بررسی تنوع ژنتیکی *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی با استفاده از آزمون‌های بیماری‌زایی و نشانگرهای RAPD*

مکامه مهدوی امیری[۱**]، محمد رضوی[۲]، کسری شریفی[۲] و رسول زارع[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۷/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۴/۲۳)

چکیده

گونه‌ی *Fusarium oxysporum* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی در اغلب مزارع سیب‌زمینی کاری ایران شایع بوده و خسارت زیادی می‌زند. استفاده از ارقام مقاوم یکی از مؤثرترین روش‌های مدیریت این بیماری محسوب می‌شود، اما به‌منظور انتخاب و توسعه ارقام مقاوم آگاهی از تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این قارچ ضروری است. در این بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت این بیمارگر در استان‌های تهران، همدان و اردبیل بررسی گردید. بدین منظور ۷۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* به‌دست آمده از استان‌های مذکور انتخاب و پس از انجام آزمون بیماری‌زایی به دو روش آزمون بیماری‌زایی توانایی پوساندگی ریشه و انسداد آوندی، با استفاده از هفت آغازگر RAPD تنوع ژنتیکی آنها بررسی شد. آزمون‌های بیماری‌زایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها نشان داد جدایه‌هایی که در سیب‌زمینی پژمردگی ایجاد می‌نمودند از توان پوساندگی کمی برخوردار بوده و بالعکس. تجزیه خوشه‌ای داده‌های RAPD با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه Dice جدایه‌ها را در سطح شباهت ۷۱ درصد در هشت گروه ژنوتیپی قرار داد. هم‌چنین جدایه‌ها از لحاظ فنوتیپ مولکولی (هاپلوتیپ) به ۱۸ گروه تقسیم شدند. تعداد اندک گروه‌بندی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی کم این قارچ در مناطق مورد بررسی می‌باشد و نشان می‌دهد که جدایه‌ها از یک منبع اجدادی منشأ گرفته‌اند که یکی از علل این امر را می‌توان به نقش ضعیف تولید مثل جنسی در این قارچ نسبت داد. هم‌چنین تجزیه خوشه‌ای داده‌های RAPD جدایه‌ها را بدون توجه به منشأ جغرافیایی در گروه‌های ژنوتیپی مختلف قرار داد. بدین ترتیب بین تنوع ژنتیکی و منشأ جغرافیایی جدایه‌ها ارتباطی مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌زایی، پوسیدگی، پژمردگی فوزاریومی، فنوتیپ مولکولی، سیب‌زمینی

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از عمده‌ترین اقلام غذایی در تغذیه انسان‌ها به‌شمار رفته که به‌علت سازگار بودن با شرایط محیطی بسیار متفاوت، از پتانسیل غذایی بسیار بالایی برای جمعیت رو به افزایش جهان برخوردار است (Hooker 2000). یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد قارچی سیب‌زمینی پژمردگی فوزاریومی (*Fusarium wilt*) می‌باشد. این بیماری از طریق غده‌ی بذری نیز قابل انتقال است

* : بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mekameh_mahdavi@yahoo.com

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

۲. به ترتیب استادیار، مربی و دانشیار پژوهشی بیماری‌شناسی گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

Archive of SID

www.SID.ir

(Powelson & Rowe 1993). طی بررسی‌های مزرعه‌ای و انباری *F. oxysporum* و *F. solani* به‌ترتیب در مزرعه و انبار در ایران مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای سیب‌زمینی تعیین گردیدند (Karimi 1970). *F. oxysporum* یکی از مهم‌ترین گونه‌های تغییر پذیر در بین گونه‌های فوزاریوم بوده، قادر است در گیاهان متعدد بیماری ایجاد کند. جمعیتی از این گونه عامل انسداد آوندی و جمعیتی مولد پوسیدگی ریشه، طوقه، غده، پیاز و سایر اندام‌های زیرزمینی گیاهان می‌باشند (Miller *et al*. 2004). بیماری پژمردگی فوزاریومی در گیاهان مربوط به خانواده‌ی بادمجانیان (Solanaceae) از اهمیت خاصی برخوردار بوده و معمولاً علائم آن در برگ‌های پایین به‌صورت زردی مشاهده می‌شود. علت آن استقرار قارچ در آوندها یا پوسیدگی ساقه و ریشه می‌باشد. گیاهان مبتلا به این بیماری در هوای گرم به سرعت پژمرده شده، از پا می‌افتند (Miller *et al*. 2004). بیماری پژمردگی فوزاریومی در آب و هوای گرم و به‌خصوص اگر گیاه تحت تأثیر تنش کم آبی قرار گرفته باشد، در صورت حضور بیمارگر در خاک یا در غده‌های مادری به‌سرعت ظاهر شده، گسترش می‌یابد (Stevenson *et al*. 2001). این قارچ قادر است با استقرار در آوند غده‌های بذری به‌راحتی از منطقه‌ای به منطقه‌ی دیگر انتقال یابد (Stevenson *et al*. 2001).

سابقه تحقیقات در زمینه طبقه‌بندی گونه‌های فوزاریوم نشان می‌دهد که به‌دلیل عدم ثبات در مشخصات ریخت‌شناسی آنها روش‌های معمول در تمایز بین و درون گونه‌ای فوزاریوم‌ها با مشکلاتی مواجه بوده است. ویژگی‌هایی مانند رنگ پرگنه، شکل و اندازه اسپور بر حسب شرایط محیطی و مواد زمینه محیط کشت متغیر بوده و تنوع فنوتیپی به فراوانی مشاهده شده است (Nelson 1991). تغییرات ژنتیکی در قارچ‌های بیمارگر از جنبه تهیه ارقام مقاوم حائز اهمیت است. ردیابی این تغییرات با روش‌های سنتی مستلزم صرف هزینه زیاد و از دست رفتن زمان خواهد بود. استفاده از روش RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) در تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های بیمارگرها موجب کسب اطلاعات مربوط به وقوع نوترکیبی در زمینه ژنتیکی آنها می‌گردد. این روش خیلی حساس و سریع است و قابلیت آنالیز ژنتیکی تعداد زیادی از نمونه‌های قارچ را خواهد داشت (Williams *et al*. 1990, Walsh & McClelland 1990). این روش به‌دلیل عدم نیاز به کاوشگرهای رادیواکتیو و اطلاعات قبلی از توالی DNA در تعیین تنوع ژنتیکی بسیاری از جمعیت‌های قارچ‌های بیمارگر از جمله *Colletotrichum graminicola* (Guthrie *et al*. 1992)، (*F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli* Nelson *et al*. 1997) *F. solani* (Crowhurst *et al*. 1991) مورد استفاده قرار گرفته است. RAPD روشی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) است که در آن الیگونوکلئوتیدهایی با توالی تصادفی به‌عنوان آغازگرهای PCR مورد استفاده قرار گرفته و به این ترتیب تکثیر چندین قطعه از ژنوم موجود به‌طور نمایی (Exponential) آغاز می‌گردد (Gurr 1992). چند شکلی مشاهده شده در روش RAPD ناشی از الحاق (Insertion)، حذف (deletion) و یا جایگزین نوکلئوتیدی می‌باشد. از این روش به‌عنوان ابزار موفقی در بررسی تنوع بین و درون گونه‌های فوزاریوم، یاد شده است (Khalil *et al*. 2003). ابزارهای مولکولی برای توصیف کردن تنوع در بین سویه‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* با هدف تشخیص ارتباط ژنتیکی در بین فرم‌های اختصاصی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kim *et al*. 1993, Kistler *et al*. 1991). به‌نظر *بلابید و همکاران* RFLP و RAPD پتانسیل خوبی برای تعیین دینامیک جمعیت و تکامل جمعیت*F. oxysporum* f. sp. *lentis* را دارند. چرا که دو همسانه‌ی قارچ می‌توانند به‌وسیله اثر نگاری DNA از هم متمایز گردند. در صورتی که به‌وسیله روش‌هایی مانند آزمون بیماری‌زایی و ارزیابی ریخت‌شناسی این عمل امکان‌پذیر نمی‌باشد (Belabid *et al*. 2004). با استفاده از مارکر RAPD نشان داده شد که چه مقدار تنوع بین جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* وجود دارد (Jimienez-Gasco *et al*. 2001). با استفاده از مارکر RAPD

Archive of SID

www.SID.ir

بین جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* جدا شده از نخود تنوع ژنتیکی پایینی مشاهده و جدایه‌ها به سه گروه تقسیم شدند (Singh *et al.* 2006, Jimienez-Gasco *et al.* 2001). پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بیماری (*F. oxysporum*) در مناطق مهم سیب‌زمینی کاری کشور (استان های تهران، اردبیل و همدان) انجام گرفت.

