

# تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* عامل پژمردگی نخود در استان کرمانشاه با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

## Genetic diversity of *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates causal agent of wilt chickpea in Kermanshah province using microsatellite markers

خشنود نوراللهی<sup>\*</sup>، افسانه علی‌آران<sup>۱</sup>، حسن یونسی<sup>۲</sup>

۱- به‌ترتیب استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ایلام

۲- مربی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه

Nourollahi KH<sup>\*1</sup>, Aliaran A<sup>1</sup>, Yonessi H<sup>2</sup>

1-Assistant professor, Former MSc Student, Department Plant of protection, Ilam university, Iran

2-Instructor, Natural resources and Agricultural research center of Kermanshah

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: k.nourollahi@ilam.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۸)

### چکیده

بیماری پژمردگی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های نخود در استان کرمانشاه است که توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Foc) جمعیت‌های قارچ Foc از گیاهان آلوده نخود در مزارع مختلف استان کرمانشاه شامل اسلام آباد، سرپل ذهاب، درود فرامان، ماهی‌دشت و هرسین که علائم زردی و پژمردگی داشتند، به‌طور تصادفی نمونه‌برداری صورت گرفت. در نهایت ۴۵ جدایه قارچ Foc از نمونه‌های آلوده با استفاده از محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز، آگار جداسازی شد. برای مطالعه ساختار ژنتیکی در جدایه‌ها از پنج جفت آغازگر ریزماهوره استفاده شد. همه آغازگرها ۱۰۰ درصد چندشکلی نشان دادند و تعداد ۱۵ آلل مختلف در بین همه جدایه‌ها مشخص شد. میانگین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرها ۹۱ درصد بود. براساس دندروگرام با روش الحاق مجاور، جدایه‌ها به نه گروه مختلف تقسیم شدند. مقایسه پارامترهای مربوط به تنوع ژنتیکی از جمله ضریب شانون در جمعیت‌ها نشان داد که جدایه‌های منطقه درودفرامان دارای بالاترین تنوع ژنتیکی می‌باشند. کم‌ترین فاصله ژنتیکی بین جدایه‌های هرسین و درودفرامان مشاهده شد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که میزان تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها ۹۳ درصد و بین جمعیت‌ها هفت درصد می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه می‌تواند در اصلاح ارقام مقاوم و گسترش اقدامات قرنطینه‌ای بسیار مفید باشد.

### واژه‌های کلیدی

پژمردگی فوزاریومی

تنوع ژنتیکی

*Cicer arietinum*

SSR

نخود (*Cicer arietinum* L) یکی از منابع مهم تغذیه انسان به شمار می‌رود. سطح زیر کشت این محصول در ایران معادل ۵۵۰ هزار هکتار بوده و با متوسط عملکرد ۵۳۶ کیلوگرم در هکتار، تولید کل آن در کشور معادل ۲۹۵ هزار کیلوگرم می‌باشد (FAO 2014). بیش‌ترین سطح کشت و میزان تولید نخود دیم متعلق به استان کرمانشاه می‌باشد. بیماری پژمردگی فوزاریومی با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Padwick) Matuo (Foc) and K. Sato یکی از مهم‌ترین فاکتورهای کاهش عملکرد نخود است (Jalali and Chand 1992; Dubey et al. 2007). قارچ عامل بیماری دارای میسیلیوم با دیواره عرضی است، میکروکنیدی‌ها بر روی فیالیدهای کوتاه قرار می‌گیرند. میکروکنیدی‌ها اغلب به صورت یک حجره‌ای، بی‌رنگ، استوانه‌ای خمیده تا بیضی کشیده دیده می‌شوند، ماکروکنیدی‌ها بی‌رنگ، هلالی شکل دارای دو سر باریک بوده و قدری خمیده هستند. معمولاً دارای سه تا پنج دیواره عرضی هستند اما ماکروکنیدی‌هایی با شش یا هفت دیواره عرضی نیز دیده می‌شوند، کلامیدوسپورها دارای دیواره صاف یا ناهموار بوده در انتهای رشته میسیلیوم و یا مابین رشته‌های میسیلیوم بوجود می‌آیند (Leslie and Summerell 2006). عامل بیماری، ساپروفیت اختیاری، بذرزاد و خاکزاد بوده و می‌تواند بدون میزبان تا شش سال در خاک زنده بماند (Haware et al. 1986a, 1986b). خسارت این بیماری در بعضی از مناطق از ۱۰ درصد تا ۱۵ درصد متغیر است و در بعضی از مناطق در شرایط مناسب خسارت آن به ۱۰۰ درصد نیز می‌رسد (Halila and Strange 1996; Navas-Cortes et al. 2000). اولین بار در ایران در سال ۱۳۴۲ از مزارع کرج، مرند، خوی، اهر و قزوین گزارش شد (Behdad 2010). به‌علت وجود نژادهای فیزیولوژیک متعدد عامل بیماری، استفاده از ارقام مقاوم در جهت کنترل بیماری با مشکل مواجه است (Chakrabarti et al. 2001). ظهور نژادهای جدید بیماری‌زا با ایجاد بیماری بر روی ارقام مختلف نخود باعث کاهش تولید و هم‌چنین کاهش منابع ژنتیکی با ارزش می‌شود. بنابراین شناسایی خصوصیات ژنتیکی بیمارگرهای دارای تنوع بیماری‌زایی بالا، برای مدیریت مناسب بیماری‌های گیاهی لازم و ضروری است. یکی از مهم‌ترین روش-

