

شناسایی گونه‌های *Fusarium* در استان لرستان با استفاده از ناحیه بین ژنی فاصله‌گذار رونویسی شونده درونی

Identification of *Fusarium* Species in Lorestan Province by Internal Transcribed Spacer Intergenic Area

سارا سیاهپوش^۱ و مصطفی درویش‌نیا^{۲*}

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۱۴

چکیده

باتوجه به اهمیت کشت گندمیان در حوزه زاگرس، کشت مکرر و غالب اکثر مزارع این مناطق را گیاهان این خانواده به خود اختصاص می‌دهند. از میان میکروارگانیسم‌های مختلف، گونه‌های قارچ *Fusarium* از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در این محصولات می‌باشند. در سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ با هدف تعیین گونه‌های مختلف *Fusarium* همراه با ریشه و طوقه گندمیان در استان لرستان، از گیاهان زراعی و غیرزراعی مزارع غلات و مراتع مختلف در این استان نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌برداری از گیاهان دارای علائم پوسیدگی طوقه و ریشه یا تغییر رنگ در این ناحیه انجام و جداسازی عامل قارچی موردنظر با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی صورت گرفت. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از ریخت‌شناسی و کلیدهای شناسایی و تعیین توالی بخشی از ژنوم شامل ناحیه فاصله‌گذار رونویسی‌شونده درونی (Internal Transcribed Spacer) انجام شد. در این مطالعه ۱۳ گونه از جنس *Fusarium* شامل *F. F. fujikuroi*, *F. falciforme*, *F. ensiforme*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. avenaceum*, *acuminatum*، *F. tricinatum* و *F. solani*، *F. scirpi*، *F. reticulatum*، *F. proliferatum*، *F. nygamai*، *longipes* گونه *F. proliferatum* بیش‌ترین فراوانی را در این استان دارد. گونه *F. ensiforme* برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شود و برای فلور ایران جدید است. هم‌چنین این نخستین گزارش از *F. falciforme* از ریشه گندم در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی طوقه و ریشه، ریخت‌شناسی، گندمیان، لرستان، *Fusarium*

۱ و ۲. به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

Email: mdarvishnia44@yahoo.com

* نویسنده مسوول

مقدمه

ژنتیکی *Fusarium culmorum* جدا شده از گندم را با استفاده از ویژگی‌های شکل‌شناسی و آزمایشات مولکولی بررسی نمودند. داوری و همکاران (2014) نیز جدایه‌های مرتبط با سنبله گندمیان وحشی را با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی کردند.

در این تحقیق با توجه به اهمیت کشت غلات در استان‌های غربی کشور و خسارت فراوان بیماری‌هایی مانند پوسیدگی‌های طوقه و ریشه، گونه‌های فوزاریوم جدا شده از ریشه و طوقه گیاهان خانواده گندمیان در استان لرستان بررسی و شناسایی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در بهار، تابستان و پاییز ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از مزارع غلات و نیز مراتع استان لرستان انجام شد. نمونه‌های دارای علائم مشکوک به پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

جداسازی جدایه‌ها

به‌منظور جداسازی بیمارگر موردنظر از بافت گیاه و خاک از محیط کشت اختصاصی تغییر یافته نش و اسنایدر (Nash and Snyder, 1962) استفاده شد. پس از رشد کلنی، خالص‌سازی و کشت در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) انجام شد و نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت تولید اندام‌ها و اسپورهای تیپیک قابل استفاده در شناسایی گونه‌های *Fusarium*، از محیط‌های کشت SNA، KCl، PDA و CLA در تناوب نوری در دمای اتاق و نیز آب مقطر سترون جهت تولید کلامیدوسپور استفاده شد.

