جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه های قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* در استان خراسان رضوی با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP

حجت اله ربانی نسب[۱،*]، سعید سروری[۲] و غلامرضا بخشی خانیکی[۳]

۱ بجنورد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان شمالی

۲ تربت جام، مدیریت جهاد کشاورزی

۳ کرج، دانشگاه پیام نور واحد کرج

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۹

چکیده

بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* متداول ترین و گسترده ترین بیماری در خربزه است که در چند کشور جهان و ازجمله ایران گزارش شده است. این تحقیق به منظور تعیین تنوع ژنتیکی بیمارگر در استان خراسان رضوی انجام گردید. برای این تحقیق از ۵۲ مزرعه در مناطق عمده خربزه کاری استان نمونه برداری شده، پس از خالص سازی و شناسایی قارچ، آزمون مولکولی انجام شد. از مجموعه جدایه های شناسایی شده، بر اساس پراکنش جغرافیایی و شدت بیماریزایی ۳۵ جدایه برای تحقیقات مولکولی انتخاب شدند. پس از استخراج DNA بررسی تنوع ژنتیکی این جدایه ها با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP، روی ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید ٦/٥ درصد و با کمک نرم‌افزار NTSYS صورت پذیرفت. بر اساس نتایج به دست آمده در سطح ضریب شباهت ٦٣ درصد جدایه های بررسی شده در ٦ گروه اصلی A، B، C ، D، E و F و دوگروه تک جدایه ای جای گرفتند. این نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جدایه‌های قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه در استان خراسان رضوی وجود دارد. از طرف دیگر با توجه به آنالیز کلاستر و دندروگرام ترسیم شده چنین نتیجه گیری شد که به جز موارد محدود بین پراکنش جغرافیایی و گروههای ژنتیکی AFLP ارتباط مشخصی وجود نداشته و همچنین بین گروههای بیماریزایی و منطقه جداسازی قارچ از گیاه با گروههای AFLP ارتباط معینی موجود نبود.

واژه های کلیدی: خراسان رضوی، خربزه، نشانگر AFLP ، *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۵۷۵۰۷۹ ، پست الکترونیکی : hrabbaniwsr@yahoo.com

مقدمه

خربزه با نام علمی (*Cucumis melo*) یکی از مهم ترین محصولات جالیزی ایران است. از ۳۵۲۰۰۰ هکتار سطح زیر کشت این محصولات ۲۵/۱۳ درصد آن به کشت خربزه اختصاص دارد. استان خراسان رضوی با بیش از ٤٥ هزار هکتار سطح زیر کشت از مهم ترین مناطق کشت این محصول در کشور به شمار می رود (۲). از مهم ترین مناطق کشت خربزه در استان خراسان رضوی می توان به شهرستانهای تربت جام ، تربت حیدریه، خواف ، تایباد، سرخس، قوچان، نیشابور و مشهد اشاره نمود. یکی از بیماریهای مهم خربزه در تمامی مراحل رشد گیاه بوته میری بوده که عامل آن قارچ *F. oxysporum* f.sp. *melonis* است (۱). این قارچ به میزان چشمگیری باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول در ایران و در استان خراسان رضوی می‌گردد (٤). برای شناسایی بهتر بیماری و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مدیریت آن لازم است که تنوع ژنتیکی آن بررسی شود. با توجه به اینکه خربزه از زمانهای بسیار قدیم در این منطقه کشت شده و از طرفی سطح وسیعی زیر کشت این محصول است به نظر می رسد تنوع قابل ملاحظه ای در این منطقه وجود داشته باشد(٤). باتوجه به اینکه قارچ عامل بیماری دارای قابلیت تغییر پذیری در جمعیت خود است، لذا امکان اینکه با ظهور نژادهای جدید بیمارگر، کارآئی ارقام مقاوم از بین برود، وجود دارد (۱۹). تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت بیمارگر در جهت شناسایی گروههای مختلف بیماریزا که از نظر ایجاد علائم متفاوت می باشند، مؤثر است. از جمله روشها برای دستیابی به این هدف می توان به روشهای مولکولی RAPD ، RLFP، AFLP ، SSR اشاره نمود. در هر یک از این روشها با استفاده از نشانگرهای مولکولی مخصوص می توان به تنوع جمعیت این قارچ پی برد (۸). AFLP یک نشانگر بسیار قدرتمند برای بررسی توالیهای پلی مورفیک DNA در قارچها می-باشد. این نشانگر غالب بوده و معمولاً در هر جایگاه ژنی فقط دو آلل را نشان می‌دهد. نشانگر فوق نسبت به سایر تکنیکهای مشابه ابتدایی مثل RAPD مزیتهایی دارد، از جمله اینکه لوکوسهای بیشتری در هر واکنش بررسی می شوند و آغازگرهائی که در AFLP استفاده می‌شوند نتایج را تکرار پذیر می‌سازند. اشکال عمده تکنیک AFLP نسبت به تکنیکهای دیگر پیچیده بودن آن است (۵). یکی از عوامل مهم ایجاد کننده تنوع ژنتیکی در *F.oxysporum* ترانسپوزونها هستند. از انواع ترانسپوزونها در *F. oxysporum* می توان به fot1 و Impala اشاره نمود که به شکل گسترده ای در فرمهای اختصاصی *F. oxysporum* پراکنده اند (١٤و ١٧). از سایر عوامل مؤثر در ایجاد تنوع، پلاسمیدهای میتوکندریایی و ذرات شبه ویروسی ایزومتریک (VLPs) می باشند که در برخی از جدایه های *F. oxysporum* کشف شده اند (۱۵). با شناسایی گروههای جمعیتی بیمارگر می توان به شناسایی ارقام مقاوم در هر منطقه مبادرت نمود و این خود مستلزم انجام آزمونهای بیماریزایی و بررسی عکس العمل در برابر بیمارگر است (۱۰). احتمالاً رابطه خاصی بین نژادها و منشأ جغرافیایی آنها وجود دارد (۱۱). پراکنش یک نژاد در یک منطقه خاص برای کشت خربزه یک مشکل جدی به شمار می‌رود (۱۳). در بیماری شناسی گیاهی برای دستیابی به بهترین روش مدیریت بیماری، شناسایی فاکتورهایی که مهم ترین نقش را در تکامل بیمارگر دارند و اینکه چگونه این نیروهای تکاملی بر هم اثر متقابل دارند تا ترکیب ژنتیکی و پتانسیل تکاملی جمعیتهای بیمارگر را رقم بزنند مهم بوده، بنابراین شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیت بیمارگرها اهمیت زیادی دارد. هدف از این تحقیق شناسایی تنوع ژنتیکی موجود در بین جدایه‌های *F. oxysporum* f.sp *melonis* در استان خراسان رضوی است تا به استناد این یافته‌ها بتوان در جهت مدیریت بهتر بیماری اقدام نمود.