های مدیریت این بیماری استفاده از ارقام مقاوم است (Nene and Reddy 1987). تشخیص ژنتیکی جدایه‌های *F. (Foc)* *oxysporum* f. sp. *ciceri* نقش بسیار مهمی در مدیریت بیماری با استفاده از ارقام مقاوم در مناطق کشت نخود دارد اما میزان موفقیت آن تحت تأثیر تنوع بیماری‌زایی جمعیت‌های *Foc* قرار می‌گیرد (Jiménez-Díaz et al. 1993). روش تشخیص نژادهای بیمارگر با کمک مطالعه واکنش جدایه‌های مختلف قارچ بر روی ارقام افتراقی صورت می‌گیرد (Sharma et al. 2009). این روش گران و زمان‌بر بوده و برای تکمیل آن حداقل به ۴۰ روز زمان نیاز است (Kelly et al. 1994). روش آسان، سریع و کم هزینه برای تعیین تنوع در قارچ‌های بیمارگر استفاده از روش‌های ملکولی می‌باشد. در سال‌های اخیر از نشانگرهای ملکولی مانند RAPD، AFLP و SSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی و تنوع نژادهای *Foc* استفاده شده‌است (Kelley et al. 1994; Jimnez Gasco et al. 2001; Jimnez Gasco and Jimnez-Diaz 2003; Gurjar et al. 2009). برای تشخیص نژادهای مختلف *Foc*، ۹۹ جدایه از مناطق مختلف جهان با کمک نشانگرهای RAPD مورد مطالعه قرار گرفته و این جدایه‌ها در گروه‌های مختلف قرار گرفته‌اند (Jiménez-Gasco et al. 2001). هم‌چنین درخت ژنی و تکاملی نژادهای *Foc* با کمک نشانگرهای ملکولی مورد مطالعه قرار گرفته‌است (Jiménez-Gasco et al. 2002, 2004). مطالعه الگوهای هضم ناشی از آنزیم محدودگر *EcoRI* بر روی rDNA در نژادهای *Foc* هند نشان داده است که بعضی از نژادها شباهت بیش‌تری به هم دارند (Chakrabarti et al. 2000). از تکنیک SCAR<sup>۱</sup> برای مطالعه و تشخیص بعضی از نژادهای *Foc* استفاده شده‌است (Jiménez-Gasco and Jiménez-Diaz 2003). هم‌چنین برای مطالعه و تعیین نژادها در جدایه‌های *Foc* از نشانگرهای SSR، AFLP، JSSR، TS-RFLP و توالی EF-1 $\alpha$  استفاده شده و به کمک این نشانگرها نژادهای مختلف از همدیگر تفکیک شده‌اند (Gurjar et al. 2009). در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Foc* با نشانگرهای AFLP و RAPD مورد بررسی قرار گرفته است (Sivaramakrishnan et al. 2003). با استفاده از ۱۵ آغازگر

<sup>1</sup> Sequence characterized amplified regions

<sup>2</sup> Translation Elongation Factor 1 alpha

بیماری‌زایی متفاوتی را بر روی ارقام افتراقی ایجاد می‌کنند به کار گرفته شده‌است (Barve et al. 2001). از SSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی گونه مرکب *F. oxysporum* استفاده شده‌است (Bogale et al. 2005).

هدف از این مطالعه تشخیص تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Foc* جدا شده از مزارع مناطق مختلف استان کرمانشاه بر اساس نشانگرهای SSR و تخمین ارتباط ژنتیکی جدایه‌هاست تا بتوان از نتایج آن در برنامه‌های مدیریت این بیماری و اصلاح ارقام مقاوم نخود استفاده کرد.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از اواخر فروردین تا اواسط خرداد سال ۱۳۹۱ بسته به شرایط آب و هوایی منطقه از اندام‌های هوایی گیاهان آلوده نخود مشکوک به بیماری پژمردگی در اغلب مناطق استان کرمانشاه از جمله، هرسین، حمیل، اسلام آباد غرب، درود فرامان، میان دربند، صورت گرفت. این نمونه‌ها همراه با مشخصات آن‌ها در پاکت‌های کاغذی نگهداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های آلوده برای انجام آزمایش‌های بعدی به مدت یک‌ماه در یخچال در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  تا  $5^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. برای جداسازی قارچ، ابتدا بافت‌های گیاهی آلوده از حدواسط بافت آلوده و سالم به قطعات نیم تا یک سانتی‌متری تقسیم شدند. پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده (یک درصد ماده فعال) به مدت یک تا دو دقیقه و سپس در اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند. سپس این قطعات را با کاغذ صافی استریل خشک کرده و تعداد سه تا پنج قطعه از هر نمونه روی محیط کشت عصاره سیب-زمینی، دکستروز، آگار<sup>۲</sup> منتقل شدند. تشتک‌های پتری به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای  $20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. کشت خالص هر یک از جدایه‌ها به روش تک‌اسپور کردن به دست آمد (جدول ۱). شناسایی جدایه‌های فوزاریوم بر اساس خصوصیات مرفولوژی انجام شد (Leslie 2006). برای انجام آزمون بیماری‌زایی، ابتدا پنج عدد بذر نخود رقم بیونج در گلدان‌های حاوی خاک و ماسه به نسبت ۳:۱ کاشته شدند. بعد از این‌که گیاهچه‌ها

RAPD، تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف *Foc* نخود در استان خراسان، مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس این مطالعه، بین منشأ جغرافیایی جدایه‌ها و گروه‌های ژنوتیپی، ارتباطی وجود نداشت. به علاوه، این نشانگر به خوبی توانست جدایه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا را در نخود تفکیک نماید (Zaker Tavallae 2003). اولین گزارش از تجزیه و تحلیل تنوع بین جدایه‌های *Foc* با استفاده از نشانگر RAPD در شمال هندوستان ارائه شده‌است. در این تحقیق، از ۴۰ آغازگر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین جدایه‌ها استفاده شد. از بین این آغازگرها، فقط چهار آغازگر چندشکلی خوبی را نشان دادند. بر اساس نتایج حاصل از این تکنیک، جدایه‌ها بر اساس منشأ جغرافیایی از هم تفکیک شدند (Sing et al. 2006). در مطالعه‌ای با استفاده از نشانگر RAPD اختلاف بین دو پاتوتیپ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود تشخیص داده شد (Kelly et al. 1994).

از نشانگرهای SSR با واحدهای تکراری دو، سه و چهار نوکلئوتیدی برای مطالعه نژادهای *Foc* استفاده شده‌است. در یک مطالعه از ۱۳ نشانگر ریزماهواره به همراه ۱۱ آنزیم محدودگر در تشخیص چهار نژاد *Foc* رایج در هند استفاده شد و توالی‌های تکراری مختلف در ژنوم *Foc* مورد تایید قرار گرفت. بسته به میزان چند شکلی، 5 (AGT)، 5 (ATC) و 4 (GATA) به عنوان بهترین پروب‌های انگشت‌نگاری برای نژادهای *Foc* معرفی شدند (Barve et al. 2001). در مطالعه‌ای از سه نشانگر مولکولی RAPD، ITS-RFLP و SSR به منظور تمایز و تفکیک نژادهای بیمارگر عامل پژمردگی نخود فرنگی در هند استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از نشانگرهای SSR و RAPD، جدایه‌های *Foc* را در چهار گروه و داده‌های حاصل از ITS-RFLP جدایه‌های مورد بررسی را در سه گروه دسته‌بندی نمود. نتایج حاصل نشان داد که گروه‌بندی جدایه‌های بیماری‌زا هیچ ارتباطی به منطقه جغرافیایی ندارد (Datta and Lal 2013). توالی‌های ریزماهواره به عنوان یک نشانگر مبتنی بر PCR برای تعیین نژاد و تنوع ژنتیکی در تعدادی از قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها بدون اطلاع از ژنوم آن‌ها استفاده شده‌است (Meyer et al. 2003). نشانگرهای SSR برای تشخیص چهارنژاد در *Foc* که شدت

