

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۲ شماره ۱، شهریور ۱۳۸۳

بررسی تنوع ژنتیکی گروه‌های سازگار رویشی قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *betae* در مزارع چغندر قند استان خراسان

با استفاده از نشانگرهای مولکولی* RAPD

RAPD analysis of genetic diversity within and among vegetative compatibility groups (VCGs) of *Fusarium oxysporum* f.sp. *betae* in sugar beet fields of Khorasan, Iran

رعنا دستجردی^۱، جواد مظفری^۲، ماهرخ فلاحتی رستگار^۱ و بهروز جعفرپور^۱

۱- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- بخش تحقیقات ژنتیک و ذخایر توارثی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

(تاریخ دریافت: ۸۲/۱۱/۱۱، تاریخ پذیرش: ۸۳/۶/۲۴)

چکیده

تنوع ژنتیکی بین گروه‌های سازگار رویشی مشاهده شده در قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *betae* عامل پژمردگی آوندی در مزارع چغندر قند استان خراسان، با استفاده از نشانگرهای مولکولی (RAPD) Random Amplified Polymorphic DNA بررسی گردید. به این منظور، ۹ جدایه بیماری‌زا به نمایندگی از ۹ گروه سازگار رویشی مختلف و هم چنین یک جدایه بیماری‌زای خود ناسازگار رویشی انتخاب شدند. واکنش‌های RAPD-PCR روی DNA استخراج شده از توده میسلیومی قارچ و با استفاده از آغازگرهای تصادفی UBC انجام گرفت. شش آغازگر، ۱۱۷ لوکوس قابل رویت را مشخص نمودند که در میان آن‌ها، ۸۳ لوکوس (۷۱٪ لوکوس‌ها) پلی‌مورفیسم خوبی را در تمام جدایه‌ها نشان دادند. الگوی

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

RAPD توانست گروه‌های سازگار رویشی مختلف را از هم تفکیک نماید. قرابت ژنتیکی جدایه‌ها بر اساس ماتریکس فاصله ژنتیکی و با استفاده از تجزیه کلاستر محاسبه گردید. همانطور که انتظار میرفت جدایه خود ناسازگار GL9 و جدایه‌های سازگار رویشی در دو گروه جداگانه اصلی قرار گرفتند. مطالعه تنوع درون گروه‌های سازگار رویشی نشان داد که در اکثر موارد اعضای یک گروه سازگار رویشی در یک کلاستر قرار می‌گیرند. این موضوع قرابت ژنتیکی بالای آن‌ها را به اثبات می‌رساند. گروه‌بندی جدایه‌ها، چهارکلاستر مجزای ژنتیکی را آشکار ساخت. اگر چه جدایه غیر بیماری‌زای GL3 به همراه جدایه‌های بیماری‌زای KR2 و N36، از 8 VCG، در یک کلاستر ژنتیکی جای گرفتند؛ اما قرابت ژنتیکی بیشتر در جدایه‌های بیماری‌زای KR2 و N36 آن‌ها را در یک کلاستر فرعی و جدا از جدایه‌های غیر بیماری‌زا طبقه‌بندی نمود. تعیین فاصله ژنتیکی چنین جدایه‌هایی، با نشانگر VCG امکان‌پذیر نمی‌باشد. نتایج تجزیه کلاستر و رسم دندروگرام نشان داد که گروه‌های سازگار رویشی در مقایسه با مناطق جغرافیایی نقش مهمتری را در ایجاد پلی مورفیسم بر عهده داشته‌اند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، *Fusarium oxysporum*، چغندر قند، مارکرهای مولکولی، RAPD، بیماری‌های گیاهی

مقدمه

قارچ *Fusarium oxysporum* Schltdl. : Fr. فرم غیر جنسی یک بیمارگر گیاهی خاک‌زاد از گروه آسکومیست‌های رشته‌ای است (Booth 1971). این قارچ‌ها از نظر اقتصادی اهمیت ویژه‌ای دارند، زیرا اغلب آن‌ها سبب پژمردگی آوندی و یا پوسیدگی ریشه در محصولات زراعی و باغی می‌شوند (Woo et al., 1998). بیماری زردی فوزاریومی یا پژمردگی آوندی چغندر قند، اولین بار در ایالت کلرادو آمریکا و توسط Stewart (1931) گزارش شد. وی این بیماری را در چغندر قندهای کشت شده و مزارع بدری مشاهده نمود ولی اشاره‌ای به علائم خارجی ریشه نکرد. Stewart عامل بیماری را قارچ *Fusarium conglutinans* var. *betae* معرفی کرد. عامل بیماری بعدها به *Fusarium oxysporum* f.sp. *betae* (FOB) تغییر نام یافت و با علائم کلروز بین رگبری، پژمردگی و نکروز آوندی توصیف شد (Rush & Martyn 1991). این

بیماری هم اکنون از سراسر مناطق تولید چغندر قند در غرب ایالات متحده، بلژیک، هلند، آلمان، هند و ایران گزارش شده است (Whitney & Duffus 1986). در ایران این بیماری اولین بار در سال ۱۳۴۸ توسط بهداد از اصفهان گزارش شد (Abbasimoghadam 1997). بنابر گزارش عباسی مقدم (۱۳۷۶) این بیماری در تمام مناطق چغندرکاری خراسان بصورت پراکنده و لکه‌ای مشاهده شده است. طی نمونه برداری‌های سال‌های ۷۴ و ۷۵، *Fusarium* spp. با ۳/۳۹ درصد آلودگی، مقام سوم را در بین قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه چغندرقند در استان خراسان دارا بوده است. وی بیشترین میزان آلودگی به قارچ *F. oxysporum*، عامل پژمردگی آوندی چغندرقند را در شهرستان سبزوار (۱۶ درصد) و کمترین آلودگی را در شهرستان قوچان (یک درصد) گزارش نموده است.

