مجله دانش گياهپزشكي ايران
دوره ۴۰, شماره ۲، ۱۳۸۸ (۱۳-۱)

شناسايي مولكولي، بررسي تنوع ژنتيكي و اختصاصي بودن ميزبان جدايه‌هاي ايراني *Macrophomina phaseolina*

ولي‌اله مهدي‌زاده[۱]، ناصر صفايي[۲]*، ابراهيم محمدي گل‌تپه[۳]،
نتهازلكوبتل مايک پرز[۴] و محمدعلي آقاجاني[۵]
۱، ۲، ۳، دانشجوي كارشناسي ارشد، دانشيار و استاد، دانشكده كشاورزي دانشگاه تربيت مدرس،
۴، مركز ملي بيوتكنولوژي مكزيک، ۵، استاديار، مركز تحقيقات كشاورزي و منابع طبيعي گرگان
(تاريخ دريافت: ۸۸/۸/۵ - تاريخ تصويب: ۸۸/۱۲/۲۳)

چكيده

فارچ ماكروفومينا يک بيمارگر خاک‌زاد و عامل بيماري پوسيدگي ذغالي، با پراكنش جهاني و دامنه ميزباني بيش از ۵۰۰ گونه گياهي مي‌باشد. جهت بررسي تنوع ژنتيكي و اختصاصيت ميزباني اين فارچ در ايران از گياهان داراي علايم و نشانه‌هاي بيماري از استان‌هاي تهران، قزوين، گرگان، سمنان، خراسان، همدان، آذربايجان شرقي، زنجان، خوزستان، مركزي، فارس،كهكيلويه و بوير احمد، اصفهان، يزد، كرمان و هرمزگان طي سال‌هاي ۸۶ و ۸۷ نمونه‌برداري شد. پس از جداسازي و خالص سازي فارچ، ۵۲ جدايه از ۲۴ ميزبان و از ۱۲ استان جداسازي و با استفاده از خصوصيات ظاهري و آغازگر اختصاصي گونه شناسايي شدند. تنوع ژنتيكي جدايه‌ها با استفاده از نشانگر ISSR بررسي شد. از ميان ۹ آغازگر مورد استفاده، ۶ آغازگر داري وضوح، تكرارپذيري و تعداد باندهاي پليمورفيک بودند و در آناليزهاي بعدي مورد استفاده قرار گرفتند. تجزيه و تحليل خوشه‌اي داده‌هاي حاصل از الگوي باندي مربوط به تلفيق آغازگرها با استفاده از ضريب تشابه جاكارد و روش UPGMA، در سطح تشابه۶۰ درصد، جدايه‌ها را در چهار گروه قرار داد. گروه اول شامل ۵/۷۶ درصد جدايه‌ها شامل جدايه‌هاي شاهدانه از كاشان و اصفهان بود. گروه دوم شامل۶۸/۵۳ درصد جدايه‌ها بود. هر سه جدايه كيوي، تمام جدايه‌هاي سويا، جدايه خربزه، جدايه زيتون، ذرت و بامیه در كنار هم در داخل اين گروه قرار گرفتند. كنار هم قرار گرفتن همه جدايه‌هاي گلسنان از ميزبان‌هاي ذرت، سورگوم، كيوي، سويا و گل جعفري با ۶۴ درصد تشابه و همچنين جدايه‌هاي قزوين از ميزبان‌هاي كدو و گوجه فرنگي با ۱۰۰ درصد تشابه در اين گروه ممكن است به علت نزديكي منشا جغرافيايي آنها باشد. گروه سوم شامل ۱۳/۴۷ درصد جدايه شامل جدايه‌هاي بقولات و كدوييان و بيشتر از مناطق خشک بودند. دو جدايه ماش كرمان با ۸۸ درصد تشابه در كنار هم داخل اين گروه قرار گرفتند. جدايه‌هاي خيار فم، خيار تهران-كرج، طالبي كاشان، لوبياي قزوين، لوبياي خراسان با ۷۵ درصد تشابه در كنار هم در اين گروه قرار گرفتند. گروه چهارم شامل ۱۹/۲۳درصد جدايه شامل خانواده سيب‌زميني، بقولات و كدوييان بود و فاقد گروه‌بندي جغرافيايي بودند. جدايه طالبي فارس و طالبي خراسان با ۶۰ درصد تشابه و گوجه‌فرنگي فم و بادمجان هرمزگان با ۶۶ درصد تشابه و جدايه‌هاي كنجد كرمان و كنجد كاشان با ۹۰ درصد تشابه و سه جدايه آفتابگردان از مركزي، فارس و خوزستان با ۶۱ درصد تشابه در اين گروه قرار گرفتند. نتايج ما بر اساس اين نشانگر نشان مي دهد كه تنوع ژنتيكي اين فارچ در بين ميزبان‌ها و مكان‌هاي مختلف جغرافيايي زياد است، تا حدي كه در برخي ميزبان‌ها اين اختلاف يا تنوع منجر به اختصاصيت ميزبان شده است به طوري كه مي‌تواند با استفاده از اين نشانگر ردبابي شود.

واژه‌هاي كليدي: تنوع ژنتيكي، پوسيدگي ذغالي، ISSR، ايران.

* نويسنده مسئول: ناصر صفايي تلفن: ۰۹۱۲-۲۶۰۰۵۰۷ E-mail: nsafaie@modares.ac.ir

مقدمه

قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. عامل پوسيدگي ذغالي از مهمترين عوامل بيماري‌زاي گياهان مختلف در مناطق گرم مي‌باشد (Pearson *et al.*, 1986). اين قارچ دامنه ميزباني وسيعي دارد و روي حدود ۷۵ خانواده و بيش از ۵۰۰ گونه گياهي‌شامل ذرت، کنجد، بادام زميني، لوبياي معمولي، سويا و خربزه بيماريزا مي‌باشد (Dhingra & Sinclair, 1973). جنس ماکروفومينا فقط داراي يک گونه *M. phaseolina* مي‌باشد. Crous *et al.* (2006) نشان دادند که اگرچه شکل جنسي ناشناخته است، اما *M. phaseolina* يکي از اعضاي خانواده بوتريوسفرياسه (Botryosphaeriaceae) مي‌باشد. علائم پوسيدگي ذغالي در گياهان جوان شامل ايجاد لکه‌هاي سياه و نامنظم مي‌باشد که از پايه‌هاي لپه‌ها شروع شده و به سمت ساقه‌ها گسترش مي يابد و در نهايت موجب مرگ گياه مي‌شود. گياهان بالغ دچار پژمردگي مي‌شوند و سيستم آوندي به دليل توليد ميکرواسکلروت، تيره يا خاکستري مي‌شود. علائم مشخص بيماري شامل لکه‌هاي تيره يا خاکستري کشيده روي برگ‌هاي بالغ، تشکيل اسکلروت‌ها برروي ساقه، کاهش توان گياه و نهايتاً کاهش عملکرد مي‌باشد. اسکلروت‌ها در خاک، روي بذرها يا بافت‌هاي آلوده به عنوان زادمايه اوليه مي‌باشند (Abawi & Pastor-Corrales, 1990). بيماري بيشتر در سال‌هاي گرم و خشک خسارت مي‌زند. در برخي مناطق خسارت بيماري ۲۰ تا ۵۰ درصد و يا بيشتر گزارش شده است (Almeida *et al.*, 2003). اين قارچ از آمريکاي شمالي و جنوبي، آسيا، افريقا و اروپا گزارش شده است. با اين وجود، اين بيماري در کشورهاي نيمه‌گرمسيري و گرمسيري داراي اقليم خشک و نيمه‌خشک از نظر اقتصادي مهمتر مي‌باشد (Wrather *et al.*, 2001). بيماري پوسيدگي ذغالي در ايران از پراکندگي جغرافيايي بالايي برخوردار است. اولين بار در ايران از مزارع خربزه اطراف اصفهان در سال ۱۳۴۸ توسط شريف گزارش شده است (Gafarian, 2000) و گزارش‌هاي متعددي از وجود بيماري بر روي گياهان مختلف از جمله پنبه (Hamdollahzadeh, 1991)، سويا (Raeyat Panah, 2002)، کنجد (Golzar, 1989)، سوزني برگان (Mirabolfathi, 1991) و زيتون (Sanei *et al.*, 2005)، کلزا (Afshari Azad, 2008) و کيوي (Aghajani & Safaie, 2008) وجود دارد. از ميزان خسارت اين بيماري در ايران گزارش جامعي وجود ندارد. اين بيماري در نواحي شمالي روي سويا خسارت‌زا مي‌باشد. بر اساس نمونه‌برداري‌هاي انجام شده اين بيماري روي ميزبان‌هاي مختلف در اکثر نقاط ايران وجود دارد و بسته به شرايط آب و هوايي و نوع ميزبان خسارت زا مي‌باشد. علي‌رغم اينکه در حال حاضر فقط يک گونه در اين جنس تشخيص داده شده است، اما تنوع مورفولوژيکي و بيماريزايي در ميان جدايه‌هاي جدا شده از ميزبان‌هاي مختلف مشاهده شده است. همچنين، جدايه‌هاي مختلف از يک گياه ميزبان نيز از نظر اين خصوصيات با هم متفاوت مي‌باشند (Dhingra & Sinclair, 1973). چنين تغييراتي گروه‌بندي جدايه‌ها به فرم مخصوص (*formae speciales*)، زير گونه و يا نژادهاي فيزيولوژيک را دشوار ساخته است (Su *et al.*, 2001).