شناسایی جدایه‌ها به روش ریخت‌شناسی

ویژگی‌های بررسی شده جهت شناسایی ریخت‌شناسی عبارت بودند از رنگ و میزان رشد کلنی در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار، شکل و اندازه ماکروکنیدی، وجود یا عدم وجود میکروکنیدی و تشکیل در زنجیره یا سر دروغین، نوع سلول کنیدی‌زا (منوفیالید یا پلی‌فیالید) و وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر بوث؛ گرلاخ و نیرنبرگ؛ نلسون و همکاران؛ پاسکو؛ برجیس و همکاران؛ سیفرت؛ سامرل و همکاران؛ ادونل و همکاران؛ نزل و سامرل؛ گاکاوا (Booth, 1971; Gerlach and Nirenberg, 1982; Nelson et al., 1983; Pascoe, 1990; Burgess et al., 1994; Seifert, 1996; Summerell et al.,

خانواده گندمیان (*Poaceae*) با ۷۰۷ جنس و بیش از ۱۱۰۰۰ گونه از مهم‌ترین گیاهان علفی می‌باشند کلیتون و همکاران (Clayton et al., 2006) که بخش بزرگی از اقتصادی‌ترین گیاهان را شامل می‌شود. این گیاهان در سطح وسیعی در دنیا کشت شده و در مقایسه با سایر محصولات زراعی انرژی فراوانی را از منابع نشاسته‌ای، چربی و پروتئینی تأمین می‌کنند. بیمارگرهای قارچی که در چرخه بیماری‌زایی خود دارای یک فاز نکروتروف هستند همچون *Fusarium spp.* خسارات قابل توجهی به محصول غلات در کل دنیا وارد می‌سازند که سالانه میلیاردها دلار برآورد شده‌است پاول و همکاران (Pawell et al., 2017). به‌طور کلی غلات همچون سایر گیاهان مورد حمله بیمارگرهای فراوانی قرار می‌گیرند که قسمت‌های مختلف گیاه از جمله ریشه، طوقه، ساقه و خوشه را آلوده می‌کنند. یکی از مهم‌ترین این بیمارگرها جنس *Fusarium* است که قارچی با پراکنش بسیار وسیع است و گونه‌های مختلف آن در کلیه مناطق جغرافیایی در سراسر دنیا پراکنده‌اند. این جنس گونه‌های فراوانی دارد که بیش‌تر آن‌ها بیمارگرهای بسیار مهمی در گیاهان متعدد به‌شمار می‌روند نلسون و همکاران؛ نزل و سامرل (Nelson et al., 1983; Leslie and Summerell, 2006). در جدیدترین بررسی انجمن بین‌المللی بیماری‌شناسان گیاهی، دو گونه از این جنس شامل *F. oxysporum* و *graminearum* در بین ۱۰ بیمارگر گیاهی بر اساس اهمیت علمی/اقتصادی به‌ترتیب در جایگاه چهارم و پنجم قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده اهمیت این جنس می‌باشد دین و همکاران (Dean et al., 2012). خسارت این قارچ در غلات به‌صورت کاهش کمیت و کیفیت محصول تولیدی در اثر بلایت خوشه بوده و هم‌چنین موجب بلایت گیاهچه، کاهش جوانه‌زنی بذر و پوسیدگی طوقه و ریشه می‌شود که این موارد به نوبه خود موجب کاهش محصول و خسارت غیرمستقیم به آن می‌گردد مانکولد؛ نانژه و همکاران (Munkvold, 2003; Nganje et al., 2004).

درویش‌نیا و همکاران (2006) براساس خصوصیات مورفولوژیک، ۳۲ گونه فوزاریوم را از تیره گندمیان مراتع کشور جداسازی و شناسایی نمودند. چهری و همکاران (2010) نیز براساس مشخصات مورفولوژیکی ۲۹ گونه از بخش‌های مختلف فوزاریوم را از ریشه و ساقه ذرت در استان کرمانشاه شناسایی کردند. عبادی (2010) در مطالعات خود به روش مورفولوژیکی و مولکولی، جایگاه فیلوژنتیکی *Fusarium semitectum* را مورد بررسی قرار داد. پوزشی‌میاب و همکاران (2014) تنوع

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی داده‌ها

برای ارزیابی توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به جدایه‌های مورد بررسی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی آن‌ها، از نرم‌افزار MEGA6 تحت سیستم عامل ویندوز استفاده شد تا مور/ و همکاران (Tamura et al., 2013). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ارزیابی توالی نوکلئوتیدی نواحی ژنی جدایه‌های مختلف و ترسیم درخت فیلوژنتیکی آن‌ها، گونه *F. ventricosum* به‌عنوان گروه خارجی (Outgroup) انتخاب و از روش نیبرجویینگ (Neighbor-Joining)، سائیتو و نی (Saitou and Nei, 1987) استفاده گردید. برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در دندروگرام حاصل، تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید فلسنستین (Felsenstein, 1985).

