Archive of SID

مطالعه تنوع جهش در قارچ *Fusarium solani* عامل پوسیدگی ریشه چغندرقند با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی و رابطه آن با بیماری‌زایی جدایه‌ها

Population genetic diversity of *Fusarium solani* the causal agent of sugar beet root rot, using vegetative compatibility groups (VCGs) and its relationship to virulence of isolates

مرجان رئوفی[۱]، رضا فرخی نژاد[۱] و سیدباقر محمودی[۲]

م. رئوفی، ر. فرخی نژاد و س.ب. محمودی. ۱۳۸۳. مطالعه تنوع جهش در قارچ *Fusarium solani* عامل پوسیدگی ریشه چغندرقند با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی و رابطه آن با بیماری‌زایی جدایه‌ها. **چغندرقند ۲۰(۱): ۵۳-۳۹**

چکیده

در این تحقیق گروه‌های سازگاری رویشی ۲۷ جدایه *Fusarium solani* که از ریشه و طوقه چغندرقند استان‌های مختلف کشور ایران جمع‌آوری شده بود با استفاده از جهش یافتگان نیت (nit mutant) تعیین شد. در مجموع از ۲۷ جدایه مورد آزمایش ۲۲۲ موتانت نیت حاصل شد. کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیت براساس مشخصات رشدی پرگنه آن‌ها روی محیط کشت پایه که حاوی یکی از چهار منبع ازت بود تعیین شد. به منظور انجام آزمون‌های مکمل‌سازی و تعیین گروه‌های سازگار رویشی کلیه جهش یافتگان nitM با جهش یافتگان nit1 , nit3 و یا nit1 با nit3 مقابل هم قرار داده شدند. در صورت وجود سازگاری در محل تلاقی ریسه‌های دو نیت مختلف, تشکیل هتروکاریون به صورت رشد پروتوتروفیک ظاهر شد. رشد پروتوتروفیک بین nitM و nit3 یا nit1 قوی‌تر از رشد پروتوتروف بین nit1 و nit3 ظاهر می‌شد. براین اساس به ترتیب ٤٤ درصد, ٣٦ درصد و ۲۰ درصد از جهش یافتگان نیت به دست آمده متعلق به کلاس فنوتیپی nit1 , nit3 و nitM بودند. جدایه‌های مورد آزمایش در این تحقیق در ١٤ گروه سازگار رویشی قرار گرفتند. در این مطالعه بین گروه‌های سازگاری رویشی و مناطق جغرافیایی محل جمع‌آوری جدایه‌ها و هم چنین بین گروه‌های سازگار رویشی و نوع علایم بیماری ارتباطی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند, فنوتیپی, گروه‌های سازگار رویشی, موتانت نیت, هتروکاریون

۱- دانشگاه شهید چمران اهواز marjan557@yahoo.com,
۲ - مؤسسه تحقیقات چغندرقند

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

به استرین‌هایی که توانایی تشکیل هتروکاریون رویشی از طریق آناستاموز بین هیف‌ها را دارند، سازگار رویشی می‌گویند. استرین‌هایی که با یکدیگر سازگاری رویشی دارند، در یک گروه سازگار رویشی VCG (Vegetative Compatibility Group) قرار می‌گیرند (Pyung et al. 1998; Leslie 1993; Katan et al. 1991;). سازگاری رویشی فقط بین موتانت‌های نیتی اتفاق می‌افتد که حداقل یک آلل مشترک در هریک از چند لوکوس ناسازگار رویشی دارند (Harveson & Rush 1997; Clark et al. 1995; Correll et al. 1987) بنابراین جدایه‌هایی که سازگاری رویشی دارند، وابستگی زیادی به هم دارند و متعلق به یک گروه سازگار رویشی هستند (Harveson and Rush 1997; Katan.and Shabi 1996). تشکیل آناستاموز یک شرط لازم برای تبادل مواد ژنتیکی از طریق مرحله پاراجنسی (Parasexuality) می‌باشد. جدایه‌هایی که سازگاری رویشی ندارند متعلق به جمعیت‌های مجزا از نظر ژنتیکی می‌باشند (Katan et al. 1991). مطالعه جمعیت‌ها بااستفاده از گروه‌های سازگاری رویشی به معنی اندازه‌گیری پراکنش طبیعی تنوع است (Daayf et al. 1995; Leslie 1993). گروه‌های سازگاری رویشی ابزار مناسبی برای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های طبیعی قارچها است (Daayf et al. 1995). گروه‌های سازگار رویشی تجزیه و تحلیل ابتدایی در مورد جمعیت یک منطقه است. گروه‌های سازگار رویشی یک ابزار شناسایی است. استرین‌هایی که در گروه بیماری‌زایی یکسانی قرار دارند مثل فرم مخصوص نژاد, در یک یا تعداد کمی گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند (Leslie 1993). جدایه‌های درون یک گروه سازگار رویشی ممکن است خصوصیات مشابهی مثل اندازه پرگنه و تولید آنتی بیوتیک داشته باشند (Correll and Puhalla 1985). جدایه‌هایی که در یک گروه سازگاری رویشی قرار دارند، توانایی تبادل اطلاعات ژنتیکی از طریق فراجنسی دارند. اهمیت این توانایی بستگی به ساختار جمعیت و تعداد اجزای یک استرین دارد که در تبادل اطلاعات نقش دارند. ارتباط بین گروه‌های سازگاری رویشی و صفات دیگر مثل بیماریزایی برای شناسایی می‌تواند مفید باشد. گروه‌های سازگار رویشی ابزار مفیدی برای یافتن منشأ ژنتیکی جدایه‌ها در جمعیت‌ها است (Leslie 1993). گروه‌های سازگاری رویشی اطلاعاتی در مورد تنوع ژنتیکی و پتانسیل بیمارگر به ما می‌دهد که ممکن است در انتخاب استرین‌های گیاهی مقاوم به بیماری مفید باشد (Robert and Leslie 1992). معمو لاً جمعیتی که تولید مثل جنسی انجام می‌دهند، تنوع زیاد گروه‌های سازگاری رویشی از آن‌ها مورد انتظار است Leslie (1993). اگر استرین‌های بیماری‌زایی که در یک گروه سازگاری رویشی قرار دارند، بازگوکننده رابطه نزدیکی باشند و با روش‌های دیگر اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی مثل RFLP و یا RAPD نیز نتیجه یکسانی به دست آید،

