DOI: http://dx.doi.org/10.22092/jsb.2014.5853

تعیین تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* از چغندرقند در ایران

Pathogenic and genetic variation of Iranian isolates of *Fusarium oxysporum* from sugar beet in Iran

شایسته بلادی بهبهانی*[1]، سعید رضائی[2] و سیدباقر محمودی[3]

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۶

ش. بلادی بهبهائی، س. رضائی و س.ب. محمودی. ۱۳۹۳. تعیین تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* از چغندرقند در ایران. **چغندرقند، ۳۰(۱): ۱۲- ۱**

چکیده

تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی ۱۳ جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* که طی سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۷۸ از مزارع چغندرقند شش استان کشور ایران جمع‌آوری شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. تنوع بیماری‌زایی آنها با استفاده از روش غوطه‌ورسازی ریشه گیاهچه‌های چهارهفته‌ای در سوسپانسیون اسپور در لوله آزمایش انجام شد. بر این اساس جدایه‌ها به دو گروه بیماری‌زای قوی و ضعیف دسته‌بندی شدند. تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از ۱۵ آغازگر تصادفی و به روش RAPD ارزیابی شدند. بر این اساس چند شکلی قابل ملاحظه‌ای بین جدایه‌های مورد بررسی مشاهده شد. گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌ها با استفاده از UPGMA به کمک نرم‌افزار MVSP، جدایه‌ها را به پنج گروه طبقه‌بندی کرد. رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی بر اساس RAPD-PCR با بیماری‌زایی جدایه‌ها یافت نشد، اما مجزا شدن برخی از جدایه‌ها از سایرین با مناطق جغرافیایی آنها در ارتباط بود. DNA ژنومی جدایه‌ها با کمک آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر شد. محصول تکثیر شده از DNA جدایه‌های مختلف ، با آنزیم‌های برشگر *Eco*RI، *Hae*III، *Taq*I هضم گردید. آنالیز ITS-RFLP جدایه‌ها الگوی باندی مشابهی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: چغندر قند، *Fusarium oxysporum*، RAPD-PCR ، rDNA-RFLP

۱ -دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی واحد علوم و تحقیقات- تهران *نویسنده مسئول shayesteh.beladi@gmail.com
۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات- تهران
۳- دانشیار موسسه تحقیقات چغندرقند- کرج

مقدمه

یکی از عوامل بیماری‌زای خاکزاد که از مناطق مختلف چغندرکاری در ایران گزارش شده و باعث بیماری زردی و پژمردگی در این محصول می‌شود .*Fusarium oxysporum* Schlecht emend. Snyd. & Hans. f. sp. *betae* است. علائم بیماری ابتدا روی برگ‌های مسن به صورت زردی (کلروز) بین رگبرگ‌های بزرگ ظاهر می‌شود. با پیشرفت بیماری، برگ‌های جوان هم کلروتیک و برگ‌های مسن نکروتیک می‌شوند. در مراحل اولیه بیماری گیاه در طول روز دچار پژمردگی می‌شود ولی در شب دوباره به‌حالت اول برمی‌گردد. تمام برگ‌ها درنهایت می‌میرند و به‌صورت توده‌ای در اطراف طوقه باقی می‌مانند. علائم خارجی روی ریشه وجود ندارد. برش عرضی ریشه تغییر رنگ آوندی را به قهوه‌ای متمایل به خاکستری نشان می‌دهد. گیاهان بالغ به‌ندرت می‌میرند ولی محصول کاهش می‌یابد (Ruppel 1991). اولین بار بیماری زردی فوزاریومی چغندرقند از ایالت کلرادو در آمریکا گزارش شد و عامل آن *Fusarium conglutinans* var. *betae* معرفی شد(Stewart 1931)، که بعدها به *F. oxysporum* f. sp. *betae* تغییر نام یافت (Ruppel 1991).

