



تعیین تنوع ژنتیکی و بیماریزایی جدایه‌های *Fusarium solani* نخود ایرانی با استفاده از نشانگرهای AFLP و RAPD در استانهای خراسان رضوی و شمالی

فاطمه حسن زاده داورانی^{۱،۲*}

^۱ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رفسنجان، گروه بیماری شناسی گیاهی، رفسنجان، ایران
^۲ عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد رفسنجان، رفسنجان، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۱

چکیده

بیماری پوسیدگی سیاه ریشه نخود با عامل *Fusarium solani* f. sp. *pisi* یکی از مهمترین بیماری‌های قارچی نخود در ایران از جمله استان خراسان رضوی و شمالی به شمار می‌رود. با توجه خلاء علمی در خصوص تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این قارچ، از نشانگرهای AFLP و RAPD با هدف تعیین تنوع ژنتیکی و بیماریزایی جدایه‌های استفاده گردید. لذا از ۵۰ مزرعه در مناطق عمده نخود کاری استان‌های خراسان رضوی و شمالی نمونه برداری صورت گرفت. پس از جداسازی، خالص سازی و اثبات بیماریزایی ۲۸ جدایه بیماری‌زا *F. solani* به دست آمد. بررسی دامنه میزبانی جدایه‌های بیماری‌زای حاکی از عدم بیماری‌زایی روی گیاهانی همچون عدس، لوبیا، ماش، سویا، نخودفرنگی، گوجه فرنگی، خربزه و هندوانه بود و تنها در دو گونه گیاهی نخود و نخود فرنگی علائم پوسیدگی ریشه را مشاهده گردید. نتایج تنوع ژنتیکی با استفاده از ۱۲ نشانگر RAPD نشان داد که هفت آغازگر چند شکلی را به خوبی نشان می‌دهند. بر این اساس ۲۸ جدایه *F. solani* بدون توجه به منطقه جغرافیایی در گروه‌های ژنوتیپی مختلفی قرار گرفتند. کاربرد AFLP با استفاده از چهار ترکیب آغازگری *EcoRI/MseI*، تعداد ۳۳۰ باند قابل امتیازدهی ایجاد کرد، که ۱۱۰ باند (حدود ۳۴٪ باندها) چند شکلی نشان دادند. فاصله ژنتیکی بین جفت جدایه‌ها بین ۰/۰۶ تا ۰/۷۸ متغیر بود. دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش UPGMA، چهار گروه ژنوتیپی در ۲۰ جدایه *F. solani* f. sp. *pisi* مشخص و تجزیه چند بعدی نیز آن را تایید نمود. تکنیک AFLP به خوبی توانست جدایه‌ها با توان بیماری‌زایی مشابه را تفکیک کند.

کلمات کلیدی: *F. solani* f. sp. *pisi*، تنوع ژنتیکی، AFLP، RAPD.

مقدمه

بین گونه‌ای فوزاریوم با موفقیت به کار رفته است (O Donnel 2000, Godoy et al., 2004, Zahng et al., 2006) و این روش‌ها نشان دادند که *F. Solani* یک گونه مرکب شامل بیش از ۲۶ گونه مشخص فیلوژنتیکی است. کاربرد روش RAPD که در آن از یک آغازگر چند نوکلئوتیدی کوتاه تصادفی برای تکثیر توالی های DNA استفاده می‌شود، به علت عدم نیاز به اطلاعات توالی DNA ژنوم بیمارگر، سرعت و سهولت کاربرد آن توسعه زیادی یافته‌است. به ویژه استفاده از RAPD برای تعیین تفاوت و تنوع درون گونه‌ای در میکروارگانیسم‌ها موفقیت‌آمیز بوده‌است. کاربرد نشانگرهای مبتنی بر AFLP در تعیین تنوع بین و درون گونه‌ای در قارچ‌ها مخصوصاً "گونه‌های فوزاریوم کمک زیادی نمود به عنوان مثال مطالعه فیلوژنی گونه‌های جنس فوزاریوم (Abd- Elsalam et al., 2003)، تعیین تنوع جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *lentis* (Abdel- Satar et al., 2003)، گوناگونی جدایه‌های *F. solani* در اتیوپی (Bogale et al., 2009) و طراحی آغازگرهای اختصاصی مشتق از نشانگر AFLP در ردیابی *F. solani* عامل پوسیدگی قهوه‌ای ریشه بادام زمینی (Casasnovas et al., 2013).

در پژوهشی Moradzade Eskandari et al (2009) با استفاده از نشانگر مولکولی FAFLP^۱ ساختار ژنتیکی ۱۴۹ جدایه ایرانی *F. solani* از چهار جمعیت میزبانی (سیب زمینی، کدوئیان،

پوسیدگی سیاه ریشه نخود اولین بار از آمریکا و هند در سال ۱۹۶۹ گزارش و عامل آن *Fusarium solani* معرفی شد (Kraft, 1969; Sharma et al., 1983). قارچ *F. solani* خاکزاد بوده و از پراکنش وسیعی برخوردار بوده و حداقل سه جنس و ۸۷ گونه گیاهی را آلوده می‌کند (Bogale et al., 2009). جدایه‌های *F. solani* از نظر بیماری‌زایی متفاوت بوده و بر اساس دامنه میزبانی و آزمون بیماری‌زایی به فرم‌های تخصص یافته‌ای تقسیم می‌شوند. تا کنون ۱۱ فرم تخصص یافته در این گونه شناسایی شده است (Suga et al., 2002). در پژوهش Westerlund et al. (1974) جدایه‌های *F. solani* به دست آمده از نخود ایرانی بر روی نخودفرنگی نیز بیماری‌زا بودند و نشان داده شد که پوسیدگی سیاه ریشه در نخود در حقیقت همان فرم اختصاصی *F. solani* f. sp. *pisi* است که در نخودفرنگی نیز پوسیدگی ریشه را ایجاد می‌کند. در پژوهشی Mohammadi and Banihashemi (2005) ۵۳ جدایه *F. solani* از مناطق مختلف استان فارس جداسازی و فرم اختصاصی آنها را *F. solani* f. sp. *pisi* گزارش نمودند. بررسی تنوع ژنتیکی در قارچ فوزاریوم از طریق مطالعه‌های معمول مورفولوژیکی و گروه‌های سازگار رویشی دارای محدودیت‌هایی می‌باشد و از حساسیت کافی برای تمایز جدایه‌ها برخوردار نیستند. تاکنون روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی جهت تخمین تنوع ژنتیکی درون و

^۱ Fluorescent AFLP

مواد و روشها

جمع آوری نمونه‌ها

نمونه‌برداری از ۵۰ مزرعه نخود از مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی و شمالی شامل شهرهای مشهد، قوچان، چناران، کاشمر، فاروج، تربت حیدریه، بجنورد، فریمان، شیروان و خواف صورت گرفت. از هر مزرعه ۸-۱۰ بوته که دارای علائم زردی، پژمردگی و پوسیدگی ریشه بودند با بیلچه و به طور کامل از خاک خارج (طوری که ریشه‌ها آسیب نبینند) و در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید.

