

بررسی سازگاری میسلیومی جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* عامل RAPD پوسیدگی ساقه کلزا و ارزیابی تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از نشانگر

Assessment of mycelial compatibility of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates, causal agent of canola stem white rot and evaluation of their genetic diversity using RAPD marker

فربیا کریمیان^۱، سعید نصرالهزاد^۱، کامران رهنما^۱، میثم تقی‌نسب^۱، اسلامه احمدی‌خواه^۲

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران و مریبی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استادیار، دانشگاه شهید بهشتی تهران

Karimian F¹, Nasrollahnejad S^{*1}, Rahnama K¹, Taghinasab M¹, Ahmadikha A²

1. MSc Student, Associate Professors and Instructor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

2. Assistant Professor, Shahid Beheshti University

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

(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳۰)

چکیده

پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کلزا در بسیاری از مناطق تولید این گیاه روغنی و با ارزش است. میزان بوته‌های بیمار در بعضی از مزارع تا ۸۰ درصد و میزان خسارت ناشی از آن، گاهی در مزارع با آزادگی شدید تا ۵۰ درصد عملکرد محصول نیز می‌رسد. این بیماری که عامل آن *Sclerotinia sclerotiorum* می‌باشد، بر روی کلزا، آفتابگردان و سایر گیاهان از قبیل کلم، کاهو، توتون، شب بو و تعدادی از گیاهان دیگر نیز باعث پوسیدگی ساقه و طوفه می‌شود. قارچ عامل بیماری، یکی از پلی‌فائز ترین پاتوژن‌های گیاهی بوده و دارای دامنه میزانی وسیعی است. در این تحقیق، ۱۹ گروه سازگار میسلیومی از ۳۳ نمونه عامل بیماری بر روی کلزا، کلم و آفتابگردان از مناطق مختلف استان در سال زراعی ۱۳۸۷-۸۸ تلاقی انجام شده ایزوله‌های مختلف قارچ S. *sclerotiorum* ۲۱ تلاقي (۱۲/۳ درصد) دارای سازگاری و ۱۵۰ تلاقي (۸۷/۷ درصد) دارای ناسازگاری میسلیومی بودند. هم‌چنین برای بررسی تنوع مولکولی قرار گرفتند که در نتیجه از ۱۷۱ تلاقي انجام شده ایزوله‌های مختلف قارچ PCR در واکنش استفاده شد که ۱۳۶ نشانگر چندشکل پس از الکتروفورز در ڈل آگارز به دست آمد. تجزیه داده‌های مولکولی با نرم-افزار POPGENE32 نشان داد که در بین جدایه‌های مورد بررسی، تنوع ژنتیکی نسبتاً بالای وجود دارد. به علاوه مشخص شد که شباهت‌ها و فواصل ژنتیکی، با دور یا نزدیک بودن فاصله مکانی نمونه‌های جمع‌آوری شده ارتباط ندارد. با توجه به آزمون تعادل هارדי-وابنرگ، می‌توان گفت جمعیت مورد مطالعه در تمام مکان‌های ژئی مورد بررسی در حال تعادل بوده است؛ ولت این امر را می‌توان جوان بودن زراعت کلزا در استان گلستان، میزان‌های فراوان این قارچ (از جمله علف‌های هرز) و یا شاید تنوع کم ارقام تحت کشت کلزا در منطقه طی چند سال اخیر ذکر کرد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی

قارچ اسکلروتینیا

کلزا

گروه‌های سازگار میسلیومی

RAPD

مقدمه

اندیمشک)، گوجه‌فرنگی (زنجان)، توت (گیلان) و بادمجان (زنجان) گزارش شده است (Ershad 1995). سیستم سازگاری - ناسازگاری میسلیومی روش ماکروسکوپی بوده که از روش خودی- غیر خودی و خودی- خودی^۱ جدایه‌ها استفاده می‌کند، که در حالت سازگاری دو جدایه ادغام شده و تشکیل یک پرگنه را می‌دهند. اما در حالت ناسازگار پرگنه‌های هر جدایه با تشکیل یک سری از سلول‌های مرده بین دو پرگنه قابل تفکیک هستند. این روش در قارچ‌ها معمول بوده و علاوه بر S. sclerotiorum در مطالعات قارچ‌های دیگر از جمله *Cryphonectria parasitica* و عامل بیماری مرگ نارون (Ophiostoma ulmi) به عنوان روش موثر برای تشخیص و ارزیابی تنوع درون گونه‌ای در جمیعت عامل بیماری‌زا شناسایی شده است (Kull et al. 2004). با توجه به این که تشخیص هتروژنی گروه‌های درون گونه‌ای قارچ بر اساس فاکتورهای فنوتیپی گروه‌ها همچون بیماری‌زا و یا پراکنش جغرافیایی محدود می‌باشد، بنابراین وجود معیارهای مستقلی برای تفکیک و طبقه‌بندی هتروژنی درون گونه‌ای ضروری است (Kohen et al. 1990; Kohen et al. 1991). در سال ۱۹۹۹ تحقیقی بر روی مقایسه ژنتیکی انواع اسکلروتینیا با استفاده از نشانگرهای مولکولی RFLP و RAPD و آنالیز DNA ریبوزومی بر روی نمونه‌های جدایه عامل بیماری‌زا آفتابگردان در استرالیا و کانادا انجام شد (Letourneau 1979) که نشان داد بین جدایه‌های مختلف تنوع ژنتیکی وجود دارد. همچنین در سال ۱۳۸۴، در ایران نیز تحقیقی بر روی تنوع ژنتیکی قارچ اسکلروتینیا اسکلروشیوروم انجام شد که با استفاده از نشانگرهای مولکولی RFLP و RFLP-PCR، نشان داده شد که در بین برخی از جدایه‌های عامل قارچ اسکلروتینیا اسکلروشیوروم بر روی کلزا تنوع وجود دارد (Karimi et al. 2010). در سال ۱۹۹۶ تحقیقی بر روی مقایسه ژنتیکی عامل قارچی اسکلروتینیا اسکلروشیوروم جدایه از مزارع نیوزیلند و آمریکا انجام شد. هدف از اجرای این تحقیق امکان استفاده از این قارچ برای کنترل بیولوژیکی علف‌های هرز در نیوزیلند بود و از نشانگرهای مولکولی RAPD و آنالیز DNA ریبوزومی جهت تعیین تنوع استفاده شد (Noonan et al. 1996).