مواد و روشها

نمونه برداری و شناسایی: نمونه برداری از اوایل خرداد ماه سال زراعی ۸۷ شروع و تا پایان شهریور ماه سال ۸۸ از مناطق مهم خربزه کاری در استان خراسان رضوی ادامه داشت. این مناطق شامل شهرستانهای تربت جام، سرخس، خواف، تایباد، تربت حیدریه، کاشمر، فریمان، نیشابور، چناران، قوچان و مشهد بودند. بوته های آلوده به شکل تصادفی و با حرکت در قطرهای مزرعه و بر اساس علائم بیماری شامل مرگ گیاهچه، زردی و پژمردگی بوته و یا خروج صمغ قهوه ای از زخمهای نکروتیک، جمع آوری شدند. نمونه ها در پاکتهای کاغذی گذاشته و سپس مشخصات مربوطه ثبت و به آزمایشگاه منتقل گردید. برای جداسازی قارچ فوزاریوم عامل پژمردگی آوندی خربزه، کشت نمونه از ناحیه ساقه، ۱۲-۱۰ سانتیمتری بالای طوقه گیاه آلوده و بافت آوندی و نیز ریشه آلوده صورت گرفت. قطعات آماده شده پس از ضدعفونی و شستشو در محیط کشت PDA کشت شده و در انکوباتور نگهداری شدند.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

پس از خالص سازی قارچ به روش تک اسپور، شناسایی آن در سطح گونه با کمک کلید بوث صورت پذیرفت (۹). آزمون اثبات بیماریزایی جدایه های *F. oxysporum* در گلخانه و روی گیاهان خربزه انجام گرفت.

براساس جدول ۱ جدایه ها بر اساس شدت بیماریزایی گروه بندی شدند(۱۹). در این بررسی برای اثبات فرم اختصاصی *F. oxysporum* f.sp. *melonis* از خیاررقم Super dimenous، هنداونه رقم Crimpson sweet، خربزه رقم khatooni ، نخود رقم جم و یک علف هرز رایج در مزارع خربزه به نام خرفه (Portulaca oleracea) استفاده شد. کلیه ارقام در شرایط گلخانه و در مرحله گیاهچه ای با سوسپانسیون اسپور ۱۵ جدایه بیماریزای *F.oxysporum* به دست آمده، به طور جداگانه و طبق روش ذکر شده در آزمون بیماریزایی مایه زنی شدند.

جدول ۱- گروهبندی جدایه ها بر اساس شدت بیماریزایی روی گیاه خربزه

گروه	علایم بیماری
۱	بدون علایم بیماری
۲	زردی و پژمردگی کوتیلودون و برگهای اولیه گیاه
۳	زردی و پژمردگی در دو برگ اولیه گیاه
٤	زردی و پژمردگی در سه و یا تعداد بیشتر برگها
٥	مرگ گیاهچه

تعیین نژاد طبق روش شفق و همکاران (۲۰) انجام شد. ارقام افتراقی (جدول ۲) استفاده شده در این تحقیق رقم حساس عمومی Charentaise fom-1, charentaise T و Margot fom-2 وIsabelle بودند. کلیه آزمایشات بر اساس جدول استاندارد شماره ۲ انجام گرفت (۲۰).

