

## شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با صفت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. روی نهال‌های گردو با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR

Identification of informative markers associated with virulence trait of  
*Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. isolates on walnut seedlings using RAPD  
and ISSR markers

خدیجه عباسی<sup>۱</sup>، دوستمراد ظفری<sup>۱\*</sup>، سعید عباسی<sup>۲</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، دانشگاه بوعلی سینا همدان

۲- دانشیار، دانشگاه رازی کرمانشاه

Abbasi KH<sup>1</sup>, Zafari D<sup>\*1</sup>, Abbasi S<sup>2</sup>

1. PhD Student, Associate Professor, Bu Ali Sina University  
2. Associate Professor, Razi University

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zafari\_d@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۴- تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

### چکیده

این مطالعه به منظور بررسی رابطه نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR با صفت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. روی نهال‌های گردو توسط رگرسیون مرحله‌ای با نرم‌افزار SPSS، ۵۸ جدایه انجام شد. از بین ۴۰ آغازگر مورد استفاده پس از بررسی براساس میزان تشکیل باند، چندشکلی و تکرارپذیری، تعداد ۱۰ آغازگر RAPD و ۱۲ آغازگر ISSR انتخاب شد که آغازگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۹۴/۷ درصد و ۹۵/۸ درصد در بین جدایه‌های مختلف چندشکلی نشان دادند. طی این مطالعه صفت بیماری‌زایی به عنوان متغیر تابع و داده‌های مولکولی (صفر و یک) به عنوان متغیر ثابت وارد مدل رگرسیونی شد. با توجه به صفت وارد شده به مدل، باندهای با  $R^2$  بالا بررسی شد. نتایج نشان داد که پنج نشانگر RAPD با صفت بیماری‌زایی مرتبط بودند و در مجموع ۴۳/۷ درصد تغییرات این صفت را توجیه کردند که دو نشانگر رابطه مثبت و سه نشانگر رابطه منفی با صفت بیماری‌زایی نشان دادند. بیشترین درصد تغییرات توجیه شده مربوط به نشانگر A7=۱۹۰۰ bp (درصد  $R^2=۱۸/۲$ ) و کمترین مقدار مربوط به نشانگر OP13=۴۰۰ bp (درصد  $R^2=۴/۸$ ) بود. همچنین پنج نشانگر ISSR با صفت بیماری‌زایی مرتبط بودند که در مجموع ۳۹ درصد تغییرات این صفت را توجیه کردند. سه نشانگر رابطه مثبت و دو نشانگر رابطه منفی با صفت بیماری‌زایی نشان دادند. بیشترین تغییرات تبیین شده توسط نشانگر ISSR برای صفت بیماری‌زایی مربوط به نشانگر UBC864=۳۵۰ bp (درصد  $R^2=۱۱/۶$ ) و کمترین مقدار مربوط به UBC880=۷۴۰ bp (درصد  $R^2=۵/۴$ ) بود. از نشانگرهای شناسایی شده می‌توان برای گزینش به کمک نشانگر (MAS) و شناسایی جدایه‌ها استفاده کرد.

### واژه‌های کلیدی

بیماری‌زایی  
تنوع ژنتیکی  
رگرسیون مرحله‌ای  
گردو  
نشانگر مولکولی

## مقدمه

بیماری سرخشکیدگی و شانکر سیتوسپورایی (Cytospora canker) یکی از بیماری‌های مهم درختان میوه از جمله گردو است که در بسیاری از نقاط دنیا موجب کاهش عمر مفید درختان شده و زیان اقتصادی گسترده‌ای را ایجاد می‌کند. (Bigs 1989a, 1989b; Belisario 1992; Adams et al. 2002; Adams et al. 2010; Fotouhifar and Hedjaroude 2006). این بیماری توسط گونه‌های مختلفی از جنس *Cytospora* ایجاد می‌شود. در بسیاری از منابع، جنس *Cytospora* به عنوان یک بیمارگر ضعیف و فرصت طلب معرفی شده است. با وجود این، خسارت بیماری از منطقه‌ای به منطقه دیگر و از باغی به باغ دیگر متفاوت است. در پاره‌ای از موارد به نظر می‌رسد خسارت بیماری فراتر از خسارت یک بیمارگر فرصت طلب باشد. سئوالی که مطرح می‌شود این است که چرا در برخی از نقاط بیماری به صورت حاد ظاهر می‌شود؟ آیا بین جدایه‌های مختلف یک گونه بیماری‌زا به لحاظ ژنتیکی اختلاف معنی‌داری وجود دارد؟ یا این اختلاف به عوامل دیگری غیر از عامل بیماری‌زا نظیر شرایط آب و هوایی، میزان مقاومت ارقام مختلف میزبان، سن میزبان، تنش‌های محیطی و غیره مربوط می‌شود؟ برخی از این قبیل سوالات را می‌توان با مطالعه تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی بیمارگر پاسخ داد.

