مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *Fusarium solani* جدا شده از سیب‌زمینی، کدوئیان، لوبیا و نخود براساس نشانگر FAFLP*

STUDY ON GENETIC STRUCTURE OF *Fusarium solani* POPULATIONS ISOLATED FROM POTATO, CUCURBIT, BEAN AND CHICKPEA BASED ON FAFLP MARKERS*

مجتبی مرادزاده اسکندری[۱]**، محمد جوان نیکخواه[۲]، رسول زارع[۳]، سید محمود اخوت[۲]، آنتونیو مورتی[۴]، استفانیا سوما[۴] و گتانو استئا[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۵/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۰/۲)

چکیده

به‌منظور مطالعه ساختار ژنتیکی *Fusarium solani* با استفاده از نشانگر مولکولی FAFLP، ۱۴۹ جدایه ایرانی این قارچ از چهار جمعیت میزبانی مورد آزمایش قرار گرفت. جدایه‌های مذکور شامل ۶۰ جدایه به‌دست آمده از سیب‌زمینی، ۳۰ جدایه *F. solani* f.sp. *cucurbitae*، ۲۹ جدایه *F. solani* f.sp. *phaseoli* و ۳۰ جدایه *F. solani* f.sp. *pisi* بودند. پس از استخراج DNA، هضم آنزیمی، اتصال قطعات برش یافته به آداپتورها و تکثیر پیش‌انتخابی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از سه ترکیب آغازگر نشاندار شده با رنگ‌های فلورسانت انجام شد. قطعات تکثیر شده از طریق الکتروفورز موئین (Capillary electrophoresis) تفکیک و سپس تجزیه و تحلیل براساس ۱۵۱ نشانگر چند شکل انجام شد. به‌طور کلی، از مجموع تنوع ژنتیکی مشاهده شده، ۹۲٪ مربوط به تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌های میزبانی و ۸٪ مربوط به تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها بود. شباهت ژنتیکی بین چهار جمعیت میزبانی مذکور، بیشتر از ۹۲٪ بود. میانگین تنوع ژنتیکی دیده شده در جمعیت‌های مربوط به جدایه‌های سیب‌زمینی، کدوئیان، لوبیا و نخود به ترتیب ۰/۳۴۳۱، ۰/۳۷۹۲، ۰/۳۶۱۹ و ۰/۳۶۰۶ بود. میانگین تنوع ژنتیکی برای همه جدایه‌های مورد بررسی و تمامی جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه براساس ضریب Nei، ۰/۳۸۸۳ بود و تنوع ژنتیکی مشاهده شده ارتباطی با میزبان و منطقه جغرافیایی جدایه‌ها نداشت. نتایج نشان داد چهار جمعیت مذکور یک دودمان کلونی(Clonal lineage) هستند. نزدیکی ژنتیکی بین جمعیت‌ها احتمال وجود جریان ژنی بین آنها را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *Fusarium solani*، تنوع ژنتیکی، جریان ژنی، فلورسانت، فرم اختصاصی

---

* : بخشی از رساله دکتری نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: eskandari_2002@yahoo.com

۱. مربی پژوهشی بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

۲. به ترتیب دانشیار و استاد بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۳. استاد بیماری‌های گیاهی ، بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

۴. به ترتیب محققان و تکنسین مؤسسه علوم مواد غذایی، انجمن ملی تحقیقات ایتالیا، باری

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

قارچ .Sacc (Mart.) *Fusarium solani* خاکزاد بوده، پراکنش جهانی دارد و دارای تعداد زیادی میزبان از ۶۶ تیره گیاهی است. این قارچ سبب ایجاد بیماری‌های گیاهی متنوعی مثل پژمردگی، بلایت و پوسیدگی‌های میوه، ریشه و ساقه می‌شود. قارچ مذکور عمدتاً سبب پوسیدگی ریشه در تعداد زیادی از محصولات استراتژیک می‌شود. هم‌چنین اعضای این گونه مرکب، مسئول حدود دوسوم بیماری‌های فوزاریومی انسان و سایر جانوران هستند (Booth 1971, Domsch *et al*. 1980& O'Donnell *et al*. 2008).

