

شناسایی فوزاریوم‌های پوساننده ریشه گل مریم در منطقه دزفول و تعیین تنوع ژنتیکی گونه غالب توسط گروه‌های سازگار رویشی و نشانگر مولکولی RAPD

ویدا مهین پو* ، رضا فرخی نژاد

گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

حمید رجبی معماری

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

زینب بهمنی

گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

جهت شناسایی گونه‌ها و جدایه‌های مختلف فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه گل مریم و بررسی تنوع ژنتیکی آنها در شهرستان دزفول نمونه‌برداری از گیاهان آلوده مزارع مختلف این شهرستان انجام گرفت. قارچ‌های وابسته به ریشه با استفاده از روش‌های معمول جداسازی در آزمایشگاه جداسازی گردیدند. جمعاً ۱۴۳ جدایه از جنس فوزاریوم شامل ۱۱۰ جدایه *Fusarium oxysporum*، ۲۷ جدایه *F. solani* و ۶ جدایه *F. equiseti* شناسایی گردید. تنوع ژنتیکی جمعیت *F. oxysporum* با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی و روش RAPD مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی گروه‌های سازگار رویشی ۴۵ جدایه به طور تصادفی انتخاب گردید. سپس جهش یافتگان نیت در محیط Dox Agar و محیط حد اقل (MMC) هر کدام با ۰.۳٪ کلرات پتاسیم تولید شدند. کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیت نیز روی محیط کشت پایه حاوی یکی از چهار منبع ازت (نیترات، نیتريت، هیپوزانتین و تارتارات آمونیوم) تعیین گردید. از کل جهش یافتگان نیت تعداد ۳۰۱، ۱۷۱ و ۷۵ عدد به ترتیب به nit1، nit3 و NitM تعلق داشتند. آزمون مکمل سازی بین جهش یافتگان تمام جدایه‌های انتخابی انجام شد. در نهایت چهار گروه VCG مشخص گردید که VCG a شامل ۲۸ جدایه، VCG b

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.vida79@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۷، تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۰

شامل ۱۰ جدایه، VCG c شامل سه جدایه و VCG d شامل چهار جدایه بود. همچنین تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها با استفاده از سیزده آغازگر تصادفی بررسی شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های RAPD با استفاده از روش‌های UPGMA، Single و Complete انجام گرفت. بهترین نتیجه با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه Dice در سطح تشابه ۶۱٪ به دست آمد که بر این اساس شش گروه ژنتیکی مختلف تشخیص داده شد. گروه I شامل دو جدایه، گروه II حاوی ۱۲ جدایه، گروه III حاوی دو جدایه و گروه IV و V تک عضوی و گروه VI نیز شامل دو جدایه بود. آزمون بیماری‌زایی که با استفاده از جدایه‌های انتخابی از گروه‌های مختلف VCG انجام گرفت نشان داد که تمام جدایه‌ها بیماری‌زا بودند. این مطالعه اولین گزارش از بررسی تنوع ژنتیکی *F.oxysporum* روی گل مریم در ایران می‌باشد.

واژه های کلیدی : هتروکاریون، جهش‌یافتگان نیت، پوسیدگی ریشه، نشانگر مولکولی، فوزاریوم، گل مریم

مقدمه

گل مریم (*Polianthes tuberosa* L.) گیاهی است چند ساله که متعلق به تیره Agavaceae است و یکی از مهمترین گل‌های شاخه بریده در مناطق مختلف جهان محسوب می‌شود (Sing, 2006). یکی از بیماری‌های رایج این محصول در مناطق مورد کشت، پوسیدگی ریشه و پیاز آن است که توسط قارچ خاکزاد *Fusarium oxysporum* Schlecht ایجاد می‌شود اما تاکنون مطالعات کمی در مورد پوسیدگی‌های قارچی این گل از جمله پوسیدگی فوزاریومی در جهان صورت گرفته است که یکی از این گزارش‌ها مربوط به شیوع پوسیدگی فوزاریومی در هندوستان است (Muthukumar, 2007). به منظور کنترل این بیماری روش‌های مختلفی پیشنهاد شده است. بر این اساس برای اعمال روش‌های صحیح مدیریتی، بررسی تنوع ژنتیکی این بیمارگر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا فوزاریوم‌ها از جمله قارچ‌هایی هستند که علی‌رغم نداشتن تولید مثل جنسی از نظر ژنتیکی بسیار ناپایدار می‌باشند. از آنجایی‌که قارچ‌هایی با تولید مثل غیر جنسی مواد ژنتیکی را تنها از طریق نو ترکیبی شبه جنسی مبادله می‌کنند، VCG پیش نیاز تبادل مواد ژنتیکی بین قارچ‌ها محسوب می‌شود (Zainadin *et al.*, 2009). گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس گروه‌های سازگار رویشی ابزار تشخیصی مفیدی را برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها فراهم کرده است 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. از بین آنها نشانگرهای RAPD و AFLP بیشترین کاربرد را دارند. از روش RAPD به عنوان یکی از نشانگرهای مولکولی مهم در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مربوط به نژادها و سویه‌های قارچ‌های مختلف استفاده می‌شود (Martin *et al.*, 1993). این تکنیک به طرز وسیعی برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی در میان

فرم‌های مخصوص و نژادهای مختلف قارچ فوزاریوم به کار گرفته شده است. ارتباط بین نشانگرهای RAPD و VCG در ارزیابی روابط ژنتیکی بین گروه‌های سازگار رویشی بعضی از قارچ‌ها نیز گزارش شده است (Lewinsohn *et al.*, 2001; Woo *et al.* 1998; Zia & Acher, 2001). دستیابی به اطلاعاتی از تنوع بیمارگر و پتانسیل تبادل ژنتیکی آن می‌تواند برای محققان اصلاح نباتات جهت شناخت فنوتیپ مقاومت در برنامه‌های به‌نژادی و تولید ارقام مقاوم سودمند باشد. در مطالعاتی که اخیراً در خوزستان انجام گرفته است تعداد زیادی از جدایه‌های قارچ فوزاریوم از ریشه و طوقه گیاهان مختلف جداسازی گردیده است. با توجه به اهمیت صادراتی گل مریم در خوزستان، کاهش میزان خسارت ناشی از آفات و بیماری‌ها روی این گل ضروری به نظر می‌رسد. به این منظور در درجه اول، شناسایی دقیق عامل بیماری و گونه غالب منطقه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از این تحقیق بررسی میزان تنوع ژنتیکی *F. oxysporum* عامل پوسیدگی پیاز و ریشه گل مریم با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی (VCG) و نشانگر مولکولی RAPD است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