^۱ Self-nonself and self-self

بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه ناشی از قارچ S. sclerotiorum (lib) de bary یکی از عوامل بیماری‌زای گیاهی با دامنه و توزیع وسیع می‌باشد. اولین گزارش این بیماری در کلزا و خردل مربوط به کشور هند می‌باشد. سپس بارها به صورت شدید از کشورهای دانمارک، فنلاند، برزیل، چین، هند، کانادا، سوئد، آلمان، فرانسه، انگلستان و ایتالیا گزارش شده است (Boland and Hall 1994). میزان بوته‌های بیمار در بعضی از مزارع کلزا تا ۸۰ درصد و میزان خسارت ناشی از آن گاهی در مزارع با آلدگی Chang and شدید تا ۵۰ درصد عملکرد محصول می‌باشد (Kozub 1994). این بیماری با توجه به علائمی که ایجاد می‌کند به نامهای مختلف از قبیل بلاست سفید، پوسیدگی سفید، پوسیدگی ساقه، بلاست ساقه، شکستگی ساقه، شانکر کلزا نامیده شده است. عموماً در شرایط طبیعی بیشتر آلدگی ساقه مشاهده می‌شود، هرچند تمام اندام‌های هوایی گیاه نیز ممکن است مورد حمله قرار گیرند. علائم روی ساقه به صورت لکه‌های کشیده و آب‌سوخته ظاهر می‌شود که بعداً میسلیوم پنبه مانند قارچ روی آنها را می‌پوشاند. علائمی چون کلروزیس و پژمردگی برگ‌ها و نکروز پایه ساقه‌ها نیز از علائم این بیماری است که در مرحله پیش روی بیماری، ساقه‌ها سفید شده و سرانجام می‌میرند (Gaetn and Madina 2005). ساقه آلدده ممکن است شکافته شود، در این صورت تعداد زیادی سختینه منظم، کروی سفید خاکستری تا سیاه در داخل بافت ساقه ایجاد می‌شود که از علائم بارز این عامل بیمارگر می‌باشد. در هوای مرتکب این سختینه‌ها ممکن است بر روی ساقه و یا غلاف‌ها نیز پدید آیند (Purdy 1985; Kolte 1975).

مهم‌ترین محصولات مورد حمله این قارچ شامل سویا، آفتابگردان، کلزا، بادام‌زمینی، توتون و سبزیجاتی چون کاهو، لوبيا، هویج، سیب‌زمینی، کلم، کرفس، کدو، هندوانه، یونجه، شبدر و دیگر بقولات علفی و تعدادی گیاهان زیستی می‌باشند. این قارچ در ایران علاوه بر کلزا از روی نخود و توت فرنگی (دزفول)، آفتابگردان (مازندران، کردستان، آذربایجان)، کاهو (اهواز و

توالی DNA نیست و تحت تاثیر کیفیت DNA قرار نمی‌گیرد (Jones et al. 1999; Virk et al. 2000). این روش به مواد رادیواکتیو نیاز ندارد و نسبتاً ساده است (Tingey et al. 1992; Weeden et al. 1993). مزیت مهم تکنیک RAPD آمکان انجام آزمون همزمان فراوانی چند مکان ژنی و انجام مقایسه کلی ژنوم-ها برای مطالعات مختلف می‌باشد (Ahmadikhah 2008).

قارچ *S. sclerotiorum* برای بیش از ۱۵۰ سال مورد مطالعات مختلف بیولوژیکی، علائم شناسی، بیماری‌زایی و مورفو‌لوژی قرار گرفته است. هر چند این تلاش‌ها اطلاعات زیادی در مورد این قارچ فراهم آورده، ولی در مورد تنوع ژنتیکی، شناسایی و مقایسه سویه‌های آن اطلاعات چندانی در دست نیست. هدف از این تحقیق بررسی سازگاری میسیلیومی و همچنین تفاوت ژنتیکی بین ایزووله‌های گونه قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا (*S. sclerotiorum*) در استان گلستان بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

کلیه نمونه‌ها در این بررسی از اسکلروت و یا ساقه‌های کلزا، آتابگردان و کلم آلوده به بیماری جمع‌آوری شدند که از سال گذشته (۱۳۸۷) و یا سال ۱۳۸۸ از شهرستان‌های مختلف استان گلستان شامل گرگان، گبک، کالله، بندرترکمن، کردکوی، علی‌آباد و مینودشت، آق‌قلاء، آزادشهر، رامیان و بندرگز به دست آمده بودند. نمونه‌ها در دمای 4°C در یخچال نگهداری شدند.

رقم‌های کلزا تحت کشت در سال زراعی ۱۳۸۷-۸۸ شامل هایولا ۴۰۱ و هایولا ۴۲۰ و رقم ۴۸۱۵ بودند [رقم اخیر یکی از ارقام جدید است که در سطح بسیار محدودی در روسنای نصرت‌آباد شهرستان علی‌آباد کشت می‌شود].

