

## تنوع ژنوتیپی، فنوتیپی و بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium solani*

### عامل پوسیدگی ریشه لوبیا در استان زنجان

مریم خداقلی<sup>۱</sup>، رقیه همتی<sup>۲\*</sup>، بیتا ناصری<sup>۳</sup> و علیرضا معرفت<sup>۴</sup>

۱ و ۲- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

۳- استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۳/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

#### چکیده

بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا ناشی از قارچ *Fusarium solani* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی لوبیا در دنیا و ایران به‌شمار می‌رود. به‌دلیل اهمیت اقتصادی لوبیا و نبود اطلاعات مدون پیرامون تنوع در جمعیت این قارچ در استان زنجان، این مطالعه برای نخستین‌بار در این استان با هدف مطالعه تنوع در شدت بیماری‌زایی، تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های بیمارگر و نیز بررسی دامنه میزبانی آن در بین برخی محصولات عمده مورد کشت منطقه انجام گرفت. نمونه‌برداری از ۱۱ منطقه استان انجام شد و ۳۰ جدایه به‌عنوان گونه *F. solani* F. خالص شدند. پس از اثبات بیماری‌زایی، بررسی دامنه میزبانی قارچ و ویژگی‌های فنوتیپی آنها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با کمک آغازگرهای RAPD و ERIC بر روی DNA استخراج‌شده، صورت پذیرفت. نتایج تحقیق نشان داد که جدایه‌ها از نظر مشخصات فنوتیپی و ژنوتیپی، متنوع بوده اما در شدت بیماری‌زایی آنها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در آزمون دامنه میزبانی از بین ۹ گیاه آرموده‌شده شامل گندم، عدس، یونجه، لوبیاهای سفید، قرمز و چیتی، نخود، اسپرس و باقلا، تنها بر روی گندم علائم بیماری ظاهر نشد. الگوهای انگشت‌نگاری DNA بر اساس هر دو نشانگر، دال بر وجود تنوع بالای ژنتیکی جدایه‌های این بیمارگر از گیاه لوبیا در سطح استان بود. گرچه نشانگر RAPD بر پایه استفاده از یک آغازگر انفرادی (OPA 13) در تفکیک جدایه‌ها کارایی بیشتری در مقایسه با نشانگر ERIC داشت، با این حال تطابق بالایی بین دو گروه‌بندی مشاهده گردید. بین پراکنش جغرافیایی و گروه‌های ژنتیکی به‌دست‌آمده، ارتباط مشخصی مشاهده نگردید. همچنین همبستگی بارزی بین ویژگی‌های ژنوتیپی و فنوتیپی اکثریت جدایه‌ها دیده نشد.

واژه‌های کلیدی: لوبیا، *Fusarium solani*، تنوع ژنتیکی، دامنه میزبانی

#### مقدمه

در ایران نیز این بیماری همه‌ساله خسارت قابل‌ملاحظه‌ای به کشاورزان تحمیل می‌نماید. Moeini & Ahmadi nejad (1998) به موارد نادری از بیماری پوسیدگی ریشه در مزارع لوبیای استان زنجان در سال‌های زراعی ۷۵-۱۳۷۴ اشاره کردند. در سال ۱۳۸۶، قارچ‌های عامل بیماری‌های پوسیدگی ریشه لوبیا بسته به شرایط هر منطقه، قادر به آلودگی ۴/۷ تا ۹۵/۳ درصد گیاهان و کاهش ۲/۸ تا ۵۷/۲ گرم بر مترمربع تولید بذر لوبیا در مزارع استان زنجان بودند (Naseri & Moradi, 2008)؛ به‌طوری‌که *F. solani* به‌عنوان عامل اصلی بیماری به‌طور متوسط از ۵۴/۲ درصد (۱۳۸۶) و ۸۶ درصد (۱۳۸۷) نمونه‌های ریشه از مزارع لوبیا جداسازی شد و قارچ‌های *M. phaseolina* R. *solani* و *F. oxysporum* از نظر فراوانی به‌ترتیب پس از آن قرار گرفتند (Naseri & Moradi, 2008).

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) یکی از پنج گونه جنس *Phaseolus* است که بعد از سویا و بادام‌زمینی، سومین محصول مهم خانواده حبوبات در دنیا به‌شمار می‌رود (Broughton et al., 2003). بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا توسط مجموعه‌ای از بیمارگرهای قارچی خاک‌زاد نظیر *Rhizoctonia solani*، *Macrophomina phaseolina* و *Pythium spp.* ایجاد می‌شود (Nderitu et al., 1997). پوسیدگی ریشه لوبیا ناشی از قارچ *F. solani* f.sp. *phaseoli* در بیشتر مناطق لوبیاکاری دنیا گزارش شده است (Naseri & Marefat, 2011).

\* نویسنده مسئول: کیلومتر ۵ جاده زنجان-تبریز، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، گد پستی: ۳۸۷۹۱-۴۵۳۷۱، تلفن: ۰۲۴۱۵۴۰۵۳، rhemati@znu.ac.ir

استان‌های خراسان رضوی و شمالی با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD نشان داد که این گونه از تنوع ژنتیکی بسیار بالایی برخوردار است. همچنین، هیچ ارتباطی بین گروه‌های ژنتیکی و منشأ جغرافیایی جدایه‌ها وجود نداشت (Baghaee Ravari et al., 2007). بکارگیری نشانگر RAPD جهت مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۹ جدایه *F. solani* f. sp. *phaseoli* به دست آمده از سویا در آمریکا، تنوع ژنتیکی اندکی را درون این فرم مخصوص نشان داد. نتایج حاصل از توالی‌یابی ناحیه ITS حاکی از وجود سطوح پایین تنوع در میان افراد و همچنین داخل گونه بود (Achenbach et al., 1997). به‌علت دامنه وسیع میزبانی این قارچ، کنترل بیماری از طریق تناوب، مشکل است. از سویی دیگر، پتانسیل بالای تغییرپذیری و وقوع نوترکیبی در جمعیت‌های بیمارگر بر نتایج نهایی روش‌های کنترل‌کننده بیماری، از جمله کاربرد ارقام مقاوم، تأثیرگذار خواهد بود.

اهمیت این بیماری مخرب در یکی از قطب‌های تولید لوبیا در کشور، انگیزه‌ای شد تا برای نخستین بار به مطالعه وضعیت ساختار ژنتیکی، صفات مورفولوژیک و دامنه میزبانی قارچ *F. solani* در بین برخی گیاهان رایج مورد کشت در منطقه پرداخته شود تا بتوان در آینده، گام‌های مؤثرتری در مدیریت این بیماری برداشت.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری و جداسازی و شناسایی قارچ

در تابستان ۱۳۸۸ از ۱۱ منطقه لوبیاکاری استان زنجان، به‌صورت تصادفی نمونه‌برداری شد (جدول ۱) و از هر مزرعه، سه بوته بیمار با علائم زردی، پژمردگی و مرگ بوته، پوسیدگی همراه با ترک‌های طولی و لکه‌های قهوه‌ای بر روی ریشه و طوقه، انتخاب و با درج مشخصات به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شستشوی سطحی ریشه و طوقه گیاهان آلوده، از حدفاصل بخش‌های آلوده و سالم، قطعاتی به ابعاد یک سانتی‌متر جدا و با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت دودقیقه ضدعفونی شدند. در ادامه، قطعات ضدعفونی‌شده به ظروف پتری محتوی PDA (۳۹ گرم در یک لیتر آب مقطر) و آنتی‌بیوتیک (کلرامفنیکول) منتقل و به مدت یک هفته در دمای اتاق (۱+۲۵°C) رشد کردند. خالص‌سازی قارچ به‌روش تک‌اسپورسازی روی محیط کشت آب-آگار (WA) دو درصد انجام گرفت. شناسایی قارچ *F. solani* با توجه به خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی آن روی محیط کشت‌های غذایی سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) و برگ میخک-آگار (CLA) با استفاده از کلید (Leslie & Summerell, 2006) انجام شد.

*F. solani* (teleomorph=*Haematonectria haematococca*)

قارچی خاک‌زاد با گسترش جهانی است که یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی محسوب می‌شود. همچنین این قارچ دارای گستره وسیع میزبانی بر روی حداقل ۸۷ جنس گیاهی می‌باشد (Burgess et al., 1992; Kolattukudy & Gamble, 1995).

