ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶
صفحه ۴۸۲ - ۴۷۷

کاربرد نشانگرهای SCAR برای شناسایی *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

The use of SCAR markers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

سیمین نصرتی*[۱]، حمیدرضا زمانی‌زاده[۲]، بهار مرید[۳]، گیلدا اسلامی[٤]

۱- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران
۲- دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، تاکستان، ایران
٤- استادیار، مرکز تحقیقات شناسایی مولکولی مخاطرات غذایی، بخش انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

Nosrati S*[1], Zamani Zadeh HR[2], Morid B[3], Eslami G[4]

1- Assistant Professor ,Department of Plant Protection, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran
2- Associate Professor , Department of Phytopathology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Takestan Branch, Islamic Azad University, Takestan, Iran
4- Assistant Professor, Research Center for Molecular Identification of Food Hazards, Department of Parasitology and Mycology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

خیار (*Cucumis sativus*) مهم‌ترین محصول گلخانه‌ای استان یزد می‌باشد. در سال‌های اخیر، بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و طوقه با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* مهم‌ترین بیماری خیار گلخانه‌ای در استان یزد بوده است. در سال‌های اخیر روش‌های مختلفی برای شناسایی جدایه‌های *F. oxysporum* ارایه شده‌است. به‌خاطر نواقص خصوصیات مورفولوژیکی برای تشخیص گونه‌ها و گروه‌های زیر جنس *Fusarium* sp. تحقیقاتی روی ابزارهای مولکولی برای تعیین و تشخیص روابط تکاملی تعدادی از گونه‌ها انجام گرفت. از آغازگرهای اختصاصیForcF1 و ForcR2 برای شناسایی جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* مربوط به تکثیر ناحیه ژنومی OPB-07 استفاده شد. همه جدایه‌ها بعد از استفاده از آغازگرهای اختصاصی تولید باندهایی با وزن مولکولی ۲۷۷ bp نمودند. در مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران با استفاده از آغازگرهای SCAR شناسایی مولکولی این فرم تخصص یافته انجام شد.

واژه‌های کلیدی

آغازگر
شناسایی مولکولی
F. oxysporum
SCAR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.15.9]