برای اعمال روش‌های صحیح و مؤثر مدیریتی در کنترل بیماری پژمردگی آوندی چغندرقند، بررسی تنوع ژنتیکی و شناخت دینامیک جمعیت این بیمارگر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. زیرا فوزاریوم‌ها از جمله قارچ‌هایی هستند که علیرغم نداشتن تولیدمثل جنسی، از نظر ژنتیکی بسیار ناپایدار بوده و بارها مشاهده شده که این قارچ‌ها در محیط کشت آزمایشگاهی سکتورهایی ایجاد می‌کنند که با کلنی مادری از نظر مورفولوژیک، بیماری‌زایی، و دیگر خصوصیات متفاوت می‌باشند (Apple & Gordon, 1994, Burnett, 1984).

گروه‌بندی جدایه‌ها به گروه‌های سازگار رویشی ابزار تشخیصی مفیدی را برای بررسی تنوع ژنتیکی برخی از قارچ‌ها مانند *F. oxysporum* فراهم کرده است. اما همانند نشانگرهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی، این روش نیز دارای محدودیت‌هایی می‌باشد (Bentley et al., 1994). به این ترتیب اگر چه شناسایی و تفکیک جدایه‌ها و به دنبال آن بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت بیمارگر، از روش‌های مختلف قابل ارزیابی است، لیکن زمانی که صفات مورد بررسی به دلیل حساسیت به شرایط محیطی تغییرپذیری زیادی دارند، از نشانگرهای مولکولی که بدلیل بررسی مستقیم تنوع در سطح ژنوم تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نگرفته و از دقت بالاتری برخوردارند، استفاده می‌شود (Weising et al., 1991). بعلاوه بر خلاف نشانگرهای مورفولوژیک و آیزوایم‌ها، تعداد نشانگرهای DNA تقریباً نامحدود بوده و بیان آن‌ها برای تشخیص پلی‌مورفیسم مورد نیاز نمی‌باشد (Soller & Beckman, 1983). اساس کلیه این روش‌ها بر تکثیر DNA ی هدف پس از اتصال با آغازگر در شرایط آزمایشگاه (*in vitro*)

استوار است. با این تفاوت که توالی، طول و تعداد آغازگرها در این روش‌ها با هم متفاوت می‌باشد (Weising et al., 1991). در این میان نشانگرهای RAPD به طور گسترده‌ای برای ارزیابی تنوع جمعیت‌های قارچی در سطح گونه، درون گونه، نژاد، جدایه و نیز بررسی تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های یک گونه، تهیه نقشه‌های ژنومی و تشخیص مولکولی بسیاری از گونه‌های قارچی مورد استفاده قرار گرفته است. ارتباط بین نشانگرهای RAPD و VCGs در ارزیابی روابط ژنتیکی بین گروه‌های سازگار رویشی بعضی از قارچ‌ها نیز گزارش شده است (Lewinsohn et al., 2001, Woo et al., 1998, Xia & Achar 2001). برای مثال Woo و همکاران در سال 1996، در تحقیق خود روی قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* نشان دادند که بین الگوی باندهای RAPD یا RFLP با VCG رابطه‌ای وجود دارد. برای مثال در بررسی آن‌ها جدایه‌هایی که در یک VCG قرار نگرفته بودند، در آزمایش‌های RAPD یا RFLP نیز الگوی باندهای یکسان و مشابهی را ایجاد نکردند.

این تحقیق نیز با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی بین گروه‌های سازگار رویشی مختلف و نیز بین جدایه‌های هر گروه سازگار رویشی قارچ FOB در استان خراسان انجام گرفت.

روش بررسی

جدایه‌های قارچی

از مجموع ۳۱ جدایه قارچ *F. oxysporum* f.sp. *betae* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی استان خراسان، که در ۱۹ گروه سازگار رویشی طبقه‌بندی شده بودند (Dastjerdi 2002)، ۱۵ جدایه از ۹ گروه سازگار رویشی مختلف و یک جدایه خود ناسازگار رویشی به عنوان نماینده انتخاب شدند (جدول ۱).

نمونه‌های مورد مطالعه در شرایط سترون و در لوله‌های ۵۰ میلی لیتری (که حدوداً حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط مایع Potato Dextrose Broth (PDB) بودند) و یا در ظروف پتری ۹ سانتی متری محتوی محیط کشت مایع PDB کشت داده شدند. کشت‌ها برای ۴-۶ روز در حرارت اتاق و با سرعت ۸۸ دور در دقیقه روی همزن قرار گرفتند. سپس میسیلیوم رشد یافته برای جداسازی و استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های مورد مطالعه از گروه‌های سازگار رویشی مختلف

Table 1. Characteristics of selected isolates from different VCGs

نام جدایه (Isolate)	محل جمع آوری (Place of collection)	بیماری‌زایی (Pathogenicity)	گروه سازگار رویشی (VCG)
CH29	چناران	+	VCG 1
CH24	چناران	+	VCG 1
SB8	سبزوار	+	VCG 3
SB13	سبزوار	+	VCG 3
GO10	جوین	+	VCG 6
GO21	جوین	+	VCG 6
N36	نیشابور	+	VCG 8
KR2	کریم آباد نیشابور	+	VCG 8
CL3	جلگه رخ	-	VCG 8
AS9	مزارع آستان قدس مشهد	+	VCG 9
B16	بجنورد	+	VCG 11
FA6	فریمان	+	VCG 14
CH17	چناران	+	VCG 14
SH3	شیروان	+	VCG 15
GH35	قوچان	+	VCG 19
CL9 *	جلگه رخ	+	-

+ = Pathogenic

+ نشانگر بیماری‌زا بودن جدایه است.

- = Non Pathogenic

- نشانگر غیربیماری‌زا بودن جدایه است.

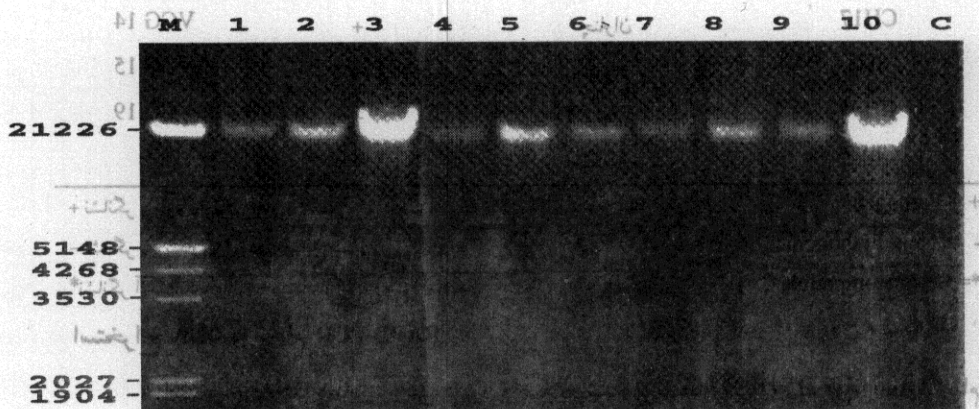
* = Self incompatible

* نشانگر آنست که جدایه خود ناسازگار رویشی است.