قارچ *F. solani* یک گونه مرکب می‌باشد و مطالعه فیلوژنی مولکولی آن سبب تشخیص ۲۶ گونه مشخص فیلوژنتیکی شد. در میان این ۲۶ گونه، نه فرم تخصص‌یافته این قارچ وجود داشتند که هر یک از آنها به‌عنوان یک گونه معین فیلوژنتیکی تشخیص داده شدند. از آنجایی که در حال حاضر برای این گونه‌ها صفات مورفولوژیکی قابل تفکیک وجود ندارد، این گونه‌ها رسماً نام‌گذاری نشده‌اند و در منابع به‌عنوان *F. solani* یا فرم‌های تخصص یافته این گونه مورد مطالعه قرار می‌گیرند (O'Donnell 2000).

جدایه‌های قارچ *F. solani* از نظر بیماری‌زایی متفاوت هستند و محدوده فعالیت آنها از غیر بیمارگر تا بیمارگرهای قوی می‌باشد. استرین‌های بیمارگر گیاهی این گونه، براساس دامنه میزبانی به گروه‌هایی تقسیم می‌شوند. هر کدام از این گروه‌ها بر اساس بیماری‌زایی تحت عنوان یک فرم تخصص‌یافته شناخته می‌شوند. تاکنون ۱۱ فرم تخصص‌یافته در این گونه شناسایی شده است (Suga *et al*. 2002).

به‌طور سنتی، تشخیص فرم‌های تخصص یافته قارچ *F. solani* براساس شکل ماکروکنیدی، تخصص میزبانی و اختصاصی بودن آزمون‌های آمیزشی (Mating test) بوده است. البته تنها راه تشخیص بدون ابهام، آن هم فقط در مورد فرم‌های تخصص یافته‌ای که تولید مثل جنسی آنها امکان پذیر بود استفاده از آزمون‌های آمیزشی و در نظر گرفتن جمعیت آمیزشی (Mating population) اختصاصی هر فرم تخصص یافته بوده است (Matuo & Snyder 1973).

آنالیز فیلوژنتیکی استرین‌های متعلق به ۱۰ فرم تخصص‌یافته قارچ *F. solani* نشان داد که مقایسه توالی ناحیه ITS-rDNA فرم‌های مذکور را به استثنای *F. s.* f.sp. *pisi*، *F. s.* f.sp. *cucurbitae* و *F. s.* f.sp. *radicicola* از یکدیگر متمایز می‌کند. ضمناً این تحقیق نشان داد که هیچ همبستگی بین شکل ماکروکنیدی و ارتباط خویشاوندی این فرم‌های تخصص‌یافته وجود ندارد (Suga *et al*. 2000).

سازمان دهی ژنوم ۲۲ استرین مربوط به هفت فرم تخصص‌یافته قارچ *F. solani* از طریق PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) و نقشه یابی ژنی (Gene mapping)، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. توجه به الگوی نوارهای کروموزومی روی ژل نشان داد که هر استرین یک الگوی متفاوت نسبت به بقیه استرین‌ها داشته و این حتی در مورد اعضای یک فرم تخصص‌یافته نیز مشاهده می‌شود. در این تحقیق، چند شکلی طولی کروموزوم (Chromosome Length Polymorphism, CLP) برای استرین‌های فرم‌های تخصص یافته *F. solani* مشاهده شد (Suga *et al*. 2002).

نشانگرهای AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) برای نشان دادن تنوع ژنتیکی پنهان استرین‌ها و گونه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

نزدیک به‌هم، که از طریق صفات مورفولوژیکی یا سایر روش‌های مولکولی امکان‌پذیر نیست، مورد استفاده می‌باشند. بنابراین، AFLP کاربرد تاکسونومیکی وسیعی داشته و در مورد تشخیص تنوع ژنتیکی و آنالیز ساختار جمعیتی جنس‌های کمپلکس مثل فوزاریوم، مفید می‌باشد. استفاده از روش انگشت نگاری AFLP درجه بالایی از تمایز و تشخیص گونه‌های فوزاریوم نشان داده و این قابلیت، کاربردی و مفید می‌باشد (Muller & Wolfenbarger 1999).

در روش FAFLP (Fluorescent AFLP) تعداد زیادی قطعات برش‌خورده از سراسر ژنوم، تکثیر و نشاندار (Labeled) شده و سپس این قطعات در یک دستگاه توالی‌یاب (Sequencer) تفکیک و اندازه قطعات مشخص می‌شود (Grady *et al.* 2000).

