

تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طبق

پیاز *F. oxysporum* f.sp. *cepae*

Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, the causal agent of onion root and basal rot disease

بهار حقانی^۱، مهدی نصرافهانی^۲ و محمد ترابی^۳

پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۲۸

دریافت: ۱۳۹۳/۳/۱

چکیده

بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیاز ناشی از قارچ *F. oxysporum* f.sp. *cepae* یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای پیاز می‌باشد که موجب خسارت اقتصادی قابل توجه در کشت پیاز می‌گردد. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی و قرابت ژنتیکی بین جدایه‌های قارچ عامل بیماری، در سال ۱۳۹۱ از سی جدایه قارچ عامل بیماری که از استان‌های اصفهان، اردبیل، کرمان و فارس جداسازی و اثبات بیماری-زایی شده بودند و در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان نگهداری می‌شوند استفاده شد. آلوده‌سازی با جدایه‌های عامل بیماری روی سه رقم پیاز سفید کاشان، سفید اهواز و قرمز آذرشهر انجام شد و برای بررسی تنوع و قرابت ژنتیکی جدایه‌ها از روش RAPD و بررسی‌های تکمیلی با استفاده از روش PCR-RFLP و جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 انجام شد. داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc تجزیه و تحلیل و جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد و ضریب تطابق ساده به روش UPGMA گروه‌بندی شدند. برای بررسی اختلاف بیماری‌زایی جدایه‌ها، سوخ‌های پیاز آلوده به جدایه‌ها در گلدان در گلخانه با دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰٪ با تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری و هر سه روز یک بار آبیاری شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار بود. و آماربرداری از بیماری سه هفته پس از کاشت انجام شد. نتایج نشان داد شدت آلودگی جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* f.sp. *cepae* در ارقام پیاز متفاوت بوده و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بین جدایه‌ها وجود داشت. در این تحقیق ارتباط خاصی بین جدایه‌ها از نظر تنوع بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی مشاهده نگردید.

واژگان کلیدی: پیاز، پوسیدگی ریشه و طبق، فورازیوم، جدایه‌ها، تنوع بیماری‌زایی، تنوع ژنتیکی.

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین - پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه

بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان

نویسنده مسئول مکاتبات: mne2011@gmail.com

مقدمه

پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.)، یکی از مهم‌ترین سبزی‌های خانواده Liliaceae، گیاهی است علفی و دو ساله که در سال اول اندام‌های رویشی آن به وجود می‌آیند و در سال دوم اندام‌های زایشی ایجاد می‌شوند که تولید دانه می‌کنند (Hussain *et al.*, 2001). در آخرین گزارش سازمان کشاورزی استان اصفهان تولید پیاز در کشور سالانه ۲/۷ میلیون تن و سطح کشت آن در استان اصفهان ۳۸۰۰ هکتار با تولید ۲۲۷ هزار تن در سال است.

یکی از بیم‌اری‌های مهم و فراگیر پیاز، بیماری پوسیدگی ریشه و طبق یا پوسیدگی فوزاریومی با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* است. فوزاریوم شامل گونه‌هایی است که ماکروکنیدهای بی رنگ و دارای جدار عرضی تولید کرده و از مشخصه قارچ آن است که سلول پایه ماکروکنیدی دارای پاشنه و یک برآمدگی کوچک می‌باشد. بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیاز یکی از بیماری‌های مهم مزارع پیازکاری کشور و جهان است. این بیماری مزارع بذری پیاز را در هر مرحله از رشد بالاخص مرحله گلدهی تهدید می‌نماید و موجب کاهش تولید بذر، پوکی بذر، کاهش جوانه‌زنی، کاهش قوه نامیه، کاهش رشد گیاهچه‌ها و ریز شدن بذر تولیدی می‌گردد. خسارت این بیماری حدود ۵۰ درصد و یا بیش‌تر در تولید بذر پیاز مشخص و تعیین شده است (حجازی و نصرافهانی، ۱۳۸۵). بررسی‌های انجام شده در کشور ترکیه در خصوص تنوع ژنتیکی قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز با استفاده از نشانگر RAPD روی جمعیت‌های مختلف از کشور ترکیه در مقایسه با یک جمعیت از کلرادو نشان داد که جدایه‌های به دست آمده از کشور ترکیه به طور میانگین تعداد ده باند برای هر آغازگر ایجاد کردند. تجزیه خوشه‌ای نیز تشابهات را تا ۶۵ درصد تعیین نمود. بررسی‌های ژنتیکی نشان داد که جدایه‌های ترکیه‌ای از جدایه‌های آمریکایی به طور معنی‌داری متفاوت بودند (Bayraktar, 2010). گروه‌های سازگار رویشی در بین جدایه‌های قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز در ژاپن در سال ۲۰۰۸ انجام شد. براساس این تحقیق چهار گروه سازگار و دو گروه خود سازگار در بین ۴۸ جدایه مورد بررسی تشخیص داده شد (Widodo *et al.*, 2008). تحقیقات انجام شده روی قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* در کشور آمریکا با بررسی ۱۹ جدایه از مناطق جنوبی، شمالی و شرقی کلرادو نشان داد که گروه‌های سازگار رویشی در این منطقه متفاوت بودند به طوری که پنج گروه سازگار رویشی تشخیص داده شد (Swift, 2002).

با توجه به اهمیت کشت پیاز و نیز خسارت شدید بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طبق پیاز لازم بود که بررسی‌هایی از جنبه‌های مختلف روی این بیماری انجام شود. لذا، در این تحقیق بررسی‌هایی در خصوص جدایه‌های مختلف عامل بیماری از مناطق مهم پیازکاری کشور از نظر مورفولوژیکی، فنولوژیکی بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی مورد استفاده در آزمایش

در این تحقیق از سی جدایه قارچ عامل بیماری که در سال ۱۳۹۱ از استان‌های اصفهان، کرمان، اردبیل و فارس جداسازی، خالص‌سازی و اثبات بیماری‌زائی شده بودند (ملکیان و همکاران، ۱۳۹۱) و در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان نگهداری می‌شوند استفاده شد برای بررسی تنوع بیماری‌زایی این سه جدایه، ابتدا آن‌ها روی محیط کشت PDA تکثیر و خالص‌سازی مجدد شدند و سپس روی سه رقم پیاز سفید کاشان، قرمز آذر شهر و سفید اهواز در گلخانه مایه‌زنی شدند.

تهیه مایه تلقیح

برای تکثیر قارچ عامل بیماری مقداری لازم از دانه گندم تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در تشتک همراه با آب کافی خیسانده شده و سپس آب آن‌ها را خالی کرده و ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتر تا نیمه از گندم‌ها پر کرده و درب آن‌ها با پنبه

و فویل آلومینیوم مسدود گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در داخل اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و دو بار استریل شدند. پس از عمل فوق و خنک شدن ارلن‌ها، بلافاصله آن‌ها را در زیر هود استریل قرار داده و مقداری از محیط کشت حاوی قارچ عامل بیماری توسط چوب پنبه سوراخ کن جدا و پس از برداشتن درب ارلن‌ها، به وسیله پنس محیط کشت را به مواد داخل ارلن اضافه کرده و درب ارلن‌ها بلافاصله با پنبه و فویل آلومینیومی مسدود گردید. ارلن‌های مذکور به مدت ۳۰ روز در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور متناوب ۱۲ ساعت قرار داده تا قارچ عامل بیماری به خوبی رشد کند. هر کدام از ارلن‌ها را در هر روز به خوبی تکان داده تا مانع از چسبیدن گندم‌ها به یکدیگر شود و نیز قارچ عامل بیماری به طور یکنواخت روی دانه‌های گندم رشد نماید. پس از مدت مذکور درب تمام ارلن‌ها را باز نموده و آن‌ها را داخل یک تشتک بزرگ با یک دیگر مخلوط کرده تا یکنواختی حاصل شده و برای مایه‌زنی آماده گردند (Shishkoff, 1993; Singleton *et al.*, 1993) با این روش مایه تلقیح برای تمام جدایه‌ها به طور جداگانه تهیه شد.

