فنآوری زیستی در کشاورزی/ جلد هفدهم/ شمارهٔ دوم/ پاییز و زمستان ۹۷
DOI: 10.22084/AB.2019.17198.1385

شناسایی گونه‌های *Fusarium* در استان لرستان با استفاده از ناحیه بین ژنی فاصله‌گذار رونویسی‌شونده درونی

Identification of *Fusarium* Species in Lorestan Province by Internal Transcribed Spacer Intergenic Area

سارا سیاهپوش[۱] و مصطفی درویش‌نیا[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۸

چکیده

باتوجه به اهمیت کشت گندمیان در حوزه زاگرس، کشت مکرر و غالب اکثر مزارع این مناطق را گیاهان این خانواده به خود اختصاص می‌دهند. از میان میکروارگانیسم‌های مختلف، گونه‌های قارچ *Fusarium* از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در این محصولات می‌باشند. در سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ با هدف تعیین گونه‌های مختلف *Fusarium* همراه با ریشه و طوقه گندمیان در استان لرستان، از گیاهان زراعی و غیرزراعی مزارع غلات و مراتع مختلف در این استان نمونه‌برداری به‌عمل آمد. نمونه‌برداری از گیاهان دارای علایم پوسیدگی طوقه و ریشه یا تغییر رنگ در این ناحیه انجام و جداسازی عامل قارچی موردنظر با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی صورت گرفت. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از ریخت‌شناسی و کلیدهای شناسایی و تعیین توالی بخشی از ژنوم شامل ناحیه فاصله‌گذار رونویسی‌شونده درونی (Internal Transcribed Spacer) انجام شد. در این مطالعه ۱۳ گونه از جنس *Fusarium* شامل *F. acuminatum*، *F. avenaceum*، *F. crookwellense*، *F. culmorum*، *F. equiseti*، *F. ensiforme*، *F. falciforme*، *F. fujikuroi*، *F. longipes*، *F. nygamai*، *F. proliferatum*، *F. reticulatum*، *F. scirpi*، *F. solani* و *F. tricinctum* شناسایی گردید. نتایج نشان داد گونه *F. proliferatum* بیش‌ترین فراوانی را در این استان دارد. گونه *F. ensiforme* برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شود و برای فلور ایران جدید است. هم‌چنین این نخستین گزارش از *F. falciforme* از ریشه گندم در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی طوقه و ریشه، ریخت‌شناسی، گندمیان، لرستان، *Fusarium*

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
*: نویسنده مسوول Email: mdarvishnia44@yahoo.com

مقدمه

خانواده گندمیان (*Poaceae*) با ۷۰۷ جنس و بیش از ۱۱۰۰۰ گونه از مهم‌ترین گیاهان علفی می‌باشند *کلیتون* و همکاران (Clayton *et al.*, 2006) که بخش بزرگی از اقتصادی‌ترین گیاهان را شامل می‌شود. این گیاهان در سطح وسیعی در دنیا کشت شده و در مقایسه با سایر محصولات زراعی انرژی فراوانی را از منابع نشاسته‌ای، چربی و پروتئینی تأمین می‌کنند. بیمارگرهای قارچی که در چرخه بیماری‌زایی خود دارای یک فاز نکروتروف هستند همچون *Fusarium spp.*، خسارات قابل توجهی به محصول غلات در کل دنیا وارد می‌سازند که سالانه میلیاردها دلار برآورد شده‌است *پاول* و همکاران (Pawell *et al.*, 2017). به‌طورکلی غلات همچون سایر گیاهان مورد حمله بیمارگرهای فراوانی قرار می‌گیرند که قسمت‌های مختلف گیاه ازجمله ریشه، طوقه، ساقه و خوشه را آلوده می‌کنند. یکی از مهم‌ترین این بیمارگرها جنس *Fusarium* است که قارچی با پراکنش بسیار وسیع است و گونه‌های مختلف آن در کلیه مناطق جغرافیایی در سراسر دنیا پراکنده‌اند. این جنس گونه‌های فراوانی دارد که بیش‌تر آن‌ها بیمارگرهای بسیار مهمی در گیاهان متعدد به‌شمار می‌روند *نلسون* و همکاران؛ *لزلی* و *سامرل* (Nelson *et al.*, 1983; Leslie and Summerell, 2006). در جدیدترین بررسی انجمن بین‌المللی بیماری‌شناسان گیاهی، دو گونه از این جنس شامل *F. graminearum* و *F. oxysporum* در بین ۱۰ بیمارگر گیاهی بر اساس اهمیت علمی/اقتصادی به‌ترتیب در جایگاه چهارم و پنجم قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده اهمیت این جنس می‌باشد *دین* و همکاران (Dean *et al.*, 2012). خسارت این قارچ در غلات به‌صورت کاهش کمیت و کیفیت محصول تولیدی در اثر بلایت خوشه بوده و هم‌چنین موجب بلایت گیاهچه، کاهش جوانه‌زنی بذر و پوسیدگی طوقه و ریشه می‌شود که این موارد به نوبه خود موجب کاهش محصول و خسارت غیرمستقیم به آن می‌گردد *مانکولد*؛ *نانژه* و همکاران (Munkvold, 2003; Nganje *et al.*, 2004).

