



دانشگاه صنعتی اصفهان

۲۰

مجله علوم و فنون

# گزارش مرزگر و منابع طبیعی

تعیین تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری برق زده گی نخود

[*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.] ایران با استفاده از مارکرهای

مولکولی RAPD

فرهاد شکوهی فر، عبدالرضا باقری و ماهرخ فلاحتی رستگار

## تعیین تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری برق‌زدگی نخود [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.] ایران با استفاده از مارکرهای مولکولی RAPD

فرهاد شکوهی<sup>۱</sup>، عبدالرضا باقری<sup>۲</sup> و ماهرخ فلاحتی رستگار<sup>۳</sup>

### چکیده

اطلاعات اندک موجود در مورد تنوع قارچ *Ascochyta rabiei* یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده برنامه‌های اصلاحی برای مقاومت نسبت به بیماری برق‌زدگی نخود است. در این پژوهش تنوع ژنتیکی جمعیت این قارچ در ایران بررسی شده است. بدین منظور، ۲۶ جدایه از ۱۶ استان کشور انتخاب و تنوع ژنومی آنها با استفاده از روش RAPD ارزیابی شد. با به کارگیری ۱۲ آغازگر تصادفی، الگوی بانندی DNA جدایه‌ها تهیه شد، و بر این اساس تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی بین جدایه‌ها محاسبه و روابط خویشاوندی آنها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای تعیین گردید.

نتایج نشان داد که روش RAPD ابزار قوی برای تجزیه ژنومی جمعیت *A. rabiei* است. در میان آغازگرهای به کار برده شده ۱۰ آغازگر پلی‌مورفیسم نشان دادند. بر اساس داده‌های به دست آمده، شاخص تنوع ژنتیکی جدایه‌ها ۹۸ درصد برآورد شد، که نشان دهنده تنوع ژنتیکی زیاد این بیمارگر در ایران است. فاصله ژنتیکی بین جفت جدایه‌ها از ۰/۱۶ تا ۰/۶۱ متغیر بود. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جدایه‌های ۲۰ و ۲۲ (از استان‌های قزوین و گلستان)، و کمترین فاصله بین جدایه‌های ۱۲ و ۲۶ (از استان‌های مرکزی و مازندران) دیده شد. در سطح شباهت ۹۰ درصد، کل جدایه‌ها در ۲۲ گروه ژنوتیپی جداسازی و از حرف A تا V نام‌گذاری شدند. و نیز الگوی پراکنش آنها در ایران مشخص شد.

واژه‌های کلیدی: *Ascochyta rabiei*، تنوع ژنتیکی، فاصله ژنتیکی، RAPD

۱. مربی بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲. استاد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳. استاد بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

## مقدمه

برق‌زدگی یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های نخود (*Cicer arietinum* L. در منطقه آسیای مرکزی و خاورمیانه است (۱۱ و ۱۵). این بیماری به وسیله قارچ [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.] ایجاد می‌شود، و در شرایط رطوبت و دمای مناسب خسارت زیادی به مزارع نخود وارد می‌سازد (۱).

هرچند از آغاز دهه ۶۰ میلادی برای مقابله با این بیماری از ارقام مقاوم استفاده شده است، ولی نبود اطلاعات کامل از تنوع قارچ، همواره برنامه‌های اصلاحی را با مشکل مواجه کرده است، به گونه‌ای که مقاومت ارقام اصلاح شده پس از مدتی شکسته شده، و از سوی دیگر به دلیل تفاوت تنوع این بیمارگر در مناطق مختلف، واکنش ارقام در تمام مناطق یکسان نبوده است (۱۵). بنابراین، پیش از اجرای برنامه‌های اصلاحی، برای دستیابی به ارقام مقاوم، باید با استفاده از روش‌های مطمئن و دقیق، جمعیت این بیمارگر را بررسی کرده، تنوع موجود در هر منطقه را شناسایی، و کل گروه‌های تعیین شده را در برنامه‌های گزینش ارقام به کار گرفت، تا منابع مقاوم مناسب برای هر منطقه شناخته شوند.

تا کنون گزارش‌های فراوانی از گروه‌بندی جدایه‌های این قارچ بر اساس صفات ظاهری (۵، ۶ و ۹) یا قدرت بیماری‌زایی (۲، ۱۰ و ۱۶) ارائه شده است. ولی به طور کلی، این روش‌ها افزون بر صرف وقت و زحمت زیاد، از تکرارپذیری کمی برخوردار بوده و نتایج به دست آمده قابل اطمینان نیست. از این رو، پژوهندگان همواره به دنبال روش‌های جای‌گزین مطمئن‌تری برای شناسایی تنوع در جمعیت این بیمارگر بوده‌اند. پژوهش‌ها نشان داده است، هنگام کار با صفات کمی، یا صفاتی مانند بروز و شدت بیماری، که به دلیل حساسیت به شرایط محیطی تغییرپذیری زیادی نشان می‌دهند، بهتر است از مارکرهای بیوشیمیایی و مولکولی برای شناسایی و جداسازی تنوع استفاده شود (۳، ۴ و ۲۰). از جمله مارکرهایی که تا کنون به کار گرفته شده است می‌توان به آیزوزایم‌ها (Isozymes)، (Restriction fragment length polymorphism) RFLPs

(Random amplified polymorphism) RAPDs

میکروساتلایت‌ها (Microsatellites) اشاره کرد (۸، ۱۲، ۱۷، ۱۸ و ۱۹)، ولی تنها شمار کمی از آنها برای بررسی جمعیت *A. rabiei* مفید بوده‌اند (۲۰). در این میان، بوزاند و همکاران (۸) با به کارگیری آیزوزایم‌ها، تنوع موجود در الگوهای آیزوزایمی جدایه‌های جمع‌آوری شده از الجزایر، تونس و سوریه را مقایسه کردند، ولی تنها میان گونه‌های مختلف جنس *Ascochyta* تفاوت‌های جزئی یافتند.

