

بررسی تنوع ژنتیکی *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی با استفاده از آزمون‌های بیماری‌زایی و نشانگرهای RAPD*

مکامه مهدوی امیری^{۱*}، محمد رضوی^۲، کسری شریفی^۲ و رسول زارع^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۷/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۴/۲۳)

چکیده

گونه‌ی *Fusarium oxysporum* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی در اغلب مزارع سیب‌زمینی کاری ایران شایع بوده و خسارت زیادی می‌زند. استفاده از ارقام مقاوم یکی از مؤثرترین روش‌های مدیریت این بیماری محسوب می‌شود، اما به‌منظور انتخاب و توسعه ارقام مقاوم آگاهی از تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این قارچ ضروری است. در این بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت این بیمارگر در استان‌های تهران، همدان و اردبیل بررسی گردید. بدین منظور ۷۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* به‌دست آمده از استان‌های مذکور انتخاب و پس از انجام آزمون بیماری‌زایی به دو روش آزمون بیماری‌زایی توانایی پوساندگی ریشه و انسداد آوندی، با استفاده از هفت آغازگر RAPD تنوع ژنتیکی آنها بررسی شد. آزمون‌های بیماری‌زایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها نشان داد جدایه‌هایی که در سیب‌زمینی پژمردگی ایجاد می‌نمودند از توان پوساندگی کمی برخوردار بوده و بالعکس. تجزیه خوشه‌ای داده‌های RAPD با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه Dice جدایه‌ها را در سطح شباهت ۷۱ درصد در هشت گروه ژنوتیپی قرار داد. هم‌چنین جدایه‌ها از لحاظ فنوتیپ مولکولی (هاپلوتیپ) به ۱۸ گروه تقسیم شدند. تعداد اندک گروه‌بندی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی کم این قارچ در مناطق مورد بررسی می‌باشد و نشان می‌دهد که جدایه‌ها از یک منبع اجدادی منشأ گرفته‌اند که یکی از علل این امر را می‌توان به نقش ضعیف تولید مثل جنسی در این قارچ نسبت داد. هم‌چنین تجزیه خوشه‌ای داده‌های RAPD جدایه‌ها را بدون توجه به منشأ جغرافیایی در گروه‌های ژنوتیپی مختلف قرار داد. بدین ترتیب بین تنوع ژنتیکی و منشأ جغرافیایی جدایه‌ها ارتباطی مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌زایی، پوسیدگی، پژمردگی فوزاریومی، فنوتیپ مولکولی، سیب‌زمینی

مقدمه

بالایی برای جمعیت رو به افزایش جهان برخوردار است (Hooker 2000). یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد قارچی سیب‌زمینی پژمردگی فوزاریومی (*Fusarium wilt*) می‌باشد. این بیماری از طریق غده‌ی بذری نیز قابل انتقال است

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از عمده‌ترین اقلام غذایی در تغذیه انسان‌ها به‌شمار رفته که به‌علت سازگار بودن با شرایط محیطی بسیار متفاوت، از پتانسیل غذایی بسیار

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mekameh_mahdavi@yahoo.com

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

۲. به ترتیب استادیار، مربی و دانشیار پژوهشی بیماری‌شناسی گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

(Powelson & Rowe 1993). طی بررسی‌های مزرعه‌ای و انباری *F. solani* و *F. oxysporum* به ترتیب در مزرعه و انبار در ایران مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای سیب‌زمینی تعیین گردیدند (Karimi 1970). *F. oxysporum* یکی از مهم‌ترین گونه‌های تغییر پذیر در بین گونه‌های فوزاریوم بوده، قادر است در گیاهان متعدد بیماری ایجاد کند. جمعیتی از این گونه عامل انسداد آوندی و جمعیتی مولد پوسیدگی ریشه، طوقه، غده، پیاز و سایر اندام‌های زیرزمینی گیاهان می‌باشند (Miller et al. 2004). بیماری پژمردگی فوزاریومی در گیاهان مربوط به خانواده‌ی بادمجانیان (Solanaceae) از اهمیت خاصی برخوردار بوده و معمولاً علائم آن در برگ‌های پایین به صورت زردی مشاهده می‌شود. علت آن استقرار قارچ در آوندها یا پوسیدگی ساقه و ریشه می‌باشد. گیاهان مبتلا به این بیماری در هوای گرم به سرعت پژمرده شده، از پا می‌افتند (Miller et al. 2004). بیماری پژمردگی فوزاریومی در آب و هوای گرم و به خصوص اگر گیاه تحت تأثیر تنش کم آبی قرار گرفته باشد، در صورت حضور بیمارگر در خاک یا در غده‌های مادری به سرعت ظاهر شده، گسترش می‌یابد (Stevenson et al. 2001). این قارچ قادر است با استقرار در آوند غده‌های بذری به راحتی از منطقه‌ای به منطقه‌ی دیگر انتقال یابد (Stevenson et al. 2001).

سابقه تحقیقات در زمینه طبقه‌بندی گونه‌های فوزاریوم نشان می‌دهد که به دلیل عدم ثبات در مشخصات ریخت‌شناسی آنها روش‌های معمول در تمایز بین و درون گونه‌ای فوزاریوم‌ها با مشکلاتی مواجه بوده است. ویژگی‌هایی مانند رنگ پرگنه، شکل و اندازه اسپور بر حسب شرایط محیطی و مواد زمینه محیط کشت متغیر بوده و تنوع فنوتیپی به فراوانی مشاهده شده است (Nelson 1991). تغییرات ژنتیکی در قارچ‌های بیمارگر از جنبه تهیه ارقام مقاوم حائز اهمیت است. ردیابی این تغییرات با روش‌های سنتی مستلزم صرف هزینه زیاد و از دست رفتن زمان خواهد بود. استفاده از روش RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) در تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های بیمارگرها موجب کسب

اطلاعات مربوط به وقوع نوترکیبی در زمینه ژنتیکی آنها می‌گردد. این روش خیلی حساس و سریع است و قابلیت آنالیز ژنتیکی تعداد زیادی از نمونه‌های قارچ را خواهد داشت (Williams et al. 1990, Walsh & McClelland 1990). این روش به دلیل عدم نیاز به کاوشگرهای رادیواکتیو و اطلاعات قبلی از توالی DNA در تعیین تنوع ژنتیکی بسیاری از جمعیت‌های قارچ‌های بیمارگر از جمله *Colletotrichum graminicola* (Guthrie et al. 1992) و *F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli* (Nelson et al. 1997) مورد استفاده قرار گرفته است. روشی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) است که در آن الیگونوکلوئوتیدهایی با توالی تصادفی به عنوان آغازگرهای PCR مورد استفاده قرار گرفته و به این ترتیب تکثیر چندین قطعه از ژنوم موجود به طور نمایی (Exponential) آغاز می‌گردد (Gurr 1992). چند شکلی مشاهده شده در روش RAPD ناشی از الحاق (Insertion)، حذف (deletion) و یا جایگزین نوکلئوتیدی می‌باشد. از این روش به عنوان ابزار موفق در بررسی تنوع بین و درون گونه‌های فوزاریوم، یاد شده است (Khalil et al. 2003). ابزارهای مولکولی برای توصیف کردن تنوع در بین سویه‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* با هدف تشخیص ارتباط ژنتیکی در بین فرم‌های اختصاصی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kim et al. 1991, Kistler et al. 1993). به نظر بلابید و همکاران RFLP و RAPD پتانسیل خوبی برای تعیین دینامیک جمعیت و تکامل جمعیت *F. oxysporum* f. sp. *lentis* را دارند. چرا که دو همسانه‌ی قارچ می‌توانند به وسیله اثر نگاری DNA از هم متمایز گردند. در صورتی که به وسیله روش‌هایی مانند آزمون بیماری‌زایی و ارزیابی ریخت‌شناسی این عمل امکان‌پذیر نمی‌باشد (Belabid et al. 2004). با استفاده از مارکر RAPD نشان داده شد که چه مقدار تنوع بین جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* وجود دارد (Jimenez-Gasco et al. 2001). با استفاده از مارکر RAPD

بررسی تنوع ژنتیکی *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی...