کاشت ارقام پیاز

گلدان‌ها حاوی خاک سترون شامل خاک، ماسه و کود پوسیده به نسبت ۱:۱:۱ جهت کاشت آماده شدند. حدود ۱۰ گرم دانه گندم آلوده به قارچ عامل بیماری در قسمت پایینی حفره‌های کشت پیاز قرار داده شد و طبق پیازها پس از شستشو و ضدعفونی و خشک کردن به مدت ۲۴ ساعت روی آن قرار داده و روی سطح غده‌ها با همان خاک گلدان پوشش داده شد. گلدان‌ها پس از مایه‌زنی در گلخانه در دمای 25 ± 5 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰٪ با تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری و هر سه روز یک بار آبیاری شدند. در تیمارهای شاهد غده‌های پیاز یک روز قبل با سوسپانسیون قارچ‌کش رورال-تی-اس ۱۰٪ به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و به مدت ۲۴ ساعت رها ساخته تا خشک شوند و سپس به همان گونه کاشته شدند. یک ماه پس از کاشت، غده‌های پیاز را از خاک بیرون آورده و شدت بیماری روی غده‌های پیاز، بر اساس تغییر رنگ و پوسیدگی غده‌ها، در شاخص‌های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ تعیین شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار مورد تجزیه آماری قرار گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SAS9.1 استفاده گردید.

جداسازی قارچ عامل بیماری از گیاهان آلوده شده

برای اطمینان از گونه مورد نظر قارچ عامل بیماری و تایید گونه آن، اقدام به جداسازی قارچ از تعدادی از نمونه‌ها که به طور تصادفی انتخاب شده بودند گردید. گیاهچه‌های آلوده زیر شیر آب به مدت نیم ساعت شسته و برای ضدعفونی سطحی در محلول کلراکس ۱۰٪ تجارتي که ۱۰ بار رقیق شده، به مدت ۱/۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از شستشو با آب مقطر استریل و خشک کردن روی کاغذ صافی استریل، با تیغ برش استریل قسمت طبق آن را به قطعات یک سانتی‌متری تقسیم و به محیط غذایی PAD (Potato Dextrose Agar) در تشتک پتری منتقل شدند. تشتک‌ها در انکوباتور در دمای 25°C به مدت سه روز قرار داده شدند.

خالص‌سازی قارچ‌های جدا شده

بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در انکوباتور، قطعه‌ای محیط حاوی قارچ به محیط آب آگار ۲ درصد منتقل و سپس به روش نوک ریسه خالص‌سازی شدند. کشت‌های خالص شده روی محیط کشت‌های PDA و برگ میخک آگار (Carnation leaf agar: CLA) رشد داده شدند و خصوصیات مختلف آن‌ها شامل رنگ پرگنه، میزان رشد، ماکروکنیدی، میکروکنیدی، فیالید و کلامیدوسپور مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی قارچ *F. oxysporum f.sp. cepae*

شناسایی قارچ در سطح گونه با استفاده از کلید بوث (Booth, 1971) و نلسون و همکاران (Nelson *et al.*, 1983) انجام شد. مشخصاتی که از آن برای شناسایی استفاده شد عبارت بودند از قطر پرگنه، نحوه رشد و رنگ پرگنه، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، نوع کلامیدوسپور، نوع فیالید، وجود یا عدم وجود اسپرو دوکیوم، فقدان یا وجود میکروکنیدی، نحوه تولید میکروکنیدی و اندازه کنیدی‌ها که با میکروسکوپ با بزرگ نمایی $400\times$ و $1000\times$ بررسی و اندازه‌گیری شدند.

تکثیر جدایه‌های قارچ *F. oxysporum f.sp. cepae* و استخراج DNA

از آن جایی که روش RAPD روش بسیار حساسی است و میزان خلوص DNA در صحت، دقت و تکرارپذیری نتایج به دست آمده تاثیر به سزایی دارد، جدایه‌های قارچ مورد آزمایش روی محیط کشت PDA رشد داده شد و پرگنه قارچ جهت استخراج DNA آماده گردید. برای استخراج DNA ژنومی، یک قطعه یک میلی‌متری از مسیلیوم قارچ پنج روزه روی محیط کشت PDA، به داخل لوله $1/5\text{ml}$ انتقال داده شد و با ریختن نیتروژن مایع روی آن با اسپات چول خرد و به آن $500\mu\text{l}$ بافر لیز کننده (50mM Tris, 50mM EDTA, 3%SDS, 1% BME, 0.1 mg/ml K proteinase) اضافه گردید. محلول در 65°C درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگهداری شد. بعد از این مدت، $500\mu\text{l}$ فنول به محلول اضافه و مخلوط گردید و با دور $300\times\text{g}$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس فاز رویی را برداشته و به تیوب جدید انتقال داده و $400\mu\text{l}$ کلروفرم ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴ به ۱ به آن اضافه و مخلوط گردید. سانتریفیوژ بر اساس شرایط قبلی مجدداً صورت گرفت. فاز رویی دوباره به تیوب جدید منتقل و $400\mu\text{l}$ آمونیوم استات $7/5\text{M}$ به همراه $50\mu\text{l}$ اتانول مطلق اضافه و در -20°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سپس، سانتریفیوژ با دور $1500\times\text{g}$ به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. فاز رویی دور ریخته و رسوب حاصله با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد. بعد از خشک شدن، رسوب در $50\mu\text{l}$ آب مقطر دو بار استریل حل گردید (محمدی و بنی‌هاشمی، ۱۳۸۴؛ Singelton *et al.*, 1993).

برای آماده‌سازی مخلوط PCR، تکثیر DNA در حجمی معادل ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای این منظور، ابتدا مواد به کار رفته در واکنش PCR به غیر از DNA در یک میکروتیوب سترون $1/5$ میلی‌لیتری مخلوط گردید و مخلوط حاصل به مدت ۳ ثانیه با ورتکس به هم زده شد تا مواد به خصوص آنزیم DNA پلی مرز به خوبی مخلوط گردند (جدول ۱).

جدول ۱- مواد و ترکیبات استفاده شده جهت PCR

Table 1. Compounds used for PCR

Material	Concentration	Quantity
DNA	10- 50 ng	1 μl
Buffer PCR	10 X	1.5 μl
dNTPs	10mM	0.35 μl
Primer Forward	20 pmol/ μl	0.5 μl
Revers Primer	20 pmol/ μl	0.5 μl
MgCl ₂	50mM	0.5 μl
Taq DNA Polymerase	5Unit/ μl	0.5 μl
Water		10.15 μl
Total		15 μl

تعداد واکنش بستگی به تعداد DNA دارد. لذا به جهت خطای میکروپیپت‌ها حجم واکنش بسته به تعداد واکنش، بیش‌تر از حجم مورد نیاز تهیه گردید و تهیه مخلوط واکنش PCR روی یخ انجام شد. در مرحله بعد به کمک میکروپیپت، ۲۴ میکرولیتر از مخلوط فوق به میکروتیوپ‌های ۰/۲ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس، یک میکرولیتر از DNA ژنومی هر نمونه به کمک میکروپیپت‌های ۱۰ میکرولیتری به مخلوط درون هر تیوپ PCR اضافه شد. در نهایت میکروتیوپ‌ها، در هر چاهک دستگاه PCR قرار داده شدند. سپس، برنامه حرارتی (جدول ۲) برای واکنش‌های PCR و تکثیر قطعات DNA بسته به نوع نشانگر و آغازگر تنظیم گردید (Hibbett, 1992; Cenis, 1992; Arnheim and Erlich, 1992).

جدول ۲- چرخه‌های حرارتی به کار رفته در PCR

Table 2. Thermal cycles used in PCR

PCR	Cycle	Time	Temperature
Initial Denaturing	1 Cycle	5 Min	94 °C
Denaturing		1 Min	94 °C
Annealing	35Cycle	2 Min	55 °C
Extension		3 Min	72 °C
Final extension	1 Cycle	10 Min	72 °C

DNA استخراج شده از جدایه‌های قارچ مذکور تقریباً عاری از آلودگی‌های پلی ساکارییدی و پروتئینی بودند و غلظت آن‌ها با استفاده از ژل آگاروز و روش اسپکتوفتومتری بین ۱۰۰ تا ۶۰۰ نانوگرم در میکرولیتر برآورد شد. در زمان انجام واکنش الکتروفورز DNA روی ژل آگاروز، بارگذاری این نمونه‌ها در چاهک‌های ژل به سختی انجام گرفت. پس از الکتروفورز DNA استخراج شده از تمام نمونه‌ها روی ژل آگاروز (TAE ۱٪) و هم چنین، انجام واکنش اسپکتوفتومتری، DNAهای استخراج شده تا حد ۵۰ نانوگرم رقیق شدند و سپس، در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

روش اسپکتوفتومتری

در این روش مقدار اسید نوکلئیک و نسبت اسید نوکلئیک به پروتئین هر جدایه قارچ با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر Beckman DU530 تخمین زده شد. ابتدا دستگاه با کوت کریستالی حاوی آب مقطر استریل در عدد صفر تنظیم شد. سپس، چهار میکرولیتر از DNA به ۵۹۶ میکرولیتر آب مقطر خالص اضافه شد. پس از اندازه‌گیری میزان ضریب نوری اسید نوکلئیک در ۲۶۰ نانومتر و پروتئین در ۲۸۰ نانومتر غلظت DNA نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{غلظت DNA} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) = \frac{\text{OD}_{260 \text{ nm}} \times \text{ضریب تصحیح دستگاه} \times \text{ضریب رقت}}{۱۰۰۰}$$

مقدار پرتو نور ماوراء بنفش جذب شده به وسیله محلول DNA به طور مستقیم نسبتی از مقدار DNA موجود در نمونه است. در طول موج جذبی ۲۶۰ nm این نسبت برابر یک و معادل ۵۰ میکروگرم، DNA دو رشته می‌باشد، بنابراین برای محاسبه غلظت DNA، ضریب تصحیح دستگاه ۵۰ محاسبه گردید. چون نسبت مناسب جذب نور در طول موج ۲۶۰ nm به مقدار جذب نور در ۲۸۰ nm هر نمونه، ۱/۸ ذکر شده است، در این اندازه‌گیری، نمونه‌هایی که نسبت OD260/OD280 آن‌ها در دامنه‌ای از ۱/۷ تا ۱/۹ قرار داشت برای انجام آزمایش‌های PCR انتخاب شد.