روش‌هاي مرسوم براي بررسي تنوع *M. phaseolina* شامل بررسي شاخص‌هاي ريخت‌شناسي، فيزيولوژيکي و بيماريزايي مي‌باشند (Suriachandraselvan & Seetharaman, 2000، Mihail & Taylor (1995) گوناگوني بالايي در بيماري‌زايي در ميان جدايه‌هايي از آستراسه، افوربياسه، فاباسه، پواسه پيدا کردند. اين قارچ داراي تنوع بيماريزايي بالا (Manici *et al.*, 1995; Mayek-Perez *et al.*, 2001; Mihail & Taylor, 1995; Miklas *et al.*, 1998; Su *et al.*, 2001) و تنوع مورفولوژيکي بالا (Mayek-Perez *et al.*, 2001; Mihail & Taylor, 1995) مي‌باشد. آغازگرهاي اختصاصي گونه*M. phaseolina* با استفاده از مناطق ITS طراحي شده و شناسايي اختصاصي جدايه‌هاي *M. phaseolina* با استفاده از اين آغازگرها به اثبات رسيده است (Babu *et al.*, 2007). در يک بررسي Mayek-Perez *et al.* (2001) نشان دادند که تفاوت بيماري‌زايي و ژنتيکي بين جدايه‌هاي مکزيکي اين قارچ جمع آوري شده از نواحي گرمسيري يا خشک وجود دارد. همچنين Su *et al.* (2001) پيشنهاد کردند که تخصيص ميزباني ماکروفومينا بر پايه تفاوت فيزيولوژيک، بيماريزايي و ژنتيکي در ميان جدايه‌ها مي‌باشد. تنوع اساس سازگاري،

پايداري و تكامل گونه‌ها و جمعيت‌ها مي‌باشد (Müller-Starck *et al.*, 1992). جمعيت‌هايي با تنوع ژنتيكي بالاتر نسبت به تغييرات شرايط محيطي پايدار تر مي‌باشند. بنابراين بررسي تنوع اولين گام در مديريت يک بيمارگر مي‌باشد. يكي از مهمترين دلايل عدم موفقيت در مديريت بيماري‌هاي گياهي مربوط به ناقص بودن اطلاعات ما در مورد ساختار ژنتيكي جمعيت‌هاي بيمارگر مي‌باشد و بالا بردن اطلاعات در اين زمينه مسلما در اتخاذ روش‌هاي موثر مديريت بيمارگر مفيد خواهد بود. امروزه نشانگرهاي مولكولي ابزارهاي سريع‌تر و مناسب‌تري را براي بررسي تنوع و تمايز زير گروه‌هاي ماكروفومينا فراهم آورده‌اند. از اين روش‌ها مي‌توان به آراف‌ال‌پي[1] (Aghakhani & Dubey, 2009; Almeida *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2001) رپيد[2] (Aboshosha *et al.*, 2007; Aghakhani & Dubey, 2009; Almeida *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2006; Jalali *et al.*, 2009a; Jana *et al.*, 2003; Meena *et al.*, 2006; Omar *et al.*, 2007; Pecina-Quintero *et al.*, 2001; Rajkumar & Kuruvinashetti, 2007;Su *et al.*, 2001; Zade *et al.*, 2009)، اي‌اف‌ال‌پي[3] (Brooker *et al.*, 2008; Mayek-Perez *et al.*, 2001; Pecina-Quintero *et al.*, 2001; Reyes-Franco *et al.*, 2006; Saleh *et al.*, 2009; Vandemark *et al.*, 2000)، يو آر پي- پي‌سي‌آر[4] (Jana *et al.*, 2005b) و رپ-پي‌سي‌آر[5] (Purkayastha *et al.*, 2008) و آي‌اس‌اس‌آر[6] (Jana *et al.*, 2005a; Purkayastha *et al.*, 2008) اشاره كرد. در ايران نيز Jalali *et al.* (2009a) تنوع ژنتيكي جدايه‌هاي سويا از اين قارچ را با استفاده از نشانگر رپيد، آي‌اس‌اس‌آر (Jalali *et al.*, 2009a) و رپ پي‌سي‌آر (Jalali *et al.*, 2009b) بررسي كردند و ارتباط مشخصي بين منشاء جغرافيايي جدايه‌ها و گروه‌هاي حاصل از بررسي تنوع ژنتيكي پيدا كردند. توالي‌هاي ساده تكرار شونده[7] يا ريز ماهواره‌ها[8] توالي‌هاي تكراري و كوتاه (۲ تا ۶ جفت باز) مي‌باشند كه به تعداد زياد در ژنوم موجودات پروكاريوت و يوكاريوتي پراكنده‌اند. آغازگرهاي نشانگر آي‌اس‌اس‌آر با اتصال به اين نواحي تكراري و تكثير ناحيه بين آنها موجب ايجاد باندهاي چند شكلي مي‌شوند. چنين روشي نياز به اطلاع از توالي ژنوم جهت طراحي آغازگرهاي تخصصي ندارد و منجر به تكثير و توليد الگوهاي چند شكلي مي‌شود. هر باند مطابق با يک توالي دي‌ان‌اي است كه توسط مرز دو توالي ميكروستلايتي معكوس مشخص شده است. استفاده از اين روش مانند نشانگر رپيد بسيار سريع و آسان است و به دليل بلندتر بودن طول آغازگرها از تكرارپذيري بيشتري برخوردار است. ايجاد الگوهاي باندي چند شكلي و تكرارپذيري آنها در ميان ارگانيسم‌هاي نزديک، آنها را به عنوان نشانگرهايي حاوي اطلاعات مفيد و با دامنه وسيعي از كاربردها از جمله بررسي تنوع ژنتيكي مطرح كرده است (Zietkiewicz *et al.*, 1994). براي بررسي تنوع ژنتيكي ماكروفومينا جدا شده از سويا و پنبه از هند و ايالات متحده امريكا Jana *et al.* (2005a) از اين نشانگر استفاده كردند و نشان دادند كه اين نشانگر مي‌تواند براي بررسي تنوع ژنتيكي و رديابي اختصاصيت ميزباني آن استفاده شود. هم اكنون اطلاعات زيادي در ارتباط با گوناگوني ژنتيكي و اختصاصيت ميزباني براي جدايه‌هاي *M. phaseolina* از ايران وجود ندارد. با توجه به دامنه ميزباني وسيع و پراكنش جغرافيايي اين قارچ در ايران اين تحقيق با هدف بررسي تنوع ژنتيكي اين قارچ با استفاده از نشانگر ISSR و بررسي اختصاصيت ميزباني آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازي جدايه‌هاي بيمارگر

از مناطق مختلف كشور شامل استان‌هاي تهران، قزوين، گرگان، سمنان، خراسان، همدان، آذربايجان شرقي، زنجان، خوزستان، مركزي، فارس،كهكيلويه و بوير احمد، اصفهان، يزد، كرمان و هرمزگان طي سال‌هاي ۸۶ تا ۸۷ گياهان داراي علايم اسكلروت در ناحيه طوقه و ريشه جمع‌آوري شدند. به منظور جداسازي قارچ عامل بيماري، نمونه‌هاي آلوده ابتدا با هيپوكلريت سديم يك درصد ضدعفوني شده و