www.SID.ir

Archive of SID

این اطلاعات نشان می‌دهد که آن‌ها از یک جد عمومی به دست آمده‌اند که در مورد *F. oxysporum f. sp. cubense* دیده شده است لذا آن‌ها منوفیلتیک (Monophyletic) هستند (Leslie 1993).

پوهالا(Puhalla 1985) موتانت‌های مقاوم به کلرات پتاسیم(Potasium chlorate) را پیدا و به نام موتانت‌های نیت(nit) نامید. موتانت‌های نیت که قادر به احیای نیترات (Nitrate) نیستند روی محیط حداقل حاوی یک منبع نیتروژن کشت داده می‌شوند این موتانت‌ها به صورت پرگنه‌های خیلی ظریف و نازک رشد می‌کنند. وقتی دو موتانت نیت متفاوت (از نظر ژنتیکی) از استرین یکسان روی محیط حداقل جفت می‌شوند، در محل تماس دو موتانت رشد تیپ وحشی را پیدا می‌کنند(Puhalla 1985).

مزیت استفاده از موتانت‌های نیت این است که آن‌ها بدون استفاده از مواد جهش‌زا به دست می‌آیند. کلرات یک آنالوگ نیترات است که برای مطالعه جذب و ترکیب نیترات در قارچ‌ها، باکتری‌ها، جلبک‌ها و گیاهان مفید است(Correll et al. 1987). آنزیم نیترات رداکتاز (Nitrate reductase) که نیترات را به نیتریت (Nitrite) تبدیل می‌کند و آنزیم نیتریت رداکتاز (Nitrite reductase) که نیتریت را به آمونیوم احیاء می‌نماید، دو آنزیم مورد نیاز قارچها برای احیاء نیترات به آمونیوم(Ammonium)هستند. معمولاً استرین‌های حساس به کلرات می‌توانند نیترات را به نیتریت تبدیل کنند. اما استرینهای مقاوم به کلرات نمی‌توانند (Correll et al. 1987). موتانت‌ها روی محیط حداقل دارای رشد ضعیف و تقریبا" فاقد اسپورزایی و میسیلیوم هوایی هستند و این رشد ضعیف به دلیل عدم توانایی موتانت در مصرف نیترات به عنوان تنها منبع ازت محیط است (Correll et al.1987). موتانت‌های نیت متفاوتی براساس تعداد و نوع لوکوس‌های جهش یافته تشخیص داده شده است که سه نوع آن‌ها بیشتر مورد استفاده‌اند: nit1 که جهش در لوکوس‌های ساختمانی نیترات رداکتاز صورت گرفته است. nit3 که جهش در لوکوس‌های تنظیم‌کننده ویژه مسیر جذب نیترات صورت گرفته است و نیت nitM که جهش در لوکوس مؤثر بر کوفاکتور حاوی مولیبدنیوم (Mo) که برای فعالیت نیترات رداکتاز لازم است صورت گرفته است (Hawthorne and Rees-George 1996). استرین‌هایی که نمی‌توانند موتانت‌های نیت M تولید کنند با استفاده از روش جاکوبسون و گوردون (به نقل از Hawthorne and Rees-George 1996) می‌توانند موتانت‌های Sul تولید نمایند. این موتانت‌ها از سکتورهای سریع‌الرشد مقاوم به سلنات(Selenate) به دست می‌آیند. این موتانت‌ها روی محیط کشت حداقل حاوی سولفات به عنوان تنها منبع گوگرد در مقایسه با تیپ وحشی رشد ضعیفی دارند (Hawthorne and Rees-George 1996) این موتانت‌ها که قادر به استفاده از منابع ازت کاتابولیزه شده توسط والد تیپ وحشی نیستند حساس به کلرات بوده و سکتورهای مقاوم به کلرات تولید می‌نمایند. در فوزاریوم‌ها ممکن است این

www.SID.ir

Archive of SID

موتانت‌ها از بعضی جهات تنظیم ازت با *Aspergillus nidulans* و *Neurospora crassa* متفاوت باشند. در گونه *Fusarium graminearum* فرم غیرجنسی *Gibberella zeae* این موتانت‌ها با استفاده از نور ایجاد شده‌اند (Correll et al. 1987; Leslie 1987). تعدادی از موتانت‌ها هم مقاوم به کلرات بوده وهم قادر به استفاده از نیترات هستند که به نام موتانت Crn نامیده می‌شوند (Correll et al. 1987). پوهالا به جای انجام تست‌های بیماری‌زایی زمانبر، برای شناسایی فرم‌های مخصوص و نژاد یک استرین از خصوصیتی به نام سازگاری رویشی یا هتروکاریون در مورد *F. oxysporum* استفاده کرد. (Correll et al. 1987; Kistler 1997; Glass and Kuldau 1992; Manicom et al. 1990)

