

ردیابی آلودگی‌های فوزاریومی بذور پنبه با استفاده از صفات

ریخت‌شناسی و نشانگر مولکولی

علی اکبرزاده^{۱*}، مجتبی مرادزاده اسکندری^۲، محمدرضا رضانی مقدم^۳،

فاطمه آزاد دیسفانی^۴ و احمد درخشان^۵

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علم و فرهنگ شعبه کاشمر
^{۲،۳،۴} استادیار مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج
کشاورزی، مشهد، ایران، ^۵ مربی دانشکده کشاورزی، دانشگاه علم و فرهنگ شعبه کاشمر
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۰

چکیده

به‌منظور بررسی وضعیت آلودگی بذور پنبه به قارچ فوزاریوم، نمونه‌هایی از طبقات مختلف ۱۰ رقم پنبه از استان‌های خراسان جنوبی، رضوی، گلستان و فارس تهیه شد. قسمت‌های مختلف بذر که شامل بذر کامل، پوسته، مغز (آندوسپرم+جنین)، آندوسپرم و جنین بود، در محیط‌های غذایی سیب‌زمینی دکستروز آگار و آب آگار کشت گردید. از تعداد ۲۳ نمونه بذر پنبه، ۷۶ جدایه فوزاریوم به‌دست آمد. آلودگی بذور کرک‌دار و دلینته به قارچ فوزاریوم به‌ترتیب ۹۸/۷ و ۱/۳ درصد بود. از بین بذور مورد بررسی در این تحقیق، رقم ورامین با ۳۵ جدایه دارای بیشترین درصد آلودگی بود. بیشترین درصد جداسازی قارچ فوزاریوم مربوط به مغز بود. شناسایی بر اساس صفات ریخت‌شناسی نشان داد جدایه‌های مذکور به‌ترتیب با فراوانی ۳۹، ۲۳، ۱۰، ۲، ۱ و ۱ جدایه متعلق به گونه‌های *Fusarium solani*، *F. nygamai*، *F. compactum*، *F. semitectum*، *F. proliferatum* و *F. equiseti* می‌باشند. گونه‌های *F. nygamai* و *F. Compactum* برای اولین بار در ایران از بذور پنبه گزارش می‌شوند. بکارگیری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه‌های غالب *F. equiseti* و *F. proliferatum* با استفاده از DNA گونه قارچی مربوطه و همچنین DNA بذوری که به‌طور طبیعی به این گونه‌ها آلوده بودند، منجر به تولید نوارهای DNA اختصاصی شد. به‌این ترتیب، نتایج شناسایی این دو گونه بر اساس صفات ریخت‌شناسی، با روش مولکولی نیز مورد تأیید قرار گرفت. این مطالعه نشان داد ردیابی فوزاریوم‌های مذکور در بذور آلوده با استفاده از واکنش PCR امکان‌پذیر است.

واژه‌های کلیدی: آندوسپرم، ریخت‌شناسی، مولکولی، کرک‌دار، ورامین

مقدمه

پنبه از مهم‌ترین محصولات زراعی و صنعتی جهان و مهم‌ترین گیاه لیفی است که برای تولید روغن‌های خوراکی، صنعتی و طبی، کنجاله برای تغذیه دام، صنایع پارچه بافی، انواع منسوجات و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (عالیشاه، ۲۰۱۲). سالیانه بیش از ۴۰ میلیون تن بذر پنبه در سرتاسر جهان تولید می‌شود که بیش از ۱۶ میلیون تن به دو کشور آمریکا و چین اختصاص دارد. در ایران نیز به‌طور متوسط بالغ بر ۲۰۰ هزار تن تخم پنبه تولید می‌شود که بیش از ۹۰ درصد آن به مصرف روغن‌کشی و بقیه به‌عنوان بذری مورد استفاده قرار می‌گیرند. سالیانه برای تحت کشت بردن ۲۰۰ - ۲۵۰ هزار هکتار از اراضی پنبه در ایران، به‌طور متوسط ۸-۱۰ هزار تن بذر پنبه تولید و مصرف می‌گردد، (عالیشاه ۲۰۱۲). سلامت بذر در کنار سایر خصوصیات کیفی بذر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (وان گاستل و همکاران، ۱۹۹۶). عوامل بیماری‌زای بذر از جمله فوزاریوم، از مهم‌ترین بیمارگرهای بذر و گیاهچه پنبه بوده و قادرند با ایجاد پوسیدگی بذر، مرگ گیاهچه، پژمردگی گیاهچه و غیره سبب کاهش تراکم و استقرار مناسب بوته در مزرعه شوند (آگراوال و سینک لایر، ۱۹۹۷). عوامل بیماری‌زای بذر از جمله قارچ فوزاریوم می‌توانند همراه با بذر، به‌صورت سطحی یا داخلی منتقل شوند (بکیک، ۲۰۰۶). در جدول ۱، به بررسی گونه‌های فوزاریوم جدا شده از پنبه اشاره شده است. در ایران، گونه‌های فوزاریوم بیشتر بر اساس صفات ریخت‌شناسی، شناسایی و طبقه‌بندی می‌شوند. طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌های فوزاریوم با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی حتی برای متخصصان دشوار ولی امکان‌پذیر بوده و سال‌ها بر این اساس عمل شده است. برای اطمینان از سلامت بذر اعم از بذور تولیدی در داخل کشور و یا بذور وارداتی باید مجهز به روش‌هایی بود که سلامت بذر را از راهی سریع، آسان و دقیق بررسی کند (عابدی تیزگی و صباغ، ۲۰۱۲). از آنجا که یکی از مهم‌ترین آلودگی‌های همراه با بذر پنبه مربوط به گونه‌های مختلف قارچ فوزاریوم می‌باشد، در صورتی که با استفاده از ابزار مولکولی این نوع آلودگی‌ها ردیابی شوند، در جهت اطمینان از سلامت بذر پنبه و جلوگیری از خرید و کشت بذره‌های آلوده گام مهمی برداشته می‌شود. روش‌های مولکولی مثل PCR^۱ روش‌هایی حساس، دقیق، سریع و مطمئن در تشخیص گونه هستند (روسل و پترسون، ۲۰۰۶). تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی و دسته‌بندی گونه‌ها مهم هستند (آماتولی و همکاران، ۲۰۱۰)، همچنین این تکنیک‌ها از قبیل استفاده از پرایمر اختصاصی گونه می‌توانند برای تشخیص معمول و شناسایی گونه‌های فوزاریوم بدون نیاز به جداسازی و بررسی‌های ریخت‌شناسی استفاده شوند (عابدی تیزگی و صباغ، ۲۰۱۲). استفاده از روش PCR به‌طور وسیعی در تاکسونومی قارچ‌ها استفاده می‌شود (برد و همکاران، ۲۰۰۸؛ و چاندار و

1. Polymerase Chain Reaction

همکاران، ۲۰۱۰) و اخیراً برای شناسایی بیمارگرهای قارچی در بافت‌های گیاهی بکار می‌رود (چاندار و همکاران، ۲۰۰۸). با توجه به اهمیت قارچ فوزاریوم در بذر پنبه و نقش مهمی که در سلامت حیوانات، انسان و اقتصاد جامعه دارد، در تحقیق حاضر بذور پنبه از نظر آلودگی به قارچ فوزاریوم بررسی شدند و مهم‌ترین گونه‌های قارچ فوزاریوم از نظر مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۱: گونه‌های فوزاریوم به‌دست آمده از پنبه