<sup>2</sup> PDA

<sup>1</sup> Prob

ساعت اضافه شد، استخراج با اضافه نمودن محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴:۱ به مخلوط ادامه یافت، آنزیم RNAase به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C به نمونه‌ها اضافه شد و دوباره محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴:۱ به مخلوط اضافه شد. در مرحله بعد، DNA با سدیم استات یک درصد و ایزوپروپانول سرد (چهار درجه سانتی‌گراد) رسوب داده شد و بعد از شستشو با اتانول ۷۰ درصد و خشک کردن در دمای اتاق در بافر TE یک درصد حاوی 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1mM EDTA نگهداری شد (Doyle and Doyle 1990). کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای بررسی تنوع ژنتیکی از پنج جفت آغازگر ریزماهواره اختصاصی برای Foc استفاده شد (جدول ۲). واکنش PCR اختصاصی با استفاده از پنج جفت آغازگر به صورت جداگانه برای نشان دادن تنوع در نمونه‌ها انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۳</sup> اختصاصی برای تمامی جدایه‌ها با حجم واکنش ۲۵ µL شامل: بافر PCR ۱۰x به مقدار ۲/۵ میکرولیتر، MgCl<sub>2</sub> (50mM) به مقدار ۱/۵ میکرولیتر، dNTP (10mM) به مقدار ۰/۹ میکرولیتر، یک میکرولیتر از هر آغازگر، (5unit µL) Taq DNA polymerase به مقدار ۰/۲ میکرولیتر، DNA ژنومی به مقدار ۲/۵ میکرولیتر، آب مقطر سترون ۱۷/۴ میکرولیتر در یک برنامه حرارتی توسط ترموسایکلر مدل بیورد<sup>۴</sup> به صورت واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴°C به مدت سه دقیقه، چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای بین ۵۹°C-۵۱°C به مدت یک دقیقه، توسعه در ۷۲°C به مدت یک دقیقه و در نهایت یک مرحله توسعه نهایی در ۷۲°C به مدت هفت دقیقه انجام شد. به منظور تفکیک محصول PCR مقدار پنج میکرولیتر از آن در ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ الکتروفورز شد. برای رنگ‌آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید یک میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و برای مشاهده باندها، از دستگاه Gel Documentation مدل Intas استفاده شد.

به سن دو هفته‌ای رسیدند، مایه‌زنی گیاهچه‌های نخود با استفاده از سوسپانسیون قارچ (بذور گندم تلقیح شده با قارچ) انجام گرفت به این صورت که در مرحله گیاهچه خاک اطراف ریشه‌ها به آرامی کنار زده شد و اسپان قارچ (بذور آلوده به قارچ) در پای ریشه‌ها ریخته شد.

جدول ۱- مشخصات جمعیت‌های قارچ Foc به دست آمده از مناطق نمونه برداری

| ردیف | تعداد جدایه‌ها | منشأ جمعیت  |
|------|----------------|-------------|
| ۱    | ۱۱             | اسلام‌آباد  |
| ۲    | ۶              | سرپل ذهاب   |
| ۳    | ۹              | درود فرامان |
| ۴    | ۷              | ماهیدشت     |
| ۵    | ۱۲             | هرسین       |

گلدان‌ها به صورت یک روز در میان آبیاری شده و گیاهچه‌ها به مدت یک ماه در این شرایط نگهداری شدند. علائم به صورت زردی و پژمردگی بوته پس از ۲۵ روز مشاهده شد. در نهایت با بررسی نشانه‌های بیماری برای اثبات بیماری‌زایی از طریق اصول کخ، دوباره قارچ عامل بیماری جداسازی شد.

برای به دست آوردن میسلیم جهت استخراج DNA، از محیط کشت مایع سیب‌زمینی<sup>۱</sup> استفاده شد. مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر از این محیط کشت در ظرف ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس این ظروف به کمک ۲-۱ قطعه از میسلیم قارچ Foc مایه‌زنی شدند. ارلن‌ها داخل شیکر-انکوباتور با دمای ۲۵°C و ۹۰ دور در دقیقه به مدت پنج روز قرار داده شدند. بعد از این مدت میسلیم به دست آمده بعد از شستشو با آب مقطر سترون، به کمک کاغذ صافی سترون و پمپ خلا آبیگری شد. میسلیم جدایه‌ها به تفکیک در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی نگهداری شدند. جهت استخراج DNA قارچ از روش CTAB<sup>۲</sup> با اندکی تغییرات استفاده شد. توده میسلیمی با ازت مایع خرد شد، سپس ۷۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج شامل (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 0.2% 2-mercaptoethanol) به توده میسلیمی نمونه‌ها به مدت یک

<sup>۱</sup> Potato dextrose broth (PDB)

<sup>۲</sup> Cetyltrimethyl ammonium bromide

<sup>۳</sup> Polymerase Chain Reaction

<sup>۴</sup> Biorad

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ریزوماهواره مورد استفاده برای مطالعه جدایه‌های *F. oxysporum* (Bogale et al. 2005)

| آغازگر | موتیف تکراری             | توالی (۳→۵)  | دمای اتصال | تعداد آل‌ها |
|--------|--------------------------|--|------------|-------------|
| MB2    | (GT)11(GA)6              | F: TGCTGTGTATGGATGGATGG<br>R: CATGGTCGATAGCTTGTCTCAG   | ۵۷         | ۲           |
| MB5    | (TG)9                    | F: ACTTGAGAAATGGGCTTC<br>R: GGATGGCGTTTAATAAAATCTGG    | ۵۴         | ۲           |
| MB11   | (GGC)7                   | F: GTGGACGAACACCTGCATC<br>R: AGATCCTCCACCTCCACCTC      | ۶۰         | ۵           |
| MB13   | (CTTGAAGTGGTAGCGG)<br>14 | F: GGAGGATGAGCTCGATGAAG<br>R: CTAAGCCTGCTACACCTCG      | ۶۰         | ۵           |
| MB18   | (CAACA)6                 | F: GGTAGGAAATGACGAAGCTGAC<br>R: TGAGCACTCTAGCACTCCAAAC | ۶۱         | ۲           |

### نتایج

تعداد ۴۵ جدایه قارچ از نمونه‌های مختلف در مناطق نمونه‌برداری جداسازی شد که براساس مشخصات ظاهری و شکل اندام‌های مختلف قارچی همه جدایه‌ها به *F. oxysporum* تعلق داشتند. پس از مایه‌زنی قارچ Foc در گلدان‌ها، نشانه‌های بیماری بعد از ۲۵ روز به صورت تغییر رنگ و پوسیدگی ریشه‌ها به رنگ سیاه ظاهر شد و با پیشروی آلودگی گیاهان دچار پژمردگی و مرگ شدند.