براساس آزمون‌های دامنه میزبانی و مولکولی، *F. solani* به فرم‌های مخصوص و واریته‌های مختلف تقسیم می‌شود (Booth, 1971; Gerlach, 1981; Zaccardelli et al., 2008). با توجه به میزان بالای آلودگی و خسارت در مزارع استان، تعیین دامنه میزبانی این بیمارگر و نیز بررسی تنوع جمعیت و بیماری‌زایی جدایه‌های این قارچ که اطلاعات مفیدی در جهت بکارگیری روش‌های مناسب کنترل بیماری در شرایط استان زنجان را فراهم خواهد کرد، امری ضروری است. روش‌های مولکولی که بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام می‌شود، ابزاری برای طراحی نقشه‌های ژنتیکی، مطالعات تکاملی، رده‌بندی و تشخیص گونه‌های قارچی است (Clulow et al., 1991; McDonald, 1997). این روش‌ها به‌تنهایی یا به‌عنوان روش‌های مکمل به‌همراه آزمون‌های مورفولوژیک و بیماری‌زایی برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم می‌توانند کاربرد داشته باشند (El-Fadly et al., 2008).

ERIC-PCR یکی از روش‌های رایج در بررسی ژنتیک

مولکولی باکتری‌هاست؛ باین‌حال، گاهی در مورد قارچ‌ها نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mehta et al., 2002). در مطالعه‌ای که روی ۴۴ جدایه قارچ *F. solani* انجام شد، آغازگر ERIC مفیدتر از RFLP در تفکیک جدایه‌ها ظاهر شد و تنوع ژنتیکی بالایی را در بین جدایه‌ها نشان داد (Godoy et al., 2004). در مطالعه روی تنوع ژنتیکی ۱۴۰ جدایه قارچ *F. solani* با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD-PCR، RFLPs، تنوع ژنتیکی وسیعی بین جدایه‌های قارچ مشاهده شد (Morid et al., 2009). در تحقیقی دیگر که روی چندشکلی DNA جدایه‌های *F. solani* f.sp. *pici* عامل پوسیدگی فوزاریومی نخود در استان‌های خراسان رضوی و شمالی توسط نشانگر RAPD انجام شد، رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی با منطقه جغرافیایی جدایه‌ها یافت نشد (Hasanzadeh et al., 2008). بررسی تنوع ژنتیکی ۱۸ جدایه *F. solani* به دست آمده از میزبان‌های گیاهی و جانوری در برزیل که از طریق انگشت‌نگاری rDNA انجام شد، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای درون‌گونه‌ای بود و این تنوع، هیچ ارتباطی با منشأ میزبانی و منطقه جغرافیایی جدایه‌ها نداشت. این تنوع، حتی در توالی‌های حفظ‌شده همچون rDNA نیز مشاهده گردید (Brasileiro et al., 2004). مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. solani* عامل پژمردگی و پوسیدگی خشک سیب‌زمینی در

### آزمون بیماری‌زایی و ارزیابی شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها

بدور لوبیاقرمز (رقم ناز تهیه‌شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان) به مدت یک دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضد عفونی و به مدت ۷۲ ساعت در آب، خیسانده شدند. گلدان‌ها به نسبت (۱:۱) از خاک مزرعه و ماسه و خاک برگ دوبار اتوکلاو شده، پُر شدند. به ازای هر جدایه، سه گلدان به ابعاد (۴×۳×۴) سانتی‌متر و یک گلدان نیز به عنوان شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی در نظر گرفته شد. در هر گلدان، سه بذر لوبیا کشت شد و گیاهان در دما ۱۴-۲۵°C با نور طبیعی در گلخانه به مدت دوهفته رشد نمودند. جهت مایه‌زنی گیاهچه‌های جوان لوبیا، در مرحله رشدی V<sub>2</sub> (مرحله ظهور برگ‌های اولیه)، سوسپانسیون اسپور با غلظت تقریبی ۱۰<sup>۶</sup> کنیدی در میلی‌لیتر از کشت هفت‌روزه هر جدایه استفاده شد (Abawi et al., 1990). پس از ایجاد زخم به کمک اسکالپل سترون، در قسمت طوقه لوبیا، دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور تهیه‌شده، بر روی محل زخم اضافه گردید. پس از گذشت پنج هفته، با مشاهده علائم بیماری، بوته‌ها از گلدان‌ها خارج و علائم، ثبت گردید. ریشه گیاهان تیمار و شاهد، جهت جداسازی و تأیید قارچ مایه‌زنی شده به عنوان عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت بررسی شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها، از مقیاس ۰-۵ به شرح زیر استفاده شد (Nasari & Moradi, 2008):

- ۰ = گیاه عاری از بیماری؛
  - ۱ = شدت بیماری ضعیف یا ۱۰-۱ درصد؛
  - ۲ = شدت بیماری متوسط یا ۲۵-۱۰ درصد؛
  - ۳ = شدت بیماری متوسط تا شدید یا ۵۰-۲۵ درصد؛
  - ۴ = شدت بیماری شدید یا ۷۵-۵۰ درصد؛
  - ۵ = شدت بیماری بسیار شدید تا مرگ کامل گیاه یا ۱۰۰-۷۵ درصد.
- مقایسه جدایه‌ها از نظر بیماری‌زایی بر اساس داده‌های به دست آمده از این آزمون توسط نرم‌افزار GENSTAT نسخه ۶ مورد ارزیابی قرار گرفت.

### آزمون دامنه میزبانی

به منظور بررسی گستره میزبانی قارچ *F. solani* ۹ گیاه گندم، عدس، یونجه، لوبیاسفید، لوبیاقرمز، لوبیاچیتی، نخود، اسپرس و باقلا انتخاب شدند. انتخاب میزبان‌ها بر اساس محصولات عمده مورد کشت در استان زنجان بود. مراحل آماده‌سازی بدور و گلدان‌ها جهت کاشت همانند روش اثبات بیماری‌زایی صورت گرفت. در این مرحله نیز به ازای هر میزبان، سه گلدان (حاوی سه بذر در هر یک) و یک گلدان نیز به عنوان شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی در نظر گرفته شد. بعد از گذشت دو هفته از زمان کاشت، به هر گلدان دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور به غلظت

تقریبی (۱۰<sup>۶</sup> × ۲۵ کنیدی/میلی‌لیتر) که از مخلوط سوسپانسیون‌های اسپور ۱۰ جدایه قارچ تهیه شده بود، اضافه گردید. بعد از گذشت پنج هفته، ریشه بوته‌ها از خاک خارج شده و شدت بروز علائم بیماری بر روی ریشه با استفاده از مقیاس فوق‌الذکر، بررسی گردید. مقایسه شدت بیماری‌زایی در بین میزبان‌ها با استفاده از نرم‌افزار GENSTAT نسخه ۶ انجام گرفت.

### آزمون دمایی

در این بخش، تأثیر دما بر ویژگی‌های فنوتیپی ۳۰ جدایه قارچ *F. solani* در دماهای ۱۵، ۲۵، ۳۵ به مدت شش‌روز بر روی محیط کشت PDA در انکوباتور در شرایط تاریکی بررسی شد. پس از گذشت این دوره، ویژگی‌های قطر و رنگ پرگنه، اسپورزایی و وجود سرهای دروغین، بررسی و ثبت شد و نتایج به صورت نمودار توسط نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ ترسیم شد.

### استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

به منظور استخراج DNA، ۲۰ میلی‌گرم از میسلیم پودر شده *F. solani* که لیوفیلیز شده بود، به روش تعدیل‌شده Liu et al., (2000) مورد استفاده قرار گرفت. جهت انجام PCR، از هشت آغازگر تصادفی RAPD و جفت آغازگر ERIC استفاده شد (جدول ۲). تکثیر DNA در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش برای RAPD-PCR شامل DFS Master Mix (2x) (شرکت فزایزوه) ۱۳ میکرولیتر، DNA ژنومی ۳ میکرولیتر، آغازگر (شرکت تکاپوزیست) ۱/۴ میکرولیتر و آب دوبار تقطیر ۷/۶ میکرولیتر بود. برنامه حرارتی تکثیر شامل واسرشتی اولیه پنج دقیقه در ۹۴°C، سپس ۴۵ چرخه به ترتیب واسرشتی یک دقیقه در ۹۴°C، مرحله اتصال آغازگر یک دقیقه در ۳۴°C، بسط آغازگر دودقیقه در دمای ۷۲°C و بسط نهایی آغازگر هفت دقیقه در دمای ۷۲°C صورت گرفت. مخلوط واکنش برای ERIC-PCR به ترتیب شامل DFS Master Mix (2x) ۱۲/۵ میکرولیتر، DNA ژنومی ۲/۵ میکرولیتر، Primer (به سفارش شرکت سیناژن) پنج میکرولیتر از هر کدام (از غلظت نهایی ۱۰ پیکومول). برنامه حرارتی PCR شامل واسرشتی اولیه هفت دقیقه در ۹۵°C ادامه با ۳۰ چرخه واسرشتی در ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر یک دقیقه در دمای ۵۲°C، مرحله بسط آغازگر هشت دقیقه در ۶۵°C و بسط نهایی یک چرخه ۱۶ دقیقه‌ای در دمای ۶۵°C انجام گرفت. جهت مشاهده محصولات PCR از الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد استفاده شد و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای قطعات تکثیر شده به کمک روش UPGMA در نرم‌افزار NTSYSpc 2.02e انجام و دندروگرام مربوط ترسیم گردید.