استخراج DNA و انجام RAPD-PCR

استخراج DNA مطابق روش CTAB اصلاح شده توسط (Adopa et al., 1998) انجام شد. به این منظور پس از جدا کردن میسلیوم آماده قارچ از محیط کشت مایع PDB، ۲-۱ گرم بافت قارچی به همراه ازت مایع در یک هاون سرد به خوبی پودر گردید. سپس به هر تیوب، ۲ ml بافر استخراج (۱ M Tris - HCl, ۵ M NaCl, ۰/۵ M EDTA, ddH₂O) افزوده و پس از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۲۵ درصد SDS، تیوب‌ها به مدت یک ساعت بر روی همزن

در حرارت اتاق قرار گرفتند. با سپری شدن این زمان، به هر تیوب ۲۶۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl اضافه نموده و تیوب‌ها در حرارت ۶۵ °C به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه انکوبه شدند. در این مرحله با اضافه کردن کلروفرم - ایزوآمیل الکل به هر تیوب، سوسپانسیون شیری رنگی به دست آمد. این سوسپانسیون به مدت ۱۲ دقیقه و با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. به منظور رسوب نوکلئیک اسید با استفاده از ایزوپروپانول سرد، فازروبی (supernatant) حاصل، مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از حذف محلول فوقانی، رسوب DNA با استفاده از اتانول ۷۰ درصد شستشو و پس از خشک شدن در ۳ میلی لیتر بافر TE (۱M Tris - HCl, ۵ M NaCl, ۰/۵M EDTA, ddH₂O) حل شد. تیوب‌ها به مدت یک شب در درجه حرارت ۴°C قرار گرفتند. پس از آن رسوب مجدد DNA با استفاده از استات سدیم و اتانول ۹۵ درصد سرد انجام گرفت. رسوب نهایی DNA در ۴۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شده و به مدت یک دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. بافر حاوی DNA به تیوب‌های ۱/۵ml منتقل و در درجه حرارت ۴°C نگهداری گردید. کیفیت و یکپارچگی DNA استخراج شده، با استفاده از اسپکتروفوتومتر و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸٪ بررسی گردید (شکل ۱).



شکل ۱- کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸٪ ستون M، سایز مارکر وستون‌های ۱-۱۰ به ترتیب: GH35, SB8, FA6, N36, CH29, B16, AS9, SH3, GO10, GL9 و ستون C شاهد منفی ژل.

Fig. 1. Quality of extracted DNA on a 0.8 % agarose gel. Lane M, size marker and Lanes 1-10: GH35, SB8, FA6, N36, CH29, B16, AS9, SH3, GO10, GL9 and lane C, negative control.

واکنش های ۲۵ میکرولیتری RAPD-PCR با استفاده از آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی از سری آغازگرهای تصادفی دریافت شده از دانشگاه بریتیش کلمبیای کانادا (UBC) و مواد خریداری شده از سیناژن تهیه گردید. هر واکنش شامل: $1/5 \text{ mM MgCl}_2$, $0/2 \text{ mM dNTPs}$, $4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ Genomic DNA, $5 \mu\text{l}$ Primer, 2 u Taq Polymerase میکرولیتر روغن معدنی سترون، در دستگاه PCR (TECHNE Genius Thermocycler) قرار گرفتند. واکنش PCR با یک سیکل آغازین در درجه حرارت 94°C به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل متوالی (94°C به مدت ۳۰ ثانیه، 35°C به مدت ۱ دقیقه، 72°C به مدت ۳ دقیقه) و سپس یک سیکل در درجه حرارت 72°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مقدار $10 \mu\text{l}$ از محصولات RAPD به همراه $2 \mu\text{l}$ بافر بارگذاری $6\times$ روی ژل آگارز $1/5$ درصد الکتروفورز شدند. از نشانگر اندازه EcoRI digest، Lambda DNA/HinDIII به عنوان نشانگر وزن مولکولی استاندارد استفاده شد. عمل الکتروفورز با شدت جریان ثابت و ولتاژ $75 \text{ V}/\text{cm}$ به مدت $2/5$ ساعت انجام گرفت. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید ($0/5 \text{ mg}/\text{L}$)، رنگ زدایی توسط آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه انجام و در نهایت ژل در دستگاه Gel Documentation System مورد مطالعه و عکس برداری قرار گرفت. به منظور اطمینان از تکرارپذیری نتایج، واکنش های RAPD-PCR دو بار تکرار شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها

تصاویر تهیه شده از ژل های الکتروفورز DNA که در آن قطعات تکثیر یافته توسط هر آغازگر بصورت باندهایی از هم تفکیک شده بودند، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. هر باند به عنوان یک لوکوس با دو آلل (حضور باند (۱) و عدم حضور باند (۰)) در نظر گرفته شد (Lewinsohn *et al.*, 2001). بررسی حضور یا عدم حضور باندها، به وسیله بازخوانی تصاویر کامپیوتری ژل ها در برنامه Photocapt MW انجام شد. طبق نتایج Gang & Weber (1996)، در این بررسی نیز کلیه باندها، اعم از ضعیف و یا قوی و قابل دیدن، برای تجزیه و تحلیل آماری در نظر گرفته شدند و باندهای غیر واضح (diffused) که در برخی از ژل ها مشاهده می شدند، در نمره گذاری وارد نشدند. ماتریکس تشابه بر مبنای ضریب تشابه Nie (1978) محاسبه گردید. برای بررسی تنوع بین افراد، ماتریکس تشابه به ماتریکس فاصله

ژنتیکی تبدیل و تجزیه کلاستر بر اساس تکنیک مراتبی و با استفاده از مدل تجمیع در نرم‌افزار کامپیوتری STATISTICA (Version 5) انجام گرفت. نتایج تجزیه کلاستر در یک دندروگرام خلاصه شد. برای رسم دندروگرام از روش میانگین حسابی غیر وزنی (UPGMA) استفاده گردید.

