

تجزیه QTL برای مقاومت به بیماری برق زدگی در نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره

## QTL Analysis for *Ascochyta* blight Resistance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Using Microsatellite Markers

همایون کانونی<sup>۱</sup>، علیرضا طالعی<sup>۲</sup>، سیدعلی پیغمبری<sup>۲</sup>، سیدمحمود اخوت<sup>۲</sup>،  
مایکل باوم<sup>۳</sup> و ماتیو آبنگ<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی سابق دکتری اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
۲- به ترتیب استاد، دانشیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران  
۳- به ترتیب متخصص بیوتکنولوژی گیاهی و بیماری‌شناسی حبوبات، مرکز تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ایکاردا)، حلب، سوریه

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۲/۱۲

### چکیده

کانونی، ه.، طالعی، ع.، پیغمبری، س. ع.، اخوت، س. م.، باوم، م.، و آبنگ، م. ۱۳۸۸. تجزیه QTL برای مقاومت به بیماری برق زدگی در نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۵: ۱۲۷-۱۰۹.

امروزه ریز ماهواره‌ها، نشانگری منتخب برای تهیه نقشه ملکولی و گزینش به کمک نشانگر برای صفات کلیدی مانند مقاومت به بیماری‌ها در بسیاری از گونه‌های زراعی هستند. در این بررسی به منظور مکان‌یابی QTL‌های مربوط به اندازه برگ و مقاومت به بیماری برق زدگی، *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.، و تعیین سهم هر کدام از QTL‌ها در تنوع فنوتیپی این صفات، ۸۳ بوته نسل  $F_2$  حاصل از تلاقی بین لاین ICC12004 (مقاوم) و نخود محلی بیونج (حساس) و خانواده‌های  $F_{2:3}$  در مرکز بین‌المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ایکاردا) مورد بررسی قرار گرفتند. نقشه پیوستگی به وسیله ۵۸ نشانگر SSR و یک نشانگر مورفولوژیک (رنگ گل) تهیه شد. از سطح زیر منحنی گسترش بیماری به عنوان معیار سنجش مقاومت به بیماری در نسل‌های  $F_2$  و  $F_3$  استفاده شد. آزمون فین بر اساس میانگین و واریانس واکنش به برق زدگی خانواده‌های  $F_{2:3}$  نشان داد که چند ژن بزرگ اثر در جمعیت در حال تفرق بوده است. تجزیه پیوستگی نشانگرها را به هشت گروه پیوستگی برابر با تعداد کروموزوم‌های نخود منسوب کرد. در این بررسی بر خلاف نتایج سایر مطالعات، نشانگر رنگ گل در هیچ کدام از گروه‌های پیوستگی قرار نگرفت. نواحی ژنومی و مکان عوامل ژنتیکی مرتبط با اندازه برگ و واکنش در برابر برق زدگی، به روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب مشخص شدند. یک QTL در گروه لینکاژ ۷ حدود ۱۵ درصد از تنوع فنوتیپی اندازه برگ را کنترل کرد. از طرف دیگر، سه QTL در گروه‌های لینکاژ ۳، ۴ و ۶ مجموعاً ۴۶/۵ درصد از واریانس واکنش به برق زدگی را توجیه کردند. با توجه به نتایج حاصل، می‌توان از نشانگرهای تعیین شده برای متمایز کردن ژرم‌پلاسما مقاوم در برنامه‌های اصلاحی آتی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: نخود زراعی، بیماری برق زدگی، مقاومت، نشانگرهای SSR، تجزیه QTL.

## مقدمه

از بین تنش‌های زیستی که محصول نخود را تحت تأثیر قرار می‌دهند، برق‌زدگی مخرب‌ترین بیماری نخود در سطح جهان است (Pande *et al.*, 2005). این بیماری که توسط قارچ *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. ایجاد می‌شود، در مزارع با آلودگی شدید کل محصول را از بین می‌برد (Nene, 1984, 1987). اصلاح برای مقاومت به این بیماری به واسطه عدم وجود مقاومت بالا در خزانه ژنی اولیه و تنوع پاتوژنیک قارچ عامل بیماری، از پیشرفت لازم برخوردار نبوده است (Dey and Singh, 1993). با این وجود، به‌نژادگران با استفاده از مقاومت نسبی قابل دسترس در مجموعه‌های ژرم‌پلاسم، ارقام متعددی را با سطوح متوسطی از مقاومت ایجاد کرده‌اند (Warkentin *et al.*, 2005)؛ در بسیاری از این ارقام، با بروز پاتوتیپ جدید و یا افزایش قدرت تهاجم پاتوتیپ‌های موجود، مقاومت شکسته شده است. بنابراین، برای متنوع ساختن پایه ژنتیکی مقاومت به برق‌زدگی و ارتقاء ماندگاری مقاومت از طریق هر می‌کردن ژن در برنامه‌های اصلاحی به منابع بیشتری از مقاومت در ژرم‌پلاسم نخود نیاز است.

