

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۹، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۰

بررسی اختلافات بیماری‌زایی و مولکولی در تعدادی از جدایه‌های

Ascochyta rabiei عامل بیماری برق زدگی نخود در ایران*

Study on pathogenic and molecular variability in some isolates of
Ascochyta rabiei causal agent of ascochyta blight of chickpea in Iran

سیمین غیائی^{۱*}، محمد رضوی^۲ و داریوش شهریاری^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۲- مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

(تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۰، تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۰)

چکیده

اختلافات بیماری‌زایی و مولکولی در تعدادی از جمعیت‌های *Ascochyta rabiei*، عامل بیماری بلایت آسکوکیتابی نخود، با استفاده از ۳۰ جدایه جمع‌آوری شده از پنج استان کشور شامل ایلام، آذربایجان شرقی، کرمانشاه، کهگیلویه و بویر احمد و لرستان بررسی شد. به منظور تشخیص طیف بیماری‌زایی جدایه‌ها، بیماری‌زایی جدایه‌های مذکور روی هفت رقم افتراقی نخود مورد مطالعه قرار گرفت که در ۱۶ گروه بیماری‌زایی طبقه بندی شدند. سه جدایه از استان آذربایجان شرقی (Ar19، Ar18، Ar17) دو جدایه از استان کهگیلویه بویراحمد (Ar16) و (Ar34)، یک جدایه از استان کرمانشاه (Ar27) و یک جدایه از استان لرستان (Ar2) بیشترین بیماری‌زایی را داشتند. که از این جدایه‌ها می‌توان در برنامه‌های اصلاحی مقاومت به بیماری استفاده نمود. ضمناً تنوع ژنتیکی جدایه‌های فوق با استفاده از نه آغازگر تصادفی RAPD مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس داده‌های بدست آمده، جدایه‌های مورد بررسی در داخل نه

* بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد نگارنده‌ی اول

** Corresponding author: simin_ghiai@yahoo.com

غیائی و همکاران: بررسی اختلافات بیماری‌زایی و مولکولی در تعدادی از جدایه‌های *Ascochyta rabiei* ...

کلاستر در شجره فیلوژنتیکی قرار گرفتند. بر اساس شیوه UPGMA و ضریب تشابه Jaccard میانگین اختلاف ژنتیکی در بین جدایه‌ها ۷۵٪ برآورد گردید که نشانگر وجود تنوع ژنتیکی زیاد در میان جدایه‌های مورد بررسی بود.

واژه‌های کلیدی: برق زدگی نخود، اختلافات بیماری‌زایی، *Ascochyta rabiei*، نشانگر RAPD.

Abstract

Pathogenic and molecular variability of 30 isolates of *Ascochyta rabiei* the causal agent of Ascochyta blight of chickpea collected from five provinces of Iran including Ilam, Kermanshah, Kohkiluyeh-Boyerahmad, East Azarbaijan and Lorestan was studied. Based on pathogenicity test, which was conducted using 7 differential chickpea cultivars, the isolates were categorized into 16 groups. All isolates collected from East Azarbaijan (Ar17, Ar18, Ar19), two isolates from Kohkiluyeh- Boyerahmad (Ar16, Ar34), one isolates from Kermanshah (Ar27), and one isolate from Lorestan (Ar2) had the highest pathogenicity. These isolates have potential to be used in breeding for resistance to ascochyta blight disease.

Molecular variability of the isolates was studied using nine random RAPD primers and the data was analyzed using UPGMA clustering method and Jaccard similarity coefficient. The isolates were categorized into nine clusters. The average genetic similarity of isolates was 75% which indicates there was a high level of genetic variability in the population.

Key words: ascochyta blight of chickpea, pathogenic variability, *Ascochyta rabiei*, RAPD primer

مقدمه

گیاه نخود در کشور ما هم از نظر سطح زیر کشت و هم از نظر میزان تولید اولین مقام را در بین حبوبات دارا است ولی در برخی مناطق، سطح زیر کشت آن رفته رفته کاهش یافته و حتی در برخی مناطق زراعت آن منسوخ شده است. یکی از عمده‌ترین دلایل نقصان عملکرد در واحد سطح، شیوع اپیدمی‌های خسارت بار قارچی تحت عنوان بیماری برق زدگی یا سوختگی آسکوکیتایی *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. در مناطق مختلف کشور می‌باشد که در برخی سال‌ها با مساعد شدن رطوبت و حرارت، قادر است زیان‌های جبران ناپذیری به کشاورزان و اقتصاد ملی کشور وارد کند. یک روش رایج برای کنترل این بیماری مبارزه

شیمیایی است که دارای مشکلات زیادی از قبیل ایجاد مقاومت، مشکلات زیست محیطی و عدم کارایی کافی می‌باشد لذا لازم است از راهکارهای عملی‌تر دیگری به صورت تلفیقی استفاده شود. یکی از مؤثرترین روش‌های کنترل بیماری استفاده از ارقام مقاوم است. اما به منظور انتخاب ارقام مقاوم ابتدا بایستی شناخت دقیقی از تنوع ژنتیکی بیمارگر و نژادهای غالب آن در مناطق آلوده پیدا نمود سپس با شناسایی نژادهای غالب، ارقام مختلف را از نظر مقاومت به بیماری ارزیابی نمود و رقم مناسب هر منطقه را معرفی کرد. به منظور گروه‌بندی جدایه‌ها، تا به حال از فاکتورهای مختلفی از جمله: گروه‌های بیماری‌زا، نژاد، فرم‌های بیماری‌زا و پاتوتیپ استفاده شده است (Chen *et al.*, 2004). آگاهی از تنوع بیماری‌زایی بیمارگر به ویژه در برنامه‌های اصلاح نژاد، به منظور انتخاب رقم مقاوم در مقابل جدایه‌های موجود در منطقه، از اهمیت زیادی برخوردار است. *A. rabiei* بر اساس نوعی طبقه‌بندی، به سه گروه بیماری‌زا تقسیم بندی شد (Chen *et al.*, 2004; Jayakumar *et al.*, 2005). گروهی از محققین سطح کمی آلودگی (پیشرفت آلودگی) را در بین ۵۳ جدایه، روی سه ژنوتیپ میزبانی مشاهده کردند (Udupa *et al.*, 1998). همچنین پاتوتیپ‌های I و III در سال ۲۰۰۶ (Pradhan, 2006) از استرالیا، در سال ۲۰۰۴ (Chen *et al.*, 2004) از آمریکا و در سال ۲۰۰۵ (Jeyakumar *et al.*, 2005) از آمریکا گزارش گردیدند. در حالیکه در هند بیش از ۱۳ پاتوتیپ (Vir and Grewal, 1974) و در پاکستان ۳ پاتوتیپ (Jamilet and Ricardo, 2000) گزارش شده است. گرچه این گزارش‌ها بر مبنای شدت آلودگی روی تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها، در هر کشور صورت گرفته است.

