ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹
صفحه ۶۸-۵۷

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی قارچ *Macrophomina phaseolina*، عامل پوسیدگی ذغالی سویا، با استفاده از نشانگرهای ISSR و rep-PCR

فرناز جلالی[۱]، ناصر صفایی*[۲]، سعید عباسی[۳]

۱و۲- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس دانشکده کشاورزی، گروه بیماری شناسی گیاهی
۳- استادیار دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nsafaie@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۹)

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی *Macrophomina phaseolina*، عامل پوسیدگی ذغالی سویا، ۲۴ جدایه از این قارچ جداسازی شده از مناطق عمده کشت سویای ایران شامل استان‌های گلستان، مازندران، اردبیل و لرستان با استفاده از دو روش مختلف انگشت نگاری مولکولی ISSR و rep-PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. از مجموع ۱۰ آغازگر ISSR، سه آغازگر واجد چند شکلی و تکرار پذیری بیشتر بوده، به همراه آغازگرهای ERIC 1R، ERIC 2I، BOX 1A و REP 2I برای تکثیر DNA جدایه‌ها به کار رفتند. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مجموع آغازگرهای ISSR جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۸ درصد به سه گروه تقسیم نموده و به استثنای یک جدایه از استان اردبیل، سایر جدایه‌های غیر گلستان را از جدایه‌های استان گلستان تفکیک کرد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مجموع آغازگرهای rep-PCR جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۹ درصد به هفت گروه تقسیم نمود. این گروه‌بندی بی‌ارتباط با محل جغرافیایی جدایه‌ها بود. نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز این گروه‌بندی‌ها را تایید کرد. همبستگی مثبت و معنی‌داری میان ماتریس‌های تشابه حاصل از داده‌های ISSR و rep-PCR با یکدیگر و به طور مجزا مشاهده شد. نیکویی برازش خوشه بندی نیز در سطح بسیار خوب قرار گرفت. میزان چندشکلی بدست آمده برای نشانگر ISSR معادل ۸۷ درصد و برای نشانگر rep-PCR معادل ۹۱ درصد محاسبه گردید. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که با وجود خصوصیات مشترکی نظیر غالبیت، سادگی و سرعت عمل بالا در هر دو سیستم نشانگرهای ISSR و rep-PCR، نشانگر ISSR قدرت بیشتری در آشکارسازی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *M. phaseolina* با توجه به محل جغرافیایی آن‌ها دارد.

واژه‌های کلیدی

پوسیدگی ذغالی،
سویا،
***Macrophomina phaseolina*،**
rep-PCR،
ISSR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]

مقدمه

بیماری پوسیدگی ذغالی سویا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول در سطح جهان به ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری با آب و هوای نیمه‌خشک می‌باشد. در ایران نیز این بیماری در برخی از مناطق کشت سویا، خسارت قابل توجهی را به این محصول وارد می‌کند. قارچ عامل بیماری، *Macrophomina phaseolina*، قارچی پلی‌فاژ می‌باشد که بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی متعلق به ۱۰۰ خانواده اعم از تک‌لپه و دولپه را آلوده می‌کند (۴). این قارچ خاک‌زاد و بذرزاد می‌باشد (۲۱). گسترده بودن دامنه میزبانی، انتشار وسیع جغرافیایی و قدرت بقای زیاد و نیز پیچیدگی محیط خاک که موجب ناکارآمدی کنترل شیمیایی می‌شود، مدیریت و مهار این بیماری را بغرنج ساخته است. از این‌رو، همانند سایر بیماری‌های خاکزاد، استفاده از ارقام مقاوم در تلفیق با روش‌های زراعی، مناسب‌ترین، اقتصادی‌ترین و عملی‌ترین راه کنترل این بیماری می‌باشد. در این راستا، به منظور تدوین و اجرای برنامه‌های بهنژادی، شناخت ساختار جمعیت عامل بیماریزا و دقت و سهولت ارزیابی مقاومت از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. در واقع، یکی از دلایل عمده عدم توفیق در مدیریت بیماری‌های گیاهی، ناشی از شناخت اندک از ساختار ژنتیکی جمعیت‌های بیمارگر می‌باشد (۱۷).

علیرغم دامنه میزبانی وسیع، جمعیت‌های این قارچ تحت گونه *M. phaseolina* قرار داده می‌شوند و با وجود تنوع قابل توجهی که در جمعیت‌های این قارچ گزارش شده است، تلاش‌ها برای تشخیص زیر گونه‌های آن بر مبنای اندازه میکرواسکلرت‌ها، خصوصیات کشت، تغییر در جمعیت‌های بیمارگر در خاک در پاسخ به تناوب و تنوع در بیماریزایی، به دلیل تنوع وسیع درون گونه یا مشکلات در کمّی کردن صفات به شکست انجامیده‌اند (۹ و ۲۳).

استفاده از نشانگرهای مولکولی بر مبنای DNA روش جدید و سریعی در مطالعات تنوع ژنتیکی برای بدست آوردن بینشی در مورد ساختار پیچیده جمعیت قارچ‌های پلیمورف نظیر *M. phaseolina*، که دامنه وسیعی از گیاهان زراعی را آلوده می‌سازد، می‌باشد. انواع متفاوتی از واکنش های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از جمله RAPD (۴، ۸، ۱۰ و ۲۷)، RFLP (۲، ۲۴ و ۳۰)، AFLP (۷، ۱۸ و ۳۱) SSR (۵ و ۱۲) و URP-PCR (۱۳) در مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *M. phaseolina*، در کشورهای مختلف به کار رفته‌اند.

