تعیین گروههای سازگار رویشی در جمعیت *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* و بیماریزائی آنها روی سیب زمینی در استانهای فارس و خوزستان

اسماعیل راه خدایی[1] و رضا فرخی نژاد[2]

چکیده

طی فصول زراعی ۷۹-۷۸ از مناطق مهم کاشت سیب زمینی در استانهای فارس (داریون، کوشک مولا و مهارلو) و خوزستان (عقیلی) جمعاً ۵۷ جدایه *F. oxysporum* از ریشه، طوقه و ساقه گیاه سیب زمینی با استفاده از محیط کشتهای PDA اسیدی و نش و اسنایدر (Nash & Snyder) جداسازی گردید. تعداد ۵۰ جدایه از مناطق مختلف دو استان انتخاب و از لحاظ بیماریزایی و گروههای سازگار رویشی (VCGs) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۲۰ درصد از جدایه‌ها، روی غده‌های سیب زمینی رقم دراگا، پوسیدگی خشک و تمام جدایه‌ها بجز یکی، پژمردگی آوندی را ایجاد کردند. از کلیه جدایه‌ها روی محیط کشت PDC حاوی کلرات پتاسیم ۳ درصد، ۶۰۷ موتانت نیت بدست آمد. کلاس فنوتیپی هر یک از موتانتهای نیت بر اساس نحوه رشدشان روی محیط کشت پایه (BM) حاوی یکی از چهار منبع ازت نیترات، نیتریت، آمونیوم و هیپوزانتین تعیین شد. بر این اساس ۷۸/۹ درصد از موتانتهای نیت در کلاس فنوتیپی *nit1* ، ۱۲/۵ درصد در کلاس فنوتیپی *nit3* و ۸/۶ درصد در کلاس فنوتیپی *NitM* قرار گرفتند. مکمل سازی بین موتانتهای نیت جدایه‌ها روی محیط کشت حداقل (MM) انجام شد و ۸ گروه سازگار رویشی در این جمعیت شناسایی گردید. بین نوع بیماری ایجاد شده توسط جدایه‌ها و VCG آنها در این فرم مخصوص رابطه‌ای مشاهده می‌شد، به این صورت که گروههای A , B , D , E و F فقط بیماری پژمردگی آوندی و جدایه‌های گروهای G ,C و H هم پژمردگی آوندی و هم پوسیدگی خشک را ایجاد کردند. بین مناطق جغرافیایی که جدایه‌ها از آنها جمع‌آوری شده بودند و VCG آنها رابطه خاصی وجود نداشت و فقط جدایه‌های گروههای F و H به یک منطقه جغرافیایی تعلق داشتند.

کلید واژه ها: فوزاریوم، سیب زمینی، گروههای سازگار رویشیVCG، بیماریزائی، فارس، خوزستان

مقدمه

گونه *Fusarium oxysporum* (Fo) قارچی خاکزاد بوده، که انتشار جهانی دارد و در تمام خاکهای زراعی و غیر زراعی بصورت بیمارگر یا گندروی و یا همراه با گیاه زندگی می‌کند (۷ و۲۶). تعداد زیادی از جدایه‌های این قارچ، عامل بیماریزای خطرناکی برای بسیاری از محصولات کشاورزی هستند و از آنجائی که بسیاری از اعضای آن، عامل پژمردگی آوندی و پوسیدگی اندامهای مختلف گیاهان هستند، از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردارند (۹). این قارچ به سیب زمینی نیز حمله کرده و هر ساله کشاورزان زیادی را متحمل خسارتهای سنگینی می‌کند (۱۳). با توجه به خصوصیات خاص بیولوژیکی Fo و به دلیل شباهتهای مورفولوژیکی جدایه های این قارچ، تفکیک جدایه‌های بیماریزا از غیر بیماریزا کار بسیار مشکلی است (۹). در ابتدا استفاده از آزمونهای بیماریزائی روش مفیدی برای تفکیک جدایه‌ها به

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز. (rahkhodaei@yahoo.com)

۲- دانشیارگروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: ۸۴/۴/۱۲

تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۱/۳

حساب می‌آمد، به ویژه اینکه تحقیقات وجود یک نوع رابطه اختصاصی بین میزبان و جدایه‌های بیماری زا را مشخص می نمود. در این سیستم جدایه‌های مختلف بر اساس توانائی ایجاد بیماری روی یک یا چند میزبان خاص، به فرمهای ویژه‌ای گروه‌بندی می‌شدند که فرم مخصوص[1] نام داشتند (۱۰). تقسیمات فرمهای مخصوص به نژادهای فیزیولوژیک نیز بر اساس بیماریزائی جدایه‌ها روی بعضی از ارقام افتراقی انجام می‌شد (۹و۲۷). این نوع گروه بندیها صرفاً بر اساس آزمونهای بیماریزائی استوار بودند که همواره تحت شرایط محیطی مانند دما، رطوبت، سن میزبان، نحوه مایه زنی و ...، قرار داشتند که انجام آنها خالی از خطا و اشکال نبوده است. از طرفی انجام این آزمونها نیاز به فضای مناسب آزمایش داشته و وقت و هزینه زیادی را در برمی‌گیرد (۳)، در نتیجه محققان همواره به دنبال روشهای دقیق ولی ساده، سریع و پایدار برای تفکیک و گروه‌بندی جدایه‌های قارچی بوده‌اند. برای مثال خصوصیات فیزیولوژیکی جدایه‌ها را بعنوان معیارهائی برای تقسیم بندی نژادهای فیزیولوژیکی یک فرم مخصوص مورد بررسی قرار داده‌اندکه روشهای مذکور نیز در موارد بسیاری نتایج متناقضی داشته است (۲۰و۲۱).