روش بررسی

۱- نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری

نمونه‌برداری از مزارع سیب‌زمینی مناطق اجرای آزمایش با توجه به وسعت سطح زیر کشت آن و انتخاب مزارع به‌صورت تصادفی انجام شد. به این ترتیب که از مناطق عمده سیب‌زمینی کاری هر استان (اردبیل، تهران و همدان) سه منطقه و از هر منطقه پنج مزرعه (حداقل یک هکتاری) و از هر مزرعه تعداد ۱۰ بوته با علائم بیماری پژمردگی انتخاب شد. نمونه‌برداری از زمان گل‌دهی تا اواخر فصل زراعی سه تا چهار بار انجام گرفت. بوته‌های کامل بلافاصله جهت جداسازی عامل بیماری به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

برای جداسازی عوامل بیماری، بوته‌های پژمرده با آب شستشو و با الکل ۷۵ % ضدعفونی سطحی شدند. قطعات کوچک (حدود یک سانتی‌متر) از آوندهای ساقه هوایی، ساقه زیرزمینی و ریشه‌ها در دو تکرار در محیط کشت اختصاصی فوزاریوم (Nash & Snyder 1965) و محیط مرطوب (در تشتک پتری روی کاغذ صافی مرطوب در شرایط سترون) کشت شدند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵±۱ °C حدود یک هفته نگه‌داری و سپس پرگنه‌های قارچها به روش تک اسپور کردن و نوک ریسه خالص‌سازی شدند. جدایه‌ها برای انجام مراحل بعدی در محیط کشت SNA و در دمای پنج درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

همه جدایه‌ها بر پایه ویژگی‌های ظاهری تشخیص داده شدند. این ویژگی‌ها عبارت بودند از: نوع فیالید (مونوفیالید یا پلی‌فیالید)، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، شکل ماکروکنیدیوم‌ها، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم، نحوه قرار گرفتن میکروکنیدیوم (در سرهای کنیدیومی یا به‌صورت زنجیره‌ای یا به هر دو صورت) و رنگ، سرعت رشد و نحوه رشد پرگنه‌ها صورت گرفت. برای شناسایی عمدتاً از گرلاخ و *نیرنبرگ* (Gerlach & Nirenberg 1982) و *نلسون* و همکاران (Nelson *et al.* 1983) استفاده شد.

از میان حدود ۲۰۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* به‌دست آمده از ریشه، طوقه و آوند ساقه بوته‌های سیب‌زمینی با علائم پژمردگی ۷۰ جدایه که با توجه به مناطق و هم‌چنین خصوصیات ریخت‌شناسی آنها همانند شکل و رنگ پرگنه‌ها طبقه‌بندی شده بودند انتخاب و در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفتند. این جدایه‌ها از استان‌های اردبیل (شامل مناطق یونجالو، آقاباقر و نمین)، تهران (شامل مناطق اسلام آباد، فیروزکوه و آبسرد) و همدان (شامل مناطق کبودرآهنگ، کرفس و قهاوند) به‌دست آمدند که مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است.

۲- بررسی شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها

به‌منظور بررسی نحوه بیماری‌زایی و شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها از دو روش آزمون بیماری‌زایی توانایی پوساندگی ریشه و انسداد آوندی جدایه‌ها به شرح زیر استفاده گردید.

۲-۱ بررسی توانایی جدایه‌ها در پوسانیدن ریشه‌های سیب‌زمینی

جدایه‌ها به‌روش تغییر یافته‌ی ترون و هولتز از نظر نحوه بیماری‌زایی و شدت آن بررسی گردیدند (Theron & Holz 1987). بدین منظور از روش آلوده‌سازی خاک گلدان و کشت تک جوانه‌های غده‌ی سیب‌زمینی رقم اگریا و عاری از بیماری که سطح بریده آنها چوب‌پنبه‌ای شده بود استفاده گردید. برای تهیه مایه تلقیح ابتدا یک قطعه به قطر ۱ سانتی‌متر از هر جدایه در ۳۰ گرم پرلیت حاوی محیط مایع Czapek-dox broth سترون در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

قرار داده شد، پس از ۱۰ روز پرگنه قارچ در محیط مزبور کاملاً رشد کرده و سپس درب ارلن‌ها را برداشته تا خشک شوند (Dhingra 1994). مایه تلقیح مزبور به نسبت ۱ به ٦ با ماسه سترون مخلوط گردید. جوانه‌های آماده شده در گلدان‌های به حجم ۱۰ لیتر حاوی خاک سترون کشت گردیدند و ۵ گرم از مایه تلقیح تهیه شده هم زمان با کشت با خاک اطراف تک جوانه‌های چوب‌پنبه‌ای شده مخلوط گردید. تیمار شاهد بدون مایه‌ی تلقیح کشت و گلدان‌ها در شرایط گلخانه در دمای ۲±۲٤ $^{\circ}$C و رطوبت حدود ۷۰ درصد نگه‌داری شدند.

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار انجام شد. تیمارها در مراحل مختلف رویشی گیاه (سبز شدن، گیاهچه، گل‌دهی) هر ۲۰ روز یک بار بررسی و نسبت به یادداشت علائم بیماری بر اساس روش تغییریافته چندرا و همکاران (Chandra *et al.* 1983) از ۰ تا ۵ بر مبنای پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه، مرگ گیاه، پژمردگی و گسترش آنها نمره دهی شدند. داده‌ها پس از تصحیح تجزیه آماری شده و در نهایت به‌روش LSD مقایسه میانگین شدند.

۲-۲- بررسی توانایی جدایه‌ها در انسداد آوندی بوته‌های سیب‌زمینی

به این منظور ریز غده‌های سیب‌زمینی (Mini tuber) رقم اگریا عاری از بیماری در گلدان‌های حاوی پرلیت سترون کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از ریشه دار شدن (حدود ۲۰ روز بعد) گیاهچه‌ها از پرلیت خارج و به تک بوته‌ها تقسیم و سپس به گلدان‌های حاوی پرلیت و پیت منتقل شدند. گلدان‌های حاوی تک بوته‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا طول بوته‌ها حدوداً ۲۰ سانتی‌متر شوند. گیاهچه‌ها هر هفته یک بار با محلول غذایی Hogland's آبیاری شدند (Dhingra 1994).

وقتی بوته‌ها ۲۰ سانتی‌متری شدند از گلدان‌ها خارج و در داخل سوسپانسیون اسپورهای قارچ با غلظت ۱۰۵ اسپور در میلی‌لیتر به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. برای تهیه سوسپانسیون اسپور، جدایه‌های خالص شده به محیط برگ میخک آگار (CLA) منتقل و پس از تشکیل کنیدیوم روی برگ میخک (حدود ۱۵ روز پس از کشت)، یک لوپ از اسپورهای روی برگ به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل و سپس با لام هموسیتومتر تعداد اسپور (شامل ماکروکنیدی و میکروکنیدی) در هر میلی‌لیتر به ۱۰۵ اسپور تنظیم شد. برای تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد.

