Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤٢، ١٣٨٥

بررسی گروه‌های سازگاری رویشی *Fusarium solani* f.sp. *pisi*، عامل پوسیدگی سیاه ریشه نخود در استان فارس*

Vegetative compatibility groups of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* the causal agent of chickpea black root rot in Fars province of Iran

حمید محمدی و ضیاءالدین بنی‌هاشمی**

دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

دریافت ١٣٨٣/١٢/٥ پذیرش ١٣٨٤/١٢/١٧

چکیده

گروه‌های سازگاری رویشی (Vegetative Compatibility Groups=VCGs) ٥٣ جدایه *Fusarium solani* f sp. *pisi* (*Fsp*)، بدست آمده از نخود و علفهای‌هرز مزارع نخود، در فصول زراعی سال‌های ٨١ ١٣و ١٣٨٢ از نقاط مختلف استان فارس شامل حومه شیراز، مرودشت، ممسنی، قیر و کارزین، فسا، خفر، نی‌ریز، استهبان، سپیدان، فیروز آباد، کوار، بوانات، آباده و اقلید با استفاده از جهش یافتگان*nit* مورد بررسی قرار گرفت.فراوانی بازیابی جهش یافتگان *nit* با استفاده از سه محیط‌کشت حاوی کلرات پتاسیم شامل محیط حداقل (Minimal medium- chlorate=MMC)، محیط سیب زمینی- دکستروز- آگار (Potato dextrose agar- chlorate=PDAC) و محیط کشت زاپکس

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

(Czapek dox agar-chlorate=CDAC) به‌ترتیب ۸٤/۲۱، ۷۳/۵۳ و ٦۸/۵۷ درصد محاسبه گردید و در نهایت از ۵۳ جدایه *Fsp*، ٤۷٦ جهش یافته *nit* بدست آمد. جهش یافتگان براساس نیاز به منابع ازت در سه گروه فنوتیپی *nit*1 (٦۰/۷۱ ٪)، *nit*3 (۲٤/۷۹ ٪)و *Nit*M (۱٤/۵ ٪) قرار گرفتند

جهت تعیین گروه‌های سازگاری رویشی جدایه‌ها، آزمون مقابله‌سازی بین جهش یافتگان *Nit*M با جهش یافتگان *nit*1 یا *nit*3 انجام شد. در مورد جدایه‌هایی که فاقد *Nit*M بودند مقابله سازی بین جهش یافتگان *nit*1 و *nit*3 انجام گرفت. در نهایت با انجام آزمون مقابله‌سازی،۵۳ جدایه *Fsp* در ۱۱ گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند. گروه VCG-1 با ۲۵ جدایه و گروه VCG-11 با یک جدایه به ترتیب بزرگترین وکوچکترین گروه‌های سازگاری رویشی را تشکیل دادند. خود ناسازگاری رویشی در هیچ‌کدام از جدایه‌ها مشاهده نشد. در خصوص ارتباط گروه‌های سازگاری رویشی با مناطق جغرافیایی جدایه‌ها به استثناء دو گروه VCG-5 و VCG-7، همبستگی مثبتی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی سیاه ریشه، نخود، .VCG، فارس

مقدمه

به‌کارگیری روش‌های ژنتیکی و مولکولی نشان می‌دهد جدایه‌های قارچی که در یک گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند نسبت به بقیه جدایه‌ها از شباهت ژنتیکی بیشتری برخوردار هستند و قادرند اطلاعات ژنتیکی را از طریق سیکل پراجنسی (Parasexual cycle) بین خود مبادله نمایند (Leslie 1993).

پوهالا (Puhalla 1985) روشهایی را که قبلاً Cove (1976) برای بررسی سازگاری رویشی در *Aspergillus* به کار گرفته بود برای مطالعه ژنتیکی قارچ *Fusarium* به کار برد. برای این منظور از جهش یافتگان*nit* (nitrate non- utilizing mutants_) که از محیط‌های حاوی کلرات بدست می‌آیند استفاده می‌شود. مشخصه اصلی این جهش یافتگان، رشد غیر متراکم و گسترده آنها بر روی محیط حداقل است که از تیپ وحشی آن که دارای رشد متراکم همراه با