در یک تحقیق با استفاده از AFLP تنوع ژنتیکی بین و داخل گونه‌های فوزاریوم از میزبان‌های مختلف در مصر ردیابی شده است. در این تحقیق ۴۶ جدایه از فوزاریوم متعلق به پنج گونه متفاوت از یکدیگر متمایز شد و کلیه جدایه‌ها در ۵ کلاستر قرار گرفتند که حدود ۳۰٪ با هم شباهت داشتند. هیچ رابطه روشنی بین منشا جغرافیایی و ژنوتیپ میزبان با کلاسترهای ایجاد شده در این آزمایش وجود نداشت (Abdel-Satar *et al.* 2003).

اهمیت برخی از فرم‌های تخصص‌یافته گونه مرکب *F. solani*، از نظر خسارت وارده به محصولات کشاورزی، تنوع زیاد بیماری‌زایی جدایه‌های این قارچ، ابهام در تخصص میزبانی فرم‌های مختلف این قارچ و وجود توام فرم‌های مختلف این قارچ روی یک میزبان این انگیزه را به وجود آورد که ساختار ژنتیکی جدایه‌های به‌دست آمده از سیب‌زمینی، گیاهان جالیزی، نخود و لوبیا به‌عنوان تعدادی از میزبان‌های مهم این قارچ در ایران، براساس انگشت‌نگاری DNA از طریق FAFLP بررسی و مقایسه گردد. پرواضح است که برنامه‌ریزی علمی جهت کنترل این گونه مرکب در عرصه کشاورزی، بدون حصول اطلاعات دقیق در مورد اجزای آن، امکان پذیر نخواهد بود.

روش بررسی

در این بررسی ۱۴۹ جدایه قارچ *F. solani* از میزبان‌های متفاوت مورد مطالعه قرار گرفت. در بین این جدایه‌ها، ۶۰ جدایه *F. solani* از سیب‌زمینی، ۳۰ جدایه *F. s.* f.sp. *pisi* از نخود، ۳۰ جدایه *F. s.* f.sp. *cucurbitae* از کدوئیان و ۲۹ جدایه *F. s.* f.sp. *phaseoli* از لوبیا، وجود داشتند. این جدایه‌ها از مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی، خراسان جنوبی، فارس، تهران، همدان و اردبیل جمع آوری شدند.

به‌منظور تهیه میسلیوم قارچی برای استخراج DNA، مقدار کمی از میسلیوم جدایه‌های قارچی رشد داده شده روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) به ظرف‌های ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط غذایی مایع ویکرهام (Wickerham's medium) (گلوکز ۴۰ گرم، پپتون ۵ گرم، عصاره مخمر ۳ گرم، عصاره مالت ۳ گرم و آب مقطر تا یک لیتر) منتقل شد. ظرف‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور (۱۲۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ °C) قرار داده شدند.

استخراج DNA جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج دی ان آ پرومگا (Promega) (Wizard ® Magnetic DNA Purification System) و مطابق با دستورالعمل کیت مذکور انجام شد.

به‌منظور انجام FAFLP، ۱۰ نانوگرم DNA از هر جدایه قارچی توسط آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Mse*I مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و سپس اتصال قطعات برش

Archive of SID

www.SID.ir

یافته به آداپتورهای اختصاصی مربوطه انجام شد. واکنش‌های هضم آنزیمی و اتصال آداپتورها به‌صورت هم‌زمان و در دمای ۲۵°C به‌مدت یک شب انجام شد. تکثیر پیش انتخابی (Preselective amplification) (۷۲°C به‌مدت ۲ دقیقه، ۲۰ چرخه شامل ۹۴°C به‌مدت ۲۰ ثانیه، ۵۶°C به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۲ دقیقه) با واکنشی به حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به‌منظور انجام واکنش تکثیر انتخابی (Selective amplification)، ۱/۵ میکرولیتر از محصول واکنش تکثیر اولیه که به‌میزان ۲۰ : ۱ رقیق شده بود، در واکنشی به حجم ۱۰ میکرولیتر تکثیر شد. برای واکنش تکثیر انتخابی از سه ترکیب آغازگر شامل *Eco*RI+AT - *Mse*I+CG، *Eco*RI+G - *Mse*I+CT و *Eco*RI+AC - *Mse*I+CC استفاده شد. آغازگرهای *Eco*RI با رنگ‌های مختلف فلورسنت (Fluorescent dye) نشاندار شده بودند. انتخاب آغازگرها و روش آزمایش بر مبنای تحقیقات انجام شده توسط *سوسکا* و *همکاران* (Susca *et al.* 2002) انجام شد. برنامه واکنش تکثیر انتخابی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه (Primary denaturing) در دمای ۹۴°C برای دو دقیقه و یک چرخه در دمای ۹۴°C به‌مدت ۲۰ ثانیه، ۶۶°C به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۲ دقیقه بود. سپس چرخه مزبور به تعداد نه بار تکرار شد، به این صورت که در هر چرخه از دمای مرحله اتصال (Annealing) یک درجه کم شد به‌طوریکه از ۶۵°C به ۵۷°C رسید. سپس ۲۰ چرخه ۹۴°C به‌مدت ۲۰ ثانیه، ۵۶°C به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۲ دقیقه و یک مرحله بسط (Extension) نهایی در دمای ۶۰°C به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. واکنش‌های تکثیر اولیه و انتخابی با استفاده از ماشین PCR مدل 9700 GeneAmp PCR System انجام شد.