بیماری‌زایی این قارچ روی چغندرقند با استفاده از روش غوطه‌ورسازی ریشه در سوسپانسیون اسپور (root-dip) بررسی شده است (Hanson 2006). تنوع ژنتیکی این قارچ تاکنون با روش‌های آزمون آیزوزایم، گروه‌های سازگاری رویشی (VCG) و RAPD مورد بررسی قرار گرفته است. جدایه‌های بیماری‌زا در تگزاس به روش آنالیز آیزوزایم بر اساس تفاوت در پروفایل آنزیمی آنها از یکدیگر تفکیک شده‌اند (Martyn *et al.* 1989). بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶۰ جدایه *F. oxysporum* از ریشه‌های چغندرقند در تگزاس آنها را در هفت گروه سازگاری رویشی قرار داد (Harveson and Rush 1997). تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های بیماری‌زا روی چغندرقند از پنج ناحیه مختلف در امریکا با استفاده از تکنیک RAPD مبین درجه بالای چندشکلی بین جدایه‌ها بود و آنها را بر اساس ناحیه جغرافیایی از هم تفکیک نمود (Fisher and Gerik 1994). در مطالعه دیگری جدایه‌های بیماری‌زا *F. oxysporum* f. sp. *betae* (Fob) و *F . oxysporum* f. sp. *phaseolina* (Fop) روی چغندرقند و لوبیا با استفاده از تکنیک RAPD-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاکی از وجود چندشکلی بالایی در جدایه‌های Fob و Fop بود و این دو فرم اختصاصی از هم جدا شدند (Cramer 2003). در ایران اولین بار این بیماری در سال ۱۳۴۸ توسط بهداد از اصفهان گزارش شد (Behdad 1983). طی مطالعه‌ای در استان خراسان *F. oxysporum* به عنوان عامل پژمردگی آوندی چغندرقند معرفی شد و مقام سوم آلودگی را در بین قارچ‌های متنوع مولد پوسیدگی ریشه چغندرقند به خود اختصاص داد (Abasi Moghadam *et al.* 1997). در بررسی رئوفی و همکاران (Raufi *et al.* 2003) *F. oxysporum* دومین فراوانی را در بین گونه‌های مختلف فوزاریوم جدا شده از مناطق مختلف چغندرکاری ایران داشت و در بررسی بیماری‌زایی وی تفاوت در شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها را گزارش کرد. اصولاً در مطالعات مربوط به مقاومت گیاهان به بیمارگرها، ابتدا باید از ساختار ژنتیکی عامل بیماری‌زا شناخت کافی داشت و در صورت وجود تنوع در صفت بیماری‌زایی نیاز به انتخاب جدایه‌های نماینده ژنتیک غالب کشور می‌باشد تا بتوان از آنها در برنامه‌های اصلاحی و انتخاب ژرم‌پلاسم مقاوم (متحمل) بهره جست (Mahmoodi *et al.* 2005). پیش از اجرای برنامه‌های اصلاحی، برای دستیابی به ارقام با مقاومت پایدار، بایستی از روش‌های مطمئن و دقیق، ساختار جمعیت بیمارگر را

بررسی و با لحاظ تنوع بیماری‌زایی در برنامه‌های گزینش ارقام، به‌توان منبع مقاوم مناسب برای هر منطقه را شناسایی نمود. با این توصیف این تحقیق بر آن شد که به بررسی تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌های *F. oxysporum* جدا شده از چغندر قند در ایران بپردازد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد هشت جدایه *Fusarium oxysporum* از کلکسیون جدایه‌های قارچی بخش تحقیقات گیاهپزشکی موسسه تحقیقات چغندرقند دریافت شد. این جدایه‌ها در فاصله سال‌های ۱۳۷۸ تا ۱۳۸۰ از مناطق عمده چغندرکاری کشور جمع‌آوری شده بود. تعداد پنج جدایه هم از نمونه‌های بیمار چغندرقند از مناطق قزوین، همدان و کرمانشاه، طی سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ جداسازی شد.

آزمون بیماری‌زایی

ارزیابی تنوع بیماری‌زایی جدایه‌ها در لوله آزمایش به روش غوطه‌ورسازی ریشه در سوسپانسیون اسپور در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار برای هر جدایه انجام شد. از کشت ۷-۵ روزه جدایه‌های مختلف روی محیط کشت PDA زیر نور فلورسنت، سوسپانسیون کنیدی به غلظت 10^6 کنیدی در هر میلی‌لیتر تهیه شد. ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون در لوله آزمایش دهانه‌گشاد استریل ریخته شد. در هر لوله آزمایش یک گیاهچه چهارهفته‌ای چغندرقند، به‌صورتی قرار گرفت که ریشه آن درون سوسپانسیون و قسمت‌های هوایی گیاه خارج از آن باشد. دهانه لوله آزمایش برای ممانعت از ورود آلودگی طوری با پنبه استریل پوشانده شد که جلوی ورود و خروج هوا گرفته نشود. گیاهچه‌های شاهد در آب مقطر استریل قرار داده شدند. یک هفته بعد از مایه‌زنی گیاهچه‌ها از لوله آزمایش خارج شده و نمره‌دهی بر اساس مقیاس پانلا و همکاران با تغییراتی انجام شد(Panella *et al.* 1995). در این مقیاس اعداد زیر معادل با علائم تعریف شده است:

۰ = بدون علائم بیماری،

۱= برگ‌ها کلروتیک با حاشیه نکروتیک،

۲= ۵۰ درصد برگ‌ها کلروتیک با حاشیه نکروتیک و ۵۰ درصد برگ‌ها به رنگ قهوه‌ای،

۳= کل برگ‌ها به رنگ قهوه‌ای،

۴= برگ‌ها کاملاً خشک و به رنگ قهوه‌ای، ریشه خشک شده، مرگ گیاه.