ماکروکنیدیوم‌ها، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم، نحوه قرار گرفتن میکروکنیدیوم (در سرهای کنیدیومی یا به صورت زنجیره‌ای یا به هر دو صورت) و رنگ، سرعت رشد و نحوه رشد پرگنه‌ها صورت گرفت. برای شناسایی عمدتاً از گریلاخ و نیرنبرگ (Gerlach & Nirenberg 1982) و نلسون و همکاران (Nelson et al. 1983) استفاده شد.

از میان حدود ۲۰۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* به دست آمده از ریشه، طوقه و آوند ساقه بوته‌های سیب‌زمینی با علائم پژمردگی ۷۰ جدایه که با توجه به مناطق و هم‌چنین خصوصیات ریخت‌شناسی آنها همانند شکل و رنگ پرگنه‌ها طبقه‌بندی شده بودند انتخاب و در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفتند. این جدایه‌ها از استان‌های اردبیل (شامل مناطق یونجالو، آق‌باقر و نمین)، تهران (شامل مناطق اسلام آباد، فیروزکوه و آسرد) و همدان (شامل مناطق کبودرآهنگ، کرفس و قهاوند) به دست آمدند که مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است.

۲- بررسی شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها

به منظور بررسی نحوه بیماری‌زایی و شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها از دو روش آزمون بیماری‌زایی توانایی پوساندگی ریشه و انسداد آوندی جدایه‌ها به شرح زیر استفاده گردید.

۱-۲ بررسی توانایی جدایه‌ها در پوساندن ریشه‌های

سیب‌زمینی

جدایه‌ها به روش تغییر یافته‌ی ترون و هولتز از نظر نحوه بیماری‌زایی و شدت آن بررسی گردیدند (Theron & Holz 1987). بدین منظور از روش آلوده‌سازی خاک گلدان و کشت تک جوانه‌های غده‌ی سیب‌زمینی رقم آگریا و عاری از بیماری که سطح بریده آنها چوب‌پنبه‌ای شده بود استفاده گردید. برای تهیه مایه تلقیح ابتدا یک قطعه به قطر ۱ سانتی‌متر از هر جدایه در ۳۰ گرم پرلیت حاوی محیط مایع Czapek-dox broth سترون در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری

بین جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* جدا شده از نخود تنوع ژنتیکی پایینی مشاهده و جدایه‌ها به سه گروه تقسیم شدند (Singh et al. 2006, Jimenez-Gasco et al. 2001). پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بیماری (*F. oxysporum*) در مناطق مهم سیب‌زمینی کاری کشور (استان‌های تهران، اردبیل و همدان) انجام گرفت.

روش بررسی

۱- نمونه برداری و جداسازی عامل بیماری

نمونه برداری از مزارع سیب‌زمینی مناطق اجرای آزمایش با توجه به وسعت سطح زیر کشت آن و انتخاب مزارع به صورت تصادفی انجام شد. به این ترتیب که از مناطق عمده سیب‌زمینی کاری هر استان (اردبیل، تهران و همدان) سه منطقه و از هر منطقه پنج مزرعه (حداقل یک هکتاری) و از هر مزرعه تعداد ۱۰ بوته با علائم بیماری پژمردگی انتخاب شد. نمونه برداری از زمان گل‌دهی تا اواخر فصل زراعی سه تا چهار بار انجام گرفت. بوته‌های کامل بلافاصله جهت جداسازی عامل بیماری به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

برای جداسازی عوامل بیماری، بوته‌های پژمرده با آب شستشو و با الکل ۷۵٪ ضدعفونی سطحی شدند. قطعات کوچک (حدود یک سانتی‌متر) از آوندهای ساقه هوایی، ساقه زیرزمینی و ریشه‌ها در دو تکرار در محیط کشت اختصاصی فوزاریوم (Nash & Snyder 1965) و محیط مرطوب (در تشتک پتری روی کاغذ صافی مرطوب در شرایط سترون) کشت شدند. تشتک‌های پتری در دمای $25 \pm 1^\circ\text{C}$ حدود یک هفته نگهداری و سپس پرگنه‌های قارچ‌ها به روش تک اسپور کردن و نوک ریشه خالص‌سازی شدند. جدایه‌ها برای انجام مراحل بعدی در محیط کشت SNA و در دمای پنج درجه سلسیوس نگهداری شدند.

همه جدایه‌ها بر پایه ویژگی‌های ظاهری تشخیص داده شدند. این ویژگی‌ها عبارت بودند از: نوع فیالیل (مونوفیالیل یا پلی‌فیالیل)، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، شکل

قرار داده شد، پس از ۱۰ روز پرگنه قارچ در محیط مزبور کاملاً رشد کرده و سپس درب ارلن‌ها را برداشته تا خشک شوند (Dhingra 1994). مایه تلقیح مزبور به نسبت ۱ به ۶ با ماسه سترون مخلوط گردید. جوانه‌های آماده شده در گلدان‌های به حجم ۱۰ لیتر حاوی خاک سترون کشت گردیدند و ۵ گرم از مایه تلقیح تهیه شده هم‌زمان با کشت با خاک اطراف تک جوانه‌های چوب‌پنبه‌ای شده مخلوط گردید. تیمار شاهد بدون مایه‌ی تلقیح کشت و گلدان‌ها در شرایط گلخانه در دمای $24 \pm 2^\circ \text{C}$ و رطوبت حدود ۷۰ درصد نگهداری شدند.

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. تیمارها در مراحل مختلف رویشی گیاه (سبز شدن، گیاهچه، گل‌دهی) هر ۲۰ روز یک بار بررسی و نسبت به یادداشت علائم بیماری بر اساس روش تغییر یافته چندرا و همکاران (Chandra et al. 1983) از ۰ تا ۵ بر مبنای پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه، مرگ گیاه، پژمردگی و گسترش آنها نمره دهی شدند. داده‌ها پس از تصحیح تجزیه آماری شده و در نهایت به روش LSD مقایسه میانگین شدند.

۲-۲- بررسی توانایی جدایه‌ها در انسداد آوندی بوته‌های سیب‌زمینی

به این منظور ریز غده‌های سیب‌زمینی (Mini tuber) رقم اگریا عاری از بیماری در گلدان‌های حاوی پرلیت سترون کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ریشه دار شدن (حدود ۲۰ روز بعد) گیاهچه‌ها از پرلیت خارج و به تک بوته‌ها تقسیم و سپس به گلدان‌های حاوی پرلیت و پیت منتقل شدند. گلدان‌های حاوی تک بوته‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا طول بوته‌ها حدوداً ۲۰ سانتی‌متر شوند. گیاهچه‌ها هر هفته یک بار با محلول غذایی Hogland's آبیاری شدند (Dhingra 1994).

وقتی بوته‌ها ۲۰ سانتی‌متری شدند از گلدان‌ها خارج و در داخل سوسپانسیون اسپورهای قارچ با غلظت ۱۰۵ اسپور

در میلی‌لیتر به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. برای تهیه سوسپانسیون اسپور، جدایه‌های خالص شده به محیط برگ میخک آگار (CLA) منتقل و پس از تشکیل کنیدیوم روی برگ میخک (حدود ۱۵ روز پس از کشت)، یک لوپ از اسپورهای روی برگ به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل و سپس با لام هموسیستمتر تعداد اسپور (شامل ماکروکنیدی و میکروکنیدی) در هر میلی‌لیتر به ۱۰۵ اسپور تنظیم شد. برای تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد.