روش الکتروفورز ژل آگارز

برای تخمین مقدار DNA هر جدایه قارچ، غلظت DNA هر کدام با غلظت استاندارد ۱۰۰ μg/ Tris-acetate) (0/001M %۰/۷ TAE آگارز III پس از الکتروفورز روی ژل (Fermentas Co., #SM0191) ۰/۷ TAE مقایسه شد. به این منظور، مقدار سه میکرولیتر از DNA استخراج شده با دو میکرولیتر بافر بارگذاری (0/04M EDTA, 0/7% Agarose, 0/03% Bromophenol blue, 0/03% Xylene cyanol FF, 60% Glycerol and 60 mM EDTA) مخلوط و روی ژل آگارز ۰/۷ TAE درصد به مدت دو ساعت با جریان الکتریکی ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (1gr Etbr. / 100ml H2O) انجام شد. برای مشاهده باند های DNA از دستگاه پرتو نور ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر استفاده شد. مقدار DNA هر نمونه با مقایسه باندهای متفاوت مارکر که نشانگر مقدار معینی از DNA بود، تخمین زده شد (Migheli *et al.*, 1998; مومنی و همکاران، ۱۳۸۴).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

برای تکثیر اختصاصی DNA در نمونه‌ها، از جفت آغازگرهای مرتبط با قارچ فورازیوم در روش PCR استفاده گردید (Hibbett, 1992). مواد مورد استفاده برای واکنش PCR عبارت بودند از آغازگرها ITS1/ITS4، مخلوط نوکلئوتیدی (CinnaGen Co., Cat no. DN7603C) که حاوی هر کدام از نوکلئوتیدهای dATP، dCTP، dGTP و dTTP بود (جدول ۳)، بدون رقیق شدن به مقدار ۰/۳۵mM در هر واکنش PCR استفاده شد (Arnheim and Erlich, 1992). آنزیم Taq DNA Polymerase (CinnaGen Co., Cat no. TA7506C) که با غلظت پنج unit در میکرولیتر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد، در آخرین مرحله، از تهیه مخلوط واکنش به مخلوط اضافه گردید (Cenis, 1992)، بافر PCR که با غلظت ۱۰ برابر و pH = ۸/۳ در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، بعد از ذوب شدن و انجام عمل ورتکس (به دلیل جلوگیری از رسوب احتمالی نمک‌های موجود در بافر) مورد استفاده قرار گرفت (Cho *et al.*, 1999; Ebrahimi *et al.*, 2009). محلول پایه کلرید منیزیم با غلظت ۵۰ میلی مولار (CinnaGen Co., Cat no. TP7506C) بدون رقیق شدن و پس از ذوب شدن و انجام ورتکس مورد استفاده قرار گرفت. مقدار کلرید منیزیم مورد نیاز در هر واکنش ۱/۵ تا دو میلی‌مولار استفاده شد (والی، ۱۳۸۸). برای انجام واکنش PCR، ابتدا یک میکرولیتر نمونه DNA در لوله‌های ۰/۲ میکرولیتری PCR قرار داده شد و سپس، ۱۴ میکرولیتر از محلول پایه به هر نمونه DNA اضافه شد تا حجم مخلوط واکنش به ۱۵ میکرولیتر برسد. لوله‌ها برای انجام واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Techne TC-512) قرار گرفتند. برای حفظ کیفیت محصول واکنش، پس از اتمام PCR، نمونه‌ها تا انجام الکتروفورز روی ژل در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Migheli *et al.*, 1998).

جدول ۳- نام و جفت آغازگرهای استفاده شده در آزمایش PCR-RFLP

Table 3. Primers used for PCR-RFLP and their sequences

نام آغازگر Primer	توالی آغازگر Sequences	دمای اتصال (°C) Annealing temp.
ITS1	ITS1 (White <i>et al.</i> , 1990) 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	56
ITS4	ITS4 (White <i>et al.</i> , 1990) 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	56

واکنش‌های RAPD

واکنش‌های PCR در مقدارهای ۳۰ میکرولیتری، با ۱۵ نانوگرم از DNA هر نمونه، در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده، شامل توالی‌های مورد نظر از منابع مربوطه بود که در این جا در واکنش‌های RAPD از تعدادی آغازگر از سری آغازگرهای OPA، OPC، OPE، OPX، OPD و OPD (جدول ۴) شامل: OPA-03، OPA-04، OPA-07، OPA-13، OPA-16، OPA-19، OPC-06، OPC-08، OPD-01، OPD-09، OPE-01، OPP-16، OPP-17، OPP-19 و OPX-14 بودند (Bentley *et al.*, 1994) که همگی یونیورسال هستند (van der Waals *et al.*, 2004).

جدول ۴- آغازگرهای مورد استفاده جهت توالی یابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepa*

Table 4. Primers used for sequencing genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepa* isolates

شماره	نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	درصد C+G
NO.	Primer	Primer sequence	Fusing temperature (°C)	C+G %
1	OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	36	60
2	OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	34	60
3	OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	33	50
4	OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	36	70
5	OPA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'	34	60
6	OPA-19	5'-CAAACGTCGG-3'	34	60
7	OPC-06	5'-GAACGGACTC-3'	34	60
8	OPC-08	5'-TGGACCGGTG-3'	36	70
9	OPD-01	5'-ACCGCGAAGG-3'	37	70
10	OPD-09	5'-CTCTGGAGAC-3'	33	50
11	OPE-01	5'-CCCAAGGTCC-3'	36	70
12	OPP-16	5'-CCAAGCTGCC-3'	36	70
13	OPP-17	5'-TGACCCGCCT-3'	36	70
14	OPP-19	5'-GGGAAGGACA-3'	34	60
15	OPX-14	5'-ACAGGTGCTG-3'	34	60

واکنش PCR پس از توزیع اجزای واکنش در لوله‌ها، با افزودن نمونه‌ی DNA الگو، در دستگاه ترموسایکلر انجام گردید. برنامه واکنش PCR شامل مراحل واسرشتگی مقدماتی به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واسرشتگی به مدت ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال به مدت ۱ دقیقه در ۳۶ درجه سانتی‌گراد، گسترش به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی به مدت ۸ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. مراحل واسرشتگی تا گسترش ۴۵ مرتبه تکرار شد. در نهایت DNA جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از آغازگرهای تصادفی تکثیر گردید (Dale *et al.*, 2003; Migheli *et al.*, 1998).

تجزیه نتایج حاصل از RAPD

باند‌های مشاهده شده روی ژل، تعیین امتیاز شد. این کار با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد انجام گردید. هم‌چنین، با استفاده از نرم‌افزار Photocapt MW الگوی باندهای DNA جدایه‌ها، با هر یک از آغازگرهای چندشکلی مشخص شد. ماتریس فاصله ژنتیکی جدایه‌ها به دست آمد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش مراتبی و با استفاده از مدل جمع‌آوری در نرم‌افزار STATISTICA (Version 5) انجام و خوشه‌بندی قرابت ژنتیکی جدایه‌ها ترسیم شد. برای رسم خوشه‌بندی از روش UPGMA استفاده گردید.