نتیجه و بحث

از مجموع ۵۴ آغازگر مورد استفاده، شش آغازگر تصادفی منجر به تکثیر ۱۱۷ لوکوس قابل رویت شدند که در بین آن‌ها ۸۳ لوکوس (۷۱٪ لوکوس‌ها) در تمام جدایه‌ها پلی مورفیسم خوبی را نشان دادند. تعداد قطعات پلی مورفیک تولید شده با هر آغازگر و در هر جدایه ۱-۱۶ عدد و دامنه اندازه قطعات تکثیر شده ۰/۱-۳/۵ kb بود (شکل ۲ و جدول ۲). دو آغازگر UBC 6 و UBC 195 هیچگونه پلی مورفیسمی ایجاد نکردند. بعلاوه برخی از آغازگرها حتی در دمای پایین اتصال، قادر به تکثیر DNA ژنومی نبودند. در واکنش‌های PCR شاهد منفی، نیز هیچ باندهی مشاهده نگردید.

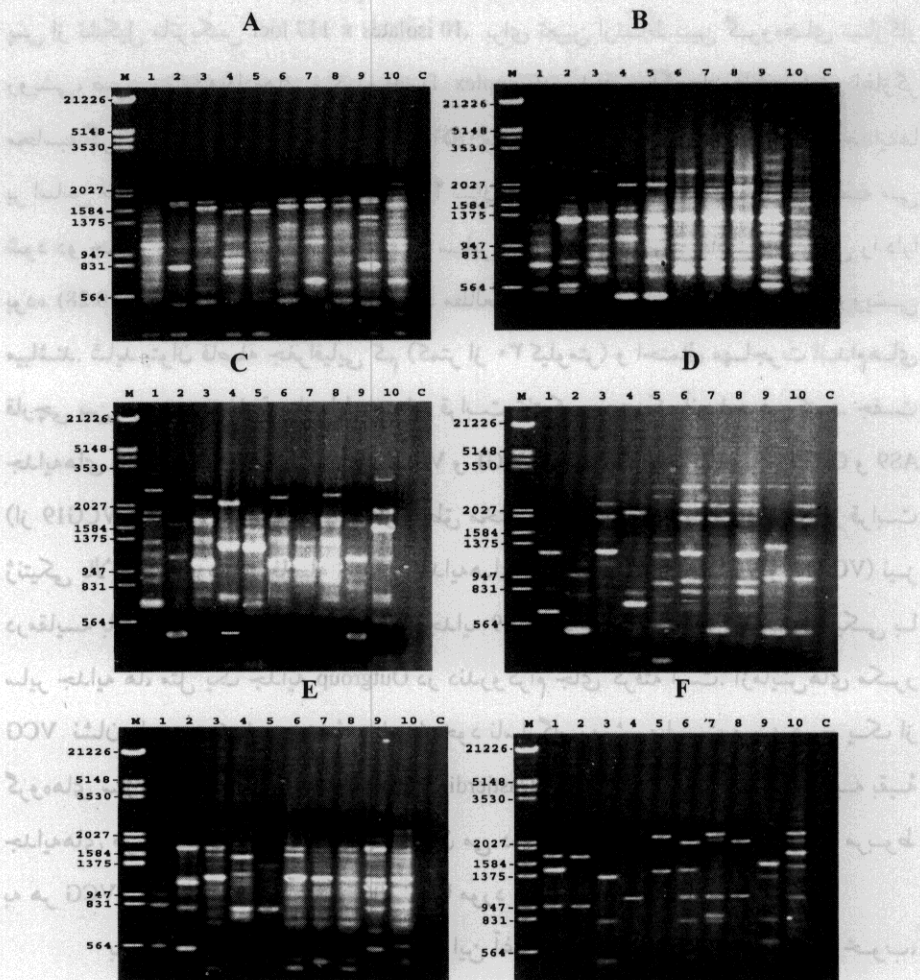
جدول ۲- مشخصات آغازگرهای استفاده شده برای انجام RAPD

Table 2. Characteristics of primers used for RAPD analysis

آغازگر	توالی آغازگر	تعداد باند تکثیر شده	تعداد باند پلی مورفیک	دامنه طول باندهای ارزیابی شده (bp)
(Primer) ^a	(Primer sequence)	(No. of fragments produced)	(No. of Polymorphic fragments)	(size range of scorable bands)
UBC 82	5'- GGG CCC GAG G-3'	19	14	1000-2000
UBC 83	5'- GGG CTC GTG G-3'	18	16	400-2500
UBC 106	5'- GGT CTG CCC G-3'	24	15	100-3000
UBC 222	5'- AAG CCT CCC C-3'	22	14	500-3500
UBC 228	5'- GCT GGG CCG A-3'	17	11	500-3400
UBC 300	5'- GGC TAG GGC G-3'	17	12	200-2800
Total	-	117	83	-