پوهالا[2] برای اولین بار جدایه‌های فرمهای مخصوص Fo را بر اساس گروههای سازگار رویشی[3] (VCG) آنها گروه‌بندی کرد. وی نشان داد که جدایه‌های یک فرم مخصوص با فرم مخصوص دیگر در یک گروه سازگار رویشی قرار نگرفته و هر فرم مخصوص، گروه یا گروههای سازگار رویشی خاص خود را دارد (۲۲). در جدایه‌های سازگار، ریسه‌ها پس از تماس با هم جوش خورده و در محل تماس آنها هتروکاریونهای پایداری تشکیل می شود، چنین جدایه‌هائی از لحاظ ژنتیکی به هم شبیه بوده و در یک گروه سازگار رویشی قرار می‌گیرند (۱۸). تا کنون تحقیقات زیادی در مورد گروههای سازگار رویشی بسیاری از فرمهای مخصوص انجام شده است (۱۶). در این تحقیقات علاوه بر تفکیک جدایه‌های بیماریزا از غیر بیماریزا، با استفاده از گروههای سازگار رویشی، تغییرات ایجاد شده در شدت بیماریزائی جدایه‌ها در اثر هتروکاریوزیس نیز بررسی شده است، از طرفی از این گروهها بعنوان ابزارهای مفیدی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیتهای یک گونه قارچی و یا یک فرم مخصوص و یا یک نژاد خاص در یک یا چند منطقه جغرافیائی استفاده شده است (۱۱، ۱۷و۲۸).

برای اولین بار ونتر و همکاران[4] گروههای سازگار رویشی را در فرم مخصوص *F.o. tuberosi* در آفریقای جنوبی مورد بررسی قرار دادند. این محققین تعداد ۳۲ جدایه را از مناطق مختلف جمع آوری کرده و بیماریزائی و گروههای سازگار رویشی آنها را بررسی کردند. این تحقیقات نشان داد که نوعی ارتباط بین گروههای سازگار رویشی و بیماریزائی جدایه‌ها وجود دارد (۲۵). قلعه‌دزدانی و همکاران در استان خراسان، سازگاری رویشی تعدادی از جدایه‌های این فرم مخصوص را مورد بررسی قرارداده و ۸ گروه سازگار رویشی در بین ۴۰ جدایه شناسائی کردند. در ابن مطالعات نیز وجود نوعی ارتباط بین گروهها و بیماریزائی جدایه‌ها در هر گروه مشاهده شده است (۱).

تحقیق حاضر، با هدف تعیین گروههای سازگار رویشی در جمعیتی از جدایه‌های Fo سیب زمینی در استانهای فارس و خوزستان و بررسی ارتباط بین گروهها و بیماریزائی در آنها و همچنین تعیین ارتباط ژنتیکی بین جدایه‌های دو استان صورت گرفت.

1- Forma specialis
2- Puhalla
3- Vegetative Compatibility Groups
4- Venter *et al.*

مواد و روشها

۱- نمونه برداری و جداسازی قارچ

نمونه برداریها در تابستان ۱۳۷۸ از بعضی از مناطق مهم کاشت سیب زمینی در استان فارس شامل داریون (داریون و دیندارلو)، کوشک مولا و مهارلو (مهارلو، ظفرآباد) و در بهار ۱۳۷۹ از منطقه عقیلی در استان خوزستان انجام شد. بوته‌هائی که علائم زردی و پژمردگی را نشان می‌دادند انتخاب و بطور کامل از خاک خارج و در اسرع وقت جهت جداسازی قارچ به آزمایشگاه منتقل گردیدند (۱۳). برای جداسازی قارچ از اندامهای گیاهی، بیشتر از بافتهای آوندی تغییر رنگ یافته ساقه‌ها و ریشه استفاده شد. اندامهای گیاهی به ویژه ریشه‌ها به دقت با آب معمولی شستشو شده، سپس قطعات کوچکی از ریشه، طوقه و ساقه (بویژه بافتهای آوندی ساقه اصلی)، به‌مدت ۳ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، ضدعفونی سطحی شده و در محیط کشت PDA اسیدی و انتخابی Nash & Snyder کشت گردیدند (۱۹).

۲- خالص سازی و شناسائی قارچ

با استفاده از محیط کشت آب - آگار (WA) جدایه‌ها به روش تک اسپور خالص سازی شدند و سپس روی محیط کشت SNA[1] و ماسه سترون در یخچال نگهداری شدند. برای شناسائی قارچها از محیط کشتهای WA، PDA، SNA و CLA[2] استفاده گردید. قارچها با استفاده از منابع معتبر و مهم شناسائی گونه‌های فوزاریوم بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی شناسائی گردیدند (۵، ۶ و ۱۹).

