

تنوع بیماری‌زایی و ژنتیکی جدایه‌های *Fusarium solani* و ارتباط آن با پوسیدگی ریشه چغندر قند

Pathogenic variability and genetic diversity of *Fusarium solani* isolates and its association with sugar beet root rot

سارا آشنا*^۱، حمید رضا زمانی‌زاده^۲ و سید باقر محمودی^۳
تاریخ دریافت: ۸۶/۹/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۹

س. آشنا، ح. ر. زمانی‌زاده و س. ب. محمودی. ۱۳۸۷. تنوع بیماری‌زایی و ژنتیکی جدایه‌های *Fusarium solani* و ارتباط آن با پوسیدگی ریشه چغندر قند. مجله چغندر قند ۲۴(۱): ۷۷-۹۵

چکیده

از ریشه‌های چغندر قند دارای علائم پوسیدگی، از مناطق چغندرکاری مختلف کشور، یکصد جدایه قارچی جداسازی شد. از بین آن‌ها، ۲۰ جدایه براساس خصوصیات ریخت‌شناسی متعلق به *F. solani* بودند. بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه روی ریشه‌های چغندر قند انجام شد. جدایه‌های مورد بررسی به گروه‌های بیماری‌زا، بیماری‌زایی کم و غیربیماری‌زا دسته‌بندی شدند. جدایه‌های *F. solani* در گلخانه روی بوته‌های ۱۴ هفته‌ای قادر به ایجاد بیماری نبودند اما روی ریشه‌های زخم شده علائم بیماری را نشان دادند. تنوع ژنتیکی ۲۰ جدایه *F. solani* با روش ITS-rDNA با کمک جفت آغازگرهای ITS 1/4 مطالعه شد. آغازگرهای مذکور در تمام جدایه‌ها منجر به تکثیر قطعات DNA شدند. جدایه‌ها با توجه به الگوی نواری به سه گروه یک نواری (۵۵۰ یا ۶۰۰ جفت باز)، دو نواری (۵۵۰ و ۶۰۰ جفت باز) و سه نواری (۵۵۰، ۶۰۰ و ۶۰۰ جفت باز) تقسیم‌بندی شدند. برش محصولات تکثیری با آنزیم‌های برشی *Msp1*, *EcoR1*, *BamH1* نشان داد که آنزیم *BamH1* فاقد محل برش در قطعات تکثیری بود. الگوی حاصل از آنزیم *EcoR1* برای همه جدایه‌ها یکسان بود و این آنزیم دارای یک محل برش در کلیه جدایه‌ها بود. برای الگوی برش آنزیم *Msp1* جدایه‌ها دارای تنوع بودند. در برخی از جدایه‌ها یک محل برش و در برخی دیگر بیش از یک محل برش وجود داشت. ارتباطی بین بیماری‌زایی، منطقه جغرافیایی و تنوع حاصل از آنالیز ITS-rDNA مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم برشی، تنوع بیماری‌زایی، *Fusarium solani*، ITS-rDNA

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات - تهران * نویسنده مسئول

Sara.Ashena@gmail.com

۲- استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات - تهران

۳- استادیار مؤسسه تحقیقات چغندر قند - کرج

مقدمه

تا به حال تحقیقات وسیعی در زمینه بیماری پوسیدگی ریشه چغندر قند در جهان انجام شده است و عوامل بیماری‌زا متعددی نیز گزارش گردیده‌اند. بیماری زردی فوزاریومی یا پژمردگی آوندی چغندر قند اولین بار از ایالت کلرادو آمریکا گزارش شد (Stewart 1931).

راپل (Ruppel 1991) نیز در بررسی گونه‌های مختلف فوزاریوم که از چغندرها بیماری جدا شده بود گونه‌های *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. solani* و *F. oxysporum* را معرفی کرد. گونه‌های *F. avenaceum* و *F. moniliforme* نیز به عنوان عوامل مرگ گیاهچه چغندر قند معرفی شده‌اند (Cook and Scott 1993). گونه *F. oxysporum* به عنوان عامل پوسیدگی نوک ریشه در چغندر قند از ایالت کلرادو و مونتانا گزارش شده است (Hanson 2006).

در ایران گونه‌های مختلف فوزاریوم از مناطق چغندرکاری کشور جداسازی و گزارش شده‌اند. پوسیدگی ریشه چغندر قند اولین بار در تیرماه ۱۳۴۳ از اصفهان گزارش شد و خسارت آن تا ۳۰ درصد برآورد گردید (بهداد ۱۳۶۹). این بیماری در مزارع کرج، فارس، خراسان، کرمانشاه، همدان، یاسوج، ممسنی و قزوین مشاهده شده است (بهداد ۱۳۶۹). ایرانی و ارشاد (۱۳۷۴)، از چغندرکاری‌های آذربایجان غربی، قارچ‌های *F. solani* و *F. oxysporum* را جدا کردند که بیشترین فراوانی مربوط به پوسیدگی فوزاریومی ناشی از *F. solani* از مناطق خوی، میان‌دوآب و ارومیه به ترتیب ۴۲، ۳۸ و ۳۵ درصد گزارش شد.

عباسی مقدم و همکاران (۱۳۷۷) بیماری‌زایی گونه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* جدا شده از مزارع چغندر قند در خراسان، در مرحله گیاهچه‌ای و روی گیاهان ۱۰ هفته‌ای چغندر قند بررسی کردند. بیماری‌زایی *F. solani* و *F. oxysporum* روی ریشه‌های چغندر قند در شرایط سیلو نیز بررسی و قارچ‌های مذکور به عنوان عوامل پوسیدگی انباری چغندر معرفی شده‌اند (شیخ‌الاسلامی و همکاران ۱۳۷۷). گونه‌های فوزاریوم همراه با پوسیدگی ریشه و طوقه چغندر قند را از مناطق کشت محصول در ایران جمع‌آوری و بیماری‌زایی آن‌ها در گلخانه بررسی شده است (رئوفی و همکاران ۱۳۸۲). در این مطالعه گونه‌های مختلف فوزاریوم جداسازی شدند. بیشترین فراوانی مربوط به *F. solani* بود.

ارجمندیان و ارشاد (۱۳۸۳) بیماری‌زایی ۹۷ جدایه *Fusarium* جمع‌آوری شده از مزارع چغندر قند استان همدان را با استفاده از روش‌های مختلف بررسی و این بیمارگر را به عنوان یکی از عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه چغندر قند در همدان معرفی کردند.

طی مطالعات انجام شده در سال‌های ۱۳۸۰-۱۳۸۲ در مزارع چغندر قند در منطقه قزوین گونه‌های *F. oxysporum*, *F. solani*، *Pythium* و *Rizoctonia solani aphanidermatum* و *Phytophthora drechsleri* روی ریشه‌های کامل و برش‌های خراش‌دار چغندر پوسیدگی ایجاد کردند ولی شدت بیماری‌زایی گونه‌های *F. oxysporum* و

ITS1 قرار گرفته‌اند که شامل ژن‌های ۵/۸S نیز می‌شوند. تکثیر این نواحی و برش محصولات تکثیری با استفاده از آنزیم‌های برشی در تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های نا همگن قارچ‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد (Cubeta et al. 1997).

