

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Ascochyta rabiei* عامل برق‌زدگی نخود در استان لرستان با استفاده از نشانگر SSR

منصوره رحیمی^۱، سید کاظم صباغ^{۲*}، محمد جوان نیکخواه^۳، حسن سلطانیلو^۴، محمد سالاری^۵ و ناصر پنجه‌که^۶
۱، ۲، ۵، ۶، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیاران، دانشگاه زابل، ۳، استاد، پردیس کشاورزی و
منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۴، استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی گرگان
(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۳۱ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۱/۱۶)

چکیده

بیماری برق‌زدگی با عامل *Ascochyta rabiei* یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های نخود است. در این تحقیق، با هدف مطالعه ساختار ژنتیکی قارچ عامل بیماری، نمونه‌برداری به صورت تصادفی از مزارع هشت منطقه مختلف استان لرستان (ازنا، الشتر، بروجرد، پلدختر، چگنی، خرم‌آباد، کوهدشت و نورآباد) صورت گرفت. پس از کشت نمونه‌ها روی محیط کشت اختصاصی آرد نخود، دکستروز و آگار، جدایه‌های قارچی با روش نوک هیف خالص‌سازی شد و تعداد ۵۳ جدایه خالص به دست آمد. تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ با نشانگر توالی تکراری ساده و با استفاده از پنج جفت آغازگر اختصاصی ارزیابی شد. تعیین تشابه جدایه با استفاده از ضریب شباهت دایس و روش الگوریتم UPGMA انجام گرفت. تجزیه خوشه‌ای داده‌ها نشان داد که جدایه‌ها در فاصله ژنتیکی برابر با سطح تشابه ۰/۳ درصد در ۹ گروه ژنوتیپی مشخص قرار می‌گیرند. آنالیز PCOA داده‌ها با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد در نرم‌افزار NTSYS صورت گرفت و طبق نتایج، از بین ۵۳ مؤلفه به دست آمده، ۱۵ مؤلفه دارای مقادیر ویژه بزرگ‌تر از ۱ بودند و ۹۰/۴۹ درصد تنوع موجود را توجیه کردند. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که بیشترین مقدار تنوع ژنتیکی (۹۶ درصد) در داخل جمعیت توزیع شده بود و تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف ۴ درصد تعیین گردید. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که بین جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان تنوع ژنتیکی زیادی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: بلایت آسکوکیتایی، تنوع ژنتیکی، ضریب دایس، نشانگر مولکولی SSR.

مقدمه

هاپلوئید و هتروتال شناخته می‌شود (Chen et al., 2004). این قارچ در دوره زندگی خود دارای یک مرحله جنسی و چندین مرحله غیرجنسی است. در شرایط آب‌وهوایی مناسب، این قارچ قادر است در هنگام خروج گیاهچه از خاک از طریق تمام اندام‌های هوایی نفوذ کند. در این شرایط گیاه علائم بارز بیماری را نشان می‌دهد و گاهی این قارچ باعث کاهش محصول تا ۱۰۰ درصد می‌شود (Kaiser, 1997; Pande et al., 2005). طبق گزارش فائو (FAO) ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان نخود در جهان و استان لرستان یکی از

نخود (*Cicer arietinum*) گیاهی است که در بین حبوبات جهان بعد از لوبیای معمولی و نخودفرنگی در رتبه سوم قرار دارد (Tekeoglu et al., 2002). این محصول تحت تأثیر تنش‌های مختلف زنده و غیرزنده قرار می‌گیرد (Reddy & Kabbabeh, 1985). یکی از مخرب‌ترین عوامل زنده‌ای که باعث کاهش شایان توجه تولید این محصول می‌شود، بیماری برق‌زدگی است. عامل این بیماری قارچ *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. [teleomorph: *Didymella rabiei* (Kovachski) Von.Arx] متعلق به رده آسکومیست است که یک قارچ

نشانگرهایی به‌شمار می‌روند که در ژنتیک گیاهی و برنامه‌های اصلاحی به‌کار می‌روند (Gupta & Varshney, 2000). تنها تعداد کمی از قارچ‌ها توانایی استفاده از نشانگر SSR را دارند. ۲۰ نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *A. rabiei* طراحی و توسعه یافته است (Geistlinger *et al.*, 2000) در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. rabiei* با استفاده از این نشانگرها، نشان داده شده است که این نشانگرها تنوع بیشتری در مقایسه با دیگر نشانگرها دارند (Geistlinger *et al.*, 2004; Peever *et al.*, 2000). بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. rabiei* از کشورهای تونس، پاکستان، ترکیه، سوریه و آمریکا با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره، چندشکلی نسبتاً بالایی را نشان داده است (Geistlinger *et al.*, 2000). در ایران تحقیقات زیادی در زمینه تنوع ژنتیکی در استان‌های مختلف صورت گرفته است. تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های ایلام و کرمانشاه با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره بررسی شده و تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی بین جدایه‌ها مشاهده گردیده است (Nourollahi *et al.*, 2011).

با توجه به اینکه استان لرستان یکی از مراکز مهم کشت و تولید نخود در ایران است و وجود بیماری برق‌زدگی نخود یکی از عوامل محدودکننده تولید محسوب می‌شود، تا کنون در ارتباط با تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. rabiei* با استفاده از نشانگرهای مولکولی تحقیق جامع و کاملی نشده است. این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های *A. rabiei* به‌دست‌آمده از مناطق کاشت نخود در استان لرستان و تعیین روابط خویشاوندی آنها با استفاده از نشانگر ریزماهوره انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و نگهداری جدایه‌ها

برای به‌دست آوردن جدایه‌های مورد نیاز در این مطالعه، نمونه‌برداری از مزارع کشت نخود در هفت منطقه استان لرستان انجام گرفت (جدول ۱).