پس از تکثیر انتخابی، یک میکرولیتر از محصول تکثیری با ۲۰ میکرولیتر فرمامید (Formamide) و ۰/۵ میکرولیتر نشانگر استاندارد راکس (GeneScan-500_(Rox) Size standard) که حاوی قطعاتی به‌طول ۳۵ تا ۵۰۰ جفت باز می‌باشد، مخلوط شد. مخلوط به‌مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار گرفت. قطعات DNA تکثیر شده از طریق الکتروفورز موئین (Capillary electrophorsis) در یک ماشین ABI PRISM 310 Genetic Analyser از یکدیگر جدا شدند .سپس، با نرم‌افزار Genescan collection version 3.1.2، الگوی به‌دست آمده استخراج و انگشت نگاری‌ها با نرم‌افزار Genotyper مورد تجزیه قرار گرفت. اطلاعات به‌صورت ماتریس دوتایی (یک به منزله وجود نوار DNA یا peak و صفر به منزله عدم حضور نوار یا پیک) استخراج شد. سپس داده‌ها در نرم‌افزار Excel وارد و جهت تجزیه و تحلیل به نرم‌افزار Pop-gene 32 منتقل شد. از این نرم‌افزار به‌منظور تعیین میزان چند شکلی در هر جمعیت میزبانی و در تمام جدایه‌ها استفاده شد. برای استفاده از این نرم‌افزار، جدایه‌های موجود در هر جمعیت میزبانی با هم و تحت یک عنوان در یک گروه قرار گرفتند و شاخص‌هایی چون ne (متوسط تعداد الل موثر در هر جایگاه ژنی)، na (تعداد الل مشاهده شده در هر جایگاه ژنی) و h (تنوع ژنی) برای چهار جمعیت میزبانی مورد آزمایش به‌طور جداگانه و هم‌چنین برای کل جدایه‌ها، به‌دست آمد.

با توجه به حضور یا عدم حضور نوارهای DNA، فاصله ژنتیکی بین جدایه‌ها، با استفاده از ضریب نی (Nei, 1978) محاسبه و بدین ترتیب ماتریس فاصله ژنتیکی بین جدایه‌ها تهیه شد. به‌منظور انجام تجزیه خوشه‌ای (Cluster analysis) با روش UPGMA، داده‌های موجود در نرم‌افزار Excel به نرم‌افزار

Archive of SID

www.SID.ir

Ntsyspc 2.0 منتقل شد. ماتریس شباهت ژنتیکی حاصل از این نرم‌افزار جهت تعیین دوری و نزدیکی مورد استفاده قرار گرفت.

در تجزیه واریانس مولکولی (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) که با نرم‌افزار GeneAlex 6.1 انجام گرفت، اجزای واریانس محاسبه و سهم هر یک از آنها در تنوع کل تعیین شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق با استفاده از FAFLP یک انگشت نگاری DNA حاوی اطلاعات مفید با کیفیت خوب تولید شد. تجزیه ۱۴۹ جدایه *F. solani* با استفاده از سه جفت آغازگر، در مجموع ۱۵۱ نوار DNA چند شکل (نشانگر چند شکل) ایجاد کرد که اندازه آنها بین ۷۵ تا ۵۰۰ جفت باز بود. میانگین تعداد نوارهای چند شکل تکثیر شده به ازای هر جفت آغازگر، ۵۰/۳ بود. برای ترکیب‌های آغازگر *Eco*RI+AC-*Mse*I+CC، *Eco*RI+AT-*Mse*I+CG و *Eco*RI+G-*Mse*I+CT به‌ترتیب ۴۲، ۴۳ و ۶۶ نوار DNA چند شکل شناسایی شد.