آزمون AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): استخراج DNA بر اساس روش شفق و همکاران (۲۰) و مبتنی بر روش CTAB انجام شد. جهت بررسی وجود یا عدم وجود DNA و تعیین کیفیت DNA استخراجی، الکتروفورز نمونه ها در ژل آگاروز ۱ درصد ساخت شرکت Biolabs انجام گرفت. در این حالت حضور تک باندهای شفاف با وزن مولکولی بالا و فاقد آلودگی، نشانگر DNA سالم و تجزیه نشده می باشد. هضم DNA با روش لوریس و همکاران (۱٦) با اندکی تغییر انجام گردید. هضم DNA در واکنش حجمی معادل ٤۰ میکرولیتر انجام شد. برای این واکنش از آنزیمهای برشی *Eco*RI و *Mse*I ساخت شرکت Biolabs استفاده گردید. توالیهای دو رشته‌ای آداپترها که متناظر با سایتهای برشی *Eco*RI و *Mse*I هستند به محلول قطعات برشی اضافه گردید. در این محلول آداپترها به انتهای چسبنده قطعات برشی حاصل از واکنش هضم جوش می‌خورند. حجم نهایی واکنش ۱۰ میکرولیتر است. محلول واکنش جوش با حجم ۱۰ میکرولیتر به محلول حاوی قطعات برشی با حجم ٤۰ میکرولیتر اضافه شد، به طوری که حجم کل محلول به ٥۰ میکرولیتر رسید. محلول نهایی به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر نگهداری شد. پس از طی این زمان محصولات واکنش جوش توسط بافر (Tris HCl 10 Mmol, EDTA 0.1 Mmol) TE سه بار رقیق شدند. این محلول در ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

واکنش PCR اولیه به کمک آغازگر های *Eco*RI+0 (5´GACTGCGTACCAATTC3´) و *Mse*I+0 (5´GATGAGTCCTGAGTAA3´) صورت پذیرفت. برای بررسی محصولات PCR، الکتروفورز با ژل آگاروز ۱ درصد انجام شد. وجود حالت Smear با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰۰ جفت باز نشان دهنده تکثیر قطعات و مثبت بودن PCR بود. در صورت وجود Smear جدایه‌ها برای مرحله بعد استفاده شدند. واکنش PCR انتخابی با استفاده از چهار آغازگر *Eco*RI+2 به نامهای *Eco*RI+GC (5´GACTGCGTACCAATTCGC3´) ، *Eco*RI+GT (5´GACTGCGTACCAATTCGT3´) ، *Eco*RI+AG (5´GACTGCGTACCAATTCAG3´) و *Eco*RI+GG (5´GACTGCGTACCAATTCGG3´) و چهار آغازگر یکسان *Mse*I+1 به نامهای *Mse*I+C

(5′GATGAGTCCTGAGTAAC3′) استفاده شد. چهار ترکیب پرایمری A، B، C و D به ترتیب *Eco*RI+GC– *Eco*RI+AG-*Mse*I+C ، *Mse*I+C–*Eco*RI+GT ،*Mse*I+C و *Eco*RI+G- *Mse*I+C در این تحقیق استفاده گردید. محصولات واکنش PCR روی ژل آگاروز یک درصد مورد بررسی قرار گرفتند. محصولاتی که در حد فاصل بین ۱۰۰bp و ۱۰۰۰bp باند داده بودند، برای بررسی روی ژل واسرشته کننده پلی اکریل آمید ٦/٥ درصد انتخاب شدند. مدت زمان الکتروفورز برای تمام نمونه ها دو ساعت با ولتاژ ۱۸۰۰، شدت جریان ۲۰۰ میلی آمپر و ۷۵ وات بود. رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید با نیترات نقره طبق قرارداد Promega با تغییراتی انجام شد. پس از ظهور ژل باندهای واضح و تکرار پذیر در وزن مولکولی حدفاصل ۱۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز به عنوان نشانگر در نظر گرفته شدند. برای باندهای هم ردیف وزن مولکولی عدد یک و عدم وجود آن عدد صفر اختصاص داده شد و در محیط نرم افزاری Excel ثبت گردید. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار NTSYS 2.11 و به روش UPGMA و بر اساس ضریب SM انجام گرفت.

جدول ۲- ارقام افتراقی و ژنهای مقاومت در آنها

نام رقم	ژن مقاومت	نژاد صفر	نژاد۱	نژاد۲	نژاد۲و۱
Charentais T	-	حساس	حساس	حساس	حساس
Charentais Fom1	مقاوم	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس
Charentais Fom2	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
Margot	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس
Isbelle	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی جدایه ها: شناسایی جدایه ها بر اساس کلید بوث (۹) انجام شد. در این تحقیق علاوه بر گونه *F .oxysporum* f.sp. *melonis* ، گونه های *F. solani*، *F. equeseti* و *F. compactum* شناسایی شد که با نتایج شفق و همکاران (۲۰) از حیث گونه ها مطابقت داشته ولی از لحاظ نسبت فراوانی متفاوت بود. جدایه هایی که قدرت بیماریزایی داشتند مورد شناسایی قرار گرفتند. بر اساس جدول استاندارد گروههای بیماریزایی، جدایه ها در گروههای مطابق جدول ۳ قرار گرفتند. اکثر جدایه ها در گروه سه قرار گرفتند. دوره آزمایش بیماریزایی حداکثر ۲۵ روز بود. غالباً اولین علائم بیماری ٤ تا ٦ روز پس از مایه زنی مشاهده گردید.گیاهچه های آلوده از روز دهم تا پانزدهم از بین رفتند. این جدایه ها در گروه ٥ قرار گرفتند. گیاهان شاهد هیچ گونه علائمی نشان ندادند.

