

مطالعه تنوع جهش در قارچ *Fusarium solani* عامل پوسیدگی ریشه چغندر قند
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 چغندر قند با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی و رابطه آن با بیماری‌زایی جدایه‌ها. چغندر قند ۲۰(۱): ۳۹-۵۳

چکیده

در این تحقیق گروه‌های سازگاری رویشی ۲۷ جدایه *Fusarium solani* که از ریشه و طوقه چغندر قند 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 ریشه‌های دو نیت مختلف، تشکیل هتروکاریون به صورت رشد پروتوتروفیک ظاهر شد. رشد پروتوتروفیک بین nitM و nit3 یا nit1 قوی‌تر از رشد پروتوتروفیک بین nit1 و nit3 ظاهر می‌شد. براین اساس به ترتیب ۴۴ درصد، ۳۶ 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 ۱۴ گروه سازگار رویشی قرار گرفتند. در این مطالعه بین گروه‌های سازگاری رویشی و مناطق جغرافیایی محل جمع‌آوری جدایه‌ها و هم‌چنین بین گروه‌های سازگار رویشی و نوع علائم بیماری ارتباطی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: چغندر قند، فنوتیپی، گروه‌های سازگار رویشی، موتانت نیت، هتروکاریون

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 (Vegetative Compatibility Group) VCG 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 (1996 Harveson and Rush 1997; Katan and Shabi). 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 با استفاده از گروه‌های سازگاری رویشی به معنی اندازه‌گیری پراکنش طبیعی تنوع است (Daayf et al. 1993; 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 فرآینسی 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). معمولاً 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،

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 منوفیلیتیک (Monophyletic) هستند (Leslie 1993).

پوهالا (Puhalla 1985) موتانت‌های مقاوم به کلرات پتاسیم (Potassium 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 نیتريت (Nitrite) تبدیل می‌کند و آنزیم نیتريت رداکتاز (Nitrite reductase) که نیتريت 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 نیتريت تبدیل کنند. اما استرین‌های مقاوم به کلرات نمی‌توانند

(Correll et al. 1987). موتانت‌ها روی محیط حداقل دارای رشد ضعیف و تقریباً 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

تغییر در بیماری‌زایی شود. الیاس و اشنايدر (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 بیماری‌شناسان گیاهی معمولاً 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

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 و هم 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

زایی جدایه‌ها و وجود یا عدم وجود همبستگی بین گروه‌های سازگار رویشی و مناطق جغرافیایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه و جداسازی جدایه‌ها

۱- در این تحقیق جمعاً ۲۷ جدایه *F. solani* در استان‌های مختلف کشور (خراسان، خوزستان، چهارمحال بختیاری، آذربایجان غربی، تهران، قزوین، کرمان، کرمانشاه، همدان، لرستان و اردبیل) که از ریشه و طوقه چغندر قند جداسازی شده بودند مورد بررسی قرار گرفت. برای خالص‌سازی از روش تک اسپور کردن استفاده شد. پس از انتقال تک اسپور و نوک ریشه‌ها به تشتک پتری محتوی محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار (Potato-Dextrose-Agar) جهت رشد پرگنه‌های خالص، تشتک‌ها در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور نگهداری کوتاه مدت کشت خالص فوزاریوم از محیط کشت SNA استفاده شد و برای نگهداری بلند مدت، کشت خالص فوزاریوم بر روی ماسه سترون شده همراه با کمی آب استفاده شد. جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از کلیدهای تشخیص گونه‌های فوزاریوم تشخیص 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 ۴-۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از رشد قارچ بر روی محیط کشت کامل یک قطعه کوچک از محیط کشت به محیط حاوی کلرات پتاسیم PDC (با درصدی مختلف ۱/۵ تا ۶) انتقال یافت. تشتک‌ها به مدت ۱۰-۱۵ 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 محدودشده قارچ خارج گردید. بعد از ظهور سکتورها، از حاشیه خارجی آن‌ها، قطعه کوچکی برداشته و به محیط حداقل انتقال یافت. بعد از ۳-۴ 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، نیتريت، هیپوزانتین (Hypoxanthin) و آمونیوم در کلاس‌های فنوتیپی مجزا قرار گرفتند.

۳- تعیین فنوتیپ موتانت‌های نیت: برای این منظور یک قطعه میسیلیومی از موتانت‌های نیت به هر یک از چهار محیط فوق انتقال یافت. سپس تشتک‌ها در شرایط مناسب قرار گرفته و بعد از چهار روز مرفولوژی پرگنه‌ها با تیپ وحشی مقایسه گردید.

۴- آزمون‌های مکمل‌سازی: جهش یافتگان نیت و تعیین گروه‌های سازگار رویشی جدایه‌های *F.*

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 دهنده تشکیل هتروکاریون و خودسازگار بودن جدایه‌ها تلقی گردید. در مرحله 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 ۷-۱۴ روز، وجود رشد متراکم در محل تلاقی موتانت‌های نیت به عنوان معیاری برای تشکیل هتروکاریون در نظر گرفته شد. این کار برای کلیه 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 چغندر قند، گلدان‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت 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 علائم 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 نیترا ت 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 از چهار منبع

نیترژن (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 نیترژن محیط) و ۲۰ درصد به فنوتیپ *nitM* (به دلیل عدم استفاده از نیترات و هیپوزانتین به عنوان تنها منبع نیترژن محیط) شناسایی شدند.

نیترژن (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 نیترژن محیط) و ۲۰ درصد به فنوتیپ *nitM* (به دلیل عدم استفاده از نیترات و هیپوزانتین به عنوان تنها منبع نیترژن محیط) شناسایی شدند.

جدول ۱ شناسایی موتانت‌های نیت از طریق رشد در محیط‌های کشت حاوی منابع متفاوت نیترژن
Table 1 Identification of nitrate non utilizing (nit) mutants by growing on different media containing different nitrogen sources

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

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

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

بیماری مشاهده شده از جدایه‌ها در هنگام تست بیماری‌زایی با علائم 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 علائم پژمردگی و پوسیدگی ریشه را تولید نمودند. اعضای گروه سازگار رویشی A قدرت

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 و VCGC، ۳ جدایه و در گروه 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 چغندر قند بیماری‌زا بودند و توانستند دو نوع علائم پوسیدگی ریشه و پژمردگی طوقه ایجاد نمایند. بیشتر علائم مشاهده شده به صورت پوسیدگی بود. هم چنین علائم

بیماری‌زایی بیشتری نسبت به اعضای گروه‌های دیگر نشان دادند.

جدول ۲ گروه‌های سازگار رویشی چند عضوی و محل نمونه‌برداری و علائم بیماری آن‌ها

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

گروه سازگار رویشی VCG	شماره جدایه Isolate no.	محل نمونه‌برداری Origin	علائم 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)

جدول ۳ فهرست جدایه‌ها، محل نمونه‌برداری و علائم بیماری

Table 3 List of isolates, their origins and disease symptoms

شماره جدایه Isolate No.	محل نمونه‌برداری Origin	علائم بیماری Disease Symptoms
1	خراسان - چناران	پوسیدگی قهوه‌ای ریشه (Brown rot)
2	خراسان - بیرجند	پوسیدگی ریشه (Root rot)
3	چهارمحال 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 - جنورد	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)

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

(1987) راندمان تولید موتانت‌های نیت تحت تأثیر عوامل محیطی و گونه قارچ می‌باشد. در این تحقیق راندمان تولید موتانت‌های نیت جدایه‌های *F. solani* در محیط کشت سیب زمینی - دکستروز - کلرات (PDC) حاوی ۱/۵ درصد کلرات 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 موتانت‌های نیت از محیط پتاسیم - دکستروز - کلرات (PDC) به دست آمد و نیازی به استفاده از محیط‌های دیگر نشد.

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

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.

(Hawthorne and Rees-George 1996) علت این که هتروکاریون نیت M قوی تر 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 جدیایه *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 هر کدام از یک کلون می‌باشند (Leslie 1993; Correll and Puhalla 1985). هم‌چنین استرین‌هایی که گروه‌های سازگار رویشی مجزایی دارند، منشأ مستقل دارند (Leslie 1993). وجود تفاوت در بین اعضای

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 مفرد ۱۳۷۹) و راه‌خدایی (راه‌خدایی ۱۳۷۹) در مورد استرین‌های *F. solani* حاصل شده بود. هاوترن و همکارانش (۱۹۹۰) از جدیایه‌های *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 (راه‌خدایی 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 موتانت‌های نیت ۱ یا ۳، هتروکاریون قوی‌تر و سریع‌تری را تشکیل می‌دهند نتایج این تحقیق نیز با تحقیقات سایر پژوهشگران هماهنگی داشت

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 چغندر قند برای کنترل موفق پوسیدگی فوزاریومی چغندر قند مفید باشد.

نکته دیگر اینکه بین گروه‌های سازگار رویشی و مناطق جغرافیایی در این تحقیق ارتباطی دیده نشد. ولی برای اظهار نظر قطعی در این مورد احتیاج به نمونه برداری بیشتری است. معمولاً یافته‌های محققین دیگر نیز چنین مسأله‌ایی 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 لوکوس vic توانایی خود را در تشکیل هتروکاریون با سایر اعضای گروه از دست داده‌اند و یا آن‌ها متعلق به فرم‌های تخصص یافته یا جمعیت‌های

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 مسأله را توجیه کند که چرا گروه سازگار رویشی گروه A در جمعیت غالب است. مشابه این نتیجه را پیونگ‌آن و همکاران در رابطه با

غیر بیماری‌زایی هستند که جهش‌هایی در لوکوس‌های بیماری‌زای آن‌ها رخ داده است (Elias et al. 1991)، فرضیه 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 چغندر قند 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 و راش (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). لسللی در این باره معتقد است که: استرینهای خودناسازگار در طبیعت از ایجاد تعداد زیاد گروه‌های سازگار رویشی جلوگیری می‌کنند. چنین گفته می‌شود که جدایه‌های خودناسازگار غیر طبیعی نبوده و آنها در واقع تحت فشار زیاد انتخاب قرار نگرفته‌اند (Chen and Swart 2001).

References

منابع مورد استفاده

- 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 کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران. ۱۲۴ صفحه.
- فرخی‌نژاد، ر. ۱۳۷۸. بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *Fusarium moniliforme* جدا شده از بذور دو رقم ذرت هیبرید با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی. مجله علمی کشاورزی، ۲۲(۱): ۷۸-۶۷.
- 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 کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز. ۱۰۰ صفحه.
- Booth C (1997) *Fusarium*, laboratory guide to the identification of the major species. Common Wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, 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

- Daayf F, Nicole M, Geiger J (1995) Differentiation of *Verticillium dahliae* populations on the basis of vegetative compatibility and pathogenicity 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. radidis – lycopersici*. *Phytopathology* 81: 255-262
- Katan T, Shabi E (1996) Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloesporioides* 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

- 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 University Press. 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 *Fusarium oxysporum* f. s. p. *cucumerinum*. Plant Disease 82: 244-246
- Robert L, Leslie J (1992) Nitrate- non utilizing mutants of *Gibberella zea* (*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/>