قبل از شناسایی و معرفی روش‌های نوین کار با نشانگرهای مولکولی، در ارزیابی روابط ژنتیکی در یک گونه خاص غالباً صفات مورفولوژیک نقش عمده را ایفا می‌کردند. اخیراً علم بیوتکنولوژی کمک شایانی در تشخیص روابط ژنتیکی و فیلوژنی کرده است. نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژی هر دو می‌توانند تکمیل کننده یکدیگر باشند و نمی‌توانند به تنهایی ابزار مفید و سودمندی در روش‌های مختلف اصلاحی محسوب شوند. گزارشات مختلف مبنی بر ارتباط توأم صفات مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از روش‌های آماری بیان شده است (Barat 2005; shooshtary et al. 2005). یکی از پیشرفت‌های بزرگ که در سال‌های اخیر در سیستم‌های تشخیص نشانگرها ایجاد شده شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مفید است (Ebrahimi et al. 2011). مطالعه حاضر با هدف بررسی رابطه نشانگرهای مولکولی RAPD

و ISSR با صفت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Cytospora chrysosperma* روی نهال‌های گردو به اجرا در آمده است.

## مواد و روش‌ها

تشخیص و تعیین نام جدایه‌ها بر اساس صفات مورفولوژیکی و با کمک کلید Gvritishvili 1982 صورت گرفت، ۵۸ جدایه بر اساس پراکنش جغرافیایی انتخاب شده و در مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). به منظور استخراج DNA ژنومی از جدایه‌های منتخب از روش Safaei et al. (2005) استفاده شد و پس از استخراج DNA، غلظت آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و کیفیت آن به وسیله ژل الکتروفورز ارزیابی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز براساس روش Zarei et al. (2008) در حجم کل ۲۵ µl صورت گرفت. قطعات حاصل روی ژل آگارز ۱/۲ درصد تفکیک شدند. رنگ‌آمیزی ژل‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر انجام شد. الگوی باندی حاصل پس از امتیازدهی باندها به صورت صفر و یک (وجود یا عدم وجود باند) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. براساس نتایج ماتریس تشابه، تجزیه خوشه‌ای با روش سنتروئید<sup>۱</sup> (Mohammadi et al. 2008) و ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از نرم‌افزار mvsp انجام شد که نتایج حاصل از نشانگرهای RAPD و ISSR در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است.

جهت انجام آزمون بیماری‌زایی تعداد ۲۰۰ نهال گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) سه ساله تهیه و در شرایط طبیعی در هوای آزاد غرس شد بدین منظور، سطح شاخه‌ها با پنبه آغشته به اتانول ضدعفونی شده و با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن<sup>۲</sup> سترون یک برش عمیق دایره‌ای به قطر شش میلی‌متر در آن ایجاد و پوست شاخه در این محل برداشته شد. سپس یک قرص شش میلی‌متری از حاشیه پرگنه در حال رشد جدایه‌های قارچی برداشته شده و به دقت در محل چاهک ایجاد شده در سطح شاخه مایه‌زنی

<sup>۱</sup> Centroid<sup>۲</sup> Corck borer

جدول ۱- جدایه‌های مورد مطالعه از قارچ *Cytospora chrysosperma* جدا شده از درختان گردو در ایران و محل جمع‌آوری آن‌ها.