1. Restriction Fragment Length Polymorphism
2. Random Amplified Polymorphic DNA
3. Amplified Fragment Length Polymorphism
4. Universal Rice Primer- PCR
5. Repetitive Sequence-Based PCR
6. Inter Simple Sequence Repeats
7. Simple Sequence Repeats=SSRs
8. Microsatellites

قطعاتي از بافت آلوده درون تشتك‌هاي پتري روي محيط كشت آب آگار يا عصاره سيب‌زميني دكستروز آگار[1] حاوي ۲۵۰ پي‌پي‌ام كلرامفنيكل قرار داده شد. تشتك‌هاي پتري قارچ در دماي ۳۰°C نگهداري شدند. خالص سازي بيمارگر با استفاده از روش نوک ريسه انجام شد. براي نگهداري بلند مدت جدايه‌ها قطعات يک سانتي‌متري خلال دندان سترون روي تشتک پتري قرار داده شد و به مدت دو هفته در دماي ۳۰°C نگهداري شد تا سطح خلال دندان‌ها كاملا با اسكلروت قارچ پوشيده شود. سپس به داخل ميكروتيوب‌هاي ۱/۵ سي‌سي انتقال و در دماي اتاق نگهداري شدند. در نهايت ۵۲ جدايه از ۲٤ ميزبان از ۱۲ استان جداسازي شدند. با توجه به نوع ميزبان و پراكنش جغرافيايي ۵۲ جدايه انتخاب (از هر ميزبان ۱تا ۳ جدايه كه معمولا هر كدام از مناطق مختلف بودند) و در مطالعه تنوع ژنتيكي مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

1. Potato Dextrose Agar

استخراج دي‌ان‌اي

براي تكثير ميسليوم هر جدايه قطعات محيط كشت به قطر ۵ ميلي‌متر از حاشيه فعال رشد قارچ جدايه‌هاي مورد نظر به درون شيشه‌هاي كتابي حاوي ۵۰ ميلي‌ليتر محيط كشت مايع عصاره سيب‌زميني (عصاره ۲۰۰ گرم سيب‌زميني براي يک ليتر) و دكستروز (۱۷ گرم براي يک ليتر) (Potato Dextrose Broth) منتقل شد. شيشه‌ها به مدت ۳ تا ۵ روز در دماي ۲۵°C روي شيكر با سرعت ۱٤۰ دور در دقيقه و در شرايط تاريكي قرار داده شدند. ميسليوم قارچ با استفاده از پمپ خلا و كاغذ صافي آب‌گيري شد و در ميكروتيوب ۱/۵ ميلي‌ليتري در فريزر ۷۰°C- قرار گرفتند. استخراج دي‌ان‌اي با روش Safaie *et al.* (2005) انجام گرفت. براي بررسي كيفيت دي‌ان‌اي از نظر كمي و كيفي پنج ميكروليتر از محلول دي‌ان‌اي در ژل آگاروز يک و نيم درصد الكتروفورز شد. همچنين غلظت دي‌ان‌اي توسط دستگاه بيوفوتومتر مورد سنجش قرار گرفت و مقداري از آن به غلظت ۲۰ نانوگرم در ميكروليتر رقيق‌سازي شد.

جدول ۱- فهرست جدايه‌هاي *Macrophomina phaseolina* و محل جمع‌آوري آن‌ها

شماره	ميزبان	محل جمع آوري	شماره	ميزبان	محل جمع آوري
۱	آفتابگردان	خوزستان	۲۷	كنجد	كرمان
۲	آفتابگردان	فارس	۲۸	كيوي	گلستان
۳	آفتابگردان	مركزي	۲۹	كيوي	گلستان
٤	سويا	گلستان	۳۰	كيوي	گلستان
۵	سويا	گلستان	۳۱	شاهدانه	اصفهان-كاشان
٦	سويا	گلستان	۳۲	شاهدانه	اصفهان
۷	زيتون	خوزستان-باغ ملک	۳۳	شاهدانه	اصفهان
۸	زيتون	خوزستان-هفت تپه	۳٤	كدو	مركزي
۹	زيتون	خوزستان-اهواز	۳۵	كدو	قزوين
۱۰	طالبي	خراسان	۳٦	كدو	قزوين
۱۱	طالبي	فارس	۳۷	ماش	كرمان
۱۲	طالبي	اصفهان-كاشان	۳۸	ماش	كرمان
۱۳	لوبياي معمولي	خراسان	۳۹	ماش	كرمان
۱٤	لوبياي معمولي	اصفهان	٤۰	بامیه	خوزستان
۱۵	لوبياي معمولي	قزوين	٤۱	بامیه	يزد
۱٦	گوجه فرنگي	خراسان	٤۲	چغندرقند	تهران
۱۷	گوجه فرنگي	قم	٤۳	كلزا	قم
۱۸	گوجه فرنگي	قزوين	٤٤	تاتوره	مركزي
۱۹	خيار	تهران-كرج	٤۵	بادمجان	هرمزگان
۲۰	خيار	همدان	٤٦	شيرتيغک	تهران-كرج
۲۱	خيار	قم	٤۷	ذرت	اصفهان-كاشان
۲۲	خربزه	خراسان	٤۸	ذرت	گلستان
۲۳	خربزه	سمنان	٤۹	هندوانه	اصفهان-كاشان
۲٤	خربزه	قم	۵۰	گل جعفري	گلستان
۲۵	كنجد	اصفهان-كاشان	۵۱	سورگوم	گلستان
۲٦	كنجد	خوزستان	۵۲	شلغم	اصفهان-كاشان

شناسايي *M. phaseolina* با استفاده از آغازگرهاي اختصاصي گونه

واكنش پي‌سي‌آر در حجم نهايي ۲۰ ميكروليتر مخلوط واكنش پي‌سي‌آر (PCR Master Mix) شامل ۱۳/۵ ميكروليتر آب ديونيزه، ۲ ميكروليتر بافر (10x) پي‌سي‌آر، ۰/٦ ميكروليتر محلول حاوي ۵۰ ميلي‌مول $MgCl_2$، ۰/٤ ميكروليتر از محلول۱۰ ميلي‌مول dNTPs حاوي ۲/۵ ميلي‌مول از هر يک از dNTPs، ۰/۳ ميكروليتر محلول حاوي پنج واحد آنزيم دي‌ان‌اي پليمراز *Taq*، يک ميكروليتر از محلول حاوي ۱۰ پيكومول از هر يک از آغازگرهاي اختصاصي گونه شامل: MpKFI (5´-CCGCCAGAGGACTATCAAAC-3´) و MpKRI (5´-CGTCCGA AGCGAG GTGTA TT -3´) و ۲ ميكروليتر از محلول حاوي ۲۰ تا ۳۰ نانوگرم دي‌ان‌اي طبق برنامه پيشنهادي Babu *et al.* (2007) به صورت ۲۵ چرخه شامل واسرشت‌سازي در دماي ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانيه، اتصال در دماي ۵٦°C به مدت يک دقيقه، بسط در دماي ۷۲°C به مدت ۲ دقيقه و مرحله بسط نهايي در دماي ۷۲°C به مدت ۱۰ دقيقه در دستگاه ترموسايكلر مدل Epgradient ساخت شركت اپندورف انجام شد. تمام مواد به كار رفته در مخلوط پي‌سي‌آر از شركت سيناژن تهيه شدند. چهار جدايه مربوط به قارچ‌هاي *Sclerotinia sclerotium*، *Trichoderma harzianum*، *Cytospora schusleri* به عنوان كنترل منفي آزمايش در نظر گرفته شدند. الكتروفورز محصول پي‌سي‌آر با شدت ولتاژ ثابت ۸۵ به مدت يک ساعت در ژل آگاروز ۱% در بافر TBE انجام گرفت.