با توجه به پژوهش‌های گذشته مبنی بر فراوانی گونه *F. solani* در ارتباط با پوسیدگی فوزاریومی ریشه چغندرقد، این تحقیق با هدف بررسی تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *F. solani* و بررسی قرابت ژنتیکی آن‌ها با استفاده از ژن‌های ریبوزومی پایه‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی

در این تحقیق تعدادی از جدایه‌های قارچی از مزارع چغندرقد صفی‌آباد دزفول در سال زراعی ۸۵-۸۴ جمع‌آوری شدند و به همراه جدایه‌های فوزاریوم موجود در کلکسیون بخش تحقیقات گیاه پزشکی مؤسسه تحقیقات چغندرقد مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های موجود در کلکسیون از علائم پوسیدگی ریشه چغندرقد و از مناطق مختلف کشور طی سال‌های ۸۴-۱۳۷۸ جمع‌آوری و روی محیط کشت SNA و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند. در نمونه‌برداری از مزارع، با مشاهده علائم بوته میری، بوته‌ها از خاک خارج شده و در درون یک پاکت کاغذی قرار گرفته و سپس پاکت کاغذی درون کیسه فریزر قرار گرفته و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

F. solani کمتر از سایر گونه‌های فوق بود (داودی و افصلی ۱۳۸۳).

وجود تنوع مورفولوژیکی در قارچ *F. solani* این امر را تداعی می‌کند که قارچ باید از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار باشد (Bereneuza et al. 2004). تنوع ژنتیکی قارچ *F. solani* توسط تکنیک ریبوتایپینگ (Ribotyping) در ۱۸ جدایه جمع‌آوری شده از میزبان‌ها و مناطق مختلف جغرافیایی در کشور برزیل بررسی شد (Bereneuza et al. 2004). در ایران نیز مطالعه روی گونه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقد و تعیین تنوع ژنتیکی در گونه *F. solani* انجام شده است. در این بررسی آزمایش بیماری‌زایی روی برش‌های ریشه و گیاهچه چغندرقد صورت گرفته و تنوع ژنتیکی با استفاده از VCG (گروه‌های سازگار رویشی) مطالعه شده است.

توالی‌هایی از DNA که RNA ریبوزومی را رمز می‌کنند نواحی مناسبی جهت بررسی روابط فیلوژنیک، تاکسونومیک و هم‌چنین قرابت‌های ژنتیکی بین قارچ‌ها به حساب می‌آیند (Bruns et al., 1991). در قارچ‌ها، ژن‌های ریبوزومی (rDNA) در هسته و نیز در DNA میتوکندریایی قرار گرفته‌اند (White et al. 1990). ژن‌های ریبوزومی هسته‌ای در دو گروه 18S و ویژه زیر واحد کوچک ریبوزومی و ۵/۸S و ۲۸S و ویژه زیر واحد بزرگ ریبوزوم قرار می‌گیرند. در حفاصل بین قطعات 18S و 28S دو قطعه فاصله‌انداز داخلی رونوشت‌برداری شده (Internal Transcribed Spacer) به اسامی ITS2

شدند و سپس با آب مقطر سترون شستشو و به اتاق کشت منتقل گردیدند. پس از خشک‌شدن سطحی ریشه‌ها در قلمروترین ناحیه ریشه توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن سترون روی ریشه حفره‌های به عمق پنج میلی‌متر ایجاد گردید برای مایه‌زنی از حاشیه کشت ۱۰ روزه قارچ روی محیط کشت WA استفاده شد. در حفره یک قطعه چهار میلی‌متری از کشت قارچ قرار داده شد. برای شاهد نیز قطعه‌ای از محیط کشت WA فاقد قارچ استفاده شد. قطعه خارج شده از ریشه مجدداً در جای خود قرار گرفت و روی محل زخم با پارافیلیم پوشانده شد، سپس ریشه‌ها درون کیسه فریزر قرار داده و مشخصات هر جدایه روی آن نوشته شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار برای هر جدایه قارچی انجام شد. بعد از گذشت ۱۰ روز در محل مایه‌زنی شده، برش عرضی داده شد و در صورت مشاهده علائم پوسیدگی و تغییر رنگ، میزان پوسیدگی ریشه در داخل بافت به عنوان شدت آلودگی توسط مقیاس بوتنر و همکاران (Buttner et al. 2004) اندازه‌گیری شد. در این مقیاس ریشه‌های سالم نمره یک و ریشه‌های کاملاً پوسیده نمره نه در یافت می‌کنند. هم‌چنین میزان پیشروی بیمارگر در بافت ریشه به عنوان قطر پوسیدگی بر حسب میلی‌متر نیز اندازه‌گیری شد.

بررسی بیماری‌زایی به روش آلوده‌سازی خاک و

ریشه در شرایط گلخانه

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی قارچ عامل بیماری

برای جداسازی قارچ قطعاتی از حدفاصل بافت سالم و آلوده جدا و پس از ضدعفونی با اتانول ۷۵ درصد روی محیط PDA کشت گردیدند. خالص‌سازی قارچ‌ها به روش تک‌اسپور، روی محیط آب آگار ۲ درصد انجام گرفت. مشخصات جدایه‌ها شامل شکل ماکروکنیدیوم، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم، شکل میکروکنیدیوم و نحوه تشکیل آن‌ها، وضعیت فیالیدها (منو فیالید یا پلی فیالید)، وجود یا عدم وجود کلاً میدوسپور، میزان رشد پرگنه، رنگ پرگنه در محیط بعد از نگه‌داری پرگنه‌ها در شرایط استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. جهت شناسایی از کلیدهای گریلاخ و نیرنبرگ (Gerlach and Nirrenberg 1982) و نلسون (Nelson et al. 1983) و کلید اینترنتی Fuskey استفاده شد.