نمونه‌برداری از تیرماه تا آبان ماه سال ۱۳۸۷ از گلکاری‌های مختلف شهرستان دزفول صورت گرفت. بوته‌هایی که دارای علائم زردی و پژمردگی بودند انتخاب شده و از نظر پوسیدگی پیاز تحت بررسی قرار گرفتند. بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه قطعاتی از بافت‌های آلوده جدا گردید و بعد از شستشو و ضدعفونی سطحی در محیط کشت اختصاصی Nash & Snyder کشت گردیدند. برای خالص سازی و تک اسپور کردن از روش مخطط کردن سوسپانسیون اسپور روی محیط کشت آب - آگار (WA) استفاده شد. شناسایی جدایه‌ها روی محیط کشت‌های برگ میخک - آگار (CLA) و سیب زمینی - دکستروز - آگار انجام گردید (Potato-Dextrose-Agar). در این بررسی ویژگی‌های ماکروسکوپی نظیر سرعت و نحوه رشد پرگنه، وجود یا عدم وجود ریشه‌های هوایی و نیز خصوصیات میکروسکوپی مانند اندازه و شکل ماکروکنیدیوم، شکل میکروکنیدیوفور، شکل سلول انتهایی و پایه ماکروکنیدیوم، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم، نوع فیالید، وجود یا فقدان کلامیدوسپور و نیز چگونگی تشکیل آن مبنای شناسایی گونه‌های فواریوم با استفاده از کلید شناسایی برگیز و کلید اینترنتی FusKey بود (Burgers *et al.*, 1994; Seifert, 1996).

تولید جهش‌یافتگان نیت

برای تعیین گروه‌های سازگار رویشی، ۴۵ جدایه به صورت تصادفی انتخاب گردید. برای تولید جهش‌یافتگان نیت از روش توصیف شده توسط Puhalla (1985) استفاده شد. به این منظور ابتدا کشت‌های خالص هر جدایه روی محیط کامل (Complete medium) منتقل شدند. همه کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با تناوب ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت یک هفته قرار گرفتند. سپس هر جدایه با ده تکرار به صورت بلوک‌های میسلیمی دو میلیمتری در مرکز تشتک پتری حاوی محیط PDC یا MMC با درصدهای مختلف کلرات (۴،۳،۱/۵ و ۵ درصد کلرات) قرار داده شد. همچنین از محیط زاپک - کلرات ۳٪ (حاوی ۵۰ میلی گرم رزبنگال) برای تولید سکتور استفاده گردید (Correll et al., 1987; Elias & Cotty, 1994). محیط کشتی که بیشترین راندمان تولید سکتور را داشت انتخاب و برای تولید جهش‌یافتگان سایر جدایه‌ها از آن محیط استفاده به عمل آمد. بعد از ظاهر شدن سکتورها از حاشیه آن‌ها قطعاتی کوچک به محیط کشت حداقل (Minimal medium) منتقل گردید و به مدت چهار تا پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. رشد ظریف، گسترده، بدون اسپور و میسلیم هوایی در این محیط به عنوان مشخصه جهش‌یافتگان نیت در نظر گرفته شد (Correll et al., 1987).

تعیین کلاس فنوتیپی جهش‌یافتگان نیت

به این منظور از چهار محیط کشت که حاوی یکی از چهار منبع نیتروژن یعنی نیترات سدیم، نیتريت سدیم، هیپوزانتین و تارتارات آمونیوم بود استفاده گردید. برای این کار چهار قطعه یک میلیمتری از جهش‌یافتگان نیت از روی محیط حداقل برداشته و به ترتیب روی محیط‌های فوق منتقل و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت چهار روز نگهداری شد. پس از گذشت این مدت، بررسی فنوتیپ جهش‌یافتگان نیت با توجه به ریخت‌شناسی پرگنه قارچ روی این محیط‌ها انجام گرفت و هر کدام در یکی از سه گروه nit3، nit1 و NitM قرار گرفتند (Correll et al., 1987).

آزمون مکمل‌سازی و تعیین گروه‌های سازگار رویشی

قبل از آزمون مکمل‌سازی خودناسازگاری رویشی هر جدایه توسط روش Jacobson & Gordon (1988) تست شد. برای این آزمون در هر تشتک پتری حاوی محیط حداقل، قطعات دو میلیمتری از NitM هر جدایه در برابر قطعات دو میلیمتری از nit1 یا nit3 همان جدایه با فاصله دو سانتیمتر از یکدیگر کشت شدند. پس از گذشت ۷-۱۴ روز 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. برای آزمون مکمل سازی یک قطعه دو میلیمتری از NitM یک جدایه در وسط تشتک پتری قرار داده شد و در چهار طرف آن یک قطعه از nit1 یا nit3 سایر جدایه‌ها در فاصله دو سانتیمتری آن کشت داده شد. در غیاب NitM نیز مکمل‌سازی بین nit1 و nit3 انجام شد. تشکیل هتروکاریون بین پرگنه‌های نیت دو جدایه نشان می‌دهد که این دو جدایه متعلق به یک گروه VCG هستند و عدم تشکیل هتروکاریون نشان دهنده قرارگرفتن دو جدایه در دو گروه متفاوت VCG است (Correll *et al.*, 1987).

