Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤١، ١٣٨٤

تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* عامل بوته‌میری زیره سبز در استان خراسان با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی*

Genetic diversity in populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, the causal agent of cumin wilt in Khorasan using vegetative compatibility groups

نسرین نورس‌مفرد، رضا فرخی‌نژاد و عزیزاله علیزاده**

دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز و دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

دریافت ١٣٨٠/٩/٧ پذیرش ١٣٨٤/٤/٢٩

چکیده

پنجاه جدایه (FO) *Fusarium oxysporum* از بافتهای آوندی ریشه و طوقه گیاهان زیره سبز آلوده به بیماری بوته‌میری جمع‌آوری شده از مناطق عمده زیره‌کاری خراسان جداسازی گردید. آزمونهای بیماریزایی نشان داد که از این تعداد ۴۸ جدایه در زیره سبز بیماریزا بودند وبه عنوان *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*(Foc) مشخص شدند. از جدایه‌های *F. oxysporum* روی سه

* قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه شهید چمران اهواز

** مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دستروز آگار، حداقل و زاپک حاوی ۱/۸٪، ۲/۵٪ و۳٪ کلرات پتاسیم، ۴۸۳ موتانت نیت به‌دست آمد. براساس نحوه رشد موتانتهای نیت روی محیط کشت پایه حاوی یکی از چهار منبع ازت (نیترات‌سدیم، نیتریت‌سدیم، هیپوزانتین و تارتارات‌آمونیوم) کلاس فنوتیپی موتانتها تعیین گردید. براین‌اساس ۷۴/۵٪ موتانتها در کلاس فنوتیپی nit1، ۱۲٪ در کلاس فنوتیپی nit3 و ۱۱/۵٪ در کلاس فنوتیپی nitM قرار گرفتند. از موتانتهای نیت برای تعیین سازگاری رویشی در بین جدایه‌ها استفاده به‌عمل آمد. در بین جدایه‌های (Fo)، شش گروه سازگار رویشی مشخص شد که دو گروه آنها مربوط به جدایه‌های غیربیماریزا و چهار گروه بقیه مربوط به جدایه‌های (Foc) بودند. بزرگترین گروه شناخته شده در این بررسی ۴۴ عضو داشت که همگی از شهرستان فردوس جمع‌آوری شده بودند. سه گروه باقیمانده نیز هر کدام تک عضوی بوده که یکی از آنها به فردوس، یکی به خواف و دیگری به بشرویه تعلق داشتند. در این بررسی یک جدایه نیز به عنوان خود ناسازگار رویشی مشخص گردید. علی‌رغم تعداد اندک جدایه‌های غیربیماریزای مورد استفاده در این بررسی به نظر می‌رسد که بین بیماریزایی و سازگاری رویشی رابطه‌ای وجود داشته باشد. همچنین بین گروه‌های سازگار رویشی و مناطق جغرافیایی محل جمع‌آوری جدایه‌ها نیز رابطه مثبتی مشاهده شد بطوریکه جدایه‌های یک منطقه به یک VCG تعلق داشتند.

واژه‌های کلیدی: زیره سبز، فوزاریوم، VCG، موتانت نیت، هتروکاریون

مقدمه

قارچ *Fusarium oxysporum* Schlecht یک بیمارگر گیاهی خاکزاد و یکی از عوامل مهم پژمردگی آوندی در بسیاری از محصولات زراعی است. این گونه از نظر میزبانی بسیار اختصاصی عمل می‌کند. اختصاصی بودن میزبانهای جدایه‌های مختلف قارچ سبب شد که *اسنایدر و هانسن* (Snyder & Hansen 1940) این گونه را براساس توانایی جدایه‌ها در ایجاد بیماری روی یک میزبان خاص و یا گروه خاصی از میزبانها به فرمهای تخصص یافته

www.SID.ir

Archive of SID

[formae speciales(f. sp.)] طبقه‌بندی نمایند. فرم‌های مخصوص نیز براساس بیماریزایی آنها روی واریته‌های خاص میزبان که از نظر مقاومت به بیماری متفاوت هستند، به نژادها تقسیم می‌گردند (Correll *et al.* 1987). اگرچه آزمایشات بیماریزایی یک ویژگی مهم و مفید برای تمایز فرم‌های تخصص یافته این قارچ محسوب می‌شوند ولی این آزمایشات اغلب تحت تأثیر عوامل متعددی از قبیل دما، سن میزبان، روش مایه‌زنی و دامنه میزبانی قرار می‌گیرند (Correll *et al.* 1987).

استفاده از گروه‌های سازگار رویشی روش مناسب دیگری برای شناسایی و تفکیک فرم‌های تخصص یافته *F. oxysporum* می‌باشد. از گروه‌های سازگار رویشی برای مطالعه دینامیک جمعیت قارچ‌های بیماریزای گیاهی و جدایه‌های غیربیماریزا استفاده شده است (Glass & Kuldau 1992). بیشترین کاربرد VCG برای بیماری شناسان گیاهی، استفاده از آن به‌عنوان یک ابزار تشخیص است. به این ترتیب که جدایه‌هایی که در یک گروه بیماریزایی مثل نژاد یا فرم اختصاصی قرار دارند در یک یا تعداد محدودی گروه سازگار رویشی قرار می‌گیرند. بنابراین بیمارگر با قرار گرفتن در یک گروه خاص از VCG بدون انجام آزمون‌های بیماریزایی تشخیص داده می‌شود (Leslie 1993).