کشت و جداسازی

ابتدا نمونه‌ها در محلول ده درصد هیپوکلریت‌سدیم (وایتکس تجاری) به مدت $1/5$ دقیقه غوطه‌ور شده و سپس با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند و برای خشک کردن نمونه‌ها از کاغذ خشک‌کن استریل استفاده شد (عملیات در زیر هود استریل انجام شد). جهت آماده کردن محیط کشت، از پودر ^۱PDA 3%

آنالیز جدایه‌های جمع‌آوری شده گیاه کلزا آلوده در اونتاریو تا شمال آلبرتا کانادا نشان داد که این جدایه‌ها از نظر ژنتیکی هتروژن و با تعدادی کلون قابل تشخیص هستند. این کلون‌ها سبب تفکیک‌ژنتیکی و جداسازی‌ژنوتیپی درون گونه‌ای می‌شود. تفکیک و جداسازی کلون‌ها بر اساس گروه‌های سازگار میسیلیومی و انگشت‌نگاری DNA صورت گرفت و نشان داده شد که همه اعضای یک کلون با هم سازگاری میسیلیومی دارند و با اعضا کلون‌های دیگر ناسازگاری دارند و همچنین انگشت‌نگاری DNA یکسانی دارند (Bardin and Huang 2001).

در گذشته بررسی تنوع ژنتیکی از طریق بررسی صفات مورفو‌لوژیک یا بیوشیمیایی انجام می‌شد. اما، استفاده از ارزیابی فنوتیپی به دلیل تاثیر محیط بر بیان‌ژن ممکن است روش قابل اعتمادی برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی نباشد. در عوض، بررسی امکان ارزیابی مستقیم تنوع ژنتیکی را فراهم می‌کند. از روش‌های گوناگونی برای بررسی DNA در ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده شده است. نوع روش مولکولی مورد استفاده برای اندازه‌گیری فاصله‌های ژنتیکی به میزان تفاوت‌های ژنتیکی در حال ارزیابی بستگی دارد (Ahmadikhah 2008).

یکی از روش‌های آشکارسازی چندشکلی ژنتیکی در گیاهان استفاده از نشانگر RAPD یا چندشکلی حاصل از تکثیر تصادفی Welsh and Mc ; Williams et al. 1990 می‌باشد (Clleland 1990)، این روش مبتنی بر واکنش زنجیره پلیمراز با یک آغازگر تصادفی الیگونوکلئوتیدی به طول ۹ تا ۱۰ باز می‌باشد (Welsh and Mc; Clleland 1990 Williams et al. 1990) آغازگرها دارای $60-80$ درصد باز G/C می‌باشند و دمای اتصال نیز برای آن‌ها تا اندازه‌ای پایین می‌باشد. این روش هم اکنون کاربرد وسیعی در تعیین تنوع ژنتیکی دارد. عموماً آغازگرها با طول $9-10$ نوکلئوتید اجراه تکثیر $3-15$ باند را می‌دهند Weeden et al. 1993; Rus-Kurtkaas et al. 1994; Jones et al. 1999). قطعات DNA تکثیر یافته با روش RAPD در سراسر ژنوم توزیع یافته است و می‌تواند توالی‌های منحصر به فرد و تکراری را شامل شود (Williams et al. 1990). مزیت این روش در سادگی تکنیک و سریع بودن آن می‌باشد که ناشی از توالی آغازگرهای تصادفی است. این روش نیازمند اطلاعات در مورد

^۱ Potato dextrose agar

از PCR Master Mix ۵/۵ میکرولیتر H₂O دیونیزه، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر RAPD (جدول ۱) و ۰/۷۵ میکرولیتر از DNA نمونه (با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) در یک میکروتیوب اضافه شد. پس از قرار دادن میکروتیوبها در دستگاه PCR، دمای اتصال آغازگرها در واکنش PCR به شرح جدول ۱ تنظیم شد.

برای الکتروفورز محصولات PCR، از ژل آگارز یک درصد و بافر UV ۱X TBE استفاده شد. جهت آشکار کردن باندها در زیر اشعه UV از ماده اتیدیوم بروماید به میزان ۰/۵ میکرگرم در میکرولیتر استفاده شد. ولتاژ دستگاه در ۱۰۰ ولت تنظیم شد و به مدت یک ساعت و چهل و پنج دقیقه الکتروفورز شد.

جدول ۱- آغازگرهای RAPD مورد استفاده و برنامه حرارتی PCR با ۳۵ چرخه تکثیر

نام آغازگر	دما اتصال (°C)	توالی آغازگر (۵' به ۳')	چرخه تکثیر
OPC04	۳۰	CCGCATCTAC	
OPB07	۳۵/۳	GGTGACGCAG	
OPA02	۴۲/۴	TGCCGAGCTG	
OPD02	۳۶/۸	GGACCCAACC	
OPC05	۳۸/۸	GATGACCGCC	
OPB03	۳۸/۶	CATCCCCCTG	
OPC10	۳۲	TGTCTGGGTG	
OPC01	۳۵/۸	TTCGAGCCAG	

امتیازدهی به الگوهای باندی و تجزیه داده‌های مولکولی حضور یا عدم حضور هر باند RAPD به ترتیب به صورت یک و صفر امتیازدهی شد. جهت تجزیه داده‌های مولکولی از نرمافزار POPGENE32 (Yeh et al. 1999) استفاده شد. در این نرمافزار، معیارهای متعددی از جمله: تعداد آلل مشاهده شده، تعداد آلل موثر، فراوانی آللی، ضریب تنوع ژنی نئی و شاخص تنوع شانون Nei and Li (1979) مورد بررسی قرار گرفت و جدول ماتریس شbahت‌های جدایه‌های مورد مطالعه، به دست آمد. گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه نئی با روش جفت گروه‌های غیر هموزن

گرم در لیتر) آماده استفاده شد. جهت جلوگیری از آسودگی میکروبی از اسیدلاتیک (۱۵ قطره در لیتر) (Greer and Dilts 1995) و کلرامفینیکل (۱۰۰ میلی لیتر در لیتر) استفاده شد و سپس نمونه‌ها در محیط کشت PDA به طور جداگانه در پتری دیش با قطر ۱۰ سانتی‌متر کشت شد. پس از سه روز، قطعات منظم ۵ میلی‌متری از هر یک از نمونه‌های رشد یافته به پتری دیش‌های حاوی محیط کشت‌های جدید انتقال داده شدند. پس از رشد شیکر در دمای ۲۲°C به مدت چهار روز استفاده شد. در شروع آزمایش برای تشکیل نوک ریسه^۱ تک رشته میسیلیومی از محیط کشت PDA به محیط کشت آب آگار منتقل شد. نمونه‌ها مکررا در محیط کشت PDB جهت تولید میسیلیوم کشت و پس از دو هفته که تمام سطح پلیت را اشغال کرد، به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم جمع‌آوری و بلا فاصله برای استخراج DNA استفاده شد.