جدول ۱- ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌های قارچ *Fusarium solani* به‌دست آمده از لوبیا در استان زنجان  
Table 1. Morphological characteristics of *Fusarium solani* isolates obtained bean from Zanjan Province

منطقه نمونه‌برداری Region of sampled	رنگ پرگنه Colony colour	اندازه میکروکنیدی Microconidia ( $\mu\text{m}$ )	اندازه ماکروکنیدی Macroconidia ( $\mu\text{m}$ )	نام جدایه Isolate
ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد - Kheirabad	صورتی (کمرنگ) - Pale pink	7.5x 2.5	45.5x4.1	Z <sub>1</sub>
عمیدآباد - Amidabad	کرم - Cream	7.5 x 2.5	42.5. x4.2	Z <sub>2</sub>
عمیدآباد - Amidabad	کرم - Cream	7 x 2.5	42.5 x 4.2	Z <sub>3</sub>
ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد - Kheirabad	صورتی (کمرنگ) - Pale pink	7.5 x 2.5	47.5 x 4.8	Z <sub>4</sub>
خیرآباد - Kheirabad	صورتی (کمرنگ) - Pale pink	10 x 2.7	45 x 4.6	Z <sub>5</sub>
ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد - Kheirabad	زرد - Yellow	8x 3	44 x 4.6	Z <sub>6</sub>
هیدج - Hidaj	کرم - Cream	6.2 x 2.5	37.5 x 4.1	Z <sub>7</sub>
نصیرآباد - Nasirabad	سفید - White	8.7 x 2.7	38 x 3.4	Z <sub>8</sub>
نصیرآباد - Nasirabad	کرم - Cream	7.5 x 2.4	37.5 x 3.4	Z <sub>9</sub>
ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد - Kheirabad	کرم - Cream	7.7 x 2.5	44 x 4	Z <sub>10</sub>
سنبل‌آباد - Sonbolabad	کرم - Cream	5.7 x 2.7	37 x 3.2	Z <sub>11</sub>
سلطانیه - Soltanieh	زرد - Yellow	11.2 x 3	45 x 4.2	Z <sub>12</sub>
صایین قلعه - Saeenghaleh	زرد - Yellow	9x 3.7	47.5 x 5	Z <sub>13</sub>
ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد - Kheirabad	صورتی (کمرنگ) - Pale pink	8x 3	42.5 x 4.8	Z <sub>14</sub>
خرم‌دره - Khorramdarreh	کرم - Cream	5.6 x 2.5	36 x 3.4	Z <sub>15</sub>
ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد - Kheirabad	صورتی (کمرنگ) - Pale pink	7.7 x 2.7	44 x 4.2	Z <sub>16</sub>
عمیدآباد - Amidabad	صورتی (کمرنگ) - Pale pink	7 x 2.8	37.5 x 4.2	Z <sub>17</sub>
نعلبندان - Nalbandan	سفید - White	12 x 3.7	50 x 5.4	Z <sub>18</sub>
ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد - Kheirabad	کرم - Cream	7.9x 2.5	44 x 4.5	Z <sub>19</sub>
خیرآباد - Kheirabad	صورتی (کمرنگ) - Pale pink	7.5 x 2.5	40 x 4.4	Z <sub>20</sub>
ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد - Kheirabad	کرم - Cream	8x 3.2`	46.5 x 4.4	Z <sub>21</sub>
هیدج - Hidaj	سفید - White	7.5 x 2.5	42.5 x 4.6	Z <sub>22</sub>
نصیرآباد - Nasirabad	سفید - White	11.2 x 3.7	47.5 x 5	Z <sub>23</sub>
نصیرآباد - Nasirabad	کرم - Cream	8.7 x 3	45 x 3.8	Z <sub>24</sub>
ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد - Kheirabad	صورتی (کمرنگ) - Pale pink	8 x 3.5	45 x 4.5	Z <sub>25</sub>
سنبل‌آباد - Sonbolabad	کرم - Cream	5.5 x 2.5	38 x 3.2	Z <sub>26</sub>
نعلبندان - Nalbandan	کرم - Cream	6.2 x 2.7	35 x 3	Z <sub>27</sub>
خرم‌دره - Khorramdarreh	کرم - Cream	7 x 2.5	40 x 3.7	Z <sub>28</sub>
یوسف‌آباد - Yoosofabad	کرم - Cream	7 x 2.5	42.5 x 4.8	Z <sub>29</sub>
ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد - Kheirabad	زرد - Yellow	7.5 x 2.7	45 x 4.2	Z <sub>30</sub>

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای بکاربرده شده RAPD و ERIC-PCR جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Fusarium solani* در استان زنجان

Table 2. Name and sequence of RAPD and ERIC-PCR primers used for study of genetic diversity of *Fusarium solani* isolates in Zanjan province

نام آغازگر	توالی آغازگرها (5'-3')
Primer	Sequence of primer
RCO9	GATAACGCAC
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-19	CAAACGTCGG
OPB-05	TGCGCCCTTC
OPG-06	GTGCCTAACC
OPL-12	GGGCGGTACT
OPN-13	AGCGTCACTC
OPA-13	CAGCACCCAC
ERIC1	5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3'
ERIC2	5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'

## نتایج و بحث

### شناسایی قارچ

در بررسی‌های انجام‌شده از میان جدایه‌های فوزاریوم به‌دست‌آمده از بوته‌های آلوده لوبیا، پس از انجام خالص‌سازی به‌روش تک‌اسپورسازی، ۳۰ جدایه به‌عنوان گونه قارچ *F. solani* شناسایی گردیدند. ویژگی‌های مشاهده‌شده این قارچ به‌شرح زیر بود: ماکروکنیدی‌ها نسبتاً عریض، مستقیم با اندکی خمیدگی، با انتهای گرد و دارای سه تا هفت دیواره عرضی (غالباً سه تا چهار دیواره) بودند. میکروکنیدی‌ها، بیضی یا قله‌ای‌شکل و یک تا دوسلولی مجتمع در سرهای دروغین روی مونوفیالیدهای بلند تشکیل شده بودند. کلامیدوسپورها غالباً به‌مقدار زیاد بعد از گذشت دو تا چهار هفته در محیط‌های کشت CLA و PDA تکی و زنجیری به‌صورت میانی یا انتهایی روی انشعابات جانبی کوتاه تشکیل شدند (شکل ۱). اسپوردوکیوم‌های این گونه به‌رنگ کرم تا زرد در سطح پرگنه مشاهده شد. به‌ترتیب، دامنه طولی و عرضی ماکرو و میکروکنیدی‌های این گونه بین ۵-۳×۵۰-۳۲/۵ و ۳/۹-۲/۵×۱۲-۵ میکرومتر متغیر بود (جدول ۱). این نتایج به‌دست‌آمده با مشخصات این گونه همخوانی داشت (Nelson et al., 1983; Lesli & Summerell, 2006) (Gerlach & Nirenberg, 1982). به‌علاوه، دو جدایه به‌نماینده‌گی از بقیه جدایه‌ها به مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران ارسال شده و مورد تأیید بخش رُستنی‌ها قرار گرفتند. از لحاظ ویژگی‌های ظاهری، جدایه‌ها تفاوت‌هایی را با یکدیگر داشتند (Nelson et al., 1983; Nirenberg, 1989). اگرچه بیش از ۶۳ درصد از جدایه‌ها دارای پرگنه کرم یا سفید بودند، با این وجود، جدایه‌هایی با پرگنه صورتی کم‌رنگ و زرد نیز مشاهده شدند؛ به‌طوری‌که در محیط کشت PDA، فراوانی پرگنه‌ها از نظر رنگ در بین جدایه‌ها بدین شرح بود: ۵۰ درصد کرم، ۲۳/۳۳ درصد

صورتی، ۱۳/۳۳ درصد سفید و ۱۳/۳۳ درصد زرد. تفرق رنگی جدایه‌ها می‌تواند گواهی بر تفرق درون این گونه مرکب باشد.