www.SID.ir

Archive of SID

ریسه‌های هوایی می‌باشد به راحتی قابل تشخیص است. میزان مقاومت قارچها به کلرات مصرفی متفاوت بوده و در مواردی جهت تولید جهش یافتگان *nit* لازم است مقدار کلرات در محیط افزایش یابد چون با بکار گیری میزان پایینی از کلرات یا سکتوری تولید نمی‌شود و یا با انتقال سکتورهای تولید شده به محیط حداقل مانند تیپ وحشی رشد خواهند نمود (Jacobson & Gordon 1988, Clark *et al*. 1995). هر چند بررسی‌های انجام شده در خصوص تعیین گروه‌های سازگاری رویشی در *F. solani* نسبت به *F. oxysporum* بسیار ناچیز است ولی تحقیقات نشان داده است این قارچ تحمل بیشتری به کلرات دارد (Correll *et al*. 1986, Hawthorne & Rees-George 1996). طی مطالعه‌ای با استفاده از محیط کشت رزبنگال دارای کلرات، پنج جدایه *F. solani* بدست آمده از سیب‌زمینی شیرین و چند میزبان دیگر در پنج گروه VCG قرار گرفتند (Elias & Cotty 1995) هاوترون و ریس جرج موفق به جداسازی چندین جدایه *F. solani* از گیاهان طالبی، گوجه‌فرنگی، نخودفرنگی، لوبیا، یونجه، گل ساعتی و کدو شدند و با انتقال این جدایه‌ها به محیط‌کشت حداقل (minimal medium=MM) حاوی کلرات (۳ درصد) تعدادی موتانت *nit* بدست آوردند و پس از آزمون مکمل‌سازی (complementaion test)، ۵۷ جدایه از این جدایه‌ها در ۳۵ گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند که ۲۶ گروه سازگاری رویشی هر کدام تنها شامل یک جدایه بودند (Hawthorne & Ress- George 1996). گرچه بیشتر محققان جهت تولید جهش یافتگان *nit* به خصوص در *F. oxysporum* از محیط‌کشت‌هایی نظیر PDA و MM استفاده کرده اند ولی مطالعات نشان داده است که محیط‌کشت‌های دیگری چون CDA (Czapek dox agar) نیز قابل استفاده است که در تولید جهش یافتگان *nit* بسیاری از قارچها از جمله *F .solani* مناسب می‌باشد (Elias & Cotty 1995). جهش یافتگان *nit* بر اساس خصوصیات مرفولوژی رشدشان بر روی محیط‌کشت پایه (Basal Medium=BM) حاوی یکی از منابع ازت (نیترات‌سدیم، نیتریت سدیم، هیپوزانتین و تارتارات آمونیوم) در سه گروه فنوتیپی *nit*1 ، *nit*3 و *Nit*M قرار می‌گیرند (Correll *et al*. 1987, Klittich & Leslie 1988). تولید جهش یافتگان *nit* در جنس‌های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

قارچ‌ها و حتی در گونه‌های مختلف یک جنس متفاوت است (Klittich & Leslie 1988)، هر چند عوامل محیطی مانند دما و تغذیه نیز بی‌تأثیر نیستند (Correll *et al*. 1987). با مقابله‌سازی بین دو جهش یافته اگزوتروف (auxotroph) و رشد آنها به سوی یکدیگر، در محل تماس ریسه با هم، رشد متراکم همراه با ریسه‌های هوایی مشاهده می‌شود. چنین حالتی دلیل بر تشکیل هتروکاریون (heterokaryon) و در نتیجه تشابه ژنتیکی دو جدایه است (Puhalla 1985) و دو جدایه در یک گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند. مطالعات نشان داده است که بین گروه‌های سازگاری رویشی و مناطق جغرافیایی در قارچ‌های مختلف ارتباطی بسیار پیچیده وجود دارد چنانکه در مواردی می‌توان همبستگی مثبتی بین این دو مشاهده نمود (Puhalla 1984) و در مواردی ارتباط مشخصی وجود ندارد (Correll 1991, Clark *et al*. 1995, Fiely *et al*. 1995).

روش بررسی

۱- تهیه جدایه‌ها

در طول فصول زراعی سال‌های ۱۳۸۱و۸۲ از مزارع نخود در استان فارس شامل حومه شیراز، مرودشت، ممسنی، قیر و کارزین، فسا، خفر، نی‌ریز، استهبان، سپیدان، فیروزآباد، کوار، بوانات، آباده و اقلید بازدید بعمل آمد و نمونه‌های نخود بیمار و علفهای‌هرز مزارع نخود (بدون علائم بیماری) جمع‌آوری گردید (جدول ۱). نمونه‌ها در داخل کیسه‌های پلاستیکی و در یخدان به آزمایشگاه انتقال یافت تا کار جداسازی انجام شود.

۲- جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی *Fusarium solani* fsp. *pisi*

برای جداسازی عامل بیماری از نخود ابتدا ریشه و طوقه گیاهان به آرامی با آب معمولی شسته شد تا گل و لای آن جدا شود سپس آنها را به قطعات ۵-٤ میلی‌متری بریده و با هیپوکلریت‌سدیم ۵/ درصد به مدت ۱/۵-۱ دقیقه گندزدایی گردیدند. قطعات گندزدایی شده سه مرتبه با آب مقطر شسته و پس از خشک کردن آنها با دستمال کاغذی روی محیط PDA

www.SID.ir

Archive of SID

کشت و در دمای ۲۵ °C قرار داده شد.برای جداسازی از علفهای‌هرز ابتدا ریشه این گیاهان با آب معمولی شسته شد و سپس به قطعات۵-٤ میلی‌متری بریده شدند. قطعات بریده شده را در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و با دستگاه تکان دهنده (با ٦۰ حرکت رفت و برگشت) تکان داده شدند (Banihashemi & de Zeeuw 1969)، پس از خشک کردن قطعات با دستمال کاغذی روی محیط PDA کشت داده شد. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک اسپور و نوک ریسه انجام شد. تشخیص جنس و گونه جدایه‌ها با کلیدهای معتبر (Burgess *et al*. 1994, Nelson *et al*. 1983) انجام شد و پس از تعیین اختصاصیت میزبانی روی نخود و نخود فرنگی (Mohammadi & Banihashemi 2006) به عنوان *F.solani* f. sp. *pisi* شناسایی شدند.