جدول ۳- گروه بیماریزایی جدایه ها

گروه بیماری زایی	*نام جدایه*
۱	deleted
۲	T1/J1/J2/GH1/KH1/KH2/TH1/TH3
۳	M3/T3/T4/T5/J5/J6/N2/N3/N4/S1/S2/S3/TH2/TH4
٤	M4/T6/GH2/GH3/GH4/KH3/KH4
٥	M1/M2/T2/J3/J4/N1

در آزمون تعیین فرم اختصاصی جدایه هایی که علائم مرگ گیاهچه و پژمردگی آوندی در گیاه خربزه ایجاد نمودند و در سایر گونه های گیاهی مذکور علائمی ایجاد نکردند به عنوان *F.oxysporum* F.sp *melonis* شناسایی و بر اساس فاکتورهای دیگر انتخابی برای آزمایشهای مولکولی

انتخاب شدند. کلیه نژادها فقط قادر به شکستن مقاومت Fom-1 بودند بنابراین به عنوان نژاد شماره یک شناسایی شدند. شفق و همکاران (۲۰) نیز در تحقیقی که قبلا با ۲۰ جدایه FOM انجام دادند تمام جدایه ها را نژاد یک تشخیص دادند.

انتخاب جدایه ها برای آزمون مولکولی: در انتخاب جدایه ها، تلاش شد تا جدایه ها توزیع جغرافیایی مناسب داشته باشند. گروههای بیماریزایی، محل جداسازی قارچ از گیاه بیمار، فرم اختصاصی و سرعت رشد در تشتک پتری و همچنین نوع رنگ پرگنه در انتخاب اولیه جدایه ها برای آزمایش مولکولی نقش داشته اند. بر این اساس ۳۵ جدایه به شرح جدول ٤ برای آزمون AFLP انتخاب شد.

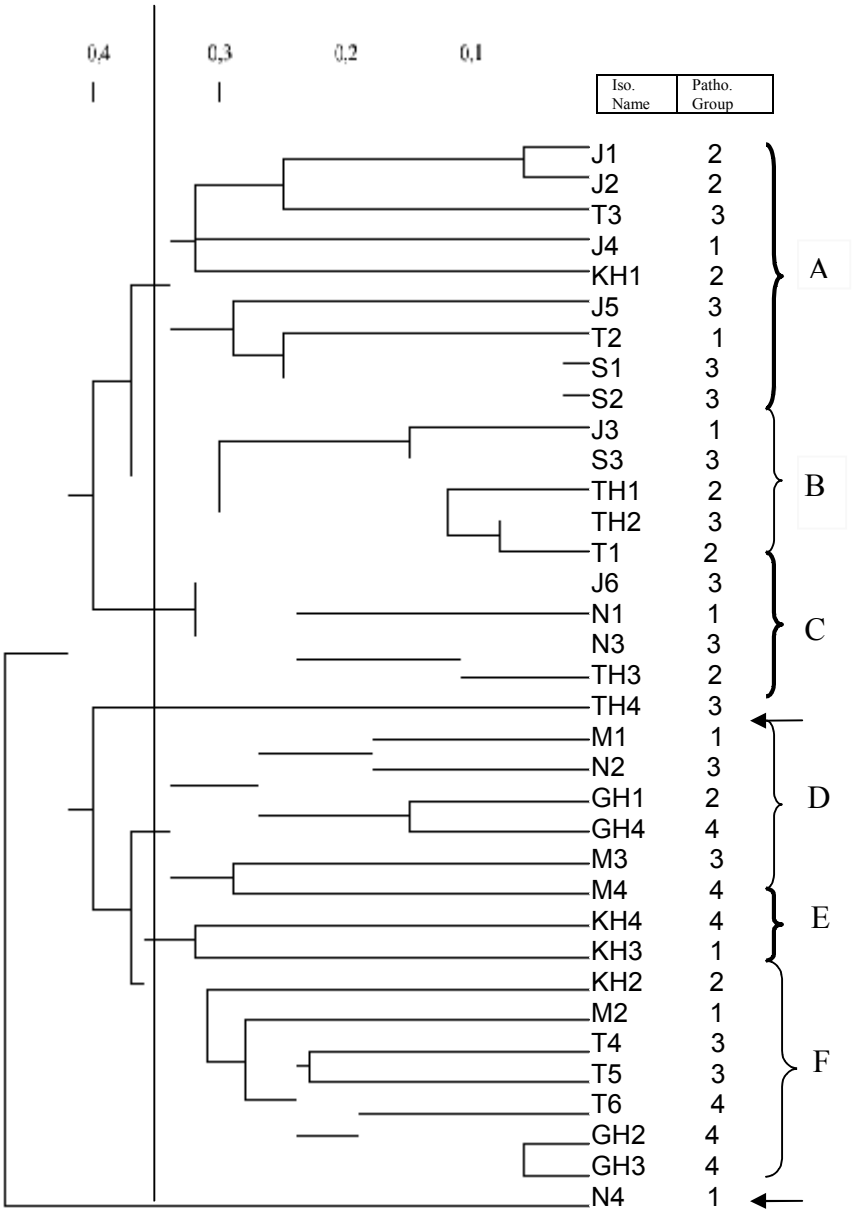
جدول ٤- مشخصات جدایه های انتخابی برای آزمون AFLP