در جایگاه‌های ریزوماهواره‌ای، ۱۵ آل مختلف با متوسط سه آل در هر جایگاه ژنی مشاهده شد که در جایگاه‌های MB2، MB5، MB11، MB13، MB18، به ترتیب دو، سه، سه، سه و چهار آل ردیابی و تکثیر شدند. بیش‌ترین تعداد آل (چهار آل) در آغازگر MB18 و کم‌ترین تعداد آل (دو آل) در آغازگر MB2 مشاهده شد (جدول ۳). جمعیت درودفرمان با ۱۲ آل بیش‌ترین میزان فراوانی آلی را نسبت به دیگر جمعیت‌ها دارا بود. جمعیت درودفرمان با ۰/۲۴۰ بیش‌ترین و جمعیت ماهیدشت با ۰/۲۱۹ کمترین میانگین تنوع آلی را نشان دادند (جدول ۳). در جدول ۴ آغازگرهای مختلف و ویژگی‌های آن‌ها آمده است. آغازگر MB18 بیش‌ترین میزان اطلاعات چندشکلی (۰/۹۶) و آغازگر MB2 کم‌ترین میزان اطلاعات چندشکلی (۰/۸۱) را نشان دادند (جدول ۴).

مقدار محاسبه شده شاخص نشانگر در آغازگرهای مورد مطالعه از ۱/۶۲ تا ۳/۸۴ متغیر بود. بیش‌ترین مقدار شاخص نشانگر برای

به منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌های Foc ابتدا الگوهای باندهای حاصل از تکثیر به صورت حضور باند (۱) و عدم حضور باند (صفر) امتیازدهی شدند. ماتریس تشابه بین جفت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد<sup>۱</sup> محاسبه و تجزیه خوشه‌ای<sup>۲</sup> جدایه‌ها با روش Neighbor joining با نرم‌افزار NTSYS ver 2.02 انجام شد (Rohlf 1998). به منظور تشخیص تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها مقادیر فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، میانگین تنوع ژنی، شاخص شانون، میزان چندشکلی، میانگین تعداد آل‌های مشاهده شده، متوسط تعداد آل موثر در هر جایگاه ژنی، میزان تمایز ژنتیکی و جریان ژنی با استفاده از نرم‌افزار Gen Alex ver. 6.501 محاسبه و تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) انجام شد (Peakall and Smouse 2012).

محتوای اطلاعات چندشکلی نشان‌دهنده میزان چندشکلی یک نشانگر می‌باشد که می‌تواند از صفر تا یک متغیر باشد. هر چه این عدد بزرگ‌تر باشد، بیانگر فراوانی زیاد چندشکلی برای جمعیت مورد مطالعه است (Mohammadi and Prasanna 2003) برای بررسی قدرت تفکیک نشانگرها، محتوای اطلاعات چندشکلی هر نشانگر به صورت زیر محاسبه شد.

$$PIC=1-\sum p^2$$

هم‌چنین شاخص نشانگر با ضرب تعداد نوارهای چندشکل در شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی به دست آمد (Kumar et al. 2009).

<sup>1</sup> Jaccard coefficient

<sup>2</sup> Cluster Analysis

جدول ۳- اطلاعات مربوط به توزیع فراوانی آلل‌ها در جمعیت‌های مختلف Foc براساس نشانگرهای SSR

| آغازگرهای<br>ریزماهواره SSR | تعداد آلل‌ها در جمعیت |              |           |         |       |
|-----------------------------|-----------------------|--------------|-----------|---------|-------|
|                             | اسلام<br>آباد         | سرپل<br>ذهاب | دروفرامان | ماهیدشت | هرسین |
| MB2                         | ۲                     | ۲            | ۲         | ۲       | ۲     |
| MB5                         | ۲                     | ۲            | ۲         | ۳       | ۲     |
| MB11                        | ۲                     | ۲            | ۲         | ۲       | ۲     |
| MB13                        | ۳                     | ۲            | ۳         | ۲       | ۲     |
| MB18                        | ۲                     | ۳            | ۳         | ۲       | ۳     |
| فراوانی آلل‌ها              | ۱۱                    | ۱۱           | ۱۲        | ۱۱      | ۱۱    |
| میانگین تنوع آلل‌ها         | ۰/۲۲۱                 | ۰/۲۳۳        | ۰/۲۴۰     | ۰/۲۱۹   | ۰/۲۳۹ |

جدول ۴- ویژگی‌های آغازگرهای استفاده شده برای جدایه‌های Foc

| آغازگر <sup>۱</sup> | دمای<br>اتصال | اندازه آلل‌ها<br>مورد انتظار | تعداد آلل‌های<br>چند شکل | شاخص<br>نشانگر | PIC  |
|---------------------|---------------|------------------------------|--------------------------|----------------|------|
| MB2                 | ۵۷            | ۶۰-۶۵۰                       | ۲                        | ۱/۶۲           | ۰/۸۱ |
| MB5                 | ۵۴            | ۱۰۰-۱۱۵۰                     | ۳                        | ۲/۷۹           | ۰/۹۳ |
| MB11                | ۶۰            | ۱۰۰-۴۰۰                      | ۳                        | ۲/۸۲           | ۰/۹۴ |
| MB13                | ۶۰            | ۱۰۰-۲۰۰                      | ۳                        | ۲/۷۹           | ۰/۹۳ |
| MB18                | ۶۱            | ۲۵۰-۳۵۰                      | ۴                        | ۳/۸۴           | ۰/۹۶ |
| میانگین             | -             | -                            | ۳                        | ۲/۷۷           | ۰/۹۱ |

PIC میزان محتوای اطلاعات چندشکلی MI شاخص نشانگر

بیش‌ترین درصد چند شکلی در بین جمعیت‌ها به مقدار ۸۰ درصد به جمعیت درود فرامان تعلق داشت. همچنین جمعیت درودفرامان به ترتیب با مقدار ۰/۳۷۶ و ۰/۲۴۰ بیش‌ترین مقدار شاخص اطلاعات شانون و تنوع ژنی را در بین جمعیت‌ها داشته است (جدول ۵).