بر اساس گزارش‌های متعدد، در کشورها و مناطق مختلف نژادهای گوناگونی از عامل بیماری مورد بحث وجود دارند (Kaiser and Kumenoglu, 1997). ساختار جمعیتی *Ascochyta rabiei* از طریق ارزیابی

صفات کمی زمینه اصلی مطالعات ژنتیکی در بیش از یک قرن گذشته بوده‌اند، چرا که این صفات نقطه مشترک تنوع طبیعی در جمعیت‌های تمامی موجودات یوکاریوت هستند. ریزماهواره‌ها یا ردیف تکراری ساده (Simple Sequence Repeats: SSR)، تکرارهای پشت سر هم (Tandem) کوچکی از DNA هستند که معمولاً دو تا پنج جفت باز طول داشته و در ژنوم اغلب یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند. از نشانگرهای ریزماهواره به طور گسترده در مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی، تهیه نقشه ژنومی و تجزیه پلی‌ژنیک صفات مختلف در گیاهان زراعی استفاده شده است (Millan *et al.*, 2006).

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) گیاهی خودگشن دیپلوئید ( $2n=2x=16$ )، یکساله با ژنوم هاپلوئید کوچک ( $\sim 738$  Mbp) است (Arumuganathan and Earle, 1991). نخود، مهم‌ترین گیاه از رده حبوبات در حوزه مدیترانه، شبه قاره هند، غرب آسیا و شمال آفریقا است (Jayakumar *et al.*, 2005). اصلی‌ترین کشورهای تولیدکننده نخود در جهان به ترتیب هند، پاکستان، ترکیه، ایران و استرالیا هستند (Gan *et al.*, 2005). سطح زیر کشت نخود در ایران ۶۴۰ هزار هکتار و تولید سالیانه آن در حدود ۴۰۰ هزار تن است (Sabbaghpour *et al.*, 2005)؛ (Banai, 1998؛ Kanouni, 2001).

از نشانگرهای مشترک در جمعیت‌های مختلف، تجزیه QTL و مکان‌یابی ژن‌های مقاومت در ژنوم میزبان انجام می‌شود (Flandez-Galvez *et al.*, 2002).

بر اساس ارقام مورد مطالعه، جدایه‌های قارچ و روش‌های غربال بیماری، مدل‌های مختلفی برای ژنتیک مقاومت به برق‌زدگی پیشنهاد شده‌اند. در برخی از این بررسی‌ها مقاومت به بیماری به صورت کمی و در بعضی دیگر به صورت کیفی گزارش شده‌اند (Santra *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1992; Takeoglu *et al.*, 2000; Lichtenzevig *et al.*, 2002). تکه اوغلو و همکاران (۲۰۰۰) تعدادی ژن کوچک اثر را که بیان مقاومت به بیماری برق‌زدگی در نخود را تغییر می‌دهند گزارش کردند. تاکنون، تعدادی QTL برای مقاومت به این بیماری تعیین شده‌اند (سانترا و همکاران، ۲۰۰۰؛ تکه اوغلو و همکاران، ۲۰۰۰؛ Flandez-Galvez *et al.*, 2003; Millan *et al.*, 2006; Udupa and Baum, 2003; Cho *et al.*, 2004؛ اودوپا و باوم، ۲۰۰۳؛ Iruela *et al.*, 2006؛ ۲۰۰۴؛ Taran *et al.*, 2007). البته تعداد محدودی از این مطالعات انحصاراً به زمینه ژنتیکی خالص *C. arietinum* اختصاص دارد، چرا که نقشه‌های پیوستگی درون گونه‌ای کمی برای ژنوم نخود در دسترس است. از بین تمامی

