

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* عامل پژمردگی و زردی نخود با استفاده از دو نشانگر RAPD و PCR-RFLP در استان‌های خراسان رضوی و شمالی

سمانه ذکائی^{۱*}، ماهرخ فلاحتی رستگار^۲، بهروز جعفرپور^۲، عبدالرضا باقری^۲ و وحید جهانبخش مشهدی^۳

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشجوی دکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۲/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۸/۳۰

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ عامل پژمردگی و زردی نخود از دو نشانگر مولکولی RAPD و PCR-RFLP استفاده شد. در روش RAPD، ۱۴ آغازگر استفاده شده، چندشکلی خوبی را نشان دادند. بعد از بررسی الگوهای باندی این ۱۴ آغازگر، میزان قرابت ژنتیکی ۲۰ جدایه بر اساس فاصله ژنتیکی به صورت دندروگرام رسم گردید. تجزیه دندروگرام ریپید نشان داد که بین منشأ جغرافیایی جدایه‌ها و گروه‌های ژنتیکی، ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. در روش PCR-RFLP قطعات تکثیرشده با استفاده از آغازگرهای IGS₂ و CLN₁₂ در یک گروه طولی ۲۵۰۰ bp قرار گرفتند. در کل، در اثر هضم محصول PCR با سه آنزیم برشی، ۲۲ عدد باند چندشکلی ایجاد شد که در این بین، آنزیم *RsaI* بیشترین تعداد باند چندشکلی (۱۲ باند) و آنزیم *EcoRI* کمترین تعداد باند چندشکلی (۳ باند) را تولید کردند. نتایج محاسبه فاصله ژنتیکی آن‌ها نشان داد که جدایه‌های FOC85، FOC86، FOC40 و FOC32 (از نیشابور)، FOC21 (از بجنورد) و FOC15 (از بردسکن) و FOC11 (از قوچان) کمترین فاصله و بیشترین شباهت ژنتیکی را از هم داشته و بیشترین فاصله ژنتیکی هم بین جدایه FOC6 (از قوچان) با سایر جدایه‌ها به دست آمد. در این روش بین منشأ جغرافیایی جدایه‌ها با گروه‌بندی خوشه‌ای آنها، رابطه آشکاری وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*، RAPD، PCR-RFLP

مقدمه

می‌شود (Jiménez-Gasco *et al.*, 2004)؛ اگرچه وجود چندین نژاد فیزیولوژیک در مورد این پاتوژن، کنترل آن را با استفاده از ارقام مقاوم، مشکل ساخته است (Chakrabarti *et al.*, 2001).

در خرما، چندشکلی حاصل از نشانگر RAPD قادر به تفکیک جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* از جدایه‌های غیربیماری‌زای *Fusarium oxysporum* موجود در ریشه و ریزوسفر بوده است؛ اما تنوع اندکی در بین فرم‌های اختصاصی با استفاده از این تکنیک مشاهده شده است (Kistler, 1997). (Kelley *et al.* (1999) با استفاده از نشانگر RAPD توانستند اختلاف بین دو پاتوتیپ یا گروه ایجادکننده پژمردگی و زردی را در عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود، تشخیص دهند (Chakrabarti *et al.*, 2001). شناسایی *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* توسط ۳۱ پرایمر مختلف با استفاده از نشانگر RAPD توسط گروهی از محققان انجام گرفت (Chiocchetti *et al.*, 1999).

در بین حبوبات، نخود (*Cicer arietinum* L.) از لحاظ میزان تولید پس از لوبیا و نخودفرنگی در مقام سوم قرار دارد (Gopalakrishnan *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006). بر طبق آمار منتشرشده توسط سازمان جهانی خواروبار و کشاورزی (FAO) در سال ۲۰۰۷، ایران پنجمین کشور تولیدکننده نخود در دنیا بوده است (Pande *et al.*, 2007). پژمردگی فوزاریومی با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید نخود در دنیاست. این بیماری در مناطق نخودکاری سراسر دنیا گسترش داشته و حداقل از ۳۳ کشور جهان گزارش شده است و سالانه، ۱۰ تا ۱۵ درصد خسارت ایجاد می‌کند (Honnareddy *et al.*, 2006). استفاده از ارقام مقاوم، یکی از مؤثرترین و کاربردی‌ترین راه‌های کنترل بیماری‌های گیاهی محسوب

* نویسنده مسئول: خراسان رضوی، بردسکن، بلوار مطهری، مطهری ۴۳، پلاک ۶، تلفن: ۰۵۲۲-۷۲۲۹۲۲۰، همراه: ۰۹۱۵۳۷۱۰۲۷۷، samaneh_zokaei@yahoo.com

جمع‌آوری شده از مناطق مختلف هندوستان، گوناگونی و تنوع وجود دارد. همچنین نتایج حاصل از هضم با آنزیم برشی *HaeIII*، جدایه‌ها را در چهار گروه قرار داد (Singh et al., 2006). در این مطالعه با بررسی وضعیت و اهمیت *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* در مزارع استان خراسان رضوی، تنوع ژنتیکی این قارچ مشخص شد و امید است که نتایج این تحقیق در طراحی پروژه‌های اصلاحی برای شناسایی منابع مقاومت و اصلاح و ایجاد ارقام مقاوم نخود مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جداسازی، تشخیص گونه *Fusarium oxysporum*، بررسی بیماری‌زایی و دامنه میزبانی