بررسی تنوع ژنتیکی

برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچی از ۱۵ آغازگر تصادفی (۱۰ نوکلئوتیدی) در واکنش RAPD-PCR استفاده شد (جدول۱). تهیه توده میسلیومی جدایه‌های بیمارگر در محیط کشت مایع GYM (با ترکیب ۱۰ گرم گلوکز، یک گرم$NH_4H_2PO_4$ ، ۰/۲ گرم KCl، ۰/۲ گرم $MgSO_4$, $7H_2O$، پنج گرم مخمر، یک میلی‌لیتر از محلول یک درصد $ZnSO_4$ و یک میلی‌لیتر از محلول نیم درصد $CuSO_4$) صورت گرفت. سه قرص پنج میلی‌متری از حاشیه کلنی‌های پنج روزه جدایه‌های بیمارگر برداشته شده و به فلاسک‌های ارلن‌مایر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع GYM منتقل گردید. پس از یک هفته، توده میسلیومی جمع‌آوری گردید. استخراج DNA مطابق روش(Frederick *et al.* 2002) CTAB انجام گرفت و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده قرار داده شد.

واکنش-DNA (Randomly amplified polymorphism RAPD-PCR PCR)

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش RAPD به صورت پنج دقیقه در ۹۴°C، ۳۹ چرخه با ۴۰ ثانیه در ۹۴،۴۰°C ثانیه در ۳۴°C، ۸۰ ثانیه در ۷۲°C و مرحله تکثیر نهایی با ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بهینه‌سازی و انجام گردید (Toda *et al.* 1999). واکنش زنجیره‌ای PCR برای تمامی جدایه‌ها توسط ۱۵ آغازگر انتخابی صورت گرفت.

جدول ۱ مشخصات آغازگرهای تصادفی مورد استفاده در واکنش RAPD-PCR

ردیف	آغازگر (Primer)	توالی آغازگر (Sequence)
۱	UBC 203	CACGGCGAGT
۲	UBC 208	ACGGCCGACC
۳	UBC 211	GAAGCGCGAT
۴	UBC 213	CAGCGAACTA
۵	UBC 214	CATGTGCTTG
۶	UBC 283	CGGCCACCGT
۷	UBC 285	GGGCGCCTAG
۸	UBC 286	CGGAGCCGGC
۹	Takapoozist 1	CGTTGGATGC
۱۰	Takapoozist 2	CCAGACAAGC
۱۱	Takapoozist 7	CCGGCCTTAG
۱۲	Takapoozist 8	CCTGGGCCTC
۱۳	Takapoozist 9	CCTGGGCTGG
۱۴	Takapoozist 10	CCGGCCCCAA
۱۵	CinnaGene 9	CCTGGGCCT<A>

ارزیابی محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد صورت گرفت. الکتروفورز تحت شرایط ۲/۵ ولت بر سانتیمتر صورت گرفت. بافر اجرا در دستگاه الکتروفورز از نوع TAE (حاوی0.04M Tris-acetate و 0.001M Na2EDTA) بود. پس از پایان الکتروفورز، ژل در محلول حاوی یک میکروگرم در میلی‌لیتر متیل بروماید رنگ‌آمیزی شد. باندهای RAPD در معرض لامپ UV مشاهده شده و از آنها عکس‌برداری گردید. به منظور تجزیه و تحلیل و نمره‌دهی داده‌های حاصل از الکتروفورز، وجود یا عدم وجود هریک از باندها به صورت اعداد یک و صفر (یک برای وجود هر باند DNA و صفر برای عدم‌وجود آن) تعیین و در نرم‌افزار Excel ثبت گردید. گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌ها به روش UPGMA در نرم‌افزارMVSP انجام شد.

آنالیز ITS-RFLP

تکثیر قطعات rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. در این واکنش از آغازگرهای ITS1 (19- mer و-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3': ITS4 (20- mer) : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') به میزان ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد (Salazar *et al.* 2000). سیکل‌های حرارتی واکنش PCR به ترتیب ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه

سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، و مراحل دوم تا چهارم ۳۵ مرتبه تکرار شد. ارزیابی محصول PCR روی ژل آگاروز دو درصد صورت گرفت. الکتروفورز، رنگ‌آمیزی و مشاهده باندها با روش یاد شده قبلی صورت گرفت.

هضم محصول PCR

از آنزیم‌های *Eco*RI, *Hae*III, *Taq*I جهت هضم قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از دو جفت آغازگر ITS1 و ITS4 استفاده شد. هر واکنش هضم در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل هفت میکرولیتر محصول PCR، دو میکرولیتر آنزیم برشی، دو میکرولیتر بافر واکنش 10X مخصوص هر آنزیم و ۱۴میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر سترون بود. هضم به مدت دو ساعت و نیم در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد (برای آنزیم‌های *Hae*III و *Eco*RI) و در ۶۵ درجه سانتی‌گراد (برای آنزیم *Taq*I) انجام و نمونه‌های هضم شده تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. الکتروفورز روی ژل آگاروز دو درصد تحت شرایط ۲/۵ ولت بر سانتی‌متر صورت گرفت. رنگ‌آمیزی و مشاهده باندها مطابق روش یاد شده قبلی انجام شد.