آزمایش PCR-RFLP برای گروه‌بندی

برای تعیین شباهت‌ها یا تفاوت‌های موجود در توالی‌های نوکلئوتیدی DNA نمونه‌های تکثیر شده توسط PCR، از روش PCR-RFLP استفاده شد. برای تکثیر منطقه 16SrRNA، ابتدا نمونه‌های موجود توسط واکنش PCR و به کمک جفت آغازگر ITS1/ITS4 تکثیر شدند (Abawi and Lorbeer, 1971). سپس، برای انتخاب آنزیم برشی مناسب، توالی برخی از جدایه‌های قارچ فوزاریوم در بانک ژن بررسی شد. با استفاده از سایت www.tools.neb.com جایگاه برش آنزیمی توالی‌های 16S rRNA تعیین گردید. از بین آنزیم‌هایی با جایگاه‌های برشی مناسب، آنزیم *AluI*، *MseI*، *TaqI*، *ECORI* تهیه شده از شرکت Fermentas co. جهت برش محصول DNA تکثیر شده هر نمونه استفاده شد (Abdessamad et al., 2003). شرایط مورد استفاده برای هضم آنزیمی برای *AluI* و *ECORI* ۳۷ درجه سانتی‌گراد، *MseI*، *TaqI*، ۶۵ درجه سانتی‌گراد بود. به دلیل بالا بودن دما و امکان تبخیر نمونه‌ها، از نوارهای پارافیلیم برای بستن در لوله‌ها استفاده شد و هر ۲۰ دقیقه یک بار، عمل میکروفیوژ برای پایین کشیدن قطرات واکنش جمع شده در بالای لوله‌ها، انجام گرفت (Lee et al., 2000).

الکتروفورز محصول PCR-RFLP

برای مشاهده باندهای حاصل از واکنش PCR-RFLP، از ژل پلی‌اکریل آمید استفاده شد. با توجه به اندازه قطعه برش یافته توسط هر آنزیم، از غلظت خاصی از ژل پلی‌اکریل آمید در الکتروفورز استفاده شد. برای تفکیک قطعات برش یافته توسط آنزیم *AluI*، *EcoRI*، *MseI* و *TaqI* به دلیل ایجاد قطعات بزرگ و کوچک توسط این آنزیم، از ژل پلی‌اکریلامید با غلظت ۵ درصد، استفاده شد ولی برای مشاهده قطعات برش یافته، به دلیل ایجاد قطعات کوچک، توسط این دو آنزیم، از ژل پلی‌اکریلامید با غلظت ۱۲ درصد استفاده گردید (والی، ۱۳۸۸).

نتایج

جدایه‌های مورد آزمون

جدایه‌های قارچ *F. oxysporum f.sp. cepae* مورد آزمایش به شرح جدول ذیل بودند که همگی از نمونه قارچ‌های نگهداری شده در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان (بخش آفات و بیماری‌ها) که توسط ملکیان و همکاران (۱۳۹۱) از استان‌های اصفهان، شیراز، کرمان و اردبیل جداسازی و کشت گردیده بودند (جدول ۵).

تنوع بیماری‌زائی جدایه‌های *F. oxysporum f.sp cepae* روی ارقام پیاز

تجزیه واریانس شدت بیماری پوسیدگی روی طبق سه رقم سفید کاشان، قرمز آذر شهر و سفید اهواز نشان داد که این سه رقم نیز نسبت به سی جدایه قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. cepae* حساس بوده و بیماری در تمامی تیمارهای مورد آزمایش دیده شد. ارقام و جدایه‌ها از نظر شدت بیماری با هم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ داشتند (جدول ۶).

مقایسه میانگین شدت بیماری (جدول ۷) روی سه رقم نشان داد که شدت بیماری جدایه‌ها روی پیاز رقم سفید کاشان بیش‌تر از دو رقم دیگر بود. بیش‌ترین شدت آلودگی مربوط به جدایه‌های برآن ۳ و علویجه ۱ و علویجه به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۵٪ و ۹۵٪ بود. کم‌ترین شدت آلودگی را جدایه شیراز ۵ با شدت بیماری ۳۵٪ به خود اختصاص داد. در پیاز رقم قرمز آذر شهر بیش‌ترین شدت آلودگی مربوط به جدایه آذر شهر ۲۳ با شدت بیماری ۹۲٪ و کم‌ترین شدت آلودگی را جدایه زیار ۱ و آذر شهر ۱ به ترتیب با شدت آلودگی ۱۵٪ و ۱۱٪ داشتند. در رقم پیاز سفید اهواز نیز به ترتیب

بیشترین و کمترین آلودگی مربوط به جدایه‌های آذر شهر ۱ با شدت آلودگی ۱۰۰٪ و زیار ۱ با شدت آلودگی ۲۵٪ بود.

جدول ۵- جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* f.sp. *cepae* از میزبان پیاز، محل و سال جمع‌آوری آن‌ها
Table 5. Isolates of *F. oxysporum* f.sp. *cepae* from onion, their site and year of collection

شماره جدایه Isolate NO.	نام جدایه Isolate name	سال Year	شهرستان City
1	Shiraz10 شیراز ۱۰	2011	Shiraz ^۱ شیراز
2	Mobarakeh مبارکه	2011	Esfahan اصفهان
3	Shiraz5 شیراز ۵	2011	Shiraz شیراز
4	Shiraz16 شیراز ۱۶	2011	Shiraz شیراز
5	Ziyar1 زیار ۱	2011	Esfahan اصفهان
6	Kerman کرمان	2011	Kerman کرمان
7	Shiraz21 شیراز ۲۱	2011	Shiraz شیراز
8	AzarShahr1 آذرشهر ۱	2011	Ardebil اردبیل
9	2Shiraz2 شیراز ۲	2011	Shiraz شیراز
10	1Shiraz2 شیراز ۲	2011	Shiraz شیراز
11	Baraan برآن	2011	Esfahan اصفهان
12	3Shiraz2 شیراز ۳	2011	Shiraz شیراز
13	1Azar Shahr7 آذرشهر ۷	2011	Ardebil اردبیل
14	Alavije1 علویجه ۱	2011	Esfahan اصفهان
15	Baraan3 برآن ۳	2011	Esfahan اصفهان
16	Shiraz2 شیراز ۲	2011	Shiraz شیراز
17	Baraan2 برآن ۲	2011	Esfahan اصفهان
18	Azar Shahr3 آذرشهر ۳	2011	Ardebil اردبیل
19	1 Shiraz7 شیراز ۷	2011	Shiraz شیراز
20	Baraan4 برآن ۴	2011	Esfahan اصفهان
21	1Azar Shahr1 آذرشهر ۱	2011	Ardebil اردبیل
22	1 Azar Shahr3 آذرشهر ۳	2011	Ardebil اردبیل
23	4Shiraz2 شیراز ۴	2011	Shiraz شیراز
24	2Azar Shahr9 آذرشهر ۹	2011	Ardebil اردبیل
25	Ziyar زیار	2011	Esfahan اصفهان
26	Azarshahr7 آذرشهر ۷	2011	Ardebil اردبیل
27	AzarShahr23 آذرشهر ۲۳	2011	Ardebil اردبیل
28	alavije علویجه	2011	Esfahan اصفهان
29	1AzarShahr9 آذرشهر ۹	2011	Ardebil اردبیل
30	AzarShahr9 آذرشهر ۹	2011	Ardebil اردبیل

جدول ۶- تجزیه واریانس شدت بیماری پوسیدگی طبق ایجاد شده توسط جدایه‌های *F. oxysporum* f.sp. *cepae* روی سه رقم پیاز
Table 6. Analysis of variance for disease severity of bulb rot induced by *F. oxysporum* f.sp. *cepae* isolates on three cultivars of onion

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات MS		
			رقم سفید کاشان Sefid Kashan	رقم قرمز آذرشهر Ghermez Azarshahr	رقم سفید اهواز Sefid Ahvaz
Isolate	جدایه	29	662.87**	742.72**	1739.20**
Error	خطا	60	199.44	1280.31	292.33
Total (SST)	کل	89	18234.73	44812.50	79163.50
C.V %	درصد ضریب تغییرات	-	0.63	0.73	0.58