میانگین تنوع ژنی، میزان چند شکلی، میانگین تعداد آلل مشاهده شده و متوسط تعداد الل موثر در هر جایگاه ژنی، با استفاده از نرم‌افزار Pop-gene 32 به‌دست آمد که در جدول ۱ آمده است.

میانگین تنوع ژنی که شاخصی از تنوع ژنتیکی می‌باشد در مجموع ۱۴۹ جدایه مورد آزمون برابر با ۰/۳۸۸۳ بود. این تنوع برای جایگاه‌های ژنی مختلف بین ۰/۲۶۵ تا ۰/۵ متغیر بود. میانگین تنوع ژنی مشاهده شده برای جمعیت‌های مربوط به جدایه‌های سیب‌زمینی، کدوئیان، لوبیا و نخود به ترتیب ۰/۳۴۳۱، ۰/۳۷۹۲، ۰/۳۶۱۹ و ۰/۳۶۰۶ محاسبه گردید. تنوع ژنتیکی مشاهده شده بین جدایه‌ها ارتباطی با منشاء میزبانی و جغرافیایی جدایه‌ها نداشت.

مقایسه دو به دو جمعیت‌های میزبانی براساس ضریب نی نشان‌دهنده میزان شباهت و فاصله ژنتیکی آنها می‌باشد (جدول ۲). همانطور که مشاهده می‌شود شباهت ژنتیکی جمعیت‌های جدایه‌های میزبان‌های مختلف مورد مطالعه در این بررسی، بیشتر از ۹۲٪ است. در عین حال فاصله ژنتیکی جمعیت جدایه‌های سیب‌زمینی با سایر جمعیت-های میزبانی بیشتر از همه می‌باشد و حداکثر شباهت بین جمعیت‌های جدایه‌های کدوئیان و لوبیا مشاهده می‌شود. در شکل شماره یک فاصله ژنتیکی این چهار جمعیت میزبانی براساس ضریب نی به‌صورت دندروگرام آمده است.

در تجزیه واریانس مولکولی که با نرم‌افزار GeneAlex 6.1 انجام شد، این امکان وجود دارد تا اجزای واریانس محاسبه و سهم هر یک از آنها در تنوع کل تعیین شود. نتایج این تجزیه نشان داد که در مجموع سهم تنوع درون جمعیت‌ها از تنوع بین آنها بیشتر است (جدول ۳). به‌طور کلی از مجموع تنوع ژنتیکی مشاهده شده، ۹۲٪ مربوط به تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها و فقط ۸٪ مربوط به تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌باشد.

تجزیه خوشه‌ای (Cluster analysis) با استفاده از نرم‌افزار Ntsyspc 2.0 و با روش UPGMA انجام شد و نشان داد که ۱۴۹ جدایه مورد آزمون در ضریب تشابه ۷۰٪ در ۲۰ گروه ژنوتیپی قرار می‌گیرند. در ضرایب تشابه کمتر این گروه‌ها با هم ادغام شده به‌طوریکه در ضریب تشابه ۴۶٪ همه جدایه‌ها در سه گروه اصلی قرار می‌گیرند. بین این گروه‌ها و منشا میزبانی و جغرافیایی جدایه‌ها ارتباطی وجود نداشت. در گروه‌های ژنوتیپی به‌دست آمده،

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. خلاصه آمار تنوع ژنی کل جایگاه‌های ژنی مورد بررسی برای جدایه‌های *F. solani* از چهار جمعیت میزبانی

Table 1. Summary of Genic Variation Statistics for All Loci

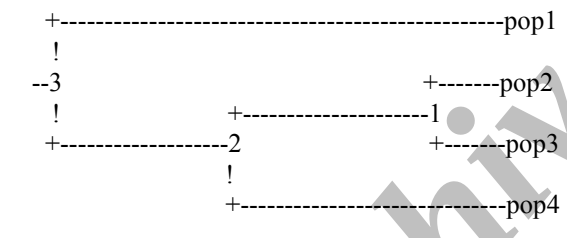
Population code	Host	Number of isolates	Mean of na	Mean of ne	Mean of h	Number of Polymorphic loci	Percentage of Polymorphic loci
1	Potato	60	1.99	1.59	0.34	150	99.34
2	Cucurbit	30	1.97	1.67	0.37	147	97.35
3	Bean	29	1.98	1.63	0.36	149	98.68
4	Chickpea	30	1.96	1.63	0.36	145	96.03
Total	-	149	2	1.69	0.38	151	100

na = Observed number of alleles
ne = Effective number of alleles
h = Nei's gene diversity