۳- آزمونهای بیماریزائی

برای انجام آزمونها از غده‌های اصلاح شده و یکنواخت سیب زمینی رقم دراگا که از مرکز تحقیقات کشاورزی همدان، ایستگاه تجرک تهیه شده بود استفاده گردید.

۱-۳- آزمون پژمردگی آوندی

غده‌های یک اندازه که از نظر ظاهری سالم بودند انتخاب شدند و پس از شستشو و تمیز شدن، قبل از کاشت در گلدان بمدت ۲۰ روز در تاریکی نگهداری شدند تا جوانه دار شوند. سپس هر غده در گلدانی به ابعاد ۱۵× ۲۰× ۲۵ سانتی‌متر که به نسبت مساوی از ماسه سترون و خاک پر شده بودند کشت گردید و گلدانها درشرایط تناوب نوری (روشنائی- تاریکی) ۱۲ ساعته و دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از اینکه ارتفاع بوته‌ها به ۲۵-۲۰ سانتی متر رسید، با سوسپانسیون اسپور قارچ مایه زنی شدند (۲۵). برای هر جدایه سه گلدان در نظر گرفته شد. ابتدا خاک اطراف طوقه و ریشه‌ها تا عمق ۵ سانتیمتری کنار زده شد و سپس سوسپانسیونی از اسپور قارچ به میزان 10^5 اسپور در میلی لیتر روی ریشه‌ها و طوقه مایه زنی گردید. گلدانهای شاهد نیز با آب مقطر سترون مایه زنی شدند.

۲-۳- آزمون بیماریزائی پوسیدگی خشک

برای هر جدایه چهار غده یک اندازه و سالم انتخاب شد. غده‌ها پس از دو بار شستشو با مواد شوینده و آب، بمدت ۲۴ ساعت در جای تمیز نگهداری شدند و پس از خشک شدن کامل، قبل از مایه زنی با استفاده از اتانول ۹۰ درصد و عبور سریع از روی شعله، سترون سطحی گردیدند. یک قطعه ۵ میلیمتری از کشت ده روزه قارچ روی محیط کشت PDA در یک طرف غده در حفره‌ای به‌عمق و ابعاد ۵ میلیمتر مایه زنی شد. در طرف دیگر غده یک قطعه PDA به عنوان شاهد مایه زنی گردید. محلهای مایه زنی با پارافیلم پوشانده شد و سپس غده‌ها در ظرفهای پلاستیکی درب دار و با فاصله مناسب از یکدیگر در دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد نگهداری شدند. این

1- Special Nutrient Agar
2- Carnation Leaf Agar

آزمون با کمی تغییر، تلفیقی از روشهای ترون و همکاران[1] و ونتر و همکاران می باشد (۲۴و۲۵).

٤- تولید موتانتهای نیت

از کشتهای خالص هر جدایه قطعات کوچکی به لوله‌های حاوی محیط کشت کامل[2] (CM) منتقل گردید و سپس از کشتهای ده روزه قارچ روی CM از هر جدایه ده قطعه ۲ میلیمتری برداشته و به وسط تشتکهای پتری حاوی محیط کشتهای MMC[3] و PDC [4] که به‌ترتیب شامل محیط کشت حداقل [5] (MM) به اضافه کلرات پتاسیم و محیط کشت PDA به اضافه کلرات پتاسیم با درصدهای ۱/۵ و ۳ درصد بود، منتقل گردیدند. محیط کشتی که بیشترین راندمان تولید موتانت نیت را داشت انتخاب و برای تولید موتانتهای سایر جدایه‌ها از آن محیط کشت استفاده گردید. موتانتهای نیت پس از تولید به محیط کشت MM منتقل شدند (۱۰).

۵- تعیین کلاس فنوتیپی موتانت نیت

قطعاتی به اندازه ۲ میلیمتر از کشت ۵ روزه هر موتانت به محیط کشتهای حاوی یکی از منابع ازت شامل نیترات سدیم، نیتریت سدیم، تارتارات آمونیم و هیپوزانتین بطور جداگانه مایه زنی گردید و تشتکهای پتری به مدت ۵ روز در دمای اتاق نگهداری شدند (۱۰).

٦- آزمونهای مکمل سازی برای تعیین گروههای سازگار رویشی جدایه ها

برای تعیین گروههای سازگار رویشی جدایه‌ها، مکمل سازی بین موتانت NitM با *nit*1 و یا *Nit*M با *nit*3 انجام شد. در غیاب موتانت *Nit*M، مکمل سازی بین *nit*1 و *nit*3 انجام شد. در این تحقیق ابتدا مکمل سازی بین موتانتهای نیت ۲۰ جدایه که از مناطق مختلف جدا شده بودند انجام شده و بعد از تعیین گروههای سازگار رویشی این جدایه‌ها، از هر گروه یک موتانت *Nit*M به‌عنوان نماینده (tester) انتخاب گردید و موتانتهای *nit*1 یا *nit*3 مابقی جدایه‌ها با آنها مکمل سازی شدند. پس از شناسائی تمام گروههای سازگار رویشی، مجدداً بین موتانتهای نیت کلیه جدایه‌های هر گروه نیز آزمون مکمل سازی انجام شد. برای انجام مکمل سازی، یک قطعه ۲ میلیمتری از موتانت *Nit*M یک جدایه در وسط تشتک پتری MM قرار داده شد و سپس در چهار طرف آن و به فاصله مساوی ۲ سانتیمتر، یک قطعه از موتانت *nit*1 یا *nit*3 جدایه‌های دیگر قرار داده شد (۱۰).