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها

تهیه مایه تلقیح و مایه‌زنی پیازها در گلدان : در این روش ابتدا برای تهیه مایه تلقیح دانه‌های گندم مایه‌زنی شدند. برای این کار دانه‌های گندم به خوبی با آب شسته و به مدت ۲۴ ساعت در آب نگهداری شدند. سپس دانه‌ها داخل شیشه‌های مکارتی ریخته شد به طوری که سه چهارم حجم شیشه‌ها را پرکرد. این شیشه‌ها دو روز متوالی به مدت نیم ساعت اتوکلاو شدند. پس از آن یک بلوک از قارچ مورد نظر روی گندم سترون مایه‌زنی شد و در شیشه‌های مکارتی با پارافیلیم پوشیده شد. شیشه‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت دو هفته نگهداری شدند تا قارچ به اندازه کافی رشد کند. سپس شیشه‌ها به یخچال منتقل شدند (Natan, 2002). برای این آزمون پیازهای سالم انتخاب شدند و بعد از شستشو با آب مدتی در دمای اتاق قرار داده شدند تا خشک شده و برای کشت آماده شدند. برای تهیه خاک گلدان نسبت‌های مساوی از شن و ماسه و کود آلی درون پاکت‌های پلاستیکی قرار گرفته و بعد از اتوکلاو کردن هوادهی شد. سپس حدود دو کیلوگرم از خاک در هر گلدان ریخته شد. درون هر گلدان یک عدد پیاز به ازای هر جدایه قارچ قرار گرفت. جهت مایه زنی گیاهان، خاک اطراف ریشه با دقت کنار زده شد و به ازای هر پیاز سه تا پنج دانه گندم آلوده کنار ریشه قرار داده شد. در تیمار شاهد از گندم سترون بدون قارچ استفاده گردید. پس از تلقیح، پیازها تا مدت بیست روز برای بررسی علائم مورد سنجش قرار گرفتند. وجود قارچ در گیاهان مایه زنی شده با برداشت نمونه از قسمت‌های آلوده و کشت در محیط PDA نیز به اثبات رسید.

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها بر اساس روش RAPD

تولید انبوه میسلیوم : تولید توده میسلیومی ۲۰ جدایه انتخابی در محیط کشت مایع PDB (Potato Dextrose Borath) انجام گرفت. چند قرص پنج میلیمتری از حاشیه پرگنه‌های چهار روزه روی محیط PDA به ازای هر جدایه جدا کرده و به فلاسک‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع PDB سترون شده منتقل شد. محیط‌ها در دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس بدون تکان دادن به مدت یک هفته نگهداری شدند. سپس میسلیوم‌ها با استفاده از کاغذ صافی

سترون و پمپ خلا از محیط مایع جدا شده و بعد از شستشو با آب مقطر سترون درون فالكون در چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند (Mahdaviamiri et al., 2009).

استخراج DNA: استخراج DNA طبق روش تغییر یافته Raeder & Broda (1985) انجام گرفت. در این روش ابتدا نمونه‌ها با ازت مایع در هاون سترون پودر شدند و مقدار ۱۰۰ میلی گرم از هر نمونه در لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس ۵۵۰ میکرولیتر بافر استخراج اضافه و لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب داغ در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از این مرحله ۴۰۰ میکرولیتر فنول-کلروفرم و ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۵:۲۴:۱ نیز به آن اضافه گردید و به‌خوبی مخلوط شده و لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد هم اندازه محلول رویی کلروفرم اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مجدداً لایه رویی حاصل جمع‌آوری و به نسبت ۰/۵۴ برابر مایع به دست آمده ایزوپروپانول سرد اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع داخل لوله‌ها خارج گردید. DNA های رسوب کرده با اتانول ۷۰٪ سرد شستشو داده شده و لوله‌ها مدتی در دمای معمولی آزمایشگاه نگهداری شدند تا خشک شوند. برای تهیه محلول DNA به دست آمده ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر سترون به لوله‌ها اضافه گردید. جهت انجام آزمایش‌های مولکولی غلظت DNA کلیه نمونه‌ها ۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر تنظیم شد (Mahdaviamiri et al., 2009; Reader & Borda, 1985).

تعیین کمیت و کیفیت DNA: این مرحله با استفاده از طیف جذبی DNA (روش اسپکتروفوتومتری) صورت گرفت. خلوص DNA به‌دست آمده با محاسبه نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر محاسبه شد. پس از کالیبره کردن دستگاه، داخل کوط به نسبت ۹۸ میکرولیتر آب مقطر سترون و دو میکرولیتر از DNA ژنومی ریخته و میزان DNA ژنومی تعیین گردید. اگر نسبت A_{260}/A_{280} در محدوده ۲-۱/۸ بود جذب صرفاً توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و DNA از کیفیت مطلوبی برای PCR برخوردار است. نسبت‌های کمتر از ۱/۸ نمایانگر این است که نمونه‌ها از لحاظ پروتئین، فنل و یا دیگر جذب‌کننده‌های اشعه ماورای بنفش ناخالصی دارند. غلظت هر نمونه نیز با در نظر گرفتن غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به ازای هر واحد OD (Optical Density) در طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه شد (Edwards et al., 1991).

واکنش PCR: برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت جدایه‌های *F. oxysporum* از ۱۳ آغازگر استفاده گردید (آغازگرهای OPA-01 تا OPA-13). تکثیر DNA در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer 10X، ۰/۷۵ $MgCl_2$ (50Mm)، ۰/۷۵ (10Mm) میکرولیتر مخلوط dNTP، ۱۰ pmol آغازگر، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۰/۳

میکرولیترا آنزیم تک پلیمراز (تهیه شده از شرکت سیناژن) در دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Germany) با برنامه حرارتی دو دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، دو دقیقه در ۹۳ درجه سلسیوس، مرحله اتصال یک دقیقه در ۳۶ درجه سلسیوس، مرحله گسترش دو دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و گسترش نهایی پنج دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس قرار داده شد. در یک واکنش به جای DNA ژنومی آب مقطر سترون اضافه گردید و به این ترتیب امکان وجود آلودگی در واکنش‌های انجام شده کنترل شد. در این آزمون از نشانگر 100 bp DNA Ladder (Fermentas) برای مقایسه وزن مولکولی باندهای تشکیل شده استفاده شد. قطعات تکثیر شده در هر واکنش با استفاده از ژل آگارز ۱٪ درون دستگاه الکتروفورز (پایا پژوهش) با ولتاژ ثابت ۷۰ ولت به مدت یک ساعت و بیست دقیقه از هم تفکیک شدند. نهایتاً ژل در دستگاه Gel Doc (تکنوژن) برای عکسبرداری به کمک نور UV قرار داده شد. در این روش به منظور رنگ آمیزی از DNA Safe Stain (تهیه شده از شرکت سیناژن) استفاده گردید که جایگزینی مناسب برای اتیدیدم بروماید می‌باشد. این ترکیب هنگام درست کردن ژل آگارز به میزان ۲-۵ ماکرولیترا به ژل اضافه می‌گردد (Belabid et al., 2004).