| شماره جدایه | محل جمع‌آوری | جدایه                                         | شماره | محل جمع‌آوری | جدایه                                       |
|-------------|--------------|-----------------------------------------------|-------|--------------|---------------------------------------------|
| ۱           | A.kah.2      | آذربایجان غربی - کهریز                        | ۳۰    | KE.sah.6     | کرمانشاه - صحنه                             |
| ۲           | A.kah.6      | آذربایجان غربی - کهریز                        | ۳۱    | KE.sah.13    | کرمانشاه - صحنه                             |
| ۳           | A.koh.2      | آذربایجان غربی - کهنه شهر                     | ۳۲    | KE.son.2     | کرمانشاه - سنقر                             |
| ۴           | A.sal.1      | آذربایجان غربی - سلماس                        | ۳۳    | KE.sah.5     | کرمانشاه - صحنه                             |
| ۵           | A.sal.4      | آذربایجان غربی - سلماس                        | ۳۴    | KE.son.7     | کرمانشاه - جاده سنقر به صحنه                |
| ۶           | CH.ave.2     | چهارمحال و بختیاری - اورگان                   | ۳۵    | KO.sagh.1    | کردستان - سقز                               |
| ۷           | CH.far.1     | چهارمحال و بختیاری - فرخ شهر                  | ۳۶    | KO.san.8     | کردستان - ۱۲ کیلومتر جاده کامیاران به سنندج |
| ۸           | CH.far.2     | چهارمحال و بختیاری - فرخ شهر - روستای خیرآباد | ۳۷    | KO.san.5     | کردستان - ۹ کیلومتر جاده کامیاران به سنندج  |
| ۹           | CH.sam.1     | چهارمحال و بختیاری - سامان                    | ۳۸    | KO.san.7     | کردستان - ۱۳ کیلومتر جاده کامیاران به سنندج |
| ۱۰          | CH.sam.4     | چهارمحال و بختیاری - سامان                    | ۳۹    | KO.san.17    | کردستان - ۱۷ کیلومتر جاده موچش              |
| ۱۱          | CH.sh.1      | چهارمحال و بختیاری - شهرکرد                   | ۴۰    | KO.san.19    | کردستان - موچش                              |
| ۱۲          | F.saf.4      | فارس - صفاشهر                                 | ۴۱    | KO.san.26    | کردستان - ۲۵ کیلومتر جاده دهگلان به سنندج   |
| ۱۳          | H.nah.1      | همدان - نهاوند                                | ۴۲    | L.ali.1      | لرستان - الیگودرز                           |
| ۱۴          | H.nah.3      | همدان - نهاوند - روستای قاسم آباد             | ۴۳    | L.azn.1      | لرستان - ازنا                               |
| ۱۵          | H.nah.6      | همدان - ۱۵ کیلومتری نهاوند                    | ۴۴    | L.bor.1      | لرستان - بروجرد                             |
| ۱۶          | H.nah.8      | همدان - ۱۵ کیلومتری نهاوند                    | ۴۵    | L.dor.1      | لرستان - دورود                              |
| ۱۷          | H.nah.18     | همدان - ۵ کیلومتر جاده نهاوند                 | ۴۶    | L.dor.2      | لرستان - دورود                              |
| ۱۸          | H.ser.1      | همدان - سرکان - ورودی روستای باباپیر          | ۴۷    | L.osh.1      | لرستان - اشترینان                           |
| ۱۹          | H.toi.1      | همدان - ابتدای سه راهی تویسرکان               | ۴۸    | L.osh.2      | لرستان - اشترینان                           |
| ۲۰          | H.toi.2      | همدان - تویسرکان                              | ۴۹    | M.ara.1      | مرکزی - اراک                                |
| ۲۱          | H.toi.4      | همدان - ۱ کیلومتر جاده تویسرکان               | ۵۰    | M.ara.2      | مرکزی - اراک                                |
| ۲۲          | H.toi.8      | همدان - تویسرکان ۱۱ جاده تویسرکان به کنگاور   | ۵۱    | M.ara.3      | مرکزی - اراک                                |
| ۲۳          | IL.il.2      | ایلام - بانقلان                               | ۵۲    | M.kho.1      | مرکزی - خمین                                |
| ۲۴          | IS.dar.1     | اصفهان - داران                                | ۵۳    | M.kho.2      | مرکزی - خمین                                |
| ۲۵          | IS.rez.3     | اصفهان - رضوان شهر - روستای تندران            | ۵۴    | M.kho.3      | مرکزی - خمین                                |
| ۲۶          | IS.rez.4     | اصفهان - رضوان شهر - روستای الوار             | ۵۵    | Z.abh.1      | زنجان - ابهر                                |
| ۲۷          | IS.rez.5     | اصفهان - رضوان شهر - روستای مهدی آباد         | ۵۶    | Z.zan.1      | زنجان - زنجان                               |
| ۲۸          | KE.gah.1     | کرمانشاه - گهواره - روستای چفته سنجایی        | ۵۷    | Z.zan.2      | زنجان - زنجان                               |
| ۲۹          | KE.kan.2     | کرمانشاه - کنگاور                             | ۵۸    | Z.zan.8      | زنجان - زنجان                               |

روی نهال در اوایل مرداد ماه ۱۳۸۸ صورت گرفت و بعد از گذشت یک ماه در اواخر مرداد هرس شدند و سطح زخم‌های ایجاد شده اندازه‌گیری شدند. داده‌های حاصل با استفاده از برنامه MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. به منظور بررسی رابطه نشانگرهای ملکولی RAPD و ISSR با

شد. مایه‌زنی به گونه‌ای بود که میسلیم قارچ در تماس با سطح کامبیوم قرار گیرد. سپس محل مایه‌زنی با استفاده از پارافیلم باندپیچی شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار به اجرا درآمد و در تکرارهای شاهد از یک قرص شش میلی‌متری محیط کشت PDA جهت مایه‌زنی استفاده شد. مایه‌زنی

جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی ۵۸ جدایه از قارچ *C. chrysosperma* با استفاده از نشانگر RAPD.

| شاخص نشانگر (MI) | محتوای اطلاعاتی چندشکلی (PIC) | درصد چندشکلی | تعداد باند چندشکلی | تعداد کل باندها | دمای اتصال آغازگر | توالی (۵'-۳') | نام آغازگر |
|------------------|-------------------------------|--------------|--------------------|-----------------|-------------------|---------------|------------|
| ۴/۰۵             | ۰/۴۱                          | ۱۰۰          | ۱۵                 | ۱۵              | ۴۰                | GTCCCGACGA    | OPC07      |
| ۳/۶۶             | ۰/۴۵                          | ۹۰           | ۹                  | ۱۰              | ۴۰                | GGTGACTGTG    | E16        |
| ۲/۳۸             | ۰/۴۰                          | ۱۰۰          | ۶                  | ۶               | ۴۰                | GACGGATCAG    | OPC15      |
| ۳/۷۲             | ۰/۳۷                          | ۱۰۰          | ۱۰                 | ۱۰              | ۴۰                | GAAACGGGTG    | A7         |
| ۲/۱۱             | ۰/۳۰                          | ۱۰۰          | ۸                  | ۸               | ۴۰                | CCGTCGGTAG    | AB1        |
| ۲/۰۵             | ۰/۴۰                          | ۸۵/۷۱        | ۶                  | ۷               | ۴۰                | CTACTGCCGT    | E17        |
| ۱/۸۲             | ۰/۳۵                          | ۸۵/۷۱        | ۶                  | ۷               | ۳۷                | ACCTGGGGAG    | U17        |
| ۳/۴۵             | ۰/۳۸                          | ۱۰۰          | ۹                  | ۹               | ۴۰                | AGACCCAGAG    | U11        |
| ۴/۷۸             | ۰/۳۷                          | ۹۳/۳۳        | ۱۴                 | ۱۵              | ۴۰                | AAGCCTCGTC    | OPC13      |
| ۱/۸۶             | ۰/۳۶                          | ۸۵/۷۱        | ۶                  | ۷               | ۳۷                | CCTGGGCTTC    | UBC1       |

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی ۵۸ جدایه از قارچ *C. chrysosperma* با استفاده از نشانگر ISSR.