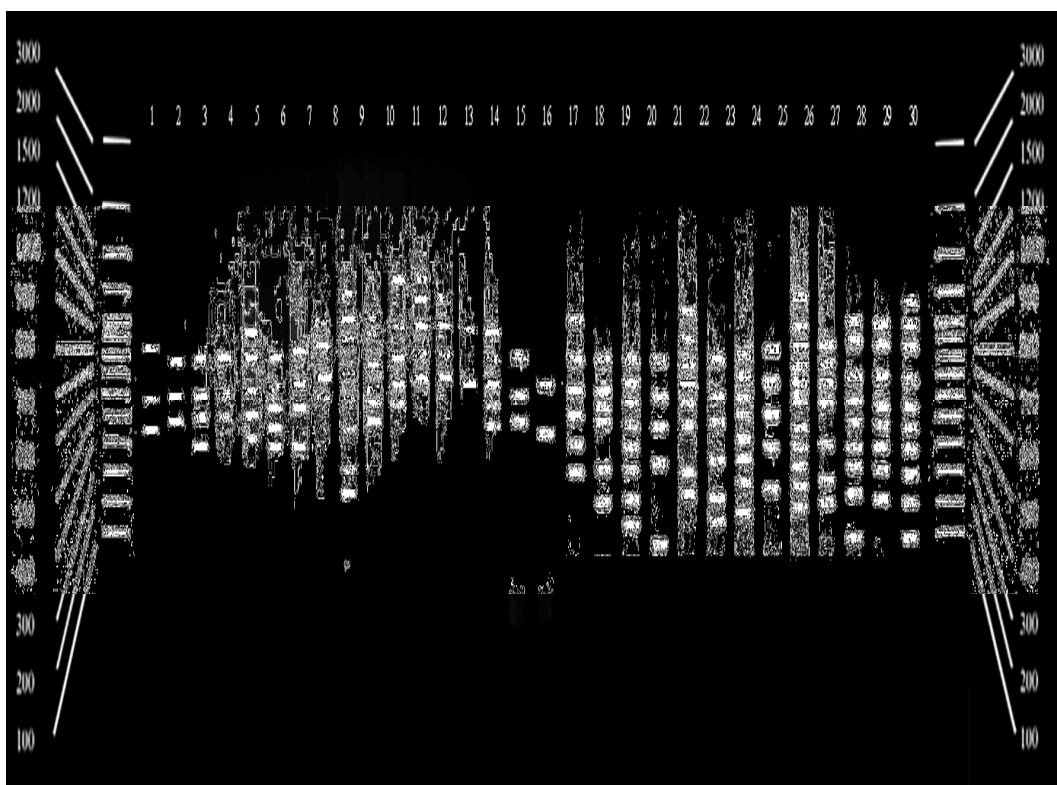
** : Significant at 1% probability level.

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

جدول ۷- مقایسه میانگین شدت بیماری پوسیدگی طبق ایجاد شده توسط جدایه‌های *F. oxysporum* f.sp. *cepae* روی سه رقم پیاز
Table 7. Mean comparison of disease severity of bulb rot induced by *F. oxysporum* f.sp. *cepae* isolates on three cultivars of onion

Isolate Name	نام جدایه	Disease severity (%)		
		سفید کاشان Sefid Kashan	رقم قرمز آذرشهر Ghermez Azarshahr	رقم سفید اهواز AhvazSefid
Shiraz 10	شیراز ۱۰	70	41	35
Mobarakeh	مبارکه	55	50	58
Shiraz 5	شیراز ۵	35	67	67
Shiraz16	شیراز ۱۶	90	67	83
Ziyar1	زیار ۱	45	15	25
Kertman	کرتمان	80	75	75
Shiraz21	شیراز ۲۱	45	42	50
Azarshahr1	آذرشهر ۱	75	65	100
2Shiraz2	شیراز ۲	75	75	92
1 Shiraz2	شیراز ۱	55	75	42
Baraan	برآن	85	83	42
3Shiraz2	شیراز ۳	70	50	33
1Azarshahr7	آذرشهر ۷	45	58	33
Alavije1	علویجه ۱	95	75	33
Baraan3	برآن ۳	100	83	75
Shiraz2	شیراز ۲	60	20	20
Baraan2	برآن ۲	40	58	42
Azarshahr3	آذرشهر ۳	90	50	33
1 Shiraz7	شیراز ۷	45	50	42
Baraan4	برآن ۴	60	67	33
1Azarshahr1	آذرشهر ۱	45	11	50
1 Azarshahr3	آذرشهر ۳	40	42	33
4 Shiraz2	شیراز ۴	45	75	33
2Azarshahr9	آذرشهر ۹	90	75	42
Ziyar	زیار	80	83	67
Azarshahr7	آذرشهر ۷	45	85	33
Azarshahr23	آذرشهر ۲۳	60	92	58
Alavije	علویجه	95	75	33
1 Azarshahr9	آذرشهر ۹	45	25	67
Azarshahr 9	آذرشهر ۹	90	75	42

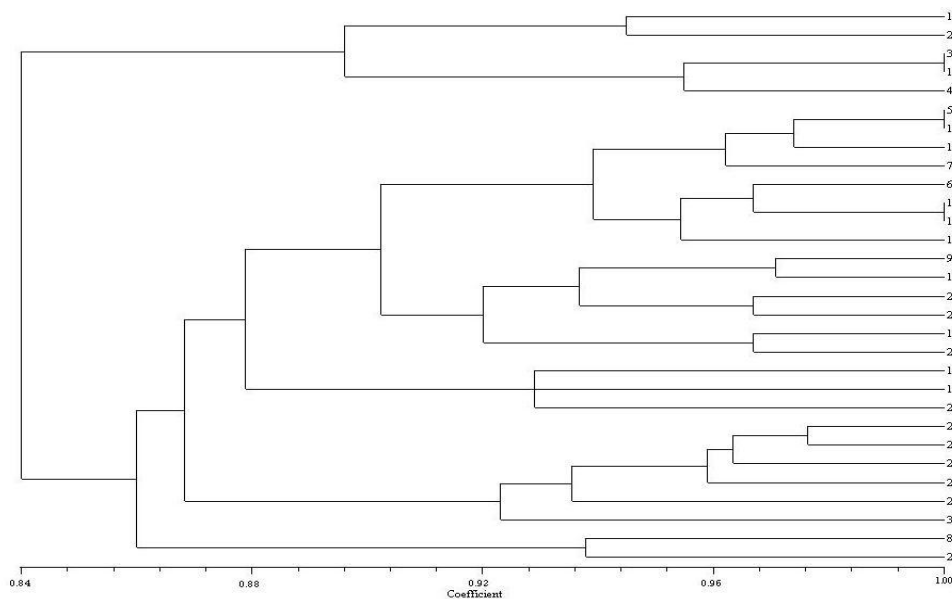
تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* با استفاده از نشانگر RAPD جدایه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های اصفهان، اردبیل، کرمان و فارس با روش RAPD و با استفاده از ۱۵ آغازگر به صورت تصادفی از نظر تنوع ژنتیکی بررسی شدند (شکل ۱ و ۳)، که بر اساس دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل نتایج و الگوی باندهای این ۳۰ جدایه در سطح تشابه ۸۵ درصد به پنج گروه تقسیم شد (شکل ۲). گروه اول شامل جدایه‌های آذر شهر ۱، ۱ شیراز ۲، برآن ۳، برآن و شیراز ۵ بودند. گروه دوم شامل ۱۳ جدایه شیراز ۷، برآن ۴، علویجه ۱، شیراز ۱۶، شیراز ۲۱، شیراز ۱۰، کرمان، زیار، آذرشهر ۷، علویجه، ۲ شیراز ۳، شیراز ۲ و ۱ آذر شهر ۷ بود. در گروه سوم جدایه‌های زیار ۱، آذرشهر ۳ و آذرشهر ۲۳ قرار گرفتند. گروه چهارم شامل جدایه‌های ۱ آذر شهر ۹، آذر شهر ۹، مبارکه ۲ شیراز ۲، برآن ۲، آذر شهر ۳ و ۱ آذرشهر ۱ بود و در گروه پنجم دو جدایه‌ی ۲ آذر شهر ۹ و ۴ شیراز ۲ قرار گرفتند.



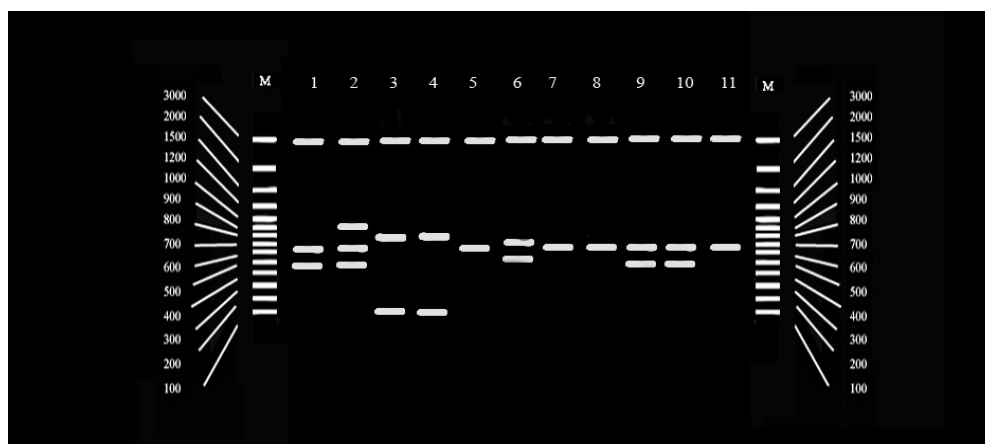
شکل ۱- الگوی باندهای RAPD حاصل از تکثیر جدایه‌های ۱ تا ۳۰ قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*
 Fig. 1. RAPD banding patterns amplified in 30 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* isolates

For name of isolates see Table 1.