جدول ۲. شباهت ژنتیکی وفاصله ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه براساس ضریب (Pop-gene Nei32)

Table 2. Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

Pop ID	Potato	Cucurbit	Bean	Chickpea
Potato	****	0.9218	0.9398	0.9270
Cucurbit	0.0815	****	0.9871	0.9482
Bean	0.0621	0.0130	****	0.9601
Chickpea	0.0758	0.0531	0.0407	****



Between	And	Length
3	pop1	3.65587
3	2	1.31055
2	1	1.69640
1	pop2	0.64892
1	pop3	0.64892
2	pop4	2.34532

Pop1: Isolates of *F. solani* from potato
Pop2: Isolates of *F. solani* f.sp. *cucurbitae*
Pop3: Isolates of *F. solani* f.sp. *phaseoli*
Pop4: Isolates of *F. solani* f.sp. *pisi*

شکل ۱. دندروگرام حاصل از روش UPGMA و ضریب شباهت نی (Nei, 1978) برای چهار جمعیت میزبانی جدایه‌های قارچ *F. solani*.

Fig. 1. Dendrogram Based Nei's (1978) Genetic distance: Method = UPGMA.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳. جدول تجزیه واریانس مولکولی

Table 3. Results of Analysis of Molecular Variance Among and Within Populations

Population	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	
n	60	30	29	30	
SSWP	1554.350	858.933	792.414	816.700	
Summary AMOVA Table					
Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	3	345.831	115.277	2.452	8%
Within Pops	145	4022.397	27.741	27.741	92%
Total	148	4368.228		30.192	100%

WP: Within Populatins
df: Degrees of freedom
SS: Sums of squares
MS: Mean squares
Est. Var.: Estimated Variance

جدایه‌های متعلق به میزبان‌های متفاوت وجود داشتند. تجزیه خوشه‌ای نیز مانند تجزیه و تحلیل انجام شده با نرم‌افزار Pop-gene 32 و تجزیه واریانس مولکولی، ضمن نشان دادن تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مورد آزمون، مشخص ساخت که بین این تنوع ژنتیکی و جمعیت‌های میزبانی مورد مطالعه ارتباط محسوسی وجود ندارد.

در این بررسی جمعیت‌های جدایه‌های ایرانی *F. solani* از چهار میزبان متفاوت براساس انگشت نگاری DNA با استفاده از نشانگر FAFLP با یکدیگر مقایسه شدند. با توجه به این‌که شباهت ژنتیکی جمعیت‌های میزبانی متفاوت در این مطالعه بیشتر از ۹۲٪ می‌باشد، به‌نظر می‌رسد که این چهار جمعیت یک دودمان کلونی (Clonal lineage) را تشکیل دهند. کشت سیب‌زمینی، حبوبات و گیاهان جالیزی در سال‌های زراعی مختلف در یک مزرعه، کشت این محصولات در مزارع نزدیک به هم و جابجایی غده و بذر این محصولات بین مناطق جغرافیایی مختلف، احتمال نقش جریان ژن در کاهش تنوع ژنتیکی و به‌عبارت دیگر همسان سازی جمعیت‌ها را پررنگ می‌کند.

نتایج این تحقیق با نتایج بسیاری از بررسی‌های انجام شده در سایر نقاط دنیا مطابقت و با برخی دیگر مغایرت دارد. اودونل (O'Donnell, 2000) براساس توالی نواحی 28S rDNA ، ITS و اگزون‌ها و اینترون‌های ژن TEF گزارش می‌کند که هر یک از فرم‌های تخصص یافته قارچ *F. solani* را به‌عنوان یک گونه فیلوژنتیکی از یکدیگر جدا می‌کند، در حالی‌که در تحقیق حاضر تفکیک جدایه‌ها براساس میزبان امکان پذیر نیست. ضمناً در تحقیق انجام شده توسط اودونل از جدایه‌های ایرانی این قارچ استفاده نشده است.