a. گروه آغازگرهای دانشگاه بریتیش کلمبیای کانادا

a : UBC, primer set of University of British Columbia, Vancouver, Canada

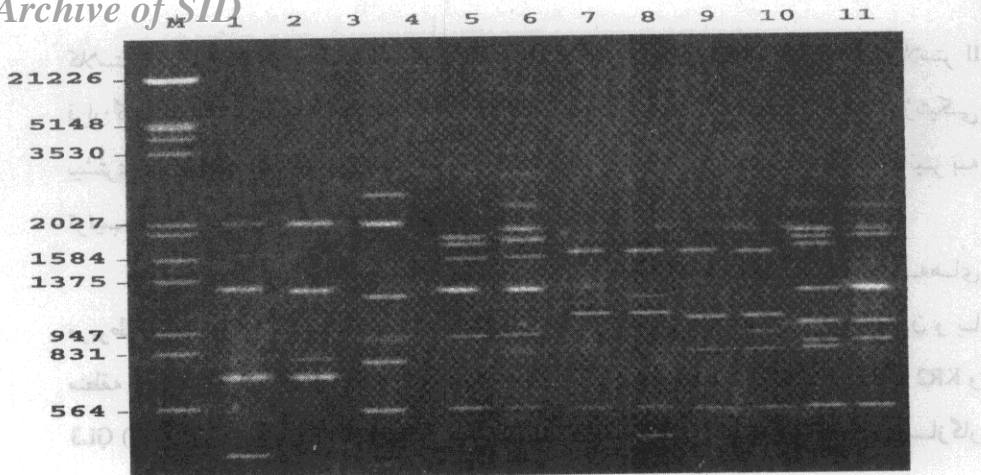


شکل ۲- مقایسه پلی مورفیسم RAPD بین گروه‌های سازگار رویشی با استفاده از آغازگرهای تصادفی روی ژل آگارز ۱.۵٪. A: آغازگر UBC 82، B: آغازگر UBC 83، C: آغازگر UBC 106، D: آغازگر UBC 222، E: آغازگر UBC 228، F: آغازگر UBC 300. ستون M، سایز مارکر و ستون‌های ۱-۱۰ به ترتیب: GH35(VCG19)، SB8(VCG3)، FA6(VCG14)، N36(VCG8)، CH29(VCG1)، B16(VCG11)، AS9(VCG9)، H3(VCG15)، GO10(VCG6)، GI9 (Self incompatible) و ستون C شاهد منفی.

Fig.2. Comparison of RAPD polymorphism among VCGs produced by UBC random primers on 1.5 % agarose gel. A; primer UBC 82, B; primer UBC 83, C; primer UBC 106, D; primer UBC 222, E; primer UBC 228, F; primer UBC 300. Lane M, size marker and lanes 1-10: GH35(VCG19), SB8(VCG3), FA6(VCG14), N36(VCG8), CH29(VCG1), B16(VCG11), AS9(VCG9), H3(VCG15), GO10(VCG6), GI9 (Self incompatible) and lane C, negative control.

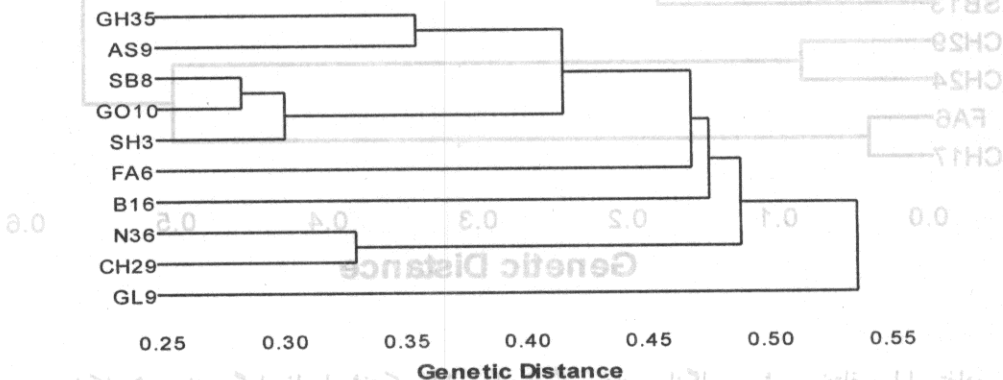
پس از تشکیل ماتریکس 10 isolates × 117 loci، برای تعیین ارتباط بین گروه‌های سازگار رویشی، ضریب تشابه داده‌های ترکیب (Complex Data) بر اساس الگوهای بانندی شش آغازگر محاسبه گردید. دامنه ضریب تشابه، 0/75 - 0/51 بود (جدول ۳). میزان قرابت ژنتیکی جدایه‌ها بر اساس ماتریکس فاصله ژنتیکی در شکل ۴ نشان داده شده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود دو جدایه SB8 و GO10 در مقایسه با سایر جدایه‌ها، کمترین فاصله ژنتیکی را دارا بوده (D=0.28) و لذا در بین VCG های مورد مطالعه شبیه ترین گروه‌های سازگار رویشی میباشند. شاید بتوان فاصله جغرافیایی کم (کمتر از ۳۰ کیلومتر) و احتمال مهاجرت اندام‌های قارچی بین دو جمعیت فوق را، دلیلی برای قرابت ژنتیکی نزدیک آنها معرفی کرد. جفت جدایه‌های N36 و CH29 (به ترتیب از VCG8 و VCG1) و همچنین جدایه‌های GH35 و AS9 (از VCG19 و VCG9) علیرغم آن که از مناطق مختلف جمع آوری شده‌اند، لیکن از قرابت ژنتیکی بالایی برخوردارند. فاصله ژنتیکی جدایه‌های FA6 و B16 (از VCG14 و VCG11) نیز درمقایسه با دیگر گروه‌ها تقریباً زیاد است. جدایه GL9 با داشتن بیشترین فاصله ژنتیکی با سایر جدایه‌ها، مثل یک جدایه Outgroup در دندروگرام جای گرفته است. آزمایش‌های مکرر VCG نشان داده بود که این جدایه بیماریزا، خود ناسازگار رویشی است و به هیچ یک از گروه‌های سازگار رویشی تعلق ندارد (Dastjerdi 2002). از این رو این جدایه نسبت به بقیه جدایه‌های مورد مطالعه، تفرق بیشتری را نشان می‌دهد. تشابه ژنتیکی بین جدایه‌های مربوط به هر VCG نیز، با استفاده از آغازگر UBC 106 مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳).

باندهای پلی مورفیک تکثیر شده با این آغازگر ضمن داشتن وضوح بانندی خوب، نسبت به سایر آغازگرها از نظر اندازه قطعات تکثیر یافته نیز از دامنه گسترده‌تری برخوردار بودند. این آغازگر شرایط بررسی پلی مورفیسم را بهتر فراهم می‌نمود. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در اکثر موارد اعضای یک گروه سازگار رویشی الگوی بانندی مشابهی دارند. محاسبه ضریب تشابه نیز نشان داد که جدایه‌های مربوط به یک VCG، از ضریب تشابه بالاتری نسبت به جدایه‌های گروه‌های مختلف برخوردارند (جدول ۴). در تمام موارد مورد مطالعه، میزان تشابه جفت جدایه‌های یک گروه سازگار رویشی بیش از ۸۳٪ بود. گروه‌بندی جدایه‌ها در فاصله ژنتیکی 0/۴، چهار کلاستر معزای ژنتیکی را نمایان ساخت (شکل ۵).