جداسازی قارچ *Fusarium solani*

برای جداسازی، اندام گیاهی و به خصوص ریشه‌ها با آب معمولی شسته و از قسمت‌های مختلف ریشه، طوقه ساقه قطعات ۳-۵ میلی متری تهیه و در هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۲-۱/۵ دقیقه برای ضدعفونی دقیقه قرار داده. پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، قطعات با استفاده از کاغذی خشک و در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA اسیدی قرار داده شدند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵°C و تاریکی به مدت ۵ تا ۷ روز قرار گرفتند. کلنی‌های رشد کرده خالص سازی و پس از تهیه کشت‌های تک اسپوری در لوله‌های حاوی محیط کشت PDA برای آزمایشات بعدی نگهداری شدند.

لوبیا و نخود) را بررسی و گزارش نمودند میانگین تنوع ژنتیکی برای همه جدایه‌های مورد بررسی و تمامی جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه بر اساس ضریب Nei برابر ۰/۳۸۸۳ بود و تنوع ژنتیکی مشاهده شده با میزبان و مناطق جغرافیایی جدایه‌ها ارتباطی نداشت و چهار جمعیت میزبانی یک دودمان کلونی هستند و احتمال جریان ژنی بین جمعیت‌ها وجود دارد. پر واضح است که برنامه ریزی علمی جهت کنترل این فرم تخصص یافته و خسارت حاصل از آن در عرصه کشاورزی بدون حصول اطلاعات دقیق بیماری‌زایی و ژنتیکی امکان پذیر نخواهد بود.

سطح زیر کشت نخود در ایران حدود ۵۵۰ هزار هکتار و در استان خراسان در سال ۸۴-۸۳ معادل ۳۳۸۰۰ هکتار بوده است که ۲۸۰۰ هکتار از آن به کشت آبی و ۳۱۰۰۰ هکتار به کشت دیم اختصاص داده شده است. از این رو در بین حبوبات تولیدی در ایران مقام اول را به خود اختصاص داده است. با توجه به اهمیت تولید گیاه نخود در استان خراسان و میزان خسارت بیماری مهم پوسیدگی سیاه ریشه، این پژوهش با هدف تعیین تنوع ژنتیکی، دامنه میزبانی و بیماری‌زایی جدایه‌های *F. solani* نخود ایرانی با استفاده از نشانگرهای RAPD و AFLP در استانهای خراسان رضوی و شمالی انجام شد.

تشخیص *F. solani*

تشخیص جدایه‌های بدست آمده بر اساس خصوصیات موفولوژیکی اندام‌های تولید مثل رویشی همچون اسپوردوکیوم‌ها، ماکروکنیدیوم‌ها، شکل و رنگ پرگنه، چگونگی تولید میسلیم و میکروکنیدیوم‌ها صورت گرفت. Nelson et al. (Burgess et al. 1994; 1994).

بذور کشیده و ظروف جهت جوانه‌زنی بذر در دمای ۲۵°C قرار داده شدند. بعد از ۳-۲ روز بذور جوانه‌زده به طور مستقیم در گلدان‌ها کشت گردیده و در گلخانه نگهداری شدند.

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی نخود و تعیین فرم اختصاصی

برای مایه‌زنی گیاهان نخود با جدایه‌های *F. solani*، ابتدا در هر گلدان ۴ عدد بذر نخود گندزدایی شده با هیپوکلریت سدیم کشت گردید. پس از رشد گیاهچه‌های نخود خاک اطراف هر بوته کنار زده شد و دور طوقه هر بوته پنج عدد بذر گندم کلنیزه شده با قارچ ریخته شد (Westerlund et al. 1974). گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲۵-۲۰ نگهداری و هر روز جهت مشاهده علائم پژمردگی از گلخانه بازدید به عمل آمد. هر جدایه قارچی سه تکرار و هر تکرار شامل ۴ گیاه بود. جهت تعیین فرم اختصاصی جدایه‌ها، گیاهان لوبیا، عدس، ماش، سویا، گوجه فرنگی، خربزه، نخود فرنگی و هندوانه مشابه روش فوق مایه‌زنی شدند.

ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها

برای ارزیابی شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها از شاخص ۹ درجه‌ای پیشنهاد شده برای فوزاریوم‌های مولد پژمردگی و پوسیدگی ریشه در نخود استفاده شد (Bhatii and Kraft, 1992). نمره ۱؛ گیاه به طور کامل سالم بوده و هیچ علائمی ندارد، نمره ۳؛ مشاهده علائم پژمردگی

سنجش بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium solani*

پرورش مایه تلقیح جدایه‌ها

برای اثبات بیماری‌زایی و تعیین فرم اختصاصی جدایه‌ها، پرورش مایه تلقیح بر روی دانه گندم صورت گرفت. بذور گندم به مدت یک شب در فلاسک‌های حاوی آب معمولی خیسانده شدند و پس از شستشو سه دفعه (به صورت یک روز در میان) و هر دفعه به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ و فشار ۱ اتمسفر) سترون شدند. به هر فلاسک ۵-۴ بلوک میسلیمی از هر جدایه اضافه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰-۱۴ روز در تاریکی نگهداری شد.

کاشت بذور نخود

بذور نخود به مدت ۱۵-۱۲ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۵٪/۰ گند زدایی و سه دفعه و هر دفعه به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر شسته شدند، سپس به مدت یک شب در ظروف یکبار مصرف حاوی آب مقطر قرار گرفتند. پس از این مدت آب ظرفها خارج و پارچه مرطوبی روی

تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از نشانگر

RAPD-PCR

در این پژوهش از ۱۲ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی کاملاً تصادفی (شرکت سیناژن) استفاده شد (جدول ۱). واکنش‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل 50Mm MgCl₂ (۲)، PCR- Buffer 10x (۲/۵)، d NTP Mix 10Mm (۰/۵)، DNA 25ng/μl (۱/۵)، Primer 10pmol (۳)، dd H₂O (۰/۲۵) Taq DNA Polymeraz (۱۵/۲۵) بود. شاهد منفی در واکنش‌ها، شامل تمام مواد فوق به استثنای DNA الگو بود. چرخه‌های دمایی به کار رفته در PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ به مدت ۳ دقیقه و چهار چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۳۵ به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ به مدت ۳ دقیقه و در خاتمه یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه بود (Williams et al. 1990). پس از اتمام عمل ۷ میکرولیتر از تولیدات روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و تحت ولتاژ ۷۵ و جریان ۵۰۰ میلی آمپر به مدت ۲/۵ ساعت الکتروفورز شدند. ژل الکتروفورز پس از نیم ساعت رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و ۴۵ دقیقه رنگ بری غیر اختصاصی در آب مقطر توسط دستگاه مشاهده و عکس‌برداری شد.