تعيين تنوع ژنتيكي با استفاده از نشانگر ISSR

واكنش پي‌سي‌آر در حجم نهايي ۲۰ ميكروليتر مخلوط واكنش پي‌سي‌آر (PCR Master Mix) شامل ۱٤/۵ ميكروليتر آب ديونيزه، ۲ ميكروليتر بافر پي‌سي‌آر، ۰/٦ ميكروليتر محلول حاوي ۵۰ ميلي‌مول $MgCl_2$، ۰/٤ ميكروليتر از محلول۱۰ ميلي‌مول dNTPs حاوي ۲/۵ ميلي‌مول از هر يک از dNTPs، ۰/۵ ميكروليتر محلول حاوي پنج واحد آنزيم دي‌ان‌اي پليمراز *Taq*، يک ميكروليتر از محلول حاوي ۱۰ پيكومول آغازگر ذكر شده در جدول ۲ و۲ ميكروليتر از محلول حاوي ۲۰ تا ۳۰ نانوگرم دي‌ان‌اي طبق برنامه Jana *et al.* (2005a) به صورت ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازي اوليه در دماي ۹۵°C به مدت ۳ دقيقه، واسرشت‌سازي در دماي ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانيه، اتصال در دماهاي ذكر شده در جدول ۲ (بهينه شده از طريق گراديانت دمايي) به مدت يک دقيقه، بسط در دماي ۷۲°C به مدت ۲ دقيقه و مرحله بسط نهايي در دماي ۷۲°C به مدت ۷ دقيقه در دستگاه ترموسايكلر (Termal cycler) مدل Epgradient ساخت شركت اپندورف انجام شد. براي مشاهده‌ي محصول پي‌سي‌آر، الكتروفورز با ژل آگاروز ۱/۵درصد انجام شد. براي اين كار ۱/۵ گرم آگاروز در ۱۰۰ ميلي‌ليتر بافر TBE (1x) توسط حرارت حل گرديد. ۱۰ ميكروليتر از محصول هر واكنش همراه دو ميكروليتر بافر رنگ X ۵ در اين ژل با ولتاژ ۸۵ به مدت ۲/۵ ساعت الكتروفورز شد. براي تخمين اندازه قطعات محصول واكنش، از نشانگر نردبان ژنومي ۱ كيلو بازي استفاده شد.

تجزيه و تحليل داده‌ها

به منظور نمره‌دهي به باندها و ايجاد ماتريس شباهت بين جدايه‌ها، عدد يک براي وجود هر باند و صفر براي عدم وجود آن تعيين و در نرم‌افزار اكسل ثبت گرديد. تجزيه و تحليل خوشه‌اي (Cluster Analysis) داده‌ها به كمك روش يو پي جي ام آ (UPGMA)[1] و استفاده از ضريب تشابه جاكارد[2] در نرم‌افزارNTSYS-PC (نسخه ۲,۰) انجام شد و دندروگرام مربوط به هر آغازگر و مجموع آغازگرها ترسيم شد. تجزيه به مختصات اصلي بر اساس ماتريس تشابه به دست آمده از ضريب تشابه جاكارد انجام گرفت.

نتايج

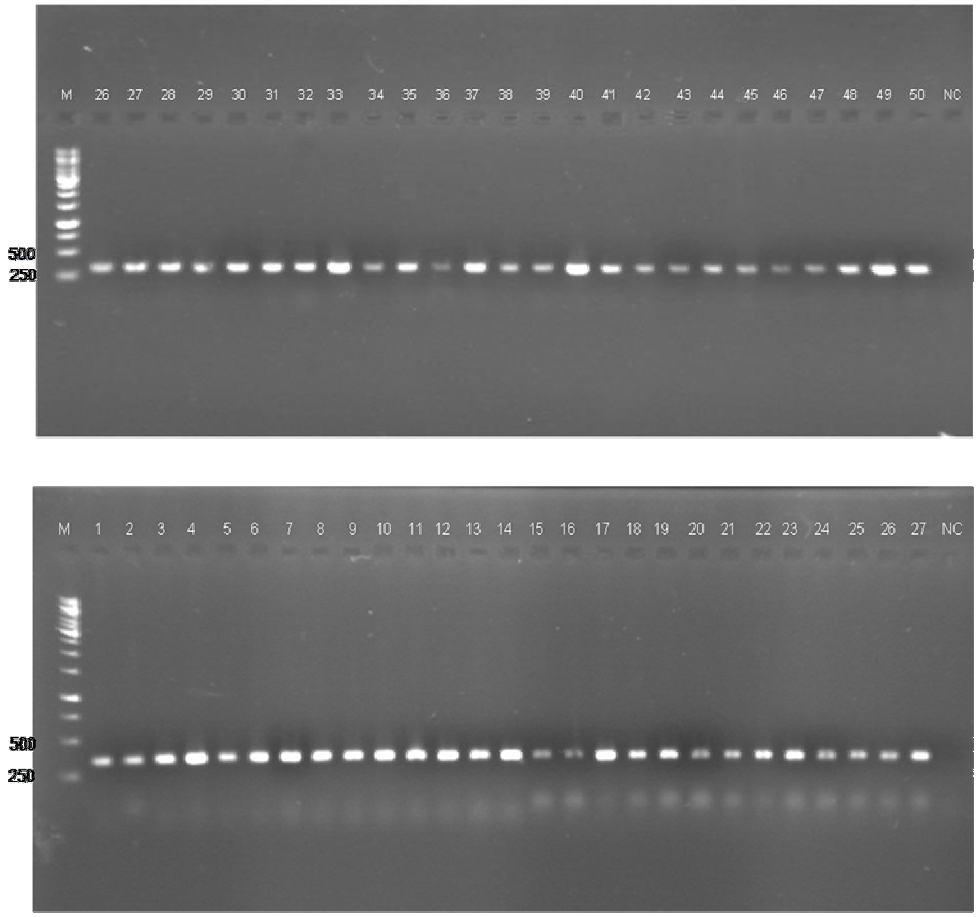
اين قارچ از استان‌هاي تهران (خيار، آفتابگردان و شيرتيغک)، سمنان (آفتابگردان و خربزه)، خراسان (طالبي، لوبيا، گوجه فرنگي، آفتابگردان، خيار و خربزه)، قزوين (خيار، آفتابگردان، لوبيا، گوجه فرنگي و كدو)، همدان (خيار، خربزه)، زنجان (خيار و آفتابگردان)، قم (كلزا، آفتابگردان، خيار، خربزه و گوجه فرنگي)، اصفهان (لوبيا، آفتابگردان، خيار، خربزه، هندوانه، طالبي، شاهدانه، كنجد، ذرت و شلغم)، يزد (آفتابگردان و باميه)،

1. Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Average
2. Jaccard's Coefficient

کرمان (کنجد و ماش) هرمزگان (آفتابگردان و بادمجان)، خوزستان (آفتابگردان، خربزه، زیتون، کنجد و بامیه)، فارس (آفتابگردان، خیار، خربزه، طالبي و کدو)، مرکزي (آفتابگردان، خیار، لوبیا و کدو)، گلستان (سویا، کیوي، آفتابگردان، ذرت، گل جعفري، سورگوم و خربزه) جداسازي شد. در نهایت ۵۲ جدایه از ۲٤ میزبان و از ۱۲ استان جداسازي شدند.

شناسايي *M. phaseolina* با استفاده از آغازگرهاي اختصاصي گونه

جفت آغازگرهاي MpKFI و MpKRI به طور اختصاصي یک باند ۳۵۰ جفت بازي را براي تمامي جدایه‌هاي *M. phaseolina* تکثیر کرد. این باند در سایر قارچ‌هاي مورد بررسي مشاهده نشد (شکل۱).