درویش‌نیا و همکاران (2006) براساس خصوصیات مورفولوژیک، ۳۲ گونه فوزاریوم را از تیره گندمیان مراتع کشور جداسازی و شناسایی نمودند. *چهری* و همکاران (2010) نیز براساس مشخصات مورفولوژیکی ۲۹ گونه از بخش‌های مختلف فوزاریوم را از ریشه و ساقه ذرت در استان کرمانشاه شناسایی کردند. *عبادی* (2010) در مطالعات خود به روش مورفولوژیکی و مولکولی، جایگاه فیلوژنتیکی *Fusarium semitectum* را موردبررسی قرار داد. *پوزشی‌میاب* و همکاران (2014) تنوع ژنتیکی *Fusarium culmorum* جدا شده از گندم را با استفاده از ویژگی‌های شکل‌شناسی و آزمایشات مولکولی بررسی نمودند. *داوری* و همکاران (2014) نیز جدایه‌های مرتبط با سنبله گندمیان وحشی را با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی کردند.

در این تحقیق با توجه به اهمیت کشت غلات در استان‌های غربی کشور و خسارت فراوان بیماری‌هایی مانند پوسیدگی‌های طوقه و ریشه، گونه‌های فوزاریوم جدا شده از ریشه و طوقه گیاهان خانواده گندمیان در استان لرستان بررسی و شناسایی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در بهار، تابستان و پاییز ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از مزارع غلات و نیز مراتع استان لرستان انجام شد. نمونه‌های دارای علائم مشکوک به پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

جداسازی جدایه‌ها

به‌منظور جداسازی بیمارگر موردنظر از بافت گیاه و خاک از محیط‌کشت اختصاصی تغییر یافته *نش* و *اسنایدر* (Nash and Snyder, 1962) استفاده شد. پس از رشد کلنی، خالص‌سازی و کشت در محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) انجام شد و نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت تولید اندام‌ها و اسپورهای تیپیک قابل استفاده در شناسایی گونه‌های *Fusarium*، از محیط‌های کشت SNA، KCl، PDA و CLA در تناوب نوری در دمای اتاق و نیز آب‌مقطر سترون جهت تولید کلامیدوسپور استفاده شد.

شناسایی جدایه‌ها به‌روش ریخت‌شناسی

ویژگی‌های بررسی شده جهت شناسایی ریخت‌شناسی عبارت بودند از رنگ و میزان رشد کلنی در محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز- آگار، شکل و اندازه ماکروکنیدی، وجود یا عدم وجود میکروکنیدی و تشکیل در زنجیره یا سر دروغین، نوع سلول کنیدی‌زا (منوفیالید یا پلی‌فیالید) و وجود یا عدم‌وجود کلامیدوسپور. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر *بوث*؛ *گرلاخ* و *نیرنبرگ*؛ نلسون و همکاران؛ *پاسکو*؛ *برجیس* و همکاران؛ *سیفرت*؛ *سامرل* و همکاران؛ *ادونل* و همکاران؛ *لزلی* و *سامرل*؛ *گاکاوا* (Booth, 1971; Gerlach and Nirenberg, 1982; Nelson *et al.*, 1983; Pascoe, 1990; Burgess *et al.*, 1994; Seifert, 1996; Summerell *et al.*,

2003; O'Donnell *et al*., 2004; Leslie and Summerell, 2006; Gagkaeva, 2008) با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی انجام شد.