نتایج

۱- جداسازی و شناسائی قارچ

پرگنه‌های قارچی معمولا پس از ۴ تا ۵ روز، روی محیط کشت ظاهر شدند. جدایه‌ها به روش تک اسپور خالص سازی شده و با استفاده از روشهای خاص شناسائی گونه‌های جنس فوزاریوم، توصیف شده در منابع معتبر شناسائی فوزاریومها مانند نلسون و همکاران[6]، بوس[7] و برگس و همکاران[8] به دقت شناسائی شدند (۵، ۶ و ۱۹). در نهایت ۵۷ جدایه متعلق به گونه Fo که شامل ۴۳ جدایه از استان فارس و ۱۴ جدایه از استان خوزستان بود شناسائی شد.

۲- آزمونهای بیماریزائی

۱-۲- آزمون پژمردگی آوندی

علائم پژمردگی بوته‌ها معمولا بین ۷ تا ۲۱ روز پس از مایه زنی قارچ ظاهر شد. در ابتدا علائم بصورت پژمردگی و تغییر رنگ برگهای پائینی بوته‌ها دیده شد که پس از آن کل بوته‌ها به تدریج پژمرده شدند. از ساقه این بوته‌ها مجددا قارچ مایه زنی شده به کمک محیط کشت PDA اسیدی

1- Theron *et al*
2- Complete Medium
3- Minimal Medium Chlorate
4- Potato Dextrose Chlorate
5- Minimal Medium

6- Nelsom *et al*
7- Booth
8- Burgess *et al*

جداسازی گردید. نود و هشت درصد از جدایه‌ها علائم پژمردگی را ایجاد کردند و بنابراین به عنوان فرم مخصوص *F.o. tuberosi* شناسائی شدند.

۲-۲- آزمون پوسیدگی خشک

بعد از سه هفته غده‌های مایه زنی شده از قسمت طولی برش داده شدند. در غده‌های آلوده علائم بصورت فرورفتگیها و چروک خوردگیهائی به رنگ قهوه‌ای تیره تا روشن نمایان بوده، سطح فرورفتگی ها در داخل غده ازکپکهای سفید، صورتی تا خاکستری رنگ پوشیده شده بود. فقط ۲۰ درصد از جدایه‌ها پوسیدگی خشک را ایجاد کردند.

۳- تولید موتانتهای نیت

روی محیط کشت MM حاوی کلرات پتاسیم ۱/۵ درصد، حتی پس از ۱۴ روز هیچ نوع سکتور سریع الرشدی تولید نگردید و جدایه‌ها بصورت تیپ وحشی (تولید میسلیومهای هوائی) رشد کردند. رشد قارچ روی محیط کشت PDA حاوی ۱/۵ درصد کلرات پتاسیم، کند بود و از ۱۰ جدایه، که از هر کدام ۱۰ قطعه روی این محیط کشت مایه زنی شده بود، فقط ۶ موتانت نیت بدست آمد. روی محیط کشت PDA، حاوی ۳ درصد کلرات پتاسیم، رشد قارچ به شدت محدود شده و پس از ۶ روز سکتورهای سریع الرشد که معمولا فاقد میسلیومهای هوائی بودند از محل پرگنه قارچ خارج شدند. سکتورهائی که پس از انتقال به محیط کشت MM، رشد نازک، ظریف و بدون تولید میسلیومهای هوائی بودند، به عنوان موتانتهای نیت تلقی شدند. تعداد ۶۰۷ موتانت نیت از جدایه‌ها بدست آمد. موتانتها به لوله‌های آزمایش حاوی MM منتقل و در یخچال نگهداری شدند.

٤- تعیین کلاس فنوتیپی موتانتهای نیت

پس از ۵ روز، تشتکهای پتری برای تعیین کلاس فنوتیپی موتانتهای نیت بررسی شدند. موتانتهائی که بر روی محیط کشتهای حاوی نیتریت، هیپوزانتین و آمونیوم بصورت تیپ وحشی رشد کردند در کلاس فنوتیپی *nit1* ، و موتانتهائی که بر روی محیط کشتهای حاوی هیپوزانتین و آمونیوم رشد کردند در کلاس فنوتیپی *nit3*، و موتانتهائی که بر روی محیط کشتهای حاوی نیتریت و آمونیوم رشد کردند در کلاس فنوتیپی *Nit*M قرار گرفتند (جدول شماره ۱).