آگاهی از تنوع بیماری‌زایی و مولکولی در میان جدایه‌های مختلف جمع‌آوری شده از مناطق مختلف در بهبود روش‌های مدیریتی این بیمارگر بسیار کارا خواهد بود. در این بین تکنیک‌های مبتنی بر PCR می‌تواند مفید باشد. همچنین اطلاعات مذکور در بکارگیری اقدامات پیش آگاهی در غالب برنامه‌های مدیریتی طولانی مدت تا حد زیادی مؤثر خواهد بود (McDonald and McDermott, 1993; McDonald and Linde, 2002). تا کنون از نشانگرهای مولکولی مختلفی جهت مطالعه ساختار مولکولی *A. rabiei* استفاده شده است. کاربرد RAPD جهت تعیین تفاوت و تنوع بین نژادهای درون گونه‌ای در گیاهان، باکتری‌ها، حیوانات و قارچ‌ها موفقیت آمیز بوده است (Williams *et al.*, 1990). (Shokuhifar *et al.*, 2003) نشانگر

RAPD را برای تعیین تنوع ژنتیکی *A. rabiei* عامل بیماری برق زدگی نخود در تعدادی از استان‌های کشور مورد استفاده قرار دادند و براساس نتایج بدست آمده از این تحقیق، بیان نمودند که جمعیت این بیمارگر در مناطق مختلف مورد بررسی با یکدیگر متفاوت است و همچنین اظهار نمودند که روش RAPD ابزاری قوی برای تجزیه ژنومی جمعیت *A. rabiei* می‌باشد. (Nourollahi et al. (2010 ساختار ژنتیکی و تنوع ۱۰۳ جدایه *A. rabiei* جمع‌آوری شده از استان‌های ایلام و کرمانشاه را با استفاده از مارکرهای SSR و MAT مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاکی از تنوع بالای ژنتیکی در جدایه‌های مذکور بود. طی تحقیق دیگری، Taleei et al. (2010 بیان نمودند که نشانگرهای ریزماهورای می‌توانند جهت متمایز ساختن ژرم پلاسما مقاوم به برق زدگی نخود استفاده شوند. در این تحقیق سعی شده است که از یک سو، با استفاده از ارقام محک (استاندارد) نخود، تفاوت‌های بیماری‌زایی جدایه‌ها مورد بررسی قرارگیرد و از سوی دیگر با استفاده از روش مولکولی RAPD اختلاف مولکولی در تعدادی از جدایه‌های این قارچ مورد بررسی قرار گیرد. همچنین در صورت امکان، ارتباط بین اختلاف مولکولی و بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری تعیین گردد. تا در نهایت بتوان از جدایه‌هایی که دارای شدت بیماری‌زایی بالایی هستند و به صورت پاتوتیپ غالب در مناطق مورد بررسی می‌باشند، در برنامه‌های اصلاحی مقاومت به بیماری برق زدگی نخود استفاده نمود.

روش بررسی

تهیه زادمایه جدایه‌های *Ascochyta rabiei* در آزمایشگاه: بدین منظور ۳۰ نمونه گیاهی آلوده به بیماری برق زدگی نخود، از پنج استان مختلف کشور شامل: آذربایجان شرقی، ایلام، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد و لرستان طی سال‌های ۸۶-۱۳۸۴ جمع‌آوری گردید. نمونه‌های بدست آمده به مدت یک دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، ضدعفونی سطحی شدند و متعاقباً قطعات در ۳ مرحله دیگر به ترتیب به مدت ۱، ۲ و ۳ دقیقه با آب مقطر سترون آبکشی شدند و روی کاغذ صافی خشک گردیدند. تعداد ۴-۵ قطعه از هر نمونه، بر روی محیط کشت آب‌آگار (WA) درون تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری قرار داده شد. سپس تشتک‌ها تحت دمای 23 ± 1 درجه سانتی‌گراد و دوره متناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲

روشنایی به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. پس از ۱۴ روز جدایه‌های رشد یافته، به روش تک اسپور خالص گردیدند و جهت مطالعات آتی در محیط کشت آب-آگار (WA) و نخود-ساکاروز-آگار (C.S.A) نگهداری شدند.

بررسی‌های بیماری‌زایی:

اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Ascochyta rabiei* در این آزمایش ۳۰ جدایه خالص شده را در محیط کشت PDA تکثیر نموده و سوسپانسیون‌هایی با غلظت 2×10^6 تهیه گردید. از سوی دیگر، یک رقم حساس محلی به نام بیوه‌نیچ در گلدان‌های با قطر ۱۱ سانتی‌متری کشت گردید (در هر گلدان ۴ بوته که دارای اندازه یکسانی بودند کشت گردید). سپس بوته‌های حساس نخود با سوسپانسیون‌های تهیه شده، به شیوه اسپور پاشی، مایه‌زنی گردید. پس از اسپور پاشی هر گلدان با سرپوش‌های شفاف پوشش داده شد و گلدان‌ها در دمای ۱۸-۲۲ درجه سلسیوس و ۱۲-۱۴ ساعت نور طبیعی روز نگهداری شدند. رطوبت نسبی در زیر سرپوش‌ها ۹۵-۱۰۰ درصد بود. ۱۰ روز پس از مایه‌زنی، علائم بیماری بر روی همه بوته‌ها ظاهر گردید و به تدریج سبب مرگ کامل گیاهچه‌ها شد. قارچ عامل بیماری مجدداً از همه بوته‌ها جداسازی شد. بدین ترتیب بیماری همه جدایه‌ها به اثبات رسید.

بررسی تفاوت‌های بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *A. rabiei*: تفاوت‌های بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ به روش مایه‌زنی بر روی هفت رقم افتراقی نخود معمولی (JLC202، JLC194، JLC1929، JLC5928، JLC72، ICC3996 و PCH15) ارزیابی شد. ارقام مذکور از مرکز تحقیقات بین‌المللی ایکاردا دریافت گردید. از هر رقم نخود، بذوری که دارای اندازه‌های یکسان بودند انتخاب شد. به منظور جوانه‌زنی از بذور هر رقم درون گلدان‌های جداگانه که حاوی ماسه بودند، کشت شد. هفت روز پس از کشت بذور، گیاهچه‌هایی را که یکنواخت جوانه‌زده بودند انتخاب نموده و درون گلدان‌های با قطر ۱۱ سانتی‌متر حاوی مخلوط شن: ماسه به نسبت ۳:۱ در عمق ۲/۵ سانتی‌متری کشت شدند. در هر گلدان چهار گیاهچه کشت گردید. سپس این گلدان‌ها در شرایط گلخانه در دمای ۱۵-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا به رشد لازم جهت مایه زنی برسند. مایه‌زنی هر ۳۰ جدایه *A. rabiei* روی ارقام افتراقی و در سه تکرار اجرا گردید. ضمناً یک تیمار شاهد در تمام تکرارهای آزمایش منظور گردید. شاهد

غیائی و همکاران: بررسی اختلافات بیماری‌زایی و مولکولی در تعدادی از جدایه‌های *Ascochyta rabiei* ...