بررسی سازگاری در بین جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum*

برای تشخیص سازگاری و یا عدم سازگاری جدایه‌های مختلف قارچ، روی محیط کشت PDA در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری دو نمونه ۴ میلی‌متری از جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum* به فاصله ۸ سانتی‌متر در مقابل هم قرار داده شدند که پس از گذشت ۱۰ روز و رشد میسیلیوم‌ها، جدایه‌هایی که با هم سازگاری داشتند، رشته‌های یکسانی را تشکیل داده و مرزی بین آنها تشکیل نشد. به این گروه از میسیلیوم‌ها گروه‌های سازگار میسیلیومی می‌گویند و میسیلیوم جدایه‌هایی که با هم سازگاری نداشتند، مابین آنها مرزی تشکیل و میسیلیوم‌ها قبل از رسیدن به قلمرو جدایه مقابل به سمت داخل حیطه پس می‌زدند، و یا در محل رسیدن میسیلیوم‌ها جفت می‌شند. به این گروه از میسیلیوم‌ها گروه‌های ناسازگار میسیلیومی می‌گویند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و الکتروفورز استخراج DNA با روش CTAB (Saghai-Marof et al. 1984) انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از کیت شرکت سیناکلون (CinnaClone) استفاده شد. به این منظور، برای تهیه یک واکنش ۱۲/۵ میکرولیتری، ۶/۲۵ میکرولیتر

¹ Potato dextrose broth

² Hyphal tip

جدایه‌های چهل دین و انار آیش و کلاله هیچ‌گونه سازگاری با دیگر جدایه‌ها نشان ندادند و جدایه محمدآباد از میزان کلم کمترین سازگاری را با دیگر جدایه‌ها نشان داد. همچنین جدایه گلیداغ (جمع شده از روی آفتابگردان) با دو جدایه از کلزا (رقم- های ۴۸۱۵ و هایولا ۴۰۱) جمع‌آوری شده از علی‌آباد سازگاری نشان داد، اما با دیگر جدایه‌ها ناسازگاری نشان داد. بیشترین سازگاری مربوط به جدایه‌های جمع‌آوری شده از روی کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (منطقه مینودشت)، کلم (منطقه محمدآباد)، کلزا رقم هایولا ۴۲۰ (مناطق اسبوهمله و فاضل‌آباد)، کلزا رقم هایولا ۴۰۱ و کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (مناطق آزادشهر، بندرترکمن و کردکوی) و همچنین کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (منطقه اسبوهمله) بوده است (جدول ۲).



شکل ۲- بررسی سازگاری رسنه‌ها. عدم سازگاری با تشکیل مرز مشخص در کشت مقابل (راست). عدم سازگاری با تشکیل مرز مشخص در کشت (چپ);

در این تحقیق هفده گروه سازگار میسیلیومی (MCG) از نمونه‌های کلزای آلوهه به عامل بیماری، به همراه یک نمونه از آفتابگردان و یک نمونه از کلم (در مجموع نوزده MCG؛ جدول ۱) با ۱۱ آغازگر RAPD (جدول ۱) مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. در میان این آغازگرها ۸ آغازگر OPC01، OPC03، OPA02، OPC04، OPC02، OPC07، OPD02 و OPC10 الگوی باندی مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند.

اندازه باندهای تشکیل شده بر روی ژل الکتروفورز افقی، بین ۲۷۵ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود که نمونه‌ای از آن در شکل ۳ نشان داده شده است.

¹ تعیین شد. از میانگین فاصله ژنتیکی جهت تعیین خط برش و تشخیص کلاسترها استفاده شد (Malone et al. 2009). آزمون تعادل آللی جمعیت در هر جایگاه آللی (آنالیز تعادل هاردی- واینبرگ) با استفاده از فرمول کای مربع محاسبه شد. میزان اطلاعات چند شکلی هر آغازگر (PIC) از رابطه زیر محاسبه شد:

$$PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$$

که در آن P_{ij} فراوانی آلل آام مربوط به فرد i می‌باشد.

نتایج و بحث

در بررسی سازگاری و ناسازگاری جدایه‌ها، سه نوع متفاوت از سازگاری- ناسازگاری شامل عدم سازگاری نوع یک (تشکیل مرز مشخص)، عدم سازگاری نوع دو (تشکیل مرز شفاف و توده‌های میسیلیومی متفاوت) (شکل ۱) و سازگاری میسیلیومی (همراه با ادغام میسیلیوم‌های بین دو نمونه) (شکل ۲) مشاهده شد. نتایج حاصل از ادغام میسیلیومی بین ۱۹ جدایه در جدول ۲ نشان داده شده است. اصطلاح ادغام میسیلیومی بدین مفهوم است که دو جدایه تشکیل یک پرگنه داده و ناحیه واکنش مشخصی بین دو جدایه دیده نمی‌شود. بررسی‌های انجام شده نشان داد که از ۱۷۱ تلاقي حاصل از کشت دو به دوی میسیلیوم‌های قارچ، غیر از ۲۱ تلاقي خودی که دارای سازگاری میسیلیومی بودند و پرگنه‌ها تمام سطح پتریدیش را می‌پوشاندند، ۱۵۰ تلاقي مربوط به تلاقي غیر خودی بود و ناسازگاری میسیلیومی نشان دادند.



شکل ۱- نمونه‌های کشت قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* بر روی محیط کشت PDA پس از ۷ روز.