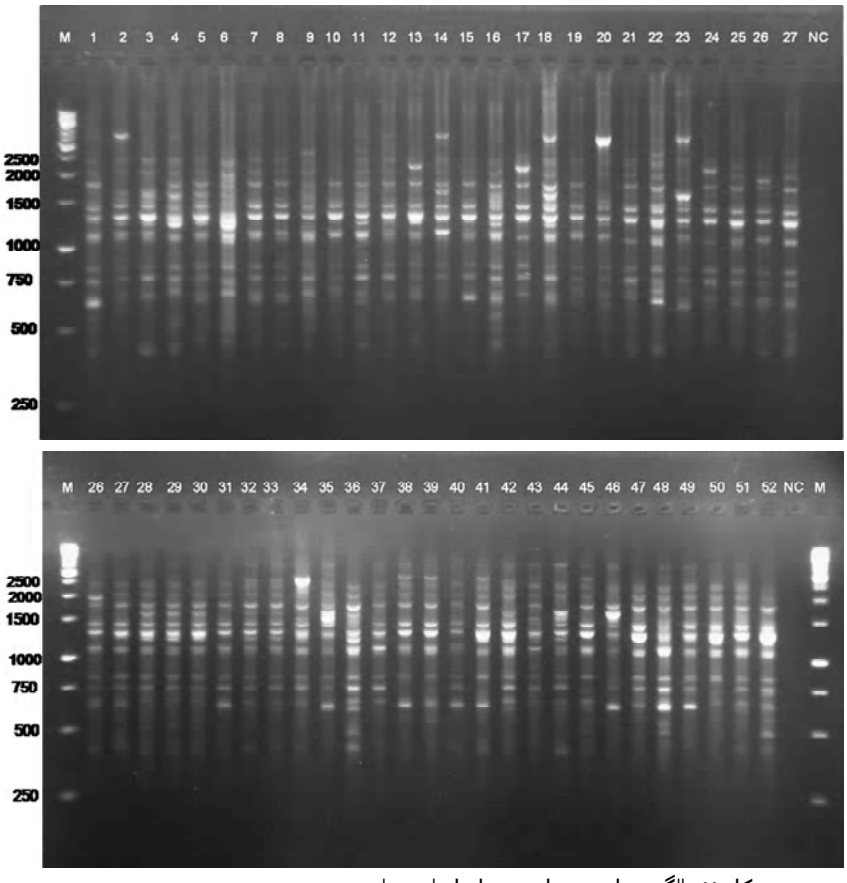
شکل ۱- شناسايي مولکولي *Macrophomina phaseolina* با استفاده از آغازگرهاي اختصاصي(MpKFI/MpKRI). الف: تکثیر یک باند ۳۵۰ جفت بازي در هر ۵۲ جدایه *M. phaseolina* ب: تکثیر باند اختصاصي جدایه‌هاي قارچي مورد آزمایش (m1، m2، m3) و عدم تکثیر این باند اختصاصي در سایر جدایه‌هاي قارچي T=*Trichoderma harzianum*، C=*Cytospora schusleri* و S= *Sclerotinia sclerotiorum* ، PC: کنترل مثبت (جدایه ماکروفومینا تایید شده) NC: کنترل منفي، M: نشانگر مولکولي 1Kb.

جدول ۲- فهرست آغازگرهاي به كار رفته و توالي‌هاي آن‌ها

شماره	آغازگر	توالي	دماي اتصال	منبع
۱	ISSR2	5'-ACTG ACTG ACTG ACTG-3'	48	Jana *et al.*, 2005
۲	ISSR5	5'-GACAC GACAC GACAC GACAC-3'	50	Jana *et al.*, 2005
۳	ISSR10	5'-CACCACCACCACCAC-3'	52	Jana *et al.*, 2005
٤	PcMs	5'-GTCGTCGTCGTCGTCGTCGTC-3	57	Islam *et al.*, 2003
٥	ISSR09	5'-CCACCACCACCACCA-3'	47	Vasserur *et al.*, 2005
٦	P4	5'-ATGATGATGATGATGATG-3'	47	Stepansky *et al.*, 1999
۷	P5	5'-ACACACACACACACACYC-3'	48	Stepansky *et al.*, 1999
۸	P6	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYG-3'	48	Stepansky *et al.*, 1999
۹	LB-B	5'-GACAGACAGACAGACATT-3	48	Arbaoui *et al.*, 2008

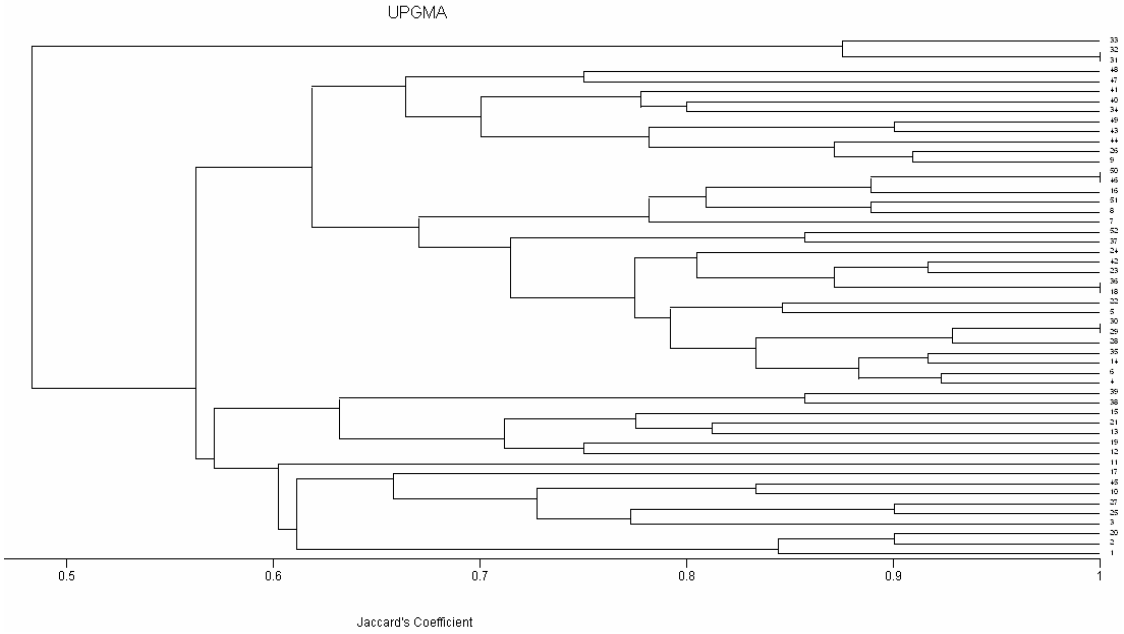
تعيين تنوع ژنتيكي با استفاده از نشانگر ISSR

از ميان ۹ آغازگر مورد استفاده، ٦ آغازگر ISSR، ISSR5، ISSR10، PcMs، ISSR09، P4 داري وضوح، تكرارپذيري و تعداد باندهاي پلي‌مورفيک بودند(جدول۲) و در آناليزهاي بعدي مورد استفاده قرار گرفتند. دامنه دماي اتصال از ٤٧°C تا ٥٧°C براي آغازگرهاي مختلف بود. تعداد كل باند براي آغازگرISSR2، ISSR5، ISSR10، PcMs، ISSR09، P4 به ترتيب ٤٨٢، ٥٣٧، ٥٤٨، ٤٧٧، ٣٦١ و ٣٩٤ بود. همچنين تعداد باند مونومورفيک به ترتيب ۲۰۸، ١٥٦، ١٠٤، ١٠٤، ١٥٦و ١٠٤ و تعداد باند پلي‌مورفيک به ترتيب ۲۷٤، ۳۸۱، ٤٤٤، ۳۷۳، ۲۰۵ و ۲۹۰ بودند. از آناليز اين ٦ آغازگر در مجموع ١٢٤ لوكوس قابل نمره دهي با ميانگين ۲۰ لوكوس به ازاي هر آغازگر به دست آمد كه ۱۰۸ لوكوس آن (معادل ۸۷%) چند شكل بودند. بيشترين چند شكلي توسط آغازگرISSR2 و ISSR5 (۲۲ لوكوس) و كمترين توسط آغازگر ISSR09 و P4 (۹ لوكوس) حاصل گرديد(شكل ۲).

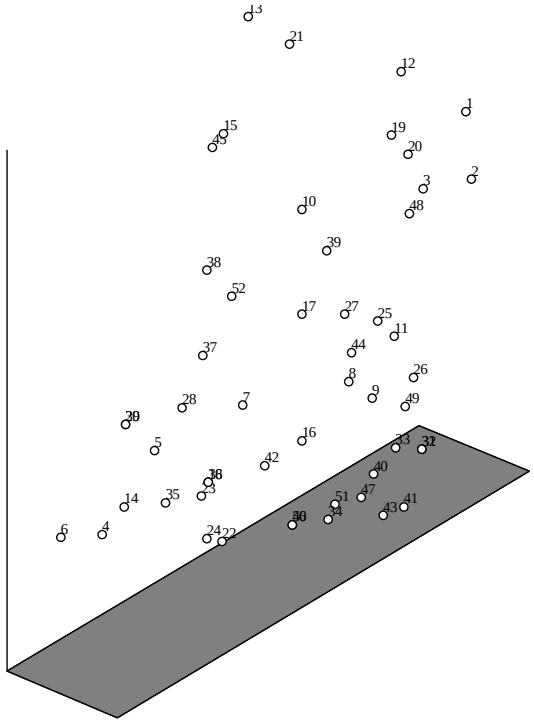


شكل ۲- الگوي باندي نماينده حاصل از جدايه ي *Macrophomina phaseolina*

با استفاده از آغازگر ISSR5، NC: کنترل منفي، M: نشانگر مولکولي 1Kb



شکل۳- دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد
براي ۵۲ جدایه *Macrophomina phaseolina* حاصل از الگوي باندي مجموع آغازگرها.