جدول ۱- راندمان تولید موتانتهای نیت جدایه‌های *F. o.* f *sp.tuberosi* درمحیط کشتهای مختلف

درصد کلرات پتاسیم	نوع محیط کشت	*nit*1(%)	*nit*3(%)	*Nit*M(%)
۱/۵	PDC	٦(۲/۳)	۰(۰)	۰(۰)
۱/۵	MMC	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)
۳	PDC	٤٧٤ (٧٨/٨٦)	٧٦ (١٢/٦٤)	٥١ (٨/٥)

۵- مکمل سازی موتانتهای نیت

از روز ششم به بعد بر روی محیط کشت MM در محل برخورد ریسه‌های موتانتهای نیت سازگار، رشد متراکمی از ریسه‌های هوائی که نشان دهنده تشکیل هتروکاریون و سازگاری رویشی دو جدایه بود مشاهده شد. جدایه‌های سازگار در یک گروه سازگار رویشی قرار گرفتند (جدول شماره ۲).

جدول ۲- مناطق جغرافیائی، نوع بیماری و گروههای سازگار رویشی جدایه های *F. o.* f sp. *tuberosi* استانهای فارس و خوزستان

ردیف	جدایه	تاریخ نمونه برداری	محل نمونه برداری	نوع بیماری		گروههای سازگار رویشی (VCG)
				پوسیدگی خشک	پژمردگی	
۱	FoD_1	خرداد ماه ۱۳۷۸	داریون	-	+	A
۲	FoD_2	خرداد ماه ۷۸	داریون	-	+	A
۳	FoD_6	خرداد ماه ۷۸	داریون	-	+	A
٤	FoD_{12}	تیر ماه ۷۸	داریون	-	+	A
٥	FoD_{15}	تیر ماه ۷۸	داریون	-	+	A
٦	FoD_{31}	تیر ماه ۷۸	داریون	-	+	A
۷	FoD_{34}	تیر ماه ۷۸	داریون	-	+	A
۸	FoM_{20}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	+	A
۹	FoM_{21}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	+	A
۱۰	FoM_{26}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	+	A
۱۱	FoM_{28}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	+	A
۱۲	FoM_{35}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	+	A
۱۳	FoA_{33}	فروردین ماه ۷۹	عقیلی	-	+	A
١٤	FoA_{38}	فروردین ماه ۷۹	عقیلی	-	+	A
۱۵	FoA_{48}	فروردین ماه ۷۹	عقیلی	-	+	A
١٦	FoA_{49}	فروردین ماه ۷۹	عقیلی	-	+	A
۱۷	FoA_{50}	اردیبهشت ماه ۷۹	عقیلی	-	+	A
۱۸	FoK_3	خرداد ماه ۷۸	کوشک مولا	-	+	B
۱۹	FoK_{11}	خرداد ماه ۷۸	کوشک مولا	-	+	B
۲۰	FoK_{14}	تیر ماه ۷۸	کوشک مولا	-	+	B
۲۱	FoK_{27}	تیر ماه ۷۸	کوشک مولا	-	+	B
۲۲	FoK_{32}	تیر ماه ۷۸	کوشک مولا	-	+	B
۲۳	FoM_{17}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	+	B
٢٤	FoM_{18}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	+	B
۲۵	FoA_{46}	اردیبهشت ماه ۷۹	عقیلی	-	+	B
٢٦	FoM_8	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	+	+	B
۲۷	FoM_{10}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	+	C
۲۸	FoM_{16}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	+	+	C
۲۹	FoK_{22}	خرداد ماه ۷۸	کوشک مولا	+	+	C
۳۰	FoK_{36}	تیر ماه ۷۸	کوشک مولا	+	+	C
۳۱	FoK_{37}	تیر ماه ۷۸	کوشک مولا	+	+	C
۳۲	FoK_{43}	تیر ماه ۷۸	کوشک مولا	+	+	C
۳۳	FoA_{47}	فروردین ماه ۷۹	عقیلی	+	+	C
٣٤	FoD_4	خرداد ماه ۷۸	داریون	-	+	D
۳۵	FoD_{30}	تیر ماه ۷۸	داریون	-	+	D
٣٦	FoD_{39}	تیر ماه ۷۸	داریون	-	+	D

ادامه جدول ۲

ردیف	جدایه	تاریخ نمونه برداری	محل نمونه برداری	نوع بیماری		گروههای سازگار رویشی (VCG)
				پوسیدگی خشک	پژمردگی	
۳۷	FoM_{25}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	+	D
۳۸	FoM_{29}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	+	D
۳۹	FoD_{9}	خرداد ماه ۷۸	داریون	-	+	E
٤٠	FoA_{40}	فروردین ماه ۷۹	عقیلی	-	+	E
٤١	FoA_{41}	فروردین ماه ۷۹	عقیلی	-	+	E
٤٢	FoA_{42}	فروردین ماه ۷۹	عقیلی	-	+	E
٤٣	FoA_{45}	اردیبهشت ماه ۷۹	عقیلی	-	+	E
٤٤	FoD_{5}	خرداد ماه ۷۸	داریون	-	+	F
٤٥	FoD_{7}	تیر ماه ۷۸	داریون	-	+	F
٤٦	FoD_{44}	تیر ماه ۷۸	داریون	-	+	F
٤٧	FoM_{19}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	+	+	G
٤٨	FoK_{23}	تیر ماه ۷۸	کوشک مولا	+	+	G
٤٩	FoM_{13}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	-	-	H
٥٠	FoM_{24}	خرداد ماه ۷۸	مهارلو	+	+	H