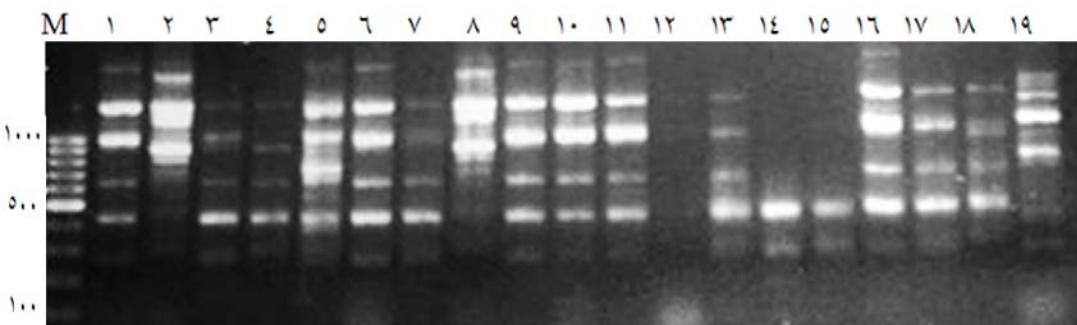
¹ Unweighted pair grouped method by arithmetic average

جدول ۲- نتیجه تلاقی میسیلیومی بین جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* از مناطق و میزان‌های مختلف در مزارع استان گلستان.

	۱B	کلم	چهل نیم(۲)	۴۸۱۵	اسبو محله (۱)	F	Ka	۸	۸	۷	۶	۵	۴	۳	>	<	=	≥	≤
۱	۱B																		
۲	کلم	Ø																	
۳	چهلدین(۲)	Ø	Ø																
۴	4815	Ø	Ø	Ø															
۵	اسبو محله(۱)	Ø	Ø	Ø	Ø														
۶	F	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø												
۷	Ka	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø												
۸	8	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø										
۹	آفتابگردان	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø									
۱۰	A	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø								
۱۱	سرکلاتنه ۴۲۰	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø							
۱۲	اسبو محله	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø						
۱۳	*	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					
۱۴	14	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø				
۱۵	3	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
۱۶	16	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
۱۷	علی‌آباد	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
۱۸	اسبو محله ۴۰۱	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
۱۹	ناناریش	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			

Ø نشان دهنده سازگاری میسیلیومی و Ø نشان دهنده عدم سازگاری میسیلیومی می‌باشد.

شکل ۳- الگوی بانده‌ی ۱۹ جدایه با نشانگر OPC05. شماره‌ها مطابق با شماره ایزوولمهای مندرج در جدول ۲ می‌باشد. M نشانگر اندازه مولکولی ۱۰۰ bp.



محاسبه شد، که نشان دهنده تنوع ژنتیکی نسبتاً بالای جمعیت قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا، آفتابگردان و کلم می‌باشد. بر اساس جدول ماتریس شباهت‌های ژنتیکی حاصل از داده‌های مولکولی (جدول ۵)، بیشترین میزان شباهت‌های ژنتیکی مربوط به جدایه‌های شماره ۱۷ (نصرت‌آباد) و ۵ (اسبو محله ۴۲۰ (۱)) بود که حدود ۸۹ درصد محاسبه شد. سپس جدایه‌های ۱۶ (علی‌آباد) و ۲ (کلم)، جدایه‌های ۱۷ (نصرت‌آباد) و ۲ (کلم)، جدایه‌های ۹ (آفتابگردان) و ۲ (کلم) بیشترین میزان شباهت‌های ژنتیکی را دارا بودند که حدود ۸۷ درصد محاسبه شد. جدایه ۱۱ (سرکلاتنه ۴۲۰) با جدایه ۵ (اسبو محله ۴۲۰ (۱)) در ردیف بعدی شباهت ژنتیکی قرار داشتند که حدود ۸۶ درصد محاسبه شد.

در کل، ۱۳۸ جایگاه آلتی توسط ۸ آغازگر تکثیر شدند که ۱۳۶ عدد از آنها چندشکل بودند (جدول ۳). آغازگر OPB03 کمترین تعداد باند (۱۲ باند) و آغازگرهای OPA02 و ۰۷ بیشترین تعداد باند (۲۰ باند) را تولید کردند. به طور متوسط هر آغازگر تعداد ۱۷/۲۵ باند تولید کرد. پایین‌ترین و بالاترین درصد محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) به ترتیب مربوط به آغازگرهای OPC04 ۲۸/۸۵ و OPD02 ۴۲/۶۲ (درصد) بود. بیشترین و کمترین تعداد آلل موثر به آغازگرهای OPD02 و OPC04 و میانگین تعداد آلل‌های موثر در این تحقیق ۱/۵۶ بوده است (جدول ۴). میانگین ضریب تنوع ژئی نی ححدود ۳۳/۵ درصد و میانگین شاخص تنوع شانون حدود ۵۱ درصد

جدول ۳- تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آنها.

PIC	درصد	درصد چند شکل	تعداد باند تولید شده	آغازگر
۳۱/۲۷	۹۰	۱۸	۲۰	OPB07
۴۲/۶۲	۱۰۰	۱۵	۱۵	OPD02
۳۱/۲۳	۱۰۰	۱۶	۱۶	OPC10
۳۶/۲۲	۱۰۰	۲۰	۲۰	OPA02
۳۳/۰۴	۱۰۰	۱۲	۱۲	OPB03
۳۸/۴۴	۱۰۰	۱۷	۱۷	OPC01
۲۸/۸۵	۱۰۰	۱۹	۱۹	OPC04
۳۳/۸۹	۱۰۰	۱۹	۱۹	OPC05
۳۴/۴۴	۹۸/۵۵	۱۷/۰	۱۷/۲۵	متوسط

جدول ۴- تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نئی و شاخص تنوع شانون برای هر آغازگر (انحراف معیارها در داخل پرانتز آورده شده است).