در تحقیق انجام شده توسط *سوگا* و *همکاران* (Suga *et al*. 2000) که براساس تعیین توالی ناحیه ITS انجام شد، علی رغم تفکیک هفت فرم تخصص یافته *F. solani*، سه فرم تخصص یافته *F. s.* f.sp. *pisi*، *F. s.* f.sp. *cucurbitae* و *F. s.* f.sp. *radicicola* قابل تفکیک نبودند. نتیجه این تحقیق از نظر عدم امکان تفکیک دو فرم تخصص یافته با تحقیق حاضر

Archive of SID

www.SID.ir

مطابقت دارد زیرا جدایه‌های ایرانی *F. s.* f.sp. *pisi* و *F. s.* f.sp. *cucurbitae* نیز در تحقیق حاضر مورد مطالعه بودند و به‌کمک FAFLP از یکدیگر جدا نشدند.

در بررسی سازمان دهی ژنوم جدایه‌های هفت فرم تخصص یافته توسط *سوگا و همکاران* (Suga *et al.* 2002) مشخص شد که هر جدایه یک الگوی متفاوت نسبت به بقیه جدایه‌ها داشته و این مورد حتی در اعضای یک فرم تخصص یافته نیز مشاهده می‌شود. با وجود این تفاوت، یک تشابه قابل توجه در الگوی جدایه‌های متعلق به چهار فرم تخصص یافته *F. s.* f.sp. *batatas*، *F. s.* f.sp. *xanthoxyli*، *F. s.* f.sp. *piperis* و *F. s.* f.sp. *mori* وجود داشته است. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که در الگوی انگشت نگاری ژنوم جدایه‌های هر فرم تخصص یافته تفاوت مشاهده می‌شود و سهم تنوع ژنتیکی داخل فرم‌های تخصص یافته (۹۲٪) از کل تنوع مشاهده شده خیلی بیشتر از سهم تنوع ژنتیکی بین فرم‌های تخصص یافته (۸٪) بود. فرم‌های تخصص یافته‌ای که طبق تحقیق *سوگا و همکاران* در الگوی ژنوم آنها تشابه زیادی دیده شده، مورد مطالعه تحقیق حاضر نبوده‌اند، بنابراین فرم‌های تخصص یافته مشترک مورد مطالعه در این دو تحقیق، با دو روش مختلف مولکولی قابل تفکیک نبوده‌اند و در هر دو تحقیق در جدایه‌های هر جمعیت میزبانی تفاوت مشاهده شده است.

لی و همکاران (Li *et al.* 2000) توانستند با استفاده از توالی زیر واحد کوچک rDNA میتوکندریایی، فرم تخصص یافته *F. s.* f.sp. *glycines* را از سایر اعضای گونه مرکب *F. solani* از میزبان‌های مختلف گیاهی شامل کدوئیان، لوبیا، نخود، سیب‌زمینی و یونجه جدا کنند. البته سه سال بعد *آئوکی و همکاران* (Aoki *et al.* 2003) نشان دادند که جدایه‌هایی که قبلا تحت نام *F. s.* f.sp. *glycines* مورد مطالعه بودند متعلق به *F. solani* نبوده و تحت دو گونه جدید از جنس فوزاریوم تشریح شدند. بنابراین جمعیت‌های میزبانی *F. solani* با روش به‌کار رفته توسط *لی و همکاران* نیز همانند روش FAFLP به‌کار رفته در این تحقیق، قابل تفکیک نبود.

انگشت نگاری DNA جدایه‌های *F. solani* از میزبان‌های مختلف گیاهی و جانوری براساس نشانگرهای PCR توسط *برازیلیرو و همکاران* (Brasileiro *et al.* 2004) همچون انگشت نگاری DNA توسط نشانگر FAFLP در این تحقیق، وجود تنوع ژنتیکی را بین جدایه‌ها نشان داد ولی تنوع مشاهده شده در هر دو تحقیق ارتباطی به منشا میزبانی و جغرافیایی جدایه‌ها نداشت.

نتیجه تحقیق حاضر با تحقیق انجام شده توسط *بقایی و همکاران* (Baghayi *et al.* 2006) مطابقت دارد چرا که آنجا نیز نامبردگان با بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ جدایه ایرانی سیب‌زمینی از این قارچ براساس نشانگرهای PCR ضمن نشان دادن وجود تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها، عدم ارتباط این تنوع را با منشا جغرافیایی تأیید کردند.

