تعیین تنوع ژنتیکی قارچ *Fusarium verticillioides* جدا شده از ذرت با استفاده از گروه های سازگار رویشی

عالیه جلودار[۱*] و رضا فرخی نژاد[۲]

[*]۱- **نویسنده مسؤول**: دانشجوی سابق کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
(a jelodar2009@yahoo.com)

۲- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۲

چکیده

در سال زراعی ۱۳۸۵ از مزارع ذرت شهرستان های اندیمشک، دزفول، شوش، شوشتر، ملاثانی و ویس واقع در استان خوزستان نمونه برداری بعمل آمد. جمعا ۱۳۵ جدایه *Fusarium verticillioides* از ریشه، طوقه، ساقه، گل آذین نر و بلال گیاه ذرت با استفاده از محیط کشت نش و اسنایدر (Nash & Snyder) جداسازی گردید. تعداد ۷۵ جدایه بطور تصادفی از بین جدایه های مذکور انتخاب و از نظر سازگاری رویشی مورد مطالعه قرار گرفتند. با استفاده از ۲ محیط کشت حاوی ۳ درصد کلرات پتاسیم شامل محیط سیب زمینی- دکستروز-آگار (Potato dextrose agar-chlorate=PDAC) و چاپک (Czapeck dox agar-chlorate=CDAC) و نیز محیط کشت های حاوی ۵ درصد کلرات پتاسیم شامل محیط حداقل (Minimal medium-chlorate= MMC) و PDAC ، ٦٦٨ جهش یافته نیت به دست آمد. جهش یافتگان نیت بر اساس شکل پرگنه روی محیط پایه حاوی یکی از منابع ازت شامل نیترات سدیم، نیتریت سدیم، هیپوزانتین و تارتارات آمونیوم گروه بندی شدند. تمام جهش یافتگان نیت بر اساس استفاده از منابع ازت در سه کلاس فنوتیپی nit1 (٤٢/٦٦٪)، nit3 (٢٣/٦٤٪)و *NitM* (٣٣/٧٪) قرار گرفتند. آزمون مکمل سازی بین جهش یافتگان نیت روی محیط کشت حداقل (MM)، به عمل آمد. بدین وسیله تعداد گروه های سازگار رویشی در هر منطقه و بین مناطق مشخص شد. در مجموع ٣٤ گروه سازگار رویشی در بین جمعیت قارچ مشخص شد که از این تعداد، ٦ گروه به جدایه های اندیمشک، ٦ گروه به جدایه های دزفول، ۸ گروه به جدایه های شوش ،۷ گروه به جدایه های شوشتر و۷ گروه به جدایه های ملاثانی تعلق داشتند. بزرگترین گروه دارای ۷ عضو بود و همچنین ۱۳ گروه تک عضوی وجود داشت. وجود گروه های سازگار رویشی تک عضوی فراوان نشان دهنده تنوع زیاد در اجتماعات قارچ در استان می باشد. از مجموع ٣٤ گروه سازگار رویشی شناخته شده بین جدایه های این قارچ در مناطق مختلف جغرافیایی ۱۰ گروه آن ها در بیش از یک منطقه وجود داشت و بقیه گروه های سازگار رویشی فقط در مناطق منشا وجود داشتند. به طور کلی نتایج این تحقیق مبین وجود تنوع ژنتیکی گسترده در اجتماعات قارچ مورد مطالعه در استان خوزستان می باشد.

کلید واژه ها: فوزاریوم، ذرت، تنوع، گروه های سازگار رویشی VCGs

مقدمه

گونه *F. verticillioides* Nirenberg (Sacc.) در تمام دنیا روی ذرت بیماری زا است. قارچ فوق قبلا در منابع به عنوان هم نام *F. moniliforme* معرفی می شده است (۶، ۲۳ و ۲۴) ولی اعضای انجمن بین المللی بیماری شناسی گیاهی و کمیته بین المللی تاکسونومی قارچ ها، بخش سیستماتیک فوزاریوم در سال ۲۰۰۳ تصویب نمودند که *F. verticillioides* به جای *F. moniliforme* جدا شده از ذرت به کار رود (۲۸). این قارچ در مناطق گرمسیری، نیمه

گرمسیری و معتدل جهان گسترش داشته و بیماری های متعددی تولید می کند و عامل مهم پوسیدگی ریشه، ساقه، دانه و سوختگی و مرگ گیاهچه در ذرت است (۲۴). این پاتوژن هم به صورت مستقیم با کاهش محصول و هم به طور غیرمستقیم، از طریق ترشح زهرابه های[1] سرطان زای زیادی از جمله فومونیزین و فوزاریک اسید موجب خسارت فراوان در محصول سالیانه ذرت می گردد (۱۸، ۲۴ و ۲۵). این توکسین ها در بقایا و محصول گیاهی باقی مانده، به موجودات مصرف کننده خصوصا دام ها صدمات زیادی وارد می کنند (۶).

تنوع به تفاوت های ژنتیکی و مورفولوژیکی موجود بین افراد یک جمعیت اشاره می نماید. چندین روش برای تعیین تنوع در جمعیت وجود دارد که یکی از آن ها استفاده از گروه های سازگار رویشی[2] می باشد (۲۲). در این روش، توانایی جدایه های متفاوت برای تشکیل هتروکاریون[3] تعیین می شود (۲۲ و ۲۶). تشکیل هتروکاریون در بین قارچ ها ی مختلف یک جزء مهم از سیکل زندگی و اولین مرحله در چرخه ی پرا جنسی[4] آنها است (۱۴). وجود هسته های مختلف از نظر ژنتیکی در یک سلول را هتروکاریوزیس و سلول حاصل از آن را هتروکاریوتیک گویند (۱۱). جدایه هایی که توانایی تشکیل هتروکاریون های رویشی دارند، از لحاظ رویشی سازگار می باشند و از نظر ژنتیکی به هم شبیه بوده و در یک گروه سازگار رویشی (VCG) قرار می گیرند ولی جدایه هایی که تولید هتروکاریون نمی کنند، از نظر رویشی ناسازگارند (۱۵ و ۳۰).