### آزمون بیماری‌زایی و مقایسه شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها

در این آزمون، بیماری‌زایی قارچ روی لوبیاقرمز (رقم ناز) به اثبات رسید. قارچ مایه‌زنی‌شده توانست همان علائم اولیه را که در مزرعه در لوبیا مشاهده شده بود، ایجاد کند. تیمارهای شاهد علائم بیماری را نشان نداده و قارچ مایه‌زنی‌شده از کشت ریشه آنها جداسازی نشد. از نظر شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی لوبیاقرمز رقم ناز، تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌ها مشاهده نشد.

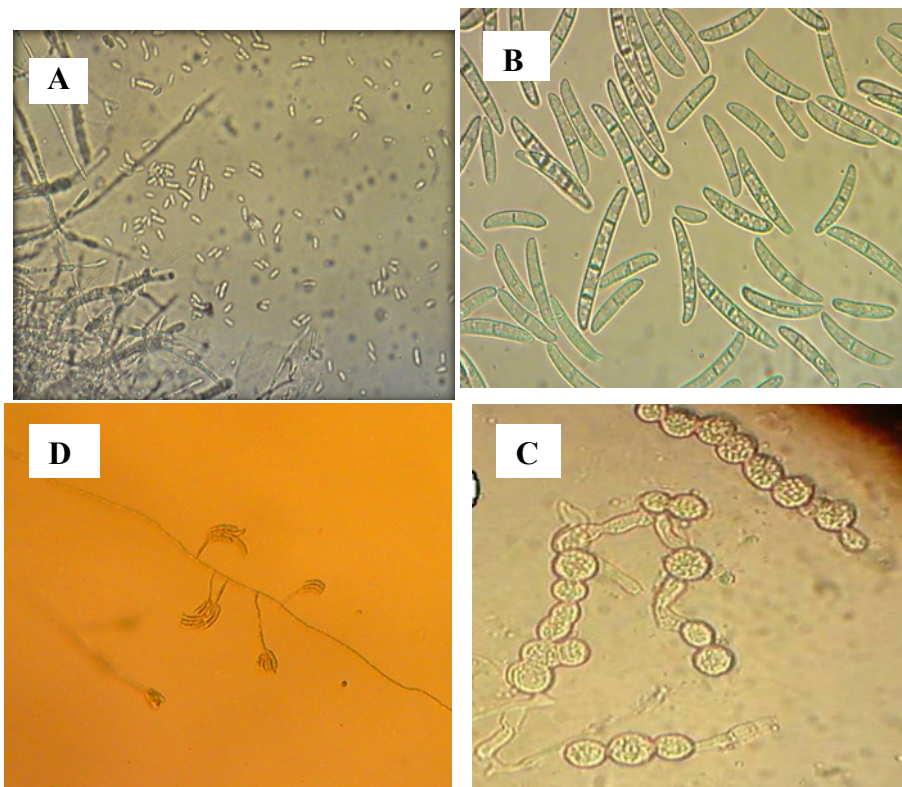
### آزمون دامنه میزبانی

در این آزمون از بین ۹ گیاه مورد بررسی، فقط گیاه گندم علائم بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه را نشان نداد و شدت بیماری در آن صفر بود (شکل ۳). بقیه میزبان‌ها که همگی از اعضای خانواده Fabaceae بودند، بعد از گذشت پنج هفته، علائم مشخصه بیماری نظیر ترک طولی ساقه و طوقه، قهوه‌ای‌شدن ریشه و طوقه و زردی برگ‌ها را نشان دادند (شکل ۲). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نوع گیاه میزبان، تأثیر معنی‌داری بر روی شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه داشت ( $p < 0.001$ ) (جدول ۳). در میان میزبان‌های مورد مطالعه، بالاترین شدت بیماری ( $p < 0.05$ ) بر روی باقلا، نخود و عدس مشاهده شد. پایین‌ترین شدت بیماری ( $p < 0.05$ ) در بین میزبان‌ها نیز بر روی یونجه و لوبیای سفید و قرمز مشاهده شد. همچنین شدت بیماری بر روی سه رقم لوبیا متفاوت بود؛ به‌طوری‌که در لوبیاچیتی، بیماری نسبت به لوبیای قرمز و سفید، شدیدتر ( $p < 0.05$ ) بود. دامنه میزبانی این قارچ خاک‌زاد در بین ۶۶ تیره گیاهی، ۱۱۱ گونه و ۸۷ جنس، گزارش شده است (Kolattukudy & Gamble, 1995). با چنین وضعیتی،



می‌کنند، مشخص می‌شوند تا از طریق تخصص میزبانی (Román-Aviles *et al.*, 2003). در این تحقیق برای نخستین بار، شدت بیماری زایی قارچ FSP بر روی گیاه زراعی مورد بررسی مقایسه شد که بیانگر بروز علائم شدیدتر بیماری بر روی ریشه نخود، باقلا و عدس نسبت به هر سه رقم لوبیا (قرمز، چیتی و سفید) به‌عنوان میزبان اصلی قارچ بود. بر اساس این یافته، قرار گرفتن نخود، باقلا و عدس در برنامه تناوبی لوبیا می‌تواند با افزایش جمعیت قارچ FSP در خاک مزرعه، رابطه مستقیم با شدت بیماری بر لوبیا داشته باشد. اگرچه در این تحقیق، لوبیای قرمز و سفید، آلودگی کمتری از لوبیای چیتی نشان دادند؛ در عین حال، گزارش Naseri & Marefat (2011) در سطح مناطق لوبیاکاری استان نشان‌دهنده آلودگی بالاتر لوبیای چیتی و سفید نسبت به لوبیای قرمز بود. بنابراین در مزارع با سابقه آلودگی زیاد، کشت لوبیای قرمز نسبت به لوبیای سفید و چیتی، توصیه می‌شود. به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده پیشنهاد می‌کند که گندم به‌عنوان گیاه غیرمیزبان یا مقاوم به بیماری در منطقه می‌تواند در قالب مدیریت زراعی و غیرشیمیایی در تناوب با لوبیا بکار گرفته شود.

مشاهده دامنه میزبانی وسیع در بین هشت گیاه مورد بررسی از اعضای خانواده Fabaceae در شرایط گلخانه، امری کاملاً طبیعی و همخوان به‌نظر می‌آید. با توجه به این‌که مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌های این گونه قارچی که از گیاه لوبیا جداسازی شده و بیماری‌زایی آنها بر روی لوبیا و سایر گیاهان هم‌خانواده لوبیا در شرایط گلخانه به اثبات رسیده و با مشخصات مورفولوژیک (Aoki *et al.*, 2003) و اظهارات برخی محققان (Abawi, 1989; Hall, 1996) در مورد قارچ (FSP) *F. solani* f.sp. *phaseoli* نیز مطابقت داشت، وجود این فرم مخصوص استان، اثبات می‌شود. به‌علاوه، بیماری‌زایی این فرم مخصوص بر روی گیاه عدس، برای نخستین بار گزارش می‌گردد. وجود چنین دامنه میزبانی وسیع، امری است که احتمال وجود گونه مرکب را در این قارچ تقویت می‌کند (Leslie & Summerell, 2006). همچنین این نتایج تصدیق‌کننده این ویژگی است که تخصص‌یافتگی فرم‌های مخصوص این گونه قارچی بر روی میزبان‌هایش، کمتر از گونه‌ای همچون *F. oxysporum* می‌باشد؛ به‌طوری‌که فرم‌های تخصص‌یافته آن، بیشتر از طریق نوع علائمی که ایجاد



شکل ۱- ویژگی‌های میکروسکوپی قارچ *Fusarium solani* بر روی محیط کشت CLA

A: ماکروکنیدی‌ها؛ B: میکروکنیدی‌های فراوان؛ C: کلامیدوسپورهای تکی و زنجیری؛ D: ماکروکنیدی‌های مجتمع در نوک کنیدی‌بر

Fig 1. Microscopic characteristics of *Fusarium solani* on CLA culture medium; A: Abundant microconidia; B: Macroconidia; C: Single and catenulate chlamydospores; D: Macroconidia on conidiophores