مورد استفاده در این آزمایش، رقم حساس محلی بیوه‌نیچ بود. همزمان با این عملیات از حاشیه کشت‌های تک اسپور قارچ، قطعاتی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر جدا و در لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و خوب هم زده شد تا سوسپانسیون غلیظی از جدایه مذکور بدست آید. سپس این سوسپانسیون در سطح تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA پخش و آب اضافی آنها خالی گردید و به مدت ۱۴ روز در شرایط دما و نور آزمایشگاه قرار داده شدند. پس از مدت مذکور پیکنیدیوم‌های قارچ به فراوانی روی محیط کشت به صورت یک لایه سیاه رنگ تشکیل گردید. سوسپانسیون اسپور قارچ با اضافه نمودن آب مقطر سترون و مالش آرام سوزن سترون بر روی سطح محیط کشت تهیه شد و با استفاده از لام گلبول‌شمار (haemocytometer)، سوسپانسیون با رقت 2×10^6 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد. هر سری از گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های دو هفته‌ای مجموعه ارقام افتراقی نخود با استفاده از پاشش دستی سوسپانسیون هر یک از جدایه‌های قارچ به طور یکنواخت تا مرحله ریزش اولین قطره از سطح برگ (run-off)، اسپور پاشی شد. برای هر گلدان ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچ استفاده شد. پس از اسپورپاشی هر گلدان با سرپوش‌های فایبرگلاس پوشش داده شد و گلدان‌ها در دمای ۱۸-۲۲ درجه سلسیوس و ۱۲-۱۴ ساعت نور طبیعی روز نگهداری شدند. رطوبت نسبی در زیر سرپوش‌ها ۹۵-۱۰۰ درصد بود. در عین حال دستگاه رطوبت‌ساز هم این رطوبت را در طول این مدت فراهم نمود. در روز ششم سرپوش‌های فایبرگلاس برداشته شد و گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط نور، دما و رطوبت طبیعی قرار گرفتند.

ارزیابی واکنش ارقام افتراقی نخود مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Ascochyta rabiei*:

عکس‌العمل هفت رقم افتراقی نخود در مقابل ۳۰ جدایه قارچ *Ascochyta rabiei*، ۱۵ روز پس از مایه‌زنی گیاهچه‌ها، هنگامی که گیاهچه‌های رقم حساس مرگ کامل را نشان دادند، ارزیابی شد. شدت بیماری با استفاده از شاخص نه درجه‌ای (۱-۹) (Jan and Wiese (1991) که در واقع فرم بهبود یافته شاخص نه درجه‌ای پیشنهاد شده (Reddy and Nene (1979) است، ثبت گردید. به اینصورت که درجه یک بدون علائم بیماری و درجه نه از بین رفتن حدود ۱۰۰٪ گیاهان می‌باشد.

گروه‌بندی بیماری‌زایی جدایه‌ها: عکس‌العمل قابل مشاهده میزبان-عامل بیماری‌زا، بر

اساس اندازه حساسیت و یا مقاومت میزبان و یا میزان بیماری‌زایی عامل بیماری می‌تواند جهت ارزیابی و گروه‌بندی شدت بیماری‌زایی استفاده شود (Halfon-meiri, 1970). تیپ آلودگی هم بر اساس علائم بیماری (مانند کلروز و نکروز) پایه‌گذاری شده است. روش‌های مورد استفاده توسط محققین مختلف جهت مطالعه تنوع بیماری‌زایی قارچ از نظر درجه‌بندی شدت بیماری و دسته‌بندی درجات ثبت شده متفاوت است. در تحقیق حاضر، از دو شیوه جهت گروه‌بندی جدایه‌ها استفاده گردید. در روش اول از شیوه ارزیابی ۹-۱ پیشنهاد شده توسط (Jan and Wiese, 1991) استفاده شد. در بررسی‌های انجام شده در ایکاردا از این شاخص جهت ارزیابی شدت بیماری آسکوکیتا استفاده شده است. در نهایت با اصلاح این شیوه، درجات آلودگی ۳-۱ به عنوان مقاوم (Low virulent) و درجات ۹-۳/۱ به عنوان حساس (High virulent) در نظر گرفته شد. در روش دوم جهت سهولت مقایسه ارتباط بین فاکتور بیماری‌زایی با میزان تنوع ژنتیکی مولکولی در *A. rabiei*، از روش ضریب تشابه (Nei, 1973) استفاده گردید. در نهایت پس از بدست آمدن ضریب تشابه Nei، با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc و برنامه UPGMA، دندروگرام مربوط به این ماتریس ترسیم گردید.

بررسی‌های مولکولی:

تکثیر جدایه‌های قارچی و استخراج DNA (DNA extraction): تکثیر و استخراج DNA جدایه‌های *A. rabiei* بر اساس روش (Raeder and Broda, 1985) با کمی اصلاحات صورت پذیرفت (Mahdavi *et al.*, 2009).

بررسی تنوع ژنتیکی به روش RAPD-PCR: به منظور بررسی اختلاف مولکولی در میان جدایه‌های *A. rabiei* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور، از نه آغازگر تصادفی (UBC519، UBC574، UBC736، UBC772، OPA، OPI، 4s، 16s و 29s) بر اساس مطالعات قبلی با این قارچ بود، استفاده شد. این آغازگرها از بین ۳۰ آغازگر تصادفی، بر اساس تعداد و وضوح باند و همچنین بیشترین پلی‌مورفیسم انتخاب گردیدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) و تکثیر DNA جدایه‌ها توسط دستگاه ترموسایکلر Bio-RAD، مدل iCycler ساخت کشور امریکا بر اساس روش (Mahdavi *et al.*, 2009) انجام شد. به منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌های *A. rabiei* ابتدا داده‌ها به صورت حضور باند (۱) و یا عدم حضور باند (۰) در نرم‌افزار Excel

غیانی و همکاران: بررسی اختلافات بیماری‌زایی و مولکولی در تعدادی از جدایه‌های *Ascochyta rabiei* ...

وارد گردید. با استفاده از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard Coefficient) در برنامه SIMQUAL در نرم‌افزار NTSYS-pc، ماتریس تشابه محاسبه و با استفاده از برنامه SHAN و روش UPGMA، تجزیه خوشه‌ای انجام گردید.

تعیین هاپلوتیپ (فنتوتیپ مولکولی) در *Ascochyta rabiei*: برای تعیین هاپلوتیپ (فنتوتیپ مولکولی)، که درون جمعیت وجود دارند، از روش کولمر استفاده گردید. طبق این روش، هر جدایه از *A. rabiei* با یک فنتوتیپ مولکولی نه رقمی، بر اساس الگوی بانندی هر یک از نه آغازگری که انتخاب شده‌اند، تعیین گردید. بر اساس این نامگذاری، تعداد هاپلوتیپ‌های مختلف در بین جمعیت ممکن گردید (Kolmer et al. 1995).

بررسی ارتباط بین اختلاف مولکولی حاصل از RAPD با تنوع بیماری‌زایی: به منظور مقایسه فاکتور بیماری‌زایی با اختلاف مولکولی، دندوگرام تشابه شدت بیماری‌زایی جفت جدایه‌ها با دندوگرام تشابه RAPD، مقایسه گردید. در نهایت ارتباط بین اختلافات بیماری‌زایی با مولکولی، در جدایه‌های *A. rabiei* ارزیابی گردید.