آغازگر	تعداد آلل موثر	تنوع ژنی نئی	شاخص تنوع شانون
OPC04	(۰/۳۰۷) ۱/۴۴	(۰/۱۲۶) ۲۷/۷۸	(۰/۱۶۱) ۴۳/۹۲
OPB07	(۰/۳۵۰) ۱/۴۵	(۰/۱۶۸) ۲۷/۱۱	(۰/۲۲۱) ۴۱/۸۵
OPD02	(۰/۱۸۶) ۱/۷۷	(۰/۰۷۶) ۴۲/۶۲	(۰/۰۸۷) ۶۱/۴۷
OPC10	(۰/۲۴۹) ۱/۴۹	(۰/۱۰۲) ۳۱/۲۹	(۰/۱۱۶) ۴۸/۶۱
OPA02	(۰/۲۸۴) ۱/۶۴	(۰/۱۲۲) ۳۶/۹۰	(۰/۱۴۴) ۵۴/۷۷
OPB03	(۰/۲۲۰) ۱/۵۲	(۰/۰۹۹) ۳۳/۰۴	(۰/۱۱۹) ۵۰/۶۷
OPC01	(۰/۲۷۷) ۱/۶۶	(۰/۱۱۷) ۳۷/۸۴	(۰/۱۳۲) ۵۶/۶۰
OPC05	(۰/۲۹۹) ۱/۵۶	(۰/۱۲۳) ۳۳/۳۹	(۰/۱۵۹) ۵۰/۵۹
متوسط	(۰/۲۹۶) ۱/۵۶	(۰/۱۲۱) ۳۳/۴۷	(۰/۱۶۰) ۵۰/۶۱

آوری شده از مناطق مختلف در یک گروه طبقه‌بندی شده‌اند، به نظر می‌رسد ارتباط مشخصی بین مکان جغرافیایی جمع‌آوری جدایه‌ها با این گروه‌بندی وجود ندارد. گروه یک تنها از دو جدایه ۲ و ۵ تشکیل شده است و گروه دوم شامل شش جدایه ۴، ۴، ۲ و ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۸ بود و ۱۱ جدایه باقی‌مانده در گروه سوم جای گرفتند. از آنجا که جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف در یک گروه طبقه‌بندی شده‌اند، به نظر می‌رسد ارتباط مشخصی بین مکان جغرافیایی جمع‌آوری جدایه‌ها با این گروه‌بندی وجود ندارد.

بر اساس تجزیه تعادل هارדי- واینبرگ در جایگاه‌های آللی مختلف، عدد کای اسکویر به دست آمده برای هر جایگاه با جدول کای اسکویر با درجه آزادی ۱۸ در سطح احتمال ۵ و یک درصد مقایسه شد و به دلیل کوچکتر بودن این عدد (۱۳/۰۲) از عدد

همچنین میزان شباهت ژنتیکی بین جدایه ۱ (B مینودشت) با جدایه ۶ (هایولا ۴۰۱ گنبد) حدود ۸۵ درصد و بین جدایه شماره ۳ (هایولا ۴۰۱ چهل‌دین ۲) با جدایه ۷ (هایولا ۴۰۱ کلاله) و جدایه ۱۱ (سرکلاته ۴۲۰) با جدایه ۲ (کلم) ۸۴ درصد بود و میزان شباهت ژنتیکی بین جدایه ۷ (هایولا ۴۰۱ کلاله) با جدایه ۲ و همچنین جدایه ۸ (هایولا ۴۰۱ فاضل آباد) با جدایه ۵ (اسیوم محله ۴۲۰)، ۸۲ درصد محاسبه شد (جدول ۵).

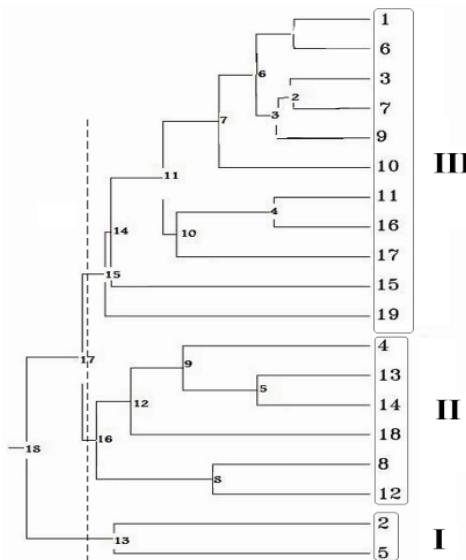
گروه‌بندی جدایه‌ها با تجزیه خوش‌های بر اساس ضربیت تشابه نئی با روش UPGMA در شکل ۴ نشان داده شده است. مطابق درخت-واره به دست آمده و تعیین خط برش بر اساس میانگین فاصله ژنتیکی، ۱۹ جدایه در سه گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۴). گروه یک تنها از دو جدایه ۲ و ۵ تشکیل شده است و گروه دوم شامل شش جدایه ۴، ۴، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۸ بود و ۱۱ جدایه باقی‌مانده در گروه سوم جای گرفتند. از آنجا که جدایه‌های جمع-

جدول ۵- ماتریس شباهت‌های ژنتیکی جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum* حاصل از داده‌های مولکولی.

۱۸	۱۷	۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	****	۱	
																			****	۱
																			****	۲
																			****	۳
																			****	۴
																			****	۵
																			****	۶
																			****	۷
																			****	۸
																			****	۹
																			****	۱۰
																			****	۱۱
																			****	۱۲
																			****	۱۳
																			****	۱۴
																			****	۱۵
																			****	۱۶
																			****	۱۷
																			****	۱۸
																			****	۱۹

نمونه) متغیر بود. Vakili Zarej and Rahnama (2010) نیز نتایج مشابهی را به دست آورده‌ند. همچنین در تحقیقی که بر روی این قارچ در دره اردن توسط Osofee et al. (2005) انجام گرفت، نتایج مشابهی به دست آمد. از مجموع ۱۷۱ تلاقی انجام شده در این تحقیق، تنها ۲۱ تلاقی (۱۲/۳ درصد) سازگاری میسیلیومی نشان دادند که در نتیجه می‌توان تا حدودی سازش ژنتیکی را در بین نمونه‌های به دست آمده از مناطق مختلف پیش‌بینی نمود. با توجه به این موضوع استفاده از بنور وارداتی در صورت عدم نظارت دقیق، می‌تواند نوعی تهدید برای گیاهان زراعی میزبان این بیماری محسوب شود. از طرف دیگر چون در بین این تلاقی‌ها ۱۵۰ تلاقی (۸۷/۷ درصد) ناسازگاری میسیلیومی نشان دادند، می‌توان حدس زد این قارچ از لحاظ ژنتیکی دارای تنوع درون‌گونه‌ای بالایی است. این موضوع نحوه مبارزه با آن را توسط قارچ کش‌های رایج مشکل می‌نماید.