شهرستان محل نمونه برداری	تعداد کل نمونه بررسی شده	نقطه نمونه برداری و نام جدایه های انتخابی برای آزمون AFLP و محل جداسازی قارچ					
مشهد	۲۰	مشهد	جیم آباد	چشمه گیلاس	گلمکان		
		ساقه/ M1	ساقه/M2	طوقه/M3	ساقه/M4		
تربت جام	۳۵	تربت جام	رونج	قلعه شیر	احمد آباد	خیرآباد	نصرآباد
		ساقه/J1	ساقه/J2	طوقه/J3	طوقه/J4	ساقه/J5	طوقه/J6
تایباد	۳۰	تایباد۱	مشهد ریزه	باخرز	قلعه نو	احمد آباد	تایباد۲
		ساقه/T1	ساقه/T2	طوقه/T3	طوقه/T4	طوقه/ T5	ساقه/T6
نیشابور	۲۲	نیشابور	فیروزه	قلعه یزدان	عشق آباد		
		ساقه/N1	طوقه/N2	ساقه/N3	طوقه/N4		
قوچان	۱۵	آلماجق	شیرین دره	علی‌آباد	شهرکهنه		
		طوقه/GH1	ساقه/GH2	طوقه/GH3	طوقه/GH4		
خواف	۲۷	زوزن	خواف	سنگان	بالاخواف		
		طوقه/KH1	ساقه/KH2	ساقه/KH3	طوقه/KH4		
سرخس	۱٦	قلعه سرخ	علی آباد	سرخس			
		ساقه/S1	طوقه/S2	طوقه/S3			
تربت حیدریه	۱۹	تربت حیدریه	چخماق	محمد آباد	رباط سفید		
		ساقه/TH1	ساقه/TH2	طوقه/TH3	طوقه/TH4		

تعیین نژاد: کلیه نژادها فقط قادر به شکستن مقاومت Fom-1 بودند بنابراین به عنوان نژاد شماره یک شناسایی شدند. شفق و همکاران (۲۰) نیز در تحقیقی که قبلا با ۲۰ جدایه FOM انجام دادند تمام جدایه ها را نژاد یک تشخیص دادند.

آزمون **AFLP** : پس از یادداشت برداری باندهای پلی مورفیک حد فاصل وزن مولکولی ۱۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز مجموعاً ٤٥ نشانگر پلی مورفیک برای ۳۵ جدایه مورد آزمایش ردیابی شد. به طور متوسط، به ازای هر ترکیب آغازگر ٦۳ باند شناسایی شد. این در حالی است که به طور میانگین ۱۷/۸ درصد آنها پلی مورفیک بودند. ترکیب

آغازگر *Eco*RI+GT- *Mse*I+C با ۱٤ نشانگر پلی مورفیک و ترکیب آغازگر *Eco*RI+GG-*Mse*I+AC با ۹ نشانگر پلی مورفیک به ترتیب بیشترین وکمترین تعداد نشانگر را داشتند. با استفاده از نتایج تحقیق دندروگرام شکل ۱ ترسیم شد. بر اساس نتایج به دست آمده در سطح ضریب شباهت ٦۳ درصد کل جدایه ها در ٦ گروه اصلی A، B، C ، D، E و F و دو گروه تک جدایه ای جای گرفتند.



شکل ۱- دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی ۳۵ جدایه از *F.oxysporum* f.sp. *melonis* جمع‌آوری شده از روی خربزه در استان خراسان رضوی بر اساس نشانگر AFLP و با استفاده از روش UPGMA

این نتایج نشان می دهد که تنوع ژنتیکی قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه در استان خراسان رضوی بالاست. بزرگترین گروه AFLP گروه A است که شامل نه جدایه است. چهار جدایه مربوط به تربت جام و سه

