

کاربرد نشانگرها SCAR برای شناسایی *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

The use of SCAR markers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

سیمین نصرتی^{۱*}، حمیدرضا زمانی زاده^۲، بهار مرید^۳، گیلدا اسلامی^۴

- ۱- استادیار، گروه گیاه پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران
- ۲- دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه گیاه پزشکی، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، تاکستان، ایران
- ۴- استادیار، مرکز تحقیقات شناسایی مولکولی مخاطرات غذایی، بخش انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

Nosrati S^{*1}, Zamani Zadeh HR², Morid B³, Eslami G⁴

- 1- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Phytopathology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Takestan Branch, Islamic Azad University, Takestan, Iran
- 4- Assistant Professor, Research Center for Molecular Identification of Food Hazards, Department of Parasitology and Mycology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: siminnosrati@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

خیار (*Cucumis sativus*) مهم ترین محصول گلخانه ای استان یزد می باشد. در سال های اخیر، بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و طوقه با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* مهم ترین بیماری خیار گلخانه ای در استان یزد بوده است. در سال های اخیر روش های مختلفی برای شناسایی جدایه های *F. oxysporum* ارائه شده است. به خاطر نواقص خصوصیات مورفولوژیکی برای تشخیص گونه ها و گروه های زیر جنس *Fusarium* sp. تحقیقاتی روی ابزارهای مولکولی برای تعیین و تشخیص روابط تکاملی تعدادی از گونه ها انجام گرفت. از آغازگرهای اختصاصی ForcF1 و ForcR2 برای شناسایی جدایه های *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* مربوط به تکثیر ناحیه ژنومی OPB-07 استفاده شد. همه جدایه ها بعد از استفاده از آغازگرهای اختصاصی تولید باندهایی با وزن مولکولی ۲۷۷ bp نمودند. در مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران با استفاده از آغازگرهای SCAR شناسایی مولکولی این فرم تخصص یافته انجام شد.

واژه های کلیدی

آغازگر
شناسایی مولکولی
F. oxysporum
SCAR

یک گونه پیدا می‌شود. سپس آن بند از روی ژل استخراج شده و توالی‌یابی می‌شود. در نهایت براساس توالی این قطعه از ژنوم آغازگرهای اختصاصی ساخته خواهد شد (Roberts et al. 2003). نشانگرهای SCAR شامل اطلاعات قطعات کوچک ژنومی بوده و در قسمت‌های مختلف ژنوم قرار دارند. بنابراین در غربال‌گری گسترده جدایه‌ها، استفاده از این نشانگرهای معتبر و قوی مفید می‌باشد. نشانگرهای SCAR برای شناسایی *F. oxysporum* غالباً با عناصر متحرک ژنوم^۲ مرتبط می‌باشند. نشانگر SCAR مربوط به شناسایی *Forc*^۳ معرفی شده به وسیله Lievens (2007) بسیار شبیه ترانسپوزون *Folyt*^۴ بود. نشانگر^۵ OPB-07_277 در تمام جدایه‌های *Forc* بدون توجه به گروه سازگار رویشی یا منطقه جغرافیایی وجود دارد و پیشنهاد این است که در این حالت ترانسپوزون *Folyt1* غیرفعال باشد. اگرچه نقش این ترانسپوزون در تعیین میزبان اختصاصی هنوز مشخص نشده است، در بعضی موارد بیماری‌زایی جدایه‌های *F. oxysporum* مرتبط با حضور ترانسپوزون‌ها می‌باشد (Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003). نشانگر^۶ OPZ-12-865 در تمام جدایه‌های *Foc*^۷ بدون توجه به گروه سازگار رویشی یا منطقه جغرافیایی و گروه‌بندی براساس توالی‌های *EF-1* (*Elongation factor 1 alpha*) وجود دارد. برای این نشانگر هیچ‌گونه هومولوگی با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های عمومی وجود نداشت (Lievens et al. 2005). هدف از انجام این تحقیق معرفی راهکاری ساده جهت شناسایی این فرم مخصوص می‌باشد.

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد. کیفیت DNA نمونه‌ها به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی و حضور تک باند شفاف نشانه DNA مطلوب و مناسب تلقی شد. کمیت و غلظت DNA استخراج شده با طول موج ۲۶۰ نانومتر و خلوص آن با کمک جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ با دستگاه

گونه *F. oxysporum* از مهم‌ترین قارچ‌های خاکزاد و همه‌جازی است و عامل بیماری‌هایی نظیر زردی، پژمردگی آوندی، پوسیدگی ریشه و بوته میری در گونه‌های گیاهی مختلف است. با وجود دامنه وسیع میزبانی سویه‌های منحصر به فرد معمولاً یک و یا تعداد کمی از گونه‌های گیاهی را آلوده می‌کنند. با توجه به خسارات عمده این بیمارگر به محصولات اقتصادی و نیز ایجاد بیماری در انسان و دام به سبب تولید زهرابه، شناسایی سریع بیمارگر جهت مدیریت به موقع و مناسب بیماری الزامی است. شناسایی استرین‌های سودمند، بیماری‌زا و نیز غیربیماری‌زا از لحاظ ظاهری به دلیل انعطاف‌پذیری ژنتیکی و قابلیت تغییر شکل ظاهری در برابر عوامل محیطی امکان‌پذیر نمی‌باشد. در گذشته برای شناسایی قارچ‌های بیمارگر گیاهی از یک‌سری معیارهای مورفولوژیکی نظیر خصوصیات کشت روی محیط کشت و نیز تشخیص علائم در گیاه میزبان در طول حضور قارچ در بافت آلوده استفاده می‌شد. امروزه این روش‌های قدیمی به سبب محدودیت‌ها و اشتباهات بسیار توسط روش‌های شناسایی مولکولی جایگزین شده‌اند (Cerkaskas et al. 2001; Rose et al. 2003). در سال‌های اخیر روش‌های مختلفی برای شناسایی جدایه‌های *F. oxysporum* ارایه شده است. به خاطر نواقص خصوصیات مورفولوژیکی برای تشخیص گونه‌ها و گروه‌های زیر جنس *Fusarium* sp. تحقیقات روی ابزارهای مولکولی برای تعیین و تشخیص روابط تکاملی تعدادی از گونه‌ها تغییر کرده است. متأسفانه تشخیص فرم‌های مخصوص در *F. oxysporum* هنوز بر اساس روش وقت‌گیر آزمون بیماری‌زایی قارچ‌ها روی گونه‌های مختلف گیاه استوار می‌باشد (Rose et al. 2003; Vakalounakis et al. 2004; Leslie et al. 2006). فن آوری‌های جدید سبب تسریع شناسایی و تفکیک بیمارگرهای گیاهی شده است. در سال‌های اخیر توالی‌های کامل ژنوم بسیاری از استرین‌های بیماری‌زا در دسترس قرار گرفته است. کاوشگرهای اختصاصی برای استرین‌های بیمارگر با استفاده از نواحی تکثیر شده با توالی مشخص^۱ SCAR شناسایی و تفکیک بیمارگرها را آسان می‌کند. برای دستیابی به این آغازگرها، ابتدا به کمک روش‌هایی مانند RAPD نوارهای الکتروفورزی اختصاصی برای

¹ Sequence Characterized Amplified Region

² mobile elements

³ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

⁴ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici Folyt1* transposable

⁵ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* RAPD marker OPB-07_277 genomic sequence

⁶ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* RAPD marker OPZ-12_865 genomic sequence

⁷ *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

جدایه‌های مشابه جهت توالی‌یابی به شرکت روبین طب ارسال شد. توالی‌های به‌دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI GenBank مقایسه و مرتب‌سازی شدند.

الکتروفورز DNA استخراج شده روی ژل آگارز، یک باند شفاف با وزن مولکولی بالا را نشان داد. همه جدایه‌ها بعد از استفاده از آغازگرهای اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تولید باندهایی با وزن مولکولی ۲۷۷ bp نمودند (شکل ۱). محصول PCR همه جدایه‌ها بعد از استفاده از آغازگرهای اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* هیچ‌گونه باندهایی تولید نکرد (شکل ۲). شناسایی مولکولی گونه *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* در ایران و یزد برای اولین بار انجام شد. شماره‌های دستیابی گونه‌ها در بانک ژن NCBI GenBank به شرح ذیل می‌باشد (جدول ۴). باندهای ایجاد شده با نتایج میزبان افتراقی انجام شده در گلخانه همخوانی داشت.

اسپکتروفوتومتری (نانودراپ) بررسی شد. از آغازگرهای اختصاصی ForcF1 و ForcR2 برای شناسایی جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* مربوط به تکثیر ناحیه ژنومی OPB-07 و آغازگرهای FocR2 و FocF1 مربوط به تکثیر ناحیه OPZ-12 برای شناسایی جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد (جدول ۱) (Lievens 2007). حجم ۲۰ میکرولیتر از مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای هر جدایه قارچ تهیه شد (جدول ۲). واکنش‌های بدون ژنوم الگو به عنوان کنترل منفی در کنار نمونه‌ها قرار گرفت. واکنش در دستگاه ترموسایکلر Quanta Biotech S-96 واقع در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی پردیس علوم پزشکی دانشگاه یزد با شرایط ویژه (جدول ۳) انجام شد. محصولات واکنش روی ژل آگارز یک درصد و در کنار نشانگر، الکتروفورز و مورد ارزیابی قرار گرفت. از ژل به دست آمده با استفاده از دستگاه ژل داک عکسبرداری شد. نمایندگانی از

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تفکیک فرم‌های مخصوص *F. oxysporum*

Primer	Sequence (5'→3')	Target organism	origin	Amplicon size (bp)
ForcF1 (F)	GGTGACGCAGCAGTCTAGA	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	OPB-07_277	277
ForcR2 (R)	GTGACGCAGGGTATGGCAT	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	OPZ-12_865	868
FocF1 (F)	TCAACGGGACACTTTATGTTT			
FocR2 (R)	TCAACGGGACTCCCTTCG			

جدول ۲- میزان مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

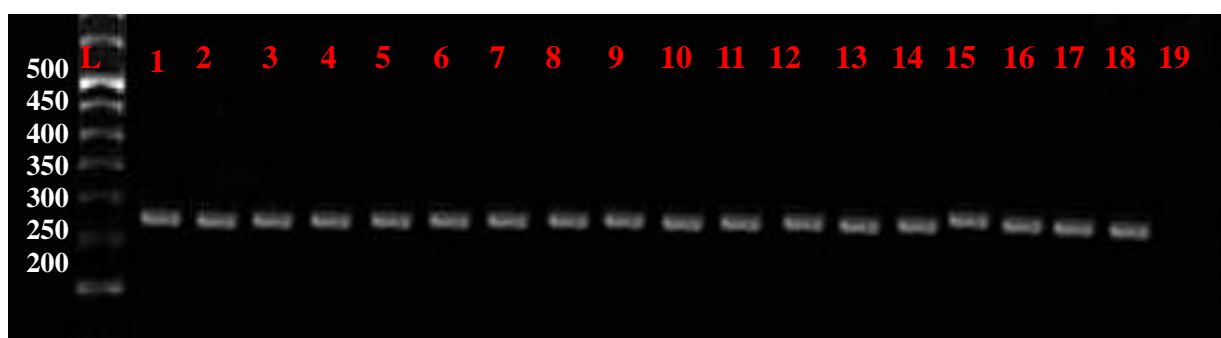
Material	Primary concentration	Final concentration	20μl
Water	-----	-----	۷ μl
Master Mix (Amplicon)	2x	1x	۱۰ μl
Work Primer	100 pmol/μl	10 pmol/μl	۱ μl
Template	400 ng/μl	100 ng/μl	۲ μl

جدول ۳- برنامه‌ریزی مراحل واکنش PCR برای تفکیک مولکولی فرم‌های مخصوص *Fusarium* sp.

مرحله	درجه حرارت (درجه سانتیگراد)	زمان (دقیقه)
واسرشت اولیه	۹۴	۵
واسرشت سازی	۹۴	۱
اتصال آغازگر	۵۸	۱
بسط	۷۵	۱
بسط نهایی	۷۲	۵

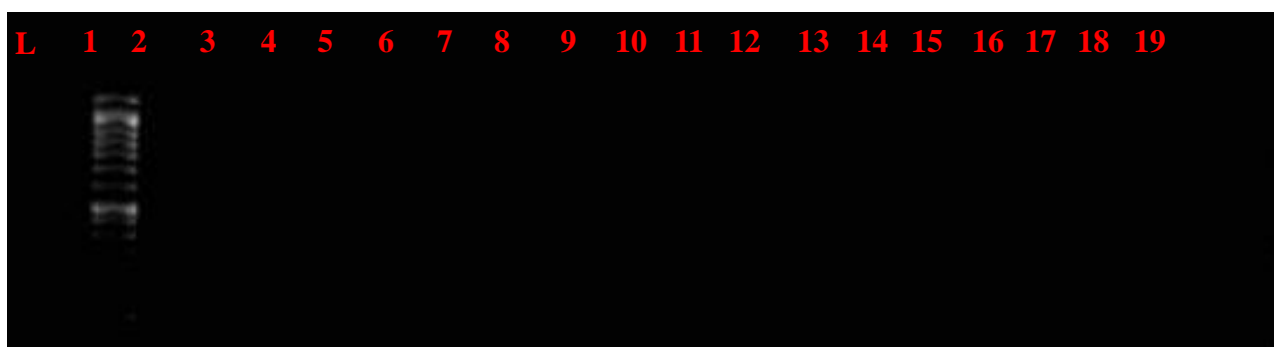
Forc (O'Donnel et al. 2000). شناسایی مورفولوژیکی گونه Forc بسیار وقت گیر و هزینه بر است. با روش مولکولی فرم‌های مخصوص را می‌توان به راحتی شناسایی کرد. شناسایی مولکولی این فرم مخصوص برای اولین بار در ایران انجام شد. نتایج بررسی‌های جداسازی و شناسایی عامل و علائم بیماری در مورد جدایه‌ها، با نتایج سایر گزارشات مطابقت داشت (Vakalounakis et al. 2005).

اندازه ژنوم *F. oxysporum* در حدود ۱۸/۱ Mb تا ۵۱/۵ Mb بوده که شامل پلاسمید خطی با تعداد کروموزوم‌های متغیر بین ۷ تا ۱۴ می‌باشد. مطالعات روی فیلوژنی *F. oxysporum* نشان دهنده تک نیایی بودن آن است. با این‌که فرم‌های مخصوص بسیاری در این گونه وجود دارد، پیشنهاد می‌شود که بیماری زایی پاتوژن و میزبان تکامل همگرای دارند. مدارک چند نیایی بودن *F. oxysporum* f. sp. *melonis* و *oxysporum* f. sp. *cubense* برای سیستم نامگذاری فرم مخصوص مشکلاتی را ایجاد کرد



شکل ۱- محصولات نهایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بعد از استفاده از آغازگرهای ForcF1 و ForcR2 برای تفکیک فرم تخصص یافته-*F. oxysporum* f. sp. *radicis* ردیف L: 100-bp DNA ladder marker و ردیف‌های ۱ تا ۱۸ جدایه‌های F1 تا F18 مربوط به قارچ-*F. oxysporum* f. sp. *radicis* که تولید بانندی به وزن تقریبی ۲۷۷ bp کردند. ردیف ۱۹: کنترل منفی می‌باشد. نتایج مشابه از ۳ بار تکرار بدست آمد. مشخصات ردیف‌ها به شرح ذیل است.

L: Ladder, 1: F1, 2: F2, 3: F3, 4: F4, 5: F5, 6: F6, 7: F7, 8: F8, 9: F9, 10: F10, 11: F11, 12: F12, 13: F13, 14: F14, 15: F15, 16: F16, 17: F17, 18: F18, 19: Control-



شکل ۲- محصولات نهایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بعد از استفاده از آغازگرهای FocF1 و FocR2 برای تفکیک مولکولی فرم تخصص یافته *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ردیف L: 100-bp DNA ladder marker و ردیف‌های ۱ تا ۱۸ جدایه‌های F1 تا F18 مربوط به جدایه *F. oxysporum* و ردیف ۱۹: کنترل منفی می‌باشد. نتایج مشابه از ۳ بار تکرار به دست آمد. مشخصات ردیف‌ها به شرح ذیل است.

L: Ladder, 1: F1, 2: F2, 3: F3, 4: F4, 5: F5, 6: F6, 7: F7, 8: F8, 9: F9, 10: F10, 11: F11, 12: F12, 13: F13, 14: F14, 15: F15, 16: F16, 17: F17, 18: F18, 19: Control-

جدول ۴- شماره‌های دستیابی جدایه‌های قارچ بیمارگر Forc در بانک ژن NCBI GenBank و کلکسیون قارچ‌های زنده ایران

Isolate cod	Primer	Query coverage ¹	Identities	Accession Number NCBI sample	Isolate Accession Number
F1	Forf1+ forcr2	95%	99%	EF056792.1	KP746403
F17	Forf1+ forcr2	93%	99%	EF056792.1	KP746407
F23	Forf1+ forcr2	96%	99%	EF056792.1	KP746408 (IRAN 2282C)
F26	Forf1+ forcr2	92%	99%	EF056792.1	KP746409

Query Coverage (percent of the query sequence that overlaps the subject sequence)

روی میسلیم یا از میکروکنیدیوفورهای کوتاه روی سرهای دروغین، تولید می‌شود در صورتی که در *F. solani* میکروکنیدی‌ها از کنیدیوفورهای جانبی و فیالیدهای بلند که در انتها کمی باریک بوده و روی سرهای دروغین، تولید می‌شود. قارچ Forc میکروکنیدیوفورهای کوتاه تولید می‌کند (Alves-santos et al. 2002; Vakalounakis et al. 2005; Zaccardelli et al. 2008). با توجه به وقت گیر بودن و هزینه بر بودن شناسایی با ویژگی‌های مورفولوژیکی و میزبان افتراقی استفاده از این مارکرها جهت سهولت شناسایی پیشنهاد می‌شود.

نویسندگان مقاله از همکاری دانشگاه آزاد اسلامی واحد یزد و دانشگاه علوم و تحقیقات تهران و دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

از نظر علایم‌شناسی، قارچ عامل بیماری وارد بافت کورتکس ریشه شده و شانکرهای قهوه‌ای رنگ ایجاد نموده و به سمت سیستم آوندی پیشرفت می‌کند. فرم اختصاصی Forc در دمای ۲۹-۱۷ درجه سانتی‌گراد باعث توسعه بیماری می‌شود و بر روی رقم افتراقی اشلی، پوسیدگی ریشه و ساقه ایجاد می‌کند در حالی که فرم اختصاصی Foc بر روی رقم افتراقی اشلی پژمردگی آوندی به وجود آورده و هیچ‌گونه شانکری در بافت کورتکس ایجاد نمی‌کند و دمای مناسب گسترش بیماری حداقل ۲۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Vakalounakis et al. 2004). قارچ *F. solani* f. sp. *Cucurbitae* نیز یک قارچ عامل پوسیدگی کورتکس است که علایم مشابه Forc ایجاد می‌کند ولی این دو قارچ از نظر مورفولوژی میکروکنیدیوفور تفاوت زیادی دارند. در *F. oxysporum* میکروکنیدی‌ها روی فیالیدهای منفرد جانبی

منابع

Alves-santos F, Ramos B, García-sánchez M, Eslava A, Díaz-mínguez J (2002) A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* 92:237-244.

Cerkauskas R, Brown J (2001) First Report of *Fusarium* Stem and Root Rot of Greenhouse Cucumber. *Plant Disease* 85:1028.

Jiménez-Gasco MM, Jiménez-Díaz RM (2003) Development of a specific polymerase chain reaction based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology* 93: 200-209.

Leslie J, Summerell A (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. BlackWell publishing pp: 79-274.

Lievens B, Claes L, Vakalounakis J, Vanachter C, Thomma P (2007) A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Environ Microbiology* 9: 2145-2161.

Lievens B, Thomma B (2005) Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant

pathogens and use in practice. *Phytopathology* 95: 1374-1380.

Lievens B, Brouwer M, Vanachter, ACRC, Lévesque CA, Cammue BPA, Thomma B (2003) Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomatos vascular wilt pathogens. *FEMS Microbiology Letters* 223:113-122.

O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK and Casper HH (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 7905-7910.

Roberts DP, Lohrke SM (2003) Programs in biological control of plant diseases. *Pest Management Science* 59: 654-664.

Rose S, Parker M, Punja ZK (2003) Efficacy of biological and chemical treatments for control of *Fusarium* roots and stems rot on greenhouse cucumber. *Plant Disease* 87:1462-1470.

Vakalounakis D, Doulis A, Klironomou E (2005) Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* Attacking Melon under Natural Conditions in Greece. *Plant Pathology* 54: 339- 346.

Vakalounakis D, Wang Z, Fragkiadakis G, Skaracis G, Li D (2004) Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAP. *Plant Disease* 88: 645-649.

Vakalounakis DJ, Doulis AG, Klironomou E (2005) Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-*

cucumerinum attacking Melon under Natural Conditions in Greece. *Plant Pathology* 54: 339-346.

Zaccardelli M, Vitale S, Luongo L, Merigh M (2008) Morphological and Molecular Characterization of *Fusarium solani* Isolates. *Journal of Phytopathology* 156:534-541.