ریشه‌های تلقیح شده به گلدان‌های حاوی خاک و پرلیت سترون (به نسبت ۱:۲) انتقال داده شدند. ۲۴ ساعت قبل از مایه‌زنی به بوته‌ها استرس خشکی و دمایی (۳۰ درجه سلسیوس) داده شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه در 25 ± 1 درجه سلسیوس تا زمان ظهور علائم پژمردگی قرار داده شدند. بوته‌ها در روز هفتم و چهاردهم مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور بوته‌های پژمرده از گلدان‌ها خارج و تغییر رنگ آوند ساقه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Venter et al. 1992). ارزیابی شدت بیماری بر اساس روش تغییر یافته چندرا و همکاران (Chandra et al. 1983) که در جدول ۲ آمده است نمره‌دهی شدند، با این تفاوت که در این روش مقیاس شماره ۵ از جدول فوق‌الذکر حذف و نمره دهی از ۰-۴ انجام شد. داده‌ها پس از تصحیح، با نرم افزار SAS تجزیه آماری و در نهایت با روش LSD مقایسه میانگین شدند. آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار صورت گرفت.

۳- استخراج DNA برای به‌کارگیری در RAPD-PCR

جدایه‌ها در ظروف ارلن حاوی محیط مایع Czapek-dox broth کشت و در ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی به‌مدت ۷ روز روی شیکر قرار داده شدند. توده‌های تشکیل شده از پارچه ملامل سترون عبور داده شده و میسلیوم‌های جمع‌آوری شده در هاون‌های چینی سترون با استفاده از نیتروژن مایع پودر شدند.

مولکولی، غلظت DNA کلیه نمونه‌ها در حد ۲۵ng/μl تنظیم و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد.

۴- بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. oxysporum* با

استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* از هفت آغازگر استفاده گردید (جدول ۲). این آغازگرها از میان ۲۰ آغازگر براساس وضوح باند و همچنین تعداد باندهای بیشتر با وضوح بالا انتخاب گردیدند (Singh et al. 2006). این آغازگرها توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شدند. تکثیر DNA در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10 x PCR، ۰/۷۵ میکرولیتر (50 mM) MgCl₂، ۰/۷۵ میکرولیتر مخلوط ۱۰ mM dNTPs (10 pmol)، آغازگر، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک پلی مرز (تهیه شده از شرکت سینازن) در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی ۲ دقیقه در ۹۴ °C و ۳۵ سیکل شامل ۲ دقیقه در ۹۳ °C، ۱ دقیقه در ۳۶ °C، ۲ دقیقه در ۷۲ °C و افزایش طول قطعات به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ °C انجام شد. یک واکنش به‌منظور کنترل آلودگی بدون افزودن DNA الگو به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. قطعات تکثیر شده در هر واکنش روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE 1x در ولتاژ ۹۰ به‌مدت ۲ ساعت الکتروفورز شد. نتایج به‌دست آمده توسط دستگاه Gel Documentation Uvi Doc (Uvi Tec انگلستان) عکس برداری شد (Belabid et al. 2004).

۵- تجزیه داده‌ها

به‌منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌های *F. oxysporum* ابتدا باندهای واضح در تصاویر ژل‌ها مشخص شد و داده‌ها به‌صورت حضور باند (۱) و یا عدم حضور باند (۰) در نرم افزار Excel وارد گردید سپس ماتریس تشابه بین جفت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس (Dice's coefficient) در برنامه SIMQUAL با نرم افزار NTSYS-pc 2.01 محاسبه

استخراج DNA ژنومی طبق روش (Raeder & Broda 1985) انجام شد. در این روش مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از پودرهای به‌دست آمده از میسلیم قارچ‌ها در لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس ۵۵۰ میکرولیتر بافر استخراج که حاوی SDS (۰/۵٪)، EDTA (۲۵ mM)، NaCl (۲۵۰ mM)، Tris-HCl (۲۰۰ mM، pH=8/5) بود به آنها اضافه گردید و با نوک سمپلر مخلوط شدند. سپس به‌ترتیب ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر فنول و سپس ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم نیز به آن اضافه و به‌خوبی هم زده شده و لوله‌ها به‌مدت نیم ساعت در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ °C سانتریفیوژ گردیدند. به‌منظور حذف RNA به هر لوله ۴ میکرولیتر آنزیم ریبونوکلئاز A (شرکت سینازن) اضافه و لوله‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس هم اندازه محلول رویی (supernatant) کلروفرم اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مجدداً لایه رویی حاصل جمع‌آوری و به نسبت ۰/۵۴ برابر مایع به‌دست آمده ایزوپروپانول سرد اضافه شد سپس لوله‌ها به‌مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع داخل لوله‌ها خارج گردید. DNAهای رسوب کرده با اتانول ۷۰٪ سرد شستشو داده شده و لوله‌ها حدود دو ساعت در دمای معمولی آزمایشگاه نگه‌داری شدند تا خشک شوند. برای تهیه محلول DNA به‌دست آمده ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر سترون به لوله‌ها اضافه شد (Raeder & Broda 1985). کیفیت DNA نمونه‌ها به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی و حضور تک باند شفاف با وزن مولکولی بالا، نشانه DNA مطلوب و مناسب تر تلقی گردید. بررسی میزان و غلظت DNA استخراج شده و خلوص آن از طریق اسپکتروفوتومتری انجام گرفت. میزان جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و محاسبه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (BioPhotometer Eppendorf AG) انجام شد. جهت انجام آزمایش‌های

جدول ۲. نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش RAPD-PCR

Table 2. Sequence of the primers used in RAPD-PCR

نام آغازگرها Primer name	توالی آغازگرهای مورد استفاده Primer sequence
OPA-01	5'-CAG GCC CTT C-3'
OPA-04	5'-AAT CGG GCT G-3'
OPB-11	5'-GTA GAC CCG T-3'
OPR-11	5'-GTA GCC GTC T-3'
17S	5'-CCT GGG CCT C-3'
4S	5'-CCT GGG CTG G-3'
34S	5'-CCG GCC CCA A-3'

هاپلوتیپ‌های مختلف در بین جمعیت ممکن گردید (Kolmer et al. 1995).

نتیجه

۱- بررسی توانایی جدایه‌ها در پوساندن ریشه بوته‌های

سیب‌زمینی

با توجه به نتایج تجزیه آماری جدایه‌ها از نظر شدت پژمردگی ناشی از پوسیدگی ریشه در سطح ۱% اختلاف معنی‌دار داشتند. بر اساس مقایسه میانگین‌ها به‌روش LSD، جدایه‌های Fo65، Fo56 و Fo42 مربوط به استان همدان (به ترتیب متعلق به مناطق کرفس، قهاوند و قهاوند) با بیشترین بیماری‌زایی (۵) در گروه A و جدایه Fo48 مربوط به استان تهران (منطقه اسلام آباد) با کمترین توان بیماری‌زایی (۰/۵) در گروه HI قبل از شاهد قرار گرفتند (جدول ۳). در این آزمایش همه جدایه‌ها قابلیت پوساندگی ریشه را داشتند

۲- بررسی توانایی جدایه‌ها در ایجاد پژمردگی آوندی

بوته‌های سیب‌زمینی

تجزیه داده‌ها نشان داد جدایه‌ها از نظر شدت بیماری‌زایی در سطح ۱% اختلاف معنی‌دار از نظر شدت پژمردگی دارند. با توجه به مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD بیشترین شدت پژمردگی (۴) مربوط به جدایه‌های Fo28، Fo42، Fo35، Fo32، Fo31، Fo41، Fo33، Fo47، Fo39، Fo30

گردید. با استفاده از برنامه SHAN و روش UPGMA تجزیه خوشه‌ای انجام گردید. سطح تشابه ۷۱ درصد (میانگین تشابه جمعیت جدایه‌های مورد بررسی) محاسبه شده به‌عنوان مبنای تفکیک گروه‌ها در دندروگرام حاصل قرار داده شد.