از سال ۱۹۹۴، نشانگر مولکولی ISSR (Inter-simple sequence repeat amplification) در مطالعات ژنتیکی قارچ‌ها به کار رفت (۳۵). در این روش برای انگشت نگاری DNA از آغازگرهای SSR تغییر یافته براساس توالی‌های مجاور ریز ماهواره‌ها که در سراسر ژنوم پراکنده‌اند، استفاده می‌شود. این روش نیمه انتخابی بوده و پرایمرهای آن دارای طولی برابر با ۱۴ تا ۲۲ جفت باز (به صورت قلاب شده در انتهای ´۳ یا ´۵) می‌باشند. تکثیر در این نشانگر، در حضور یک آغازگر مکمل با توالی‌های SSR یا Microsatellite هدف، انجام می‌پذیرد و تنوع حاصله در طول فرآورده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تابعی از تعداد واحدهای ریزماهواره است (۳۴).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر مبنای توالی‌های تکرار شونده (rep-PCR)[1] روش انگشت نگاری ژنومی دیگری است که کارآیی آن برای تشخیص مولکولی گونه‌های باکتریایی اثبات گردیده است (۲۶ و ۳۳). خانواده‌های توالی‌های DNA تکرار شونده به نام‌های توالی پالیندرومی تکرار شونده خارج ژنی (REP)[2] ۳۵ تا ۴۰ جفت بازی، توالی توافقی تکرار شونده داخل ژنی انتروباکتریایی (ERIC)[3] ۱۲۴ تا ۱۲۷ جفت بازی و عنصر BOX ۱۵۴ جفت بازی، درون ژنوم گونه‌های مختلف باکتری‌ها پراکنده‌اند (۱۵ و ۳۲). گرچه آغازگرهای rep-PCR برای عناصر تکرار شونده در ژنوم‌های پروکاریوتی طراحی گردیدند، اما مشاهده شده است که آغازگرهای BOX، ERIC و REP توالی‌های بین توالی‌های تکرار شونده در پروکاریوت‌ها (۱۴) و نیز برخی ژنوم‌های قارچی را هم با موفقیت تکثیر می‌کنند (۶) و برای مطالعه تنوع در سطوح بین و یا درون‌گونه جنس‌های قارچی متعدد به کار رفته‌اند (۳، ۱۹، ۲۰ و ۲۲). از این‌رو، rep-PCR روش نسبتاً جدیدی برای

[1] Repetitive Extragenic Palindrome- based Polymerase Chain Reaction
[2] Repetitive Extragenic Palindrome
[3] Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]

تعیین تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های قارچی می‌باشد که می‌تواند روش‌های موجود انگشت‌نگاری مبتنی بر DNA را تکمیل کند (۱۱). این روش انگشت نگاری‌های DNA را با تکثیر توالی‌های بین کپی‌های پراکنده تصادفی از یک قطعه DNA تکرار شونده در ژنوم، ایجاد می‌کند. استفاده از این نشانگر و نیز آغازگرهای میکروساتلایت قبلا برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های هندی *M. phaseolina* جداسازی شده از گیاهان مختلف گزارش شده است (۲۵). مطالعه حاضر به بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی *M. phaseolina* روی سویا، جمع آوری شده از ۴۸ محل مختلف ۴ استان کشور، با استفاده از دو نشانگر مولکولی مختلف ISSR و rep-PCR می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی

در بازدیدهایی که در سال ۱۳۸۵ از مزارع سویا در استان‌های گلستان، مازندران، اردبیل و لرستان به عمل آمد، نمونه‌های مشکوک به بیماری پوسیدگی ذغالی با علائم پژمردگی و وجود نقاط سیاه‌رنگ در طوقه و ساقه گیاه جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌های آلوده ابتدا کاملاً با آب شستشو داده شدند تا گل و لای و آلودگی‌های سطحی آن‌ها حذف شوند. سپس با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی گردیده و قطعاتی از بافت آلوده درون تشتک‌های پتری روی محیط کشت آب آگار یا عصاره‌ی سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) حاوی ۲۵۰ قسمت در میلیون (ppm) کلرامفنیکل قرار داده شد. به منظور رشد قارچ، تشتک‌های پتری در دمای $35^{\circ}C$ – ۲۸ نگهداری شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک ریسه انجام گرفت. از مجموع ٤٨ جدایه *M. phaseolina* به دست آمده از گیاه سویا، ٢٤ جدایه با توجه به پراکنش جغرافیایی انتخاب و در مطالعه حاضر به کار رفتند (جدول۱).

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی جدایه‌های قارچی مطابق روش صفایی و همکاران (۱۳۸۴) استخراج گردید (۱). به این منظور، mg ۵۰–۴۰ میسلیوم پودر شده قارچ در نیتروژن مایع به یک میکروتیوب ml ۱/۵ منتقل و سپس µl ۴۰۰ بافر استخراج (Tris-HCl ۱۰۰mM، mM ۵ EDTA و NaCl ۴/۱M [pH=7.5-8]) به هر میکروتیوب اضافه گردید. محتویات میکروتیوب توسط دستگاه ورتکس (vortex) به مدت چند ثانیه هم زده شد و کاملاً مخلوط گردید. میکروتیوب‌ها سپس به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبی با دمای $65^{\circ}C$ قرار داده شدند. پس از انتقال میکروتیوب‌ها بر روی یخ، به منظور سرد شدن و ته نشین شدن کامل پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها، محتویات میکروتیوب با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای $4^{\circ}C$ و به مدت ۱۰ دقیقه، در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار (64R, Beckman) سانتریفوژ شد. محلول رویی با احتیاط زیاد به کمک میکروپیپت به میکروتیوب تمیز و سترون دیگری منتقل شده و ۰/۷ حجم آن ایزوپروپانول اضافه گردید. میکروتیوب به آرامی وارونه شد تا محتویات آن مخلوط گردد و سپس در دستگاه سانتریفوژ بدون یخچال (Eppendorph 5415D, Hamburg, Germany)، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از حذف ایزوپروپانول (فاز رویی)، رسوب حاصل در معرض هوای اتاق قرار گرفت تا باقیمانده الکل تبخیر و رسوب DNA در مجاورت هوا خشک گردد. سپس µl ۵۰ آب دیونیزه سترون به رسوب DNA اضافه و یک شب در یخچال نگهداری شد تا DNA در آب حل گردد. در ادامه و به منظور حذف RNA موجود، یک میکرولیتر RNase (۱۰mg/ml) به محلول حاصل اضافه گردید و پس از ۲ ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق، محلول به دست آمده در دمای $-20^{\circ}C$ نگهداری شد. کیفیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز و غلظت آن توسط دستگاه بیوفتومتر (Eppendorph AG 22331, Hamburg, Germany) مورد سنجش قرار گرفت.

