نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ص. ۱۹۱-۱۸۵

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 2, Summer 2013, P. 185-191

شناسایی آنزیم توماتیناز با تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک در جدایه‌های نژاد۱ قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی در استانهای خراسان شمالی و رضوی

ناهید حیدرزاده[1*]- حمید روحانی[2]- ماهرخ فلاحتی رستگار[3]- عصمت مهدیخانی مقدم[4]

تاریخ دریافت:۱۳۸۹/۱۱/۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۲/۲۴

چکیده

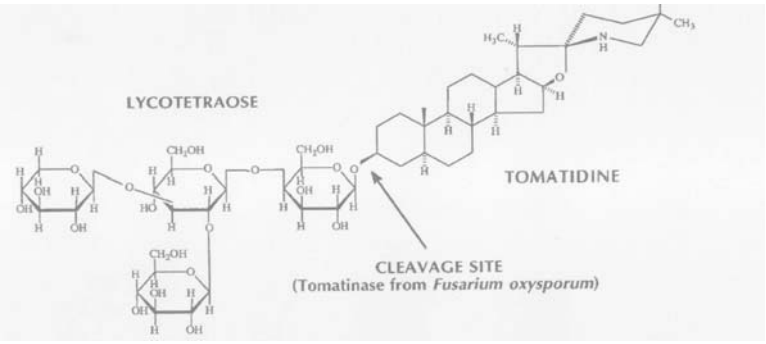
این تحقیق با هدف شناسایی آنزیم tomatinase در جدایی‌های نژاد فیزیولوژیک ۱ قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی در استانهای خراسان شمالی و رضوی با تکنیک TLC انجام شد . بدین منظور در طی فصل زراعی ۸۹-۸۸ از مناطق عمده گوجه کاری استانهای فوق نمونه برداری صورت گرفت، و ۲۰ جدایه قارچ FoL از بافت آوندی ریشه، طوقه و ساقه گیاهان گوجه فرنگی آلوده جداسازی گردید. آزمون اثبات بیماریزایی روی گوجه فرنگی رقم Bonny Best (حساس عمومی) انجام شد و ۱۷ جدایه بیماریزا که باعث پژمردگی آوندی می‌شدند تشخیص داده شد. آزمون اثبات فرم اختصاصی جهت تایید بر اختصاصی بودن جدایه‌های بیماریزا با استفاده از گوجه فرنگی رقم (Bonny Best)، تاتوره، تاجریزی و نخود انجام گردید که این جدایه‌ها تنها بر روی گوجه فرنگی پژمردگی ایجاد نمودند. تعیین نژاد فیزیولوژیک نیز با استفاده از ارقام افتراقی انجام که همه جدایه‌ها مطابق جدول استاندارد علائم بیماری در نژاد ۱ قرار گرفتند. برای شناسایی آنزیم tomatinase، ابتدا سوسپانسیونی از اسپورهای قارچ تهیه و پس از آن عصاره گیری پروتئین‌های قارچ انجام شد و بعد از خالص سازی توسط تیوبهای دیالیز با استفاده از تکنیک TLC(کروماتوگرافی لایه نازک) و به کمک ترکیبات استاندارد tomatidine وtomatine-α آنزیم tomatinase شناسایی گردید.

