

شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی و دودمان‌های کلونال قارچ *Fusarium solani* عامل پوسیدگی ریشه لوبیا در زنجان

زهرا صفرلو¹ و رقیه همتی*²

¹دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه زنجان

²استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

* مسئول مکاتبه: rhemati@znu.ac.ir

تاریخ پذیرش: 92/08/15

تاریخ دریافت: 92/03/27

چکیده

گروه‌های سازگاری رویشی 42 جدایه *Fusarium solani* عامل بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا جمع‌آوری شده از مناطق مختلف لوبیاکاری استان زنجان، با استفاده از جهش‌یافته‌گان nit تعیین شدند. فنوتیپ جهش‌یافته‌گان nit بر اساس مشخصات رشدی آن‌ها در محیط غذایی حداقل (MM) حاوی منابع مختلف نیتروژن تعیین گردید و جهش‌یافته nitM بیش‌ترین فراوانی جهش‌یافته‌ها را به‌خود اختصاص داد. آزمون مکمل‌سازی و تعیین گروه‌های سازگاری رویشی برای جدایه‌های خودسازگار صورت گرفت. بر این اساس، جدایه‌ها در 16 گروه VCG قرار گرفتند که چهار گروه از آن‌ها تک-عضوی و بقیه چندعضوی بودند. گروه‌های چندعضوی هم‌چنین دربرگیرنده جدایه‌های متصل‌کننده یا پل بودند که به-طور هم‌زمان در بیش از یک گروه قرار گرفتند. ارتباطی بین گروه‌های سازگاری رویشی و منطقه جغرافیایی مشاهده نگردید. جهت تعیین دودمان‌های کلونال، هشت آغازگر تصادفی مورد استفاده قرار گرفتند و از بین آن‌ها یک آغازگر (OPA-13) با تولید باندهای تکرارپذیر و چندشکلی مناسب انتخاب شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز از بین 42 جدایه برای 26 جدایه، موفق بود و نتایج مولکولی تنوع بالای این جدایه‌ها را نشان داد به‌طوری‌که آن‌ها در 13 دودمان کلونالی با ضریب تشابه 75 درصد گروه‌بندی نمود. هر دودمان کلونالی متشکل از تنها یک هاپلو تیپ یک یا چندعضوی بود. بین گروه‌بندی بر اساس روش مولکولی و سازگاری رویشی هم‌بستگی بارزی مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی فوزاریومی، ناسازگاری رویشی، هاپلو تیپ، *Phaseolus vulgaris*

مقدمه

و قارچ *F. solani* به‌عنوان عامل اصلی بیماری از 54/2 درصد نمونه‌های ریشه لوبیا جداسازی گردید (ناصری و مرادی 1386). مطالعه جمعیت بیمارگر با استفاده از نشان‌گرهای مختلف ژنتیکی و فنوتیپی اطلاعات مفیدی را در مورد توان تغییرپذیری در جمعیت‌های آن‌ها

گونه مرکب *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber به‌عنوان یکی از عوامل عمده محدود-کننده تولید محصول لوبیا در جهان گزارش شده است (کنودل و همکاران 2007). در یک بررسی، عوامل عمده پوسیدگی ریشه در مزارع لوبیا در استان زنجان تعیین

قارچ *F. solani* با استفاده از نشان‌گرهای مولکولی RFLPs و RAPD-PCR، تنوع ژنتیکی وسیعی بین جدایه‌های این قارچ مشاهده شد (مرید و همکاران 1387). در تحقیقی دیگر که روی چندشکلی DNA جدایه‌های *F. solani* f.sp. *pisi* عامل پوسیدگی فوزاریومی نخود در استان‌های خراسان رضوی و شمالی توسط نشان‌گر RAPD انجام شد، رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی و منطقه جغرافیایی جدایه‌ها به‌دست نیامد (حسن‌زاده و همکاران 1387). بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *F. solani* از چهار میزبان مختلف بر اساس نشان‌گر AFLP در ایران، تمام جدایه‌ها را در یک دودمان کلونالی قرار داد (مرادزاده اسکندری و همکاران 1388). در تحقیقی دیگر، بررسی تنوع ژنتیکی بین 26 جدایه *F. solani* به‌دست‌آمده از کدوئیان در استان‌های فارس و خراسان رضوی با استفاده از نشان‌گرهای RFLP و RAPD موجب شناسایی 10 دودمان کلونالی (در ضریب تشابه 75 در-صد) بین این جدایه‌ها گردید (علی‌منش و همکاران 2009).

با کاربرد آغازگرهای RAPD جهت بررسی تنوع بین جدایه‌های *F. solani* عامل مرگ ناگهانی سویا در مناطق مختلف ایالات متحده آمریکا، هر هفت آغازگر به-کاررفته، این جدایه‌ها را در دو گروه مجزا قرار دادند، به-طوری‌که تمام جدایه‌های دو ایالت در یک گروه و جدایه‌های بقیه ایالت‌ها در گروه دیگر قرار گرفتند. تنوع کم موجود در این جمعیت‌ها نشان‌دهنده وضعیت کلونال جمعیت‌های این قارچ روی سویا در آمریکا بود (آخن‌باخ و همکاران 1997). در یونان، مطالعه سازگاری رویشی 68 جدایه قارچ *Fusarium oxysporum cucumerinum* f.sp. *radicis* نشان داد که 60 جدایه در یک گروه و پنج جدایه در گروه سازگاری دیگر قرار گرفتند. سه جدایه نیز به‌عنوان جدایه‌های متصل‌کننده² معرفی گردیدند که با جدایه‌هایی در هر دو گروه سازگار بودند

فراهم می‌آورد. یکی از روش‌هایی که به‌طور موفق جهت شناسایی ساختار ژنتیک جمعیت در بسیاری از قارچ‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، مطالعه سازگاری رویشی¹ است (لزلی 1993). با وجود توسعه روش‌های مولکولی، گروه‌بندی بر اساس سازگاری رویشی هم-چنان به‌عنوان یکی از روش‌های قابل اطمینان مورد توجه است (دوهان و جانسون 2001). در ایران، رؤوفی و همکاران (1383) تنوع در جمعیت قارچ *F. solani* عامل پوسیدگی ریشه چغندر قند در استان‌های مختلف کشور را با استفاده از گروه‌های سازگاری رویشی و رابطه آن با بیماری‌زایی جدایه‌ها مطالعه کردند. محمدی و بنی‌هاشمی (1385) نیز 53 جدایه قارچ *F. solani* f.sp. *pisi* را از ریشه نخود و علف‌های هرز مزارع آن در استان فارس جدا کرده و مورد مطالعه قرار دادند. شریفی و همکاران (2008) سازگاری رویشی بین 38 جدایه قارچ *F. solani* عامل پوسیدگی خشک غده سیب-زمینی را مطالعه نموده و 15 گروه سازگاری رویشی را شناسایی نمودند. در یک بررسی دیگر، گروه‌های سازگاری رویشی برای 57 جدایه *Gibberella intermedia* از جمعیت‌های میزبانی ذرت، برنج، نیشکر و پیاز مطالعه شد و بر این اساس 57 جدایه در 30 گروه سازگار رویشی قرار گرفتند که در بین آن‌ها، 23 گروه تک‌عضوی و هفت گروه چندعضوی بودند (علیزاده و همکاران 2010). مطالعه هم‌زمان جمعیت‌های یک بیمارگر با دو نشان‌گر فنوتیپی و مولکولی اطلاعات مفیدی را در مورد زیست‌شناسی بیمارگر فراهم می-آورد. مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. solani* عامل پوسیدگی خشک سیب‌زمینی در استان‌های خراسان رضوی و شمالی با استفاده از نشان‌گر RAPD نشان داد که این گونه از تنوع ژنتیکی بسیار بالایی برخوردار است. هم‌چنین هیچ ارتباطی بین گروه‌های ژنتیکی و منشأ جغرافیایی جدایه‌ها وجود نداشت (بقایی‌راوری و همکاران 1385). در بررسی تنوع ژنتیکی 140 جدایه

¹ Bridging Isolates

¹ Vegetative Compatibility

WAC و MMC)⁴ انتقال یافتند. تشنگ‌ها به مدت 10 تا 15 روز در دمای 24 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. روی محیط‌های حاوی کلرات، رشد پررنگه قارچ محدود خواهد شد. در طول این مدت، بخش‌های سریع‌الرشد از رشد محدودشده‌ی قارچ خارج گردید.