قارچ *F. oxysporum* قارچی ناقص و فاقد مرحله جنسی است. محققین علاقمند به کارهای ژنتیکی، هتروواریوزیس (heterokaryosis) و چرخه پراجنسی (parasexual cycle)، قارچ را مورد مطالعه قرار داده‌اند (Puhalla 1984). هتروواریوزیس در قارچ‌های ناقص، پتانسیل تبادل ژنتیکی را در سیکل پراجنسی تحت‌تأثیر قرار داده و در یک جمعیت، تنوع ژنتیکی ایجاد می‌کند (Glass & Kuldau 1992). تشکیل هتروواریون پایدار به عنوان معیاری برای سازگاری رویشی در نظر گرفته شده است (Leslie 1993). استفاده از نشانگرهای ژنتیکی مثل موتانتها یکی از راه‌های تشخیص تشکیل هتروکاریون پایدار به شمار می‌رود.

پوآلا (Puhalla 1985) روشی را در مورد گونه‌های فوزاریوم پیشنهاد کرد که قبلا توسط *کاو* (Cove 1976) برای *Aspergillus nidulans* بکار رفته بود. او بیان کرد که روی محیط حاوی نمک

www.SID.ir

Archive of SID

کلرات‌پتاسیم، رشد تیپ وحشی محدود می‌شود و موتانتهای نیت به صورت سکتورهای مقاوم به کلرات بدست می‌آیند (Correll *et al.* 1987). این سکتورها روی محیط حداقل دارای رشد سریعی بوده و پرگنه‌های ظریف و بدون میسلیوم هوایی تولید می‌کنند. این موتانتها قادر به مصرف نیترات نبوده و موتانتهای نیت [nitrate non-utilizing(nit) mutants] نامیده می‌شوند. *پوآلا* (Puhalla 1985) موتانتهای نیت را از ۲۱ جدایه *F. oxysporum* بدون استفاده از مواد جهش‌زا بدست آورد. وی دو موتانت نیت را که می‌توانستند با هم هتروواریون تشکیل دهند بطور قراردادی nitA وnitB معرفی نمود. هر چند تفکیک موتانتها بهnitA وnitB کار عملی و موثر بود ولی این نوع نامگذاری، فنوتیپ فیزیولوژیکی موتانتهای نیت را نشان نمی‌داد. *کارل و همکاران* (Correll *et al.* 1987) کلاس فنوتیپی موتانتهای نیت را براساس نحوه رشد آنها روی محیط‌های کشت حاوی یکی از پنج منبع مختلف ازت مشاهده نموده و موتانتهای نیت را در سه گروه فنوتیپیnit1، nit3 و nitM قرار دادند.

موتانتهای نیت سازگار، با تشکیل هتروواریون روی محیط حداقل (minimal medium=MM) با یکدیگر کامل می‌شوند و در محلی که پرگنه‌های دو موتانت نیت با هم برخورد می‌کنند، آناستوموز می‌یابند و مآلا در محل برخورد، رشد هوایی متراکم تولید می‌شود (Correll *et al.* 1987).

پوآلا (Puhalla 1985) معتقد است که جدایه‌های موجود در یک VCG از نظر ژنتیکی شبیه هستند و جدایه‌هایی که در VCGهای متفاوت قرار می‌گیرند، از این نظر شباهتی ندارند. بنابراین بین یک VCG خاص و ژنوتیپ موجود ارتباط وجود دارد. وی همچنین متوجه شد که بین گروه‌های سازگار رویشی و فرم‌های تخصص یافته ارتباط وجود دارد و اعضای یک VCG به یک فرم تخصص یافته تعلق دارند. سایر محققین با استفاده از روش ابداعی پوآلا در سال ۱۹۸۵، گروههای سازگار رویشی دیگر فرم‌های تخصص یافته*F. oxysporum* را تعیین کرده‌اند

www.SID.ir

Archive of SID

Elias & Schneider 1992, Katan & Katan 1999, Bentley *et al.* 1994, Manicom *et al.* 1990,) Woudt *et al.* 1995, Venter *et al.* 1992, Woo *et al.* 1996, Marlatt *et al.* 1996, Katan *et al.* 1996, Harveson & Rush 1997, Alves-Santos *et al.* 1999, Sarpeleh & Banihashemi 2000, Basirnia & Banihashemi 2004).

بیماری بوته‌میری زیره سبز یکی از بیماری‌های مهم این محصول در خراسان می‌باشد که همه ساله خسارت زیادی وارد می‌نماید. طبق گزارش *علوی* (Alavi 1969)، در ایران بیماری برای اولین بار توسط رسولیان معرفی و عامل آن توسط شریف *F. oxysporum* f. sp. *cumini* Prasad et Patel تعیین گردید و بیماریزایی آن روی زیره سبز نیز توسط علوی به اثبات رسید.