۶- تعیین هاپلوتیپ‌ها (فنوتیپ‌های مولکولی) در قارچ

F. oxysporum

برای تعیین تعداد هاپلوتیپ‌هایی (فنوتیپ‌های مولکولی) که درون جمعیت وجود دارند از روش کولمر (Kolmer et al. 1995) استفاده گردید. در این روش هر جدایه از *F. oxysporum* با یک فنوتیپ مولکولی ۷ رقمی براساس الگوی باندهی هر یک از ۷ آغازگری که انتخاب شده‌اند تعیین گردید. هر رقم بیانگر باند مشترکی است که بیشترین فراوانی را در جمعیت داشته و به‌وسیله هر آغازگر برای آن جدایه تولید شده است. به‌عنوان مثال فنوتیپ مولکولی ۱۱۱۲۱۱۲ بیانگر این است که به‌وسیله آغازگرهای ۱ (OPA-01)، ۲ (OPA-04)، ۳ (OPB-11)، ۵ (17S) و ۶ (4S) باندهی تولید شده که بیشترین فراوانی را در جمعیت داشته است و لذا شماره ۱ گرفته است و به‌وسیله آغازگرهای ۴ (OPR-11) و ۷ (34S) با توجه به این که بیشترین باند مشترک تشکیل نشده بود باندهای مربوط به دومین الگوی باندهی با بیشترین فراوانی (رتبه دوم) در نظر قرار گرفته شد و لذا شماره ۲ به آنها داده شد. بر اساس این نوع نام‌گذاری تعداد

جدول ۳. مقایسه میانگین‌های شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* با استفاده از روش مایه‌زنی خاک براساس آزمون LSD در سطح ۵%

Table 3. Comparison of disease severity means of *Fusarium oxysporum* isolates using inoculation of soil method based on LSD test at 5%

شدت بیماری‌زایی			شدت بیماری‌زایی			شدت بیماری‌زایی		
Disease severity			Disease severity			Disease severity		
گروه	میانگین	جدایه‌ها	گروه	میانگین	جدایه‌ها	گروه	میانگین	جدایه‌ها
Group	Mean	Isolates	Group	Mean	Isolates	Group	Mean	Isolates
DEFGHI	1.5	Fo17	BCDEFG	2.5	F11	A*	5	Fo65
EFGHI	1.25	Fo36	CDEFGH	2.25	Fo3	A	5	Fo42
EFGHI	1.25	Fo32	CDEFGH	2.25	Fo12	A	5	Fo56
EFGHI	1.25	Fo38	CDEFGH	2.25	Fo21	AB	4.25	Fo44
EFGHI	1.25	Fo57	CDEFGH	2.25	Fo31	AB	4.25	Fo51
EFGHI	1.25	Fo58	CDEFGH	2.25	Fo43	ABC	3.5	Fo45
EFGHI	1.25	Fo63	CDEFGH	2.25	Fo52	ABC	3.5	Fo24
FGHI	1	Fo66	CDEFGH	2	Fo50	ABC	3.5	Fo22
FGHI	1	Fo55	CDEFGH	2	Fo40	ABC	3.5	Fo53
FGHI	1	Fo49	CDEFGH	2	Fo37	ABC	3.5	Fo59
FGHI	1	Fo69	CDEFGH	2	Fo8	ABCD	3.25	Fo68
FGHI	1	Fo33	CDEFGH	2	Fo27	ABCD	3.25	Fo29
FGHI	1	Fo34	CDEFGH	2	Fo62	ABCD	3.25	Fo7
FGHI	1	Fo23	CDEFGH	2	Fo64	ABCD	3.25	Fo13
FGHI	1	Fo15	CDEFGH	2	Fo46	ABCD	3.25	Fo14
FGHI	1	Fo26	CDEFGH	2	Fo70	ABCD	3.25	Fo18
FGHI	1	Fo2	CDEFGHI	1.75	Fo10	BCDE	3	Fo35
FGHI	1	Fo4	CDEFGHI	1.75	Fo16	BCDE	3	Fo67
FGHI	1	Fo6	CDEFGHI	1.75	Fo39	BCDEF	2.75	Fo20
GHI	0.75	Fo9	CDEFGHI	1.75	Fo47	BCDEF	2.75	Fo25
GHI	0.75	Fo19	DEFGHI	1.5	Fo60	BCDEFG	2.5	Fo41
HI	0.5	Fo48	DEFGHI	1.5	Fo61	BCDEFG	2.5	Fo28
I	0	شاهد	DEFGHI	1.5	Fo54	BCDEFG	2.5	Fo1
			DEFGHI	1.5	Fo5	BCDEFG	2.5	Fo30

*: Similar letters indicate the same group

* حروف مشترک نشان‌دهنده یک گروه می‌باشند.

گروه JK و جدایه‌های Fo68 و Fo50 (به ترتیب مربوط به استان همدان منطقه کبودرآهنگ و استان تهران منطقه آبسرد) بیماری‌زا نبود که با شاهد در گروه K قرار گرفتند.

۳- بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. oxysporum* با استفاده

از نشانگرهای مولکولی RAPD

تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* در سه استان تهران، اردبیل و همدان با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کل باندهای تکثیر شده با هفت آغازگر ۴۰ عدد و تعداد کل باندهای پلی مورفیک ۱۹ عدد بود. شکل ۱ نقوش الکتروفورز حاصل از به‌کارگیری

و Fo29، Fo2 (۸ جدایه اول مربوط به استان تهران به ترتیب متعلق به مناطق فیروزکوه، اسلام آباد، اسلام آباد، فیروزکوه، فیروزکوه، آبسرد، فیروزکوه و آبسرد، جدایه بعدی مربوط به استان همدان متعلق به منطقه قهاوند و ۳ جدایه آخر مربوط به استان اردبیل به ترتیب متعلق به مناطق آق‌باقر، یونجالو و یونجالو) بود که به اتفاق در گروه A قرار گرفتند (جدول ۴). کمترین شدت پزومردگی (۰/۵) مربوط به جدایه‌های Fo62، Fo70، Fo4، Fo12 و Fo6 به ترتیب متعلق به استان‌های اردبیل (منطقه یونجالو)، اردبیل (منطقه نمین)، اردبیل (منطقه آق‌باقر)، همدان (منطقه کرفس) و تهران (منطقه فیروزکوه) بودند که در

جدول ۴. مقایسه میانگین‌های شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* به‌روش غوطه‌ور سازی ریشه‌ها در سوسپانسیون اسپور براساس آزمون LSD در سطح ۵٪

Table 3. Comparison of disease severity means of *Fusarium oxysporum* isolates using root dip method in spore suspension based on LSD test at 5%