در تعداد کمی از برگها، یا کمتر از ده درصد سیستم ریشه بافت مرده شده‌است، نمره ۵؛ حدود ۲۰ درصد شاخ و برگها دچار پژمردگی شده یا ۲۵ درصد هیپوکوتیل توسط لکه‌های بافت مرده پوشیده شده‌است، نمره ۷؛ حدود ۵۰ درصد شاخ و برگها دچار پژمردگی شده و گیاهان نسبت به گیاهان سالم از رشد کمتری برخوردارند یا حدود ۵۰ درصد سیستم ریشه و هیپوکوتیل توسط لکه‌های بافت مرده پوشیده شده و تعداد ریشه‌ها کاهش می‌یابد، نمره ۹؛ گیاهان دچار پژمردگی و کاهش رشد شدید شده و در نهایت می‌میرند یا سیستم ریشه و هیپوکوتیل به شدت پوسیده و در نهایت گیاه خشک می‌شود. اعداد ۲، ۴، ۶ و ۸ برای مواردی است که علائم مشاهده شده حد واسط اعداد گفته شده‌است.

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Fusarium*

solani

استخراج DNA

برای استخراج DNA، جدایه‌های قارچی به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در محیط کشت PDB بر روی شیکر قرار داده شدند. پس از بدست آوردن میسلیوم جدایه‌ها، از روش CTAB برای خالص سازی DNA استفاده گردید (Weising et al. 1995). کمیت و کیفیت DNA خالص شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتوفتومتر تعیین شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای RAPD مورد استفاده جهت تفکیک جدایه‌های *F. solani*

Table 1- Primers sequence used in RAPD.

توالی Sequence	نام پرایمر Primer name
	Rco 8
5' – GGATGTCGAA – 3'	
5' – GCTCCCCAC – 3'	VBC 199
5' – GGGCCCGAG – 3'	VDC 82
5' – CTCCTGCCAA – 3'	OPK 19
5' – CTCCTGAGC – 3'	VBC 53
5' – GATAACGCAC – 3'	RCO 9
5' – GGCTAGGGCG – 3'	VBC 300
5' – CTCCTGCCAA – 3'	OPK 15
5' – GGGCTCGTGG – 3'	VBC 83
5' – AAGCCTCCCC – 3'	VBC 222
5' – GCTGGGCCGA – 3'	VBC 228
5' – CCTGGGCCTA – 3'	VDC 6

اتصال قطعات برشی به رابط‌ها

به منظور دو رشته‌ای کردن رابط‌ها ۵ میکرولیتر از هر کدام از رشته‌های رفت و برگشت رابط *EcoRI* و ۵ میکرولیتر از هر کدام از رشته‌های رفت و برگشت رابط *Tru9I* در چرخه دمایی ۶۵ (۱۰ دقیقه)، ۳۷ (۱۰ دقیقه) و ۲۵ درجه سلسیوس (۱۰ دقیقه) قرار گرفتند. برای انجام واکنش‌های اتصال، هر نمونه ۴۵ میکرولیتری حاوی ۴۰ میکرولیتر قطعات DNA برش خورده، پنج میکرولیتر رابط دو رشته‌ای مربوط به *EcoRI*، ۵۰ میکرولیتر رابط دو رشته‌ای مربوط به *Tru9I*، یک میکرولیتر بافر، ۲ میلی مولار ATP، یک واحد از دو آنزیم برشی و یک واحد T4 DNA Ligase در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت سه ساعت قرار گرفت (Vos et al., 1995).

تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از نشانگر

AFLP

برای برش آنزیمی هر نمونه ۴۰ میکرولیتری حاوی ۵۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۴ میکرولیتر بافر OPA، ۵ واحد از هر کدام از آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *Tru9I* (جدول ۲) و ۳۰/۴۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر سترون شده بود. واکنش برش در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت انجام گرفت (Vos et al., 1995). برای اطمینان از برش موفق، از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد با شرایط ولتاژ ثابت ۸۰ به مدت ۱/۵ ساعت استفاده شد. عدم وجود باندها در ناحیه DNA ژنومی نشان از انجام صحیح برش بود.

جدول ۲- آنزیم‌های برشی، آدابتورها و آغازگرهای تکثیر انتخابی در تکنیک AFLP.

Table 2- Restriction enzymes, adaptors and primers for selective amplification in AFLP technique.

آدابتور adaptors	آنزیم برشی Restriction enzymes
5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTC AT-5' توالی مرکزی جایگاه برشی	<i>Mse I</i>
5' CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGG TTAA-5' توالی مرکزی جایگاه برشی	<i>EcoR I</i>
آغازگر تکثیر پیش انتخابی primers for pre-selective amplification	
Primer- <i>EcoR I</i> + 0	5'- GACTGCGTACCAATTC-3'
Primer- <i>Mse I</i> + 0	5'- GATGAGTCCTGAGTAA-3'
آغازگر تکثیر انتخابی primers for selective amplification	
<i>MseI</i> آغازگرهای	<i>EcoR I</i> آغازگرهای
5' GATGAGTCCTGAGTAAAG 3'	5' GACTGCGTACCAATTCAC 3'
5' GATGAGTCCTGAGTAAAG 3'	5' GACTGCGTACCAATTCAG 3'
5' GATGAGTCCTGAGTAAAC 3'	5' GACTGCGTACCAATTCAG 3'
5' GATGAGTCCTGAGTAAACG 3'	5' GACTGCGTACCAATTCAG 3'

تکثیر پیش انتخابی

هیچ تکثیر انتخابی در این مرحله برای آغازگرها در نظر گرفته نشد. اجزای یک محلول ۲۵ میکرولیتری عبارت بودند از ۴ میکرولیتر DNA پنج برابر رقیق شده حاصل از مرحله اتصال، ۵۰ نانوگرم از هر کدام از آغازگرهای پیش انتخابی، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR غلظت ۱X، ۲ میلی مولار MgCl₂، ۰/۲ میلی مولار مخلوط نوکلئوتیدی، یک واحد تک پلی مراز و ۱۴/۸ میکرولیتر آب سترون. واکنش در دستگاه ترمال سایکلر انجام شد.

