* مشاهده کردند. هدف از این پژوهش بررسی تنوع احتمالی موجود در منطقه DNA ریپوزومی جدایه‌های *F. solani* سیب‌زمینی و بررسی ارتباط آن با بیماری‌زایی و منشاء جغرافیایی بوده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی عامل بیماری: طی سال‌های زراعی ۸۴-۱۳۸۳ از مناطق عمده سیب‌زمینی کاری استان‌های خراسان رضوی و شمالی اقدام به جداسازی و شناسایی جدایه‌های عامل بیماری پژمردگی و پوسیدگی خشک سیب‌زمینی گردید. مشخصات عمده برای شناسایی گونه *F. solani* براساس کلیدهای شناسایی فوزاریوم



شکل ۱- دیاگرام شماتیک بخشی از کلاستر ژن rDNA. ژن‌های مناطق کدکننده توسط مناطق ITS1 و ITS2 از هم جدا شده‌اند. این مناطق بعد از رونویسی پیرایش می‌شوند. آغازگر ITS4 و ITS5 برای تکثیر منطقه rDNA و تشکیل قطعه در ناحیه 400-900 bp مورد استفاده قرار می‌گیرد (برسیلیرو و همکاران، ۲۰۰۴).

(گرلاخ و نیرنبرگ، ۱۹۸۲؛ نلسون و همکاران، ۱۹۸۳؛ برگس و همکاران، ۱۹۹۴) ملاحظه و اعمال شدند. جدایه‌های شناسایی شده جهت آزمایش‌های مولکولی و نگهداری طولانی مدت روی محیط SNA¹ و ماسه سترون کشت و در گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد نگهداری شدند.

اثبات بیماری زایی: در این تحقیق، روش‌های مختلف اثبات بیماری زایی با ۵ تکرار به منظور بالا بردن ضریب اطمینان از بیماری‌زا بودن جدایه‌ها و منتفی کردن احتمال تأثیرگذاری شرایط محیطی بر علائم بیماری به کار گرفته شد. در اثبات بیماری زایی برای جدایه‌های بخش ساقه، طوقه و ریشه از سه آزمون آلوده‌سازی خاک^۲ (اباوی و لوربیر، ۱۹۷۲)، فروبردن ریشه گیاهچه در سوسپانسیون اسپور^۳ (ونتر و همکاران، ۱۹۹۲) و مایه‌زنی غده‌ها با سوسپانسیون اسپور^۴ (ترون و هولمز، ۱۹۸۷) استفاده شد. همچنین برای جدایه‌های به دست آمده از غده دو آزمون مایه‌زنی غده‌ها با سوسپانسیون اسپور (ترون و هولمز، ۱۹۹۱) و مایه‌زنی غده‌ها با قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ انجام پذیرفت. تمام آزمون‌ها بر روی رقم آگریا در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت شرایط کنترل شده انجام شد.

استخراج DNA: استخراج DNA برای بیست و دو جدایه استان‌های خراسان رضوی و شمالی به علاوه شش جدایه از استان‌های تهران، همدان و اردبیل طبق روش CTAB⁵ (وسینگ و همکاران، ۱۹۹۵) اصلاح شده انجام شد. پس از بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی، جهت انجام آزمایش‌های مولکولی، غلظت DNA کلیه نمونه‌ها در حد ۲۵ ng/μl تنظیم و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

PCR ریوتایپینگ^۱: به منظور مطالعه تنوع موجود در کلاستر ژنی DNA ریوزومی جدایه‌های *F. solani* به وسیله آغازگرهای پیشنهادی توسط برسلیرو و همکاران (۲۰۰۴)، این منطقه تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت.