بر خلاف آیزوزایم‌ها، مارکرهای مولکولی DNA در بررسی جمعیت این قارچ قابلیت بیشتری نشان دادند، به طوری که ویسینگ و همکاران (۱۹) با به کارگیری توالی‌های تکراری مینی‌ساتلایت‌ها به عنوان کاوشگر (Probe) در روش RFLP، توانستند شش نژاد موجود در سوریه (۱۶) را با دقت زیادی از یکدیگر جدا کنند. کارایی مارکرهای DNA در شناسایی تنوع جمعیت *A. rabiei*، در پژوهش‌های دیگری نیز تأیید شده است. مورجان و همکاران (۱۲) با روشی مشابه، ۱۵۶ جدایه جمع‌آوری شده از تونس را در ۱۷ گروه ژنوتیپی تقسیم‌بندی کردند. آدوپا و همکاران (۱۸) افزون بر به کارگیری مینی‌ساتلایت‌ها، از روش RAPD نیز برای بررسی جمعیت این بیمارگر در سوریه استفاده کردند و توانستند شش نژاد تعیین شده به وسیله ردی و کبابه (۱۶) و نیر سه گروه پاتوتیپی را که توسط خود آنها تعیین شده بود، از یکدیگر جدا کنند. هرچند در این پژوهش روش RAPD در تشخیص تنوع موجود در جمعیت *A. rabiei* قابلیت زیادی نشان داد، ولی از به کارگیری توأم این روش با روش مینی‌ساتلایت نتایج بهتری به دست آمد (۱۸).

با این حال، روش RAPD به دلیل مزایایی چون استفاده نکردن از مواد رادیواکتیو، نیاز به DNA ژنومی اندک و هزینه کم، برای بررسی جمعیت موجودات زنده کاربرد بیشتری دارد، چون معمولاً در این بررسی‌ها شمار زیادی نمونه ارزیابی شده و روش‌های دیگر، علاوه بر صرف وقت زیاد، به اطلاعات اولیه‌ای از ژنوم موجودات نیاز دارند که در مجموع مقرون به

صرفه نمی‌باشند. اگرچه استفاده از روش RAPD با مشکلاتی چون تکرارپذیری کم برخی از باندها، حساسیت شدید به شرایط واکنش، و بهینه‌سازی (Optimization) طولانی همراه بوده است، ولی در حال حاضر به طور گسترده‌ای در آزمایش‌های جمعیت و تعیین تنوع به کار گرفته می‌شود (۱۸، ۲۰ و ۲۱).

این پژوهش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ *A. rabiei* و تعیین روابط خویشاوندی جدایه‌های جمع‌آوری شده از ایران انجام شد. همچنین، تلاش شد تا گذشته از شناسایی و نام‌گذاری گروه‌های ژنوتیپی این بیمارگر، الگوی پراکنش آنها نیز در کشور مشخص گردد.

## مواد و روش‌ها

به منظور تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت *A. rabiei* ۲۶ جدایه به عنوان نماینده جمعیت این بیمارگر در ایران بر اساس نتایج پژوهش‌های گذشته (۲) انتخاب (جدول ۱)، و با استفاده از ۱۲ آغازگر تصادفی (Random primer) (۱۰ نوکلئوتیدی) در روش مولکولی RAPD مقایسه شدند.

## تهیه بافت میسلیم و استخراج DNA

بیست و شش جدایه انتخاب شده در ویال‌های حاوی محیط کشت (Potato Dextrose Broth) PDB کشت، و در شرایط دمایی ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد، روی هم‌زن با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت چهارده روز نگهداری شد. DNA جدایه‌ها بر اساس روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) اصلاح شده استخراج شد (۱۸). در این روش حدود ۱-۲ گرم بافت میسلیم قارچ همراه با ازت مایع، با استفاده از هاون به خوبی پودر شد. حدود یک گرم پودر حاصل را به لوله آزمایش ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل کرده، دو میلی‌لیتر بافر استخراج (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH=۸، ۱۰۰ میلی‌مولار EDTA و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl) به آن افزوده و به خوبی به هم زده شد تا به صورت سوسپانسیون درآید. سپس

۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۲۵ درصد SDS به آن اضافه، و به آهستگی در دمای اتاق به مدت یک ساعت به هم زده شد. پس از آن ۳۰۰ میکرولیتر محلول کلرور سدیم ۵ مولار به آن افزوده و به آهستگی به هم زده شد. سپس ۲۶۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl (کلرور سدیم ۰٫۷ مولار و CTAB ده درصد) به آن اضافه، و پس از به هم زدن به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد تیمار شد. حدوداً چهار میلی‌لیتر محلول کلروفرم ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) به آن افزوده، پس از چند بار به هم زدن به مدت ۱۲ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد.