۳-تولید جهش یافتگان *nit* (*nit* mutants)

جهت تولید جهش یافتگان *nit* از روش پوهالا (Puhalla 1985) استفاده گردید. ابتدا از هر جدایه خالص که روی محیط PDA رشد کرده بود، یک بلوک میسلیومی به محیط MM منتقل و در دمای ۲۵ °C نگهداری گردید (جهت مشاهده رشد تیپ وحشی). پس از ٤-۳ روز ۱۵ بلوک ۵/ میلی‌متری از پرگنه‌های رشد کرده روی محیط MM جدا و به محیط حاوی کلرات (CDAC, PDAC, MMC) منتقل شدند. به‌طوری‌که در هر تشتک پتری پنج بلوک میسلیومی قرار داده و در دمای ۲۵ °C نگهداری گردیدند.رشد پرگنه‌ها روزانه از نظر تولید سکتور مورد بررسی قرار گرفت. با مشاهده سکتورهای سریع‌الرشد، قسمت کوچکی ازحاشیه آن جدا و مجدداً به MM انتقال داده شد. با این روش جهش یافتگان *nit* که دارای رشدی غیر متراکم، گسترده و فاقد ریسه هوایی روی این محیط بودند از جهش یافتگان مقاوم به کلرات که رشدی مشابه تیپ وحشی (رشد متراکم و واجد میسلیوم‌های هوایی) داشتند تشخیص داده شد (Correll *et al.* 1987). جهش یافتگان*nit* تولید شده به لوله آزمایش حاوی محیط حداقل منتقل و در سردخانه نگهداری شدند.

٤- تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان *nit*

از جهش یافتگان *nit* که روی محیط MM رشد غیرمتراکم داشتند بلوک‌های میسلیومی به قطر ۵/ میلی‌متر جدا و به محیط‌های کشت حاوی یکی از منابع نیتروژن (شامل نیترات سدیم،

www.SID.ir

Archive of SID

نیتریت سدیم، هپوزانتین و تارتارات آمونیوم) منتقل و در دمای ۲۵ ºC نگهداری گردید. پس از ٤-٥ روز جهش یافتگان *nit* از نظر مرفولوژی پرگنه‌ها در یکی از گروه‌های *nit*1، *nit*3 یا *Nit*M قرار گرفتند (Correll *et. al*. 1987).

٥- آزمون مقابله‌سازی جهش یافتگان *nit*

جهت تعیین گروه‌های سازگاری رویشی جدایه‌های *Fsp*، *Nit*M بدست آمده از هر جدایه با جهش یافتگان *nit*1 یا *nit*3 سایر جدایه‌ها مقابله‌سازی شد. در مورد جدایه‌هایی که فاقد *Nit*M بودند آزمون مقابله‌سازی تنها بین جهش یافتگان، *nit*1 و *nit*3 انجام شد. برای انجام آزمون مقابله‌سازی ابتدا جهش یافتگان *nit* بر روی محیط MM کشت داده شدند و پس از مشاهده رشد غیرمتراکم و گسترده جهش یافتگان بلوک هایی به قطر ٥/. میلی‌متر جدا و به محیط‌کشت MM جدید منتقل گردیدند به‌طوری‌که در وسط یک تشتک پتری ۱۰ سانتی‌متری یک بلوک از *Nit*M و در اطراف آن نیز پنج بلوک از *nit*1 یا *nit*3 سایر جدایه‌ها به فاصله ۲/٥-۲ سانتی‌متری قرار گرفت و در دمای ۲۵ ºC نگهداری شدند. با رشد ریسه‌ها و تماس آنها با هم، تشکیل یا عدم تشکیل هتروکاریون مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل هتروکاریون بین دو جهش یافته *nit* از دو جدایه مختلف دلیل بر تشابه ژنتیکی آنها بوده و نشان می‌دهد این دو جدایه متعلق به یک گروه VCG هستند (Correll *et al*. 1987).

٦- بررسی میزان برگشت‌پذیری جهش یافتگان *nit*

جهش یافتگان*nit* ، که به مدت حدود یک سال در سرد خانه نگهداری شده بودند مجدداً به محیط MM منتقل و رشد پرگنه‌های آنها مورد بررسی قرار گرفت. رشد به حالت تیپ وحشی دلیل بر برگشت‌پذیری جهش یافتگان *nit* تلقی گردید.

نتیجه

۱- تولید جهش یافتگان *nit*

برای بدست آوردن جهش یافتگان *nit*، سه جدایه *Fsp* انتخاب و به‌طور آزمایشی روی سه محیط PDA، MM و CDA حاوی ۱۵ گرم در لیتر کلرات پتاسیم منتقل شدند. پرگنه‌ها پس از ۱۵-۱۰ روز رشد عادی داشتند و هیچ سکتوری مشاهده نشد. با افزایش میزان کلرات مصرفی