تجزیه و تحلیل داده‌ها : بدین منظور ابتدا باندهای واضح در تصویر ژل‌ها مشخص شد و سپس داده‌ها به صورت حضور باند (۱) و عدم حضور باند (۰) در نرم افزار Excel وارد و سپس ماتریس تشابه بین جفت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه Dice توسط نرم افزار NTSYSpc 2.01 محاسبه شد. در این روش تنها باندهای تکرار پذیر جهت تجزیه و تحلیل انتخاب شدند که چند شکلی نشان داده بودند و مکان‌های تک شکل حذف گردیدند. در این بررسی از روش خوشه‌بندی میانگین حسابی غیر وزنی (UPGMA) در سطح تشابه ۶۱٪ برای رسم دندروگرام استفاده شد.

نتایج

در این تحقیق مجموعاً ۱۴۳ جدایه فوزاریوم از پیاز و ریشه‌های گل مریم از مناطق مختلف شهرستان دزفول به ویژه مناطق جاته و مزارع اطراف مرکز خدمات بنوار ناظر جمع‌آوری گردید. جدایه‌ها بعد از شناسایی در سه گونه قرار گرفتند که عبارت بودند از : *Fusarium solani* (Mart.) Sacc، *F. oxysporum* (Corda) Sacchardo و *Fusarium equiseti* که به ترتیب شامل ۱۱۰، ۲۷ و ۶ جدایه بودند. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته علائم مشاهده شده بیشتر به صورت پوسیدگی، زردی و پژمردگی اندام‌های هوایی بود. بررسی تنوع ژنتیکی این قارچ با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی نشان داد که در محیط MMC حاوی ۱/۵٪ کلرات پتاسیم هیچ گونه سکتوری مشاهده نگردید (شکل ۱).



شکل ۱ - رشد هتروکاریون *F. oxysporum* در آزمون مکمل سازی (اصلی)

Figure 1. Heterokaryon growth of *F. oxysporum* in complementation test

بنابراین از محیط‌های حاوی ۳، ۴ و ۵ درصد کلرات پتاسیم استفاده شد. بیشترین راندمان تولید سکتور نیز در محیط MMC حاوی ۳٪ کلرات پتاسیم مشاهده شد و از این محیط ۱۷۳ سکتور به دست آمد (جدول ۱). با این حال رشد تعدادی از جدایه‌ها محدود نشد. بنابراین به منظور افزایش راندمان تولید سکتور محیط زاپک-کلرات با ۳٪ کلرات به کار رفت. در این محیط به طور قابل ملاحظه ای سکتور تولید گردید. بنابراین برای اکثر جدایه‌ها از این محیط استفاده شد (شکل ۲).

جدول ۱- درصد جهش یافتگان حاصله از جدایه‌های فوزاریوم جدا شده از پیاز و ریشه گل مریم در دزفول

Table 1. The numbers of nit mutants *F.oxysporum* collected from root and bulb of tuberose in Dezful

Medium	MMC	C`zapeck	Total
Chlorate %	1.5	3	5
nit1	0	83	30
nit3	0	67	19
NitM	0	23	5
Total	0	173	54
			320
			547

تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان نیز مشخص کرد که از ۳۲۰ سکتور حاصله در این محیط ۱۱۸۸ nit، ۸۵ nit و NitM۴۷ به دست آمد (جدول ۱). در نهایت پس از آزمون مکمل سازی چهار گروه VCG به دست آمد. بر این اساس ۲۸ جدایه در گروه VCG a، ۱۰ جدایه در گروه VCG b، سه جدایه در گروه VCG c و چهار جدایه در گروه VCG d قرار گرفتند (جدول ۲).



شکل ۲- تشکیل سکتور *F.oxysporum* در محیط زاپک کلرات (شکل از نگارنده)

Figure 2. Sector production of *F.oxysporum* in C`zapeck chlorate medium

جدول ۲- بیماریزایی و گروه‌های سازگار رویشی جدایه‌های *F.oxysporum* جدا شده از پیاز و ریشه گل مریم در دزفول

Table 2. Pathogenicity and VCG groups of isolates of *F.oxysporum* collected from root and bulb of tuberose in Dezful

Isolate	VCG groups	Pathogenicity	Isolate	VCG groups	Pathogenicity
F35	VCG a	No test	F11	VCG a	virulent
F36	VCG a	virulent	F24	VCG a	virulent
F65	VCG a	No test	F40	VCG a	No test
F37	VCG a	virulent	F25	VCG a	virulent
F73	VCG a	virulent	F29	VCG a	No test
F78	VCG a	No test	F113	VCG b	virulent
F97	VCG a	virulent	F16	VCG b	No test
F99	VCG a	virulent	F34	VCG b	No test
F66	VCG a	virulent	F51	VCG b	No test
F59	VCG a	virulent	F3	VCG b	No test
F52	VCG a	No test	F4	VCG b	virulent
F98	VCG a	virulent	F105	VCG b	No test
F92	VCG a	No test	F2	VCG b	No test
F87	VCG a	No test	F15	VCG b	No test
F1	VCG a	No test	F9	VCG b	No test
F21	VCG a	virulent	F20	VCG c	virulent
F5	VCG a	No test	F81	VCG c	No test
F100	VCG a	virulent	F95	VCG c	No test
F18	VCG a	virulent	F27	VCG d	virulent
F54	VCG a	No test	F8	VCG d	virulent
F53	VCG a	No test	F31	VCG d	No test
F22	VCG a	virulent	F48	VCG d	virulent
F45	VCG a	No test			

این نتایج نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی پایین این قارچ در منطقه مورد نظر است که یکی از دلایل این امر می‌تواند به خاطر عدم وجود تولیدمثل جنسی این قارچ باشد. در تولیدمثل جنسی تلاقی در ایجاد تنوع ژنتیکی اهمیت زیادی دارد و با ایجاد افراد نوترکیب در یک جمعیت تنوع ژنتیکی افراد آن جمعیت افزایش می‌یابد. اما در تولید مثل پراجنسی با کاهش احتمال سازگاری رویشی بین جدایه‌ها در حالت تصادفی تنوع در جمعیت کم می‌شود. در این حالت احتمال به وجود آمدن افراد با تنوع ژنتیکی جدید بسیار کم است (Assigbetse et al., 1994). گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس گروه‌های سازگار 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. 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 می‌شود.