تکثیر انتخابی

آغازگرهای انتخابی نیز از شرکت SIB Enzyme (کشور روسیه) خریداری شدند و دارای دو نوکلئوتید انتخابی بودند (جدول ۲). مخلوط ۲۰ میکرولیتری واکنش متشکل از ۳ میکرولیتر DNA سه بار رقیق شده حاصل از تکثیر پیش انتخابی، ۵۰ نانوگرم از هر کدام از آغازگرهای انتخابی، یک میکرولیتر بافر PCR غلظت ۱X، ۲/۵ میلی مولار MgCl₂، ۰/۱ میلی

پرگنه‌ی جدایه‌های *F. solani* از نظر رنگ و مورفولوژی بسیار متنوع بود (شکل ۱). بعضی جدایه‌ها دارای رنگریزه و رشد آنها به صورت دواير متحدالمركز منظم و يا نامنظم بود. ماکروکنیدیوم‌ها معمولاً دارای چهار تا پنج دیواره عرضی و کمی حالت خمیدگی داشتند. سلول انتهایی آنها گرد و درشت و سلول پایه کمی فرورفته بود. طول ماکروکنیدیوم‌ها ۴۸-۳۸ میکرون و عرض آنها ۵-۳/۷ میکرون اندازه‌گیری شد (شکل ۱). ماکروکنیدیوم‌ها بر روی فیالیدهای حاصل از اسپورودکیوم در محیط CLA تشکیل و به رنگ کرم و تا سبز مایل به آبی بودند. میکروکنیدیوم‌ها به تعداد زیاد و عموماً تک سلولی و گاهی دو سلولی، بیضی شکل، تخم مرغی و قلوهای شکل مشاهده شد. میکروکنیدیوم‌ها به صورت مجتمع بر روی منوفیالیدهای خیلی بلند، ساده و یا در سرهای دروغین تشکیل شدند. از ۷۸ جدایه به دست آمده ۲۸ جدایه به *F. solani* تعلق داشت. علائم بیماری در آزمون‌های بیماری‌زایی شامل زردی و پژمردگی اندام‌های هوایی و پوسیدگی ریشه بود (شکل ۲).

مولار مخلوط نوکلئوتیدی، یک واحد تک پلی مرز و ۱۱/۳ میکرولیتر آب سترون بود.

الکتروفورز عمودی و رنگ آمیزی ژل‌ها

محصولات تکثیری روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ واسرشت کننده در دستگاه الکتروفورز عمودی مدل پایا پژوهش تزریق شد. یک محلول ۱۱۰ میلی‌لیتری ژل با استفاده از ۵۰ گرم اوره، ۱۱ میلی‌لیتر TBE پنج برابر، ۱۹/۲۵ میلی‌لیتر محلول اکریلامید ۴۰٪ و تا حجم ۱۱۰ میلی‌لیتر آب سترون تهیه شده و ۷۵۰ میکرولیتر آمونیوم پیرسولفات ۱۰ درصد همراه با ۱۵۰ میکرولیتر تمد به آن اضافه شد. پس از واسرشت سازی نمونه‌ها و انجام الکتروفورز مقدماتی الکتروفورز فراورده‌ها در ولتاژ ثابت ۱۰۰۰ و به مدت ۳ ساعت در دمال ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به منظور مشاهده باندها از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل باندها

برای تجزیه و تحلیل داده‌های ملکولی، علامت ۱ برای حضور باند و علامت ۰ برای عدم حضور باند در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل در نرم افزار Pop Gene 32 برای نشانگرهای غالب وارد شد و رسم دندروگرام با نرم افزار NTYSIS صورت گرفت.

نتایج و بحث



شکل ۱- تنوع رشدی (A)، ماکروکنیدی (B) و میکروکنیدی تولید شده بر روی فیالیدهای بلند (C) و اسپوردوکیوم (D) در جدایه‌های *Fusarium solani* f. sp. *pisi*

Figure 1- Growth diversity (A), macroconidia (B), microconidia produced on long phialides (C) and sporochium (D) in of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* isolates.

(شکل ۳). کاربرد نشانگر نشان داد که تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی در بین این جدایه‌ها وجود دارد. آغازگر VBC222 بیشترین باند چند شکل (۱۸ باند) و آغازگر VBC82 کمترین باند چند شکل (۶ باند) را تولید کردند. آغازگر VBC83 چون شاخص تنوع ژنتیکی بالایی نسبت به بقیه آغازگرها داشت (۳۷٪) به عنوان بهترین آغازگر شناخته شد. نتایج نشان داد که تکنیک RAPD از پتانسیل بالایی در تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. solani* f. sp. *pisi* برخوردار است

در دامنه میزبانی علائم فقط روی نخود و نخود فرنگی مشاهده شد و فرم اختصاصی قارچ به عنوان *F. solni* f. sp. *pisi* شناسایی شد. در تکنیک RAPD از میان ۱۲ آغازگر تست شده روی ۲۸ جدایه با منشاء جغرافیایی متفاوت، تعداد هفت آغازگر چند شکلی خوبی را نشان دادند. آغازگر VBC300 در اکثر نمونه‌ها تکثیری نشان نداد. اندازه محصولات تکثیر شده بین ۳۵۰۰ - ۵۰۰ bp بود. در واکنش‌های شاهد منفی نیز هیچ باندهای مشاهده نگردید

(M-AG)، (E-AG, M-AC)، (E-AG, M-AG) و (E-AG, M-CG) در مجموع ۳۳۰ باند قابل امتیاز دهی با اندازه بین ۱۰۰-۹۰۰ bp ایجاد نمود. از کل باندهای ایجاد شده ۱۱۰ باند (حدود ۳۴٪ باندها) چند شکلی نشان دادند (شکل ۵). میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر جفت آغازگر ۸۲/۵ و میانگین تعداد باندهای چند شکلی به ازای هر جفت آغازگر ۲۷/۵ بود. توانایی جفت آغازگرهای مختلف در آشکار سازی چند شکلی در بین جدایه‌های *F. solani* f. *sp. pisi* متغیر بود. در این میان ترکیب آغازگری E-AC, M-AG دارای بیشترین تعداد باند چند شکلی (۳۱ باند) و ترکیب آغازگری E-AG, M-CG دارای کمترین تعداد باند چند شکلی (۲۵ باند) بود متوسط تعداد آل موثر در هر لوکوس (Ne) برای تمام ترکیبات آغازگری ۰/۱۳۲۱۰ ± ۱/۵۴۳۲ محاسبه گردید، که با توجه به نزدیک بودن این عدد به تعداد آل واقعی یعنی دو، دلیل بر تاثیر خوب آل‌ها در چند شکلی بالا و برآورد تنوع ژنتیکی می‌باشد. شاخص تنوع ژنی بر اساس داده‌های به دست آمده از هر جفت آغازگر بین ۰/۲۹ تا ۰/۳۸ متغیر بود. کمترین مقدار شاخص تنوع ژنی برای ترکیب آغازگری E-AC, M-AG و بیشترین مقدار این شاخص برای ترکیب آغازگری E-AG, M-CG محاسبه شد. به منظور محاسبه سطح تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها از ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد. بر اساس داده‌های AFLP، فاصله ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین ۰/۰۶ تا ۰/۷۸ متغیر بود و میانگین فواصل