پوهالا اولین کسی است که در مطالعات خود روی جمعیت قارچها ارتباط بین گروه‌های سازگاری رویشی و فرم مخصوص را پیدا کرد (Correll et al. 1987; Puhalla 1985). بنا به نوشته لسلی (Lesliy 1993)، کرون(Kroon) و الگرسما (Elgersma) در سال ۱۹۹۱ نتایج متفاوتی در مورد ارتباط بین گروه‌های سازگاری رویشی و نژاد بیماریزای *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici* به دست آوردند. آن‌ها پیشنهاد کردند که یک یا احتمالاً تعدادی بیشتر از لوکوس‌های *vic* ممکن است در بردارنده خصوصیات شناسایی گیاه میزبان باشد و تغییرات در ژنوتیپ *vic* می‌تواند باعث تغییر در بیماری‌زایی شود. الیاس و اشنایدر (Elias et al. 1991) گروه بیماریزای واحدی را یافتند که می‌تواند به چندین گروه سازگار رویشی تقسیم شود و تعدادی گروه سازگار رویشی یکسان که می‌تواند به نژادهای بیماریزای متفاوت متعلق باشد. گروه سازگار رویشی همراه با تست‌های بیماری‌زایی اطلاعاتی را در مورد تنوع ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی ساکن در خاک برای ما فراهم می‌کند (Correll et al. 1987). فرضی که اغلب در مورد جدایه‌هایی با طیف میزبانی مشترک و فرم مخصوص یکسان وجود دارد، این است که آن‌ها در مقایسه با جدایه‌هایی که میزبان‌های تخصصی دارند شباهت‌های ژنتیکی بیشتری دارند، از نظر تکاملی چنین عنوان می‌شود که فرم‌های مخصوص منوفیلتیک بوده و جدایه‌هایی با طیف میزبانی مشترک به طور مشابه از یک ژنوتیپ بیماری‌زایی مخصوص حاصل شده‌اند. این فرض اکنون با نشانگرهای ژنتیکی و مستقل از تست‌های بیماری‌زایی انجام می‌شود. مساله مطالعه تنوع ژنتیکی روی یک فرم مخصوص از این نظر مهم است که بیماری شناسان گیاهی معمولا روی یک بیماری یا محصول تمرکز می‌کنند(Kistler 1997). هدف از انجام این تحقیق بررسی میزان تنوع ژنتیکی در جدایه‌های *F. solani* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور و هم چنین بررسی وجود یا عدم وجود همبستگی میان گروه‌های سازگار رویشی به دست آمده و بیماری

www.SID.ir

Archive of SID

زایی جدایه‌ها و وجود یـا عـدم وجـود همبسـتگی بـین گروه‌های سازگار رویشی و مناطق جغرافیایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه و جداسازی جدایه‌ها

۱- درا ین تحقیق جمعاً ۲۷ جدایـه *F. solani* دراسـتان‌های مختلـف کشـور(خراسـان, خوزسـتان, چهارمحال بختیاری, آذربایجان غربی, تهـران, قـزوین, کرمان, کرمانشاه, همدان, لرستان و اردبیل) که از ریشه و طوقه چغندرقند جداسازی شـده بودنـد مـورد بررسـی قرار گرفت. برای خالص‌سازی از روش تک اسپورکردن استفاده شد. پس از انتـقال تـک اسپـور و نوک ریسه‌ها به تشتک پتری محتوی محیط کشـت سـیب زمینـی- دکسـتروز- آگـار (Potato-Dextrose-Agar) جهـت رشد پرگنه‌های خالص, تشتک‌ها در شـرایط دمـای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. بـه منظـور نگـه‌داری کوتاه مدت کشـت خـالص فوزاریـوم از محـیط کشـت SNA استفاده شد و برای نگه‌داری بلند مـدت, کشـت خالص فوزاریوم بر روی ماسه سـترون شـده همـراه بـا کمی آب استفاده شد. جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از کلیدهای تشخیص گونه‌های فوزاریوم تشـخیص داده شدند. (Booth 1997; Burgess et al. 1994; Gerlach 1982; Nelson et al. 1983; Siefert 2001)

۲- جداسازی جهش یافتگان نیت Nit (mutant): جهش یافتگان نیت به روش کارل و همکاران تولید شدند (Correll et al. 1987). یک بلوک میسیلیومی از محیط کشت خالص هر جدایه از روی محیط PDA به محیط کشت کامل (CM) انتقال یافت و تشتک‌ها حدود ۵ـ۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از رشد قارچ بر روی محیط کشت کامل یک قطعهٔ کوچک از محیط کشت به محیط حاوی کلرات پتاسیم PDC (با درصدهای مختلف ۱/۵ تا ۶) انتقال یافت. تشتک‌ها به مدت ۱۵ـ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. بر روی محیط‌های حاوی کلرات، رشد پرگنه قارچ محدود می‌شود. در طول این مدت، سکتورهای سریع‌الرشد از رشد محدودشدهٔ قارچ خارج گردید. بعد از ظهور سکتورها، از حاشیهٔ خارجی آن‌ها، قطعه کوچکی برداشته و به محیط حداقل انتقال یافت. بعد از ۴ـ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پرگنه‌هایی که رشد نازک، گسترده و بدون میسیلیوم هوایی داشتند، به عنوان موتانت نیت جدا شدند. موتانت‌های نیت براساس رشد در محیط‌های دارای یکی از چهار منبع ازت یعنی نیترات، نیتریت، هیپوزانتین (Hypoxanthin) و آمونیوم در کلاس‌های فنوتیپی مجزا قرار گرفتند.

۳- تعیین فنوتیپ موتانت‌های نیت: بـرای ایـن منظور یک قطعه میسیلیومی از موتانت‌های نیت به هـر یک از چهار محیط فوق انتقال یافت. سـپس تشـتک‌ها در شـرایط مناسـب قـرار گرفتـه و بعـد از چهـار روز مرفولوژی پرگنه‌ها با تیپ وحشی مقایسه گردید.

۴- آزمـون‌های مکمـل‌سازی: جهـش یافتگـان نیت و تعیین گروه‌های سازگار رویشـی جدایـه‌های *F.*

www.SID.ir

Archive of SID

solani: در ابتدا برای آزمایش خودسازگاری جدایه‌ها، یک موتانت nitM از هر جدایه با موتانت nit1 یا nit3 از همان جدایه مقابل هم قرار گرفتند. وجود رشد متراکم و هوایی در محل تلاقی پرگنه در موتانت، نشان دهندهٔ تشکیل هتروکاریون و خودسازگار بودن جدایه‌ها تلقی گردید. در مرحلهٔ بعد یک موتانت nitM از یک جدایه در مقابل موتانت‌های nit1 و یا nit3 سایر جدایه‌ها قرار گرفت. یک بلوک میسیلیومی از این موتانت در وسط تشتک گذاشته شد و چهار موتانت nit1 یا nit3 از چهار جدایه در مقابل آن درون تشتک کشت 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. این کار برای کلیهٔ موتانت‌های نیت به دست آمده از جدایه‌های *F. solani* انجام شد.

۵- آزمون بیماری‌زایی: آزمون بیماری‌زایی در شرایط گلخانه انجام شد. در این روش از مخلوط خاک بکر و ماسه ضدعفونی شده با گاز متیل بروماید استفاده شد. پس از کشت بذور چغندرقند, گلدان‌ها در شرایط ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی و دمای(۳±۲۵) درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و هفته‌ای دو بار با آب مقطر آبیاری شدند. قبل از مایه‌زنی, گیاهان گلدان‌ها تنک گردیده و در هر گلدان سه گیاهچه نگه داشته, برای هر جدایه دو تکرار در نظر گرفته شد. به منظور مایه‌کوبی گیاهچه‌ها در کنار هر گیاهچه سه بذر گندم آلوده به قارچ (مایه تلقیح) قرار داده شد. گلدان‌ها با آب مقطر به حد اشباع آبیاری گردیدند. گلدان شاهد فقط با دانه‌های گندم حاوی محیط کشت مایه‌کوبی شد. پس از ظهور علایم بیماری گیاهچه‌های آلوده بر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند و جهت جداسازی مجدد قارچ از گیاهچه آلوده مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

۱- جداسازی جهش یافتگان نیت: سکتورهای مقاوم به کلرات از روز هفتم پس از کشت, روی محیط سیب زمینی- دکستروز-کلرات (PDC) با درصدهای مختلف کلرات, در کلیه جدایه‌ها ایجاد شدند. تعدادی از سکتورهای مقاوم به کلرات ایجاد شده قادر به مصرف نیترات نبوده و روی محیط حداقل, رشد وسیع و بدون میسیلیوم هوایی داشتند. به عبارت دیگر از ۶۲۶ سکتور مقاوم به کلرات به دست آمده ۲۲۲ موتانت نیت به دست آمد. فراوانی تولید سکتور در محیط کلرات و نسبت فنوتیپ‌های جهش یافتگان (موتانت‌های نیت) در بین ۲۷ جدایه متفاوت بود. در محیط کشت پتاسیم- دکستروز- آگار ابتدا پرگنه بسیار محدود قارچ غیر جهش یافته *F.solani* ایجاد شد. سپس از روز هفتم به بعد سکتورهای سریع‌الرشد مقاوم به کلرات شروع به رشد کردند.

۲- کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیت: در این مرحله تمامی جهش یافتگان نیت به دست آمده با توجه به نحوه رشد روی محیط‌های دارای یکی ا ز چهار منبع

www.SID.ir

Archive of SID

نیتروژن (نیترات سدیم, نیتریت سدیم, هیپوزانتین و تارتارات آمونیوم) در یکی از سه کلاس فنوتیپی nit1, nit3 و nitM قرار گرفتند (جدول ۱). از این تعداد جهش یافته نیت ۴۴ درصد آن‌ها متعلق به فنوتیپ nit1 (به دلیل عدم استفاده از نیترات به عنوان تنها منبع نیتروژن محیط) ۳۶ درصد به فنوتیپ nit3 (به دلیل عدم استفاده از نیتریت و نیترات به عنوان تنها منبع نیتروژن محیط) و۲۰ درصد به فنوتیپ nitM (به دلیل عدم استفاده از نیترات و هیپوزانتین به عنوان تنها منبع نیتروژن محیط) شناسایی شدند.

جدول۱ شناسایی موتانت‌های نیت از طریق رشد در محیط‌های کشت حاوی منابع متفاوت نیتروژن
Table 1 Identification of nitrate non utilizing (nit) mutants by growing on different media containing different nitrogen sources

کلاس فنوتیپی موتانت نیت nit mutant penotypic class	نیترات سدیم Soudium nitrat	نیتریت سدیم Soudium nitrit	هیپوزانتین Hypoxantin	تارتارات آمونیوم Ammounium tartarat
nit1	-	+	+	+
nit3	-	-	+	+
nitM	-	+	-	+

(-) رشد ضعیف و بدون میسیلیوم هوایی
(+) تیپ وحشی همراه با میسیلیوم هوایی

(-)Weak growth with no aerial mycelium
(+)Wild –type growth with aerial mycelium

۳- گروه‌های سازگار رویشی جدایه‌های *F. solani*: از بین ۲۷ جدایه مورد آزمایش چهار جدایه خود ناسازگار بودند و از بین بقیه جدایه‌ها در مجموع ۱۴ گروه سازگار رویشی شناسایی گردیدند. در گروه اول یا VCGA, ۵ جدایه و در گروه دوم و سوم VCGB وVCGC, ۳ جدایه و درگروه چهارم یا گروه VCGD, ۲ جدایه و در بین بقیه گروه‌ها فقط یک جدایه قرار گرفت.

۴- نتایج آزمون بیماری‌زایی: تمام جدایه‌ها به جز جدایه شماره ۶ روی گیاهچه‌های چغندرقند بیماری‌زا بودند و توانستند دو نوع علایم پوسیدگی ریشه و پژمردگی طوقه ایجاد نمایند. بیشتر علایم مشاهده شده به صورت پوسیدگی بود. هم چنین علایم بیماری مشاهده شده از جدایه‌ها در هنگام تست بیماری‌زایی با علایم مشاهده شده در مزرعه یکسان بود.

۵- ارتباط بین بیماری‌زایی و گروه‌های سازگار رویشی: کلیه جدایه‌های *F. solani* مورد مطالعه در این تحقیق به جز جدایه شماره ۶ بیماری‌زا بودند. جدایه شماره ۶ غیربیماری‌زا بوده و در عین حال از نظر سازگار رویشی نیز خود ناسازگار بود. به جز گروه سازگار رویشی D که اعضای آن فقط تولید پوسیدگی قهوه‌ای ریشه نمودند اعضای دیگر گروه‌های سازگار رویشی هر دو نوع علایم پژمردگی و پوسیدگی ریشه را تولید نمودند. اعضای گروه سازگار رویشی A قدرت

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری‌زایی بیشتری نسبت به اعضای گـروه‌های دیگـر نشان دادند.

جدول۲ گروه‌های سازگار رویشی چند عضوی و محل نمونه‌برداری و علائم بیماری آن‌ها

Table 2 Multimemberane vegetative compatibility groups and their origions as well as disease symptoms

گروه سازگار رویشی VCG	شماره جدایه Isolate no.	محل نمونه‌برداری Origin	علایم بیماری Diseases symptom
A	1	خراسان - چناران	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه(Brown rot)
	3	چهارمحال بختیاری- شهرکرد	مرگ گیاهچه(Damping- off)
	8	خراسان -چناران	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه(Brown rot)
	18	خراسان -چناران	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه(Brown rot)
	25	لرستان-بروجرد	پوسیدگی خشک ریشه(root rot)
B			
	9	خراسان- جنورد	پژمردگی(Wilting)
	11	خراسان - چناران	پوسیدگی ریشه(Root rot)
	17	خراسان - چناران	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه(Brown rot)
C			
	2	خراسان- بیرجند	پوسیدگی ریشه(Root rot)
	4	خراسان- بیرجند	پوسیدگی ریشه(Root rot)
	5	خراسان- گناباد	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه(Brown rot)
D			
	7	خراسان- مشهد	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه(Brown rot)
	22	همدان- همدان	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه(Brown rot)

جدول۳ فهرست جدایه‌ها, محل نمونه‌برداری و علایم بیماری

Table 3 List of isolates, their origins and disease symptoms

شماره جدایه Isolate No.	محل نمونه‌برداری Origin	علایم بیماری Disease Symptoms
1	خراسان- چناران	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
2	خراسان - بیرجند	پوسیدگی ریشه (Root rot)
3	چها ر محال بختیاری – شهرکرد	مرگ گیاهچه (Damping- off)
4	خراسان - بیرجند	پوسیدگی ریشه (Root rot)
5	خراسان – گناباد	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
6	خراسان –چناران	پژمردگی (Wilting)
7	خراسان – مشهد	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
8	خراسان –چناران	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
9	خراسان –بجنورد	پژمردگی (Wilting)
10	خراسان – چناران	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
11	خراسان – چناران	پوسیدگی ریشه (Root rot)
12	تهران – کرج	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
13	تهران – کرج	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
14	خراسان –تربت حیدریه	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
15	خراسان – قوچان	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
16	خراسان- بیرجند	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
17	خراسان – چناران	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)

www.SID.ir

Archive of SID

پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)	خراسان – چناران	18
پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)	تهران – کرج	19
پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)	کرمان – کرمان	20
پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)	همدان – همدان	21
پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)	همدان – همدان	22
پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)	کرمان – کرمان	23
پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)	لرستان – بروجرد	24
پوسیدگی خشک ریشه (Dry root rot)	لرستان – بروجرد	25
پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)	کرمان – کرمان	26
پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)	همدان – همدان	27

۶- ارتباط بین گروه‌های سازگار رویشی و مناطق جغرافیایی:

گروه سازگار رویشی A: سه عضو از این گروه متعلق به شهرستان چناران در استان خراسان بودند و دو عضو دیگر متعلق به دو استان دیگر بودند.

گروه‌های سازگار رویشی C و B: اعضای این گروه‌ها همگی متعلق به استان خراسان بودند.

گروه سازگار رویشی D: سازگاری رویشی به صورت خیلی ضعیف بین جدایه‌های این گروه دیده شد.

بنابراین بین گروه‌های سازگار رویشی و مناطق جغرافیایی ارتباطی دیده نشد.

بحث

در بررسی تنوع ژنتیکی در قارچ‌ها از موتانت‌های نیت استفاده می‌شود. برای تولید موتانت‌های نیت از محیط‌های مختلفی مثل محیط کشت حداقل- کلرات (MMC), محیط سیب زمینی – دکستروز –کلرات(PDC) و زاپک کلرات استفاده می‌شود که در هر کدام از آن‌ها میزان تولید موتانت نیت متغیر است. به عقیده کارل و همکاران Correll et al. (1987) راندمان تولید موتانت‌های نیت تحت تأثیر عوامل محیطی و گونه قارچ می‌باشد. در این تحقیق راندمان تولید موتانت‌های‌نیت جدایه‌های *F. solani* در محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- کلرات (PDC) حاوی ۱/۵ درصدکلرات ناچیز بود. به این منظور از محیط کلرات حاوی کلرات پتاسیم بیشتر یعنی سه, چهار, پنج و در نهایت شش درصد استفاده شد. در محیط ۶ درصد علاوه بر افزایش تعداد سکتورها و موتانت‌های نیت از اکثر جدایه‌های *F. solani* موتانت نیت به دست آمد. گاهی از محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- کلرات (PDC) نمی‌توان موتانت نیت به دست آورد یا تعداد کمی موتانت‌نیت به دست می‌آید. به این منظور از محیط کشت‌های دیگر مثل حداقل- کلرات و زاپک کلرات استفاده می‌شود ولی در این مطالعه تمام موتانت‌های‌نیت از محیط پتاسیم – دکستروز- کلرات(PDC) به دست آمد و نیازی به استفاده از محیط‌های دیگر نشد.

اصولاً استرین‌های *F. solani* نسبت به *F. oxysporum* و *F. moniliforme* به کلرات مقاوم‌تر می‌باشند. جدایه‌های *F. moniliforme* و *F. oxysporum* معمولاً در محیط کشت حاوی ۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

گرم کلرات در یک لیتر محیط PDA رشدشان محدود می‌شود (Hawthorne and Rees-George 1996)، ولی رشد استرین‌های *F. solani* معمولاً در درصدهای بالای کلرات محدود می‌گردد. این نتیجه قبلاً نیز توسط نورس مفرد (نورس مفرد۱۳۷۹) و راه خدایی (راه خدایی ۱۳۷۹) در مورد استرین‌های *F. solani* حاصل شده بود. هاوترن و همکارانش (۱۹۹۰) از جدایه‌های *F. solani* در محیط حاوی ۱/۵ درصد کلرات نتوانستند سکتور مقاوم به کلرات به دست آورند به این دلیل از محیط حاوی سه درصد کلرات برای به دست آوردن سکتور مقاوم به کلرات استفاده کردند.

قبل از انجام هر تست مکمل‌سازی باید ابتدا کلاس فتوتیپی موتانت‌ها مشخص شود، زیرا برای انجام این تست باید نیت‌هایی با فتوتیپ متفاوت در مقابل هم قرار داده شوند. نتایج این تحقیق نشان داد که اکثر موتانت‌ها از نوع نیت ۱ بودند و موتانت‌های نیت ۳ و نیت M به ترتیب از فراوانی کمتری برخوردار بودند. این نتایج با نتایج پژوهشگران دیگر همخوانی داشت (راه خدایی ۱۳۷۹, فرخی نژاد ۱۳۷۸, نورس مفرد ۱۳۷۹ ;Correll et al. 1987 .(Kedera et al. 1994;

معمولاً در تحقیقات مربوط به گروه‌های سازگار رویشی موتانت‌های نیت M با یکی از موتانت‌های‌نیت ۱ یا ۳، هتروکاریون قوی‌تر و سریع‌تری را تشکیل می‌دهند نتایج این تحقیق نیز با تحقیقات سایر پژوهشگران هماهنگی داشت (Hawthorne and Rees-George 1996) علت این که هتروکاریون نیت M قوی‌تر است این است که در نیت M در چند لوکوس آن جهش صورت گرفته در حالی که در نیت ۱ و ۳ تنها در یک لوکوس آن‌ها جهش صورت می‌گیرد و به این دلیل نیت M قدرت تشکیل هتروکاریون بیشتری دارد.

در مطالعه حاضر ۲۷ جدایه *F. solani* در ۱۴ گروه سازگار رویشی قرار گرفتند که چهار گروه آن چند عضوی و بقیه گروه‌ها تک عضوی بودند. اعضای گروه‌های چند عضوی از مناطق مختلف جمع‌آوری شده بودند. عوامل مختلفی تعداد گروه‌های VCG را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عواملی چون روش تولیدمثل قارچ، منبع و تعداد نمونه قارچی گروه‌های سازگار رویشی یک گونه یا فرم مخصوص, از آن جمله‌اند (راه‌خدایی ۱۳۷۹).

لسلی معتقد است که گروه‌های سازگار رویشی ابزار مناسبی برای شناسایی کلن‌هایی است که از یک جد عمومی هستند (Leslie 1993). با توجه به این که استرین‌هایی که درون یک گروه سازگار رویشی هستند از نظر ژنتیکی مشابه هستند، می‌توان نتیجه گرفت که اعضای گروه‌های سازگار رویشی A, B, C و D که در این مطالعه مشخص شده‌اند هرکدام از یک کلون می‌باشند (Leslie 1993; Correll and Puhalla 1985)، هم چنین استرین‌هایی که گروه‌های سازگار رویشی مجزایی دارند، منشأ مستقل دارند (Leslie 1993). وجود تفاوت در بین اعضای

www.SID.ir

Archive of SID

گروه‌های سازگار رویشی از نظر شدت بیماری‌زایی نشان می‌دهد که این تفاوت‌ها می‌تواند به علت وقوع جهش در لوکوس یا لوکوس‌های مربوط به بیماری‌زایی گونه *F. solani* باشد. تقسیم میوز و احتمال ایجاد افراد نوترکیب از راه کراسینگ‌آور دلیل دیگر این گونه جهش‌ها است و این جهش‌ها ممکن است باعث قطع ارتباط بین لوکوس‌های مسئول بیماری‌زایی و لوکوس‌های مربوط به سازگاری رویشی نیز, گردد. احتمالاً به همین دلیل بین شدت بیماری‌زایی و گروه‌های سازگار رویشی به دست آمده همبستگی مشاهده نشد. چنین نتیجه‌ای با یافته‌های ناصری (۱۳۷۹) همخوانی دارد. در گروه‌های سازگار رویشی که در این مطالعه دیده شد، بزرگترین گروه، گروه A بود که تنوع محلی آن نشان می‌دهد که جمعیت هموژن (Homogen) گسترده‌ای در مناطق مختلف جغرافیایی دارد. وقوع گروه‌های سازگار رویشی در بیش از یک ناحیه می‌تواند به وسیله پراکنش گسترده ابتدایی از یک گروه سازگار رویشی یا بیشتر از یک گروه سازگار رویشی از یک منطقه جغرافیایی از طریق بذر، نهال، بقایای آلوده و فعالیت‌های انسانی توجیه شود (Pyung Ahn et al .1998). در آزمون بیماری‌زایی گروه VCGA نیز دیده شد که اعضای آن قدرت بیماری‌زایی زیادی دارند. شاید، بیماری‌زایی قوی آن‌ها این مساله را توجیه کند که چرا گروه سازگار رویشی گروه A در جمعیت غالب است. مشابه این نتیجه را پیونگ‌آن و همکاران در رابطه با جدایه‌های *F. oxysporum f. sp cucumerinum* عامل پژمردگی خیار گرفتند. این محققین معتقدند که شناخت گروه سازگار رویشی غالب در جمعیت برای کنترل موفقیت‌آمیز پژمردگی خیار و برای ارزیابی لاین‌های اصلاح شده خیار به وسیله گروه‌های متنوع ژنتیکی پاتوژن مفید است (Pyung Ahn et al. 1998). ممکن است بررسی وقوع VCGA در مناطق جدید تولید چغندرقند برای کنترل موفق پوسیدگی فوزاریومی چغندرقند مفید باشد.

نکته دیگر اینکه بین گروه‌های سازگار رویشی و مناطق جغرافیایی در این تحقیق ارتباطی دیده نشد. ولی برای اظهارنظر قطعی در این مورد احتیاج به نمونه‌برداری بیشتری است. معمولاً یافته‌های محققین دیگر نیز چنین مساله‌ایی را تأیید می‌کند (فرخی‌نژاد ۱۳۷۸) و کشف جدایه‌ها در گروه‌های سازگار رویشی یکسان از منابع مختلف نشان‌دهنده هموژن بودن جدایه‌هایی است که در مناطق اکولوژیکی مختلفی پراکنده هستند (Chen and Swart 2001). مسأله مورد توجه دیگر در مورد گروه‌های سازگار رویشی، گروه‌های سازگار رویشی تک عضوی هستند. به عقیده الیاس و همکاران اعضای گروه‌های تک عضوی یا به گروه‌های سازگار رویشی بزرگ تعلق داشته که در اثر یک جهش ساده در یک یا چند لوکوسvic توانایی خود را در تشکیل هتروکاریون با سایر اعضای گروه از دست داده‌اند و یا آن‌ها متعلق به فرم‌های تخصص یافته یا جمعیت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

غیر بیماری‌زایی هستند که جهش‌هایی در لوکوس‌های بیماری‌زای آن‌ها رخ داده است (Elias et al. 1991)، فرضیهٔ سوم این است که این‌ها جدایه‌های مجزایی از جمعیت‌های بومی مناطق مربوطه می‌باشند (Correll and Puhalla 1985). یکی از اهداف این تحقیق مطالعه این مساله بود که آیا بین علایم مختلف چغندرقند با گروه‌های سازگار رویشی مجزا ارتباطی وجود دارد یا خیر. نتایج نشان داد که چنین ارتباطی وجود ندارد، حتی با وجود این که علایم پوسیدگی ریشه غالب بود, جدایه‌هایی که باعث ایجاد علایم پوسیدگی انتهایی ریشه می‌شوند، در تست‌های مکمل‌سازی اغلب با جدایه‌هایی که علایم پوستگی انتهایی را ایجاد نمی‌کنند، هتروکاریون‌هایی تشکیل می‌دهند. در بررسی‌های هاروسون وراش (Harveson and Rush 1998) از هفت گروه سازگار رویشی، شش تای آن‌ها دو نوع علایم را دارا بودند. این مسأله چنین فرضی را ایجاد می‌کند که ژن‌های مسوول سازگاری رویشی از ژن‌های مسئول بیماری‌زایی مجزا هستند و گروه‌های سازگاری رویشی قادر نیستند جدایه‌هایی را که باعث دو نوع علایم اصلی بیماری می‌شوند شناسایی کرده یا تشخیص دهند. گاهی در بین بعضی از جدایه‌های قارچ هیچ هتروکاریونی در محل برخورد موتانت‌های نیت مختلف یک جدایه تشکیل نمی‌گردد، این جدایه‌ها به نام خودناسازگار معرفی می‌شوند (Klittich and Leslie 1987). در این مطالعه از ۲۷ جدایه ۲۳ جدایه خودسازگار بودند و چهار جدایه خودناسازگاری نشان دادند. در جدایه‌های خودسازگار، وقتی که آناستاموز هیفی و به دنبال آن اتصال پروتوپلاسمی صورت می‌گیرد، هتروکاریون تشکیل می‌شود، ولی در حالت خودناسازگاری، به دنبال آناستاموز هیفی ممکن است اتصال پروتوپلاستی صورت نگرفته و سلول‌های هتروکاریوتیک کشنده از هسته‌های ناسازگار تشکیل گردند. در تفسیر این حالت گفته می‌شود که ممکن است ترکیبات غشا سلولی یا موادی که بین غشا سلولی و دیواره سلولی قرار دارند، در این واکنش کشنده دخالت داشته باشند. در جمعیت‌های مزرعه حدود ۲-۱ درصد جدایه‌های خودناسازگار دیده می‌شود و پراکنش جغرافیایی وسیعی دارند (Chen and Swart 2001). در واقع وجود ژنتیک متفاوت در ۲ لوکوس مجزا و متفاوت به صورت خودناسازگاری ظاهر می‌شود (Glass and Kuldau 1992). لسلی در این باره معتقد است که : استرینهای خودناسازگار در طبیعت از ایجاد تعداد زیاد گروههای سازگار رویشی جلوگیری می‌کنند. چنین گفته می‌شود که جدایه‌های خوناسازگار غیر طبیعی نبوده و آنها در واقع تحت فشار زیاد انتخاب قرار نگرفته‌اند (Chen and Swart 2001).

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده References

راه خدایی، ا. ۱۳۷۹. تعیین گروه‌های سازگار رویشی در جمعیت‌های *Fusarium solani* و *Fusarium* oxysporum و بیماری‌زایی آن‌ها روی سیب‌زمینی در استان فارس و خوزستان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز, ایران. ۱۲۴ صفحه.

فرخی‌نژاد، ر. ۱۳۷۸. بررسی تنوع ژنتیکی در جمعتی‌های *Fusarium moniliforme* جدا شده از بذور دو رقم ذرت هیبرید با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی. مجله علمی کشاورزی، ۲۲(۱):۷۸ ـ۶۷

ناصری، ب. ۱۳۷۹. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت در قارچ *Fusarium graminearum* با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی و رابطه آن با بیماری‌زایی نسبی جدایه‌ها. مجله بیماری‌های گیاهی,۳۶ (۳ و ۴), ۲۸-۲۶.

نورس مفرد، ن. ۱۳۷۹. تعیین تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ‌های عامل بوته‌میری زیره سبز در استان خراسان، با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی VCG و ارتباط آن با بیماری‌زایی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی, دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز. ۱۰۰صفحه.

Booth C (1997) Fusarium, laboratory guide to the identification of the major species. Common Wealth Mycological Institute, Kew, Survey, UK. 237p

Burgess LW, Summerell Brett A, Bulbck S, Gott KP, Backhouse D (1994) Laboratory manual for fusarium research. Fusarium research laboratory, Department of Crop Sciences, university of Sydney and Royal Botanic Gardens

Clark C, Hoy M, Nelson P (1995) Variation among isolates of *Fusarium ateritium* from sweet potato for pathogenicity and vegetative compatibility. Phytopathology 85: 624 – 629

Chen W, Swart W (2001) Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates associated with root rot of *Amaranthus hybridus* in South Africa. Plant Disease 85: 1076-1080

Correll J, Puhalla J (1985) Vegetative compatibilty groups among non pathogenic root-colonizing strains of *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Botany 64: 2358-2361

Correll J, Klittich C, Leslie J (1987) Nitrate non utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility testes. Phytopathology 77: 1640-1646

www.SID.ir

Archive of SID

Daayf F, Nicole M, Geiger J (1995) Differentation of *Verticillium dahliae* populations on the basis of vegetative compatibility and pathogencity on cotton. European Journal of Plant Pathology 101: 69-79

Elias K, Schneider R, Lear M (1991) Analysis of vegetative compatibility groups in non pathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from symptomless tomato roots. Canadian Journal of Botany 69: 2089-2094

Gerlach W, Nirenberg H (1982) The genus fusarium a pictorial atlas. Bibliothek der biologischen bunde santlat fur land-und for stwritsch aftkonigh- luise strabe 19-D-1000 berlin 33 (Dahlem). 406 p

Glass N, Kuldau G (1992) Mating type and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycetes. Annal Reveiw of Phytopathology 30: 201-204

Harveson R, Rush C (1997) Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates from sugar beet as determined by vegetative compatibility. Plant Disease 81: 85-88

Hawthorne B, Rees-George J(1996) Use of nitrate non-utilizing mutants to study vegetative incompatibility in *Fusarium solani (Nectria heamatococca)*. Especially members of mating populations I, V and VI. Mycological Research 100: 1075-1081

Katan T, Zamir D, Sarfatti M, Katan J (1991) Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum f. sp. radicis – lycopersici.* Phytopathology 81: 255-262

Katan T, Shabi E (1996) Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloesporiodes* from almond in Israel. European Journal of Plant Pathology 102: 597-600

Kedera C, Leslie J, Claflin E (1994) Genetic diversity of fusarium section liseola (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. Phytopathology 84: 603-607

Kistler H (1997) Genetic diversity in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathology. 87: 473 – 479

Klittich C, Leslie J (1987) Nitrate reduction mutants of *Fusarium monilforme* (*Gibbrella fujikuroi*). Genetics 118: 417-423

www.SID.ir

Archive of SID

Leslie J (1987) A Nitrate non– utilizing mutant of *Gibberella Zeae*. Journal of.General Microbiology 133: 1279 – 1287

Leslie J (1993) Fungal vegetative compatibility. Annual Review of phytopathology 31: 127- 50

Manicom B, Bar– Joseph M, Kotze JM, Becker M (1990) A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum. F. s. p. dianthi*. Phytopathology 80: 336-339

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) Fusarium species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State UniversityP ress. U.S.A.193p

Puhalla J (1985) Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Canadian Journal of Botany 63: 179-183

Pyung Ahn I, Chung H, Lee Y(1998) Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarim oxysporum f. s. p. cucumerinum*. Plant Disease 82: 244-246

Robert L, Leslie J (1992) Nitrate– non utilizing mutants of *Gibberella zeae (Fusarium graminearum)* and their use in determining vegetative compatibility. Experimental Mycology 16: 308-315

Siefert K (2001) Fus key .Available:http://WWW.sis.Agr.gc.ca/brd/fusarium/

www.SID.ir