شناسایی فنوتیپ جهش‌یافته‌گان nit

بعد از ظهور بخش‌های سریع‌الرشد، از حاشیه‌ی خارجی آن‌ها، نوک ریشه‌ای برداشته شد و به محیط حداقل (MM) انتقال یافت. بعد از سه تا چهار روز در دمای 24 درجه سانتی‌گراد پررنگه‌هایی که رشد نازک، گسترده و بدون میسلیم هوایی داشتند، به‌عنوان جهش‌یافته nit جدا گردیدند. جهش‌یافته‌گان nit بر اساس رشد در محیط‌های دارای یکی از چهار منبع نیتروژن یعنی نیترات، نیتريت، هیپوزانتین⁵ و آمونیوم-تارتارات در کلاس‌های فنوتیپی مجزا قرار گرفتند (لزلی و سامرل 2006). محیط دارای نیترات، به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. زیرا هیچ‌کدام از جهش‌یافته‌های nit قادر به استفاده از نیترات نبوده و رشد ضعیف دارند. محیط دارای آمونیوم-تارتارات به‌عنوان شاهد مثبت منظور گردید. زیرا تمامی جهش‌یافته‌های nit قادر به استفاده از آمونیوم می‌باشند. آمونیوم ساده‌ترین شکل قابل استفاده نیتروژن می‌باشد و تمامی جهش-یافته‌های nit در این نوع محیط، رشد کامل شبیه تیپ وحشی دارند (لزلی و سامرل 2006).

آزمون خودسازگاری جدایه‌ها

یک جهش‌یافته nitM از هر جدایه با جهش‌یافته nitI یا nit3 از همان جدایه مقابل هم به‌فاصله حدود دو سانتی‌متر از یکدیگر روی محیط MM دارای نیترات سدیم به‌عنوان منبع نیتروژن قرار گرفتند. چهار تا 21

(واکالوناکیس و فراگ‌کیاداکیس 1999). بررسی تنوع ژنتیکی 18 جدایه *F. solani* به‌دست‌آمده از میزبان‌های گیاهی و جانوری در برزیل از طریق انگشت‌نگاری rDNA، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای درون‌گونه‌ای بود و این تنوع هیچ ارتباطی با منشأ میزبانی و منطقه جغرافیایی جدایه‌ها نداشت. این تنوع حتی در توالی‌های حفظ‌شده مثل rDNA نیز مشاهده گردید (براسیلیرو و همکاران 2004).

هدف از تحقیق حاضر، مطالعه تنوع گروه‌های سازگاری رویشی در جمعیت‌های قارچ *F. solani* در استان زنجان، تعیین دودمان‌های کلونالی³ بر اساس انگشت‌نگاری DNA در جمعیت‌های این بیمارگر و تعیین وجود یا نبود هم‌بستگی بین گروه‌های سازگاری رویشی و دودمان‌های کلونالی است.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های قارچی

در این تحقیق از 42 جدایه قارچ *F. solani* استفاده شد که طی دو فصل زراعی 1388 و 1389 از ریشه گیاهان لوبیا در مناطق مختلف استان زنجان جمع‌آوری شده بودند. با توجه به این‌که در ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد، ارقام متنوعی از لوبیا با عمق کاشت‌های مختلف کشت شده بودند، با پیش‌فرض وجود تنوع بیشتر، نمونه‌های بیشتری از این منطقه جمع‌آوری شدند (جدول 1).

جداسازی جهش‌یافته‌گان nit

جهت انجام این مرحله از روش کارل و همکاران (1987) استفاده شد، بدین ترتیب که قطعات میسلیمی دو میلی‌متری از محیط کشت خالص هفت‌روزه هر جدایه از روی محیط PDA به محیط حاوی کلرات پتاسیم با درصد‌های مختلف 1/5 تا 6 درصد (PDC)،

¹PDA Chlorate, Water Agar Chlorate and Minimal Medium Chlorate

²Hypoxanthin

³ Clonal Lineage

مورد آزمایش نیز به عنوان کنترل مثبت در کنار آن‌ها قرار داده شد. بعد از گذشت سه تا چهار روز، پرگنه‌ها بررسی شده و جدایه‌های سازگار در یک گروه سازگار رویشی قرار گرفتند. با توجه به وجود جدایه‌های پل (جدایه‌هایی که در چند گروه سازگاری رویشی قرار می‌گرفتند) هر گروه سازگاری رویشی به عنوان یک صفت در نظر گرفته شد. سپس واقع شدن یک جدایه در هر گروه به صورت عدد یک و غیاب هر جدایه در یک گروه به صورت صفر منظور گردید. به این ترتیب با تشکیل ماتریس صفر و یک، دندروگرامی در نرم افزار NTSYS pc 2/02 (رولف 1998) ترسیم شد.

روز پس از کشت، تلاقی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. وجود رشد متراکم و هوایی در محل تلاقی پرگنه در جهش‌یافته، نشان‌دهنده تشکیل هتروکاریون و خود-سازگار بودن جدایه‌ها تلقی گردید.

آزمون‌های مکمل‌سازی و تشخیص گروه‌های سازگاری رویشی

این آزمون تنها برای جدایه‌های خودسازگار انجام گرفت. یک جهش‌یافته nitM از یک جدایه در مقابل جهش‌یافته‌گان nit1 و یا nit3 سایر جدایه‌ها قرار گرفت. یک قطعه میسلومی از یک جهش‌یافته در وسط تشتک گذاشته شد و سه جهش‌یافته nit1 و یا nit3 از سه جدایه در مقابل آن کشت گردید و یک جهش‌یافته مکمل جدایه

جدول 1- مناطق مختلف کشت لوبیا در استان زنجان و تعداد جدایه های *Fusarium solani* به دست آمده از آن‌ها

نام اختصاری جدایه‌های هر منطقه	تعداد جدایه‌های به‌کاررفته در تجزیه‌تحلیل‌های مولکولی	تعداد جدایه‌ها	مناطق نمونه‌برداری
Z ₁₆ , Z ₁₉ ***, Z ₂₁ , Z ₂₅ , Z ₃₀ *** Z ₁ ***, Z ₄ , Z ₆ , Z ₁₀ ***, Z ₁₄	10	10	ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد
I ₂ , Z ₈ ***, Z ₉ , Z ₂₃ , Z ₂₄ Z ₂ ***, Z ₃ , Z ₁₇ ***	4	5	نصیرآباد
Z ₁₈ , Z ₂₇	-	3	عمیدآباد
Z ₂₉	-	2	نعلبندان*
I ₉ , I ₁₁ , I ₁₂ , Z ₁₅ ***, Z ₂₈ ***	2	1	یوسف‌آباد*
Z ₇ , Z ₂₂ ***	2	5	خرم‌دره
Z ₁₁ , Z ₂₆	-	2	هیدج
I ₆ , Z ₁₃	1	2	سنبل‌آباد*
Z ₁₂ ***	1	2	صایین‌قلعه**
Z ₅ , Z ₂₀	-	1	سلطانیه**
I ₁ , I ₃ , I ₄ , I ₇ , I ₈ , I ₁₀	۲	2	خیرآباد*
I ₅ ***	۱	6	چرگر
	26	1	قلعه حسینیه**
		42	تعداد کل جدایه‌ها

*: مناطقی که در تجزیه‌تحلیل‌های مولکولی به علت عدم تکثیر ژن در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز لحاظ نشدند.

** : مناطقی که به علت وجود تنها یک جدایه موفق در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، از بخشی از تجزیه‌تحلیل‌های مولکولی حذف گردیدند.

***: جدایه‌هایی که هم در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز موفق بوده و هم گروه سازگاری رویشی آن‌ها تعیین گردید.