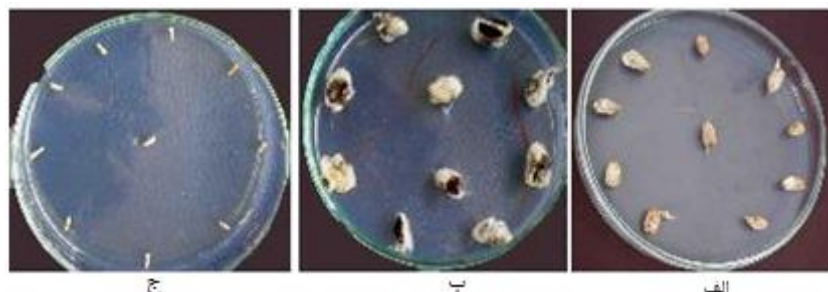
منبع	گونه‌های فوزاریوم	ردیف
اسمیت، ۱۹۵۰	<i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. incarnatum</i>	۱
آرندت ۱۹۵۷، بیرد ۱۹۷۴، جانسون و همکاران ۱۹۷۸، واتکینسون ۱۹۸۱، مینتون و گاربر ۱۹۸۳	<i>F. equiseti</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i>	۲
کوچ، ۱۹۸۶	<i>F. equiseti</i> , <i>F. semitectum</i>	۳
ملرو وارا و همکاران، ۱۹۹۰	<i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i>	۴
وانگ و همکاران، ۱۹۹۲	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. compactum</i>	۵
سلیمانی و همکاران، ۱۹۹۳	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. buharicum</i> , <i>F. latritium</i>	۶
سلیمانی و حجارود ۱۹۹۳، وودروف ۱۹۷۲، کلیک ۱۹۸۲، یامادا ۱۹۸۶	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. verticillioides</i>	۷
ژانگ و همکاران، ۱۹۹۶	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>F. pallidroseum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. semitectum</i>	۸
بایر و کورلینگ، ۱۹۹۸	<i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. nivale</i>	۹
هایلوکس و والر، ۱۹۹۹	<i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. proliferatum</i>	۱۰
چیمبکوجو، ۲۰۰۰	<i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i>	۱۱
پالماتر و همکاران، ۲۰۰۴	<i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. chlamidosporium</i> , <i>F. latritium</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. subglutinans</i>	۱۲
عرب سلمانی، ۲۰۱۵	<i>F. acuminatum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. buharicum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. proliferatum</i>	۱۳

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: طی سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴، تعداد ۲۳ نمونه بذر پنبه متعلق به طبقات ارقام ارمغان، بختگان، خرداد، خورشید، ساحل، کاشمر، گلستان، دکتر عمومی، ورامین و T14 از شرکت بهداشت بشرویه (انحصاری تولید بذر رقم خرداد در ایران)، کارخانه طلای سفید بشرویه، کارخانه طلای سفید کاشمر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و استان‌های گستان و فارس تهیه شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری درون پاکت‌های کاغذی مجزا قرار گرفته و پس از ثبت مشخصات لازم، جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور بررسی آلودگی‌های فوزاریومی، بذور پنبه روی محیط‌های سیب زمینی دکستروز آگار (PDA^۱) و آب آگار (WA^۲) قرار داده شد.

کشت بذور پنبه روی محیط‌های غذایی PDA و WA: این قسمت از آزمایش طبق روش سلیمانی و همکاران (۱۹۹۳) با کمی تغییر انجام شد. در این بخش، بذور پنبه به‌طور تصادفی انتخاب شده و قسمت‌های مختلف بذر از هم تفکیک شدند. به منظور جدا کردن پوسته، مغز (آندوسپرم+جنین)، آندوسپرم و جنین، ابتدا بذور کرک‌دار و دلینته به ترتیب به مدت ۲۴ و ۱۲ ساعت در آب خیسانده شد. هر کدام از قسمت‌های مختلف بذر در ظروف مشخص با توجه به رقم آن قرار داده، با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضد عفونی و با آب مقطر سترون شستشو شدند. ضد عفونی قسمت‌های مختلف بذر به شرح ذیل بود: بذر کامل ۴ دقیقه، مغز (شامل آندوسپرم و جنین) ۳ دقیقه، پوسته، آندوسپرم و جنین ۲ دقیقه. پس از خشک کردن این قطعات در زیر هود، از قسمت‌های پنج‌گانه هر بذر به تعداد ۱۰ عدد در محیط‌های PDA و WA کشت گردید (شکل ۱) و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از گذشت یک هفته مورد بررسی قرار گرفته و جدایه‌های متعلق به جنس فوزاریوم پس از خالص‌سازی، جهت تحریک اسپورزایی به محیط برگ میخک آگار (CLA^۳) منتقل شدند سپس تشتک‌های پتری به زیر نور NUV^۴ نزدیک ماورا بنفش، با تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک اسپور انجام شد و جهت نگهداری به میکروتیوب‌های حاوی ماسه بادی سترون منتقل شدند (جونز، ۱۹۷۴). جهت میزان رشد، شکل و رنگ پرگنه، جدایه‌های خالص روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی نگهداری شدند.

1. Potato Dextrose Agar
2. Water Agar
3. Carnation Leaf-piece Agar
4. Near Ultra Violet



شکل ۱: الف) کشت مغز در محیط کشت WA ب) کشت پوسته در محیط کشت WA ج) کشت جنین در محیط کشت WA

روش شناسایی جدایه‌های فوزاریوم: برای شناسایی قارچ در سطح گونه از کلیدهای شناسایی نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس (۱۹۹۴) و لزلی و سومرل (۲۰۰۶) استفاده شد.

ردیابی مولکولی جدایه‌های فوزاریوم به روش واکنش PCR اختصاصی: به‌منظور آماده‌سازی میسلیم جهت استخراج DNA، جدایه‌های خالص قارچ مورد نظر در پتری‌های حاوی محیط PDA کشت داده و به مدت ۴ تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از رشد کافی پرگنه قارچ، با استفاده از اسکالپل سترون بافت قارچی از روی محیط کشت تراشیده شد و مستقیماً به داخل هاون‌های چینی سترون منتقل گردید (یلی-ماتیل و همکاران، ۲۰۰۴). جهت استخراج DNA از کیت شرکت دنازیست آسیا (Genomic DNA isolation Kit-IV) که دارای بافرها و لوله‌های دارای صافی مخصوص بود، استفاده گردید. جهت اطلاع از موفقیت استخراج DNA ژنومی بافر TAE 0/5x، الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد. به‌منظور مشاهده DNA ژنومی استخراج شده، ژل آگارز ۰/۸ درصد تهیه گردید و سوسپانسیون حاصل در ماکروویو قرار گرفت تا آگارز ذوب شده و در بافر حل شود. جهت رنگ‌آمیزی ژل، ۵ میکرولیتر محلول گرین‌ویور^۱ اضافه شد. سپس مخلوط حاصل درون سینی مخصوص ژل ریخته شد. جهت الکتروفورز DNA ژنومی روی ژل پس از منعقد شدن آگارز، سینی حاوی ژل درون تانک الکتروفورز قرار داده شد و تانک با بافر TAE 0/5x پر گردید. ۵ میکرولیتر از DNA ژنومی استخراج شده با یک میکرولیتر بافر بارگذاری (Loading Dye, ThermoScientific) مخلوط شد و مخلوط حاصل به درون چاهک‌های ژل ریخته شد. به‌منظور بررسی وزن مولکولی نوارهای DNA به‌دست آمده، از DNA سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Gene Ruler 100bp, Thermo Scientific) استفاده شد. سپس تانک الکتروفورز به دستگاه تأمین

کننده جریان الکتریکی (Electrophoresis, PowerPac Basic, BIO RAD, USA) با ولتاژ 75 به مدت 20 دقیقه وصل شد. بعد از اتمام الکتروفورز، جهت مشاهده DNA ژنومی، از دستگاه عکس‌برداری از ژل¹ استفاده شد. جهت انجام PCR در سطح گونه، از سه جفت آغازگر اختصاصی گونه (ساخت شرکت ماکروژن²) استفاده شد. آغازگرها با غلظت 10 میکرومولار تهیه شدند. اندازه محصول PCR، اسامی و توالی آغازگرها در جدول شماره 2 ذکر شده است. فرایند PCR در حجم 25 میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش PCR در جدول شماره 3 آمده است. واکنش PCR پس از تهیه در دستگاه (MJ Mini Gardient Termal Cycler Bio PCR Rod, USA) بر اساس برنامه حرارتی اختصاصی هر گونه صورت گرفت، (جدول 4). به منظور بررسی محصول PCR از ژل آگارز با غلظت 1/5 درصد استفاده شد. جهت الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز 1/5 درصد رنگ آمیزی شده با گرین ویور با ولتاژ 90 و به مدت 60 دقیقه استفاده شد تا قطعات DNA تکثیر شده بر اساس طول و بار الکتریکی از هم جدا شوند. پس از اتمام الکتروفورز، محصول PCR در دستگاه عکس‌برداری از ژل مشاهده گردید.