هدف از این بررسی جداسازی *F. oxysporum* f. sp. *cumini* عامل بوته‌میری زیره سبز از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان خراسان و تعیین تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ‌های جدا شده با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی و نیز ارتباط بین بیماریزایی و گروه‌های سازگار رویشی در قارچ مذکور می‌باشد.

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های *F. oxysporum*

نمونه‌برداری در اواخر فروردین و اوایل اردیبهشت ماه سال‌های ۱۳۷۸و ۱۳۷۹ از روستاها و بخش‌های شهرستان‌های مختلف استان خراسان انجام گرفت. قارچ عامل بیماری از بافتهای آوندی ناحیه ریشه و طوقه گیاهان آلوده جداسازی گردید. برای جداسازی قارچ از محیط کشت انتخابی فوزاریوم (Nash & Snyder 1962) استفاده شد. ریشه‌های آلوده از ناحیه طوقه بریده شده و زیر شیر آب شسته شدند. بعد از ضدعفونی با الکل اتیلیک ۷۵٪ و عبور از روی شعله، از بافت‌های آوندی قطعات ضدعفونی شده، قسمت‌های کوچکی جدا و روی محیط کشت فوق قرار داده شد. پس از آن ظروف کشت برای مدت ۴ تا ۵ روز در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جدایه‌های قارچ حاصله بعد از تک اسپور شدن برای نگهداری به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت غذایی مخصوص (special nutrient

www.SID.ir

Archive of SID

agar=SNA) منتقل گردیدند. شناسایی *F. oxysporum* براساس شکل و رنگ پرگنه، رنگ اسپرودوکیوم و مشخصات اندامهای زایشی مثل اندازه و شکل ماکروونیدیومهای تولید شده در اسپرودوکیوم، فیالیدها، میکروونیدیومها و کلامیدوسپورها و بر اساس کلید *نلسون* و همکاران (Nelson *et al.* 1983) صورت گرفت.

بازیابی موتانتهای نیت

موتانتهای نیت به روش *کارل* و همکاران (Correll *et al.* 1987) بدست آمدند. بلوکهای میسلیومی ۳-۲ میلیمتری از محیط کشت کامل (complete medium) که حاوی کشت پنج روزه قارچ بود جدا و به محیط کشت‌های حداقل حاوی ۱/۸٪ کلرات پتاسیم (minimal medium chlorate=MMC) و عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار حاوی ۱/۸٪ کلرات پتاسیم (potato dextrose chlorate=PDC) منتقل و در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای هر جدایه ۱۰ تشتک پتری مایه‌کوبی گردید. چون برخی از جدایه‌ها روی این محیط‌کشتها هیچگونه سکتوری تولید نکردند لذا به محیط‌کشتهای PDC و MMC حاوی درصد بیشتر کلرات پتاسیم (۳-۲/۵٪) و نیز به محیط‌کشت زاپک حاوی ۲/۵٪ کلرات پتاسیم (Elias & Cotty 1995) منتقل شدند. ظروف کشت به مدت ۱۵-۱۰ روز در انکوباتور نگهداری گردیدند. در طول این مدت سکتورهای سریع‌الرشد از پرگنه محدود شده قارچ خارج شد. بعد از ظهور سکتورها، از حاشیه خارجی آنها قطعه کوچکی برداشته و به محیط حداقل انتقال یافت. پس از ۴-۳ روز نگهداری در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، سکتورهایی که رشد نازک، گسترده و بدون میسلیوم هوایی داشتند به عنوان موتانت انتخاب شدند.

تعیین کلاس فنوتیپی موتانتهای نیت

برای تعیین کلاس فنوتیپی موتانتهای نیت، چهار قطعه میسلیومی از هر موتانت نیت به محیط‌کشت پایه (basal medium) که حاوی یکی از منابع ازت شامل نیترات سدیم، نیتریت سدیم، هیپوزانتین و تارتارات آمونیوم بود منتقل گردید. پس از آن ظروف کشت برای مدت ۵-۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. براساس نحوه رشد در این محیط‌کشتها ،

www.SID.ir

Archive of SID

موتانتهای نیت در یکی از سه کلاس فنوتیپی nit1، nit3 و nitM قرار گرفتند (Correll *et al.*1987).

بررسی گروههای سازگار رویشی

ابتدا برای آزمایش خودسازگاری جدایه‌ها، یک موتانت nitM از هر جدایه با موتانت nit1 و یا nit3 از همان جدایه مقابل هم کشت شدند. وجود رشد مترام و هوایی در محل تلاقی دو موتانت نشان دهنده تشکیل هتروکاریون و خودسازگار بودن جدایه تلقی شد. در مرحله بعد یک قطعه کوچک از موتانت nitM یک جدایه در وسط تشتک پتری روی محیط حداقل قرار داده شد و در مقابل آن چهار قطعه میسلیومی از موتانتهای nit1 و یا nit3 چهار جدایه دیگر کشت گردید. برای سهولت کار یک موتانت nitM از یک جدایه که با اکثر جدایه‌ها سازگاری داشت به عنوان تستر انتخاب گردید. بعد از حدود ۱۴-۷ روز، وجود رشد متراکم در محل تلاقی موتانتهای نیت به عنوان معیاری برای تشکیل هتروکاریون در نظر گرفته شد.