برای نام جدایه‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.



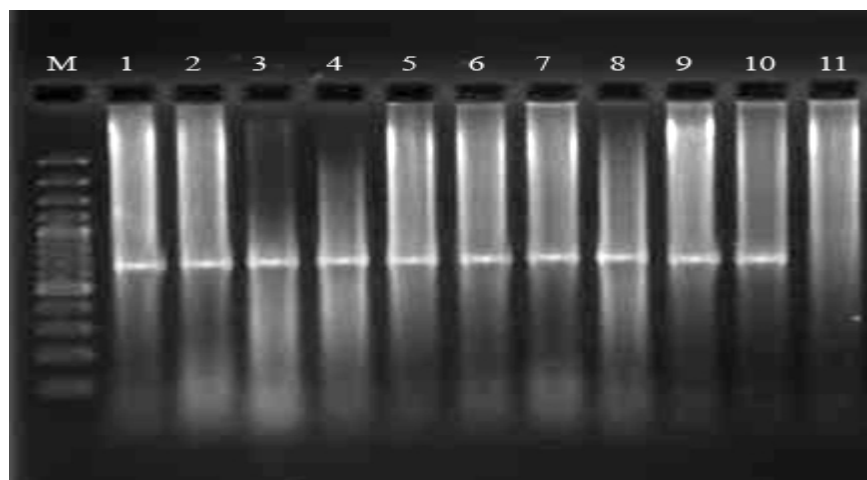
شکل ۲- دندروگرام جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* توسط RAPD با استفاده از برنامه UPGMA
 Fig. 2 UPGMA dendrogram of the *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* isolates by RAPD



شکل ۳- الکتروفورز DNAهای استخراج شده از جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*
 Fig. 3. Electrophoresis of extracted DNA from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* isolates
 برای نام جدایه‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.

واکنش PCR از توالی‌های منطقه ITS

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیاپاز از آغازگرهای ITS1/ITS4 نیز استفاده گردید، که بر مبنای ژن ITS طراحی شده‌اند. در واکنش PCR از جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 (قطعه تکثیری مورد انتظار ۷۰۰ bp)، استفاده شد (White *et al.*, 1990). در الکتروفورز محصول واکنش PCR روی ژل آگاروز ۱٪ نمونه‌ها دارای باند تکثیر شده در حدود ۶۰۰ bp بودند (شکل ۴). در نمونه‌های سالم هیچ گونه باندهایی روی ژل مشاهده نشد. دلیل اصلی استفاده از این آغازگر، طول مناسب قطعه مورد تکثیر با این جفت آغازگر بود.



Ladder 100 plU: M

شکل ۴- تکثیر قطعه ≈ 600 bp توسط جفت آغازگر ITS1/ITS4 از جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepa*e. Fig. 4. Multiplication of 600 bp segment by ITS1/ITS4 primers from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepa*e isolates. For name of isolates see Table 1. برای نام جدایه‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.

تجزیه و تحلیل PCR-RFLP جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepa*e و گروه‌بندی جدایه‌ها

با مقایسه توالی نوکلئوتیدی قطعه تکثیر یافته از ناحیه ITS، جدایه‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن، این جدایه‌ها با ۹۹ درصد شباهت با عوامل HQ65896، HQ77559، GU136492 و HQ658958 همگی در گروه *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepa*e قرار گرفتند. با وجود الگوی برش مشابه بین جدایه‌ها در آنالیز PCR-RFLP با استفاده از آنزیم *AluI*، *TaqI*، *MseI*، *EcoRI* و همگی در یک گروه طبقه‌بندی شدند (شکل ۵).

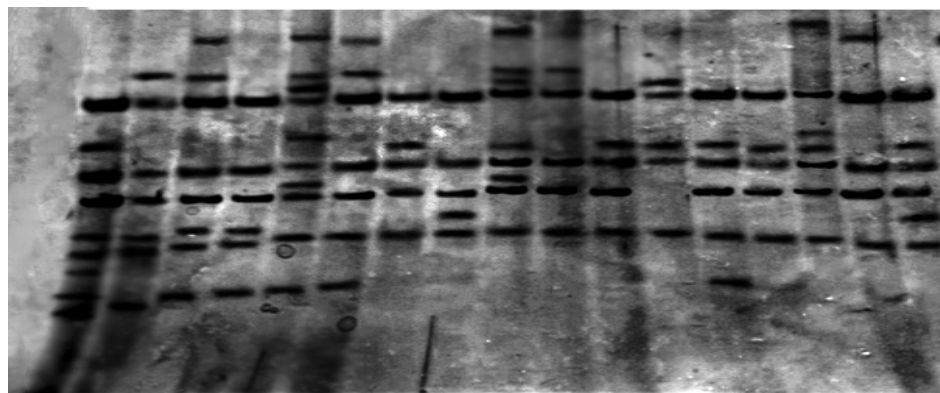
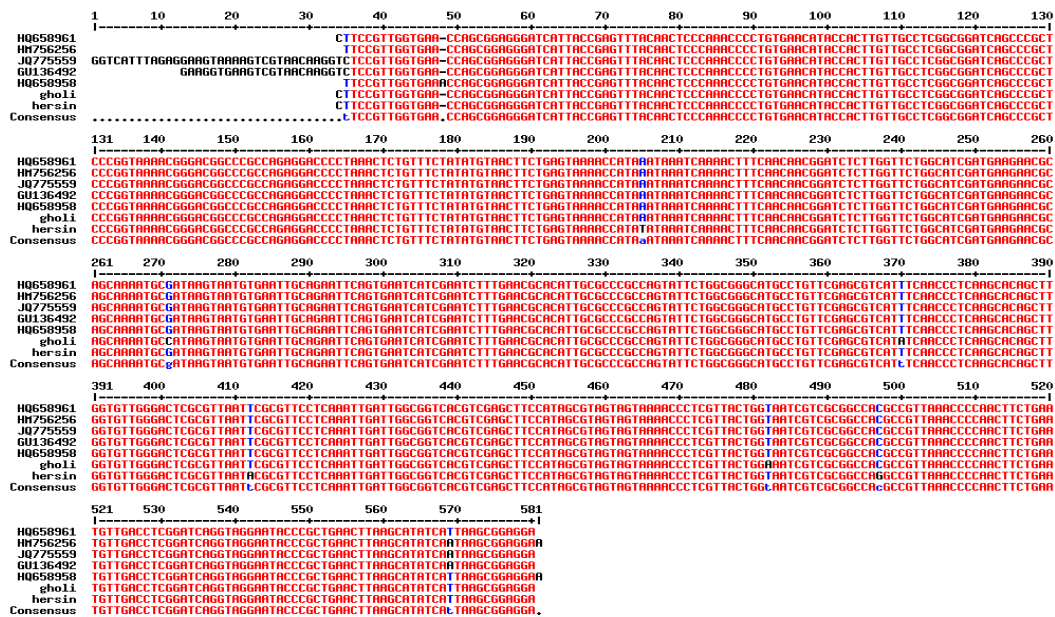
شکل ۵- الگوی باندی RFLP حاصل از تکثیر ۱۷ جدایه *F.oxysporum* f.sp. *cepa*e با آنزیم *AluI*

Fig. 5. RFLP banding patterns amplified by 17 isolates of *F. oxysporum* f.sp. *cepa*e by *AluI* enzyme. جدایه‌های شهرهای مختلف دارای الگوی RFLP مشابهی بودند. در برخی از نمونه‌ها باندهای ضعیفی هم مشاهده شد که به نظر می‌رسد، دلیل عدم انجام واکنش صحیح PCR می‌باشد که با بهینه‌سازی واکنش این الگوهای اضافه حذف شدند دو نمونه، یکی مرتبط با قولی قصه (جدایه آذر شهر ۱) و یکی مرتبط با پیاز هرسین (جدایه مبارکه) به عنوان نمونه‌هایی از کل مجموعه انتخاب شدند و برای توالی‌یابی فرستاده شدند. نمونه‌های توالی‌یابی شده پس از انجام بلاست