ریشه‌های تلقیح شده به گلدان‌های حاوی خاک و پرلیت سترون (به نسبت ۱:۲) انتقال داده شدند. ۲٤ ساعت قبل از مایه‌زنی به بوته‌ها استرس خشکی و دمایی (۳۰ درجه سلسیوس) داده شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه در ۱±۲۵ درجه سلسیوس تا زمان ظهور علائم پژمردگی قرار داده شدند. بوته‌ها در روز هفتم و چهاردهم مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور بوته‌های پژمرده از گلدان‌ها خارج و تغییر رنگ آوند ساقه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Venter *et al.* 1992). ارزیابی شدت بیماری بر اساس روش تغییر یافته چندرا و همکاران (Chandra *et al.* 1983) که در جدول ۲ آمده است نمره‌دهی شدند، با این تفاوت که در این روش مقیاس شماره ۵ از جدول فوق‌الذکر حذف و نمره دهی از ٤-۰ انجام شد. داده‌ها پس از تصحیح، با نرم افزار SAS تجزیه آماری و در نهایت با روش LSD مقایسه میانگین شدند. آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ٤ تکرار صورت گرفت.

۳- استخراج DNA برای به‌کارگیری در RAPD-PCR

جدایه‌ها در ظروف ارلن حاوی محیط مایع Czapek-dox broth کشت و در ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱٦ ساعت روشنایی به‌مدت ۷ روز روی شیکر قرار داده شدند. توده‌های تشکیل شده از پارچه ململ سترون عبور داده شده و میسلیوم‌های جمع‌آوری شده در هاون‌های چینی سترون با استفاده از نیتروژن مایع پودر شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج DNA ژنومی طبق روش (Raeder & Broda 1985) انجام شد. در این روش مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از پودرهای به‌دست آمده از میسلیوم قارچ‌ها در لوله های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس ۵۵۰ میکرولیتر بافر استخراج که حاوی SDS (۰/۵%)، EDTA (۲۵ mM)، NaCl (۲۵۰mM)، Tris-HCl (۲۰۰ mM, pH=8/5) بود به آنها اضافه گردید و با نوک سمپلر مخلوط شدند. سپس به‌ترتیب ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر فنول و سپس ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم نیز به آن اضافه و به‌خوبی هم زده شده و لوله ها به‌مدت نیم ساعت در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در ٤ °C سانتریفیوژ گردیدند. به‌منظور حذف RNA به هر لوله ٤ میکرولیتر آنزیم ریبونوکلئاز A (شرکت سیناژن) اضافه و لوله ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس هم اندازه محلول رویی (supernatant) کلروفرم اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مجددا لایه رویی حاصل جمع‌آوری و به نسبت ۰/٥٤ برابر مایع به‌دست آمده ایزوپروپانول سرد اضافه شد سپس لوله ها به‌مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع داخل لوله ها خارج گردید. DNAهای رسوب کرده با اتانول ۷۰% سرد شستشو داده شده و لوله ها حدود دو ساعت در دمای معمولی آزمایشگاه نگه‌داری شدند تا خشک شوند. برای تهیه محلول DNA به‌دست آمده ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر سترون به لوله ها اضافه شد (Raeder & Broda 1985). کیفیت DNA نمونه‌ها به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی و حضور تک باند شفاف با وزن مولکولی بالا، نشانه DNA مطلوب و مناسب تر تلقی گردید. بررسی میزان و غلظت DNA استخراج شده و خلوص آن از طریق اسپکتروفوتومتری انجام گرفت. میزان جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و محاسبه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (BioPhotometer Eppendorf AG,) انجام شد. جهت انجام آزمایش‌های مولکولی، غلظت DNA کلیه نمونه‌ها در حد ۲۵ng/µl تنظیم و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد.

۴- بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های *F. oxysporum* با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* از هفت آغازگر استفاده گردید (جدول ۲). این آغازگرها از میان ۲۰ آغازگر براساس وضوح باند و هم‌چنین تعداد باندهای بیشتر با وضوح بالا انتخاب گردیدند (Singh *et al.* 2006). این آغازگرها توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شدند. تکثیر DNA در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10 x، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (50 mM)، ۰/۷۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs (10 mM)، 10 pmol آغازگر، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک پلی مراز (تهیه شده از شرکت سیناژن) در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی ۲ دقیقه در ٩٤ °C و ۳۵ سیکل شامل ۲ دقیقه در ۹۳ °C، ۱ دقیقه در ۳٦ °C، ۲ دقیقه در ۷۲ °C و افزایش طول قطعات به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ °C انجام شد. یک واکنش به‌منظور کنترل آلودگی بدون افزودن DNA الگو به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. قطعات تکثیر شده در هر واکنش روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE 1x در ولتاژ ۹۰ به‌مدت ۲ ساعت الکتروفورز شد. نتایج به‌دست آمده توسط دستگاه Uvi Doc Gel Documentation Uvi Tec) انگلستان) عکس‌برداری شد (Belabid *et al.* 2004).

۵- تجزیه داده‌ها

به‌منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌های *F. oxysporum* ابتدا باندهای واضح در تصاویر ژل‌ها مشخص شد و داده‌ها به‌صورت حضور باند (۱) و یا عدم حضور باند (۰) در نرم افزار Excel وارد گردید سپس ماتریس تشابه بین جفت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس (Dice's coefficient) در برنامه SIMQUAL با نرم افزار NTSYS-pc 2.01 محاسبه

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲. نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش RAPD-PCR

Table 2. Sequence of the primers used in RAPD-PCR

نام آغازگرها Primer name	توالی آغازگرهای مورد استفاده Primer sequence
OPA-01	5'-CAG GCC CTT C-3'
OPA-04	5'-AAT CGG GCT G-3'
OPB-11	5'-GTA GAC CCG T-3'
OPR-11	5'-GTA GCC GTC T-3'
17S	5'-CCT GGG CCT C-3'
4S	5'-CCT GGG CTG G-3'
34S	5'-CCG GCC CCA A-3'

گردید. با استفاده از برنامه SHAN و روش UPGMA تجزیه خوشه‌ای انجام گردید. سطح تشابه ۷۱ درصد (میانگین تشابه جمعیت جدایه‌های مورد بررسی) محاسبه شده به‌عنوان مبنای تفکیک گروه‌ها در دندروگرام حاصل قرار داده شد.

٦- تعیین هاپلوتیپ‌ها (فنوتیپ‌های مولکولی) در قارچ *F. oxysporum*

برای تعیین تعداد هاپلوتیپ‌هایی (فنوتیپ‌های مولکولی) که درون جمعیت وجود دارند از روش *کولمر* (Kolmer *et al*. 1995) استفاده گردید. در این روش هر جدایه از *F. oxysporum* با یک فنوتیپ مولکولی ۷ رقمی براساس الگوی باندی هر یک از ۷ آغازگری که انتخاب شده‌اند تعیین گردید. هر رقم بیانگر باند مشترکی است که بیشترین فراوانی را در جمعیت داشته و به‌وسیله هر آغازگر برای آن جدایه تولید شده است. به‌عنوان مثال فنوتیپ مولکولی ۱۱۱۲۱۱۲ بیانگر این است که به‌وسیله آغازگرهای ۱ (OPA-01)، ۲ (OPA-04)، ۳ (OPB-11)، ۵ (17S) و ٦ (4S) باندی تولید شده که بیشترین فراوانی را در جمعیت داشته است و لذا شماره ۱ گرفته است و به‌وسیله آغازگرهای ٤ (OPR-11) و ۷ (34S) با توجه به این که بیشترین باند مشترک تشکیل نشده بود باندهای مربوط به دومین الگوی باندی با بیشترین فراوانی (رتبه دوم) در نظر قرار گرفته شد و لذا شماره ۲ به آنها داده شد. بر اساس این نوع نام‌گذاری تعداد هاپلوتیپ‌های مختلف در بین جمعیت ممکن گردید (Kolmer *et al*. 1995).