گروه های سازگار رویشی نه تنها برای تعیین تنوع در ساختار جمعیتی بسیاری از قارچ ها استفاده شده است (۵ و ۲۲)، بلکه در بعضی موارد ارتباط گروه های سازگار رویشی با بیماریزایی در یک میزبان خاص نشان داده شده است (۱۰). از سازگاری رویشی نه تنها به عنوان یک نشانگر ژنتیکی مفید در مطالعات مربوط به جمعیت استفاده شده است، بلکه سازگاری رویشی می تواند مستقیما توانایی تبادل ژنتیکی ارگانیسم هایی را که فاقد تولید مثل جنسی می باشند از طریق پراجنسی تحت تاثیر قرار دهد (۲۷). اگر نوترکیبی جنسی و پراجنسی کمیاب باشد سرعت بالای جهش، ابزار مهمی برای تغییر پذیری نسل هاست، زیرا موجودات برای بقا نیاز به سازگاری با تغییرات محیطی دارند (۱۱). سازگاری رویشی توسط لوکوس های چندگانه ناسازگار رویشی کنترل می شود که، اصطلاحا به ژن های ناسازگار رویشی (*vic*) یا هتروکاریون (*het*) معروف هستند (۲۶). جدایه هایی که دارای یک سری از لوکوس های *vic* مشابه اند، قادر به تشکیل هتروکاریون های پایدار هستند و استرین هایی که در این لوکوس ها تفاوت دارند قادر به تشکیل هتروکاریون پایدار نیستند. در حقیقت آلل های این لوکوس ها در استرین های سازگار یکدیگر را شناسایی کرده و در نهایت بعد از تماس ریسه ای و جوش خوردن هتروکاریون های پایدار تشکیل می شود. این نوع واکنش ها معمولا به عنوان سازگاری آللی شناخته می شوند (۸، ۱۰ و ۲۲).

پوهالا[5] (۲۶) گزارش کرد که در روی محیط حاوی نمک کلرات پتاسیم، رشد تیپ وحشی محدود می شود و جهش یافتگان نیت به صورت سکتورهای مقاوم به کلرات به دست می آیند. او در آزمایش خود برای تولید جهش یافتگان نیت از دو محیط MMC[6] وPDC[7] (هر کدام محتوی ۱۵ گرم کلرات پتاسیم در لیتر) استفاده کرد. این سکتورهای

1- Mycotoxin
2- Vegetative Compatibility Groups (VCGs)
3- Heterokaryon
4- Parasexual
5- Puhalla
6- Minimal medium chlorate
7- Potato dextrose chlorate

دارای رشد سریع، مقاوم به کلرات بوده و روی محیط حداقل رشد کاملا نازک و بدون میسیلیوم هوایی تولید می کنند. این سکتورها قادر به مصرف نیترات نمی باشند (۹). با استفاده از محیط کشت انتخابی حاوی منابع متفاوت نیتروژن، جهش یافتگان نیت در سه گروه فنوتیپی nit1 ، nit3 و *NitM* قرار می گیرند. کلیتیچ و لزلی[1] (۲۱) توانایی تولید جهش یافتگان نیت در جدایه های *F.moniliforme* مربوط به گیاه ذرت را مورد بررسی قرار داده و سکتورهای مقاوم به کلرات را در محیط حاوی ۱/۵ درصد کلرات جداسازی نمودند.

F. verticillioides از همه بافت های گیاهی ذرت جدا شده است (۱۷). استفاده از VCG برای این قارچ موثر است زیرا ناسازگاری رویشی در این قارچ بسیار گسترش دارد (۲۲ و ۲۹).

تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت های *F. verticillioides* جدا شده از گیاه ذرت در مناطق مختلف استان خوزستان با استفاده از گروه های سازگار رویشی می باشد.

مواد و روش ها

نمونه برداری و جداسازی قارچ

نمونه برداری ها از تیر تا آبان سال۱۳۸۵ از قسمت های مختلف گیاه ذرت (ریشه، طوقه، ساقه، گل آذین نر و بلال) از مناطق اندیمشک، دزفول، شوش، شوشتر، ملاثانی و ویس در استان خوزستان انجام گرفت. نمونه برداری در چندین مرحله طی مراحل مختلف رشد گیاه و به صورت تصادفی به عمل آمد. نمونه های دارای علایم پژمردگی و پوسیدگی ریشه و طوقه و پارگی ساقه بطور کامل از زمین خارج و در اسرع وقت جهت جداسازی قارچ به آزمایشگاه منتقل گردید. از بوته های با ظاهر سالم و بدون علائم هم نمونه تهیه شد، زیرا در اکثر مواقع گیاه آلوده فاقد علایم ظاهری بود. پس از شستشو با آب معمولی و ضدعفونی سطحی با پنبه ی آغشته به الکل متیلیک ۷۰٪، اندام های گیاهی به سرعت از روی شعله عبور داده شد. سپس قطعات کوچکی از آن ها با اسکالپل سترون جدا و در محیط کشت انتخابی نش و اسنایدر قرار داده شدند.

خالص سازی و شناسایی قارچ

با استفاده از محیط کشت آب آگار (WA) جدایه ها به روش تک اسپور خالص سازی شدند و سپس روی محیط کشت SNA[2] در یخچال نگهداری شدند. برای شناسایی قارچ ها از محیط کشت های CLA, PDA, WA[3] استفاده گردید. بعد از جمع آوری تمام اطلاعات لازم، با استفاده از منابع معتبر شناسایی، اقدام به شناسایی جدایه ها گردید (۶ و ۲۴).