و در سطح تشابه ۶۵٪، ۱۶ گروه ژنوتیپی (از A تا P) تفکیک گردید. نتایج محاسبه فاصله ژنتیکی نشان داد که دو جدایه FA, FS9 (به ترتیب از مشهد و فریمان) با فاصله ژنتیکی ۰/۱۳ از بقیه جدایه‌ها به یکدیگر نزدیک‌ترند و در کمترین فاصله ژنتیکی نسبت به هم قرار دارند (شکل ۴). بیشترین فاصله ژنتیکی نیز بین جدایه‌های FS16, FS7 (هر دو از منطقه فریمان)، N2، (به ترتیب از نیشابور و فریمان) و دو جدایه FS25, FS7 (به ترتیب از فاروج و فریمان) با فاصله ژنتیکی ۰/۸۸ به دست آمد. رابطه آشکاری بین منشا جغرافیایی جدایه‌ها با گروه‌بندی ژنوتیپی حاصل از نشانگر RAPD مشاهده نشد و جدایه‌های مربوط به یک منطقه جغرافیایی برخی مواقع در گروه‌های ژنوتیپی مجزا و جدایه‌های جمع آوری شده از چند منطقه مختلف در یک گروه ژنوتیپی قرار گرفتند.

نتایج حاصل از نشانگر RAPD در این مطالعه با نتایج دیگر محققین در استفاده از این نشانگر جهت بررسی تنوع *F. solani* جدا شده از کدوئیان (Alymanesh et al., 2009)، مرکبات (Hatam-Mostafa et al., 2013)، لوبیا (Khodaghali et al., 2011) و *Fusarium oxysporum* جدا شده از میزبان‌های مختلف (Jae- Min et al., 2006) مطابقت داشت و تنوع ژنتیکی بالایی در جدایه‌های مورد مطالعه تشخیص داده شد. تجزیه AFLP بیست جدایه *F. solani* f. *sp. pisi* با پراکنش جغرافیایی متفاوت با استفاده از چهار جفت آغازگر (E-AC،

ژنتیکی بین تمام جفت نمونه‌ها ۰/۴۳ محاسبه گردید. نتایج محاسبه فاصله ژنتیکی نشان داد که دو جدایه H1 و H3 (هر دو مربوط به منطقه خواف) با فاصله ژنتیکی ۰/۰۶ از بقیه جدایه‌ها به یکدیگر نزدیکترند و در کمترین فاصله ژنتیکی نسبت به هم قرار دارند. جدایه‌های MP و FS28 (به ترتیب از منطقه خواف و بجنورد) و همچنین دو جدایه FS25 و FS28 (به ترتیب از فاروج و بجنورد) با فاصله ژنتیکی ۰/۷۸ در دورترین فاصله ژنتیکی نسبت به هم قرار گرفتند. دندروگرام حاصل از گروه بندی خوشه‌ای جدایه‌ها با استفاده از روش UPGMA در فاصله تشابه ژنتیکی نزدیک به ۰/۶۵، چهار گروه اصلی (حروف A تا D) را در بین ۲۰ جدایه *F. solani* (*f. sp. pisi* مشخص نمود (شکل ۶). گروه اول (A) جدایه‌های (H1, H3 FS2, FS7, CH, N2,)، گروه دوم (B) (FS5, FS9, FA, MP FS25,)، گروه سوم (C) (FS18, FS31 FS18, FS20,) و گروه چهارم (D) (FS36, FSF, FS14, FS16) بودند. در گروه ژنوتیپی A جدایه‌هایی با درجه بیماریزایی بالا و متوسط قرار گرفتند. در گروه ژنوتیپی B جدایه‌هایی با درجه بیماریزایی متوسط و در گروه ژنوتیپی C جدایه‌هایی با درجه بیماریزایی متوسط و پایین قرار گرفتند. جدایه غیر بیماریزای FS28 از منطقه بجنورد در گروه ژنوتیپی D به صورت مجزا قرار گرفت. گروه بندی حاصل از داده‌های AFLP در سطح تشابه ژنتیکی نزدیک به ۰/۶۵ تقریباً جدایه‌های با توان بیماریزایی مشابه را به خوبی تفکیک کرد. در

گروه ژنوتیپی A جدایه‌های H3 و H1 هر دو از یک منطقه جغرافیایی (خواف) جدا شده بودند. این دو جدایه از لحاظ درجه بیماریزایی (درجه بیماریزایی ۹) نیز یکسان بودند. در همین گروه دو جدایه CH و FS5 با اینکه از دو منطقه متفاوت (به ترتیب از کوه سرخ کاشمر و مزرعه دانشکده) بودند، اما در فاصله ژنتیکی بسیار کمی قرار گرفتند. لذا، به نظر می‌رسد رابطه آشکاری بین منشا جغرافیایی جدایه‌ها با گروه بندی خوشه‌ای جدایه‌ها وجود ندارد. نتایج این مطالعه با نتایج پژوهش *Abdel - Elsalam et al* (2003) مطابقت داشت. در تحقیق وی نشانگر AFLP تنوع ژنتیکی بین و داخل گونه‌های فوزاریوم از میزبان‌های مختلف در مصر را نشان داد و ۴۶ جدایه از پنج میزبان مختلف را متمایز و در پنج کلاستر قرار داد، اما رابطه آشکاری بین مناطق جغرافیایی و ژنوتیپ میزبان با گروه بندی جدایه‌ها بر اساس نشانگر ژنتیکی وجود نداشت. نتیجه تحقیق حاضر با نتیجه تحقیق انجام شده در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ جدایه ایرانی *F. solani* بر اساس نشانگرهای PCR توسط *Baghayi et al* (2006) ضمن نشان از وجود تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها، عدم ارتباط این تنوع را با منشا جغرافیایی جدایه‌ها تایید کردند. قابلیت نشانگر AFLP در تمایز جدایه‌ها با قدرت بیماریزایی مختلف با نتایج تحقیق *Bogale et al* (2006) همخوانی داشت. در این پژوهش محققان در بررسی تنوع جدایه‌های *F. solani* در کشور اتیوپی نشان دادند که نشانگر AFLP تنوع بالایی

