مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۱، سال ۱۳۸۲ (۷۵-۶۷)

تعیین گروههای سازگاری رویشی قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* در استان خراسان

حجت‌اله قلعه دزدانی[۱]، ماهرخ فلاحتی رستگار[۲]، بهروز جعفرپور[۳] و مجتبی مرادزاده اسکندری[٤]
۱، عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی بلوچستان ۲، ۳، استادان دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
٤، محقق مرکز تحقیقات کشاورزی استان خراسان
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۸/۸

خلاصه

دراین‌تحقیق‌گروههای سازگاری رویشی (VCG)[1] چهل جدایه *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* ، عامل بیماری های مهم سیب زمینی در سه مرحله در انبار و مزرعه شامل پوسیدگی خشک فوزاریمی پژمردگی و پوسیدگی انتهایی ساقهٔ سیب زمینی که از مناطق مختلف سیب زمینی کاری استان خراسان جمع آوری شده بودند، با استفاده از جهش یافتگان نیت تعیین شد. ابتدا جهش یافتگان نیت بصورت سکتورهائی در محیط های مختلف کلرات دار تولید شدند. سپس کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیت بر اساس مشخصات رشدی پر گنهٔ آنها روی محیط پایه که حاوی یکی از پنج نوع منبع نیتروژن (نیترات سدیم، نیتریت سدیم، تارتارات آمونیم، اسید اوریک و هیپوزانتین) بود، تعیین گردید. بر این اساس ٤۹/۹ درصد از جهش یافتگان نیت متعلق به کلاس فنوتیپی nit 1 ، ۳۰/۳ درصد به کلاس فنوتیپی nit3 و ۱۵/۹ درصد در کلاس فنوتیپی Nit M قرار گرفتند. ۳/۹ درصد از جهش یافتگان نیت در هیچ کلاس فنوتیپی قرار نگرفتند که به آنها crn اطلاق می گردد. به منظور انجام آزمون های مکمل سازی و تعیین گروههای سازگاری رویشی، بین تمامی جهش یافتگان Nit M هر جدایه با جهش یافتگان nit 1 یا nit 3 سایر جدایه ها مقابله برقرار گردید. جدایه هائی که قادر به تشکیل هترکاریون های پروتروف پایدار در حد فاصل پرگنه های سازگار Nit M با nit 1 یا nit3 بودند، در یک گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند. نماد تشکیل هترکاریون پروتروف، تشکیل خط رشدی متراکم از میسلیوم های هوایی در حدفاصل پرگنه ها در محیط کشت حداقل بعد از ۷ تا ١٤ روز است. بر این اساس ۸ گروه سازگاری رویشی به نامهای VCG1, VCG2, VCG3, VCG4, VCG5, VCG6, VCG7 و VCG8تعیین شد که در این میان VCG1, VCG2 و VCG3مربوط به جدایه های عامل پژمردگی، VCG4 شامل جدایه های عامل پژمردگی و پوسیدگی انتهائی ساقه، VCG5 شامل فقط یک عضو مربوط به پوسیدگی انتهایی ساقه, VCG6,VCG7 و VCG8مربوط به جدایه های عامل پوسیدگی خشک فوزاریومی سیب زمینی بودند. به نظر می رسد بین جدایه های عامل پژمردگی و پوسیدگی انتهائی ساقه همولوژی ژنتیکی وجود داشته باشد. ارتباطی بین VCG و پراکنش جغرافیائی جدایه ها وجود نداشت. از آنجا که از گروههای سازگاری رویشی استاندارد(به علت عدم وجود آنها) استفاده نشده است، نامگذاری گروهها به روش معمول صورت نگرفته است.

واژه‌های کلیدی: گروههای سازگاری رویشی، VCG ، *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi*

---

1 . Vegetative Compatibility Groups

مکاتبه کننده: حجت‌اله قلعه دزدانی

مقدمه

مطالعهٔ جمعیت ها با استفاده از گروههای سازگاری رویشی (VCG) به عنوان ابزار اندازه گیری تنوع ژنتیکی در سالهای اخیرگسترش یافته است. جدایه های درون یک VCG بالقوه قادر به تبادل اطلاعات ژنتیکی از طریق تولید مثل پراجنسی[1] هستند. اهمیت این توانائی به ساختار جمعیت و تعداد افرادی که یک نژاد می تواند با آنها تبادل اطلاعات انجام دهد، بستگی دارد. ارتباطات بین VCG و ویژگیهایی مانند درجه بیماریزایی (در صورت وجود) ابزار مناسبی جهت شناسایی می باشند.یکی از قارچهائی که گروههای سازگاری رویشی آن در سطح وسیعی بررسی شده است قارچ فوزاریوم و بخصوص گونهٔ *Fusarium oxysporum* Schelecht.fr. می‌باشد. سویه های این گونه از لحاظ فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مشابه هم هستند. این گونه یک بیمارگر گیاهی خاکزاد با انتشار وسیع است. فرم های اختصاصی این قارچ نیز از لحاظ مورفولوژیکی از یکدیگر قابل تمایز نیستند. از طرفی تفکیک و شناسائی فرمهای اختصاصی و نیز بررسی تنوع نژادهای درون یک فرم اختصاصی صرفا بر اساس آزمایشهای بیماریزائی خالی از اشکال نیست. این آزمایشها اغلب تحت تاثیر متغیرهای محیطی مثل دما، سن میزبان، روش مایه زنی و دامنه میزبانی قرار می‌گیرند (۵). بنابراین برای شناسائی دقیق، محققان استفاده از نشانگرهای مولکولی و ژنتیکی را در دستور کار خود قرار دادند. بوسلند و ویلیایز (۱۹۸۷) از تجزیه آیزوزایمی به عنوان روشی برای تعیین فرم اختصاصی و نژادهای *Fusarium oxysporum* استفاده کردند. تعیین گروههای سازگاری رویشی روش مناسبی برای شناسایی و تفکیک فرم اختصاصی این گونه است. در این روش قارچها بر اساس ژنتیک و نه بر همکش میزبان- بیمارگر به زیر گروههائی تفکیک می‌شوند (۲). از آنجا که واکنشهای سازگاری یا ناسازگاری بین جدایه ها به صورت ظاهری قابل مشاهده نیست، جهش یافتگان نیت که قادر به مصرف نیترات نمی باشند، جهت تشخیص گروههای سازگار رویشی معرفی شده‌اند. جهش یافتگان نیت در محیط حاوی کلرات انتخاب می‌شوند. کلرات به عنوان آنالوگ نیترات عمل کرده و به وسیله آنزیم احیا کننده نیترات به ماده سمی کلریت تبدیل می شود(۵). بدین ترتیب جهش یافتگان مقاوم به کلرات که دارای نقص ژنتیکی در زمینه سنتز آنزیم احیا کننده نیترات هستند، در قالب سکتورهای سریع الرشد از روی محیط کلرات دار قابل جدا سازی می‌باشند.

جهش یافتگان واقعی، در روی محیط کشت حداقل که فقط دارای نیترات به عنوان تنها منبع ازت است، رشدی ضعیف، گسترده و تقریبا بدون اسپورزائی و میسیلیوم هوائی از خود نشان می‌دهند. این رشد ضعیف به دلیل عدم توانائی قارچ جهش یافتهٔ نیت در مصرف نیترات به عنوان تنها منبع نیتروژن است. جهش یافتگان نیت بر اساس تعداد و نوع لوکوس‌های جهش یافته به سه گروه فنوتیپی مشخص تقسیم شده‌اند. در گروه اول یک جهش در لوکوس ساختمانی آنزیم احیا کننده نیترات رخ داده است که به آن nit1 ، در گروه دوم یک جهش در لوکوس تنظیمی – اختصاصی مسیر مصرف نیترات ایجاد شده است که به آن nit3 و بالاخره در گروه سوم حداقل پنج جهش در لوکوس موثر در ساخت کوفاکتور مولیبدن دار که لازمه فعالیت آنزیم احیا کننده نیترات است صورت گرفته که به آن NitM اطلاق می‌شود (۶).

در برخی از جدایه ها چندین سکتور مقاوم به کلرات ولی دارای رشد تیپ وحشی روی محیط حداقل به دست می‌آید. به این دسته از جهش یافتگان که مقاوم به کلرات و قادر به مصرف نیترات هستند، جهش یافتگان crn اطلاق می‌گردد (۲).

برای تعیین گروههای سازگاری رویشی، جهش یافتگان نیت در روی محیط کشت حداقل با یکدیگر مقابله داده می‌شوند. جهش یافتگانی که قادر به تشکیل هترکاریون پایدار با همدیگر باشند در یک VCG قرار می‌گیرند. آزمون تشکیل هترکاریون معمولا شامل ایجاد یک هتروکاریون پروتوتروف پایدار تحت شرایطی است که هیچیک از دو جزء اکسوتروف نتواند بقای خود را حفظ نماید. درجهٔ بالایی از همولوژی ژنتیکی بین جدایه ها برای سازگاری رویشی لازم است. پوآلا متوجه شد که بین گروهای سازگاری رویشی و فرمهای اختصاصی *F.oxysporum* ارتباط وجود داشته، اعضای یک VCG متعلق به یک فرم اختصاصی هستند (۵). بنابراین می‌توان اقدام به شناسایی نژادهای بیماریزا نمود. این روش بسیار سریع‌تر، دقیق‌تر و راحت‌تر از آزمایش‌های بیماریزائی در گلخانه یا مزرعه است. در

1- Parasexual

واقع به جای انجام آزمون‌های فراوان و وقت گیر بیماریزائی روی تعداد زیادی ارقام و لاین‌های استاندارد، از همبستگی میان VCG و درجه بیماریزائی (در صورت وجود) جدایه‌ها استفاده می‌شود. چندین گونه فوزاریوم به عنوان عامل بیماری پوسیدگی خشک فوزاریومی سیب زمینی معرفی شده‌اند. گونهٔ *Fusarium oxysporum* یکی از این گونه‌هاست . این گونه همچنین باعث پژمردگی و پوسیدگی انتهایی ساقه سیب زمینی می‌شود. هدف از این بررسی تعیین گروههای سازگاری رویشی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* عامل بیماریهای مهم سیب زمینی در سه مرحلهٔ پوسیدگی خشک فوزاریمی، پژمردگی و پوسیدگی انتهایی ساقه در استان خراسان می‌باشد. در همین راستا تلاش شد تا ارتباط بین بیماریزائی و VCG نیز بررسی گردد. ونتر و همکاران در آفریقای جنوبی در تحقیق‌مشابهی از مجموع ۳۵ جدایهٔ *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* روی سیب زمینی ۶ گروه سازگاری رویشی به نامهای A، B، C، D، E و F تشخیص دادند (۷).

مواد و روشها

۱- تهیه جدایه ها

چهل جدایهٔ *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* برای این تحقیق انتخاب گردید (جدول ۳). پانزده جدایهٔ عامل پوسیدگی خشک فوزاریمی از نمونه های سیب زمینی آلوده قوچان، گناباد، تربت جام، مشهد، نیشابور، کاشمر، کوهسرخ، اسفراین، چناران و تربت حیدریه جداسازی، شناسایی و اثبات بیماریزایی شد. بیست جدایهٔ عامل پژمردگی از چناران، جلگه رخ، قوچان، تربت جام و بجنورد و پنج جدایهٔ عامل پوسیدگی انتهائی ساقه متعلق به شهرستانهای قوچان، تربت جام، چناران که قبلا شناسائی شده بود از آزمایشگاه بیماری شناسی مرکز تحقیقات کشاورزی خراسان تهیه گردید. این جدایه ها از انبارها، سردخانه‌ها، میدانهای بار و مزارع، طی سالهای ۷۷و ۷۸ جمع‌آوری شدند.

۲- محیط های کشت

محیط کشت پایه: مواد مورد نیاز برای تهیه محیط کشت پایه که برای ساخت سایر محیط کشتها استفاده می شود به شرح زیر است:

ساکاروز ۳۰ گرم، KH_2PO_4 ۱ گرم ، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۵ گرم ، KCl ۰/۵ گرم، $FeSO_4.7H_2O$ ۱۰ میلی گرم، آگار ۲۰ گرم و ۰/۲ میلی لیترمحلول عناصر کم مصرف در یک لیتر آب مقطر. محلول عناصر کم مصرف شامل مواد زیر است:

اسید سیتریک ۵ میلی‌لیتر، $ZnSO_4.7H_2O$ ۵گرم، $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ ۱گرم، $CuSO_4.5H_2O$ ۰/۲۵ گرم، $MnSO_4.H_2O$ ۵۰ میلی‌گرم، H_3BO_3 ۵۰ میلی‌گرم، $NaMO_4$ ۵۰ میلی گرم، آب مقطر ۹۵ میلی لیتر.

محیط کشت حداقل: با افزودن دو گرم نیترات سدیم به یک لیتر محیط پایه تهیه و محیط حاصله سترون شده برای شناسائی جهش یافتگان نیت و همچنین آزمون مکمل سازی استفاده می شود.

محیط‌های کلرات دار: این محیط ها شامل PDC[1]، MAC[2]، CMA[3]، MMC[4] بوده که با اضافه کردن ۱۵ تا ۴۵ گرم کلرات پتاسیم به محیط کشت های به ترتیب PDA ، مالت آگار، آرد ذرت- آگار و محیط حداقل تهیه می شود. این محیط ها برای تولید جهش یافتگان نیت استفاده شدند.

محیط‌های نیتروژن‌دار: این محیط کشت‌هاشامل محیط‌های نیترات، نیتریت، تارتارت آمونیم، اسیداوریک و هیپوزانتین هستند که به ترتیب با افزودن ۲ گرم نیترات سدیم، ۰/۵گرم نیتریت سدیم، ۱ گرم تارتارات آمونیم، ۰/۲ گرم اسید اوریک و ۰/۲ گرم هیپوزانتین به یک لیتر محیط پایه تهیه می‌شوند.

۳- تولید جهش یافتگان نیت

طبق روش پوآلا (۱۹۸۵) از کشت های خالص هر جدایه در محیط PDA قطعات کوچکی به قطر تقریبی ۲ میلی متر تهیه و به محیط کشت حاوی کلرات پتاسیم منتقل شد. هر جدایه در دو تکرار به تمام محیط کشت های فوق الذکر منتقل گردید. تشتک های پتری در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد، به مدت ۲۱ روز در انکوباتور نگهداری و مرتبا مورد بررسی قرار گرفتند تا از تشکیل سکتورهای سریع الرشد که احتمالا جهش یافته نیت هستند، اطلاع حاصل شود.

1 . PDA medium + Cholorate
2 . Malt Agar medium + Chlorate
3 . Corn Meal Agar medium + Chlorate
4 . Minimal medium + Chlorate

۴- شناسائی جهش یافتگان نیت

به منظور شناسائی جهش یافتگان نیت از حاشیه سکتورها یا مناطقی که رشد غیر عادی داشتند، قطعاتی کوچک به قطر ۲ میلی‌متر به محیط کشت حداقل منتقل گردید. این محیط ۴ تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در انکوباتور نگهداری شد. جهش یافتگان نیت در روی این محیط رشدی ظریف و گسترده داشته، اسپور و میسلیوم هوائی تولید نمی نمایند. در مواردی که تیپ وحشی قارچ ظاهر می شد جدایهٔ مورد نظر از ادامه تحقیق حذف می گردید.

۵ - تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیت

کلاس فنوتیپی تمام جهش یافتگان نیت با توجه به ریخت شناسی پرگنه آنها روی پنج محیط کشت که دارای یکی از پنج منبع نیتروژن یعنی نیترات سدیم، نیتریت سدیم، هیپوزانتین، تارتارات آمونیم و اسید اوریک بودند،تعیین شد. بدین منظور پنج قطعه یک میلیمتری از جهش یافتگان نیت از روی محیط حداقل برداشته و به ترتیب روی محیط هایی که دارای یکی از ۵ منبع نیتروژن فوق الذکر بود، منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ روز نگهداری شد. پس از گذشت این مدت، بررسی فنوتیپ جهش یافتگان نیت با توجه به ریخت شناسی پرگنهٔ قارچ روی این محیط ها به کمک جدول(۱) انجام شده هر کدام در یکی از سه گروه nit1، nit3 یا NitM قرار گرفتند (۲).

۶- آزمون مکمل سازی فیزیولوژی جهش یافتگان نیت

برای انجام این آزمون در هر تشتک پتری حاوی محیط کشت حداقل، قطعات ۲ میلیمتری از NitM هر جدایه در برابر قطعات ۲ میلیمتری nit1 یا nit3 همان جدایه ، با فاصله ۱/۵ تا ۲ سانتیمتر از یکدیگر کشت شدند. تشتکها در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد و دورهٔ نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به مدت ۷ تا ۱۴ روز نگهداری شدند. پس از گذشت مدت مذکور، تشتک ها به منظور بررسی تشکیل یا عدم تشکیل هتروکاریون (تشکیل یک خط رشد متراکم از میسلیوم‌های هوائی در محلی که دو پرگنه نیت با همدیگر تماس حاصل کرده‌اند) کنترل شدند. در صورت عدم تشکیل هتروکاریون معلوم می‌شود که جدایه مورد آزمایش دارای صفت خود - ناسازگاری رویشی[1]است و باید از ادامه تحقیق حذف شود تا از بروز اشتباه اجتناب گردد. جدایه های خود سازگار برای ادامه تحقیق استفاده شدند. مانند روش بالا برای ۴۰ جدایه مورد آزمایش، بینNitM هر جدایه با nit1 یا nit3 ۳۹ جدایه دیگر مقابله انجام شد. برای صرفه جوئی در مصرف مواد به جای کشت فقط دو قطعه در هر تشتک، چندین قطعه در یک تشتک قرار گرفتند. بدین صورت که NitM هر جدایه را در وسط تشتک کشت داده و چند قطعه ازnit3 یا nit1 جدایه های دیگر در فاصله ۱/۵ تا ۲ سانتیمتری آنها کشت داده شدند. با گذاشتن علامت در زیر تشتک مشخصات هر قطعه ثبت گردید. قارچها در همان شرایط و زمان فوق الذکر نگهداری شدند. تشکیل هترکاریون بین پرگنه‌های نیت دو جدایه نشان می‌هد که این دو جدایه متعلق به یک VCG هستند و عدم تشکیل هترکاریون نشان دهنده قرار گرفتن دو جدایه در دو VCG متمایز است (۲).

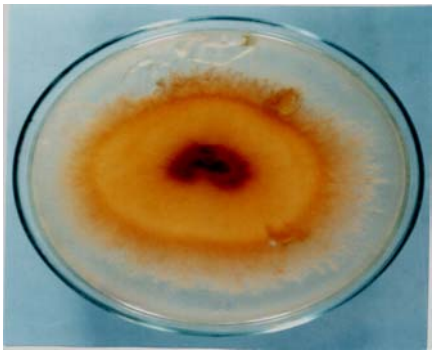
در آزمون مکمل سازی تلاش شد تا یکی از اعضای جفتهای مورد مطالعه NitM باشد، چرا که طبق نتایج سایر محققین (۲، ۳، ۴ ، ۵، ۶) nit1 با خودش یا با nit3 (حتی در صورت وجود سازگاری رویشی) به سهولت تشکیل هترکاریون نداده، باعث بروز اشتباه می‌شود. بنابراین به منظور تشخیص دقیق‌تر و سریع‌تر جدایه‌های متعلق به یک گروهVCG، دراین آزمایش NitM هر جدایه درمقابلnit1 یاnit3 جدایه‌های دیگر قرار گرفت.

نتایج و بحث

۱- جداسازی جهش‌یافتگان نیت

جدایه‌های مورد آزمایش در غلظت ۱/۵ درصد کلرات پتاسیم محیط کشتهای کلرات دار که توسط ونتر و همکاران (۱۹۹۲) پیشنهاد شده بود، سکتورهای مقاوم به کلرات پتاسیم تولید نکردند. بدین منظور غلظت کلرات پتاسیم به ۲ تا ۳ برابر افزایش یافت. با این تغییر پس از حدود ۷ تا ۱۴ روز سکتورهای جهش یافته به صورت نا منظم و به رنگهای متمایز از پرگنهٔ تیپ وحشی ایجاد شدند (شکل ۱).

1 - Vegetative self-incompatibility



شکل ۱- رشد نامنظم قطاعها از کلنی بسیار کوچک تیپ وحشی قارچ

میانگین تعداد سکتورهای تولید شده روی چهار محیط کلرات دار MAC, PDC, MMC وCMC به ترتیب ۲/۷۵، ۵، ۰/۴و ۰/۲ بود. بنابراین محیط CMC وMAC به دلیل نداشتن کارائی مطلوب و عدم تولید سکتورهای مشخص مقاوم به کلرات در ادامه آزمایش کنار گذاشته شدند. بیشترین تعداد سکتور ۶ عدد در محیطPDC بدست آمد. اکثر سکتورهای ایجاد شده قادر به مصرف نیترات نبوده و روی محیط حداقل رشد سریع و بدون سیلیوم هوائی داشتند. به عبارت دیگر بیش از ۹۵٪ سکتورهای ایجاد شده، جهش یافته نیت بودند.فراوانی تولید سکتور در محیط کلرات و نسبت فنوتیپهای جهش‌یافتگان نیت، در بین ۴۰ جدایه متفاوت بود.از نظر مورفولوژی پرگنه، رنگ میسلیوم، حاشیه سکتور سریع الرشد و تعداد سکتور تولید شده از هر پرگنهٔ تیپ وحشی تنوع زیادی مشاهده شد.

۲- کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیت

با توجه به نحوه رشد پر گنهٔ جهش یافتگان نیت روی محیط های دارای یکی از پنج منبع نیتروژن (نیترات سدیم، نیتریت سدیم، هیپوزانین، تارتارات آمونیم و اسید اوریک) بر اساس جدول ۱، سه کلاس فنوتیپی nit1، nit3 و NitM مشخص گردید.

اکثر جهش یافتگان نیت، nit1 بوده (۴۹/۹درصد) و همچنین تعداد این جهش یافتگان روی محیطPDC بیشتر از محیط MMC بوده NitM وnit3 به ترتیب ۳۰/۳ و ۱۵/۹ درصد جهش یافتگان را به خود اختصاص دادند. بیشترین فراوانی nit3 روی محیط MMC بود. در مجموع فراوانی NitM کمتر از دو فنوتیپ دیگر بود.

حدود ۴ درصد سکتورهای ایجاد شده مقاوم به کلرات بوده ولی قادر به مصرف نیترات نیز بودند (جهش یافتگانcrn). به دلیل اینکه این جهش یافتگان روی محیط حداقل رشد تیپ وحشی دارند (برخلاف جهش یافتگان نیت) از گروه جهش یافتگان nit قابل تمیز بوده و برای اجتناب از اشتباه حذف گردیدند.

جدول ۱ – تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیت روی پنج محیط نیتروژن دار مختلف (Correll et. al. 1987)

کلاس فنوتیپی	نوع رشد روی منابع مختلف نیتروژن				
	نیترات‌سدیم	نیتریت سدیم	تارتارات آمونیوم	اسید اوریک	هیپوزانتین
تیپ وحشی	+	+	+	+	+
nit1	–	+	+	+	+
nit 2	–	–	+	+	+
nitM	–	–	+	–	+

+ = رشد تیپ وحشی روی محیط مربوطه

– = رشد نازک بدون میسلیوم هوایی روی محیط مربوطه

۳ - مکمل سازی و تعیین گروههای سازگاری رویشی

نتایج حاصل از آزمون مکمل سازی نشان داد که جز در موارد بسیار نادر پدیده خود ناسازگاری رویشی مشاهده نشد. پرگنه‌ها با رشدی ظریف به سمت یکدیگر رشد کرده و به هم نزدیک شده ودر محل تماس پس از ایجاد آناستوموز بین دو جهش یافته سازگار اکسوتروف،هتروکاریون ایجاد و در حقیقت این دو فرد اکسوتروف تبدیل به یک فرد پروتوتروف شده و رشد تیپ وحشی قارچ را از خود نشان داده و نهایتا خطی از رشد متراکم قارچ در محل تماس ایجاد شد (شکل ۲و ۳). در مواردی که این پدیده مشاهده نشد، آزمون مکمل سازی با سایر فنوتیپ‌های همان جدایه ها انجام شد تا از عدم وجود سازگاری رویشی اطمینان حاصل شود.هنگامی که در آزمون مکمل‌سازی، NitM یکی از دو عضو موتانت نیت بود، تشکیل هتروکاریون و رشد متراکم قارچ به سرعت انجام شد، در حالیکه در مقابله بین nit1 وnit3 این پدیده به کندی صورت گرفت و در برخی موارد سه تا چهار هفته طول کشید و همچنین هتروکاریونهای بدست آمده ضعیف تر از هتروکاریونهای بدست آمده در حد فاصل پرگنه‌هایNitM باnit1 یاnit3 بود. تمام جدایه‌هایی که با یکدیگر سازگاری رویشی داشتند در یک VCG قرار گرفتند (شکل ۳، نه جدایه های پژمردگی را که در یک VCG قرار گرفته اند نشان می دهد).

شکل ۲- تشکیل خطی از رشد متراکم قارچ در محل تماس دو جهش یافته نیت

شکل ۳- ۹ جدایه عامل پژمردگی سیب‌زمینی که در یک VCG قرار گرفتند

با مکمل سازی جهش یافتگان نیت حاصل از ۴۰ جدایه *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* در تمام حالات ممکن هر جدایه به یک VCG ربط داده شد. بدین ترتیب چهل جدایه موردآزمایش در ۸ گروه سازگاری رویشی به نامهای VCG_7 ,VCG_6, VCG_5, VCG_4, VCG_3, VCG_2, VCG_1 و VCG8 قرار گرفتند (جدول ۴).

بدلیل عدم وجود تستر[1] استاندارد گروههای سازگاری رویشی به روش معتبر بین المللی (۴) نامگذاری نشده اند. بنابراین اولین جدایه ای که می‌توانست قویترین و سریعترین واکنش تشکیل هتروکاریون و سازگاری رویشی را با دیگر اعضای آن VCG بدهد بعنوان تستر انتخاب شد و در مراحل بعدی از آن استفاده گردید. بر همین اساس NitM جدایه‌های ۱، ۱۸، ۱۵، ۲، ۷، ۳۰ و۳۴به‌ترتیب‌عنوان‌تستر گروههای هفتگانه VCG_1, VCG_2, VCG_3, VCG_4, VCG_5, VCG_6و VCG7 انتخاب شدند و در VCG5 که تک عضوی بود تستری در نظر گرفته نشد.

بنابراین به منظور ادامه آزمایش، فنوتیپ های nit1 یا nit3 جدایه‌های بعدی (که هنوز VCG آنها مشخص نشده بود) در مقابل تستر قرار گرفتند. با تشکیل هتروکاریون و رشد پروتوتروفیک بین تستر و موتانتهای nit1 و nit3 جدایه‌های دیگر، آنها به عنوان اعضای جدید گروههای هفتگانه شناخته شده ودر این گروهها قرار گرفتند. در صورت ناسازگاری رویشی بین یک تستر و فنوتیپ‌های nit3 و nit1 جدایه‌ها با تسترهای دیگر مقابله داده شدند و بدین ترتیب تمام جدایه‌ها در گروههای مختلف قرار گرفتند.

۱۵ جدایهٔ عامل پوسیدگی خشک فوزاریمی سیب زمنی در سه گروه مختلف به نامهای VCG6،VCG7 وVCG8 قرارگرفتند. ۲۰ جدایهٔ عامل پژمردگی سیب زمینی در چهار گروه مختلف به نامهای VCG1 ، VCG2، VCG3 و VCG4 قرار گرفتند. VCG 4 شامل ۷ جدایه است که علاوه بر سه جدایهٔ عامل پژمردگی ۴ جدایهٔ عامل پوسیدگی انتهائی ساقه را نیز شامل می شود.

۵ جدایهٔ عامل پوسیدگی انتهایی ساقهٔ سیب زمینی در دو گروه به نامهای VCG4 و VCG5 قرار گرفتند. VCG5 تنها دارای یک عضو متعلق به پوسیدگی انتهایی ساقهٔ سیب زمینی است (جدول ۴).

اگر چه این تعداد نمونه برای یک نتیجه گیری کلی در یک منطقه جغرافیائی به وسعت خراسان بسیار کم است، با این وجود تقریبا ارتباط بین بیماریزائی جدایه ها و VCG را نشان می دهد. به غیر از VCG4 تمام اعضای مربوط به یک VCG یک نوع بیماری را ایجاد می نماید. وجود سه جدایه پژمردگی و چهار جدایه پوسیدگی انتهای ساقه در کنار یکدیگر در VCG4 احتمال ارتباط و نزدیکی بین این جدایه‌ها را بیان می‌کند. به عبارت دیگر قبل از انجام آزمون بیماریزائی می توان این احتمال را داد که یک جدایه پژمردگی بتواند باعث بیماری پوسیدگی انتهائی ساقه شود و بالعکس . به نظر می رسد جدایه هائی که از لحاظ بیماریزائی با هم تفاوت داشته و در داخل یک VCG قرار گرفته اند، ممکن است در تعداد نسبتا کمی از ژنگاهها با هم تفاوت داشته باشند. از طرف دیگر با توجه به این مطلب که اعضای درون یکVCG دارای قرابت و نزدیکی ژنتیکی بیشتری نسبت به اعضای سایر گروهها هستند احتمال دارد که از یک

1 - Tester

جدول ۲- درصد فراوانی فنوتیپ‌ها روی محیط PDC،MMC

کلاس فنوتیپی	تعدادجهش	درصد جهش	محیط کشت حاوی کلرات پتاسیم			
			PDC		MMC	
			تعداد جهش	درصد جهش	تعدادجهش	درصد جهش
nit1	۴۴۶	۴۹/۹	۳۹۰	۷۸/۴	۵۶	۱۲/۶
nit2	۲۷۱	۳۰/۳	۶۵	۲۳/۹	۲۰۶	۷۶/۱
NitM	۱۴۲	۱۵/۹	۴۰	۲۱/۱	۱۱۲	۷۹
Crn	۳۴	۳/۹	۲۸	۸۲/۳	۶	۱۷/۷
کل	۸۹۳					

Minimal Medium with Chlorate =MMC Potato dextrose Agar with Cholorate =PDC

جدول ۳- مناطق جغرافیایی و شماره جدایه های مربوط به آنها

مناطق جغرافیایی	جدایه های مورد آزمایش
اسفراین	۳۳
بجنورد	۲۰و۲۸
تربت‌جام	۵،۶،۸،۹،۱۵،۱۶،۲۳،۲۴،۲۵،۲۶،۳۶
تربت حیدریه	۳۷
جلگه‌رخ	۱۳،۱۴،۱۰،۲،۱۰،۱۱،۱۲
چناران	۱۸،۱۹،۳۴، ۱۷
قوچان	۴،۷،۲۱،۲۲،۳۲، ۳
کاشمر	۳۵
کوهسرخ	۳۹
گناباد	۲۹
مشهد	۲۸،۳۱،۴۰
نیشابور	۳۰،۳۸

کلون منشاء گرفته باشند. وجود تفاوت در نوع علایم بیماری بین اعضا می تواند به علت وقوع جهش در لوکوس یا لوکوسهای مربوط به بیماریزائی باشد.

احتمال ایجاد افراد نوترکیب از راه کراسینگ اور دلیل دیگر اینگونه جهش‌هاست و این جهش (یا جهش‌ها) باعث قطع ارتباط بین لوکوسهای مسؤول بیماریزائی و لوکوسهای مربوط به سازگاری رویشی می‌گردد. البته قبل از اینکه پدیده سازگاری رویشی بتواند بعنوان یک ابزار، جدایه های عامل دو بیماری پژمردگی و پوسیدگی انتهایی ساقه را از هم تمیز دهد، نیاز به اطلاعات بیشتری در مورد ارتباط بین VCG و جدایه‌ها است.

جدول ۴- گروههای سازگاری رویشی (VCG) ۴۰ جدایه *Fusarium oxysporum*.f.sp.*tuberosi* مربوط به سه مرحله مختلف بیماری در سیب زمینی در استان خراسان

VCG	پژمردگی	پوسیدگی انتهایی ساقه	پوسیدگی خشک
VCG1	۱، ۱۹، ۱۷، ۱۳، ۴، ۱۵، ۱۱، ۱۰، ۷		
VCG2	۱۸، ۹، ۱۶		
VCG3	۱۵، ۱۲، ۸، ۶، ۳		
VCG4	۲، ۱۴، ۲۰	۲۲، ۲۳، ۳۴، ۲۵	
VCG5		۲۱	
VCG6			۲۷، ۳۲، ۲۹، ۳۶، ۳۱
VCG7			۳۰، ۳۵، ۲۸، ۴۰، ۳۹، ۲۶، ۳۳
VCG8			۳۴، ۳۷، ۳۸

گروههای VCG_6، VCG_7 و VCG_8 فقط شامل جدایه‌های پوسیدگی خشک می‌باشد. این موضوع می‌رساند که ممکن است جدایه‌های پوسیدگی خشک فوزاریمی نسبت به گروههای پژمردگی و پوسیدگی انتهای ساقه گروه مشخص‌تری باشند.

از آنجا که جدایه‌های مربوط به نقاط مختلف استان خراسان در گروههای مختلف قرار گرفته و ارتباطی بین پراکنش جغرافیائی جدایه‌ها و سازگاری رویشی وجود نداشت، به نظر می‌رسد که عامل بیماری به نقاط مختلف استان منتقل شده باشدواین‌انتقال‌می‌تواند از طریق غده‌های آلوده، ادوات کشاورزی آلوده و یا انتشار اسپورها توسط باد و باران صورت پذیرد.

سپاسگزاری

لازم می‌دانیم مراتب سپاس خود را از راهنماییهای عالمانهٔ استاد ارجمند آقای دکتر عزیزاله علیزاده استاد محترم دانشگاه تربیت مدرس و دکتر جیم کارل از دانشگاه آرکانزاس ابراز نماییم.

REFERENCES

1. Bosland, P.W. and P.H.Williams.1987.An evaluation of *fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility and geographic origin. Can.J.Bot. 65:2067-2073.
2. Correll. J.C., C.J.R.Klittich and J.F.Leslie.1987. Nitrate nonutilizing mutants *of fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. Phytopathology. 77: 1640-1646.
3. Gordone,T.R. and D.okamoto.1990.Vegetative compatibnility grouping in a local population of *fusarium oxysporum*. Can.J.Bot. 69: 168-172
4. H. Katan, and Diprimo, P. 1999. Current status of vegetative. 1999. compatibility Groups in *Fusarium Oxysporum*: Supplement(1999). Phytoparasitica 27: 4.
5. Leslie,F.G. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annu. Rev. Phytopathology, 31: 127-150.
6. Puhalla,J.E. 1985. Classification of strains of *fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Can.J.Bot. 63:179-183.
7. Venter,S.L., D.J.Theron, P.J.Steyn, D.I.Ferriera, and A.Eicker. 1992. Relationships between , vegetative compatibility and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f.sp.*tuberosi* from potato.Phytopathology.82:858-862.

Determination of Vegetative Compatibility Groups (VCGs) of *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* in Khorasan Province

H. GHALE-DEZDANI[1], M. FALAHATI RASTEGAR[2], B. JAFARPOUR[3] AND M. M. ESKANDARI[4]

1, Academic Member, Agriculture Research Center, Baluchestan

2, 3, Professors, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad

4, Researcher, Agriculture Research Center of Khorasan

Accepted Oct. 30, 2002

SUMMARY

In this research 40 isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi,* the causal agent of three important diseases of potato in field or storage namely, Fusarium dry rot, Wilt and Stem end-rot were used for determination of Vegetative Compatibility Groups (VCG). At first nit mutants were generated on chlorate media and then nit mutants were assigned to different phenotypic classes on the basis of their growth on media containing one of the five different nitrogen sources (NaNO3, NaNO2, Hypoxanthine, Ammonium nitrate and Uric acid). 49.9% of nit mutants were classified to nit1, 30.3% to nit3 and 15.9% to NitM phenotypic classes. For complementation tests and determining VCGs , all NitM mutants of every isolate were paired with nit1 or nit3 mutants of other isolates. Generating of dense aerial growth in touch place of colonies after 7 to 14 days shows vegetative compatibility. On this basis eight VCGs were determined as VCG1, VCG2, VCG3, VCG4, VCG5, VCG6, VCG7 and VCG8. VCG1, VCG2 and VCG3 belonged to wilt isolates. VCG4 contains isolates that belonged to wilt and stem end rot. VCG5 having just one isolate that belonged to Stem end rot. VCG6, VCG7 and VCG8 contained fusarium dry rot isolates. Results show the possibility of some genetical homology between wilt and stem end rot isolates. There was not any relationship found between geographical distribution and VCGs.

Key words: Vegetative compatibility groups (VCG), *Fusarium oxysporum f. sp. tuberosi*.