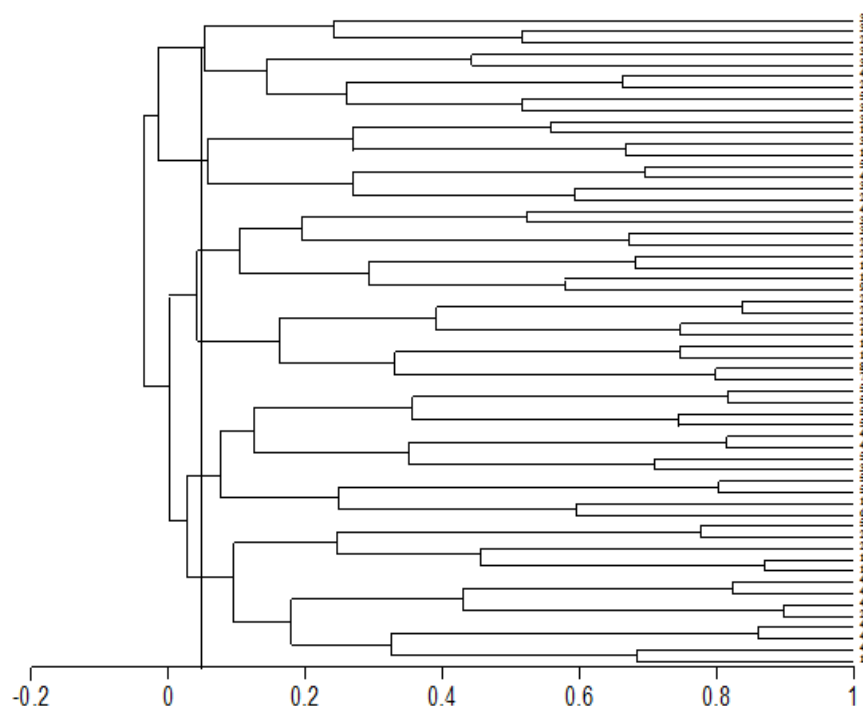
| شاخص نشانگر (MI) | محتوای اطلاعاتی چندشکلی (PIC) | درصد چندشکلی | تعداد باند چندشکلی | تعداد کل باندها | دمای اتصال آغازگر | توالی (۵'-۳')                       | نام آغازگر              |
|------------------|-------------------------------|--------------|--------------------|-----------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| ۳/۹۷             | ۰/۳۱                          | ۱۰۰          | ۱۳                 | ۱۳              | ۶۳                | GTGGTGGTGGTGGTG                     | (GTG)5                  |
| ۳/۰۹             | ۰/۲۸                          | ۱۰۰          | ۱۲                 | ۱۲              | ۵۹                | GACGACGACGACGAC                     | (GAC)5                  |
| ۲/۳۶             | ۰/۲۸                          | ۹۰           | ۹                  | ۱۰              | ۵۹                | CCACCACCACCACCA                     | (CCA)5                  |
| ۲/۳۴             | ۰/۳۸                          | ۸۷/۵۰        | ۷                  | ۸               | ۵۶                | ATGATGATGATGATGATG                  | P4                      |
| ۲/۷۱             | ۰/۳۴                          | ۱۰۰          | ۸                  | ۸               | ۵۶                | ACTGACTGACTGACTG                    | ISSR02                  |
| ۲/۲۲             | ۰/۲۴                          | ۹۰/۹۱        | ۱۰                 | ۱۱              | ۵۳                | GGAGAGGAGAGGAGA                     | UBC-880                 |
| ۳/۰۷             | ۰/۳۰                          | ۹۱/۶۷        | ۱۱                 | ۱۲              | ۵۳                | ACTGACTGACTGACTG                    | UBC-864                 |
| ۲/۹۱             | ۰/۲۹                          | ۱۰۰          | ۱۰                 | ۱۰              | ۵۶                | GAGAGAGAGAGAGAGAC                   | UBC-811                 |
| ۲/۱۶             | ۰/۳۰                          | ۸۸/۸۹        | ۸                  | ۹               | ۵۳                | GAGAGAGAGAGAGAGAYC                  | UBC-841                 |
| ۲/۰۴             | ۰/۲۳                          | ۱۰۰          | ۹                  | ۹               | ۵۶                | ACACACACACACACACYT                  | UBC-855                 |
| ۲/۷۲             | ۰/۳۰                          | ۱۰۰          | ۹                  | ۹               | ۵۳                | GACAGACAGACAGACA                    | UBC-112                 |
| ۲/۱۷             | ۰/۲۷                          | ۱۰۰          | ۸                  | ۸               | ۵۳                | GGAGAGGAGAGGAGA<br>ACTGACTGACTGACTG | ترکیب UBC-880 و UBC-864 |

ده آغازگر از مجموع ۲۰ آغازگر RAPD و ۱۲ آغازگر از مجموع ۲۰ آغازگر ISSR با چندشکلی و تکرارپذیری بالا جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. میزان چندشکلی حاصل از نشانگرهای RAPD و ISSR به ترتیب برابر با ۹۴/۷ درصد و ۹۵/۸ درصد بود. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از نشانگرهای RAPD و ISSR بر اساس روش Centroid و ضریب تشابه جاکارد جدایه‌ها را به ترتیب به شش و هفت گروه در

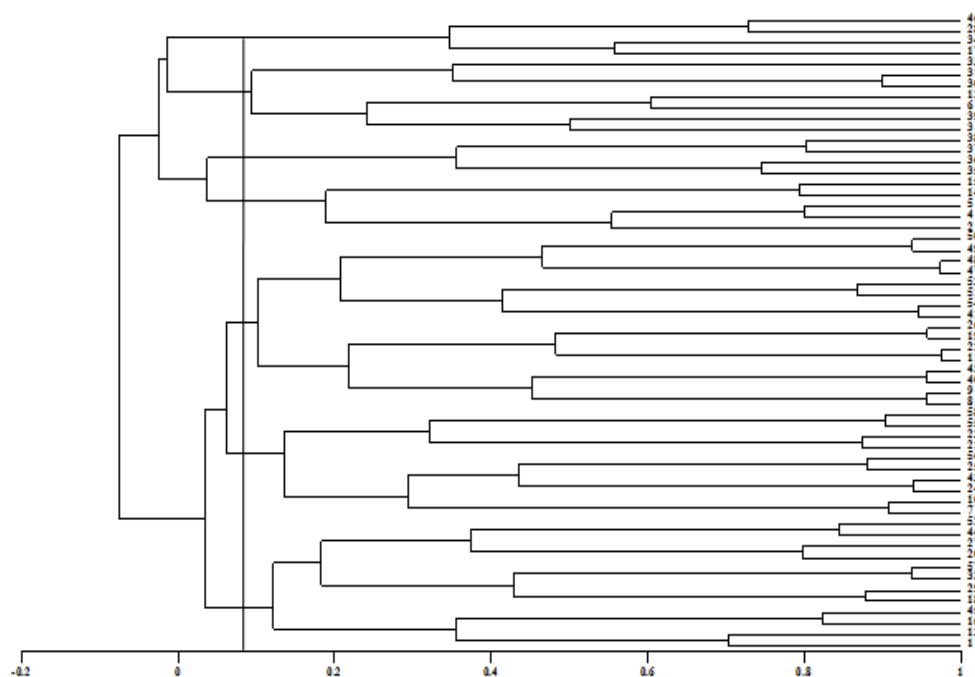
صفت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Cytospora chrysosperma* روی نهال‌های گردو رگرسیون مرحله‌ای با نرم‌افزار SPSS روی ۵۸ جدایه انجام شد.

### نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی جدایه‌های منتخب با استفاده از دو نشانگر RAPD و ISSR مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس یک آزمایش اولیه تعداد



شکل ۱- دندروگرام حاصل از نشانگر RAPD بر اساس ضریب تشابه جاکارد.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه جاکارد.

مناسبی جهت مطالعات تنوع ژنتیکی در جدایه‌های قارچ *C. chrysosperma* می‌باشند اما نشانگر ISSR به دلیل دمای اتصال بالا، تکرارپذیری قابل قبول و هزینه یکسان با نشانگر

بهترین نقطه برش تقسیم‌بندی کرد (شکل‌های ۱ و ۲) که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالایی در بین جمعیت‌های *C. chrysosperma* است. نتایج نشان داد که نشانگرهای RAPD و ISSR، نشانگرهای

جدول ۴- نتایج حاصل از رگرسیون گام به گام بین صفت بیماری زایی و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای RAPD مؤثر در جدایه‌های مورد مطالعه.

| نشانگر       | B       | Std. Error | Beta   | T      | Sig.  |
|--------------|---------|------------|--------|--------|-------|
| A7=۱۹۰۰bp    | -۵۱/۵۷۹ | ۱۰/۴۶۳     | -۰/۵۰۱ | -۴/۹۳۰ | ۰/۰۰۰ |
| OPC13=۱۹۰۰bp | ۲۶/۳۶۴  | ۷/۵۹۵      | ۰/۳۶۶  | ۳/۴۷۱  | ۰/۰۰۱ |
| OPC13=۴۰۰bp  | -۲۲/۷۴۸ | ۸/۶۳۴      | -۰/۲۸۱ | -۲/۶۳۵ | ۰/۰۱۱ |
| OPC15=۱۷۰۰bp | -۲۶/۰۷۱ | ۸/۶۵۶      | -۰/۳۲۸ | -۳/۰۱۲ | ۰/۰۰۴ |
| AB1=۱۵۰۰bp   | ۳۲/۰۸۱  | ۱۲/۶۹۷     | ۰/۲۷۵  | ۲/۵۲۷  | ۰/۰۱۵ |

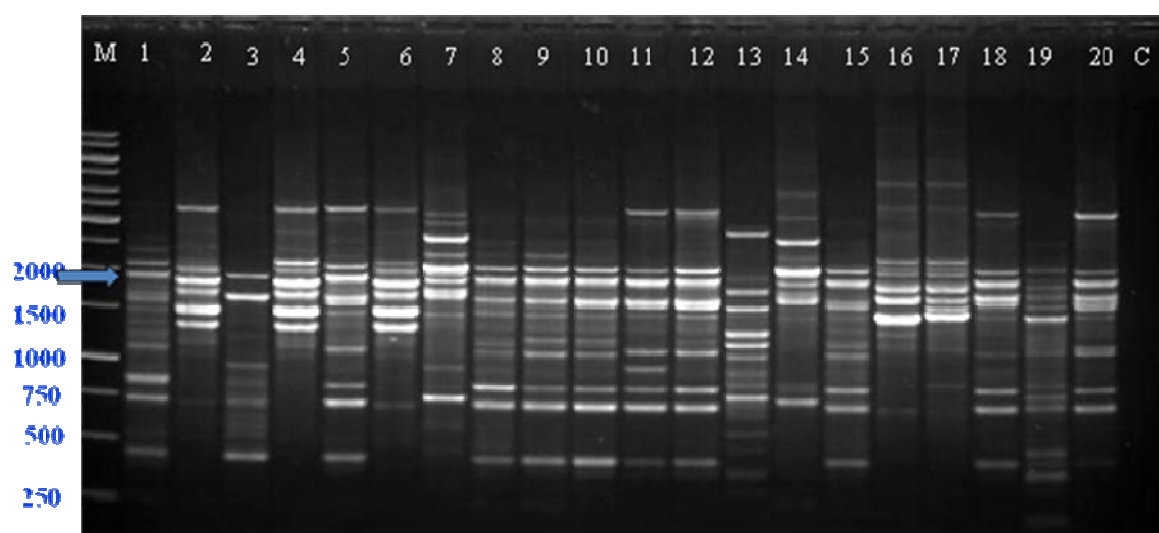
جدول ۵- نتایج حاصل از رگرسیون گام به گام بین صفت بیماری زایی و داده‌های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای ISSR مؤثر در جدایه‌های مورد مطالعه.