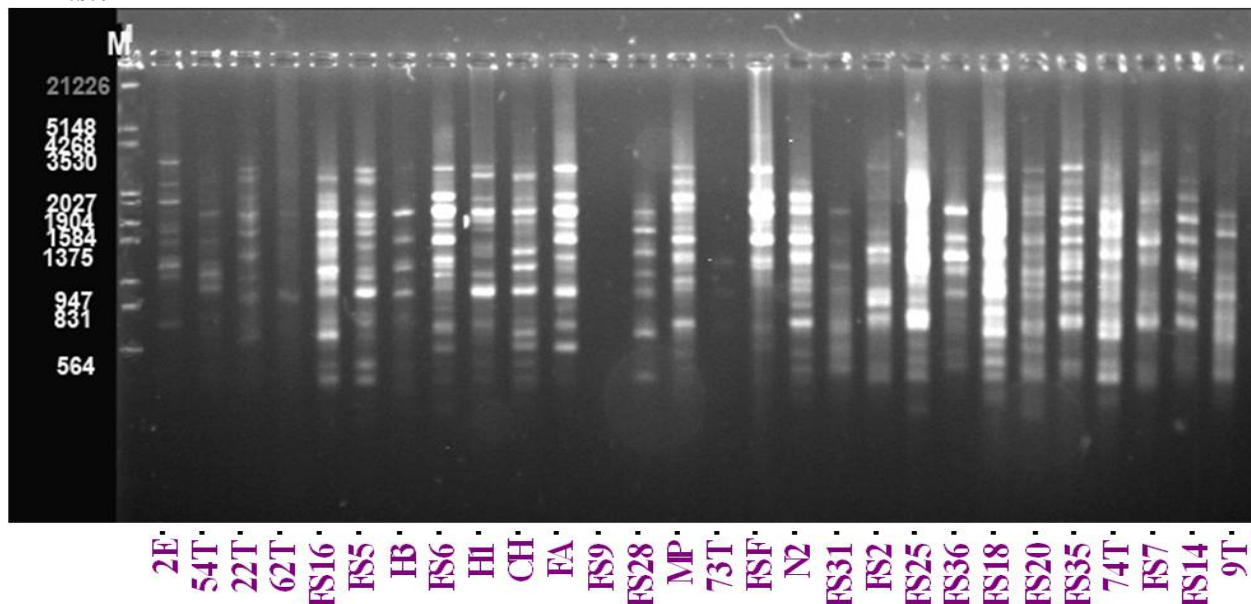
و آشکارسازی چند شکلی بالا در ارزیابی تنوع جدایه‌های *F. solani* f. sp. *pisi* موفق بود. بنابراین استفاده از AFLP درجه بالایی از تمایز و تشخیص جدایه‌های مختلف فوزاریوم را نشان داده و این قابلیت، کاربردی و مفید می‌باشد.

را در جدایه‌ها دارد و لذا دودمان فیلوژنتیکی جدیدی را با توجه به شرایط آب و هوایی کشور ایتوپی مشخص کردند. در مجموع، این پژوهش به خوبی نشان داد که تکنیک AFLP با توجه به قابلیت بالای خود در پوشش گسترده تنوع ژنومی



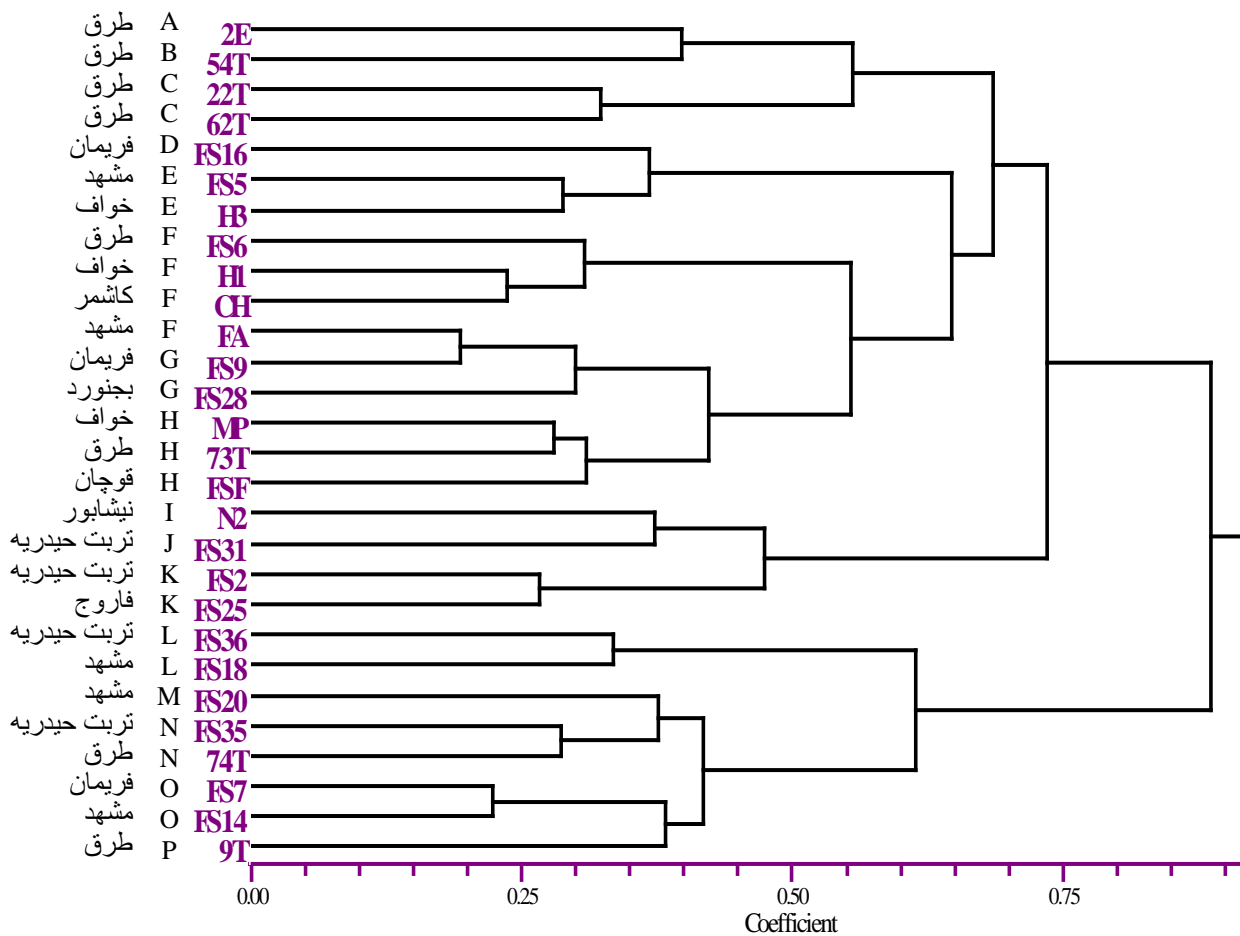
شکل ۲- علائم پوسیدگی ریشه ناشی از مایه‌زنی با جدایه‌های *Fusarium solani* f. sp. *pisi* روی کولتیوار جم.