نتیجه

۱- بررسی توانایی جدایه‌ها در پوسانیدن ریشه بوته‌های سیب‌زمینی

با توجه به نتایج تجزیه آماری جدایه‌ها از نظر شدت پژمردگی ناشی از پوسیدگی ریشه در سطح ۱% اختلاف معنی‌دار داشتند. بر اساس مقایسه میانگین‌ها به‌روش LSD، جدایه‌های Fo65، Fo56 و Fo42 مربوط به استان همدان (به ترتیب متعلق به مناطق کرفس، قهاوند و قهاوند) با بیشترین بیماری‌زایی (۵) در گروه A و جدایه Fo48مربوط به استان تهران (منطقه اسلام آباد) با کمترین توان بیماری‌زایی (۰/۵) در گروه HI قبل از شاهد قرار گرفتند (جدول ۳). در این آزمایش همه جدایه‌ها قابلیت پوسانندگی ریشه را داشتند

۲- بررسی توانایی جدایه‌ها در ایجاد پژمردگی آوندی بوته‌های سیب‌زمینی

تجزیه داده‌ها نشان داد جدایه‌ها از نظر شدت بیماری‌زایی در سطح ۱% اختلاف معنی‌دار از نظر شدت پژمردگی دارند. با توجه به مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD بیشترین شدت پژمردگی (٤) مربوط به جدایه‌های Fo30، Fo39، Fo47، Fo33، Fo41، Fo31، Fo32، Fo35 ، Fo42، Fo28

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۳. مقایسه میانگین‌های شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* با استفاده از روش مایه‌زنی خاک براساس آزمون LSD در سطح ۵%

Table 3. Comparison of disease severity means of *Fusarium oxysporum* isolates using inoculation of soil method based on LSD test at 5%

شدت بیماری‌زایی Disease severity			شدت بیماری‌زایی Disease severity			شدت بیماری‌زایی Disease severity		
گروه Group	میانگین Mean	جدایه‌ها Isolates	گروه Group	میانگین Mean	جدایه‌ها Isolates	گروه Group	میانگین Mean	جدایه‌ها Isolates
DEFGHI	1.5	Fo17	BCDEFG	2.5	F11	A*	5	Fo65
EFGHI	1.25	Fo36	CDEFGH	2.25	Fo3	A	5	Fo42
EFGHI	1.25	Fo32	CDEFGH	2.25	Fo12	A	5	Fo56
EFGHI	1.25	Fo38	CDEFGH	2.25	Fo21	AB	4.25	Fo44
EFGHI	1.25	Fo57	CDEFGH	2.25	Fo31	AB	4.25	Fo51
EFGHI	1.25	Fo58	CDEFGH	2.25	Fo43	ABC	3.5	Fo45
EFGHI	1.25	Fo63	CDEFGH	2.25	Fo52	ABC	3.5	Fo24
FGHI	1	Fo66	CDEFGH	2	Fo50	ABC	3.5	Fo22
FGHI	1	Fo55	CDEFGH	2	Fo40	ABC	3.5	Fo53
FGHI	1	Fo49	CDEFGH	2	Fo37	ABC	3.5	Fo59
FGHI	1	Fo69	CDEFGH	2	Fo8	ABCD	3.25	Fo68
FGHI	1	Fo33	CDEFGH	2	Fo27	ABCD	3.25	Fo29
FGHI	1	Fo34	CDEFGH	2	Fo62	ABCD	3.25	Fo7
FGHI	1	Fo23	CDEFGH	2	Fo64	ABCD	3.25	Fo13
FGHI	1	Fo15	CDEFGH	2	Fo46	ABCD	3.25	Fo14
FGHI	1	Fo26	CDEFGH	2	Fo70	ABCD	3.25	Fo18
FGHI	1	Fo2	CDEFGHI	1.75	Fo10	BCDE	3	Fo35
FGHI	1	Fo4	CDEFGHI	1.75	Fo16	BCDE	3	Fo67
FGHI	1	Fo6	CDEFGHI	1.75	Fo39	BCDEF	2.75	Fo20
GHI	0.75	Fo9	CDEFGHI	1.75	Fo47	BCDEF	2.75	Fo25
GHI	0.75	Fo19	DEFGHI	1.5	Fo60	BCDEFG	2.5	Fo41
HI	0.5	Fo48	DEFGHI	1.5	Fo61	BCDEFG	2.5	Fo28
I	0	شاهد	DEFGHI	1.5	Fo54	BCDEFG	2.5	Fo1
			DEFGHI	1.5	Fo5	BCDEFG	2.5	Fo30

*: Similar letters indicate the same group

* حروف مشترک نشان‌دهنده یک گروه می‌باشند.

و Fo2، Fo29 (۸ جدایه اول مربوط به استان تهران به‌ترتیب متعلق به مناطق فیروزکوه، اسلام آباد، اسلام آباد، فیروزکوه، فیروزکوه، آبسرد، فیروزکوه و آبسرد، جدایه بعدی مربوط به استان همدان متعلق به منطقه قهاوند و ۳ جدایه آخر مربوط به استان اردبیل به‌ترتیب متعلق به مناطق آقاباقر، یونجالو و یونجالو) بود که به اتفاق در گروه A قرار گرفتند (جدول ۴). کمترین شدت پژمردگی (۰/۵) مربوط به جدایه‌های Fo62، Fo70، Fo4، Fo12 و Fo6 به‌ترتیب متعلق به استان‌های اردبیل (منطقه یونجالو)، اردبیل (منطقه نمین)، اردبیل (منطقه آقاباقر)، همدان (منطقه کرفس) و تهران (منطقه فیروزکوه) بودند که در گروه JK و جدایه‌های Fo68 و Fo50 (به ترتیب مربوط به استان همدان منطقه کبودرآهنگ و استان تهران منطقه آبسرد) بیماری‌زا نبود که با شاهد در گروه K قرار گرفتند.

۳- بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. oxysporum* با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* در سه استان تهران، اردبیل و همدان با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کل باندهای تکثیر شده با هفت آغازگر ۴۰ عدد و تعداد کل باندهای پلی مورفیک ۱۹ عدد بود. شکل ۱ نقوش الکتروفورز حاصل از به‌کارگیری

www.SID.ir

جدول۴. مقایسه میانگین‌های شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* به‌روش غوطه‌ور سازی ریشه‌ها در سوسپانسیون اسپور براساس آزمون LSD در سطح ۵%

Table 3. Comparison of disease severity means of *Fusarium oxysporum* isolates using root dip method in spore suspension based on LSD test at 5%

شدت بیماری‌زایی Disease severity			شدت بیماری‌زایی Disease severity			شدت بیماری‌زایی Disease severity		
گروه Group	میانگین Mean	جدایه‌ها Isolates	گروه Group	Isolates	جدایه‌ها Isolates	گروه Group	میانگین Mean	جدایه‌ها Isolates
FGHI	1.5	Fo10	BCD	2.75	Fo44	A*	4	Fo2
GHIJ	1.25	Fo48	BCD	2.75	Fo13	A	4	Fo15
GHIJ	1.25	Fo63	CDE	2.5	Fo45	A	4	Fo28
GHIJ	1.25	Fo66	CDE	2.5	Fo59	A	4	Fo29
HIJ	1	Fo55	DEF	2.25	Fo25	A	4	Fo30
HIJ	1	Fo67	DEFG	2	Fo17	A	4	Fo31
HIJ	1	Fo69	DEFG	2	Fo18	A	4	Fo32
HIJ	1	Fo58	DEFG	2	Fo22	A	4	Fo33
HIJ	1	Fo5	DEFG	2	Fo52	A	4	Fo35
HIJ	1	Fo60	DEFG	2	Fo61	A	4	Fo39
HIJ	1	Fo8	DEFG	2	Fo64	A	4	Fo41
HIJ	1	Fo9	EFGH	1.75	Fo53	A	4	Fo42
HIJ	1	Fo26	EFGH	1.75	Fo23	A	4	Fo47
IJK	0.75	Fo20	EFGH	1.75	Fo24	A	3.75	Fo43
IJK	0.75	Fo51	EFGH	1.75	Fo19	A	3.75	Fo14
Jk	0.5	Fo62	EFGH	1.75	Fo21	A	3.75	Fo3
Jk	0.5	Fo70	EFGH	1.75	Fo11	AB	3.5	Fo1
Jk	0.5	Fo4	FGHI	1.5	Fo49	AB	3.5	Fo16
Jk	0.5	Fo12	FGHI	1.5	Fo56	AB	3.5	Fo34
Jk	0.5	Fo6	FGHI	1.5	Fo57	AB	3.5	Fo37
K	0	Fo68	FGHI	1.5	Fo54	AB	3.5	Fo38
K	0	Fo50	FGHI	1.5	Fo65	AB	3.5	Fo40
K	0	شاهد	FGHI	1.5	Fo27	AB	3.5	Fo46
			FGHI	1.5	Fo7	ABC	3.25	Fo36