نتایج

در این بررسی از ریشه و طوقه گیاهان خانواده گندمیان در استان لرستان، ۱۳ گونه فوزاریوم شناسایی و در بانک ژن ثبت گردید که فهرست آن‌ها به همراه کد دسترسی در بانک ژن در جدول ۲ آورده شده‌است. کلیه گونه‌ها از مزارع و مراتع استان لرستان جمع‌آوری شدند. جدایه‌ها به روش ریخت‌شناسی و با استفاده از ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی شناسایی گردیدند. از میان گونه‌های شناسایی شده، گونه‌های *F. ensiforme* با ۲ جدایه از منطقه کوه‌دشت از ریشه گندم و *F. falciforme* با ۸ جدایه از منطقه ازنا از ریشه گندم برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شوند. بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی به‌ترتیب به گونه‌های *F. proliferatum* با ۱۰۱ جدایه و *F. ensiforme* با ۲ جدایه و ۰/۵ درصد تعلق داشت.

توصیف گونه‌های شناسایی شده

1. *Fusarium ensiforme* Samuels et al., Mycologia, 103(6): 1311 (2011)

این گونه سرعت رشد متوسطی دارد به‌طوری‌که پس از یک هفته قطر کلنی در محیط‌کشت PDA به ۳/۲-۳/۴ سانتی‌متر رسید. تولید میسلیوم هوایی به رنگ سفید می‌کند. رنگ پشت پرگنه کرمی رنگ تا نارنجی است. اسپوردوکیوم پس از حدود ۲ هفته تشکیل می‌شود. ماکروکنیدی‌های شکل گرفته بر روی اسپوردوکیوم، بلند، دارای کمی انحنا، دارای ۳-۷ دیواره، دارای سلول پایه پاشنه‌ای شکل مشخص و سلول انتهایی کمی گرد، به اندازه ۴۵-۶۰/۲ × ۴/۵-۶/۵ میکرومتر هستند. کنیدیوفورهای روی میسلیوم‌های هوایی فراوان، صاف و بدون انشعاب هستند. میکروکنیدی‌ها تخم‌مرغی بدون دیواره، به اندازه

2003; O'Donnell et al., 2004; Leslie and Summerell, 2008; Gagkaeva, 2006) با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی انجام شد.

استخراج DNA

با هدف شناسایی دقیق‌تر و شناسایی جدایه‌های جدید، بخشی از ژنوم شامل ناحیه ITS جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، بافت میسلیومی قارچی با استفاده از محیط‌کشت مایع سیب‌زمینی- دکستروز- برات (PDB) و روش کاغذ صافی و پمپ خلاء تهیه و در فریزر نگهداری شد (Al-Samarrai and Schmid, 2000). استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش ژانگ و استفنسون (Zhong and Steffenson, 2001) انجام شد. محلول به‌دست‌آمده برای نگهداری طولانی مدت در دمای ۲۰°C- قرار داده شد.

تکثیر ناحیه فاصله‌گذار رونویسی‌شونده درونی (ITS)

برای تکثیر این ناحیه از آغازگرهای ITS1 و ITS4 استفاده شد (White et al., 1990; Gardes and Bruns, 1993) (جدول ۱).