آزمایش‌های بیماریزایی

بوته‌های پنج هفته‌ای زیره با قارچ عامل بیماری مایه‌زنی گردیدند. جهت مایه‌زنی میزبان از بذور گندم کلنه شده با قارچ عامل بیماری که قبلاً آماده شده بود، استفاده شد. به این ترتیب که بذور آلوده در کنار طوقه و ریشه گیاهان زیره قرار گرفت. گلدانهای حاوی گیاهان تیمار شده در شرایط دمایی ۲±۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. علائم بیماری ۱۰-۳ روز پس از مایه‌زنی ظاهر گردید. قارچ عامل بیماری مجدداً از گیاهان مایه‌زنی شده جداسازی گردید.

نتیجه

جداسازی و تشخیص جدایه‌های *F. oxysporum*

از کشت بافتهای آلوده گیاهی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان خراسان تعداد ۵۰ جدایه بدست آمد که دارای پرگنه‌هایی با رشد پنبه‌ای به رنگ سفید و هلویی کم رنگ بودند. بعد از خالص‌سازی، جدایه‌ها با استفاده از خصوصیات اندامهای تولید شده روی محیط کشت

www.SID.ir

Archive of SID

برگ میخک آگار (carnation leaf agar=CLA) و با استفاده از کلید شناسایی *نلسون* و همکاران (Nelson *et al.*1983) شناسایی شدند. این جدایه‌ها پس از بررسی میکروسکوپی اندامهای زایشی شامل ماکروکنیدیومها، میکروکنیدیومها، فیالیدها و کلامیدوسپورها به‌عنوان *F. oxysporum* تشخیص داده شدند. خصوصیات جدایه‌های هر منطقه در جدول یک منعکس گردیده است.

جدول ۱- تعداد جدایه، محل جمع‌آوری، بیماریزایی و تعداد گروه‌های سازگار رویشی *F. oxysporum* f. sp. *cumini* مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Number of isolates, locality, pathogenicity and number of vegetative compatibility groups of *F. oxysporum* f. sp. *cumini* used in this study

شماره No.	تعداد جدایه No. of isolate	محل جمع آوری Locality	بیماریزایی Pathogenicity	گروههای سازگار رویشی VCG
1	44	فردوس (F)	+	A
2	1	فردوس (F)	+	B
3	1	کاشمر (K)	–	C
4	1	خواف (Kh)	+	D
5	1	فردوس (F)	–	E
6	1	بشرویه (B)	+	F
7	1	تایباد (T)	+	*

F = Ferdos Kh = Khaf T = Taibad B = Boshrooyeh K = Kashmar
* self incompatible

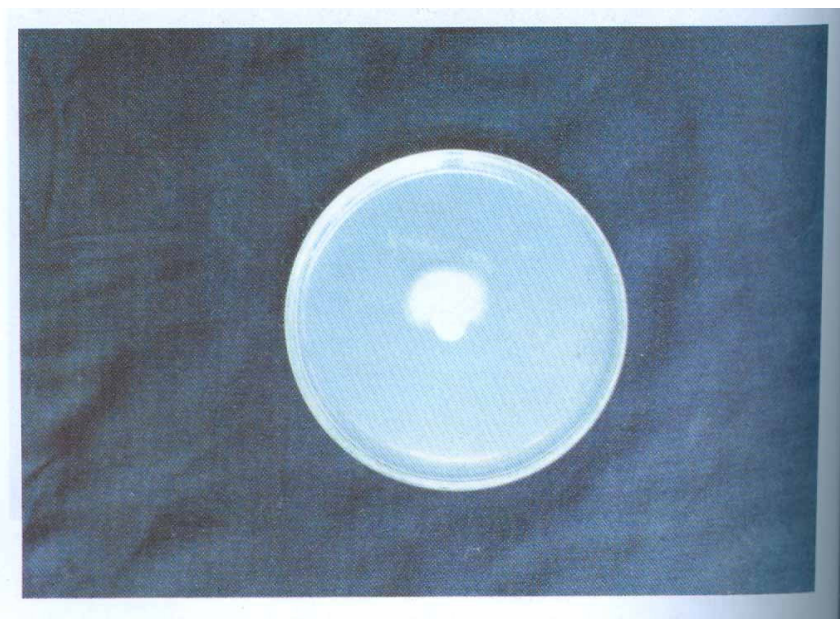
تولید موتانتهای نیت

اکثر جدایه‌های *F. oxysporum* روی محیط‌های PDC و MMC حاوی ۱/۸٪ کلرات پتاسیم، سکتورهای سریع الرشدی تولید کردند (شکل۱). رشد پرگنه قارچ روی این محیطها و بویژه