تولید جهش یافتگان نیت

از کشت های خالص هر جدایه قطعات کوچکی به پتری حاوی محیط کشت کامل[4] (CM) منتقل گردید و سپس از کشت های ده روزه قارچ روی CM از هر جدایه۱۰ قطعه ۲ میلیمتری برداشته و به وسط تشتک های پتری محتوی محیط کشت های حداقل[5]، سیب زمینی- دکستروز-آگار[6] حاوی ۳ و۵ درصد کلرات پتاسیم و چاپک حاوی ۳ درصد کلرات پتاسیم[7] منتقل گردیدند. محیط کشتی که بیشترین راندمان تولید جهش یافته نیت را داشت انتخاب و برای تولید جهش یافتگان سایر جدایه ها از آن محیط کشت استفاده گردید. جهش یافتگان نیت پس از تولید به محیط کشت حداقل منتقل شدند (۹).

1- Killitich & Leslie

2- Special Nutrient Agar
3- Carnation-Leaf Agar
4- Complete Medium
5- Minimal Medium Chlorate
6- Potato Dextrose Agar-Chlorate
7-Czapeck Dox Agar Chlorate

تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافته نیت

قطعات ۲ میلیمتری از کشت ۵ روزه هر جهش یافته به محیط کشت های حاوی یکی از منابع ازت شامل نیترات سدیم، نیتریت سدیم، تارتارات آمونیوم و هیپوزانتین بطور جداگانه منتقل گردید و تشتک های پتری به مدت ۵ روز در دمای اتاق نگهداری و نوع رشد پرگنه جدایه ها در محیط کشت های فوق مطالعه شد (۹).

آزمون های مکمل سازی برای تعیین گروه های سازگار رویشی جدایه ها

ابتدا آزمون خودسازگاری و یا خودناسازگاری جدایه ها با مقابل هم قرار دادن جهش یافته *NitM* از هر جدایه با جهش یافتهnit1 یا nit3 از همان جدایه انجام شد. در مرحلهٔ بعد جهش یافته *NitM* از یک جدایه در مقابل جهش یافتگان nit1 یا nit3 سایر جدایه ها قرار گرفت. در غیاب جهش یافتگان *NitM*، جهش یافتگان nit1 و nit3 مقابل هم قرار گرفتند. برای انجام آزمون مکمل سازی یک قطعهٔ ۲ میلی متری از جهش یافته *NitM* یک جدایه به وسط تشتک پتری محیط کشت حداقل مایه زنی شد و سپس در چهار طرف آن و به فاصلهٔ مساوی ۲ سانتیمتر یک قطعهٔ ۲ میلیمتری از جهش یافتگان nit1 یا nit3 سایر جدایه ها قرار داده شد. این عمل در مورد تمام جدایه های هر منطقه انجام شد. بعد از تعیین گروه های سازگار رویشی این جدایه ها، از هر گروه یک موتانت *NitM* به عنوان نماینده (tester) انتخاب گردید و جهش یافتگان nit1 یا nit3 مابقی جدایه ها با آنها مکمل سازی شدند.

نتایج

جداسازی و شناسایی قارچ

پرگنه های قارچی معمولا پس از ۴ تا ۵ روز، روی محیط کشت ظاهر شدند. جدایه ها به روش تک اسپور خالص سازی و با استفاده از کلیدهای معتبر شناسایی فوزاریوم ها شناسایی شدند (۲۳). در نهایت ۱۳۵ جدایه متعلق به گونه *F. verticillioides* از همه قسمت های گیاه ذرت شناسایی شد که از این تعداد، ۷۵ جدایه از مناطق مختلف جهت مطالعه گروه های سازگار رویشی انتخاب شدند.

تولید جهش یافتگان نیت

کلیه جدایه هایی که به طور آزمایشی روی محیط کشت MMC حاوی کلرات پتاسیم ۱/۵ و۳ درصد، مایه زنی شده بودند، هیچ نوع سکتور سریع الرشدی بعد از ۱۴ روز تولید نکردند و جدایه ها به صورت تیپ وحشی رشد کردند ولی روی محیط حداقل حاوی ۵ درصد کلرات پتاسیم فقط ۶ جهش یافته نیت به دست آمد. رشد قارچ روی محیط کشت PDA حاوی ۱/۵ درصد کلرات پتاسیم، کمی محدودتر شد و سکتورهای سریع الرشد تولید شدند ولی تمام سکتورها روی محیط حداقل به حالت تیپ وحشی برگشتند. روی محیط کشت PDA حاوی ۳ و ۵ درصد کلرات پتاسیم، از تعداد زیاد سکتورهای حاصله به ترتیب ۱۰۰ و ۲۳۷ جهش یافته نیت حاصل شد. روی محیط کشت رزبنگال –کلرات با ۳ درصد کلرات، سرعت رشد پرگنه ها بسیار پایین و تعداد سکتورها زیاد بود و در مجموع ۳۲۵ جهش یافته نیت از این محیط جداسازی گردید (شکل ۱). سکتورهایی که پس از انتقال به محیط کشت حداقل دارای رشد نازک و بدون میسلیوم های هوایی بودند، به عنوان جهش یافتگان نیت تلقی شدند. تعداد ۶۶۸ جهش یافته نیت از جدایه ها به دست آمد. جهش یافتگان نیت به لوله های آزمایش حاوی محیط کشت حداقل منتقل و در یخچال نگهداری شدند (جدول شماره ۱).

شکل ۱- سکتور سریع الرشد *F. verticillioides* روی محیط چاپک کلرات

جدول ۱- درصد جهش یافتگان نیت حاصله از جدایه های *F. verticillioides* در محیط های کشت مختلف حاوی کلرات

نوع محیط / درصد کلرات / نوع جهش یافته	MMC	PDC		Czapeck	مجموع
	۵	۳	۵	۳	
Nit1	./۸۸	۸/۲	۱۵/۵	۱٤/۹۲	۳۹/۵۰
Nit3	۰	۲/٤	۱۳/۵	۱۰/۸۲	۲٦/۷۲
NitM	۰	۱/۱	٦/٤۷	۲٦/۲۱	۳۳/۷۸
مجموع	./۸۸	۱۱/۷	۳۵/٤۷	۵۱/۹۵	۱۰۰

تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیت

پس از ۵ روز، تشتک های پتری برای تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیت بررسی شدند. جهش یافتگانی که روی محیط کشت های حاوی نیتریت، هیپوزانتین و آمونیوم به صورت تیپ وحشی رشد کردند در کلاس فنوتیپی nit1، جهش یافتگانی که روی محیط کشت های حاوی هیپوزانتین و آمونیوم رشد کردند در کلاس فنوتیپی nit3 و جهش یافتگانی که روی محیط کشت های حاوی نیتریت و آمونیوم رشد کردند در کلاس فنوتیپی *NitM* قرار گرفتند (شکل ۲ و جدول ۲).