تکثیر PCR و الکتروفورز ژل

از میان ده آغازگرISSR که مقدمتا مورد آزمون قرار گرفتند، سه آغازگر تکرار پذیری و چندشکلی بیشتری را نشان دادند. در نتیجه این سه آغازگر به همراه آغازگرهای ERIC1R، ERIC2I، BOX1A و REP2I برای تکثیر کلیه جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (جدول۲).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *M. phaseolina* عامل پوسیدگی ذغالی سویا جمع‌آوری شده از چهار استان کشور

ردیف	محل جمع آوری	کد جدایه	ردیف	محل جمع آوری	کد جدایه
۱	کردکوی- گلستان	G-13*	۲۵	کفشگیری- گلستان	G-Ka3
۲	آق قلا- گلستان	G-16*	۲۶	کفشگیری- گلستان	G-Ka4
۳	خان بین- گلستان	G-19*	۲۷	کفشگیری- گلستان	G-Ka5*
۴	قرن آباد- گلستان	G-20*	۲۸	لمسک- گلستان	G-Lm1
۵	حسین آباد- گلستان	G-21*	۲۹	لمسک- گلستان	G-Lm2*
۶	عطا آباد- گلستان	G-22*	۳۰	لمسک- گلستان	G-Lm3
۷	علی آباد- گلستان	G-23*	۳۱	لمسک- گلستان	G-Lm4
۸	بابلسر- مازندران	M-30*	۳۲	لمسک- گلستان	G-Lm5*
۹	الشتر- لرستان	L-Al*	۳۳	نصر آباد- گلستان	G-NA1*
۱۰	جعفرآباد- اردبیل	A-Ja1*	۳۴	نصر آباد- گلستان	G-NA2
۱۱	جعفرآباد- اردبیل	A-Ja2*	۳۵	نصر آباد- گلستان	G-NA3
۱۲	بالاجاده- گلستان	G-Bj1*	۳۶	نصر آباد- گلستان	G-NA4
۱۳	بالاجاده- گلستان	G-Bj2	۳۷	نصر آباد- گلستان	G-NA5
۱۴	بالاجاده- گلستان	G-Bj3	۳۸	سر کلاته- گلستان	G-Sk1*
۱۵	بالاجاده- گلستان	G-Bj4*	۳۹	سر کلاته- گلستان	G-Sk2
۱۶	بالاجاده- گلستان	G-Bj5	۴۰	سر کلاته- گلستان	G-Sk3
۱۷	مغان- اردبیل	A-Mo*	۴۱	سر کلاته- گلستان	G-Sk4
۱۸	قلندر محله- گلستان	G-Gm1	۴۲	سیدمیران - گلستان	G-Sm1*
۱۹	قلندر محله- گلستان	G-Gm2*	۴۳	سیدمیران- گلستان	G-Sm2
۲۰	قلندر محله- گلستان	G-Gm3	۴۴	سیدمیران- گلستان	G-Sm3*
۲۱	قلندر محله- گلستان	G-Gm4	۴۵	سیدمیران- گلستان	G-Sm4
۲۲	قلندر محله- گلستان	G-Gm5	۴۶	توسکستان-گلستان	G-Tu1*
۲۳	کفشگیری- گلستان	G-Ka1*	۴۷	توسکستان-گلستان	G-Tu2
۲۴	کفشگیری- گلستان	G-Ka2	۴۸	توسکستان-گلستان	G-Tu3

* جدایه‌های استفاده شده در مطالعه تنوع ژنتیکی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]

جدول ۲- توالی کل آغازگرهای ISSR و rep-PCR آزمون شده.

نشانگر	آغازگر	توالی
ISSR	ISSR02*	5`-ACTGACTGACTGACTG-3`
	ISSR10	5`-CACCACCACCACCAC-3`
	P1	5`-TCTCTCTCTCTCTCTCC-3`
	P4*	5`-GCG$(CGA)_5$-3`
	P5	5`-ACACACACACACACACYC-3`
	P6	5`-GAGAGAGAGAGAGAGAYG-3`
	Stag1	5`-BDBACAACAACAACAACA-3`
	Stag2	5`-CAACAACAACAACAA-3`
	Stag3	5`-CAGCAGCAGCAGCAG-3`
	PCMS*	5`-$(GTC)_7$-3`
rep-PCR	ERIC 1R*	5`-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3`
	ERIC 2I*	5`-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3`
	BOX 1A*	5`-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3`
	REP 2I*	5`-ICGICTTATCIGGCCTAC-3`

* آغازگرهایی که تکرار پذیری و چندشکلی بیشتری داشته و برای کلیه جدایه‌ها استفاده شدند.

برای آغازگرهای ISSR واکنش PCR در حجم واکنش ۲۰ µl برای هر جدایه شامل ۲ µl از بافر ۱۰X PCR، ۱۳/۵ µl آب دیونیزه سترون، ۰/۶ µl $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۰/۴ µl dNTP mix (۱۰ mM)، ۱ µl از هر یک از آغازگرها (۱۰ µM)، ۲/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase و ۲ µl از DNA نمونه (۲۰ ng/µl) صورت گرفت. برای کنترل منفی ۲ µl آب دیونیزه سترون به جای DNA نمونه مصرف گردید. تکثیر PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorph AG 22331, Hamburg, Germany) برای آغازگرهای ISSR02 و P4 به صورت یک چرخه مقدماتی شامل مراحل واسرشتگی مقدماتی ۵ دقیقه در ˚C ۹۵، اتصال مقدماتی ۴۵ ثانیه در ˚C ۴۵، گسترش مقدماتی یک دقیقه در ˚C ۷۲، به دنبال آن تکرار ۳۸ چرخه شامل مراحل واسرشتگی ۴۵ ثانیه در˚C ۹۵، اتصال ۴۵ ثانیه در ˚C ۵۰، گسترش یک دقیقه در ˚C ۷۲ و در پایان، مرحله گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در ˚C ۷۲ صورت گرفت. برای آغازگر PCMS دمای اتصال در چرخه ها ˚C ۶۷ مناسب تشخیص داده شد.

برای آغازگرهای rep-PCR حجم و مواد مورد استفاده در مخلوط واکنش همانند ISSR بود. برنامه PCR برای آغازگرهای ERIC به صورت مرحله واسرشتگی مقدماتی۲ دقیقه در ˚C ۹۵، سپس تکرار ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشتگی یک دقیقه در ˚C ۹۴، مرحله اتصال ۱/۵ دقیقه در ˚C ۵۳، مرحله گسترش دو دقیقه در ˚C ۷۲ و در پایان مرحله گسترش نهایی ۸ دقیقه در ˚C ۷۲ صورت گرفت.

برنامه PCR برای آغازگر BOX1A به صورت یک چرخه مقدماتی شامل مراحل واسرشتگی مقدماتی ۵ دقیقه در ˚C ۹۴، اتصال مقدماتی ۲ دقیقه در ˚C ۶۸، گسترش مقدماتی ۲ دقیقه در ˚C ۷۰ و سپس تکرار ۴۴ چرخه شامل مراحل واسرشتگی یک دقیقه در˚C ۹۴، اتصال ۱ دقیقه در ˚C ۶۰، گسترش ۲ دقیقه در ˚C ۷۰ و در پایان گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در ˚C ۷۰ صورت گرفت.