نتیجه و بحث

تفاوت‌های بیماری‌زایی: اثر متقابل هفت رقم افتراقی نخود با ۳۰ جدایه *A. rabiei* منجر به تشکیل ۱۶ گروه بیماری‌زایی گشت (جدول ۳). گروه نه با دارا بودن پنج جدایه، که دو جدایه متعلق به استان کهگیلویه و بویراحمد (Ar16 و Ar34) و سه جدایه دیگر متعلق به استان آذربایجان شرقی بود (Ar17، Ar18، Ar19)، که به علت بیماری‌زا بودن بر روی همه ارقام افتراقی، بیشترین بیماری‌زایی را داشتند. پس از گروه ۹، گروه بیماری‌زای ۲ شامل جدایه Ar.2 (لرستان) و جدایه Ar.36 (آذربایجان شرقی) و گروه بیماری‌زای ۱۶ شامل جدایه Ar.27 (کرمانشاه) دارای بیشترین شدت بیماری‌زایی بر روی ارقام افتراقی مورد استفاده در این بررسی بودند. گروه بیماری‌زای ۱۲ که شامل جدایه Ar.23 متعلق به استان کرمانشاه می‌باشد، روی دو رقم ILC1929 و ILC5928 بیماری‌زا بود. گروه بیماری‌زای چهار با دارا بودن سه جدایه از استان لرستان شامل جدایه‌های Ar.4، Ar.5 و Ar.6، کمترین بیماری‌زایی را بر روی ارقام افتراقی داشت و تنها بر روی رقم ILC1929 بیماری‌زا بودند. بنابراین به نظر می‌رسد که

جدایه‌های استان آذربایجان شرقی دارای بیشترین قدرت بیماری‌زایی و اکثر جدایه‌های استان لرستان دارای کمترین قدرت بیماری‌زایی بودند. گروه بیماری‌زای ۵ و ۹، هر گروه با دارا بودن ۵ جدایه، بیشترین فراوانی را در بین گروه‌های بیماری‌زا داشتند. گروه‌های ۴ و ۷ هر یک دارای ۳ جدایه، گروه‌های بیماری‌زای ۱ و ۲ هر یک دارای ۲ جدایه و سایر گروه‌ها تنها دارای یک جدایه بودند. با مقایسه واکنش ارقام افتراقی در برابر جدایه‌های مختلف *A. rabiei* به کار رفته در این بررسی، بیشترین شدت بیماری‌زایی روی رقم ILC-1929 و کمترین شدت بیماری‌زایی روی رقم ILC-72 مشاهده شد. همچنین رقم افتراقی ILC-1929 به عنوان حساس‌ترین، و رقم ILC-7 به عنوان مقاوم‌ترین رقم در این بررسی ظاهر شد که احتمالاً مقاومت رقم مذکور به دلیل وجود ژن‌های مقاومت در ژرم پلاسما این رقم می‌باشد (Imtiaz et al. 2008). تا به حال تلاش‌های زیادی جهت بررسی و گروه‌بندی بیماری‌زایی جدایه‌های *A. rabiei* صورت گرفته است که همگی حاکی از تنوع زیاد جدایه‌های این بیمارگر در مناطق مختلف می‌باشد. در ایران نیز تلاش‌هایی جهت گروه‌بندی بیماری‌زایی و شناسایی پاتوتیپ‌های مختلف به منظور انتخاب ارقام مقاوم صورت گرفته است. بطوری‌که طی مطالعه‌ای، ۱۳ فرم بیماری‌زایی و شش نژاد فیزیولوژیکی شناسایی شد و ارقام S96293 و Flip97-43c به عنوان ارقام مقاوم تا متحمل توصیه شد (Shahriari and Izadyar, 2000). طی مطالعه دیگری، ۱۲ گروه بیماری‌زا در میان ۳۰ جدایه مورد بررسی از استان کرمانشاه شناسایی گردید (Younessi et al. 2003). در بررسی حاضر ۳۰ جدایه *A. rabiei* جمع‌آوری شده از پنج استان مختلف کشور، با مایه زنی بر روی هفت رقم افتراقی و یک رقم حساس محلی (بیوه‌نیچ) در قالب ۱۶ گروه بیماری‌زا تفکیک شدند. در این بررسی، به دلیل اینکه هنوز رابطه ژن برای ژن (gene for gene) در بین جدایه‌های *A. rabiei* در پرده ابهام است (Akem, 1999)، و هنوز یک سیستم دقیق استاندارد برای تعیین نژادهای فیزیولوژیک این قارچ معرفی نشده و در هر مکان ارقام افتراقی نخود و شرایط و روش‌های آزمایشی مورد استفاده برای بررسی نژادهای فیزیولوژیک متفاوت می‌باشد، لذا از کاربرد واژه نژاد در مورد ۱۶ گروه بیماری‌زای شناسایی شده خودداری گردیده است. در بین گروه‌هایی که بیشترین شدت بیماری‌زایی را داشتند، همه جدایه‌های استان آذربایجان شرقی، دو جدایه از استان کهگیلویه بویراحمد، یک جدایه از استان کرمانشاه و یک جدایه از استان لرستان وجود

داشت. با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق، می‌توان جدایه‌های استان آذربایجان شرقی را به عنوان بیماری‌زاترین و جدایه‌های استان لرستان را به عنوان غیربیماری‌زاترین جدایه‌های مورد بررسی ذکر کرد. از جدایه‌های با بیماری‌زایی زیاد، می‌توان جهت برنامه‌های اصلاحی معرفی ارقام مقاوم استفاده نمود. با توجه به اینکه ارقام افتراقی مورد استفاده در این تحقیق مطابق ارقام افتراقی (Singh, 1990) می‌باشد که از آنها جهت تعیین نژاد جدایه‌های جمع‌آوری شده از سوریه و لبنان استفاده شده بود، با مقایسه این دو گروه‌بندی می‌توان گفت که گروه بیماری‌زای چهار مطابق نژاد یک، گروه بیماری‌زای هفت مطابق نژاد دو، گروه بیماری‌زای پنج مطابق نژاد سه، گروه بیماری‌زای ۱۱ مطابق نژاد چهار و گروه بیماری‌زای نه مطابق نژاد شش معرفی شده توسط سینگ می‌باشد.

نتایج RAPD: الگوی بانندی تولید شده توسط جدایه‌های *A. rabiei* با استفاده از نه آغازگر تصادفی RAPD، از تکرار پذیری و پلی مورفیسم بالایی برخوردار بودند. تعداد قطعه‌های DNA تکثیر شده توسط هر آغازگر از پنج تا ۱۳ متفاوت بود (جدول ۱). تمامی جدایه‌های *A. rabiei* حداقل یک تا هفت قطعه مشترک تکثیر نمودند که وزن آن‌ها بین ۵۰۰ bp تا ۵۰۰۰ bp متفاوت بود. با وجود اینکه بیشترین قطعه تکثیر شده در این واکنش توسط آغازگر UBC-736 بود، اما بیشترین قطعه‌های چندشکل توسط آغازگرهای UBC-574 و UBC-772 تولید شد (شکل ۱). ارتباط فیلوژنتیکی بین ۳۰ جدایه *A. rabiei* محاسبه گردید و شجره مربوطه نیز ترسیم گردید (شکل ۲). بر اساس شجره فیلوژنتیکی در سطح تشابه ۷۵٪ و با استفاده از ضریب تشابه Jaccard، جدایه‌ها در قالب نه گروه (H-I) جای گرفتند. گروه B با دارا بودن ۱۶ جدایه که عمدتاً متعلق به استان‌های لرستان و کرمانشاه بودند، بیشترین تعداد ژنوتیپ را در خود جای داد. پس از آن گروه‌های C، E و A به ترتیب با دارا بودن ۴، ۳ و ۲ جدایه، بزرگ‌ترین گروه‌ها بودند. جدایه‌های گروه A و C به ترتیب متعلق به استان‌های لرستان و کرمانشاه بودند. هیچ یک از گروه‌های D، F، G، H و I زیرگروه نداشتند و هر یک با دارا بودن یک جدایه تشکیل یک شاخه مجزا دادند. جدایه‌های Ar23 و Ar24 که هر دو متعلق به استان کرمانشاه بودند، بیشترین شباهت ژنتیکی (بیش از ۹۴٪) را با یکدیگر داشتند و احتمالاً منشأ والدی یکسانی دارند.