شکل ۳- مقایسه پلی مورفیسم RAPD درون گروه‌های سازگار رویشی با استفاده از آغازگر تصادفی UBC 106 روی ژل آگارز ۱/۵٪. ستون M، سایز مارکر و ستون‌های ۱-۱۱ به ترتیب: N36، KR2، GL3 (VCG8)، CH29 و CH24 (VCG1)، SB8 و SB13 (VCG3)، GO10 و GO21 (VCG6)، FA6 و CH17 (VCG14).

Fig.3. Comparison of RAPD polymorphism within VCGs, produced by random primer UBC 106 on 1.5 % agarose gel. Lane M, size marker and Lanes 1-11: N36, KR2 and GL3 (VCG8), CH29 and CH24 (VCG1), SB8 and SB13 (VCG3), GO10 and GO21 (VCG6), FA6 and CH17 (VCG14).

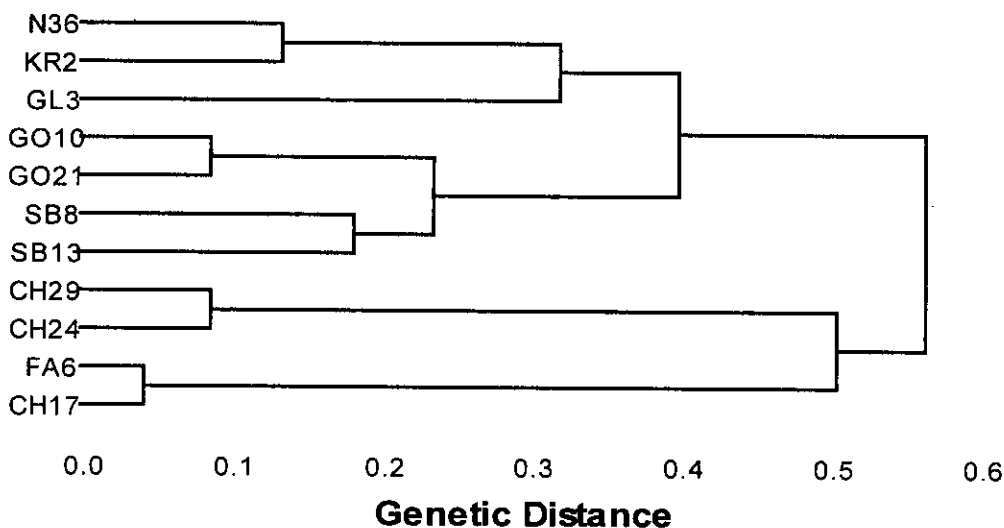


شکل ۴- دنداروگرام حاصل از داده های ترکیبی ۶ آغازگر، نمایانگر میزان فواصل ژنتیکی در ۹ گروه سازگار رویشی مختلف.

Fig. 4. Dendrogram showing genetic distance between 9 different VCGs using complex data of six primers.

کلاستر I شامل سه جدایه مربوط به VCG 8 می باشد. گروه های VCG 6 و VCG 3 در کلاستر II قرار گرفتند. این موضوع نشان داد که این دو گروه سازگار رویشی به مراتب از قرابت ژنتیکی بیشتری در مقایسه با سایر VCG های مورد مطالعه برخوردارند. کلاسترهای III و IV نیز به ترتیب شامل اعضای VCG 1 و VCG 14 می باشند.

بررسی الگوی بانندی DNA حاصل از نشانگرهای RAPD نشان داد که جدایه های مربوط به یک VCG، تقریباً الگوی بانندی یکسانی داشته و صرف نظر از بیماری زا بودن و یا منطقه جغرافیایی، ارتباط نزدیکی با یکدیگر داشتند، به گونه ای که جدایه های N36، KR2 و GL3 (VCG 8) در یک کلاستر ژنتیکی جای گرفتند. مطالعه الگوی بانندی در این گروه سازگار رویشی نشان داد که جدایه GL3 از این گروه دارای باندهایی است که در سایر اعضای این VCG وجود ندارد.



شکل ۵ - دندروگرام فاصله ژنتیکی ۱۱ جدایه از گروه های سازگار رویشی مختلف با استفاده از آغازگر UBC 106 .

Fig. 5. Dendrogram showing genetic distance among 11 isolates, from different VCG_s using UBC 106 primer.

جدول ۳- تشابه ژنتیکی بین جدایه‌های انتخابی از گروه‌های سازگار

Table 3. Genetic similarity among isolates representing different VCGs

Isolates	VCG	19	9	14	8	1	3	6	15	11
GH35	19									
AS9	9	0.70								
FA6	14	0.62	0.65							
N36	8	0.62	0.68	0.64						
CH29	1	0.62	0.71	0.53	0.72					
SB8	3	0.64	0.67	0.64	0.56	0.60				
GO10	6	0.63	0.68	0.60	0.58	0.68	0.75			
SH3	15	0.63	0.71	0.62	0.56	0.62	0.75	0.73		
BI6	11	0.61	0.70	0.61	0.62	0.58	0.66	0.62	0.55	
GL9	-	0.64	0.63	0.54	0.61	0.51	0.56	0.62	0.56	0.61

جدول ۴- تشابه ژنتیکی دو به دو جدایه‌ها (داخل و مابین گروه‌های سازگار رویشی)

Table 4. Genetic similarity among isolates (within and among VCGs)

ردیف	Isolates	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	N36										
2	KR2	0.88									
3	CH29	0.54	0.50								
4	CH24	0.54	0.50	0.92							
5	FA6	0.58	0.58	0.58	0.58						
6	CH17	0.54	0.54	0.63	0.63	0.96					
7	GO10	0.58	0.70	0.63	0.63	0.71	0.75				
8	GO21	0.58	0.71	0.54	0.63	0.63	0.67	0.92			
9	SB8	0.63	0.63	0.46	0.54	0.54	0.58	0.75	0.83		
10	GL3	0.67	0.79	0.46	0.54	0.54	0.58	0.67	0.75	0.67	
11	SB13	0.71	0.71	0.54	0.63	0.54	0.58	0.75	0.83	0.83	0.75