نمونه‌برداری از ۴۰ مزرعه نخود از اوایل اردیبهشت‌ماه تا اواسط مردادماه در سال زراعی ۸۵-۱۳۸۴ از مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی و شمالی انجام گرفت. این مناطق شامل شهرهای قوچان، بردسکن، نیشابور، بجنورد، مشهد و سبزوار بودند. قارچ مورد نظر در محیط کشت PDA جداسازی شد و سپس خالص‌سازی با استفاده از تک‌اسپور انجام گرفت. در این بررسی، برای شناسایی قارچ فوزاریوم از کلیدهای شناسایی (Nelson et al (1994) و Burgess et al (1994)). در آزمون بیماری‌زایی، مایه‌زنی گیاهچه‌های نخود رقم جم با سوسپانسیون اسپور با غلظت 1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر به‌روش فروبردن ریشه در سوسپانسیون انجام شد. سپس ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* بر اساس شاخص نُه‌درجه‌ای (Bayaa et al., 1994) انجام گرفت. به‌منظور بررسی دامنه میزبانی، تمام جدایه‌های *Fusarium oxysporum* که روی نخود، بیماری‌زا بودند، روی هفت گیاه شامل لوبیا، عدس، سیب‌زمینی، بادمجان، هندوانه، خربزه و گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شدند و گیاه نخود به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. مایه‌زنی به روش آزمون بیماری‌زایی انجام گردید و روزانه، تیپ آلودگی روی گیاهان ثبت شد.

استخراج DNA

در مجموع، ۲۰ جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* برای انجام آزمایشات، مورد استفاده قرار گرفت. جدایه‌های خالص‌سازی شده در محیط PDA، کشت و تحت دمای 25°C در انکوباتور نگهداری شدند. پس از آن، دیسکی از قارچ کشت شده تحت شرایط سترون به ویال‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع سیب‌زمینی-دکستروز (PDB) منتقل گردید. ویال‌ها به مدت سه روز در دمای 25°C و

Zaker Tavallaee (2003) با استفاده از نشانگر RAPD و ۱۵ آغازگر، تنوع ژنتیکی موجود بین جدایه‌های مختلف *Fusarium oxysporum* آوندی نخود را در استان خراسان، مورد بررسی قرار داد. بر اساس این مطالعه، بین منشأ جغرافیایی جدایه‌ها و گروه‌های ژنوتیپی، ارتباط محسوسی موجود نبود. به‌علاوه، این نشانگر به خوبی توانست جدایه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا را در نخود تفکیک نماید (Zaker Tavallaee, 2003). Heydar Zadeh (2005) تنوع ژنتیکی ۲۵ جدایه بیماری‌زای *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* را با ۱۰ آغازگر RAPD در استان‌های خراسان رضوی و شمالی بررسی کرد که بین منشأ جغرافیایی جدایه‌ها و گروه‌های ژنتیکی، ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (Heydar Zadeh, 2005). اولین گزارش از تجزیه و تحلیل تنوع بین جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* با استفاده از نشانگر RAPD در شمال هندوستان توسط Singh et al. (2006) ارائه شده است. در این تحقیق، از ۴۰ آغازگر به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین جدایه‌ها استفاده شد. از بین این آغازگرها، فقط چهار آغازگر چندشکلی خوبی را نشان دادند. بر اساس نتایج حاصل از این تکنیک، جدایه‌ها بر اساس منشأ جغرافیایی از هم تفکیک شدند (Singh et al., 2006). Appel et al (1995) تنوع درون نژادی را در *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* با استفاده از آنالیز RFLP (بر مبنای تکثیر ناحیه IGS) و متعاقباً از طریق تعیین توالی جزئی این ناحیه مشخص کردند. تنوع در ناحیه تکثیر یافته IGS در سایر قارچ‌ها مثل *Histoplasma capsulatum* و *Puccinia graminis* نیز مطالعه شده است (Chakrabarti et al., 2001). اخیراً تکنیک PCR-RFLP بر مبنای تکثیر ناحیه IGS به‌منظور شناسایی گونه‌های *Saccharomyces*، *Armillaria*، *Laccaria* و *Hebeloma* به کار برده می‌شود. مطالعات اندکی در زمینه استفاده از IGS به‌عنوان یک نشانگر مولکولی در جنس فوزاریوم انجام شده که این مطالعات، محدود به دو گونه *Fusarium oxysporum* و *Fusarium graminearum* است (Kim et al., 2001). بر اساس این مطالعات، تنوع موجود در مناطق IGS و همچنین تنوع در ارتباطات درون‌گونه‌ای *Fusarium oxysporum* و فرم‌های اختصاصی آن، بررسی گردید و مشخص شد که بین فرم‌های اختصاصی *Fusarium oxysporum* اختلافاتی وجود دارد (Kim et al., 2001). Singh et al. (2006) نیز اقدام به بررسی تنوع موجود در جدایه‌های *Fusarium oxysporum* با استفاده از تکنیک PCR-RFLP کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بین جدایه‌های

میلی‌لیتر استفاده شد و در نهایت در دستگاه Gel document زیر نور UV مشاهده و از آن عکس تهیه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از RAPD

تصاویر تهیه‌شده از ژل‌های الکتروفورز که در آن قطعات تکثیر یافته توسط هر آغازگر به صورت باندهایی از هم تفکیک شده بودند، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. هر باند به‌عنوان یک لوکوس با دو آلل [حضور باند (۱) و عدم حضور باند (۰)] در نظر گرفته شد. بررسی حضور یا عدم حضور باند توسط بازخوانی تصاویر کامپیوتری ژل‌ها در نرم‌افزار Lab work و با دادن نمره صفر و یک انجام شد. کلیه باندها به‌جز باندهای غیر واضح و خیلی ضعیف مورد شمارش قرار گرفتند (Heydar Zadeh, 2005). از آنجا که ماتریس‌های تشابه، نتایج حاصل از الگوهای باندی را تقویت کرده و روابط بین جدایه‌ها را واضح‌تر بیان می‌کنند، پس از تعیین و وارد کردن کدهای ۰ و ۱ در برنامه اکسل، ماتریس تشابه بر مبنای ضریب تشابه فاصله ژنتیکی تبدیل و تجزیه کلاستر در نرم‌افزار کامپیوتری NTSYS^۲ انجام گرفت و نتایج کلاستر در یک دندروگرام خلاصه شد.

تکثیر ناحیه rDNA-IGS

در این تحقیق برای تهیه محصول PCR از آغازگرهای CLN₁₂ و IGS₂ که منطقه بین‌ژنی IGS^۳ را در DNA ریبوزومی تکثیر می‌کنند، استفاده شد. توالی آغازگرها به صورت زیر می‌باشد:

IGS₂ = 5'- AAT GAG CCA TTC GCA GTT C- 3'
CLN₁₂ = 5'- CTG AAC CGC CTC TAA GTC A G-3'

برنامه حرارتی در مرحله تکثیر در دستگاه ترموسایکلر به صورت یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه برای واسرشته کردن ابتدایی، ۳۵ چرخه (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای واسرشته کردن، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای امتداد زنجیره DNA) و یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای امتداد نهایی زنجیره DNA انجام گرفت. واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر با محتویات ۳ میکرولیتر کلوروفورم منیزیم (MgCl₂) ۲۵ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۰/۵ میکرولیتر d NTPs (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (۱۰ واحد بر میکرولیتر)، یک میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر از DNA (با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و ۳۷ میکرولیتر آب دوار تقطیر انجام شد. محصول واکنش PCR در چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد به مقدار ۶ میکرولیتر تزریق

روی شیکر با سرعت ۸۸ دور در دقیقه گذاشته شدند. این کار به منظور تسریع رشد اولیه قارچ و ورود اکسیژن کافی به محیط مایع انجام گرفت. بعد از این مرحله، ویال‌ها را به مدت ۱۲ تا ۱۴ روز در تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی نگهداری کرده تا توده‌ای از میسیلیوم روی سطح فوقانی محیط PDB تشکیل گردد و مقدار کافی از میسیلیوم قارچ برای استخراج DNA به دست آید. برای استخراج DNA از روش CTAB^۱ اصلاح شده استفاده شد.

RAPD-PCR

از آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی تهیه شده از شرکت سیناژن در این بررسی استفاده شد. برای رقیق کردن آغازگرها طبق دستور شرکت سازنده عمل گردید. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

به منظور انجام واکنش PCR از مجموعه کیت Genepak universal ساخت کشور روسیه استفاده شد. مجموعه کیت برای ۱۰۰ واکنش به حجم ۲۵ میکرولیتر مخلوط در نظر گرفته شد (محتویات خشک داخل میکروتیوب نیز محاسبه شده است). میزان مواد مورد نیاز در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR شامل ۱۰ میکرولیتر رقیق کننده PCR (حاوی ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، ۱۰ میلی‌مولار تریس-HCl با اسیدیته ۹، ۵۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۱/۵ میلی‌مولار کلوروفورم منیزیم و ۲۰۰ میلی‌مولار d NTPs)، ۴/۵ میکرولیتر آب دوار تقطیر، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) و ۴ میکرولیتر DNA (با غلظت ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) بود (Nasiri, 2003). برای کنترل آلودگی و صحت انجام آزمایش، یک واکنش با اضافه کردن آب و بدون استفاده از DNA (به‌عنوان شاهد منفی) در کنار سایر نمونه‌ها در نظر گرفته شد. به منظور نشان دادن اندازه مولکولی باندها از سائزمارکر Lambda DNA/Hind III, EcoRI Digest تولید شده در شرکت سیناژن استفاده گردید. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر با یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای واسرشته کردن ابتدایی، ۴۰ چرخه (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای واسرشته کردن، ۳۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه برای امتداد زنجیره DNA) و یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای امتداد نهایی زنجیره DNA انجام گرفت (Singh et al., 2006). محصول واکنش PCR در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد به مقدار ۷ میکرولیتر تزریق شد و الکتروفورز تحت ولتاژ ۷۵ به مدت سه ساعت انجام گرفت. برای رنگ آمیزی از اتیدیوم بروماید یک میکروگرم بر

2- Numerical Taxonomy System of Multivariation Program
3- Intergenic Spacer (IGS)

1- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

نتایج و بحث

RAPD-PCR

در مجموع، ۱۴ آغازگر توانستند تنوع موجود بین جدایه‌ها را نشان دهند. تعداد کل باندهای چندشکلی ایجادشده ۲۷۱ و اندازه قطعات تکثیرشده بین ۳۰ تا ۴۷۲۶ بود. آغازگر VBC228 بیشترین باند چندشکلی (۲۵ باند) و آغازگر OPK19 کمترین باند چندشکلی (۱۰ باند) را تولید کردند (جدول ۱، شکل ۱ و ۲). بررسی ماتریس تشابه، حاکی از آن است که اکثر جدایه‌ها ضریب تشابه کمتر از ۷۰ درصد داشتند. دو جدایه FOC40 و FOC84 (هر دو از نیشابور) ضریب تشابه ۱۰۰ درصد داشته و بیشترین فاصله ژنتیکی هم بین جدایه FOC6 (از قوچان) با سایر جدایه‌ها بود (شکل ۳).

گردید و الکتروفورز تحت ولتاژ ۸۵ و به مدت یک ساعت انجام گرفت و سپس ژل، مطابق روش گفته شده، رنگ آمیزی شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش PCR به همراه ۱/۵ تا ۲ میکرولیتر از آنزیم‌های برشی *RsaI*، *BsuRI* (*HaeIII*) و *EcoRI* مطابق پروتکل شرکت سازنده مورد هضم قرار گرفت. قطعات برش خورده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۹۶ به مدت چهار ساعت ارزیابی گردید و از سایز مارکر ۱ kb برای نشان دادن اندازه مولکولی باندها استفاده شد.

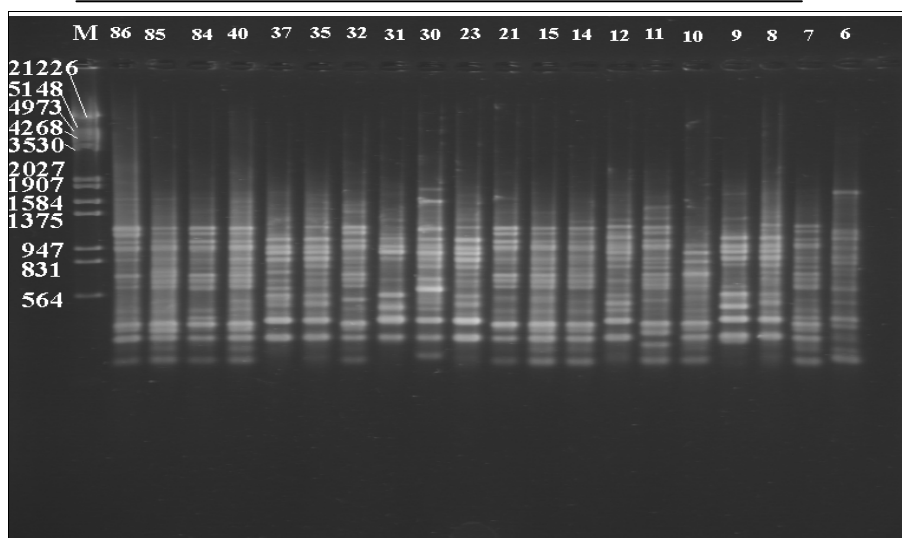
تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نشانگر PCR-RFLP

تجزیه و تحلیل داده‌ها مطابق روش ذکر شده در قسمت قبل انجام گرفت.

جدول ۱- نتایج استفاده از آغازگرهای مختلف

Table 1. The results of application of different primers

تعداد باند چندشکلی Number of polymorphic bands	توالی Sequence	آغازگر Primer
18	AAGCCTCCCC	VDC6
22	GGGCTCGTGG	VBC83
24	CCTGGGCTA	OPK15
23	GCTCCCCAC	VBC199
10	CTCCTGCCAC	OPK19
25	GCTGGGCCGA	VBC228
24	GGGCCCGAGG	VDC82
22	AAGCCTCCCC	VBC222
18	CTCCCTGACC	VBC53
13	GGCTAGGGCG	VBC300
15	GGATGTCGAA	RCO8
19	GATAACGCAC	RCO9
23	TGCCGAGCTG	OPA-02
15	GTAGACCCGT	OPB-11



شکل ۱- الگوی باندهای تکثیرشده از DNA جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri* توسط آغازگر VBC228 شماره هر چاهک، نشان‌دهنده شماره جدایه و حرف M، معرف سایز مارکر است.

Fig. 1. RAPD profiles of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri* isolates obtained by VBC228 primer
M, Marker. Lanes 1-20, *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri* isolates

یک منطقه جغرافیایی در دو گروه مستقل و همچنین قرار گرفتن دو جدایه از دو منطقه مختلف در یک گروه، مؤید این مطلب است.

تکثیر ناحیه IGS در DNA

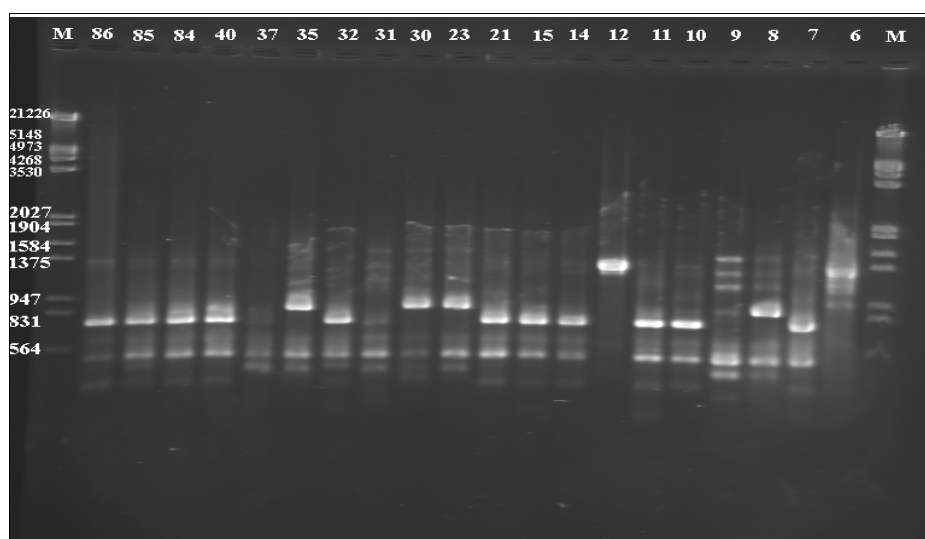
در این تحقیق، قطعات تکثیر شده برای تمامی جدایه‌های مورد بررسی در یک گروه طولی ۲۵۰۰ bp قرار گرفتند (شکل ۴). Appel *et al* (1995) و نیز Kim *et al* (2001) گروه طولی ۲۶۰۰ bp را گزارش کرده‌اند؛ اما Alves-Santos *et al* (1999) گزارش نمودند که جدایه‌های *Fusarium oxysporum* قطعات تکثیر شده، در دو گروه ۲۵۰۰ bp و ۲۶۰۰ bp قرار می‌گیرند (Kim *et al.*, 2001).

آنالیز مولکولی مناطق IGS

در هضم آنزیمی جدایه‌ها با *EcoRI* محدوده باندهای تشکیل شده، ۲۵۰-۴۰۰۰ bp بود. تفاوت در اندازه باندهای تولیدی روی ژل آگارز به وضوح قابل مشاهده است (شکل ۵). همچنین در هضم آنزیمی توسط *HaeIII* در جدایه‌ها، باندهایی در محدوده ۲۵۰-۷۵۰ bp مشاهده شد (شکل ۶) و در هضم با آنزیم برشی *RsaI* جدایه‌ها، قطعات ۱۰۰۰-۲۵۰ bp تولید کردند (شکل ۷). در کل در اثر هضم با سه آنزیم، ۲۲ عدد باند چندشکلی ایجاد شد که در این بین، آنزیم *RsaI* بیشترین تعداد باند چندشکلی (۱۲ باند) و آنزیم *EcoRI* کمترین تعداد باند چندشکلی (۳ باند) را تولید کردند.

دندروگرام به دست آمده پس از آنالیز کلاستر در سطح تشابه ۰/۵ جدایه‌ها را به دو دسته A و B تقسیم کردند (شکل ۳). دسته A شامل ۱۱ گروه که ضریب تشابه آنها بین ۰/۵ تا ۱ بود. این دسته در سطح شباهت ۰/۶ به دو گروه تفکیک شد که فقط جدایه FOC10 (از قوچان) در گروه مجزا قرار گرفت. اما در سطح تشابه ۰/۶۸، جدایه FOC14 (از بجنورد) همراه با دو جدایه از بردسکن و جدایه FOC32 (از بجنورد) به همراه چهار جدایه از نیشابور در یک گروه قرار می‌گیرد. در دسته B نیز جدایه FOC6 (از قوچان) از بقیه متمایز گردید. در این گروه در سطح تشابه ۰/۶۶، دو جدایه بجنورد و بردسکن در یک گروه قرار گرفته و در سطح تشابه ۰/۷۲ نیز جدایه‌های قوچان و بردسکن، هم گروه هستند. بنابراین نشانگر RAPD نتوانست جدایه‌ها را بر اساس منشأ جغرافیایی از هم تفکیک کند. محققان در مناطق مختلف جهان جمعیت قارچ‌های گوناگونی را با استفاده از RAPD گروه‌بندی کرده‌اند و بر اساس آن، جدایه‌ها بر اساس منشأ جغرافیایی یا بیماری‌زایی از هم تفکیک شدند (Zaker Tavallaee, 2003; Singh *et al.*, 2006).

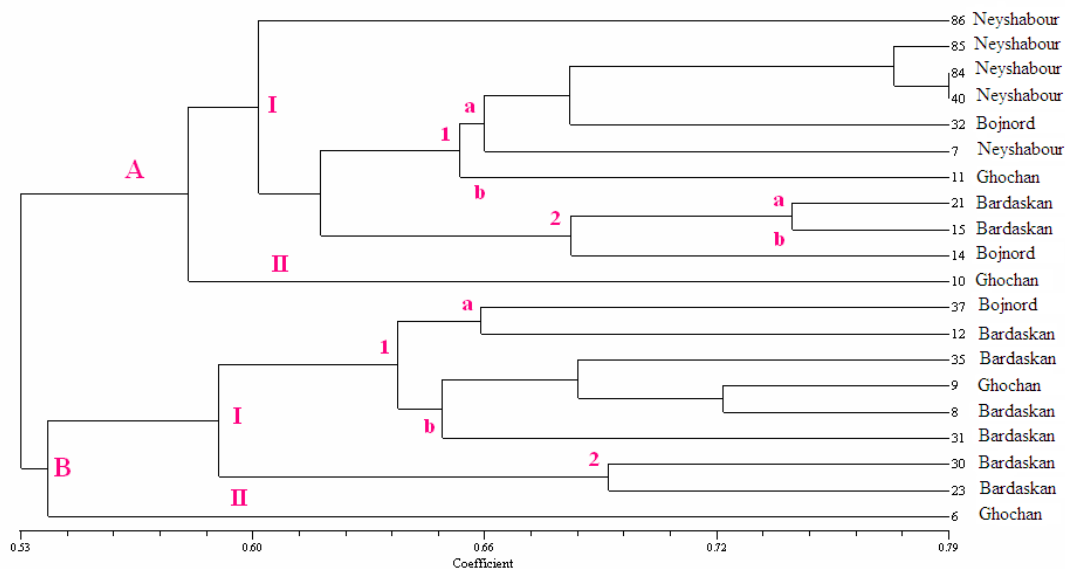
به نظر می‌رسد که در این تحقیق، نشانگر RAPD قادر به تفکیک جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* بر اساس بیماری‌زایی و منشأ جغرافیایی نیست (شکل ۳). بررسی فاکتور منشأ جغرافیایی و بیماری‌زایی در گروه‌بندی جدایه‌ها نشان می‌دهد که گرچه این عامل، فاکتور مهمی در جداسازی جدایه‌های مختلف قارچی است، اما به نظر می‌رسد که خود، تحت تأثیر عواملی مثل فشار انتخابی میزبان و بروز جهش‌های احتمالی باشد. در نتایج به دست آمده نیز قرار گرفتن جدایه‌های



شکل ۲- الگوی باندهای تکثیر شده از DNA جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* توسط آغازگر OPK19

شماره هر چاهک، نشان‌دهنده شماره جدایه و حرف M معرف سایز مارکر است

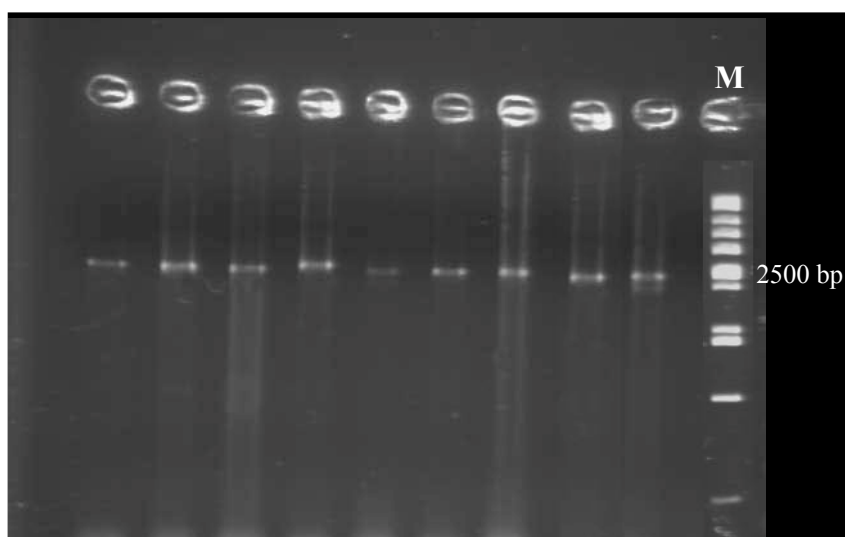
Fig. 2. RAPD profiles of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates obtained by OPK19 primer M, Marker. Lanes 1-20, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates



شکل ۳- نمودار روابط خویشاوندی جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* بر اساس فاصله ژنتیکی به دست آمده از آنالیز RAPD
 Fig. 3. Dendrogram of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* isolates based on genetic distance obtained by RAPD analysis

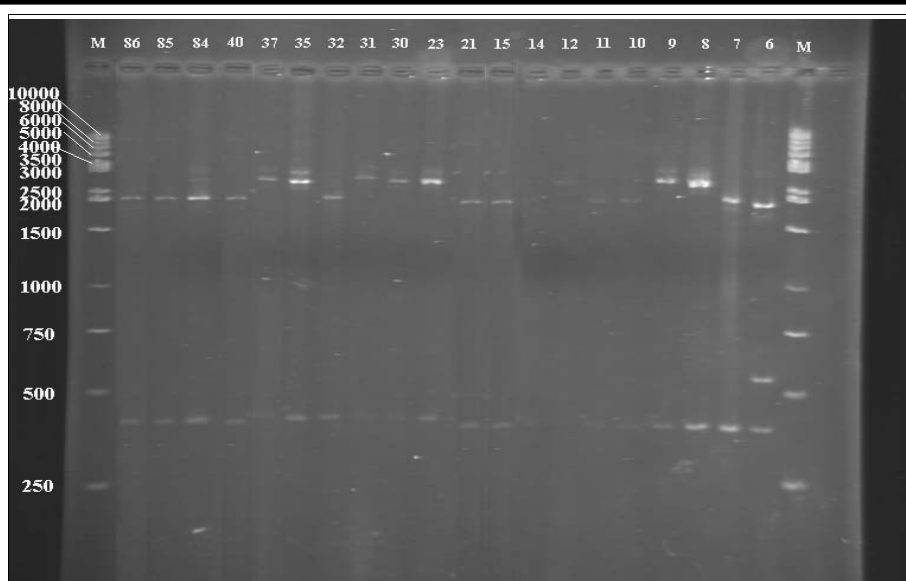
شامل FOC84، FOC85 و FOC86 (از نیشابور) و گروه B شامل جدایه‌های FOC37 (از بجنورد)، FOC35، FOC8، FOC31، FOC23 و FOC9 (از بردسکن)، FOC6 و FOC30 (از قوچان) می‌باشد.

نتایج تجزیه کلاستر در یک دندروگرام خلاصه شد. بر اساس این دندروگرام، جدایه‌ها در دو گروه A و B قرار می‌گیرند. گروه A شامل جدایه‌های FOC10 و FOC11 (از قوچان)، FOC15، FOC21 و FOC12 (از بردسکن)، FOC14 و FOC32 (از بجنورد)، FOC7، FOC40



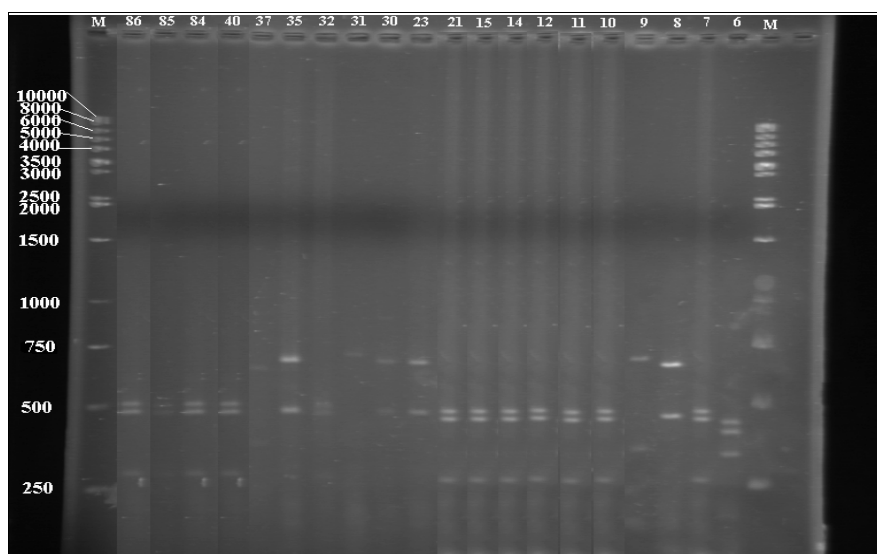
شکل ۴- الگوی باندهای تکثیرشده از محصول DNA جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* توسط آغازگرهای IGS₂ و CLN₁₂ و حرف M معرف سایز مارکر (1Kb.p) است

Fig. 4. Profile of DNA amplification products of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates by IGS₂ and CLN₁₂ primers M, Marker (1Kb.p ladder)



شکل ۵- الگوی بانندی هضم‌شده از محصول PCR جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* توسط آنزیم *EcoRI* شماره هر چاهک، نشان‌دهنده شماره جدایه و حرف M معرف سایز مارکر (1Kb.p) است

Fig. 5. The restricted profile from PCR product of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates by *EcoRI* enzyme M, Marker. Lanes 1–20, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates



شکل ۶- الگوی بانندی هضم‌شده از محصول PCR جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* توسط آنزیم *HaeIII* شماره هر چاهک، نشان‌دهنده شماره جدایه و حرف M معرف سایز مارکر (1Kb.p) است

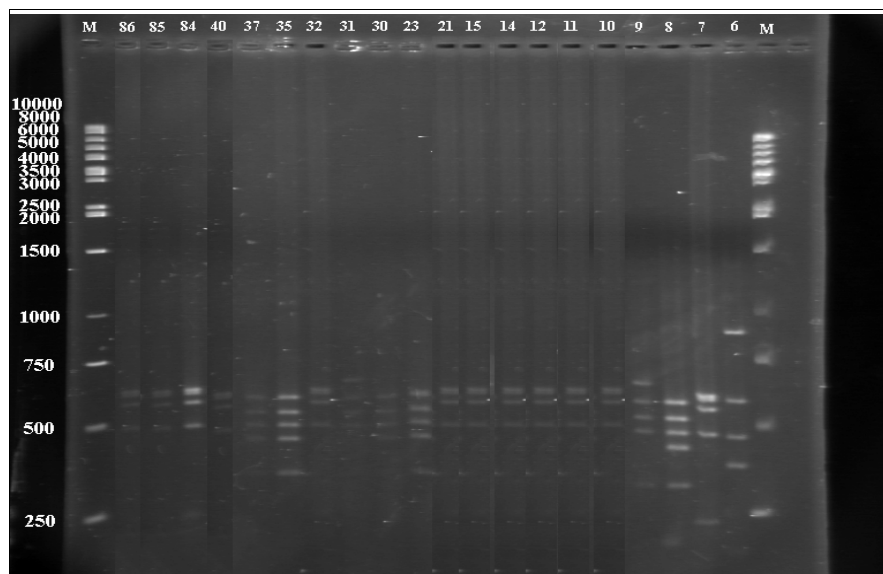
Fig. 6. The restricted profile from PCR product of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates by *HaeIII* enzyme M, Marker. Lanes 1–20, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates

FOC85 و FOC40 (از نیشابور)، FOC32 (از بجنورد)، FOC21 و FOC15 (از بردسکن) و FOC11 (از قوچان)، کمترین فاصله را از لحاظ ژنتیکی داشته و بیشترین فاصله ژنتیکی هم بین جدایه FOC6 (از قوچان) با سایر جدایه‌هاست (شکل ۸). پس از انجام عمل هضم توسط آنزیم‌ها، تکنیک PCR-RFLP نتوانست جدایه‌ها را بر اساس منشأ جغرافیایی از

سپس گروه A به دو گروه تفکیک شد که فقط جدایه غیربیماری‌زای FOC7 (از نیشابور) در گروه مجزا قرار می‌گیرد و در مورد گروه B نیز این تقسیم‌بندی مشاهده می‌شود که در اینجا، جدایه FOC6 (از قوچان) از بقیه متمایز می‌گردد. در سطح شباهت ۹۰ درصد، ۱۱ گروه ژنوتیپی تفکیک شد (شکل ۷). نتایج محاسبه فاصله ژنتیکی نشان داد که جدایه‌های FOC86،

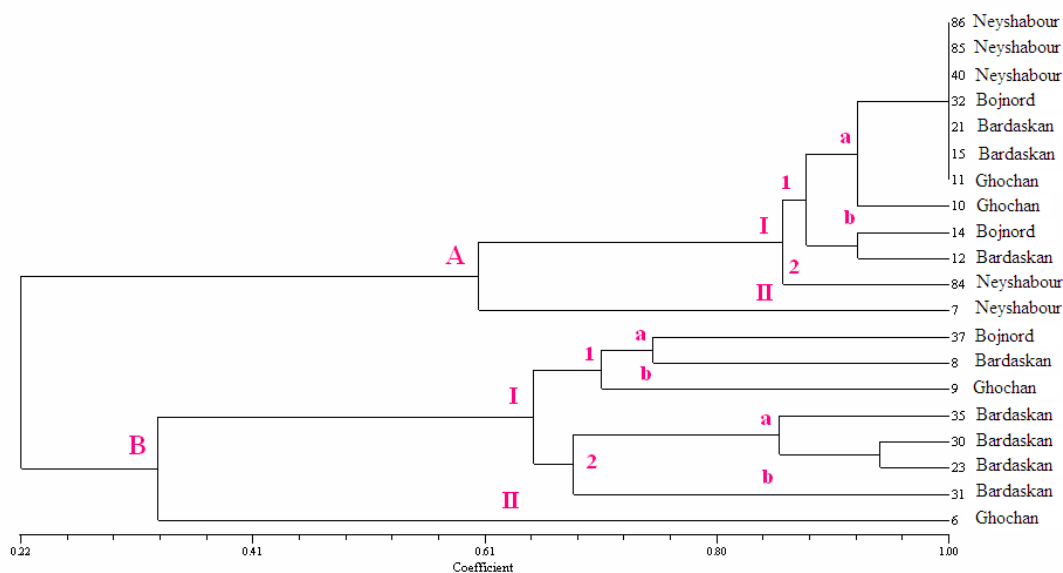
هم تفکیک کند، اما جدایی غیربیماری‌زا از دیگر جدایه‌ها متمایز شد. بنابراین تکنیک PCR-RFLP روش مناسبی برای شناسایی روابط درون‌گونه‌ای محسوب می‌شود. به‌منظور شناسایی بهتر روابط ژنتیکی *Fusarium oxysporum* و شناسایی فرم‌های اختصاصی آن از طریق تکنیک

PCR-RFLP، شناسایی ناحیه IGS در تعداد بیشتری جدایه *Fusarium oxysporum* و تعیین توالی این ناحیه ضروری است تا از این طریق بتوان اطلاعات بیشتری را به‌دست آورد (Kim et al., 2001).



شکل ۷- الگوی باندهای هضم‌شده از محصول PCR جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* توسط آنزیم *RsaI* شماره هر چاهک، نشان‌دهنده شماره جدایه و حرف M معرف سایز مارکر (1Kb.p) است

Fig. 7. The restricted profile from PCR product of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates by *RsaI* enzyme M, Marker. Lanes 1–20, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates



شکل ۸- نمودار روابط خویشاوندی جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* بر اساس فاصله ژنتیکی به‌دست‌آمده از آنالیز ناحیه IGS

Fig. 8. Dendrogram of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* isolates based on genetic distance obtained by IGS region analysis

منابع

1. Bayaa, B., Erskine, W., and Hamdi, A. 1994. Evaluation of a wild lentil collection for resistance to vascular wilt. *Genetic Resources and Crop Evolution* 42: 231-235.
2. Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., and Backhouse, D. 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. University of Sidney. 133 pp.
3. Chakrabarti, A., Mukherjee, P.K., Sherkhane, P.D., Bhagwat, A.S., and Murthy, N.B.K. 2001. A simple and rapid molecular method for distinguishing between races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* from India. *Current Science* 4: 571-575.
4. Chiocchetti, A., Ghignone, S., Minotu, A., Gullino, M.L., Garibaldi, A., and Migheli, Q. 1999. Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *basillici* isolated from soil, basil seed and plants by RAPD analysis. *Plant Diseases* 83: 576-581.
5. Gopalakrishnan, S., and Strange, R.N. 2005. Identity and toxicity of *Fusarium* species isolated from wilted chickpea. *Phytopathologia Mediterranea* 2: 180-188.
6. Heydar Zadeh, N. 2005. Determination of physiological races and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* the causal agent of vascular wilt in tomato by RAPD in Razavi and Northern Khorasan provinces. MSc. Thesis. Ferdowsi University of Mashhad, Iran (In Persian).
7. Honnareddy, N., and Dubey, S.C. 2006. Pathogenic and molecular characterization of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing chickpea wilt. *Current Science* 5: 661-666.
8. Jiménez-Gasco, M.M., Navas-Cortés, J.A., and Jiménez-Díaz, R.M. 2004. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris/Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology* 7: 95-104.
9. Kim, H.J., Choi, Y.K., and Min, B.R. 2001. Variation of the Intergenic Spacer (IGS) Region of Ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae speciales. *The journal of Microbiology* 4: 265-272.
10. Kistler, H.C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 4: 474-479.
11. Nasiri, M. 2003. A pamphlet on educational workshop of application of molecular markers in investigation of the variety of animal genome. Educational Workshops of Iran International third Conference of Biotechnology. Mashhad. 196 p. (In Persian).
12. Nelson, P.E., Dignani, M.C., and Anaissie, E.J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 479-504.
13. Pande, S., Gaur, P.M., Sharma, M., Rao, J.N., Rao, B.V., and Krishna Kishore, G. 2007. Identification of single and multiple disease resistance in Desi chickpea genotypes to Ascochyta blight, Botrytis gray mold and Fusarium wilt. *SAT Agricultural* 5: 1-3.
14. Singh, B.P., Saikia, R., Yadav, M., Singh, R., Chauhan, V.S., and Arora, D.K. 2006. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing wilt of chickpea. *African Journal of Biotechnology* 6: 497-502.
15. Zaker Tavallae, F. 2003. Genetic diversity determination of vascular *Fusarium oxysporum* isolates in chickpea by RAPD molecular marker. MSc. Thesis. Ferdowsi University of Mashhad, Iran (In Persian).

Genetic diversity determination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* the causal agent of wilting and chlorosis in chickpea by using RAPD and PCR-RFLP techniques in Razavi and Northern Khorasan provinces

Zokaee^{1*}, S., Felahati Rastegar², M., Jafarpour³, B., Bagheri⁴, A. & Jahanbakhsh Mashhadi⁵, V.

1- The former MSc. Student from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

2, 3 & 4- Professor from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad,
rastegar@um.ac.ir; bjafarpour@um.ac.ir; abagheri@um.ac.ir, respectively

5- Ph.D Student from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, va_ja190@stu-mail.um.ac.ir

Received: 17 May 2010

Accepted: 21 November 2010

Abstract

In order to study the genetic diversity of the causal agent of *Fusarium* wilting in chickpea, two techniques including RAPD and PCR-RFLP were used. In RAPD-PCR technique, all 14 primers could show the diversity among the isolates. After studying the banding patterns of 14 primers, a dendrogram based on similarity matrix was constructed. The RAPD dendrogram analysis could not separate isolates based on their geographical origins. In PCR-RFLP technique, two primers, IGS₂ and CLN₁₂, were used which made the same band pattern (2.5 kb) in all isolates. Totally, 22 polymorphic bands obtained through digestion with three digestive enzymes. The digestive enzyme *RsaI* produced the highest number of polymorphic bands (12 bands) and *EcoRI* produced the lowest number (3 bands). The genetic calculation results of the isolates showed that FOC85, FOC86 and FOC40 isolates (from Neyshabour), FOC32 (from Bojnord), FOC21 and FOC15 (from Bardaskan) and FOC11 (from Ghochan) showed the lowest genetic distance and the highest genetic similarity. The most genetic distance observed among FOC6 isolates (from Ghochan) compared to other isolates. Analysis of clusters in this method showed that there are not any specific relation between genotypic grouping and their geographical origins.

Key words: *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*, Genetic variation, PCR-RFLP, RAPD

* Corresponding Author: samaneh_zokaee@yahoo.com, Mobile: 09153710277