جدایه مربوط به تایباد و خواف است. فاصله نزدیک جغرافیایی این مناطق می تواند نزدیکی ژنتیکی این جدایه ها را به یکدیگر توجیه نماید هر چند وجود دو جدایه از سرخس در این گروه که فاصله جغرافیایی بیشتری با این منطقه دارد بیانگر این واقعیت است که ممکن است بین مناطق جغرافیایی و گروههای AFLP ارتباط خاصی وجود نداشته باشد. از طرف دیگر وجود گروههای بیماریزایی متفاوت در هر یک از گروههای AFLP و همچنین محل جداسازی قارچ برای هر جدایه مؤید این است که ارتباط محسوسی بین گروههای بیماریزایی، محل جداسازی جدایه از بوته با گروههای AFLP وجود ندارد. گروه B دارای پنج عضو بوده و یک گروه کاملاً نامتجانس است. گروه C دارای ٤ عضو بوده و دو جدایه از نیشابور در این گروه AFLP جای گرفته اند. گروه D شش جدایه را شامل می شود که همگی در یک منطقه جغرافیایی با مرز مشترک قرار گرفته اند (مشهد ، نیشابور و قوچان). گروه E فقط شامل دو جدایه از شهرستان خواف است. یکی از جدایه ها از منطقه ساقه و دیگری از منطقه طوقه جداسازی شده است. گروه F دومین گروه بزرگ با هفت عضو است. این گروه نیز بسیار نا متجانس است. در این گروه جدایه هایی از تایباد و قوچان در کنار یکدیگر قرار گرفته اند. در مجموع این دندروگرام نشان می دهد که اولا تنوع ژنتیکی FOM در استان خراسان رضوی نسبتاً زیاد است. ثانیاً به جز موارد محدود بین پراکنش جغرافیایی و گروههای ژنتیکی AFLP ارتباط مشخصی وجود ندارد. از طرف دیگر بین گروههای بیماریزایی و منطقه جداسازی قارچ از گیاه با گروههای AFLP نیز ارتباط مشخصی پیدا نشد.

شفق و همکاران (۲۰) در تحقیق مشابهی، تنوع ژنتیکی *F. oxysporum* f.sp. *melonis* را با استفاده از مارکر مشابهی با استفاده از ۱۵ جدایه در دو استان خراسان رضوی و شمالی بررسی نمودند. آنالیز کلاستر با نرم افزار Popgene و با در نظر گرفتن ضریب تشابه ٦۰ درصد هفت گروه ژنتیکی شناسایی شد. در تحقیق فوق با وجود کم بودن تعداد جدایه ها تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای به دست آمد. همچنین بین مناطق جغرافیایی و گروههای ژنوتیپی ارتباطی وجود نداشت. ضمن اینکه بین شدت بیماریزایی و محل جداسازی قارچ با گروههای ژنوتیپی نیز ارتباطی مشاهده نشد که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. در بسیاری از آزمایشات دیگر نیز نتایج مطالعات در یک منطقه با یکدیگر مشابهتهایی داشته اند. بلالی و همکاران (۳) در مطالعه تنوع ژنتیکی گروه AG I-IA قارچ Rhizoctonia solani جدا شده از گیاه برنج با استفاده از مارکر پکتیک زایموگرام به این نکته اشاره نمودند که چون جدایه های موجود در این تحقیق شامل بخشی از جدایه های شمال کشور بوده است نتایج آنها با هم همخوانی دارد. بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه در تمام مناطق مهم خربزه کاری استان خراسان رضوی وجود دارد. پراکندگی وسیع این بیمارگر در مناطق جغرافیایی مختلف می تواند دلالت بر تنوع ساختار ژنتیکی آن داشته باشد. این تنوع را می توان دلیلی بر سازگاری بالای قارچ در شرایط اقلیمی مختلف نیز دانست. زیرا در تمامی مراحل رشد گیاه و مخصوصاً در مرحله گیاهچه ای و مرحله رسیدن میوه ، بیمارگر از گیاهان آلوده قابل جمع آوری و جداسازی بود و این در حالی است که تفاوت دمایی در این دو مرحله رشدی در مناطق مورد بررسی، بالا و در حدود ۱۲ درجه سلسیوس بود. تفاوت در علائم ایجاد شده توسط برخی جدایه ها در رقم حساس عمومی و خربزه رقم خاتونی که رقم متداول منطقه است، لزوم بررسیهای بیشتر در زمینه ساختار ژنتیکی خربزه بومی رقم خاتونی را تأیید می کند. تجزیه و تحلیل کلاستر بیانگر وجود ٦ گروه ژنتیکی بود و با توجه به اینکه تمام جدایه های بیماریزا (۳۵ جدایه) فقط دریک نژاد قرار گرفتند، این مطلب نشان دهنده این حقیقت است که نژاد مذکور از سطح تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است. قرار گرفتن جدایه های یک منطقه جغرافیایی در دو گروه مستقل ژنتیکی و همچنین قرار گیری دو جدایه از دو منطقه متفاوت در یک گروه، نشانگر