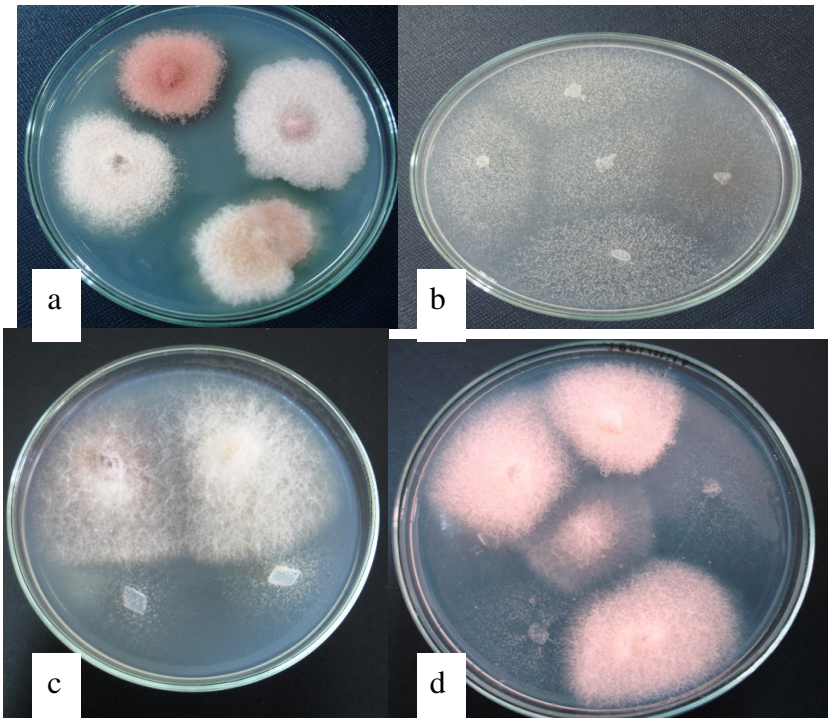
مکمل سازی جهش یافتگان نیت

از روز ششم به بعد روی محیط کشت حداقل در محل برخورد ریسه های جهش یافتگان نیت سازگار، رشد متراکمی از ریسه های هوایی که نشان دهنده تشکیل هتروکاریون و سازگاری رویشی جدایه ها بود، مشاهده شد (شکل ۳). جدایه های سازگار در یک گروه سازگار رویشی قرار گرفتند (جدول ۲).

جدول ۲- شناسایی کلاس فنوتیپی جهش یافته گان نیت جداسازی شده در آزمایشگاه بر اساس نحوه رشد در منابع مختلف نیتروژن(۹)

محل	نوع جهش	نیترات سدیم	نیتریت سدیم	تارتارات آمونیوم	هیپوزانتین	اسید اوریک	دفع نیتریت
لکوس ساختمانی آنزیم احیاءکننده نیترات	nit1	−	+	+	+	+	آزمایش نشده
لکوس تنظیمی- اختصاصی مسیر احیاء نیترات	nit3	−	−	+	+	+	−
لکوس مسئول ساخت کوفاکتور مولیبدن	*NitM*	−	+	+	−	+	+

+ = رشد تیپ وحشی روی محیط مربوطه − = رشد نازک بدون میسلیوم هوایی روی محیط مربوطه



شکل ۲- نحوه رشد جدایه در محیط های کشت مختلف

شامل:

a- محیط تارتارات آمونیوم، رشد به صورت تیپ وحشی

b- محیط نیترات، رشد به صورت میسلیوم ضعیف و گسترده

c- محیط نیتریت، رشد به صورت تیپ وحشی و میسلیوم ضعیف و گسترده

d- محیط هیپوزانتین، رشد به صورت تیپ وحشی و میسلیوم ضعیف و گسترده

جدول ۲- تعداد جدایه های *F. verticillioides* ، اندام گیاهی مورد کشت، تاریخ و محل نمونه برداری و گروه های سازگار رویشی