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی ریشه چغندر قند در شرایط آزمایشگاه

در این آزمایش مطابق روش کرماک و موفات (Cormark and Moffat 1961)، تمامی جدایه‌های *F. solani* روی ریشه‌های رقم زرقان مایه‌زنی شدند. ابتدا ریشه‌ها به وزن تقریبی ۷۰۰-۵۰۰ گرم از خاک خارج شدند و پس از شستشو یک شبانه روز در هوای آزاد خشک شدند. سپس برای هر جدایه دو ریشه سالم و بدون خراش انتخاب، در محلول هیپو کلرید سدیم رقیق شده (یک درصد) به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه قرار داده

زرقان برای هر جدایه انجام شد. پس از گذشت دو هفته ریشه‌ها از خاک خارج شده و از محل مایه‌زنی برش داده شد. شدت آلودگی با استفاده از مقیاس نه گانه بوتنر و همکاران (Buttner et al. 2004) اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA

تهیه توده میسلیمی جدایه‌ها در محیط کشت مایع (PDB (عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی همراه با ۱۵ گرم دکستروز در یک لیتر آب) صورت گرفت. بدین ترتیب که دو یا سه قرص پنج میلی‌متری از میسلیم سه تا پنج روزه قارچ برداشته شده و به ظرف ارلن مایر محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB منتقل گردید. ظروف سه تا پنج روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر دورانی (۹۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند. سپس محتوی هر کدام از این ارلن‌ها، با کمک پمپ خلاء و روی قیف بوختر از کاغذصافی واتمن شماره یک عبور داده شدند. به این ترتیب میسلیم، از محیط کشت مایع جدا شده و با آب مقطر استریل شستشو گردید. میسلیم بعد از برداشت و توزین در فویل آلومینیومی قرارداده شده و تا مرحله استخراج DNA در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. تکثیر rDNA با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 انجام شد (Schneider et al. 1997; Salazar et al. 2000). دمای اتصال آغازگرهای ITS1:5'-(19-mer) TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

در بررسی بیماری‌زایی به روش آلوده‌سازی خاک، از گیاهان ۱۴ هفته‌ای رقم حساس رسول استفاده شد. مایه‌زنی گلدان‌ها توسط بذور جو آلوده به جدایه‌های قارچی موردنظر انجام شد. جهت تهیه مایه تلقیح، ابتدا بذور به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده، سپس در شیشه‌های مک‌کارتنی ریخته و دو مرتبه متوالی به فاصله ۲۴ ساعت سترون شدند. سپس جدایه‌های قارچی موردنظر روی بذر جو به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند (Sneh et al. 1991). بذرهای آلوده جو در عمق دو سانتی‌متری خاک کنار ریشه خراشیده قرار گرفتند. جهت مایه‌زنی شاهد از بذور جو تلقیح نشده استفاده شد. دمای گلخانه بین ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار برای هر جدایه انجام شد. شدت آلودگی پنج هفته بعد از مایه‌زنی ریشه‌ها، با مقیاس بوتنر و همکاران (Buttner et al. 2004) اندازه‌گیری شد. در بررسی بیماری‌زایی در شرایط گلخانه به روش آلوده‌سازی ریشه از رقم زرقان استفاده شد. بوته‌های کاملاً رشد یافته از مزرعه به گلخانه منتقل و در گلدان‌های ۵ کیلویی در شرایط دمایی ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در این آزمایش تعدادی از جدایه‌ها (۱۲ جدایه) بررسی شدند. جهت مایه‌زنی پنج عدد بذر جو آلوده در کنار ریشه زخم شده قرار داده شد و خاک اطراف آن کاملاً پوشانده شد. جهت مایه‌زنی شاهد از بذور جو تلقیح نشده استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه بوته چغندرقد رقم

درجه‌سانتی گراد بود.

و -5':ITS4(20-mer)

-3' TCCTCCGCTTATGATATGC ۶۰

جدول ۱ اجزای PCR

اجزای واکنش	مقدار برداشت (μl)	غلظت نهایی
D.D.H ₂ O آب دوبار تقطیر	۱۴/۷	-
Reaction Buffer ۱۰×	۲/۵	۱X
dNTP (25mM)	۲	۰/۲mM
MgCl ₂ (25mM)	۱/۶	۱/۶mM
primers (50 ng/μl)	۱	۱۰۰ng
Taq Polymerase (5 u/μl)	۰/۲	۱ Unit
DNA (50mg/μl)	۲	۱۰۰ng
Total حجم کل	۲۵	-

تجزیه و تحلیل داده‌ها

مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SPSS(version 11.5) انجام شد. گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌ها بر مبنای متغیر شدت آلودگی و میزان پیشروی قارچ با استفاده از الگوریتم UPGMA براساس توان دوم اقلیدسی با کمک نرم‌افزار SPSS(version 11.5) انجام شد.

برش محصولات PCR

از آنزیم‌های *MspI*, *BamHI*, *EcoRI* جهت برش قطعات DNA تکثیری با استفاده از آغازگرهای ITS1/ITS4 (Bereneuza et al. 2004; Edel et al.1997; Mirhendi et al.2001) استفاده شد. قطعات برشی با الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲ درصد تفکیک و ژل‌ها با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند.

نتایج

شناسایی جدایه‌های قارچی

در این بررسی از بین ۱۰۰ جدایه قارچی با علائم پوسیدگی ریشه، ۵۸ جدایه فوزاریوم تشخیص داده شد. جدایه‌های فوزاریوم جهت تشخیص گونه مورد

بررسی دقیق‌تر قرار گرفتند. از ۵۸ جدایه فوزاریوم، ۲۰ جدایه به گونه *F. solani* تعلق داشتند (جدول ۲). از ۲۰ جدایه *F. solani*، ۸۰ درصد آن‌ها از ریشه‌های پوسیده، ۱۰ درصد از طوقه‌های پوسیده، ۵ درصد از گیاهچه‌های مرده و ۵ درصد از بوته‌های پژمرده جداسازی شدند.

جدول ۲ مشخصات جدایه‌های *Fusarium solani* جدا شده از چغندرقد

کد ایزوله	جداسازی شده از	علائم	محل جمع آوری
81-101-S	طوقه	پوسیدگی قهوه‌ای طوقه	شاهرود
O	ریشه	پوسیدگی ریشه	ارومیه
Safiabad	ریشه	پوسیدگی سیاه	صفی‌آباد
5	ریشه	پوسیدگی ریشه	گناباد
81-16-Ke	ریشه	پوسیدگی نوک ریشه	کرمان
43	ریشه	پوسیدگی ریشه	تربت حیدریه
55-1	ریشه	پژمردگی	چناران
81-128-O	ریشه	پوسیدگی ریشه	ارومیه
84-22-AZ	ریشه	پوسیدگی ریشه	آذربایجان غربی
81-143-Ka	طوقه	پوسیدگی طوقه	کرج
81-148-Ka	ریشه	پوسیدگی ریشه	کرج
B5-H	ریشه	پوسیدگی قهوه‌ای	کرج
78-29-O	گیاهچه	مرگ گیاهچه	ارومیه
44	ریشه	پوسیدگی ریشه	تربت حیدریه
K9/9	ریشه	پوسیدگی ریشه	کرج
87	ریشه	پوسیدگی سیاه	قوچان
16	ریشه	پوسیدگی قهوه‌ای	بیرجند
81-151-Ka	ریشه	پوسیدگی ریشه	کرج
H ₁	ریشه	پوسیدگی قهوه‌ای نوک ریشه	همدان
H ₂	ریشه	پوسیدگی قهوه‌ای نوک ریشه	همدان

بیماری‌زایی جدایه‌های فوزاریوم در شرایط

در این آزمایش، ریشه‌های مایه‌زنی شده پس

آزمایشگاه

از گذشت ۱۰ روز از انکوباتور خارج شدند. سپس از وسط

جدایه‌ها را به ۳ گروه بیماری‌زا، بیماری‌زایی کم و غیربیماری‌زا تقسیم کرد (شکل‌های ۱ و ۲).