مقادیر حجمی مواد به‌کار رفته در ترکیب مخلوط PCR به حجم نهایی ۲۵μl به این صورت بود: DNA ژنومی الگو ۳μl، آغازگرهای مستقیم و معکوس هر کدام ۰/۵ μl، مخلوط واکنش ۱/۵mM به حجم ۱۲/۵μl و آب دیونیزه سترون ۸/۵μl. واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA با واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دورگه‌سازی در ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (با تکرار ۳۵ چرخه در سه مرحله اخیر)، بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه انجام شد.

به‌منظور مشاهده محصول PCR، الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲۵ درصد انجام گرفت. جهت بررسی وزن باندهای تشکیل شده از نشانگر اندازه DNA یک کیلوبازی (Gene Ruler TM 1Kb DNA Ladder به شماره SM0313) ساخت شرکت آلمانی MBI Fermentas استفاده شد. عکس‌برداری با استفاده از دستگاه Gel Documentation انجام شد (دونل و سیگنیک (O'Donnell and Cigelnik, 1997). محصولات تکثیر شده، خالص‌سازی و برای تعیین توالی به شرکت پیشگام تهران ارسال شدند. سپس کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas Pro نسخه 1.7.6 و نرم‌افزار Editseq نسخه 5.01 مشاهده، ویرایش و در بانک ژن بلاست یا مشابهت‌سازی شدند (آلتشول و همکاران (Altschul et al., 1997).

(2017) و از برخی مناطق دنیا گزارش شده‌است. نخستین بار توسط سامریل و اشروور (2002) به‌عنوان گونه مجزا در بخش *F. solani* شناسایی و معرفی گردید. در ایران این گونه توسط چهری و همکاران (2014) از خاک‌های زراعی گزارش شده‌است. این گونه به تعداد ۸ جدایه از منطقه ازنا در لرستان از ریشه گندم جداسازی و شناسایی شد. این نخستین گزارش از گونه *F. falciforme* بر روی گندم در ایران است.

آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌ها

هم‌ردیف کردن توالی‌ها، نشان داد که تنوع و تفاوت‌هایی در بین بخش‌های فوزاریوم و در میان جدایه‌ها وجود دارد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با روش نیبرجویینینگ و با گونه *F. ventricosum* به‌عنوان گروه خارجی انجام و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد (شکل ۳). گونه‌های *Fusarium* شناسایی شده، در دو گروه فیلوژنتیکی اصلی قرار گرفتند. جدایه‌های SPF282 و SPF146، و SPF054 و SPF015 در کنار یکدیگر و همه در مجاورت گونه‌های *F. proliferatum* با ۱۰۰ درصد مشابهت جای گرفتند که با شناسایی ریخت‌شناسی مطابقت کامل دارد. جدایه SPF300 که به روش ریخت‌شناسی گونه *F. acuminatum* شناسایی شد در کنار گونه اخذ شده از بانک ژن با کد دسترسی JX177431 با ۱۰۰ درصد مشابهت قرار گرفت. جدایه SPF207 در مجاورت گونه *F. solani* با ۹۹ درصد مشابهت جای گرفت که گونه شناسایی شده از طریق ریخت‌شناختی را تأیید نمود. جدایه SPF361 که گونه جدید *F. ensiforme* شناسایی شده بود، در کنار گونه بانک ژن با کد دسترسی LT746248 قرار گرفت. جدایه‌های SPF129 و SPF130 از بخش *Martiella* به‌صورت جداگانه در نزدیکی جدایه‌های فوق قرار گرفتند. جدایه SPF010 از بخش *Sporotrichiella* در کنار گونه *F. tricinctum* اخذ شده از بانک ژن با کد دسترسی MG704912 با ۹۹ درصد مشابهت قرار گرفت که با نتایج ریخت‌شناسی مطابقت دارد.