شکل ۲- علائم بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه بر روی ۹ گیاه تلقیح شده با سوسپانسیون اسپور مخلوط ۱۰ جدایه *Fusarium solani* در شرایط گلخانه بر روی ریشه و طوقه ۹ گیاه مختلف شامل A: باقلا؛ B: نخود؛ C: عدس؛ D: لوبیاچیتی؛ E: لوبیاسفید؛ F: لوبیاقرمز؛ G: اسپرس؛ H: یونجه، I: گیاه سالم گندم

Fig. 2. Disease symptoms of *Fusarium* root and crown rot on nine plants inoculated with 10 isolates of *Fusarium solani*, under greenhouse conditions; A: Fababean, B: Chickpea, C: Lentil, D: Pinto bean, E: White bean, F: Red bean, G: Sainfoin, H: Alfalfa, I: Healthy wheat plant

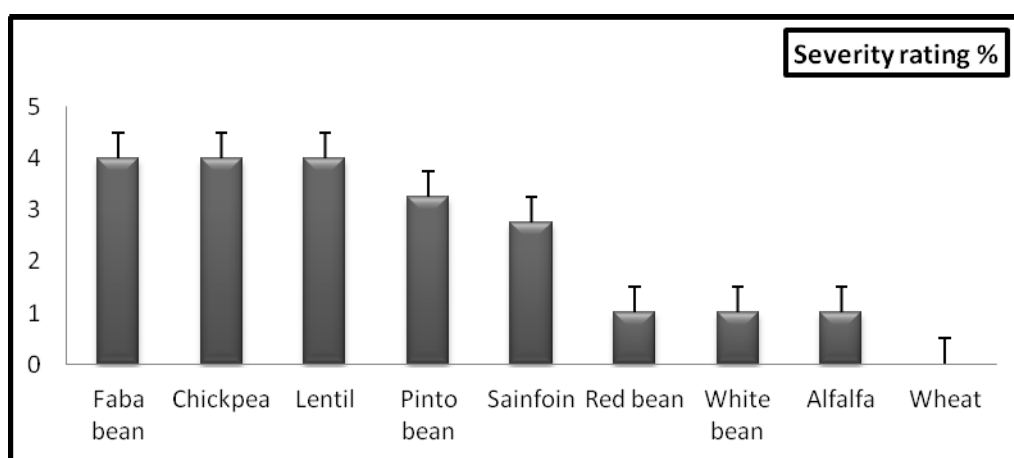
#### آزمون دمایی

نتایج این آزمون نشان داد که بیشترین قطر پرگنه در اکثر جدایه‌های این قارچ در دمای ۲۵°C و عدم رشد در دمای ۵°C مشاهده شد (شکل ۴). در هر سه دمای ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد که قارچ رشد رویشی داشت، اسپورزایی و سرهای دروغین نیز مشاهده شدند. طبق نتایج این بررسی، فاکتور دما در رنگ پرگنه تغییری ایجاد نکرد؛ اما ۳۰ جدایه قارچ *F. solani* از نظر فاکتور رشدی قطر پرگنه در طی شش روز، تنوع قابل توجهی نشان دادند. میزان رشد رویشی گاهی به عنوان یک صفت ثانویه در شناسایی و توصیف گونه‌ها به کار می‌رود (Leslie & Summerell, )

(2006). نتایج این تحقیق با دامنه مطلوب دمایی (۲۵°C تا ۳۰°C) برای رشد قارچ *F. solani* در منابع (Burgess et al., 1994) همخوانی داشت. در مطالعه‌ای دیگر بر روی تأثیر دما و محیط‌های مختلف رشدی برای دو گونه فوزاریوم، بهترین دما برای رشد و اسپورزایی قارچ *F. solani* ۲۸°C بود (Kumar Gupta et al., 2010). در مقایسه تأثیر دماهای ۲۰°C، ۲۵°C، ۳۰°C و ۴۰°C بر رشد *F. solani* نیز مطلوب‌ترین دمای رشد این قارچ، ۲۵°C بود و دماهای بالاتر یا پایین‌تر از آن منجر به کاهش رشد گردید (Kausar et al., 2009). بدین ترتیب، نتایج یافته‌های قبلی با نتایج این آزمون، مطابقت داشت؛ به نحوی که

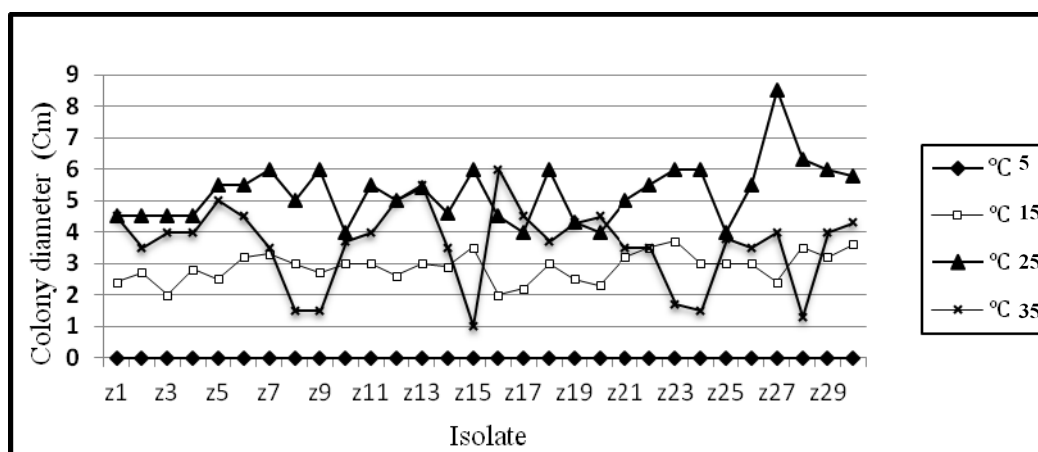
۲۷°C به‌عنوان دمای مناسب جهت رشد گیاهچه لوبیاقرمز و خروج از خاک در انکوباتور گزارش شده است (Van Bruggen *et al.*, 1986) و این دما نزدیک به دمای مطلوب قارچ است. بنابراین جهت حصول به یک برنامه دقیق مدیریتی جهت کنترل این بیماری، بررسی‌های دقیق‌تری لازم است.

مناسب‌ترین دمای رشد برای جدایه‌ها به‌استثنای دو جدایه، ۲۵°C بود. از آنجایی‌که دمای نامناسب به‌عنوان یکی از عوامل محیطی تنش‌زا محسوب شده است (Abawi, 1989)، نتایج این آزمون می‌تواند در انتخاب زمان مناسب کاشت لوبیا یا سایر گیاهان میزبان به‌عنوان یک راهکار مدیریتی این بیماری مورد استفاده قرار گیرد به‌طوری‌که دوره رشدی حساس گیاه با دوره‌ای که قارچ *F. solani* حداکثر فعالیت خود را دارد، تداخل نداشته باشد. ازسویی دیگر دمای



شکل ۳- مقایسه میانگین شدت بیماری در بین ۹ گیاه مایه‌زنی شده با قارچ *Fusarium solani* در شرایط گلخانه

Fig. 3. Comparison of mean disease severity on nine plants inoculated with *Fusarium solani* under greenhouse conditions



شکل ۴- قطر پرگنه قارچ *Fusarium solani* در چهار دمای مختلف پس از شش‌روز رشد در شرایط تاریکی

Fig. 4. Colony diameter of *Fusarium solani* after six days incubation in four different temperatures



جدول ۳- تجزیه واریانس شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا بر روی ۹ گیاه

Table 3. Analysis of variance for Fusarium root-rot disease severity on nine plants

S.O.V.	(d.f.)	(S.S.)	(M.S.)	F (pr)
Host	8	60.666	7.5833	< 0.001 *
Error	18	11.333	0.6296	
Total	26	72.000	26	

\* Significant at  $p < 0.01$

هاپلوتیپ تشکیل شده بودند که اغلب هاپلوتیپ‌ها از بیش از یک جدایه تشکیل شده بودند. چندعضوی بودن برخی هاپلوتیپ‌ها نشان‌دهنده کلونال بودن جمعیت‌ها می‌باشد که با توجه به تولیدمثل غیرجنسی فراوان در این قارچ، چنین نتیجه‌ای مورد انتظار است. از سویی دیگر، تعداد زیاد دودمان‌های کلونی در جمعیت این قارچ، نشان از تنوع بالای ژنتیکی جدایه‌های قارچی مورد مطالعه دارد که می‌تواند در اثر پدیده‌هایی همچون جهش یا چرخه‌های شبه‌جنسی و نیز جریان‌ات ژنی ایجاد شده باشد.

#### تنوع درون‌مزرعه‌ای

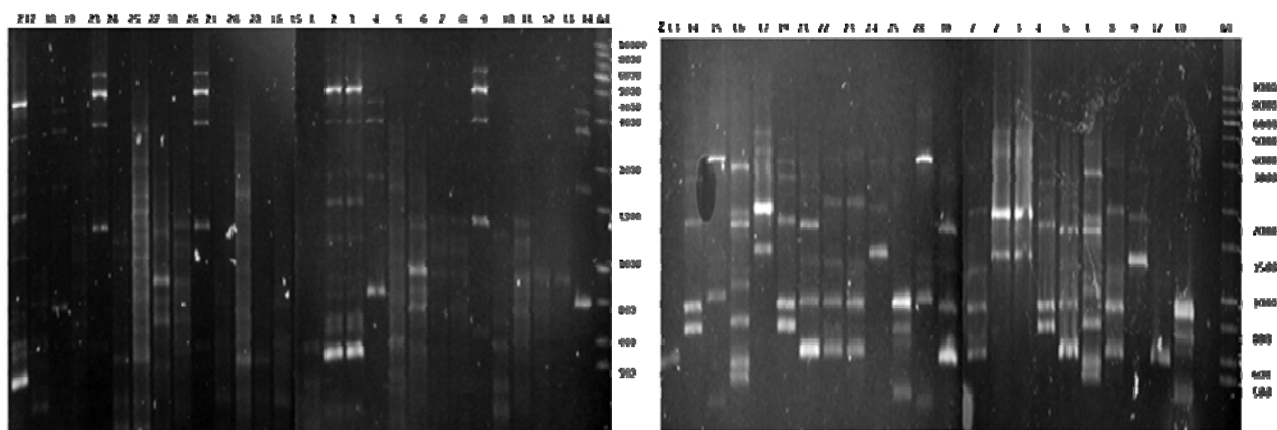
در بسیاری از مزارع مورد مطالعه، همسانی جدایه‌ها از نظر نوع هاپلوتیپ به‌طور بارزی مشاهده گردید. با این حال در جمعیت *F. solani* به‌دست‌آمده از ایستگاه تحقیقاتی خیرآباد، که بیشترین تعداد جدایه را در مقایسه با سایر مزارع داشت، تنوع هاپلوتیپ‌ها مشاهده شد؛ به‌طوری‌که در دندروگرام حاصل از روش RAPD-PCR، جدایه‌های این مزرعه، در سه هاپلوتیپ مجزا (هاپلوتیپ‌های A<sub>1</sub>، B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub>) قرار گرفته و جایگاه دو جدایه از این جمعیت به‌دلیل عدم تکثیر ژنوم توسط آغازگر مربوطه، نامعلوم ماند. همین جدایه‌ها در روش ERIC-PCR نیز در پنج هاپلوتیپ مجزا قرار گرفتند. این نتایج، تنوع ژنتیکی جدایه‌ها را در درون یک مزرعه علاوه بر تنوع ژنتیکی بین مزارع نشان می‌دهد. با توجه به تعدد سایر عوامل قارچی یا گونه‌های دیگر فوزاریوم بر روی لوبیا، تعداد جدایه‌های *F. solani* به‌دست‌آمده از هر مزرعه در این تحقیق، اندک بود؛ به عبارت دیگر، بسیاری از جمعیت‌های مورد مطالعه بسیار کوچک بودند. لذا جهت حصول جمعیت‌های بزرگ‌تر این قارچ، لازم است نمونه‌های بیشتری از هر مزرعه برداشت شود. با این وجود، در بسیاری از مزارع مورد مطالعه، وضعیت کلونال مشاهده گردید. از سویی دیگر در مزرعه تحقیقاتی خیرآباد که جمعیتی بزرگ‌تر را در بر داشت، وضعیت کلونال با تنوع هاپلوتیپ‌ها در یک مزرعه توأم شده است، به‌طوری‌که ۱۰ جدایه این مزرعه در چندین هاپلوتیپ مختلف توزیع گردیده‌اند. وقوع تولیدمثل غیرجنسی به‌روش تولید اسپورهای غیرجنسی در

#### انگشت‌نگاری DNA توسط تکنیک RAPD-PCR و ERIC-PCR

در این روش از هشت آغازگر آزموده‌شده، فقط آغازگر OPA-13 توانست چندشکلی مطلوبی را از جدایه‌های استان ارائه دهد. به‌کمک این آغازگر از بین ۳۰ جدایه، ژنوم ۲۳ جدایه تکثیر شد. تعداد باندهای قابل ارزیابی توسط آن ۱۷ عدد با اندازه‌های بین ۴۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بازی بود (شکل ۳). انگشت‌نگاری DNA قارچ *F. solani* توسط آغازگر RAPD، جدایه‌ها را در ضریب تشابه چهاردرصد به دو گروه اصلی و در ضریب تشابه ۷۵ درصد به ۱۱ دودمان کلونی تقسیم نمود. هر دودمان کلونی از یک هاپلوتیپ تشکیل شده بود و بسیاری از هاپلوتیپ‌ها از دو یا چند جدایه تشکیل شده بودند. بررسی جدایه‌ها توسط این نشانگر سطوح بالای تنوع ژنتیکی جدایه‌های این قارچ را در گستره مناطق نمونه‌برداری شده استان زنجان نشان داد. این آغازگر در تحقیقات قبلی به‌عنوان آغازگری با توانایی تولید باندهای پلی‌مورفیک و تفکیک جدایه‌های قارچی در سطح جنس و نیز تفکیک جدایه‌های برخی گونه‌های قارچی در سطح فرم مخصوص یا نژاد گزارش شده است (Jana et al., 2003). در تحقیق حاضر، تنوع بالایی در بین جدایه‌های مطالعه‌شده توسط این آغازگر مشاهده شد که با نتایج برخی تحقیقات مشابه در این زمینه (Brasileiro et al., 2004; Baghaee Ravari et al., 2007; Morid et al., 2009) مطابقت داشت. مجموع قطعات DNA تکثیرشده قابل ارزیابی توسط جفت آغازگر ERIC، ۲۰ عدد بود. اندازه باندهای ارزیابی‌شده ۳۵۰ تا ۶۰۰۰ جفت باز بوده است. اگرچه تعداد ۲۸ جدایه از مجموع ۳۰ جدایه توسط این تکنیک، انگشت‌نگاری شدند؛ اما در مقایسه با آغازگر RAPD وضوح بسیاری از باندهای حاصله در این تکنیک، اندک بوده (شکل ۳) و لذا از تلفیق نتایج انگشت‌نگاری این روش با روش RAPD و تشکیل ماتریس واحد، خودداری گردید و آنالیز داده‌های هر روش به‌طور جداگانه انجام شد. بر طبق دندروگرام به‌دست‌آمده از تکنیک ERIC-PCR در ضریب تشابه چهاردرصد، کل جدایه‌ها به سه گروه تقسیم شدند. در ضریب تشابه ۷۵ درصد، ۱۳ دودمان کلونی در بین جدایه‌های قارچ *F. solani* دیده شد. دودمان‌های کلونی حاصل از این نشانگر نیز هر کدام تنها از یک

میزبانی (Li *et al.*, 2003) و توالی نوکلئوتیدهای DNA ریپوزومی (O'Donnell & Gray, 1995; Suga *et al.*, 2000) نشان از تنوع فرم مخصوص phaseoli بر روی لوبیا داشته است؛ به طوری که این فرم را غیر قابل تمیز از سایر فرم‌های نزدیک خود نظیر glycines ناموده است. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و مطالعات قبلی، امکان وجود فرم‌های مخصوص متنوعی از قارچ *F. solani* بر روی لوبیا نیز دور از ذهن نیست، لذا حصول به اطلاعات دقیق‌تر نیازمند مطالعات تکمیلی بر روی این گونه مرکب است. براساس نتایج حاصل شده، بین تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی قارچ *F. solani* به دست آمده از لوبیا در استان زنجان، ارتباط منظمی وجود نداشت. جدایه‌ها از نظر ژنتیکی، بیماری‌زایی و ریخت‌شناسی روی لوبیا، غیریکنواخت بودند. در مورد بیماری‌زایی، تنوعی کمی در شدت و خسارت جدایه‌ها مشاهده شد. به جز برخی جدایه‌ها، همبستگی خاصی بین صفات ریخت‌شناسی، بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی دیده نشد. به علت فقدان مقاومت کامل به بیماری و مشاهده سطوح مختلف حساسیت به بیماری، به نظر می‌رسد که مقاومت به این بیماری، یک صفت کمی بوده و احتمالاً تعداد زیادی ژن در کنترل مقاومت، مؤثر هستند. نتایج این تحقیق که سطوح بالای تنوع را در بین مناطق لوبیاکاری استان زنجان نشان داد، می‌تواند در راستای ایجاد ارقام مقاوم در منطقه نسبت به قارچ *F. solani* در کنار نتایج سایر محققان، مؤثر باشد.