از آغازگرهای ITS4 (5'-TCCTCCGCCTTATTGATATGC-3')

و ITS5

(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAA-3') تهیه شده از کمپانی MWG, Biotech, Germany

برای بررسی تنوع در این مطالعه استفاده شد. تکثیر DNA در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X (۲۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH: ۸.۵، ۵۰ میلی‌مولار KCl)، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط dNTPs، ۱۲/۵ پیکومول از هر آغازگر، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱/۲۵ واحد آنزیم تک‌پلیمرز (شرکت سیناژن) در دستگاه ترموسایکلر (ساخت کمپانی Biometra آلمان) با برنامه حرارتی ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه با ۱ دقیقه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. یک واکنش بدون اضافه کردن DNA ژنومی به عنوان شاهد برای کنترل احتمال آلودگی نیز در نظر گرفته شد. قطعات تکثیر شده در هر واکنش با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE 0/5x و با ولتاژ ۷۵ میلی‌ولت از یکدیگر تفکیک شدند. ژل‌ها با قرار گرفتن به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۱۰ mg/ml و همین مدت در آب مقطر، رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه Gel Doc (ساخت کمپانی Biodoc آمریکا) در مقابل نور UV مرئی شدند. همچنین، برای تفکیک بهتر باندها و برآورد اندازه دقیق‌تر، از الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید ۶ درصد (سمبروک و همکاران، ۱۹۸۹) در بافر

- 1- Special Nutrient Agar
- 2- Soil-infestation
- 3- Root-dipping
- 4- Tuber Inoculation with spore suspension
- 5- Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide

6- PCR-ribotyping

TBE 1x و با ولتاژ ۹۰ میلی ولت و به مدت ۲/۵ ساعت استفاده شد. ژل‌ها تحت رنگ‌آمیزی نیتترات نقره قرار گرفتند و از تصویر آنها جهت بررسی‌های بعدی عکس برداری شد.

PCR- RFLP¹: به منظور مقایسه بین آنزیم‌های برشی از نظر احتمال تولید چندشکلی بین جدایه‌های مختلف *F. solani*، از دو آنزیم *EcoRI* و *HaeIII* (مطابق دستورالعمل شرکت Fermentas) برای هضم قطعات DNA ریبوزومی تکثیر شده استفاده گردید. در نهایت چندشکلی قطعات ایجاد شده از نظر نواحی برش و تعداد باندهای برش خورده و طول قطعات برش خورده روی ژل پلی اکریلامید ۶ درصد مطابق روش قبل مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

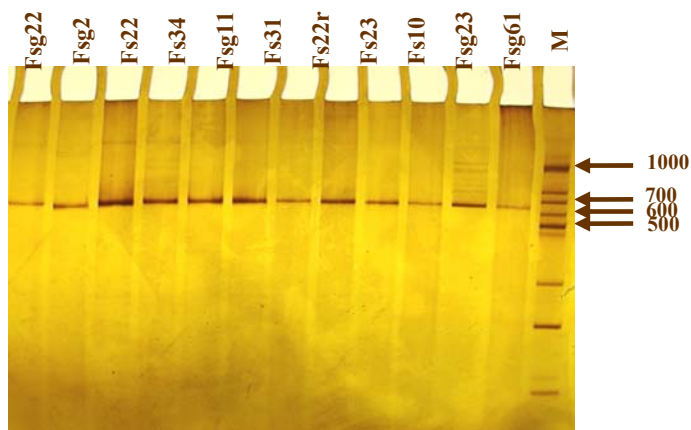
علائم بیماری در بخش‌های هوایی گیاهان آلوده به صورت خشکیدگی، پیچیدگی و قهوه‌ای شدن برگ‌ها، کاهش رشد، پژمردگی و در مواردی رزت نمایان بود. همچنین لکه‌های قهوه‌ای، چروکیدگی در محل زخم‌ها و مومیایی شدن از علائم بارز آلودگی غده‌ها بود. از مجموع خالص سازی‌های انجام شده، ۲۲ جدایه به دست آمده از بخش‌های ساقه، طوقه، ریشه و غده سیب‌زمینی براساس کلیدهای شناسایی فوزاریوم، به گونه *F. solani* تعلق داشت.

نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی: نتایج آزمون‌های آلوده‌سازی خاک و فروبردن ریشه گیاهچه در سوسپانسیون اسپور، جدایه‌های بخش‌های ریشه، طوقه و ساقه را در گروه‌های تقریباً مشابه قرار داد. علائم به صورت قهوه‌ای شدن، پیچیدگی، آویزان شدن برگ‌ها و پژمردگی دیده شد. طول نکرز آوندی در بافت ساقه در محدوده ۰/۷-۰/۵ میلی متر بود که نشان می‌دهد این بیمارگر بیشتر به ناحیه ریشه و

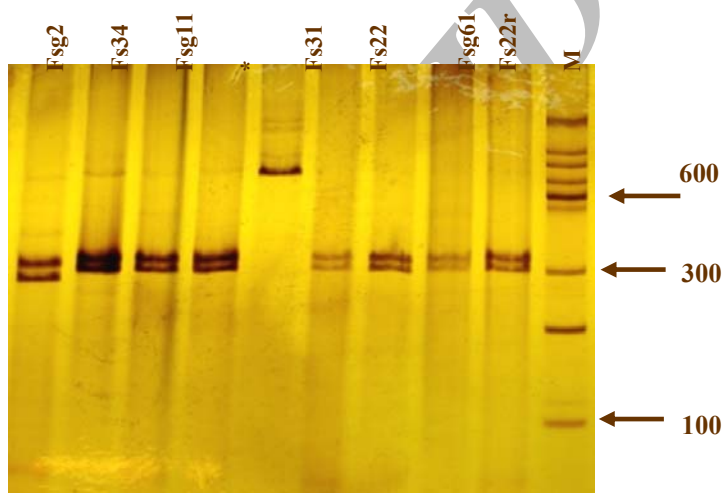
طوقه خسارت زده ولی می‌تواند بافت آوندی را مورد تهاجم قرار دهد و باعث پژمردگی آوندی شود.

در بررسی نتایج آزمون‌های مایه‌زنی غده با سوسپانسیون اسپور و مایه‌زنی غده با قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ، همه جدایه‌های مورد آزمون، پوسیدگی خشک را پس از سه هفته نشان دادند. نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی حاکی از بیماری‌زا بودن تمام جدایه‌ها در مطالعه حاضر بود.

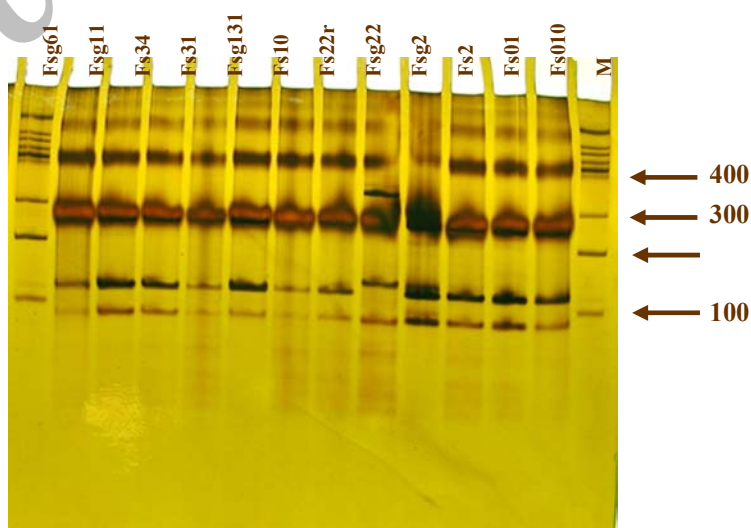
نتایج PCR-ribotyping: همان‌طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 قطعه ۶۲۰ bp در تمامی جدایه‌ها تکثیر شد و تنها در جدایه *Fsg22*، یک تک باند در محدوده ۶۰۰ bp تولید شده است. در این بررسی با توجه به نتایج تکثیر منطقه ITS، دو گروه ITS تپ ۱ و ITS تپ ۲ از هم تفکیک شدند که با نتایج ارائه شده توسط برسلیرو و همکاران (۲۰۰۴) تقریباً مطابقت دارد (شکل ۲). هر چند تمامی جدایه‌ها به استثناء جدایه *Fsg22* در ITS تپ ۱ قرار گرفتند ولی انتظار می‌رفت چند شکلی در توالی این منطقه نیز مشاهده گردد. در هضم آنزیمی جدایه‌ها با *EcoRI* جدایه‌های ITS تپ ۱، دو باند ۳۰۰ و ۳۲۰ bp تولید کردند در حالی که دو باند ۲۹۰ و ۳۱۰ bp در جدایه ITS تپ ۲، تکثیر شد (شکل ۳). تفاوت بسیار اندک در اندازه باندهای تولیدی روی ژل پلی‌اکریلامید به وضوح مشاهده می‌شود. این نتیجه با نتایج برسلیرو و همکاران (۲۰۰۴) مبنی بر تولید دو قطعه منومورفیک در محدوده ۳۱۰ bp متفاوت بود که این می‌تواند به علت تفاوت در ژنوم این جدایه‌ها باشد. همچنین در هضم آنزیمی توسط *HaeIII* جدایه‌ها ITS تپ ۱، چهار قطعه تولید نمودند که باند ۱۳۰ bp در آنها به صورت دو قطعه منومورفیک بود. این در حالی بود که در تنها عضو ITS تپ ۲، سه قطعه تولید شد (شکل ۴).