شکل ٤- پلات سه بعدي حاصل از تجزیه به مختصات اصلي به روش ماتریس تشابه جاکارد

بر اساس تجزیه و تحلیل خوشه‌اي داده‌هاي حاصل از الگوي باندي مربوط به تلفیق آغازگرها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، در سطح تشابه ٦٠ درصد جدایه‌ها در چهار گروه قرار گرفتند (شکل۳).

پلات حاصل از تجزيه به مختصات اصلي نيز تا حدودي بيانگر اين مطلب مي‌باشد (شكل٤). گروه اول شامل ٥/٧٦ درصد جدايه‌ها شامل هر سه جدايه شاهدانه از كاشان (٣١)، اصفهان (٣٢ و ٣٣) بود. گروه دوم شامل ٦٨/٥٣ درصد جدايه‌ها بود. هر سه جدايه كيوي از گلستان (٢٨، ٢٩ و ٣٠) با ٩٤ درصد تشابه و همچنين هر سه جدايه سويا از گلستان (٤، ٥ و ٦) با سطح تشابه ٧٨درصد و همچنين هر سه جدايه خربزه از قم (٢٤)، سمنان (٢٣) و خراسان (٢٢) با سطح تشابه ٧٨ درصد و همچنين هر سه جدايه زيتون (٧، ٨، ٩) و همچنين دو جدايه ذرت گلستان (٤٨) و ذرت كاشان (٤٧) با ٧٤ درصد تشابه و هر دو جدايه باميه از يزد (٤١) و خوزستان (٤٠) در كنار هم در اين گروه قرار گرفتند. همه جدايه‌هاي گلستان از ميزبان‌هاي ذرت، سورگوم، كيوي، سويا و گل جعفري و همچنين جدايه‌هاي قزوين از ميزبان‌هاي كدو (٣٥ و ٣٦)، گوجه فرنگي (١٨) با ١٠٠ درصد تشابه در اين گروه ممكن است به علت نزديكي منشا جغرافيايي آنها باشد. گروه سوم شامل ١٣/٤٧درصد جدايه شامل جدايه‌هاي بقولات و كدوييان و بيشتر از مناطق خشک بودند. دو جدايه ماش كرمان (٣٨ و ٣٩) با ٨٨ درصد تشابه در كنار هم داخل اين گروه قرار گرفتند. خيار قم (٢١)، خيار تهران-كرج (١٩)، طالبي كاشان (١٢)، لوبيا قزوين (١٥)، لوبيا خراسان (١٣) با ٧٥ درصد تشابه در كنار هم در اين گروه قرار گرفتند. گروه چهارم شامل ١٩/٢٣ درصد جدايه‌ها شامل خانواده سيب زميني، بقولات و كدوييان بود و فاقد گروه بندي جغرافيايي بودند. جدايه طالبي فارس (١١) و طالبي خراسان (١٠) با ٦٠ درصد تشابه و گوجه‌فرنگي قم (١٧) و بادمجان هرمزگان (٤٥) با ٦٦ درصد تشابه و جدايه‌هاي كنجد كرمان (٢٧) و كنجد كاشان (٢٥) با ٩٠درصد تشابه و سه جدايه آفتابگردان از مركزي (٣)، فارس (٢) و خوزستان (١) با ٦١ درصد تشابه در اين گروه قرار گرفتند.

بحث

اين قارچ از ٢٤ ميزبان جداسازي شد، اين امر نشان مي‌دهد اين قارچ داراي دامنه ميزباني وسيع در خانواده‌هاي گياهي مختلف مي‌باشد، چنانكه Dhingra & Sinclair (1973) اعلام كردند اين قارچ روي حدود ٧٥ خانواده و بيش از ٥٠٠ گونه بيماريزا مي‌باشد. اين قارچ از نمونه‌هاي كهگيلويه و بويراحمد، آذربايجان شرقي جداسازي نشد. اين امر مي‌تواند به دليل گرمادوست بودن قارچ و يا نياز به جمع‌آوري نمونه بيشتر باشد. ميزبان‌هاي شاهدانه، شلغم، ماش، باميه، گل جعفري، تاتوره و شير تيغک براي اين قارچ براي اولين بار از ايران گزارش مي‌شود. با توجه به پتانسيل بالاي قارچ براي بيماري‌زايي احتمال گزارش‌هاي جديد از ساير ميزبان‌ها نيز وجود دارد. اخيراً Babu *et al.* (2007) جفت آغازگرهاي MpKFI و MpKRI را از مناطق اختصاصي ITS، طراحي كرده و اثبات كردند كه با استفاده از اين آغازگرها به طور اختصاصي مي‌توان جدايه‌هاي *M. phaseolina* را شناسايي نمود. در آزمايش‌هاي ما نيز اين آغازگرها محصول تكثير ٣٥٠ جفت بازي را براي تمامي جدايه‌هاي *M. phaseolina* نتيجه دادند. فقدان اين باند در ساير قارچ‌هاي مورد بررسي، تأييد مي‌كند كه اين آغازگرها مي‌توانند به صورت انتخابي و اختصاصي براي تشخيص *M. phaseolina* به كار روند. اولين گام در مديريت بيماري شناخت عامل و بررسي تنوع دروني آن مي‌باشد. وجود تنوع در يک قارچ نشان دهنده قدرت سازگاري يک قارچ با شرايط مواجه با آن مي‌باشد. هرچه قارچ داراي تنوع بالاتري باشد داراي قدرت سازگاري بالاتري بوده و در برابر فشار انتخاب كه در اثر عوامل مختلف از جمله عوامل كنترل اعمال مي‌شود، مي‌تواند پايداري بيشتري از خود نشان دهد. لذا در استفاده از هرگونه روش كنترلي، به خصوص كنترل شيميايي، مي بايست توانايي قارچ در ايجاد تنوع ژنتيكي و توليد نژاد هاي مقاوم ارزيابي شود. آناليز هاي مولكولي آي اس اس آر روش مناسبي براي تشخيص اختلافات ژنتيكي درون گونه‌اي در كل ژنوم در جمعيت‌هاي *M. phaseolina* مي‌باشد (Jana *et al.*, 2005a). از اين رو در اين تحقيق از اين نشانگر استفاده شد. با استفاده از شش آغازگر ISSR، ISSR5، ISSR10، PcMs، ISSR09، P4 سطوح متفاوتي از پليمورفيسم و تعداد باند بدست آمد. جدايه‌هاي ذرت از كاشان و گلستان با ٧٥ درصد تشابه، جدايه‌هاي باميه از يزد و خوزستان با ٧٥ درصد تشابه و