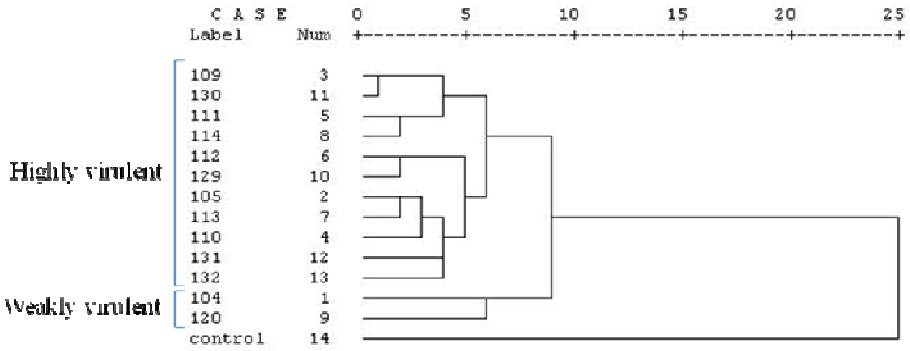
نتایج و بحث

بروز علایم بیماری روی گیاهچه‌های چغندرقند (تغییر رنگ و نکروز) هر روز مورد بررسی قرار گرفت. بعد از یک هفته گیاهچه‌ها از سوسپانسیون اسپور خارج شده و با مقیاس صفر تا چهار نمره‌دهی شدند.

شکل ۱ مقایسه علائم بیماری در آزمون بیماری‌زایی یک هفته بعد از مایه‌زنی

تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها با استفاده از متوسط پیوستگی بین گروه‌ها (Average linkage between groups) در فاصله اقلیدسی (Squared euclidean distance)، در نرم‌افزار SPSS آنها را از نظر بیماری‌زایی به دو گروه بیماری‌زای قوی و بیماری‌زای ضعیف دسته‌بندی کرد (شکل۲).

نتایج تجزیه واریانس به کمک آزمون کروسکال والیس نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر بیماری‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد، جدایه ۱۰۵ و ۱۰۹ به عنوان بیماری‌زاترین و جدایه ۱۰۴ و ۱۲۰ به عنوان ضعیف‌ترین جدایه‌ها مشخص شدند (جدول۳).



شکل ۲ تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها بر مبنای شدت بیماری در آزمون درون شیشه‌ای

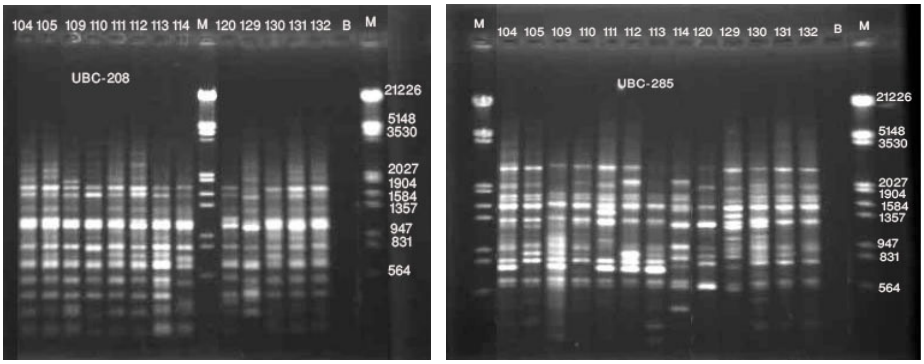
جدول ۳ مشخصات جدایه های *F. oxysporum* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشت چغندرقند در ایران و نتایج آزمون رتبه‌ای کروسکال والیس+

ردیف	کد جدایه	تاریخ نمونه برداری	منطقه جغرافیایی	مجموع رتبه‌ها
۱	104	2001	Lorestan	405.5
۲	105	1999	Qazvin	825.0
۳	109	2001	Hanedan	815.0
۴	110	2001	Ardabil-Moghan	773.0
۵	111	2001	Kermanshah	583.5
۶	112	2001	Kerman	699.5
۷	113	2001	Ardabil-Moghan	709.5
۸	114	2001	Kerman	783.5
۹	120	2007	Qazvin	218.0
۱۰	129	2008	Hamedan-Nahavand	636.0
۱۱	130	2008	Kermanshah-Bistoon	699.5
۱۲	131	2008	Kermanshah-Bistoon	741.5
۱۳	132	2008	Kermanshah-Bistoon	625.5