بحث

راندمان تولید موتانتهای نیت جدایه‌ها در محیط کشت MMC و PDC با کلرات پتاسیم ۱/۵ درصد بسیار ناچیز بوده ولی با استفاده از محیط کشت PDC ۳ درصد، از تمام جدایه‌ها موتانت بدست آمد. ونتر و همکاران به کمک محیط کشتهای PDC ۱/۵ درصد، از تمام جدایه‌های این فرم مخصوص، موتانتهای نیت بدست آوردند (۲۵). قلعه دزدانی و همکاران نیز از محیط کشتهای MMC و PDC، ۱/۵ درصد فقط تعداد اندکی موتانت در این فرم مخصوص جداسازی کردند. آنها برای جداسازی موتانتهای نیت از محیط کشتهای حاوی کلرات پتاسیم ۳ و ۴/۵ درصد استفاده نمودند (۱). در اکثر تحقیقات، محققان برای تولید موتانتهای نیت ازمحیط کشتهای حاوی کلرات پتاسیم ۱/۵ درصد استفاده کرده اند (۲، ۸ و۱۲). به عقیده کرل و همکاران[1] راندمان تولید موتانتهای نیت علاوه بر درصد و درجه خلوص کلرات پتاسیم، تحت تاثیر عوامل محیطی و نوع قارچ نیز می باشد (۱۰). در این تحقیق همچنین تعدادی از سکتورهای سریع الرشد بعد از انتقال به محیط کشت حداقل، بصورت تیپ وحشی رشد کردند. در بررسی کرل و همکاران معلوم شد این نوع از موتانتها از ازت بخوبی استفاده کرده و غالبا در جدایه‌هائی که ریسه چند هسته ای دارند بیشتر دیده می شود. در این نوع از جهش یافته‌گان، ریسه‌ها مخلوطی از هسته‌های حساس و مقاوم به کلرات را دارا هستند (۱۰).

آنالیز ژنتیکی موتانتهای نیت گونه Fo با گونه *F. moniliforme* تطبیق داده شده است و سه نوع فنوتیپ موتانت نیت در این گونه شناسائی گردیده است (۱۰). این فنوتیپها بر اساس نحوه رشد موتانت روی منابع مختلف ازت تعیین می‌شوند. در این تحقیق اکثر موتانتهای نیت از نوع *nit*1 (با فراوانی ۷۸/۹ درصد) بوده و موتانتهای *nit*3 (۱۲/۵ درصد) و *Nit*M (۸/۶ درصد) از فراوانی کمتری برخوردار

1- Correl *et al*

بودند. فراوانی موتانتهای *nit1* جدایه‌های آفریقای جنوبی و استان خراسان نیز از موتانتهای *nit3* و *Nit*M بیشتر بود (۱و ۲۵).

در آزمونهای مکمل سازی بین موتانتهای نیت جدایه‌ها درحالتی که از موتانتهای نیت *Nit*M در مقابل موتانتهای *nit1* یا *nit3* استفاده می‌شد، جوش خوردن و تشکیل هتروکاریون در مدت زمان کمتری و با تراکم بیشتری انجام می‌گرفت، نسبت به حالتی که از موتانتهای *nit1* در مقابل موتانتهای *nit3* استفاده می‌گردید.

در عمل مکمل سازی بین موتانتهای دو فنوتیپ مختلف از یک جدایه مادری مشخص شد، که تمام جدایه‌ها خودسازگار هستند. در بعضی از جدایه‌های یک فرم مخصوص یا یک گونه قارچی در محل برخورد موتانتهای نیت یک جدایه مادری گاهی اوقات هیچ گونه هتروکاریونی تشکیل نمی‌شود. هنوز مکانیزم دقیق و قانع کننده‌ای در این مورد شناسائی نگردیده است. پوهالا معتقد است که این حالت در اثر یک نوع جهش دو گانه روی می‌دهد که در بعضی از موتانتهای نیت یک جدایه اتفاق می‌افتد (۲۲). نظریه دیگر این که خود ناسازگاری یک صفت ارثی است که توسط یک جفت ژن کنترل می شود (۱۰). جاکوبسون و همکاران[1] پدیده خود ناسازگاری را در اثر یک نوع موتانت نیت مصنوعی می دانند (۱۴).

از عمل مکمل سازی موتانتهای نیت دو استانهای فارس و خوزستان، تعداد ۸ گروه سازگار رویشی شناسائی گردید. در استان خراسان نیز قلعه دزدانی و همکاران از ۴۰ جدایه این فرم مخصوص، تعداد ۸ گروه سازگار رویشی شناسائی کرده‌اند (۱). از ۳۲ جدایه آفریقای جنوبی، ۶ گروه سازگار رویشی گزارش شده است (۲۵). مسلما گروههای سازگار رویشی این فرم مخصوص در دو استان فقط محدود به این ۸ گروه نمی‌شود، زیرا افزایش دفعات نمونه برداری از یک منطقه یا از مناطق دیگر احتمال جداسازی جدایه‌های جدیدی را که در گروههای جدید قرار گیرند، فراهم می‌سازد. سیدو[2] معتقد است، عواملی چون ژنتیک، نحوه تولید مثل قارچ، تعداد و منابع نمونه‌های قارچی، در تعداد گروههای سازگار رویشی یک گونه یا فرم مخصوص مؤثر است (۲۳).