برنامه PCR برای آغازگر REP2I به صورت ۲ دقیقه در ˚C ۹۵، ۳۰ ثانیه در ˚C ۹۲، و سپس تکرار ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشتگی ۳۰ ثانیه در ˚C ۹۲، اتصال ۳۰ ثانیه در ˚C ۳۸، گسترش ۳ دقیقه و بیست ثانیه در ˚C ۶۸ و در پایان گسترش نهایی ۸ دقیقه در ˚C ۶۸ صورت گرفت.

الکتروفورز محصولات PCR در هر مورد، با شدت ولتاژ ثابت ۸۵ ولت، در ژل آگارز یک درصد در بافر 1X TBE انجام شد. رویت باندهای حاصل، با استفاده از اتیدیوم بروماید (۱ µg/ml) و تحت نور UV انجام پذیرفت.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]

تجزیه و تحلیل داده‌ها

با توجه به اینکه نشانگرهای بکار رفته در این تحقیق جزو نشانگرهای غالب می‌باشند، در هر دو روش، تفسیر ژل با وجود (۱) یا عدم وجود (۰) باند امتیازدهی شد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA[4]، ضریب تشابه جاکارد و نرم افزار NTSYS-pc (ver.2.1)[5] (۲۹) صورت گرفت. برای مشاهده فواصل بین جدایه‌ها به صورت دو بعدی، از آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی به عنوان مکمل روش خوشه بندی و برای تعیین همبستگی بین ماتریس‌های تشابه حاصل از تجزیه داده‌ها، از آزمون مانتل استفاده شد (۱۶). بررسی همبستگی بین ماتریس کوفنتیک و ماتریس تشابه یا فاصله ضریب کوفنتیک نیز به عنوان معیاری برای اندازه گیری نیکویی برازش خوشه بندی (Goodness of fit) مورد استفاده قرار گرفت (۲۹).

نتایج

تجزیه و تحلیل انگشت نگاری‌های ژنومی ISSR

از میان ده آغازگرISSR آزمون شده، تعداد سه آغازگر ISSR02، PCMS و P4 تکرار پذیری و چندشکلی بیشتری را نشان داده و در نتیجه برای کلیه جدایه‌ها استفاده شدند (شکل۱). تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر و محدوده آنها مطابق جدول۳ می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مجموع الگوهای باندی حاصل از مجموع آغازگرهای ISSR جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۸ درصد به سه گروه تقسیم نمود. پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز موید همین مطلب می‌باشد (شکل۲).

گروه اول جدایه مازندران (۴ درصد جدایه‌ها)، گروه دوم دو جدایه از اردبیل به همراه جدایه لرستان (۱۳ درصد جدایه‌ها) و گروه سوم کل جدایه‌های گلستان (۱۹ جدایه) و یک جدایه از اردبیل (۸۳ درصد جدایه‌ها) را در برگرفت. بنابراین با استفاده از این نشانگر، به استثنای جدایه A-Mo از استان اردبیل، سایر جدایه‌های غیر استان گلستان از جدایه‌های استان گلستان تفکیک گردیدند.

از مجموع الگوهای باندی ISSR، ۴۸ جایگاه ژنی حاصل شد که شش جایگاه ژنی یک شکل بوده و نهایتا ۸۷ درصد چندشکلی نشان دادند. بیشترین جایگاه ژنی چندشکل توسط آغازگر P4 (۱۸ جایگاه ژنی) و کمترین آن توسط آغازگر ISSR02 (۹ جایگاه ژنی) حاصل شد. در بین این آغازگرها تنها آغازگر P4 به تنهایی قادر به تفکیک کامل جدایه‌ها بر مبنای منشا جغرافیایی بود. بیشترین تشابه بر اساس ضریب جاکارد، در میان دو جدایه G-21 و G-19 با یکدیگر و G-Sm3 و G-Na1 با یکدیگر با ۱۰۰ درصد تشابه و بیشترین فاصله ژنتیکی در میان جدایه مازندران با سایر جدایه‌ها با ۳۰ درصد تشابه مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل انگشت نگاری‌های ژنومی rep-PCR

آغازگرهای ERIC 1R، ERIC 2I، BOX 1A و REP 2I قادر به ایجاد الگوهای باندی چندشکل و تکرار پذیر برای جدایه‌های *M. phaseolina* بوده و در نتیجه برای کلیه جدایه‌ها استفاده شدند (شکل۳). تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر و محدوده آنها مطابق جدول۳ می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الگوهای باندی حاصل از مجموع آغازگرهای rep-PCR جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۹ درصد به هفت گروه تقسیم نمود. پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز موید همین مطلب می‌باشد (شکل٤).

گروه اول جدایه مازندران (٤ درصد جدایه‌ها)، گروه دوم یک جدایه گلستان (٤ درصد جدایه‌ها)، گروه سوم دو جدایه اردبیل و یک جدایه گلستان (۱۳ درصد جدایه‌ها)، گروه چهارم چهار جدایه گلستان (۱۷ درصد جدایه‌ها)، گروه پنجم جدایه لرستان (٤ درصد جدایه‌ها)، گروه ششم یک جدایه اردبیل (٤ درصد جدایه-ها) و گروه هفتم ۱۳ جدایه گلستان (٥٤ درصد جدایه‌ها) را در برگرفت.

از مجموع الگوهای باندی rep-PCR، ٥٤ جایگاه ژنی حاصل شد که ٥ جایگاه ژنی یک شکل بوده و نهایتا ۹۱ درصد چندشکلی نشان دادند. بیشترین جایگاه ژنی چندشکل توسط آغازگر REP 2I (۱۳ جایگاه ژنی) حاصل شد. بیشترین تشابه بر اساس

[4] Unweighted pair-group method
[5] Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]

ضریب جاکارد، در میان جدایه‌های G-Ka1 و G-Ka5 با تشابه ژنتیکی ۹۲ درصد و بیشترین فاصله ژنتیکی در میان جدایه مازندران با سایر جدایه‌ها (با ٤٦ درصد تشابه) مشاهده شد. این نشانگر از لحاظ جغرافیایی قادر به تفکیک جدایه‌ها نبود.