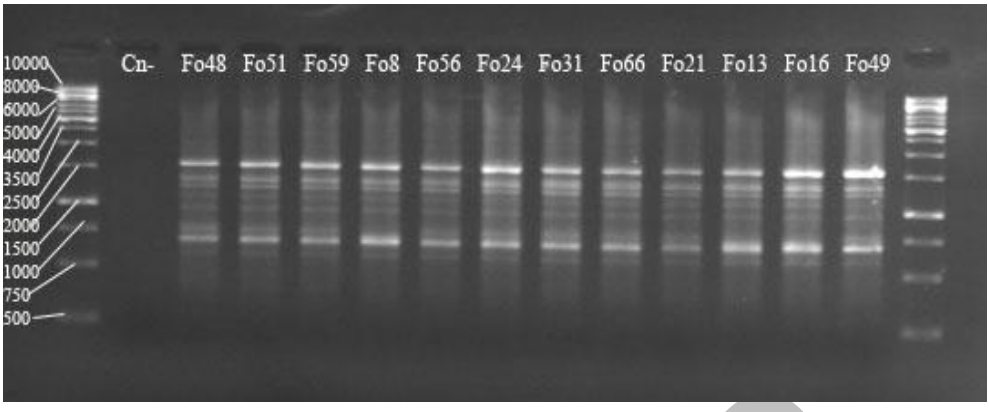
*: Similar letters indicate the same group

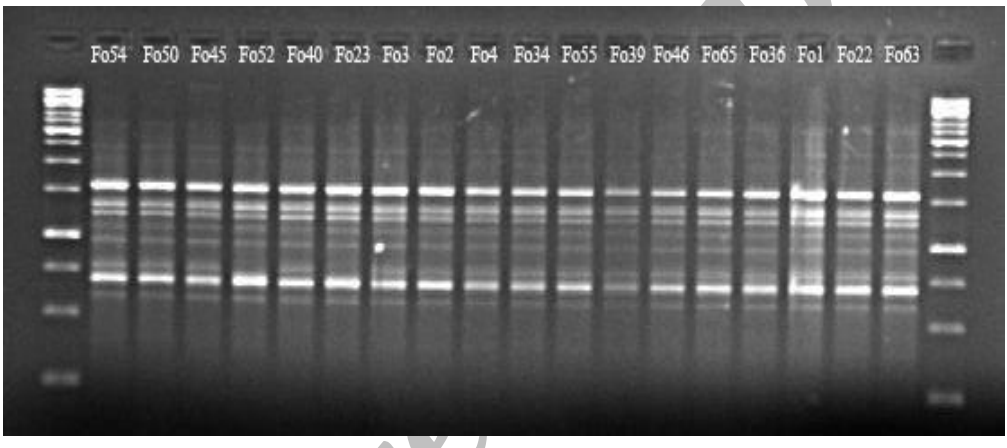
* حروف مشترک نشان‌دهنده یک گروه می‌باشند.

RAPD در بین ۷۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* با استفاده از پرایمر s ٣٤ را نشان می‌دهد. نتیجه تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب دایس (Dice's coefficent) و روش UPGMA نشان داد که جدایه‌های Fo38 و Fo33 جمع‌آوری شده از استان تهران (به ترتیب مناطق اسلام آباد و فیروزکوه) با یک‌دیگر ۱۰۰% تشابه داشته و احتمالاً هر دو جدایه از یک دودمان ژنتیکی می‌باشند. هم‌چنین جدایه‌ی Fo12 به‌دست آمده از استان همدان (منطقه کرفس) با دو جدایه مذکور ۹۵% شباهت داشت. بین جدایه‌های Fo59 و Fo53 به‌دست آمده از استان تهران (منطقه اسلام آباد) و جدایه‌های Fo13 و Fo16 متعلق به استان اردبیل (منطقه آقاباقر) بیش از ٩٦% تشابه وجود داشت. جدایه‌ی Fo64 جمع‌آوری شده از استان اردبیل (منطقه نمین) با جدایه‌های Fo59 و Fo53 متعلق به استان تهران ۹۵% شباهت داشت. جدایه‌های Fo51 و Fo62 متعلق به استان اردبیل (منطقه یونجالو) بیش از ۹۵% با یک‌دیگر شباهت داشتند. جدایه‌های Fo21 و Fo35 جمع‌آوری شده از استان تهران (به ترتیب مناطق فیروزکوه و آبسرد) و هم‌چنین جدایه‌های Fo43 و Fo30 به‌دست آمده از استان‌های اردبیل و تهران (به ترتیب مناطق نمین و فیروزکوه) ۹۵% با یک‌دیگر شباهت داشتند. جدایه‌ی Fo54 جمع‌آوری شده از استان اردبیل (منطقه آقاباقر) کمتر از ٤٥% با سایر جدایه ها شباهت داشت. جدایه‌های Fo70 متعلق به استان اردبیل (منطقه نمین) و Fo60

Archive of SID

www.SID.ir





شکل۱. نقوش الکتروفورز حاصل از انگشت نگاری به‌روش RAPDبین ۷۰ جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* با استفاده از آغازگر s ۳۴ در ژل آگارز ۱/۲ درصد (ستون اول و ستون آخر در هر کدام از تصاویر بالا مارکر استاندارد kb ۱ می‌باشد و بقیه ستون‌ها مربوط به جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* می‌باشد).

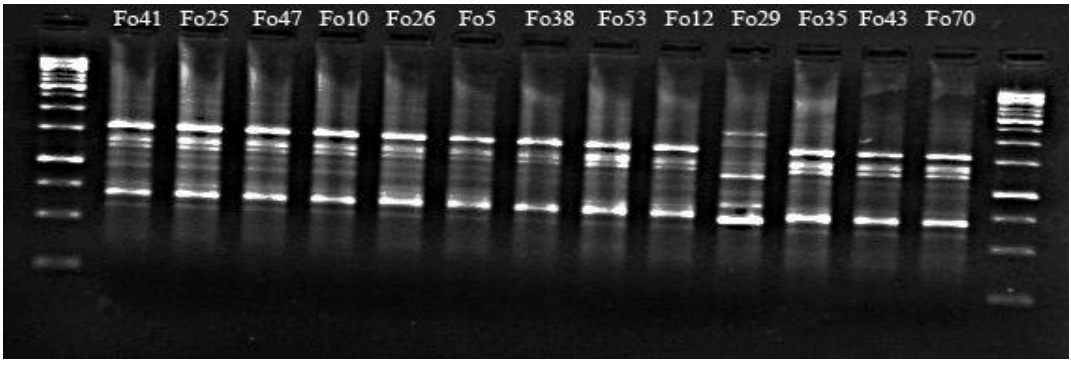
Fig. 1. Electrophoretic patterns of DNA fingerprinting by RAPD marker among 70 isolates of *Fusarium oxysporum* using primer 34s (the first and last column in each figure is 1kb standard marker and the rest of the column related to the *F. oxysporum* islates).