نتایج به دست آمده از بررسی مولکولی تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا با استفاده از آغازگرهای RAPD نشان دهنده تنوع نسبتاً بالا در جمعیت جدایه‌های جمع-آوری شده قارچ عامل بیماری، *S. sclerotiorum* در مناطق مختلف استان گلستان می‌باشد. در بررسی مولکولی دیگر در ایران به طور مشابهی و همزمان با بررسی موجود، با استفاده از آغازگرهای RAPD برروی قارچ *S. sclerotiorum* از ۳ آغازگر انتخابی شامل Ar0R2، Ar081 و Ar0173 و چند آغازگر AP(-) PCR استفاده شد (Colagar et al. 2010). محصولات PCR برای



شکل ۴- درخت واره گروه‌بندی ۱۹ جدایه قارچ *S. sclerotiorum* در استان گلستان بر اساس ضریب تشابه نئی با روش UPGMA. شماره‌ها مطابق با شماره ایزوولهای مندرج در جدول ۲ می‌باشد.

کای اسکوئیر جدول ۲۸/۸۷ برای ۵ درصد و ۳۴/۸۰ برای یک درصد، نتیجه‌گیری شد که جمعیت مورد مطالعه در تمام جایگاه‌ها در حال تعادل آلی کامل ($P > 0.79$) بوده است. در این تحقیق پرگنهای حاصل از نمونه‌های مختلف آلوهه به قارچ *S. sclerotiorum* از مناطق مختلف و زراعت‌های مختلف، شکل ظاهری متفاوتی داشتند که از عدم سازگاری (تشکیل مرز مشخص و یا تشکیل مرز شفاف و توده‌های میسیلیومی متفاوت) تا سازگاری میسیلیومی (همراه با حل شدن میسیلیوم‌های بین دو

جهت مطالعه مشخصات ۸ جدایه مایکوپارازیت کونیوتربیوم می-نی تنس (عامل کنترل بولوژیک) انجام شده بود، هیچ الگوی بانددهی برای برخی آغازگرها مشاهده نشد و آغازگرهای OPA8، OPA14، OPA17، OPA18، OPA20 و OPA1 با باندهای OPA9، OPA15، OPA13، OPA7، OPA12، OPGMA انجام گرفت و نتیجه‌گیری شد که تکنیک RAPD برای جدا کردن گروههای واضحی تولید نکردند. اما آغازگرهای OPA10، OPA9، OPA8، OPA11، OPA12، OPA16، OPA17، OPA11، OPA12، OPA12، OPA17 و OPA12) تعداد بیشتری باند (تا ۱۴ باند) تولید کردند. بعد از ساختن ماتریس با ترکیب اطلاعات به دست آمده از آغازگرهای مورد بررسی، یک دندروگرام ترسیم شد که جدایه Z1 و Z2 در یک دسته و ۶ جدایه باقیمانده در دسته دیگر قرار گرفتند. مطالعه Arbaoui et al. (2008) بر روی شش جدایه مختلف این قارچ با نشانگرهای ISSR نشان داد که تفاوت‌های ژنتیکی نسبتاً بالایی (از ۵۴/۸ تا ۱۲/۵ درصد) بین آنها وجود داشت. همچنین نتایج این مطالعه نشان دهنده شباهت بیشتر جدایه‌های جمع‌آوری شده از گیاه لوپیا و آفتابگردان بود و میان منشا جغرافیایی و گروه‌بندی جدایه‌ها ارتباطی مشاهده نشد. Meinhardt et al. (1999) و Carpenter et al. (2002) مطالعات این قارچ به ترتیب موید تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه جدایه‌های موجود در نیوزیلند و بزریل بود.

با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد قارچ عامل بیماری با وجود جوان بودن زراعت کلزا در استان گلستان از تنوع بالای برشوردار است که وجود میزبان‌های دیگری از گیاهان زراعی و علف‌های هرز در منطقه احتمالاً یکی از دلایل این تنوع ژنتیکی می‌باشد.

منابع

- Ahmadihah A (2008) Principles of plant biotechnology. Gorgan University Press. Gorgan, Iran. (In Farsi)
Bardin SD, Huang HC (2001) Research on biology and control of *Sclerotinia* disease in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 23: 88-98.