www.SID.ir

Archive of SID

روی MMC محدود شده و فقط از بعضی قسمت‌های پرگنه رشد سریع مشاهده گردید. این سکتورها روی محیط PDC حدود ۱۰–۷ روز بعد از کشت و روی محیط MMC، ۱۵–۱۰ روز بعد از کشت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد ظاهر شدند و در مجموع تعداد ۴۸۳ موتانت نیت بدست آمد. راندمان بازیابی موتانتهای نیت از PDC، ۷۰/۴٪ و از MMC، ۶/۶٪ بود. رشد تعدادی از جدایه‌های *F. oxysporum* روی محیط‌های کشت حاوی ۱/۸٪ کلرات پتاسیم محدود نشد. در نتیجه برای این جدایه‌ها از محیط کشت‌های حاوی ۳–۲/۵٪ کلرات پتاسیم و نیز محیط کشت زاپک حاوی ۲۵ گرم در لیتر کلرات پتاسیم استفاده شد. از جدایه‌های انتقال یافته به محیط زاپک، ۱۱۱ موتانت نیت حاصل شد.



شکل ۱– تولید سکتورهای سریع‌الرشد *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* روی محیط سیب‌زمینی–دکستروز حاوی کلرات پتاسیم (PDC).

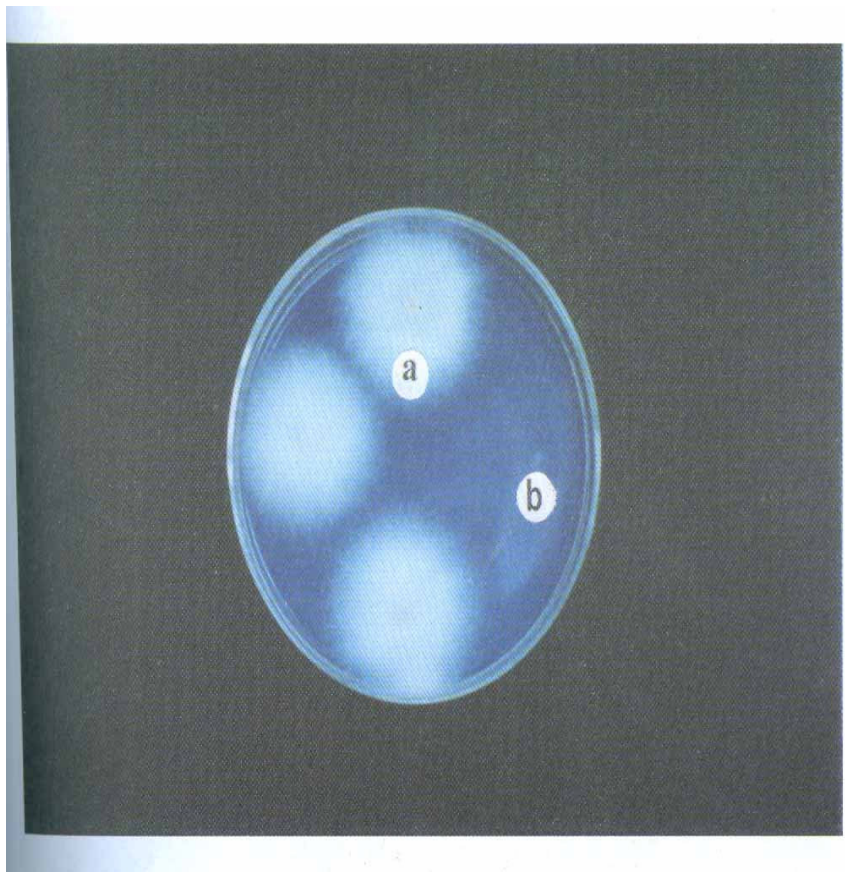
Fig. 1. Fast growing sectors of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* on PDC.

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین فنوتیپ موتانتهای نیت

موتانتهای نیت بدست آمده براساس مورفولوژی پرگنه روی محیط‌های کشت حاوی یکی از چهار منبع ازت نیترات سدیم، نیتریت سدیم، هیپوزانتین و تارتارات آمونیوم در یکی از سه کلاس فنوتیپی قرار گرفتند (جدول ۲، شکل ۲).



شکل ۲– تعیین کلاس فنوتیپی موتانتهای نیت . a) رشد بصورت تیپ وحشی و b) بصورت ضعیف و گسترده.

Fig. 2. Determination of phenotypic classes of nit mutants a) wild type and b) sparse growth.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲– تعیین کلاس فنوتیپی موتانتهای نیت

Table 2. Determination of phenotypic classes of nit mutants (Correll *et al.* 1987)

کلاس فنوتیپی موتانت نیت PCNM	نیترات سدیم NaNo3	نیتریت سدیم NaNo2	هیپوزانتین Hypo.	تارتارات آمونیوم Am. Tar.
nit1	-	+	-	+
nit3	-	-	+	+
NitM	-	+	-	+

- = علامت منفی بیانگر رشد پراکنده موتانت روی محیط مربوطه است.