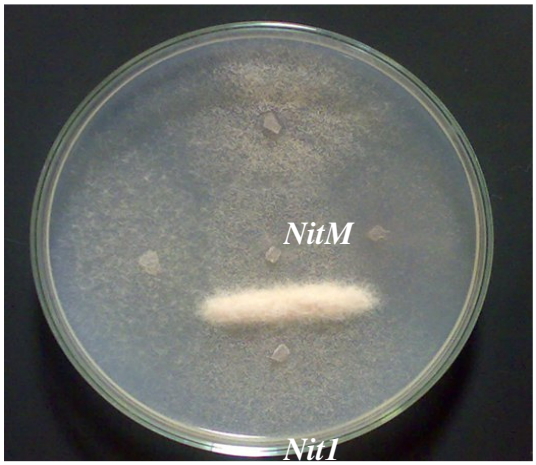
ردیف	جدایه	کدمزرعه	اندام گیاهی	محل	ماه نمونه برداری	گروه سازگار رویشی
۱	F1D1	D	ریشه	دزفول	تیر	VCG1
۲	F3D4	B	ریشه	دزفول	مرداد	VCG2
۳	F6D5	B	ریشه	دزفول	مرداد	VCG2
۴	F13D6	B	ریشه	دزفول	مرداد	VCG4
۵	F1D7	C	ریشه	دزفول	مرداد	VCG3
۶	F8D8	C	ریشه	دزفول	مرداد	VCG1
۷	F1D11	F	طوقه	دزفول	شهریور	VCG2
۸	F1D12	E	بند۴ساقه	دزفول	شهریور	VCG3
۹	F3D5	E	بند۱ساقه	دزفول	شهریور	VCG6◙
۱۰	F3D17	E	ریشه	دزفول	شهریور	VCG2◙
۱۱	F3D18	E	گل آذین نر	دزفول	شهریور	VCG2◙
۱۲	F1D23	I	طوقه	دزفول	مهر	VCG4
۱۳	F1D24	J	بند۱ساقه	دزفول	مهر	VCG3
۱۴	F2D25	K	بند۳ساقه	دزفول	آبان	VCG5▫
۱۵	F2D26	K	بلال	دزفول	آبان	VCG4▫
۱۶	F1SHR3	D	طوقه	شوشتر	تیر	VCG7
۱۷	F2SHR14	A	طوقه	شوشتر	مرداد	VCG10
۱۸	F14SHR24	B	ریشه	شوشتر	مرداد	VCG12
۱۹	F9SHR27	B	ریشه	شوشتر	مرداد	VCG8
۲۰	F1FHR32	C	طوقه	شوشتر	مرداد	VCG7
۲۱	F2SHR39	E	بند۱ساقه	شوشتر	شهریور	VCG8
۲۲	F1SHR42	G	بند۲ساقه	شوشتر	شهریور	VCG13
۲۳	F3SHR43	G	ریشه	شوشتر	شهریور	VCG11
۲۴	F8SHR45	G	ریشه	شوشتر	شهریور	VCG10
۲۵	F7SHR46	G	ریشه	شوشتر	شهریور	VCG7
۲۶	F2SHR48	I	بند۲ساقه	شوشتر	مهر	VCG8
۲۷	F2SHR52	K	بلال	شوشتر	مهر	VCG7
۲۸	F3SHR53	J	بلال	شوشتر	مهر	VCG9
۲۹	F1SHR54	J	ریشه	شوشتر	مهر	VCG8
۳۰	F2SHR55	J	ریشه	شوشتر	مهر	VCG7
۳۱	F1MO1	C	ریشه	ملاثانی	تیر	VCG14
۳۲	F2MO2	B	ریشه	ملاثانی	تیر	VCG15
۳۳	F3MO4	B	طوقه	ملاثانی	تیر	VCG14
۳۴	F2MO	A	ریشه	ملاثانی	مرداد	VCG14
۳۵	F4MO6	A	طوقه	ملاثانی	مرداد	VCG18
۳۶	F3MO7	A	ریشه	ملاثانی	مرداد	VCG15

علایم مشابه در کنار گروه های سازگار رویشی در جدول ۲ نشان دهنده جدایه های حاصله از یک گیاه است.

ادامه جدول ۲

ردیف	جدایه	کدمزرعه	اندام گیاهی	محل	ماه نمونه برداری	گروه سازگار رویشی
۳۷	F4MO8	D	گل آذین نر	ملاثانی	شهریور	VCG14
۳۸	F1MO9	E	طوقه	ملاثانی	شهریور	VCG16◘
۳۹	F1MO10	E	گل آذین نر	ملاثانی	شهریور	VCG19◘
۴۰	F10MO11	F	بند۱ساقه	ملاثانی	مهر	VCG17
۴۱	F6MO12	F	طوقه	ملاثانی	مهر	VCG17
۴۲	F5MO13	F	ریشه	ملاثانی	مهر	VCG19
۴۳	F4MO14	I	بلال	ملاثانی	آبان	VCG16
۴۴	F3MO15	H	بند۲ساقه	ملاثانی	آبان	VCG20
۴۵	F1MO16	G	بند۱ساقه	ملاثانی	آبان	VCG15
۴۶	F4A1	A	ریشه	اندیمشک	مرداد	VCG22
۴۷	F5A2	B	طوقه	اندیمشک	مرداد	VCG25
۴۸	F3A3	B	طوقه	اندیمشک	مرداد	VCG23
۴۹	F1A4	C	بند۱ساقه	اندیمشک	شهریور	VCG24●
۵۰	F1A5	C	ریشه	اندیمشک	شهریور	VCG23●
۵۱	F2A6	D	بند۱ساقه	اندیمشک	شهریور	VCG21▪
۵۲	F2A7	D	طوقه	اندیمشک	شهریور	VCG23▪
۵۳	F2A8	E	بند۱ ساقه	اندیمشک	مهر	VCG23*
۵۴	F2A9	E	بند۱ ساقه	اندیمشک	مهر	VCG23*
۵۵	F2A10	E	بند۲ساقه	اندیمشک	مهر	VCG21*
۵۶	F2A11	E	بند۳ساقه	اندیمشک	مهر	VCG26*
۵۷	F2A12	E	گل آذین نر	اندیمشک	مهر	VCG22*
۵۸	F1A13	E	گل آذین نر	اندیمشک	مهر	VCG23¤
۵۹	F1A14	E	ریشه	اندیمشک	مهر	VCG26¤
۶۰	F5A16	F	بلال	اندیمشک	آبان	VCG22
۶۱	F10SH1	A	ریشه	شوش	مرداد	VCG30
۶۲	F11SH3	A	طوقه	شوش	مرداد	VCG28
۶۳	F7SH4	A	طوقه	شوش	مرداد	VCG28
۶۴	F14SH5	A	طوقه	شوش	مرداد	VCG29
۶۵	F3SH6	A	طوقه	شوش	مرداد	VCG32
۶۶	F2SH9	B	بند۱ساقه	شوش	مرداد	VCG28
۶۷	F1SH10	B	گل آذین نر	شوش	مرداد	VCG27
۶۸	F6SH11	E	بلال	شوش	مهر	VCG28
۶۹	F4SH12	E	گل آذین نر	شوش	مهر	VCG29
۷۰	F3SH13	C	گل آذین نر	شوش	مهر	VCG31
۷۱	F1SH14	C	بند۱ساقه	شوش	مهر	VCG33
۷۲	F1SH15	D	ریشه	شوش	مهر	VCG31♦
۷۳	F1SH18	D	بلال	شوش	مهر	VCG27♦
۷۴	F2SH19	D	ریشه	شوش	مهر	VCG33◊
۷۵	F2SH20	D	ریشه	شوش	مهر	VCG34◊

علایم مشابه در کنار گروه های سازگار رویشی در جدول ۲ نشان دهنده جدایه های حاصله از یک گیاه است.