واژه‌های کلیدی: *Fusarium oxysporum*، tomatinase ، کروماتوگرافی، گوجه فرنگی

مقدمه

قارچ*Fusarium oxysporum* یک پاتوژن گیاهی خاکزاد با دامنه میزبانی وسیع بوده که باعث پژمردگی آوندی در گیاهان مختلف می‌شود (۳). این پاتوژن دارای فرمهای اختصاصی فراوان می‌باشد. در گیاه گوجه فرنگی این پاتوژن یکی از مهمترین بیماریهای گوجه فرنگی را موجب می‌شود و تاکنون ۳ نژاد فیزیولوژیک برای آن گزارش شده است (۱). گیاه گوجه فرنگی مانند سایر گیاهان بطور طبیعی دارای مکانیسم‌های دفاعی مختلفی در مقابل حمله پاتوژنها می‌باشد که از جمله این مکانسیم‌های دفاعی، تولید ترکیب ضد قارچ α-tomatine می‌باشد (۸). توماتین یک گلیکو آلکالوئید بوده که شامل دو بخش aglycone(Tomatidine) و تتراساکارید (β-lycotetraose) که خود شامل ۲ مولکول گلوکزو یک گالاکتوز یا زایلوز می‌باشد. این ترکیب در غلظت بالای حدود 1mM در قسمتهای مختلف گیاه از جمله برگ، ساقه، ریشه و میوه گوجه فرنگی تولید می‌شود و نقش مهمی در مقاومت گیاه در برابر پاتوژنهای قارچی دارد (۷) اثر سمی توماتین بر روی قارچها بصورت ترکیب با استرولهای غشاء و افزایش منافذ آن و در نهایت تخریب سلول می‌باشد (۱۳) مطالعات نشان داده که بطور کلی پاتوژنهای قارچی گوجه فرنگی حساسیت کمتری نسبت به توماتین در مقابل قارچهای غیر بیماریزا دارند. بعضی قارچها مقاوم بر توماتین بوده زیرا ترکیب غشاء آنها متفاوت بوده و برخی آنزیم اختصاصی تولید می‌کنند که اثر توماتین راخنثی می‌کند (۱۲) این آنزیم‌ها تحت عنوان tomatinase (که یک آنزیم خارج سلولی بوده و در گیاهان گوجه فرنگی ترکیب ضد قارچیtomatine را در هم شکسته و بی اثر می‌کند) شناسایی شده اند که یک مولکول قند یا همه قندهای موجود در ساختمان α-tomatine را حذف می‌کند. این آنزیم در قارچهای مختلفی از جمله Verticillium,Fusarium, Alternaria, Septoria گزارش شده که نحوه فعالیت آن در هر کدام متفاوت می‌باشد (۹) (شکل ۱).

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادان و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: nahidheidarzadeh@yahoo.com)



شکل ۱- ساختمان توماتین و نحوه اثر آنزیم توماتیناز

برای شناسایی فعالیت آنزیمی تکنیک‌های مختلفی وجود دارد از جمله تکنیک TLC (Thin Layer Chromatography) کروماتوگرافی با لایه نازک که اساس این روش نیز همانند سایر روش‌های کروماتوگرافی بر پایه فاز ثابت و متحرک می‌باشد (۳) این تکنیک در بین سایر تکنیک‌های کرو ماتوگرافی دارای مزایای زیادی بوده و در تحقیقات آزمایشگاهی برای تشخیص ترکیبات مختلف از جمله اسیدهای آمینه، قندها، اسیدهای ارگانیک، آنزیم‌ها و ترکیبات ناشناخته کاربرد فراوانی دارد و هدف از این تحقیق نیز شناسایی فعالیت آنزیم tomatinase در جدایه‌های بیماریزای قارچ FOLبا تکنیک TLC می‌باشد (۱۱).

مواد و روش ها

در سال زراعی ۸۹-۸۸ نمونه برداری از مناطق عمده گوجه کاری استانهای خراسان شمالی و رضوی براساس علایم ظاهری شامل مرگ گیاهچه در مراحل اولیه رشد و زردی برگها و پژمردگی یکطرفه گیاهان انجام شد (۲) نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه توسط آب بخوبی شستشو داده شده وسپس قطعات چند میلی متری از بافت آوندی ریشه، طوقه و ساقه تهیه و پس از ضدعفونی توسط هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱-۵ دقیقه و ۳ مرتبه شستشوبا آب مقطر سترون، بر روی کاغذ صافی سترون به مدت ۲ ساعت نگهداری شدند تا خشک شوند. سپس نمونه‌ها به محیط کشت Nash & Snyder, PDA منتقل و درانکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. جهت اسپورزایی و تشکیل اسپورودوکیوم از محیط کشت CLA با استفاده از قفسه نوری با شرایط تناوب نوری 12 ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) استفاده شد (۵) پس از تشکیل اسپورودوکیوم با استفاده از روش تک اسپور خالص سازی صورت گرفت و جدایه‌های بدست آمده با استفاده از کلید شناسایی بوس و نلسون شناسایی گردیدند (۴ و ۱۱).