هم چنین جدایه مذکور فاقد برخی باندهای مشاهده شده در اعضای هم گروه خود می باشد. باید اشاره نمود که اگر چه این تنوع در الگوی باندهای DNA یک جدایه، خصوصیتی است که از یک آغازگر به آغازگر دیگر متفاوت است، اما می تواند به میزان زیادی نمایانگر

تنوع جدایه‌های درون یک گروه باشد. در این گروه (VCG 8)، جدایه‌های بیماریزای N36 و KR2 از یک منطقه جغرافیایی (نیشابور) جمع‌آوری شدند، در حالی که جدایه CL3 غیر بیماری‌زا بوده و مربوط به منطقه جلگه رخ (ترت حیدریه) می‌باشد. عدم بیماری‌زایی GL3 می‌تواند دلیلی برای تنوع درون گروهی VCG 8 باشد. باید توجه کرد که ژن‌های بیماری‌زایی تحت تاثیر فشار انتخابی میزان قرار می‌گیرند. از این رو جهش در لوکوس بیماری‌زایی می‌تواند سبب تغییر در بیماری‌زایی جدایه گردد (Elias et al., & Schneider, 1991). به این ترتیب در برخی موارد مطابق نتایج (Elmer & Stephens (1989)، ممکن است توان بیماری‌زایی یک جدایه از بین رفته در حالی که لوکوس سازگاری رویشی آن باقی مانده باشد. لذا جدایه‌های غیر بیماری‌زایی حاصل می‌شوند که از نظر ژنتیکی ارتباط نزدیکی با جدایه‌های بیماری‌زا دارند. این موضوع یکی از دلایل برتری روش‌های مولکولی بر تکنیک‌های دیگر مثل VCG را نشان می‌دهد. VCG اگر چه ابزاری نیرومند و شاخصی مفید از تشابه ژنتیکی بین اعضای یک گروه سازگار رویشی است، اما میزان تشابه بین افراد گروه‌های مختلف و یا افراد داخل یک VCG را مشخص نمی‌کند (Woo et al., 1998). در حالی که مارکرهای مولکولی نظیر RAPD و RFLP، نه تنها قادر به شناسایی ارتباطات درون و بین گونه‌ای بوده، بلکه می‌توانند تنوع درون و بین گروه‌های داخل یک گونه را نیز نشان دهند (Woo et al., 1996).

قرار گرفتن گروه‌های VCG 6 و VCG 3 (از مناطق جوین و سبزوار) در یک کلاستر ژنتیکی، نشانگر خویشاوندی نزدیک این دو گروه می‌باشد (شکل ۵). به نظر می‌رسد فاصله جغرافیایی کوتاه بین دو منطقه، شانس توزیع مواد ژنتیکی مشترک را افزایش داده و لذا ظاهراً فاصله ژنتیکی در ارتباط مستقیم با فاصله جغرافیایی بوده است. اما فاصله ژنتیکی نمایندگان این دو گروه سازگار رویشی با نماینده VCG15 (از منطقه شیروان در شمال شرق شهرستان سبزوار) نیز بسیار اندک می‌باشد (شکل ۴). هر چند محل جغرافیایی جمع‌آوری این جدایه‌ها متفاوت است، اما جدایه‌های مذکور اغلب الگوی DNA مشابهی را با آغازگرهای مورد استفاده نشان دادند. این احتمال وجود دارد که نمایندگان این گروه‌ها از یک منبع مشترک منشا گرفته و از نظر ژنتیکی مشابه باشند. یک احتمال دیگر برای مشاهده تنوع ژنتیکی اندک بین گروه‌های فوق، وجود جدایه‌های ارتباط دهنده یا تلاقی‌پذیر (Bridging Group Isolates or Cross Compatible Isolates (BGI)) در داخل آن‌هاست. این چنین

جدایه‌هایی قادر به تشکیل هتروکاریون با NitM جدایهٔ آزمون (Tester) (که نمایندهٔ هر دو VCG می‌باشد) هستند (Bentley et al., 1998). در تحقیقات خود نشان دادند که فقط یک جهش در یک لوکوس ناسازگاری رویشی (Vic) سبب می‌شود تا جدایه‌های نزدیک به هم ناسازگار رویشی شوند و به این ترتیب جدایه‌های وابسته به یک والد، در VCG‌های مختلف قرار گیرند. آنها توانستند الگوی بانندی یکسانی را برای چندین VCG مختلف (مثلاً VCG 0120 و VCG 1215 در موز) با استفاده از چند آغازگر بدست آورند. حتی در برخی موارد، مثلاً VCG 01213 و VCG 01216 با تمام آغازگرهای تصادفی الگوی انگشت نگاری یکسانی را ایجاد کردند. آن‌ها پیشنهاد کردند که چنین گروه‌هایی احتمالاً زنوتیپ مشابه دارند.

(Lewinsohn et al., 2001) در بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *Pleurotus eryngii*، نشان دادند که علاوه بر فاصله جغرافیایی، عوامل اکولوژیک نیز روی تنوع جمعیت قارچ موثرند. در این تحقیق نیز به نظر می‌رسد عوامل اکولوژیک نقش فاصله جغرافیایی را تحت تاثیر قرار داده و سبب خویشاوندی برخی جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف مثل جدایه N36 با CH29، و همینطور جدایه‌های GO10 و SB8 با SH3 و جدایه FA6 با B16 شده است. قرارگرفتن جدایهٔ خسود ناسازگار رویشی GL9 در یک گروه کاملاً جداگانه (شکل ۴)، فاصلهٔ خویشاوندی زیاد این جدایه را با سایر جدایه‌های مورد مطالعه به اثبات می‌رساند. باید اشاره کرد که VCG قابلیت بررسی ارتباط ژنتیکی بین جدایه‌های خود ناسازگار رویشی و یا توانایی تعیین میزان خویشاوندی بین این جدایه‌ها را با جدایه‌های سازگار رویشی ندارد (Woo et al., 1996).