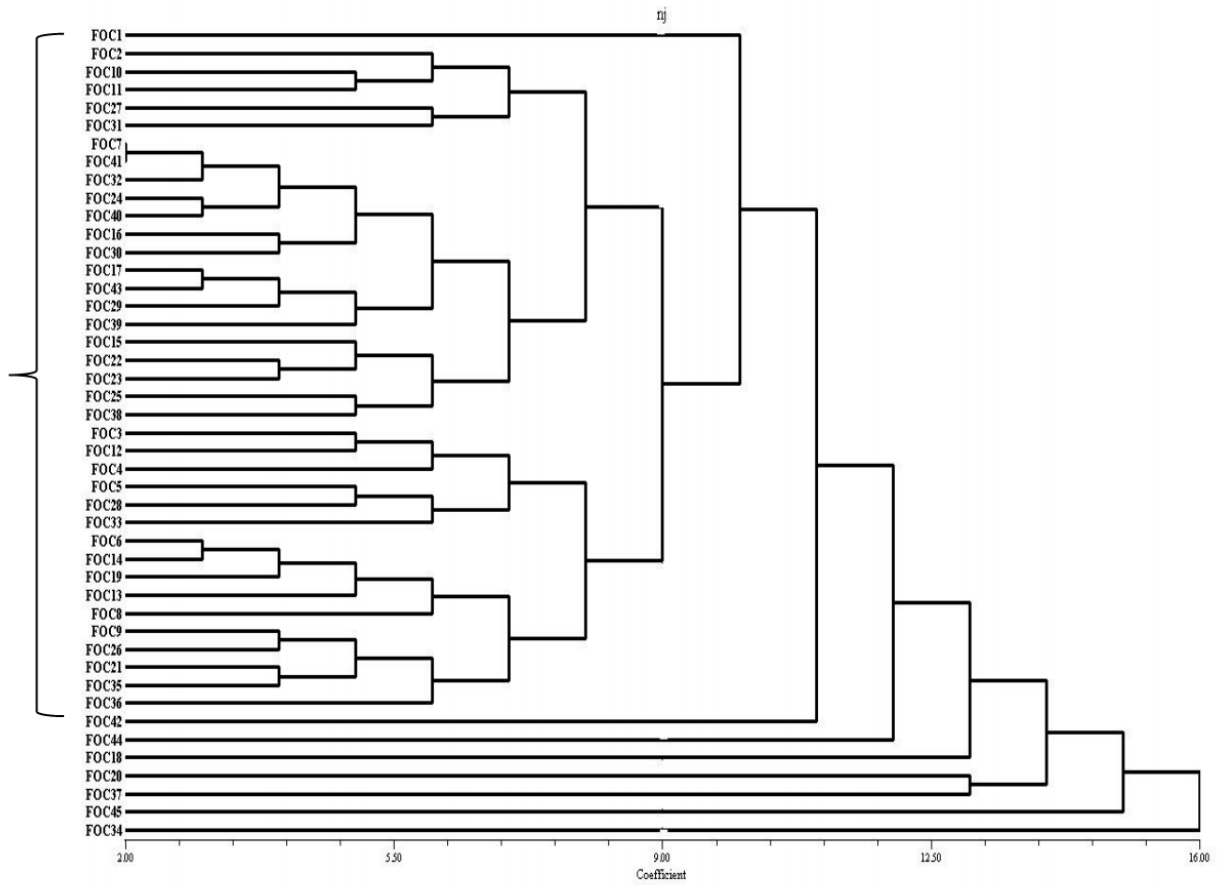
مقایسه دو به دو جمعیت‌ها نشان داد که بیش‌ترین فاصله ژنتیکی (۴۸ درصد) بین جمعیت‌های ماهیدشت با درودفرامان و هرسین با ماهیدشت و کم‌ترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۰۷) بین جمعیت‌های هرسین و درودفرامان وجود دارد (جدول ۶).

آغازگر MB18 بود. متوسط شاخص نشانگر برای نشانگرهای مورد مطالعه ۲/۷۷ می‌باشد که نشان دهنده قدرت تفکیک زیاد این آغازگرها است. درصد چندشکلی جایگاه ژنی در همه آغازگرها ۱۰۰ درصد بود (جدول ۴).

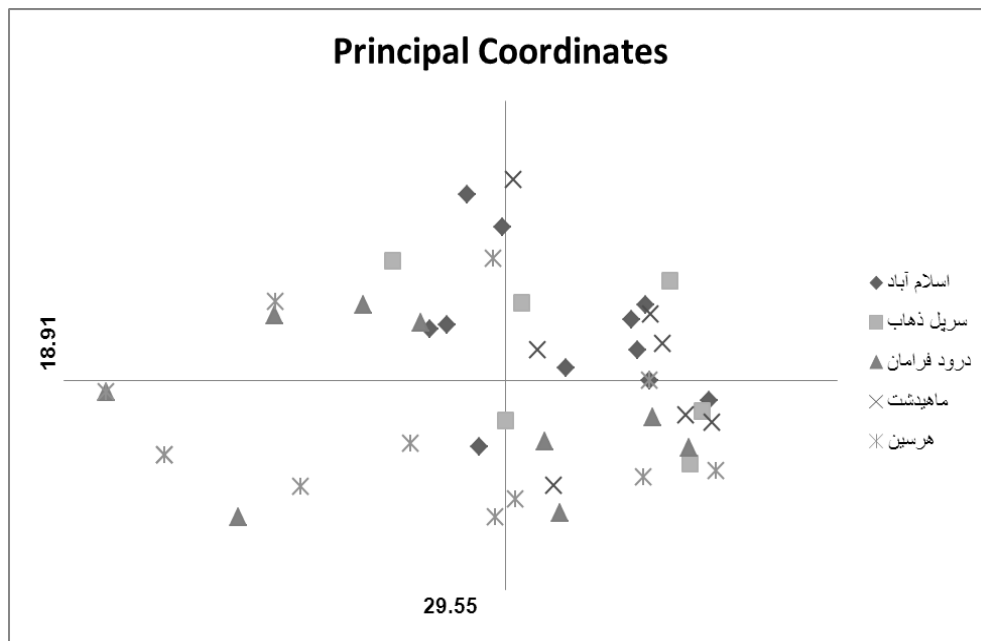
رسم دندروگرام جدایه‌ها بر اساس روش Neighbor joining نشان داد که جدایه‌ها در نه گروه مجزا قرار دارند (شکل ۱). این گروه‌ها شامل هشت گروه تک عضوی و یک گروه ۳۷ عضوی بودند که در این گروه، نشان‌دهنده تشابه بالای جدایه‌های با هم است بطوری‌که جدایه‌های FOC41 و FOC7 به ترتیب از جمعیت‌های هرسین و اسلام‌آباد غرب؛ در همین گروه با هم ۱۰۰ درصد تشابه ژنتیکی داشته‌اند. بنابراین قرار گرفتن جدایه‌های یک منطقه جغرافیایی در گروه‌های مستقل و جدایه‌های مناطق مختلف در یک گروه نشان دهنده این است که عامل منطقه جغرافیایی با وجود مفید بودن در گروه‌بندی جدایه‌ها نمی‌تواند به عنوان فاکتور کامل و مستقل در این زمینه مورد استفاده قرار گیرد و بیش‌تر تشابه ژنتیکی جدایه‌ها تحت تاثیر فشار گزینش میزبان، جهش-های ژنتیکی و جریان ژنی ناشی از تبادلات زادمایه بیماری در بین مناطق قرار می‌گیرد (McDonald 1997). برای بررسی تنوع آلی در جدایه‌های مورد مطالعه، از تجزیه به مختصات اصلی در جهت تکمیل تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. پراکنش جدایه‌ها در تمامی محورهای مختصات معرف تنوع ژنتیکی بالای جدایه‌ها می‌باشد، بطوری‌که ۲۹/۵۵ درصد از تغییرات ژنتیکی توسط مؤلفه اول و ۱۸/۹۱ از این تغییرات توسط مؤلفه دوم قابل توجیه است و در مجموع ۴۸/۴۶ درصد از تغییرات توسط مؤلفه اول و دوم قابل توجیه است (شکل ۲).