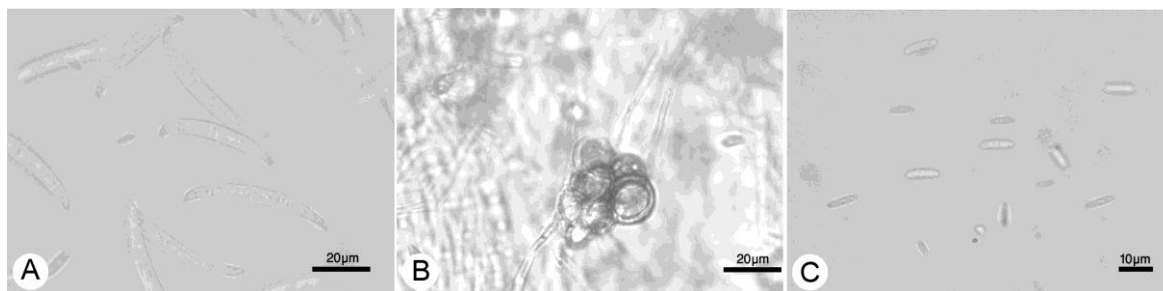
۱۰-۶/۶ × ۲-۲/۴ میکرومتر هستند. سلول کنیدی‌زا به‌صورت منوفیالید است. این گونه کلامیدوسپورهایی با دیواره صاف و به‌ندرت دارای تزئینات تولید می‌کند (شکل ۱).

شناسایی این جدایه از طریق خصوصیات ریخت‌شناختی با استفاده از مقاله چهری و همکاران (2015)، انجام شد. کلیه ویژگی‌های فوق، با منبع ذکر شده انطباق کامل داشتند. این گونه در محیط‌های کشاورزی رشد می‌کند و موجب پوسیدگی‌های طوقه و ریشه می‌شود. نخستین بار توسط نلیم و همکاران (Nalim et al., 2011) به‌عنوان گونه مجزا درون بخش *F. solani* شناسایی و معرفی گردید. این گونه از ۲ جدایه از منطقه کوه‌دشت لرستان از ریشه گندم جداسازی و شناسایی شد. این نخستین گزارش از گونه *F. ensiforme* بر روی گندم در ایران است (SPF361).

2. *Fusarium falciforme* Summerbell and Schroers, Journal of Clinical Microbiology, 40(8): 2872 (2002)

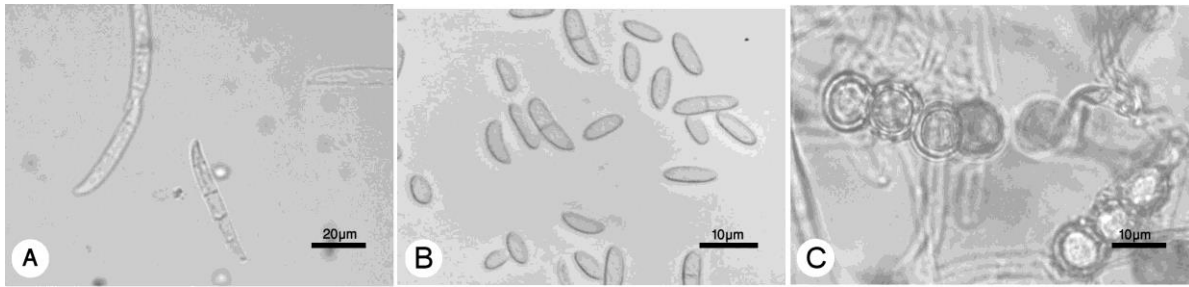
این گونه سرعت رشد سریعی دارد به‌طوری‌که پس از یک هفته قطر کلنی در محیط‌کشت PDA به ۶ سانتی‌متر رسید. میسلیم هوایی سفید، زرد تا کرمی‌رنگ است. رنگ پشت پرگنه زرد است. ماکروکنیدی‌های شکل گرفته بر روی اسپوردوکوم، قایقی‌شکل و دارای ۳-۵ دیواره، با سلول پایه دارای کمی فرورفتگی و سلول انتهایی نوک‌تیز، به اندازه ۴۷-۳۲/۲ × ۴/۶-۳/۶ میکرومتر هستند. کنیدیوفورهای روی میسلیم‌های هوایی فراوان، کم و بیش صاف و بدون انشعاب هستند. میکروکنیدی‌ها تخم‌مرغی تا لوبیایی‌شکل، ۱-۰ دیواره، به اندازه ۹/۶-۶/۳ × ۳/۲-۵/۵ میکرومتر هستند. سلول کنیدی‌زا به‌صورت منوفیالید است. این گونه دارای کلامیدوسپورهایی تکی، دوتایی و توده‌ای است (شکل ۲).