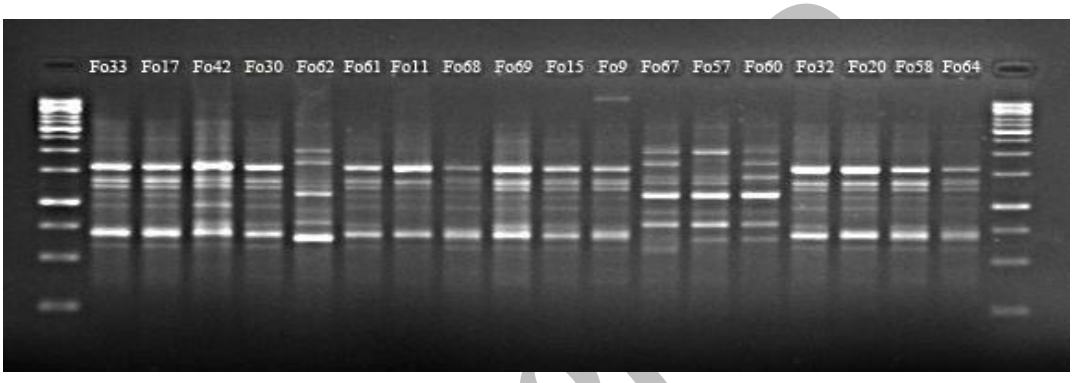
به‌دست آمده از استان اردبیل (منطقه یونجالو) به‌ترتیب کمتر از ۵۵% و ٦۰% با سایر جدایه ها شباهت داشتند. نتایج حاصل از گروه‌بندی براساس RAPD در سطح تشابه ۷۱% (میانگین تشابه جمعیت) ۷۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* را به ۸ گروه تقسیم نمود. از میان جدایه‌های مورد بررسی ٥٤ جدایه در گروه ۱ قرار گرفتند که اکثریت جدایه‌ها را شامل بود. گروه ۳ دارای ٦ عضو و گروه ٤ و ٥ به‌ترتیب ۲ و ٤ عضو و بقیه گروه‌ها تک عضوی بودند (شکل ۲). هم‌چنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ارتباطی بین منشأ جغرافیایی جدایه‌ها با تنوع ژنتیکی آنها وجود نداشته، این دو مستقل از یک‌دیگر می‌باشند

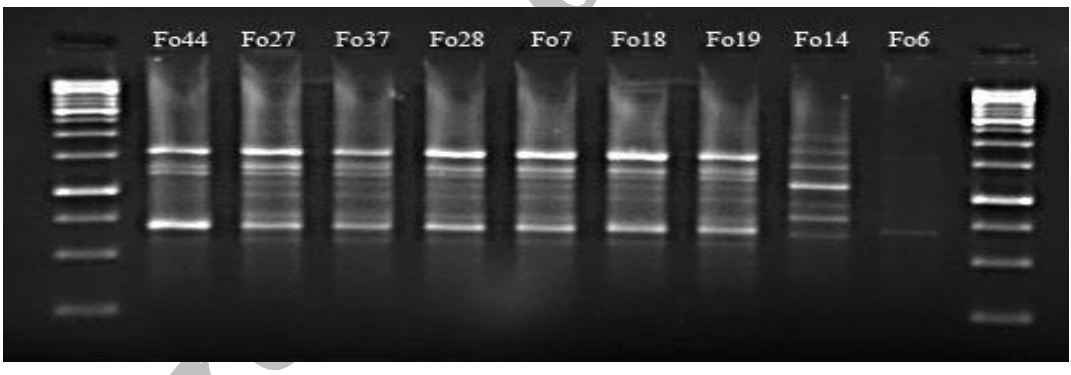
۴- تعیین هاپلوتیپ‌های (فنوتیپ مولکولی) قارچ *F. oxysporum*

تعداد ۱۸ گروه هاپلوتیپ مختلف در کل جمعیت نمونه‌های مورد بررسی شناسایی گردید (جدول ٥). این هاپلوتیپ‌ها براساس فراوانی آلل‌های مشترک به‌دست آمده با استفاده از ۷ آغازگرRAPD (آغازگرهای OPA-01، OPA-04، OPB-11، OPR-11، 17S، 4S و 34S) شناسایی گردیدند. هاپلوتیپ‌ها به‌طور تصادفی در میان مناطق مختلف نمونه‌برداری توزیع شده

www.SID.ir







ادامه شکل۱. نقوش الکتروفورز حاصل از انگشت نگاری به‌روش RAPD بین ۷۰ جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* با استفاده از آغازگر s ۳۴ در ژل آگارز ۱/۲ درصد (ستون اول و ستون آخر در هر کدام از تصاویر بالا مارکر استاندارد kb ۱ می‌باشد و بقیه ستون‌ها مربوط به جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* می‌باشد).

Fig. 1. (continued) Electrophoretic patterns of DNA fingerprinting by RAPD marker among 70 isolates of *Fusarium oxysporum* using primer 34s (the first and last column in each figure is 1kb standard marker and the rest of the column related to the *F. oxysporum* islates).

بودند. در استان تهران از بین ۲٤ جدایه مورد بررسی هشت هاپلوتیپ شناسایی گردید که ۱۳ جدایه هاپلوتیپ مشابه (هاپلوتیپ HP1) داشتند. در استان اردبیل از بین ۲۲ جدایه مورد بررسی شش هاپلوتیپ شناسایی گردید که ۱٤ جدایه دارای هاپلوتیپ مشابه (هاپلوتیپ HP1) بودند. در استان همدان نیز از بین ۲٤ جدایه مورد بررسی هشت هاپلوتیپ شناسایی گردید که ۱۵ جدایه دارای هاپلوتیپ مشابه (هاپلوتیپ HP1) بودند. این نحوه توزیع هاپلوتیپ‌ها

www.SID.ir

جدول۵. گروه‌های هاپلوتیپی شناسایی شده براساس فراوانی آلل‌های مشترک با استفاده از ۷ آغازگر RAPD (آغازگرهای OPA-01، OPA-04، OPB-11، OPR-11، 17S، 4S و 34S) در قارچ *Fusarium oxysporum* جداسازی شده ازسیب‌زمینی، جمع‌آوری شده از استان های اردبیل، همدان و تهران

Table 5. Molecular phenotypes (haplotype) of *Fusarium oxysporum* isolates collected from Ardebil, Hamedan and Tehran provinces based on random RAPD primers (OPA-01, OPA-04, OPB-11, OPR-11, 17S, 4S, 34S)

گروه هاپلوئیدی Haplotype group	فنوتیپ مولکولی (هاپلوتیپ) Molecular phenotype (haplotype)	تعداد در بین جمعیت Numbers within population	تعداد در مناطق Number in locations
HP1	1 1 1 1 1 1 1	42	1a(5)b، 2(5) ، 3(3) ، 4(4) ، 5(6) ، 6(4) ، 7(4) ، 8(6) ، 9(5)
HP2	1 1 2 1 1 1 1	6	2(3) ، 9(2) ، 8(1)
HP3	2 1 2 1 1 1 1	2	8(1) ، 3(1)
HP4	1 1 1 2 1 1 1	1	7(۱)
HP5	1 1 6 1 1 1 1	3	3(1) ، 1(1) ، 9(1)
HP6	1 1 1 1 7 1 1	۱	3(1)
HP7	1 1 1 1 1 7 1	1	1(1)
HP8	3 1 1 3 1 2 1	1	4(1)
HP9	1 1 5 1 1 1 1	1	7(1)
HP10	1 1 5 7 1 1 1	1	7(1)
HP11	1 6 6 1 1 1 1	1	5(1)
HP12	2 4 1 1 1 1 2	1	6(1)
HP13	2 2 1 7 1 2 1	1	4(1)
HP14	1 1 1 3 1 1 1	1	3(1)
HP15	2 6 5 4 1 1 1	1	6(1)
HP16	2 6 6 7 1 1 1	1	3(1)
HP17	2 1 1 4 1 1 1	1	1(1)
HP18	2 1 6 7 1 1 1	1	7(1)

a: اعداد خارج از پرانتز مربوط به مناطق جمع‌آوری جدایه‌هاست. ۱= اسلام آباد، ۲= فیروزکوه، ۳= آبسرد، ٤= یونجالو، ٥= آقاباقر، ٦= نمین، ۷= کبودرآهنگ، ۸= قهاوند و ۹= کرفس می‌باشد.

b: اعداد داخل پرانتز نشانگر فراوانی جدایه‌های مربوط به هاپلوتیپ‌های متعلق به آن منطقه می‌باشد.