www.SID.ir

Archive of SID

به ۳۰ گرم در لیتر گرچه رشد پرگنه‌ها محدود شد ولی باز هم سکتور قابل توجه‌ای بدست نیامد. با افزایش میزان کلرات به ۵۰ گرم در لیتر رشد پرگنه‌ها روی سه محیط به شدت محدود شد و پس از ۱۰-۵ روز سکتورهای تولید شده (شکل۱ -A) به محیط MM انتقال داده شد که تعدادی از این سکتورها روی این محیط رشد وحشی داشتند (شکل۱ -B). در مرحله بعد میزان کلرات مصرفی به ۷۰ گرم در لیتر افزایش داده شد که با این میزان کلرات تعداد قابل توجهی سکتور تولید شد و با انتقال سکتورها به محیط کشت MM مشاهده شد که درصد بالایی از آنها به صورت غیرمتراکم و گسترده رشد کردند. نتایج نشان داد که محیط زاپکس (حاوی ۷۰ گرم در لیتر کلرات) با راندمان ۸٤/۲۱ درصد بهترین محیط جهت بازیابی جهش یافتگان *nit* جدایه‌های *Fsp* است و محیط‌های PDA و MM به‌ترتیب با راندمان ۷۳/۵۳ و ٦۸/۵۷ درصد در مراحل بعدی قرار دارند. به همین دلیل برای تولید جهش یافتگان *nit* در جدایه‌های *Fsp* از محیط زاپکس حاوی ۷۰ گرم در لیتر کلرات استفاده گردید. در نهایت از ۵۳ جدایه *Fsp*، ٤۷٦ جهش یافته *nit* بدست آمد.

۲- تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان *nit*

جهش یافتگان *nit* بدست آمده از جدایه‌های *F. solani* f. sp. *pisi* برحسب رشد رویشی بر روی محیط پایه حاوی یکی از منابع ازت (نیترات سدیم، نیتریت سدیم، هیپوزانتین و تارتارات آمونیوم) در سه کلاس *nit*1 ، *nit*3 و *Nit*M (شکل۱ -C) و به‌ترتیب با فراوانی ٦۰/۷۱، ۲٤/۷۹ و ۱٤/۵ درصد قرار گرفتند.

۳- مقابله‌سازی جهش یافتگان *nit* جهت تعیین گروههای سازگاری رویشی

مقابله‌سازی بین جهش یافتگان *nit* مختلف نشان داد در مواردی که *Nit*M با *nit*1 یا *nit*3 مقابل هم قرار می‌گیرند هتروکاریون با سرعت و تراکم بیشتری تشکیل می‌شود (شکل۱-D) در حالی که تشکیل هتروکاریون بین جهش یافتگان *nit*1 و *nit*3 با سرعت کمتر و تراکم بسیار ضعیف صورت می‌گیرد (شکل۱-E). تشکیل هتروکاریون بین جهش یافتگان *nit* جدایه‌های مختلف دلیل بر سازگاری رویشی آنها با هم بوده و در نتیجه در یک گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند. در بعضی از جدایه‌ها هم پس از مقابله‌سازی بین جهش یافتگان *nit* هیچ هتروکاریونی مشاهده نشد (شکل۱-F) که این جدایه‌ها در گروه‌های سازگاری رویشی مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

قرار گرفتند.

در این تحقیق ۵۳ جدایه *Fsp* پس از انجام آزمون مقابله‌سازی در ۱۱ گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند. گروه یک با ۲۵ جدایه و گروه ۱۱ با یک جدایه به‌ترتیب بزرگترین و کوچکترین گروه سازگاری رویشی را تشکیل دادند.

٤- میزان برگشت‌پذیری جهش یافتگان *nit*

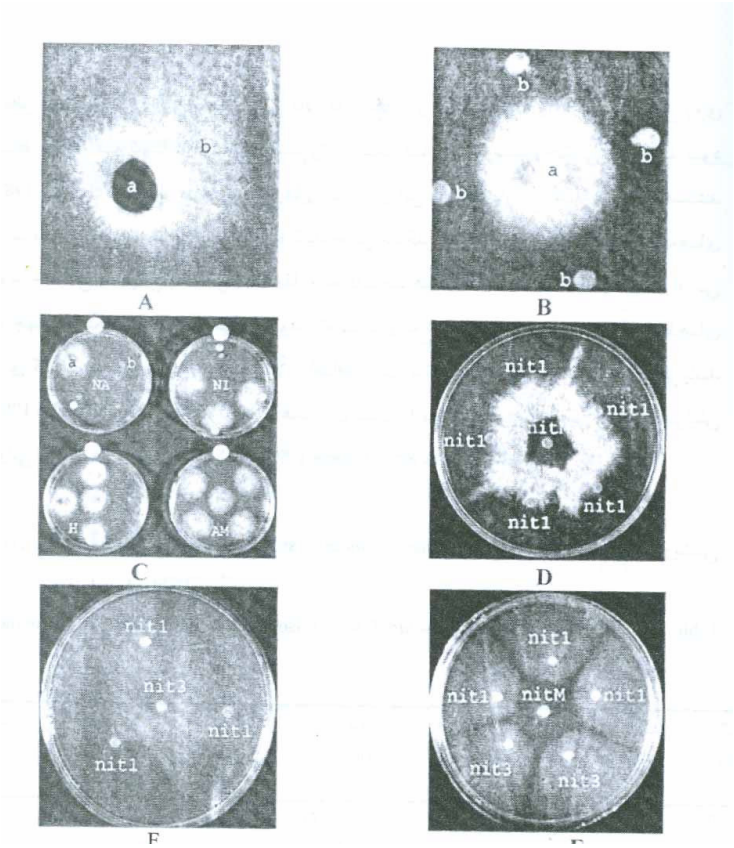
جهش یافتگان *nit* که حدود یکسال در سردخانه نگهداری شده بودند مجدداً بر روی محیط MM کشت و مرفولوژی پرگنه آنها مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۱۹/۷۵ درصد کل جهش یافتگان *nit* با رشد وحشی بر روی محیط مزبور، به عنوان میزان برگشت‌پذیری محاسبه گردید که از این میزان ٢٤/٥٧ درصد مربوط به جهش یافتگان *nit*1 و ١٣/٥٦ و ١٠/١٤ درصد نیز به ترتیب مربوط به *nit*3 و *Nit*M بود.