شکل ۲- الگوی بانندی جدایه‌های قارچ *Fusarium solani* حاصل از تکثیر منطقه ITS، DNA ریپوزومی با استفاده از تکنیک PCR-Ribotyping در ژل پلی‌اکریلامید ۶ درصد M: مارکر ۱۰۰bp



شکل ۳- هضم قطعات ITS تکثیر شده جدایه‌های *Fusarium solani* با آنزیم برشی *EcoRI* در ژل پلی‌اکریلامید ۶ درصد
*: قطعه تکثیر شده ITS تیپ ۱ M: مارکر ۱۰۰bp



شکل ۴- هضم قطعات ITS تکثیر شده جدایه‌های *Fusarium solani* با آنزیم برشی *HaeIII* در ژل پلی‌اکریلامید ۶ درصد

جدایه‌های ITS تپ ۱، تولید یک قطعه ۹۰ bp، دو قطعه ۱۳۰ bp و یک قطعه ۲۷۰ bp نمودند و در ارتباط با جدایه Fsg22، یک قطعه ۸۵ bp، یک قطعه ۱۵۰ bp و یک قطعه ۳۶۵ bp تولید شد. در مجموع، آنزیم برشی *HeaIII* نسبت به *EcoRI* چند شکلی را در تعداد و طول قطعات حاصل از هضم بهتر نشان داد. نتایج هضم با *HaeIII*، *HaeIII* تپ ۱ تولید سه قطعه نمود که در یک جایگاه دو قطعه منومورفیک وجود داشت و این مورد با نتایج تحقیقات برسیلیرو و همکاران (۲۰۰۴) متفاوت می‌باشد. در بررسی‌های این محققان هضم آنزیم با *HaeIII* در ارتباط با جدایه‌های ITS تپ ۱، دو قطعه تولید نمود که یک قطعه آن از دو باند منومورفیک تشکیل شده بود. در گزارش‌های ارائه شده قبلی (ادونیل، ۲۰۰۰) هضم آنزیمی با *HeaIII* با موفقیت همراه نبوده است در حالی که در مطالعه حاضر هر دو آنزیم برشی، کارایی خوبی را نشان دادند.