Figure 2- Symptom of root rot on cultivar Jam in inoculation with *Fusarium solani* f. sp. *Pisi*.



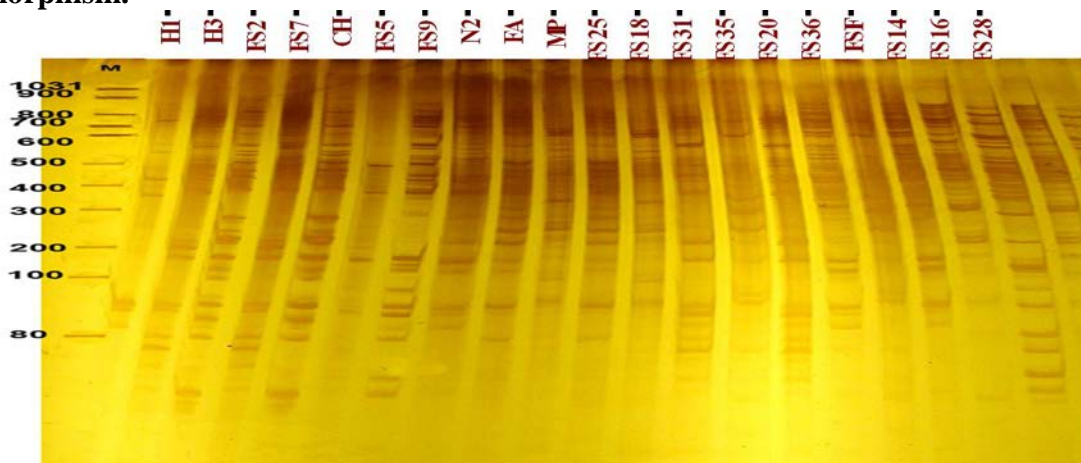
شکل ۳- تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *Fusarium solani* f.sp *pisi* با آغازگر VBC222.

Figure 3- RAPD-PCR amplification of genomic DNA from *Fusarium solani* f.sp *pisi* isolates with primer VBC222.



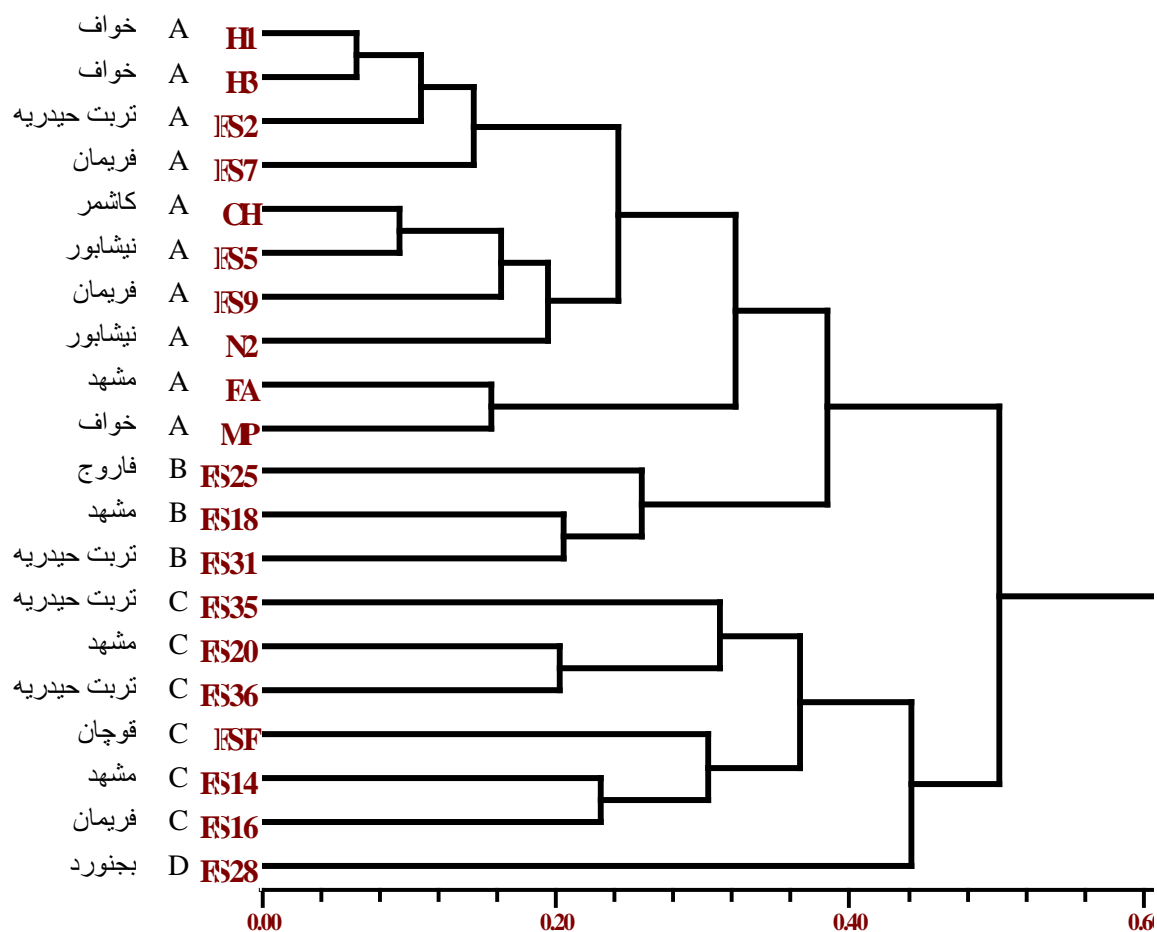
شکل ۴- دندروگرام به دست آمده از روش UPGMA برای نمایش قرابت جدایه‌های قارچ *Fusarium solani f. sp. pisi* با استفاده از داده‌های حاصل از تجزیه RAPD.

Figure 4- UPGMA clustering of *Fusarium solani f. sp. pisi* isolates based on RAPD polymorphism.



شکل ۵- الگوی باندهای تکثیر شده جدایه‌های *Fusarium solani f. sp. pisi* با ترکیب آغازگری E-ag/M-ag در تکنیک AFLP در ژل بلند. M: 100bp DNA Ladder.

Figure 5- AFLP-PCR amplification of genomic DNA from *Fusarium solani f. sp. Pisi* isolates with primer combination E-ag/M-ag.



شکل ۶- دندروگرام به دست آمده از روش UPGMA برای نمایش قرابت جدایه‌های قارچ *Fusarium solani* f. sp. *pisi* با استفاده از داده‌های حاصل از تجزیه AFLP.

Figure 9- UPGMA clustering of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* isolates based on AFLP polymorphism.