آزمون بیماریزایی

در این آزمون علائم جدایه‌ها بسته به نوع جدایه‌ها بین ۱۵ تا ۳۰ روز بعد از تلقیح روی گیاهان ظاهر گردید که به صورت سیاه‌شدن نوک ریشه‌ها، پوسیدگی پیازها، پوسیدگی بالای پیازها و زرد شدن برگ‌ها بود. بعد از مشاهده علائم، از قسمت‌های آلوده روی محیط اختصاصی Nash & Snyder کشت گردید تا از بیماریزا بودن قارچ مورد نظر اطمینان حاصل گردد. کلیه جدایه‌ها بیماریزا بودند اما از نظر شدت بیماریزایی با هم تفاوت داشتند. شدت بیماریزایی در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفت. بر اساس علائم مشاهده شده جدایه‌های F36 و F18 به عنوان بیماریزاترین جدایه در نظر گرفته شدند و باعث پوسیدگی شدید پیاز شدند و جدایه F37 به عنوان ضعیف‌ترین جدایه در نظر گرفته شد.

تعیین تنوع ژنتیکی

در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* از ۱۳ آغازگر به کار رفته، هفت آغازگر باندهای قابل تکثیری تولید کردند (جدول ۳). این آغازگرها شامل OPA-01, OPA-02, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-12 و OPA-13 بودند. آغازگرهای OPA-04, OPA-05, OPA-06 و OPA-07 هیچ گونه باندهای تولید نکردند. آغازگرهای OPA-03 و OPA-11 باندهای ضعیفی را ایجاد کردند. از ۳۸ باند ایجاد شده ۳۰ باند چندشکلی و هشت باند تک شکلی بودند. درصد چندشکلی ۸۷/۹۴ و درصد تک شکلی کل ۲۱/۰۵ درصد بود. تعداد قطعات تکثیر شده با هر آغازگر متفاوت بود. آغازگر OPA-01 دارای بیشترین تعداد باندهای تکثیر شده و آغازگر OPA-13 دارای کمترین باندهای تکثیر شده بود. میانگین تعداد

باند‌های تکثیر شده چند شکل به ازای هر آغازگر برابر با ۷۶/۸۵٪ بود. همچنین اندازه قطعات تکثیر شده در آغازگرها در محدوده ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز بود.

جدول ۳- توالی آغازگرها و درصد پلی‌مورفیسم باند‌های تکثیر شده *F. oxysporum* جدا شده از پیاز و ریشه گل مریم در دزفول

Table 3. Primers sequences and major random amplified polymorphic DNA fragments generated from the *F. oxysporum* isolates collected from root and bulb of tuberose in Dezful

Primer	sequence	Polymorphic bands	Total bands	Polymorphism %	The size of band (bp)
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	8	9	88	200-1000
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	3	5	60	100-700
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	-	-	-	-
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	-	-	-	-
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	-	-	-	-
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	-	-	-	-
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	-	-	-	-
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'	3	4	75	100-700
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'	3	5	60	100-1500
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	4	5	80	100-1000
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	5	6	83	100-1200
OPA-12	5'-TCGGCGATAT-3'	-	-	-	-
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	4	4	100	100-700

نتایج تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی

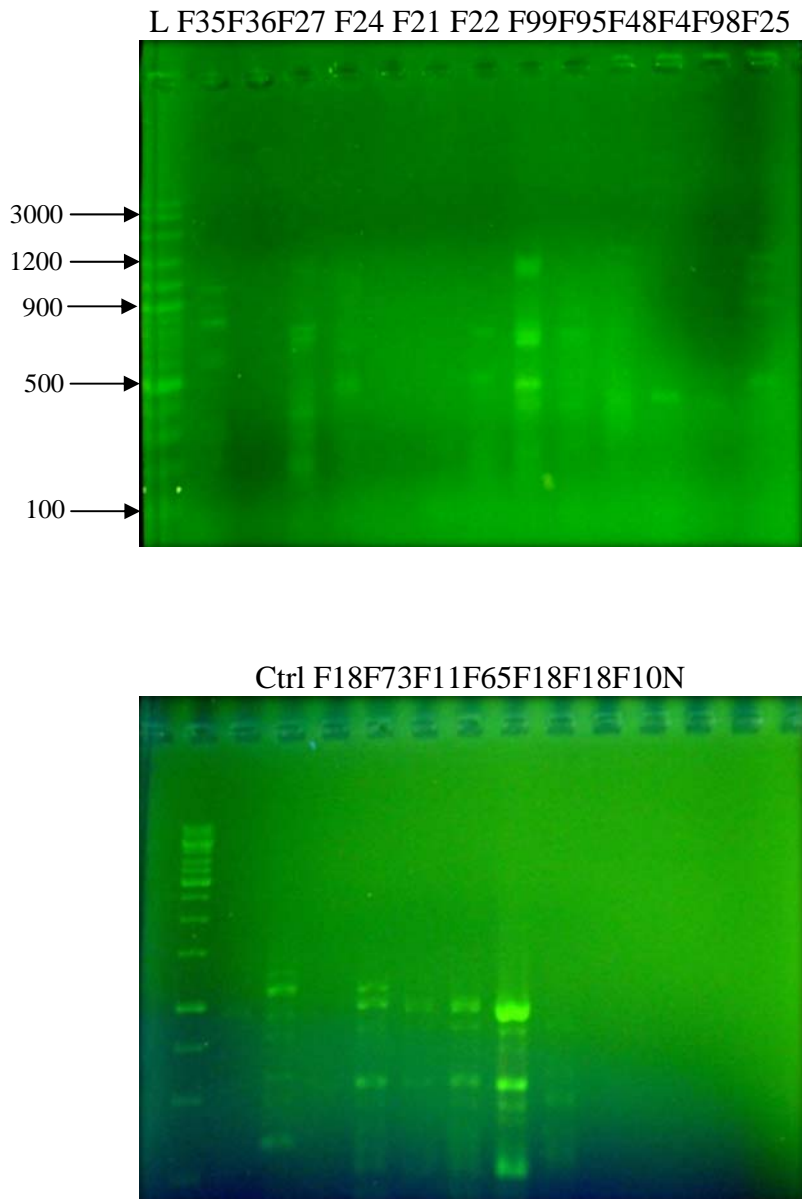
در این روش بیشترین تشابه ژنتیکی بر اساس داده‌های حاصل از ماتریکس تشابه بین جدایه‌های F22 و F59 (۰/۹۰۹۰۹۰۹) و کمترین تشابه بین جدایه‌های F37 و F4 (۰/۳۲۰۰۰۰) بود. ضریب همبستگی کوفنتیک (Cophenetic) در این روش برابر با ۰/۷۹۴۳۱ بود. برش دندروگرام در سطح تشابه ۰/۶۱ جدایه‌ها را به شش گروه تقسیم کرد. گروه I شامل جدایه‌های F48 و F4، گروه II شامل جدایه‌های F100، F18، F24، F97، F11، F113، F73، F25 و F8، F59، F22، FO36، گروه III شامل جدایه‌های F99 و F27، گروه IV شامل جدایه F20، گروه V شامل جدایه F21 و گروه VI شامل جدایه‌های F37 و F66 بود. در بین جدایه‌ها، جدایه F20 که متعلق به گروه VCG و گروه ژنتیکی IV می‌باشد در هر خط برش در دندروگرام از لحاظ ژنوتیپی جدا از تمام جدایه‌ها بود و یک جدایه Outgroup محسوب می‌شود و احتمال دارد از فرم مخصوص متفاوتی باشد ولی برای اثبات این احتمال باید از تعیین توالی (Sequencing) جهت تایید موضوع استفاده کرد.

مقایسه گروه‌های VCG با گروه‌های ژنتیکی

در بررسی‌هایی که به منظور مقایسه گروه‌های VCG و نتایج حاصل از گروه بندی ژنوتیپی صورت گرفت مشخص شد که دو جدایه F22 و F59 که دارای بیشترین تشابه ژنتیکی اند هر دو در گروه ژنتیکی II و گروه VCG a قرار دارند. در گروه I جدایه‌های F48 و F4 به ترتیب متعلق به گروه‌های VCG d و VCG b بودند. در گروه II نیز تطابق کامل بین نتایج آزمون RAPD و VCG وجود نداشت. در این گروه از ۱۲ جدایه ۱۰ جدایه دارای گروه VCG a بودند ولی جدایه F113 دارای گروه VCG b و جدایه F8 در گروه VCG d بودند. در گروه III نیز این تطابق دیده نشد و جدایه F99 متعلق به گروه VCG a و جدایه F27 متعلق به گروه VCG d بود. گروه IV و V هر دو تک عضوی و در گروه VI نیز هر دو جدایه F37 و F66 متعلق به گروه VCG a بودند.

با توجه به نتایج ذکر شده می‌توان چنین استنباط نمود که نشانگر RAPD توانسته است تا حدی گروه‌های سازگار رویشی را از هم تفکیک کند و در برخی موارد اعضای یک گروه سازگار رویشی در یک گروه قرار گرفتند و این موضوع قرابت ژنتیکی آنها را به اثبات می‌رساند. محاسبه ضریب تشابه نیز نشان داد که جدایه‌های مربوط به یک VCG از ضریب تشابه بالاتری نسبت به جدایه‌های گروه‌های مختلف برخوردارند. وجود شش گروه ژنتیکی در یک منطقه جغرافیایی و همچنین عدم تولید مثل جنسی این قارچ می‌تواند دلیلی بر پایین بودن تنوع ژنتیکی قارچ مورد نظر در این منطقه باشد. هر چند عواملی چون بروز جهش‌های احتمالی و تولیدمثل جنسی نقش مهمی در ایجاد تنوع ایفاء می‌کنند.

بعضی از اعضای دو گروه سازگار رویشی VCG b و VCG d در چند مورد در یک گروه ژنوتیپی قرار گرفتند. این موضوع نشان می‌دهد که این دو گروه به مراتب از قرابت ژنتیکی بالاتری در مقایسه با سایر گروه‌های VCG مورد مطالعه برخوردار هستند. شاید بتوان منطقه جغرافیایی یکسان و احتمال مهاجرت اندام‌های قارچی بین دو جمعیت فوق را دلیلی بر قرابت ژنتیکی نزدیک آنها معرفی کرد. می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً این گروه‌ها از یک منبع مشترک منشاء گرفته‌اند. بررسی الگوی باندی نیز نشان داد که تقریباً افراد متعلق به یک VCG الگوی باندی مشابهی را تولید کردند.



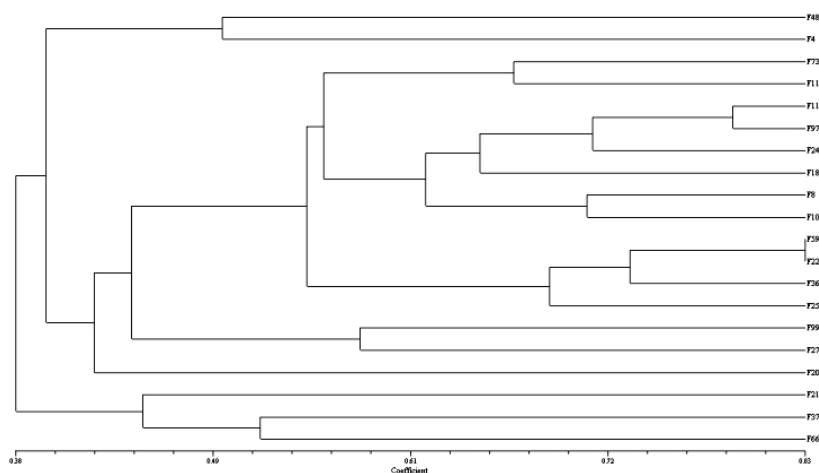
شکل ۳- الگوی RAPD به دست آمده از ۲۰ جدایه انتخابی فوزاریوم جدا شده از پیاز و ریشه گل مریم در دزفول با استفاده از آغازگر OPA-01

L: سایز نشانگر مولکولی، ستون‌های ۱ تا ۲۰ نام جدایه‌ها، N: شاهد منفی

Figure 3. RAPD pattern obtained from 20 isolates of *F. oxysporum* collected from root and bulb of tuberose in Dezful with OPA-01

L: Molecular marker, 1-20: isolates, N: control

F25(VCG a), F36(VCG a), F27(VCG d), F24(VCG a), F21(VCG a), F22(VCG a), F99(VCG a), F4(VCG b), F8(VCG d), F18(VCG a), F73(VCG a), F11(VCG a), F66(VCG a), F59(VCG a), F100(VCG a), F97(VCG a), F37(VCG a), F113(VCG b), F20(VCG c), F48(VCG d)



شکل ۴- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های ۲۰ جدایه *F. oxysporum* جدا شده از پیاز و ریشه گل مریم در دزفول بر اساس ضریب تشابه Dice

Figure 4. UPGMA clustering analysis of RAPD data of 20 isolates of *F.oxysporum* collected from root and bulb of tuberose in Dezful by Dice Coefficient

بحث

با توجه به بررسی‌های صورت گرفته در مزارع گل مریم در شهرستان دزفول، علائم مشاهده شده بیشتر به صورت زردی و پژمردگی اندام‌های هوایی بود. این علائم مشابه با علائم گزارش شده از ایالت Tamil Nadu در هندوستان بود که به صورت پوسیدگی ازگردن پیازها شروع شده و به سمت پایین امتداد می‌یابند. گیاهان دچار کوتولگی شده و گلدهی کاهش می‌یابد. تغییر رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز نیز بر روی پیازها مشاهده می‌شود (Muthukumar et al., 2006). گزارش‌های زیادی در سایر مناطق جهان در رابطه با شیوع قارچ *F. oxysporum* روی این گل موجود نبود و تنها در ایالت کارولینای شمالی و هندوستان اطلاعات مختصری در رابطه با شیوع پوسیدگی ریشه ناشی از گونه‌های *F. solani* و *F. equiseti* گزارش شده است (Grand & Vernia, 2004; Muthukumar et al., 2006). این بررسی اولین گزارش رسمی در مورد وقوع پوسیدگی فوزاریومی گل مریم در ایران است. نتایج این تحقیق مشابه با بررسی‌های Rahkhodaei & Farokhi Nejad (2007) در مورد تعیین گروه‌های سازگار رویشی قارچ‌های *F. solani* و *F. oxysporum* بود و همانند تحقیق حاضر در محیط MMC حاوی ۱/۵٪ کلرات پتاسیم سکتوری تولید نشد. در بررسی انجام گرفته توسط Jelodar (2009) نیز بیشترین راندمان تولید سکتور از محیط زاپک- کلرات حاوی ۳٪ کلرات پتاسیم به دست آمد اما بر خلاف تحقیق حاضر (Norasmofrad et al., 2005) در تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ عامل بوته میری زیره سبز (*F. oxysporum*) نشان داد که تولید سکتور در محیط PDC راندمان بیشتری داشت.

در بررسی تنوع ژنتیکی نتایج حاصل از RAPD و آزمون VCG نیز در مواردی نزدیک به هم بود. بنابراین این نشانگر توانسته است بخشی از تنوع را نشان دهد. از جمله دلایل این امر این است که این نشانگر کل ژنوم را پوشش نمی‌دهد. همچنین برخی از خصوصیات مورفولوژیک در RAPD بروز پیدا نمی‌کند، اما به احتمال زیاد افزایش تعداد آغازگرها و افزایش تعداد جدایه‌ها قادر به حل این موضوع است. بنابراین نوع نشانگرها باید به نحوی باشد که بتوانند تا حد زیادی کل ژنوم را پوشش دهند. نتایج تحقیق حاضر مشابه با تحقیقی بود که در استرالیا در مورد بررسی تنوع ژنتیکی *F. oxysporum* روی گل میخک انجام گرفت که با مطالعه تنوع درون گروه‌های سازگار رویشی نشان داده شد که در اکثر موارد اعضای یک گروه سازگار رویشی در یک گروه ژنوتیپی قرار می‌گیرند زیرا در تحقیق حاضر نیز با در نظر نگرفتن گروه‌های تک عضوی و ملاک قرار دادن گروه دوم با ۱۲ عضو به عنوان بزرگترین گروه این نتیجه حاصل خواهد شد (Kalc Wright et al., 1996). VCG a بزرگترین گروه در بین گروه‌های چهارگانه VCG بود و بیش از نیمی از جدایه‌ها متعلق به این گروه بودند. این گروه در سطح تشابه ۶۱٪ یک گروه بزرگ منسجم را تشکیل داد که نشان دهنده غالبیت این گروه است. این امر همچنین در مورد گروه ژنوتیپی II که اکثریت جدایه‌های VCG a متعلق به آن بودند صادق بود. همچنین جدایه‌هایی با بیشترین بیماری‌زایی در یک گروه ژنوتیپی و یک گروه VCG قرار گرفتند و جدایه‌هایی با بیماری‌زایی کم دارای گروه‌های VCG و ژنوتیپی متفاوتی نسبت به آنها بودند. می‌توان چنین استنتاج کرد که بین بیماری‌زایی و گروه ژنتیکی ارتباط مستقیمی وجود دارد اما با توجه به اینکه شدت بیماری‌زایی در این تحقیق اندازه‌گیری نشد اثبات این امر نیازمند افزایش تعداد آزمایشات، جدایه‌ها و مقایسه داده‌های آماری حاصل از اندازه‌گیری شدت بیماری‌زایی با نتایج حاصل از آزمون RAPD می‌باشد. مطالعه Dastjerdi et al. (2005) نشان داد که گروه‌های VCG نقش مهمی را در مقایسه با مناطق جغرافیایی در ایجاد پلی‌مورفیسم ایفا می‌کنند. مقایسه یافته‌های موجود نشان می‌دهد که RAPD و VCG هر دو می‌توانند درجه‌ای از تنوع ژنتیکی را نشان دهند. اما با این حال VCG میزان تشابه بین افراد گروه‌های مختلف و یا افراد داخل یک گروه سازگار رویشی را مشخص نمی‌کند. در حالی که نشانگرهایی مانند RAPD نه تنها قادر به شناسایی ارتباطات درون گونه‌ای و بین گونه‌ای بوده بلکه می‌توانند تنوع درون و بین گروه‌های داخل یک گونه را نیز نشان دهند (Woo et al., 1998). ارتباط بین نشانگرهای RAPD و VCG در ارزیابی روابط ژنتیکی بین گروه‌های سازگار رویشی بعضی از قارچ‌ها نیز گزارش شده است. مثلاً Woo و همکاران در تحقیقات خود روی قارچ *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* نشان دادند که بین الگوی باندی RAPD یا RFLP با VCG رابطه‌ای وجود دارد و جدایه‌هایی که در یک VCG قرار نگرفته بودند الگوی باندی یکسانی نیز در RAPD تولید نکردند (Woo et al., 1998). مشاهده باندهای DNA مشترک

بین دو جدایه مربوط به یک گروه سازگار رویشی، نشانگر وجود همولوژی ژنتیکی زیاد بین آنهاست. به نظر می‌رسد ارتباط مستقیمی بین بیماریزایی، VCG و گروه‌بندی ژنوتیپی وجود دارد ولی این ارتباط حداقل در مورد نشانگر RAPD به‌طور کامل نیست و استفاده از نشانگرهای دیگر که بتواند کل ژنوم این گیاه را در بر گیرند می‌تواند درک کاملتری از ارتباط بین این سه عامل را به ما بدهد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و نیز همکاری اعضای محترم گروه گیاه‌پزشکی و گروه زراعت و اصلاح نباتات این دانشگاه جهت همکاری در اجرای تحقیق قدردانی می‌گردد.

منابع

- Assigbetse, K. B., Fernandez, D., Dubois, M. P., & Geiger, J.P. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races 123 on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology*, 84:622-626.
- 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(1): 25-31.
- Burgess, L.W., Summerrell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. & Backhouse, D. 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3th.ed, University of Sidney, Australia.
- Correll, J.C., Klittich, C.J.R. & Leslie, J.F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*, 77: 1640-1646.
- Dastjerdi, R., Mozafari, G., Falahatirastgar, M. & Jafarpour, B. 2005. Investigation on genetic diversity of vegetative compatibility groups of *F.oxysporum* f.sp. *betae* in sugar beet fields using RAPD marker in Khorasan province. *Applied Entomology and Phytopathology*, 1(72): 1-17.
- Edwards, K., Johnstone, C. & Tompson, C.A. 1991. Simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19:1394.
- Elias, W. H. & Cotty, P.J. 1994. Rose Bengal amended medium for selecting nitrate-metabolism mutant from fungi. *Canadian Journal of Botany*, 73: 680-682.
- Grand, L.F. & Vernia, C. F. 2004. Fungi on plants in North Carolina. North Carolina State University. Available online from URL: <http://www.cals.ncsu.edu>. Course/pp 318/fungus.pdf.
- Jacobson, D. J. & Gordon, T. R. 1988. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Phytopathology*, 78:668-672.
- Jelodar, A. 2009. *Isolation and identification Fusarium species associated with Corn and investigation of genetic diversity among dominant species population using vegetative*

- compatibility groups in Khuzestan province*. M.Sc. Thesis, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
- Kalc Wright, G. F., Guest, D. I., Wimalajeewa, D. L. S. & Van Heeswijck. 1996. Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *European Journal of Plant Pathology*, 102(5): 451-457.
- Leslie, J.F. & Sumerrell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 3th ed, Blackwell.
- Lewinsohn, D., Nevo, E., Wasser, P.S., Hadar, Y. & Behara, V. 2001. Genetic diversity in population of the *Pleurotus eryngii* complex in Israel. *Mycological Research*, 105(8): 941-951.
- Mahdaviamiri, M., Razavi, M., Sharifi, K. & Zare, R. 2009. Investigation on genetic diversity of *Fusarium oxysporum* causal agent of potato Fusarium wilt using pathogenicity test and RAPD marker. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 45(1): 9-24.
- Martin, M.G., Simon, C.J. & Nuehlbauer, F.J. 1993. Use of random amplified polymorphism DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. *Phytopathology*, 83: 612-614.
- Muthukumar, A. 2007. Occurrence of tuber rot (*Fusarium oxysporum*) of Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) in Tamil Nadu. *Mycology and Plant Pathology*, 37:1.
- Muthukumar, A., Karthikeyan, G. & Prabakar, K. 2006. Management of tuber rot (*Fusarium oxysporum*) of Tuberose (*Polinthes tuberosa* L.). *Madras Agriculture Journal*, 93(1-6):132- 134.
- Natan, P. 2002. Evaluation of inoculation Methods to determine disease responses of cultivated and native cultivars to *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. An Astralian National Botanic Gardens. Available online from URL: <http://www.anbg.gov.au>.
- Norasmofrad, N., Farokhi Nejad, R. & Alizadae, A. 2005. Genetic diversity in populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, the causal agent of cumin wilt in Khorasan using vegetative compatibility groups. *Plant Diseases*, 41(1): 437-453.
- Puhala, J.E.1985. Classification of strain of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, 63: 179-183.
- Rahkhodayi, A. & Farokhi Nejad, R. 2007. Determination of vegetative compatibility groups among population of *F.oxysporum* f.sp. *tuberosi* and their pathogenicity on potato in Fars and Khuzestan provinces. *Scientific Journal of Agriculture*, 29(2): 43-53.
- Reader, U. & Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letter of Applied Microbiology*, 1: 17-20.
- Seifert, K. 1996. Fusarium Interactive Key. Agriculture & and Agri-Food Canada Available online from URL: <http://res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html>.
- Sing, A.K. 2006. *Flower Crop: Cultivation and Management*. New India Publishing. India.
- Woo, S.L., Zonia, A., Sorbo, G., Lorito, M.D., Scalan, B.F. & Novliell, C. 1998. Charecterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* by pathogenic race, VCG, RFLP and RAPD. *Phytopathology*, 89: 966-973.

- Xia, Z. & Achar, N. 2001. Random amplification polymorphic DNA and polymerase chain reaction markers for the different ion and detection of *Stenocarpella maydis* maize seeds. *Phytopathology*, 149: 35-44.
- Zainadin, N.A., Ismail, N.A., Mohamadnor, N.M., Razak, A.A., Nordahliawate, S., Sedique, M. & Salleh, B. 2009. Nitrate nonutilizing mutant and vegetative compatibility groups of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium sacchari* isolated from Rice in the Peninsular Malaysia and Kolimantan, Indonesia. *Journal of Plant Protection*, 49(2): 229-23.