اطلاعات حاصل از پنج جایگاه نشان می‌دهد که جمعیت درود فرامان با ۱/۶ بالاترین تعداد آلل و جمعیت ماهیدشت با ۱/۳۳۳ کم‌ترین تعداد آلل را داشتند و میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده در جمعیت‌های مورد مطالعه ۱/۴۶۷ بود. بیش‌ترین تعداد آلل‌های مؤثر مربوط به جمعیت هرسین با ۱/۳۷۴ و کمترین تعداد آلل‌های مؤثر مربوط به جمعیت اسلام آباد با ۱/۳۲۳ می‌باشد، متوسط تعداد آلل‌های مؤثر در جمعیت‌ها ۱/۳۵۵ می‌باشد.

<sup>1</sup> Primer



شکل ۱- دندروگرام ارتباط ژنتیکی جدایه‌های Foc ایجاد شده به روش الحاق مجاور



شکل ۲- نمودار تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بین جدایه‌های Foc

جدول ۵- اطلاعات تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های قارچ Foc بر اساس جایگاه‌های ریزماهواره

| H <sup>4</sup> | I <sup>3</sup> | Ne <sup>2</sup> | Na <sup>1</sup> | درصد چندشکلی<br>جایگاه ژنی | جمعیت      |
|----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|------------|
| ۰/۲۲۱          | ۰/۳۴۹          | ۱/۳۲۳           | ۱/۴۶۷           | ۷۳/۳۳                      | اسلام‌آباد |
| ۰/۲۳۳          | ۰/۳۶۳          | ۱/۳۵۴           | ۱/۴۶۷           | ۷۳/۳۳                      | سرپل‌ذهاب  |
| ۰/۲۴۰          | ۰/۳۷۶          | ۱/۳۶۳           | ۱/۶             | ۸۰/۰۰                      | درودفرمان  |
| ۰/۲۱۹          | ۰/۳۳۳          | ۱/۳۶۲           | ۱/۳۳۳           | ۶۶/۶۷                      | ماهیدشت    |
| ۰/۲۳۹          | ۰/۳۶۸          | ۱/۳۷۴           | ۱/۴۶۷           | ۷۳/۳۳                      | هرسین      |
| ۰/۲۳۰          | ۰/۳۵۸          | ۱/۳۵۵           | ۱/۴۶۷           | ۷۳/۳۳                      | میانگین    |

۱- تعداد آل‌های مشاهده شده ۲- تعداد آل‌های مؤثر ۳- ضریب اطلاعات شانون ۴- تنوع ژنی

مورد مطالعه جمعیت درود فرمان بیش‌ترین تنوع ژنتیکی را نشان داده است. در این مطالعه بیش‌ترین تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها و کم‌ترین در میان جمعیت‌ها شناسایی شد. در این مطالعه جریان ژنی یکی از نیروهای تکاملی است که نقش بسیار مهمی در تنوع ژنتیکی یک جمعیت دارد. در غیاب جریان ژنی، ریزش ژنتیکی باعث تفاوت در فراوانی آل‌های جایگاه‌های ژنی درون جمعیت‌ها می‌شود و باعث افزایش تمایز جدایه‌ها در جمعیت‌ها می‌شود (McDonald 1997). در بررسی مشابهی که در استان‌های خراسان شمالی و خراسان رضوی برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های Foc عامل زردی و پژمردگی نخود با استفاده از دو نشانگر PCR-RFLP و RAPD انجام گرفت، نتایج محاسبه فاصله ژنتیکی در نشانگر PCR-RFLP بیانگر عدم وجود رابطه آشکار بین منشاء جغرافیایی جدایه‌ها با گروه‌بندی خوشه‌ای آن‌ها بود (Zokaee et al. 2012).

همچنین بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۹۳ درصد) و تنوع بین جمعیت‌های مختلف برابر (۷ درصد) بود که نشان می‌دهد افراد درون جمعیت‌ها از لحاظ ژنتیکی بیشتر از افراد جمعیت‌های مختلف به یکدیگر نزدیک هستند (جدول ۷). تمایز کمتر بین جمعیت نسبت به داخل جمعیت‌ها نشان‌دهنده این است که گروه‌بندی صورت گرفته برای جدایه‌ها در تفکیک جدایه‌ها بر اساس شباهت آن‌ها موفق عمل کرده است و جمعیت‌ها در دندروگرام حاصل، از افراد متفاوتی تشکیل شده‌اند.

## بحث

در این تحقیق جهت بررسی تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری پژمردگی نخود از نشانگر ریزماهواره SSR استفاده شد. مناطق نمونه‌برداری شامل پنج جمعیت منطقه‌ای مختلف بودند. میزان چندشکلی حاصل از نشانگر SSR ۱۰۰ درصد بود. نتایج به دست آمده این تحقیق بیانگر این است که نشانگر SSR نشانگر مناسبی جهت مطالعات تنوع ژنتیکی در جدایه‌های Foc می‌باشد و ما را قادر می‌سازد که جدایه‌های Foc را در سطح مولکولی به گروه‌های مختلف تقسیم کنیم. در این مطالعه تجزیه خوشه‌ای تنوع بالایی در میان جدایه‌ها را نشان داد، جدایه‌های Foc از مناطق جغرافیایی مختلف به گروه‌های ژنتیکی مشخص در دندروگرام تقسیم شده‌اند. در این مطالعه مشخص شده‌است که جدایه‌های بعضی از مناطق دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند، در بین جمعیت‌های

جدول ۶- فاصله ژنتیکی بین زوج جمعیت‌های Foc

| جمعیت      | اسلام-<br>آباد | سرپل-<br>ذهاب | درودفرمان | ماهیدشت | هرسین |
|------------|----------------|---------------|-----------|---------|-------|
| اسلام‌آباد |                |               |           |         |       |
| سرپل‌ذهاب  | ۰/۰۱۶          |               |           |         |       |
| درودفرمان  | ۰/۰۳۵          | ۰/۰۲۸         |           |         |       |
| ماهیدشت    | ۰/۰۲۰          | ۰/۰۲۰         | ۰/۰۴۸     |         |       |
| هرسین      | ۰/۰۴۱          | ۰/۰۳۸         | ۰/۰۰۷     | ۰/۰۴۸   |       |