قرار گرفتن جدایه‌های مربوط به یک گروه سازگار رویشی، جمع‌آوری شده از دو یا چند منطقه جغرافیایی مختلف در یک کلاستر ژنتیکی، نشان می‌دهد که گروه‌های سازگار رویشی در مقایسه با مناطق جغرافیایی نقش مهمتری در تبیین پلی مورفیسم بر عهده داشته‌اند. برای مثال جدایه‌های FA6 و CH17 از VCG14 و یا جدایه‌های مربوط به VCG8 علی‌رغم آنکه از مناطق جغرافیایی مختلف جمع‌آوری شده‌اند، اما در مقایسه با اعضای سایر گروه‌ها (که از یک منطقه می‌باشند) کمترین فاصله ژنتیکی را دارا می‌باشند. همچنین جدایه‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه جغرافیایی (مثل چناران)، در VCG‌های مختلف (مثلاً VCG1 و VCG14) قرار گرفته و کلاسترهای مجزای ژنتیکی را نیز شکل دادند.

روابط بین گروه‌های سازگار رویشی که توسط الگوی بانندی به دست آمد با گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس رفتار VCG مرتبط بود. مشاهده باندهای DNA مشترک بین دو جدایه مربوط به یک گروه سازگار رویشی، نشانگر وجود همولوژی ژنتیکی زیاد بین آنهاست. بنابراین کلاسترهای مختلف احتمالاً نماینده اجداد مختلف می‌باشند (Woo *et al.*, 1996, Duncan *et al.*, 1993). تطابق نتایج بدست آمده از آزمایشات RAPD-PCR با VCG نشان می‌دهد که نشانگرهای RAPD روشی مناسب برای تعیین تنوع ژنتیکی در جمعیت FOB می‌باشد، لذا با توجه به محدودیت‌ها و برخی از معایب کاربرد VCG، استفاده از دیگر صفات تنوع ژنتیکی نظیر نشانگرهای RAPD، چشم‌انداز نوینی را برای ارزیابی ارتباطات ژنتیکی در قارچ‌ها فراهم می‌سازد. با این همه باید اشاره کرد که اگر چه نشانگرهای مولکولی ابزاری مفید برای اهداف تاکسونومیک می‌باشند، اما کاربرد آنها در تلفیق با دیگر شاخص‌های بیولوژیک مثل بیماری‌زایی و یا ژنتیک مثل VCG بررسی مطمئن‌تری را در مقایسات مختلف، ارائه خواهد داد (Woo *et al.*, 1998).

گونه‌هایی از فوزاریوم که دارای چرخه جنسی می‌باشند، گروه‌های سازگار رویشی بیشتری داشته و تنوع ژنتیکی در جمعیت آنها نسبت به قارچ‌هایی که فاقد فرم جنسی‌اند بیشتر است. بعلاوه جدایه‌هایی که از بذر به دست آمده‌اند نسبت به جدایه‌هایی که از مناطق مختلف گیاه جدا شده‌اند، تنوع بیشتری را در VCG نشان می‌دهند (Clark *et al.*, 1995). در حالی که *F. oxysporum* فاقد فرم جنسی شناخته شده در طبیعت می‌باشد (Snyder & Toussoun, 1965). ارزیابی تنوع مولکولی بر اساس شاخص‌های متنوع DNA نشان داده است که *F. oxysporum* گونه‌ای هتروژنوس بوده و از تنوع زیادی برخوردار است (Woo *et al.*, 1998). نتایج این تحقیق نیز بیانگر تنوع بالای ژنتیکی FOB در مناطق چغندرکاری خراسان می‌باشد، به گونه‌ای که پلی مورفیسیم مشاهده شده توسط تنها یک آغازگر، جداسازی گروه‌های مختلف را امکان‌پذیر می‌سازد. وجود تنوع ژنتیکی بالا در قارچ‌های فاقد مرحله جنسی همیشه برای محققین سؤال برانگیز بوده است. در این خصوص باید اشاره کرد که ایران از جمله مراکز اصلی تنوع ژنتیکی چغندر محسوب شده که گونه‌های مختلف جنس *Beta* در آن گسترش دارد (Cooke & Scott, 1993). با توجه به قدمت طولانی کشت انواع لپوئی و علوفه‌ای این محصول در استان خراسان، تکامل همزمان میزبان - بیمارگر (Plant-Pathogen Coevolution) ممکن است

تنوع ژنتیکی زیادی را در قارچ‌های آلوده کننده این جنس و از جمله FOB به وجود آورده باشد. انتخاب طبیعی نیز گزینش گروه‌های سازگار رویشی در مناطق مختلف را تحت تاثیر قرار داده است. بعلاوه تنوع وسیع آب و هوایی در منطقه، بر افزایش پلی مورفیسم قارچ موثر بوده است. (2001) Lewinsohn *et al.* نشان دادند که پلی مورفیسم ژنتیکی بالا در سطح DNA و پروتئین، مرتبط با فشارها و ناهمگنی‌های محیطی می‌باشد. آن‌ها نشان دادند که تنوع محیط و زیستگاه در اسرائیل، افزایش تنوع ژنتیکی را در قارچ *Pleurotus eryngii* به دنبال داشته است. بسیاری از عوامل ژنتیکی مانند ترانسپوزون‌ها در *F. oxysporum* شناسایی شده‌اند. این پدیده نیز می‌تواند یکی از دلایل تنوع بالا در این گونه قارچی باشد (Daboussi & Langin, 1994). اما یقیناً عواملی غیر از فاکتورهای ژنتیکی قابل انتقال نیز در ایجاد تنوع نقش دارند. این احتمال نیز وجود دارد که یک مرحله جنسی ناشناخته برای این قارچ در طبیعت وجود داشته باشد. در حال حاضر اگر چه FOB در مقایسه با سایر عوامل خسارت‌زای چغندر قند، بیماری‌گری کم اهمیت در مناطق چغندر قند استان خراسان تلقی می‌گردد، اما با عنایت به خاکزاد بودن این قارچ، پراکندگی وسیع و تنوع زیاد آن در منطقه و همچنین امکان ایجاد نژادهای مهاجم از قارچ مذکور، توجه بیشتر به این بیمارگر ضرورت دارد.

نشانی نگارندگان: رعنا دستجردی، دکتر ماهرخ فلاحی رستگار دکتر بهروز جعفرپور و دکتر جواد مظفری. دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج.