



## Investigation of ITS-rDNA polymorphisms in *Fusarium* of *Elegans* and *Martiella-Ventricosum* sections related to Cucurbits using RFLP marker in Tehran province

Khazae FA<sup>a</sup>, Darvishnia M<sup>b\*</sup>, Bazgir E<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Fkhazaii63@gmail.com

<sup>b\*</sup> Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Darvishnia.m@lu.ac.ir

<sup>c</sup> Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran. bazgir.ei@lu.ac.ir

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Forood Ali Khazae, Mostafa Darvishnia, Eidi Bazgir. Investigation of ITS-rDNA polymorphisms in *Fusarium* of *Elegans* and *Martiella-Ventricosum* sections related to Cucurbits using RFLP marker in Tehran province. *Journal of Cell and Tissue*. 2022;13(3):187-199.

doi <https://10.52547/JCT/13.3.187>

### KEYWORDS

Cucurbit, *Fusarium*,  
*Elegans*, *Martiella*-  
*Ventricosum*, rDNA-ITS-  
RFLP

### ABSTRACT

**Aim:** The aim of this study was to collect and identify *Fusarium* of *Elegans* and *Martiella-Ventricosum* sections related to cucurbits plant in Tehran province and evaluation the efficiency of ITS-rDNA RFLP polymorphisms as a molecular marker in assessment of relationships between these *Fusaria*. **Materials and Methods:** During the cropping season, sampling from cucurbit field was done from the root, crown, stem up to height of 15 cm, as well as the soil (rhizosphere). Fungal isolates were cultured on PPA culture medium, purified by single sporulation method, and then identified based on morphological characteristics. Genomic DNA of fungi was extracted. The genomic DNA of *Fusarium* isolates was extracted and ITS-rDNA region was amplified with ITS1 and ITS4 primers. PCR products were digested with *SmaI*, *BglII* and *MboI* restriction enzymes and then loaded on 2.5% agarose gel. Data analyses were performed by NTSYS-PC V2.02 software. At first, a data matrix of the presence (1) or absence (0) of each band was drawn for each isolate. Then using the SM similarity coefficient, the genetic distance matrix was produced and the similarity dendrogram of isolates

\* Corresponding author. Tel.: +98-6633431917; Fax: +98-6633431917

E-mail address: Darvishnia.m@lu.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/13.3.187>

Received: December 21, 2021; Received in revised form: July 9, 2022; Accepted: August 20, 2022

Original Article



was drawn based on the SAHN coefficient and the UPGMA method. **Results:** A total of 95 *Fusarium* isolates belonging to species of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* were identified. Of which, 45 isolates belonging to *F. solani* and 50 isolates were identified as *F. oxysporum*. In this research, based on morphological characteristics, *F. redolens* isolates were not differentiated from *F. oxysporum* isolates and both were placed under *F. oxysporum* group. PCR reproduction of ITS region result in fragments in size of  $550\pm 25$  bp in *F. oxysporum* isolates, and  $575\pm 25$  bp in *F. solani* isolates. *Bgl II* enzyme had no cleavage site in ITS products in both species, neither in *F. solani* nor in *F. oxysporum*. *SmaI* enzyme had one cleavage site in *F. solani* isolates and produced two fragments (350bp and 230bp) but had no cleavage site in *F. oxysporum* isolates. The *MboI* enzyme in some *F. oxysporum* isolates produced four fragments (180bp, 160bp, 130 bp and 90 bp), so these isolates called as *Fusarium redolens*. *MboI* enzyme in others *Fusarium oxysporum* isolates produced two bands (320 bp and 190 bp). *MboI* enzyme had no restriction site in *F. solani* isolates. **Conclusion:** It seems that the use of rDNA-ITS RFLP marker is a suitable method to differentiate *Fusarium* species belonging to section *Elegance* from those of *Martiella-Ventricosum* sections. It is more efficient method for studying diversity within and between species in section *Elegans*.



## بررسی چند شکلی ناحیه ITS-rDNA فوزاریوم بخش‌های *Martiella*- و *Elegans* و *Ventricosum* مرتبط با کدوئیان با استفاده از مارکر RFLP در استان تهران

فروغعلی خزایی<sup>۱</sup>، مصطفی درویش‌نیا<sup>۲\*</sup>، عیدی بازگیر<sup>۳</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. Fkhazaii63@gmail.com  
 ۲- استاد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. darvishnia.m@lu.ac.ir  
 ۳- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. bazgir.ei@lu.ac.ir

چکیده	واژگان کلیدی
<p><b>هدف:</b> هدف از این تحقیق جمع‌آوری و شناسایی فوزاریوم‌های مرتبط با گیاهان تیره کدوئیان در مناطق کشت این محصولات در استان تهران و ارزیابی چندشکلی ITS-rDNA RFLP به عنوان یک نشانگر مولکولی در بررسی روابط خویشاوندی این گروه از فوزاریوم‌ها می‌باشد. <b>مواد و روش‌ها:</b> در طول فصل زراعی از مناطق عمده‌ی کشت محصولات جالیزی استان تهران، از محل ریشه، طوقه، ساقه تا ارتفاع ۱۵ سانتی‌متری و همچنین خاک اطراف گیاه (ریزوسفر)، نمونه‌برداری‌ها به عمل آمد. جدایه‌های قارچی بر روی محیط کشت PPA کشت، و به روش تک اسپور کردن خالص سازی شده و سپس بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی شناسایی شدند. DNA ژنومی قارچ‌ها استخراج شد. ناحیه ژنومی rDNA ITS جدایه‌های فوزاریوم با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4، تکثیر شد. محصولات PCR با استفاده از آنزیم‌های <i>Sma</i> I، <i>Bgl</i> II و <i>Mbo</i> I مورد هضم قرار گرفتند و سپس بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد بارگذاری شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-PC V2.02 انجام شد. بدین نحو که ابتدا یک ماتریکس داده از وجود (۱) یا عدم وجود (۰) هر باند برای هر جدایه ترسیم شد. سپس با استفاده از ضریب شباهت SM، ماتریکس فاصله ژنتیکی تولید و بر اساس مقیاس SAHN و روش UPGMA دندوگرام شباهت جدایه‌ها ترسیم شد. <b>نتایج:</b> در مجموع تعداد ۹۵ جدایه فوزاریوم متعلق به گونه‌های <i>Fusarium solani</i> و <i>F. oxysporum</i> شناسایی شد که از این تعداد، ۴۵ جدایه متعلق به <i>F. solani</i> و ۵۰ جدایه به عنوان <i>F. oxysporum</i> تشخیص داده شد. از</p>	<p>Fusarium, Elegans, Martiella-Ventricosum, rDNA-ITS-RFLP آنزیم برشی، کدوئیان</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۴</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۴/۵</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۲</p>

تکثیر ناحیه بین ITS1 و ITS4 در جدایه‌های *F. oxysporum* یک ناحیه‌ی  $25 \pm 550$  bp و در جدایه‌های *F. solani*، ناحیه‌ای به اندازه‌ی  $25 \pm 575$  bp به دست آمد. آنزیم *Bgl* II فاقد جایگاه برشی در ناحیه‌ی ITS بود. آنزیم *Sma* I در گونه‌های *F. oxysporum* بدون جایگاه برشی، ولی در گونه‌های *F. solani* دارای یک جایگاه برشی بود و دو قطعه‌ی  $350$  و  $230$  جفت بازی تولید شد. آنزیم *Mbo* I در برخی جدایه‌های تشخیص داده شده به نام *F. oxysporum* چهار باند ( $180$  bp،  $160$  bp،  $130$  bp و  $90$  bp) تولید کرد که این جدایه‌ها به عنوان *F. redolens* تشخیص داده شدند و در دیگر جدایه‌های *F. oxysporum* دو باند  $320$  bp و  $190$  bp تولید شد. آنزیم *Mbo* I در جدایه‌های *F. solani* به استثنای چند جدایه فاقد جایگاه برشی بود. نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد، استفاده از روش rDNA-RFLP با استفاده از آنزیم‌های برشی *Sma* I و *Mbo* I می‌تواند روش مناسبی برای تفکیک گونه‌های فوزاریوم متعلق به دو بخش *Elegans* و *Martiella-Ventricosum* از همدیگر و همچنین بررسی تنوع داخلی یا بین گونه‌ای در بخش *Elegans* باشد.

## ۱- مقدمه

گیاهان خانواده کدوبیان (Cucurbitaceae) یا گیاهان جالیزی، یکی از مهمترین گروه‌های گیاهی هستند که در ایران و به خصوص استان تهران کشت می‌شوند. از مهمترین گونه‌های اقتصادی این خانواده می‌توان به هندوانه (*Citrullus lunatus* L.) خیار (*Cucumis sativus* L.)، طالبی (*C. melo* var. *cantalupenses*) و خربزه (*C. melo* var. *inodorus*) اشاره کرد. استان تهران با دارا بودن بیش از  $5000$  هکتار زمین زیر کشت جالیز، یکی از استان‌های مهم در تولید این محصولات می‌باشد (۱). گونه‌های مختلف فوزاریوم مهمترین عوامل بیماریزای خاکزاد و همچنین بذرزاد هستند که باعث پوسیدگی‌ها و پژمردگی‌ها در بیش از  $80$  گونه گیاهی و از جمله کدوبیان می‌شوند (۲). از مهمترین این عوامل بیماری‌زا می‌توان به *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (بیمارگر گروه ملون‌ها) و *F. proliferatum* و *F. solani* f.sp. *cucurbitae* (عامل پوسیدگی طوقه و ریشه‌ی ملون‌ها، کدو خورشتی، کدو حلواپی و میوه‌ی کدو حلواپی) اشاره کرد (۳، ۴).

Wollenweber و Reinking در سال ۱۹۳۵ گونه‌های فوزاریوم موجود را در شانزده بخش قرار دادند. در این تقسیم‌بندی، بخش *Elegans* شامل گونه‌های *F. oxysporum* و *F. redolens* و بخش *Martierella* شامل تک گونه‌ی *F. solani* بود. بعداً Snyder و Hansen (۱۹۴۱)، همه‌ی گونه‌ها، نژادها و فرم مخصوص‌ها را از بخش‌های *Martiella* و *Ventricosum* به *F. solani* منتقل کردند و این چیدمان به طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفت (۵).

تشخیص ساختار جمعیتی قارچ‌های بیمارگر در جهت دانستن زیست‌شناسی موجود و توسعه راهکارهای کنترل بیماری (۶) و همچنین مطالعات مولکولی بین افراد که جزیی از این ساختار جمعیتی می‌باشند بسیار مهم است (۷).

گروه مرکب *F. solani* دارای دامنه میزبانی گسترده و تنوع بالایی در بیماری‌زایی و ریخت‌شناسی است (۸). هر چند که سیستم رده‌بندی بر مبنای ریخت‌شناسی تنها، ابزار دقیقی در جهت شناسایی گروه *F. solani* و یا فهم روابط بین جدایه‌های این گروه

را فراهم نمی‌کند. لذا داشتن یک دستاورد مولکولی در جهت نیل به این هدف، می‌تواند امیدوارکننده باشد (۹، ۱۰). وجود تنوع زیاد در گونه‌ها، خصوصاً در شرایط محیطی مختلف، دانشمندان علم رده‌بندی را بر آن داشته است تا ویژگی‌های خاص دارای اهمیت را در رده‌بندی گونه‌ها مورد توجه قرار دهند. به‌همین دلیل، روش‌ها و کلیدهای مختلفی برای شناسایی گونه‌ها ارائه شده‌است (۵). شناسایی گونه‌های فوزاریوم عمدتاً بر اساس ویژگی‌های متمایز کننده‌ی شکل و اندازه‌ی ماکرو و میکروکنیدی‌ها، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور و همچنین خصوصیات ظاهری پرگنه‌ها، رنگدانه‌ها و سرعت رشد بر روی محیط‌های کشت آگار بنا شده است (۵). از میان روش‌هایی که توسط محققین در جهت تجزیه و تحلیل‌های تبارشناسی گونه‌های *F. solani* استفاده می‌شود، می‌توان به مواردی مانند ناحیه‌های بین ژنی در DNA ریبوزومی (rDNA-IGS)، ناحیه‌های نسخه‌برداری شده میان ژنی (rDNA-ITS)، ژن زیر واحد بزرگ RNA (LSU) و فاکتور آلفای طویل‌شدن ترجمه ( $\text{tef-}\alpha$ ) اشاره کرد (۱۱).

واحدهای تکرار شونده‌ی DNA ریبوزومی (rDNA) شامل توالی‌های ژنی و غیر ژنی یا فاصله‌ها می‌باشند. هر واحد تکراری شامل یک کپی از ژنهای 18S, 5.8S, 28S و دو فاصله، یعنی فاصله‌ی بین نواحی نسخه‌برداری شونده (ITS1 و ITS2) (Internal Transcribed Spacer) و فاصله‌ی بین دو ژن (Intergenic spacer) (IGS) می‌باشد. ژن‌های rDNA به‌دلیل اینکه از حفاظت شدگی خیلی بالایی برخوردار هستند، در جهت مطالعات تکاملی در سطوح بالا مورد استفاده قرار می‌گیرند. در حالی که فاصله‌های بین نواحی نسخه‌برداری شده (ITS1 و ITS2) بسیار متغیر هستند و لذا در بررسی‌ها جهت مطالعه روابط خویشاوندی در سطح گونه از آنها استفاده می‌شود. بنابراین به‌دلیل سودمندی ناحیه ITS در علم سیستماتیک و تاکسونومی، در رده‌بندی دیگر گونه‌های قارچی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲، ۱۳). ناحیه rDNA-ITS احتمالاً بیشترین ناحیه‌ای است که از DNA قارچ‌ها، توالی‌بایی شده‌است. نواحی rDNA-ITS و rDNA-IGS بیشترین درجه‌ی تنوع را در مقایسه با دیگر نواحی ژنومی مانند LSU و SSU از خود نشان داده‌اند (۱۴). آغازگرهای مختلفی از جمله آغازگرهای ITS1 و ITS4 جهت مطالعه این قارچ‌ها استفاده شده‌اند (۱۵). برای بررسی میزان شباهت ژنومی بین گونه‌های فوزاریوم، ناحیه‌ی ITS تکثیر شده با استفاده از آنزیم‌های برشی متعددی مورد برش (هضم) قرار می‌گیرند. از جمله‌ی آنزیم‌هایی که کاربرد بیشتر در مطالعات ژنتیکی قارچ‌ها دارند می‌توان به *Pst*III, *Sma*I, *Hinf*I, *Sph*I, *Hae*III, *Bgl*II, *Hind*III, *Msp*I, *Mob*I, *Sac*I, *Sal*II, *Hinc*I, *Xho*I, *Eco*R را اشاره کرد (۱۶، ۱۷، ۱۱). در این پژوهش نیز از سه آنزیم برشی *Sma* I, *Bgl* II و *Mbo* I جهت هضم توالی‌های ITS استفاده شد. پژوهش حاضر با هدف جمع‌آوری و شناسایی فوزاریوم‌های مرتبط با گیاهان تیره کدوئیان در مناطق کشت این محصولات در استان تهران و همچنین ارزیابی کارایی ناحیه‌ی ژنومی ITS به‌عنوان یک نشانگر مولکولی در بررسی روابط خویشاوندی این گروه از فوزاریوم‌ها، انجام گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری و جداسازی قارچ‌ها:** در طول فصل زراعی ۹۷-۱۳۹۶ از مناطق عمده‌ی کشت محصولات جالیزی استان تهران، نمونه‌برداری‌ها به‌عمل آمد. از ریشه، طوقه و ساقه تا ارتفاع ۱۵ سانتی‌متری و همچنین از خاک اطراف گیاه (ریزوسفر تا عمق ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متری و فاصله ۱۵ سانتی‌متری از گیاه)، به‌عنوان نمونه جمع‌آوری شد (جدول ۱).

تعداد جدایه	شماره جدایه	گیاه میزبان	منطقه/ بخش
۳	F 791, F 779, F 781	خریزه	پاکدشت
۱۳	F 670, F 654, F 72, F73, F 51, F 134, F 770, F 771, F 82, F 84, F 91, F 92, F 20	خیار گلخانه	پیشوا
۵	F 736, F 36, F 1002, F 1004, F 1006	خریزه	پیشوا
۲	F 800, F 805	هندوانه	پیشوا
۲۰	F 718, F 696, F 698, F 756, F 725, F 727, F 731, F 753, F 623, F 624, F 626, F 627, F 620, F 622, F 633, F 628, F 632, F 743, F 744, F 746	کدو خورشتی	پیشوا
۸	F 643, F 645, F 653, F 47, F 63, F 64, F 66, F 123	خیار گلخانه	جوادآباد
۲	F 180, F 183	خیار زمینی	جوادآباد
۱۲	F 710, F 708, F 175, F 176, F 177, F 178, F 174, F 184, F 185, F 186, F 188, F 234	خریزه	جوادآباد
۶	F 662, F 678, F 679, F 199, F689, F677	هندوانه	جوادآباد
۱۱	F 112, F 195, F 687, F 686, F 600, F 602, F 603, F 604, F 607, F 608, F611	طالبی	جوادآباد
۱	F189	خیار زمینی	دماوند
۲	F 615, F 852	کدو خورشتی	دماوند
۱	F 141	خیار زمینی	رباط کریم
۶	F 816, F 817, F 806, F 807, F 808, F 821	خیار گلخانه	رباط کریم
۲	F 829, F 832	خیار زمینی	ورامین
۱	FOM1	مرکز تحقیقات کشاورزی	ورامین
۹۵	مجموع جدایه‌ها		

جدول ۱: شماره‌ی جدایه‌ها، میزبان و محل جمع‌آوری آنها

از خاک‌های آماده شده به نسبت ۵۰ ml:۱g در آب مقطر استریل حاوی آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین ۵۰۰ ppm، در ارلن‌های با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر یک سوسپانسیون تهیه‌شد و سپس جهت آزاد شدن بهتر اجزای قارچی در سوسپانسیون حاصله، ارلن‌ها به مدت ۲ ساعت بر روی دستگاه شیکر با دور ۱۵۰ rpm قرار داده شدند. در مورد نمونه‌های ریشه و ساقه نیز، ابتدا آنها را به با چاقو یا اسکالپل به قطعات ریز چند میلی‌متری برش داده و سپس مانند مرحله بالا مقدار یک گرم از این قطعات به ۵۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد. مقدار یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون‌ها بر روی پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متری حاوی محیط کشت PPA (Peptone PCNB Agar) حاوی ۵۰۰ ppm آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin 500 mg) پخش شد.

پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $27 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و پس از این مدت در زیر میکروسکوپ تک کلونی‌های فوزاریوم با سوزن جداسازی شده و به یک محیط کشت جدید PPA انتقال داده شدند. خالص سازی جدایه‌های قارچی به روش تک اسپور کردن انجام شد.

**شناسایی قارچها:** جدایه‌های قارچی پس از خالص‌سازی بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی پرگنه (قطر، رنگ، بافت و رنگدانه‌ها و ...) و میکروسکوپی مانند تولید ماکرو و میکروکنیدیوم، نوع فیالیدها، شکل و تعداد سلول‌های ماکرو و میکروکنیدی، شکل، نحوه تشکیل و تعداد سلول‌های کلامیدوسپورها مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸،۵).

**استخراج DNA.** جدایه‌های فوزاریوم بر روی محیط کشت PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. بعد از گذشت ۱۰ روز، با اضافه کردن ۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به سطح محیط کشت و با کمک یک قاشقک، میسیلیوم‌ها به آرامی ساییده شده و در یک ویال ۲ میلی‌لیتر جمع‌آوری شدند. DNA ژنومی قارچ‌ها بر اساس روش گونزالس و همکاران (۲۰۱۰) استخراج شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس قسمت رویی (سوپرناتانت) دور ریخته شد و به قسمت ته‌نشین شده (پلت) مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر استخراج [SDS 3% w/v, SDS [EDTA 0.5 mM, NaCl 1 M, Tris-HCl 0.1 mM pH:8] داغ (۶۵ درجه سانتی‌گراد) اضافه شد و با عمل برگرداندن متناوب کاملاً یکنواخت شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم (۶۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند مجدداً با آرام برگرداندن متناوب (صد مرتبه) محتویات آنها مخلوط شده و سپس ۰/۴ میلی‌لیتر از مخلوط کلروفرم/فنول (۱:۱ v/v) به آنها اضافه شد. با عمل برگرداندن میکروتیوب‌ها مخلوط شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. محتویات ویال‌ها سه فاز شده که فاز رویی حاوی DNA می‌باشد. فاز رویی (۰/۸ میلی‌لیتر) به یک ویال جدید انتقال داده شد و ۰/۸ میلی‌لیتر پروپانول خنک در حد یخ به آن اضافه شد. پس از یکنواخت کردن محتویات میکروتیوب‌ها با عمل برگرداندن متناوب، به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. (به منظور رسوب بیشتر DNA، بهتر است قبل از انجام این سانتریفیوژ، ویال‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- میلی‌لیتر نگهداری شوند). پس از سانتریفیوژ، ایزوپروپانول رویی با دقت به آرامی کشیده شد و سپس ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به DNA رسوب شده در ته ویال‌ها اضافه شد و با عمل برگرداندن متناوب DNA رسوب شده کاملاً شسته شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی با دقت و با کج کردن آرام تیوب‌ها دور ریخته شد تا پلت DNA در ته تیوب باقی بماند. سپس در معرض هوا (حدود ۳۰ دقیقه) خشک شد. به پلت DNA کاملاً خشک شده ۵۰ میکرولیتر از بافر [0.122% w/v Tris-Base pH:8 10mM, %0.02 w/v EDTA TE 1mM] اضافه شد و اجازه داده شد تا DNA کاملاً در آن حل شده و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. از دستگاه اسپکتروفوتومتر جهت بررسی کیفیت و غلظت DNA ژنومی استفاده شد (۱۹).

**واکنش‌های PCR** جهت تکثیر ناحیه ژنومی ITS مربوط به گونه‌های فوزاریوم (یک قطعه DNA با طول تقریباً ۶۰۰ bp) از آغازگرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') استفاده شد (۵). تکثیرها در یک واکنش با حجم ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (2X)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۰/۵ μM)، ۲/۵ μL از DNA الگو و ۸ میکرولیتر آب مقطر مخصوص PCR انجام شد. ویال‌های حاوی مخلوط واکنش در دستگاه PCR (Bioer®) قرار داده شدند. مراحل واکنش PCR بدین نحو انجام شد: واسرشته‌سازی اول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ چرخه از سه مرحله‌ی واسرشته‌سازی دوم به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و بسط رشته‌ها به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۱۰ دقیقه در بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۱۶). جهت بررسی قطعات ژنومی تکثیری احتمالی، محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱ درصد حاوی DNA Safe Stain (Sinaclon™) (۱/۵ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر ژل) در دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت و مقاومت ۸۰ میلی‌آمپر به مدت ۶۰ دقیقه بارگذاری شد. سپس جهت آشکارسازی باندها، ژل‌ها بر روی دستگاه ژل داکيومنت با نور UV و شدت نور ۳۲۰ قرار داده شدند.

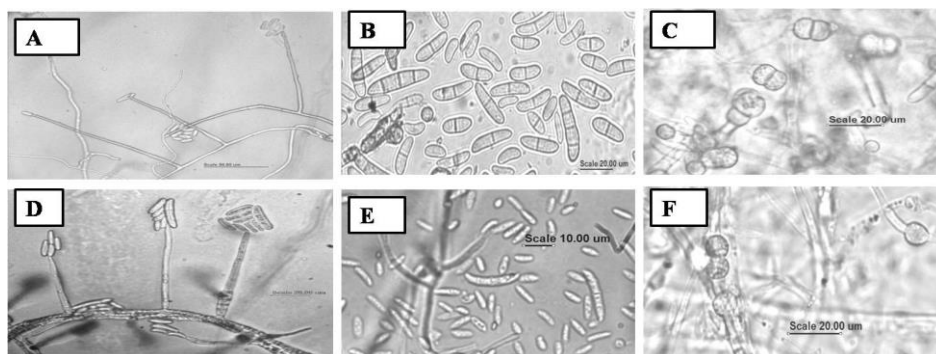
**مخلوط واکنش هضم آنزیمی:** مقدار ۱۲ تا ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از ۱۰-۵ واحد آنزیمی از آنزیم‌های *Sma* I، *Bgl* II و *Mbo* I به همراه ۵ میکرولیتر از بافر عمومی همراه آنزیم، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Jena Bioscience) مورد هضم قرار گرفتند. در پایان، این محصولات بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد حاوی ماده‌ی رنگ‌آمیزی DNA Safe Stain، به مدت ۳۰ دقیقه در ۸۰ ولت و ۲۰۰ میلی‌آمپر بارگذاری شدند. قطعات برش خورده‌ی DNA به همراه خط‌کش 1Kb DNA در زیر نور UV 320 nm آشکارسازی شدند.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** جهت بررسی اندازه‌ی مولکولی قطعات تکثیر شده، با استفاده از نرم‌افزار Digimizer®، بر اساس منحنی استاندارد به دست آمده از حرکت هر باند در مقابل لگاریتم اندازه مولکولی آن باند از خط‌کش مولکولی 1Kb، طول قطعات ژنی تکثیر شده، محاسبه شد. قطعاتی که بر روی ژل آگارز، فاصله یکسانی را طی کرده بودند به عنوان یک باند مشترک در نظر گرفته شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-PC V2.02 انجام شد. بدین نحو که ابتدا یک ماتریکس داده از وجود (۱) یا عدم وجود (۰) هر باند برای هر جدایه ترسیم شد. سپس با استفاده از ضریب شباهت SM، ماتریکس فاصله ژنتیکی تولید و بر اساس مقیاس SAHN و روش UPGMA دندوگرام شباهت جدایه‌ها ترسیم شد.

### ۳- نتایج

#### جمع‌آوری و شناسایی مورفولوژیک قارچ‌ها

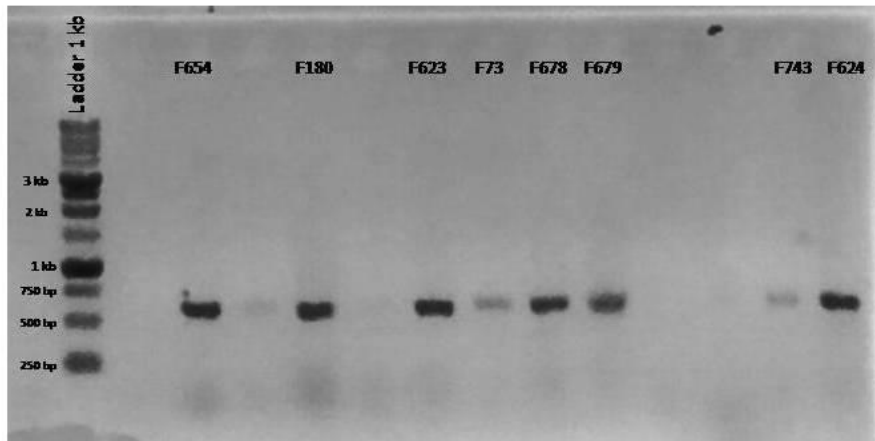
در مجموع تعداد ۹۵ جدایه فوزاریوم متعلق به گونه‌های *Fusarium solani* و *F. oxysporum* شناسایی شد که از این تعداد، ۴۵ جدایه متعلق به *F. solani* و ۵۰ جدایه به عنوان *F. oxysporum* تشخیص داده شد (شکل ۱).



شکل ۱: خصوصیات ظاهری *Fusarium solani*: ردیف بالا A- کنیدیوفور، B- ماکروکنیدیوم و میکروکنیدیوم، C- کلامیدوسپور. *Fusarium oxysporum*: ردیف پایین D- کنیدیوفور، E- ماکروکنیدیوم و میکروکنیدیوم، F- کلامیدوسپور.

## واکنش‌های PCR

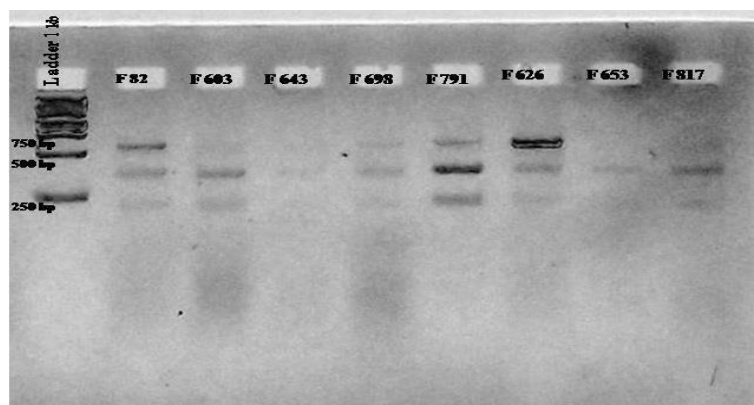
تکثیر ناحیه بین ITS1 و ITS4 در جدایه‌های *F. oxysporum* یک ناحیه‌ی  $25 \pm 550$  bp را تولید کرد و در جدایه‌های *F. solani*، ناحیه‌ای به اندازه‌ی  $25 \pm 575$  bp تکثیر شد (شکل ۲).



شکل ۲: باندهای تکثیرشده از ناحیه‌ی ITS (ITS1, 5.8S, ITS2) در جدایه‌های فوزاریوم. (*Fusarium oxysporum* (F654, F180) و *Fusarium solani* (F623, F73, F678, F679, F743, F624))

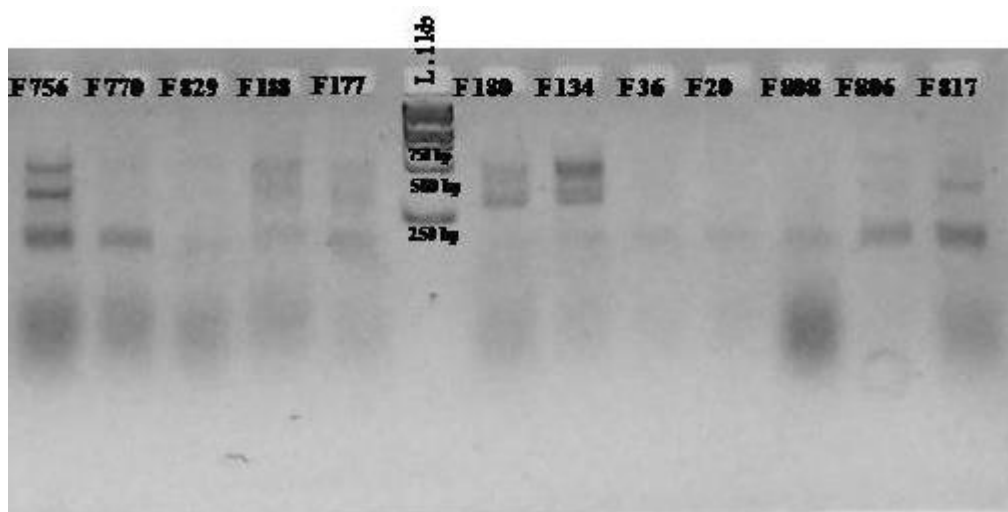
## هضم آنزیمی و تجزیه و تحلیل‌های باندهای RFLP

پس از تکثیر ناحیه‌ی ITS، این محصول PCR توسط آنزیم‌های *Sma* I، *Bgl* II، و *Mbo* I مورد هضم قرار گرفت. آنزیم *Bgl* II هیچ‌گونه برشی در محصول PCR انجام نداد که نشان می‌دهد این آنزیم فاقد جایگاه برشی در ناحیه‌ی ITS این دو گونه‌ی فوزاریوم می‌باشد. آنزیم *Sma* I در گونه‌ی *F. oxysporum* فاقد جایگاه برشی بود. ولی در گونه‌های *F. solani* ایجاد دو قطعه‌ی ۳۵۰ و ۲۳۰ جفت بازی کرد (شکل ۳).



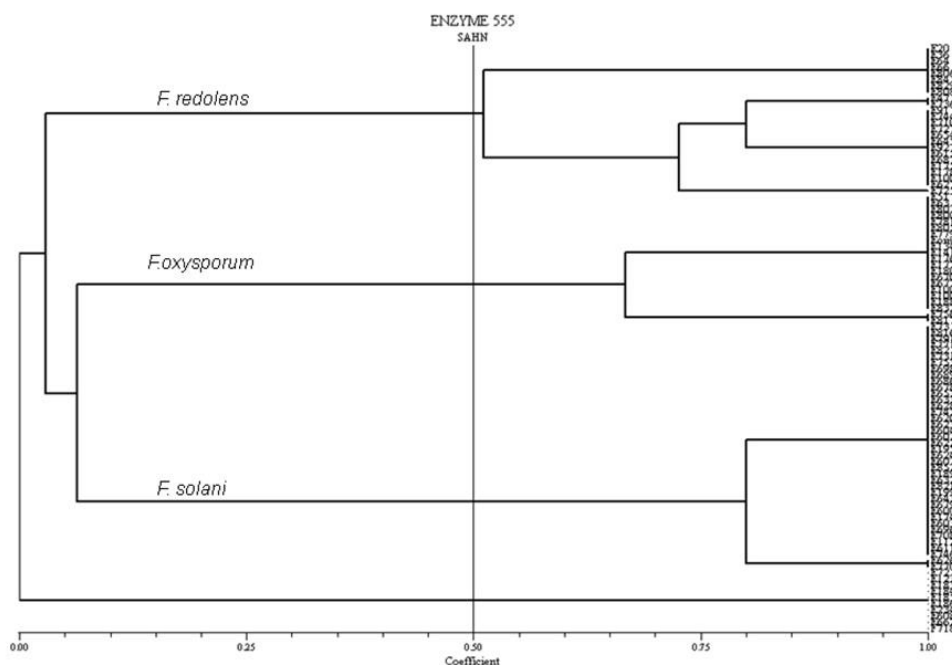
شکل ۳: الگوی قطعات هضم‌شده از ناحیه‌ی ITS توسط آنزیم *Sma* I در برخی جدایه‌های *Fusarium solani*

آنزیم *Mbo* I در جدایه‌های *F. solani* به‌استثنای چند جدایه فاقد جایگاه برشی بود. این آنزیم در برخی جدایه‌های *F. oxysporum* چهار باند به اندازه‌های ۱۸۰، ۱۶۰، ۱۳۰ و ۹۰ جفت باز، و در دیگر جدایه‌ها دو قطعه‌ی ۳۲۰ و ۱۹۰ جفت بازی تولید کرد. احتمالاً باندهایی با اندازه کوچکتری نیز تولید می‌شوند که در این آزمایش‌ها رویت نشدند (شکل ۴).



شکل شماره ۴: الگوی قطعات هضم‌شده از ناحیه‌ی ITS توسط آنزیم *Mbo* I (*Fusarium oxysporum* (F756, F188, F177, F134, F180), *Mbo* I توسط آنزیم *F. solani* (F817), *F. redolens* (F770, F829, F36, F20, F808, F806)

رسم درخت‌واره تشابه جدایه‌های فوزاریوم بر اساس نتایج هضم آنزیمی نشان‌داد. جدایه‌های *F. redolens* در گروهی جدا از *F. oxysporum* قرار گرفتند که این نتایج با نتایج برخی محققین مطابقت داشت (شکل ۵)



شکل ۵: دندوگرام شباهت بین جدایه‌های فوزاریوم، حاصل از قطعات برش خورده‌ی آنزیمی از ناحیه ITS ریبوزومی، بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه SM.

### ۳- بحث

با توجه به اینکه بخش *Elegans* شامل دو گونه‌ی *F. oxysporum* و *F. redolens* و بخش‌های *Martiella-Ventricosum*

شامل تک جنس *F. solani* می‌باشد (۲۰)، لذا مراحل ریخت‌شناسی و استفاده از نشانگرهای مولکولی بر روی تفکیک و تمایز این گونه‌ها از همدیگر استوار شد. شناسایی جدایه‌ها بر اساس صفات ظاهری مانند رنگ پرگنه، داشتن سر دروغین، مونوفیالید بودن، نوع میکروکنیدیوم، شکل و تعداد سلول ماکروکنیدیوم و همچنین تشکیل کلامیدوسپور و شکل آن انجام شد. رنگ پرگنه‌ها در هر دو گونه عمدتاً سفید پنبه‌ای است و در گونه‌های سولانی گاهی به رنگ نخودی با تجمع قطرات ریز آب بر روی میسیلیوم‌ها که حاوی انبوهی از ماکروکنیدی و یا میکروکنیدی‌ها است، می‌باشد. پشت تشک‌های پتری در گونه‌ی سولانی عمدتاً زرد نخودی گاهی متمایل به قهوه‌ای می‌باشد. در گونه‌های اکسیسپوروم پشت تشک محیط کشت دارای تنوع رنگ از سفید، صورتی تا سیاه‌رنگ دیده می‌شود. در هر دو گونه برخی جدایه‌ها به صورت دایره‌های متحدالمرکز رشد می‌کنند.

در این بررسی‌ها شاید مهمترین وجه تمایز گونه‌ی سولانی و اکسیسپوروم از همدیگر، طول فیالیدها و شکل و اندازه‌ی میکروکنیدیوم‌ها بود. در گونه‌ی اکسیسپوروم، طول فیالید کوتاه‌تر بوده (۱۱) و ادغام میسیلیوم‌ها در همدیگر و تولید حالت بندکشی شدن بیشتر است. میکروکنیدیوم‌های گونه‌ی اکسیسپوروم نیز عمدتاً یک سلولی و تخم‌مرغی شکل است. میکروکنیدیوم در برخی گونه‌ی سولانی عمدتاً دو سلولی و در گروه دیگر نیز، یک سلولی بیضی یا تخم‌مرغی شکل ولی بسیار بزرگتر از میکروکنیدیوم‌های اکسیسپوروم است (۱۶). ماکروکنیدیوم‌ها در گونه‌ی اکسیسپوروم عمدتاً با ۳ دیواره سلولی و کمی خمیده و دارای سلول پاشنه کاملاً مشخص، ولی ماکروکنیدیوم‌ها در گونه‌ی سولانی صاف تا کمی خمیده با ۳-۴ دیواره - عرضی و پاشنه اسپور کاملاً واضح نیست.

کلامیدوسپورهای هر دو قارچ تقریباً مشابه هم، به صورت تکی، جفت سلول (عمدتاً) و زنجیر سه تایی دیده‌شد. به نظر می‌رسد تنها تفاوت جزئی بین آنها در این باشد که سطح کلامیدوسپورهای گونه‌ی سولانی کمی خاردار می‌باشد. در بررسی‌های ریخت‌شناسی گونه‌های *F. oxysporum* و گونه‌ی *F. redolens*، از همدیگر تمایز داده‌نشده‌اند. و این امر قابل پیش‌بینی بود. زیرا برخی محققین نیز در آزمایشات خود قادر به تفکیک این دو گونه از همدیگر نشده‌بودند (۱۷). در تکثیر ناحیه‌ی ITS ریبوزومی توالی‌هایی به طول حدود ۵۰۰-۶۳۰ bp تکثیر شد. با توجه به اینکه در گونه‌های *F. oxysporum* و همچنین برخی فرم مخصوص‌هایی از مجموعه‌ی *F. solani* مانند *F. s. f.sp. piperis* طول rDNA-ITS حدود ۵۵۰ bp است و مضافاً اینکه در مجموعه‌ی *F. solani* برخی گونه‌ها ۵۷۰ bp و برخی دیگر ۶۲۰ bp است، لذا تفکیک قطعی گونه‌های این دو بخش مهم و پیچیده از همدیگر بر اساس طول توالی ناحیه‌ی ITS ریبوزومی کار آسانی نخواهد بود (۸). در این آزمایشات نیز این موضوع کاملاً صدق می‌کرد و تنها جدیه‌های از *F. solani* که باند حدود ۶۰۰ bp تولید کردند به راحتی و با اطمینان از گونه‌های بخش *Elegans* قابل شناسایی بودند. این نتایج امکان وجود چندشکلی را در ناحیه‌ی rDNA-ITS در میان جدایه‌های مختلف این گونه‌ها، تقویت کرد که این موضوع در ادامه با هضم این توالی‌ها توسط آنزیم‌های برشی بررسی شد. با توجه به شباهت‌های بسیار نزدیک ظاهری و مولکولی گونه‌های *F. oxysporum* و *F. redolens* به همدیگر و عدم تفکیک آنها در مراحل قبل، تلاش شد، از آنزیم‌هایی که در تفکیک این دو گونه از همدیگر و همچنین این دو گونه از *F. solani* کارایی داشته باشند استفاده شود. آنزیم *Sma* I در جدایه‌های متعلق به بخش *Elegans* فاقد جایگاه برشی بود. در جدایه‌هایی که تحت نام *F. solani* شناسایی شده بودند داری یک جایگاه برشی بود که منجر به تولید دو قطعه‌ی حدود ۳۵۰ bp و ۲۳۰ bp شد. (به استثنای شش جدایه‌ی F123, F234, F602, F608, F662 که هیچ‌گونه بانندی مشاهده‌نشده‌اند). این آنزیم برشی در تفکیک این دو گروه قارچی از همدیگر کارایی مناسبی دارد. این نتایج با نتایج سایر محققان نیز مطابقت داشت (۱۶، ۱۱). به نظر می‌رسد، شش گونه‌ی ذکر شده در بالا جزو جدایه‌هایی از *F. solani* مانند *F. s. f.sp. piperis* باشند که از لحاظ ظاهری به *F. solani* شباهت دارند ولی از لحاظ الگوی rDNA-RFLP-ITS به *F. oxysporum* شبیه هستند.

با توجه به اینکه اطلاعاتی در مورد ایجاد چندشکلی در ناحیه‌ی rDNA-ITS توسط آنزیم *Bgl II* و در نهایت شناسایی فوزاریوم‌های بخش‌های *Elegans* و *Martiella* توسط نگارندگان یافت نشده بود، از آنزیم *Bgl II* به‌عنوان یک آنزیم جدید در این بررسی‌ها استفاده شد تا شاید نتایج احتمالی آن به حل این موضوع کمک کند. نتایج نشان داد که آنزیم *Bgl II* بر روی جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق از این دو بخش فوزاریوم، فاقد هر گونه جایگاه برشی است و هیچگونه باند تمایز کننده‌ای که در تقسیم بندی این گونه‌های فوزاریوم تعیین کننده باشد تولید نمی‌شود.

آنزیم *Mbo I* به دلیل توانایی تولید باندهایی با اندازه‌های مختلف، در تفکیک دو گونه‌ی *F. redolens* و *F. oxysporum* از همدیگر، کارایی خوبی از خود نشان داده بود (۱۷). نتایج حاصل از این تحقیق نیز این موضوع را تایید کرد. این آنزیم در برخی جدایه‌های *F. oxysporum* چهار باند به اندازه‌هایی حدود ۱۸۰ bp، ۱۶۰ bp، ۱۳۰ bp و ۹۰ bp تولید کرد که با نتایج Waalwijk و همکاران ۱۹۹۶ مشابهت داشت و این جدایه‌ها به‌عنوان *F. redolens* تشخیص داده شدند. در برخی دیگر از جدایه‌های شناسایی شده به نام *F. oxysporum* نیز دو باند ۳۲۰ bp و ۱۹۰ bp تولید شد که این گروه به‌عنوان *F. oxysporum* تشخیص داده شدند. در هر دو گروه احتمالاً باندهایی با اندازه‌های کوچکتر نیز تولید می‌شوند که در این آزمایش‌ها رویت نشدند (۱۷).

در پنج جدایه (F183, F184, F185, F186 و F72) که از لحاظ ریخت‌شناسی به‌عنوان *F. oxysporum* تشخیص داده شده بودند هیچ گونه چند شکلی مشاهده نشد. که علت این امر شاید شناسایی اشتباه برخی گونه‌های بسیار شبیه از گروه *F. solani* یا *F. subglutinans* به جای *F. oxysporum* باشد (۵).

در جدایه‌های تحت نام *F. solani* به استثنای پنج جدایه F626, F770, F725, F756 و F817 آنزیم *Mbo I* فاقد جایگاه برشی بود و هیچگونه چندشکلی مشاهده نشد. در جدایه‌های F756 و F817 مانند جدایه‌های *F. oxysporum* دو باند ۳۲۰ bp و ۱۹۰ bp و در جدایه F725 سه باند ۱۸۰ bp، ۱۶۰ bp و ۱۳۰ bp و در دو جدایه‌ی F626 و F770 یک تک باند ۱۸۰ bp مشاهده شد.

با توجه به شباهت بسیار زیاد برخی ویژگی‌های *F. redolens* و *F. solani* خصوصاً در ماکروکنیدی، و یا وجود گونه‌ها بینابینی در میان *F. oxysporum* و *F. redolens* حصول این نتایج دور از انتظار نبود (۵).

در این تحقیق جدایه‌های متعلق به بخش *Elegans* تنوع داخل گونه‌ای بیشتری نسبت به جدایه‌های متعلق به بخش *Martiella* از خود نشان دادند. جدایه‌های *F. redolens* در گروهی جدا از *F. oxysporum* قرار گرفتند که این نتایج با نتایج برخی محققین مطابقت دارد (۱۷).

#### ۴- نتیجه‌گیری

در پایان، به نظر می‌رسد که استفاده از روش rDNA-RFLP با استفاده از آنزیم‌های برشی *Sma I* و *Mbo I* می‌تواند روش مناسبی برای تفکیک گونه‌های فوزاریوم متعلق به دو بخش *Elegans* و *Martiella* از همدیگر و خصوصاً بررسی تنوع‌های داخل یا بین گونه‌ای در بخش *Elegans* باشد.

#### ۵- تشکر و قدردانی

از مسئولین آزمایشگاه بیماری‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، جهت همکاری صمیمانه‌اشان در انجام گرفتن برخی آزمایش‌ها و همچنین از جناب آقای مهندس داریوش شهریاری- مرکز تحقیقات کشاورزی ورامین- جهت دریافت جدایه Fom1 تشکر و قدردانی ویژه به عمل می‌آید.

#### ۶- منابع

1. Anonymous. Agricultural Statistics. Crop year. 1397-98. Ministry of agriculture, deputy of planning and economy. Volume 1 (Crops). 1399 (In Persian). 87 pp.

2. Avinash TS, Ravishankar RV. Biocontrol potentials of plant growth promoting *Rhizobacteria* against *Fusarium* wilt disease of cucurbit. *eSci Journal of Plant Pathology*. 2013,02 (03) : 155-161.
3. Namiki F, Shiomi T, Kayamura T, Tsuge T. Characterization of the formae speciales of *Fusarium oxysporum* causing wilts of cucurbits by DNA fingerprinting with nuclear repetitive DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994, 60: 2684-2691.
4. Pivonia S, Cohen R, Kafkafi U, Ben Ze'ev IS, et al. Sudden wilt of melons in southern Israel: fungal agents and relationship with plant development. *Plant Disease*. 1997, 81: 1264–1268.
5. Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium Laboratory Manual*. UK: Blackwell Publish Ltd. 2006, 388 pp.
6. Malvick DK, Percich JA. Genotypic and pathogenic diversity among pea-infecting isolates of *Aphanomyces euteiches* from the central and western United States. *Phytopathology*. 1998, 88: 915–921.
7. Leung H, Nelson RJ, Leach JE. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. In: Andrews, J.H., Tomm-erup, I.C. (Eds.), *Advances in Plant Pathology*. Academic Press, London. 1993; pp. 157–204.
8. Brasileiro BTRV, Coimbra MRM, De Morais Jr, MA, De Oliveria, NT. Genetic variability within *Fusarium solani* species as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004, 35, 205–210.
9. O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J. Clinical Microbiol.* 2008, 46: 2477–2490.
10. Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, et al. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006, 44: 2186–2190.
11. Lee YM, Choi YK, Min BR. PCR-RFLP and Sequence Analysis of rDNA ITS Region in the *Fusarium* spp. *The Journal of Microbiology*. 2000, 38(2): 66-73.
12. Bruns TD, White TJ, Taylor JW. Fungal molecular systematics. *Annual Review. Ecology and Systematic*. 1991; 22: 525-564.
13. Samuels GJ, Seifert KA. The impact of molecular characters on systematics of filamentous Ascomycetes. *Annual review. Phytopathology*. 1995; 33: 37-67.
14. Depriest PT, Been MD. Numerous group I introns with variable distributions in the ribosomal DNA of a lichen fungus. *Journal of Molecular Biology*. 1992, 228: 315–321.
15. Hibbett DS, Vilgalys R. Evolutionary relationships of *Lentinus* to the Polyporaceae: evidence from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Mycologia* 1991, 83: 425-439.
16. Chehri k, Salleh B, Yli-Mattila T, Reddy K.R.N. and Abbasi S. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2011, 18: 341-351.
17. Waalwijk C, Baayen RP, De Koning JRA, Gams W. Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* sections *Liseola* and *Elegans*. *Sydowia*. 1996, 48(1): 90-104.
18. Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Philadelphia. 1983; 193 pp.
19. González Mendoza D, Argumedo-Delira R, Morales-Trejo A, Pulido-Herrera A, et al.,. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. *Genetics and Molecular Research*. 2010; 9 (1): 162-166.
20. Refai M, Hassan A, Hamed M. Monograph on the genus *Fusarium*. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University. Giza, Egypt. 2015; Pp.275.