مزارع هدف به‌طور تصادفی و با فواصل معین انتخاب شدند و نمونه‌هایی از برگ، ساقه و نیام که دارای علائم

مهم‌ترین مراکز مستعد با شرایط آب‌وهوایی مناسب برای تولید نخود است که هر ساله همه‌گیری‌های شدیدی از این بیماری در این استان دیده می‌شود (<http://faostat.fao.org>). در جهان نیز همه‌گیری‌های شدیدی از بیماری برق‌زدگی نخود روی ارقام مختلف گزارش شده است (Navase-Cortes *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1981). هر چند از آغاز دهه ۶۰ میلادی برای مقابله با این بیماری از ارقام مقاوم استفاده شده است، ولی کمبود اطلاعات کامل از تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ، همواره برنامه‌های اصلاحی را با مشکل مواجه کرده است؛ به گونه‌ای که مقاومت ارقام اصلاح‌شده پس از مدتی شکسته شده است (Jayakumar *et al.*, 2005). از سوی دیگر، به دلیل بالا بودن تنوع ژنتیکی این بیمارگر در مناطق مختلف، واکنش ارقام در تمام مناطق یکسان نبوده است (Porta-Poglia *et al.*, 1997). بنابراین، پیش از اجرای برنامه‌های اصلاحی، برای دستیابی به ارقام مقاوم، باید با استفاده از روش‌های مطمئن و دقیق، جمعیت این بیمارگر را بررسی و تنوع ژنتیکی موجود در هر منطقه را شناسایی کرد. آنگاه، کل گروه‌های تعیین‌شده را در برنامه‌های گزینش ارقام به‌کار گرفت تا منابع مقاوم مناسب برای هر منطقه شناخته شود. بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی و مولکولی برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچی بسیار مؤثرتر از روش‌های دیگر است. همچنین این نشانگرها برای صفات کمی، یا صفاتی مانند بروز و شدت بیماری که به میزان زیادی به شرایط محیطی مختلف وابسته‌اند، کارایی بیشتری دارند (Morjane *et al.*, 1994; Thomas & Scoll, 1994; Udupa *et al.*, 1998; Weising *et al.*, 1991). نشانگرهای ژنتیکی برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی پاتوتیپ‌ها، ساختار جمعیت و ژن‌های بیماری‌زایی مفید بوده و در تهیه نقشه ژنومی به‌کار می‌روند (Taran *et al.*, 2007). تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. rabiei* با استفاده از نشانگرهای (Chongo *et al.*, 2004)، انگشت‌نگاری DNA (Morjan *et al.*, 1994) و همچنین ریزماهوره‌ها (Geistlinger *et al.*, 1997) بررسی شده است. توالی‌های تکراری ساده (SSR) که در محل‌های ژنی اختصاصی وجود دارند، از

استخراج DNA

برای استخراج DNA، ابتدا ۲ کاغذ صافی حاوی میسلیم قارچ *A. rabiei* به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع (Potato Dextrose PDB (Broth, Merk, Germany) به علاوه دو گرم عصاره مخمر انتقال داده شده و ارلن‌ها روی همزن دورانی با ۱۴۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶-۸ روز قرار داده شدند. میسلیم‌های رشد کرده روی کاغذ صافی سترون به کمک دستگاه پمپ خلأ آب‌گیری شدند و هر جدایه به تفکیک در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA ژنومی مطابق روش چوی و همکاران انجام گرفت (Choi *et al.*, 2010). ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به DNA استخراج شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب نگهداری شدند. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه طیف سنجی و ژل الکتروفورز آگارز ۱٪ به ترتیب اندازه‌گیری شد.

بیماری بودند، جمع‌آوری شدند و در داخل پاکت‌های کاغذی در یخچال نگهداری شدند. برای جداسازی قارچ از بافت‌های آلوده، قطعات کوچکی از حد فاصل بین بافت آلوده و سالم با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۳-۲ دقیقه ضدعفونی سطحی و سپس سه بار با آب مقطر سترون شست‌وشو داده شدند.

سپس، به کمک کاغذ صافی سترون خشک و در تشتک‌های حاوی محیط‌های کشت جامد (PDA: PDA (CSMDA: Chickpea و Potato Dextrose Agar) Seed Meal Dextrose Agar کشت داده شدند (Dolar *et al.*, 1994). نمونه‌ها به مدت سه روز در انکوباتور در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار داده شدند.

خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک‌اسپور کردن انجام گرفت و در نهایت، تعداد ۵۳ جدایه خالص‌سازی شده روی کاغذ صافی سترون در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مطالعات بعدی نگهداری شد.

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های قارچ *Ascochyta rabiei* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشت نخود در استان لرستان طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۹۰.

ردیف	منطقه نمونه‌برداری	شماره جدایه	ردیف	شماره جدایه	منطقه نمونه‌برداری
۱	الشتر	۱-G۱IL	۲۸	IL28-G6	نورآباد
۲	بروجرد	IL2-G2	۲۹	IL29-G3	خرم‌آباد
۳	بروجرد	IL3-G2	۳۰	IL30-G3	خرم‌آباد
۴	خرم‌آباد	IL4-G3	۳۱	IL31-G3	خرم‌آباد
۵	خرم‌آباد	IL5-G3	۳۲	IL32-G3	خرم‌آباد
۶	کوهدشت	IL6-G4	۳۳	IL33-G4	کوهدشت
۷	کوهدشت	IL7-G4	۳۴	IL34-G4	کوهدشت
۸	چگنی	IL8-G5	۳۵	IL35-G4	کوهدشت
۹	چگنی	IL9-G5	۳۶	IL36-G4	کوهدشت
۱۰	چگنی	IL10-G5	۳۷	IL37-G4	کوهدشت
۱۱	چگنی	IL11-G5	۳۸	IL38-G4	کوهدشت
۱۲	خرم‌آباد	IL12-G3	۳۹	IL39-G4	کوهدشت
۱۳	الشتر	IL13-G1	۴۰	IL40-G4	کوهدشت
۱۴	الشتر	IL14-G1	۴۱	IL41-G4	کوهدشت
۱۵	الشتر	IL15-G1	۴۲	IL42-G4	کوهدشت
۱۶	الشتر	IL16-G1	۴۲	IL43-G4	کوهدشت
۱۷	الشتر	IL17-G1	۴۴	IL44-G4	کوهدشت
۱۸	الشتر	IL18-G1	۴۵	IL45-G4	کوهدشت
۱۹	الشتر	IL19-G1	۴۶	IL46-G4	کوهدشت
۲۰	نورآباد	IL20-G6	۴۷	IL47-G7	پلدختر
۲۱	نورآباد	IL21-G6	۴۸	IL48-G7	پلدختر
۲۲	نورآباد	IL22-G6	۴۹	IL49-G7	پلدختر
۲۳	نورآباد	IL23-G6	۵۰	IL50-G8	ازنا
۲۴	نورآباد	IL24-G6	۵۱	IL51-G8	ازنا
۲۵	نورآباد	IL25-G6	۵۲	IL52-G8	ازنا
۲۶	نورآباد	IL26-G6	۵۳	IL53-G1	الشتر
۲۷	نورآباد	IL27-G6			

Geistlinger *et al.*) استفاده گردید (ArA03T و ArH05T). (al., 2000).
مشخصات آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ آمده است.

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه با استفاده از نشانگر SSR به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. rabiei* به‌دست‌آمده از مزارع آلوده کشت نخود در مناطق مختلف استان لرستان، از پنج جفت آغازگر SSR اختصاصی *A. rabiei* (ArR12D، ArH06T، ArH02T، ArR12D، ArH06T، ArH02T)

جدول ۲. مشخصات و توالی آغازگرهای SSRs استفاده‌شده در این مطالعه (Gestilinger *et al.* 2000).

مکان ژنی	توالی تکرارشونده گزارش شده	توالی آغازگرها	اندازه مورد نظر
ArH02T	(GAA)58 (GTA)6	CTGTATAGCGTTACTGTGTG TCCATCCGCTCTTGACATCCG	365
ArR12D	(CA)15	ATACACCCAAACCGGGTATC GTATGGAATGTGCGATAGGA	158
ArH06T	(CAA)9(CAG)7(CAA)21	CTGTACAGTAACGACAACG ATTCCAGAGAGCCTTGATTG	167
ArA03T	(GAA)31	TAGGTGGCTAAATCTGTAGG CAGCAATGGCAACGAGCACG	379
ArH05T	(CTT)18	CATTGTGGCATCTGACATCAC TGGATGGGAGGTTTTGGTA	197

رسم گردید (Huson *et al.*, 2007). در این تحقیق، میانگین ضریب تشابهات و انحراف از معیار داده‌ها^۱ به‌دست آمد که به کمک این اعداد خط برش^۲ روی دندروگرام ترسیم گردید. تعیین میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) با بسته نرم‌افزاری GenAlex اجرا گردید. آنالیز مربوط به PCoA با سه مؤلفه اول به‌صورت پراکنده و میله‌ای رسم شد.

نتایج

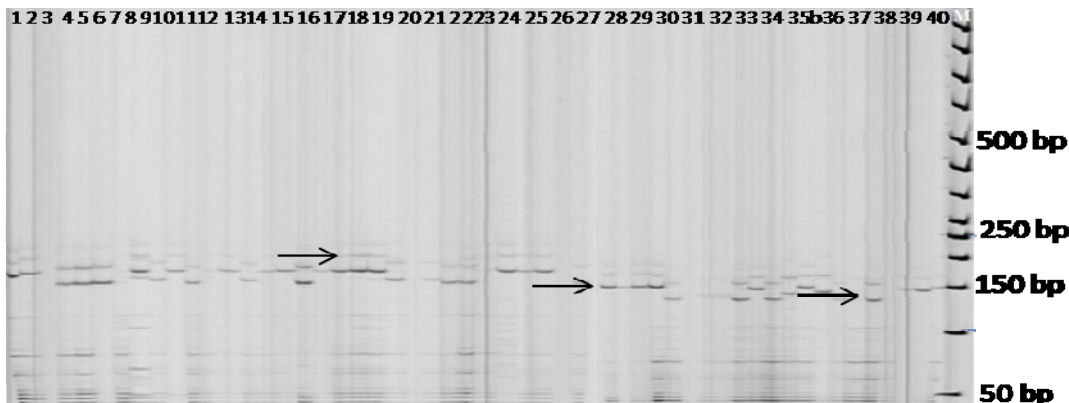
تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. rabiei* عامل بیماری بلایت نخود در استان لرستان با استفاده از پنج جفت آغازگر اختصاصی ریزماهوره بررسی شد. تمام آغازگرها قادر به تولید باندهای تکثیری قوی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده بودند. مشخصات آغازگرها و اندازه محصولات تولیدی در جدول ۲ آمده است. شکل‌های ۱ و ۲ آل‌های تکثیرشده توسط جفت آغازگرهای ArH06T و ArH02T را به ترتیب نشان می‌دهند. جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها در مناطق مختلف استان، فراوانی آل‌های به‌دست‌آمده از هر جفت آغازگر محاسبه گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر از محلول واکنش و مقدار نیم میکرولیتر از هر آغازگر انجام گرفت. مراحل زنجیره‌ای پلیمرز با برنامه حرارتی زیر و با استفاده از دستگاه Palm_Cycler™ Gradient (Corbett Research, Australia) انجام گرفت. واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه انجام گرفت و به دنبال آن ۳۶ چرخه حرارتی (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۹- ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه) و توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر قطعات مورد نظر اعمال گردید. محصولات PCR در روی ژل پلی‌اکریل آمید پنج درصد تفکیک و با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد و سپس به کمک دستگاه ژل اسکن به‌صورت باندهایی آشکار شد.

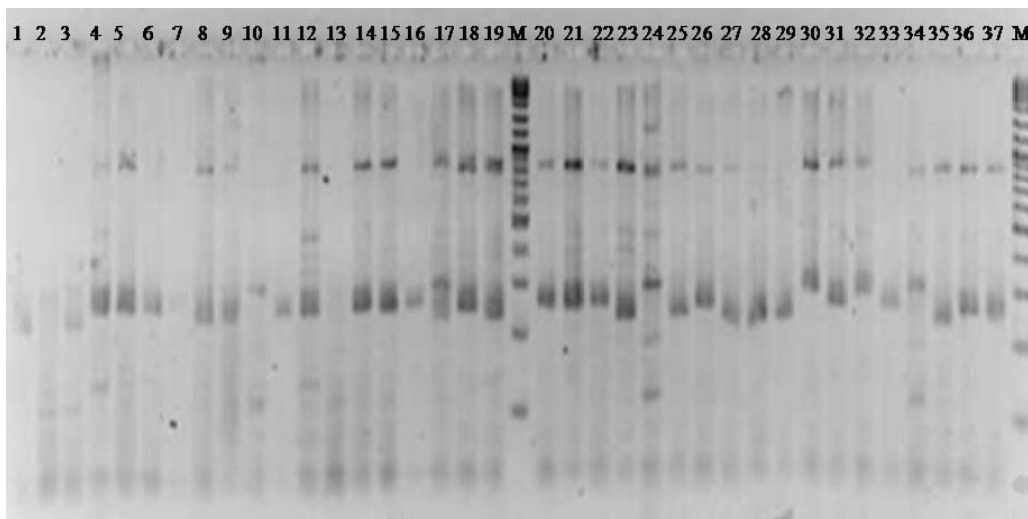
آنالیز داده‌ها

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. rabiei* قطعات SSR رؤیت‌پذیر روی ژل پلی‌اکریل آمید بررسی شدند و داده‌های حاصل بر اساس وجود باند (یک) یا نبود باند (صفر) در برنامه Excel وارد شدند. سپس، تجزیه خوشه‌ای داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS (Version 2) و الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس اجرا شد و دندروگرام حاصل از گروه‌های مربوط

1. Standard Deviation
2. Cut off point



شکل ۱. آل‌های مختلف تکثیرشده توسط نشانگر ریزماهواره ArH06T در بین جدایه‌های *A. rabiei* جداسازی شده از مناطق مختلف استان لرستان (ستون ۱ تا ۴۰ مربوط به جدایه‌های IL1-IL40 و ستون M مربوط به نشانگر استاندارد 50bp) است. پیکان‌های سیاه آل‌های مختلف یک مکان ژنی را نشان می‌دهد.



شکل ۲. نقوش الکتروفورزی حاصل از قطعات تکثیرشده با جفت آغازگر ArH02T در بین جدایه‌های قارچ *A. rabiei* جداسازی شده از مناطق مختلف استان لرستان. (اعداد درج شده در بالای شکل از چپ به راست مربوط به جدایه‌های ۱-۳۷ و M نشانگر استاندارد 100 bp است)

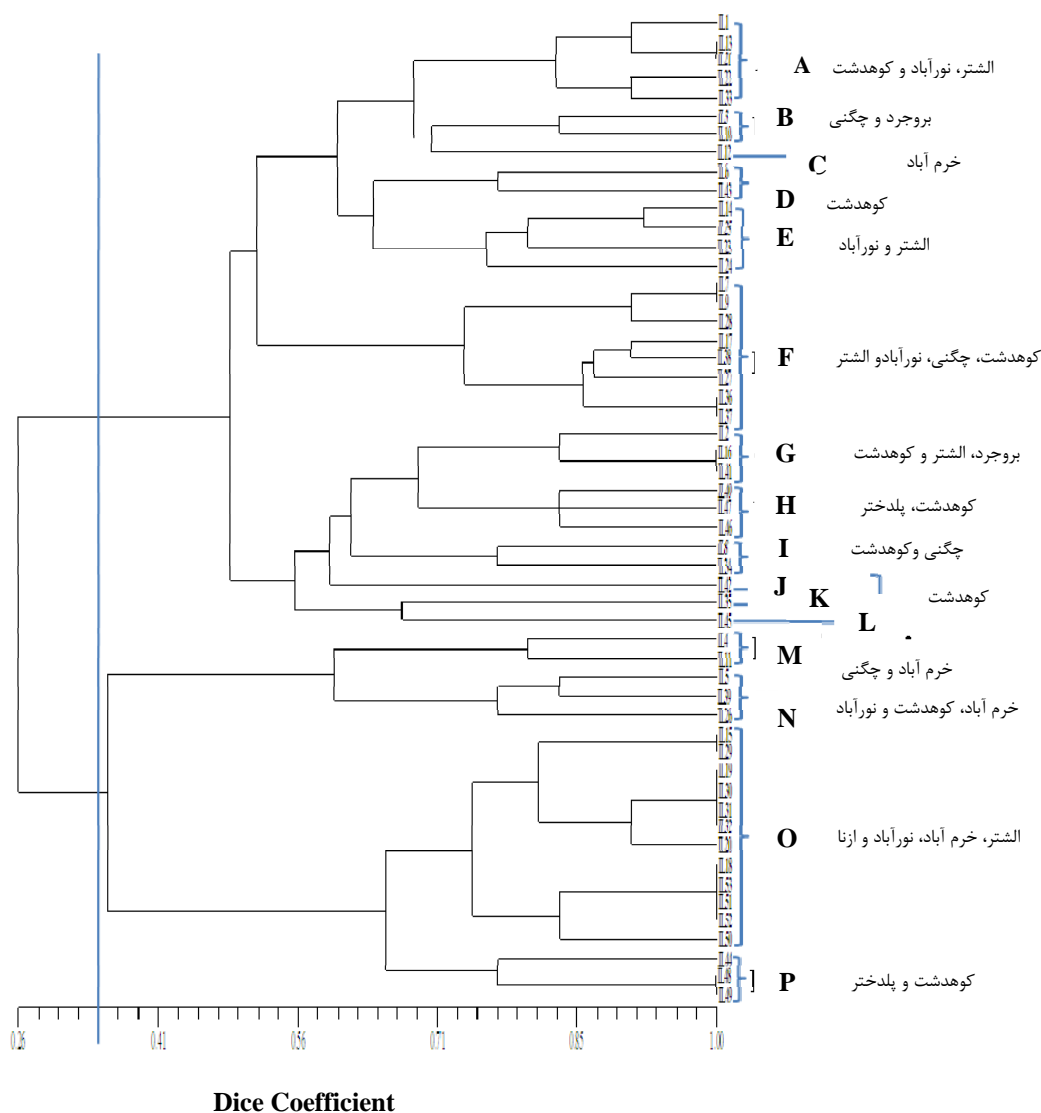
که بهترین ضریب برای انجام تجزیه خوشه‌ای ضریب جاکارد و الگوریتم UPGMA با ضریب کوفنتیک ۰/۸۳ است که نشان‌دهنده همبستگی بالای بین ماتریس تشابه و دندروگرام است. از سه ضریب جاکارد، دایس و تطابق ساده و سه الگوریتم UPGMA برای تعیین نزدیک‌ترین و دورترین همسایه استفاده شد و ضریب کوفنتیک برای ۹ دندروگرام محاسبه شد که ضریب و الگوریتم مذکور بالاترین ضریب کوفنتیک را نشان داد. محاسبه میانگین داده‌های حاصل از محاسبه ضریب تشابه نشان داد که عدد مربوط به خط برش عدد ۰/۳۲۵۸۹ است که

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. rabiei* نشان داد که نشانگرهای ArH06T و ArH02T به ترتیب حداکثر و حداقل تنوع را نشان دادند.

نتیجه تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA نشان داد که جدایه‌ها در فاصله ژنتیکی برابر با سطح تشابه ۰/۳ درصد در ۹ گروه ژنوتیپی در دندروگرام مربوط قرار می‌گیرند که به ترتیب از حرف A تا P تعیین شدند. تعداد جدایه‌ها در گروه‌های ژنوتیپی از دو تا ۳ عضو متغیر بود (شکل ۳). تجزیه داده‌های حاصل با نرم‌افزار NTSYS نشان داد

متعلق به شهرستان‌های الشتر و خرم‌آباد است. گروه‌های A-D هر کدام با ۲ جدایه از دو ناحیه مختلف تشابه زیادی داشتند، درحالی‌که جدایه‌های مربوط به گروه‌های E, F و P با درصد تشابه بالا مربوط به یک منطقه نمونه‌برداری بودند (شکل ۳).

نشان‌دهنده تشابه پایین جدایه‌های شهرستان‌های مختلف است. بیشتر شاخه‌های مربوط به ۹ دندروگرام، ۲ جدایه با درصد تشابه بالا دارند که در اغلب موارد این دو جدایه مربوط به یک ناحیه نمونه‌برداری است. شاخه G دارای جدایه‌هایی از الشتر و ازنا و H دارای ۳ جدایه

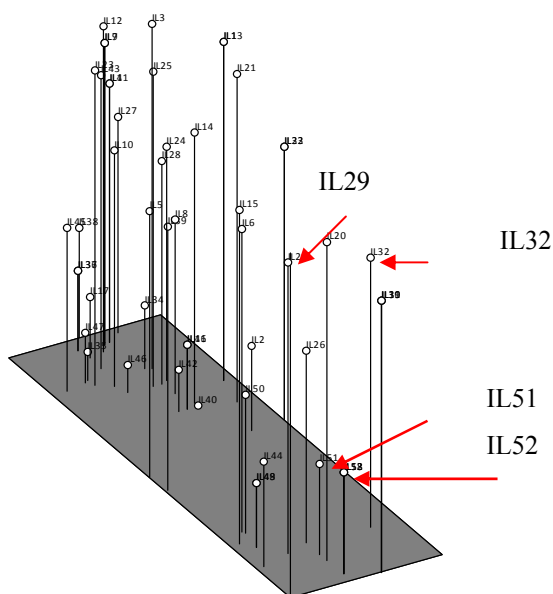


شکل ۳. دندروگرام تشابه ۵۳ جدایه *rabiei* A، جداسازی شده از مناطق مختلف استان لرستان با استفاده از نشانگرهای SSR و روش آنالیز خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه دایس.

مولکولی (AMOVA) نشان داد که ۴ درصد تنوع در بین جمعیت‌ها و ۹۶ درصد تنوع در داخل جمعیت است و میزان تنوع بین جمعیت‌ها در مقایسه با تنوع بالای درون جمعیت‌ها معنادار نیست (جدول ۳). نمودار حاصل از آنالیز PCoA نشان داد که بین منشأ و گروه ژنوتیپی جدایه‌ها ارتباط نسبتاً محسوسی وجود دارد و

آنالیز PCoA داده‌ها با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد در نرم‌افزار NTSYS اجرا شد و طبق نتایج، از بین ۵۳ مؤلفه حاصل، ۱۵ مؤلفه مقادیر ویژه بزرگ‌تر از ۱ داشتند و ۹۰/۴۹ درصد تنوع موجود را توجیه کردند. نمودار پراکنش جدایه‌ها بر اساس دو مؤلفه اول رسم گردید (شکل ۴). نتایج حاصل از تجزیه واریانس

جدایه‌هایی که از مناطق مختلف یک شهرستان جداسازی شدند، در گروه‌های نزدیک به هم پراکنده‌اند.



شکل ۴. نمایش سه بعدی آنالیز PCoA نمایانگر تنوع ژنتیکی ۵۳ جدایه فارچ *A. rabiei* ایزوله‌های ۵۱ و ۵۲ مربوط به ازنا و ایزوله‌های ۲۹ و ۳۲ مربوط به خرم‌آباد است.

بین جمعیت‌ها در مقایسه با تنوع زیاد درون جمعیت‌ها معنادار نیست (جدول ۳).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که ۴ درصد تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها و ۹۶ درصد تنوع در داخل جمعیت است و میزان تنوع

جدول ۳. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA). (احتمال معنادار بودن انحراف بعد از ۹۶ جایگزینی تصادفی)

PhiPT	درصد واریانس	واریانس برآورد شده	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
۰/۰۴۲ ^{NS}	٪۴	۰/۰۱	۰/۳۰۴	۲/۱۳	۷	بین جمعیت‌ها
	٪۹۶	۰/۲۳۹	۰/۲۳۹	۱۰/۷۴	۴۵	درون جمعیت‌ها

*تعداد آلل

بحث

استان لرستان یکی از مناطق عمده کشت نخود در ایران به‌شمار می‌رود که با توجه وجود شرایط آب‌وهوایی مساعد، قارچ عامل سوختگی آسکوکیته‌ای نخود هر ساله خسارت جبران‌ناپذیری را به تولید این محصول وارد می‌کند. این مطالعه برای اولین بار در ایران برای تعیین تنوع ژنوتیپی جدایه‌های جمع‌آوری شده *A. rabiei* از گیاهان آلوده در استان لرستان واقع در غرب کشور صورت گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد که از لحاظ جغرافیایی، جدایه‌ها دارای فاصله ژنتیکی قابل‌ملاحظه‌اند و بالا بودن این تنوع می‌تواند مبارزه با

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، بهترین تجمع مربوط به جدایه‌های گروه ۴ و ۶ است که تعداد ۳ جدایه از هر گروه در یک ناحیه خطی پراکنده وجود دارند. جدایه‌های H, G و P بر روی دندروگرام یک منشأ دارند. 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. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با توجه به قرار گرفتن جدایه‌های شهرستان‌های مختلف در یک گروه، میزان تنوع ژنتیکی زیادی بین جدایه‌ها وجود دارد.

این بیماری را دچار مشکل کند. تنوع ژنتیکی قارچ *A. rabiei* در مناطق مختلف جهان گزارش شده است و سطوح مختلفی از تنوع را از خود نشان داده‌اند. تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ *A. rabiei* در میان ۳۷ جدایه از هند و ۳۷ جدایه از ۱۵ کشور جهان با استفاده از نشانگر SSR مطالعه شده است که ۲۶ آلل در جهان و ۱۵ آلل در هند در جایگاه ریزماهورای ARMS1 شناسایی شده است (Barve *et al.*, 2004). تنوع ژنتیکی *A. rabiei* هم در کانادا مطالعه شده و شباهت میان جدایه‌ها بین ۱۰۰-۲۰ درصد بوده است (Chongo *et al.*, 2004). تفاوت و تشابه ژنتیکی در بین ۴۷ جدایه از کشورهای هند، آمریکا، پاکستان و سوریه بررسی شده و همه جدایه‌ها از کشور آمریکا با ضریب تشابه ۵۵/۰ شباهت بیشتری به جدایه‌های پاکستانی در مقایسه با دیگر کشورها داشتند. جدایه‌های پاکستان با ضریب تشابه ۴۹/۰ نسبت به جدایه‌های هندی بوده‌اند و جدایه‌های سوریه با ضریب تشابه ۳۳/۰ نسبت به جدایه‌های هندی بوده‌اند (Sattar, 1933). در سوریه هم تنوع ژنتیکی زیادی ($H=0/7$) در میان ۵۳ جدایه قارچ *A. rabiei* گزارش شده است (Udupa *et al.*, 1998). در تونس روی ۴۰ جدایه نماینده از ۵ منطقه برای بررسی تنوع ژنتیکی مطالعه شد و تنوع ژنتیکی زیادی در میان زیرجمعیت‌ها مشاهده گردیده است (Rhaïem *et al.*, 2008). در ترکیه تنوع ژنتیکی مطالعه شد و شباهت بین جدایه‌ها ۱۰۰-۳۷ درصد گزارش شده است (Bayraktar *et al.*, 2002). به‌طور کلی، نتایج این بررسی نشان داد که تنوع ژنتیکی *A. rabiei* در استان لرستان زیاد است. بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های این قارچ در استان‌های ایلام و کرمانشاه نشان داده است که بین جدایه‌های این مناطق تنوع ژنتیکی زیادی وجود دارد (Nourollahi *et al.*, 2011). این دلیلی بر تنوع بسیار زیاد این بیمارگر در کشور است که باید عوامل مؤثر در ایجاد و گسترش آن بررسی شود، هر چند جهش و تولیدمثل جنسی از عمده‌ترین عوامل تأثیرگذار در ایجاد تنوع گزارش شده است (Morjane *et al.*, 1994; Reddy & Kabbabeh, 1985). با توجه به کنترل نسبی بیماری توسط قارچ‌کش‌ها، به علت بالا بودن هزینه‌های کنترل شیمیایی این روش مقرون‌به‌صرفه نیست (Chongo *et al.*, 2011).

استفاده از ارقام مقاوم یکی از بهترین و مطمئن‌ترین راه‌های کنترل بیماری معرفی شده است (Singh *et al.*, 1992). اگرچه این مقاومت با توجه به تنوع نسبتاً زیاد قارچ در قدرت بیماری‌زایی، چندان بادوام نیست و طی چند سال شکسته می‌شود (Peever 2004). تعیین تیپ‌های بیماری‌زای مربوط به جدایه‌های هر منطقه با استفاده از میزبان‌های افتراقی یکی از مهم‌ترین برنامه‌ها در مطالعات اصلاح نباتات و تولید گیاهان مقاوم به این بیماری است (Türkkan & Dolar, 2009). با توجه به کاربرد ارقام اصلاحی با مقاومت نسبتاً زیاد، به نظر می‌رسد فشارهای میزبان مقاوم از جمله عوامل مهم است که در تنوع‌پذیری جمعیت بیمارگر نقش دارد که با استفاده از ارقام با مقاومت نسبی تا اندازه‌ای می‌توان با این مشکل برخورد کرد. در کشورهای خارجی به دلیل اصلاح، معرفی و کشت ارقام مقاوم به‌طور مستمر تنوع این بیمارگر تا حد زیادی کنترل شده است (Hamza *et al.*, 1998; Udupa *et al.*, 2000). در کشور ایران نیز با توجه به اهمیت استفاده از ارقام مقاوم در جهت کاهش میزان خسارت ناشی از بیماری‌های گیاهی مختلف، مؤسسات تحقیقاتی مختلفی نظیر مؤسسه دیم کشور تحقیقات نسبتاً جامعی در معرفی ارقام مقاوم انجام داده‌اند و هر ساله محصولات اصلاح‌شده خود را در خدمت کشاورزان قرار می‌دهند. با توجه به تنوع جدایه‌های عامل بیماری در مناطق مختلف خودکاری کشور، توصیه می‌شود اصلاح ارقام در محل‌های بومی کاشت نخود و در شرایط محیطی هر استان صورت بگیرد تا خطر شکسته شدن مقاومت به قارچ کاهش یابد. با توجه به فاصله نزدیک شهرستان‌های استان لرستان به یکدیگر، وجود تنوع زیاد جدایه می‌تواند در تولید و نحوه استفاده از ارقام مقاوم نخود در نظر گرفته شود. وجود تنوع زیاد باعث ایجاد پاتوتیپ‌ها و نژادهای مختلف قارچ خواهد شد که همواره تهدیدی برای ارقام مقاوم مورد استفاده است. تعیین نژادها و پاتوتیپ‌های جمعیت قارچ در مناطق مختلف کشت نخود در این استان و استان‌های مجاور می‌تواند شناخت جامعی از مشخصات ژنتیکی و بیماری‌زایی قارچ در خدمت محققان اصلاح نباتات قرار دهد و امکان تولید ارقام

این بیماری را دچار مشکل کند. تنوع ژنتیکی قارچ *A. rabiei* در مناطق مختلف جهان گزارش شده است و سطوح مختلفی از تنوع را از خود نشان داده‌اند. تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ *A. rabiei* در میان ۳۷ جدایه از هند و ۳۷ جدایه از ۱۵ کشور جهان با استفاده از نشانگر SSR مطالعه شده است که ۲۶ آلل در جهان و ۱۵ آلل در هند در جایگاه ریزماهورای ARMS1 شناسایی شده است (Barve *et al.*, 2004). تنوع ژنتیکی *A. rabiei* هم در کانادا مطالعه شده و شباهت میان جدایه‌ها بین ۱۰۰-۲۰ درصد بوده است (Chongo *et al.*, 2004). تفاوت و تشابه ژنتیکی در بین ۴۷ جدایه از کشورهای هند، آمریکا، پاکستان و سوریه بررسی شده و همه جدایه‌ها از کشور آمریکا با ضریب تشابه ۵۵/۰ شباهت بیشتری به جدایه‌های پاکستانی در مقایسه با دیگر کشورها داشتند. جدایه‌های پاکستان با ضریب تشابه ۴۹/۰ نسبت به جدایه‌های هندی بوده‌اند و جدایه‌های سوریه با ضریب تشابه ۳۳/۰ نسبت به جدایه‌های هندی بوده‌اند (Sattar, 1933). در سوریه هم تنوع ژنتیکی زیادی ($H=0/7$) در میان ۵۳ جدایه قارچ *A. rabiei* گزارش شده است (Udupa *et al.*, 1998). در تونس روی ۴۰ جدایه نماینده از ۵ منطقه برای بررسی تنوع ژنتیکی مطالعه شد و تنوع ژنتیکی زیادی در میان زیرجمعیت‌ها مشاهده گردیده است (Rhaïem *et al.*, 2008). در ترکیه تنوع ژنتیکی مطالعه شد و شباهت بین جدایه‌ها ۱۰۰-۳۷ درصد گزارش شده است (Bayraktar *et al.*, 2002). به‌طور کلی، نتایج این بررسی نشان داد که تنوع ژنتیکی *A. rabiei* در استان لرستان زیاد است. بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های این قارچ در استان‌های ایلام و کرمانشاه نشان داده است که بین جدایه‌های این مناطق تنوع ژنتیکی زیادی وجود دارد (Nourollahi *et al.*, 2011). این دلیلی بر تنوع بسیار زیاد این بیمارگر در کشور است که باید عوامل مؤثر در ایجاد و گسترش آن بررسی شود، هر چند جهش و تولیدمثل جنسی از عمده‌ترین عوامل تأثیرگذار در ایجاد تنوع گزارش شده است (Morjane *et al.*, 1994; Reddy & Kabbabeh, 1985). با توجه به کنترل نسبی بیماری توسط قارچ‌کش‌ها، به علت بالا بودن هزینه‌های کنترل شیمیایی این روش مقرون‌به‌صرفه نیست (Chongo *et al.*, 2011).

همکاری صمیمانه آقای دکتر صادق‌زاده، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات دیم کشور به خاطر در اختیار گذاشتن بذور افتراقی نخود کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از سرکار خانم دکتر سیده ساناز رمضانپور برای آنالیز مولکولی داده‌ها تقدیر و تشکر می‌شود.

نخود اصلاحی با مقاومت نسبی به پاتوتیپ‌ها را فراهم کند.

سپاسگزاری

از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران به دلیل در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی و گلخانه تحقیقاتی و از

REFERENCES

1. Barve, M. P., Santra, D. K., Ranjekae, P. K. & Gupta, V. S. (2004). Genetic diversity analysis of a world-wide collection of *Ascochyta rabiei* isolates using sequence tagged microsatellite markers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 735-741.
2. Bayraktar, H., Babaliog, I., Deirci, F., Dolar, F.S. & Maden, S. (2002). Distribution of *Ascochyta* blight in some of the important chickpea grown provinces of Turkey. *Turkish Phytopathology*.
3. Bouznad, Z., Corbiri, R. & Spir, D. (1997). Protein and isozyme analysis of *Ascochyta* species of food legumes using the isoelectric focusing method. *Phytopathology*.
4. Chongo, G., Gossen, B., Buchwaldt, L., Adhikari, T. & Rimmer, S. (2004). Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. *Plant Disease Journal*, 88, 4-10.
5. Geistlinger, J., Weising, K., Winter, P. & Kahl, G. (2000). Locus-specific microsatellite markers for the fungal chickpea pathogen *Didymella rabiei* (anamorph) *Ascochyta rabiei*. *Molecular Ecology*, 9, 1939-1941.
6. Gupta, P. & Varshney, R. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113, 163-185.
7. Hamza, S., Samir, S., Rebai, A., Salah, R., Kahl, G. & Moncef, H. (2000). Pathotype variation of the representative genotypes of *Ascochyta rabiei* in the Beja region. *Journal of Plant Pathology*, 82, 8-23.
8. Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J. & Schuster, S. C. (2007). Megan analysis of metagenomic data. *Genome Research*, 17, 377-386
9. Kaiser, W. J. (1997). Inter-and intranational spread of ascochyta pathogens of chickpea, faba bean, and lentil. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19, 215-224.
10. Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. & Vilgalys, R. (1993). Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2274-2280.
11. Morjane, H., Geistlinger, J., Harrabi, M., Weising, K. & Kahl, G. (1994). Oligonucleotide fingerprinting detects genetic diversity among *Ascochyta rabiei* isolates from a single chickpea field in Tunisia. *Current Genetics*, 26, 191-197.
12. Navase-Cortes, J. A., Trapero-Casas, A. & Jimenz-Diaz, R. (1995). Survival of *Didymella rabiei* in chickpea straw in Spain. *Plant Pathology*, 44, 332-339.
13. Nourollahi, K., Javannikkhah, M., Naghavi, M. R., Lichtenzveig, J., Okhovat, S. M., Oliver, R. P. & Ellwood, S. R. (2011). Genetic diversity and population structure of *Ascochyta rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces using MAT and SSR markers. *Mycological Progress*, 10, 1-7.
14. Pande, S., Siddique, K., Kishore, G., Bayaa, B., Gaur, P., Gowda, C., Bretag, T. & Crouch, J. (2005). *Ascochyta* blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56, 317-332.
15. Phan, H., Ford, R. & Taylor, P. (2003). Mapping the mating type locus of *Ascochyta rabiei*, the causal agent of ascochyta blight of chickpea. *Molecular Plant Pathology*, 4, 373-381.
16. Porta-Poglia, A., Joantino, A., Crino, P., Angelini, R. & Venora, G. (1997). *Ascochyta* blight of chickpea present status and prospects Pakistan. *Phytopathology*, 9, 9-15.
17. Reddy, M. & Kabbabeh, S. (1985). Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. in Syria and Lebanon. *Phytopathologia Mediterranea*, 24, 265-266.
18. Rhaiem, A., Cherif, M., Peever, T. & Dyer, P. (2008). Population structure and mating system of *Ascochyta rabiei* in Tunisia: evidence for the recent introduction of mating type 2. *Plant Pathology*, 57, 540-551.
19. Santra, D. K., Singh, G., Kaiser, W. J., Gupta, V. S., Rangeekar, P. K. & Muehbauer, F. J. (2001). Molecular analysis of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the pathogen of *Ascochyta* blight in chickpea. *Theoretical Applied Genetic*, 102, 676-682.

20. Sattar, A. (1933). On the occurrence, perpetuation and control of gram (*Cicer arietinum* L.) blight caused by *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse, with special reference to Indian conditions. *Annals of Applied Biology*, 20, 612-632.
21. Singh, K. B., Hawtin, G. C., Nene, Y. L. & Reddy, M.V. (1981). Resistance in chickpeas to *Ascochyta rabiei*. *Plant Disease*, 65, 586-587.
22. Taran, B., Warkentin, T. D., Tulla, A. & Vandenberg, A. (2007). Genetic mapping of *Ascochyta* blight resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using a simple sequence repeat linkage map. *Genome*, 50, 26-34.
23. Tekeoglu, M., Rajesh, P. & Muehlbauer, F. (2002). Integration of sequence tagged microsatellite sites to the chickpea genetic map. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 105, 847-854.
24. Thomas, M. R. & Scoll, N. S. (1994). Sequence-tagged site markers for microsatellite a simplified technique rapidly flanking sequence. *Plant Disease Molecular Biology Reporter*, 12, 58-64.
25. Udupa, S., Weigand, F., Saxena, M. & Kahl, G. (1998). Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the *ascochyta* blight pathogen of chickpea. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 97, 299-307.
26. Weising, K., Kaemmer, D., Epplen, J.T., Weigand, F., Saxena, M. & Kahl, G. (1991). DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligodeoxynucleotides. *Current Genetics*, 19, 483-489.