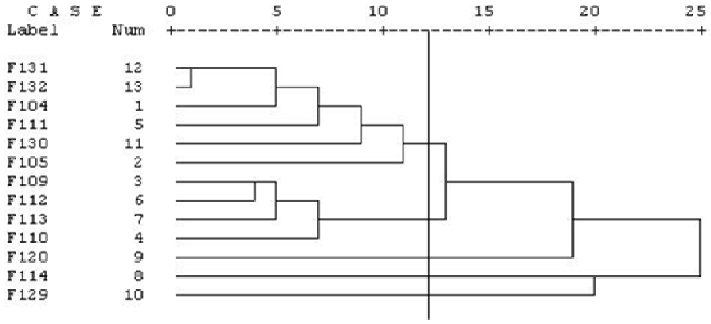
+آماره کروسکال والیس در سطح احتمال پنج درصد معنی دار است

واکنش RAPD-PCR

تمام ۱۵ آغازگر به کار رفته در این پژوهش چند شکلی خوبی بین جدایه‌های مورد بررسی نشان دادند. اندازه باندهای به‌دست آمده بین ۱۲۰-۳۰۰۰bp تخمین زده شد. بر اساس تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها به پنج گروه تقسیم شدند. نتایج نشان می‌دهد که جدا شدن برخی از جدایه‌ها از سایرین بر اساس واکنش RAPD-PCR با منطقه جغرافیایی آنها در ارتباط بود. چهار جدایه مربوط به استان کرمانشاه به همراه یک جدایه از لرستان و یک جدایه از قزوین با هم در گروه یک قرار گرفتند. دو جدایه ۱۱۰ و ۱۱۳ مربوط به استان اردبیل به همراه یک جدایه از همدان و یک جدایه از کرمان با هم در گروه دوم قرار گرفتند. سه گروه باقی‌مانده تک عضوی و هر کدام دارای یک جدایه به ترتیب از استان‌های قزوین، کرمان و همدان بودند. بین نتایج حاصل از بیماری‌زایی و RAPD ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (شکل۴).



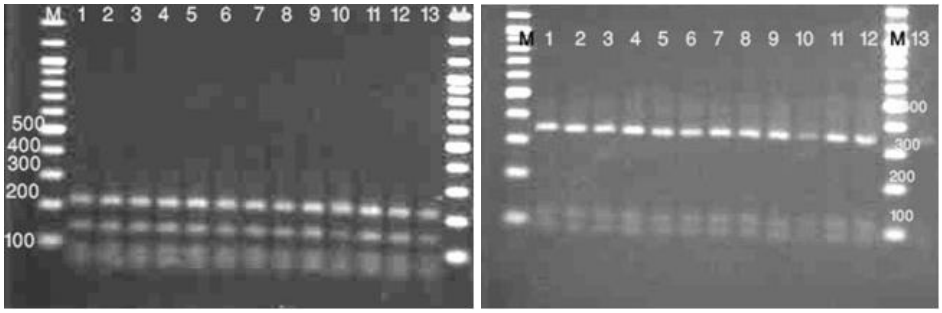
شکل ۳ نقوش باندی قطعات تکثیری جدایه‌های *Fusarium oxysporum* با استفاده از آغازگرهای UBC-208 ، UBC-285 در ژل آگارز ۱/۲٪، جدایه‌ها به ترتیب از چپ به راست ۱۰۴، ۱۰۵، ۱۰۹، ۱۱۰، ۱۱۱، ۱۱۲، ۱۱۳، ۱۱۴، ۱۲۰، ۱۲۹، ۱۳۰، ۱۳۱ و ۱۳۲ می‌باشند. M نشانگر مارکر وزن مولکولی است.



شکل ٤ تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های فوزاریوم با استفاده از داده‌های مربوط به RAPD-PCR

آنالیز ITS-RFLP و مقایسه اثر آنزیم‌های برشگر روی محصول PCR

محصول تکثیر شده از DNA جدایه‌های *F. oxysporum* با استفاده از جفت آغازگرهای ITS1 و ITS4روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، متشکل از یک قطعه DNA با اندازه تقریباً یکسان برای کلیه جدایه‌ها با وزن تقریبی ۵۷۰-۵۵۰ جفت باز بود. هیچ قطعه تکثیرشده‌ای در شاهدهای منفی مشاهده نگردید. برش محصول تکثیر شده از DNA جدایه‌های مختلف با استفاده از دو جفت آغازگر، با آنزیم‌های *Taq*I ,*Eco*RI ,*Hae*III نشان داد هر سه آنزیم دارای محل برش روی قطعه مذکور بودند. با هضم آنزیمی محصولات PCR جدایه‌های مختلف با آنزیم *Eco*RI دو قطعه با طول متفاوت به دست آمد. روی ژل آگارز دو درصد، دو باند با اندازه تقریبی ۲۵۰ و ۳۵۰-۳۲۰ جفت باز مشخص شد. حال آنکه در نتیجه هضم آنزیمی محصولات PCR جدایه‌ها با آنزیم *Hae*III سه قطعه با طول متفاوت به دست آمد. روی ژل آگارز دو درصد، سه باند با با وزن تقریبی ۹۰، ۱۲۰ و ۳۴۰ جفت باز تخمین زده شد و در برش با آنزیم *Taq*I چهار قطعه با وزن تقریبی ۷۰، ۹۰، ۱۵۰ و ۲۳۰ جفت باز مشخص شد (شکل۷).