۱۲ نمونه مفرد هر کدام چندشکلی زیادی را ایجاد کرد. نمایش باندها با استفاده از نشانگرهای RAPD برای نمونه‌های مختلف قارچ *S. sclerotiorum* با هم تفاوت داشتند. تجزیه کلستر بر اساس این ۳ آغازگر به وسیله روش UPGMA انجام گرفت و نتیجه‌گیری شد که تکنیک RAPD برای جدا کردن گروههای چندگانه مؤثر بوده و تکنیک قابل اطمینانی برای ارزیابی گوناگونی ژنتیکی بین جدایه‌های قارچ بوده است. اما این تفاوت‌های ژنتیکی در جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum* هیچ همبستگی مشخصی با وضعیت جغرافیایی جدایه‌ها نداشته است (Colagar et al. 2010). در تحقیق حاضر نیز شباهت‌های ژنتیکی بین جدایه‌ها (جدول ۵)، هیچ گونه همبستگی با نزدیک یا دور بودن فاصله مکانی نمونه‌های جمع‌آوری شده بیماری نشان نمی‌دهند، زیرا جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف در گروه یکسانی طبقه‌بندی شده‌اند (شکل ۴). آنچه مسلم است این تنوع در عامل بیماری اسکلروتینیایی در مناطق مختلف استان پراکنده می‌باشد. در بررسی که توسط Kohen et al. (1979) از بررسی بر روی این قارچ به عمل آمد، اظهار داشتن این نتایج ممکن است ناشی از تنوع بالای ژنتیکی و درصد بالای DNA جهش‌یافته در *S. sclerotiorum* باشد. همچنین بر اساس آنالیز تعادل هاردی-واینبرگ، نشان داده شد که جمعیت مورد مطالعه در حال تعادل ژنتیکی است که می‌توان علت آن را در جوان بودن زراعت کلزا در منطقه هرز منطقه و وجود میزبان‌های فراوان این قارچ (از جمله علف‌های درمنه) و یا شاید تنوع کم ارقام تحت کشت کلزا در منطقه ذکر نمود. دندروگرام ترسیم شده بر اساس ۸ آغازگر RAPD نشان داد که جدایه ۲ (محمد آباد- گیاه کلم) و جدایه ۵ (اسبو- محله ۴۲۰ (۱)) شباهت بیشتری به هم داشتند و مابقی جدایه‌ها در گروههای جداگانه‌ای قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از آنالیز RAPD توسط Grenedene and Minardi (2001) که

- Boland GJ, Hall R (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology 16: 93-108.
Carpenter MA, Frampton C, Stewart A (1999) Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. New Zealand Jurnal of Crop Horticulture Science 27: 13-21.

- Chang HH, Kozub GC (1994) Germination of immature and mature sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 84: 246-250.
- Colagar AH, Saadati M, Zarea MA, Talei SA (2010) Genetic Variation of Iranian *Sclerotiorum* isolates by standardizing DNA polymorphic fragments. *Biotechnology* 9: 67-72.
- Ershad J (1995) The fungi of Iran. Agricultural Research and Education Organization Press. Tehran, Iran. (In Farsi).
- Gaten S, Madina M (2005) Occurrence of stem rot on canola caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Argentina. *Plant Diseases* 89: 530.
- Greer GG, Dilts BD (1995) Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. *International Journal of Food Microbiology* 25: 141-51.
- Grendene A, Minardi P (2001) Characterization of the mycoparasite *coniothyrum minitans*: Comparison between morpho-physiological and molecular analysis. *Mycology* 106: 796-807.
- Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sale F, Van DE Wiel, C, Bredemejer G, Buiatti M, Maestri E, Malcevshi A, Marmirli N, Aert R, Volckaer G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A (1999) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381-390.
- Karimi E, Safaei N, Shams-Bakhsh M (2010) Genetic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from different regions and host plants in Iran. In: Proceedings of 19th Iranian plant protection congress. Iran, 140. (In Farsi)
- Kohn LM, Stasovski E, Carbone I, Royer J, Anderson JB (1991) Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 81: 480-485.
- Kohn LM (1979) Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 881-886.
- Kohn LM, Carbone I, Anderson JB (1990) Mycelial in compatibility and molecular markers identify genetic variability in field population of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 81: 480-485
- Kolte SJ (1985) *Sclerotinia* rot. In: Disease of annual edible oilseed crops. Rapeseed, Mustard and Sesame diseases. 1-35.
- Kull LS, Pederson WL, Palmquist D, Hartan GL (2004) Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *S. sclerotiorum*. *Plant Disease* 88: 325-322
- Lamey HA (1995) Survey of blackleg and *Sclerotinia* stem rot of canola in north Dakota in 1991 and 1993. *Plant Disease* 79: 322-324.
- Letourneau D (1979) Morphology, Cytology and physiology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 887-890.
- Malone E, Kopp M, Malone G, Branco JSC, Carvalho FI, Oliviera AC (2009) Genetic distances among rice mutant genotypes assessed by AFLP and aluminum tolerance - related traits. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 10: 106-111.
- Meinhardt LW, Wulff NA, Bellato CM, Tsai SM (2002) Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27: 211-215.
- Arbaoui M, Kraic J, Huszar J (2008) Genetic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from different conditions. *Agriculture* 54: 36-39.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of National Academy of Science of USA* 76: 5269-5273.
- Noonan MP, Glare TR, Harvey IC, Sands DC (1996) Genetic comparison of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from New Zealand and USA. In: *Proceedings of 49th New Zealand plant protection conference*. Nelson, New Zealand. 126-131.
- Osofee H, Hameed KM, Mahasneh A (2005) Relatedness among indigenous members of *Sclerotinia sclerotiorum* by mycelial compatibility and RAPD analysis in the Jordan Valley. *Plant Pathology Journal* 21: 106-110.
- Purdy LH (1975) *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Disease and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution and Impact. *Phytopathology* 69: 875-880.
- Rus-Kortekaas V, Smulder MJM, Arens P, Vosman V (1994) Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 37: 375-381.
- Saghafi-Marof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of National Academy of Science USA* 81: 8014-8018.
- Tingey SV, Rafalski JA, Williams JGK (1992) Genetic analysis with RAPD markers. In: *Applications of RAPD technology to plant breeding: Selected papers from the Joint Plant Breeding Symposia Series*. Minneapolis, Minnesota, USA.
- Vakili Zarej Z, Rahnam K (2010) Morphological variety and mycelial compatibility grouping in *Sclerotinia sclerotiorum* the causal agent of canola stem white rot in Golestan province. In: Proceedings of 19th Iranian plant protection congress. Iran, 184.
- Virk AS, Bran JS, Mangot BK (2000) Cytoplasmic differentiation using near - isonuclear polycytoplasmic male sterile lines in pearl millet. *Euphytica* 67: 127-134.
- Weeden NF, Swiwicki WK, Timmerman G, Ambrose M (1993) Guidelines for future mapping studies in *pisum*. *Genetics* 25: 13-14.
- Welsh J, Mc Clelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 19: 303-306.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999) POPGENE Version 1.32. Microsoft windows based freeware for population genetic analysis. University of Alberta, Edmonton, AB, Canada. 26.