پس از اتمام سانتریفوژ، فاز بالایی به لوله جدید منتقل و ۰٫۶ حجم حاصل ایزوپروپانل سرد به آن اضافه گردید. لوله آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری، و سپس ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از حذف محلول بالایی، رسوب DNA با الکل سرد ۷۰٪ شست‌شو و در دمای اتاق نگهداری شد تا خشک شود. با افزودن ۳۰۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH=۸، یک میلی‌مولار EDTA با pH=۸) رسوب DNA حل شده، به آن ۳۰۰ میکرولیتر استات سدیم سه مولار و ۶۶۰ میکرولیتر اتانول خالص سرد اضافه شد. نمونه برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری، و سپس به منظور رسوب دادن DNA، ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده، رسوب DNA پس از تخلیه محلول فوقانی با الکل سرد ۷۰٪ شست‌شو، و اجازه داده شد در دمای اتاق خشک شود. با توجه به مقدار DNA رسوب کرده، نمونه حاصل در ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. در مرحله پایانی به منظور رسوب ناخالصی‌ها و حذف DNA حل نشده، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ، و بافر حاوی DNA به لوله جدید منتقل شد، و تا هنگام تعیین کمی و کیفیت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

برای تعیین کیفیت و کمی DNA استخراج شده، ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه ۲۵۰ برابر با بافر TE رقیق شد. پس از

جدول ۱. شماره و منشأ ۲۶ جدایه از جمعیت قارچ *A. rabiei* در ایران

شماره جدایه	محل جمع‌آوری	شماره جدایه	محل جمع‌آوری
۱	کرمانشاه	۱۴	همدان
۲	کرمانشاه	۱۵	همدان
۳	لرستان	۱۶	تهران
۴	لرستان	۱۷	خراسان
۵	فارس	۱۸	کردستان
۶	فارس	۱۹	زنجان
۷	ایلام	۲۰	قزوین
۸	ایلام	۲۱	گلستان
۹	ایلام	۲۲	گلستان
۱۰	نریز	۲۳	اردبیل
۱۱	مرکزی	۲۴	ارومیه
۱۲	مرکزی	۲۵	ارومیه
۱۳	همدان	۲۶	مازندران

تعیین میزان جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، خلوص DNA به دست آمده با محاسبه نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر محاسبه، و غلظت هر نمونه با در نظر گرفتن غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ارای هر واحد OD (Optical density) در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد.

تجزیه RAPD

دوازده آغازگر (جدول ۲)، که در آزمایش آدوپا و همکاران (۱۸) تنوع خوبی بین جدایه‌های *A. rabiei* نشان داده بودند، از شرکت اوپرون (Operon Technologies, Alameda, California) تهیه شد. تکثیر DNA در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲٫۵ میکرولیتر بافر PCR 10X (Tris-HCl) ۱۰ میلی‌مولار با pH=۸، ژلاتین ۰/۰۱ درصد، KCl ۵۰ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرومول مخلوط dNTPs (سینا ژن)، ۱۵ پیکومول آغازگر، ۱۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، یک واحد آنزیم تک پلیمرار (Taq polymerize) (سینا ژن) و یک قطره روغن معدنی (سیگما) برای جلوگیری از تخریب در دستگاه ترموسایکلر (Maxi-Gene،

درجه سانتی‌گراد و ۴۰ چرخه با یک دقیقه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۳۶ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، و مرحله تکثیر سهایی با پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بهینه‌سازی و انجام گردید. در یک واکنش به جای DNA ژنومی آب مقطر استریل اضافه گردید، و بدین وسیله امکان وجود آلودگی در واکنش‌های انجام شده کنترل شد. محصول واکنش در ژل آگاروز ۱٪ تریبو و در بافر TAE (Tris-HCl) ۸۹ میلی‌مولار با pH=۸، اسید استیک ۸۹ میلی‌مولار، EDTA دو میلی‌مولار) به مدت سه ساعت با ولتاژ ثابت ۷۵ میلی‌ولت الکتروفورز انجام گردید. سپس ژل در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و ریسر نور UV از آن عکس گرفته شد. مکان‌های تکثیر شده به وسیله هر آگارگر به صورت باندهایی در شکل آشکار شد

ثابت داده‌ها

شکل‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار LabWorks™ ۷.3 تحریر و تحلیل شده. تنها باندهای قوی انتخاب و به

جدول ۲. نام و توالی ۱۲ آغازگر<sup>۱</sup> تصادفی (۱۰ نوکلئوتیدی) به کار برده شده در تجزیه RAPD

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر
۱	OPI-01	5-ACCTGGACAC
۲	OPI-16	5-TCTCCGCCCT
۳	OPJ-01	5-CCCGGCA1AA
۴	OPJ-10	5-AAGCCCGAGG
۵	OPJ-15	5-TGTAGCAGGG
۶	OPJ-18	5-TGGTCCGAGA
۷	OPK-09	5-CCCTACCGAC
۸	OPK-12	5-TGGCCCTCAC
۹	OPK-15	5-CTCC1GCCAA
۱۰	OPL-05	5-ACGCAGGCAC
۱۱	OPL-16	5-AGGTTGCAGG
۱۲	OPM-02	5-ACAACGCC1C

<sup>۱</sup> Operon Technologies (Alameda, California)

و نمودار روابط حویشاوندی در این فاصله گروه‌بندی شد  
 $\bar{X} - S \cdot t_{\alpha=10\%}$  = فاصله معادل ۱۰ درصد نداشتن تشابه  
 $\bar{X}$  میانگین ماتریس فاصله‌های ژنتیکی، S واریانس ماتریس  
 فاصله‌های ژنتیکی و t عدد استاندارد معادل حدود احتمال  $\alpha$   
 است. شاخص تنوع ژنتیکی جدایه‌ها نیز با استفاده از فرمول ننی  
 (۱۴) محاسبه شد

$$H = \left[ \frac{n}{n-1} \right] \left[ 1 - \sum X_i^2 \right]$$

که در آن H شاخص تنوع ژنتیکی، n شمار افراد مورد بررسی و  
 $X_i$  فراوانی نسبی هر ژنوتیپ است.

### نتایج و بحث

تنها ۱۰ آغازگر در مکان‌های تکثیر شده پلی‌مورفیسم نشان  
 دادند (حدول ۳) دو آغازگر OPJ-10 و OPI-16 با این که در  
 مجموع بیش از ۱۵ منطقه از ژنوم جدایه‌ها را تکثیر کردند، ولی  
 نتوانستند پلی‌مورفیسمی را شناسایی کنند. در واکنش‌های انجام  
 شده، بسته به نوع آغازگر، بین ۴ تا ۱۳ منطقه از DNA تکثیر

کدهای صفر و یک تبدیل، و پس از انتقال داده‌ها به برنامه  
 Excel 97، تنها مکان‌هایی که پلی‌مورفیسم نشان داده بودند  
 برای انجام محاسبات بعدی انتخاب شدند.

### فاصله ژنتیکی (Genetic distance) و تنوع ژنتیکی (Genetic diversity)

بر اساس فرمول اصلاح شده ننی (۱۳) فاصله ژنتیکی میان تمام  
 جدایه‌ها محاسبه و ماتریس فاصله تشکیل شد.

$$d_{ij} = -\ln(n/N)$$

$d_{ij}$  فاصله ژنتیکی میان دو فرد 1 و 2 و n شمار لوکوس‌های  
 مشابه میان دو فرد، و N شمار کل لوکوس‌های مورد بررسی در  
 جمعیت است. ماتریس حاصل با روش UPGMA (میانگین  
 حسابی غیر رزنی) در برنامه آماری Statistica 5.5 تجزیه  
 خوشه‌ای شد، و نمودار روابط حویشاوندی جدایه‌ها تهیه  
 گردید. برای تعیین سطح تشابه ۹۰ درصد و جداسازی گروه‌های  
 ژنوتیپی، عدد معادل ۱۰ درصد از جدول اعداد استاندارد t به  
 دست آمد، و با استفاده از فرمول ریر، فاصله مورد نظر تعیین

جدول ۳. نتایج تجزیه ژنوم ۲۶ جدایه *A. rabiei* با استفاده از ۱۰ آغازگر تصادفی در روش RAPD

ردیف	نام آغازگر	شمار لوکوس تکثیر شده	شمار باند پلی مورف	شمار ژنوتیپ جدا شده	شاخص تنوع ژنتیکی
۱	OPI-01	۱۳	۶	۱۱	۰/۹۰
۲	OPJ-01	۱۲	۲	۴	۰/۵۵
۳	OPJ-15	۹	۲	۳	۰/۶۰
۴	OPJ-18	۱۲	۲	۳	۰/۶۳
۵	OPK-09	۵	۱	۲	۰/۳۷
۶	OPK-12	۱۲	۳	۵	۰/۸۰
۷	OPK-15	۶	۴	۱۰	۰/۸۸
۸	OPL-05	۴	۲	۴	۰/۷۱
۹	OPL-16	۱۱	۴	۷	۰/۸۳
۱۰	OPM-02	۹	۴	۷	۰/۸۲

ولی تنها شش منطقه از ژنوم جدایه‌های سوریه را تکثیر و فقط دو ژنوتیپ در میان آنها شناسایی کرده بود. این اختلافات در نتایج به دست آمده از آغازگرهای دیگر نیز از جمله OPJ-01، OPK-12 و OPM-01 مشهود است.

در مجموع، مقایسه نتایج نشان می‌دهد که جمعیت این بیمارگر در مناطق مختلف با یکدیگر بسیار متفاوت است، و این مسئله می‌تواند یکی از دلایل واکنش متفاوت ارقام مقاوم در مناطق مختلف به حساب آید.

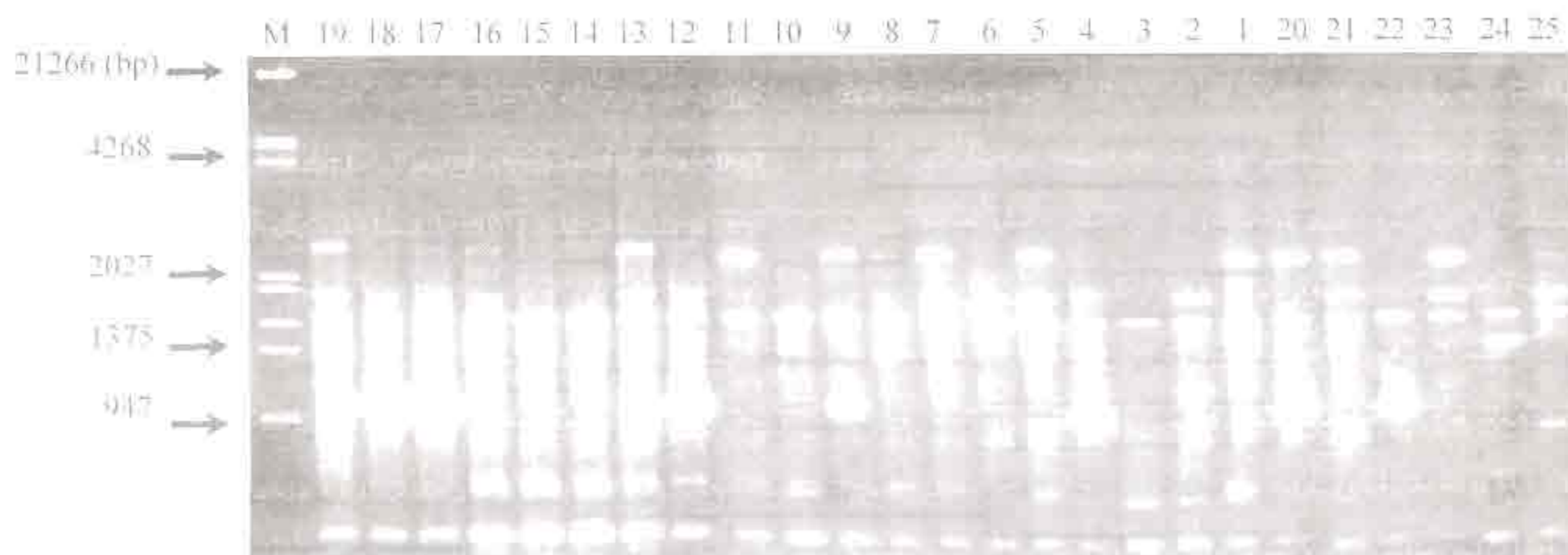
#### تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی

شاخص تنوع محاسبه شده بر اساس داده‌های به دست آمده از هر آغازگر بین ۰/۳۷ تا ۰/۹۰ متغیر بود (جدول ۳). کمترین شاخص به آغازگر OPK-09 مربوط بود (شکل ۲)، در حالی که بر اساس آغازگرهای OPI-01 و OPK-15 بیشترین ضریب تنوع ژنتیکی محاسبه شد. شاخص تنوع بر اساس داده‌های به دست آمده از کل آغازگرها حدود ۰/۹۸ برآورد شد، که در مقایسه با گزارش آدوپا و همکاران (۱۸) بسیار زیاد و دلیل دیگری بر تنوع بسیار این بیمارگر در کشور است. در کشورهایی مانند سوریه از ارقام مقاوم به طور گسترده

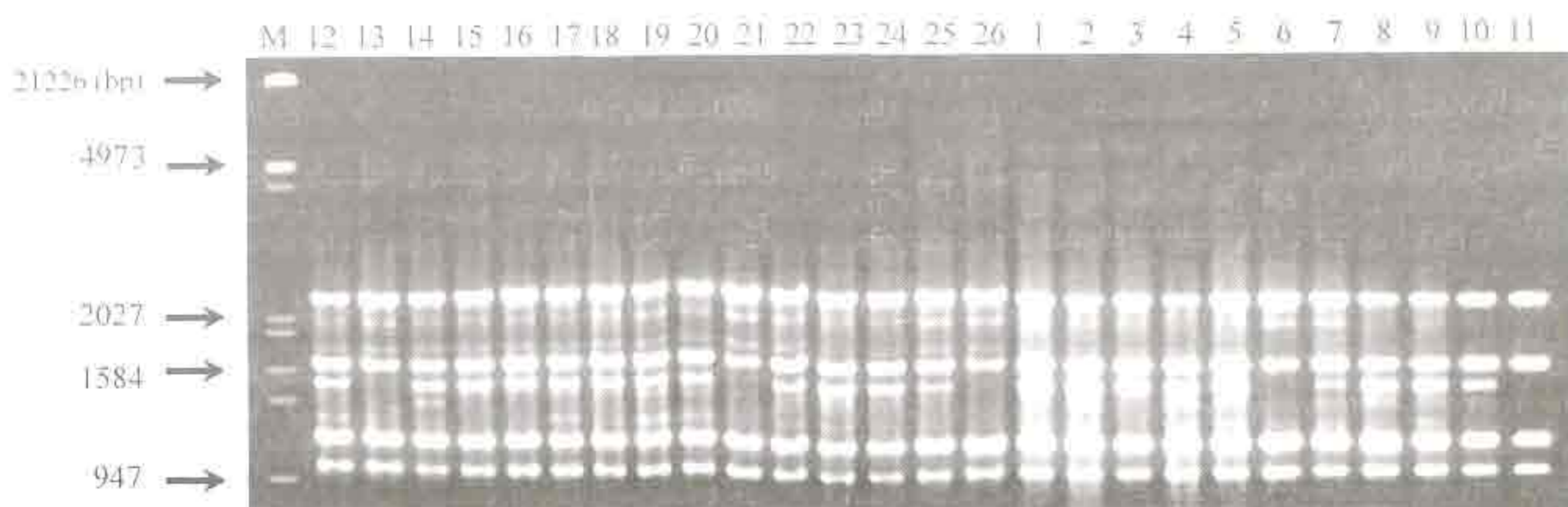
شده بود، و در مجموع ۳۰ منطقه پلی مورفیک در سطح ژنوم جدایه‌های مورد بررسی شناسایی شد، که بیشترین پلی مورفیسم شناسایی شده به آغازگر OPI-01 مربوط بود.

بر پایه شمار باند پلی مورف تولید شده به وسیله هر آغازگر، بین ۲ تا ۶۴ ژنوتیپ قابل جداسازی بود، که در این میان آغازگر OPI-01 با تشخیص ۱۱ ژنوتیپ تنوع بیشتری را شناسایی کرد. هرچند این آغازگر نسبت به دیگر آغازگرها باند پلی مورف بیشتری را تکثیر کرد، ولی آغازگر OPK-15 در تشخیص ژنوتیپ بازده بیشتری از خود نشان داد (شکل ۱)، زیرا با تولید چهار باند پلی مورف از شش باند تکثیر شده، ۱۰ ژنوتیپ را در سطح جدایه‌های مورد بررسی شناسایی نمود.

مقایسه نتایج به دست آمده با گزارش‌های ارائه شده از سوریه گویای وجود اختلاف زیادی بین نمونه‌های مورد بررسی است. با این که آغازگر OPJ-15 با تکثیر ۱۲ منطقه ژنومی، ۱۳ ژنوتیپ بین جدایه‌های سوریه شناسایی کرده بود، ولی در پژوهش حاضر با تکثیر ۹ منطقه از جدایه‌های ایران تنها توانست سه ژنوتیپ را شناسایی کند. در مقابل، آغازگر OPI-01 با وجود این که با تولید ۱۳ باند و تشخیص ۱۱ ژنوتیپ بیشترین قدرت تشخیص تنوع را در جدایه‌های ایران نشان داد،



شکل ۱. الگوی بانندی تکثیر شده از DNA جدایه‌های *A. rabiei* با استفاده از آغازگر OPK-15. شماره هر چاهک نشان دهنده شماره جدایه و حرف M معرف مارکر وزنی (فاز لامبدا برش خورده با *HindIII* و *EcoRI*) است.



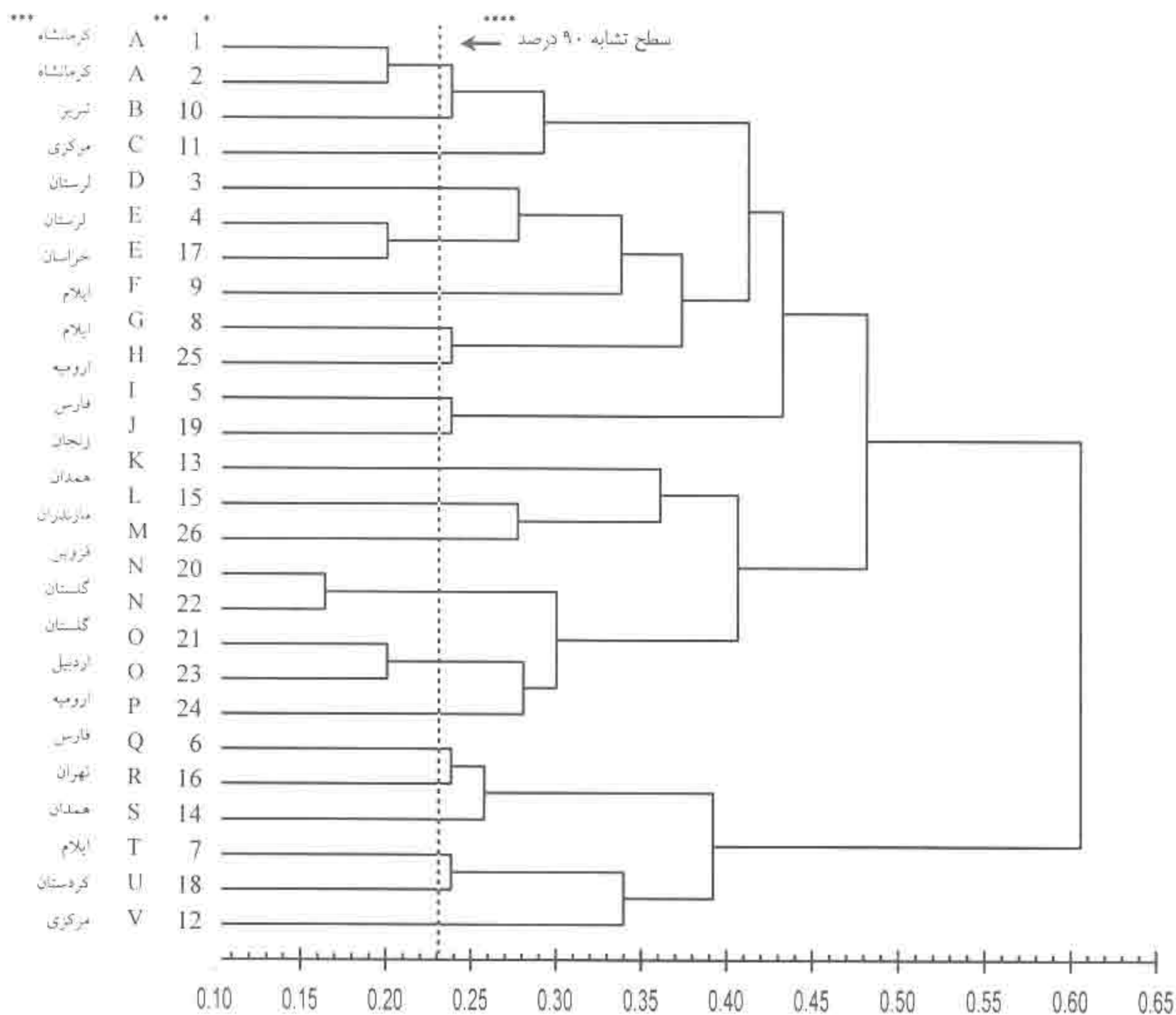
شکل ۲. الگوی بانندی تکثیر شده از DNA جدایه‌های *A. rabiei* با استفاده از آغازگر OPK-09. شماره هر چاهک نشان دهنده شماره جدایه و حرف M معرف مارکر وزنی (فاز لامبدا برش خورده با *HindIII* و *EcoRI*) است.

جمعیت بیمارگر را کاهش داد و با کشت متناوب ارقام مقاوم مختلف در یک منطقه تنوع آن را کنترل نمود.

فاصله ژنتیکی جفت جدایه‌ها بین ۰/۱۶ تا ۰/۶۱ متغیر بود. و نشان داد که علاوه بر این که هیچ کدام از جدایه‌ها از یک کلنی نبوده‌اند، جدایه‌هایی با فاصله کمتر از ۰/۱۶ نیز در بین نمونه‌های مورد بررسی وجود نداشته است. به نظر می‌رسد به دلیل اندک بودن شمار جدایه‌ها، درصدی از تنوع در نظر گرفته نشده، ولی مشاهده جدایه‌هایی با فاصله ژنتیکی ۰/۶۱ شایان توجه است، زیرا حداکثر فاصله گزارش شده در مناطق دیگر در حدود ۰/۳۹ بوده است (۱۸). وجود این فاصله ژنتیکی بسیار در

استفاده می‌شود، و بدین وسیله تنوع جمعیت بیمارگر تا حد زیادی کنترل می‌گردد. زیرا با کشت ارقام مقاوم در یک منطقه تنها ژنوتیپ‌های محدودی از بیمارگر قادر به ایجاد بیماری بوده و در تشکیل جمعیت بیمارگر در سال‌های بعد مؤثر خواهند بود، و بدین صورت تنوع موجود در جمعیت بیمارگر کاهش می‌یابد. ولی در ایران، معمولاً خرید بذر نخود مرسوم نیست، و کشاورزان بیشتر بذر خود را از محصول سال گذشته انتخاب می‌کنند. بنابراین، به دلیل اثر متقابل میزبان و بیمارگر، تنوع زیاد میزبان منجر به تنوع زیاد بیمارگر در منطقه می‌شود. به نظر می‌رسد با اعمال فشار گزینشی میزبان تنوع موجود در





شکل ۳. روابط خویشاوندی جدایه‌های قارچ *A. rabiei* در ایران بر اساس فاصله ژنتیکی به دست آمده از تجزیه RAPD

\* : شماره جدایه‌ها

\*\* : گروه‌های ژنوتیپی

\*\*\* : محل جمع‌آوری جدایه‌ها

\*\*\*\* : فاصله معادل سطح شباهت ۹۰ درصد و مبنای گروه‌بندی و جداسازی ژنوتیپ‌ها

حالی که گروه‌های دیگر دارای جدایه‌هایی با منشأ غیر یکسان بودند. در میان نمونه‌های مورد بررسی دو جدایه ۲۰ و ۲۲ شباهت بیشتری به هم داشتند. پس از آنها جفت جدایه‌های ۱ و ۲ (از کرمانشاه)، ۴ و ۱۷ (از خراسان و لرستان) و ۲۱ و ۲۳ (از گلستان و اردبیل) نسبت به دیگر نمونه‌ها در فاصله کمتری از یکدیگر قرار داشته و در فاصله ۰/۲۰ دومین سطح گروه‌بندی را تشکیل دادند. همان گونه که در شکل ۴ دیده می‌شود بین منشأ

جدایه‌های مورد بررسی دلیل دیگری بر تنوع زیاد این بیمارگر در ایران است.

روابط خویشاوندی جدایه‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است. در فاصله ژنتیکی برابر سطح شباهت ۹۰ درصد، ۲۲ گروه ژنوتیپی جدا و از حرف A تا V نام‌گذاری شد. در این میان چهار گروه A، E، N و O دارای دو عضو و بقیه تک عضوی بودند. در گروه A تنها جدایه‌های کرمانشاه قرار گرفتند، در



شکل ۴. الگوی پراکنش ۲۲ گروه ژنوتیپی قارچ *A. rabiei* در ایران بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه RAPD. حروف، معرف گروه ژنوتیپی موجود در هر منطقه است.

تولید مثل جنسی را از عمده‌ترین عوامل تأثیرگذار در ایجاد تنوع دانسته‌اند (۱۲ و ۱۶)، ولی به نظر می‌رسد افزون بر موارد فوق، بود فشارهای میریان مقاوم از جمله عوامل مهمی باشد که در عدم کنترل تنوع در جمعیت بیمارگر نقش دارد. این مسئله در کشورهایی مانند ایران، که از ارقام مقاوم به طور گسترده استقبال نشده مشهود است، در حالی که در کشورهای دیگر (۱۰ و ۱۸) به دلیل اصلاح، معرفی و کشت ارقام مقاوم به طور مستمر، نوع این بیمارگر تا حد زیادی کنترل شده است.

و گروه ژنوتیپی جدایه‌ها ارتباط محسوسی وجود ندارد. بنابراین، به نظر می‌رسد اگر نخست مناطق مختلف بر اساس شرایط اقلیمی، نوع ارقام زیر کشت و تاریخ کاشت گروه‌بندی شوند، ارتباط بهتری بین منشأ و گروه ژنوتیپی جدایه‌ها مشاهده می‌گردد.

۴. طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع قارچ *A. rabiei* در ایران بسیار زیاد است و باید عوامل مؤثر در ایجاد و گسترش آن بررسی شود. هرچند پژوهندگان موتاسیون و

## سپاسگزاری

امکانات اجرایی این پژوهش را فراهم کرده‌اند صمیمانه تشکر و

بذین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، که فزردانی می‌شود.

## منابع مورد استفاده

۱. باقری، ع. ا.، نظامی و م. سنطانی. ۱۳۷۹. اصلاح حیوانات سرما دوست برای تحمل سه تنش‌ها. انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
۲. شکوهی، فر. ف.، ع. باقری، م. رستگار و س. ملک‌راد. ۱۳۸۰. تعیین تنوع بیماری‌رایی در قارچ عامل بیماری برقرزدگی بخود [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.] با استفاده از ارقام افتراقی مجموعه مقالات دومین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
۳. فولاد، م. و ر. اجونر. ۱۳۷۱. استفاده از مارکرهای مولکولی در اصلاح نباتات جکیده مقالات کلیدی اولین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج
۴. قره‌یاضی، ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای دی ان آ در اصلاح نباتات. مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.
۵. بورالهی، ح. م.، فلاحی رستگار و ب. جعفرپور. ۱۳۷۹. تشخیص نژادهای فیزیولوژیک *Ascochyta rabiei* عامل بیماری برقرزدگی بخود، در چند منطقه از کشور. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۴(۱): ۱۲۷-۱۳۶.
6. Ahmad, G. D., A. Hafiz and M. Ashraf. 1952. Association of morphological characters with blight resistance. Proceedings of The Fourth Pakistan Science Conference, Peshawar, Pakistan.
7. Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of genetic linkage mapping man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Human Genet. 32: 314-331.
8. Bouznad, Z., R. Corbiri and D. Spire. 1997. Protein and isozyme analysis of *Ascochyta* species of food legumes using the isoelectric focusing method. PP. 49-66. In: S. M. Udupa and F. Wigand (Eds.), DNA Markers and Breeding for Resistance to *Ascochyta* Blight in Chickpea. ICARDA, Aleppo, Syria.
9. Grewal, J. S. 1984. Evidence of physiological races in *Ascochyta rabiei* of chickpea. PP. 55-65. In: M. C. Saxena and K. B. Singh (Eds.), *Ascochyta* Blight and Winter Sowing of Chickpea. Martinus Nijhoff, The Netherlands.
10. Hamza, S., S. Samir, A. Rebai, R. Salah and H. Moncef. 2000. Pathotype variation of representative genotypes of *Ascochyta rabiei* in the Beja region. J. Plant Pathol. 82: 23-28
11. Mmbaga, M. T. 1997. Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* and *ascochyta* blight resistance in chickpea. PP. 23-37. In: S. M. Udupa and F. Wigand (Eds.), DNA Markers and Breeding for Resistance to *Ascochyta* Blight in Chickpea. ICARDA, Aleppo, Syria.
12. Morjane H., J. Geistlinger, M. Harrabi, K. Weising and G. Kahl. 1994. Oligonucleotide fingerprinting detects genetic diversity among *Ascochyta rabiei* isolates from a single field in Tunisia. Current Genet. 26: 191-197.
13. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Naturalist 106: 283-292.
14. Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
15. Porta-Poglia, A., A. Inantino, P. Crino, R. Angelini and G. Venora. 1997. *Ascochyta* blight of chickpea: present status and prospects. Pakistan J. Phytopathol. 9: 9-15.
16. Reddy, M. V. and S. Kabbabeh. 1985. Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei*. PP. 135-143. In: K. B. Singh and M. C. Saxena (Eds.), Disease Resistance Breeding in Chickpea. ICARDA, Aleppo, Syria.

17. Thomas, M. R. and N. S. Scott, 1994. Sequence-tagged site markers for microsatellites, a simplified technique for rapidly obtaining flanking sequences. *Plant Mol. Biol. Reporter* 12: 58-64.
18. Udupa, S. M., F. Wigand, M. C. Saxena and G. Kahl, 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Theor. Appl. Genet.* 97: 299-307.
19. Weising, K., D. Kaemmer, J. T. Epplen, F. Wigand, M. C. Saxena and G. Kahl, 1991. DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligonucleotides. *Current Genet.* 19: 483-489.
20. Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer, 1995. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press, USA.
21. Williams, S. G. K., A. R. Kubcik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey, 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

## Identification of Genetic Diversity in the *Ascochyta* Blight Pathogen of Chickpea [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.] Using RAPD Markers

F. Shokoohifar<sup>1</sup>, A. Bagheri<sup>2</sup> and M. Falahati Rastegar<sup>3</sup>

### Abstract

The poor information available on variation of *Ascochyta* blight fungus is the most important factor limiting chickpea breeding programs for resistance to blight disease. In this study, efforts were made to detect genetic variation of the pathogen in Iran. The RAPD marker was employed to evaluate 26 isolates collected from 16 provinces. Twelve random primers were used to analyze genomic DNA of the isolates.

Only ten primers showed polymorphism among isolates. Primer OPK-01 defined the highest number of polymorphism and primer OPK-09 confirmed relatively low degree of polymorphism. On the basis of this molecular marker, the estimated genetic diversity index was 98% and the pair-wise genetic distance of the isolates varied from 0.16 to 0.61. The least genetic distance belonged to isolates 20 and 22 from Qazvin and Golestan while the highest distance belonged to isolates 26 and 12 from Mazandaran and Markazi. The phylogenetic tree was constructed by cluster analysis and all the isolates grouped to 22 genetic clusters at the 90% similarity level. The genetic groups were named from A to V and their distribution in Iran was determined. The results revealed that genetic variation among Iranian population of the pathogen is very high, and further that RAPD is a vigorous tool for genomic analysis of *Ascochyta rabiei*.

**Keywords:** *Ascochyta* blight, Genetic diversity, Genetic distance, RAPD.

---

1. Researcher, Research Center for Plant Sci., Ferdowsi Univ., Mashhad, Iran.

2. Prof. of Plant Breed., College of Agric., Ferdowsi Univ., Mashhad, Iran.

3. Prof. of Plant Pathol., College of Agric., Ferdowsi Univ., Mashhad, Iran.