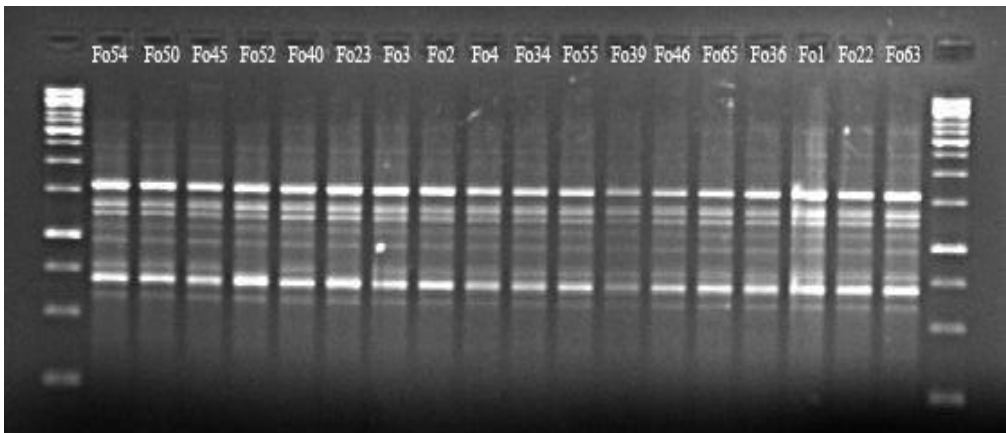
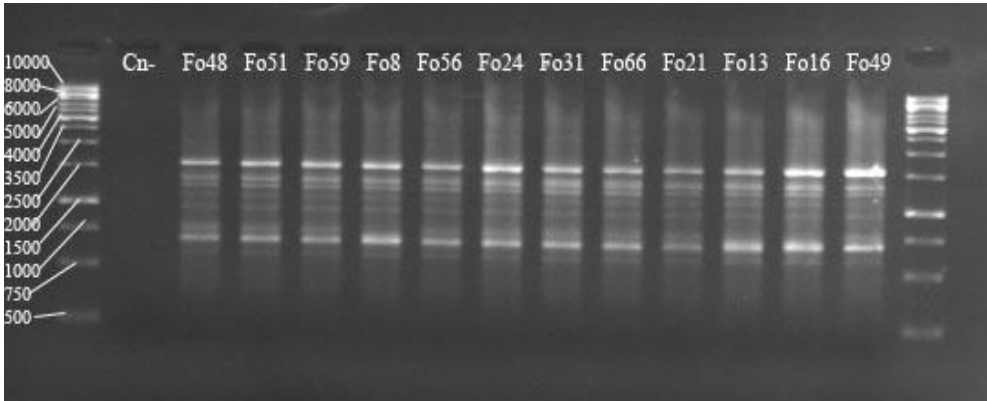
شدت بیماری‌زایی			شدت بیماری‌زایی			شدت بیماری‌زایی		
Disease severity			Disease severity			Disease severity		
گروه	میانگین	جدایه‌ها	گروه	Isolates	جدایه‌ها	گروه	میانگین	جدایه‌ها
Group	Mean	Isolates	Group	Isolates	Isolates	Group	Mean	Isolates
FGHI	1.5	Fo10	BCD	2.75	Fo44	A*	4	Fo2
GHIJ	1.25	Fo48	BCD	2.75	Fo13	A	4	Fo15
GHIJ	1.25	Fo63	CDE	2.5	Fo45	A	4	Fo28
GHIJ	1.25	Fo66	CDE	2.5	Fo59	A	4	Fo29
HIJ	1	Fo55	DEF	2.25	Fo25	A	4	Fo30
HIJ	1	Fo67	DEFG	2	Fo17	A	4	Fo31
HIJ	1	Fo69	DEFG	2	Fo18	A	4	Fo32
HIJ	1	Fo58	DEFG	2	Fo22	A	4	Fo33
HIJ	1	Fo5	DEFG	2	Fo52	A	4	Fo35
HIJ	1	Fo60	DEFG	2	Fo61	A	4	Fo39
HIJ	1	Fo8	DEFG	2	Fo64	A	4	Fo41
HIJ	1	Fo9	EFGH	1.75	Fo53	A	4	Fo42
HIJ	1	Fo26	EFGH	1.75	Fo23	A	4	Fo47
IJK	0.75	Fo20	EFGH	1.75	Fo24	A	3.75	Fo43
IJK	0.75	Fo51	EFGH	1.75	Fo19	A	3.75	Fo14
Jk	0.5	Fo62	EFGH	1.75	Fo21	A	3.75	Fo3
Jk	0.5	Fo70	EFGH	1.75	Fo11	AB	3.5	Fo1
Jk	0.5	Fo4	FGHI	1.5	Fo49	AB	3.5	Fo16
Jk	0.5	Fo12	FGHI	1.5	Fo56	AB	3.5	Fo34
Jk	0.5	Fo6	FGHI	1.5	Fo57	AB	3.5	Fo37
K	0	Fo68	FGHI	1.5	Fo54	AB	3.5	Fo38
K	0	Fo50	FGHI	1.5	Fo65	AB	3.5	Fo40
K	0	شاهد	FGHI	1.5	Fo27	AB	3.5	Fo46
			FGHI	1.5	Fo7	ABC	3.25	Fo36

*: Similar letters indicate the same group

* حروف مشترک نشان‌دهنده یک گروه می‌باشند.

Fo64 جمع‌آوری شده از استان اردبیل (منطقه نمین) با جدایه‌های Fo59 و Fo53 متعلق به استان تهران ۹۵٪ شباهت داشت. جدایه‌های Fo51 و Fo62 متعلق به استان اردبیل (منطقه یونجالی) بیش از ۹۵٪ با یک‌دیگر شباهت داشتند. جدایه‌های Fo21 و Fo35 جمع‌آوری شده از استان تهران (به ترتیب مناطق فیروزکوه و آبسرد) و هم‌چنین جدایه‌های Fo43 و Fo30 به‌دست آمده از استان‌های اردبیل و تهران (به ترتیب مناطق نمین و فیروزکوه) ۹۵٪ با یک‌دیگر شباهت داشتند. جدایه‌ی Fo54 جمع‌آوری شده از استان اردبیل (منطقه آقاباقر) کمتر از ۴۵٪ با سایر جدایه‌ها شباهت داشت. جدایه‌های Fo70 متعلق به استان اردبیل (منطقه نمین) و Fo60

RAPD در بین ۷۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* با استفاده از پرایمر s ۳۴ را نشان می‌دهد. نتیجه تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب دایس (Dice's coefficient) و روش UPGMA نشان داد که جدایه‌های Fo38 و Fo33 جمع‌آوری شده از استان تهران (به ترتیب مناطق اسلام آباد و فیروزکوه) با یک‌دیگر ۱۰۰٪ تشابه داشته و احتمالاً هر دو جدایه از یک دودمان ژنتیکی می‌باشند. هم‌چنین جدایه‌ی Fo12 به‌دست آمده از استان همدان (منطقه کرفس) با دو جدایه مذکور ۹۵٪ شباهت داشت. بین جدایه‌های Fo59 و Fo53 به‌دست آمده از استان تهران (منطقه اسلام آباد) و جدایه‌های Fo13 و Fo16 متعلق به استان اردبیل (منطقه آقاباقر) بیش از ۹۶٪ تشابه وجود داشت. جدایه‌ی



شکل ۱. نقوش الکتروفورز حاصل از انگشت نگاری به روش RAPD بین ۷۰ جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* با استفاده از آغازگر ۳۴ s در ژل آگارز ۱/۲ درصد (ستون اول و ستون آخر در هر کدام از تصاویر بالا مارکر استاندارد ۱ kb می باشد و بقیه ستون ها مربوط به جدایه های قارچ *F. oxysporum* می باشد).

Fig. 1. Electrophoretic patterns of DNA fingerprinting by RAPD marker among 70 isolates of *Fusarium oxysporum* using primer 34s (the first and last column in each figure is 1kb standard marker and the rest of the column related to the *F. oxysporum* isolates).

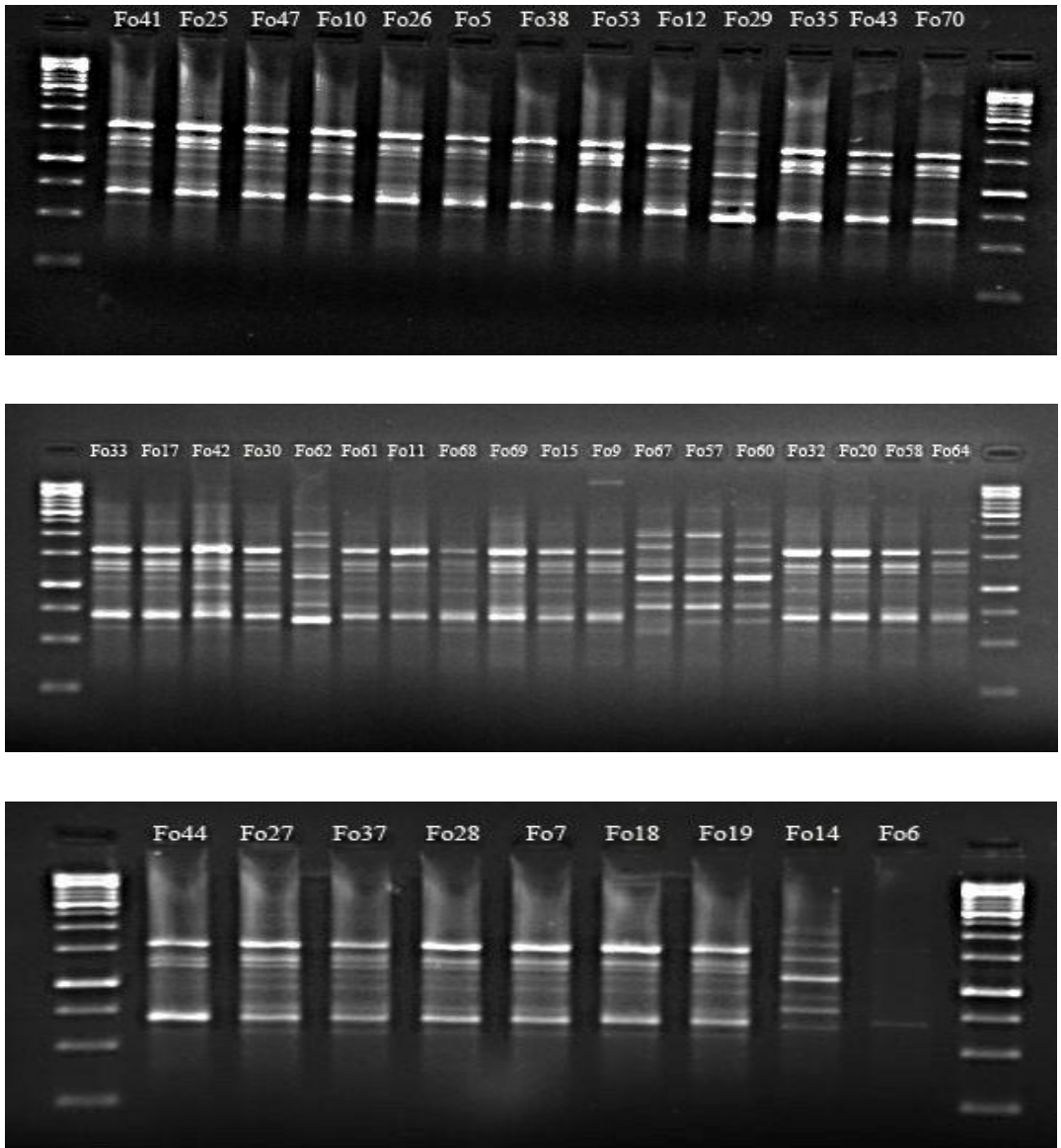
تنوع ژنتیکی آنها وجود نداشته، این دو مستقل از یکدیگر می باشند