جدول ۱- توالی نه آغازگر مورد استفاده در واکنش RAPD-PCR و تعداد قطعه‌های

تولید شده و چند شکلی، در بررسی تنوع ژنتیکی *Ascochyta rabiei*

Table 1. Sequence of nine random decamer primers and the number of polymorphic and monomorphic fragments produced by each primer, used for RAPD analysis of *Ascochyta rabiei*

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer sequences	تعداد کل باندها No. of bands	باندهای مشترک Common bands	باندهای دارای چند شکلی Polymorphic Bands
OPA-02	5'-TGC CGA GCT C-3'	5	2	3
OPI-01	5'-ACC TGG ACA C-3'	10	5	5
UBC519	5'-ACC GGA CAC T-3'	6	2	4
UBC574	5'-GCC AGA CAA G-3'	8	2	6
UBC736	5'-GAG GGA GGA G-3'	13	8	5
UBC772	5'-CCC ACC ACC C-3'	5	1	4
4S	5'-CCT GGG GTG G-3'	7	4	3
16S	5'-GGT GGC GGG A-3'	10	9	1
29S	5'-CCG GCC TTA C-3'	10	3	7

جدول ۲- گروه‌های هاپلوتیپی شناسایی شده بر اساس فراوانی آلل‌های مشترک با

استفاده از نه آغازگر RAPD در میان جدایه‌های *Ascochyta rabiei*

Table 2- Haplotype groups identified among *Ascochyta rabiei* by nine RAPD primers based on frequencies of the most common allele among *Ascochyta rabiei* isolates.

تعداد در مناطق Number in province	تعداد در بین جمعیت Number in population	فنوتیپ مولکولی Molecular Phenotype (Haplotype)	گروه‌های هاپلوتیپی Haplotype groups
2 ^b (1) ^a , 3(3), 4(1), 5(7)	12	111111111	HP1
5(2), 4(2)	4	111121111	HP2
5(1), 3(3)	4	111111112	HP3
4(3), 2(1), 1(2)	6	111111121	HP4
1(1)	1	111121131	HP5
3(1)	1	111111211	HP6
3(1)	1	111111213	HP7
4(1), 2(2)	3	111111131	HP8
2(1)	1	111112211	HP9
4(1)	1	111312131	HP10
1(1)	1	111111231	HP11
1(1)	1	111111215	HP12

a: اعداد خارج از پرانتز مربوط به مناطق جمع‌آوری جدایه‌ها است. یعنی ۱= آذربایجان شرقی، ۲= ایلام، ۳= کرمانشاه، ۴= کهگیلویه و بویراحمد و ۵= لرستان است.

b: اعداد داخل پرانتز نشانگر تعداد جدایه‌های متعلق به آن منطقه می‌باشد.

a: The number out of parenthesis refers to the location (province) of the isolates. Includes: 1= East-Azərbayjan, 2= Ilam, 3= Kermanshah, 4= Kohkiluyeh-Buyerhamad, 5= Lorestan

b: the number inside the parenthesis refers to the abundance of the isolates of each location.

جدول ۳- گروه‌های بیماری‌زا در بین ۳۰ جدایه *A. rabiei* بر اساس واکنش آن‌ها روی هفت رقم افتراقی نخود

Table 3. Pathotype groups identified among 30 isolates of *Ascochyta rabiei* by testing them on seven differential chickpea lines

ارقام افتراقی نخود							گروه‌های بیماری‌زا Pathotype group	جدایه‌ها Isolates (Ar.)
Differential chickpea lines								
ILC 194	ILC 5928	ILC 202	ILC 72	ILC 1929	ICC 3996	PCH 15		
L	H	L	L	H	L	H	1	1, 29
H	H	H	L	H	H	H	2	2, 36
L	L	H	L	H	H	H	3	3
L	L	L	L	H	L	L	4	4, 5, 6
H	H	L	L	H	L	H	5	7, 9, 11, 14, 31
H	H	H	L	H	L	H	6	8
H	L	L	L	H	L	H	7	10, 22, 32
H	L	H	H	H	L	H	8	13
H	H	H	H	H	H	H	9	16, 17, 18, 19, 34
L	H	H	L	H	L	H	10	20
H	H	L	L	H	H	H	11	21
L	H	L	L	H	L	L	12	23
H	H	L	L	H	L	L	13	24
H	L	L	H	H	L	L	14	25
H	L	H	L	H	L	H	15	26
H	H	H	H	H	L	H	16	27

H: high virulence, L: low virulence

H: بیماری‌زایی زیاد، L: بیماری‌زایی کم

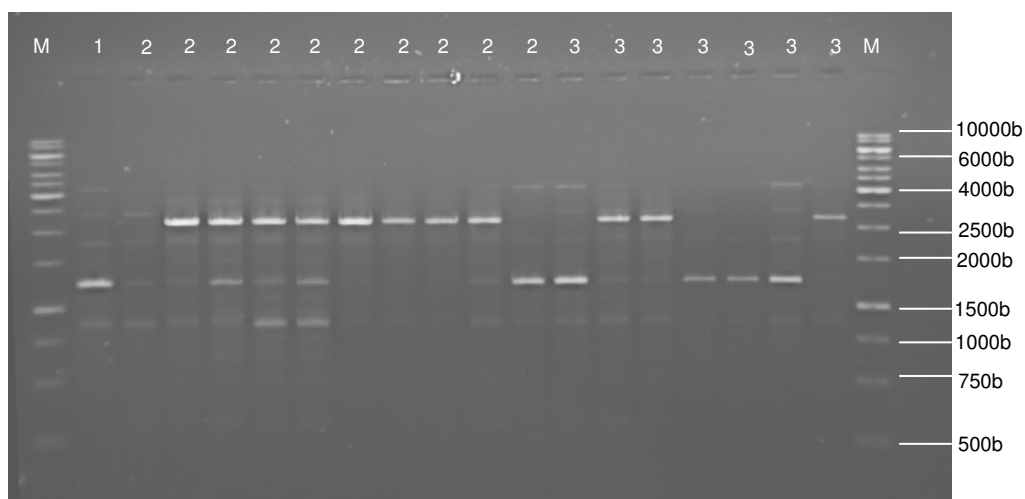
تعیین هاپلوتیپ (فنتوتیپ مولکولی): با استفاده از روش کولمر (Kolmer, 1995)، تعداد ۱۲ گروه هاپلوتیپ مختلف در کل جمعیت نمونه‌های مورد بررسی شناسایی گردید (جدول ۲). این هاپلوتیپ‌ها بر اساس فراوانی آلل‌های مشترک بدست آمده با استفاده از نه آگارگر RAPD شناسایی گردیدند. هاپلوتیپ‌ها به طور تصادفی در میان مناطق مختلف نمونه برداری توزیع شده بودند. در استان آذربایجان شرقی از بین پنج جدایه مورد بررسی، چهار هاپلوتیپ شناسایی گردید که دو جدایه دارای هاپلوتیپ مشابه بودند و در گروه HP4 قرار گرفتند. در استان ایلام از بین پنج جدایه مورد بررسی، چهار هاپلوتیپ شناسایی گردید که دو جدایه دارای هاپلوتیپ مشابه بودند و در گروه HP8 قرار گرفتند. در استان لرستان از بین ۱۰ جدایه مورد بررسی، سه هاپلوتیپ شناسایی گردید که هفت جدایه دارای هاپلوتیپ مشابه بودند و در گروه HP1 قرار گرفتند و دو جدایه دیگر در گروه HP2 قرار گرفتند. در استان کرمانشاه از بین هشت جدایه مورد بررسی، چهار هاپلوتیپ شناسایی شد که سه جدایه با هاپلوتیپ مشابه در

گروه HP1، سه جدایه دیگر نیز با هاپلو تیپ مشابه در گروه HP3 قرار گرفتند و دو جدایه دیگر، هر یک به شکل مجزا در یک گروه هاپلو تیپی قرار گرفتند. در استان کهگیلویه و بویراحمد نیز از بین هشت جدایه مورد بررسی، پنج هاپلو تیپ شناسایی شد که سه جدایه با هاپلو تیپ مشابه در گروه HP4، دو جدایه دیگر نیز با هاپلو تیپ مشابه در گروه HP2، و بقیه به شکل مجزا در سه گروه هاپلو تیپی دیگر قرار گرفتند.