این مطلب است که عامل منطقه جغرافیایی با وجود مفید بودن در گروه بندی جدایه ها نمی تواند به عنوان فاکتوری کامل و مستقل در این زمینه مورد استفاده قرار بگیرد، زیرا تحت تأثیر فشار انتخابی میزبان و جهشهای ژنتیکی است . بنابراین به نظر می رسد که اگر ابتدا مناطق مختلف بر اساس عواملی چون شرایط اقلیمی و یا تاریخ کاشت گروه بندی شوند، ارتباط بهتری بین منشأ و گروه ژنوتیپی جدایه ها مشاهده می شود. جمع بندی نتایج فوق نشان می دهد که ارتباط خاصی بین درجه بیماریزایی و شدت علائم با گروه بندی ژنوتیپی وجود ندارد. همچنین جدایه های دارای تیپ رشدی و ویژگیهای مورفولوژیکی و میکروسکوپی یکسان در گروههای مختلف قرار گرفته اند. این امر بیانگر این مطلب است که شکل شناسی به تنهایی شاخصی مطمئن برای تمیز دادن بین جدایه های مختلف نمی باشد(۷). بررسی مولکولی تنوع بالایی را در ساختار *F.oxysporum* f.sp. *melonis* نشان می دهد. عوامل مؤثر در این زمینه عبارتند از : جهشهای ژنتیکی و شبه تولید مثل جنسی. به نظر می رسد که نبود فشارهای میزبان مقاوم نیز در عدم کنترل تنوع در جمعیت بیمارگر نقش داشته باشد. این مسئله در کشورهایی مثل ایران که از ارقام مقاوم به طور گسترده ای استقبال نشده، مشهود است. این در حالی است که در کشورهای دیگر مثل آمریکا و کانادا به دلیل اصلاح ، معرفی و کشت ارقام مقاوم به طور مستمر تنوع این بیمارگر تا حد زیادی کنترل شده است. اصلاح ژنتیکی خربزه برای مقاومت به پژمردگی فوزاریومی با استفاده از تکنولوژی نشانگرهای مولکولی برای افزایش کارآیی انتخاب مفید است (١٤). ارزیابی تنوع مولکولی بر اساس شاخصهای DNA نشان می دهد که *F.oxysporum* f.sp. *melonis* گونه ای هتروژنوس بوده و تنوع زیادی در آن مشاهده می شود (۸). تکنیک RAPD می تواند روشی مناسب برای تعیین تنوع ژنتیکی در جمعیت *F.oxysporum* f.sp. *melonis* باشد، اما نشانگرهایی مانند AFLP ضمن اینکه تنوع واقعی‌تری را نشان می‌دهند نتایج را نیز تکرارپذیر می‌سازند. لذا به نظر می رسد نشانگرهای DNA از جمله AFLP می توانند چشم انداز نوینی را برای ارزیابی ارتباطات ژنتیکی در قارچها فراهم سازند. با این وجود می توان گفت که اگر چه نشانگرهای مولکولی ابزاری مفید برای اهداف تاکسونومیکی می باشند ، اما کاربرد آنها در کشاورزی زمانی مفیدتر است که با دیگرشاخصهای بیولوژیکی مثل آزمون بیماریزایی و یا ژنتیکی مثل VCG همراه باشد (۱۸). همچنین شناسایی تنوع ژنتیکی میزبان می تواند در کاربردی نمودن مطالعات تنوع ژنتیکی بیمارگر مؤثر باشد. تنوع ژنتیکی میزبان از جمله نمونه های بومی و خویشاوندان وحشی آنها می توانند منابع ژنتیکی مناسبی هم جهت حفاظت و نگهداری ژرم پلاسم و هم برنامه های اصلاحی باشند (٦). در حال حاضر تلاشهایی در جهت معرفی نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن مقاومت fom-1 و fom-2 در حال انجام است که به نظر می رسد تحقیقات آینده به معرفی این نشانگرها در شناسایی ژنهای مقاومت به نژاد ۲،۱ و با استفاده از لاینهای دبل هاپلویید منجر شود (۱۲).

منابع

۱. اگریوس، جرج ن.۱۳۷۰ . بیماریهای گیاهی . (ترجمه مهرآوران ، ح و مظفر، ا) . انتشارات دانشکده کشاورزی و دامپروری ارومیه ، ٦۱۲ صفحه

۲. آمارنامه کشاورزی ایران. ۱۳۸۵. وزارت جهاد کشاورزی جمهوری اسلامی ایران.

۳. بلالی غ. رحیمیان م. و کوثری م. در مطالعه تنوع ژنتیکی گروه AG I-IA قارچ *Rhizoctonia solani* جدا شده از گیاه برنج با استفاده از مارکر پکتیک زایموگرام. مجله زیست شناسی ایران. ۱۳۸۷. جلد ۲۱، شماره ۱ (ویژه نامه میکروبیولوژی). صفحه ۱۷-۲۳.

٤. جهانبخش و. ۱۳۷٦ . بررسی پوسیدگی طوقه و ریشه خربزه (بوته میری) در استان خراسان. پایان نامه کارشناسی ارشد . دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد.

٥. ربانی نسب ح. اخوت م. ترابی م. حجارود ق.شریفی تهرانی ع. مظفری ج. و عباسی م. ۱۳۸۷ . مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت های *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* در ایران با استفاده از نشانگر AFLP. مجله بیماریهای گیاهی. شماره ۱. جلد ٤.