- = Sparse growth of nit mutants on each nitrogen source

+ = علامت مثبت نشان دهنده رشد موتانت به صورت تیپ وحشی روی محیط مربوطه است.

+ = Dense and wild type growth of nit mutants on each nitrogen source

PCNM = Phenotypic classes of nit mutants

بیشتر موتانتهای بدست آمده از نوع nit1 بوده و موتانتهای nit3 و nitM از فراوانی کمتری برخوردار بودند (جدول ۳).

جدول ۳– راندمان بازیابی موتانتهای نیت قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*

Table 3. Efficiency of recovery of nit mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*

جدایه Isolate	موتانتهای نیت nit mutants		
	nit1	nitt3	NitM
F. oxysporum	360(75.5%)	58(12%)	65(13.5%)

www.SID.ir

Archive of SID

موتانتهای نیت بدست آمده از MMC و زاپک کلرات نسبت به موتانتهای بدست آمده از PDC تنوع بیشتری داشتند.

گروههای سازگار رویشی

در نتیجه آزمون انجام شده برای تعیین خودسازگاری جدایه‌ها، یک جدایه به عنوان خود ناسازگار رویشی مشخص گردید. از بین تمام جدایه‌ها، موتانت nitM یک جدایه که هتروکاریون قوی (شکل ۳) با سایر جدایه‌ها ایجاد نمود به عنوان تستر انتخاب گردید.

شکل ۳- a) تشکیل هتروکاریون قوی و پایدار بین جدایه‌های سازگار و b) عدم تشکیل هتروکاریون بین جدایه‌های ناسازگار.

Fig. 3. a) Stable heterokaryon formation between compatible isolates and b) no heterokaryon formation between incompatible isolates.

www.SID.ir

Archive of SID

یین موتانتهای نیت، پنج جدایه باnitM تستر، هتروکاریونی تشکیل ندادند در نتیجه برای این جدایه‌ها، کلیه مقابله‌های ممکن روی محیط حداقل انجام شد و چون بین آنها نیز هتروکاریونی تشکیل نگردید، لذا هر یک از آنها در یک گروه مجزا قرار گرفت. به این ترتیب شش گروه سازگار رویشی مشخص گردید که پنج گروه آنها هر کدام دارای یک جدایه و گروه ششم (A) شامل ۴۴ جدایه بود (جدول ۱).

آزمون بیماریزایی

کلیه جدایه‌های *F. oxysporum* به استثنای دو جدایه روی زیره سبز بیماریزا بوده و علائم پژمردگی نشان دادند. در نتیجه این جدایه‌ها به‌عنوان *F. o.* f. sp. *cumini* تشخیص داده شدند. از کشت مجدد بافتهای آلوده این بوته‌ها عامل بیماری مجددا جداسازی گردید.

بحث

بیشتر قارچها می‌توانند با احیای نیترات به آمونیوم، از نیترات به عنوان یک منبع ازت استفاده نمایند. این پروسه از طریق آنزیمهای نیترات ریداکتاز (nitrate reductase) و نیتریت ریداکتاز (nitrite reductase) صورت می‌گیرد. کلرات به عنوان آنالوگ نیترات برای مطالعات مصرف نیترات استفاده می‌شود. احیای کلرات به کلریت توسط آنزیم نیترات ریداکتاز سبب سمیت کلرات می‌شود (Correll *et al.* 1987).

در این بررسی راندمان سکتوردهی روی MMC و PDC به ترتیب ۶/۶٪ و۷۰/۴٪ بود. همچنین راندمان سکتوردهی روی محیط زاپک–کلرات، ۲۲/۹٪ تعیین شد. راندمان سکتوردهی تحت تأثیر شرایط محیطی مثل دما، سطح تغذیه (Correll *et al.* 1987) و فشار انتخاب یا میزان مقاومت جدایه قرار می‌گیرد (Correll *et al.* 1987, Klittich & Leslie 1988, Klittich *et al.* 1988).

تشکیل پرگنه در بین جدایه‌های قارچی روی محیط کلرات–رزبنگال متفاوت است. رشد تیپ وحشی به صورت رشد هیفی متراکم و محدود مشاهده می‌شود که حتی پس از ۹۰ روز نگهداری در انکوباتور به هیچوجه بیشتر از یک سانتی‌متر گسترش نمی‌یابد

www.SID.ir

Archive of SID

(Elias & Cotty 1995).