در بررسی روند تکامل در سطح گونه از ژن‌های DNA ریوزومی استفاده شد، که این امر به دلیل حفاظت شده بودن این مناطق می‌باشد که در تمام موجودات به جز استثنائات جزئی ثابت می‌باشند. در مطالعه‌ای که روی ۱۲ فرم تخصص یافته *F. solani* انجام گرفت، طول منطقه S 5.8 بعد از تعیین توالی در همه به‌طور یکسان ۱۲۸ bp بود، به جز *F. solani f.sp. phaseoli* که یک حذف نوکلئوتیدی را در جایگاه ۲۴ نشان می‌داد (لی و همکاران، ۲۰۰۰). این در حالی است که مناطق ITS ژن‌های DNA ریوزومی بسیار تغییرپذیر بوده، به همین دلیل برای بررسی روابط در سطح گونه استفاده می‌شوند. البته احتمال وجود تنوع در جمعیت یک گونه را نیز در منطقه ITS نباید نادیده گرفت (سموئل و شیفر، ۱۹۹۵). بررسی‌ها نشان می‌دهد که استرین‌های متعلق به دسته *Martiella* میزان بالاتری از جانشینی‌های نوکلئوتیدی را در ناحیه ITS تپ ۲، نسبت به سایر دسته‌ها نشان می‌دهند (لی و همکاران، ۲۰۰۰). استفاده از این روش در بین فرم‌های تخصص یافته متفاوت بیمارگر *F. solani* از کارایی بالاتری برخوردار است (الیورا و

همکاران، ۱۹۹۵؛ سوگا و همکاران، ۲۰۰۰)، زیرا با استفاده از الگوی هضم منطقه rDNA-ITS می‌توان فرم‌های تخصص یافته و حتی نژادهای *F. solani f. sp. cucurbitae* را تشخیص داد. همچنین تعیین توالی این منطقه بیانگر آن امر است که بیشتر کلاسترهای به‌دست آمده در تجزیه و تحلیل‌های مولکولی، شامل استرین‌های متعلق به یک فرم تخصص یافته هستند (سوگا و همکاران، ۲۰۰۰). از طرف دیگر، وجود جایگاه‌های برشی خاص در مناطق ITS برای بعضی از اندونوکلئازهای برشی، توانایی تفکیک بعضی از فرم‌های تخصص یافته را در مجموعه گونه‌ای *F. solani* مهیا ساخته است. تفکیک *F. solani f. sp. Phaseoli* جدا شده از سویا به خاطر داشتن یک جایگاه برشی در منطقه ITS تپ ۲، برای آنزیم *PstI* حاکی از این امر است (ادونیل و گری، ۱۹۹۵). بنابراین به‌نظر می‌رسد تفکیک جدایه *Fsg22* طبق جدول ۱، از نظر تولید قطعه ITS و تفاوت آن با سایر جدایه‌ها در مورد هضم با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *HaeIII* می‌تواند ناشی از حذف، اضافه شدن و یا جانشینی یک نوکلئوتید باشد که برای حصول اطمینان بایستی منطقه مورد نظر تعیین توالی شود.

بررسی میزان تأثیر فاکتور منطقه جغرافیایی در گروه‌بندی جدایه‌ها نشان می‌دهد، اگرچه این عامل از اهمیت بالایی در گروه‌بندی و جداسازی جدایه‌های مختلف قارچی برخوردار است ولی به‌نظر می‌رسد خود تحت‌الشعاع فاکتورهایی چون فشار انتخابی میزبان، دارا بودن فرم جنسی قارچ و بروز جهش‌های احتمالی باشد. از سوی دیگر، در ITS تپ ۱، جدایه‌هایی با قدرت بیماری‌زایی متفاوت جای گرفته بودند و تنها عضو ITS تپ ۲، هیچ مشخصه متمایزکننده‌ای از لحاظ قدرت بیماری‌زایی نسبت به جدایه‌های تپ اول نداشت که به‌عنوان ملاک جداسازی مد نظر قرار گیرد. بنابراین، با توجه به تحقیقات برسیلیرو و همکاران (۲۰۰۴)، و نیز نتایج مطالعه حاضر احتمال وجود تنوع در بین جدایه‌های یک جمعیت گونه‌ای وجود دارد که این به تفاوت در ژنوم این جدایه‌ها بر می‌گردد.