استخراج DNA

با هدف شناسایی دقیق‌تر و شناسایی جدایه‌های جدید، بخشی از ژنوم شامل ناحیه ITS جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، بافت میسلیومی قارچی با استفاده از محیط‌کشت مایع سیب‌زمینی- دکستروز- براث (PDB) و روش کاغذ صافی و پمپ خلاء تهیه و در فریزر نگهداری شد *ال‌سامارای* و *اشمید* (Al-Samarrai and Schmid, 2000). استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش *ژانگ* و *استفنسون* (Zhong and Steffenson, 2001) انجام شد. محلول به‌دست‌آمده برای نگهداری طولانی مدت در دمای ۲۰°C- قرارداده‌شد.

تکثیر ناحیه فاصله‌گذار رونویسی‌شونده درونی (ITS)

برای تکثیر این ناحیه از آغازگرهای ITS1 و ITS4 استفاده شد *وایت* و همکاران؛ *گاردز* و *برونز* (White *et al*., 1990; Gardes and Bruns, 1993) (جدول ۱).

مقادیر حجمی مواد به‌کار رفته در ترکیب مخلوط PCR به حجم نهایی ۲۵µl به این صورت بود: DNA ژنومی الگو ۳µl، آغازگرهای مستقیم و معکوس هر کدام ۰/۵ µl، مخلوط واکنش ۱/۵mM به حجم ۱۲/۵µl و آب دیونیزه سترون ۸/۵µl. واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA با واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه، واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت۳۰ ثانیه، دورگه‌سازی در ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه (با تکرار ۳۵ چرخه در سه مرحله اخیر)، بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶ دقیقه انجام شد.

به‌منظور مشاهده محصول PCR، الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲۵ درصد انجام گرفت. جهت بررسی وزن باندهای تشکیل شده از نشانگر اندازه DNA یک کیلوبازی (Gene Ruler TM 1Kb DNA Ladder به شماره SM0313) ساخت شرکت آلمانی MBI Fermentas استفاده شد. عکس‌برداری با استفاده از دستگاه Gel Documentation انجام شد *ادونل* و *سیگلنیک* (O'Donnell and Cigelnik, 1997). محصولات تکثیر شده، خالص‌سازی و برای تعیین‌توالی به شرکت پیشگام تهران ارسال شدند. سپس کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas Pro نسخه 1.7.6 و نرم‌افزار Editseq نسخه 5.01 مشاهده، ویرایش و در بانک ژن بلاست یا مشابهت‌سازی شدند *آلتشول* و همکاران (Altschul *et al*., 1997).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی داده‌ها

برای ارزیابی توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به جدایه‌های موردبررسی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی آن‌ها، از نرم‌افزار MEGA6 تحت سیستم عامل ویندوز استفاده شد *تامورا* و همکاران (Tamura *et al*., 2013). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ارزیابی توالی نوکلئوتیدی نواحی ژنی جدایه‌های مختلف و ترسیم درخن فیلوژنتیکی آن‌ها، گونه *F. ventricosum* به‌عنوان گروه خارجی (Outgroup) انتخاب و از روش نیبرجوینینگ (Neighbor-Joining)، *سایتو* و *نی* (Saitou and Nei, 1987) استفاده گردید. برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در دندروگرام حاصل، تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید *فلسنستین* (Felsenstein, 1985).

نتایج

در این بررسی از ریشه و طوقه گیاهان خانواده گندمیان در استان لرستان، ۱۳ گونه فوزاریوم شناسایی و در بانک ژن ثبت گردید که فهرست آن‌ها به همراه کد دسترسی در بانک ژن در جدول ۲ آورده شده‌است. کلیه گونه‌ها از مزارع و مراتع استان لرستان جمع‌آوری شدند. جدایه‌ها به روش ریخت‌شناسی و با استفاده از ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی شناسایی گردیدند. از میان گونه‌های شناسایی شده، گونه‌های *F. ensiforme* با ۲ جدایه از منطقه کوهدشت از ریشه گندم و *F. falciforme* با ۸ جدایه از منطقه ازنا از ریشه گندم برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شوند. بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی به‌ترتیب به گونه‌های *F. proliferatum* با ۱۰۱ جدایه و ۲۵/۲۵ درصد و *F. ensiforme* با ۲ جدایه و ۰/۵ درصد تعلق داشت.