شکل ۷ نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *F. oxysporum* هضم شده با آنزیم برش‌دهنده *Hae*III روی ژل آگارز ۲ درصد (راست) و با آنزیم برش‌دهنده *Taq*1 (چپ)، شماره‌های ۱ تا ۱۳ به ترتیب جدایه‌های ۱۰۴، ۱۰۵، ۱۰۹، ۱۱۰، ۱۱۱، ۱۱۲، ۱۱۳، ۱۱۴، ۱۲۰، ۱۲۹، ۱۳۰، ۱۳۱ و ۱۳۲ هستند. M نشانگر وزن مولکولی.

یکی از مهم‌ترین عوامل کمک‌کننده در مدیریت بیماری‌های گیاهی، داشتن اطلاعات کافی در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت‌های بیمارگر می‌باشد و بالا بردن اطلاعات در این زمینه مسلماً در اتخاذ روش‌های مؤثر کنترل و تنظیم استراتژی‌های کارآمدتر نقش خواهد داشت (Martin and English 1997). از طرف دیگر جمعیت بیمارگرها رو به تکامل است چرا که باید با تغییرات محیطی، ازجمله تناوب زراعی، کاربرد ارقام مقاوم، قارچ‌کش‌ها و آبیاری سازگاری حاصل کنند. بنابر این اگر به خواهیم استراتژی‌های کنترل مؤثر واقع شوند می‌بایست به جای تمرکز روی حالت انفرادی و ویژه، جمعیت‌ها را هدف قرار دهیم (MacDonald 1997). بیمارگر *F. oxysporum* یک قارچ با پراکندگی وسیع است که در خاک وجود دارد. که به دلیل توانایی‌اش در ایجاد پژمردگی آوندی یا پوسیدگی ریشه روی طیف وسیعی از گیاهان، توجه بیماری‌شناسان گیاهی زیادی را از ۸۰ سال پیش تا کنون به خود جلب کرده است. در این بررسی تعداد ۱۳ جدایه از ایران از نظر بیماری‌زایی با یکدیگر مقایسه شدند که از این نظر با یکدیگر متفاوت بودند با این وجود تنوع زیادی در بیماری‌زایی جدایه‌ها مشاهده نشد. دلیل چنین نتیجه‌ای شاید تعداد کم جدایه‌ها باشد و اگر از تعداد جدایه بیشتری استفاده می‌شد، تنوع بیشتری مشاهده می‌گشت. دو جدایه ۱۰۴ و ۱۲۰ از قدرت بیماری‌زایی کمتری برخوردار بودند. شاید یکی از دلایل کاهش شدت بیماری‌زایی وجود مایکوویروس در آنها باشد (Noorifar *et al.* 2009).

روش‌های متعددی برای تعیین تنوع ژنتیکی در فرم‌های اختصاصی *F. oxysporum* مورد استفاده قرار گرفته است که شامل گروه‌های سازگاری رویشی (VCGs) (Puhalla 1985)، آزمون ایزوزایم‌ها (Bosland and Williams 1987)، RFLPs (Elias *et al.* 1993)، انگشت‌نگاری DNA، تفاوت طول قطعات حاصل از هضم یا RFLPs، RAPD و تعیین توالی DNAهای تکرار شونده (Kistler 1997) است. بررسی مشخصات جدایه‌های *F.oxysporum* چغندرقند، کمتر از سایر فرم‌های اختصاصی این گونه انجام گرفته است. جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *betae* که به منظور تعیین گروه‌های سازگاری رویشی مورد بررسی قرار گرفتند، تنوع ژنتیکی بالایی را نشان دادند

(Harveson and Rush 1997). در این پژوهش نیز تنوع ژنتیکی قابل توجهی بین جدایه‌های مورد بررسی مشاهده شد. آنالیز RAPD جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *betae* از کالیفرنیا، مونتانا و اورگون، الگوی باندی متفاوتی را در این مناطق نشان داد و جدایه‌ها را بر مبنای ناحیه جغرافیایی از هم تفکیک نمود (Fisher and Gerik 1994). در تحقیق حاضر نیز به نظر می‌رسد جدا شدن بعضی از جدایه‌ها از سایرین با ناحیه جغرافیایی آنها در ارتباط است. تکثیر DNA جدایه‌های *F. oxysporum* با استفاده از تکنیک RAPD تولید باندهای واضح، تکرارپذیر و چندشکلی نمود که امکان تشخیص جدایه‌ها را بر اساس الگوی باندهای حاصل فراهم‌کرد. ۱۵ آغازگر که ۲۲۹ باند چندشکلی تولید کردند برای مقایسه تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های قارچی انتخاب شدند. گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌ها با خصوصیات بسیار متنوع با استفاده از این نشانگر و آن هم با تعداد ۱۵ آغازگر تصادفی، توانست جدایه ها را به پنج گروه تقسیم کند.