بحث

در این تحقیق بازده سکتوردهی جدایه‌های *F. solani* f. sp. *pisi* روی سه محیط PDA ، MM و CDA حاوی ۷۰ گرم در لیتر کلرات‌پتاسیم به ترتیب ٧٥/٥٦، ٧٧/٧٨ و ٨٤/٤٤ درصد محاسبه گردید و بهترین محیط‌کشت جهت تولید سکتور محیط CDA در نظر گرفته شد. تحقیقات نشان داده است که محیط CDA حاوی کلرات در سکتوردهی جدایه‌های *F. solani* محیط مناسبتری نسبت به PDA و MM است (Elias& Cotty 1995). تولید سکتور در قارچها تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند دما، تغذیه و نوع قارچ قرار دارد (Klittich & Leslie 1988)، گرچه در این خصوص عوامل ژنتیکی نیز از اهمیت خاصی برخوردارند (Klittich *et al.* 1988). میزان کلرات پتاسیم مصرفی جهت تولید سکتور در قارچها در بیشتر مطالعات ۱/۵ درصد گزارش شده است (Jacobson & Gordon 1988, Clark *et al*. 1995,) ولی در مورد *F.solani* با مصرف این میزان از کلرات سکتوری تولید نشده است (Hawthorne & Ress- George 1996) چون این گونه نسبت به *F. oxysporum* تحمل بیشتری به کلرات پتاسیم نشان می‌دهد (Correl *et al.* 1986). در این بررسی همچنین مشاهده شد که با انتقال سکتورهای تولید شده به محیط MM بعضی سکتورها رشد غیر متراکم و گسترده داشتند که به عنوان جهش یافته *nit*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱– A: تولید سکتور از *Fusarium solani* f. sp. *pisi* روی محیط‌کشت CDAC – B: رشد وحشی و ضعیف سکتورها روی محیط‌کشت MM – C: تعیین فنوتیپ جهش یافتگان *nit* روی محیط‌کشت BM حاوی نیترات‌سدیم (NA)، نیتریت‌سدیم (NI)، هیپوزانتین (H) و تارتارات آمونیوم (AM)– D: تشکیل هتروکاریون متراکم– E: تشکیل هتروکاریون ضعیف–F: عدم تشکیل هتروکاریون (a =رشد وحشی و b= رشد ضعیف).

Fig. 1. A: sectore formation of *Fusarium solani* f. sp. *pisi on* CDAC -B: fast ,thin and wild type growing on MM- C: growth of *nit* mutants on BM containing sodium nitrate (NA) , sodium nitrite (NI), hypoxantine (H) and amonium tartarate (AM) – D: dense heterokaryon formation- E: thin heterokaryon formation–F: no heterokaryon formation. (a= wild type growth- b=thin growth).

www.SID.ir

Archive of SID

در نظر گرفته شدند. چنین سکتورهایی قادر به استفاده از نیترات نبوده و به همین دلیل روی محیط MM که تنها دارای منبع نیتروژن است قادر به رشد وحشی نخواهند بود (Correl *et al*. 1987) از طرفی سکتورهایی که روی این محیط دارای رشد وحشی هستند قادرند به خوبی از ازت موجود استفاده کنند چنین سکتورهایی دارای ترکیبی از هسته‌های مقاوم، حساس و جهش یافته بوده که مقاوم به کلرات هستند (Correll *et al.* 1987). فراوانی نوع جهش یافتگان *nit* در قارچها می تواند تحت تاثیر نوع منبع ازت موجود در محیط‌های حاوی کلرات پتاسیم قرار می گیرد مثلاً با اضافه کردن ترئونین فراوانی *Nit*M افزایش می‌یابد (Klittich & Leslie 1988). هاوترون و همکاران نشان دادند که وجود ترئونین باعث افزایش فراوانی *Nit*M در *F. solani* می‌شود (Hawthorne & Ress- George 1996).

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *Fusarium. solani* f. sp. *pisi* و گروه‌های سازگاری رویشی آنها در استان فارس

Table 1. Characteristic of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* isolates and their VCG in Fars province

شماره ردیف Number	کد جدایه Isolate code	محل نمونه برداری location	زمان Time	میزبان host	محل جدا سازی از بافت plant tissue	گروه VCG
1	EST1	استهبان E	۸۰/۱/۲۱ (M 2001)	نخود C	ریشه R	6
2	Est2	〃	〃	〃	〃	〃
3	EST3	〃	〃	〃	〃	〃
4	EST4	〃	〃	〃	〃	〃
5	EST-gl	〃	〃	شیرین بیان GL	〃	1
6	FAS1	فسا FA	۸۰/۱/۳۱ (M 2001)	نخود C	طوقه و ریشه R&CR	〃
7	FAS2	〃	〃	〃	ریشه R	〃
8	FAS3	〃	〃	〃	〃	4

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- (ادامه)

Table 1. (continued)