۴- تعیین هاپلوتیپ های (فنوتیپ مولکولی) قارچ

F. oxysporum

تعداد ۱۸ گروه هاپلوتیپ مختلف در کل جمعیت نمونه های مورد بررسی شناسایی گردید (جدول ۵). این هاپلوتیپ ها براساس فراوانی آلل های مشترک به دست آمده با استفاده از ۷ آغازگر RAPD (آغازگرهای OPA-01، OPA-04، OPB-11، OPR-11، 17S، 4S و 34S) شناسایی گردیدند. هاپلوتیپ ها به طور تصادفی در میان مناطق مختلف نمونه برداری توزیع شده

به دست آمده از استان اردبیل (منطقه یونجالو) به ترتیب کمتر از ۵۵% و ۶۰% با سایر جدایه ها شباهت داشتند. نتایج حاصل از گروه بندی براساس RAPD در سطح تشابه ۷۱% (میانگین تشابه جمعیت) ۷۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* را به ۸ گروه تقسیم نمود. از میان جدایه های مورد بررسی ۵۴ جدایه در گروه ۱ قرار گرفتند که اکثریت جدایه ها را شامل بود. گروه ۳ دارای ۶ عضو و گروه ۴ و ۵ به ترتیب ۲ و ۴ عضو و بقیه گروه ها تک عضوی بودند (شکل ۲). هم چنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ارتباطی بین منشأ جغرافیایی جدایه ها با



ادامه شکل ۱. نقوش الکتروفورز حاصل از انگشت نگاری به روش RAPD بین ۷۰ جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* با استفاده از آغازگر ۳۴ s در ژل آگارز ۱/۲ درصد (ستون اول و ستون آخر در هر کدام از تصاویر بالا مارکر استاندارد ۱ kb می باشد و بقیه ستون ها مربوط به جدایه های قارچ *F. oxysporum* می باشد).

Fig. 1. (continued) Electrophoretic patterns of DNA fingerprinting by RAPD marker among 70 isolates of *Fusarium oxysporum* using primer 34s (the first and last column in each figure is 1kb standard marker and the rest of the column related to the *F. oxysporum* isolates).

دارای هاپلوتیپ مشابه بوده و در گروه هاپلوتیپی HP1 قرار گرفتند. در استان همدان نیز از بین ۲۴ جدایه مورد بررسی هشت هاپلوتیپ شناسایی گردید که ۱۵ جدایه دارای هاپلوتیپ مشابه (هاپلوتیپ HP1) بودند. این نحوه توزیع هاپلوتیپ ها

بودند. در استان تهران از بین ۲۴ جدایه مورد بررسی هشت هاپلوتیپ شناسایی گردید که ۱۳ جدایه هاپلوتیپ مشابه (هاپلوتیپ HP1) داشتند. در استان اردبیل از بین ۲۲ جدایه مورد بررسی شش هاپلوتیپ شناسایی گردید که ۱۴ جدایه

جدول ۵. گروه‌های هاپلوتیپی شناسایی شده براساس فراوانی آلل‌های مشترک با استفاده از ۷ آغازگر RAPD (آغازگرهای OPA-01، OPA-04، OPB-11، OPR-11، 17S، 4S و 34S) در قارچ *Fusarium oxysporum* جداسازی شده از سیب‌زمینی، جمع‌آوری شده از استان‌های اردبیل، همدان و تهران

Table 5. Molecular phenotypes (haplotype) of *Fusarium oxysporum* isolates collected from Ardebil, Hamedan and Tehran provinces based on random RAPD primers (OPA-01, OPA-04, OPB-11, OPR-11, 17S, 4S, 34S)

تعداد در مناطق Number in locations	تعداد در بین جمعیت Numbers within population	فنوتیپ مولکولی (هاپلوتیپ) Molecular phenotype (haplotype)	گروه هاپلوتیدی Haplotype group
7(4) ، 6(4) ، 5(6) ، 4(4) ، 3(3) ، 2(5) ، 1a(5)b ، 9(5) ، 8(6)	42	1 1 1 1 1 1 1	HP1
8(1) ، 9(2) ، 2(3)	6	1 1 2 1 1 1 1	HP2
3(1) ، 8(1)	2	2 1 2 1 1 1 1	HP3
7(۱)	1	1 1 1 2 1 1 1	HP4
9(1) ، 1(1) ، 3(1)	3	1 1 6 1 1 1 1	HP5
3(1)	۱	1 1 1 1 7 1 1	HP6
1(1)	1	1 1 1 1 1 7 1	HP7
4(1)	1	3 1 1 3 1 2 1	HP8
7(1)	1	1 1 5 1 1 1 1	HP9
7(1)	1	1 1 5 7 1 1 1	HP10
5(1)	1	1 6 6 1 1 1 1	HP11
6(1)	1	2 4 1 1 1 1 2	HP12
4(1)	1	2 2 1 7 1 2 1	HP13
3(1)	1	1 1 1 3 1 1 1	HP14
6(1)	1	2 6 5 4 1 1 1	HP15
3(1)	1	2 6 6 7 1 1 1	HP16
1(1)	1	2 1 1 4 1 1 1	HP17
7(1)	1	2 1 6 7 1 1 1	HP18

a: اعداد خارج از پرانتز مربوط به مناطق جمع‌آوری جدایه‌هاست. ۱= اسلام آباد، ۲= فیروزکوه، ۳= آبسرد، ۴= یونجالو، ۵= آق‌باقر، ۶= نمین، ۷= کبودرآهنگ، ۸= قهاوند و ۹= کرفس می‌باشد.