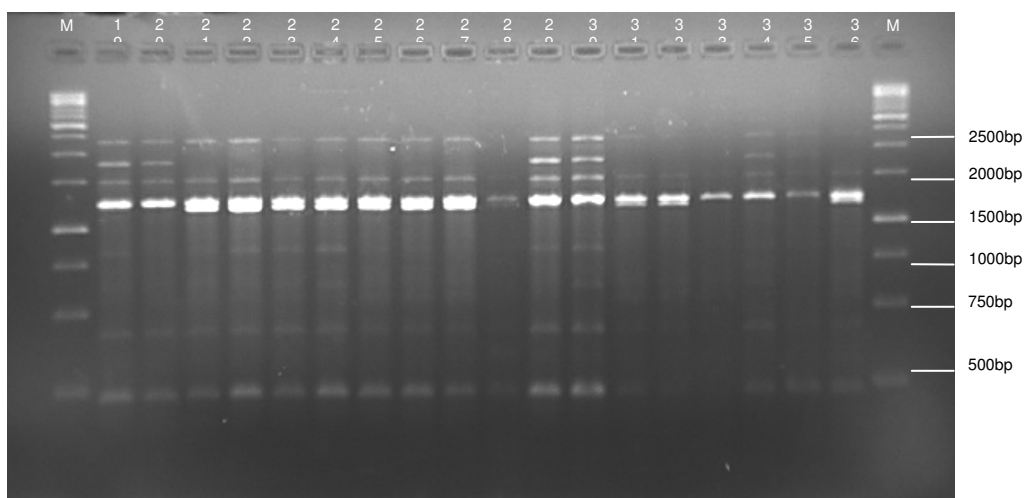
هاپلو تیپ HP1 با داشتن ۳۳/۳ درصد فراوانی، هاپلو تیپ غالب بود و در چهار استان (ایلام، کرمانشاه، لرستان و کهگیلویه و بویراحمد) پراکنده بود. هاپلو تیپ‌های HP4 با ۱۶/۷، HP2 و HP3 هر یک با ۱۱/۱ درصد و HP8 با ۸/۳ درصد، بیشترین فراوانی را داشتند. فراوانی بقیه هاپلو تیپ‌ها ۲/۷ درصد بود که در این گروه‌ها تنها یک جدایه قرار گرفت (جدول ۲).

ارتباط بین تنوع مولکولی و بیماری‌زایی: در دندروگرام ترسیم شده بر اساس داده‌های بیماری‌زایی، جدایه‌ها به دو گروه عمده با بیماری‌زایی کم (I) و بیماری‌زایی زیاد (II) تقسیم شدند. به طوریکه گروه‌های بیماری‌زای ۴ و ۱۲ که در روش اول (جدول ۳) به عنوان گروه‌های با کمترین بیماری طبقه‌بندی شده بودند، در این دندروگرام در بالا و در گروه (I) قرار گرفتند. گروه بیماری‌زای ۹ (به استثنای جدایه Ar.19) و گروه‌های ۲ و ۱۶ که دارای بیشترین شدت بیماری‌زایی بودند، در پایین دندروگرام و در گروه (II) قرار گرفتند. بنابراین دندروگرام (شکل ۳) به طور مؤثری جدایه‌های *A. rabiei* را از لحاظ بیماری‌زایی از یکدیگر تفکیک نموده است. بر اساس داده‌های مولکولی (شکل ۲)، جدایه‌های Ar.23 و Ar.24 بیشترین شباهت ژنتیکی (۹۴٪) را با یکدیگر دارند در حالیکه در دندروگرام بیماری‌زایی این شباهت تنها ۶۹٪ می‌باشد. از سوی دیگر جدایه‌های Ar.1 و Ar.36 که به ترتیب متعلق به استان‌های لرستان و آذربایجان شرقی بودند، دارای تشابه مولکولی (۵۴٪) و بیماری‌زایی (۳۱٪) کمی بودند. به طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. rabiei* در ایران (در ۵ استان مورد بررسی) نسبتاً زیاد است و بایستی عوامل مؤثر در ایجاد و گسترش آن بررسی شود. با توجه به الگوی پراکنش هاپلو تیپ‌ها در استان‌های مورد بررسی می‌توان پیشنهاد نمود که آسکوسپورهای هوازاد، بیشترین نقش را به عنوان منبع اولیه زادمایه *A. rabiei* داشته است.

غیائی و همکاران: بررسی اختلافات بیماری‌زایی و مولکولی در تعدادی از جدایه‌های *Ascochyta rabiei* ...



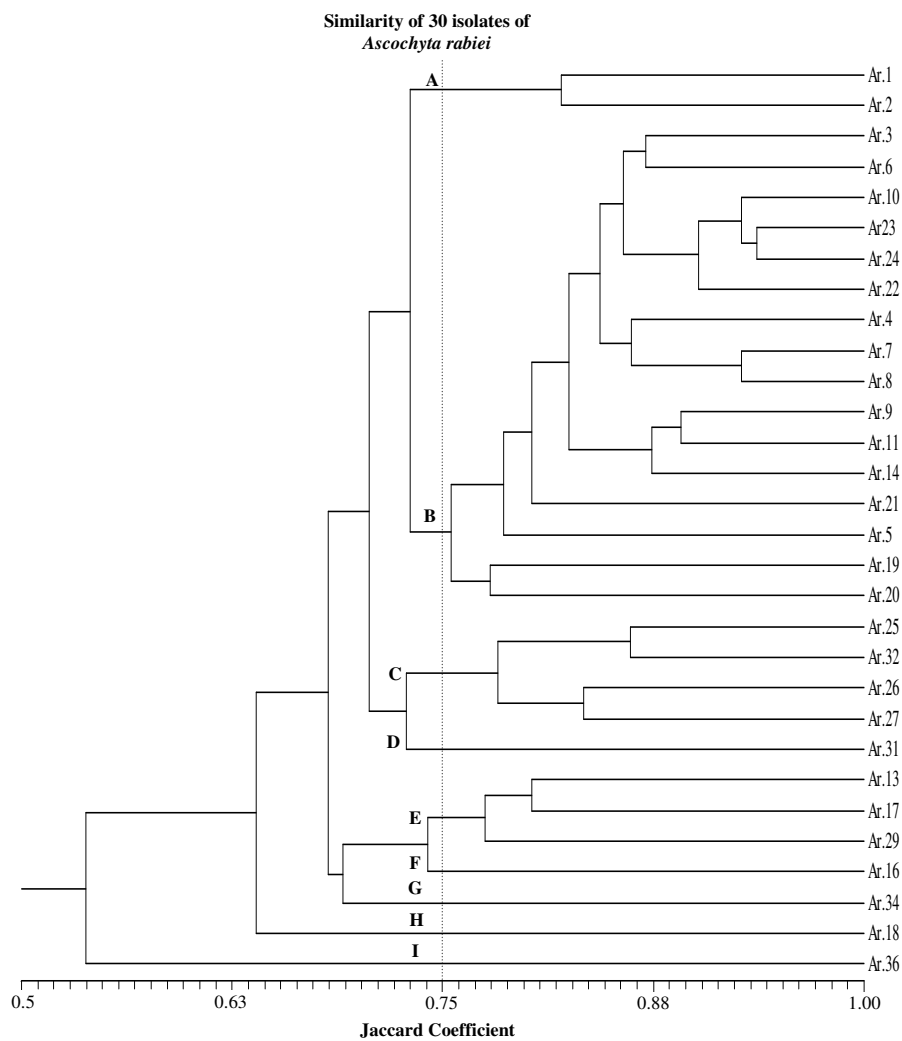
UBC-772



UBC-574

شکل ۱- نقوش الکتروفورزی حاصل از انگشت نگاری DNA به روش RAPD در بین تعدادی از جدایه‌های *Ascochyta rabiei* با استفاده از آغازگرهای UBC-772 و UBC-574 در ژل آگارز ۱/۲ درصد (اعداد درج شده در بالای شکل، مربوط به شماره جدایه و ستون اول و آخر مربوط به مارکر استاندارد 1kb می‌باشد)

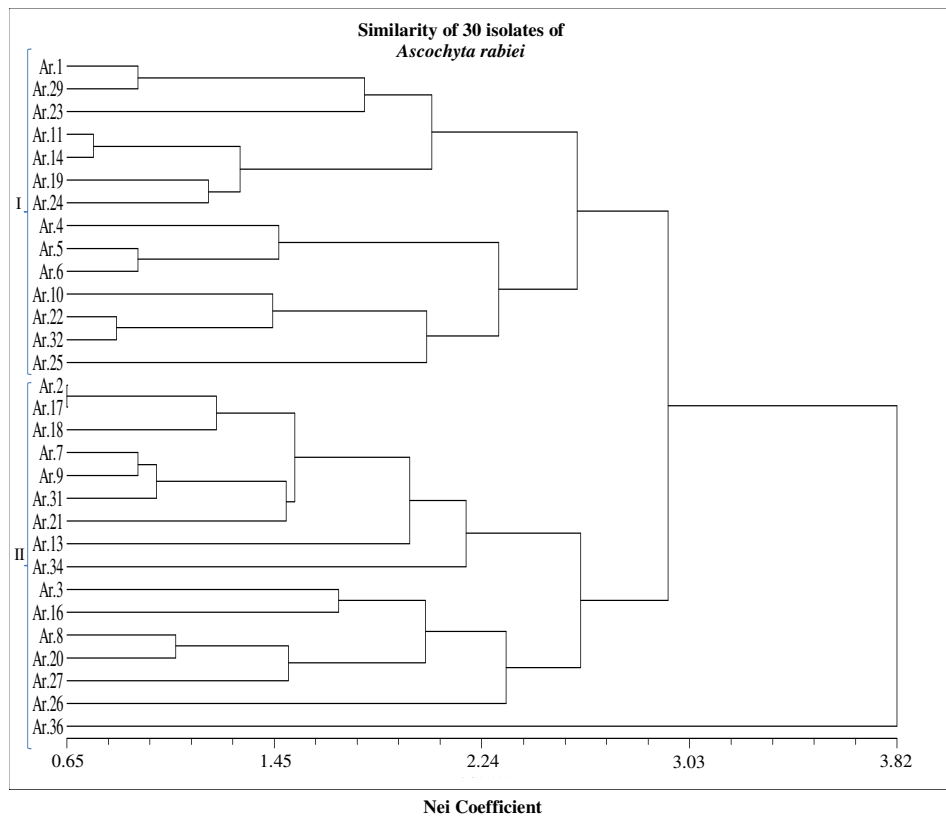
Fig. 1. Electrophoretic analysis of RAPD products of some representative isolates of *Ascochyta rabiei* after amplification with UBC-772 and UBC-574. The M lane in all analyses is a 1kb DNA ladder



شکل ۲- دندروگرام تشابه ۳۰ جدایه مختلف *Ascochyta rabiei* بر اساس آنالیز RAPD با استفاده از برنامه UPGMA و ضریب تشابه Jaccard (خط عمود نشانگر میانگین تشابه جدایه‌های *A. rabiei* جمع‌آوری شده از استان‌های آذربایجان شرقی، ایلام، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد و لرستان می‌باشد)

Fig. 2. Dendrogram of similarity of 30 isolates of *Ascochyta rabiei* collected from East-Azərbayjan, İlam, Kermanshah, Lorestan and Kohkiluyeh-Boyerahmad provinces of Iran based on RAPD analysis. The UPGMA algorithm of SAHN program of NTSYS-pc and the similarity coefficient of Jaccard was used for cluster analysis. The vertical dotted line is the average similarity of the population

غیائی و همکاران: بررسی اختلافات بیماری‌زایی و مولکولی در تعدادی از جدایه‌های *Ascochyta rabiei* ...



شکل ۳- دندروگرام گروه‌بندی جدایه‌های *Ascochyta rabiei* جمع‌آوری شده از پنج استان آذربایجان شرقی، ایلام، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد و لرستان، بر اساس بیماری‌زایی بر روی هفت رقم افتراقی با استفاده از ضریب تشابه Nei

Fig. 3. Dendrogram resulting from cluster analysis of *Ascochyta rabiei* collected from East-Azərbayjan, İlam, Kermanshah, Lorestan and Kohkiluyeh-Boyerahmad provinces of Iran based on their virulence test on seven differential chickpea cultivars/lines, using coefficient of Nei

گزارش‌هایی مبنی بر وجود تولیدمثل جنسی از برخی استان‌های کشور نیز تأییدی بر نظریه مذکور می‌باشد (Kaiser and Okhovat 1996; Mahmudi and Banhashemi, 2004).

نتیجه بررسی حاضر نشان داد که ارتباط نسبتاً ضعیفی بین تنوع بیماری‌زایی و مولکولی *A. rabiei* وجود دارد. برخی جدایه‌ها که دارای رفتار بیماری‌زایی مشابهی بودند، از لحاظ مولکولی تفاوت زیادی داشتند. بنابراین چنین می‌توان استنباط نمود که خصوصیات مذکور مستقل از یکدیگر می‌باشند. در گذشته نیز تلاش‌هایی جهت کشف رابطه بین خواص مورفولوژیکی و اسپورزایی و بیماری‌زایی *A. rabiei* صورت پذیرفته است (Singh, 1990). مطالعات مشابه دیگری بر روی این قارچ نشان داده شد که نشانگرهای DNA ارتباطی با فرم‌های بیماری‌زایی ندارند (Ahmed et al., 2007; Chang et al., 2008). گرچه به عقیده عده‌ای از محققین، نتیجه مذکور به دلیل تولیدمثل جنسی مکرر این قارچ می‌باشد (Peever et al., 2004). در این بررسی تلاش شد تا با بررسی مولکولی و گلخانه‌ای جدایه‌های *A. rabiei* جدا شده از پنج استان کشور، الگویی از شرایط ژنتیکی و شدت بیماری‌زایی این قارچ در مناطق مورد بررسی بدست آید تا بتوان از این اطلاعات در تولید و معرفی ارقام مقاوم متناسب با هر منطقه استفاده نمود. با توجه به نتایج بدست آمده از جدایه‌هایی با قدرت بیماری‌زایی زیاد می‌توان در برنامه‌های اصلاح استفاده نمود. همچنین با توجه به وجود تفاوت‌های ژنتیکی زیاد در بین جدایه‌ها، احتمال شکسته شدن سریع منابع مقاومت دور از انتظار نیست و لازم است از ارقامی که دارای مقاومت چندژنی و غیر وابسته به نژاد می‌باشند، در جهت مدیریت این بیماری استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات که امکانات لازم جهت اجرای این پژوهش را فراهم نمودند تشکر می‌شود. همچنین از زحمات آقایان مهندس خشنود نوراللهی، مهندس حسن یونسی و مهندس حمیدرضا پورعلی بابا جهت کمک در جمع‌آوری

گیاهی و همکاران: بررسی اختلافات بیماری‌زایی و مولکولی در تعدادی از جدایه‌های *Ascochyta rabiei* ...

نمونه‌های قارچی قدردانی می‌گردد*.

منابع

- AHMED, H. U., K. F. CHANG, S. F. HWANG and R. J. HOWARD, 2007. Pathogenic diversity of *Didymella rabiei* isolates from southern Alberta, Canada. *Plant Dis. Protect* 114: 189-195.
- AKEM, C. 1999. Ascochyta blight of chickpea: Present status and future priorities. *International Journal of Pest Management* 45: 131-137.
- CHANG, K. F., S. F. HWANG, A. H. KHADHAIR, H. U. AHMED, S. E. STRELKOV, M. DEYHOLOS, G. D. TURNBULL and J. FENG, 2008. Molecular diversity of *Ascochyta rabiei* isolates from chickpea in Alberta, Canada. *Plant Pathology* 7: 20-26.
- CHEN, W., C. J. COYNE, T. L. PEEVER and F. J. MUEHLBAUR, 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant Pathology* 53: 759-769.
- HALFON-MEIRI, A. 1970. Infection of chickpea seed by *Ascochyta rabiei* in Israel. *Plant Disease* 54: 442-446.
- IMTIAZ, M., M. MATEME, K. HOBSON, M. VAN GINKLE, and R. S. MALHOTRA, 2008. Molecular genetic diversity and linked resistance to ascochyta blight in Australian chickpea breeding materials and their wild relatives. *Australian journal of agricultural research*, 59: 554-560.
- JAMILET, M. and B. RICARDO, 2000. Analysis of DNA microarray data. Part I: Technological background and experimental design. *Biotechnologia Aplicada* 2008. 25: 90-96.
- JAN, H. and M. W. WIESE, 1991. Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting chickpea in the Palouse. *Plant Disease* 75: 904-906.
- JAYAKUMAR, P., B. D. GOSEN, Y. T. GAN, T. D. WARKENTIN and S. BANNIZA, 2005. Ascochyta blight of chickpea: Infection and host resistance mechanisms. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 499-509.

*نشانی نگارندگان: مهندس سیمین غیائی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران؛ دکتر محمد رضوی و مهندس داریوش شهریاری، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران، ایران.

- KAISER, W. J. and M. OKHOVAT, 1996. Distribution of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 32: 158-162.
- KOLMER, J. A., J. Q. LIU and M. SIES, 1995. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia reconditae* f. sp. *tritici* in Canada. Phytopathology 85: 276-285.
- MAHDAVI, M., M. RAZAVI, K. SHARIFI and R. ZARE, 2009. Investigation on genetic diversity of *Fusarium oxysporum* causing potato fusarium wilt by pathogenicity tests and RAPD markers. Iranian Journal of Plant Pathology 45: 9-24.
- MAHMUDI, F. and Z. BANIHASHEMI, 2004. Formation of sexual form, distribution of mating types and genetic variability of *Didymella rabiei*, causal agent of chickpea blight in Fars province. Iranian Journal of Plant Pathology 40: 15-30.
- MCDONALD, B. A. and C. LINDE, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annual Review of Phytopathology 40: 349-379.
- MCDONALD, B. A. and J. M. MCDERMOTT, 1993. The population genetics of plant pathogenic fungi. BioScience 43: 311-319.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- NOUROLLAHI, K., M. JAVANNIKKHAH, M. R. NAGHAVI, J. LICHTENZVEIG, S. M. OKHOVAT, R. P. OLIVER and S. R. ELLWOOD, 2010. Genetic diversity and population structure of *Ascochyta rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces using MAT and SSR markers. Mycological progress 10: 127-133.
- PEEVER, T. L., S. S. SALIMATH, G. Su, W. J. KAISER and MUEHLBAUER, F. J. 2004. Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. Molecular Ecology 13: 291-309.
- PRADHAN, P. 2006. Studies of *Ascochyta rabiei* in Australia. MSC thesis, University of Melbourne. Pp 1-120.
- RAEDER, P. and A. BRODA, 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology 1: 17-20.
- REDDY, M. V. and Y. L. NENE, 1979. A case for Induced Mutation in Chickpea for *Ascochyta* Blight Resistance. Pp. 398-408 In: Proce. Symp. Role Induced Mutant. Crop Improve. Osmania University, Hyderabad, India.

- SHAHRIARI, D. and M. IZADYAR, 2000. Virulence groups of *Ascochyta rabiei* on chickpea cultivars of Iran. 14th Iranian Plant Protection Congress Pp. 82.
- SHOKUHIFAR, F., A. BAGHERI and M. FALAHATI RASTEGAR, 2003. Study of genetic diversity of chickpea blight [*Ascochyta rabiei* (Passs.) Lab.] of Iran, using RAPD markers. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 2: 193-203.
- SINGH, G. 1990. Identification and designation of physiological races of *Ascochyta rabiei* in India. Indian Phytopathology 43: 48-52.
- TALEEI, A., H. KANOUNI and M. BAUM, 2010. Genetical studies of *Ascochyta* blight resistance in chickpea. International Journal of Bio-Science and Bio-Technology 2: 19-28
- UDUPA, S. M., F. WEIGAND, M. C. SAXENA and G. KAHL, 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea. Theoretical and Applied Genetics 97: 299-307.
- VIR, S. and J. S. GREWAL, 1974. Physiologic specialization in *Ascochyta rabiei*, the causal organism of gram blight. Indian Phytopathology 27: 355-360.
- WILLIAMS, J. G., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAC, J. A. RAFALSKI and S. V. TINGEY, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. Nucleic Acids Research 18: 6631-6635.
- YOUNESSI, H., S. M. OKHOVVAT, G. A. HADJAROUDE, S. J. ZAD, A. R. TALEI and M. ZAMANI, 2003. Virulence variability of *Ascochyta rabiei* isolates on chickpea cultivars in Kermanshah province. Iranian Journal of Plant Pathology 39: 213-230.

Address of the authors: Eng. S. GHIAI, Islamic Azad University, Science and Research Branch; Dr. M. RAZAVI and Eng. D. SHAHRIYARI, Iranian Research Institute of Plant Protection, P. O. Box 1454, Tehran, Iran.