قارچ *F. solani* به وفور رخ می‌دهد؛ بنابراین توزیع افراد کاملاً مشابه (هاپلو تیپ‌ها) در مزرعه و وقوع وضعیت کلونال، دور از انتظار نیست. تنوع هاپلو تیپ‌ها در داخل یک مزرعه ممکن است ناشی از وقوع نو ترکیبی جنسی، جهش و یا جریانات ژنتیکی از سایر مزارع باشد. وقوع هاپلو تیپ‌های مشترک بین مزارع، بسیار به ندرت رخ داده است. این نتیجه دال بر آن است که جریانات ژنی بین مزارع، به ندرت اتفاق افتاده است. با این حال، جهت انجام تحلیل‌های دقیق‌تر از وضعیت جمعیت‌های این قارچ در منطقه، مطالعه جمعیت‌های بزرگ‌تر امری ضروری می‌باشد. به نظر می‌رسد جمعیت‌های قارچ *F. solani* در استان زنجان، جمعیت‌هایی تقریباً جدا و متمایز از هم می‌باشند که عمدتاً به روش تولید مثل غیر جنسی در مزرعه تکثیر و منتشر شده‌اند و جریان ژنی ناچیزی بین آنها برقرار بوده است. با توجه به دندروگرام حاصل شده از نتایج هر دو نوع PCR، مشخص شده که علی‌رغم وجود افرادی با تشابه ژنتیکی بالا (افراد تشکیل دهنده هاپلو تیپ‌ها) فاصله بین برخی هاپلو تیپ‌ها از هم بسیار زیاد بوده است. از سویی دیگر، هر دو نشانگر مولکولی، جدایه‌های گونه مورد مطالعه را به گروه‌های اصلی (دو گروه توسط RAPD و سه گروه توسط ERIC) تقسیم نمودند که تشابه بین این گروه‌ها در حد ۰/۰۴ بود که این امر نشان از تفرق بالا بین جدایه‌های درون این گونه یا گونه مرکب است. با این حال، با کاربرد نشانگرهای ژنتیکی بیشتر، احتمال کاهش این فاصله‌ها نیز وجود دارد (شکل ۶). بررسی‌های تخصص



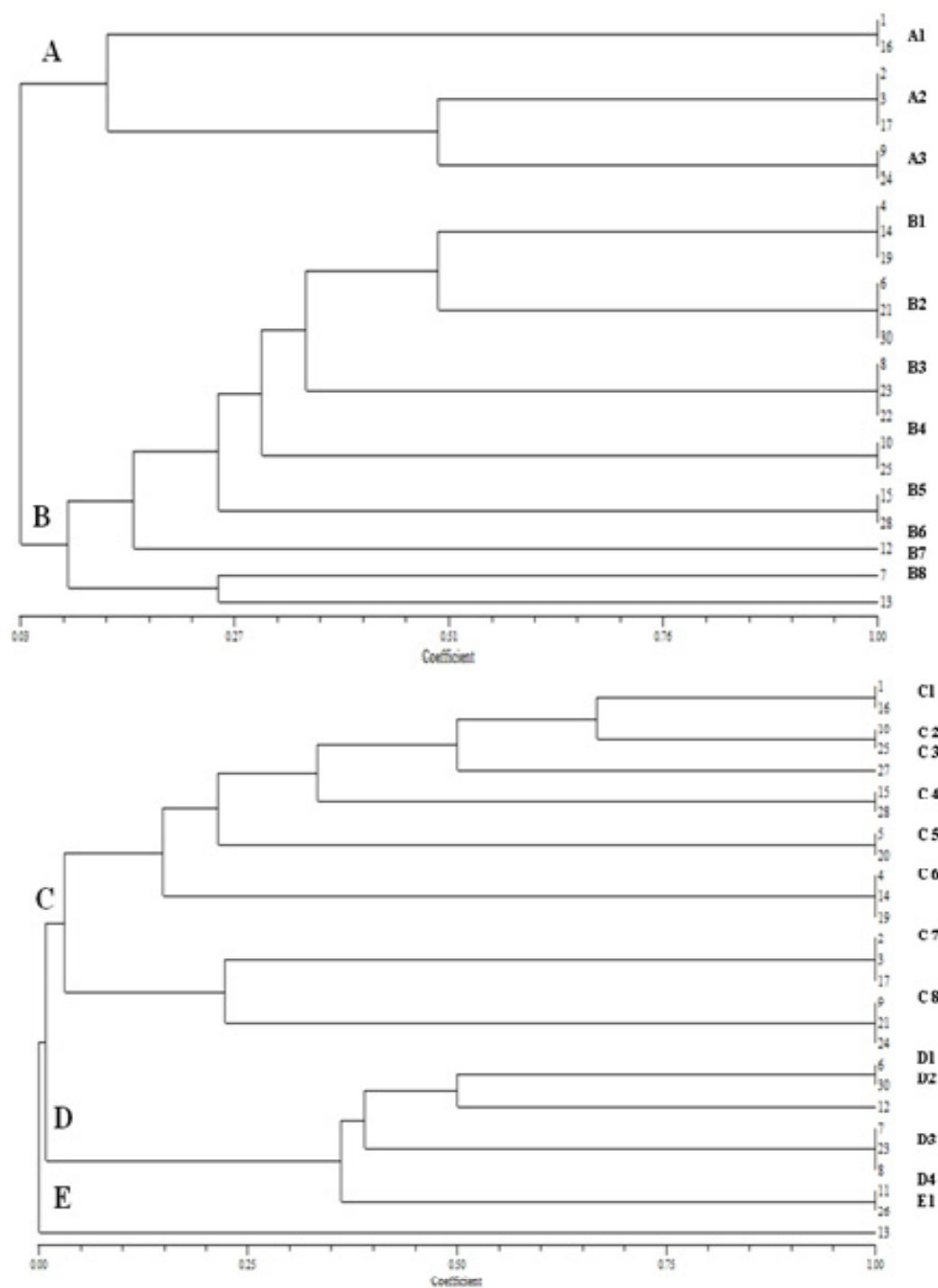
شکل ۵- انگشت‌نگاری DNA جدایه‌های قارچ *Fusarium solani* به دست آمده از لوبیا با استفاده از نشانگر RAPD-PCR (راست)

و ERIC-PCR (چپ)

چاهک M نشانگر مولکولی ۵۰۰ bp است.

Fig. 5. DNA fingerprinting of *Fusarium solani* isolates from bean plants using RAPD-PCR (right) and ERIC-PCR (left)

Lane M: High range DNA Ladder (0.5 to 10 kbp linear scale, Jena Bioscience)



شکل ۶ - دندروگرام به دست آمده در نرم افزار NTSYS با روش UPGMA برای جدایه های قارچ *Fusarium solani* بر اساس داده های مولکولی حاصل از نشانگر RAPD-PCR (بالا) و ERIC-PCR (پایین) محور افقی معرف میزان شباهت است.

Fig .6. Dendrogram obtained by UPGMA using NTSYS ver. 2.1 for the *Fusarium solani* isolates based on molecular data from RAPD-PCR (up) and ERIC-PCR (down)  
The line below the dendrogram represents the similarity index.