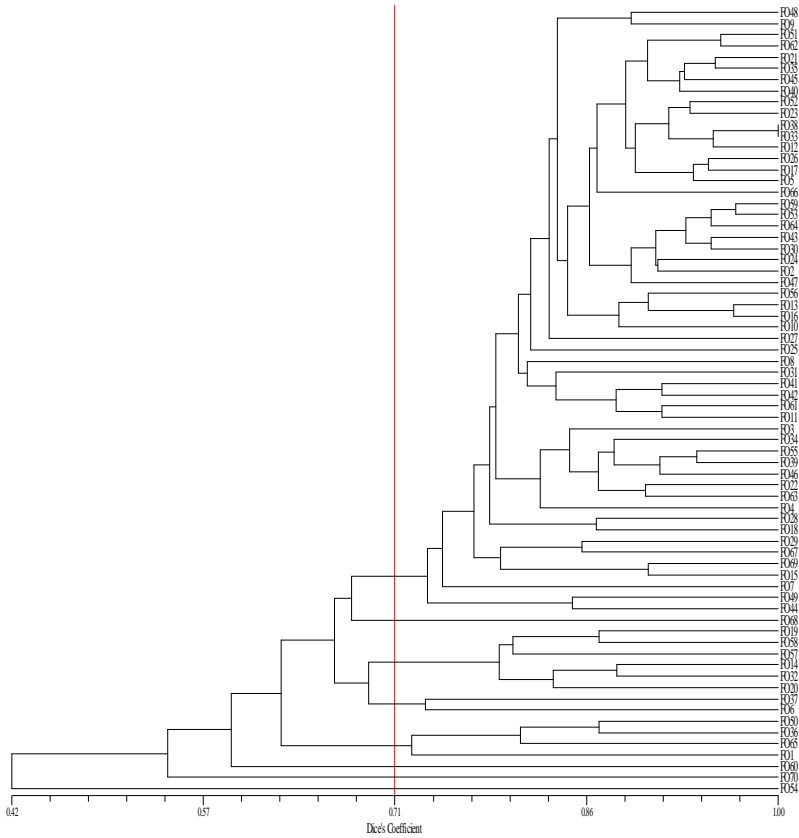
b: اعداد داخل پرانتز نشانگر فراوانی جدایه‌های مربوط به هاپلوتیپ‌های متعلق به آن منطقه می‌باشد.

a: Numbers outside of brackets indicate to the location of isolates. 1= Eslam-Abad, 2= Firuzkuh, 3= Absard, 4= Yonjaloo, 5= Aghabagher, 6= Namin, 7= Kaboodarahang, 8= Ghahavand, 9= Karafs.

b: Numbers within brackets shows the number of molecular phenotype within that location.

کبودرآهنگ، قهاوند و کرفس) پراکنده بود و هاپلوتیپ‌های HP5، HP2 به ترتیب با ۵/۱ و ۲/۴ درصد و HP3 با ۸/۲ درصد بیشترین فراوانی را داشتند. فراوانی بقیه هاپلوتیپ‌ها ۲/۱۴ درصد بود که در این گروه‌ها تنها یک جدایه قرار گرفت (جدول ۵). در ضمن از میان ۷۰ جدایه مورد بررسی ۳ جدایه

در میان مناطق مختلف نشان داد که ساختار جمعیت‌های قارچ *F. oxysporum* در مناطق مورد بررسی از تنوع زیادی برخوردار نمی‌باشند. هاپلوتیپ HP1 با داشتن ۶۰ درصد فراوانی، هاپلوتیپ غالب بود و در تمام مناطق مورد بررسی (مناطق اسلام آباد، فیروزکوه، آبسرد، یونجالو، آق‌باقر، نمین،



شکل ۲. دندروگرام تشابه ۷۰ جدایه مختلف *Fusarium oxysporum* با استفاده از برنامه UPGMA و ضریب تشابه Dice (خط عمودی نشانگر تشابه جمعیت جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* جمع‌آوری شده از استان‌های اردبیل، همدان و تهران می‌باشد).

Fig. 2. Cluster analysis of 70 isolates of *Fusarium oxysporum* using UPGMA program and Dice's coefficient (vertical line shows the similarity means of *Fusarium oxysporum* population collected from Ardebil, Hamedan and Tehran provinces).

(Gerlach & Nirenberg 1982). در حال حاضر به دلیل پیشرفت پژمردگی فوزاریومی در مناطق مهم کشت سیب‌زمینی این بیماری به یکی از مشکلات اساسی تولید سیب‌زمینی تبدیل شده است (Sharifi et al. 2006). در بین همه راه‌های کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل یکی از مطمئن‌ترین و اقتصادی‌ترین روش‌های مبارزه با بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌باشد. به منظور انتخاب ارقام مقاوم به بیماری نیاز به آگاهی در مورد ماهیت عامل بیماری، چگونگی بیماری‌زایی، شرایط محیطی مناسب برای بیماری‌زایی، تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌های قارچ عامل بیماری و احتمال وجود فرم جنسی

Fo6، Fo14، Fo57 به دلیل عدم تولید باند با بیشتر آغازگرها در گروه‌های هاپلو تپیی منظور نگردید و از گروه بندی حذف شدند.

بحث

عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای سیب‌زمینی می‌باشد. به طوری که خسارت قابل توجهی به محصولات مختلف کشاورزی وارد می‌سازد (Karimi 1970).

F. oxysporum از نظر اقتصادی و بهداشتی از مهم‌ترین گونه‌های جنس فوزاریوم بوده و پراکنش جهانی دارد

قارچ در چرخه‌ی زندگی عامل بیماری در طبیعت می‌باشد. نتایج این تحقیق بیانگر وجود تنوع در نوع بیماری‌زایی جدایه‌های *F. oxysporum* جدا شده از سیب‌زمینی می‌باشد. اهمیت تنوع در بیماری‌زایی بیمارگرها از زوایای مختلف مورد توجه بیماری‌شناسان گیاهی و متخصصین اصلاح نباتات می‌باشد. بیماری‌شناسان به دنبال بررسی علل و عوامل تأثیرگذار بر تغییر در بیماری‌زایی بیمارگرها، فراوانی ژن‌های بیماری‌زا از نظر زمانی و مکانی و مطالعه اپیدمیولوژی بیمارگرهای حامل ژن‌های مختلف بیماری‌زا هستند. از طرفی متخصصین اصلاح نباتات تنوع در بیماری‌زایی بیمارگر را به دلیل تأثیر آن بر پایداری مقاومت میزبان حائز اهمیت دانسته، شکسته شدن مقاومت ارقام را به این مسأله نسبت می‌دهند (Peever et al. 2000). تحقیقات حاضر نشان داد جدایه‌هایی که از قدرت پوساندگی بیشتری برخوردار بودند شدت پژمردگی در آنها کمتر بود هم‌چنین جدایه‌هایی که از توان پژمردگی بالایی برخوردارند قدرت پوساندگی کمتری دارند. ولی با این حال تمامی جدایه‌های بیماری‌زا هم پژمردگی و هم پوسیدگی ایجاد کردند. این امر نشانگر این مطلب می‌تواند باشد که به‌کارگیری تنها یک روش برای اثبات بیماری‌زایی بیماری‌پژمردگی کافی نبوده، صرف پوساندن بودن یک جدایه *F. oxysporum* نمی‌تواند دلیل بر عدم قدرت آن جدایه در پژمردن ساختن گیاه باشد و بالعکس. از بین جدایه‌هایی که شدت بیماری‌زایی آنها بررسی گردید جدایه‌های Fo68 و Fo5، در آزمون به‌روش غوطه ورسازی ریشه‌ها در سوسپانسیون دارای شدت بیماری‌زایی یکسان با شاهد (۰) بودند و به‌عبارت دیگر این جدایه‌ها پژمردگی آوندی تولید نمی‌کنند ولی از لحاظ پوساندگی ریشه دارای توان بالایی بودند پس می‌توان آنها را به‌عنوان عامل پوسیدگی ریشه به‌شمار آورد. نتایج تحقیقات ونترو و همکاران (Venter et al. 1992) نیز روی ۳۵ جدایه از *F. oxysporum* f. sp. *tuberosi* نشان داد که در بین پژمردگی فوزاریومی و پوسیدگی ریشه و ساقه سیب‌زمینی ممکن است

ارتباطی وجود داشته باشد. جدایه‌های عامل پژمردگی احتمالاً علائم پوسیدگی فوزاریومی انتهایی ساقه را در درون غده‌های سیب‌زمینی القاء می‌نمایند و بالعکس. از جدایه‌هایی که هم دارای قدرت زیاد پوساندن غده و هم دارای قدرت پوساندن ریشه می‌باشند، نظیر Fo13 و Fo18 می‌توان در برنامه‌های انتخاب ارقام مقاوم سیب‌زمینی استفاده نمود. بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های قارچ *F. oxysporum* با استفاده از نشانگر RAPD نشان داد که جمعیت‌های قارچ عامل بیماری در مناطق مورد بررسی در ایران از تنوع ژنتیکی پایینی برخوردارند. نلسون و همکاران (Nelson et al. 1997) تنوع ژنتیکی ۲۰۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli* جمع‌آوری شده از ۱۰ منطقه مختلف در پرو را بررسی نمودند که نتایج بیانگر وجود تنوع کم ژنتیکی در بین جدایه‌های قارچ مزبور بود.

بر اساس فراوانی آلل‌های شناسایی شده توسط نشانگر RAPD تعداد ۱۸ هاپلوتیپ در ۷۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* شناسایی شد که هاپلوتیپ HP1 بیشترین فراوانی را داشت و به‌عنوان هاپلوتیپ غالب در جمعیت تعیین گردید. با توجه به این که این هاپلوتیپ (HP1) در چند منطقه وجود داشت از این هاپلوتیپ در صورتی که دارای قدرت بیماری‌زایی بالایی باشد می‌توان در انتخاب ارقام مقاوم یا متحمل برای آن مناطق استفاده نمود که با توجه به نتایج به‌دست آمده، جدایه‌های Fo35، Fo40، Fo38، Fo33، Fo43، Fo30، Fo2، Fo47، Fo16، Fo31، Fo41، Fo42، Fo3، Fo34، Fo39، Fo46، Fo28، Fo29، Fo15، Fo14، Fo32، Fo37، Fo36، Fo1 که بیشترین شدت بیماری‌زایی را به‌خصوص از لحاظ پژمردگی داشتند در این هاپلوتیپ قرار گرفتند. چن و مک دونالد (Chen & McDonald 1996) با استفاده از RFLP بین ۶۳ جدایه قارچ *Mycosphaerella graminicola* جمع‌آوری شده از یک مزرعه در ایالت اورگون آمریکا ۶۱۷ هاپلوتیپ شناسایی کردند که نشانگر وجود تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت قارچ عامل بیماری در منطقه فوق می‌باشد. این محققین

جدایه‌های قارچ *F. o. f. sp. f. sp. cucumerinum* عامل پژمردگی خیار که دارای علائم پژمردگی بودند با استفاده از گروه‌های سازگاری رویشی (VCG) و RAPD گروه‌بندی شدند (Najafinia & Sharma 2008). آنها ۵۰ جدایه قارچ مزبور را از لحاظ VCG به ۸ گروه تقسیم‌بندی نموده و با استفاده از نشانگر RAPD این جدایه‌ها را به ۴ گروه اصلی تقسیم‌بندی نمودند. همچنین آنها نشان دادند هیچ رابطه‌ای بین گروه‌بندی RAPD و نواحی جغرافیایی جدایه‌ها وجود ندارد. با توجه به تعداد اندک گروه‌بندی به دست آمده در سطح مشابه ۷۱ درصد می‌توان گفت جدایه‌ها از یک منبع اجدادی منشأ گرفته‌اند که یکی از علل این امر می‌تواند به نقش ضعیف تولید مثل جنسی در این قارچ نسبت داد. از طرفی چون *F. oxysporum* در سیب‌زمینی بذرزاد (غده‌زاد) یا همراه بذر می‌باشد (Powelson et al. 1993) می‌توان تنوع ژنتیکی اندک را به استفاده از بذرهای بومی در سطح استان‌ها و انتقال این غده‌ها از شهری به شهر دیگر نسبت داد که این امر با نتایج سایر پژوهشگران در بعضی موارد مطابقت دارد (Katan et al. 1991, Fiely et al. 1995).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر ارتباطی بین بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی قارچ *F. oxysporum* مشاهده نگردید. تحقیقات روی سویه‌های *F. oxysporum* جدا شده از لوبیای معمولی در اسپانیا نشان داد که بین بیماری‌زایی و نشانگر RAPD ارتباطی وجود ندارد (Fernando et al. 2001). عدم ارتباط بین بیماری‌زایی جدایه‌های *F. oxysporum* و تنوع ژنتیکی آن با استفاده از نشانگر RAPD در این تحقیق و تحقیقات مشابه را می‌توان به دلیل تصادفی بودن آغازگرها نسبت داد، زیرا به دلیل انتخاب تصادفی این آغازگرها ممکن است نواحی از ژنوم قارچ تکثیر پیدا کند که ارتباطی با ژن بیماری‌زایی نداشته باشد. همچنین استفاده از تعداد محدودی آغازگر یکی دیگر از این دلایل می‌تواند باشد که امکان برقراری ارتباط بین بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌ها میسر نگردید. بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از نشانگرهایی نظیر RFLP و SCAR می‌تواند

نتیجه‌گیری نمودند که تنوع ژنتیکی زیاد در منطقه فوق احتمالاً به دلیل تولید مثل جنسی قارچ می‌باشد. در تولید مثل جنسی کراسینگ اور (Crossing over) در ایجاد تنوع ژنتیکی اهمیت زیادی دارد و با ایجاد افراد نوترکیب در یک جمعیت، تنوع ژنتیکی آن جمعیت افزایش می‌یابد. در تولید مثل پرا جنسی (Parasexual reproduction) با کاهش احتمال سازگاری رویشی بین جدایه‌ها در حالت تصادفی، تنوع در جمعیت کاهش می‌یابد. در این حالت احتمال به وجود آمدن افراد با تنوع ژنتیکی جدید بسیار کم است (Bowden & Leslie 1992). لذا می‌توان تنوع محدود ژنتیکی در بین جدایه‌های مورد آزمون را به پدیده پرا جنسیت نسبت داد. در نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *F. oxysporum* با استفاده از نشانگرهای RAPD با توجه به خط برش در سطح شباهت ۷۱ درصد ۸ گروه ژنوتیپی شناسایی شد که اغلب جدایه‌هایی که در گروه ۱ قرار گرفتند از لحاظ فنوتیپی در گروه هاپلو تیپی ۱ یا HP1 که گروه غالب از لحاظ فنوتیپی بود قرار گرفتند. اعضای گروه ۳ هر کدام در یک گروه هاپلو تیپی قرار داشتند. اعضای گروه ۵ نیز همگی جز گروه هاپلو تیپی غالب یا HP1 بودند به جز Fo50 که در گروه هاپلو تیپی HP5 قرار گرفت. گروه‌های دیگر نیز اغلب تک‌عضوی بودند که هر کدام در یک گروه هاپلو تیپی قرار می‌گرفتند. بنابراین می‌توان گفت که گروه‌بندی براساس RAPD با گروه‌بندی هاپلو تیپی یا فنوتیپی جدایه‌ها تا حد زیادی هم‌خوانی داشته و تا حدودی می‌تواند جدایه‌ها را از یکدیگر متمایز نماید.

جدایه‌های *F. oxysporum* جمع‌آوری شده از یک منطقه اغلب الگوی باندهای RAPD متفاوتی داشتند. بنابراین در بین منطقه جغرافیایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌ها ارتباطی مشاهده نگردید. کیم و همکاران (Kim et al. 1993) و کسلر و همکاران (Kistler et al. 1987) تنوع ژنتیکی *F. oxysporum* را با استفاده از نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند نتایج این تحقیق نشان داد که ارتباطی بین چند شکلی و منطقه جغرافیایی در قارچ *F. oxysporum* وجود ندارد.

جنس به وجود آورند.

منابع

در بررسی تکمیلی تنوع ژنتیکی این قارچ و گروه‌بندی دقیق‌تر آن مؤثر باشند. در ضمن با توجه به قدمت طولانی کشت سیب‌زمینی در استان‌های مورد بررسی در این تحقیق تکامل هم‌زمان میزبان - بیمارگر (Host-pathogen coevolution) ممکن است تنوع ژنتیکی نسبی را در قارچ‌های آلوده کننده این

جهت ملاحظه به صفحات (3-5) متن انگلیسی مراجعه شود.