همان‌طور که ملاحظه می‌شود تحقیقات بالا در راستای تفکیک جمعیت‌های میزبانی *F. solani* با ابزارهای متفاوت مولکولی بود که به‌طور کلی در اکثر موارد، این جداسازی امکان‌پذیر نبوده است. در نقطه مقابل این تحقیقات، بررسی‌هایی وجود دارد که براساس تکنیک‌های مولکولی و آزمایش‌های بیماری‌زایی انجام شده و نتیجه آنها تجمع چند جمعیت میزبانی مختلف و به‌عبارتی یکی کردن آنها بوده است. از جمله این تحقیقات می‌توان به تحقیق انجام شده در کالیفرنیا توسط *رومبرگ و دیویس* (Romberg & Davis 2007) اشاره کرد. این محققین نشان

Archive of SID

www.SID.ir

دادند که علاوه بر سیب‌زمینی که سابقاً به‌عنوان تنها میزبان قارچ *F. s.* f.sp. *eumartii* شناخته می‌شد، گوجه فرنگی، فلفل و بادمجان نیز می‌توانند میزبان این قارچ باشند. ضمناً فیلوژنی مولکولی جدایه‌های حاصل از این میزبان‌ها نشان داد که همگی یک نیایی (Monophyletic) می‌باشند. در این تحقیق جدایه‌های کالیفرنیایی *F. s.* f.sp. *eumarti* از نظر فیلوژنی مولکولی از سایر فرم‌های تخصص یافته *F. solani* جدا می‌شود ولی منحصر شدن میزبان این قارچ به سیب‌زمینی مردود شناخته می‌شود. در این تحقیق یک گام در جهت افزایش دامنه میزبانی *F. s.* f.sp. *eumarti* آن هم در داخل تیره گیاهی Solanaceae برداشته می‌شود. در این راستا مهل و اپستین (Mehl & Epstein 2007) گام‌های بیشتری برداشته و برای اولین بار ثابت کردند که جدایه‌های انسانی قارچ *F. solani*، توانایی بیماری‌زایی روی گیاه را داشته و این توانایی قابل مقایسه با جدایه‌های گیاهی می‌باشد. از طرفی آنها نشان دادند که جدایه‌های گیاهی این قارچ توانایی رشد در دمای ۳۷°C و به‌عبارتی توانایی رشد در دمای بدن انسان را داشته و پیش‌بینی نمودند که جدایه‌های گیاهی مورد مطالعه آنها، بتواند همانند جدایه‌های انسانی، روی انسان بیماری‌زا باشد. محدوده تحقیقاتی نامبردگان روی جدایه‌های گونه شماره یک ترکیب *F. solani* بود. اعضای گونه شماره یک این ترکیب به‌واسطه شباهت سه ژن در تحقیقات اودونل (2000) به‌عنوان یک گونه در کنار یک‌دیگر قرار گرفته بودند. نژاد ۲ فرم تخصص یافته *F. s.* f.sp. *cucurbitae*، تعدادی از جدایه‌های بیماری‌زای انسانی و تعدادی دیگر از جدایه‌های این قارچ که از محیط‌های مختلف به‌دست آمده بودند، در داخل گونه شماره یک قرار داشتند. *مهل و اپستین* ثابت کردند که تمام اعضای این گونه توانایی بیماری‌زایی روی کدوئیان، رشد در دمای ۳۷°C و قابلیت آمیزش و تولید نسل بارور را با یکدیگر دارند و این صفات ارتباطی با منشا میزبانی آنها ندارد. بنابراین، تحقیق حاضر از نظر عدم تفکیک جدایه‌های *F. solani* براساس میزبان با تحقیق *مهل و اپستین*(Mehl & Epstein 2007) مطابقت دارد به‌عبارتی، وقتی جدایه‌های انسانی و گیاهی این قارچ در یک گونه قرار می‌گیرند، قرار گرفتن کنار هم برای جدایه‌های میزبان‌های مختلف گیاهی امری دور از ذهن نیست.

به‌طور کلی، تحقیق حاضر نشان داد که در بین ۱۴۹ جدایه ایرانی *F. solani* متعلق به چهار گروه میزبانی تنوع ژنتیکی وجود دارد ولی این تنوع ارتباطی با میزبان و منطقه جغرافیایی جدایه‌ها ندارد و در بعضی موارد شباهت ژنتیکی بعضی از جدایه‌ها از میزبان‌های مختلف خیلی بیشتر از شباهت جدایه‌های یک میزبان و حتی یک فرم تخصص یافته می‌باشد. تحقیق حاضر نشان داد که در مورد جدایه‌های مورد مطالعه، تفکیک براساس میزبان اساس ژنتیکی ندارد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (55 -53) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir