ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵
صفحه ۵۵-۴۵

بررسی تنوع ژنتیکی در قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* با استفاده از سازگاری رویشی و نشانگرهای ISSR

Study of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* based on VCG groups and ISSR marker.

فاطمه خیری*[۱]، کامران رهنما[۱]، احد یامچی[۱]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Khairy F*[1], Rahnama K[1], Yamchi A[1]

1. MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor, Gorgan university of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:kheiryf624@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۹)

چکیده

بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* متداول‌ترین بیماری در خربزه است که در چند کشور جهان و از جمله ایران گزارش شده‌است. استفاده از ارقام متحمل یکی از موثرترین روش‌های مدیریت این بیماری محسوب می‌شود، اما به‌منظور انتخاب و توسعه ارقام متحمل آگاهی از تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این قارچ ضروری است. در این مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت این بیمارگر در استان خراسان رضوی بررسی شد. بدین منظور ۲۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* f.sp. *melonis*، عامل پژمردگی خربزه از استان خراسان (کلکسیون گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) انتخاب و با استفاده از گروه‌های سازگاری رویشی و روش ISSR تنوع ژنتیکی آن‌ها بررسی شد. برای بررسی گروه‌های سازگاری رویشی، ابتدا جهش‌یافتگان نیت به صورت قطاع‌هایی در محیط‌های مختلف کلرات‌دار تولید شده، سپس کلاس فنوتیپی جهش‌یافتگان براساس مشخصات رشدی پرگنه آن‌ها روی محیط پایه حاوی یکی از پنج نوع منبع نیتروژن (نیترات سدیم، نیتریت سدیم، تارتارات آمونیوم، اسید اوریک و هیپوزانتین) تعیین شد. بر این اساس ۶۸ درصد از موتانت‌های نیت در کلاس فنوتیپی nit1، ۱۸ درصد آن‌ها در کلاس nit3 و ۱۴ درصد آن‌ها در کلاس فنوتیپی nitM قرار گرفتند. به‌منظور انجام آزمون‌های مکمل‌سازی و تعیین گروه‌های سازگاری رویشی، بین تمامی جهش یافتگان nitM هر جدایه با جهش یافتگان nit1 یا nit3 سایر جدایه‌ها کشت متقابل انجام شد. در نتیجه بین جدایه‌ها، سازگاری رویشی مشاهده نشد و جدایه‌ها در ۲۰ گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند. همچنین تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها با استفاده از بیست آغازگر بررسی شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های ISSR با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه SM جدایه‌ها را در سطح تشابه ۶۰ درصد در پنج گروه قرار داد. این نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جدایه‌های قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه در استان خراسان رضوی وجود دارد. تجزیه خوشه‌ای نشان داد که به جز موارد محدود بین پراکنش جغرافیایی و گروه‌های ژنتیکی ارتباط مشخصی وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
سازگاری رویشی
فوزاریوم
نشانگر مولکولی
هتروکاریون

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]

مقدمه

طالبی و خربزه متعلق به تیره کدوئیان (cucurbitacea) از مهمترین گیاهان این خانواده محسوب می‌شوند، که در نواحی گرم و خشک کشت می‌شوند (Farahvash and Mobasher 2006). خربزه یکی از مهم‌ترین محصولات جالیزی ایران به شمار می‌رود به طوری‌که از ۳۲۶ هزار هکتار سطح زیر کشت این محصولات ۲٤/۸ درصد آن به کشت خربزه اختصاص دارد و تقریبا در اکثر استان‌های کشور کشت می‌شود. استان خراسان رضوی با بیش از ۳۹ هزار هکتار سطح زیر کشت یکی از مناطق مهم کشت این محصول در کشور به شمار می‌رود (Statistics of Iranian Agriculture 2010-2011). بیماری زردی و پژمردگی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* یکی از بیماری‌های مهم ارقام c. melo می‌باشد (Banihashemi Luongo et al. 2012 ;2010). این قارچ به میزان چشمگیری باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول در ایران و در استان خراسان رضوی می‌شود (Teimuri et al. 2011). گیاهان در تمام مراحل رشدی ممکن است مورد حمله قرار گیرند (Ashrafizadeh et al. 2005). عامل بیماری باعث زردی، کوتولگی، پژمردگی و مرگ گیاه می‌شود. علائم بیماری معمولاً بعد از ظهور گل و تشکیل میوه ظاهر می‌شود. در گیاهان بالغ علائم بیماری معمولاً به‌صورت یک طرفه ظاهر شده و ابتدا یک قسمت از گیاه علائم زردی را نشان می‌دهد و به‌تدریج به سایر قسمت‌های گیاه گسترش می‌یابد (Noruzi et al. 2011). این قارچ یکی از مهم‌ترین گونه‌های تغییرپذیر در بین گونه‌های فوزاریوم است (Saremi 1998). فوزاریوم‌ها از جمله قارچ‌هایی هستند که علی‌رغم نداشتن تولیدمثل جنسی از نظر ژنتیکی بسیار ناپایدار می‌باشند (Mahinpoo et al. 2011). بر این اساس برای اعمال روش‌های صحیح مدیریتی، بررسی تنوع ژنتیکی این بیمارگر از اهمیت ویژه ای برخوردار است (Chehri et al. 2011; Mahinpoo et al. 2011; Nasre Esfahani et al. 2013). در جمعیت‌هایی با تنوع ژنتیکی بالا احتمال وجود تنوع در قدرت بیماری‌زایی و نیز عکس‌العمل جدایه‌ها نسبت به قارچ کش‌ها یا توانایی در مقاومت به عوامل بیوکنترل بسیار زیاد است. بنابراین، بالا بردن اطلاعات در این زمینه مسلماً در اتخاذ روش‌های موثر کنترل و تنظیم استراتژی‌های کنترل کارآمدتر نقش خواهد داشت (Karimi et al. 2010). مطالعه تغییرات ژنتیکی در قارچ‌های بیمارگر از جنبه تولید ارقام مقاوم حائز اهمیت می‌باشد (Heidarzadeh and Baghaee Ravari 2012; Rabbaninasab et al. 2013) تعیین گروه‌های سازگاری رویشی (VCGs)[1] روش مناسبی برای شناسایی و تفکیک فرم‌های اختصاصی *F. oxysporum* می‌باشد که به عنوان ابزار اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در سال‌های اخیر گسترش یافته است (Mousanejad et al. 2005; Demirci and Genc 2009). در این روش قارچ‌ها بر اساس ژنتیک به زیر گروه‌هایی تفکیک می‌شوند (Amani et al. 2005; Grubisha and Cotty 2010). گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس گروه‌های سازگار رویشی ابزار تشخیصی مفیدی را برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها فراهم کرده اما همانند نشانگرهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی این روش نیز دارای محدودیت‌هایی است. بنابراین محققین برای شناسایی دقیق‌تر، استفاده از نشانگرهای مولکولی را در دستور کار خود قرار دادند (Mahinpoo et al. 2011). انگشت نگاری DNA یکی از روش‌های مفید برای بررسی ژنتیکی جمعیت‌های قارچی می‌باشد (Karimi et al. 2010). از نشانگرهای مولکولی می‌توان به ISSR، AFLP ، RLFP و RAPD اشاره کرد. در هر یک از این روش‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی مخصوص می‌توان به تنوع جمعیت این قارچ پی‌برد (Rabbaninasab et al. 2013). نشانگر ISSR توسط Zitkiewicz et al. (1994) معرفی و برای انگشت نگاری DNA به کار برده شد. در این روش نواحی بین ریزماهواره به‌عنوان آغازگر مورد استفاده قرار می‌گیرند (Hassani et al. 2014).

شکل ۱- رشد گسترده و فاقد ریسه هوایی موتانت نیت بر روی محیط حداقل

[1] Vegetative incompatibility groups

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]

بررسی‌نواحی‌بین‌توالی‌های ساده‌تکراری (ISSR) روشی‌است که‌به سرعت تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های یک گونه را نشان می‌دهد (Karimi et al. 2010).لذا،درپژوهش‌حاضروجودتنوع ژنتیکی‌بین گروه‌های سازگاری رویشی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* با استفاده‌ازنشانگرمذکورموردبررسی‌قرار رفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، بیست جدایه قارچ *F. oxysporum* f.sp. *melonis*، عامل پژمردگی گیاهان جالیزی از کلکسیون بخش گیاه-پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی مطالعه قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های قارچی مربوط به قسمت‌های مختلف استان خراسان.

تعداد نمونه	منطقه
۳	غزل حصار
۲	لنگر
٤	جوادی
۲	اسماعیل آباد
٤	قندک
۳	یحیی‌آباد
۲	اردکانی

تولید جهش‌یافتگان نیت

از کشت‌های خالص هر جدایه در محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار[1]، قطعات کوچکی به قطر تقریبی دو میلی‌متر تهیه و به محیط کشت حداقل[2] (Correll et al. 1987) منتقل شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با گذشت یک هفته طبق روش Puhalla (1985) قطعات کوچکی به قطر دو میلی‌متر تهیه و به محیط کشت‌های MMC[3]، PDC[4]، MAC[5] و CMA[6] حاوی ٤-۱/۵ کلرات پتاسیم منتقل شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۱ روز در انکوباتور نگهداری و مرتبا مورد بررسی قرار گرفتند تا از تشکیل قطاع‌های سریع‌الرشد که احتمالاً جهش‌یافتگان نیت هستند، اطلاع حاصل شود.

شناسایی جهش‌یافتگان نیت

به‌منظور شناسایی جهش‌یافتگان نیت از حاشیه مناطقی که رشد غیر عادی داشتند، قطعاتی کوچک به قطر ۲ میلی‌متر به محیط کشت حداقل منتقل گردید. این محیط ٤ تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. جهش‌یافتگان نیت در روی این محیط رشدی ظریف و گسترده داشته، اسپور و میسلیوم هوایی تولید نمی‌کنند لذا در مواردی که تیپ وحشی قارچ ظاهر می‌شد جدایه مورد نظر از ادامه تحقیق حذف شد.

تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیت

کلاس فنوتیپی تمام جهش‌یافتگان نیت با توجه به ریخت‌شناسی پرگنه آن‌ها روی پنج محیط کشت که دارای یکی از پنج منبع نیتروژن (نیترات سدیم، نیتریت سدیم، هیپوزانتین، تارتارات آمونیم و اسید اوریک) بودند، تعیین شد. بدین منظور پنج قطعه دو میلی-متری از کشت ۵ روزه هر موتانت روی محیط کشت حداقل برداشته و به ترتیب روی محیط‌هایی که دارای یکی از۵ منبع نیتروژن فوق‌الذکر بود، منتقل و در دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت شش روز نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت، بررسی فنوتیپ جهش‌یافتگان نیت با توجه به ریخت‌شناسی پرگنه قارچ روی این محیط‌ها به کمک جدول ۲ انجام شده و هر کدام در یکی از سه گروه nitM یا nit3، nit1 قرار گرفتند (Correll et al. 1987).

جدول ۲- تعیین کلاس فنوتیپی جهش‌یافتگان نیت روی پنج محیط نیتروژن‌دار مختلف (Correll et al. 1987)

کلاس فنوتیپی	نوع رشد روی منابع مختلف نیتروژن				
	نیترات سدیم	نیتریت سدیم	تارتارات آمونیوم	اسید اوریک	هیپوزانتین
تیپ وحشی	+	+	+	+	+
nit1	−	+	+	+	+
nit 3	−	−	+	+	+
nitM	−	−	+	−	+

+) رشد تیپ وحشی روی محیط مربوطه؛ −) رشد نازک بدون میسلیوم هوایی روی محیط مربوطه

[1] Potato dextrose agar (PDA)
[2] Minimal medium
[3] Minimal medium + Chlorate
[4] PDA medium + Chlorate
[5] Malt agar medium + Chlorate
[6] Corn Meal agar medium + Chlorate

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]

آزمون مکمل‌سازی فیزیولوژی جهش‌یافتگان نیت و تعیین گروه-های سازگاری رویشی

قبل از آزمون مکمل‌سازی خود ناسازگاری رویشی هر جدایه با روش (Jacobson and Gordon 1988) بررسی شد. برای انجام این آزمون در هر تشتک پتری حاوی محیط حداقل، قطعات دو میلی‌متری از nitM هر جدایه در برابر قطعات دو میلی‌متری از nit3 یا nit1 همان جدایه با فاصله دو سانتی‌متر از یکدیگر کشت شدند. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به مدت ۱٤-۷ روز نگهداری شدند. سپس تشتک‌ها به منظور تشکیل یا عدم تشکیل هتروکاریون بررسی شدند. در صورت عدم تشکیل هتروکاریون معلوم می‌شود که جدایه مورد آزمایش دارای صفت خود ناسازگاری رویشی است و باید از ادامه تحقیق حذف شود تا از بروز اشتباه اجتناب شود. در مرحله بعد بین nitM هر جدایه باnit1 یا nit3 سایر جدایه‌ها مقابله انجام شد. بدین صورت که nitM هر جدایه را در وسط تشتک کشت داده و در مقابل آن چهار قطعه میسلیومی از nit3 یا nit1 جدایه‌های دیگر در فاصله ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متری آن‌ها کشت داده شدند. قارچ‌ها در همان شرایط و زمان فوق‌الذکر نگهداری شدند. تشکیل هترکاریون بین پرگنه‌های نیت دو جدایه نشان می‌هد که این دو جدایه متعلق به یک VCG هستند و عدم تشکیل هترکاریون نشان‌دهنده قرار گرفتن دو جدایه در دو VCG متمایز است (Correll et (al. 1987.

تولید انبوه میسلیوم

تولید توده میسلیومی ۲۰ جدایه در محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز[1] انجام گرفت. یک قرص دو میلی‌متری از حاشیه پرگنه-های سه روزه هر جدایه روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع سیب‌زمینی دکستروز منتقل شد. ارلن‌ها در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت روی شیکر قرار داده شدند. توده‌های تشکیل شده از پارچه ململ سترون عبور داده و با آب مقطر سترون شسته شدند.

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها بر اساس روش ISSR

استخراج DNA طبق روش (Murray and Thompson (1980 انجام شد. بررسی میزان و غلظت DNA استخراج شده و خلوص آن از طریق اسپکتروفوتومتری انجام گرفت. خلوص DNA به-دست آمده از طریق اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج‌های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر و محاسبه نسبت جذب ۲۸۰/۲٦۰ به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (BioPhotometer Eppendorf AG) انجام شد. کیفیت DNA نمونه‌ها به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی و حضور تک باند شفاف با وزن مولکولی بالا، نشانه DNA مطلوب و مناسب‌تر تلقی شد.

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های این بیمارگر از بیست آغازگر استفاده شد (جدول ۳). تکثیر DNA در واکنش ۲۰ میکرولیتری شامل دو میکرولیتر PCR Buffer10X، $MgCl_2$ با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، ۱۰ pmol آغازگر، ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱٤/۷ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل و یک واحد آنزیم تک پلیمراز (Bioscience Jena) در دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندورف و یا مدل LTD شرکت COASTEC انجام گرفت. چرخه حرارتی به صورت ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ٤۰ چرخه به صورت ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ٤۵ ثانیه مرحله اتصال آغازگر بسته به دمای اتصال آغازگر (جدول ۳)، دو دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. قطعات تکثیر شده در هر واکنش با استفاده از ژل آگارز یک درصد درون دستگاه الکتروفورز (پایا پژوهش) با ولتاژ ثابت ۷۰ ولت به مدت یک ساعت و بیست دقیقه از هم تفکیک شدند. نهایتا ژل در دستگاه Gel Doc برای عکسبرداری به کمک نور UV قرار داده شد. در این روش به منظور رنگ‌آمیزی از اتیدیوم بروماید استفاده شد.

ارزیابی نتایج

بدین منظور ابتدا باندهای واضح در تصویر ژل‌ها مشخص شد و سپس داده‌ها به‌صورت حضور باند (۱) و عدم حضور باند (صفر) در نرم‌افزار Excel وارد شد. برای بررسی محتوای اطلاعات چندشکل آغازگرها از پارامتر PIC (Polymorphism Information Contect) استفاده شد.

[1] Potato Dextrose Borath (PDB)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]

جدول ۳- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش ISSR-PCR

نام آغازگر	توالی آغازگرهای مورد استفاده (′۳-′۵)	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
ISSR3	CACACACACACACACAG	۵۴
ISSR4	GTGGTGGTGGTGGTG	۵۲
UBC855	ACACACACACACACACYT	۵۲
UBC856	ACACACACACACACACYA	۵۲
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	۵۰
UBC-809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	۵۰
UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	۵۰
UBC-841	GACACGACACGACACGACAC	۶۰
UBC-864	ATGATGATGATGATGATG	۵۰
UBC-880	GGAGAGGAGAGGAGAGGAGA	۶۰
UBC-868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	۵۰
P3	GAGAGAGAGAGAGAGAT	۵۰
P4	AGAGAGAGAGAGAGAGT	۵۰
P5	ACACACACACACACACACRY	۵۴
P9	ACCACCACCACCACCACCCC	۶۰
P6	CCATGATGATGATGATGATG	۵۰
P7	CACACACACACACACARG	۵۴
P10	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	۵۰
P8	CCATGTGTGTGTGTGTGT	۵۴
P11	AGAGAGAGAGAGAGAGAGG	۵۰

محتوای اطلاعات چندشکل براساس رابطه PIC =1- Σpi محاسبه شد که در این رابطه pI فراوانی الل I ام و n تعداد الل است. MI شاخص نشانگری (Marker Index) که بیانگر میزان چندشکلی بوده و می‌تواند به عنوان شاخصی جهت برآورد کارایی یک نشانگر در یک ژرم پلاسم ناشناخته استفاده شود، با استفاده از رابطه MI= PIC× np ×β به دست آمد که در این رابطه np تعداد کل نوارهای چندشکل و β نسبت تعداد نوار چندشکل به تعداد کل نوارها می‌باشد (Powell et al. 1996). جهت گروه‌بندی جدایه‌های مورد مطالعه، تعیین تفاوت‌ها و شباهت‌های جدایه‌ها ابتدا براساس روش‌های مختلف انجام شد و در نهایت بهترین گروه‌بندی براساس شاخص‌های آماری انتخاب شد که بدین منظور از نرم‌افزار NTSYSpc 2.01 (Rohlf 1998) استفاده شد. مقایسه نتایج روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه متفاوت براساس ضریب کوفنتیک نشان داد که بهترین روش در محاسبه ماتریس تشابه، روش تطابق ساده و دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش میانگین حسابی غیر وزنی (UPGMA) و براساس الگوی چند شکلی DNA محصولات PCR در سطح تشابه ٦٠ درصد می‌باشد. همچنین تجزیه واریانس مولکولی با نرم‌افزار GenAlEx 6.4 انجام گرفت.

نتایج

جدایه‌های مورد آزمایش در غلظت‌های ٤- ١/٥ درصد کلرات پتاسیم محیط کشت‌های کلرات‌دار، قطع‌های مقاوم به کلرات پتاسیم تولید کردند. پس از حدود ١٠ تا ١٥ روز قطع‌های جهش-یافته به‌صورت نامنظم و به رنگ‌های متمایز از تیپ وحشی ایجاد شدند. میانگین تعداد قطع‌های تولید شده روی چهار محیط کشت کلرات‌دار MMC، PDC، MAC و CMC به‌ترتیب ٢/٧٥، ٥، ٠/٤ و ٠/٢ بود. بنابراین محیط CMC و MAC به‌دلیل عدم کارایی مطلوب و عدم تولید قطع‌های مشخص مقاوم به کلرات در ادامه آزمایش کنار گذاشته شدند. بیشترین تعداد قطع ٦ عدد در محیط کشت PDC بدست آمد. قطع‌های سریع‌الرشد به محیط حداقل منتقل شدند که تقریبا در تمامی موارد قطع‌های ایجاد شده قادر به مصرف نیترات نبوده و در مقایسه با تیپ وحشی رشد سریع و بدون میسلیوم هوایی داشتند (شکل ١). به‌عبارت دیگر بیش از ٩٥ درصد قطع‌های ایجاد شده، جهش یافته نیت بودند. فراوانی قطع در محیط کلرات و نسبت فنوتیپ‌های جهش‌یافتگان نیت، در بین ٢٠ جدایه متفاوت بود (جدول ٤). از نظر مورفولوژی پرگنه، رشد میسلیوم، حاشیه قطع سریع الرشد و تعداد قطع تولید شده از هر پرگنه تیپ وحشی تنوع زیادی مشاهده شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]

جدول ٤- درصد فراوانی فنوتیپ‌ها روی محیط کشت‌های حاوی کلرات

کلاس فنوتیپی	تعداد جهش	درصد جهش	PDC		MMC	
			تعداد جهش	درصد جهش	تعداد جهش	درصد جهش
Nit1	٣٣٠	٪٦٨	٢٣١	٪٧٠	٩٩	٪٣٠
Nit3	٨٧	٪١٨	٤١	٪٤٧	٤٦	٪٥٣
NitM	٦٨	٪١٤	١٧	٪٢٥	٥١	٪٧٥
کل	٤٨٥		٢٦٥		٢٢٠	

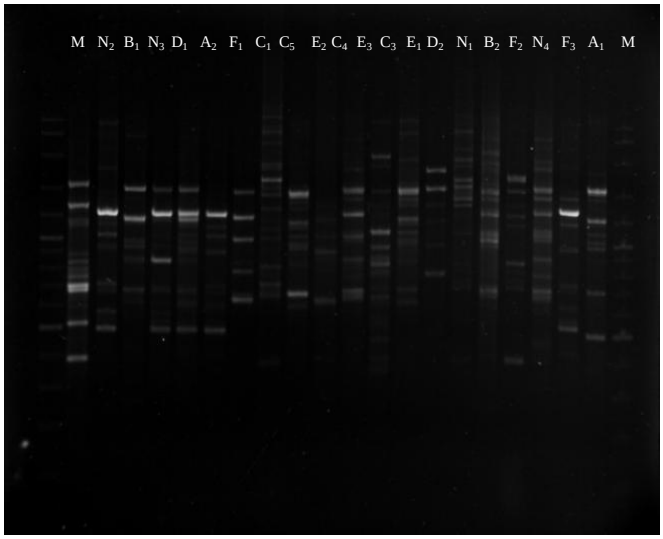
بعد از شش روز، تشتک‌های پتری برای تعیین کلاس فنوتیپی موتانت‌های نیت بررسی شدند. کلیه موتانت‌های نیت با توجه به نحوه رشد پرگنه روی محیط‌های دارای یکی از پنج منبع نیتروژن (نیترات سدیم، نیتریت سدیم، هیپوزانتین، تارتارات آمونیوم و اسید اوریک) بر اساس جدول ٢، در سه گروه فنوتیپی nit1, nit3 و nitM قرار گرفتند. اکثر جهش‌یافتگان نیت، nit1 بوده (٦٨ درصد) و همچنین تعداد این جهش‌یافتگان روی محیط PDC بیشتر از محیط MMC بود. این جهش‌یافتگان روی تمامی محیط-های کشت مورد استفاده به جز محیط حاوی نیترات دارای رشدی مشابه تیپ وحشی بودند. nitM و nit3 به‌ترتیب ١٤ و ١٨ درصد جهش‌یافتگان را به خود اختصاص دادند. بیشترین فراوانی nit3 روی محیط MMC بود. در مجموع فراوانی nitM کمتر از دو فنوتیپ دیگر بود.

موتانت‌های نیت مکمل از جدایه‌های مختلف در مقابل هم قرار داده شد. نتایج حاصل از آزمون مکمل‌سازی نشان دهنده پدیده خودناسازگاری بین جدایه‌های مورد آزمایش بود. برای اطمینان از عدم وجود سازگاری رویشی آزمون مکمل‌سازی بین تمامی فنوتیپ‌های جدایه‌ها انجام شد. با مکمل‌سازی جهش یافتگان نیت حاصل از ٢٠ جدایه *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* در تمام حالات ممکن هر یک از جدایه‌ها در یک گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند. به این‌ترتیب ٢٠ جدایه مورد آزمایش در ٢٠ گروه سازگاری رویشی قرار داده شدند (جدول ٥).

جدول ٥- مشخصات جدایه‌های *F. oxysporum* براساس نام جدایه، محل جغرافیایی و VCG

نام جدایه	محل جغرافیایی	گروه سازگاری رویشی	نام جدایه	محل جغرافیایی	گروه سازگاری رویشی
A_1	اسماعیل آباد	٢	F_1	غزل حصار	١٣
E_1	یحیی آباد	٣	F_2	غزل حصار	٩
E_2	یحیی آباد	١٨	F_3	غزل حصار	٤
E_3	یحیی آباد	١٢	C_1	جوادی	٢٠
N_1	قندک	١٧	D_2	اردکانی	١٩
N_2	قندک	١٠	C_3	جوادی	٨
N_3	قندک	١٦	C_4	جوادی	٧
N_4	قندک	١	C_5	جوادی	٥
A_2	اسماعیل آباد	١١	B_2	لنگر	١٥
B_1	لنگر	١٤	D_1	اردکانی	٦

از مجموع ٢٠ آغازگر استفاده شده در این تحقیق، تعداد ١١ آغازگر توانستند چند شکلی و تکثیر مناسبی در ژنوتیپ‌ها نشان دادند (شکل ٢). ٩ آغازگر دارای تکثیر تک شکل بودند و از آزمایشات حذف شدند. ترکیب‌های آغازگری و پارامترهای مربوطه از جمله تعداد نوارهای تکثیر شده و نوارهای چند شکل، درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) در جدول ٧ ذکر شده است. در بروز چندشکلی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق می‌باشد.



شکل٢- الگوی نواری حاصل از تکثیر آغازگر UBC-809 در جدایه‌های مورد مطالعه. M) نشانگر bp ١٠٠؛ ستون‌های جدایه‌ها براساس جدول ٥.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]

جدول ٦- تعداد کل نوارهای تکثیر شده، نوارهای چندشکل و میزان PIC هر آغازگر ISSR

نام آغازگر	مجموع جایگاه‌های ژنی	تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل	درصد چندشکلی	PIC	شاخص نشانگری
P11	١٤	١٤	١٠٠	٠/٢٢	١٥/٦٢
P4	٢١	٢١	١٠٠	٠/٢٧	٣٥/٦٤
UBC-811	١٦	١٦	١٠٠	٠/٣٠	٣٠/٩
UBC856	١٣	١٣	١٠٠	٠/٣٤	٣٤
UBC-809	٢٢	٢٢	١٠٠	٠/٢٧	٣٦/١٨
UBC-864	١٥	١٥	١٠٠	٠/٣٧	٤٥/٨٨
UBC855	١٣	١٣	١٠٠	٠/٢٧	١٩/٧١
UBC-868	١٧	١٧	١٠٠	٠/٣٢	٣٣/٦
P8	١٤	١٤	١٠٠	٠/٢١	١٣/٦٥
UBC-808	١٦	١٦	١٠٠	٠/٣٢	٣٨/٤
P6	١٤	١٤	١٠٠	٠/٣١	٢٨/٢١
کل	١٧٥	١٧٥	-	-	-
میانگین	١٥/٩	١٥/٩	١٠٠	٠/٢٩	٣٠/١٦

از ١١ آغازگر استفاده شده در این مطالعه در مجموع ١١١٨ نوار تکثیر شد که ١١١٨ (صد درصد) نوار آن چندشکلی نشان داد. آغازگر UBC-809 بیشترین تعداد باند (١٣٤ باند) و آغازگر P8 کمترین تعداد باند (٦٥ باند) را تکثیر کردند. مقدار میانگین PIC برای آغازگرهای به کار گرفته شده در این مطالعه ٠/٢٩ محاسبه شد که از ٠/٢١ تا ٠/٣٧ متغیر بود. در میان ترکیب آغازگرها بیشترین میزان PIC (٠/٣٧) مربوط به آغازگر UBC-864 و آغازگر P8 دارای کمترین مقدار PIC (٠/٢١) بود. میزان MI بین ٤٥/٨٨ تا ١٣/٦٥ متغیر بود و آغازگرهای UBC-864، UBC-808، و UBC-809 به ترتیب با ٤٥/٨٨، ٣٨/٤ و ٣٦/١٨ واحد دارای بیشترین شاخص نشانگری (MI) بودند (جدول ٦) که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها بود.

تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها براساس نتایج بدست آمده از نشانگرهای ISSR ماتریس تشابه بین جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار NTSYSpc 2,0 تشکیل شد. بر طبق ماتریس حاصل تشابه بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از ٠/٤٩ تا ٠/٧٠ با میانگین تشابه ٠/٦٠ بدست آمد. بیشترین تشابه (٠/٧٠) بین جدایه‌های F_2 و N_4، D_1 و C_4 ثبت شد و کمترین تشابه (٠/٤٩) بین جدایه‌های F2 و E_3 مشاهده گردید. تجزیه خوشه‌ای داده‌های ISSR نرم‌افزار NTSYScp 2.0 جهت انجام تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از نشانگر ISSR مورد استفاده قرار گرفت. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به روش UPGMA براساس ماتریس تطابق ساده انجام شد و دندروگرام حاصل در شکل ٣ نشان داده شده‌است. ضریب کوفنتیک براساس ضریب تشابه تطابق ساده، ٠/٦٦ بود که نشان‌دهنده برازش متوسط بین دندروگرام و ماتریس تشابه و نیز کارایی نسبی این روش برای گروه‌بندی جدایه‌ها بود. درخت ترسیم شده ژنوتیپ‌های جدایه‌ها را در پنج گروه اصلی قرار داد، پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز بیانگر این مطلب بود (شکل ٤). در گروه اول تنها دو جدایه A_1، F_1 قرار گرفتند. در گروه دوم جدایه‌های F_3 و N_2 در کنار هم قرار گرفتند. گروه سوم با ١٢ عضو ٦٠ درصد جدایه‌ها را در بر گرفت که شامل جدایه‌های B_2، E_2، C_3، E_1، A_2، F_2، N_4، C_5، B_1، D_1، C_4 و N_1 بود.

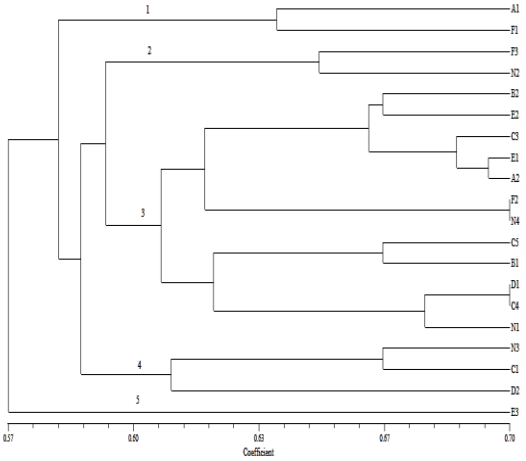
جدول ٧- تجزیه واریانس مولکولی برای جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* f. sp *melonis*

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	6	205.850	34.308	0.000	0%
Within Pops	13	458.750	35.288	35.288	100%
Total	19	664.600	69.596	35.288	100%

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]

گروه چهارم دارای ۳ عضو بوده و جدایه‌های N_3، C_1 و D_2 در این گروه جای گرفتند. گروه پنجم تنها دارای یک جدایه E_3 بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۷) نشان داد که تنوع ژنتیکی بین جدایه های مورد مطالعه در این تحقیق در سطح یک درصد معنی‌دار بود.



شکل ۳- گروه‌بندی جدایه های قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* از مزارع مختلف استان خراسان براساس نشانگر ISSR، با استفاده از روش UPGM.

بحث

بیماری زردی و پژمردگی طالبی و خربزه ناشی از *F. oxysporum* f. sp. *melonis* در غالب کشورها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این بیماری در تمام مناطق مهم خربزه‌کاری استان خراسان رضوی وجود دارد. پراکندگی وسیع این بیمارگر در مناطق جغرافیایی مختلف می‌تواند دلالت بر تنوع ساختار ژنتیکی آن داشته باشد. این تنوع را می‌توان دلیلی بر سازگاری بالای این قارچ در شرایط اقلیمی مختلف دانست (Noruzi et al. 2011; Teimuri et al. 2011; Rabbaninasab et al. 2013).

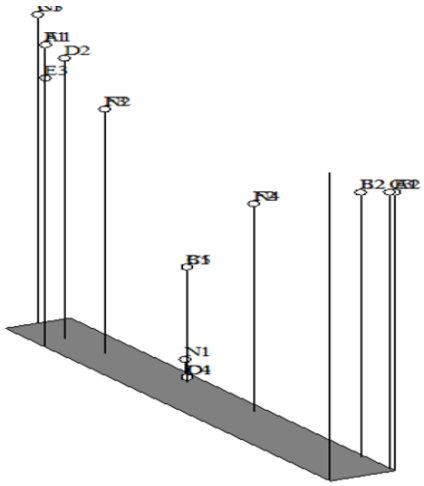
در این تحقیق هدف بررسی و شناسایی تنوع ژنتیکی قارچ عامل پژمردگی خربزه بود که در این راستا ۲۰ جدایه مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی راندمان تولید موتانت‌های نیت جدایه‌ها در محیط کشت MMC و PDC با کلرات پتاسیم ۳ و ٤ درصد کم بوده ولی با استفاده از محیط کشت‌های PDC و MMC ۱/۵ درصد، از تمام جدایه‌ها موتانت بدست آمد. Venter et al. (1992) به کمک محیط کشت PDC ۱/۵ درصد، از تمام جدایه‌های این فرم مخصوص، موتانت نیت بدست آوردند (Rahkhodaii and Farokhi Nejad 2006). Ghale- al. (2003) dezdani et از محیط کشت‌های MMC و PDC، ۱/۵ درصد تعداد اندکی موتانت در فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *tuberosi* جداسازی کردند. Rahkhodaii and Farokhi Nejad (2006) نیز از محیط PDC حاوی سه درصد کلرات پتاسیم برای جداسازی موتانت‌های نیت قارچ *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* استفاده کردند. اکثر محققان برای تولید موتانت‌های نیت از محیط کشت-های حاوی کلرات پتاسیم ۱/۵ درصد استفاده کرده‌اند (Rahkhodaii and Farokhi Nejad 2006).

آنالیز ژنتیکی موتانت‌های نیت گونه Fo با گونه *F. moniliforme* تطبیق داده شده است و سه نوع فنوتیپ نیت در این گونه شناسایی گردیده است (Correll et al. 1987). این فنوتیپ‌ها براساس نحوه رشد موتانت روی منابع مختلف ازت تعیین می-شوند. در این تحقیق اکثر موتانت‌های نیت از نوع nit1 (با فراوانی ٦٨ درصد) بوده و موتانت‌های nit3 (١٤ درصد) و nitM (١٨ درصد) از فراوانی کمتری برخوردار بودند. در بررسی‌های انجام گرفته توسط سایر محققین بر روی این فرم مخصوص فراوانی موتانت‌های nit1 بیشتر از دو فنوتیپ دیگر بود (Elena and Pappas 2006). جهش‌یافتگان nit1 در اثر جهش در ژن‌گاه ساختمانی نیترات ردوکتاز و جهش‌یافتگان nit3 در اثر جهش در ژنگاه تنظیم کننده مسیر اختصاصی جذب نیترات تولید می‌شوند در حالی که nitM بر اثر جهش در حداقل پنج ژنگاه بدست می-آید (Klittich and Leslie 1988). درصد فراوانی کمتر nitM نسبت به nit1 و nit3 را شاید بتوان به احتمال وقوع جهش‌ها نسبت داد و چون nitM احتمال کمتری دارد در نتیجه درصد کمتری را نیز خواهد داشت. در آزمون‌های مکمل‌سازی بین موتانت‌های نیت جدایه‌ها از موتانت‌های nitM در مقابل موتانت‌های nit1 یا nit3 استفاده شد و تشکیل هتروکاریون مشاهده نشد. در این تحقیق از عمل مکمل‌سازی موتانت‌های نیت بیست جدایه، تعداد بیست گروه سازگاری رویشی شناسایی شد. سایر محققین از ۱۹ جدایه این فرم مخصوص، دو گروه سازگاری رویشی شناسایی کرده‌اند (Elena and Pappas 2006). در یک بررسی دیگر ۲۸ جدایه *F. oxysporum* f.sp. *melonis* در چهار گروه سازگار

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]

رویشی قرار دادند (Gennari and Ercole 1994). Parvin (2011) and Farokhi Nejad ۲۵ گروه سازگاری رویشی را در میان ۷۹ جدایه *F. solani* تشخیص دادند. مسلما گروه‌های سازگار رویشی این فرم مخصوص در استان خراسان رضوی فقط محدود به این بیست گروه نمی‌شود، زیرا افزایش دفعات نمونه‌برداری از یک منطقه یا از مناطق دیگر احتمال جداسازی جدایه‌های جدیدی را که در گروه‌های جدید قرار گیرند، فراهم می‌سازد. سیدو معتقد است، عواملی مانند ژنتیک، نحوه تولیدمثل قارچ، تعداد و منابع نمونه‌های قارچی، در تعداد گروه‌های سازگاری رویشی یک گونه یا فرم مخصوص موثر است (Rahkhodaii and Farokhi Nejad 2006). در این تحقیق الگوی خاصی بین پراکنش گروه‌های سازگار رویشی و مناطق جغرافیایی جدایه‌ها مشاهده نشد و هر کدام از جدایه‌ها در یک گروه سازگار رویشی قرار گرفتند، از این رو می‌توان ادعا کرد که جدایه‌های این استان از لحاظ ژنتیکی تفاوت زیادی با هم دارند. اگرچه این موضوع می‌تواند نوید بخش این بررسی باشد که به‌دلیل سابقه طولانی کشت جالیز در استان خراسان وجود تنوع ژنتیکی اجتناب ناپذیر است. بنابراین مطالعات بیشتر در زمینه گروه‌های سازگار رویشی در این فرم مخصوص می‌تواند اطلاعات کاملی از تنوع، ارتباطات و پراکندگی ژنتیکی جمعیت‌های این فرم مخصوص ارائه داده که می‌توان از آن‌ها در امر مدیریت بیماری استفاده کرد.

گروه‌بندی جدایه‌ها براساس گروه‌های سازگاری رویشی ابزار تشخیصی مفیدی را برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌هایی مانند *F. oxysporum* فراهم کرده است اما این روش نیز مانند نشانگرهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی دارای محدودیت‌هایی است (Mahinpoo et al. 2011). به همین دلیل از نشانگرهای مولکولی به علت بررسی مستقیم تنوع در سطح ژنوم و به دلیل اینکه تحت تاثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند و از دقت بالاتری برخوردارند استفاده شد. نشانگر ISSR توانست ۲۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* که هر یک نماینده یک VCG بودند را در سطح تشابه ۷۰ درصد به ۱۸ ژنوتیپ تفکیک کند و نشان داد که گروه‌های سازگاری رویشی نماینده افرادی هستند که از نظر ژنتیکی متفاوتند و هر VCG به لحاظ ژنتیکی با بقیه متفاوت است.



شکل ٤- پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتریس تشابه تطابق ساده برای ۲۰ جدایه قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* از مزارع مختلف استان خراسان براساس نشانگر ISSR.

براساس نتایج به دست آمده در سطح ضریب شباهت ٦٠ درصد کل جدایه‌ها در ٥ گروه اصلی قرار گرفتند. نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که جدایه‌های متعلق به مناطق مشابه در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند و از سایر جدایه‌های مناطق دیگر تفکیک شده‌اند، این امر بیانگر این مطلب است که تنوع ژنتیکی این بیمارگر در استان خراسان رضوی نسبتا زیاد است. دندروگرام نشان می‌دهد که به‌جز موارد محدود بین پراکنش جغرافیایی و گروه‌های ژنتیکی ارتباط مشخصی وجود ندارد. در بین جدایه‌ها، جدایه E_3 در هر خط برش در دندروگرام از لحاظ ژنوتیپی از تمام جدایه‌ها جدا بود. این امر بیانگر این مطلب است که احتمالا این جدایه از نژاد متفاوتی باشد ولی برای اثبات این احتمال باید از آزمون بیماری‌زایی جهت تایید موضوع استفاده کرد. Shafagh et al. (2008) در تحقیق مشابهی، تنوع ژنتیکی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* را با استفاده از مارکر RAPD با استفاده از ۱۵ جدایه در دو استان خراسان رضوی و شمالی بررسی کرده و با در نظر گرفتن ضریب تشابه ٦٠ درصد جدایه‌ها را در هفت گروه ژنتیکی قرار دادند. Rabbaninasab et al. (2013) با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP، ۳۵ جدایه را با سطح تشابه ٦٣ درصد در ۸ گروه ژنتیکی قرار دادند. در تحقیق فوق تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین جدایه‌ها مشاهده شد. با توجه به این‌که تمام جدایه‌های بیماری‌زا متعلق به یک فرم مخصوص بودند، این مطلب نشان‌دهنده این حقیقت است که عامل بیماری از سطح

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]

تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است. قرار گرفتن جدایه‌های یک منطقه جغرافیایی در گروه‌های مستقل ژنتیکی و همچنین قرارگیری دو جدایه از دو منطقه در یک گروه، نشانگر این مطلب است که عامل جغرافیایی با وجود مفید بودن در گروه‌بندی جدایه‌ها نمی‌تواند به عنوان فاکتوری کامل و مستقل در این زمینه مورد استفاده قرار گیرد، زیرا تحت تاثیر فشار انتخابی میزبان و جهش‌های ژنتیکی است. در این بررسی جدایه‌های دارای تیپ رشدی و ویژگی‌های مورفولوژیکی و میکروسکوپی یکسان در گروه‌های مختلف قرار گرفتند. این امر بیانگر این مطلب است که شکل شناسی به تنهایی شاخصی مطمئن برای تمیز دادن بین جدایه‌ها نمی‌باشد (Rabbaninasab et al. 2013). بررسی مولکولی تنوع بالایی را در ساختار *F. oxysporum* f. sp. *melonis* نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که نبود فشارهای میزبان مقاوم نیز در عدم کنترل تنوع در جمعیت بیمارگر نقش داشته باشد.

اصلاح ژنتیکی خربزه برای مقاومت به پژمردگی فوزاریومی با استفاده از تکنولوژی نشانگرهای مولکولی برای افزایش کارآیی انتخاب مفید است (Rabbaninasab et al. 2013). ارزیابی تنوع مولکولی بر اساس شاخص‌های DNA نشان می‌دهد که *melonis* *F.oxysporum* f.sp. گونه‌ای هتروژنوس بوده و تنوع زیادی در آن مشاهده می‌شود (Belabid et al. 2004). با این وجود می‌توان گفت که اگر چه نشانگرهای مولکولی ابزاری مفید برای اهداف تاکسونومیکی می‌باشند، اما کاربرد آن‌ها در کشاورزی زمانی مفیدتر است که با دیگرشاخص‌های بیولوژیکی مثل آزمون بیماریزایی و یا ژنتیکی مانند VCG همراه باشد (Rabbaninasab et al. 2013). همچنین شناسایی تنوع ژنتیکی میزبان می‌تواند در کاربردی نمودن مطالعات تنوع ژنتیکی بیمارگر مؤثر باشد (Rashidi et al. 2008).

منابع

Amani M, Zamanizadeh H.R, Hssanzadeh N, Saboki E, Razaii S (2005) Vegetative Compatibility Groups (VCGs) of *Fusarium oxysporum*, the Causal Agent of Banana Wilt in Balochestan Province. Journal of Agricultural Sciences Islamic Azad University 11: 31-39. (In Farsi).

Ashrafizadeh A, Etebarian H, Zmanyzadh H (2005) Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of Fusarium wilt of melon. Journal of Plant Diseases 41: 35-57. (In Farsi).

Banihashemi Z (2010) Reaction of cucumis melo cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* the cause of melon vascular wilt. Journal of Plant Diseases 46: 11-22. (In Farsi).

Belabid L, Baum M, Fortas Z, Bouznad Z, Eujayl I (2004) Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. African journal of Biotechnology 3: 25-31.

Chehri K, Salleh B, Yli-Mattila T, Reddy K.R.N, Abbasi S (2011) Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. Saudi Journal of Biological Sciences 18: 341-351.

Correll J. C, Klittich C. J. R, Leslie J.F (1987) Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility test. Phytopathology 77: 1640-1646.

Demirci E, Genc T (2009) Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* isolates from weeds in potato fields. Journal of Plant Pathology 91: 671-676.

Development of scar markers and pcr assay for *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 2-specific detection. Journal of Plant Pathology 94: 193-199.

Elena, K, Pappas A.C (2006) Race Distribution, Vegetative Compatibility and Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Isolates in Greece. Phytopathology 154: 250-255.

Farahvash F, Mobasher M (2006) Vegetable production technology. Islamic Azad University of Tabriz Press, Iran. (In Farsi).

Gennari S, D'Ercole N (1994) Determination of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp.*melonis* isolates (*). Phytopathologia Mediterranea 33: 63-70.

Ghale-dezdani H, Falahati Rastegar M, Jafarpour B, Eskandari M. M (2003) Determination of Vegetative Compatibility Groups (VCGs) of *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* in Khorasan Province. Iranian, Journal Agricultural Sciences 34:67-76. (In Farsi).

Grubisha L.C, Cotty P.J (2010) Genetic isolation among sympatric vegetative compatibility groups of the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. Molecular Ecology 19: 269–280.

Hassani Tesie F, Samizadeh Lahiji H, Shoaei Deilami M (2014) Study of genetic diversity among and within types of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) using ISSR markers. Journal of Modern Genetics 1: 1-12. (In Farsi).

Heidarzadeh N, Baghaee Ravari S (2012) Study genetic diversity of causative agent of dry rot in potato using ISSR method. 12 Iranian genetic congrees, 1-6. (In Farsi).

Jacobson D.J, Gordon T.R (1988) Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* F. sp. *melonis*. Phytopathology 78: 668-672.

Karimi E, Safaie N, Shamsbakhsh M (2010) DNA polymorphism among mycelial compatibility groups of *Sclerotinia sclerotiorum* using ISSR marker. Journal of Agricultural Biotechnology.2: 41-55. (In Farsi). Klittich C. I. R, Leslie J. F (1988) Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). Genetics 118: 417-423.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]

Luongo L, Vitale S, Haegi A, Belisario A (2012) Development of scar markers and PCR assay for *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 2-specific detection. Journal of Plant Pathology 94: 193-199.

Mahinpoo V, Farokhi Nejad R, Rajabi Memari H, Bahmani Z (2011) Identification of *Fusarium* root rot from Tuberose (*Polianthes tuberosa L.*) in Dezful region and determination of genetic diversity of dominant species based on RAPD analysis and VCG groups. Journal of Plant Protection 3: 53-71. (In Farsi).

Mousanejad S, Javan Nikkhah M, Mohammadi Goltape E (2005) Characterization of Vegetative Compatibility Groups in Magnaporthe grisea Poulation in Guilan Province, Iran. Iranian, Agricultural Sciences Vol. 36: 305-317. (In Farsi).

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.

Nasre Esfahani M, Shafagh N, Falahati Rastegar M, Malekiyan R (2013) Genetical diversity analysis of Iranian *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* by PCR - RAPD marker. International Journal of Farming and Allied Sciences 2: 1054-1059.

Noruzi Z, Rabbaninasab H, Taghinasab M (2011) Biological control of *Fusarium oxysporum* causal agent wilt of melon using the fungus *Trichoderma* spp and bacterial antagonists in greenhouse conditions. University of Agricultural Sciences and Natural Resource Gorgan.

Parvin M, Farokhi Nejad R (2011) Genetic diversity of *Fusarium* causal agent solani root rot of tomato using vegetative compatibility groups. Journal of Research of Plant Diseases 2: 59-68. (In Farsi).

Powell W, Morgante M, Andre C, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: 225-238.

Puhalla J.E (1985) Classification of strains of Fusarium oxysporum on the basis of vegetative compatibility. Canadian Journal of Botany 63: 179-183.

Rabbaninasab H, Sarvary S, Bakhshi khaniki Gh (2013) Determination of genetic variability of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* isolates in Khorassan Razavi province by AFLP molecular marker. Journal of Iranian Biology 26: 18-27. (In Farsi).

Rahkhodaii A, Farokhi Nejad R (2006) Determining Vegetative Compatibility Groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* and pathogenicity of potato in Fars and Khuzestan provinces. Scientific Journal Agriculture 29: 43-53. (In Farsi).

Rashidi Monfared S, Naghavi M, Hossein zadeh A, Mardi M (2008) Assessment of genetic diversity and identification of native and cultivated genotypes of durum wheat glutenin subunits of heavy use, the protein markers. Journal of Iranian Biology 21: 393-399. (In Farsi).

Rohlf FJ (1998) NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.0. Setauket, NewYork.

Saremi h (1998) Ecology and taxonomy of Fusarium species. Mashhad Jahad Daneshgahi Press, Iran. (In Farsi).

Shafagh N, Falahati- Rastegar M, Jafarpour B (2008) Physiological reces and genetic diversity determination of *Fusarium oxysporum f.* sp. *Melonis* by differential hosts and molecular marker RAPD in Northern and Razavi Khorassan provinces. Research Journal of Biology Science 3:790-793.

Statistics of Iranian agriculture. 2010-2011. Iran's Ministry of Agriculture.

Teimuri S, Rahnama K, Hajian Shahri M, Afzali M (2011) Identification, Distribution and pathogenicity of Fusarium species isolated from root and crown rot of melons in Khorasan Razavi province. Journal of Research of Plant Diseases 2: 33-44. (In Farsi).

Zitkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase reaction amplification. Genomics 20: 176-183.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.5.8]