9	FAS4	〃	〃	〃	طوقهCR
10	FAS5	〃	〃	〃	〃	1
11	SHI1	شیرازSH	۸۰/۲/۱۵ (April 2001)	〃	ریشهR	7
12	SHI2	〃	〃	〃	〃	〃
13	SHI3	〃	〃	〃	〃	〃
14	SPD1	سپیدانS	۸۰/۲/۲۵ (April 2001)	〃	〃	2
15	SPD2	〃	〃	〃	〃	1
16	SPD3	〃	〃	〃	〃	〃
17	SPD4	〃	〃	〃	〃	2
18	KAV1	کوار K	۸۰/۲/۲۷ (April 2001)	〃	〃	8
19	KAV2	〃	〃	〃	طوقهCR	〃
20	KAV3	〃	〃	〃	ریشهR	〃
21	KAVcp	〃	〃	کیسه کشیش CA	〃	11
22	FUS1	فیروز آباد F	〃	نخودC	〃	1
23	FUS2	فیروز آبادF	۸۰/۲/۲۷	نخودC	ریشهR	1
24	FUS3	〃	〃	〃	〃	〃
25	KAR1	کارزین KA	〃	〃	〃	〃
26	KAR2	〃	〃	〃	〃	〃
27	KAR3	〃	〃	〃	〃	〃
28	ABD1	آباده AB	۸۰/٤/۱ (June 2001)	〃	〃	9
29	ABD2	〃	〃	〃	〃	〃
30	ABD3	〃	〃	〃	〃	〃
31	ABD4	〃	〃	〃	〃	〃
32	ABDam1	〃	〃	تاج خروسAM	〃	10
33	ABDam2	〃	〃	〃	〃	〃
34	ABDch	〃	〃	سلمه تره CH	〃	1
35	EGH1	اقلید EG	〃	نخودC	〃	3
36	EGH2	〃	〃	〃	〃	〃
37	EGH3	〃	〃	〃	〃	1

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1. (continued)

جدول ۱- (ادامه)

38	EGH4	〃	〃	〃	〃	〃
39	NIR1	نی ریز N	۸۱/۲/۵ (April 2002)	〃	〃	〃
40	NIR2	〃	〃	〃	〃	6
41	NIRgl	〃	〃	شیرین بیان	〃	1
42	MAM1	ممسنی M	۸۱/۲/۲۰ (April 2002)	نخودGL	〃	〃
43	MAM2	〃	〃	〃	〃	〃
44	MAMgl	〃	〃	شیرین بیانGL	〃	10
45	KAF1	خفر KF	۸۱/۲/۲۶ (April 2002)	نخودC	〃	1
46	KAF2	〃	〃	〃	〃	〃
47	KAF3	〃	〃	〃	〃	〃
48	KAF4	〃	〃	〃	〃	〃
49	BAV1	بوانات B	۸۱/۳/۲۱ (May 2002)	〃	〃	5
50	BAV2	بواناتB	۸۱/۳/۲۱ (May 2002)	نخودC	ریشهR	5
51	BAV3	〃	〃	〃	〃	〃
52	BAVal1	〃	〃	سیر وحشی AL	〃	1
53	BAVal2	〃	〃	〃	〃	〃

E= Estahban, FA= Fasa. SH=Shiraz, S= Sepidan, K= Kavar, F= Firouzabad, KA= Karzin, AB= Abadeh, EG= Eghlid, N= Neyriz, M= Mamasani, KF= Khafr, B= Bavanat, C= chickpea, R= Root, R&CR= Root and crown, CR= Crown, GL, *Glycyrrhiza glabra* CA= *Capsella bursa-pastoris*, AM= *Amaranthus retroflexus*, CH= *Chenopodium album*, AL= *Allium seabriseapum*

جهش یافتگان *nit*1 در اثر جهش در ژنگاه ساختمانی نیترات ردوکتاز و جهش یافتگان *nit*3 در اثر جهش در ژنگاه تنظیم کننده مسیر اختصاصی جذب نیترات تولید می‌شوند در حالی *Nit*M بر اثر جهش در حداقل پنج ژنگاه بدست می‌آید (Klittich & Leslie 1988,). درصد فراوانی کمتر *Nit*M نسبت به *nit*1 و *nit*3 را شاید بتوان به احتمال وقوع جهش‌ها نسبت داد و چون *Nit*M احتمال کمتری دارد در نتیجه درصد کمتری را نیز خواهد داشت. در آزمون مقابله‌سازی بین موتانت‌های *Nit*M با یکی از موتانت‌های *nit*1 یا *nit*3 تشکیل

www.SID.ir

Archive of SID

هتروکاریون با سرعت و تراکم بیشتر مشاهده شد در حالی که تشکیل هتروکاریون بین موتانت‌های *nit*1 و *nit*3 به آهستگی و به صورت ضعیف ظاهر گردید. جدایه‌هایی که تشکیل هتروکاریون ضعیف می‌دهند با وجود توانایی در تشکیل هتروکاریون، قادر نیستند آن را به خوبی حفظ کنند. اعضای این گروه‌های سازگاری رویشی دریک یا دو ژنگاه با هم اختلاف دارند و برای تشکیل هتروکاریون به سویه شریک وابستگی بیشتری دارند. به این دلیل چنین جدایه‌هایی با بعضی از اعضای گروه سازگاری رویشی خود تشکیل هتروکاریون قوی و با بعضی تشکیل هتروکاریون ضعیف می‌دهند (Woudt *et al*., 1995).