مقایسه ماتریس‌ها و آزمون مانتل

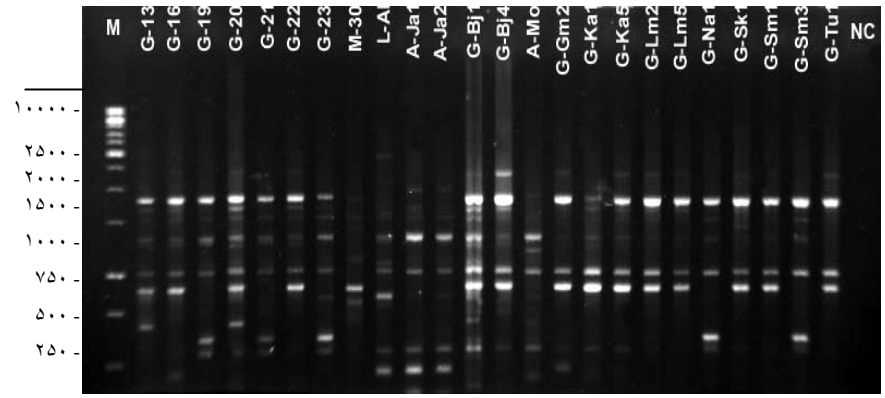
میزان همبستگی بین ماتریس‌های تشابه حاصل از داده‌های ISSR و rep-PCR با یکدیگر و بطور مجزا با استفاده از آزمون مانتل تعیین گردید که در تمام حالات همبستگی مثبت و معنی‌دار بود. نیکویی برازش خوشه‌بندی با ماتریس تشابه (ضریب کوفنتیک) (جدول۴) برای داده‌های حاصل از ISSR در سطح بسیار خوب ($r \geq ۰/۹$)، برای داده‌های حاصل از rep-PCR در سطح خوب ($۰/۸ \leq r \leq ۰/۹$) و برای تلفیق داده‌های حاصل از هر دو آغازگر نیز در سطح بسیار خوب ارزیابی گردید.

جدول۳- تعداد و محدوده باندهای تولید شده توسط آغازگرهای مورد بررسی.

آغازگر	مجموع باندها	تعداد باندهای چندشکل	محدوده باندها
ISSR02	۱۸۵	۱۱۳	۲۵۰ تا ۲۰۰۰جفت باز
P4	۱۵۸	۱۵۸	کمتر از ۲۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز
PCMS	۲۶۰	۱۸۸	۵۰۰ تا ۴۰۰۰جفت باز
کل ISSR	۶۰۳	۴۵۹	کمتر از ۲۵۰ تا تا ۴۰۰۰جفت باز
ERIC 1R	۱۴۹	۱۲۵	۲۵۰-۳۰۰۰ جفت باز
ERIC 2I	۲۰۱	۱۲۹	۲۵۰-۲۵۰۰ جفت باز
BOX 1A	۱۳۰	۱۳۰	۵۰۰-۳۰۰۰ جفت باز
REP 2I	۱۶۴	۱۴۰	۲۵۰ تا بیش از ۱۰۰۰۰ جفت باز
کل rep-PCR	۶۴۴	۵۲۴	۲۵۰ تا بیش از ۱۰۰۰۰ جفت باز

جدول۴- نتایج آزمون مانتل (۱۰۰۰مرتبه پرمیوتیشن تست)

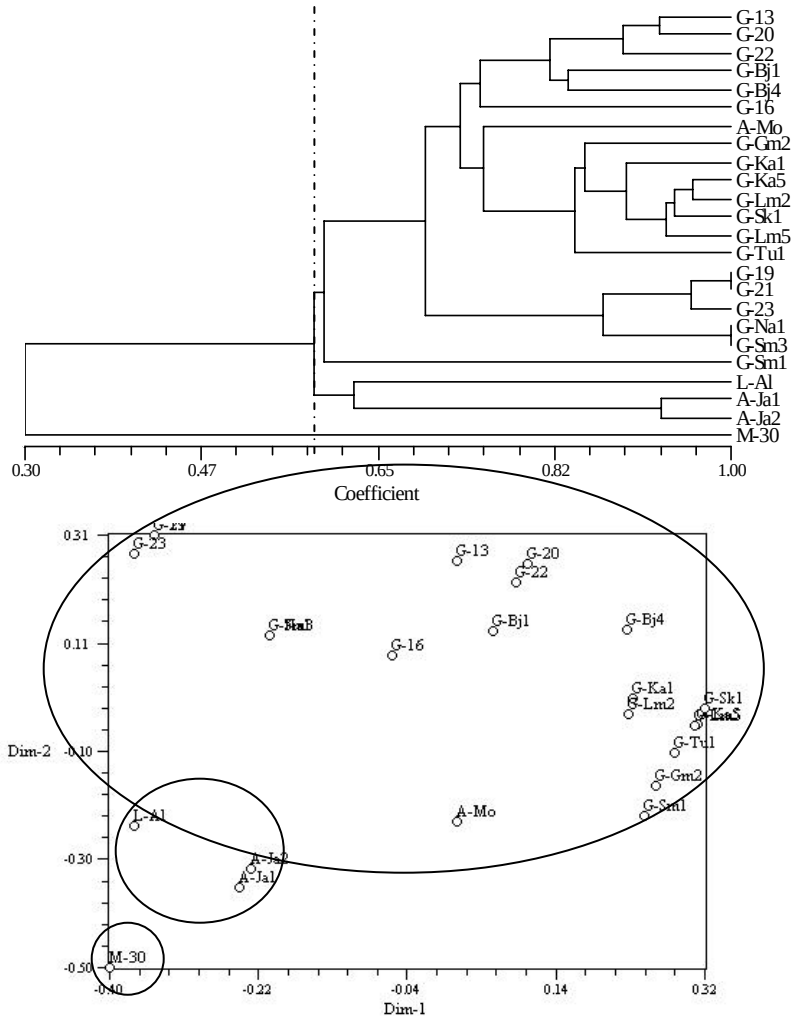
	ISSR	rep-PCR	ISSR+ rep-PCR
همبستگی بین ماتریس تشابه جاکارد و ماتریس کوفنتیک حاصل از آن	r = ۰/۹۴	r = ۰/۸۲	r = ۰/۹۱
	p=۰/۰۰۲	p=۰/۰۰۲	p=۰/۰۰۲



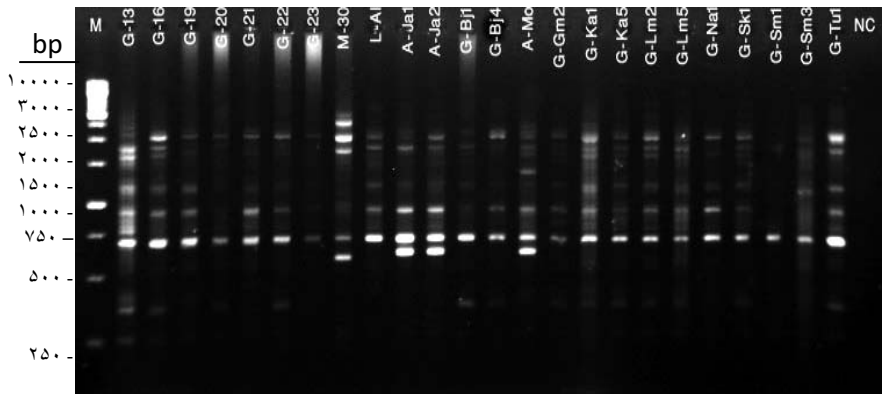
شکل۱- الگوی باندی حاصل از ٢٤ جدایه منتخب *M. phaseolina* با استفاده از آغازگرP4 . M: نشانگر مولکولی 1Kb، NC: کنترل منفی.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]