اثبات بیماریزایی جدایه‌های *F.oxysporum*

این آزمون جهت شناسایی قدرت بیماریزایی جدایه‌های F.o صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا اقدام به تهیه سوسپانسیون با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر نموده و سپس مایه زنی با استفاده از روش فرو بردن ریشه در سوسپانسیون اسپور در گلخانه و در شرایط استاندارد و بر روی گوجه فرنگی رقم حساس عمومی(Bonny Beat) در مرحله شش برگی گیاهچه‌ها صورت گرفت (۱). گیاهچه‌ها پس از مایه زنی به گلدانهای حاوی خاک سترون با نسبت مساوی خاک: خاک برگ: ماسه سترون منتقل شدند. برای هر جدایه ۴ تکرار و یک شاهد در نظر گرفته شد که گیاهچه شاهد توسط آب مقطر سترون مایه زنی گردید. ثبت علایم ۱۰ روز پس از مایه زنی و به مدت ۵ هفته بصورت روز در میان انجام و نمونه‌های آلوده جهت بررسی اصول کخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند (۳).

اثبات فرم اختصاصی جدایه‌های *F.oxysporum*

در این آزمون کلیه جدایه هایی که در آزمون بیماریزایی مشخص شدند که بیماریزا هستند مورد استفاده قرار گرفتند. بدین ترتیب مانند روش قبل ابتدا مایه تلقیح تهیه وسپس گیاهان تاتوره، تاجریزی و نخود و گوجه فرنگی در رقم حساس عمومی (در مرحله شش برگی) مورد آزمایش قرار گرفتند. برای هر جدایه ۴ تکرار و یک شاهد در نظر گرفته شد و مانند روش قبل گیاهان مایه زنی شده به آزمایشگاه منتقل و مجدداً قارچ عامل بیماری از آنها جدا گردید.

تهیه سوسپانسیون اسپور

برای این منظور، جدایه‌های بیماریزای قارچ FoL به محیط کشت PDB منتقل و بمدت ۱ هفته در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و بر روی شیکر با سرعت 120 rpm (در شرایط آزمایشگاهی) قرار داده شدند. پس از این مدت میکروکنیدیهای موجود در محیط کشت از فیلترهای با اندازه‌های مختلف 10µmو1µmعبور داده شده و مایع

حاصل بمدت ۱۵ دقیقه به سانتریفیوژ 10000g دمای ۴ درجه سانتیگراد انتقال داده شد. پس از آن به اسپورهای حاصله گلیسرول به حجم ۳۰ درصد اضافه و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۷).

تهیه عصاره قارچ

در این روش از محیط کشت اختصاصی (Casamino Acid)CA استفاده شد که شامل کاسامینواسید 10gr/li ، سولفات آمونیم 10mM و Yeast Nitrogen Broth 0/5 gr/li می‌باشد. سپس سوسپانسیون حاصل از روش قبل به غلظت ۲×۱۰^{۶} اسپور در میلی لیتر محیط کشت اضافه و بمدت یک شبانه روز بر روی شیکر 120rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرارداده شد. پس از این زمان20µg/ml از محلولomatine-α در بافر سیترات پتاسیم 50mM(PH=4) به محیط کشت اضافه گردید. بعد از طی زمان ۴۸ ساعت که بر روی شیکر با سرعت 120rpm دمای ۲۸ درجه سانتیگراد قرار گرفتند مایع حاصله از فیلترهای مختلف 1µm و 10µm عبور داده شده و سپس بمدت ۱۵ دقیقه به سانتریفوژ 10000g دمای ۴ درجه سانتیگراد منتقل و در نهایت مایع بدست آمده از فیلتر 0/22µmعبور داده شده (۶).

خالص سازی نسبی عصاره قارچ

در این روش که به کمک تیوبهای دیالیز انجام می‌شود، پس از آماده سازی تیوبهای دیالیز برش داده شد درون آب مقطر و محلول سولفیت سدیم و اسیدسولفوریک، 200cc از عصاره قارچی حاصل از روش قبل به این تیوبها منتقل که پس از قرار گرفتن تیوبها در محیط PEG(35000) بمدت ۳تا۴ ساعت به بافر فسفات پتاسیم 10mM (PH=6/7) بمدت یک شبانه روز و دمای ۴ درجه سانتگراد منتقل شدند پس از آن محلول بدست آمده توسط دستگاه فریزدرایر بمدت ۲۴ ساعت خشک و پودر حاصله به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد انتقال داده شد (۱۲).

آنالیزTLC

جهت انجام این آزمون 4µg از عصاره خالص شده مورد استفاده قرار گرفت که به این عصاره 10mM توماتین اضافه گردید. و در دمای اتاق بمدت یک شبانه روز قرار داده شد ، پس از آن توسط دیسکاتور رطوبت آن گرفته شد و بعد در حجم مناسبی متانول (۱۰٪) حل گردید. سپس صفحه سیلیکاژل ۶۰ بروی هیتر بمدت ۱۰ دقیقه و دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد قرارداده شد که برای ترزیق نمونه‌ها آماده شود. پس از آن توسط لوله‌های موئین در قسمت پایین صفحه بصورت نقطه ای جدایه‌ها ترزیق شدند، و بهمراه نمونه‌ها دو استاندارد tomatidine و tomatine- α نیز به همان غلظت نمونه‌ها ترزیق شدند، پس از ترزیق صفحه سیلیکاژل به تانک حاوی بافر حلال که شامل اسید استیک، اتیل استات، متانول و آب به حجم (۱:۲۰:۳۰:۱۰) بود منتقل گردید. بعد از حدود ۲ ساعت و تا رسیدن بافر به نزدیکی لبه انتهایی، صفحه مجدداً بر روی هیتر با دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ دقیقه برای نمایان شدن لکه‌های حاصل از فعالیت توماتیناز قرار گرفت (۱۰ و ۱۴).

نتایج

جداسازی قارچ از بافت آلوده گیاه

پس از جمع آوری نمونه‌ها از تمام مراحل رشد گیاه عامل بیماری جداسازی گردید. پس از حدود ۴-۳ روز قارچ از حاشیه بافت آلوده شروع به رشد نمود. پس از خالص سازی شناسایی جدایه‌ها با استفاده از کلید شناسایی نلسون و همکاران (۴) و بوس و همکاران انجام شد. و در این بررسی ۲۰ جدایه از بافت آوندی بخش‌های ریشه، طوقه و ساقه بعنوان *F.oxysporum* شناسایی شدند.

اثبات بیماریزایی

آزمون بیماریزایی جدایه‌های مختلف بر روی گیاهچه‌های گوجه فرنگی رقمBonny Best (حساس عمومی) نشان داد که جدایه‌های بدست آمده از نظر علایم بیماری مطابق روش استاندارد به ۵ گروه تقسیم می‌شوند (۱۱).

گروه ۱: فاقد علایم

گروه ۲: کلروز خفیف،توقف رشد یا پژمردگی

گروه ۳: کلروز متوسط، توقف رشد یا پژمردگی

گروه ۴: کلروز شدید، توقف رشد یا پژمردگی

گروه ۵: مرگ گیاهچه

اولین علایم بیماری ۱۵ روز بعد از مایه زنی گیاهان در مرحله ۶ برگی بصورت زردی و پژمردگی بروز کرد و از نمونه‌های آلوده در آزمایشگاه، قارچ عامل بیماری مجدداً شناسایی گردید. بدین ترتیب در بین۲۰ جدایه قارچ F.o ۱۷ جدایه بیماریزا و ۳ جدایه غیر بیماریزا بودند (جدول ۱).

اثبات فرم اختصاصی جدایه ها

آزمون اثبات فرم اختصاصی مانند آزمون اثبات بیماریزایی انجام گرفت، با این تفاوت که در این آزمون از گیاهچه‌های گوجه فرنگی حساس عمومی، علفهای هرز تا توره تاجریزی و نخود استفاده شد. گیاهچه‌های ارقام فوق توسط ۱۷ جدایه بیماریزای قارچ مایه زنی شدند که علایم بیماری تنها برروی ارقام گوجه فرنگی مشاهده گردید و سایر ارقام هیچگونه علایمی نشان ندارند (جدول ۲).

جدول ۱ - جدایه های *F. oxysporum* جمع آوری شده از مزارع گوجه فرنگی استان خراسان شمالی و رضوی

ردیف	نام جدایه	محل جمع آوری		کد بیماری بر اساس علائم استاندارد در رقم Bonny Best	اندام گیاه که قارچ از آن جداسازی گردید
۱	F_{t1}	تربت جام	نصر آباد	۵	ساقه
۲	F_{t2}	تربت‌جام	علی‌آباد	۴	طوقه
۳	F_{t3*}	تربت جام	مؤمن آباد	۱	ریشه
۴	F_{t4*}	تربت جام	حاجی آباد	۱	طوقه
۵	F_{ta1*}	تایباد	حومه	۱	ریشه
۶	F_{b1*}	بجنورد	حومه	۳	طوقه
۷	F_{c1}	چناران	قره کوسه	۴	طوقه
۸	F_{c2}	چناران	قوشق آباد	۳	ریشه
۹	F_{c3}	چناران	چهار طاق	۲	ساقه
۱۰	F_{c4}	چناران	درنگ‌آباد	۴	ریشه
۱۱	F_{c5}	چناران	رضا آباد	۴	ریشه
۱۲	F_{c6}	چناران	چهار طاق	۲	ساقه
۱۳	F_{c7}	چناران	به آباد	۳	ساقه
۱۴	F_{c8}	چناران	زن آقل	۲	ساقه
۱۵	F_{f1}	فریمان	جیم آباد	۵	ساقه
۱۶	F_{f2}	فریمان	کته شمشیر	۳	ساقه
۱۷	F_{f3}	فریمان	تپه سلام	۵	طوقه
۱۸	F_{f4}	فریمان	قلندرآباد	۳	طوقه
۱۹	F_{f5}	فریمان	انداد	۴	ریشه
۲۰	F_{g1}	قوچان	فتح آباد	۴	ساقه

جدول ۲- اثبات فرم اختصاصی ۲۵ جدایه بیماریزای *F. oxysporum* بر روی ارقام محک در استانهای خراسان شمالی و رضوی

ردیف	نام جدایه	شاهد	ارقام محک و کد بیماری بر اساس علائم استاندارد استفاده شده					
			Bonny Best	Mobil	تاجریزی	نخود	خربزه	تاتوره
۱	F_{f1}	۱	۵	۴	۱	۱	۱	۱
۲	F_{f2}	۱	۵	۵	۱	۱	۱	۱
۳	F_{n1}	۱	۴	۳	۱	۱	۱	۱
۴	F_{c1}	۱	۴	۳	۱	۱	۱	۱
۵	F_{g1}	۱	۴	۴	۱	۱	۱	۱
۶	F_{t1}	۱	۵	۵	۱	۱	۱	۱
۷	F_{f3}	۱	۵	۳	۱	۱	۱	۱
۸	F_{t2}	۱	۴	۳	۱	۱	۱	۱
۹	F_{k1}	۱	۴	۳	۱	۱	۱	۱
۱۰	F_{m1}	۱	۴	۳	۱	۱	۱	۱
۱۱	F_{m3}	۱	۳	۲	۱	۱	۱	۱
۱۲	F_{m5}	۱	۴	۴	۱	۱	۱	۱
۱۳	F_{f4}	۱	۴	۳	۱	۱	۱	۱
۱۴	F_{f5}	۱	۴	۳	۱	۱	۱	۱
۱۵	F_{c2}	۱	۳	۳	۱	۱	۱	۱

جدول۳- تعیین نژادهای فیزیولوژیک *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* با استفاده از واکنش ارقام افتراقی

ردیف	نام جدایه	ارقام افتراقی و کد بیماری بر اساس علائم استاندارد استفاده شده			شاهد	نژاد
		Bonny Best	Walter	VFN-8		
۱	F_{f1}	۵	۱	۱	۱	۱
۲	F_{f2}	۵	۱	۱	۱	۱
۳	F_{n1}	۴	۱	۱	۱	۱
۴	F_{c1}	۴	۱	۱	۱	۱
۵	F_{g1}	۴	۱	۱	۱	۱
۶	F_{t1}	۵	۱	۱	۱	۱
۷	F_{f3}	۵	۱	۱	۱	۱
۸	F_{t2}	۴	۱	۱	۱	۱
۹	F_{k1}	۴	۱	۱	۱	۱
۱۰	F_{m1}	۴	۱	۱	۱	۱
۱۱	F_{m3}	۳	۱	۱	۱	۱
۱۲	F_{m5}	۴	۱	۱	۱	۱
۱۳	F_{f4}	۴	۱	۱	۱	۱
۱۴	F_{f5}	۴	۱	۱	۱	۱
۱۵	F_{c2}	۳	۱	۱	۱	۱

تعیین نژادهای فیزیولوژیک *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

تعیین نژاد قارچ عامل بیماری آوندی گوجه فرنگی از استانهای خراسان شمالی و رضوی با مقایسه عکس العمل ارقام افتراقی گوجه فرنگی به این جدایه‌ها مطابق دستورالعمل استاندارد صورت گرفت (۱۱).

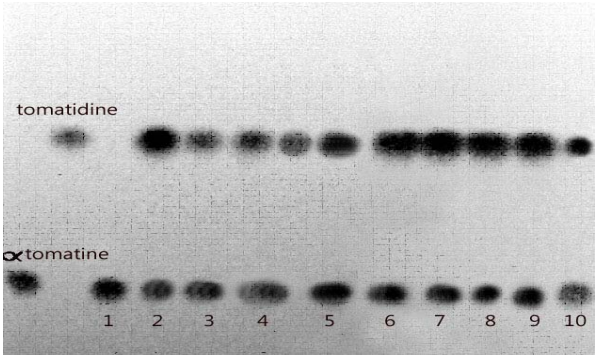
در این آزمون گیاهچه‌های ۶ برگی گوجه فرنگی Bonny Best (حساس عمومی)، walter(دارای ژن مقاوم به نژاد ۱و ۲) ،VFN-8 (دارای ژن مقاوم به نژاد ۱) توسط جدایه‌های قارچ مایه زنی شدند. اولین علایم بیماری ۱۰ روز پس از مایه زنی در شرایط گلخانه بر روی رقم Bonny Best و در برگهای پایین بصورت کلروز مشاهده گردید. ثبت علایم بمدت ۵ هفته انجام گرفت و جدایه‌ها براساس علایم که بر روی ارقام افتراقی ایجاد نمودند گروه بندی شدند.

براساس نتایج بدست آمده در این آزمون جدایه‌ها از نظر نوع علایم بر روی رقم Bonny Best در ۵گروه قرار گرفتند در حالیکه دو رقم walter و VFN-8 یا هیچگونه علایمی نشان نداده و یا زردی بسیار خفیف بر روی برگهای پایین آنها مشاهده گردید. نمونه‌های آلوده به آزمایشگاه منتقل و میزان تغییر رنگ آوندی آنها نیز بررسی گردید. بدین ترتیب کلیه جدایه‌های بیماریزا در نژاد ۱ قرار گرفتند (جدول ۳).

خالص سازی نسبی عصاره قارچ

پس از تهیه سوسپانسیون اسپور همانگونه که در قسمت مواد و روش توضیح داده شد اسپورهای حاصله به محیط کشت اختصاصی Casamino Acid منتقل و طی مراحل عبور از فیلترهای مختلف و سانتریفوژ عصاره قارچی تهیه گردید. پس از آن چون عصاره قارچی حاوی پروتئین‌های مختلفی می‌باشد، خالص سازی عصاره با تیوبهای دیالیز(Cut off) 10000 Da انجام که پس از قرار گرفتن تیوبهای حاوی عصاره قارچی در محیط PEG(35000) عصاره حدود ۱۰ برابر غلیظ تر گردید، پس از آن عصاره حاصله به بافرسیترات پتاسیم منتقل و در نهایت توسط دستگاه فریز درایر بمدت ۲۴ ساعت آبگیری انجام و پودر خالصی بدست آمد.

آنالیز TLCپس از اضافه کردن tomatine- ∝ به عصاره خالص سازی شده واکنش بین tomatinase درصورت حضور با tomatine- ∝ صورت گرفته و بر روی صفحات سیلکاژل دو لکه نمایان گردید. این لکه‌ها حاصل فعالیت آنزیم tomatinase و در هم شکستن ساختار tomatine-∝می باشد. در این آزمون دو استاندارد tomatine-∝ و tomatidie نیز مورد استفاده قرار گرفت. پس از طی مراحل مختلف آنالیز TLC ، لکه حاصل از tomatine-∝ در قسمت پایین صفحه و لکه حاصل از tomatdine در قسمت بالای صفحه قرار می‌گیرد که در نمونه‌های ترزیق شده جدایه‌های مختلف قارچ نیز بدلیل حضور آنزیم tomatinase دو لکه در قسمت پایینی و بالایی صفحه نمایان گردید که نشان دهنده فعالیت آنزیم است:



شکل ۲- آنالیز TLC به کمک استانداردها و ۱۰ جدایه انتخابی از ۵ گروه بیماری زایی قارچ FoL نژاد ۱

بحث و نتیجه گیری

صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی برخی گونه‌های فوزاریوم از جمله *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در محیط کشت با تغییرات شدید همراه می‌باشد. احتمالاً بدلیل وجود چنین خصوصیات ذاتی، این گونه‌ها قادر به اشغال نواحی اکولوژیکی وسیع در بسیاری از مناطق جغرافیایی می‌باشند (۲). در این بررسی نیز ضمن مشاهده تغییرات مورفولوژیکی قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در محیط کشت، جمع آوری و جداسازی این قارچ از تمامی مراحل رشد گیاه گوجه فرنگی در مناطق مختلف استان خراسان شمالی و رضوی نشان داد که FoL دارای تواناییهای ویژه ای برای سازگاری در اقلیم‌های مختلف می‌باشد و تقریباً در تمام مزارع گوجه فرنگی کم و بیش وجود دارد. اگر چه جمعیتی از این قارچ*F.oxysporum* دارای میزبانهای اختصاصی بوده و انسداد آوندی را در گیاهان موجب می‌شود ولی بسیاری از جمعیت *F.oxysporum* بصورت ساپروفیت در خاک زندگی کرده و از جمله مهاجمان ثانویه گیاهی می‌باشند (۳). ثانیاً جمعیتی از این قارچ نیز باعث پوسیدگی ریشه و طوقه می‌گردند و تغییر رنگ آوندی در آنها محدود به ناحیه ریشه می‌باشد. از اینرو در این تحقیق عدم بیماریزایی برخی جدایه‌ها بر روی گوجه فرنگی نباید به معنای غیر بیماریزا بودن آنها تلقی شود زیرا در اینجا تنها جدایه هایی که پژمردگی آوندی ایجاد می‌نمودند مورد استفاده قرار گرفتند و این احتمال وجود دارد که سایر جدایه‌ها دارای قدرت بیماریزایی بروی میزبانهای گیاهی دیگر بوده و به سایر فرمهای اختصاصی قارچ*F.oxysporum* تعلق داشته باشند و یا اینکه بعنوان جدایه‌های ساپروفیت در گروه مهاجمان ثانویه قرار گیرند (۱۶) با توجه به اینکه در استانهای خراسان شمالی و رضوی اکثر کشاورزان از ارقامی مانند موبیل و جنیا و غیره استفاده می‌کنند که دارای عملکرد مناسب و بازار پسندی خوبی می‌باشند بنظر می‌رسد که کاشت مداوم این ارقام شرایط را برای آسیب پذیری بیشتر گیاه در مقابل بیماریهای مختلف مهیا می‌سازد (۱۵).

طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق بیشترین جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* مربوط به قسمت طوقه و ساقه بودند که نشان دهنده فعالیت بیشتر قارچ در این نواحی می‌باشد و از طرفی بر احتمال بیماریزا بودن جدایه‌ها می‌افزاید. نتایج آزمون اثبات بیماریزایی دامنه وسیعی از علایم را نشان داد و درجات مختلفی از بیماریزایی از ضعیف تا شدید را برای تمام جدایه‌ها ظاهر نمود. عوامل مختلفی در شدت وضعف بیماری دخیل هستند از جمله حضور آنزیم خارج سلولی tomatinase می‌باشد که برای شکستن سد دفاعی گیاه گوجه فرنگی که توسط ساپونین α-tomatine ایجاد می‌شود موثر است. این گلیکو آلکالوئید در قسمتهای مختلف گیاه گوجه فرنگی و به غلظت بالایی تولید می‌شود که یکی از مکانسیم‌های دفاعی گوجه فرنگی در برابر حمله پاتوژنها می‌باشد. عوامل بیماری زای گوجه فرنگی رفتار مختلفی در مقابل این مکانسیم دفاعی از خود بروز می‌دهندکه از جمله این رفتارها تولید آنزیم tomatinase توسط قارچ‌های مختلف از جمله *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* **می**باشد که میزان این آنزیم بنظر می‌رسد با توجه به نقش آن در شدت بیمارزایی و یا تاثیر بیماریزایی آنزیم در قارچ *F.oxysporum* در جدایه‌های بیماریزا و ساپروفیت یا غیر بیماریزای قارچ متفاوت باشد. در این تحقیق از مجموع ۱۷ جدایه بیماریزا ۱۵جدایه آن که اختصاصی گوجه فرنگی بودند از نظر حضور آنزیم tomatinase مورد بررسی قرار گرفتند که تمامی این جدایه‌ها با توجه به قرارگرفتن در یک نژاد فیزیولوژیک و ۵ گروه باید شدت بیماریزایی و میزان فعالیت آنزیم tomatinase در گروههای مختلف بیماریزایی مورد بررسی قرار گیرد زیرا با توجه به نقش آن در تشدید علایم بیماری انتظار می‌رود میزان فعالیت آن نیز در گروههای مختلف متفاوت باشد (۱۶).

منابع

۱- اعتباریان ح. ۱۳۶۸ . بررسی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی و مبارزه شیمیایی با آن در منطقه ورامین . مجله علوم کشاورزی ایـران، ۲۳(۱) : ۱۱-۱.

۲- صارمی ح .۱۳۷۷ . اکولوژی و تاکسونومی گونه‌های فوزاریوم . انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ص ۱۳۲.

3- Alexander L.J., and Hoover M.M. 1993. Disease resistance in wild species of tomato. Ohio Agricaltural experimental station research balltin , 752p.

4- Booth C.1997.Fusarium. laboratory guide to the identification of the major species. CMJ. England.

5- Bouarab K., Meiton R., Peart J, Baul combe D., and Osbourn A. 2002. asaponin-detoxifying enzyme mediates sappression of plant defences. Matare 415:889-872.

6- Bargess L.W. 1981.General Ecology. Fusarium: Disease, Biology and taxonomy(Eds.P.E jurrian, j. and E,A weststeign .1999.

7- Ito so. takahara H., Kawaguchi T., Tanaka S., and Komega M. 2002. Post-transcriptional sciencing of the tomatinase gene in *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* phytopathol.150:474-480.

8- Ito S., Eto T., Tanaka S., Yamaguchi N., Takahara H., and Ikeda T. 2004. tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of ∝ —tomatiane by *Fusarium oxysporum* tomatinase , suppress induced defense response in tomato cells. Lett . 571:31-34

9- Ito S., Nagata A., Kai T., Takahara H., and Tanakam S. 2005. symptom less infection of tomato plants by tomatinase producing *Fusarium oxysporum* formae speciales nonpathogen, on tomat, plants, physiol. 66:183-191.

10- Ito S., Nagata A., Kai Lai T., Takahara H., and Tanaka S. 2004. Distribution of the fotoml gene encoding tomatinase in formae speciales of *Fusarium oxysporum* and identification of a novel tomatinase from *Fusarium oxysporum* f.sp.radicis –lycopersici, the casual a gent of Fusarium crow and root rot of tomato. Gen plant path, l.70:195-201.

11- Kistler H.C., Scheider R.W., and Elias K.S. 2003. Origen of race 3 of *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici at single site in California. Phyto pathology, 93: 1014 – 1021.

12- Nelson P.E., Toussoun T.A., and Marasos W.F.O. 1983. Fusarim species. The pennsy lvania state university,193p.

13- Roldan A., Perza E., Ruiz A., Pubio M. 1999. tomatinas from *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* defines a new class of saponinases. Mol. Plant-nicrobe,12:852-861.

14- Summereli B.A., and leslie J.F. 2003. A utilization approach to Fusarium identification , plant disease , 87:117-128.

15- Wong M.W. 2003. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* phytopathol, 85:1348-1355.

16- Yolanda P., Isabel M., and Carmen Ruiz – Roldan M. 2008. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* is required for full Virulence on tomato plants phytopathol97:1304-1310.