جدول ۷ - تجزیه واریانس مولکولی برای جمعیت‌های Foc

| منبع تغییر    | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | درصد تغییرات |
|---------------|------------|--------------|----------------|--------------|
| بین جمعیت‌ها  | ۴          | ۱۷/۸۱۷       | ۴/۴۵۴          | ۷            |
| داخل جمعیت‌ها | ۴۰         | ۱۰۶/۹۸۳      | ۲/۶۷۵          | ۹۳           |
| کل            | ۴۴         | ۱۲۴/۸        |                | ۱۰۰          |

در مطالعه دیگری تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف Foc در استان خراسان، با استفاده از ۱۵ آغازگر RAPD، مورد بررسی قرار گرفت و بین منشأ جغرافیایی جدایه‌ها و گروه‌های ژنتیکی، ارتباط محسوسی وجود نداشت، به علاوه، این نشانگر به‌خوبی توانست جدایه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا را در نخود تفکیک نماید (Zaker Tavallae 2003). در جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق تنوع ژنتیکی پایینی وجود داشت، تنوع ژنتیکی پایین ممکن است در اثر چند عامل ایجاد شود به اینصورت که فاصله جغرافیایی میان جمعیت‌ها زیاد نبوده و در این فاصله کم، با جابجایی بقایای گیاهی آلوده و بذور آلوده بیماری به جمعیت‌ها انتقال می‌یابد، و در اثر انتقال بیماری تنوع ژنتیکی کاهش می‌یابد مبادله بذر آلوده به این بیماری احتمالاً عمومی‌ترین عامل به حساب می‌آید و بذور نخود آلوده باعث گسترش بیماری و استقرار آلودگی در مزارع می‌شوند. همچنین *F. oxysporum* دارای پایداری بالایی در خاک است و ممکن است به‌صورت جنسی و غیر جنسی تکثیر شود، انتشار فرم‌های جنسی و غیر جنسی قارچ با کمک عملیات زراعی و انتقال بذر به مناطق مختلف باعث توزیع و تغییر فراوانی آلل‌ها می‌شود. به‌علاوه بذر آلوده در این بیماری می‌تواند به پایداری قارچ در مناطق جدید کمک کند و ممکن است عامل توزیع و تنوع ژنوتیپ‌ها در آخر فصل رشد در درون جمعیت‌های این بیماری شود. بنابراین یکنواختی ژنتیکی جدایه‌های Foc در بعضی از مناطق جغرافیایی ممکن است ناشی از درجاتی از نوترکیبی جنسی در شرایط مزرعه باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های Foc در هند بر اساس نشانگرهای مولکولی، بین میزان بیماری‌زایی و منطقه جغرافیایی هیچ‌گونه رابطه مستقیمی به‌دست نیامد و جدایه‌ها در دو گروه بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا قرار گرفتند، همچنین جدایه‌های بیماری‌زا در شش گروه با تشابه ژنتیکی ۰/۷۷ قرار گرفتند، تنها تفاوت این جدایه‌ها در شدت و قدرت بیماری‌زایی آن‌ها بود (Sharma et al. 2009). در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۰ جدایه قارچ

*F. oxysporum* f. sp. *lentis* در هند با استفاده از نشانگر SSR، ۲۶ آلل شناسایی شد (Chehri et al. 2011). در بررسی ۶۴ جدایه *F. oxysporum* با استفاده از ۹ ریزوماهواره ۷۱ آلل تکثیر شد و میزان محتوی چندشکلی نشانگرها ۰/۲۵ گزارش شد این چندشکلی نشان‌دهنده درجه بالایی از تنوع زیستی است (Bogale et al. 2005). در بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی جدایه‌های Foc در ترکیه نشان داده شد که بیش‌ترین تنوع ژنتیکی جدایه‌ها ناشی از تفاوت درون جمعیت است، میزان جریان ژنی (Nm) بالا و برابر ۳/۰۰۹ بود که در اثر جابجایی عامل بیماری بین مناطق آلوده، اتفاق می‌افتد (Bayraktar et al. 2007). بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در این مطالعه نشان می‌دهد که تنوع درون جمعیت‌ها بیش‌تر از میان جمعیت‌هاست. با تخمین جریان ژنی، می‌توان میزان جریان ژنی که از تمایز جمعیت‌ها جلوگیری می‌کند را مشخص کرد. زمانی‌که جریان ژنی کمتر از یک باشد نشان می‌دهد که تمایز در میان جمعیت‌ها وجود دارد و جریان ژنی بیشتر از یک نشان می‌دهد که تمایز کمتری در میان جمعیت‌ها رخ می‌دهد. تعیین مشخصات ژنتیکی بیمارگرهای گیاهی برای توسعه بهترین روش‌های مدیریت بیماری‌های گیاهی لازم و ضروری است. اصلاح ارقام مقاوم یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل بیماری پژمردگی نخود است. برای بررسی روش‌های کنترل و تأثیر آن‌ها دانستن اطلاعات تنوع ژنتیکی جمعیت بیمارگر بسیار مهم و حائز اهمیت است. در همین راستا تنوع ژنتیکی Foc توسط نشانگر SSR مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه بینش ما نسبت به تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های Foc افزایش یافته است و بررسی‌های بیش‌تر این قارچ با تکنیک‌های مولکولی در بدست آوردن اطلاعات بیش‌تری در مورد ساختار ژنتیکی این قارچ می‌تواند مفید باشد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی بالایی در بین جدایه‌ها مشاهده شد و این نشان‌دهنده این است که پتانسیل ایجاد خسارت در مزارع نخود وجود دارد. افزایش تنوع ژنتیکی جدایه‌ها در هر منطقه باعث افزایش پتانسیل سازگاری آن جدایه‌ها در مقابل تغییرات شرایط محیطی و روش‌های کنترل می‌شود. این تنوع بالا به اصلاح کنندگان کمک می‌کند که وارپته‌هایی که دارای پتانسیل مقاومت هستند را مطابق با تنوع ژنتیکی قارچ برای رسیدن به ارقام با مقاومت پایدار آزمایش کنند. هم‌چنین اقدامات

تشخیص تنوع ژنتیکی عامل بیماری، کاربرد ژن‌های مقاوم یا مخلوطی از وارته‌ها برای کنترل پایدار در مدیریت بیماری در جهت افزایش عملکرد این محصول با ارزش اقدام شود. همچنین لازم است که تحقیقات دیگری در زمینه‌های مختلف بیولوژی و اپیدمیولوژی این بیماری صورت گیرد.