میکرولیتر بود. برنامه حرارتی تکثیر شامل واسرشتی اولیه پنج دقیقه در 94 درجه سانتی‌گراد، سپس 45 چرخه به‌ترتیب واسرشتی یک دقیقه در 94 درجه- سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگر یک دقیقه در 34 درجه سانتی‌گراد، بسط آغازگر دو دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی آغازگر هفت دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (جانا و همکاران 2003). جهت مشاهده محصولات PCR از الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد استفاده شد. فاصله طی‌شده توسط باندهای روی ژل با اندازه‌گیری فاصله هر باند تا ته چاهک اندازه‌گیری و اندازه هر باند با مقایسه آن با باندهای شاخص وزنی مولکولی با مقیاس خطی 0/5 الی 10 کیلو باز⁷، ساخت شرکت ژنا- بایوساینس⁸ محاسبه گردید. به این ترتیب انواع باندهای تکثیرشده بر اساس اندازه و نیز باندهای مشترک روی ژل‌های مختلف تعیین شدند. سپس وجود یا نبود هر باند در هر جدایه به‌ترتیب با یک و صفر در ماتریس داده‌های صفر و یک نشان داده شد. جهت تعیین گروه‌های ژنتیکی، ابتدا بر اساس ماتریس صفر و یک، ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد در نرم افزار NTSYS-pc 2.02 محاسبه و تجزیه تحلیل خوشه- ای روی ماتریس تشابه به‌کمک روش UPGMA انجام و دندروگرام مربوطه ترسیم گردید. در این دندروگرام، هاپلوتیپ به گروه‌های ژنتیکی اطلاق گردید که درصد تشابه الگوی انگشت‌نگاری ژنومی بین اعضای تشکیل- دهنده آن‌ها 100 درصد بود. به‌عبارت دیگر جدایه‌هایی که از نظر نوع باندهای تولیدشده روی ژل کاملاً یکسان بودند در نرم‌افزار مذکور در یک گروه ژنتیکی با ضریب تشابه 100 (هاپلوتیپ) گروه‌بندی گردیدند. جهت تعیین شاخص‌های مربوط به فراوانی باندها و هتروزیگوسیتی، از نرم‌افزار 6 GENALEX (پیکل و

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلی‌مران به‌منظور استخراج DNA، تمام توده قارچی پرگنه هفت‌روزه هر جدایه از سطح محیط کشت PDA بعد از افزودن چند قطره آب مقطر با استفاده از اسکالپل استریل برداشته شده و به شیشه‌های درب‌دار استریل منتقل گردیدند. سپس شیشه‌ها درون لوله‌های فالكون قرار گرفته و به مدت شش ساعت به دستگاه فریز درایر⁶ متصل شده و تحت شرایط خلأ و دمای 60- درجه سانتی‌گراد لیوفیلیز گردیدند. استخراج DNA از میسلیم لیوفیلیز شده به روش ليو و همکاران (2000) پس از اعمال برخی تغییرات انجام شد.

جهت انجام PCR روی جدایه‌های *F. solani* از هشت آغازگر تصادفی RAPD استفاده شد (جدول 2) و از بین آنها آغازگر OPA-13 (CAGCACCCAC) به- علت موفقیت آن در تکثیر ژنوم بسیاری از جدایه‌های *F. solani* و تولید باندهای تکرارپذیر و قابل ارزیابی به- منظور تجزیه تحلیل نتایج انتخاب شد. جهت ارزیابی تکرارپذیری باندهای این آغازگر موفق، واکنش زنجیره- ای پلی‌مران در دو تکرار برای جدایه‌ها انجام گرفت و تمام باندهایی که در تکرار اول تولید شده بودند، مجدداً تولید گردید که این امر نشان‌دهنده تکرارپذیر بودن عمل آغازگر مورد نظر بود. بقیه آغازگرها اغلب باندی تولید نمودند. تنها آغازگر OPA-19 برای تعداد معدودی از جدایه‌ها دو باند بسیار ضعیف تولید کرد که عدم تنوع این باندها بین جدایه‌ها و نیز ضعیف بودن این باندها و از سویی دیگر عدم موفقیت این آغازگر برای تعداد زیادی از جدایه‌ها موجب حذف داده‌های آن از ارزیابی- های نهایی گردید. مخلوط واکنش برای RAPD- PCR شامل DFS Master Mix (2x) (شرکت فزایژوه) 13 میکرولیتر، سه میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت پنج نانوگرم بر میکرولیتر، آغازگر (تهیه شده از شرکت تکاپوزیست) 1/4 میکرولیتر و آب دوبار تقطیر 7/6

⁷ High Range DNA Ladder, 0.5 – 10 kbp linear scale

⁸ Jena Bioscience

⁶ Freeze Dryer

جهت ترسیم دندروگرام به نرم افزار NTSYS pc 2/02 وارد شدند. بدین ترتیب، دندروگرامی بر اساس سازگاری رویشی در نرم افزار مذکور ترسیم گردید. سپس این دندروگرام با دندروگرام ترسیم شده بر اساس داده های مولکولی مقایسه شد.

نتایج

تولید بخش‌های مقاوم به کلرات و جداسازی جهش یافته‌گان nit

توانایی و سرعت رشد ریشه‌های سریع‌الرشد مقاوم به کلرات در اطراف قرص‌های میسلیومی انتقال یافته به محیط واجد کلرات، متفاوت بود. در مورد بعضی جدایه‌ها بخش‌های سریع‌الرشد، حدود چهار تا پنج روز پس از کشت، خیلی سریع تولید می‌شدند. ولی برخی دیگر در مدت زمان بیشتری تشکیل شده و پس از گذشت حدود 21 روز، برای خالص‌سازی به روش نوک‌ریسه آماده می‌شدند.

اسموس (2006) و جهت تعیین تنوع ژنوتیپی از نرم‌افزار Multilocus 1.3 (آگاپو و برت 2001) استفاده شد. هم-چنین برای تعیین تفرق ژنتیکی بین جدایه‌های مناطق مختلف، فاصله ژنتیکی بین آن‌ها در نرم‌افزار GENALEX 6 محاسبه گردید. بدین منظور لازم بود از هر منطقه داده‌های ژنتیکی حداقل دو جدایه در اختیار باشند.

مقایسه گروه‌بندی فنوتیپی و مولکولی

به‌منظور مقایسه گروه‌های سازگار رویشی با دودمان‌های کلونالی به‌دست‌آمده، ابتدا گروه‌های سازگار رویشی که از کنارهم قرارگرفتن جدایه‌های سازگار حاصل شدند، با دودمان‌های کلونالی مقایسه گردیدند. سپس بر اساس قرارگرفتن جدایه‌ها در گروه‌های سازگاری مختلف، ماتریس‌های صفر و یک تشکیل شدند. بدین‌مفهوم که هر یک از گروه‌های سازگاری رویشی به‌عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و واقع‌شدن یا واقع‌نشدن هر جدایه در هر گروه به‌ترتیب با یک و صفر تعیین گردید. داده‌های حاصل

جدول 2 - نام و توالی آغازگرهای به‌کاربرده‌شده RAPD جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Fusarium solani* در استان زنجان

تعداد باندهای چندشکلی تولیدشده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز	توالی آغازگرها (3' - 5')	نام آغازگرها
-	GATAACGCAC	RCO9
-	CAGGCCCTTC	OPA-01
2	CAAACGTCCGG	*OPA-19
-	TGCGCCCTTC	OPB-05
-	GTGCCTAACC	OPG-06
-	GGGCGGTACT	OPL-12
-	AGCGTCACTC	OPN-13
17	CAGCACCCAC	OPA-13

*: OPA-19 فقط در چند جدایه دو باند ضعیف تولید نمود و با توجه به این‌که برای بسیاری از جدایه‌ها هیچ باندهای تولید نشد، این آغازگر از ارزیابی‌ها حذف گردید.

نسبی جهش‌یافته‌گان *nit1* در محیط کشت WAC نسبت به سایر محیط‌های کشت بیش‌تر بود. *nit3* فقط برای 16 جدایه به‌دست آمد. بیش‌ترین فراوانی مربوط به جهش-یافته‌گان *nit3* در محیط کشت MMC مشاهده گردید، به‌طوری‌که در محیط PDC در هیچ‌یک از جدایه‌ها جهش‌یافته نوع *nit3* شناسایی نشد.

آزمون‌های مکمل‌سازی

باوجود استفاده از محیط‌های مختلف با درصد‌های متفاوت کلرات‌پتاسیم، برای سه جدایه تنها *nitM* تولید گردید و از آزمون‌های خودسازگاری کنار گذاشته شدند. در مورد جدایه‌های خودناسازگار (HSI)¹⁰ در محل تلاقی جهش‌یافته‌ها رشد هتروکاریون مربوطه متوقف شد و هتروکاریون تشکیل نگردید. در مورد برخی جدایه‌های HSI در محل تلاقی جهش‌یافته‌ها، پس از آناستوموز، رشد سلول هتروکاریون اولیه متوقف شده و ادامه نیافت و در برخی دیگر در محل به‌هم-رسیدن، ریشه‌های دو پرگنه ناسازگار از رشد باز ماندند و حتی تشکیل سلول هتروکاریون هم صورت نگرفت و یک ناحیه بدون رشد در بین آن‌ها باقی ماند. برای اطمینان از خودناسازگاری جدایه‌ها، آزمون مکمل-سازی چندین مرتبه و با فنوتیپ‌های مختلف آن جدایه تکرار و پس از اطمینان کامل، نتایج ثبت شدند (شکل 1). نتایج نشان داد که 21 جدایه HSI بودند. با حذف جدایه‌های خودناسازگار و جدایه‌هایی که تنها یک نوع *nit* تولید نموده بودند، از کل 42 جدایه مورد آزمون، تنها 18 جدایه از نظر سازگاری رژیسی تقسیم‌بندی گردیدند و بقیه جدایه‌ها یا به‌علت خودناسازگاری و یا به‌دلیل عدم تشکیل یکی از جهش‌یافته‌گان ضروری جهت انجام تقابل، از آزمون‌های سازگاری رژیسی حذف شدند.