جدول ۱- نتایج تکثیر منطقه ITS جدایه‌های *F. solani* و هضم آن با آنزیم‌های برشی *HaeIII* و *EcoRI*

ITS-RFLP (bp)		ITS (bp)	منشاء جغرافیایی و ناحیه‌ای که قارچ از آن جدا شده	
<i>HaeIII</i>	<i>EcoRI</i>			
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	نیشابور- خراسان- ساقه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	نیشابور- خراسان- طوقه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	فریمان- خراسان- طوقه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	مشهد- خراسان- طوقه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	نیشابور- خراسان- طوقه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	چناران- خراسان- طوقه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	قوچان- خراسان- طوقه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	فریمان- خراسان- ریشه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	ترت حیدریه- خراسان- طوقه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	فریمان- خراسان- طوقه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	فریمان- خراسان- ریشه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	نیشابور- خراسان- ریشه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	نیشابور- خراسان- ریشه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	ترت حیدریه- خراسان- ریشه	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	قوچان- خراسان- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	ترت جام- خراسان- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	نیشابور- خراسان- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	نیشابور- خراسان- غده	
۳۶۵+۱۵۰+۸۵	۳۱۰+۲۹۰	۶۰۰	چناران- خراسان- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	مشهد- خراسان- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	ترت جام- خراسان- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	مشهد- خراسان- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	کوريجان- همدان- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	امیرآباد- همدان- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	فندوقلو- اردبیل- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	فندوقلو- اردبیل- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	کتالان- تهران- غده	
۲۷۰+۱۳۰(*۲)+۹۰	۳۲۰+۳۰۰	۶۲۰	سبلان- تهران- غده	

منابع

1. Abawi, G.S., and Lorbeer, J.W. 1972. Several aspects of ecology and pathology of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. Phytopathology. 62:870-876.
2. Brasileiro, B., Coimbra, M., Morais, Jr. M., and de Oliveira, N.T. 2004. Genetic variability within *Fusarium solani* species as revealed by PCR-Fingerprint based on PCR-markers. Brazilian J. Microbiol. 35: 205-210.
3. Burgess, L.S., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., and Backhouse, D. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. Third edition. 133pp.
4. Gerlach, W., and Nirenberg, H. 1982. The Genus *Fusarium*- a pictorial atlas. 409. Land-Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem: Mitt. Biol. Bundesanst.