فنوتیپ موتانتهای نیت از نحوه رشد پرگنه روی محیطهایی که دارای یکی از چهار منبع متفاوت ازت هستند تعیین گردید. این گروهها براساس یک جهش در یک لوکوس ساختمانی آنزیم احیا ننده نیترات (nit1 قادر به استفاده از نیترات نمی‌باشد)، یک لوکوس اختصاصی تنظیم کننده مسیر مصرف نیترات (nit3 قادر به مصرف نیترات و نیتریت نمی‌باشد) و جهش در پنج لوکوس مسوول ساخت وفاکتور دارای مولیبدن که برای فعالیت نیترات ریداکتاز لازم است (nitM قادر به استفاده از نیترات و هیپوزانتین نیست) حاصل می‌شوند (Correll *et al.* 1987). در این بررسی موتانتهای nit1 بیشترین فراوانی را داشتند و موتانتهای nit3 و nitM از وفور کمتری برخوردار بودند. در دو محیط MMC و PDC تنوع کلاس فنوتیپی موتانتهای نیت کم بوده ولی روی محیط زاپک-کلرات، موتانتهای نیت دارای تنوع فنوتیپی نسبتاً بالایی بودند. از ۱۱۱موتانت نیت بدست آمده روی این محیط کشت ۴۴٪ آنها (۴۹ عدد) nit1، ۳۶/۹٪ آنها (۴۱ عدد) nitM و۱۸/۹٪ آنها (۲۱ عدد) nit3 بود. در بررسی انجام شده توسط *الیاس و کوتی* (Elias & Cotty 1995) نیز نتیجه مشابهی بدست آمده است.

نوع ازت مورد استفاده در محیط کلرات بر فراوانی فنوتیپ موتانتهای نیت تأثیردارد. *کلی‌تیچ و لسلی* (Klittich & Leslie 1988) در بررسی خود روی *F. moniliforme* برای ارزیابی موتانتهای نیت از محیط حاوی کلرات که دارای ترئونین بود استفاده کردند. آنها بیشترین موتانتهای nitM را از محیط کلرات-ترئونین بدست آوردند و نتیجه‌گیری کردند که عامل اصلی مؤثر بر فراوانی تولید موتانتهای نیت، نوع منبع ازت محیط حاوی کلرات است. بیشتر جدایه‌های Foc در این بررسی در یک گروه سازگار رویشی قرار گرفتند. عواملی نظیر نحوه تولید مثل قارچ، محل جمع‌آوری و تعداد نمونه‌های قارچی مورد استفاده، می‌تواند تعداد گروههای سازگار رویشی را در یگ گونه تحت تأثیر قرار دهند (Sidhu 1986).

گروههای سازگار رویشی در*F. oxysporum* نسبت به قارچهایی نظیر *Cryphonectria parasitica* و *Neurospora crassa* که تولید مثل جنسی دارند کمتر است. *کلارک*

www.SID.ir

Archive of SID

و همکاران (Clark *et al.* 1995) پیشنهاد کردند که گونه‌هایی از فوزاریوم که دارای چرخه جنسی هستند، گروههای سازگار رویشی بیشتری دارند و تنوع ژنتیکی در جمعیت آنها نسبت به قارچهای فاقد فرم جنسی بیشتر است.

طبق نظر *پوآلا* (Puhalla 1985) تعداد گروههای سازگار رویشی در ابتدا زیاد بوده است ولی با گذشت زمان تعدادی از آنها بطور شانسی یا با انتخاب طبیعی از دست رفته‌اند و در این انتخاب، گیاه میزبان نقش زیادی دارد. VCGهای باقی مانده ژنوتیپ مشخصی را انتقال می‌دهند که بعضی از آنها بیماریزایی را کنترل می‌کنند. در واقع بین VCG و پاتوتیپ (pathotype) ارتباط مستقیمی وجود دارد. در بسیاری از قارچها، سازگاری رویشی توسط لوکوسهای ناسازگاری رویشی (vegetative incompatibility gene=vic) کنترل می‌شود. طی تقسیم میوز، نه تنها ژنهای کنترل کننده ناسازگاری رویشی (vic) جدا می‌شوند بلکه ژنهای دیگری مثل ژنهای کنترل کننده بیماریزایی نیز شکسته می‌شوند. تریب ژن یا ژنهای vic با این ژنها یا ترکیبات مختلف آنها به‌طور تصادفی قابل حصول است. در طی تقسیم‌های میوز بعدی این اتصالات شکسته شده و ترکیبات جدیدی ایجاد می‌گردند. اگر چرخه جنسی رخ ندهد تبادلات ژنی به چرخه پراجنسی محدود می‌شود. نامبرده در بررسی‌های خود همچنین به رابطه بین VCG و فرمهای اختصاصی *F. oxysporum* دست یافت. او پیشنهاد کرد که از آنجایی که چرخه جنسی و نوترکیبی میوزی در این قارچ حذف شده است، لوکوسهای مربوط به ناسازگاری رویشی (vic) و لوکوسهای بیماریزایی پیوستگی نزدیکی با هم دارند و در نتیجه VCG در جمعیتهای این قارچ به عنوان ابزاری قوی در گروه‌بندی جمعیتهای بیماریزا و غیربیماریزای قارچ به کار می‌رود.

در این بررسی بین جدایه‌های بیماریزا و غیر بیماریزای *F. oxysporum* هتروکاریون تشکیل نگردید. *جاکوبسون و گوردون* (Jacobson & Gordon 1988) و *کتان و کتان* (Katan & Katan 1989) با آزمایش روی قارچهای عامل پژمردگی خربزه و میخک به این نتیجه دست یافتند که بین جدایه‌های بیماریزا و غیر بیماریزا هتروکاریونی تشکیل نمی‌شود و این جدایه‌ها در گروههای سازگار رویشی مجزا قرار می‌گیرند و بیان کردند که تکنیک VCG

www.SID.ir

Archive of SID

می‌تواند جدایه‌های بیماریزا و غیربیماریزا را از هم جدا کند. .پژوهشگران ایرانی نیز (Sarpeleh & Banihashemi 2000) در مطالعات خود به همین نتیجه دست یافته‌اند.