اغلب بخش‌های مقاوم به کلرات، هفت تا 14 روز پس از کشت ظاهر گردیدند. تولید ریشه‌های سریع‌الرشد جدایه‌ها روی محیط‌های کشت حاوی کلرات پتاسیم به-میزان سه درصد سریع‌تر و راحت‌تر بود. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان تولید بخش‌های مقاوم به کلرات در محیط WAC سه درصد به‌میزان 41/76 درصد و در محیط MMC سه درصد به‌میزان 35/44 درصد از کل بخش‌های مقاوم به کلرات بود. کم‌ترین میزان بخش‌های مقاوم به کلرات به میزان 3/84 درصد در محیط MMC پنج درصد تولید شد. تمام جدایه‌ها در محیط MMC، بخش‌های مقاوم به کلرات ایجاد کردند. تعداد بخش‌های مقاوم به کلرات که جهش‌یافته *nit* بودند، در بین جدایه‌ها از 0/59 درصد تا 5/92 درصد متفاوت بود. از میان بخش‌هایی که به‌منظور تهیه جهش‌یافته‌های *nit* از محیط‌های غذایی واجد کلرات به محیط کشت MMC منتقل گردیدند، جهش‌یافته‌های *nit* 38/15 درصد آن‌ها را به خود اختصاص دادند و بقیه (61/85 درصد) شامل جدایه‌هایی با رشد وحشی بودند که هم توانایی استفاده از منبع نیترات را دارا بودند و هم نسبت به منبع کلرات مقاومت نشان دادند (جهش‌یافته‌گان *crn*⁹). در مورد تمامی جدایه‌های مورد آزمون در همه محیط‌های حاوی کلرات شامل MMC، PDC و WAC فنوتیپ غالب جهش‌یافته‌های جداسازی‌شده را فنوتیپ *nitM* به‌خود اختصاص داد. *nitM* در مورد تمامی جدایه‌ها به جزء جدایه *Z*₁₄ تولید شد. به‌طوری‌که 57/4 درصد کل جهش‌یافته‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه مربوط به همین فنوتیپ بود. *nit1* 31/36 درصد و *nit3* 11/24 درصد از کل جهش‌یافته‌های *nit* به‌دست‌آمده را تشکیل دادند. از 42 جدایه که در محیط MMC دارای سه درصد کلرات، تولید بخش‌های مقاوم به کلرات کردند، 32 جدایه *nitM* تولید نمودند. در نهایت، فراوانی جهش-یافته‌گان *nitM* در محیط کشت MMC بیش‌تر از سایر محیط‌های کشت مورد استفاده بود. هم‌چنین فراوانی

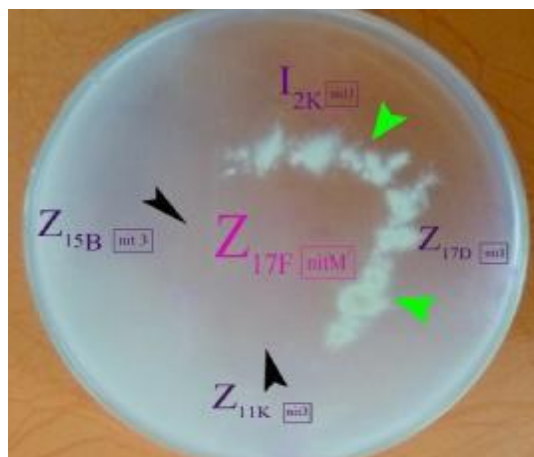
¹⁰ Heterokaryon Self Incompatible

⁹ ClO₃-resistant NO₃-utilizing

نتایج تجزیه‌تحلیل‌های مولکولی و گروه‌های ژنتیکی مربوط

از بین 42 جدایه مورد بررسی، تنها 26 جدایه با استفاده از آغازگر OPA-13 باندهای قابل ارزیابی تولید نمودند و در مجموع 17 باند متفاوت قابل ارزیابی با دامنه اندازه 400 تا 3000 جفت‌باز تولید گردید (شکل 3). تمام باندهای تولیدشده چندشکلی بودند (درصد باندهای چندشکلی در بین کل جدایه‌ها: 100 درصد). تعداد باندها در جدایه‌ها یک‌سان نبوده و از یک الی هفت باند متغیر بود. کم‌ترین تعداد باندهای چندشکلی مربوط به سه جدایه Z_{12} ، Z_{13} و I_3 بوده و بیش‌ترین تعداد باندهای چندشکلی به جدایه‌های Z_1 و Z_{16} اختصاص داشت (جدول 4).

میزان هتروزیگوسیتی برای باندهای مختلف بین 0/08 تا 0/52 قرار داشت و میانگین آن برای کل باندها 0/27 بود. از بین 17 باند تکثیرشده، 16 باند دارای فراوانی بیش از پنج درصد بودند. بر اساس ضریب تشابه 75 درصد جدایه‌ها در 13 دودمان کلونالی قرار گرفتند. هر دودمان کلونالی تنها یک هاپلوتیپ را در برداشت و به این ترتیب 13 هاپلوتیپ شناسایی شدند. در این میان شش هاپلوتیپ تک‌عضوی بوده و بقیه دارای چندین جدایه بودند به طوری که فراوان‌ترین هاپلوتیپ از پنج جدایه تشکیل شده بود (شکل 4).



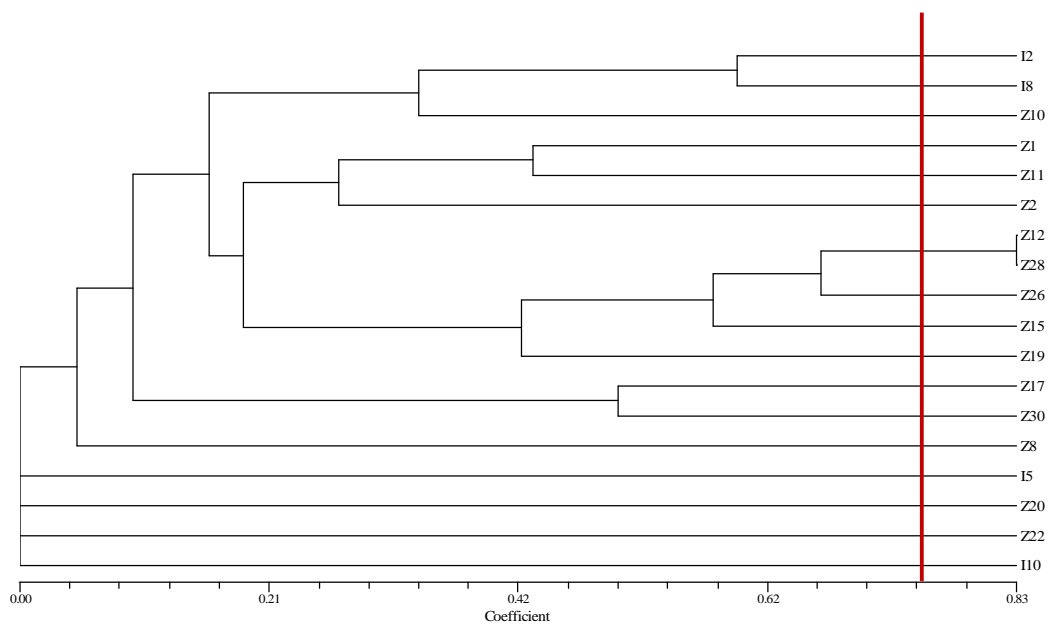
شکل 1- سازگاری رویشی و تشکیل هتروکاریون (فلش‌های سمت راست) و ناسازگاری رویشی (فلش‌های سمت چپ) بین جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium solani*

با بررسی نتایج واکنش‌های سازگاری/ناسازگاری رویشی و قرار دادن جدایه‌های سازگار در گروه‌های مجزا، 16 گروه سازگاری رویشی شناسایی گردیدند. از بین 16 گروه تنها چهار گروه تک‌عضوی بودند. همه 14 گروه دیگر بیش از یک جدایه را در بر داشتند و از سویی دیگر وجود جدایه‌های متصل‌کننده در بین این گروه‌های چندعضوی مشهود بود (جدول 2). گروه‌بندی بر اساس سازگاری رویشی با استفاده از نرم افزار NTSYS pc 2/02 جدایه‌ها را به 14 گروه در ضریب تشابه 50 درصد و به 17 گروه در ضریب تشابه 75 درصد تقسیم نمود (شکل 2).