| نشانگر        | B       | Std. Error | Beta   | T      | Sig.  |
|---------------|---------|------------|--------|--------|-------|
| (GAC)5=۱۳۰۰bp | -۱۸/۳۲۸ | ۸/۴۲۸      | -۰/۲۴۸ | -۲/۱۷۵ | ۰/۰۳۴ |
| UBC112=۱۵۰۰bp | -۹۶/۹۹۹ | ۲۳/۶۰۰     | -۰/۶۰۶ | -۴/۱۱۰ | ۰/۰۰۰ |
| UBC864=۳۵۰bp  | ۶۶/۱۱۲  | ۲۳/۳۸۲     | ۰/۴۱۳  | -۲/۸۲۷ | ۰/۰۰۷ |
| UBC880=۷۴۰bp  | ۳۸/۱۵۹  | ۱۷/۶۰۰     | ۰/۲۳۸  | ۲/۱۶۸  | ۰/۰۳۵ |
| UBC855=۱۶۰۰bp | ۴۰/۴۱۷  | ۱۸/۶۷۸     | ۰/۲۵۲  | ۲/۱۶۴  | ۰/۰۳۵ |

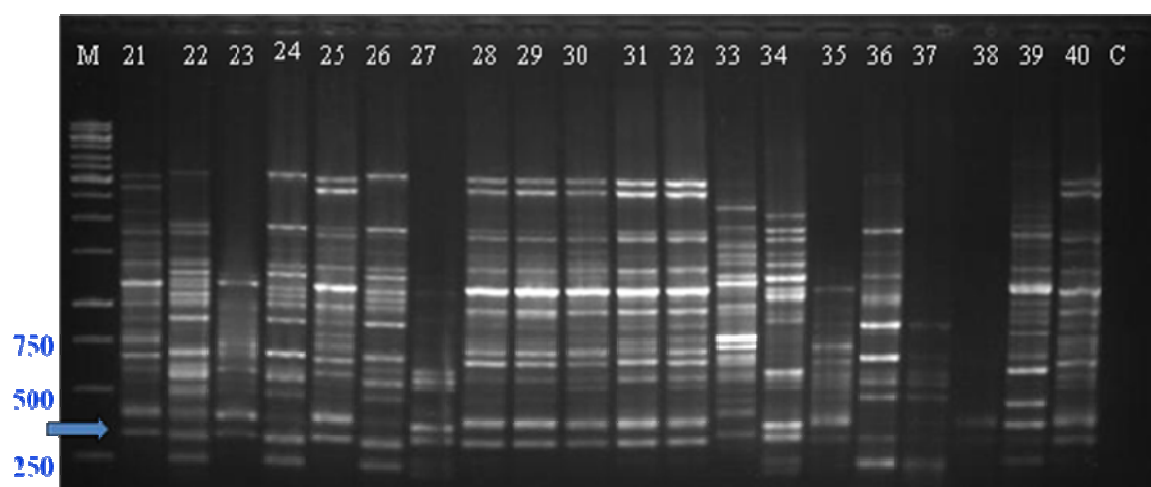
OP13 (درصد  $R^2=4/8$ ) بود. همچنین پنج نشانگر ISSR با صفت بیماری‌زایی مرتبط بودند (جدول ۵) که در مجموع ۳۹ درصد تغییرات این صفت را توجیه کردند. سه نشانگر رابطه مثبت و دو نشانگر رابطه منفی با صفت بیماری‌زایی نشان دادند. بیشترین تغییرات تبیین شده توسط نشانگرها برای صفت بیماری‌زایی مربوط به نشانگر ۳۵۰ bp از آغازگر UBC864 (درصد  $R^2=11/6$ ) (شکل ۴) و کمترین مقدار مربوط به نشانگر ۷۴۰ bp از آغازگر UBC880 (درصد  $R^2=5/4$ ) بود.

با استفاده از نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفت بیماری‌زایی با استفاده از انتخاب به وسیله نشانگر (MAS)، می‌توان به شناسایی ژن‌های مهم و معرفی نشانگرهای کاندید برای مطالعه بیشتر جمعیت‌های قارچی اقدام کرد. به علاوه بررسی پتانسیل ژنتیکی جدایه‌ای خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی و شناسایی ال‌های صفت مطلوب در جمعیت‌های قارچی امکان‌پذیر است. همچنین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده با به‌کارگیری آغازگرهای معرفی شده در این مطالعه، قسمت‌هایی از ژنوم که ارتباط نزدیک با صفت بیماری‌زایی دارند، با تکنیک‌های مولکولی ویژه جدا شده و در مطالعات مولکولی مورد استفاده قرار گیرند.