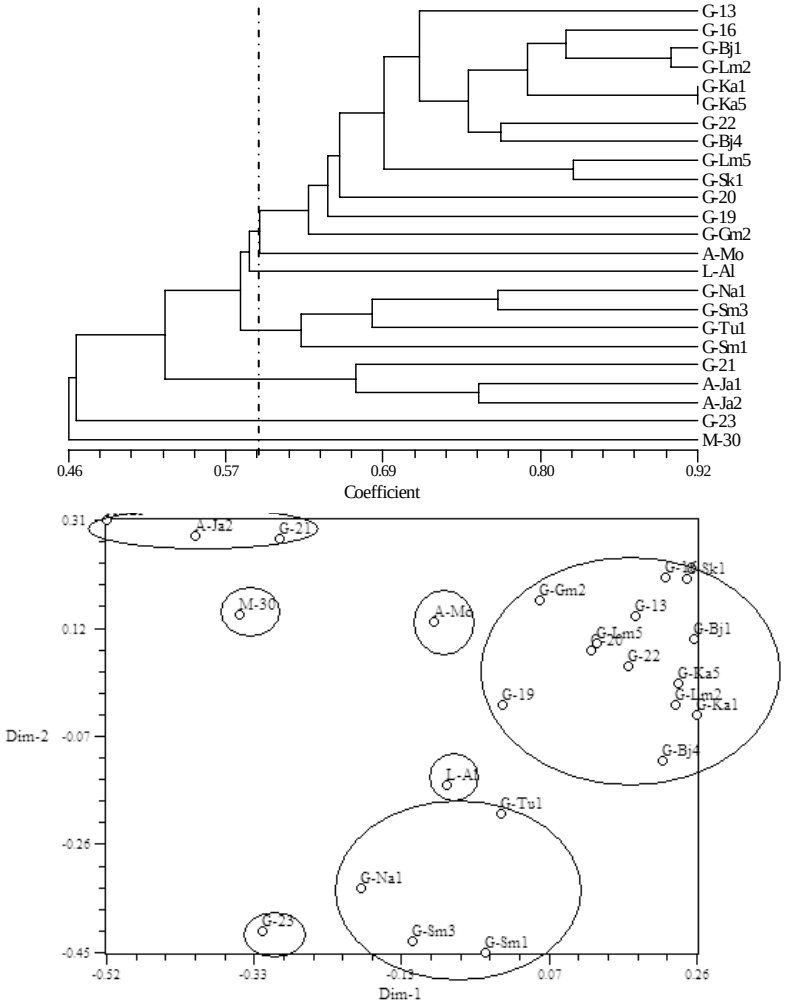
شکل۲- دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA برای ٢٤ جدایه منتخب *M. phaseolina* با استفاده از تلفیق داده‌های حاصل از الگوهای باندی ISSR و پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتریس تشابه جاکارد.



شکل ۳- الگوی باندی حاصل از ٢٤ جدایه منتخب *M. phaseolina* با استفاده از آغازگر ERIC 1R

M: نشانگر مولکولی 1Kb، NC: کنترل منفی.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]



شکل٤- دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA برای ٢٤ جدایه منتخب *M. phaseolina* با استفاده از مجموع آغازگرهای rep-PCR و پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی بر روش ماتریس تشابه جاکارد

بحث

نتایج تحقیق حاضر کارآیی روش‌های انگشت نگاری ژنومی با استفاده از نشانگرهای ISSR و rep-PCR را برای مطالعه تنوع ژنتیکی در قارچ *M. phaseolina* تایید می‌کند. مزایای مهم استفاده از این روش‌ها سادگی آن‌ها، عمومیت آغازگرهای PCR، تحمل دامنه وسیعی از غلظت‌های DNA در ایجاد نتایج تکرارپذیر و امکان تجزیه و تحلیل رایانه‌ای داده‌ها می‌باشد (۲۵).

در بررسی درصد چندشکلی حاصله توسط هر یک از نشانگرها این میزان برای نشانگر ISSR معادل ۸۷ درصد و برای نشانگر rep-PCR معادل ۹۱ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. در سطح تشابه ۵۸ درصد نشانگر ISSR قادر به تفکیک جدایه‌ها به سه گروه بود؛ در حالیکه با استفاده از نشانگر rep-PCR در سطح تشابه مشابه (۵۹ درصد) تعداد گروه‌ها به هفت گروه افزایش می‌یافت که می‌تواند نشان از قدرت تفکیک بالاتر این نشانگر در مقایسه با ISSR باشد. بلندتر بودن توالی آغازگرهای rep-PCR و نیز نیمه اختصاصی بودن آغازگر ISSR و اختصاصی بودن نشانگرهای rep-PCR این امر را توجیه می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که این عناصر تکرار شونده که در سلسله باکتری‌ها بسیار حفاظت شده‌اند، در قارچ *M. phaseolina* متعلق به قارچ‌های ناقص نیز وجود دارند. از سوی دیگر متوسط جایگاه ژنی چندشکلی به ازای هر آغازگر ISSR، ۱۴ جایگاه ژنی و به ازای هر آغازگر rep-PCR، ۱۲ جایگاه ژنی محاسبه گردید. ضمن اینکه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]

نیکویی برازش خوشه‌بندی با ماتریس تشابه (ضریب کوفنتیک) نیز نشان داد که اندکی تطابق بیشتر بین دندروگرام‌های حاصل از ISSR نسبت به rep-PCR وجود دارد، اما در مجموع چون در هر دو روش عدم وجود باند در معیار اندازه گیری منظور نمی‌شود، بنابراین تفاوت چندانی میان همبستگی‌ها دیده نشد و برازش در سطح بسیار خوبی قرار گرفت.