٦. رشیدی منفرد س. نقوی م. حسین زاده ع. و مردی م. ۱۳۸۷. بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی زیرواحدهای سنگین گلوتنین ژنوتیپهای بومی و ارقام زراعی گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای پروتئینی. مجله زیست شناسی ایران. ۱۳۸۷. جلد ۲۱، شماره ۳- صفحه ۳۹۳- ۳۹۹

۷. صارمی ح.۱۳۷۷. اکولوژی و تاکسونومی گونه های فوزاریوم ، جهاد دانشگاهی مشهد ، ۱۳۱ صفحه .

8. Belabid, L., Baum, M., Fortas, B. Z. and Eujayl, I. 2004. Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. African Journal of Biotechnology 3:25-31.

9. Booth, C. 1971. The genus *Fusarium* . CAB Publication .237p.

10. Burger, Y., Katzir, N., Tzuri, G., Portnoy, V., Saar, U., Shrider, S., Perl – Treves, R. and Cohen, R. 2003 . Variation in the response of melon genotypes to *Fusarium oxysorum* f. sp. *melonis* race 1 determinated by inoculation tests and molecular markers. Plant pathology 52:204-211.

11. Edel,V., Steinberg, C., Avelange, L., Laguerre, G. and Alabouvette, C. 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* population isolated from different soil in France. FEMS. Microbiology.Ecology 36:61-71.

12. Ficcadenti, N., Sestili, S., Annibali, S., Campanelli, G., Belisario, A., Maccaroni, M. and Corazza, L. 2002. Resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* race 1.2 in Muskmelon lines Nad -1 and Nad-2. Plant Disease. 86: 897-900.

13. Freman, S., Zveibil, A., Vintal, H. and Maymon, M. 2001. Isolation of non-pathogenic mutants of *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* for biological control of fusarium wilt in cucurbits. Phytopathology. 92:164-168.

14. Gurr, S.J., Mcpheson, M.J. and Bowles, D.J. 1992 . Molecular plant pathology : a practical approach .Oxford : IRL press at Oxford University press.

15. Kim, D.H., Martyn, R.D. and Magill, C.W.1992. Mitochondrial DNA(mt DNA) – Relatedness among formae Speciales of *Fusarium oxysporum* in the Cucurbitaceae. Phytopathology 83:91-97.

16. Lorys, M., Villaréal, M. A., Lannou, C., de Vallavieille-Pope, C. and Neema, C. 2002. Genetic Variability in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Populations Sampled on a Local Scale during Natural Epidemics. Appl. Environ. Microbiology, 68(12): 6138–6145.

17. Migheli, Q., Steinberg, C., Daviere, J. M., Olivain, C., Gerlinger, C., Gautheron, N., Alabouvette, C. and Daboussi, M.J. 2000 . Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of Impala in *Fusarium oxyporum* f.sp. *melonis* . Phytopathology, 90 : 1279 – 1284.

18. Mishra, P.K., Fox, R.T.V. and Culham, A. 2002. Development of a PCR – based assay for rapid and reliable identification of pathogenic fusaria. FEMS Microbiology Letter. 218:329-332.

19. Pitrat, M. and Perchepied, L. 2003. Identification of molecular markers linked to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 1.2 in melon. http:// www:intl-pag. Org/12/abstracts/p5q-PAG12-756.Html

20. Shafagh, N., Falahati- rastegar M., and Jafarpour, B. 2008. Physiological reces and genetic diversity determination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* by differential hosts and molecular marker RAPD in Northern and Razavi Khorassan provinces. Research Journal of Biology Science. 3(7):790-793.

Determination of genetic variability of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* isolates in Khorassan Razavi province By AFLP molecular marker

Rabbaninasab H.[1], sarvary S.[2] and Bakhshi khaniki Gh.[3]

[1]Agricultural and Natural Resource Research Center of North Khorassan, Bojnourd

[2] Jehad-e-Agriculture Management, Torbat e jam

[3] Payam noor University, Unit Karaj

Abstract

Fusarium wilt of melon is one of the most common and widespread disease of this crop in the world and specially Iran. This investigation was carried out to determine genetic variation of Fusarium *oxysporum* f.sp. *melonis* in Khorassan Razavi province. For this purpose 52 samples were collected from main melon cultivation region of Khorassan Razavi. After purification and identification of isolates, molecular analysis was performed. From all sampled isolates only 35 based on their geographical origin and pathogenicity for molecular analysis were selected. After DNA extraction, genetic variation based on AFLP markers, on 6.5%polyacryl amide gel electrophoresis and analysis by NTSYS software was done. Results showed at 63% similarity level, all isolates were placed in 6 AFLP groups A, B, C, D, E, F and two groups with just single member. Cluster analysis also showed there was significant genetic variation among *F. oxysporum* f.sp. *melonis* isolates in Khorassan Razavi. On the other hand according to cluster analysis it was determined that there was no specific correlation between geographical regions and AFLP genotypic groups. Also, no identified specific correlation was found between pathogenicity groups and isolated point of plant with AFLP groups.

Key words: Khorassan Razavi, Melone, AFLP marker, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*