شکل ۳- تشکیل هتروکاریون رویشی در بین جدایه های سازگار

بحث

راندمان تولید جهش یافتگان نیت جدایه ها در محیط کشت MMC حاوی ۱،۳/۵ و۵ درصد کلرات پتاسیم و PDC با کلرات پتاسیم ۱/۵ درصد بسیار ناچیز بود ولی با استفاده از محیط کشت PDC حاوی ۳ و ۵ درصد کلرات پتاسیم و محیط کشت CDAC حاوی ۳ درصد کلرات پتاسیم، از تمام جدایه ها جهش یافته به دست آمد. در مطالعات هاوتورن و ریس جورج[1](۱۶) عدم تولید سکتور در *F. solani* روی محیط کشت MMC حاوی ۱/۵، ۳ و ۵ درصد کلرات مشاهده شده است. محمدی در سال ۱۳۷۹ از گونه *F.moniliforme* حاصله از نیشکر در محیط کشت MMC با درصدهای ۱/۵ و ۱/۸ کلرات هیچ سکتوری تولید نکرد ولی با افزایش درصد کلرات به ۲ و ۲/۵ درصد در همان محیط کشت، به ترتیب ۵۱ و ۱۰۰ جهش یافته نیت به دست آورد (۲). راه خدایی (۱) تولید موتانت های نیت جدایه های *F. oxysporum* f. sp. *tuberosi* در محیط کشت MMC و PDC با کلرات پتاسیم ۱/۵ درصد بسیار ناچیز گزارش کرد در حالی که با استفاده از محیط کشت PDC حاوی ۳ درصد کلرات پتاسیم از تمام جدایه های مذکور جهش یافته به دست آورد. موذن (۳) نیز فراوانی تولید جهش یافتگان نیت جدایه های *F. proliferatum* در درصد های ۱/۵، ۳ و ۵ کلرات پتاسیم محیط کشت MMC را صفر گزارش نمود. وی با استفاده از محیط PDC حاوی ۳ و ۵ درصد کلرات پتاسیم، سکتورها و جهش یافتگان نیت زیادی از جدایه های قارچ مذکور به دست آورد. نوع ازت مورد استفاده در محیط کلرات در فراوانی فنوتیپ جهش یافتگان نیت تاثیر دارد. کلیتیچ و لزلی (۲۱) در بررسی خود روی *F. moniliforme* برای ارزیابی جهش یافتگان نیت از محیط حاوی کلرات که دارا ی منابع مختلف نیتروژنی بود استفاده کرده و گزارش نمودند عامل اصلی که فراوانی تولید جهش یافته نیت را تحت تاثیر قرار می دهد، نوع منبع ازت محیط حاوی کلرات می باشد. در این مطالعه به دلیل عدم وجود تنوع لازم در جهش یافتگان نیت و تعداد کم جهش یافتگان *NitM* تولید شده، از محیط چاپک حاوی ۳ درصدکلرات استفاده شد. موذن نیز با استفاده از محیط کشت CDAC حاوی ۳ درصد کلرات پتاسیم، تعداد جهش یافته *NitM* را بالا برد (۳). به عقیده کورل و همکاران[2] (۹) راندمان تولید جهش یافتگان نیت علاوه بر در صد و درجه خلوص

1- Hawthorne & Rees-George.

2- Correll *et al.*

کلرات پتاسیم، به عوامل محیطی و نوع قارچ نیز بستگی دارد.

در این مطالعه تعدادی از سکتورهای سریع الرشد وقتی که به محیط کشت حداقل انتقال یافتند، به صورت تیپ وحشی رشد کردند. در بررسی کورل و همکاران (۹) معلوم شد این سکتورها از ازت به خوبی استفاده کرده و اغلب در جدایه هایی که ریسه چندهسته ای دارند، دیده می شود.

کلیتیچ و لزلی (۲۱) پیشنهاد کردند که تولید سکتور در *F. moniliforme* ممکن است به علت وجود عناصر قابل انتقال صورت گیرد. نام بردگان در بررسی خود این نکته را بیان کردند که سکتوردهی در *F. moniliforme* تحت کنترل ژن های هسته ای است.

در این تحقیق اکثر جهش یافتگان نیت از نوع nit1 با فراوانی ۴۲/۶۶٪ (۲۸۵عدد) بوده و جهش یافتگان *NitM* با فراوانی ۳۳/۷٪ (۲۲۵ عدد) و جهش یافتگان nit3 با فراوانی ۲۳/۶۴٪ (۱۵۸ عدد) از فراوانی کمتری برخوردار بودند. محمدی (۲) نیز در مطالعات خود بر روی جدایه های *F. moniliforme* حاصله از نیشکر و ذرت، فراوانی جهش یافتگان نیت nit1 را بیشتر از جهش یافتگان *NitM* و nit3 گزارش کرد.

در آزمون های مکمل سازی بین جهش یافتگان نیت وقتی که *NitM* در مقابل nit1 یا nit3 قرار می گرفت در مقایسه با زمانی که از جهش یافتگان nit1 در مقابل جهش یافتگان nit3 استفاده می شد، جوش خوردن و تشکیل هتروکاریون با سرعت و تراکم بیشتری انجام می گرفت. این نتایج با تحقیقات سایر پژوهشگران هماهنگی داشت (۳،۱ و ۱۶). نتایج آزمون مکمل سازی در جدایه های *F. verticillioides* نشان داد که هیچ کدام از جدایه های این گونه پدیده ی خودناسازگاری از خود نشان ندادند. کلیتیچ و همکاران (۲۱) در تمام جدایه های مورد مطالعه به استثنای یک جدایه، خودسازگاری رویشی را مشاهده کردند. کدرا و همکاران[1] (۲۰) در یکی از جدایه های حاصل از بلال ذرت خودناسازگاری را گزارش نمودند. فرخی نژاد (۱۳) نیز در تمام جدایه های مورد مطالعه خودسازگاری رویشی را مشاهده کرد.

از عمل مکمل سازی جهش یافتگان نیت متعلق به ۷۵ جدایه حاصل از ذرت از ۵ منطقه در استان خوزستان، تعداد ۳۴ گروه سازگار رویشی شناسایی گردید. از این تعداد VCG شماره ۲۳ با هفت عضو پر جمعیت ترین گروه را تشکیل داد. سیزده گروه نیز گروه هایی بودند که هر کدام تنها یک جدایه داشتند. وجود تعداد بالای VCG و گروه های سازگار رویشی تک عضوی زیاد نشان دهنده تنوع زیاد در اجتماعات قارچ در استان می باشد. این تنوع زیاد در جمعیت پاتوژن باعث ایجاد اشکال در امر اصلاح گیاه ذرت به منظور تهیه واریته های مقاوم در مقابل بیماری های ناشی از قارچ *F. verticillioides* شده و نیز در امر توسعه یک راه مبارزه جهت کنترل بیماری مشکل آفرین می باشد (۱۳). مطالعات صورت گرفته روی *Gibberella fujikuroi* نشان داد که ۳۸ جدایه از این قارچ در ۳ گروه سازگار رویشی قرار گرفتند (۲۹). فرخی نژاد (۱۳) در جدایه های *F. moniliforme* حاصل از بذور ذرت تنوع را بسیار بالا دانسته است. نام برده ۳۷۳ جدایه قارچی را در ۱۹۴ گروه VCG قرار داده است که از این تعداد،۱۳۴ گروه فقط دارای یک عضو بوده اند. وی همین طور ارتباطی بین مناطق جغرافیایی و گروه های VCG مشاهده نکرد. طی مطالعات هوانگ و همکاران[2] (۱۷) چهل و سه جدایه این قارچ از ذرت در ۲۷ گروه VCG و ۳۲ گروه RAPD قرار گرفتند و طی تحقیق دیگری در همان سال ۶۳ جدایه این قارچ از ذرت در ۴۲ گروه VCG و ۳۷ گروه

1- Kedera *et al.*
2- Huang *et al.*

RAPD قرار گرفت. شولز و همکاران[1] (۷) در ۵ منطقه در کشور آرژانتین از ذرت های تحت شرایط بدون شخم، نمونه برداری کرده و مشاهده کردندکه ۳۶ جدایه *F.moniliforme* با تیپ جنسی A[2] در ۲۸ گروه سازگار رویشی قرار گرفت. سیدو[3] (۲۹) معتقد است عواملی چون ژنتیک، نحوه تولید مثل قارچ، تعداد و منابع نمونه های قارچی در تعداد گروه های سازگار رویشی یک گونه موثر است. توزیع گروه های سازگار رویشی درون هر منطقه و بین مناطق مختلف به گونه ای بود که هیچ رابطه خاصی بین VCG و منشا جغرافیایی جدایه ها مشاهده نشد. این یافته موافق نظر برخی از محققین (۱،۳،۴،۱۲و۱۳)، و مخالف یافته برخی دیگر از پژوهشگران (۸) در مورد ارتباط بین VCG و مناطق جغرافیایی می باشد. از مجموع ۳۴ گروه سازگار رویشی شناخته شده بین جدایه های این قارچ در مناطق مختلف جغرافیایی، ۱۰ گروه آن ها در بیش از یک منطقه وجود داشت و بقیه گروه های سازگار رویشی فقط در مناطق منشا وجود داشتند. جالب است که تمام گروه های سازگار رویشی منطقه ملاثانی فقط در منطقه منشاء وجود داشته و در مناطق دیگر مشاهده نگردیدند. در صورت آلودگی بذر زاد می توان احتمال داد که بذور در مزارع نمونه برداری شده در منطقه ملاثانی توسط کشاورزان تهیه شده باشد. البته افزایش دفعات نمونه برداری از هر منطقه، احتمال جداسازی جدایه های جدیدی را فراهم می سازد که ممکن است در گروه های جدید یا گروه های قدیمی قرار گیرند. بدین معنی که احتمال دارد در صورت انجام این آزمایشات با نمونه های بیشتر، این منطقه نیزگروه های سازگار مشترک با مناطق دیگر داشته باشد. طبق گزارش کدرا و همکاران (۱۹) در گیاهان ذرت آلوده نیز تنوع VCG، در جدایه های حاصله از قسمت های مختلف یک گیاه بالاست. آلودگی فوزاریومی در ذرت می تواند سیستمیک ، غیر سیستمیک (ثانوی) یا به هر دو صورت باشد. توجه به این نکته که جدایه های قارچ به راحتی با بذور به مناطق مختلف، منتقل شده و تنوع جمعیتی قارچ را تغییر می دهد، ضروری می باشد. حال چه انتقال درون استان باشد و چه همراه با بذور مادری ارسالی از مغان یا جاهای دیگر باشد. باد، یکی از عوامل اصلی انتشار قارچ روی گیاه است که می تواند با ورود جدایه های متفاوت به یک محیط روی تعداد VCG تاثیر بگذارد (۲۰). مطالعات بیشتر در زمینه گروه های سازگار رویشی در مورد این پاتوژن در تمام مناطق کشت ذرت در کشور می تواند اطلاعات کاملی از تنوع، ارتباطات و پراکندگی ژنتیکی این قارچ ارائه دهد که می توان از آن ها در امر مدیریت بیماری استفاده نمود. ضمنا کاربرد این روش در تلفیق با شاخص های بیولوژیک مثل بیماریزایی و استفاده از نشانگرهای مولکولی نتایج مطمئن تری ارائه خواهد داد (۱۷ و ۳۱).