RAPD از ارجحیت بیشتری برخوردار است. جهت تعیین درجه بیماری‌زایی در بین جمعیت گونه *C. chrysosperma*، جدایه‌های منتخب در سه تکرار روی نهال‌های گردو مایه‌زنی شدند و مساحت زخم اندازه‌گیری شد. سپس میانگین سه تکرار محاسبه و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنوع قابل ملاحظه‌ای از لحاظ بیماری‌زایی در جدایه‌های *C. chrysosperma* وجود دارد. به منظور بررسی رابطه نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR با صفت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ روی نهال‌های گردو توسط رگرسیون مرحله‌ای با نرم‌افزار SPSS روی ۵۸ جدایه انجام شد. طی این مطالعه صفت بیماری‌زایی به عنوان متغیر تابع و داده‌های مولکولی (صفر و ۱) به عنوان متغیر ثابت وارد مدل رگرسیونی شد. با توجه به صفت وارد شده به مدل، باندهایی که مقدار  $R^2$  بالایی داشتند مورد بحث و بررسی قرار گرفتند. چهار نشانگر RAPD با صفت بیماری‌زایی مرتبط بودند (جدول ۴) و در مجموع ۴۳/۷ درصد تغییرات این صفت را توجیه کردند که دو نشانگر رابطه مثبت و سه نشانگر رابطه منفی با صفت بیماری‌زایی نشان دادند. بیشترین درصد تغییرات توجیه شده مربوط به نشانگر ۱۹۰۰ bp از آغازگر A7 (درصد  $R^2=18/2$ ) (شکل ۳) و کمترین مقدار مربوط به نشانگر ۴۰۰ bp از آغازگر



شکل ۳- الگوی بانندی حاصل از نشانگر RAPD با استفاده از آغازگر A7 (نشانگر ۱۹۰۰ bp و دارای اثر منفی).



شکل ۴- الگوی بانندی حاصل از نشانگر ISSR با استفاده از آغازگر UBC864 (نشانگر ۳۵۰ bp و دارای اثر مثبت).

#### منابع

- Adams GC, Surve-lyer RS, lezzoni A (2002) Ribosomal DNA sequence divergence and group 1 introns within *Leucostoma* species, *L. cinctum*, *L. persoonii* and *L. parapersoonii* sp. nov., ascomycetes that cause Cytospora canker of fruit trees. *Mycologia* 94: 947-967.
- Adams GC, Wingfield MJ, Common R, Roux J (2005) Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae) from Eucalyptus. *Studies in Mycology* 52: 11-44.
- Barat shoostary M, Soltani M, Shiran B, Rabiei K, Ahmadian S (2005) Study of relationships between RAPD markers and morphological traits in field and hydroponics

conditions. The 4<sup>th</sup> National Conference on Biotechnology in Iran (In Farsi).

Belisario A (1992) Phytopathological problems of walnut. *Informatore Agrio* 48: 51-53.

Biggs AR (1989a) Temporal changes in the infection court following wounding of peach bark are associated with cultivar variation in infection by *Leucostoma persoonii*. *Phytopathology* 79: 627-630.

Biggs AR (1989b) Integrated control of *Leucostoma* canker of peach in Ontario. *Plant Disease* 73: 869-874.

Ebrahimi A, Naghavi M, Sabokdast M, Moradi Sarab Sheli A (2011) Analysis of microsatellite markers associated with agronomic traits in Iranian native barley. *Modern Genetics Journal* 1: 35-43 (In Farsi).

Fotouhifar KB, Hedjaroude GA (2010) ITS rDNA phylogeny of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs. *Mycologia* 102: 1369-1382.

Gvritishvili MN (1982) The fungal genus *Cytospora* in the USSR. Lzdatelstve Sabchota Sakastvelo, Tbilici, Russia.

Mohammadi SA, Khodarahmi M, Jamalirad S, Jalal Kamali MR (2008) Genetic diversity in a collection of old and new bread wheat cultivars from Iran as revealed by simple sequence repeat-based analysis. *Annals of Applied Biology* 154: 67-76.

Safaei N, Alizadeh A, Rahimian H, Adam G (2005) Molecular characterization and evaluation of genetic variation in Iranian populations of causal agent of spike blight of wheat. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41: 171-189.

Zarei L, Cheghamirza K, Farshadfar E (2008) Study of genetic variation and cultivar identification by RAPD and ISSR markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). The 9<sup>th</sup> International Congress on Cell Biology-Seoul, Korea.