اکثر جدایه‌های بدست آمده *F. oxysporum* در این بررسی بیماریزا بودند و فقط دو جدایه غیر بیماریزا وجود داشت که در دو گروه مجزا قرار گرفته و با جدایه‌های بیماریزا هتروکاریون تشکیل ندادند. عدم بیماریزایی آنها بر روی زیره به معنی غیر بیماریزا بودن آنها نیست بله ممکن است آنها روی گیاهان دیگر بیماریزا باشند و به سایر فرمهای تخصص یافته *F. oxysporum* تعلق داشته باشند. از طرفی ممکن است این جدایه‌ها صرفاً میکروارگانیسمهای کودرست بوده و به هیچ عنوان بیماریزا نباشند. به هرحال با وجود تعداد اندک جدایه‌های غیربیماریزای مورد مطالعه، نتایج این بررسی می‌تواند مؤید این فرضیه باشد که بین گروههای سازگار رویشی و بیماریزایی ارتباط وجود دارد و می‌توان جدایه‌های بیماریزا و غیربیماریزا را با این روش از یکدیگر تفکیک نمود.

در این بررسی شش گروه سازگار رویشی بین جدایه‌هایFo مشخص گردید که دو گروه آنها مربوط به جدایه‌های غیر بیماریزا بودند (جدول ۱). در بین جدایه‌های Foc عامل بوته‌میری زیره سبز مورد مطالعه در این تحقیق چهار گروه سازگار رویشی تشخیص داده شد. این تعداد اندک VCG، نشان دهنده تنوع ژنتیکی کم این فرم مخصوص می‌باشد و نشان می‌دهد که بیشتر جدایه‌ها از یک منبع اجدادی منشاء گرفته و مونوفیلتیک (monophylitic) هستند (Fiely *et al.* 1995). این داده‌ها با نتایج سایر پژوهشگرانی که روی گروههای سازگار رویشی در جمعیت دیگر فرمهای اختصاصی Fo کار کرده‌اند همسو می‌باشد (Elias & Schnider 1991, Harveson & Rush 1997, Kattan *et al.* 1991). یکی از علل این امر می‌تواند عدم وجود تولید مثل جنسی این قارچ باشد. از طرفی چون Foc در زیره بذرزاد می‌باشد (Singh *et al.* 1972) می‌توان این تنوع ژنتیکی‌اند را به استفاده زارعین از بذور برداشت شده توسط خود آنها در سطح استان خراسان و شهرهای مختلف آن نسبت داد.

در بسیاری از تحقیقات انجام شده، توسط سایر محققین بین مناطق جغرافیایی که جدایه‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

از آنجا جمع‌آوری شده بودند و گروههای سازگار رویشی ارتباطی مشاهده نشده است (Farrokhi – Nejad 1999, Bosland & Williams 1987, Elmer 1991, Elmer *et al.* 1994, Elmer & Stephens 1989, Fiely *et al.* 1995, Sarpeleh & Banihashemi 2000). در بررسی‌های انجام شده در این تحقیق، تمام جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *cumini* موجود در گروه A (۴۴ جدایه یا۹۳/۶٪ جمعیت مورد مطالعه) از شهرستان فردوس جمع‌آوری شده‌اند (جدول ۱). سه گروه سازگار رویشی دیگر هر کدام شامل یک جدایه (۲/۱۳٪) به ترتیب از فردوس، خواف و بشرویه جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱).

علیرغم جمعیت‌اند هر یک از گروههای سازگار رویشی B، D و F (جدول ۱) میتوان رابطه خاصی را بین گروههای سازگار رویشی و منشاء جغرافیایی جدایه‌ها مشخص نمود. یکی از دلایل توجیه کننده این حالت می‌تواند بذرزاد بودن عامل بیماری و نیز مصرف بذور تولیدی هر منطقه توسط زارعین همان منطقه برای کشت در سال بعد باشد. بصیرنیا و بنی‌هاشمی نیز با توجه به بذر زاد بودن *F. oxysporum* f. sp. *sesami* روی کنجد، بین گروههای سازگار رویشی و انتشار جغرافیایی همبستگی مثبتی مشاهده کردند که یکی از علل آن را عدم توزیع بذور کنجد به مناطق دیگر نسبت داده‌اند (Basirnia & Banihashemi 2004). اظهارنظر قاطع‌تر در این زمینه با مطالعه تعداد بیشتری از جدایه‌های مناطق مختلف امکان‌پذیر می‌باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (197-193) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: نسرین نورس‌مفرد، رضا فرخی‌نژاد و عزیزاله علیزاده، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز و دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

www.SID.ir