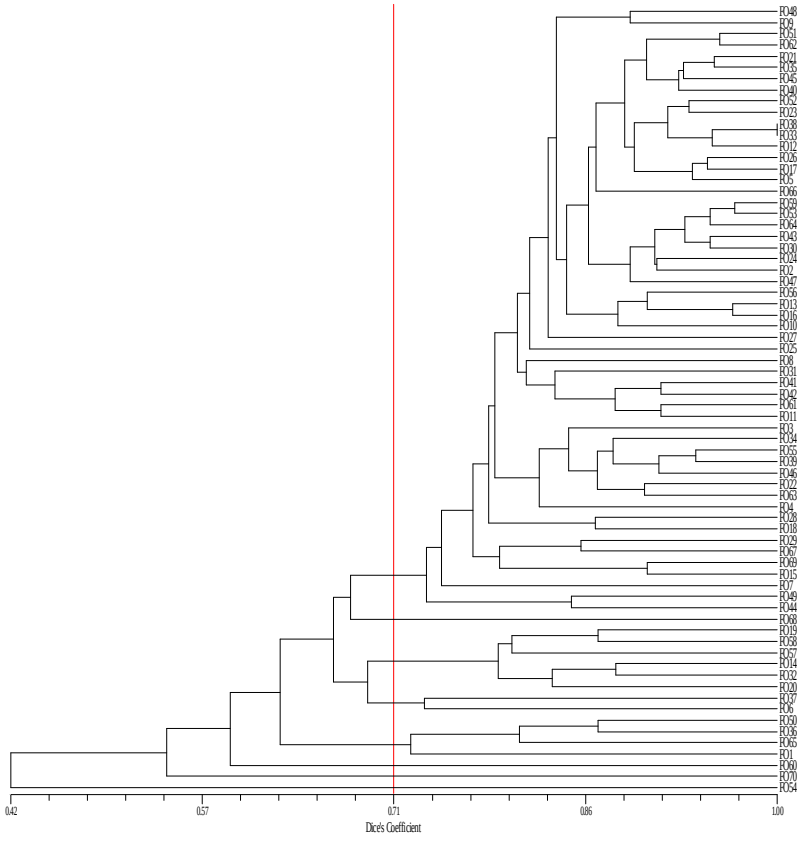
a: Numbers outside of brackets indicate to the location of isolates. 1= Eslam-Abad, 2= Firuzkuh, 3= Absard, 4= Yonjaloo, 5= Aghabagher, 6= Namin, 7= Kaboodarahang, 8= Ghahavand, 9= Karafs.

b: Numbers within brackets shows the number of molecular phenotype within that location.

در میان مناطق مختلف نشان داد که ساختار جمعیت‌های قارچ *F. oxysporum* در مناطق مورد بررسی از تنوع زیادی برخوردار نمی‌باشند. هاپلوتیپ HP1 با داشتن ٦۰ درصد فراوانی، هاپلوتیپ غالب بود و در تمام مناطق مورد بررسی (مناطق اسلام آباد، فیروزکوه، آبسرد، یونجالو، آقاباقر، نمین، کبودرآهنگ، قهاوند و کرفس) پراکنده بود و هاپلوتیپ‌های HP5،HP2 به‌ترتیب با ۸/۵ و ٤/۲ درصد و HP3 با ۲/۸ درصد بیشترین فراوانی را داشتند. فراوانی بقیه هاپلوتیپ‌ها ۱/٤۲ درصد بود که در این گروه‌ها تنها یک جدایه قرار گرفت (جدول ۵). در ضمن از میان ۷۰ جدایه مورد بررسی ۳ جدایه

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲. دندروگرام تشابه ۷۰ جدایه مختلف *Fusarium oxysporum* با استفاده از برنامه UPGMAو ضریب تشابه Dice (خط عمودی نشانگر میانگین تشابه جمعیت جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* جمع‌آوری شده از استان های اردبیل، همدان و تهران می‌باشد).

Fig. 2. Cluster analysis of 70 isolates of *Fusarium oxysporum* using UPGMA program and Dice's coefficient (vertical line shows the similarity means of *Fusarium oxysporum* population collected from Ardebil, Hamedan and Tehran provinces).

Fo57، Fo14، Fo6 به‌دلیل عدم تولید باند با بیشتر آغازگرها در گروه‌های هاپلوتیپی منظور نگردید و از گروه‌بندی حذف شدند.

بحث

عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای سیب‌زمینی می‌باشد. به‌طوری که خسارت قابل توجهی به محصولات مختلف کشاورزی وارد می‌سازد (Karimi 1970).

F. oxysporum از نظر اقتصادی و بهداشتی از مهم‌ترین گونه‌های جنس فوزاریوم بوده و پراکنش جهانی دارد (Gerlach & Nirenberg 1982). در حال حاضر به‌دلیل پیشرفت پژمردگی فوزاریومی در مناطق مهم کشت سیب‌زمینی این بیماری به یکی از مشکلات اساسی تولید سیب‌زمینی تبدیل شده است (Sharifi *et al*. 2006). در بین همه راه‌های کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل یکی از مطمئن‌ترین و اقتصادی‌ترین روش‌های مبارزه با بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌باشد. به‌منظور انتخاب ارقام مقاوم به بیماری نیاز به آگاهی در مورد ماهیت عامل بیماری، چگونگی بیماری‌زایی، شرایط محیطی مناسب برای بیماری‌زایی، تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های قارچ عامل بیماری و احتمال وجود فرم جنسی

Archive
www.SID.ir

قارچ در چرخه‌ی زندگی عامل بیماری در طبیعت می‌باشد.

نتایج این تحقیق بیانگر وجود تنوع در نوع بیماری‌زایی جدایه‌های *F. oxysporum* جدا شده از سیب‌زمینی می‌باشد. اهمیت تنوع در بیماری‌زایی بیمارگرها از زوایای مختلف مورد توجه بیماری شناسان گیاهی و متخصصین اصلاح نباتات می‌باشد. بیماری شناسان به‌دنبال بررسی علل و عوامل تأثیر گذار بر تغییر در بیماری‌زایی بیمارگرها، فراوانی ژن‌های بیماری‌زا از نظر زمانی و مکانی و مطالعه اپیدمیولوژی بیمارگرهای حامل ژن‌های مختلف بیماری‌زا هستند. از طرفی متخصصین اصلاح نباتات تنوع در بیماری‌زایی بیمارگر را به‌دلیل تأثیر آن بر پایداری مقاومت میزبان حائز اهمیت دانسته، شکسته شدن مقاومت ارقام را به این مسأله نسبت می‌دهند (Peever *et al*. 2000). تحقیقات حاضر نشان داد جدایه‌هایی که از قدرت پوساندگی بیشتری برخوردار بودند شدت پژمردگی در آنها کمتر بود هم‌چنین جدایه‌هایی که از توان پژمردگی بالایی برخوردارند قدرت پوساندگی کمتری دارند. ولی با این حال تمامی جدایه‌های بیماری‌زا هم پژمردگی و هم پوسیدگی ایجاد کردند. این امر نشانگر این مطلب می تواند باشد که به‌کارگیری تنها یک روش برای اثبات بیماری‌زایی بیماری پژمردگی کافی نبوده، صرف پوساننده بودن یک جدایه *F. oxysporum* نمی‌تواند دلیل بر عدم قدرت آن جدایه در پژمرده ساختن گیاه باشد و بالعکس. از بین جدایه‌هایی که شدت بیماری‌زایی آنها بررسی گردید جدایه‌های Fo68 و Fo5 ، در آزمون به‌روش غوطه ورسازی ریشه‌ها در سوسپانسیون دارای شدت بیماری‌زایی یکسان با شاهد (۰) بودند و به‌عبارت دیگر این جدایه‌ها پژمردگی آوندی تولید نمی‌کنند ولی از لحاظ پوساندگی ریشه دارای توان بالایی بودند پس می‌توان آنها را به‌عنوان عامل پوسیدگی ریشه به‌شمار آورد. نتایج تحقیقات *ونتر و همکاران* (Venter *et al*. 1992) نیز روی ۳۵ جدایه از *F. oxysporum* f. sp. *tuberosi* نشان داد که در بین پژمردگی فوزاریومی و پوسیدگی ریشه و ساقه سیب‌زمینی ممکن است ارتباطی وجود داشته باشد. جدایه‌های عامل پژمردگی احتمالاً علائم پوسیدگی فوزاریومی انتهایی ساقه را در درون غده‌های سیب‌زمینی القاء می‌نمایند و بالعکس. از جدایه‌هایی که هم دارای قدرت زیاد پوسانیدن غده و هم دارای قدرت پوسانیدن ریشه می‌باشند، نظیر Fo13 و Fo18 می‌توان در برنامه‌های انتخاب ارقام مقاوم سیب‌زمینی استفاده نمود. بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های قارچ *F. oxysporum* با استفاده از نشانگر RAPD نشان داد که جمعیت‌های قارچ عامل بیماری در مناطق مورد بررسی در ایران از تنوع ژنتیکی پایینی برخوردارند. *نلسون* و همکاران (Nelson *et al*. 1997) تنوع ژنتیکی ۲۰۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli* جمع‌آوری شده از ۱۰ منطقه مختلف در پرو را بررسی نمودند که نتایج بیانگر وجود تنوع کم ژنتیکی در بین جدایه های قارچ مزبور بود.