منابع

۱. راه خدایی، ا. و فرخی نژاد، ر. ۱۳۸۵. تعیین گروه های سازگار رویشی در جمعیت *Fusarium oxysporum f.sp. tuberosi* و بیماریزایی آنها روی سیب زمینی در استان های فارس و خوزستان. مجله علمی کشاورزی. جلد ۲۹. شماره ۲، صص۴۳ –۵۲.

1- Chulze *et al.*
2- Mating population A (M. P. A)
3- Sidhu

۲. محمدی، ع.۱۳۸۰. بررسی تنوع ژنتیکی در جدایه های *F.moniliforme* جداسازی شده از نیشکر با استفاده از گروه های سازگاری رویشی و تعیین ارتباط آن با جدایه های ذرت.پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی.دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، ۸۵ ص.

۳. موذن، ر. و فرخی نژاد، ر. ۱۳۸۶. تعیین گرو های سازگار رویشی در *Fusarium proliferatum* عامل بیماری چاقوبریدگی نیشکر در خورستان، مجله علمی کشاورزی. جلد ۳۰، شماره ۴، صص ۱۳۳ – ۱۴۷.

4. Bosland, P.W., and Williams, P.H. 1987. An evaluation of *Fusarium oxyspoum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. Canadian Journal of Botany, 65: 2067-2073.

5. Bowden, R.L., and Leslie, J.F. 1992. Nitrate non-utilizing mutants of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) and their use in determining vegetative compatibility. Experimental Mycology, 16: 308-315.

6. Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., and Backhouse, D. 1994. Laboratory Manual for Fusarium Research. Fusarium Research Laboratory, Department of Crop Science, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, 133 p.

7. Chulze, S.N., Ramirez, M.L., Torres, A., and Leslie, J.F. 2000. Genetic variation in *Fusarium* section Liseola from no- till maize in Argentina. Applied Environmental Microbiology, 66 (12): 5312-5315.

8. Clark, C.A., Hoy, M.W., and Nelson, P.E. 1995. Variation among isolates of *Fusarium lateritium* from sweet potato for pathogenicity and vegetative compatibility. Phytopathology, 85: 624-629.

9. Correll, J.C., Klittich, C.J.R., and Leslie, J.F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. Phytopathology, 77: 1640-1646.

10. Correll, J.C. 1991. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, 81: 1061-1064.

11. Day, P.R. 1960. Variation in phytopathogenic fungi. Annual Review of Microbiology, 14: 1-16.

12. Elmer, W.H., and Stephens C.T. 1989. Classification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* into vegetative compatible groups. Phytopathology, 79: 88-93.

13. Farrokhi Nejad, R. 2000. Study of genetic diversity in *Fusarium moniliforme* population recovered from seeds of two hybrid cultivar of corn using vegetative compatibility groups. Scientific Journal of Agriculture, 22(1): 67-86.

14. Glass, N.L., and Kuldau, G.A. 1992. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycetes. Annual Review of Phytopathology, 30: 201-224.

15. Harveson, R.M., and Rush, C.M. 1997. Genetic Variation among *Fusarium oxysporum* isolates from sugarbeet as determined by vegetative compatibility. Plant Disease, 81: 85-88.

16. Hawthorne, B.T., and Rees-George, J. 1996. Use of nitrate non-utilizing mutants to study vegetative incompatibility in *Fusarium solani* (*Nectria heamatococca*), especially members of mating population I, V, and VI. Mycological Research, 100: 1075-1081.

17. Huang, R., Galperin, M., Levy, Y., and Perl-Treves, R. 1997. Genetic diversity of *Fusarium moniliforme* detected by vegetative compatibility groups and random amplified polymorphic DNA markers. Plant Pathology, 46: 871- 881.

18. Jardine, D.J., and Leslie, J.F. 1999. Aggressiveness to mature maize plant of *Fusarium* strains differing in ability to produce fumonisin. Plant Disease, 83: 690-693.

19. Kedera, C.J., Leslie, J.F., and Claflin, L. E. 1992. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. (Abstr.). Phytopathology, 82: 1138.

20. Kedera, C.J., Leslie, J.F., and Claffin, L. E. 1994. Genetic diversity of Fusarium section Liseola (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalk. Phytopathology, 84: 603- 607.

21. Klittich, C.J.R., and Leslie, J.F. 1989. Chlorate resistant, nitrate- utilizing mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). Journal of General Microbiology, 135: 721-727.

22. Leslie, J.F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology, 31: 127-151.

23. Leslie, J.F., and Brett, A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Summerell Blackwell Publishing, 388 p.

24. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas,W.F.O. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, 193 p.

25. Partridge, J. E. 2003. *Fusarium* stalk rot. Plant Pathology, 52: 369-372.

26. Puhalla, J.E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility.Canadian Journal of Botany, 63: 179-183.

27. Rayner, A.D.M. 1991. The phytopathalogical significance of mycelial individualism. Annual Review of Phytopathalogy, 29: 305-323.

28. Seifert, K.A., Aoki, T., Baayen, R.P., Brayford, D., Burgess, L.W., Chulze, S., Gams, W., Geiser, D., deGruyter, J., Leslie, J.F., Logrieco, A., Marasas, W.F.O., Nirenberg, H.I., O'Donnell, K., Rheeder, J.P., Samules, G.J., Summerell, B.A., Thrane, U. and Waalwijk, C. 2003. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. Mycological Research, 107: 643-644.

29. Sidhu, G.S. 1986. Genetics of *Gibberella fujikuroi* VIII. Vegetative compatibility groups. Canadian Journal of Botany, 64: 117-121.

30. Woo, S.L., Zoina, A., Delsorbo, G., Lorito, M., Nanni, B., Scala, F., and Noviello, C.1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCG, $RFLP_S$, and RAPD. Phytopathology, 86: 966-973.

31. Woo, S.L., Noviello, C., and Lorito, M. 1998. Sources of molecular variability and applications in characterization of the plant pathogen *Fusarium oxysporum* In Couteaudier, Y., and Clarkson, j. (eds), Molecular Variability of Fungal Pathogens Bridge, P., CAB International, UK., pp: 187-208.