توصیف گونه‌های شناسایی شده

1. ***Fusarium ensiforme*** Samuels *et al.*, Mycologia, 103(6): 1311 (2011)

این گونه سرعت رشد متوسطی دارد به‌طوری‌که پس از یک هفته قطر کلنی در محیط‌کشت PDA به ۳/۴-۳/۲ سانتی‌متر رسید. تولید میسلیوم هوایی به رنگ سفید می‌کند. رنگ پشت پرگنه کرِمی رنگ تا نارنجی است. اسپوردوکیوم پس از حدود ۲ هفته تشکیل می‌شود. ماکروکنیدی‌های شکل گرفته بر روی اسپوردوکیوم، بلند، دارای کمی انحنا، دارای ۷-۳ دیواره، دارای سلول پایه پاشنه‌ای‌شکل مشخص و سلول انتهایی کمی گرد، به اندازه ۶۰/۲-۴۵ × ۶/۵-۴/۵ میکرومتر هستند. کنیدیوفورهای روی میسلیوم‌های هوایی فراوان، صاف و بدون‌انشعاب هستند. میکروکنیدی‌ها تخم‌مرغی بدون دیواره، به اندازه

۱۰-۶/۶ × ۲-۲/۴ میکرومتر هستند. سلول کنیدی‌زا به‌صورت منوفیالید است. این گونه کلامیدوسپورهایی با دیواره صاف و به‌ندرت دارای تزئینات تولید می‌کند (شکل ۱).

شناسایی این جدایه از طریق خصوصیات ریخت‌شناختی با استفاده از مقاله *چهری* و همکاران (2015)، انجام شد. کلیه ویژگی‌های فوق، با منبع ذکر شده انطباق کامل داشتند. این گونه در محیط‌های کشاورزی رشد می‌کند و موجب پوسیدگی‌های طوقه و ریشه می‌شود. نخستین بار توسط *نلیم* و همکاران (Nalim *et al.*, 2011) به‌عنوان گونه مجزا درون بخش *F. solani* شناسایی و معرفی گردید. این گونه از ۲ جدایه از منطقه کوهدشت لرستان از ریشه گندم جداسازی و شناسایی شد. این نخستین گزارش از گونه *F. ensiforme* بر روی گندم در ایران است (SPF361).

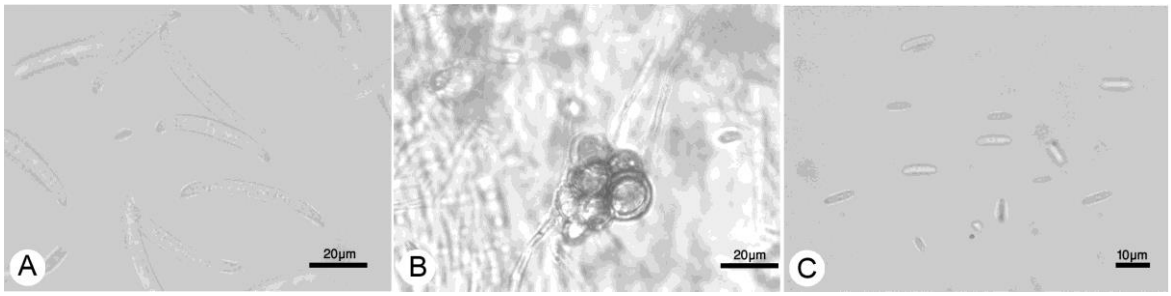
2. ***Fusarium falciforme*** Summerbell and Schroers, Journal of Clinical Microbiology, 40(8): 2872 (2002)