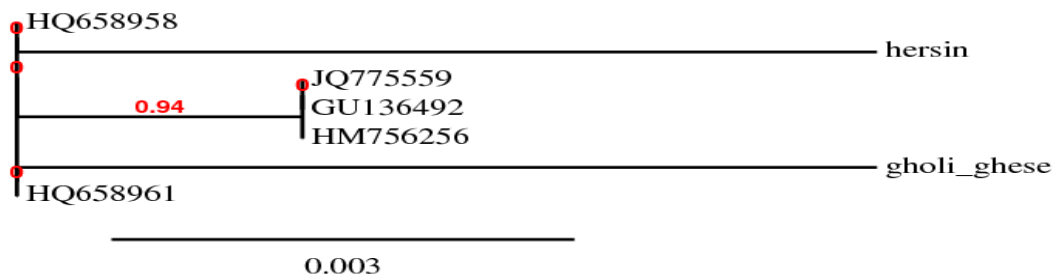
با نمونه HQ 65896 که مرتبط با *F. oxysporum* f. sp. *cepaе* که از کشور آمریکا در بانک ژن مرتبط با پوسیدگی ریشه و طبق پیاز گزارش شده بود شباهت نشان داد. جدایه‌های مبارکه به ترتیب در نوکلئوتید ۲۰۵، ۴۱۲، ۴۹۷ و آذرشهر ۱ در نوکلئوتیدهای ۲۷۱، ۴۸۲، ۳۷۰ با جدایه HQ 65896 که توسط ساکسنا و همکاران (Saxena *et al.*, 2010) هم چنین، با توالی‌های دیگری که شامل JQ77559 (Weber, 2012)، GU136492 (Chen, 1985) و HQ658958 و GU136492 (Chen, 1985) multalign قرار گرفتند (Saxena *et al.*, 2010) مشابهت نشان داد. جدایه‌های این تحقیق با جدایه‌های فوق در نرم‌افزار multalign قرار گرفتند که میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های آن‌ها مورد بررسی قرار بگیرد. شباهت‌ها و تفاوت‌ها در شکل ۶ نشان داده شده است (Saxena *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 1985; Weber, 2012).



شکل ۶- هم ردیف‌سازی توالی جدایه‌های تکثیر شده با جفت آغازگر ITS1/ITS4 با نرم‌افزار Multialign موجود در سایت ExPASy (هرسین: مبارکه و قوی قصه منظور جدایه آذرشهر ۱ می‌باشد).

Fig. 6. Alignment of amplified isolates with ITS1/ITS4 primer and Multialyn application in ExPASy site.

بر اساس نتایج این تحقیق، درخت فیلوژنتیکی حاصل از بلاست جدایه‌های مبارکه و آذرشهر ۱ با جدایه‌های موجود در بانک ژن مشخص شد (شکل ۷).



شکل ۷- درخت فیلوژنتیکی حاصل از بلاست جدایه هرسین (مبارکه) و قوی قصه (آذرشهر ۱) با جدایه‌های بانک ژن
Fig. 7. Phylogenetic tree of the blast of Hersin (Mobarake) and Gholighese (Azarshahr1) isolates and isolates from Genbank

بحث

همان‌طور که نتایج آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز نشان داد، جدایه‌ها از بیماری‌زایی متفاوتی روی سه رقم پیاز کاشان، آذر شهر و اهواز، برخوردار بودند و بیماری‌زایی آن‌ها روی ارقام پیاز بالا بود. این موضوع بیانگر احتمال وجود نژادهای فیزیولوژیک در جمعیت قارچ عامل بیماری است. این نتایج با یافته‌های بایراکتار (Bayraktar, 2010) در خصوص تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ FOC و وجود نژادها برای این قارچ بیماری‌زا در پیاز همخوانی دارد. روش RAPD روش مبتنی بر PCR است که بر پایه تکثیر تصادفی توالی‌های ژنومی استوار است و به وسیله آن می‌توان انگشت نگاری DNA یک ژنوم بزرگ و پیچیده را تهیه کرد. در این روش برخلاف روش‌های استاندارد PCR از یک آغازگر به طول ۱۰-۹ نوکلئوتید که ردیف بازی آن به‌طور قراردادی تعیین می‌گردد استفاده می‌شود. در این واکنش یک آغازگر منفرد نقاط مکمل خود را روی دو رشته DNA ژنومی نمونه پیدا و خود را در آن نقاط روی دو رشته DNA متصل می‌کند. اگر محل اتصال آغازگرها در روی رشته متقابل به هم نزدیک باشند (فاصله‌ای که DNA قابل تکثیر باشد) توالی بین آن دو نقطه اتصال طی PCR تکثیر خواهد شد. بنابراین چنانچه دو آغازگر به طور تصادفی روی دو قطعه از DNA قرار بگیرند فرآورده‌های حاصل از آن‌ها متفاوت خواهد بود؛ به عبارت دیگر، الگوی RAPD آن‌ها متفاوت است. از این تفاوت‌ها برای مطالعات الگوی پلی مورفیسم DNA، تعیین روابط فیلوژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی می‌توان استفاده کرد. همچنین استفاده از مارکر RAPD به دلیل مزایای بالای آن از قبیل استفاده از آغازگرهای تصادفی، عدم نیاز به توالی DNA و مواد رادیواکتیو از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. به علاوه، از این روش به‌عنوان یکی از نشانگرهای مولکولی مهم در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مربوط به نژادها استفاده می‌شود. بنابراین روش RAPD به‌عنوان بهترین روش جهت مطالعه مولکولی جدایه‌های قارچ عامل انتخاب شد. سهولت انجام RAPD و سریع بودن آن از دیگر دلایل انتخاب این روش بود.

استفاده از روش RAPD به دلیل تصادفی بودن پرایمرها نتوانست روش مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی در این تحقیق محسوب شود. اگرچه با تکنیک PCR-RFLP به کار رفته در این تحقیق تمامی جدایه‌ها الگوی بانندی مشابهی را نشان دادند اما استفاده از مناطق کم‌تر حفاظت شده می‌تواند در تعیین تنوع ژنتیکی کمک کننده باشد. همچنین بر مبنای تنوع ژنتیکی گروه‌ها می‌توان راهکارهای متنوعی را برحسب گروه ژنتیکی برای کنترل به‌کاربرد. به نظر می‌رسد منطقه ITS نمی‌تواند منطقه مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های فوزاریوم در ایران محسوب شود. RAPD یک نشانگر غالب است که برای بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی جدایه‌های قارچ FOC استفاده شده است (Thompson *et al.*, 1997; Ouborg *et al.*, 1999; Mackill *et al.*, 1995; Haley *et al.*, 1994).

در مقایسه بین جدایه‌ها از نظر تشابهات گروهی در خصوص بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی آن‌ها، این‌طور به نظر می‌رسد که ارتباط خاصی در این خصوص و در این تحقیق وجود نداشت، چرا که کم‌ترین و بیش‌ترین شدت بیماری متعلق به جدایه‌های گروه دوم در دندروگرام حاصله بود.

بررسی‌های انجام شده در خصوص تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیاز و پیازچه در کشور ژاپن نشان داد که از ۱۲ منطقه‌ای که منجر به اخذ ۵۵ جدایه از این قارچ شده بود (۲۷ جدایه از پیاز و ۲۸ جدایه پیازچه) با یکدیگر از نظر ژنتیکی متفاوت بودند در این بررسی‌ها از روش توالی‌یابی و گروه‌های سازش ریشی در مطالعه تنوع این جدایه‌ها استفاده شده بود (Sasaki *et al.*, 2015). همچنین بررسی‌ها در خصوص شناسایی مولکولی دو گروه سازگار ریشی قارچ FOC در کشور ژاپن روی پیاز با استفاده از مارکر رپید، (SCAR)، IR و انگشت‌نگاری نشان داد که فقط آغازگرهای رپید توانستند اطلاعات لازم و کافی را در خصوص دو گروه سازگار ریشی این قارچ نمایان سازد ولی روش (SCAR) چیزی را مشخص ننمود، در این راستا ۸۸ جدایه قارچ مذکور مورد مطالعه قرار