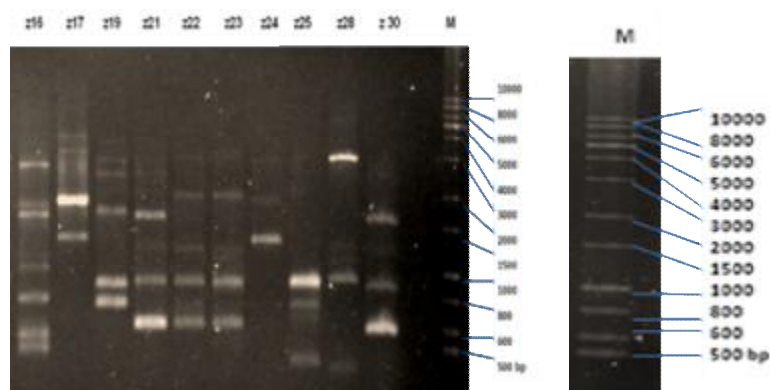
جدول 3- قرارگرفتن اولیه جدایه‌های قارچ *Fusarium solani* در 16 گروه سازگاری رویشی*

VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG	VCG
16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Z_{28}	Z_{26}	Z_{19}	Z_{17}	Z_{15}	Z_{12}	Z_{11}	Z_{10}	Z_2	Z_1	I_8	I_2	Z_{22}	Z_{20}	I_{10}	I_5
Z_{12}	Z_1	I_2	I_2	Z_1	Z_{15}	I_8	Z_{11}	Z_{11}	Z_8	I_2	I_8				
Z_{15}	Z_{11}	I_8	Z_{10}	Z_{12}	Z_{17}	Z_1	Z_{17}	Z_{26}	Z_{11}	Z_{11}	Z_{17}				
Z_{19}	Z_{12}	Z_{10}	Z_{12}	Z_{26}	Z_{19}	Z_2	Z_{19}		Z_{15}	Z_{19}	Z_{19}				
Z_{26}	Z_{15}	Z_{12}		Z_{28}	Z_{26}	Z_{10}									
	Z_{19}	Z_{26}			Z_{28}	Z_{26}									
	Z_{28}	Z_{28}			Z_{20}										

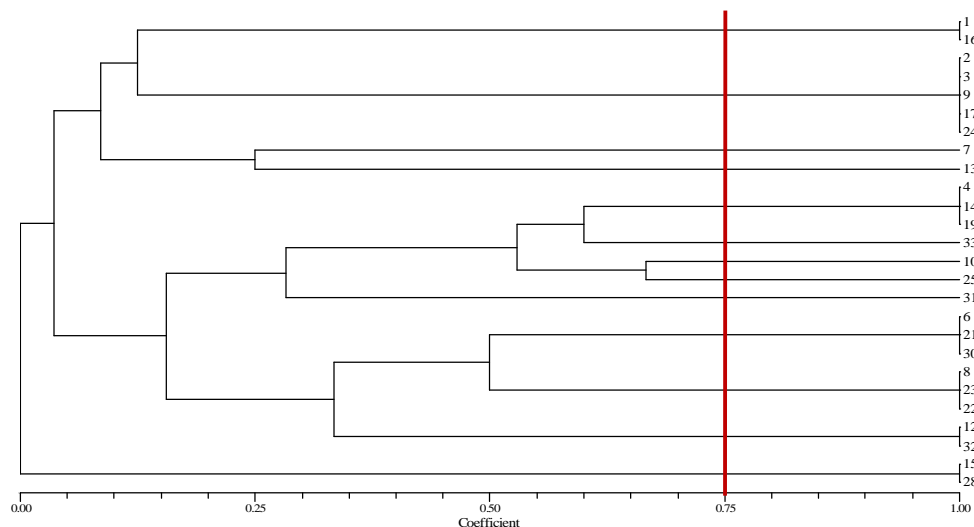
* به‌علت وجود جدایه‌های پل، گروه‌های پنج الی 16 قابلیت پیوستن بهم و تشکیل یک گروه سازگاری رویشی بزرگ را دارند.



شکل 2- دندروگرام بر اساس روش UPGMA برای 18 جدایه قارچ *Fusarium solani* از روش VCG. خط جداکننده نشان‌دهنده گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه 75 درصد می‌باشد.



شکل 3- الگوی انگشت‌نگاری DNA برخی جدایه‌های قارچ *Fusarium solani* به دست آمده از لوبیا با استفاده از نشان‌گر RAPD-PCR (آغازگر OPA-13): M: شاخص وزنی مولکولی با مقیاس خطی 0/5 الی 10 کیلوباز



شکل 4- دندروگرام بر اساس روش UPGMA برای 26 جدایه فارچ *Fusarium solani* با استفاده از روش انگشت‌نگاری ژنتیکی (از بین 42 جدایه تنها 26 جدایه در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تولید باندهای قابل ارزیابی نمودند). شماره‌گذاری سمت راست نشان‌دهنده هاپلوتیپ‌ها می‌باشد که شماره‌های 1 تا 30 معادل با جدایه‌های Z_1 تا Z_{30} و شماره‌های 31 و 32 و 33 به ترتیب جدایه‌های I_1 ، I_3 و I_5 می‌باشند.

ژنتیکی بین دو منطقه هیدج و نصیرآباد و بیش‌ترین فاصله بین هیدج و خرم‌دره و نیز چرگر و خرم‌دره بوده است (جدول 5). در بین مناطق مورد مطالعه، جدایه‌های عمیدآباد در یک هاپلوتیپ قرار گرفتند و این نکته در مورد جدایه‌های خرم‌دره نیز صادق بود. جدایه‌های بقیه مناطقی که بیش از یک جدایه از آن‌ها در PCR موفق بودند، در گروه‌های متفاوتی متفرق گردیدند. جدایه‌های ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد در پنج هاپلوتیپ مختلف قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های نصیرآباد در دو هاپلوتیپ واقع گردیده و دو جدایه هیدج نیز در دو هاپلوتیپ مجزا قرار گرفتند.

تنوع ژنوتیپی محاسبه‌شده در نرم‌افزار Multilocus در بین جدایه‌ها 0/93 بود که با توجه به نزدیک‌بودن آن به عدد یک، تنوع ژنوتیپی بالای بین جدایه‌ها را نشان می‌دهد. از 42 جدایه متعلق به 13 منطقه مختلف، تنها 26 جدایه در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز موفق بودند که این جدایه‌ها متعلق به نه منطقه به شرح جدول 1 بودند و از بین آن‌ها نیز امکان مقایسه تفرق بین منطقه‌ای تنها برای شش منطقه که تعداد جدایه‌های موفق آن‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز بیش از یک بود، امکان داشت (ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد، نصیرآباد، عمیدآباد، خرم‌دره، هیدج و چرگر). بررسی تفرق یا فاصله ژنتیکی بین جدایه‌های این شش منطقه نشان داد که کم‌ترین فاصله

جدول 4- تعداد باندهای (چندشکلی) * تولیدشده برای جدایه‌های مختلف *Fusarium solani* با استفاده از آغازگر OPA-13

نام جدایه‌ها	تعداد جدایه‌ها	تعداد باندهای چندشکلی
I_3, Z_{13}, Z_{12}	3	1
$Z_{28}, Z_{24}, Z_{17}, Z_{15}, Z_{10}, Z_9, Z_3, Z_2$	8	2
$Z_{30}, Z_{25}, Z_{23}, Z_{22}, Z_{21}, Z_{19}, Z_{14}, Z_8, Z_6, Z_4$	10	3
Z_7	1	4
I_5	1	5
I_1	1	6
Z_{16}, Z_1	2	7

* با توجه به این‌که تمام باندها چندشکلی می‌باشند، لذا تعداد کل باندها با تعداد باندهای چندشکلی برابر است.

جدول 5- فاصله ژنتیکی بین منطقه‌ای، برای جدایه‌های *Fusarium solani* از استان زنجان *

چرگر	هیدج	خرم‌دره	عمیدآباد	نصیرآباد	ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد	ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد
					0	0
				0	0/12	نصیرآباد
			0	0/08	0/23	عمیدآباد
		0	0/27	0/23	0/27	خرم‌دره
	0	0/31	0/23	0/07	0/14	هیدج
0	0/23	0/31	0/23	0/11	0/18	چرگر

* از 13 منطقه تنها برای شش منطقه (با بیش از یک جدایه) امکان بررسی فاصله ژنتیکی وجود داشت.