این گونه سرعت رشد سریعی دارد به‌طوری‌که پس از یک هفته قطر کلنی در محیط‌کشت PDA به ۶ سانتی‌متر رسید. میسلیوم هوایی سفید، زرد تا کرِمی‌رنگ است. رنگ پشت پرگنه زرد است. ماکروکنیدی‌های شکل گرفته بر روی اسپوردوکیوم، قایقی‌شکل و دارای ۵-۳ دیواره، با سلول پایه دارای کمی فرورفتگی و سلول انتهایی نوک‌تیز، به اندازه ۴۷-۳۲/۲ × ۴/۶-۳/۶ میکرومتر هستند. کنیدیوفورهای روی میسلیوم‌های هوایی فراوان، کم و بیش صاف و بدون انشعاب هستند. میکروکنیدی‌ها تخم‌مرغی تا لوبیایی‌شکل، ۱-۰ دیواره، به اندازه ۹/۶-۶/۳ × ۵/۵-۳/۲ میکرومتر هستند. سلول کنیدی‌زا به‌صورت منوفیالید است. این گونه دارای کلامیدوسپورهای تکی، دوتایی و توده‌ای است (شکل ۲).

شناسایی این جدایه از طریق خصوصیات ریخت‌شناسی با استفاده از مقاله *سامربل* و *اشرور* (Summerbell and Schroers, 2002) انجام شد. کلیه ویژگی‌های فوق، با منبع ذکر شده انطباق کامل داشتند. این گونه در محیط‌های زراعی به‌صورت رایج رشد می‌کند *سوزا* و همکاران (Sousa *et al.*, 2017) و از برخی مناطق دنیا گزارش شده‌است. نخستین بار توسط *سامربل* و *اشرور* (2002) به‌عنوان گونه مجزا در بخش *F. solani* شناسایی و معرفی گردید. در ایران این گونه توسط *چهری* و همکاران (2014) از خاک‌های زراعی گزارش شده‌است. این گونه به تعداد ۸ جدایه از منطقه ازنا در لرستان از ریشه گندم جداسازی و شناسایی شد. این نخستین گزارش از گونه *F. falciforme* بر روی گندم در ایران است.

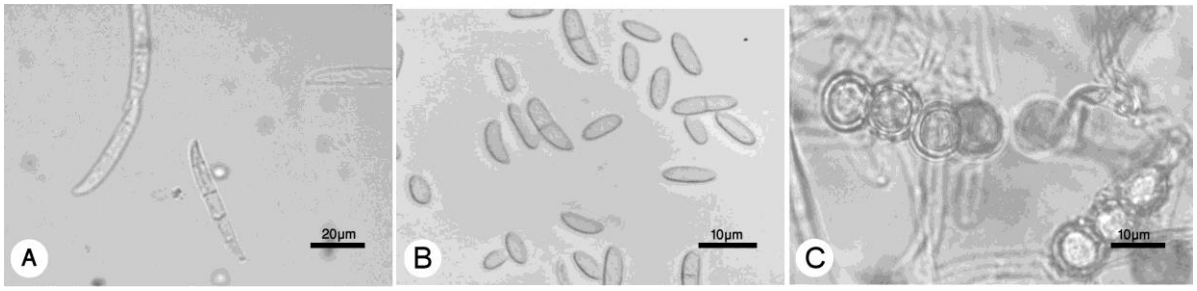
آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌ها

هم‌ردیف کردن توالی‌ها، نشان داد که تنوع و تفاوت‌هایی در بین بخش‌های فوزاریوم و در میان جدایه‌ها وجود دارد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با روش نیبرجوینینگ و با گونه *F. ventricosum* به‌عنوان گروه خارجی انجام و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد (شکل ۳). گونه‌های *Fusarium* شناسایی شده، در دو گروه فیلوژنتیکی اصلی قرار گرفتند. جدایه‌های SPF282 و SPF146، و SPF054 و SPF015 در کنار یکدیگر و همه در مجاورت گونه‌های *F. proliferatum* با ۱۰۰ درصد مشابهت جای گرفتند که با شناسایی ریخت‌شناسی مطابقت کامل دارد. جدایه SPF300 که به روش ریخت‌شناسی گونه *F. acuminatum* شناسایی شد در کنار گونه اخذ شده از بانک ژن با کد دسترسی JX177431 با ۱۰۰ درصد مشابهت قرار گرفت. جدایه SPF207 در مجاورت گونه *F. solani* با ۹۹ درصد مشابهت جای گرفت که گونه شناسایی شده از طریق ریخت‌شناختی را تأیید نمود. جدایه SPF361 که گونه جدید *F. ensiforme* شناسایی شده بود، در کنار گونه بانک ژن با کد دسترسی LT746248 قرار گرفت. جدایه‌های SPF129 و SPF130 از بخش *Martiella* به‌صورت جداگانه در نزدیکی جدایه‌های فوق قرار گرفتند. جدایه SPF010 از بخش *Sporotrichiella* در کنار گونه *F. tricinctum* اخذ شده از بانک ژن با کد دسترسی MG704912 با ۹۹ درصد مشابهت قرار گرفت که با نتایج ریخت‌شناسی مطابقت دارد.