در این تحقیق بین بیماریزائی و گروههای سازگار رویشی جدایه‌ها رابطه مستقیمی وجود داشت. بطوری که جدایه‌های یک گروه یا فقط یک نوع بیماری را ایجاد می‌کردند (پوسیدگی خشک یا پژمردگی آوندی) و یا مولد هر دو بیماری بودند. از ۶ گروه سازگار رویشی شناسائی شده در آفریقای جنوبی نیز یک نوع ارتباط بین گروههای سازگار رویشی و نوع بیماریزائی جدایه‌های آن گروهها وجود داشت، به این صورت که در دو گروه جدایه‌ها فقط پوسیدگی خشک غده را ایجاد کرده، در دو گروه دیگر پوسیدگی انتهائی ساقه و جدایه‌های دو گروه دیگر پژمردگی آوندی را ایجاد می‌کردند، البته تعداد اندکی از جدایه‌ها هر سه نوع بیماری و یا دو نوع از آن را ایجاد می کردند. ونتر و همکاران بیان داشتند، رابطه مستقیمی بین بیماریزائی جدایه‌ها و گروههای سازگار رویشی در این فرم مخصوص وجود دارد (۲۵). در استان خراسان نیز یک چنین رابطه‌ائی بین بیماریزائی و گروههای سازگار رویشی وجود داشته است (۱). همچنین ونتر و همکاران موفق شدند به کمک گروههای سازگار رویشی در این فرم مخصوص جدایه‌های بیماریزا را از جدایه های غیر بیماریزا تفکیک کنند (۲۵). پوهالا برای اولین بار به کمک گروههای سازگار رویشی موفق به تفکیک جدایه‌های فرمهای مخصوص Fo از یکدیگر شد. وی معتقد است که ژنهای کنترل

1- Jacobson *et al*

2- Sidho

کننده سازگار رویشی همبستگی نزدیکی با ژنهای کنترل کننده بیماریزائی دارند (۲۲). تا کنون نیز تحقیقات زیادی بر روی بیماریزائی و ارتباط آن با گروههای سازگار رویشی در فرمهای مخصوص این گونه انجام شده است (۱۶). همچنین در بعضی از فرمهای مخصوص که دارای نژادهای فیزیولوژیک هستند، وجود چنین رابطه‌ای بیماری شناسان را بر آن داشته تا به کمک گروههای سازگار رویشی، بیماریزائی نژادهای فیزیولوژیک در میزبانها را تفسیر کنند (۳ و ۴).

در این تحقیق الگوی خاصی بین پراکنش گروههای سازگار رویشی و مناطق جغرافیائی جدایه‌ها مشاهده نگردید و در هر گروه جدایه‌هائی از مناطق مختلف دو استان وجود داشتند. در استان خراسان نیز مشابه آفریقای جنوبی، پراکندگی خاصی بین گروهها و مناطق جغرافیائی جدایه‌ها وجود نداشت (۱ و ۲۵). پراکنش قارچ در فرم مخصوص *F.o.tuberosi* از طریق غده‌های آلوده به مناطق مختلف شاید از دلایل این مسئله باشد. در بعضی از فرمهای مخصوص حتی با وجود زیاد بودن گروههای سازگار رویشی، بعضی از مناطق جغرافیائی فقط محدود به یک یا تعداد محدودی گروه هستند، به طوریکه به کمک این گروهها می‌توان منطقه جغرافیائی یک جدایه جدید را تخمین زد (۱۵). استفاده از گروههای رویشی در ردیابی جدایه‌ها در مناطق مختلف جهت ترسیم الگوی پراکنش، این امکان را فراهم می‌سازد تا تنوع ژنتیکی و ارتباطات ژنتیکی جدایه‌های یک گونه یا فرم مخصوص را بین مناطق مختلف بررسی کرده تا از این طریق منبع یا منابع ژنتیکی تشکیل دهنده آن گونه یا فرم مخصوص را ردیابی کرد (۲ و ۱۱). در این بررسی جدایه‌های دو استان در ۴ گروه مشترک قرار گرفتند و از این رو با هم قرابت ژنتیکی داشته و می‌توان ادعا کرد که جدایه‌های دو استان از لحاظ ژنتیکی شباهت زیادی با هم دارند. وجود چنین ارتباطی بین جدایه‌ها احتمالا نشانگر انتشار سیب زمینیهای آلوده به قارچ Fo از مناطق مشترک به دو استان و یا از یک استان به استان دیگر در طول سالیان گذشته است. مطالعات بیشتر در زمینه گروههای سازگار رویشی در این فرم مخصوص در تمام استانهای کشور می‌تواند اطلاعات کاملی از تنوع، ارتباطات و پراکندگی ژنتیکی جمعیت های این فرم مخصوص ارائه داده که می‌توان از آنها در امر مدیریت بیماری استفاده نمود.

منابع

۱. قلعه دزدانی، ح.، فلاحتی رستگار، م.، جعفرپور، ب. و مرادزاده اسکندری، م. ۱۳۸۲. تعیین گروههای سازگار رویشی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* در استان خراسان. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۳۴، شماره ۱، صفحات ۷۶-۶۷

2. Alves– Santos, F. M., and Benito, E. P. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. Applied and Environmental Microbiology 65: 3335-3340.