5. Guadet, J., Julien, J., Lafay, J.F., and Yves, B. 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* 6(3): 227-242.
6. Lee, Y.M., Choi, Y.K., and Min, B.R. 2000. PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA-ITS Region in the *Fusarium* spp. *J. Microbiol.* 38(2): 66-73.
7. Lui, L.H., and Kushalappa, A.C. 2002. Response surface models to predict potato tuber infection by *Fusarium sambucinum* from duration of wetness and temperature and dry rot lesion expansion from storage time and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 19-25.
8. Mills, A.A.S., Platt, H.W., and Hurta, R.A.R. 2004. Effect of salt compounds on mycelial growth, sporulation and spore germination of various potato pathogens. *Post Harv. Biol. and Technol.* 34: 341-350.
9. Mostofee zadeh Ghalamfarsa, R., and Banihashemi, Z. 2000. Detection and pathogenicity of *Fusarium* associated with potato in western south of Fars province. *Proc. 14th Iran. Plant Prot. Cong.*
10. Nalim, F.A. 2004. Studies on molecular phylogenetics of *Fusarium* species. PhD thesis. The Pennsylvania State University. USA. 139pp.
11. Nalim, F.A., Samules, G.J., Wijesundera, R.L., and Geiser, D.M. 2003. Biogeography of the *Fusarium solani* species complex: sampling in Gondwanic regions. *Inoculum (Abstract)*. 54 (3): 36.
12. Nasr-Esfehani, M., and Mortazavi, A. 2004. Comparative susceptibility of commercial cultivars and wild clones of potato to *Fusarium* dry rot. *Plant Dis.* 40:291- 311.
13. Nelson, P.E., Tousson, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* Species, an Illustrated Manual for Identification. Penn State University Press. USA. 192pp.
14. O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92:919-938.
15. O'Donnell, K., and Gray, L.E. 1995. Phylogenetic relationship of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f.sp.*phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. *Mol. Plant-Microbe Int.* 8 (5): 709-716.
16. Oliveira, V.C., and da Costa, J.L.S. 2002. Restriction analysis of rDNA (ARDRA) can differentiate *Fusarium solani* f.sp.*phaseoli* from *F. solani* f.sp. *glycine*. *Fitopatol. Bras.* 27(6):631-634.
17. Rahkhodaei, E., Farokhinajad, R., and Banihashemi, Z. 2002. Vegetative compatibility groups of *Fusarium solani* and their pathogenicity on potato in Fars and Khozestan provinces. *Proc. 16th Iran. Plant Prot. Cong.*
18. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2th ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold spring harbor: New ork.
19. Samuels, G.J., and Seifert, K.A. 1995. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33: 37-67.
20. Schisler, D.A., Slininger, P.J., and Bothast, R.J., 1997. Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. *Phytopathol.* 87: 177-183.
21. Sharifi, R., Nasr-Esfahani, M., and Hosseini, M.R. 2000. Studies on wilting fusaria of potato in Esfahan (Frydan). *Proc. 14th Iran. Plant Prot. Cong.*
22. Suga, H., Hasegawa, T., Mitsu, H., Kageyama, K., and Hyakumachi, M. 2000. Phylogenetic analysis of phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. *Mycol. Res.* 10: 1175-1183.
23. Theron, D.J., and Holz, C. 1987. Laboratory assessment of potato tuber resistance to dry rot caused by *Fusarium solani*. *Phytophactica*.19: 521-523.
24. Theron, D.J., and Holz, G. 1991. Dry rot of potatoes caused by *Gliocladium roseum*. *Plant Pathol.* 40: 302- 305.
25. Venter, S.L., Theron, P.J., Ferreria, D.I., and Eicker, A. 1992. Relationship between vegetative compatibility and pathogenicity of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Tuberosa* from potato. *Phytopathology.* 82: 858-862.
26. Wale, S.J. 2001. Integration knowledge of soilborne pathogens to minimize disease risk in potato production. *Austral. Plant Pathol.* 33(2): 167-172.
27. Weising, K.H., Nybom, K., and Wolf, M.W. 1995. *DNA fingerprint in plants and Fungi*. CRC Press, 322 pp.

The study of probable variation in ITS- rDNA region of *Fusarium solani* in potato and its correlation with pathogenicity and geographical origin in Razavi and Northern Khorasan Provinces

S. Baghaee Ravari¹, M. Falahati Rastegar², B. Jafarpour² and F. Shokoohifar³

¹Ph.D. student of Plant pathology Tarbiat Modares University, Iran, ²Full Prof., of Dept. of Plant pathology, University of Ferdowsi, Iran, ³Instructor of plant Science Research Center, University of Ferdowsi, Iran

Abstract

Lack of adequate information regarding genotypic diversity within populations of plant pathogenic fungi is one of the most critical factors limiting breeding programs. During the growing seasons of 2003-2004, twenty two *Fusarium solani* isolates, the casual agent of wilting and dry rot of potato were obtained from fields and storages of Razavi and Northern Khorasan provinces. The pathogen city tests were carried out by soil-infestation, root-dipping, injection of spore suspension into tubers and tuber inoculation with a piece of media covered with mycelia on susceptible cultivar, Agria. In order to study the variation of the rDNA gene cluster, PCR-ribotyping was done on 22 isolates of Razavi and Northern Khorasan provinces and six isolates of Tehran, Hamadan and Ardabil provinces. Also the amplification of ITS-rDNA was subjected to digest by *EcoRI* and *HeaIII* enzymes. The results revealed that dry rot occurred by all isolates, soft rot by 28% and wilting symptoms by 76% of the total 22 isolates used in this experiment. The amplification of rDNA-ITS divided all isolates into ITS1 and ITS2 types. *HeaIII* showed the polymorphism in number and length of digested fragments better than *EcoRI*. In this study, there was no obvious evidence of any correlation between geographical origin, pathogenicity and ITS types of isolates.

Keywords: *Fusarium solani*; PCR- ribotyping; Potato