هر سه جدايه كيوي با بيشتر از ۹۰ درصد تشابه در كنار هم قرار گرفتند. اين موارد نشان‌دهنده وجود اختصاصيت ميزباني اين قارچ در برخي جدايه‌ها مي‌باشد و با نتايج Jana *et al.* (2005a) مطابقت دارد. از ميان شش آغازگر استفاده شده، هيچ يک از اين آغازگرها قادر به تفكيک كامل تمام جدايه‌ها بر مبناي مكان جغرافيايي نبودند، علت اين امر مي‌تواند به دليل انتخاب تعداد زياد ميزبان و يا منطقه باشد، در صورتي كه جانا و همكاران فقط از دو ميزبان پنبه و سويا استفاده كردند و توانستند با اين نشانگر اين ميزبان‌ها را از هم تفكيک كنند. جدايه‌هاي كنجد و زيتون از خوزستان با ۸۷ درصد تشابه در يک گروه بر مبناي مكان جغرافيايي قرار گرفتند. بر اساس منطقه آب و هوايي خشک يا مرطوب، سردسيري يا گرمسيري گروه بندي مشاهده نشد. بر اساس خانواده گياهي ميزبان برخي جدايه‌هاي كدوييان (خيار قم، طالبي كاشان، طالبي فارس) با ۷۵ درصد تشابه در يک گروه قرارگرفتند ولي در دو مورد به طور غيرمنتظره‌اي جدايه كدو (جدايه‌هاي ۳۵ و ۳۶) در كنار بقولات قرار گرفت. قرار گرفتن جدايه‌هاي شاهدانه از كاشان و شاهدانه از اصفهان با ۷۰ درصد تشابه، جدايه‌هاي ذرت از كاشان و گلستان با ۷۵ درصد تشابه، جدايه‌هاي باميه از يزد و خوزستان با ۷۵ درصد تشابه در كنار هم مي تواند دو علت داشته باشد، يكي مهاجرت يا انتقال تصادفي اين جدايه بين اين دو ناحيه و دوم و مهمتر اينكه علي رغم وجود فاصله زياد بين اين دو مكان اين دو جدايه بر اساس نوع ميزبان و وجود اختصاصيت با ميزبان، اين نزديكي يا شباهت به وجود آمده است. اين مطلب موييد اين است كه اختصاصيت ميزباني مي تواند منجر به ايجاد صفات منحصر به فرد جدايه‌هاي قارچي در ميزبان خاص شود. جدايه‌هاي ذرت و شاهدانه از كاشان و از يک منطقه و دو مزرعه نزديک هم جداسازي شدند. چنانكه از دندروگرام پيداست اين دو جدايه ۱۰۰ درصد شباهت ژنتيكي دارند. اين امر نشان دهنده اين است كه احتمالا اين دو جدايه يک جدايه قارچ است. نكته قابل تامل در اين باب اين است كه بر اساس علايم مشاهده شده روي گياه و ميزان پيشروي علايم اسكلروت روي ساقه هر دو گياه در زمان نمونه‌برداري (در صورتي كه از ميزان مقاومت ذرت و شاهدانه نسبت به قارچ صرف‌نظر كنيم) ميزان بيماري‌زايي اين جدايه روي شاهدانه به مقدار زيادي بيشتر از ذرت بود (با توجه به ميزان پيشروي اسكلروت روي ساقه). بنابراين شدت يا مقدار بيماري‌زايي را مي‌توانيم به مكانيسم‌هاي اختصاصي بين ميزبان گياهي و جدايه قارچي نسبت دهيم. چنانكه Su *et al.* (2001) نشان دادند ميزان بيماريزايي جدايه‌هاي برخي ميزبان‌ها مانند غلات روي ديگر ميزبان‌ها كمتر است. محققين مختلف نيز مطابق با نتايج بدست آمده در اين تحقيق با استفاده از نشانگرهاي مختلف توانستند جدايه‌هاي مختلف ميزباني را از همديگر تفكيک كنند. Su *et al.* (2001) به منظور بررسي تخصص ميزباني در *M. phaseolina* از نشانگر رپيد و ار اف ال پي استفاده كردند و نتيجه گرفتند جدايه‌هاي يک ميزبان معين با لحاظ ژنتيكي مشابه يكديگرند، و مشخصاً از ديگر ميزبان‌هاي متمايزند. Jana *et al.* (2003) استفاده از يك آغازگر رپيد به نام OPA-13 توانستند جدايه‌هاي *M. phaseolina* از سويا، كنجد، بادام زميني، لوبياي چشم بلبلي، پنبه، لوبياي معمولي، باميه، و ۱۳ ميزبان ديگر را تفكيك كنند. همچنين پوركاياستا و همكاران (Purkayastha *et al*., 2006) نشان دادند كه جدايه‌هاي يک ميزبان عموماً مشابه يكديگرند، ولي مشخصاً از ميزبان‌هاي ديگر تفكيک مي‌گردند. Purkayastha *et al.* (2008) با استفاده از نشانگر آي اس اس آر و رپ-پي‌سي‌آر جدايه‌هاي مورد مطالعه را بر مبناي ميزبان، و در يک ميزبان واحد بر مبناي فنوتيپ كلرات تفكيک كردند. Jana *et al.* (2005b) در بررسي تنوع ژنتيكي ۴۰ جدايه *M. phaseolina*، جداسازي شده از سويا، پنبه و لوبيا چيتي با استفاده از يو آر پي-پي‌سي‌آر توانستند جدايه‌ها را با توجه به ميزبان تفكيک كنند. اين اولين مطالعه در مورد جدايه‌هاي ماكروفومينا جدا شده از ميزبان‌هاي مختلف در ايران مي‌باشد. در كارهاي قبلي Jalali *et al.* (2009a, b) فقط از جدايه‌هاي سويا استفاده كردند، كه بر اساس رپيد و اي‌اس‌اس‌آر توانستند جدايه‌هاي گلستان را از ساير مناطق جدا كنند و بر اساس رپ پي‌سي‌آر هيچ رابطه‌اي بين منشا جغرافيايي جدايه‌ها و گروه‌هاي حاصل از تنوع ژنتيكي پيدا نكردند. استدلال ما بر اساس اين يافته اين است كه تنوع ژنتيكي

اين قارچ در بين ميزبان‌ها و مكان‌هاي مختلف جغرافيايي زياد است، تا حدي كه در برخي ميزبان‌ها اين اختلاف يا تنوع منجر به اختصاصيت ميزبان شده است. در قارچ‌هايي كه به صورت جنسي توليدمثل مي‌كنند، اين تغيير ممكن است به دليل درجه‌ي بالاي نو تركيبي ژنتيكي باشد. در غياب توليدمثل جنسي در ماكروفومينا تغييرپذيري ژنتيكي مي‌تواند ناشي از فرآيندهاي نوتركيبي رويشي مانند ادغام سلولي يا نوتركيبي فراجنسي[1] باشد (Carlile, 1986). توالي‌هاي تكراري در تمام طول ژنوم پراكنده‌اند، با استفاده از اين نشانگر ما مي توانيم تمام طول ژنوم را براي بررسي تنوع بررسي كنيم و يک ديد كلي در مورد اختلاف بين جمعيت و برقراري ارتباط آنها با صفات خاص مانند اختصاصيت ميزباني باشيم. در گامي جلوتر مي‌توان با رديابي اين اختلافات و شناسايي ژن‌هاي دخيل در آن مانند ژن‌هاي مربوط به مكانيسم‌هاي بيماري‌زايي و سيستم‌هاي دفاعي ميزبان خاص آسان‌تر به وجود اين اختصاصيت پي برد. نتايج ما بر اساس اين نشانگر نشان مي‌دهد كه اين قارچ داراي تنوع ژنتيكي بالايي در ايران مي‌باشد. با اين پتانسيل اين قارچ داراي قدرت سازگاري بالاتري بوده و در برابر فشار انتخاب مي‌تواند پايداري بيشتري از خود نشان دهد. لذا در مديريت بيماري بايد از روش‌هاي تلفيقي استفاده شود. يافتن نشانگرهاي مولكولي مناسب كه بتواند جدايه‌هاي قارچي را به طور كامل بر اساس ميزبان و منطقه تفكيک كند براي مطالعات ژنتيكي و اپيدميولوژيكي اين بيمارگر مفيد است. در گام بعد بررسي ژن‌هايي كه در اختصاصيت ميزباني و مقاومت نقش دارند تعيين كننده استراتژي توليد گياهان مقاوم خواهد بود.

1. Para Sexual Recombination

REFERENCES

1. Abawi, G. S. & Pastor-Corrales, M. A. (1990). *Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies and management strategies*. CIAT, Cali, Colombia.
2. Aboshosha, S. S., Attaalla , S. I., El-Korany, A. E. & El-argawy, E. (2007). Characterization of *Macrophomina phaseolina* isolates affecting sunflower growth in El-Behera governorate, Egypt. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9, 807-815.
3. Afshari Azad, H. (2008). Determination of damping-off, root and crown rot causal agents of rapeseed throughout important cultivation areas of Iran. *Proceeding of the 18th Iranian Plant Protection Congress*, Hamedan, iran, p.14. (In Farsi).
4. Aghajani, M. A. & Safaie, N. (2008). Occurrence of charcoal rot on Kiwi fruit in Iran. *Proceeding of the 18th Iranian Plant Protection Congress*, Hamedan, Iran, p.167. (In Farsi).
5. Aghakhani, M. & Dubey, S. C. (2009). Determination of genetic diversity among Indian isolates of *Rhizoctonia bataticola* causing dry root rot of chickpea. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 96(4), 607-619.
6. Almeida, A. M. R., Abdelnoor, R. V., Arias, C. A. A., Carvalho, V. P., Martin, S. R. R., Benato, L. C., Pinto, M. C. & Carvalho, C. G. P. (2003). Genotypic diversity among brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 279-285.
7. Almeida, M. R., Sosa-Gomez, D. R., Binneck, E., Marin, S. R. R., Zucchi, M. I., Abdelnoor, R. V. & Souto, E. R. (2008). Effect of crop rotation on specialization and genetic diversity of *Macrophomina phaseolina*. *Tropical Plant Pathology*, 33(4), 257-264.
8. Babu, B. K., Saxena, A. K., Srivastava, A. K. & Arora, D. K. (2007). Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. *Mycologia*, 99(6), 797-803.
9. Brooker, N., Lord, J. R., Long, J. & Jayawardhana, A. (2008). AFLP analysis of genetic diversity in charcoal rot fungal populations impacted by crop rotations. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 73(2), 7-19.
10. Carlile, M. J. (1986). Genetic exchange and gene flow: Their promotion and prevention in Evolutionary Biological of the Fungi. *Cambridge University Press, Cambridge, UK*, 203-214.
11. Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Philips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. & Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Study in Mycology*, 55, 235-53.
12. Das, I. K., Fakrudin, B. & Arora, D. K. (2006). RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some Indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationships with pathogenicity. *Microbiological Research*, 163(2), 215-224.

13. Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. (1973). Variation among isolates of Macrophomina phaseoli (Rhizoctonia bataticola) from the same soybean plant. *Phytopathology*, 62, 1108.
14. Gafarian, A. (2000). *Biological control of Macrophomina phaseolina by Trichoderma and Gliocladium*. M.Sc. dissertation. Ahvaz University, Iran. (In Farsi)
15. Golzar, H. (1989). Evaluating susceptibility of sesame cultivars to 3 fungal pathogens in Gorgan. *Proceeding of the 9th Iranian Plant Protection Congress*, Mashad, Iran, p.98. (In Farsi)
16. Hamdollahzadeh, A. (1991). Charcoal rot of cotton in Iran. *Proceeding of the 11th Iranian Plant Protection Congress*, Kerman, Iran, p.120. (In Farsi).
17. Jalali, F., Safaie, N. & Abbasi, S. (2009a). Genetic diversity of Iranian isolates of *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of soybean charcoal rot, using RAPD and ISSR markers. *Proceeding of the 6th National Biotechnology Conference*, Tehran, Iran, p.140-141. (In Farsi)
18. Jalali, F., Safaie, N. & Abbasi, S. (Year). Utilization of rep-PCR to study the DNA polymorphism among Iranian isolates of *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of soybean charcoal rot. Paper read at Proc 6th Nat Biotech Conf of Iran, 13-15 Aug. 2009, Tehran.
19. Jana, T., Sharma, T. R., Prasad, R. D. & Arora, D. K. (2003). Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and Fusarium species by a single primer RAPD technique. *Microbiological Research*, 158(3), 249-257.
20. Jana, T., Sharma, T. R. & Singh, N. K. (2005a). SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mycological Research*, 109(1), 81-86.
21. Jana, T., Singh, N., Koundal, K. & Sharma, T. (2005b). Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(2), 159-164.
22. Manici, L. M., Caputo, F. & Cerato, C. (1995). Temperature responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climatic regions of sunflower production in Italy. *Plant Disease*, 79, 834-838.
23. Mayek-Perez, N., Lpez-Castaeda, C., Gonzglez-Chavira, M., Garcia-Espinosa, R., Acosta-Gallegos, J., de la Vega, O. M. & Simpson, J. (2001). Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(5), 257-264.
24. Meena, S., Sharma, R. C., Sujay, R., Poonam, Y., Lokendra, S. & Ram, D. (2006). Genetic variability in *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid incitant of charcoal rot of maize in India. *Indian Phytopathology*, 59(4), 453-459.
25. Mihail, J. D. & Taylor, S. J. (1995). Interpreting variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, pycnidium production, and chlorate utilization. *Canadian Journal of Botany*, 73(10), 1596-1603.
26. Miklas, P. N., Schwartz, H. F., Salgado, M. O., Nina, R. & Beaver, J. S. (1998). Reaction of select tepary bean to ashy stem blight and fusarium wilt. *HortScience*, 33(1), 136-139.
27. Mirabolfathi, M. (1991). Charcoal rot of conifer in Iran. *Proceeding of the 11th Iranian Plant Protection Congress*, Kerman, Iran, p.148. (In Farsi)
28. Müller-Starck, G., Baradat, P. & Bergmann, F. (1992). Genetic variation within European tree species. *New Forests*, 6, 23-47.
29. Omar, M. R., Abd-Elsalam, K. A., Aly, A. A., El-Samawaty, A. M. A. & Verreet, J. A. (2007). Diversity of *Macrophomina phaseolina* from cotton in Egypt: Analysis of pathogenicity, chlorate phenotypes, and molecular characterization. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114, 196-204.
30. Pearson, C. A. S., Leslie, J. F. & Schwenk, F. W. (1986). Variable chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina* from corn, soybean and soil. *Phytopathology*, 76, 646-649.
31. Pecina-Quintero, V., Martinez-de la Vega, O., Alvarado-Balleza, M. J., Vandemark, G. J. & Williams-Alanis, H. (2001). Comparison between two systems of molecular markers on the analysis of genetic relationship of /i *Macrophomina phaseolina*. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 19(2), 128-139.
32. Purkayastha, S., Kaur, B., Arora, P., Bisyer, I., Dilbaghi, N. & Chaudhury, A. (2008). Molecular genotyping of Macrophomina phaseolina isolates: Comparison of microsatellite primed PCR and repetitive element sequence-based PCR. *Journal of Phytopathology*, 156(6), 372-381.
33. Purkayastha, S., Kaur, B., Dilbaghi, N. & Chaudhury, A. (2006). Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. *Plant Pathology*, 55(1), 106-116.
34. Raeyat panah, S., Foroutan, A. , and Oladi, M. (2002). Evaluation of Soybean Cultivars to Charchoal Rot Caused by Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid in Mazandaran. *Proceeding of the 15th Iranian Plant Protection Congress. Isfahan*, 116.
35. Rajkumar, F. B. & Kuruvinashetti, M. S. (2007). Genetic variability of sorghum charcoal rot pathogen (*Macrophomina phaseolina*) assessed by random DNA markers. *Plant Pathology Journal*, 23(2), 45-50.

36. Reyes-Franco, M. C., Hernandez-Delgado, S., Beas-Fernandez, R., Medina-Fernandez, M., Simpson, J. & Mayek-Perez, N. (2006). Pathogenic and genetic variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 447-453.
37. Safaie, N., Alizadeh, A., Saidi, A., Rahimian, H. & Adam, G. (2005). Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of Fusarium graminearum, the causal agent of wheat head blight. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 41, 171-189.
38. Saleh, A. A., Ahmed, H. U., Todd, T. C., Travers, S. E., Zeller, K. A., Leslie, J. F. & Garrett, K. A. (2009). Relatedness of *Macrophomina phaseolina* isolates from tallgrass prairie, maize, soybean and sorghum. *Molecular Ecology*, 19, 79-91.
39. Sanei, S. J., Okhovvat, S. M. & Taheri, A. H. (2005). Investigation on diseases of Olive trees and seedlings in Iran. *Proceeding of the 57th International Symposium on Crop Protection*, Ghent, Belgium, p.64. (In Farsi)
40. Su, G., Suh, S.-O., Schneider, R. W. & Russin, J. S. (2001). Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 91(2), 120-126.
41. Suriachandraselvan, M. & Seetharaman, K. (2000). Relationships among pigment synthesis,culture media, grouth and virulence of the geolraphical isolates of causing charcoal rot of sunflower. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 30, 370-374.
42. Vandemark, G., Martinez, O., Pecina, V. & Alvarado, M. D. (2000). Assessment of genetic relationships among isolates of *Macrophomina phaseolina* using a simplified AFLP technique and two different methods of analysis. *Mycologia*, 92(4), 656-664.
43. Wrather, J. A., Anderson, T. R., Arsyad, D. M., Tan, Y., Ploper, L. D., Porta-Puglia, A., Ram, H. H. & Yorinori, J. T. (2001). Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23(2), 115-121.
44. Zade, M. S. A., Zadeh, N. A., Nejad, R. F., Rezaee, S. & Mahmoudi, B. (2009). RAPD marker as a criterion to study differentiation of isolates of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia bataticola* (*Macrophomina phaseolina*). *Phytopathology*, 99(6), 113-113.
45. Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genom & Genet W*, 20, 176-183.