پورکایاستا و همکاران (۲۵) با استفاده از آغازگرهای میکروساتلایت در دو وضعیت touchdown وnon- touchdown و نیز نشانگر rep-PCR، برای بررسی تنوع ژنتیکی ۷۰ جدایه *M. phaseolina* جداسازی شده از میزبان‌های مختلف، شامل سه جدایه سویا، بین دو جدایه هندی سویا به ترتیب سطح تشابه ژنتیکی ٦۰، ۸۷ و ۷۵ درصد و بین این دو جدایه با جدایه سوم (جدایه پاکستانی) به ترتیب سطح تشابه ژنتیکی ٤٥، ٤۰ و ٤٥ درصد را گزارش کردند. ضرایب همبستگی کوفنتیک در این سه روش به ترتیب معادل ۸۸، ۸۵ و ۸۳ درصد محاسبه شده بود. آنها همچنین نتیجه گرفته بودند که rep-PCR، از قدرت تفکیک بالاتری در آشکارسازی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *M. phaseolina*، نسبت به دو روش دیگر برخوردار است. یافته-های مطالعه حاضر نیز این نتیجه را تایید می‌کند.

جانا و همکاران (۱۲) با استفاده از سه آغازگر SSR، ٤۰ جدایه *M. phaseolina* جداسازی شده از سویا و پنبه در هند و آمریکا را مطابق میزبان و منطقه جغرافیایی در سه گروه اصلی دسته بندی کردند. گروه اول با ۲۷ جدایه سویا و۸۰ درصد تشابه و گروه دوم با ۳ جدایه سویا و ۵۲ درصد تشابه تشکیل گردید و گروه سوم، شامل جدایه‌های آمریکایی جدا شده از ریشه پنبه با سطح تشابه ۹۷ درصد بود.

در مطالعه بیرد و همکاران (۵) با استفاده از ۱۲ آغازگر SSR، دندروگرام حاصل، ۱۰۹ جدایه *M. phaseolina* جداسازی شده از مناطق جغرافیایی مختلف آمریکا و میزبان‌های مختلف (۷۹ جدایه از سویا) را مستقل از میزبان و محل جغرافیایی گروه‌بندی کرد.

چنانکه در نتایج سایر پژوهشگران با استفاده از نشانگرهای مختلف (۱۸، ۲۴، ۲۷، ۲۸ و ۳۱) نیز دیده شده بود، این دو نشانگر نتوانستند به طور کاملاً واضح زیر گروه‌های معینی را بر مبنای منشأ جغرافیایی آشکار سازند. با این حال، بر مبنای دندروگرام به دست آمده با نشانگر ISSR می‌توان استنباط کرد که این روش تا حد زیادی قادر به تفکیک جدایه‌های غیر استان گلستان از جدایه‌های استان گلستان می‌باشد.

مطالعه حاضر تنوع قابل ملاحظه‌ای درمیان جدایه‌های سویای *M. phaseolina* تشخیص داد، ضمن اینکه برخی جدایه‌ها با هر دو روش با یکدیگر دسته‌بندی شده و دسته بندی برخی دیگر از جدایه‌ها در این دو روش با یکدیگر متفاوت بود. تمامی گروه‌های تشکیل شده به وسیله یک روش منفرد انگشت نگاری تایید نمی-شدند، به این دلیل که آغازگرهای مختلف مناطق مختلفی از ژنوم را هدف قرار داده و تنوع ژنتیکی را به شکل مختلفی نشان می-دهند. گروه بندی متفاوت جدایه‌ها با استفاده از این دو نشانگر در مطالعات پورکایاستا و همکاران نیز مشاهده شده بود (۲۵).

گروه‌بندی جدایه‌هایی با منشا جغرافیایی دور از هم (مثلا جدایه لرستان با جدایه‌های اردبیل در روش ISSR یا جدایه A-Mo از اردبیل با جدایه‌های گلستان در هر دو روش) با یکدیگر می‌تواند ناشی از انتقال بیمارگر از طریق بذر باشد که به ایجاد جدایه‌هایی با الگوی مشابه در مناطق دور از هم در سطح کشور انجامیده است. انتقال توسط بذر نقش مهمی در توزیع جغرافیایی *M. phaseolina* بازی کرده (۲) و احتمالا به سطح بالای تنوع ژنتیکی مشاهده شده در میان جدایه‌ها در این مطالعه کمک کرده است.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی وسیع در این گونه قارچ پلیمورف نه تنها در بین جدایه‌های میزبان‌ها و مناطق جغرافیایی مجزا، بلکه در درون جمعیت‌های جدایه‌های جمع آوری شده از یک میزبان گیاهی و حتی در یک منطقه (مثلا جدایه‌های سیدمیران در استان گلستان Sm) نیز دیده می‌شود. فعالیت ترانسپوزان‌ها و نرخ موتاسیون بالای میکروساتلایت‌ها می‌تواند در تنوع ژنتیکی ایجاد شده به وسیله نوترکیبی شبه جنسی این قارچ مهم و موثر باشد (۲۵). با توجه به اینکه میکرواسکلرت‌ها از تورم یک سلول منفرد یا ترکیب دو سلول از دو هیف مجاور تشکیل می‌گردند، ترکیب بین سلول‌های رویشی می‌تواند هتروکاریون‌ها را شکل داده و نوترکیبی شبه جنسی بین

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]

ژن‌های هسته رخ دهد (۸). مجموع این نکات این فرضیه را که پاراسکسوالیسم (parasexualism) نیز می‌تواند منبع احتمالی تولید ژنوتیپ‌های جدید محسوب گردد، تقویت می‌کند (۲۵).

مطالعه حاضر اطلاعات قابل توجهی در رابطه با تنوع ژنتیکی در جدایه‌های ایرانی سویای *M. phaseolina* با کمک دو نشانگر مولکولی مختلف rep-PCR و ISSR فراهم آورد. برای روشن ساختن میزان نوترکیبی در جمعیت‌های این قارچ نمونه‌برداری بیشتر و در سطح وسیع‌تری لازم است. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان تنوع در *M. phaseolina* نسبتا بالا است. در مورد بیمارگری که ذاتا ساپروفیت و فرصت طلب است، تنوع ژنتیکی بالا به بقاء آن در طبیعت کمک می‌کند. ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی *M. phaseolina* مرحله اول در درک ساختار جمعیت بیمارگر عامل پوسیدگی ذغالی می‌باشد و به نظر می‌رسد به طور ویژه وقتی مفید است که با آزمایشات *in vitro* و *in planta* (از جمله آزمایش بیماریزایی جدایه‌ها و حساسیت به کلرات) نیز ترکیب گردد.