3. Bentley, S., Pegg, K. G., Moore, N. Y., Davis, R. D., and Buddenhagen, I. W. 1998. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. Phytopathology 88: 1283-1293.

4. Bodker, L., Lewis, B. G., and Coddington, A. 1993. The occurrence of a new genetic variant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. Plant Pathology 42: 833-838.

5. Booth, C. 1971. The Genus Fusarium. CMI. Kew, Survey, UK. 237 p.

6. Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., and Backhous, D. 1994. Laboratory Manual for Fusarium Research. *Fusarium* Reserch Laboratory, Department of Crop Scince, University of Sydny and Royal Botanic Gardens, 133 p.

7. Caesar, A. J. 1996. Identity, pathogenicity, and comparative virulence of *Fusarium* spp. related to stand declines of leafy spurge (*Euphorbia esula*) in the Northern Plains. Plant Disease 80: 1395-1398.

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. 1991. The relationship between formae specialis, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 81: 1061-1064.

10. 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.

11. Elias, K. S., and Schneider, R.W. 1992. Genetic diversity within and among races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* as determined by isozyme analysis. Phytopathology 82: 1421-1427.

12. 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.

13. Huguelet, J. E., and Hooker, W. J. 1981. *Fusarium* wilts. pp. 60-62. In: Hooker, W.J. (Ed.) Compendium of Potato Diseases. APS Press.Minnesuta USA. 125 p.

14. Jacobson, D. J., and Gordon, T. R. 1988. Vegetative compatibility and self incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Phytopathology 78:668-672.

15. Jacobson, D. J., and Gordon, T. R. 1990. Further investigation of vegetative compatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Canadian Journal of Botany 68: 1245- 1248

16. Katan, T., and Primo, P. 1999. Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxyspoum*. Phytoparasitica 27: 273-277.

17. Kistler, H. C. 1997. Genetic diversity in the plant pathogenic fungus, *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 87: 474-479.

18. Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology 31: 127-150.

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

20. Ploetz, R. C., and Correll, J. C. 1988. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Plant Disease 72: 325-328.

21. Puhalla, J. E. 1984. Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *apii* in California and their genetic interrelationships. Canadian Journal of Botany 62: 546-550.

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

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

24. Theron, D. j., and Holz, G. 1989. *Fusarium* species associated with dry and stem-end rot of potatoes in South Africa. Phytophylactica 21: 175- 181.

25. Venter, S. L., Theron, D. J., Steyn, P. J., Ferreira, D. I., and Eicker, A. 1992. Relationship between vegetative compatibility and pathogencity of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* from potato . Phytopathology 82: 858-862.

26. 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, RFLPs, and RAPD. Phytopathology 86: 966-973.

27. Yoder, D. C., Valent, B., and Chumley, P. 1989. Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. Phytopathology 76: 383-385.

28. Zuniga, T. L., Zitter, T. A., Gordon, T. R., Schroeder, D. T., and Okamoto, D. 1997. Characterization of pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* causing *Fusarium* wilt of melon in New York. Plant Disease 81:592-596.

Determination of Vegetative Compatibility Groups and Pathogenicity in Population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tuberosi* from Potato in Fars and Khuzestan provinces

E. Rahkhodaei[1] and R. Farokhi Nejad[2]

Abstract

F.oxysporum f.sp. *tuberosi* is the causal agent of wilt, dry rot and stem end rot in potato (*Solanum tuberosom*). This investigation was carried out during 1999-2000 growing seasons to determine pathogenicity and vegetative compatibility groups in population of *F.o.* f.sp. *tuberosi*. Diseased poptato plants were collected from major potato producing areas in Fars (Daryon, Kooshkemola, & Maharloo) & Khuzestan (Aghili) Provinces. Totally, 57 isolates of *F.oxysporum* were isolated from root, crown and stem of potato using acidified PDA and Nash & Snyder media. Fifty of these were selected for the study. Results of the pathogenicity tests showed that 98% of isolates were pathogenic to potato plants, causing wilt disease symptoms on Draga cultivar plants, and a bout 20% of these isolates caused dry rot symptoms on tubers of the same cultivar. Collectively 607 *nit* mutants were generated on PDC containing 3% $KClO_3$. *nit* mutant phenotypes were identified based on their growth on Basal Medium (BM) containing one of the four different nitrogen sources (nitrate, nitrite, ammonium and hypoxantine). Results showed that 78.9%, 12.5% and 8.6% of *nit* mutants were *nit*1, *nit*3 and *Nit*M respectively. The complementation test showed that there was 8 vegetative compatible groups among the isolates. There was a relationship between VCGs and disease type. Groups A, B, D, E and F caused wilting but members of C, G and H groups produced both dry rot and wilting. No relation was found between geographic origin of the isolates and their VCGs. Only isolates of F and H groups were found in the same location.

Keywords: *Fusarium, Potato, Vegetative Compatibility Groups, Fars, Khuzestan*

1- Former graduate student, Dep. of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz , Khuzestan, Iran (rahkhodaei@yahoo.com).

2- Associate Professor, Dep. of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz , Khuzestan, Iran.