منابع

- Abd- Elsalam KA, Schnieder F, Khalil MS, Asran- Amal A, Verreet A (2003). Use of AFLP fingerprinting to analyse genetic variation within and between populations of *Fusarium* spp. derived from Egyptian cotton cultivars. *Plant pathology* 85: 99- 103.
- Abdel- Satar MA, Khalil MS, Mohmed IN, Abd- Elsalam KA, Verreet A (2003). Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. *African Journal of Biotechnology* 2: 51- 55.
- Afshari azad H (1998). Identification of fungal causal of yellow disease chickpea in Iran. *Proceedings of 13th Iranian Plant Protection Congress*. Karaj. Pp 143 (In Farsi).
- Alymanesh MR, Flahatirastegar M, Jafarpour B, Mehdikhanimoghadam, E (2009). Genetic diversity in the fungus *Fusarium solani* f.sp. cucurbitae race 1, the casual agent of root and crown rot of cucurbits in Iran, using molecular markers. *Pakistan Journal of Biological Science* 11: 836-43.
- Baghayi Ravari S, Falahati Rastegar M, Jafarpour B, Shokohifar F, Moradzade Eskandari M (2006). DNA Fingerprinting of *Fusarium solani* isolates causing wilt and dry rot of

- potato in Razavi and Northern Khorasan provinces using molecular markers based on PCR. *Journal Plant Disease* 42: 417-437.
- Bhatii MA, Kraft JM (1992). Effects of inoculum density and temperature on root rot and wilt of chickpea. *Plant Disease* 76: 50- 54.
- Bogale M, Steenkamp ET, Wingfield MJ, Wingfield BD (2009). Diverse *Fusarium solani* isolates colonise agricultural environments in Ethiopia. *European Journal of Plant Pathology* 124: 369-378.
- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D (1994). *Laboratory Manual for Fusarium Research*. University of Sydney. 133 p.
- Casasnovas F, Fantini EN, Palazzini JM, Gaj-Merlera G, Chulze SN, Reynoso MM, Torres AM (2013). Development of amplified fragment length polymorphism (AFLP)-derived specific primer for the detection of *Fusarium solani* aetiological agent of peanut brown root rot. *Journal of Application Microbiology* 6: 1782-92.
- Godoy P, Cano J, Gené J, Guarro J, Höfling-Lima AL, Colombo AL (2004). Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4494-4497.
- Hatem Mostafa Y, Nuria Ali E, Issa Saleh F (2013). Genetic Variation of *Fusarium solani* Isolates Based on RAPD-PCR Analysis. *Persian Gulf Crop Protection* 2: 44-51.
- Jae-Min P, Gi-Young K, Song-Jin L, Mun-Ok K, Man-Kyu H, Tae-Ho L, Jae-Dong L (2006). Comparison of RAPD, AFLP, and EF-1 α Sequences for the Phylogenetic Analysis of *Fusarium oxysporum* and Its formae speciales in Korea. *Mycobiology* 34: 45-55
- Khodaghali M, Hemmati R, Naseri B, Marefat A (2011). Genetic diversity of *Fusarium solani* the causal agent of bean root rot in Zanjan province. *Proceedings of 1th International Agricultural Science and New Technique Congress*. Zanjan.
- Kraft JM (1969). Chickpea a new host of *Fusarium solani* f.sp. pisi. *Plant Disease Reproduction* 53: 110- 111.
- Mohammadi H, Banihashemi Z (2005). Spreading, pathogenesis and survival of *Fusarium* wilting and root rot agent of chickpea in Fars province. *Journal of Plant Pathology* 41: 687-695 (In Farsi).
- Moradzade Eskandari M, Javan Nikkhah M, Zare R, Okhovat M, Morti A, Suma A, Stea G (2009). Study on genetic structure of *Fusarium solani* populations isolated from potato, cucurbit, bean and chickpea based on FAFLP markers. *Journal of Plant Disease* 45: 189-197 (In Farsi).
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ (1994). Taxonomy, Biology, and Clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Review* 7: 479- 504.
- O'Donnell K (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92: 919-938.
- Sharma BL, Gupta RN, Gupta JS (1983). Studies on survey of wilt and root rot incidence of *Cicer arietinum* in northern region of Madhya Pradesh. *Indian Phytopathology* 36: 82-84.
- Suga H, Ikeda S, Taga M, Kageyama K, Hyakumachi M (2002). Electrophoretic karyotyping and gene mapping of seven formae speciales in *Fusarium solani*. *Current Genetic* V41: 254-260.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Vandelee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407- 4414.
- Weising KH, Nybom K, Wolf MW (1995). *DNA fingerprint in plants and fungi*. CRC Press, pp: 322.

- Westerlund FVJ, Campbell RN, Kimble KA (1974). Fungal root rots and wilt of chickpea in California. *Phytopathology* 64: 432- 436.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Raflaski JA, Tingev SV (1990). DNA polymorphism, amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531- 6535.
- Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2186–2190.

Genetic diversity and pathogenesis of *Fusarium solani* isolates of chickpea using RAPD and AFLP markers in Razavi and Northern Khorasan provinces

Hasanzadeh Davarani F.^{*1,2}

¹ Assistant professor of Plant Pathology Department, Islamic azad university, Rafsanjan Branch, Iran.

² Member of young researchers and elite club, Islamic azad university, Rafsanjan Branch, Iran.

Abstract

Black root rot of chickpea caused *Fusarium solani* f. sp. *pisi* is one of the most important fungal diseases in Iran, specially in Razavi and Northern Khorasan provinces. Because of scientific lack about genetic diversity populations of this fungi, the aim of study was determination of genetic diversity and pathogenesis of isolates using RAPD and AFLP markers. Sampling was carried out from 50 fields of major growing-chickpea in Razavi and Northern Khorasan provinces. Pathogenicity test conducted with chickpea seedling using root dip methods and locating infected wheat seeds around tap roots confirmed 28 isolates as *Fusarium solani*. Host range study of *F. solani* isolates with inoculation eight plant species including (Lentis, Bean, Soybean, Pea, Chickpea, Tomato, Melon and Watermelon) showed that all the pathogenic isolates caused root rot only in chickpea and pea. In RAPD- PCR, from 12 primers, only 7 primer showed polymorphism well. Based on this marker, 28 isolates Fsp placed in different genotype groups, without considering geographical regions. In AFLP technique, 4 primer combinations (*EcoRI/MseI*) produced 330 scorable bands of which 110 bands were polymorphic (34%). Also the pair-wise genetic distance was from 0.06 to 0.78. The dendrogram constructed using UPGMA method, distinguished 4 main groups among 20 isolates of Fsp that was confirmed by multi-dimensional scaling. AFLP technique could separate the isolates with different levels of pathogenicity.

Key words: *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, RAPD, AFLP, Genetic diversity.

*Corresponding Author: Hasanzadeh D.F. Tel: 03431313077

Email:hasanzadeh.fatemeh1662@gmail.com