تشکیل هتروکاریون ضعیف بین دو جهش یافته را می‌توان نوعی هتروکاریون موقت (transitory heterokaryon) دانست که در آن مرگ سیتوپلاسمی (cytoplasmic killing) در ناحیه آناستوموزی از سرعت کمی برخوردار است به گونه‌ای که مانع سنتز آنزیم‌های احیاکننده نیترات نمی‌شود. در نتیجه هتروکاریون تشکیل شده آنقدر پایدار می‌ماند تا امکان سنتز برخی آنزیم‌های احیاکننده نیترات فراهم گردد، هر چند که آنزیم‌های سنتز شده برای رشد متراکم و گسترده (extensive) کافی نیست (Leslie 1996, Clarkson & Heale 1985). تراکم هتروکاریون بین دو جهش یافته بستگی زیادی به قرابت و نسبت هسته‌های یکی شده بین دو موتانت در محل آناستوموزی دارد. هرچه این نسبت از توازن بهتری برخوردار باشد رشد هتروکاریون متراکم‌تر و عریض‌تر خواهد بود (Sidhu 1986). در کل متفاوت بودن آمیزش ریسه‌ای و ایجاد هتروکاریون‌های ضعیف و قوی در جدایه‌های یک گروه سازگاری رویشی را می‌توان به ماهیت جدایه‌ها و فنوتیپ موتانت‌های*nit* نسبت داد (Joaquim & Rowe 1990).

در این تحقیق مشخص شد که در بین بعضی از جدایه‌ها هیچ نوع هتروکاریونی تشکیل نمی‌شود. در جنس فوزاریوم بین سویه‌هایی که دارای هسته‌های ناسازگار رویشی هستند نیز آمیزش ریسه‌ای صورت می‌گیرد ولی در اثر این فرآیند ناسازگار، واکنشی رخ می‌دهد که باعث مرگ سلول‌های هتروکاریوتیک می‌شود (Leslie 1993) و می‌توان گفت آنچه که نهایتاً به صورت عدم تشکیل هتروکاریون ارزیابی می‌شود پس از مرگ سلول‌های نامبرده است. نتایج حاصل از آزمون مقابله‌سازی بین موتانت‌های*nit* مادری نشان داد که همهٔ جدایه‌های *F. solani* f. sp. *pisi* خود سازگار می‌باشند. راه خدایی(۱۳۷۹) نیز با انجام آزمون مقابله‌سازی بین ۳۶

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه *F.solani* جدا شده از سیب‌زمینی همه جدایه‌ها را خودسازگار گزارش داد (Rahkodaei 2000). جدایه‌های خود ناسازگار جدایه‌هایی هستند که در مقابله‌سازی بین موتانت‌های *nit* مادری هیچ هتروکاریونی تشکیل نمی‌دهند (Klittich & Leslei 1988). در بعضی از جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *melonis* خودناسازگاری گزارش شده است (Jacobson & Gordon, 1988).

هاوترون و ریس جرج گزارش دادند که در بین جدایه‌های مختلف *F. solani* تعداد زیادی جدایه خودناسازگار وجود دارد (Hawthorne & Ress-George 1996). در *F. moniliforme* خودناسازگاری یک صفت ارثی است که توسط یک ژن کنترل می‌شود (Correrll *et al*., 1987, Leslie 1993).

در این تحقیق ۱۱ گروه سازگاری رویشی شناسایی شد که از نظر تعداد جدایه‌ها با هم متفاوت بودند. گروه سازگاری رویشی یک (VCG- 1) با ۲۵ جدایه از نقاط مختلف (آباده، سپیدان، کارزین، اقلید، نی ریز، خفر، فسا، بوانات، ممسنی، فیروز آباد و استهبان) بزرگترین گروه و گروه سازگاری رویشی یازده (VCG -11) با یک جدایه از کوار، کوچکترین گروه‌ها را تشکیل دادند. هاوترن و ریس‌جرج (۱۹۹٦) ۵۷ جدایه *F. solani* به دست آمده از میزبان‌های مختلف را در ۳۵ گروه سازگاری رویشی قرار دادند (Hawthorne & Ress-George 1996). راه خدایی (Rahkodaei,2000) ۲۰ گروه سازگاری رویشی را در میان ۳٦ جدایه *F. solani* سیب‌زمینی تشخیص داد. تعداد گروه‌های سازگاری رویشی در یک قارچ بستگی به عواملی چون منبع، تعداد نمونه‌های قارچی به دست آمده و روش تولید مثل آن دارد (Sidhu 1986). تنوع گروه‌های سازگاری رویشی در قارچ‌هایی که تولید مثل جنسی دارند مانند *Neurospora crassa* و *Cryphonecteria parasitica* نسبت به قارچ‌هایی که تولیدمثل جنسی ندارند مانند *F. oxysporum* بیشتر است (Jacobson & Gordon 1990). در مورد *F.oxysporum* f. sp. *ciceri* با مطالعه برروی ٤۵ جدایه از هفت نژاد و از نقاط مختلف تنها یک گروه سازگاری رویشی شناسایی شده است (Perez-Artes *et al*., 1995).