گونه *F. oxysporum* از مهم‌ترین قارچ‌های خاکزاد و همه‌جازی است و عامل بیماری‌هایی نظیر زردی، پژمردگی آوندی، پوسیدگی ریشه و بوته میری در گونه‌های گیاهی مختلف است. با وجود دامنه وسیع میزبانی سویه‌های منحصر به فرد معمولا یک و یا تعداد کمی از گونه‌های گیاهی را آلوده می‌کنند. با توجه به خسارات عمده این بیمارگر به محصولات اقتصادی و نیز ایجاد بیماری در انسان و دام به سبب تولید زهرابه، شناسایی سریع بیمارگر جهت مدیریت به موقع و مناسب بیماری الزامی است. شناسایی استرین‌های سودمند، بیماری‌زا و نیز غیربیماری‌زا از لحاظ ظاهری به‌دلیل انعطاف‌پذیری ژنتیکی و قابلیت تغییر شکل ظاهری در برابر عوامل محیطی امکان‌پذیر نمی‌باشد. در گذشته برای شناسایی قارچ‌های بیمارگر گیاهی از یک‌سری معیارهای مورفولوژیکی نظیر خصوصیات کشت روی محیط کشت و نیز تشخیص علائم در گیاه میزبان در طول حضور قارچ در بافت آلوده استفاده می‌شد. امروزه این روش‌های قدیمی به سبب محدودیت‌ها و اشتباهات بسیار توسط روش‌های شناسایی مولکولی جایگزین شده‌اند (Cerkauskas et al. 2001; Rose et al 2003). در سال‌های اخیر روش‌های مختلفی برای شناسایی جدایه‌های *F. oxysporum* ارایه شده‌است. به خاطر نواقص خصوصیات مورفولوژیکی برای تشخیص گونه‌ها و گروه‌های زیر جنس *Fusarium* sp. تحقیقات روی ابزارهای مولکولی برای تعیین و تشخیص روابط تکاملی تعدادی از گونه‌ها تغییر کرده است. متاسفانه تشخیص فرم‌های مخصوص در *F. oxysporum* هنوز بر اساس روش وقت‌گیر آزمون بیماری‌زایی قارچ‌ها روی گونه‌های مختلف گیاه استوار می‌باشد (Rose et al. 2003; Vakalounakis et al. 2004; Leslie et al. 2006). فن آوری‌های جدید سبب تسریع شناسایی و تفکیک بیمارگرهای گیاهی شده‌است. در سال‌های اخیر توالی‌های کامل ژنوم بسیاری از استرین‌های بیماری‌زا در دسترس قرار گرفته است. کاوشگرهای اختصاصی برای استرین‌های بیمارگر با استفاده از نواحی تکثیر شده با توالی مشخص SCAR[1] شناسایی و تفکیک بیمارگرها را آسان می‌کند. برای دست‌یابی به این آغازگرها، ابتدا به‌کمک روش‌هایی مانند RAPD نوارهای الکتروفورزی اختصاصی برای یک گونه پیدا می‌شود. سپس آن بند از روی ژل استخراج شده و توالی‌یابی می‌شود. در نهایت براساس توالی این قطعه از ژنوم آغازگرهای اختصاصی ساخته خواهد شد (Roberts et al. 2003). نشانگرهای SCAR شامل اطلاعات قطعات کوچک ژنومی بوده و در قسمت های مختلف ژنوم قرار دارند. بنابراین در غربال‌گری گسترده جدایه‌ها، استفاده از این نشانگرهای معتبر و قوی مفید می‌باشد. نشانگرهای SCAR برای شناسایی *F. oxysporum* غالبا با عناصر متحرک ژنوم[2] مرتبط می‌باشند. نشانگرSCAR مربوط به شناسایی Forc[3] معرفی شده به‌وسیله Lievens (2007) بسیار شبیه ترانسپوزون *Folyt*[4] بود. نشانگر OPB-07_277[5] در تمام جدایه‌های Forc بدون توجه به گروه سازگار رویشی یا منطقه جغرافیایی وجود دارد و پیشنهاد این است که در این حالت ترانسپوزون *Folyt1* غیرفعال باشد. اگرچه نقش این ترانسپوزون در تعیین میزبان اختصاصی هنوز مشخص نشده است، در بعضی موارد بیماری‌زایی جدایه‌های *F. oxysporum* مرتبط با حضور ترانسپوزون‌ها می‌باشد (Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003). نشانگر OPZ-12-865[6] در تمام جدایه‌های Foc[7] بدون توجه به گروه سازگار رویشی یا منطقه جغرافیایی و گروه‌بندی براساس توالی‌های EF-1 (*Elongation factor 1 alpha*) وجود دارد. برای این نشانگر هیچ‌گونه هومولوگی با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های عمومی وجود نداشت (Lievens et al. 2005). هدف از انجام این تحقیق معرفی راهکاری ساده جهت شناسایی این فرم مخصوص می‌باشد.

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد. کیفیت DNA نمونه‌ها به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی و حضور تک باند شفاف نشانه DNA مطلوب و مناسب تلقی شد. کمیت و غلظت DNA استخراج شده با طول موج ۲۶۰ نانومتر و خلوص آن با کمک جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ با دستگاه

[1] Sequence Characterized Amplified Region

[2] mobile elements

[3] *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

[4] *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici Folyt1 transposable*

[5] *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* RAPD marker OPB-07_277 genomic sequence

[6] *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* RAPD marker OPZ-12_865 genomic sequence

[7] *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.15.9]

اسپکتروفوتومتری (نانودراپ) بررسی شد. از آغازگرهای اختصاصی ForcF1 و ForcR2 برای شناسایی جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* مربوط به تکثیر ناحیه ژنومی OPB-07 و آغازگرهای FocF1 و FocR2 مربوط به تکثیر ناحیه OPZ-12 برای شناسایی جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد (جدول۱) (Lievens 2007). حجم ۲۰ میکرولیتر از مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای هرجدایه قارچ تهیه شد (جدول۲). واکنش‌های بدون ژنوم الگو به عنوان کنترل منفی در کنار نمونه‌ها قرار گرفت. واکنش در دستگاه ترموسایکلر Quanta Biotech S-96 واقع در آزمایشگاه میکروب‌شناسی پردیس علوم پزشکی دانشگاه یزد با شرایط ویژه (جدول ۳) انجام شد. محصولات واکنش روی ژل آگارز یک درصد و در کنار نشانگر، الکتروفورز و مورد ارزیابی قرار گرفت. از ژل به دست آمده با استفاده از دستگاه ژل داک عکسبرداری شد. نمایندگانی از جدایه‌های مشابه جهت توالی‌یابی به شرکت روبین طب ارسال شد. توالی‌های به‌دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI GenBank مقایسه و مرتب‌سازی شدند.

الکتروفورز DNA استخراج شده روی ژل آگارز، یک باند شفاف با وزن مولکولی بالا را نشان داد. همه جدایه‌ها بعد از استفاده از آغازگرهای اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* تولید باندهایی با وزن مولکولی۲۷۷ bp نمودند (شکل۱). محصول PCR همه جدایه‌ها بعد از استفاده از آغازگرهای اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* هیچ‌گونه باندی تولید نکرد (شکل۲). شناسایی مولکولی گونه *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* در ایران و یزد برای اولین بار انجام شد. شماره‌های دستیابی گونه‌ها در بانک ژن NCBI GenBank به شرح ذیل می‌باشد (جدول٤). باندهای ایجاد شده با نتایج میزبان افتراقی انجام شده در گلخانه همخوانی داشت.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تفکیک فرم‌های مخصوص *F. oxysporum*

Primer	Sequence (5′→3′)	Target organism	origin	Amplicon size (bp)
ForcF1 (F)	GGTGACGCAGCAGTCTAGA	*F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*	OPB-07_277	277
ForcR2 (R)	GTGACGCAGGGTAGGCAT			
FocF1 (F)	TCAACGGGACACTTTATGTTC	*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*	OPZ-12_865	868
FocR2 (R)	TCAACGGGACTCCCTTCG			

جدول۲- میزان مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

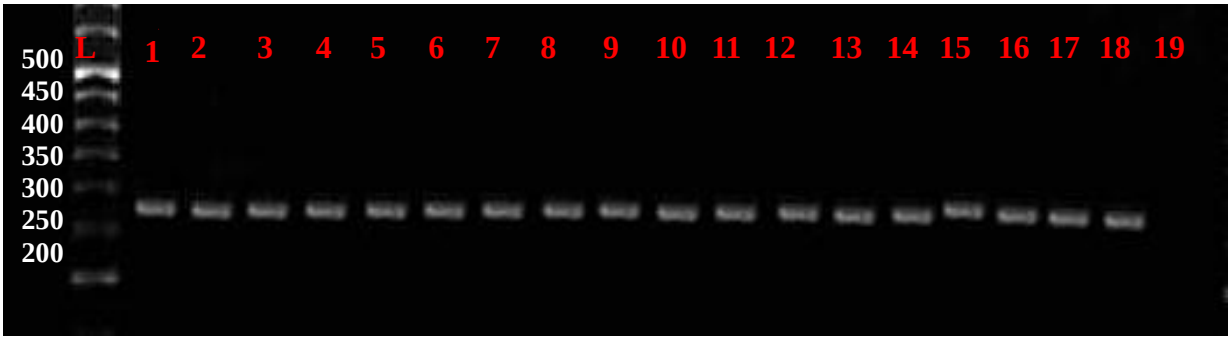
Material	Primary concentration	Final concentration	20µl
Water	-----	----	۷ µl
Master Mix (Amplicon)	2x	1x	۱۰µl
Work Primer	100 pmol/µl	10 pmol/µl	۱ µl
Template	400 ng/µl	100 ng/µl	۲ µl

جدول۳- برنامه‌ریزی مراحل واکنش PCR برای تفکیک مولکولی فرم‌های مخصوص *Fusarium* sp.

مرحله	درجه حرارت (درجه سانتیگراد)	زمان (دقیقه)
واسرشت اولیه	۹٤	۵
واسرشت سازی	۹٤	۱
اتصال آغازگر	۵۸	۱
بسط	۷۵	۱
بسط نهایی	۷۲	۵

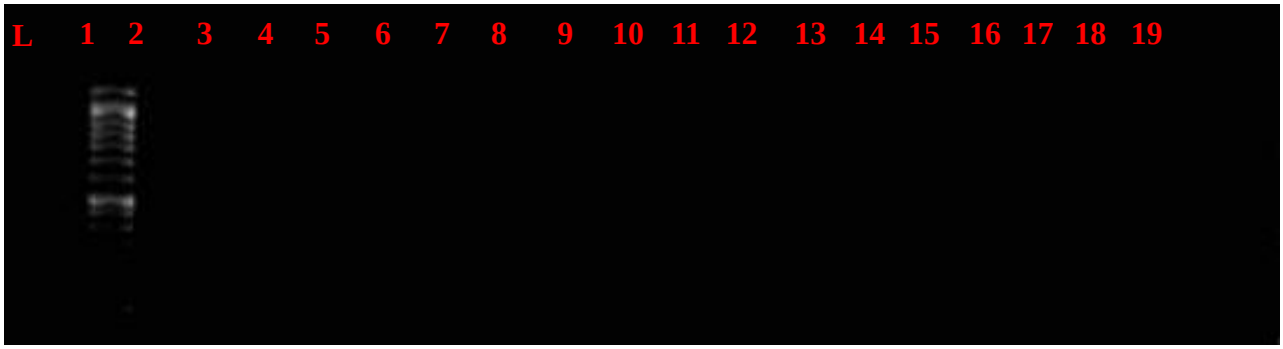
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.15.9]

اندازه ژنوم *F. oxysporum* در حدود ۱۸/۱ Mb تا ۵۱/۵ Mb بوده که شامل پلاسمید خطی با تعداد کروموزوم‌های متغییر بین ۷ تا ۱٤ می‌باشد. مطالعات روی فیلوژنی *F. oxysporum* نشان دهنده تک نیایی بودن آن است. با این‌که فرم‌های مخصوص بسیاری در این گونه وجود دارد، پیشنهاد می‌شود که بیماری‌زایی پاتوژن و میزبان تکامل همگرای دارند. مدارک چند نیایی بودن *F. oxysporum* f. sp. *cubense* و *F. oxysporum* f. sp. *melonis* برای سیستم نامگذاری فرم مخصوص مشکلاتی را ایجاد کرد (O'Donnel et al. 2000). شناسایی مورفولوژیکی گونه Forc بسیار وقت‌گیر و هزینه‌بر است. با روش مولکولی فرم‌های مخصوص را می‌توان به‌راحتی شناسایی کرد. شناسایی مولکولی این فرم مخصوص برای اولین بار در ایران انجام شد. نتایج بررسی‌های جداسازی و شناسایی عامل و علایم بیماری در مورد جدایه‌ها، با نتایج سایر گزارشات مطابقت داشت (Vakalounakis et al. 2005).



شکل۱- محصولات نهایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بعد از استفاده از آغازگرهای ForcF1 و ForcR2 برای تفکیک فرم تخصص یافته-*F. oxysporum* f. sp. *radicis*-*cucumerinum*: ردیف L: 100-bp DNA ladder marker و ردیف‌های ۱ تا ۱۸جدایه‌های F1 تا F18 مربوط به قارچ-*F. oxysporum* f. sp. *radicis*-*cucumerinum* که تولید باندی به وزن تقریبی ۲۷۷ bp کردند. ردیف ۱۹: کنترل منفی می‌باشد. نتایج مشابه از ۳ بار تکرار بدست آمد.مشخصات ردیف‌ها به شرح ذیل است.

L: Ladder, 1: F1, 2: F2, 3: F3, 4: F4, 5: F5, 6: F6, 7: F7, 8: F8, 9: F9, 10: F10, 11: F11, 12: F12, 13: F13, 14: F14, 15: F15, 16: F16, 17: F17, 18: F18, 19: Control-



شکل۲- محصولات نهایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بعد از استفاده از آغازگرهای FocF1 و FocR2 برای تفکیک مولکولی فرم تخصص یافته *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. ردیف L: 100-bp DNA ladder marker و ردیف‌های ۱ تا ۱۸جدایه‌های F1 تا F18 مربوط به جدایه *F. oxysporum* و ردیف ۱۹: کنترل منفی می‌باشد. نتایج مشابه از ۳ بار تکرار به‌دست آمد. مشخصات ردیف‌ها به شرح ذیل است.

L: Ladder, 1: F1, 2: F2, 3: F3, 4: F4, 5: F5, 6: F6, 7: F7, 8: F8, 9: F9, 10: F10, 11: F11, 12: F12, 13: F13, 14: F14, 15: F15, 16: F16, 17: F17, 18: F18, 19: Control-

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.15.9]

جدول٤- شماره‌های دستیابی جدایه‌های قارچ بیمارگر Forc در بانک ژن NCBI GenBank و کلکسیون قارچ‌های زنده ایران

Isolate cod	Primer	Query coverage[1]	Identities	Accession Number NCBI sample	Isolate Accession Number
F1	Forf1+ forcr2	95%	99%	EF056792.1	KP746403
F17	Forf1+ forcr2	93%	99%	EF056792.1	KP746407
F23	Forf1+ forcr2	96%	99%	EF056792.1	KP746408 (IRAN 2282C)
F26	Forf1+ forcr2	92%	99%	EF056792.1	KP746409

Query Coverage (percent of the query sequence that overlaps the subject sequence)

از نظر علایم‌شناسی، قارچ عامل بیماری وارد بافت کورتکس ریشه شده و شانکرهای قهوه‌ای رنگ ایجاد نموده و به سمت سیستم آوندی پیشرفت می‌کند. فرم اختصاصی Forc در دمای ۲۹-۱۷درجه سانتی‌گراد باعث توسعه بیماری می‌شود و بر روی رقم افتراقی اشلی، پوسیدگی ریشه و ساقه ایجاد می‌کند در حالی‌که فرم اختصاصی Foc بر روی رقم افتراقی اشلی پژمردگی آوندی به‌وجود آورده و هیچ‌گونه شانکری در بافت کورتکس ایجاد نمی‌کند و دمای مناسب گسترش بیماری حداقل ۲۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Vakalounakisl et al. 2004). قارچ *F. solani* f. sp. *Cucurbitae* نیز یک قارچ عامل پوسیدگی کورتکس است که علایم مشابه Forc ایجاد می‌کند ولی این دو قارچ از نظر مورفولوژی میکروکنیدیوفور تفاوت زیادی دارند. در*F. oxysporum* میکروکنیدی‌ها روی فیالیدهای منفرد جانبی روی میسلیوم یا از میکروکنیدیوفورهای کوتاه روی سرهای دروغین، تولید می‌شود در صورتی‌که در *F. solani* میکروکنیدی‌ها از کنیدیوفورهای جانبی و فیالیدهای بلند که در انتها کمی باریک بوده و روی سرهای دروغین، تولید می‌شود. قارچ Forc میکروکنیدیوفورهای کوتاه تولید می‌کند (Alves-santos et al. 2002; Vakalounakis et al. 2005; Zaccardelli et al. 2008). با توجه به وقت گیر بودن و هزینه بر بودن شناسایی با ویژگی‌های مرفولوژیکی و میزبان افتراقی استفاده از این مارکرها جهت سهولت شناسایی پیشهاد می‌شود.

نویسندگان مقاله از همکاری دانشگاه آزاد اسلامی واحد یزد و دانشگاه علوم و تحقیقات تهران و دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Alves-santos F, Ramos B, García-sánchez M, Eslava A, Díaz-mínguez J (2002) A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phase*oli. Phytopathology 92:237-244.

Cerkauskas R, Brown J (2001) First Report of Fusarium Stem and Root Rot of Greenhouse Cucumber. Plant Disease 85:1028.

Jiménez-Gasco MM, Jiménez-Díaz RM (2003) Development of a specific polymerase chain reactionbased assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. Phytopathology 93: 200-209.

Leslie J, Summerell A (2006) The Fusarium Laboratory Manual. BlackWell publishing pp: 79-274.

Lievens B, Claes L, Vakalounakis J, Vanachter C, Thomma P (2007) A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. Environ Microbiology 9: 2145-2161.

Lievens B, Thomma B (2005) Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant pathogens and use in practice. Phytopathology 95: 1374-1380.

Lievens B, Brouwer M, Vanachter, ACRC, Lévesque CA, Cammue BPA, Thomma B (2003) Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomatos vascular wilt pathogens. FEMS Microbiology Letters 223:113-122.

O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK and Casper HH (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 7905-7910.

Roberts DP, Lohrke SM (2003) Programs in biological control of plant diseases. Pest Management Science 59: 654-664.

Rose S, Parker M, Punja ZK (2003) Efficacy of biological and chemical treatments for control of Fusarium roots and stems rot on greenhouse cucumber. Plant Disease 87:1462-1470.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.15.9]

Vakalounakis D, Doulis A, Klironomou E (2005) Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucum*erinum Attacking Melon under Natural Conditions in Greece. Plant Pathology 54: 339- 346.

Vakalounakis D, Wang Z, Fragkiadakis G, Skaracis G, Li D (2004) Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAP. Plant Disease 88: 645-649.

Vakalounakis DJ, Doulis AG, Klironomou E (2005) Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* attacking Melon under Natural Conditions in Greece. Plant Pathology 54: 339-346.

Zaccardelli M, Vitale S, Luongo L, Merigh M (2008) Morphological and Molecular Characterization of *Fusarium solani* Isolates. Journal of Phytopathology 156:534-541.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.15.9]