منابع

۱. صفایی ن، علیزاده ع، سعیدی ع، رحیمیان ح، و آدام گ(۱۳۸٤) تشخیص مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی *Fusarium graminearum* عامل بلایت سنبله گندم، مجله بیماری‌های گیاهی، ش ٤۱-۱۸۹-۱۷۱.

2. Almeida A M R, Abdelnoor R V, Arias C A A, Carvalho V P, Jacoud-Filho D S, Marin S R R, Benato L C, Pinto M C, and Carvalho C G P (2003) Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. Fitopatologia Brasileira, 28: 279-285.

3. Arruda M C C, Miller R N G, Ferreira M A S V, and Felipe M S S (2003) Comparison of *Crinipellis perniciosa* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence based PCR genomic fingerprinting. Plant Pathology, 52: 236–244.

4. Babu B K, Reddy S S, Yadav M K, Sukumar M, Mishra V, Saxena A K, and Arora D K (2010) Genetic diversity of *Macrophomina phaseolina* isolates from certain agro-climatic regions of India by using RAPD markers. Indian Journal of Microbiology (In Press).

5. Baired R E, Wadi P A, Allen T, McNeill D, Wang X, Moulton J K, Rinehart T A, Abbas H K, Shier T, and Trigiano R N (2010) Variability of United States isolates of *Macrophomina phaseolina* based on simple sequence repeats and cross genus transferability to related genera within Botryosphaeriaceae. Mycopathologia (In Press).

6. Van Belkum A, Scherer S, Van Alphen L, and Verbrugh H (1998) Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. Microbiology and Molecular Biology Review, 62: 275–293.

7. Brooker N, Lord J R, Long J, and Jayawardhana A (2008) AFLP analysis of genetic diversity in charcoal rot fungal populations impacted by crop rotations. Communications in Agriculturel and Applied Biological Sciences, 73: 7-19.

8. Das I K, Fakrudin B, and Arora D K (2008) RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some indian isolates *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationship with pathogenicity. Microbial Research, 163: 215-224.

9. Dhingra O D, and Sinclair J B (1972) Variation among isolates of *Macrophomina phaseoli* (*Rhizoctonia bataticola*) from the same soybean plant. (Abstr.) Phytopathology, 62(suppl.): S1108.

10. Ganeshamoorthi P, Anand T, Saravanan A, Prakasam V, Chandarmohan N, and Ragupathi N (2010) Cultural and genetic variability in *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. And incidence of Mulberry root rot. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43: 123-132.

11. George M L C, Nelson R J, Ziegler R S, and Leung H (1998) Rapid population analysis of Magnaporthe grisea by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. Phytopathology, 88: 223–229.

12. Jana T, Sharma T R, and Singh N K (2005a) SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. Mycological Research, 109: 81-86.

13. Jana T K, Singh N K, and Sharma T R (2005b) Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR. Canadian Journal of Microbiology, 51: 159-164.

14. Kaur B, Purkayastha S, Dilbaghi N, and Chaudhury A (2005) Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *cyamopsidis*, the bacterial blight pathogen of clusterbean, using PCR-based molecular markers. Journal of Phytopathology, 153: 470–479.

15. Lupski J R, and Weinstock G M (1992) Short interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. Journal of Bacteriology, 174: 4525–4529.

16. Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Researches, 27: 209-220.

17. Martin F N, and English J T (1997) Population genetics of soilborne fungal plant pathogens (Introduction). Phytopathology, 87: 446-447.

18. Mayek-Peres N, Lopes Castaneda C, Gonzalez-Chavira M, Garcia-Espinosa R, Acosta-Gallegos J A, Martines-De Ia Vega O, and Simpson J (2001) Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]

on pathogenic and AFLP genotype. Physiological and Molecular, Plant Pathology, 59: 257-263.
19. McDonald J G, Wong E, and White G P (2000) Differentiation of Tilletia species by rep-PCR genomic fingerprinting. PlantDisease, 84: 1121–1125.
20. Mehta A, Mehta Y R, and Rosato Y B (2002) ERIC and REP-PCR banding patterns and sequence analysis of the internal transcribed spacer of rDNA of *Stemphylium solani* isolates from cotton. Current Microbiology, 44: 323–328.
21. Ndiaye M (2007) Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the sahel. PhD Thesis Wagening University, the Netherland, PP114.
22. Palencia E R, Klich M A, Glenn A E, and Bacon C W (2009) Use of rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section Nigri. Journal of Microbiology Methods, 79: 1-7
23. Pearson C A S, Leslie J F, and Schwenk F W (1986) Variable chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina* from corn, soybean, and soil. Phytopathology, 76: 646-649.
24. Purkayastha S, Kaur B, Dilbaghi N, and Chaudhury A (2006) Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of clusterbean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. Plant Pathology, 55: 106-116.
25. Purkayastha S, Kaur B, Arora P, Bisyer I, Dilbaghi N, and Chaudhury A (2008) Molecular genotyping of *Macrophomina phaseolina* isolates: Comparsion of microsatellite primed PCR and repetitive element sequence-based PCR. Journal of Phytopathology, 156: 372-381.
26. Rademaker J L W, and deBruijn F J (1997) Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: Caetano-Anolles, G, Gressho, P. M. (eds), DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. New York, NY, USA, Wiley.
27. Rajkumar Bashasab f, and Kuruvinashetti M S (2007) Genetic variability of sorghum charcoal rot pathogen(*Macrophomina phaseolina)* assessed by random DNA markers. The Plant Pathology Journal, 23: 45-50.
28. Reyes-Franco M C, Hernandez-Delgado S, Beas-Fernandes R, Medina-Fernandes M, Simpson J, and Mayek-Perez N (2006) Pathogenic and genetic variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. Phytopathology, 154: 447-453.
29. Rholf F J (2000) NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Setauket, NY, USA, Exeter publishing.
30. Su G, Suh S O, Schneider R W, and Russian J S (2001) Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina.* Phytopathology, 70 :13-17.
31. Vandermark G, Martnez O, Pecina V, and Alvardo M J (2000) Assessment of genetic relationship among isolates of *Macrophomina phaseolina* using simplified AFLP technique and two different methods of analysis. Mycologia, 92: 656-664.
32. Versalovic J, Kapur V, Mason E O J R, Shah U, Koeuth T, Lupski J R, and Musser J M (1993) Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston: identification and molecular characterization of multiple clones. Journal of Infected Disease, 167: 850–856.
33. Versalovic J, Schneider M, deBruijn F J, and Lupski L R (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods of Molecular and Cell Biology, 5: 25–40.
34. Weising K, Nybom H, Wolff K, and Meyer W (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Fla. P.322.
35. Zietkiewicz E, Fafalski A, and Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176-183.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.6.1]