در موجوداتی که تولیدمثل جنسی دارند ترکیبات ژنی به طور مرتب در حال جدا شدن و شکستن هستند که با ترکیب شدن مجدد باعث ایجاد تنوع ژنی در موجود می‌شوند ولی در

www.SID.ir

Archive of SID

موجوداتی که تولیدمثل جنسی ندارند ترکیبات ژنی ثابت باقی می‌مانند (Correll *et al*., 1986). مثلاً در *F. moniliforme* که دارای تولیدمثل جنسی است ده ژنگاه وجود دارد و در نتیجه 2^{10} یعنی ۱۰۲٤ ترکیب مختلف ژنی قابل دست‌یابی است. در این مورد حتی یک اختلاف آللی بین دو جدایه می‌تواند باعث ایجاد ناسازگاری رویشی در آنها شود و در نتیجه تنوع ژنتیکی در جمعیت این قارچ افزایش می‌یابد (Puhalla 1985). در *F.solani* حداقل هفت ژنگاه گزارش شده است (Hawthorne & Ress-George 1996) که می‌توان انتظار داشت در طبیعت 10^{7} یعنی ۱۲۸ ترکیب ژنی از این قارچ وجود داشته باشد. در *F. oxysporum* به علت نداشتن فرم جنسی اطلاع دقیقی از تعداد ژنگاه‌های کنترل کننده سازگاری رویشی در دست نیست (Elias *et al*., 1991).

در تولیدمثل جنسی، تلاقی (crossing over) در ایجاد تنوع ژنتیکی اهمیت زیادی دارد و با ایجاد افراد نو ترکیب در یک جمعیت، تنوع ژنتیکی آن جمعیت افزایش می‌یابد. در تولیدمثل پرا جنسی (parasexual reproduction) با کاهش احتمال سازگاری رویشی بین جدایه‌ها در حالت تصادفی، تنوع در جمعیت کم می‌شود. در این حالت احتمال به وجود آمدن افراد با تنوع ژنتیکی جدید بسیار کم است (Bowden & Leslie 1992).

تعداد گروه‌های سازگاری رویشی با توجه به تعداد نمونه‌های قارچی ممکن است متفاوت گزارش شود. مثلاً در *F. oxysporum* f. sp. *cubense* به ترتیب ۱۱، ۲۰ و ۲٤ گروه سازگاری رویشی گزارش شده که با افزایش تعداد نمونه‌ها، تعداد گروه‌های سازگاری رویشی نیز بیشتر شده است (Ploetz & Correll 1988).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که از ۱۱ گروه سازگاری رویشی به دست آمده تنها گروه‌های VCG-5 و VCG-7 شامل جدایه‌های یک منطقه جغرافیایی می‌باشند و رابطه مستقیمی بین مناطق جغرافیایی و گروه‌های سازگاری رویشی مشاهده می‌شود. در بقیه گروه‌ها چنین رابطه‌ای دیده نمی‌شود به طوری که در بعضی گروه‌ها جدایه‌های مناطق مختلف قرار دارند و در بعضی موارد نیز جدایه‌های یک منطقه در دو گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند. مثلاً جدایه‌های اقلید، فسا، آباده، کوار و سپیدان در بیش از یک گروه سازگاری رویشی قرار دارند و در گروه‌های سازگاری رویشی VCG-1 و VCG-6 جدایه‌های مناطق مختلف قرار دارند. در

www.SID.ir

Archive of SID

گروه سازگاری رویشی VCG-1 جدایه‌های ۱۱ منطقه مختلف قرار دارد و هیچ رابطه‌ای بین گروه‌های سازگاری رویشی و مناطق جغرافیایی جدایه‌ها مشاهده نمی‌شود. رابطه بین مناطق جغرافیایی و گروه‌های سازگاری رویشی در فرم‌های اختصاصی فوزاریوم بسیار متفاوت گزارش شده است.

پوهالا رابطه مستقیمی بین گروه‌های سازگاری رویشی و مناطق جغرافیایی در جدایه‌های *F. oxysporum* به‌دست‌آمده از گل داوودی مشاهده کرد (Puhalla 1984). مطالعات برروی جدایه‌های *F. solani* به دست آمده از نخودفرنگی نشان داد که بین گروه‌های سازگاری رویشی و مناطق جغرافیایی جدایه‌ها رابطه مستقیمی وجود دارد (Hawthorne & Rees-George 1996).

راه خدایی(Rahkodaei,2000) گزارش داد جدایه‌های *F. solani* سیب‌زمینی به‌دست‌آمده از یک منطقه در یک گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند و در مواردی که جدایه‌های یک گروه سازگاری رویشی از دو منطقه متفاوت می‌باشند، این مناطق از نظر جغرافیایی فاصله چندانی با هم ندارند. در این صورت بین گروه‌های سازگاری رویشی و مناطق جغرافیایی تا حدودی رابطه وجود دارد.

به عقیده Elmer (۱۹۹۱) وجود جدایه‌های مناطق مختلف در یک گروه سازگاری رویشی یا به عبارتی دیگر وجود یک گروه سازگاری رویشی در چند منطقه نشان‌دهندهٔ انتخابی بودن بقاء گروه‌های سازگاری رویشی است هر چند در مورد قارچ‌هایی که تولیدمثل جنسی دارند این انتخاب توسط میزبان چندان قطعی نیست (Elmer 1991).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (50-47) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: حمید محمدی و ضیاءالدین بنی‌هاشمی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

www.SID.ir