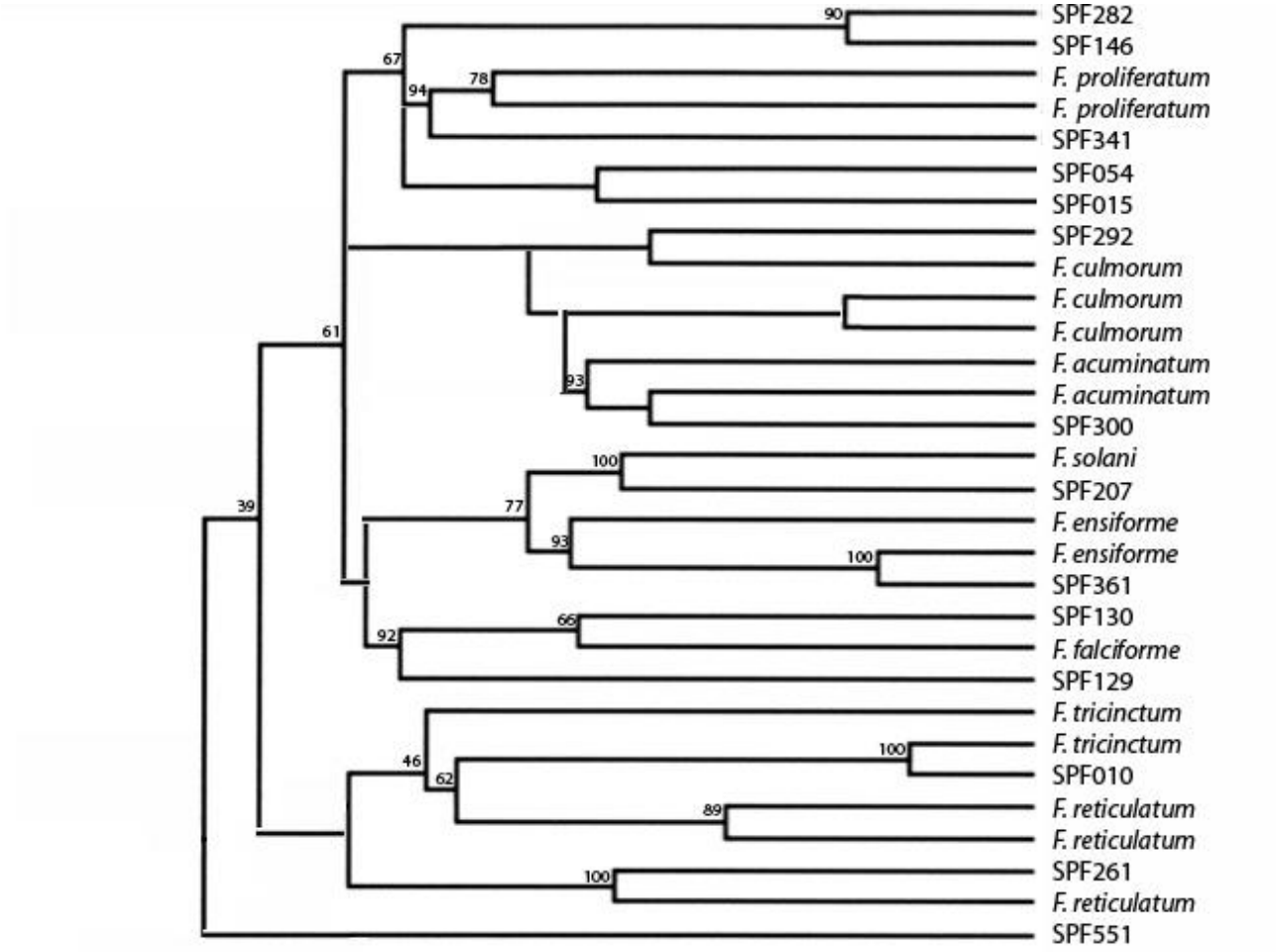
شکل ۱: *Fusarium ensiforme*: A. ماکروکنیدیوم، B. توده کلامیدوسپور C. میکروکنیدیوم

Fig. 1: *Fusarium ensiforme*: A. Macroconidium, B. Chlamydospore clamp, C. Microconidium



شکل ۲: *Fusarium falciforme*: A. ماکروکنیدیوم، B. میکروکنیدیوم، C. کلامیدوسپور

Fig. 2: *Fusarium falciforme*: A. Macroconidium, B. Microconidium, C. Chlamydospore



شکل ۳: دندروگرام جدایه‌های فوزاریومی به‌روش نیبرجوینینگ. کد دسترسی جدایه‌های اخذ شده از بانک ژن داخل پرانتز آورده شده است. اعداد بوت استراپ با هزار تکرار- CI=0.85, RI=0.94

Fig. 3: Dendrogram of *Fusarium* isolates by Neighbor joining method. Codes in parenthesis are accession numbers of gene bank isolates. With 1000 replication of boot strap. CI=0.85, RI=0.94

جدول ۱: توالی آغازگرهای ITS1 (*گاردز و برونز*، 1993) و ITS4 (*وایت* و همکاران، 1990)

Table 1: Primers sequences, ITS1 (Gardes and Bruns, 1993) and ITS4 (White *et al*., 1990)

نام آغازگر Primer name	توالی Sequences
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC

جدول ۲: فهرست گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق به‌همراه کد دسترسی در بانک ژن

Table 3: List of identified species in this research and their accession numbers in gene bank

کد جدایه Isolate	گونه شناسایی شده Species	کد دسترسی Accession number
SPF300	*F. acuminatum*	MH378686
SPF292	*F. culmorum*	MH547033
SPF361	*F. ensiforme*	MH120871
SPF129	*F. falciforme*	MH046062
SPF130	*F. falciforme*	MH379108
SPF341	*F. proliferatum*	MH547046
SPF054	*F. proliferatum*	MH379109
SPF282	*F. proliferatum*	MH547042
SPF015	*F. proliferatum*	MH547120
SPF146	*F. proliferatum*	MH547040
SPF261	*F. reticulatum*	MH547035
SPF207	*F. solani*	MH547034
SPF010	*F. tricinctum*	MH546136

بحث

جنس *Fusarium* تنوع ریخت‌شناسی بالایی دارد که تشخیص گونه‌های مختلف آن را مشکل می‌سازد. برخی از ویژگی‌های گونه‌های مختلف این جنس به‌مرور زمان و در اثر کشت‌های پی‌درپی، تغییر می‌یابند. لذا استفاده از کشت‌های تازه و خالص‌سازی شده، جهت بررسی‌های ریخت‌شناختی امری ضروری است. شناسایی با روش‌های مرسوم ریخت‌شناسی، مستلزم صرف زمان و نیروی انسانی و نیازمند مهارت و تخصص است *لیونس* و همکاران (Lievens *et al.*, 2005). شناسایی برخی از گونه‌های *Fusarium* بر مبنای خصوصیات ریخت‌شناختی گاهی ناقص و بی‌نتیجه است. در چنین مواردی روش‌های مولکولی به‌عنوان شاخص تکمیلی شناسایی بسیار مفید خواهد بود *نورعین‌عزتی* و *صالح* (Nur Ain Izzati and Salleh, 2009). پیشرفت روش‌های فیلوژنتیکی در زمینه شناسایی گونه‌های قارچی مختلف، کمک شایانی به محققین نموده‌است. ناحیه فاصله‌گذار رونویسی‌شونده درونی در تشخیص گونه‌های جنس *Fusarium* و بررسی‌های تاکسونومیکی به مراتب کم‌تر از سایر نواحی همچون ژن EF-1 مورداستفاده قرار گرفته‌است لکن در پژوهش‌هایی که این ناحیه استفاده شده‌است به‌خوبی برای تمایز دادن گونه‌های قارچی نتیجه داده‌است *بریان* و همکاران (Bryan *et al.*, 1995). *گارجا* و همکاران (Gurja *et al.*, 2009) نیز از این ناحیه بین ژنی برای ساخت آغازگرها در شناسایی گونه‌های *Fusarium* استفاده کردند. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق (ITS1 و ITS4) توسط *گارجا* و همکاران (2009) برای شناسایی نژادهای بیماری‌زای *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* به‌کار رفته اند. *تانارسی* و همکارانش (Tunarsih *et al.*, 2015) از داده‌های توالی ناحیه ITS برای شناسایی جدایه‌های فوزاریومی و بررسی‌های فیلوژنتیکی استفاده نمودند. البته در مواردی همچون مجموعه گونه‌ای *F. oxysporum* که حاوی چندین گونه پنهان از نظر ریخت‌شناسی است، توالی این ناحیه ژنی برای تشخیص گونه‌ها کارآیی چندانی ندارد (*تانارسی* و همکاران، 2015). در چنین مواردی استفاده از توالی یک ناحیه ژنی و یک ناحیه بین ژنی به‌صورت توأم توصیه می‌شود *لارنس* و همکاران (Laurence *et al.*, 2014). بسیاری از محققین از نواحی ژنی مختلفی برای تحلیل‌های فیلوژنتیکی گونه‌های *Fusarium* استفاده کرده‌اند. از آن جمله می‌توان این موارد را نام برد: mtSSU rDNA و EF-1α در *F. redolens* و *F. hostae* توسط *باین* و همکاران (Baayen *et al.*, 2001)؛ ITS، mtSSU و EF-1α در *F. oxysporum* و *F. commune* توسط *استوارت* و همکاران (Stewart *et al.*, 2006)؛ ITS، LSU، EF-1α و RPB2 در FSSC و FTSC توسط *ادونل* و همکاران (O'Donnell *et al.*, 2008). *ادونل* و همکاران (2013) با استفاده از RPB1 و RPB2، ۲۲ مجموعه گونه‌ای جدید برای جنس *Fusarium* شناسایی کرده‌اند. *وانگ* و همکاران (Wang *et al.*, 2011)، ناحیه IGS را برای تشخیص جدایه‌های این جنس مفید دانسته‌اند.

در این تحقیق، گونه‌های شناسایی شده به‌روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی، ۱۳ گونه از بخش‌های مختلف بودند به‌این صورت که سه گونه از بخش *Discolor*، یک گونه از بخش *Dlaminii*، سه گونه از بخش *Gibbosum*، دو گونه از بخش *Liseola*، سه گونه از بخش *Solani* و یک گونه از بخش *Sporotrichiella* بودند. بخش *Discolor*، *Gibbosum* و *Solani* هرکدام با سه گونه بیش‌ترین فراوانی و بخش‌های *Dlaminii*، *Roseum* و *Sporotrichiella* هرکدام با یک گونه کم‌ترین فراوانی را داشتند. تنوع میزبانی وسیعی در برخی از گونه‌ها خصوصاً *F. proliferatum* و *F. solani* دیده شد.

در تحقیق حاضر، تجزیه و تحلیل توالی‌های به‌دست آمده از ناحیه ITS جدایه‌ها، بیانگر تطابق صفات ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی گونه‌ها بود. براساس تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی، جدایه‌های مربوط به بخش *Liseola* در دو گروه اصلی که از یک جد منشاء می‌گیرند، قرار گرفته که بیانگر روابط نزدیک فیلوژنتیکی این گروه گونه‌ای می‌باشد، اگرچه تفاوت‌هایی در بین این گروه گونه‌ای وجود دارد و در چند خوشه قرار گرفته‌اند. تحلیل‌های توالی‌های ناحیه ITS جدایه‌های مختلف به‌دست‌آمده در این تحقیق، موجب دسته‌بندی آن‌ها در بخش‌های مختلفی گردید. این گروه‌بندی با بخش‌ها و گروه‌های مشخص شده در منابع معتبر براساس مشخصات ریخت‌شناختی، تطابق دارند.

سپاسگزاری

از مدیریت حفظ نباتات سازمان جهاد کشاورزی استان لرستان به جهت یاری رساندن در انجام این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۶-۱۴ متن انگلیسی مراجعه شود.