### منابع

Barve MP, Haware MP, Sainani MN, Ranjekar PK, Gupta VS (2001) Potential of microsatellites to distinguish four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* prevalent in India. *Theoretical and Applied Genetics* 102:138-147.

Bayraktar H, Dolar FS, Maden S (2007) Use of RAPD and ISSR Markers in Detection of Genetic Variation and Population Structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Isolates on Chickpea in Turkey. *Phytopathology Journal* 156:146-154.

Behdad A (2010) Principles of plant diseases. Neshat Press, Esfahan, Iran. (In Farsi).

Bogale M, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp EJ (2005) Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex. *Molecular Ecology Note* 5: 622-624.

Chakrabarti A, Mukherjee PK, Sherkhane PD, Bhagwat AS, Murthy NBK (2001) A simple and rapid molecular method for distinguishing between races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* from India. *Current Science*, 4: 571-575.

Chehri KSB, Yli Mattila T, Reddy KRN, Abbasi S (2011) Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18: 341.

Datta J, Lal N (2013) Genetic diversity of *Fusarium* wilt races of pigeonpea in major regions of India. *African Crop Science Journal* 21: 20-211.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13.

Dubey SC, Suresh M, Singh B (2007) Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control* 40: 118-127.

FAO (2014) FAOSTAT. Food and Agricultural commodities production. Available at <http://www.faostat.fao.org>.

Gurjar G, Barve M, Giri A, Gupta V (2009) Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. *Mycologia* 101: 484-495.

Halila MH, Strange RN (1996) Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race 0. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 67-74.

Haware MP, Nene YL, Mathur SB (1986a) Seed borne diseases of chickpea. *Technical Bulletin* 1. Danish

و مقررات قرنطینه‌ای برای جلوگیری از ورود جدایه‌های با تنوع بالا از مناطق دیگر به مناطق دارای جدایه‌های با تنوع کم‌تر را به-طور جدی در نظر بگیرند. با توجه به شیوع این بیماری در بسیاری از مناطق کشت نخود در کشور پیشنهاد می‌شود که مطالعات تعیین تنوع ژنتیکی فارچ Foc در سطح وسیع در کشور انجام گیرد تا بتوان با تحقیقات کاربردی و هدفدار از قبیل

Government Institute of Seed Technology for developing countries. *Copenhagen* 1: 1-32.

Haware MP, Nene YL, Natrajan M (1986b) Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in soil in absence of chickpea. Paper presented in the National Seminar on Management of soil borne diseases of crop plants Proc. Natn. Sem. 8-10 Jan. 1986, Tamilnadu Agricultural University, Coimbatore, Tamilnadu India.

Jalali BL, Chand H (1992) Chickpea wilt. pp. 420-444 in: *Plant diseases of International Importance. Vol.1. Diseases of cereals and pulses.* U.S. Singh, Mukhopadhyay AN, Kumar J, Chaube HS, eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Jime'nez-Dí'az RM, Alcalá'-Jime'nez AA, Herva's A, Trapero-Casas JL (1993) Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem. In: *Third European Fusarium Seminar: Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance.* Radziko'v, Poland: Hodowla Ro'slin Aklimatyzacja I Nasieennictwo, Plant Breeding and Acclimatization Institute, 87-94.

Jime'nez-Gasco MM, Jime'nez-Diaz RM (2003) Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and its pathogenic races 0, 1A, 5 and 6. *Phytopathology* 93: 200-209.

Jime'nez-Gasco MM, Milgroom MG, Jime'nez-Diaz RM (2002) Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* as a monophyletic group. *Plant Pathology* 51:72-77.

Jiménez-Gasco MM, Milgroom MG, Jiménez-Díaz RM (2004) Stepwise evolution of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* inferred from fingerprinting with repetitive DNA sequences. *Phytopathology* 94: 228-235.

Jime'nez-Gasco MM, Pe'rez-Arte's E, Jime'nez-Diaz RM (2001) Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *European Journal of Plant Pathology* 107: 237-248.

Kelly A, Alcalá'-Jimenez AR, Bainbridge BW, Heale JB, Perez-Artes E, Jimnez-Diaz RM (1994) Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* infecting chickpea. *Phytopathology* 84: 1293-1298.

Kumar M, Mishra GP, Singh R, Kumar J, Naik PK, Singh SB (2009) Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among

different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15: 225-236

Leslie JF, Summerell BA (2006) *The fusarium laboratory manual*. Iowa: Ames.

Mcdonald BA (1997) The population genetics of fungi. Tools and techniques. Symposium on population genetics of soil borne fungal Plant Pathogens. *Phytopathology* 87: 448-453.

Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E (2003) The Ibero American cryptococcal study group. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Diseases* 9: 189-195.

Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plant: Salien statistical tools and considerations. *Crop Science* 43: 1248-1235.

Navas-Cortes JA, Hau B, Jimenez-Díaz RM (2000) Yield loss in chickpeas in relation to development of *Fusarium* wilt epidemics. *Phytopathology* 90: 1269-1278.

Nene YL, Reddy MV (1987) Chickpea diseases and their control. In: Saxena MC, Singh KB, editors. *The Chickpea*. Oxon, UK. CAB-International, 233-270.

Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.

Pe´rez-Arte´s E, Roncero MIG, Jimenez-Diaz RM (1995) Restriction fragment length polymorphism analysis of the

mitochondrial DNA of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Journal of Phytopathology* 143:105-109.

Rohlf FJ (1998) NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Exeter Software. Setauket.

Sharma M, Varshney KR, Rao JN, Kannan S, Hoisington D, Pande S (2009) Genetic diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, chickpea wilt pathogen. *African Journal of Biotechnology* 8: 1016-1023.

Singh BP, Ratul Saikia R, Yadav M, Singh R, Chauhan VS Arora DK (2006) Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* causing wilt of chickpea. *African Journal of Biotechnology* 5: 497-502.

Sivaramakrishnan S, Kannan S, Singh SD (2003) Genetic variability of *Fusarium* wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers. *Mycopathologia* 155:171-178.

Zaker Tavallae F (2003) Genetic diversity determination of vascular *Fusarium oxysporum* isolates in chickpea by RAPD molecular marker. Dissertation, University of Ferodissi Mashhad, Iran. (In Farsi).

Zokae S, Falahati Rastegar M, Jafar Poor B, Bagheri A, Jahanbakhsh Mashhadi V (2012) Genetic diversity determination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* the causal agent of wilting and chlorosis in chickpea by using RAPD and PCR-RFLP techniques in Razavi and Northern Khorasan Provinces. *Iranian Journal of Pulses Research* 2: 7-16. (In Farsi).