یک منطقه (خرم‌دره) جداسازی شده بودند. تشابه دیگر این دو گروه‌بندی در آن بود که جدایه 33 یا I5 (از قلعه حسینیه) که تنها عضو گروه سازگاری رویشی شماره یک VCG1 بود، در انگشت‌نگاری ژنومی نیز در ضریب تشابه 75 درصد در یک گروه تک‌عضوی واقع شد. چهار جدایه ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد، در مطالعه مولکولی در چهار هاپلوتیپ جداگانه واقع شدند حال آنکه در مطالعه بر اساس سازگاری رویشی، جدایه Z₃₀ در یک گروه سازگاری رویشی و سه جدایه دیگر به صورت جدایه‌های متصل‌کننده در چند گروه سازگاری رویشی واقع شدند. در دندروگرام ترسیم‌شده بر اساس سازگاری رویشی، دو جدایه Z₂₈ (از خرم‌دره) و Z₁₂ (از سلطانیه) در یک گروه قرار گرفتند در حالی که بر اساس انگشت‌نگاری ژنومی، این دو جدایه در هاپلوتیپ‌های جدا و نزدیک به هم قرار گرفتند. جدایه‌های Z₂ و Z₁₇ از عمیدآباد بر اساس انگشت‌نگاری ژنومی در یک گروه و بر اساس سازگاری رویشی در گروه‌های مجزا واقع شدند. جدایه Z₂₂ از هیدج گرچه همراه با جدایه Z₈ از نصیرآباد در یک هاپلوتیپ واقع شدند، اما در گروه‌های متفاوت سازگاری رویشی قرار گرفتند، به طوری که Z₂₂ یک گروه تک‌عضوی را تشکیل داد.

مقایسه نتایج حاصل از VCG و RAPD-PCR

برخی از جدایه‌هایی که گروه سازگاری آن‌ها تعیین شد، هیچ بانندی را در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با آغازگر مورد استفاده ایجاد نکرده بودند، عکس این قضیه نیز صادق بود به این مفهوم که برخی از جدایه‌هایی که پس از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس باندهای قابل ارزیابی ایجاد نمودند، به دلیل خودسازگاری یا عدم ایجاد جهش‌یافته‌های موردنیاز، از آزمون‌های تعیین گروه سازگاری حذف گردیدند. بدین ترتیب، امکان مقایسه نتایج دو نوع نشان‌گر تنها برای 12 جدایه از کل 42 جدایه امکان‌پذیر شد که این جدایه‌ها شامل جدایه‌هایی از ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد (چهار جدایه)، نصیرآباد (یک جدایه)، عمیدآباد (دو جدایه)، خرم‌دره (دو جدایه)، هیدج (یک جدایه)، سلطانیه (یک جدایه)، و قلعه حسینیه (یک جدایه) بودند که در جدول 1 مشخص گردیده‌اند. همبستگی و همخوانی بارزی بین گروه‌بندی بر اساس سازگاری رویشی و انگشت‌نگاری ژنومی وجود نداشت. تنها در مورد دو جدایه 15 (Z₁₅) و 28 (Z₂₈) می‌توان گفت که این دو جدایه در ضریب تشابه 50 درصد بر اساس سازگاری رویشی و در ضریب تشابه 75 درصد بر اساس انگشت‌نگاری ژنومی در یک گروه قرار گرفتند. قابل ذکر است که این دو جدایه از

در هر کدام از گروه‌های سازگاری رویشی چند-عضوی و نیز در هر یک از گروه‌های دندروگرام مبتنی بر سازگاری رویشی، جدایه‌هایی از مناطق مختلف موجود بوده و بنابراین ارتباط آشکاری بین پراکنش جغرافیایی و گروه‌بندی مشاهده نشد. این موضوع در رابطه با گروه‌بندی بر اساس داده‌های مولکولی و پراکنش جغرافیایی نیز صادق بود.

بحث

سازگاری/ناسازگاری رویشی ابزاری مناسب جهت تعیین کلون‌ها در جمعیت یک قارچ در مزرعه می‌باشد و گروه‌های سازگار رویشی یا VCG این امکان را می‌دهد که به‌طور نسبی روابط بین جدایه‌ها از نظر ژنتیکی تعیین گردد (لزلی 1993). برخی تحقیقات نشان‌دهنده ارتباط و همبستگی بین گروه‌های بیماری‌زایی و گروه‌های سازگار رویشی بوده است (پوهالا 1985). در این پژوهش با استفاده از محیط‌های حاوی کلرات-پتاسیم، جهش‌یافته‌گان مقاوم به کلرات که فاقد توانایی استفاده از منبع نیترات بودند، جداسازی شدند. در مورد سه جدایه با وجود عوض کردن نوع محیط‌ها و اضافه نمودن درصد کلرات به محیط‌های مورد استفاده، غیر از nitM جهش‌یافته دیگری به دست نیامد، چنین نتیجه‌ای توسط برخی محققین دیگر هم گزارش شده است (هاسورن و ریز-جورج 1996). جدایه‌هایی که فاقد توانایی تشکیل هتروکاریون‌ها بین جهش‌یافته‌گان به دست آمده از خودشان باشند، خودناسازگار نامیده می‌شوند (کارل و همکاران 1989). در صورت تلاقی دادن این جدایه‌ها با جدایه‌های دیگر نیز هتروکاریونی تشکیل نخواهد شد. بدین ترتیب در صورتی که تلاقی بین جدایه‌های مختلف بدون شناسایی اولیه جدایه‌های خود-ناسازگار انجام شود، تعداد گروه‌های سازگاری رویشی در جمعیت بیش از حد واقعی برآورد خواهد شد. حضور این نوع جدایه‌ها که در جمعیت‌های انواع گونه‌های فوزاریوم از جمله *F. oxysporum*، *F.*

moniliforme و *F. subglutinans* و برخی گونه‌های دیگر این قارچ مشاهده شده‌اند، گاه تفسیر داده‌های جمعیت را با مشکل مواجه می‌نماید (لزلی 1993). قابل ذکر است که نیمی از جدایه‌های استفاده‌شده در تعیین گروه‌های سازگاری رویشی در این تحقیق، خود-ناسازگار بودند. تعداد بالای HSI شناسایی شده در این تحقیق مشابه با نتایج به دست آمده توسط برخی محققین دیگر می‌باشد، بدین ترتیب که هاسورن و ریز-جورج (1996) نیز از 89 جدایه *F. solani*، 32 جدایه را به-عنوان جدایه‌های HSI شناسایی نمودند. تحقیقات نشان می‌دهند که پدیده HSI به دلیل کاهش آناستوموزهای ریشه‌ای در داخل پرگنه یک قارچ می‌باشد و این امر در مورد گونه‌هایی از فوزاریوم از جمله *F. oxysporum* و *F. moniliforme* (کارل و همکاران 1987، جاکوبسون و گوردون 1988) و نیز در مورد *F. solani* (هاسورن و ریز-جورج 1996) به اثبات رسیده است. اهمیت خود-ناسازگاری در طبیعت مشخص نیست. نگهداری قارچ‌ها به مدت طولانی در محیط‌های کشت مصنوعی باعث وقوع جهش‌هایی در تعدادی از جدایه‌ها می‌شود که برخی از این جهش‌ها موجب وقوع خودناسازگاری در بعضی جدایه‌ها می‌گردد (هاسورن و ریز-جورج 1996).