گرفت (Sasaki *et al.*, 2015). در همین راستا ساتوود و همکاران (Southwood *et al.*, 2012) در آفریقای جنوبی با بررسی جدایه‌های قارچ FOC عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز مشاهده کردند که جدایه‌های اخذ شده از نظر گروه‌های سازش رویشی با یک دیگر متفاوت بوده و قابل تفکیک می‌باشند. این جدایه‌ها با گروه‌های رویشی کلورادو نیز مقایسه گردیده بود. در این بررسی‌ها مشاهده گردید که ۴۷٪ از جدایه‌ها از گروه‌های سازگار غالب کلورادو و ۴۷٪ آن‌ها متعلق به آفریقای جنوبی بودند. بررسی‌های ژنتیکی توسط rDNA آن را مورد تأیید قرار داد. بررسی‌های انجام شده توسط تایلور و همکاران (Taylor *et al.*, 2013) در خصوص شناسایی و تفاوت جدایه‌های قارچ FOC در کشور انگلیس روی پیاز نشان داد که جدایه‌های مربوطه از نظر ژنتیکی و نیز بیماری‌زایی تفاوت قابل توجهی دارند و همچنین مشاهده گردید که جدایه‌ها از نظر بیماری‌زایی به دو گروه قابل تفکیک هستند هرچند که هر دو گروه بیماری‌زا بوده ولی از نظر شدت بیماری‌زایی با یک دیگر تفاوت قابل توجهی داشتند. پژوهش‌ها نشان داده است، هنگام کار با صفات کمی، یا صفاتی مانند شدت بیماری، که به دلیل حساسیت به شرایط محیطی تغییرپذیری زیادی نشان می‌دهد، بهتر است از مارکرهای بیوشیمیایی و مولکولی برای شناسایی و جداسازی تنوع استفاده شود. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و همچنین بررسی مطالعات قبلی که کارآیی این روش را در عرصه مطالعاتی ژنتیکی از طریق طبقه‌بندی آن‌ها نشان می‌دهد پیشنهاد می‌شود تا با انجام مطالعات پیشرفته‌تر با استفاده از سایر نشانگرهای مولکولی از جمله آیزوایم (Isozymes)، RFLPs (Restriction fragment length) و میکروساتلایت‌ها (Microsatellites) اطلاعات بیش‌تری در این زمینه به دست آورد و با ادغام نتایج حاصله به بررسی و شناخت هر چه بهتر ذخایر توارثی و ساختار ژنتیکی این جدایه‌ها پرداخته شود. این موضوع سبب شناسایی هر چه سریع‌تر خصوصیات مجموعه‌های ژنتیکی می‌شود. به همین منظور برای تکمیل فعالیت‌ها تصمیم بر آن شد تا از واکنش دیگری تحت عنوان PCR-RFLP استفاده گردد. تجزیه و تحلیل تابع تشخیص و گروه‌بندی مقایسه‌ای مزدوج نیز با احتمال ۱۰۰ درصد اختلاف واقعی بین این پنج گروه را مورد تأیید قرار داد و مشخص کرد که ارتباط معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد و گروه‌های به دست آمده کاملاً مستقل از هم هستند.

References

منابع

- حجازی، ر. و نصر اصفهانی، م. ۱۳۸۵. بررسی و شناسایی عوامل قارچی همراه پوسیدگی ریشه و طبق پیاز اصفهان. خلاصه مقالات هفدهمین گنکره گیاه پزشکی ایران، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج. ص ۱۷۹.
- محمدی، ح. و بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۸۴. انتشار، بیماری‌زایی و پایداری فوزاریوم‌های مولد پژمردگی و پوسیدگی ریشه نخود در استان فارس. بیماری‌های گیاهی ۴۱: ۴-۸.
- ملکیان، ر.، نصر اصفهانی، م.، فهیمی، ح. و مجروحی، ع. ۱۳۹۱. بررسی‌های فنولوژیکی، مورفولوژیکی، سازگاری رویشی و بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز. پایان نامه کارشناسی ارشد، گروه علوم گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران. ۱۶۲ صفحه.
- مومنی، ح.، مظفری، ج.، رستگار، م. ف. و جعفرپور، ب. ۱۳۸۴. بررسی چند شکلی DNA در گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia solani* در مزارع چغندر قند استان خراسان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD. بیماری‌های گیاهی ۴۱: ۴۹۵-۵۰۷.
- والی، ف. ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی گروه فایتوپلاسمایی Aster yellow در فلات مرکزی ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.
- Abawi, G. S. and Lorbeer, J. W. 1971. Reaction of selected onion varieties to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. Plant Disease Reporter 55: 1000-1004.

- Abdessamad, M. E., Lilja, A., Hantula, J. and Martin, M. P. 2003.** Identification of Spanish isolates of *Rhizoctonia solani* from potato by anastomosis grouping, ITS-RFLP and RAMS-fingerprinting. *Phytopathologia Mediterranea* 42: 2-10.
- Arnheim, N. and Erlich, H. 1992.** Polymerase chain reaction strategy. *Annual. Review of Biochemistry* 61: 131-156.
- Bayraktar, H. 2010.** Genetic diversity and population structure of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* , the causal agent of Fusarium basal plate rot on onion, using RAPD markers. *Journal of Agricultural Sciences* 16: 139-149.
- Bentley, S., Pegg, K. G. and Dale, J. L. 1994.** Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyse genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Journal of Phytopathology* 142: 64-78.
- Booth, C. 1971.** The Genus *Fusarium*. CMI, Kew Surrey, England. 273pp.
- Cenis, J. L. 1992.** Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20: 2380.
- Chen, Q., X. Ji, X. and Sun, W. 1985.** Identification of races of cotton Fusarium wilt in China. *Agricultural Science China* 6: 1-6.
- Cho, Y. C., Shing, Y. S., Ahn, S. N., Gregorio, G. B., Kang, K. H., Brar, D. and Moon, H. P. 1999.** DNA Fingerprinting of rice cultivars using AFLP and RAPD markers. *Korean Journal of Crop Science* 44 (1): 26-31.
- Dale, J. K., Maroto, M., Dequeant, M. L., Malapert, P., McGrew, M. and Pourquie, O. 2003.** Periodic inhibition by lunatic fringe underlies the chick segmentation Clock. *Nature* 16; 421(6920): 275-278.
- Ebrahimi, R., Zamani, Z. and Kashi, A. 2009.** Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 119(4): 345-351.
- Haley, S. D., Afanador, L. K. and Kelly, J. D. 1994.** Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near – isogenic lines for RAPD marker localization. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 337-342.
- Hibbett, D. S. 1992.** Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transactions of the British Mycological Society* 33: 533-556.
- Hussain, S. W., Ishtiaq, M. and Hussain, S. A. 2001.** Effect of different bulb sizes and planting dates on green leaf production of onion (*Allium cepa* L.). *Online Journal of Biological Sciences* 1(5): 345-347.
- Lee, Y., Choi, Y. K. and Min, B. 2000** PCR – RFLP and sequence analysis of the rDNA its region, in the *Fusarium* spp. *Journal of Mycology* 38: 66-73.
- Mackill, D. J., Zhang, Z. and Redona, E. D. 1995.** Comparison of AFLP, microsatellite and RAPD marker poly- morphism in rice. *RGN* 12: 245-248.
- Migheli, Q., Briatore, E. and Garibaldi, A. 1998.** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify races 1, 2, 4 and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy. *European Journal of Plant Pathology* 104: 49-50.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983.** *Fusarium Species : An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA. 193 pp.
- Ouborg, N. J., Piquot, Y. and Van Groenendael, J. M. 1999.** Population genetics, molecular markers, and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87 (4): 551-568.
- Sasaki, K., Nakahara, K., Tanaka, S., Shigyo, M. and Ito, S. 2015.** Genetic and pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolated from onion and welsh onion in Japan. *Phytopathology* 105(4): 525-532.
- Saxena, R., Hivert, M.F., Langenberg, C., Tanaka, T., Pankow, J.S., Vollenweider, P., Lyssenko, V., Bouatia.Naji, N., Dupuis, J., Jackson, A.U., Kao, W.H., et al., 2010.** Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. *Nat. Genet.* 42: 142-148.
- Shishkoff, N. 1993.** Pyrenochaeta. pp. 153-156. In: Singleton, L.L., Mahail, J.D. and Rush, C.M. (eds.) *Methods for Research on Soil Borne Phytopathogenic Fungi*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Singleton, L. L., Mihail, J. D. and Rush, C. M. 1993.** *Methods for Research on Soil Borne Phytopathogenic Fungi*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 265 pp.

- Southwood, M. J., Viljoen, A., Mostert, L., Rose, L. J. and McLeod, A. 2012.** Phylogenetic and biological characterization of *Fusarium oxysporum* isolates associated with onion in South Africa. *Plant Disease* 96 : 1250-1261.
- Swift, C. E., Wickliffe, E. R. and Schwartz, H. F. 2002.** Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from onion in colorado. *Plant Disease* 86: 606-610.
- Taylor, A., Vagany, V., Barbara, D. J., Thomas, B., Pink, D. A. C., Jones, J. E. and Clarkson, J. P. 2013.** Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* isolates in commercial onion cultivars through the development of a rapid seedling assay. *Plant Pathology* 62: 103–111.
- Thompson, J. D., Gison, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997.** The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- van der Waals, J. E., Korsten, L. and Slippers, B. 2004.** Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease* 88: 959-964.
- White, T. J. 1990.** PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, USA.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and
- Widodo., Kondo, N., Kobayashi, K. and Ogoshi, A. 2008.** Vegetative compatibility groups within *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* in Hokkaido-Japan. *Journal Microbiology Indonesia* 1: 39-43.