شناسایی این جدایه از طریق خصوصیات ریخت‌شناسی با استفاده از مقاله سامریل و اشروور (Summerbell and Schroers, 2002) انجام شد. کلیه ویژگی‌های فوق، با منبع ذکر شده انطباق کامل داشتند. این گونه در محیط‌های زراعی به‌صورت رایج رشد می‌کند سوزا و همکاران (Sousa et al.,

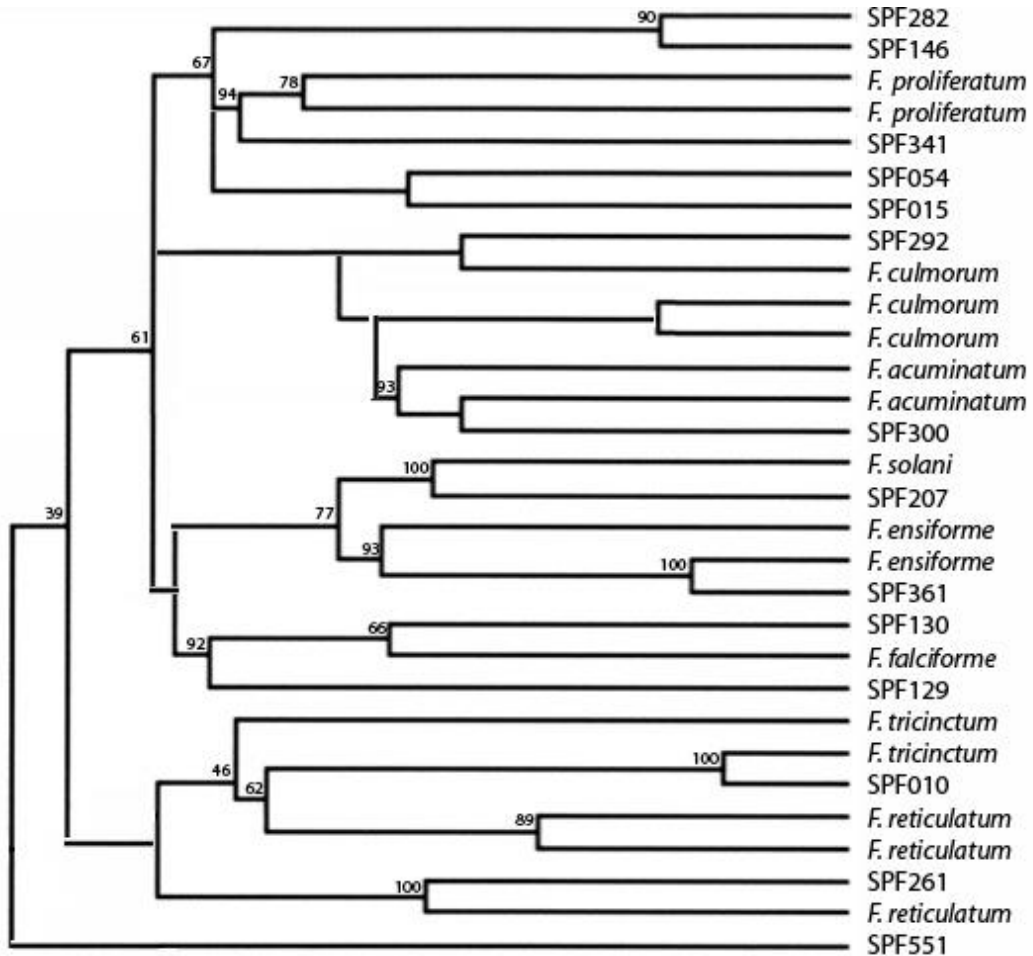


شکل ۱: *Fusarium ensiforme*: A. ماکروکنیدیوم، B. توده کلامیدوسپور، C. میکروکنیدیوم