بیماری‌زایی در شرایط گلخانه به روش آلوده‌سازی خاک و ریشه

در بررسی بیماری‌زایی در شرایط گلخانه به روش آلوده‌سازی خاک، بوته‌ها پس از گذشت ۴۰ روز از مایه‌زنی، از خاک خارج شده و به آزمایشگاه منتقل شدند پس از شستشو، با مقایسه ریشه‌های مایه‌زنی شده با شاهد هیچ‌گونه علائمی ناشی از پوسیدگی ریشه مشاهده نشد. در بررسی بیماری‌زایی در شرایط گلخانه به روش آلوده‌سازی ریشه، ریشه‌های مایه‌زنی شده پس از گذشت دو هفته از خاک خارج شدند. علائم بیماری به صورت پوسیدگی خشک یا نرم و قهوه‌ای در محل مایه‌زنی دیده شد. میزان پوسیدگی ریشه جدایه‌های مختلف درخور توجه و قابل ارزیابی با مقیاس بوتنر و همکاران (۲۰۰۴) نبود (جدول ۳). تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد.

به دو قسمت تقسیم شدند. جدایه‌های قارچی در قیاس با شاهد باعث تغییر رنگ و پوسیدگی قهوه‌ای بافت ریشه شده بودند. میزان پوسیدگی ریشه به عنوان شدت آلودگی با استفاده از مقیاس نه گانه بوتنر و همکاران (۲۰۰۴) اندازه‌گیری شد. هم‌چنین میزان پیشروی قارچ بر حسب میلی‌متر، نیز اندازه‌گیری شد. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن برای شدت آلودگی، تیمارها را به دو گروه دسته‌بندی کرد. جدایه O-۱۲۸-۸۱ با میانگین شدت آلودگی ۴/۵ (در مقیاس ۱ تا ۹) بیماری‌زاترین جدایه در بین تیمارهای مورد بررسی شناخته شد. مقایسه میانگین‌ها برای میزان پیشروی قارچ در بافت ریشه تیمارها را در سه گروه دسته‌بندی کرد (جدول ۳) که جدایه O-۱۲۸-۸۱ نیز بیشترین میزان پوسیدگی ریشه را سبب شده بود. تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها بر مبنای تغییر شدت آلودگی و میزان پیشروی قارچ (۱۰ روز پس از مایه‌زنی) با استفاده از الگوریتم UPGMA بر اساس توان دوم اقلیدسی،

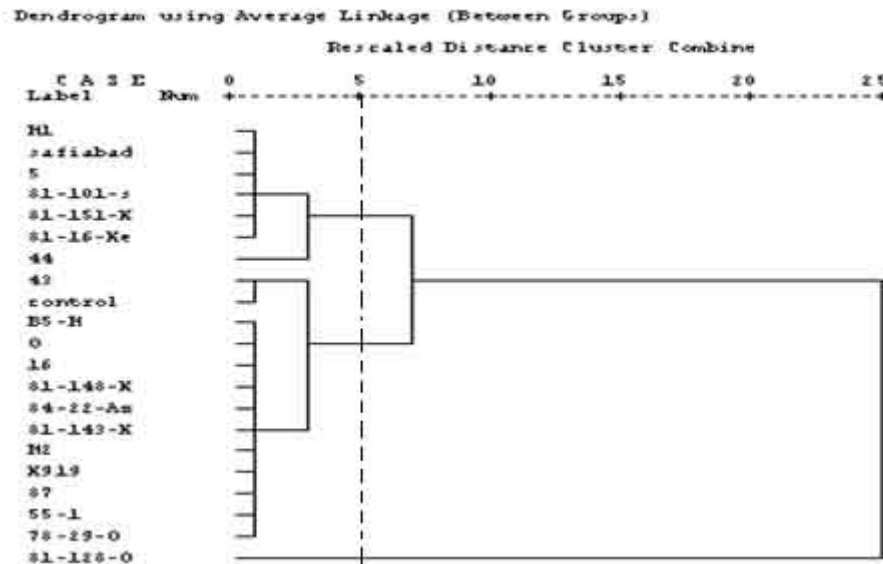
جدول ۳ مقایسه شدت آلودگی جدایه‌های مختلف *F.solani* و میزان پیشرفت آن‌ها در بافت ریشه

در آزمون‌های بیماری‌زایی

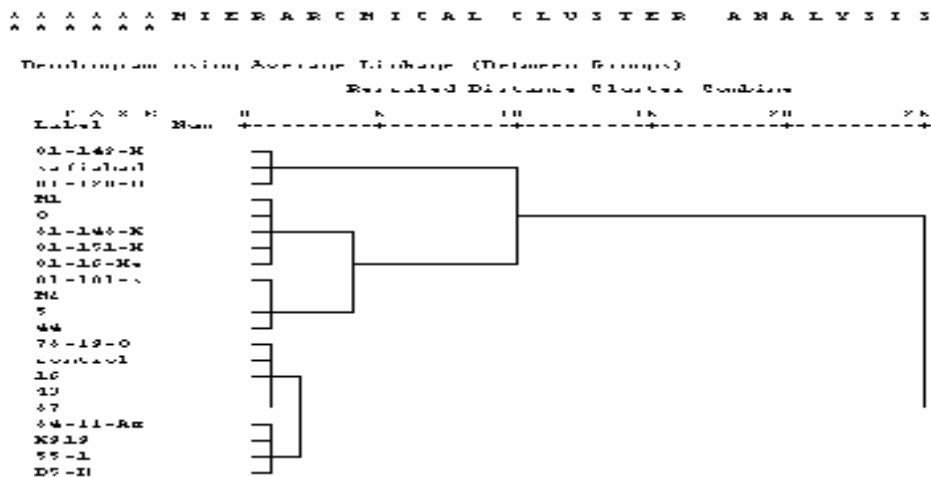
ردیف	کد ایزوله	شدت آلودگی در آزمایشگاه	قطر پوسیدگی بر حسب میلی متر	شدت آلودگی در گلخانه
۱	81-101-S	۲/۵ b	۱۲/۵ ab	-
۲	O	۲b	۷/۵ bc	۲
۳	Safiabad	۲/۵ b	۱۵ ab	-
۴	5	۲/۵ b	۱۲/۵ ab	۲
۵	81-16-Ke	۳ ab	۷/۵ bc	۱/۳۳
۶	43	۱ b	۰c	۱
۷	55-1	۱/۵ b	۲c	۱
۸	81-128-O	۴/۵ a	۱۷/۵ a	-
۹	84-22-AZ	۲ b	۲/۵c	-
۱۰	81-148-Ka	۲ b	۷/۵ bc	۱/۶۶
۱۱	B5-H	۲ b	۳ c	۲
۱۲	78-29-O	۱ b	۰c	-
۱۳	44	۳ ab	۱۵ ab	۱/۶۶
۱۴	K9/9	۱/۵ b	۲/۵ c	۱
۱۵	87	۱ b	۰c	۱
۱۶	16	۱ b	۰c	-
۱۷	81-151-Ka	۳ ab	۷/۵ bc	۱/۶۶
۱۸	H1	۲/۵ b	۷/۵ bc	-
۱۹	H2	۲ b	۱۲/۵ ab	-
۲۰	شاهد	۱ b	۰c	۱

در هر ستون میانگینهای برخوردار از حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (آزمون دانکن) می‌باشند

شکل ۱ تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های *F. solani* بر مبنای شدت بیماری ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی (مقیاس ۱ تا ۹) روی ریشه‌های چغندر قند رقم زرکان در شرایط آزمایشگاه.



شکل ۲ تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های *F. solani* بر مبنای قطر پوسیدگی ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی بر روی ریشه‌های چغندر رقم زرکان در شرایط آزمایشگاه.

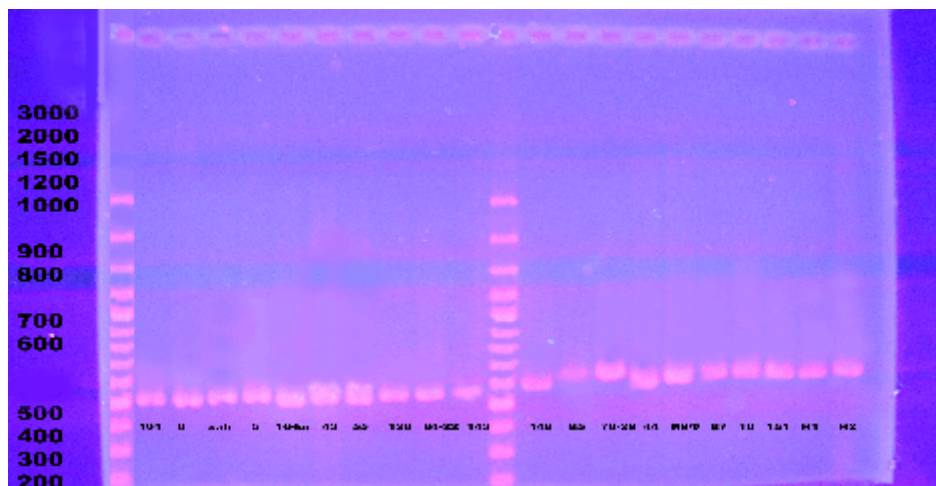


آغازگرهای ITS1/4 در تمام جدایه‌ها منجر به تکثیر قطعات DNA شد (شکل ۳). در جدایه‌های ۴۳، ۵۵-۱ و ۵۵،۴۴-۱ سه قطعه به طول ۵۰۰، ۵۵۰

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. solani* بر اساس تجزیه ITS-rDNA

ترتیب جدایه‌ها در سه دسته یک، دو و سه نواری دسته‌بندی شدند (جدول ۴).

و ۶۰۰ در جدایه‌های B5-H، ۵، k9/9 و 78-29-0 دو قطعه به طول‌های ۶۰۰ و ۵۵۰ و در بقیه جدایه‌ها یک قطعه با طول ۵۵۰ یا ۶۰۰ جفت باز تکثیر شد. به این

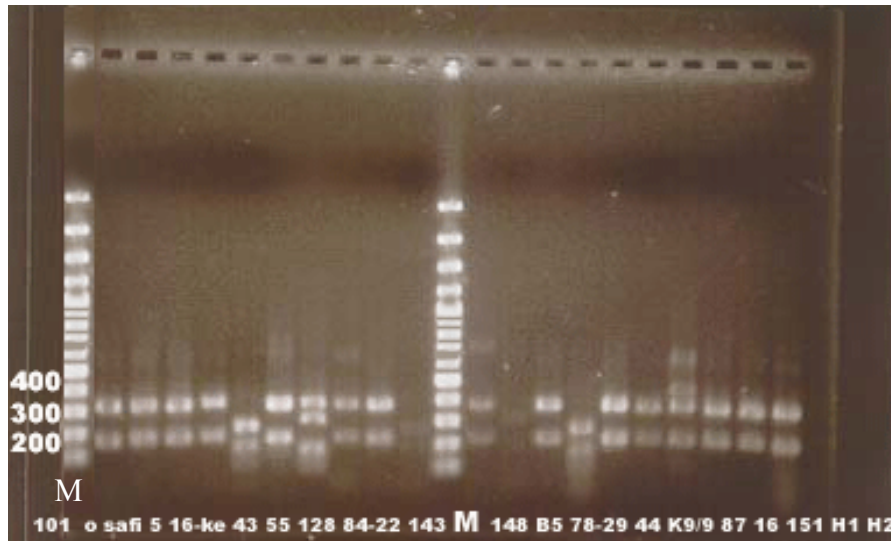


شکل ۳ الگوی نواری محصولات تکثیری جدایه‌های *F. solani* جدا شده از چغندرقد با استفاده از آغازگرهای ITS1/4 در ژل آگاروز ۲٪ M. نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰ جفت باز)

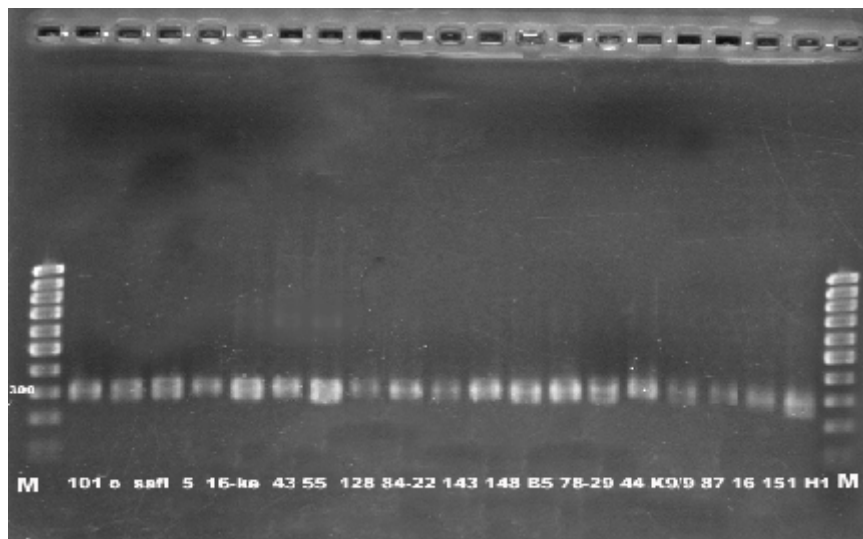
تکثیری با آنزیم برشی *MspI* منجر به تولید دو نوار با طول تقریبی به ترتیب ۲۰۰ و ۳۵۰ جفت باز در کلیه جدایه‌ها بجز جدایه‌های 81-16-ke, B5-H, 44, 55-1 شد. در جدایه‌های مذکور نوارهایی با طول ۱۸۰، ۱۲۰ و ۲۵۰ جفت باز تولید شد (شکل ۴). جدایه ۱-۵۵ الگوی متفاوتی نسبت به سایر جدایه‌ها داشت. جدایه ۴۴ نیز دو نوار به طول تقریبی ۲۷۰ و ۱۸۰ جفت باز نشان داد (جدول ۴). با توجه به تعداد قطعات تکثیری و الگوی هضم آن‌ها با آنزیم‌های مختلف، جدایه‌ها به ۴ گروه ITS تقسیم شدند (جدول ۴).

مقایسه اثر آنزیم‌های برشگر روی محصول PCR

محصول تکثیر شده از rDNA جدایه‌های مختلف، با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 با سه آنزیم برشی *MspI*، *EcoR1* و *BamHI* در شرایط مناسب برای هر آنزیم تیمار و محصول روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. آنزیم برشی *BamHI* دارای محل برش روی قطعه مذکور نبود. آنزیم *EcoR1* منجر به تولید دو نوار نزدیک به هم به طول تقریبی حدود ۲۷۰ و ۳۰۰ جفت باز شد و از نظر الگوی نواری حاصل از این آنزیم تفاوتی بین جدایه‌ها مشاهده نشد (شکل ۵). تیمار محصولات



شکل ۴ الگوی نواری محصولات تکثیری جدایه‌های *F. solani* جدا شده از چغندر قند تیمار شده با آنزیم برشی *M.MspI* نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰ جفت باز)



شکل ۵ الگوی نواری محصولات تکثیری جدایه‌های *F. solani* جدا شده از چغندر قند تیمار شده با آنزیم برشی *EcoRI* نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰ جفت باز)

جدول ۴ اندازه قطعات تکثیرشده با آغازگرهای ITS4 و ITS5 در جدایه‌های مختلف

F. solani و هضم آن‌ها با آنزیم‌های برشی مختلف

ردیف	جدایه‌ها	اندازه نوارها (جفت باز)	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> R1	<i>Msp</i> I	نوع ITS
۱	81-101-S	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۳۵۰ و ۲۰۰	۱
۲	O	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۲۵۰ و ۲۰۰	۱
۳	Safiabad	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۳۵۰ و ۲۰۰	۱
۴	5	۵۵۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۲۵۰ و ۲۰۰	۱
۵	81-16-Ke	۵۵۰، ۵۰۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۲۵۰ و ۱۲۰، ۱۸۰	۲
۶	43	۵۵۰، ۵۰۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۲۵۰ و ۲۰۰	۱
۷	55-1	۵۵۰، ۵۰۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۳۰۰ و ۱۷۰، ۲۰۰	۳
۸	81-128-O	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۲۵۰ و ۲۰۰	۱
۹	84-22-AZ	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۳۵۰ و ۲۰۰	۱
۱۰	81-148-Ka	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۲۵۰ و ۲۰۰	۱
۱۱	B5-H	۵۵۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۲۵۰ و ۱۲۰، ۱۸۰	۲
۱۲	78-29-O	۵۵۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۲۵۰ و ۲۰۰	۱
۱۳	44	۵۵۰، ۵۰۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۲۷۰ و ۱۸۰	۴
۱۴	K9/9	۵۵۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۲۵۰ و ۲۰۰	۱
۱۵	87	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۳۵۰ و ۲۰۰	۱
۱۶	16	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۳۵۰ و ۲۰۰	۱
۱۷	81-151-Ka	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۳۵۰ و ۲۰۰	۱
۱۸	H1	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۳۵۰ و ۲۰۰	۱
۱۹	H2	۵۵۰	۵۵۰	۳۰۰ و ۲۷۰	۳۵۰ و ۲۰۰	۱

بحث

تولید کلامیدوسپور می‌باشد. کلامیدوسپورها می‌توانند

شرایط نا مناسب را تحمل کنند بنابراین، دوام و بقای

قارچ در طبیعت نسبتاً بالا است.

قارچ *F. solani* در شرایط مختلف اقلیمی و

در مزارع و مراتع گسترش دارد این گسترش همه جانبه

در این تحقیق از ۵۸ جدایه فوزاریوم جمع‌آوری

شده، تعداد ۲۰ جدایه *F. solani* از مناطق مختلف

کشور با شرایط آب و هوایی متفاوت جدا شدند. از آن

جایی که قارچ فوزاریوم قارچ خاکزی است و قادر به

گونه‌های فوزاریوم روی چغندر قند بالغ در شرایط گلخانه علائم مشخصی مشاهده نکردند.

ارجمندیان و ارشاد (۱۳۸۳) با مایه‌زنی ریشه‌های بالغ چغندر قند بیماری‌زایی ۹۷ جدایه *Fusarium spp* را نشان دادند حال آن که داوودی و افضلی (۱۳۸۳) قارچ *Pythium aphanidermatum* را به عنوان بیمارگر غالب پوسیدگی ریشه در قزوین معرفی و گونه‌های فوزاریوم را به عنوان عوامل ثانویه شناختند. در آزمون بیماری‌زایی که در گلخانه روی ریشه‌های زخم شده چغندر قند انجام شد علائم پوسیدگی و لهیدگی بافت‌های ریشه بعد از گذشت ۱۰ روز روی ریشه‌ها مشاهده شد. این نشان‌دهنده آن است که *F. solani* در اثر زخم قادر به پوسیدگی ریشه چغندر قند شده است.

در آزمون بیماری‌زایی بر روی ریشه مطابق روش کرماک و موفات (Cormark and Moffat 1961) که در آزمایشگاه انجام شد جدایه‌ها از یکدیگر متمایز و در سه گروه بیماری‌زا، بیماری‌زایی کم و غیربیماری‌زا دسته‌بندی شدند. نتایج حاصل از این آزمون با بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط گلخانه هم‌خوانی داشت (جدول ۳). علاوه بر این، در این دو آزمایش مایه تلقیح در مجاورت بافت زخم شده گیاه میزبان قرار داشت در صورتی که در روش اول به دلیل وجود مایه تلقیح (بذر جو) در مجاورت ریشه شاید مایه تلقیح با ریشه فاصله داشته و تماس حاصل نشده است.

به علت توانایی آن‌ها در زندگی ساپروفیتی روی مواد مختلف در شرایط نامناسب می‌باشد (صارمی ۱۳۸۲).

مطابق گزارش‌های موجود علائم بیماری‌های فوزاریومی در چغندر قند به صورت پژمردگی یا نکروز آوندی و پوسیدگی ریشه می‌باشد (Whitney and Duffus 1986، رئوفی و همکاران ۱۳۸۲). در نمونه‌های جمع‌آوری شده در این تحقیق و در آزمون‌های بیماری‌زایی، علائم بیماری بیشتر به صورت پوسیدگی خشک قهوه‌ای تیره و در برخی موارد به صورت پوسیدگی نرم قهوه‌ای روشن، ایجاد شده توسط جدایه‌های *Fusarium* مشاهده شد.

در تحقیق حاضر بیماری‌زایی ۲۰ جدایه *F. solani* روی گیاه چغندر قند به دو روش بررسی شد. در روش اول، که مایه‌زنی با استفاده از بذر جو آغشته به جدایه مورد نظر انجام شد که هیچکدام از جدایه‌ها علائم پوسیدگی روی ریشه ایجاد نکردند. به طور کلی اعتقاد بر این است که گونه‌های فوزاریوم در مزارع تحت تنش خشکی یا در حضور زخم و یا در کنار سایر عوامل بیماری‌زا به عنوان یک عامل ثانویه در ایجاد بیماری پوسیدگی ریشه به حساب می‌آید (روستایی ۱۳۸۰ و Abawi et al. 1986). علی‌رغم این که عباسی‌مقدم و همکاران (۱۳۷۷)، بیماری‌زایی گونه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* را روی گیاه ۱۰ هفته‌ای چغندر قند در گلخانه نشان دادند اما شیخ‌الاسلامی و همکاران (۱۳۸۱) با آزمون بیماری‌زایی

طول قطعات ۵۰۰ و ۵۵۰ و ۶۰۰ جفت باز، با طول قطعات تکثیرشده توسط برانزا و همکاران (Lee et al. 2000, Bereneuza et al, 2004) تقریباً مشابه بود. تنوع جدایه‌های *F. solani* جمع‌آوری شده از میزبان‌ها و مناطق مختلف کشور برزیل با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 بررسی شده است (Bereneuza et al. 2004). در این بررسی نوارهایی با طول ۶۲۰bp مشاهده شد و از بین چهار آنزیم برشی *EcoR1*، *HaeIII* و *MspI* و سه آنزیم *DraI* دارای جایگاه برش در محصولات تکثیری بودند که نتایج آن‌ها تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای را در میان جدایه‌های *F. solani* بدون هیچ رابطه‌ای بین منطقه جغرافیایی و میزبان آن‌ها نشان داد (Bereneuza et al. 2004).

در این مطالعه چند شکلی حتی در ناحیه ITS-rDNA مشاهده شد. در تیمار با سه آنزیم برشی *EcoR1*، *MspI* و *BamHI* تنها تنوع توسط برش با آنزیم *MspI* مشاهده شد. در حالی که در تیمار با آنزیم *EcoR1* تنوعی بین جدایه‌ها مشاهده نشد. آنزیم *EcoR1* دارای یک جایگاه برش روی قطعه تکثیری حاصل از ITS1/4 بود. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج سایر محققین (Lee et al. 2000; Bereneuza et al. 2004) که از آنزیم *EcoR1* جهت بررسی چندشکلی استفاده کردند مطابقت داشت. تاکنون از آنزیم برشی *BamHI* در بررسی چندشکلی در *F. solani* استفاده نشده است این آنزیم جایگاه برش

تفاوت در شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها، در جدایه‌های *F. solani* وجود دارد. در بررسی‌های اخیر روی بیماری‌زایی فوزاریوم‌های مولد پژمردگی و پوسیدگی ریشه نخود در استان فارس تفاوت زیادی در شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *F. solani* دیده شده است که در آن جدایه‌های *F. solani* روی نخود فرنگی ایجاد پوسیدگی ریشه نموده‌اند ولی روی سایر حبوبات بیماری‌زا نبودند (محمدی و بنی‌هاشمی ۱۳۸۴). قارچ *F. solani* دارای فرم اختصاصی می‌باشد، احتمال آن می‌رود که جدایه‌هایی که روی چغندرقد بیماری‌زایی ایجاد نکردند فرم اختصاصی چغندرقد نبوده و می‌توانند روی میزبان مخصوص خود بیماری‌زا باشند. با توجه به نتایج فوق و به استناد تحقیقات گذشته *F. solani* در چغندرقد در اغلب موارد به عنوان یک عامل ثانویه ایجادکننده آلودگی به حساب می‌آید.

نشان‌گرهای مختلفی جهت شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی به کار می‌روند. از آن‌جا که بیمارگر دارای تنوع بیماری‌زایی است برای بررسی احتمال وجود تنوع درون گونه‌ای از ITS-RFLP استفاده شد. برای تعیین تنوع ژنتیکی با استفاده از ITS-RFLP چند شکلی نواحی فاصله‌انداز داخلی رونوشت‌برداری شده (Internal Transcribed Spacer)، توسط آنزیم‌های برشی بررسی شد. محصولات PCR، ۱۹ جدایه با یکدیگر مقایسه شدند و بر این اساس جدایه‌ها به سه گروه یک نواری، دو نواری و سه نواری تقسیم شدند.

موفقیت‌آمیز نبوده است (Lee et al. 2000). این تحقیق نیز بر آن بود تا با توجه به فراوانی جدایه‌های فوزاریوم در مزارع چغندر قند و جداسازی آن‌ها از ریشه‌های پوسیده، ضمن بررسی بیماری‌زایی آن‌ها از آنالیز ITS-rDNA جهت تشخیص و ارتباط جدایه‌ها با بیماری‌زای استفاده نماید. نتایج این بررسی نشان داد که علی‌رغم فراوانی جدایه‌های فوزاریوم در ریزوسفر چغندر قند آن‌ها نمی‌توانند عامل مهم و تهدیدکننده‌ای برای این زراعت باشند و وجود تنوع در نواحی فاصله ساز داخلی ربطی به بیماری‌زایی یا منطقه جغرافیایی محل جمع‌آوری قارچ ندارد.

روی قطعه تکثیری حاصل از ITS1/4 نداشت. تحقیقات اخیر نیز روی *F. solani* جدا شده از میزبان‌های متفاوت، در برش آنزیمی محصول PCR تنوع را فقط توسط برش با آنزیم *MspI* نشان دادند (Lee et al. 2000). از بین سه آنزیم برشی *MspI*, *EcoRI*, *BamHI* مورد بررسی در این مطالعه نیز تنها تنوع توسط برش با آنزیم *MspI* مشاهده شد. از آنالیز ITS-rDNA برای تشخیص جدایه‌های قارچی در حد گونه و زیرگونه استفاده می‌شود (محمودی و همکاران ۱۳۸۴، تاجیک و همکاران ۱۳۸۴). در استفاده از این روش برای شناسایی گونه‌ها و فرم‌های اختصاصی فوزاریوم نیز استفاده شده است که چندان

References:

منابع مورد استفاده:

- ارجمندیان، ا. ارشاد، ج. ۱۳۸۳. شناسایی و بررسی پراکنش عوامل قارچی مسبب پوسیدگی‌های ریشه چغندر قند در استان همدان. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران. صفحه ۱۳۸.
- ایرانی، ح. ارشاد، ج. ۱۳۷۴. شناسایی قارچ‌های مرتبط با پوسیدگی ریشه قند در آذربایجان غربی. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران. آموزشکده کشاورزی کرج. صفحه ۱۲۶.
- بهداد، ا. ۱۳۶۹. بیماری‌های گیاهان زراعی. دانشگاه تهران. ۴۲۴ صفحه.
- تاجیک، م. ع. رحیمیان، ح. علیزاده، ع. ۱۳۸۴. مطالعه جمعیت‌های *Rhizoctonia solani* AG-11A جدا شده از برنج در استان مازندران به کمک rDNA-RFLP. مجله بیماری‌های گیاهی ۴۱: ۵۰۷-۵۲۳.
- رئوفی، م. ۱۳۸۲. بررسی گونه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه چغندر قند در ایران و تعیین تنوع ژنتیکی در گونه غالب. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز. ایران. ۱۸۶ صفحه.
- روستایی، م. ۱۳۸۰. مدیریت بیماری‌های گیاهی (ترجمه) مؤسسه نشر جهاد. ۴۱۶ صفحه.

- داودی، ع. افضلی، ح. ۱۳۸۳. شناسایی عوامل قارچی پوسیدگی‌های مختلف ریشه چغندرقد در منطقه قزوین. شانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. دانشگاه تبریز صفحه ۱۶۸.
- شیخ‌الاسلامی، م. حجارود، ق و اخوت، م. ۱۳۷۷. قارچ‌های مولد پوسیدگی ریشه چغندرقد بعد از برداشت در کرمانشاه. بیماری‌های گیاهی. ۳۴: ۹۲-۸۱.
- شیخ‌الاسلامی، م. یونسی، ح. ارشاد، ج. ۱۳۸۱. شناسایی قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه چغندرقد و تعیین پراکندگی آن‌ها در استان کرمانشاه. پانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. صفحه ۱۳۳.
- صارمی، ح. ۱۳۸۲. الگوی پراکنش گونه‌های فوزاریوم در اقلیم‌های مختلف. مجله بیماری‌های گیاهی ۳۹ (۲ و ۱): ۸۵-۷۳.
- عباسی‌مقدم، ا. رستگار، م و جعفریور، ب. ۱۳۷۷. اتیولوژی پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقد در خراسان. سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج. صفحه ۱۲۵.
- محمودی، س. ب. مصباح، م. رحیمیان، ح. علیزاده، ع. نوروزی، پ. ۱۳۸۴. تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* از چغندرقد با استفاده از RAPD-PCR و آنالیز ITS-rDNA. بیماری‌های گیاهی ۴۱ (۴): ۵۴۲-۵۲۳.
- محمدی، ح. بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۸۴. انتشار، بیماری‌زایی و پایداری فوزاریوم‌های مولد پژمردگی و پوسیدگی ریشه نخود در استان فارس. مجله بیماری‌های گیاهی جلد ۴، ۴۱: ۷۰۸-۶۷۸.
- Abawi GS, Crosier DC, Cobb AC, Becke RF (1986) Root rot of table beets in New York State. New York's Food and Life Sciences Bulletin.No:115
- Bereneuza T, Brasileiro RV, Coimbra MRM, De Moraes MA, De Oliveira NT (2004) Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR- fingerprinting based on PCR markers. Braz. J. Microbial., 35 (3): 1-10
- Burns TD, White TJ, Tylor JW (1991) Fungal molecular systematics. Ann. Rev. Ecol. System 22: 525-564
- Buttner G, Pfahler B, Marlander B (2004) Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to *Rhizoctonia* root and crown rot. Plant Breeding 123: 158-166
- Cormarc MW, Moffatt JE (1961) Factors influencing storage decay of sugar beet by *Phoma betae* and other fungi. Phytopathology 51: 3-5
- Cook DA, Scott RK (1993) The Sugar beet Crop: Science into Practice. Champan and Hall, New York. 675pp

- Cubeta MA, Vilgalys R (1997) Population biology of *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopathology* 87: 480-484
- EdelV Steinberg C, Gautheron N, Alabouvette C (1997) Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycological Research*,101: 179-187
- Gerlach W, Nirenberg H (1982) The Genus *Fusarium*- a Pictorial atlas. Mitt. Biol. Bund. Land-Forst. 406pp
- Grajal-Martin MJ, Simon CJ, Muehlbauer FJ (1993) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. *Phytopathology* 83:612- 614
- Hanson LE (2006) Beet Root-rot inducing isolates of *Fusarium oxysporum* from Colorado and Montana. *Plant Dis.* 90:247
- Harveson RM, Rush CM (1997) Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates from sugar beet as determined by vegetative compatibility. *Plant Dis.*81:85-88
- Lee Y, Choi Y, Min B (2000) PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. *J. Microbiology* 38: 66-73
- Mirhendi SH, Kordbacheh P, Kazemi B, Samiei S, Pezeshki M, Khoramshahi M (2001) A PCR-RFLP method to identification of the important opportunistic fungi: *Candidia* sp, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus famigatus* and *Fusarium solani*. *Iranian J.Pub.Health*, 30: 103-106
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state university, University Park and London. 193pp
- Ruppel EG, (1991) Pathogenecity of *Fusarium* spp.from diseased sugar beets and variation among sugar beet isolates of *Fusarium oxysporum*. *Plant Dis.*75:486-489

- Salazar O, Julian MC, Rubio V (2000) Primers based on specific rDNA-ITS sequence for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG-2 subgroups and ecological types ,and binucleate *Rhizoctonia*. Mycological Research 104:281-285
- Schneider JHM, Salazar O, Rubio V, Keijer J (1997) Identification of *Rhizoctonia solani* associated with field grown tulips using ITS rDNA polymorphism and pectic zymograms. European Journal of Plant Pathology 103:607-622
- Schwartz H, Panella LW, Brick MA, Byrne P F (2001) *Fusarium* wilt and yellows of sugar beet and dry bean. Colorado state University , Cooperative Extension, no:2. 950
- Stewart D (1931) Sugar beet yellows caused by *Fusarium conglutinans* var. *betae*. Phytopathology 21:59-70
- Sneh B, Burpee LL, Ogoshi A (1991) Identification of *Rhizoctonia* Species. St. Paul-MN APS Press 133p
- Seifert K (2000) Fuskey. [http:// res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html](http://res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html)
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M A. Gelfand, D H Sninsky, J Jand White, T J.(eds): PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, M A INNis Academic Press San Diego.CA.USA. pp 315-322
- Weiland JJ (1997) Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. Fungal Genet. Newsl. 44:60-63
- Whithney ED, Duffus EJ (1986) Compendium of beet diseases and Insects. APS press. St. Paul, Minnesota, USA