منابع

1. Abawi, G.S. 1989. Root rot. In: H.F. Schwartz and M.A. Pastor-Corrales (Eds.). Bean Production Problems: Disease, Insect, Soil and Climatic Constraints of *Phaseolus vulgaris*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 105-57.
2. Abawi, G.S., and Pastor-Corrales, M.A. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies, and Management Strategies. CIAT pub. No.35, Colombia. 114pp.
3. Achenbach, L.A., Patrick, J.A., and Gray, L.E. 1997. Genetic homogeneity among isolates of *Fusarium solani* that cause soybean sudden death syndrome. Theoretical and Applied Genetics 95: 474-478.
4. Aoki, T., O'Donnell, K., Homma, Y., and Lattanzi, A.R. 2003. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex-*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. Mycologia 95: 660-684.
5. Baghaee Ravari, S., Falahati Rastegar, M., Jafarpour, B., Shokoohifar, F., and Moradzadeh 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. Iranian Journal of Plant Pathology 42: 417-437 (In Persian with English Summary).
6. Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Common Wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, United Kingdom, p. 237.
7. Brasileiro, B.T., Coimbra, M.R., Morias, M.A., and Oliveira, N.T. 2004. Genetic variability within *Fusarium solani* species as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. Brazilian Journal of Microbiology 35: 205-210.
8. Broughton, W.J., Hernandez, G., Blair, M.W., Beebe, S.E., Geptes, P., and Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.)- Model Food Legumes. Plant and Soil 252: 55-128.
9. Burgess, L.W., and Summeral, B.A. 1992. Mycogeography of fusarium: survey of *Fusarium* species from subtropical and semi-arid grassland soils from Queensland, Australia. Mycological Research 96: 780-784.
10. Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., and Backhouse, D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research (3<sup>rd</sup> Ed.). Sydney: *Fusarium* Research Laboratory.
11. Clulow, S.A., Lewis, B.C., and Matthews, P. 1991. A pathotype classification for *Mycosphaerella pinodes*. Phytopathology 131: 322-332.
12. El-Fadly, G.B., El-Kazzaz, M.K., Hassan, M.A.A., and El-Kot, G.A.N. 2008. Identification of some *Fusarium* spp. using RAPD-PCR technique. Egyptian Journal of Phytopathology 36: 71-80.
13. Gerlach, W. 1981. The present concept of *Fusarium* classification. In: P.E. Nelson, T.A. Toussoun and R.J. Cook (Eds.). *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*. University Park, PA, USA, Pennsylvania State University Press. p. 413-426.
14. Gerlach, W., and Nirenberg, H. 1982. The Genus *Fusarium* A Pictorial Atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem) 209: 1-405.
15. Godoy, P., Cano, J., Gene, J., Guarro, J., Hofling-Lima, A.L., and Lopes Colombo, A. 2004. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. Journal of Clinical Microbiology 42: 4494-4497.
16. Hall, R., 1996. Inoculum dynamics of *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* and management of *Fusarium* root rot of beans. In: R. Hall (Ed.). Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens. APS Press, St. Paul, 279-310. pp.

17. Hasanzadeh, F., Falahati Rastegar, M., Jafarpour, B., and Eskandari, M. 2008. Survey of DNA polymorphism of isolates of *Fusarium solani* f.sp. *pici* in chickpea fields of Razavi and Northern Khorasan provinces using RAPD markers. Proceedings of the 18<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, August 24-27 2008. Hamedan. p. 5.
18. Jana, T., Sharma, T.R., Prasad, R.D., and Arora, D.K. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. Microbiological Research 158: 249- 257.
19. Kausar, P., Chohan, S., and Parveen, R. 2009. Physiological studies on *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani*, the cause of Shesham decline. Mycopathology 7: 35-38.
20. Kolattukudy, P.E., and Gamble, D.L. 1995. *Nectria haematococca*. Pathogenesis and host specificity in plant dis. Vol 2 Eukaryotes. In: K. Kohmoto, U.S. Singh and R.P. Singh (Eds.). Pathogenesis and host specificity in plant. Pathogenic Fungi and Nematodes 83-102 pp.
21. Kumar Gupta, V., Kumar Misra, A., and Kumar Gaur, R. 2010. Growth characteristics of *Fusarium* spp. causing wilt disease in *Psidium guajava* L. Indian Journal of Plant Protection Research 50: 452-462.
22. Leslie, J.F., Summeral, B.A., and Brett, A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell. 380pp.
23. Li, S., and Hartman, G.L. 2003. Molecular detection of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* roots and soil. Plant Pathology 52: 74-83.
24. Liu, D., Coloe, S., Baird, R., and Pedersen, J. 2000. Rapid Mini-Preparation of fungal DNA for PCR. Journal of Clinical Microbiology 38: 471.
25. McDonald, B.A. 1997. The population genetic of fungi: tools and techniques. Phytopathology 87: 448- 453.
26. Mehta, Y.R., Mehta, A., and Rosato, Y.B. 2002. ERIC and REP-PCR banding patterns and sequence. Analysis of the internal transcribed spacer of rDNA of *Stemphylium solani* isolates from cotton. Current Microbiolog 44: 323-328.
27. Moeini, M.R., and Ahmadinejad, A. 1998. Assessment of diseases status of bean in Zanjan province. Proceeding of the 13<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, August 23-27, Karaj, Iran, p. 154.
28. Morid, B., Zare, R., Zamanizadeh, H.R., and Hajmansour, S.H. 2008. Genetic diversity of *Fusarium solani* using RAPD-PCR and PCR-RFLPs. Proceedings of the 18<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, August 24-27, 2008. Hamedan. p. 2.
29. Naseri, B. 2008. Root rot of common bean in Zanjan, Iran: major pathogens and yield loss estimates. Australasian Plant Pathology 37: 546-551.
30. Naseri, B., and Marefat, A. 2011. Large-scale assessment of agricultural practices affecting Fusarium root rot and common bean yield. European Journal of Plant Pathology 131: 179-95.
31. Nderitu, J.H., Buruchara, R.A., and Ampofo, K.O. 1997. Integrated Pest Management of Beans. African Highland Initiative.
32. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
33. Nirenberg, H.I. 1989. Identification of Fusaria accruing in Europe on cereals and potatoes. In: J. Chelkowski (Ed.). Fusarium: Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity. Elsevier, New York pp. 179-193.
34. O'Donnell, K., and Gray, L.E. 1995. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. Molecular Plant-Microbe Interactions 8: 709-716.
35. Román-Aviles, A.B., Snapp, S.S., and Kelly, J.K. 2003. Fusarium root rot of common beans. Michigan State University. Available at: Website <http://fieldcrop.msu.edu/uploads/documents/E2876>.



36. Suga, H., Hasegawa, T., Mitsui, H., Kageyama, K., and Hyakumachi, M. 2000. Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. *Mycologia* 104: 1175-1183.
37. Van Bruggen, A.H.C., Whalen, C.H., and Arneson, P.A. 1986. Emergence, growth and development of dry bean seedlings in response to temperature, soil moisture and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76: 568-572.
38. Zaccardelli, M., Vitale, S., Luongo, L., Merighi, M., and Corazza, L. 2007. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* isolates. *Phytopathology* 156: 534-541.

## Genotypic, phenotypic and pathogenicity variation of *Fusarium solani* isolates, the causal agent of bean root rot in Zanjan province

Khodagholi<sup>1</sup>, M., Hemmati<sup>2\*</sup>, R., Naseri<sup>3</sup>, B. and Marefat<sup>4</sup>, A.

1, 2 and 4- MSc. Student, Assistant Professor and Associate Professor of Plant Pathology, respectively; University of Zanjan, Zanjan, Iran

3- Assistant Researcher of Plant Pathology, Research Institute of Agriculture and Natural Resources, Zanjan, Iran.

Received: 16 June 2012  
Accepted: 29 December 2012

### Abstract

Bean root rot caused by plant pathogenic fungus, *Fusarium solani*, is considered one of the most important diseases of bean in the world and in Iran. Because of economic importance of bean and the lack of information on population diversity of the pathogen in Zanjan province, a research was conducted to study phenotypic, genotypic and pathogenicity variation of pathogen isolates and to assess pathogen host range among several commonly cultivated crops in the studied region. Plants with disease symptoms were sampled from 11 fields of province and totally 30 isolates of *F. solani* were obtained. After disease proving, host range experiment and phenotypic investigations, polymerase chain reaction (PCR) was conducted on total DNA by using RAPD and ERIC primers. The results showed no significant difference in pathogenicity of isolates, but there was phenotypic and genotypic diversity among them. Among 9 inoculated plants including wheat, alfalfa, white bean, red bean, pinto bean, sain foin, faba bean, lentils and chickpea, only wheat showed no disease symptoms. DNA fingerprinting patterns from both molecular markers demonstrated high genetic diversity of isolates on bean in Zanjan. However RAPD PCR based on using single primer (OPA 13) produced more reliable products, but grouping based on this marker was considerably consistent with grouping based on ERIC marker. There was no association between geographic regions and genetic groups. Also there was no consistency between phenotypic and genotypic diversity of isolates.

**Key words:** Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Fusarium solani*, Genetic diversity, Host range

---

\* Corresponding Author: rhemati@znu.ac.ir, Tel: 0241-5154053