در این بررسی نواحی فاصله‌ساز بین ژن‌های ریبوزومی به همراه قطعه 5.8S توسط دو جفت آغازگر ITS1 and ITS4 با PCR تکثیر و قطعات حاصل روی ژل آگارز ارزیابی گردید. طول قطعات تکثیری حاصل از آغازگرهای ITS1 and ITS4 در این پژوهش با آنچه که محققین در گذشته برای *F. oxysporum* به‌دست آوردند، مطابقت داشت (Lee *et al.* 2000). در این مطالعه از سه آنزیم برشی *Eco*RI ,*Hae*III ,*Taq*I جهت هضم قطعه تکثیری حاصل از آغازگرهای ITS1 and ITS4 استفاده شد. این سه آنزیم دارای محل برش روی قطعه مذکور بودند. در مطالعاتی که توسط سایر محققین با استفاده از این آنزیم‌های برشگر انجام گرفته است، نیز چنین نتایجی به‌دست آمده است (Lee et al. 2000 ; Arruda *et al.* 2005). تخمین طول قطعات حاصل از هضم محصول PCR جدایه‌های مورد بررسی، با آنزیم‌های برشی مذکور با نتایج سایر محققین با قدری تفاوت دربرآورد طول قطعات حاصله تطبیق دارد (Lee *et al.* 2000).

نتیجه‌گیری کلی

به طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع در این قارچ نسبتاً بالاست؛ بنابراین باید عوامل مؤثر در ایجاد و گسترش آن بررسی شود. هر چند پژوهشگران، جهش، سیستم‌های آمیزشی و جریان ژنی را از عمده‌ترین عوامل تأثیرگذار در ایجاد تنوع دانسته‌اند، ولی به نظر می‌رسد، افزون بر موارد فوق، به دلیل اثر متقابل میزبان و بیمارگر که تنوع زیاد میزبان منجر به تنوع زیاد بیمارگر می‌شود و نیز نبود فشار میزبان مقاوم ازجمله عواملی است که در عدم کنترل تنوع در جمعیت بیمارگر می‌تواند نقش داشته باشد. در اینجا نکته قابل توجه، وجود *F. oxysporum* به عنوان گونه‌ای متفاوت از سایر گونه‌های فوزاریوم است که در بررسی‌های صورت‌گرفته تا کنون تنوع ژنتیکی بیشتری را نشان داده است. علاوه‌بر این فرم اختصاصی betae که خود نسبت به دیگر فرم‌های اختصاصی این گونه تنوع ژنتیکی بیشتری دارد. بررسی‌های صورت گرفته روی دیگر فرم‌های اختصاصی این گونه موید این مطلب است (Namiki *et al.* 1998; Woo *et al.* 1996). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، نتایج گزارش‌های گذشته را مبنی بر وجود تنوع ژنتیکی قابل استناد در این قارچ تأیید کرده و نیاز برای بررسی‌های بیشتر را در این فرم اختصاصی مهم آشکار می‌کند. رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی بر اساس RAPD-PCR با بیماری‌زایی جدایه‌ها یافت نشد، اما مجزا شدن برخی از جدایه‌ها از سایرین احتمالاً با مناطق جغرافیایی آنها در ارتباط است. جابجایی محصول چغندرقند برای انتقال به کارخانه قند از یک منطقه به منطقه‌ی

دیگر می‌تواند دلیل قرار گرفتن جدایه‌هایی از مناطق جغرافیایی مختلف در کنار هم در گروه‌بندی RAPD باشد.

تصور بر این است که نشان‌گر ITS-RFLP تفاوت درون گونه‌ای را نشان نمی‌دهد و نتایج حاصل از بررسی‌های متعدد، مؤید این مسأله است. نتایج حاصل از ITS-RFLP روی جدایه‌های مختلف *F. oxysporum* یک نیم رخ همانند و یکسان ارائه می‌دهد در حالی‌که در نتایج حاصل از IGS-RFLP تفاوت‌هایی در باندها دیده شده است (Pavaanen *et al.* 1999). گرچه نواحی ذکرشده در بسیاری از موارد توانسته‌اند گونه‌های مختلف را از هم متمایز سازند، اما باید توجه داشت که محل برش آنزیم‌های برشی معمولاً باعث تفاوت بین جدایه‌های متعلق به گونه‌های مختلف می‌شود. اگرچه صددرصد بودن شباهت الگوی باندی به‌دست آمده نیز به معنای یکسان بودن این نواحی نیست و شاید بتوان با آنزیم‌های برشی دیگر بین آنها تمایز ایجاد کرد ولی خود می‌تواند دلیلی بر تشخیص صحیح گونه باشد.

منابع مورد استفاده: References:

Abasi Moghadam E, Rastgar M, Jafarpoor B. Etiology of root and crown rot of sugar beet in Khorasan. Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran. 1997; P. 125. (In Persian, abstract in English)

Arruda GMT, Miller RNG, Ferreira MASV, Café-fiho AC. Morphological and molecular characterization of the sudden death syndrome pathogen of soybean in Brazil. Plant Pathology. 2005; 54:53-65.

Behdad E. Diseases of Agricultural Plants in Iran. Neshat Esfahan Publishers. 1983. (In Persian)

Bosland PW, Williams PH. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. Can. J. Bot. 1987; 65:2067-2073.

Cramer RA. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from common bean and sugar beet using pathogenicity assays and random-amplified polymorphic DNA markers. Journal of Phytopathology. 2003; 151: 352-360.

Elias KS, Zamir D, Lichtman-Pleban T, Katan T. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Mol. Plant-Microb Intract. 1993; 6:565-572.

Ferderick MA, Roger Brent R, Kingston D, Seidamn J, Smith A, Strunl K. Preparation of plant DNA using CTAB. Short Protocol Molecular Biology. 2002; 2/4: 2/10.

Fisher GA, Gerik JS. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates pathogenic to sugar beets. (Abstr) Phytopathology. 1994; 84:1098.

Hanson LE. Beet root-rot inducing isolates of *Fusarium oxysporum* from Colorado and Montana. Plant Disease. 2006; 90: 247.

Harveson RM, Rush CM. Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates from sugar beet as determined by vegetative compatibility. Plant Disease. 1997; 81:85-88p.

Kistler HC. Genetic diversity in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathology. 1997; 87:474-479.

Lee YM, Choi YK, Min BY. PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. The Journal of Microbiology. 2000; 38: 66-73.

Mahmoodi SB, Mesbah MR, Rahimian H, Alizadeh A, Noroozi P. Genetic diversity of sugar beet of *Rhizoctonia solani* revealed by RAPD-PCR and ITS-PCR and ITS-rDNA analysis. Iranian Journal of Plant Pathology. 2005; 41: 523-542. (In Persian, abstract in English)

Martin FN, English JT. Population genetics of soil born Fungal plant pathogens. Phytopathology. 1997; 87: 446-447.

Martyn RD, Rush CM, Biles CL, Bake EH. Etiology of a root rot disease of sugar beet in Texas. Plant Disease. 1989; 73: 879-883.

MacDonald B. The population genetics of Fungi: tools and techniques. Phytopathology. 1997; 87: 448-453.

Namiki F, Shiomi T, Nishi K, Kayamura T, Tsuge T. Pathogenic and genetic variation in the Japanese strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Phytopathology. 1998; 88:804-810.

Noorifar N, Etebarian HR, Mahmoodi SB, Hashemi M. Separation and identification of dsRNA related to some isolates of three species of genus *Fusarium* and study of their effects on isolates pathogenicity. Proceedings of the 6th National Biotechnology Congress of Iran, 13-15 Aug, Tehran, Iran; 2009. (In Persian)

Panella LW, Ruppel EG, Hecker RJ. Registration of four multigerm sugar beet germplasm resistant to *Rhizoctonia* root rot. Crop Science. 1995; 35: 291-292.

Pavaanen-Huhtala S, Hyvonen J, Bulat SA, Yli-Maltila T. RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analyses in identification of finfish *Fusarium oxysporum* isolates. Mycological Research. 1999;103:625-634.

Puhalla JE. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Can. J. Bot. 1985; 63:179-183.

Raufi M, Farokhinejad R, Mahmoodi SB. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with sugar beet root and crown rot in Iran. Journal of Sugar Beet. 2003; 19(2): 109-122. (In Persian, abstract in English)

Ruppel EG. Pathogenicity of *Fusarium* spp. from diseased sugar beets and variation among sugar beet isolates of *Fusarium oxysporum*. Plant Disease. 1991; 75:486-489.

Salazar O, Julian MC, Rubio V. Primers based on specific rDNA-ITS sequence for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* :AG-2 subgroups and ecological types and binucleate *Rhizoctonia*. Mycological Research. 2000; 104: 281-285.

Toda T, Hyakumachi M, Suga H, Kageyama K, Tanaka A, Tani T. Differentiation of *Rhizoctonia* AG-D isolated from turf grass in to subgroups I and II based on rDNA and RAPD analyses. European Journal of Plant Pathology. 1999; 105: 835-846.

Woo SL, Zonia A, Del Sorbo G, Lorito M, Nanni B, Scala F, Noviello P. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLP and RAPD. Phytopathology. 1996; 88:966-973.