جدول 2: توالی جفت آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص *Fusarium proliferatum* و *Fusarium equiseti*

منبع	اندازه محصول PCR (bp)	توالی هدف	آغازگر	گونه
Mule <i>et al.</i> , 2004	585	CTT TCC GCC AAG TTT CTT C	PRO1	<i>F. proliferatum</i>
		TGT CAG TAA CTC GAC GTT GTT G	PRO2	<i>F. proliferatum</i>
Visentin <i>et al.</i> , 2009	390	GCT TGC CGC AAG GGC TCG C	ITS1	<i>F. proliferatum</i>
		GCT TGC CGC AAG GGC TCG C	ITS-R	<i>F. proliferatum</i>
Abedi-Tizaki and Sabbagh, 2012	400	CAT ACC TAT ACG TTG CCT CG	FEF1	<i>F. equiseti</i>
		TTA CCA GTA ACG AGG TGT ATG	FER1	<i>F. equiseti</i>

جدول 3: مخلوط واکنش PCR

آب مقطر	بافر PCR	Mgcl ₂	dntp	آنزیم Taq پلی مرارز	از هر جفت آغازگر با غلظت 10 پیکومول	DNA نمونه	مخلوط واکنش
دیونیزه فاقد نوکلئاز							
۱۲/۶	۲/۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۱۵	۰/۷۵	۷/۰	حجم به میکرولیتر

1. Alphaimager Mini System, Economical Gel Documentation
2. Macrogen

جدول ۴: برنامه حرارتی آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص *Fusariumproliferaum* و *Fusariumequiseti*

آغازگر	واسرشت سازی اولیه	تعداد چرخه	واسرشت سازی	اتصال آغازگر	بسط	بسط نهایی
PRO1/PRO2	۵ دقیقه، ۹۵ درجه	۳۵	۵۰ ثانیه، ۹۴ درجه	۵۰ ثانیه، ۵۶ درجه	۱ دقیقه، ۷۲ درجه	۷ دقیقه، ۷۲ درجه
ITS1/proITS-R	۲ دقیقه، ۹۴ درجه	۳۵	۶۰ ثانیه، ۹۶ درجه	۶۰ ثانیه، ۶۰ درجه	۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه	۱۰ دقیقه، ۷۲ درجه
FEF1/FER1	۵ دقیقه، ۹۵ درجه	۳۵	۵۰ ثانیه، ۹۴ درجه	۵۰ ثانیه، ۵۶ درجه	۱ دقیقه، ۷۲ درجه	۷ دقیقه، ۷۲ درجه

*دما در تمام مراحل بر حسب درجه سلسیوس است.

ردیابی آلودگی‌های فوزاریومی بذر پنبه به روش PCR اختصاصی: به منظور استخراج DNA بذر پنبه، بذر کامل و مغز ارقام ورامین، خرداد و بختگان که دارای بیشترین درصد آلودگی به قارچ فوزاریوم بود، هر کدام جداگانه به کمک نیتروژن مایع در هاون‌های چینی سترون ساییده شدند. به منظور یکسان بودن شرایط استخراج برای تمام نمونه‌ها، از یک کیت استخراج DNA (Genomic DNA isolation Kit- DNA) استفاده شد و مراحل انجام استخراج DNA طبق دستور کیت انجام گرفت. به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA با یک میکرولیتر بافر بارگذاری (Loding Dye, Fermetas) مخلوط شد و در ژل آگارز ۰/۸ درصد رنگ آمیزی شده با گرین ویور در دستگاه الکتروفورز تحت ولتاژ ۷۰ به مدت ۴۵ دقیقه با بافر TAE 0/5 قرار گرفت. سپس ژل تحت نور ماوراء بنفش، در دستگاه عکس برداری از ژل مشاهده گردید. جهت انجام PCR دو گونه غالب *F. proliferatum* و *F. equiseti* از سه جفت آغازگر اختصاصی گونه استفاده شد (جدول ۲). فرایند PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد (جدول ۳). واکنش PCR پس از بهینه‌سازی، در دستگاه PCR بر اساس برنامه حرارتی اختصاصی هر آغازگر صورت گرفت، (جدول ۴). الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با گرین ویور تحت ولتاژ ۷۰ به مدت ۴۵ دقیقه با بافر TAE 0/5 x در دستگاه الکتروفورز انجام شد. سپس ژل تحت نور ماوراء بنفش، در دستگاه عکس برداری از ژل مشاهده گردید.

نتایج

در این بررسی طی سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴، در مجموع ۱۷ نمونه از طبقات بذور کرکدار و شش نمونه از طبقات بذور دلینته از استان‌های خراسان جنوبی، خراسان رضوی، گلستان و فارس جمع آوری شد (جدول ۵).

جدول ۵: جدایه‌های فوزاریوم و محل جمع‌آوری بذور تجاری پنبه

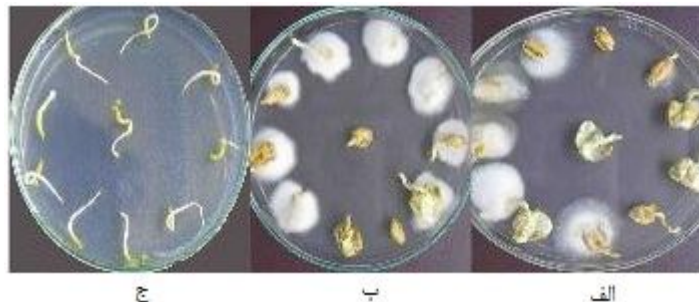
کد جدایه	گونه قارچی	محل جمع‌آوری	رقم و طبقه پنبه	قسمت کشت شده
Fc1	<i>F. equiseti</i>	بشرویه	خرداد الیت	بذر کامل
Fc2	<i>F. equiseti</i>	بشرویه	خرداد گواهی شده	بذر کامل
Fc3-Fc13	<i>F. equiseti</i>	بشرویه	خرداد گواهی شده	مغز
Fc14- Fc16	<i>F. equiseti</i>	کاشمر	ورامین نوکلئوس	مغز
Fc17- Fc24	<i>F. equiseti</i>	کاشمر	ورامین الیت	مغز
Fc25- Fc26	<i>F. equiseti</i>	کاشمر	ورامین سوپر الیت	مغز
Fc27	<i>F. equiseti</i>	کاشمر	ورامین سوپر الیت دلینته	مغز
Fc28- Fc32	<i>F. equiseti</i>	کاشمر	ورامین گواهی شده	مغز
Fc33	<i>F. equiseti</i>	کاشمر	ورامین گواهی شده	بذر کامل
Fc34	<i>F. equiseti</i>	کاشمر	خورشید	مغز
Fc35	<i>F. equiseti</i>	کاشمر	خورشید	بذر کامل
Fc36- Fc37	<i>F. equiseti</i>	گلستان	کاشمر	آندوسپرم
Fc38	<i>F. equiseti</i>	گلستان	کاشمر	پوسته
Fc39	<i>F. equiseti</i>	گلستان	گلستان	پوسته
Fc40	<i>F. proliferatum</i>	بشرویه	خرداد گواهی شده	مغز
Fc41- Fc47	<i>F. proliferatum</i>	فارس	بختگان گواهی شده	مغز
Fc48- Fc50	<i>F. proliferatum</i>	کاشمر	ورامین سوپر الیت	آندوسپرم
Fc51- Fc52	<i>F. proliferatum</i>	کاشمر	ورامین گواهی شده	آندوسپرم
Fc53	<i>F. proliferatum</i>	کاشمر	ورامین گواهی شده	بذر کامل
Fc54- Fc60	<i>F. proliferatum</i>	کاشمر	ورامین گواهی شده	مغز
Fc61- Fc62	<i>F. proliferatum</i>	گلستان	ارمغان	مغز
Fc63- Fc64	<i>F. semitectum</i>	فارس	بختگان گواهی شده	مغز
Fc65- Fc67	<i>F. semitectum</i>	گلستان	ارمغان گواهی شده	پوسته
Fc68- Fc69	<i>F. semitectum</i>	گلستان	کاشمر	آندوسپرم
Fc70- Fc71	<i>F. semitectum</i>	گلستان	کاشمر	بذر کامل
Fc72	<i>F. semitectum</i>	گلستان	کاشمر	پوسته
Fc73	<i>F. compactum</i>	فارس	بختگان گواهی شده	بذر کامل
Fc74	<i>F. compactum</i>	کاشمر	ورامین سوپر الیت	مغز
Fc75	<i>F. nygamai</i>	کاشمر	ورامین گواهی شده	مغز
Fc76	<i>F. solani</i>	گلستان	ساحل گواهی شده	آندوسپرم

جدول ۶: تعداد جدایه‌های قارچ فوزاریوم به دست آمده از ارقام و طبقات تجاری پنبه

تعداد کل جدایه‌ها	Fusarium solani	Fusarium nygamai	Fusarium compactum	Fusarium semitectum	Fusarium proliferatum	Fusarium equiseti	گونه‌ی فوزاریوم طبقات پنبه	ردیف
۳	۰	۰	۰	۰	۰	۳	نوکلئوس سلکسیون کرک‌دار ورامین	۱
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	نوکلئوس تکثیریکرک‌دار ورامین	۲
۶	۰	۰	۱	۰	۳	۲	سوپرالیت کرک‌دار ورامین	۳
۸	۰	۰	۰	۰	۰	۸	الیت کرک‌دار ورامین	۴
۱۷	۰	۱	۰	۰	۱۰	۶	گواهی شده کرک‌دار ورامین	۵
۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱	سوپرالیت دلینته ورامین	۶
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	الیت دلینته ورامین	۷
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	گواهی شده دلینته ورامین	۸
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	سوپرالیت کرک‌دار خرداد	۹
۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱	الیت کرک‌دار خرداد	۱۰
۱۳	۰	۰	۰	۰	۱	۱۲	گواهی شده کرک‌دار خرداد	۱۱
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	سوپرالیت دلینته خرداد	۱۲
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	الیت دلینته خرداد	۱۳

به‌طور کلی در این آزمون از مجموع ۲۳ نمونه بذر پنبه، شش گونه قارچ فوزاریوم به‌دست آمد. گونه‌های فوزاریوم شناسایی شده عبارتند از: *F. proliferatum*، *Fusarium equiseti*، *F. solani* و *F. nygamai*، *F. compactum*، *F. semitectum*، ۱۰، ۲، ۱ و ۱ جدایه بود. درصد آلودگی بذور کرک‌دار به قارچ فوزاریوم ۹۸/۶۸ و بذور دلینته ۱/۳۲ بود. بیشترین درصد آلودگی مربوط به طبقه گواهی شده کرک‌دار ورامین با ۲۲/۳۷ درصد بود. پس از آن طبقات گواهی شده کرک‌دار خرداد و گواهی شده کرک‌دار بختگان به ترتیب با ۱۷/۱۱ و ۱۳/۱۶ درصد آلودگی بودند. از طبقات سوپرالیت دلینته ورامین، الیت کرک‌دار خرداد، گواهی شده کرک‌دار ساحل و گواهی شده کرک‌دار گلستان تنها ۱ جدایه قارچ فوزاریوم به‌دست آمد. طبقات الیت کرک‌دار ورامین و سوپر الیت کرک‌دار کاشمر (جمع آوری شده از گلستان) به‌طور مشترک به میزان ۱۰/۵۳ درصد آلودگی در رتبه چهارم قرار گرفتند. از ارقام دکتر عمومی کرک‌دار و T14 دلینته قارچ فوزاریوم جدا نگردید (جدول ۶).

در این بررسی از جنین بذور ارقام تجاری پنبه قارچ فوزاریوم جدا نگردید. بیشترین آلودگی مربوط به مغز با ۶۸/۴۲ درصد بود (شکل ۲). آلودگی آندوسپرم، بذر کامل و پوسته به قارچ فوزاریوم به ترتیب با فراوانی ۱۰، ۸ و ۶ عدد بود (جدول ۷). گونه *F. equiseti* ۵۱/۳۲ درصد از بذور پنبه جدا گردید.



شکل ۲- الف) آلودگی مغز رقم ورامین به قارچ فوزاریوم ب) آلودگی مغز رقم خرداد به قارچ فوزاریوم، ج) عدم آلودگی جنین به قارچ فوزاریوم

جدول ۷: تعداد گونه‌های فوزاریوم جدا شده از قسمت‌های مختلف بذر

تعداد کل جدایه‌ها	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium nygamai</i>	<i>Fusarium compactum</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	گونه فوزاریوم / قسمت کشت شده
۶	۰	۰	۰	۴	۰	۲	یوسته
۸	۰	۰	۱	۲	۱	۴	بذر کامل
۵۲	۰	۱	۱	۲	۱۷	۳۱	مغز (آندوسپرم+جنین)
۱۰	۱	۰	۰	۲	۵	۲	آندوسپرم
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	جنین
۷۶	۱	۱	۲	۱۰	۲۳	۳۹	تعداد کل جدایه‌ها

Fusarium equiseti,

Soleimani *et al.*, Plant Dis.(1993), Soleimani & Hajarud, Plant Dis. (1993) and Arabsalmani, (1995)

میزان رشد پرگنه قارچ در محیط کشت PDA بعد از ۷۲ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی ۲ تا ۳/۸ سانتی‌متر است. رنگ پرگنه از پشت تشک پتری قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره و نارنجی است. در این گونه میکروکنیدی تولید نشد ولی کلامیدوسپور به صورت فراوان و زنجیری تشکیل گردید. در محیط CLA اسپورودوکایوم‌های نارنجی فراوان تشکیل شد (در تعدادی از جدایه‌ها ماکروکنیدی به تعداد کم مشاهده شد. اسپورودوکایوم تولید نشد. پرگنه در محیط CLA پنبه‌ای و به تعداد فراوان، زنجیری و خوشه‌ای کلامیدوسپور تولید شد). ماکروکنیدی‌ها خمیده و دارای ۵ جداره عرضی بودند. سلول پایه در ماکروکنیدی شبیه پاشنه پا و سلول انتهایی به یک نقطه ختم می‌شود. نتایج ریخت‌شناسی این گونه با توصیف ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس (۱۹۹۴) و لزلی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه در ایران توسط سلیمانی و همکاران (۱۹۹۳) سلیمانی و حجارود (۱۹۹۳) و عرب سلمانی (۱۹۹۵) از پنبه گزارش شده است (شکل ۳).



د

ج

ب

الف

شکل ۳: گونه *Fusarium equiseti* (الف) رنگ پرگنه (ب) تشکیل اسپورودوکایوم‌های نارنجی رنگ روی برگ میخک در محیط کشت CLA (ج) ماکروکنیدیوم (د) زنجیره کلامیدوسپور

Fusarium proliferatum, Soleimani *et al.*, Plant Dis.(1993)

میزان رشد پرگنه قارچ در محیط کشت PDA بعد از ۷۲ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی ۱/۵ تا ۲/۶ سانتی متر است. رنگ میسلیم هوایی سفید رنگ است. رنگ پرگنه از پشت تشتک پتری متغییر بوده، خاکستری، بنفش و قرمز است. در این گونه میکروکنیدی فراوان به صورت زنجیرهای طویل و مجتمع (Fals-head) تشکیل شد، کلامیدوسپور وجود نداشت و اسپورودوکوم مشاهده نشد. فیالیدها یا سلول‌های تولید کننده کنیدی چندشاخه (Polypfalide) وجود دارد. نتایج ریخت‌شناسی این گونه با توصیف ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس (۱۹۹۴) و لزلی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه در ایران توسط سلیمانی و همکاران (۱۹۹۳) از پنبه گزارش شده است (شکل ۴).



شکل ۴: گونه *Fusarium proliferatum* (الف) رنگ پرگنه از پشت تشتک پتری

(ب) رشد قارچ در محیط کشت CLA (ج) زنجیره میکروکنیدیوم (د) فیالید

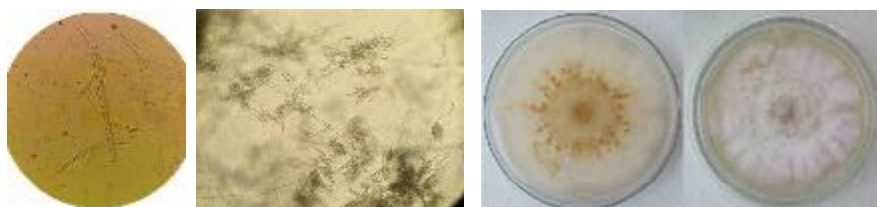
Fusarium semitectum
Soleimani et al., Plant Dis. (1993)

میزان رشد پرگنه قارچ در محیط کشت PDA بعد از ۷۲ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی ۲/۵ تا ۴/۱ سانتی متر است. رنگ میسلیم هوایی سفید است. رنگ پرگنه از پشت تشتک پتری سفید مات و خاکستری است. میکروکنیدی به تعداد کم و ۱-۲ سلولی است. کلامیدوسپور وجود دارد. اسپورودوکوم مشاهده نشد. در محیط CLA کنیدی‌ها بصورت گوش خرگوش بود. ماکروکنیدی ۵ دیواره عرضی و دارای مزوکنیدی است. نتایج ریخت‌شناسی این گونه با توصیف ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس (۱۹۹۴) و لزلی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه در ایران توسط سلیمانی و همکاران (۱۹۹۳) از پنبه گزارش شده است (شکل ۵).



شکل ۵: گونه *Fusarium semitectum* (الف) رنگ پرگنه (ب) ماکروکنیدیوم به شکل گوش خرگوش در محیط کشت CLA (ج) ماکروکنیدیوم، مزوکنیدیوم و میکروکنیدیوم

میزان رشد پرگنه قارچ در محیط کشت PDA بعد از ۷۲ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی ۲/۳ تا ۳/۱ سانتی‌متر است. رنگ میسلیم هوایی سفید است. رنگ پرگنه از پشت تشتک پتری سفید و در مرکز خاکستری است. میکروکنیدی تولید نشد. کلامیدوسپور به صورت فراوان و زنجیری تشکیل گردید. در محیط CLA اسپورودوکایوم‌های نارنجی فراوان تشکیل شد. ماکروکنیدی‌ها دارای انحنای زیاد و ۵ جداره عرضی بودند. سلول انتهایی کشیده و به یک نقطه ختم می‌شود و سلول پایه شبیه پاشنه پا است. نتایج ریخت‌شناسی این گونه با توصیف ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس (۱۹۹۴) و لزلی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه برای اولین بار در ایران از پنبه گزارش می‌شود (شکل ۶).

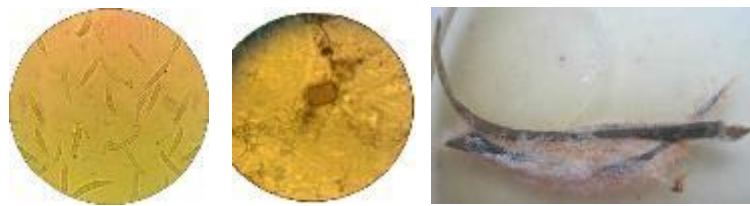


شکل ۶: گونه *Fusarium compactum* (الف) رنگ پرگنه (ب) مجموعه ماکروکنیدیوم و کلامیدوسپور در محیط کشت CLA (ج) ماکروکنیدیوم

Fusarium nygamai

میزان رشد پرگنه قارچ در محیط کشت PDA بعد از ۷۲ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی ۳/۷ سانتی‌متر است. رنگ پرگنه از پشت تشتک پتری کرم رنگ است. در حاشیه محیط CLA میکروکنیدی با زنجیره کوتاه و مجتمع (False-head) تشکیل شد. کلامیدوسپور فراوان

و به صورت زنجیری و مجتمع بود. اسپورودوکئیوم‌های نارنجی فراوان تشکیل شد. ماکروکنیدی‌ها خمیده و دارای ۳ جداره عرضی بودند. سلول پایه در ماکروکنیدی شبیه پاشنه پا و سلول انتهایی به یک نقطه ختم می‌شود. نتایج ریخت‌شناسی این گونه با توصیف ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس (۱۹۹۴) و لزلی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه برای اولین بار در ایران از پنبه گزارش می‌شود (شکل ۷).

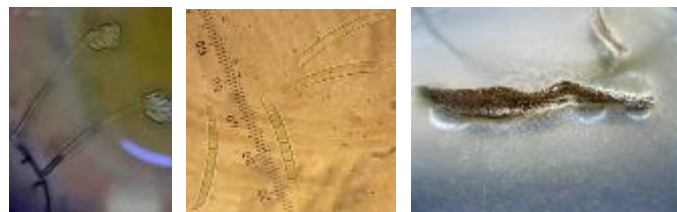


شکل ۷: گونه *Fusarium nygamai* (الف) تشکیل اسپورودوکئیوم‌های نارنجی رنگ روی برگ میخک در محیط کشت CLA (ب) اسپورودوکئیوم با بزرگ نمایی ۴۰x در محیط کشت PDA (ج) ماکروکنیدیوم

Fusarium solani

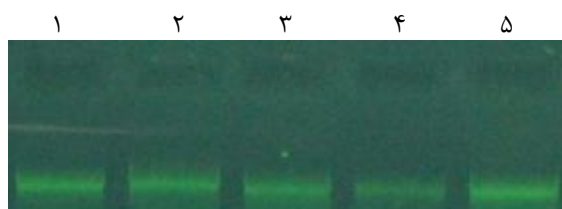
Mansoori and Hamdollahzadeh, Entomol and Phytopathol. 62: 61-62 17 (1994)

میزان رشد پرگنه قارچ در محیط کشت PDA بعد از ۷۲ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی ۲/۰ سانتی‌متر است. رنگ پرگنه از پشت تشک پتری کرم رنگ است. میکروکنیدی‌ها مجتمع (False-head)، ۱-۲ سلولی، بیضوی شکل و روی فیالیدهای بلند تشکیل شد. کلامیدوسپور به صورت فراوان و زنجیری تشکیل گردید. در محیط CLA اسپورودوکئیوم‌های کرم رنگ فراوان تشکیل شد. ماکروکنیدی‌ها کمی خمیده، ۳-۵ و اکثراً دارای ۵ جداره عرضی بودند. نتایج ریخت‌شناسی این گونه با توصیف ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس (۱۹۹۴) و لزلی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه در ایران توسط منصور و حمداله‌زاده (۱۹۹۴) از پنبه گزارش شده است (شکل ۸).



شکل ۸: گونه *Fusarium solani* (الف) تشکیل اسپورودوکئیوم‌های کرم رنگ روی برگ میخک در محیط کشت CLA (ب) ماکروکنیدیوم (ج) فیالیدهای بلند و مجموعه میکروکنیدیوم

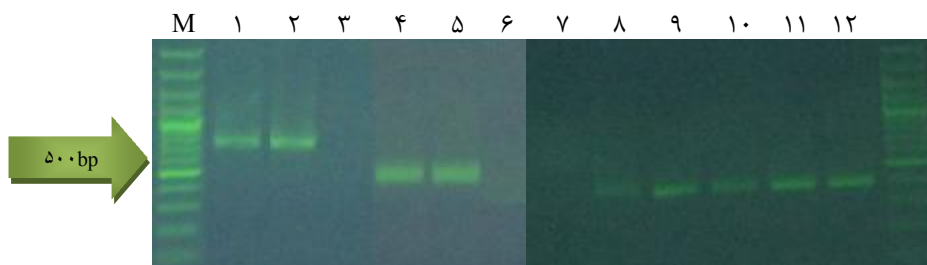
استخراج DNA: نتایج الکتروفورز DNA در ژل آگارز نشان داد که DNA استخراج شده از میسلیوم قارچ و بذور پنبه به روش کیت شرکت دنازیست آسیا از کیفیت خوبی برخوردار است (شکل ۹).



شکل ۹: چاهک ۱-۲) DNA استخراج شده از میسلیوم قارچ فوزاریوم چاهک ۳-۵) DNA استخراج شده از مغز ارقام ورامین، خرداد و بختگان

نتایج ردیابی مولکولی جدایه‌های فوزاریوم به روش واکنش PCR اختصاصی: در این بخش از تحقیق امکان بکارگیری تکنیک PCR اختصاصی به منظور ردیابی جدایه‌های قارچی متعلق به گونه‌های *F. proliferatum* و *F. equiseti* مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه بررسی کمیت و کیفیت DNA ژنومی نشان داد که DNA استخراج شده از میسلیوم قارچ با کیت شرکت دنا زیست آسیا از کیفیت بالایی برخوردار است (شکل ۹). DNA ۶۲ جدایه قارچی متعلق به گونه‌های *F. proliferatum* و *F. equiseti* با استفاده از تکنیک PCR و ۳ جفت آغازگر اختصاصی گونه مورد ردیابی قرار گرفت. در تمامی مراحل این بخش از تحقیق به منظور بررسی و تعیین اندازه محصول PCR متعلق به آغازگرهای به کار رفته، DNA سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی^۱ مورد استفاده قرار گرفت. برای ردیابی گونه *F. proliferatum* دو جفت آغازگر اختصاصی (PRO1/PRO2) و (ITS1/proITS-R) استفاده شد، که در تمام جدایه‌های این گونه به ترتیب نوار به طول ۵۸۵ (مول و همکاران، ۲۰۰۴) و ۳۹۰ (وایت و همکاران، ۱۹۹۰؛ ویسنتین و همکاران، ۲۰۰۹) جفت باز را تکثیر می‌نمایند. مطابق انتظار جدایه‌هایی که از نظر ریخت‌شناسی *F. proliferatum* شناسایی شدند با تکثیر قطعات مذکور مورد تأیید قرار گرفتند (شکل ۱۰). یک جفت آغازگر اختصاصی *F. equiseti* (FEF1/FER1) قادر است در جدایه‌های *F. equiseti* نوار به طول ۴۰۰ (مول و همکاران، ۲۰۰۴) جفت بازی را تکثیر نماید. در این تحقیق در تمام جدایه‌ها نوار به طول ۴۰۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۱۰).

1. Gene Ruler 100 bp DNA Ladder # SM0241 ThermoScientific



شکل ۱۰: ردیابی گونه‌های قارچ فوزاریوم، چاهک‌های ۱ و ۲) آغازگر PRO1/2 چاهک‌های ۴ و ۵) آغازگر proITS-R/ITS1 و چاهک‌های ۸-۱۲) آغازگر FEF1/FER1. چاهک‌های ۴، ۵ و ۱۰، ۱۲) چاهک‌های ۳ و ۶) کنترل منفی *Fusarium proliferatum* چاهک‌های ۸-۱۲) *Fusarium equiseti* چاهک ۷) کنترل منفی *Fusarium equiseti* سایز مارکر ۱۰۰bp.

نتایج ردیابی مولکولی گونه‌های فوزاریوم در بذر پنبه: در این مطالعه امکان استفاده از واکنش PCR اختصاصی به منظور ردیابی گونه‌های *F. proliferatum* و *F. equiseti* از بذور پنبه که به طور طبیعی آلوده به قارچ فوزاریوم بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. در واکنش جداگانه‌ای گونه‌های *F. proliferatum* و *F. equiseti* به طور مستقیم از بذور پنبه که به طور طبیعی آلوده به قارچ فوزاریوم بودند با استفاده از و

واکنش PCR و ۳ جفت آغازگر اختصاصی مورد ردیابی قرار گرفتند (شکل ۱۱). هدف این مرحله از تحقیق، تکمیل نتایج به دست آمده از شناسایی مولکولی و ریخت‌شناسی گونه‌های نام برده که در آزمایش‌های جداگانه انجام شده است نیز بود.



شکل ۱۱: (M) سایز مارکر ۱۰۰bp. چاهک‌های ۲ و ۴) ردیابی گونه *Fusarium proliferatum* از بذر پنبه با آغازگر اختصاصی PRO1/2. چاهک‌های ۱ و ۳) کنترل منفی. چاهک‌های ۶-۸) ردیابی گونه *Fusarium proliferatum* از بذر پنبه با آغازگر اختصاصی proITS-R/ITS1. چاهک ۵) کنترل منفی. چاهک‌های ۱۰-۱۴) ردیابی گونه *Fusarium equiseti* از بذر پنبه با آغازگر اختصاصی FEF1/FER1. چاهک ۹) کنترل منفی.

بحث و نتیجه گیری

پنبه یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی در دنیا می‌باشد. قارچ فوزاریوم یکی از مخاطرات اصلی این محصول به‌خصوص دانه‌های آن محسوب می‌شود و خسارت قابل توجهی را همه ساله در سراسر دنیا به مزارع پنبه وارد می‌کند. بررسی‌هایی در برخی از کشورها در خصوص قارچ‌های فوزاریوم بذریه و گیاهچه پنبه صورت گرفته است. با توجه به اینکه گونه‌های فوزاریوم یکی از مهم‌ترین عوامل خسارتزای پنبه محسوب می‌شوند و مخاطرات آن بر روی سلامت انسان و دام تاثیر گذار است، این انگیزه بوجود آمد تا با اجرای این تحقیق مطالعه‌ای در مورد گونه‌های فوزاریوم روی بذور ارقام تجاری پنبه انجام شود که طی آن با ردیابی گونه‌های فوزاریوم غالب بوسیله روش‌های مولکولی، ردیابی آسان، سریع، دقیق و ارزان در نمونه‌های بذور پنبه می‌گردد.

نتایج حاصل از شناسایی بر اساس صفات ریخت‌شناسی شامل گونه‌های *Fusarium equiseti*، *F. proliferatum*، *F. semitectum*، *F. compactum*، *F. nygamai* و *F. solani* با فراوانی به ترتیب ۳۹، ۲۳، ۱۰، ۲، ۱ و ۱ جدایه بودند. نتایج ریخت‌شناسی گونه‌های مذکور با توصیف ارائه شده توسط نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگس و همکاران (۱۹۹۴) و لزی و سومرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت. در ایران گونه‌های *F. Proliferatum* و *F. Semitectum* توسط سلیمانی و همکاران (۱۹۹۳) و گونه *F. solani* توسط منصوری و حمداله زاده (۱۹۹۴) از پنبه گزارش شده‌اند. گونه‌های *F. Compactum* و *F. nygamai* برای اولین بار در ایران از بذور پنبه گزارش می‌شوند. بررسی‌ها در این آزمون نشان داد که بیشترین آلودگی مربوط به بذور کرک‌دار با ۹۸/۷ درصد بود. نتایج این تحقیق با مطالعه منصوری (۱۹۹۳) و عرب سلمانی (۲۰۱۵) مطابقت دارد. در بین طبقات بذور پنبه، بیشترین آلودگی مربوط به طبقه گواهی شده کرک‌دار ورامین بود. فراوانی بالای *F. equiseti* همراه با بذور پنبه رقم ورامین با بررسی سلیمانی و همکاران (۱۹۹۳) مطابقت دارد همچنین بیشترین آلودگی گونه‌های فوزاریوم مربوط به قسمت‌های داخلی بذور بود که با مطالعات انجام شده توسط سلیمانی و همکاران (۱۹۹۳) مطابقت دارد. گونه *F. equiseti* با تعداد ۳۹ جدایه دارای بیشترین فراوانی بود. اهمیت این گونه به دلیل پراکنش آن در اغلب مناطق آب و هوایی می‌باشد گوردن (۱۹۵۲؛ ۱۹۶۰)، کمدال و همکاران (۱۹۷۵)، برجس (۱۹۸۱)، ماراساز و همکاران (۱۹۸۸)، برجس و همکاران (۱۹۸۸)، برجس و سومرل (۱۹۹۲) و سومرل و همکاران (۱۹۹۳). *F. equiseti* در کشورهای اسپانیا (ملرو وارا، ۱۹۹۰)، ایالات متحده (کولیر، ۱۹۸۸؛ روی و بورلاند، ۱۹۸۲)، لوئیزیانا (کولیر، ۱۹۸۸)، گرجستان (بایرد و کارلینگ، ۱۹۹۸)، نیجریه (چیمبکوجو، ۲۰۰۰)، آلاباما (پالماتر و همکاران، ۲۰۰۴)، برزیل (رودریگز و منزس، ۲۰۰۵)، کانادا (تامبوریک و اسپاسفام، ۲۰۰۸)، و هند (ناگاراچا و همکاران، ۲۰۱۶) مشاهده شده است. این گونه در ایران از بذور پنبه توسط سلیمانی و همکاران (۱۹۹۳)، سلیمانی و حجارود (۱۹۹۳) و عرب سلمانی

(۱۹۹۵) گزارش شده است. *F. equiseti* جزء مهمی در بیماری‌زایی مناطق کمربند پنبه ایالات متحده در نظر گرفته می‌شود (کولیر ۱۹۸۸؛ روی و بورلاند، ۱۹۸۲). درصد فراوانی *F. equiseti* در سال‌های ۱۹۹۵ و ۱۹۹۶ از سایر گونه‌های فوزاریوم جدا شده از پنبه بیشتر بود (بایرد و کارلینگ، ۱۹۹۸). ۳۰ درصد از قارچ‌های فوزاریوم جدا شده از پنبه مربوط به گونه *F. equiseti* بوده است، همچنین *F. equiseti* به‌عنوان عامل مولد بیماری پنبه گزارش شده است (چیمبکوجو، ۲۰۰۰). فراوانی بالای *F. equiseti* همراه با پنبه با بررسی‌های جانسون و همکاران (۱۹۷۸)، کلیک (۱۹۸۶)، شامرا و ساندهو (۱۹۸۶)، موسی و همکاران (۱۹۹۰) و سلیمانی و همکاران (۱۹۹۳) مطابقت دارد. در بررسی فراوانی و تنوع قارچ‌های پنبه، گونه *F. equiseti* غالب می‌باشد (پالماتر و همکاران، ۲۰۰۴). در بررسی حاضر *F. Equiseti* گونه غالب در بین جدایه‌های آلوده کننده پنبه بود که با بررسی‌های ذکر شده در بالا مطابقت دارد. شناسایی گونه‌های فوزاریوم با استفاده از روش‌های معمول و بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی قارچ اغلب زمان‌بر بوده و نیاز به تجربه و مهارت بالایی دارد. روش‌های مولکولی نظیر PCR روش‌های حساس، دقیق و سریع در تشخیص گونه می‌باشند که این امکان را فراهم می‌سازند تا در جهت شناسایی فوزاریوم‌های عامل بیمارگر گیاه مورد استفاده قرار گیرند. در بررسی حاضر به‌منظور تأیید شناسایی‌های ریخت‌شناسی، ردیابی مولکولی جدایه‌های *F. Proliferatum* و *F. equiseti* با استفاده از تکنیک PCR اختصاصی انجام گرفت. نتایج به‌دست آمده با مطالعه ویزنتین و همکاران (۲۰۰۹) که با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر ناحیه ITS موفق به ردیابی *F. proliferatum* شدند، مطابقت داشت، همچنین می‌شرا و همکاران (۲۰۰۳) به‌منظور شناسایی فوزاریوم‌های بیماری‌زا با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر ناحیه ITS موفق به ردیابی *F. equiseti* شدند. در بررسی محصولات PCR به‌دست آمده، نوارهای اختصاصی به‌ترتیب ۴۰۰ و (۵۸۵، ۳۹۰) جفت بازی در سطح گونه، تأییدی بر شناسایی‌های انجام شده بود. برای تشخیص سه گونه *F. proliferatum*، *F. subglutinans* و *F. verticillioides* آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی قسمتی از ژن *calmodulin* طراحی و به‌طور موفقیت‌آمیز مورد استفاده قرار گرفته است (مول و همکاران، ۲۰۰۴). استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه، *F. equiseti* با موفقیت ردیابی شد دمک و همکاران (۲۰۰۵). آزمایشی به‌منظور شناسایی مولکولی فوزاریوم‌های جدا شده از بلال ذرت در ایران صورت گرفت. در این تحقیق رهجو و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی، موفق به ردیابی گونه *F. proliferatum* شدند. عابدی تیزکی و صباغ (۲۰۱۲) موفق به ردیابی *F. proliferatum* از خوشه گندم در شمال ایران شدند. در بررسی حاضر نتایج به‌دست آمده در خصوص ردیابی مولکولی گونه‌های *F. equiseti* و *F. proliferatum* با نتایج مطالعات ذکر شده مطابقت دارد.

در تحقیق حاضر، این مسأله مطرح بود که آیا در پنبه که به‌طور طبیعی آلوده به قارچ فوزاریوم هستند با استخراج DNA از بذر پنبه، امکان ریابی گونه‌های فوزاریوم با استفاده از نشانگرهای مولکولی و تکنیک PCR اختصاصی وجود دارد؟ بنابراین جهت ردیابی دو گونه *F. proliferatum* و *F. equiseti* پس از استخراج DNA از بذر پنبه واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی هر گونه مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب نتایج حاصل از واکنش PCR اختصاصی، با تولید نوار ۵۸۵ و ۳۹۰ جفت بازی به ترتیب متعلق به جفت آغازگرهای اختصاصی PRO1/2 و ITS1/proITSR و نوار ۴۰۰ جفت بازی متعلق به جفت آغازگر اختصاصی FEF1/FER1 (*F. proliferatum*) و نتایج جداسازی و شناسایی گونه‌های فوزاریوم از نمونه‌های پنبه را تکمیل نمود. نتایج به‌دست آمده با مطالعه یلی‌ماتیللا و همکاران (۲۰۰۴) که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی موفق به ردیابی گونه‌های فوزاریوم از غلات شدند، مطابقت دارد. در بررسی ریعی مطلق و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به روش PCR، موفق به ردیابی گونه *F. proliferatum* از بذور آلوده پیاز شدند.

منابع

1. Abedi-Tizaki, M., and Sabbagh, S.K. 2012. Morphological and molecular identification of Fusarium head blight isolated from wheat in north of Iran. *Australian Journal of Crop Science*, 6(9): 1356-1361.
2. Agrawal, V.K., and Sinclair, J.B. 1997. Principles of seed Pathology. Edition CRC Press, Boca Raton, USA, 539p.
3. Amatolli, M.T., Spadaro, D., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. 2010. Molecular identification of *Fusarium* spp. associated with bakanae disease of Rice in Italy and assessment of their pathogenicity. *Plant Pathology*, 59: 839-844.
4. Arabsalmani, M. 2015. Cotton seed borne disease in Golestan Province in Northern Iran. *Cumhuriyet University Faculty of Science*, 36(3): 2065-2070.
5. Arndet, C.H. 1957. Temperature as a factor in the infection of cotton seedlings by ten pathogens. *Plant Diseases*: 246: 263-284.
6. Baird, R., and Carling, D. 1998. Survival of Parasitic and Saprophytic Fungi on Intact Senescent Cotton Roots. *CottonScience*, 2:27-34.
7. Bird, L.S. 1974. The dynamics of cotton seedling disease. *PlantDiseases*: 75-79.
8. Burgess, L.W. 1981. General Ecology. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. In: P.E. Nelson, T.A. Tossoun and R.J. Cook (eds). pp. 225-235. The Pennsylvania State University Press, University Park.
9. Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., and Backhouse, D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. University of Sydney, Sydney.

10. Burgess, L.W., Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Forbes, G.A. 1988. Distribution of *Fusarium* species in sections Roseum, Arthrosporiella, Gibbosum and Discolor recovered from grassland, pasture and pine nursery soils of eastern Australia. *Mycologia*, 80: 815-824.
11. Burgess, L.W. and Summerell, B.A. 1992. Mycogeography of *Fusarium*: survey of *Fusarium* species from subtropical and semi-arid grassland soils from Queensland, Australia. *Mycological Research*, 96: 480-484.
12. Chimbekujwo, I.B. 2000. Frequency and pathogenicity of fusarium wilts (*Fusarium solani* and *Fusarium equiseti*) of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Adamawa in Nigeria. *Revista Biologia Tropical*, 48(1): 1-5.
13. Colyer, P.D. 1988. Frequency and pathogenicity of *Fusarium* spp. Associated with seedling diseases of cotton in Louisiana. *Plant Diseases*, 72: 400-402.
14. Demeke, T., Randy, M., Clarar, S.K., and Patrik, D.G. 2005. Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *Mycobiologia*, 103: 271-284.
15. Gordon, W.L. 1952. The occurrence of *Fusarium* species in Canada II. Prevalence and taxonomy of *Fusarium* species in sereal seed. *Canadian Journal Botany*, 30: 209-251.
16. Gordon, W.L. 1960. The taxonomy in habitats of *Fusarium* species from tropical and temprate regions. *Canadian Journal Botany*, 38: 643-658.
17. Johnson, L.F., Baird, D.D., Chambers, A.V., and Shamiyeh, N.B. 1978. Fungi associated with postemergence seedling-disease of cotton in three soils. *Phytopathology*, 68: 917-920.
18. Klich, M. 1986. Mycoflora of cotton seed from the southern USA a three year study of distribution and frequency. *Mycology*, 78: 706-712.
19. Kommedahl, T., Windels, C.E., and Long, D.S. 1975. Comparison of *Fusarium* populations in grasslands of Minnesota and Iceland. *Mycologia*, 67: 38-44.
20. Kuch, M.A. 1986. Mycoflora of cotton seed from the Southern United States: a Three year study of distribution and frequency. *Mycology*, 78: 796-812.
21. Leslie, J.F., and Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory manual*. Blackwel Publishing Professional, American, IA, USA.
22. Mansoori, B., and Hamdollahzadeh, A. 1994. Seed test and seedling disease of cotton in Gorgan and Gonbad. *Applied Entomology and Phytopathology*, 62: 80-83.
23. Mansoori, M. 1993. Cotton seed fungi in Iran. *Proceedings of 11th Iranian Plant Protection Congress*. 28 Aug.-2 Sep., Gilan University, Rash, Iran.
24. Marasaas, W.F.O., Burgess, L.W., Anelich, R.Y., Lamprecht, S.C., and van Schalkwyk, D.J. 1988. Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. *South African Journal of Botany*, 54: 63-71.

25. Melero-vara, J.M., and Jimenez-diaz, R.M. 1990. Etiology incidence and distribution of cotton seedling damping-off in southern Spain. *Plant Diseases*, 74: 597-600.
26. Minton, B.F., and Garber, R.H. 1983. Controlling the seedling disease complex of cotton. *Plant Diseases*, 67: 115-118.
27. Mishra, P.K., Roland T.V., and Culham. A. 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *Microbiology*: 329-332.
28. Mousa, E.M., Gaafar, A.A., and EL-Shennawy. 1990. The influence of root-knot nematode on damping-off and wilt fungiof cotton. *Nematology*, 36: 373.
29. Mule, G., Susca, A., Stea, G., and Moretti. A. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusariumverticillioides*, *F.proliferatum* and *F. sublutinans*. *Plant Pathology*, 10: 495-502.
30. Nagaraja, H., Chennappa, G., Pooran Chandra Rao, K., Mahadev Prasad, G., and Sreenivasa, M.Y. 2016. Diversity of toxic and phytopathogenic *Fusarium* species occurring on cereal grown in Karnataka state, India. *Biotechnology*, 57: 6.
31. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species, on illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, Press Park and London.
32. Palmateer, A.J., McLean, K.S., Morgan-Jones, G., and Santen, E. 2004. Frequency and diversity of fungi colonizing tissues of upland cotton. *Mycopathologia* 157: 303-316.
33. Rabiey-Motlagh, E., Falahati-Rastegar, M., Rohani, H., Jafarpor, B., and Jahan-Bakhsh, V. 2010. Investigation of Onion Bulb *Fusarium* in North and Razavi Khorasan Provinces. *Plant Protection-Science and Technology*, 24(22): 137-144.
34. Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Mirzadi Gohari, A., Okhovvat, S.M., Bihanta, M.R., Razzaghian, J., and Klemsdal, S.S. 2008. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from Maize ears in Iran. *Plant Pathology*, 90 (93): 436-468.
35. Rodrigues, A.A.C., and Menezes, M. 2005. Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. *Mycopathologia*, 159(1): 79-85.
36. Roy, K.W. Bourland, F.M. 1982. Epidermiological and mycoflora relationship in cotton seedling disease in Mississippi. *Phytopatology*, 72: 868- 872.
37. Shamra, Y.R., and Sandhu, B.S. 1986. A new fungus associated with boll rot of arboreum cotton. *Current Science (Bangal)*: 54: 937.
38. Smith, A.L. 1950. Ascochyta seedling blight of cotton in Alboma in 1950. *Plant Diseases Report*, 34: 233.

39. Soleimani, M.J., Hajarud, G., and Zad, J. 1993. Cotton Seed Mycoflora in Iran. *Plant Diseases Journal*, 29: 35-41.
40. Soleymani, M.J., Hejaroud, G., and Zad, J. 1993. Survey on mycoflora of cotton seed in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 29: 55-56.
41. Summerell, B.A., Burgess, L.W., Sangalang, A.E., and Backhoues, D. 1993b. Mycogeography of *Fusarium* in Australian soils. *Hodowla Roslin Aklimatyzacjai Nasiennnctwo*, 37(4): 27-36.
42. Summerell, B.A., Bugg, C.A., and Burgess, L.W. 1993a. Mycogeography of *Fusarium*: a survey of *Fusarium* species in forest and woodland soils in north Queensland, Australia. *Mycological Research*, 97: 1015-1019.
43. Tamburic-Illincic, L., and Schaafsma, A.W. 2008. The prevalence of *Fusarium* spp. colonizing seed corn stalks in southwestern Ontario, Canada. *Plant Science*, 89(1): 103-106.
44. Visentin, I., Tamietti, G., Valentino, D., Portis, E., Karlovsky, P., Moretti, A., and Cardinale, F. 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *Mycological Research*, 113(10): 1137-1145.
45. Wang, G.C., Gu, Z., Lou, X., and Ye, Q. 1992. Studies on the pathogens of *Fusarium* root rot of cotton. *Acta Phytopathologica Sinica*, 22: 211-215.
46. Watkins, G.M. 1981. Compendium of cotton disease. American Phytopathology society. 87 P.
47. Woodroof, N.C. 1927. A disease of roots produced by *Fusarium moniliforme* Sheld. *Phytopathology*, 17: 227-238.
48. Yil-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Konstantinova, P., and Gagkaev, T.V. 2004. Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and north-western Russia. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 573-585.
49. Zhang, C.R., Howell, J.L., and Starr, M.H.W. 1996. Frequency of isolation and the pathogenicity of *Fusarium* species associated with roots of healthy cotton seedlings. *Mycologia*, 100(6):747-752.