یکی از چالش‌های مهم در آزمون‌های تعیین سازگاری رویشی در جمعیت‌های قارچ‌ها، تنوع در قوت هتروکاریون می‌باشد. تنوع بالا در قوت هتروکاریون در واکنش‌های سازگار به فراوانی در بین جدایه‌های قارچ *F. solani* مشاهده شده است. در این تحقیق نیز نمونه‌هایی از این تنوع در ضعف و قوت هتروکاریون‌ها مشاهده گردید. در مورد تمام جدایه‌هایی که باهم سازگار بودند، سازگاری با قوت بالا و با سرعت بالاتری اتفاق افتاد ولی در مورد دو جدایه Z_{19} و Z_{28} هتروکاریون با سرعت کم‌تری تشکیل شد و نسبت به هتروکاریون‌های دیگر خیلی ضعیف بوده و توسعه زیادی نیافت. این امر نشان می‌دهد که در بیان فنوتیپی

میزبان نخود با استفاده از نشان‌گرهای RAPD مشاهده شد. محققین دیگری هم تنوع بسیار بالای ژنتیکی در جمعیت‌های این گونه را از میزبان‌های مختلف گزارش نموده‌اند (بقایی‌راوری و همکاران 1385، براسیلیرو و همکاران 2004). با این حال گزارش‌هایی از تنوع پایین برخی فرم‌های مخصوص این قارچ وجود دارد (رمبرگ و دیویس 2007). در نتایج تحقیق حاضر تنوع ژنوتیپی در بین جدایه‌ها 0/93 بود که مقدار بالایی است. چراکه دامنه تنوع ژنوتیپی محاسبه‌شده در نرم‌افزار Multilocus از صفر تا یک می‌باشد و با توجه به نزدیک‌بودن این عدد به یک و از طرف دیگر با توجه به وجود 13 هاپلوتیپ در بین 26 جدایه، می‌توان چنین نتیجه گرفت که تنوع بالایی در بین جدایه‌ها وجود دارد. از سوی دیگر ارتباط بارزی بین گروه‌های سازگاری رویشی و پراکنش جغرافیایی و نیز دودمان‌های کلونالی یا هاپلوتیپ‌ها و مناطق جغرافیایی مشاهده نشد. چنین نتیجه‌ای با نتایج برخی محققین مشابه و با بعضی دیگر مغایر است. در تحقیق انجام‌شده روی سازگاری رویشی جدایه‌های *F. solani* از زیره سبز در ایران، 19 جدایه این قارچ در 15 گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند و ارتباطی بین منطقه جغرافیایی و سازگاری رویشی ملاحظه نگردید (محمدی و نورس-مفرد 2009). رمبرگ و دیویس (2007) در مطالعه سازگاری رویشی در جدایه‌های قارچ *F. solani* f.sp. *eumartii* جداشده از دو میزبان گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی دریافتند که تمام جدایه‌های به‌دست‌آمده از گوجه‌فرنگی در یک گروه سازگاری رویشی واقع شدند درحالی‌که جدایه‌های سیب‌زمینی در بیش از یک گروه قرار گرفتند. آن‌ها تعداد بیش‌تر VCGs را در جدایه‌های سیب‌زمینی به قدیمی‌تر بودن این جمعیت مربوط نمودند. در تحقیقی دیگر که در نیوزلند روی جدایه‌های *F. solani* جداشده از پنج میزبان مختلف انجام شد، درجاتی از انطباق گروه‌های سازگاری رویشی با زمان نمونه‌برداری (سال‌های مختلف) و منطقه جغرافیایی

سازگاری رویشی علاوه بر سازگاری ژن‌ها عوامل دیگری نیز دخیل می‌باشند. این پدیده در مورد *F. moniliforme* به اثبات رسیده است (پوهالا و اسپایس 1983). چنین تنوعی کاملاً وابسته به جدایه بوده و در گونه *F. solani* نیز مشاهده شده است. هم‌چنین تحقیقات نشان داده‌اند که تلاقی‌هایی که در آن‌ها یکی از طرفین تلاقی، جهش‌یافته nitM باشد، اغلب منجر به تشکیل هتروکاریون‌هایی با قوت، پایداری و تکرارپذیری بیش‌تری می‌شوند (هاسورن و ریز-جورج 1996). در تحقیق حاضر، گروه‌بندی بر اساس سازگاری رویشی به دو روش انجام شد. یکی روش مستقیم بود که در این روش جدایه‌های سازگار در یک گروه قرار گرفتند و به این ترتیب گروه‌ها تعیین شدند اما روش دیگر استفاده از نرم‌افزار و ترسیم دندروگرام بود که با توجه به وجود جدایه‌های متصل‌کننده بین گروه‌های سازگار رویشی انتظار می‌رود که این دو نوع گروه‌بندی منطبق بر هم نباشند. اگر به دلیل وجود جدایه‌های متصل‌کننده، گروه‌های سازگاری رویشی به ناچار کنار هم گذاشته شوند، در این صورت با توجه به تعداد این جدایه‌ها در تحقیق حاضر، 12 گروه سازگاری به هم پیوسته و یک گروه بزرگ را ایجاد خواهند کرد که درون این گروه بین برخی جدایه‌ها سازگاری و بین برخی جدایه‌ها ناسازگاری رویشی مشاهده خواهد شد. گروه‌بندی بر اساس نتایج مولکولی هم نشان‌دهنده آن بود که علاوه بر وجود تنوع بین جدایه‌ها از نظر قطعات تکثیرشده توسط آغازگر مورد استفاده، وضعیت کلونال نیز در آن‌ها مشهود است. زیرا از بین 13 هاپلوتیپ، هفت هاپلوتیپ در برگیرنده بیش از یک جدایه بودند. با این حال در صورتی‌که آغازگرهای بیش‌تری استفاده می‌شدند، احتمال تفکیک برخی جدایه‌های یک هاپلوتیپ در گروه‌های جداگانه وجود داشت. تنوع بالای ژنتیکی در مطالعات مرید و همکاران (1387) در جمعیت‌های *F. solani* با استفاده از نشان‌گرهای RFLPs و RAPD و نیز حسن‌زاده و همکاران (1387) روی *F. solani* از

(2006). بنابراین واضح است که نمی‌توان انتظار داشت جدایه‌هایی که بر اساس کاربرد یک آغازگر، در یک گروه ژنتیکی واقع شده‌اند، الزاماً در یک گروه سازگاری رویشی نیز قرار گیرند. البته عکس این حالت همواره قابل انتظار نیست، به عبارت دیگر، نمی‌توان انتظار داشت جدایه‌هایی که در یک گروه سازگاری رویشی هستند، باید در یک گروه انگشت‌نگاری ژنتیکی واقع شوند، چرا که جای‌گاه‌های ژنی تنظیم‌کننده سازگاری رویشی ممکن است با جای‌گاه‌های ژنی مورد مطالعه در انگشت‌نگاری ژنومی پیوسته نباشند. همچنین عدم سازگاری بین برخی جدایه‌های درون بزرگ‌ترین گروه سازگاری رویشی (VCG5 با 14 عضو) نشان می‌دهد که اعضای این گروه از نظر ژنتیکی کاملاً مشابه نیستند و این امر نشان‌دهنده وجود تنوع و تفرق در جمعیت است. عدم تکثیر قطعات DNAی برخی جدایه‌ها با آغازگر به‌کاررفته در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز نیز حاکی از تفرق جدایه‌ها و نبود مراکز مناسب جهت چسبیدن آغازگرها به ژنوم آنها است. با توجه به سابقه کشت حبوبات و حضور بیماری در منطقه، جمعیت قارچی مورد مطالعه جمعیتی نسبتاً قدیمی است. با توجه به این‌که تولیدمثل جنسی تا کنون برای *F. solani* f.sp. *phaseoli* مشاهده نشده است، انتظار می‌رود که جمعیت‌های این بیمارگر در منطقه به‌طور غالب کلونال باشند، اما از طرف دیگر، وجود 16 گروه سازگار رویشی و نیز 13 هاپلوטיפ نشان از تنوع بالای موجود در بین جدایه‌ها دارد. وجود جدایه‌های متصل‌کننده در بین گروه‌های سازگار رویشی نیز می‌تواند تقویت‌کننده این فرضیه باشد که جمعیت کلونال این قارچ طی گذشت زمان به‌سوی ایجاد و افزایش تنوع پیش رفته و جدایه‌های موجود در یک گروه سازگار رویشی به‌تدریج از هم متفرق شده و در گروه‌های متنوعی جای گرفته‌اند.

مشاهده گردید (هاسورن و ریز-جورج 1996). شریفی و همکاران (2008)، سازگاری رویشی جدایه‌های *F. solani* از مزارع سیب‌زمینی در سه استان ایران را مورد مطالعه قرار داده و تنوع نسبتاً بالایی را مشاهده کردند، به‌طوری‌که در بین 38 جدایه 15 گروه تعیین نمودند که هفت گروه تک‌عضوی بودند. آنها همچنین بین منطقه جغرافیایی و گروه سازگاری رویشی همبستگی نسبی مشاهده کردند. ناهم‌خوانی پراکنش جغرافیایی با دودمان‌های کلونالی با اغلب تحقیقات انجام‌شده در این زمینه مطابقت دارد (براسیلیرو و همکاران 2004، رمبرگ و دیویس 2007). با وجود تنوع کم گروه‌های سازگاری در این تحقیق، نتایج مولکولی با استفاده از آغازگر OPA-13، جدایه‌های مورد مطالعه را در دودمان‌های کلونالی و هاپلوטיפ‌های متعددی قرار داد و تجزیه‌تحلیل داده‌های حاصل از آن نشان‌دهنده تنوع ژنوتیپی بالایی بین جدایه‌ها بود. از سوی دیگر، گرچه آغازگر OPA-13 یکی از آغازگرهای معروف و بسیار موفق و مفید در زمینه RAPD برای مطالعه تنوع درون‌گونه‌ای گونه‌های قارچی مختلف از جمله جنس *Fuzarium* می‌باشد، مسلم است که کاربرد این آغازگر به تنهایی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی واقعی نبوده و در صورتی‌که از آغازگرهای بیشتری استفاده می‌شود، تنوع بالاتری حاصل می‌گردد. همچنین همبستگی چندانی بین دو نوع گروه‌بندی مشاهده نشد. چنین نتیجه‌ای دور از انتظار نیست چرا که دودمان‌های کلونالی به‌دست‌آمده در این تحقیق تنها بر اساس کاربرد یک آغازگر منتج شده‌اند، در صورتی‌که، فنوتیپ سازگاری رویشی، نتیجه تشابه چندین جای‌گاه ژنی است که تعداد این جای‌گاه‌ها در گونه‌های مختلف جنس *Fuzarium* از 10 الی 15 متغیر بوده و اغلب با تعداد کروموزوم‌های هر گونه برابر است و در *F. solani* این جای‌گاه‌ها 14 عدد تخمین زده می‌شود (لزلی و سامرل

منابع

- بقایی‌راوری س، فلاحتی‌رستگار م، جعفرپور ب، شکوهی‌فر ف و مرادزاده اسکندری م، 1385. انگشت نگاری DNA جدایه های *F. solani* عامل پژمردگی و پوسیدگی خشک فوزاریومی سیب زمینی در استان‌های خراسان رضوی و شمالی با استفاده از نشان‌گرهای مولکولی مبتنی بر PCR. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد 417 تا 437.
- حسن‌زاده ف، فلاحتی‌رستگار م، جعفرپور ب و مرادزاده اسکندری م، 1387. بررسی چندشکلی جدایه‌های *Fusarium solani f.sp. pisi* در مزارع نخود استان خراسان رضوی و شمالی با استفاده از نشان‌گر مولکولی RAPD. جلد 2- صفحه 5 خلاصه مقالات هیجدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
- رئوفی م، فرخی‌نژاد ر و محمودی سب، 1383. مطالعه تنوع جهش در قارچ *Fusarium solani* عامل پوسیدگی ریشه چغندرقد با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی و رابطه آن با بیماری‌زایی جدایه‌ها. مجله چغندرقد، جلد بیستم، صفحه‌های 39 تا 53.
- مرادزاده اسکندری م، جوان‌نیکخواه م، زارع ر، اخوت س م، مورتی آ، سوما ا و استئا گ، 1388. مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *Fusarium solani*، جدا شده از سیب‌زمینی، کدوئیان و نخود بر اساس نشان‌گر AFLP. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد 417 تا 197.
- مرید ب، زارع ر، زمانی‌زاده حر و حاج‌منصور ش، 1387. بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *Fusarium solani* با استفاده از نشان‌گرهای مولکولی PCR-RFLPs و RAPD-PCR. جلد 2- صفحه 2 خلاصه مقالات هیجدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
- محمدی ح و بنی‌هاشمی ض، 1385. بررسی گروه‌های سازگاری رویشی *Fusarium solani f.sp. pisi* عامل پوسیدگی سیاه ریشه نخود در استان فارس. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد 417 تا 179.
- ناصری ب و مرادی پ، 1386. شیوع عوامل پوسیدگی ریشه و خسارت وارده به محصول لوبیا در زنجان، ایران (گزارش کوتاه علمی). مجله بیماری‌های گیاهی، جلد 417 تا 347.
- Achenbach LA, Patrick JA and Gray LE, 1997. Genetic homogeneity among isolates of *Fusarium solani* that cause soybean sudden death syndrome. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 474-478.
- Agapow PM and Burt A, 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1: 101-102.
- Alimanesh MR, Falahatirastegar M, Jafarpour B and Mahdikhani Moghadam E, 2009. Genetic diversity in the fungus *Fusarium solani f.sp cucurbitae* Race 1, the causal agent of root and crown rot of cucurbits in Iran, using molecular markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12: 836-843.
- Alizadeh A, Javan-Nikkhah M, Fotouhifar KB, Rabiee Motlagh E and Rahjoo V, 2010. Genetic diversity of *Fusarium proliferatum* populations from maize, onion, rice and sugarcane in Iran based on vegetative compatibility grouping. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 216-222.
- Brasileiro BT, Coimbra MR, Morias, MA and Oliveira NT, 2004. Genetic variability within *Fusarium solani* species as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiology* 35: 205-210.
- Correll JC, Klittich CJR and Leslie JF, 1987. Nitrate non-utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility test. *Phytopathology* 77: 1640-1646.
- Douhan LI and Johnson DA, 2001. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahlia* from spearmint and peppermint. *Plant Disease* 85: 297-302.

- Hawthorne BT and Rees-George J, 1996. Use of nitrate non- utilizing mutants to study vegetative incompatibility in *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*) especially members of mating populations I, V and VI. *Mycological Research* 100: 1075-1081.
- Jacobson DJ and Gordon TR, 1988. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Phytopathology* 78: 668-672.
- Jana T, Sharma TR, Prasad RD and Arora DK, 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiological Research* 158: 249-257.
- Knodel JJ, Bradly CA, Luecke, JL and Mars GA, 2007. 2004 and 2005 dry bean grower survey. External Report Notes. North Dakota State University, Fargo, ND.
- Leslie JF, 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31: 127-151.
- Leslie JF and Summerell BA, 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing Professional, Ames, USA.
- Liu D, Coloe S, Baird R and Pedersen J, 2000. Rapid mini- preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 471.
- Mohammadi A and Nooras Mofrad N, 2009. Genetic diversity in populations of *Fusarium solani* from cumin in Iran. *Journal of Plant Protection Research* 49: 283-286.
- Peakall R and Smouse PE, 2006. GENALEX 6: genetic analysis in excel, population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Puhalla JE, 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* 63: 179-183.
- Puhalla JE and Spieth PT, 1983. Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*. *Experimental Mycology* 7: 328-335.
- Rohlf FI, 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.0. Applied Biostatistics, New York, USA.
- Romberg MK and Davis RM, 2007. Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f.sp. *eumartii* from potato and tomato in California. *Plant Disease* 91: 585-592.
- Sharifi K, Zare R and Rees-George J, 2008. Vegetative compatibility groups among *Fusarium solani* isolates causing potato dry rot. *Biological Science* 8: 374-379.
- Vakalounakis DJ and Fragkiadakis GA, 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD fingerprinting. *Phytopathology* 89: 161-168.

Identification of Vegetative Compatibility Groups and Clonal Lineages of *Fusarium solani*, the Causal Agent of Bean Root Rot in Zanjan, Iran

Z Safarloo¹ and R Hemmati^{2*}

¹ MSc Student of Plant Pathology, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

² Assistant Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

* Corresponding Author: rhemati@znu.ac.ir

Received: 17 June 2013

Accepted: 6 November 2013

Abstract

Vegetative compatibility groups of 42 isolates of *Fusarium solani*, the causal agent of root rot, isolated from different bean cultivation regions of Zanjan province, Iran were determined using nit mutants. The phenotype of nit mutants was detected according to their developmental characters in minimal medium (MM) containing different nitrogen sources and nitM was found as the most abundant nit mutant. Complementary experiments were conducted among the self-compatible isolates and accordingly the isolates were grouped in 16 VCGs, with four single-isolate and 12 multi-isolate VCGs. There were bridging isolates, the isolates compatible with two or more VCGs, among multi-isolate groups. There was no correlation between vegetative compatibility groups and geographic origin of the isolates. To identify clonal lineages, one primer (OPA-13) among eight RAPD primers, amplified appropriate and polymorphic DNA patterns. Polymerase Chain Reaction was successful for 26 out of 42 isolates. The results of molecular data analysis showed high diversity among the isolates and according to these results 13 clonal lineages were identified among 26 isolates (similarity coefficient: 75%). Each clonal lineage included only one single or multi-member haplotype. There was no correlation between haplotypes and VCGs.

Keywords: Fusarium root rot, Haplotype, Vegetative incompatibility, *Phaseolus vulgaris*