براساس فراوانی آلل‌های شناسایی شده توسط نشانگر RAPD تعداد ۱۸ هاپلوتیپ در ۷۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* شناسایی شد که هاپلوتیپ HP1 بیشترین فراوانی را داشت و به‌عنوان هاپلوتیپ غالب در جمعیت تعیین گردید. با توجه به این که این هاپلوتیپ (HP1) در چند منطقه وجود داشت از این هاپلوتیپ در صورتی که دارای قدرت بیماری‌زایی بالایی باشد می‌توان در انتخاب ارقام مقاوم یا متحمل برای آن مناطق استفاده نمود که با توجه به نتایج به‌دست آمده، جدایه‌های Fo35، Fo40، Fo38، Fo33، Fo43، Fo30، Fo2، Fo47، Fo16، Fo31، Fo41، Fo42، Fo3، Fo34، Fo39، Fo46، Fo28، Fo29، Fo15، Fo14، Fo32، Fo37، Fo36، Fo1 که بیشترین شدت بیماری‌زایی را به‌خصوص از لحاظ پژمردگی داشتند در این هاپلوتیپ قرار گرفتند. چن و مک *دونالد* (Chen & McDonald 1996) با استفاده از RFLP بین ۶۷۳ جدایه قارچ *Mycosphaerella graminicola* جمع‌آوری شده از یک مزرعه در ایالت اورگون آمریکا ۶۱۷ هاپلوتیپ شناسایی کردند که نشانگر وجود تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت قارچ عامل بیماری در منطقه فوق می‌باشد. این محققین

www.SID.ir

نتیجه‌گیری نمودند که تنوع ژنتیکی زیاد در منطقه فوق احتمالاً به‌دلیل تولید مثل جنسی قارچ می باشد. در تولید مثل جنسی کراسینگ اور (Crossing over) در ایجاد تنوع ژنتیکی اهمیت زیادی دارد و با ایجاد افراد نوترکیب در یک جمعیت، تنوع ژنتیکی آن جمعیت افزایش می یابد. در تولید مثل پرا جنسی (Parasexual reproduction) با کاهش احتمال سازگاری رویشی بین جدایه‌ها در حالت تصادفی، تنوع در جمعیت کاهش می‌یابد. در این حالت احتمال به‌وجود آمدن افراد با تنوع ژنتیکی جدید بسیار کم است(Bowden & Leslie 1992). لذا می‌توان تنوع محدود ژنتیکی در بین جدایه‌های مورد آزمون را به پدیده پرا جنسیت نسبت داد. در نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *F. oxysporum* با استفاده از نشانگرهای RAPD با توجه به خط برش در سطح شباهت ۷۱ درصد ۸ گروه ژنوتیپی شناسایی شد که اغلب جدایه هایی که در گروه ۱ قرار گرفتند از لحاظ فنوتیپی در گروه هاپلوتیپی ۱ یا HP1 که گروه غالب از لحاظ فنوتیپی بود قرار گرفتند. اعضای گروه ۳ هر کدام در یک گروه هاپلوتیپی قرار داشتند. اعضای گروه ۵ نیز همگی جز گروه هاپلوتیپی غالب یا HP1 بودند به جز Fo50 که در گروه هاپلوتیپی HP5 قرار گرفت. گروه‌های دیگر نیز اغلب تک عضوی بودند که هر کدام در یک گروه هاپلوتیپی قرار می‌گرفتند. بنابراین می‌توان گفت که گروه‌بندی براساس RAPD با گروه‌بندی هاپلوتیپی یا فنوتیپی جدایه‌ها تا حد زیادی هم خوانی داشته و تا حدودی می‌تواند جدایه‌ها را از یکدیگر متمایز نماید.

جدایه‌های *F. oxysporum* جمع‌آوری شده از یک منطقه اغلب الگوی باندی RAPD متفاوتی داشتند. بنابراین در بین منطقه جغرافیایی و تنوع ژنتیکی جدایه ها ارتباطی مشاهده نگردید. *کیم و همکاران* (Kim *et al*. 1993) و *کسلر و همکاران* (Kistler *et al*. 1987) تنوع ژنتیکی *F. oxysporum* را با استفاده از نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند نتایج این تحقیق نشان داد که ارتباطی بین چند شکلی و منطقه جغرافیایی در قارچ *F. oxysporum* وجود ندارد.

جدایه های قارچ *F. o. f. sp.* f. sp. *cucumerinum*عامل پژمردگی خیار که دارای علائم پژمردگی بودند با استفاده از گروه های سازگاری رویشی (VCG) و RAPD گروه‌بندی شدند (Najafinia & Sharma 2008). آنها ۵۰ جدایه قارچ مزبور را از لحاظ VCG به ۸ گروه تقسیم بندی نموده و با استفاده از نشانگر RAPD این جدایه‌ها را به ٤ گروه اصلی تقسیم بندی نمودند. هم‌چنین آنها نشان دادند هیچ رابطه‌ای بین گروه‌بندی RAPD و نواحی جغرافیایی جدایه‌ها وجود ندارد.

با توجه به تعداد اندک گروه بندی به‌دست آمده در سطح تشابه ۷۱ درصد می توان گفت جدایه ها از یک منبع اجدادی منشأ گرفته اند که یکی از علل این امر را می توان به نقش ضعیف تولید مثل جنسی در این قارچ نسبت داد. از طرفی چون *F. oxysporum* در سیب‌زمینی بذرزاد (غده زاد) یا همراه بذر می‌باشد (Powelson *et al*. 1993) می توان تنوع ژنتیکی اندک را به استفاده از بذرهای بومی در سطح استان‌ها و انتقال این غده ها از شهری به شهر دیگر نسبت داد که این امر با نتایج سایر پژوهشگران در بعضی موارد مطابقت دارد (Katan *et al*. 1991, Fiely *et al*. 1995).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر ارتباطی بین بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی قارچ *F. oxysporum* مشاهده نگردید. تحقیقات روی سویه‌های *F. oxysporum* جدا شده از لوبیای معمولی در اسپانیا نشان داد که بین بیماری‌زایی و نشانگر RAPD ارتباطی وجود ندارد (Fernando *et al*. 2001). عدم ارتباط بین بیماری‌زایی جدایه‌های *F. oxysporum* و تنوع ژنتیکی آن با استفاده از نشانگر RAPD در این تحقیق و تحقیقات مشابه را می توان به‌دلیل تصادفی بودن آغازگرها نسبت داد، زیرا به‌دلیل انتخاب تصادفی این آغازگرها ممکن است نواحی از ژنوم قارچ تکثیر پیدا کند که ارتباطی با ژن بیماری‌زایی نداشته باشد هم‌چنین استفاده از تعداد محدودی آغازگر یکی دیگر از این دلایل می‌تواند باشد که امکان برقراری ارتباط بین بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌ها میسر نگردید بنابراین به‌نظر می‌رسد استفاده از نشانگرهایی نظیر RFLP و SCAR می‌تواند

Archive of SID

www.SID.ir

در بررسی تکمیلی تنوع ژنتیکی این قارچ و گروه‌بندی دقیق‌تر آن مؤثر باشند. در ضمن با توجه به قدمت طولانی کشت سیب‌زمینی در استان‌های مورد بررسی در این تحقیق تکامل هم‌زمان میزبان _ بیمارگر (Host-pathogen coevolution) ممکن است تنوع ژنتیکی نسبی را در قارچ‌های آلوده کننده این جنس به‌وجود آورند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (3-5) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir