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

فرهاد شکوهی‌فر[۱]، عبدالرضا باقری[۲] و ماهرخ فلاحتی رستگار[۳]


## 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 باندی DNA جدایه‌ها تهیه شد، و بر این اساس تنوع ژنتیکی و فاصلهٔ ژنتیکی بین جدایه‌ها محاسبه و روابط خویشاوندی آنها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای تعیین گردید.***

***نتایج نشان داد که روش RAPD ابزاری 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 فاصلهٔ 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




[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]

## 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 دهۀ ٦٠ 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، ٦ و ۹) یا قدرت بیماری‌زایی (۲، ۱۰ و ١٦) 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 کمّی، 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، ٤ و ۲۰). از جمله مارکرهایی که تا کنون به کار گرفته شده است می‌توان به آیزوزایم‌ها (Isozymes)، RFLPs (Restriction fragment length polymorphism)، RAPDs (Random amplified polymorphism) و 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 (١٦) 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، ١٥٦ 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 وسیلۀ ردی و کبابه (١٦) و نیز 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



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]

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 میسلیوم و استخراج DNA

بیست و شش جدایه انتخاب شده در ویال‌های حاوی محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth) 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 Trimetyl Ammonium Bromide) اصلاح شده استخراج شد (۱۸). در این روش حدود ۱-۲ گرم بافت میسلیوم قارچ همراه با ازت مایع، با استفاده از هاون به خوبی پودر شد. حدود یک گرم پودر حاصل را به لولهٔ 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. لولهٔ 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 لولهٔ جدید منتقل شد، و تا هنگام تعیین کمیت و کیفیت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

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



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]

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

| شماره جدایه | محل جمع‌آوری | شماره جدایه | محل جمع‌آوری |
|---|---|---|---|
| ۱ | کرمانشاه | ۱٤ | همدان |
| ۲ | کرمانشاه | ۱۵ | همدان |
| ۳ | لرستان | ۱٦ | تهران |
| ٤ | لرستان | ۱۷ | خراسان |
| ۵ | فارس | ۱۸ | کردستان |
| ٦ | فارس | ۱۹ | زنجان |
| ۷ | ایلام | ۲۰ | قزوین |
| ۸ | ایلام | ۲۱ | گلستان |
| ۹ | ایلام | ۲۲ | گلستان |
| ۱۰ | تبریز | ۲۳ | اردبیل |
| ۱۱ | مرکزی | ۲٤ | ارومیه |
| ۱۲ | مرکزی | ۲۵ | ارومیه |
| ۱۳ | همدان | ۲٦ | مازندران |

تعیین میزان جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج‌های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، خلوص DNA به دست آمده با محاسبه نسبت جذب در طول موج ۲٦۰ به ۲۸۰ نانومتر محاسبه، و غلظت هر نمونه با در نظر گرفتن غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ازای هر واحد OD (Optical density) در طول موج ۲٦۰ 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 ۰/۰۰۱ درصد، KCl ۵۰ میلی‌مولار)، ۲۰۰ میکرومول مخلوط dNTPs (سینا ژن)، ۱۵ پیکومول آغازگر، ۱۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، یک واحد آنزیم تک پلیمراز (Taq polymerize) (سینا ژن) و یک قطره روغن معدنی (سیگما) برای جلوگیری از تبخیر در دستگاه ترموسایکلر (Maxi-Gene, Sturt Scientific Co., UK) با برنامه دمایی دو دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد و ٤۰ چرخه با یک دقیقه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۳٦ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، و مرحله تکثیر نهایی 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٪ تزریق 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 زیر نور UV از آن عکس گرفته شد. مکان‌های تکثیر شده به وسیلهٔ هر آغازگر به صورت باندهایی در شکل آشکار شد.

**ثبت داده‌ها**

شکل‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار LabWorks™ V.3 تجزیه و تحلیل شده، تنها باندهای قوی انتخاب و به



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]

جدول ۲. نام و توالی ۱۲ آغازگر[۱] 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-CCCGGCATAA |
| ٤ | OPJ-10 | 5-AAGCCCGAGG |
| ٥ | OPJ-15 | 5-TGTAGCAGGG |
| ٦ | OPJ-18 | 5-TGGTCGCAGA |
| ۷ | OPK-09 | 5-CCCTACCGAC |
| ۸ | OPK-12 | 5-TGGCCCTCAC |
| ۹ | OPK-15 | 5-CTCCTGCCAA |
| ۱۰ | OPL-05 | 5-ACGCAGGCAC |
| ۱۱ | OPL-16 | 5-AGGTTGCAGG |
| ۱۲ | OPM-02 | 5-ACAACGCCTC |

۱. Operon Technologies (Alameda, California)

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.

**فاصلهٔ ژنتیکی (Genetic distance) و تنوع ژنتیکی (Genetic diversity)**

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

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

$d_{ij}$ فاصله ژنتیکی میان دو فرد i و j 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 وزنی) در برنامه آماری Statestica 5.5 تجزیه خوشه‌ای شد، و نمودار روابط خویشاوندی 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 زیر، فاصلهٔ مورد نظر تعیین و نمودار روابط خویشاوندی در این فاصله گروه‌بندی شد.

$\overline{X} - S \cdot t_{\alpha=10\%}$ = فاصله معادل ۱۰ درصد نداشتن تشابه

$\overline{X}$ 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 نئی (۱٤) محاسبه شد.

$$H = \left[n/(n-1)\right]\left[1 - \sum X_i^2\right]$$

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 (جدول 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 ٤ تا ۱۳ منطقه از DNA تکثیر



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]

**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 پلی‌مورف | شمار ژنوتیپ جدا شده | شاخص تنوع ژنتیکی |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | OPI-01 | ۱۳ | ٦ | ۱۱ | ۰/۹۰ |
| ۲ | OPJ-01 | ۱۲ | ۲ | ٤ | ۰/۵۵ |
| ۳ | OPJ-15 | ۹ | ۲ | ۳ | ۰/٦۰ |
| ٤ | OPJ-18 | ۱۲ | ۲ | ۳ | ۰/٦۳ |
| ۵ | OPK-09 | ۵ | ۱ | ۲ | ۰/۳۷ |
| ٦ | OPK-12 | ۱۲ | ۳ | ۵ | ۰/۸۰ |
| ۷ | OPK-15 | ٦ | ٤ | ۱۰ | ۰/۸۸ |
| ۸ | OPL-05 | ٤ | ۲ | ٤ | ۰/۷۱ |
| ۹ | OPL-16 | ۱۱ | ٤ | ۷ | ۰/۸۳ |
| ۱۰ | OPM-02 | ۹ | ٤ | ۷ | ۰/۸۲ |

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

بر پایهٔ شمار باند پلی‌مورف تولید شده به وسیلهٔ هر آغازگر، بین ۲ تا ٦٤ 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 پلی‌مورف بیشتری را تکثیر کرد، ولی آغازگر OPK-15 در تشخیص ژنوتیپ بازده بیشتری از خود نشان داد (شکل ۱)، زیرا با تولید چهار باند پلی‌مورف 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 منطقهٔ 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، 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 فاصلهٔ ژنتیکی

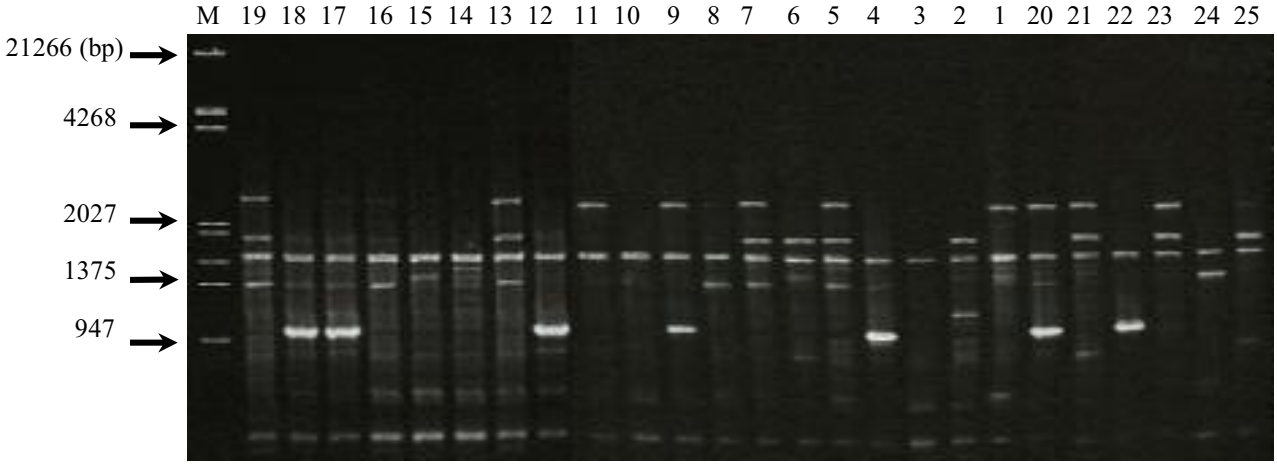
شاخص تنوع محاسبه شده بر اساس داده‌های به دست آمده از هر آغازگر بین ۰/۳۷ تا ۰/۹ متغیر بود (جدول ۳). کمترین شاخص به آغازگر OPK-09 مربوط بود (شکل ۲)، در حالی که بر اساس آغازگرهای OPI-01 و OPK-15 بیشترین ضریب تنوع ژنتیکی محاسبه شد. شاخص تنوع بر اساس داده‌های به دست آمده از کل آغازگرها حدود ۰/۹۸ برآورد شد، 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

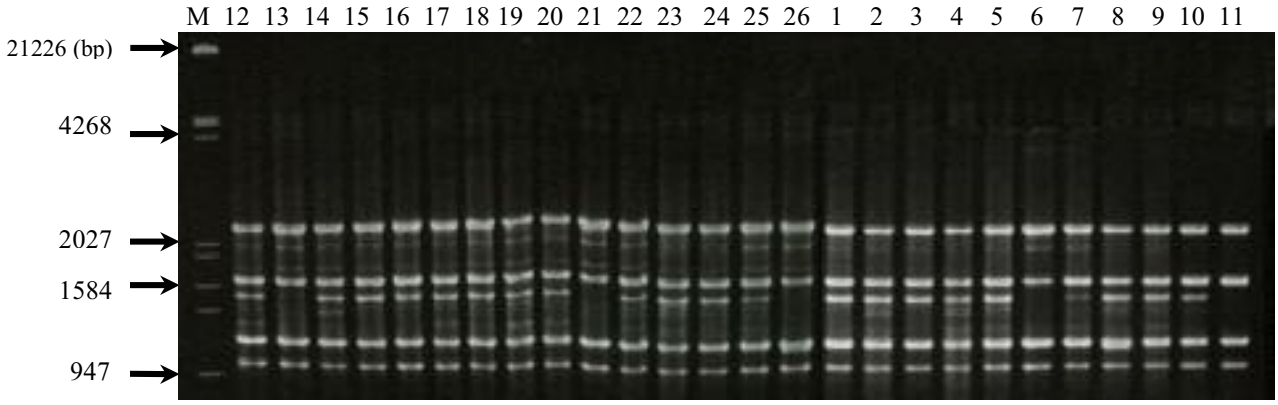


[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]




**شکل ۱. الگوی باندی 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 (فاژ لامبدا برش خورده با HindIII و EcoRI) است.**




**شکل ۲. الگوی باندی 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 (فاژ لامبدا برش خورده با HindIII وEcoRI) است.**

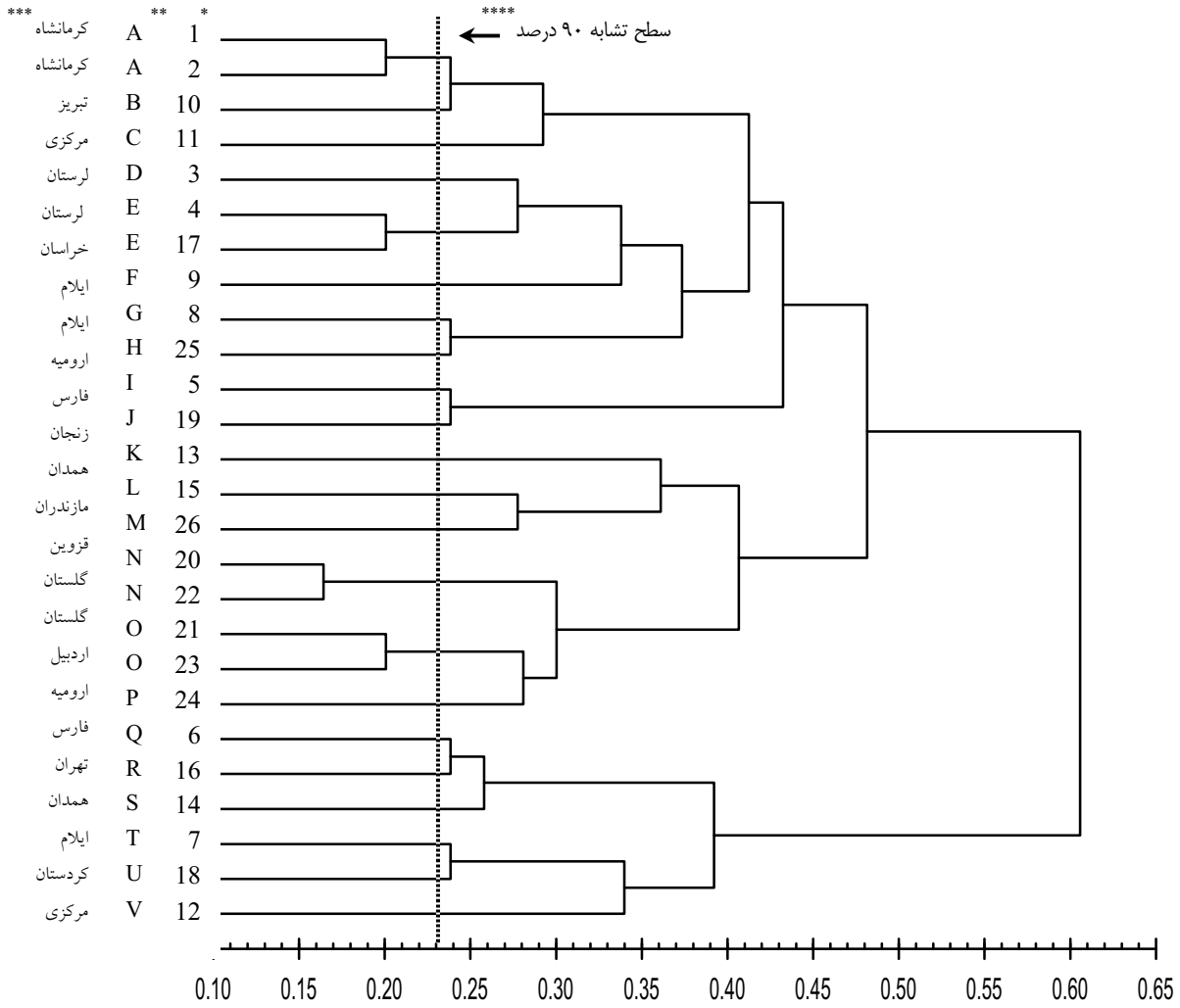
استفاده می‌شود، و بدین وسیله تنوع جمعیت بیمارگر تا حد زیادی کنترل می‌گردد. زیرا با کشت ارقام مقاوم در یک منطقه تنها ژنوتیپ‌های محدودی از بیمارگر قادر به ایجاد بیماری بوده و در تشکیل جمعیت بیمارگر در سال‌های بعد مؤثر خواهند بود، و بدین صورت تنوع موجود در جمعیت بیمارگر کاهش می‌یابد. ولی در ایران، معمولاً خرید بذر نخود مرسوم نیست، و کشاورزان بیشتر بذور 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 بتوان تنوع موجود در جمعیت بیمارگر را کاهش داد و با کشت متناوب ارقام مقاوم مختلف در یک منطقه تنوع آن را کنترل نمود.

فاصلهٔ 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 فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۶۱ شایان توجه است، زیرا حداکثر فاصلهٔ گزارش شده در مناطق دیگر در حدود ۰/۳۹ بوده است (۱۸). وجود این فاصلهٔ ژنتیکی بسیار در



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]




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

*** : شمارهٔ جدایه‌ها**

**** : گروه‌های ژنوتیپی**

***** : محل جمع‌آوری جدایه‌ها**

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

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

روابط خویشاوندی جدایه‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است. در فاصلهٔ 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 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)، ٤ و ۱۷ (از خراسان و لرستان) و ۲۱ و ۲۳ (از گلستان و اردبیل) نسبت به دیگر نمونه‌ها در فاصلهٔ کمتری از یکدیگر قرار داشته و در فاصلهٔ ۰/۲۰ دومین سطح گروه‌بندی را تشکیل دادند. همان گونه که در شکل ٤ دیده می‌شود بین منشأ



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]




**شکل ٤. 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.**

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.

به 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 پژوهشگران موتاسیون و تولید مثل جنسی را از عمده‌ترین عوامل تأثیرگذار در ایجاد تنوع دانسته‌اند (۱۲ و ۱٦)، ولی به نظر می‌رسد افزون بر موارد فوق، نبود فشارهای میزبان 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، تنوع این بیمارگر تا حد زیادی کنترل شده است.



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]

## سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، که امکانات اجرایی این پژوهش را فراهم کرده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع مورد استفاده

۱. باقری، ع.، ا. نظامی و م. سلطانی. ۱۳۷۹. *اصلاح حبوبات سرما دوست برای تحمل به تنش‌ها*. انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

۲. شکوهی‌فر، ف.، ع. باقری، م. رستگار و س. ملک‌زاده. ۱۳۸۰. تعیین تنوع بیماری‌زایی در قارچ عامل بیماری برق‌زدگی نخود [*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. اجونز. ۱۳۷۱. استفاده از مارکرهای مولکولی در اصلاح نباتات. چکیده مقالات کلیدی اولین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج.

٤. 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. نورالهی، خ.، م. فلاحتی رستگار و ب. جعفرپور. ۱۳۷۹. تشخیص نژادهای فیزیولوژیک *Ascochyta rabiei*، عامل بیماری برق‌زدگی نخود، در چند منطقه از کشور. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ٤(۱): ۱۲۷-۱۳٦.

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 bligth 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.



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]

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. Kubeik, 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.

[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1382.7.2.16.7 ]