Fig. 1: *Fusarium ensiforme*: A. Macroconidium, B. Chlamydospore clamp, C. Microconidium



شکل ۲: *Fusarium falciforme*: A. ماکروکنیدیوم، B. میکروکنیدیوم، C. کلآمیدوسپور
 Fig. 2: *Fusarium falciforme*: A. Macroconidium, B. Microconidium, C. Chlamydospore



شکل ۳: دندروگرام جدایه‌های فوزاریومی به روش نیبرجویینگ. کد دسترسی جدایه‌های اخذ شده از بانک ژن داخل پرانتز آورده شده است. اعداد بوت استراپ با هزار تکرار - CI=0.85, RI=0.94

Fig. 3: Dendrogram of *Fusarium* isolates by Neighbor joining method. Codes in parenthesis are accession numbers of gene bank isolates. With 1000 replication of boot strap. CI=0.85, RI=0.94

جدول ۱: توالی آغازگرهای ITS1 (گاردز و برنز، ۱۹۹۳) و ITS4 (ویت و همکاران، ۱۹۹۰)

Table 1: Primers sequences, ITS1 (Gardes and Bruns, 1993) and ITS4 (White *et al.*, 1990)

نام آغازگر	توالی
Primer name	Sequences
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC

جدول ۲: فهرست گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق به همراه کد دسترسی در بانک ژن

Table 3: List of identified species in this research and their accession numbers in gene bank

کد دسترسی Accession number	گونه شناسایی شده Species	کد جدایه Isolate
MH378686	<i>F. acuminatum</i>	SPF300
MH547033	<i>F. culmorum</i>	SPF292
MH120871	<i>F. ensiforme</i>	SPF361
MH046062	<i>F. falciforme</i>	SPF129
MH379108	<i>F. falciforme</i>	SPF130
MH547046	<i>F. proliferatum</i>	SPF341
MH379109	<i>F. proliferatum</i>	SPF054
MH547042	<i>F. proliferatum</i>	SPF282
MH547120	<i>F. proliferatum</i>	SPF015
MH547040	<i>F. proliferatum</i>	SPF146
MH547035	<i>F. reticulatum</i>	SPF261
MH547034	<i>F. solani</i>	SPF207
MH546136	<i>F. tricinctum</i>	SPF010

بحث

همچون مجموعه گونه‌های *F. oxysporum* که حاوی چندین گونه پنهان از نظر ریخت‌شناسی است، توالی این ناحیه ژنی برای تشخیص گونه‌ها کارایی چندانی ندارد (تانارسی و همکاران، 2015). در چنین مواردی استفاده از توالی یک ناحیه ژنی و یک ناحیه بین ژنی به صورت توأم توصیه می‌شود لارنس و همکاران (Laurence et al., 2014). بسیاری از محققین از نواحی ژنی مختلفی برای تحلیل‌های فیلوژنتیکی گونه‌های *Fusarium* استفاده کرده‌اند. از آن جمله می‌توان این موارد را نام برد: mtSSU rDNA و EF-1 α در *F. hostae* و *F. redolens* توسط باین و همکاران (Baayen et al., 2001)؛ ITS، mtSSU و EF-1 α در *F. commune* و *F. oxysporum* توسط استوارت و همکاران (Stewart et al., 2006)؛ ITS، LSU و EF-1 α در RPB2 و FSSC و FTSC توسط ادونل و همکاران (O'Donnell et al., 2008)؛ ادونل و همکاران (2013) با استفاده از RPB1 و RPB2، ۲۲ مجموعه گونه‌ای جدید برای جنس *Fusarium* شناسایی کرده‌اند. وانگ و همکاران (Wang et al., 2011)، ناحیه IGS را برای تشخیص جدایه‌های این جنس مفید دانسته‌اند.

در این تحقیق، گونه‌های شناسایی شده به روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی، ۱۳ گونه از بخش‌های مختلف بودند به این صورت که سه گونه از بخش *Discolor*، یک گونه از بخش *Dlaminii*، سه گونه از بخش *Gibbosum*، دو گونه از بخش *Liseola*، سه گونه از بخش *Solani* و یک گونه از بخش *Sporotrichiella* بودند. بخش *Discolor*، *Gibbosum* و *Solani* هر کدام با سه گونه بیش‌ترین فراوانی و بخش‌های *Dlaminii*، *Roseum* و *Sporotrichiella* هر کدام با یک گونه کم‌ترین فراوانی را داشتند. تنوع میزبانی وسیعی در برخی از گونه‌ها خصوصاً *F. proliferatum* و *F. solani* دیده شد.

جنس *Fusarium* تنوع ریخت‌شناسی بالایی دارد که تشخیص گونه‌های مختلف آن را مشکل می‌سازد. برخی از ویژگی‌های گونه‌های مختلف این جنس به مرور زمان و در اثر کشت‌های پی‌درپی، تغییر می‌یابند. لذا استفاده از کشت‌های تازه و خالص‌سازی شده، جهت بررسی‌های ریخت‌شناختی امری ضروری است. شناسایی با روش‌های مرسوم ریخت‌شناسی، مستلزم صرف زمان و نیروی انسانی و نیازمند مهارت و تخصص است لیونس و همکاران (Lievens et al., 2005). شناسایی برخی از گونه‌های *Fusarium* بر مبنای خصوصیات ریخت‌شناختی گاهی ناقص و بی‌نتیجه است. در چنین مواردی روش‌های مولکولی به‌عنوان شاخص تکمیلی شناسایی بسیار مفید خواهد بود نورعین‌عزتی و صالح (Nur Ain Izzati and Salleh, 2009). پیشرفت روش‌های فیلوژنتیکی در زمینه شناسایی گونه‌های قارچی مختلف، کمک شایانی به محققین نموده است. ناحیه فاصله‌گذار رونویسی‌شونده درونی در تشخیص گونه‌های جنس *Fusarium* و بررسی‌های تاکسونومیک به مراتب کم‌تر از سایر نواحی همچون ژن EF-1 مورد استفاده قرار گرفته است لکن در پژوهش‌هایی که این ناحیه استفاده شده است به‌خوبی برای تمایز دادن گونه‌های قارچی نتیجه داده است بریان و همکاران (Bryan et al., 1995). گارجا و همکاران (Gurja et al., 2009) نیز از این ناحیه بین ژنی برای ساخت آغازگرها در شناسایی گونه‌های *Fusarium* استفاده کردند. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق (ITS1 و ITS4) توسط گارجا و همکاران (2009) برای شناسایی نژادهای بیماری‌زای *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* به‌کار رفته‌اند. تانارسی و همکارانش (Tunarsih et al., 2015) از داده‌های توالی ناحیه ITS برای شناسایی جدایه‌های فوزاریومی و بررسی‌های فیلوژنتیکی استفاده نمودند. البته در مواردی

دسته‌بندی آن‌ها در بخش‌های مختلفی گردید. این گروه‌بندی با بخش‌ها و گروه‌های مشخص شده در منابع معتبر براساس مشخصات ریخت‌شناختی، تطابق دارند.

سپاسگزاری

از مدیریت حفظ نباتات سازمان جهاد کشاورزی استان لرستان به جهت یاری رساندن در انجام این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

در تحقیق حاضر، تجزیه و تحلیل توالی‌های به‌دست آمده از ناحیه ITS جدایه‌ها، بیانگر تطابق صفات ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی گونه‌ها بود. براساس تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی، جدایه‌های مربوط به بخش *Liseola* در دو گروه اصلی که از یک جد منشاء می‌گیرند، قرار گرفته که بیانگر روابط نزدیک فیلوژنتیکی این گروه گونه‌ای می‌باشد، اگرچه تفاوت‌هایی در بین این گروه گونه‌ای وجود دارد و در چند خوشه قرار گرفته‌اند. تحلیل‌های توالی‌های ناحیه ITS جدایه‌های مختلف به‌دست‌آمده در این تحقیق، موجب

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۶-۱۴ متن انگلیسی مراجعه شود.