قابلیت بیماری‌زایی آن بر روی یک سری ارقام زراعی محک تعیین می‌شود. ردی و کبابه (Reddy and Kabbabeh, 1985) با استفاده از سه لاین افتراقی نخود (ILC 482، ILC 1229 و ILC 3279) وجود سه پاتوتیپ (I، II و III) را در سوریه گزارش کردند. علاوه بر این، یک مجموعه نشانگرهای ریز ماهواره و RAPD برای تجزیه و تحلیل تنوع پاتوتیپی در عامل بیماری برق‌زدگی مورد استفاده واقع شده است (Udupa *et al.*, 1998). نتایج این بررسی نشان داد که پاتوتیپ I بالاترین تنوع ژنتیکی و قدرت تهاجم کم، پاتوتیپ II تنوع ژنتیکی متوسط و مهاجم، و پاتوتیپ III تنوع ژنتیکی پائین و بیشترین قدرت تهاجم را دارند.

با این وصف، فقدان گیاهان میزبان محک عمومی برای توصیف صفات اختصاصی جدایه، و استفاده از شیوه‌ها و یا شرایط غربال‌گری متفاوت، و همچنین نبود توافق نظر بر این که آیا تنوع *A. rabiei* ناشی از گوناگونی در پاتوتیپ‌ها است یا قدرت تهاجم یک پاتوتیپ منفرد، تشخیص ژن‌های مختلف مقاومت در آن را دشوار کرده است (Santra *et al.*, 2000). علاوه بر این، واکنش ژنوتیپ‌های نخود با ژن‌های بالقوه متفاوت برای مقاومت، غالباً به فنوتیپ‌های مشابه منتج می‌شود. بنابراین مقاومت حاصل از ژن‌های مختلف را نمی‌توان به تنهایی بر اساس ارزیابی بیماری از هم مجزا کرد. برای متمایز کردن ژن‌های مقاومت به برق‌زدگی با استفاده از یک نقشه لینکاژ متشکل

مکان‌های شناسایی شده و (۳) مطالعه اثر متقابل عوامل ژنتیکی کنترل‌کننده مقاومت به برق‌زدگی در نخود.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد گیاهی

در سال‌های ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵ با تلاقی نخود محلی بیونج و لاین ICC 12004، در گلخانه‌های مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر یک جمعیت F<sub>2</sub> شامل ۸۳ فرد ایجاد شد. بیونج رقمی با تیپ کابلی و متوسط‌ترس است که علی‌رغم سازگاری گسترده و بازارپسندی مطلوب، فوق‌العاده به برق‌زدگی حساس است (صباغ‌پور و همکاران، ۲۰۰۳). ICC 12004 که از لاین‌های اصلاح شده مؤسسه بین‌المللی تحقیقات گیاهان زراعی برای مناطق نیمه خشک گرمسیری (ایکریسات)، هندوستان است، دارای تیپ دسی بوده و در بررسی‌های مختلف به عنوان مقاوم به بیماری برق‌زدگی گزارش شده است (فلاندز-گالوز و همکاران، ۲۰۰۳؛ چو و همکاران، ۲۰۰۴).

##### ارزیابی فنوتیپی صفات

اندازه برگ برای ۸۳ ژنوتیپ نسل F<sub>2</sub> با دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ مدل CI203 Laser ساخت کشور ژاپن مشخص شد. برای این کار در آغاز مرحله گلدهی برگ‌های چهارم و پنجم از قسمت انتهایی دم‌برگ یکی از شاخه‌های جانبی هر بوته قطع و پس از انتقال به

نقشه‌های پیوستگی درون گونه‌ای نخود که تا امروز ارائه شده‌اند (اودوپا و باوم، ۲۰۰۳؛ فلاندز-گالوز و همکاران، ۲۰۰۳؛ تاران و همکاران، ۲۰۰۷)، فقط تاران و همکاران (۲۰۰۷) نقشه‌ای اختصاصی با تعداد زیادی نشانگر SSR تهیه کرده‌اند.

نظر به سابقه و اهمیت بیماری برق‌زدگی در ایران، طی سال‌های اخیر فعالیت‌هایی برای شناسایی پاتوتیپ‌های موجود در داخل کشور، تعیین تنوع بیماری‌زایی قارچ عامل برق‌زدگی نخود با استفاده از ارقام افتراقی و ارزیابی مقاومت ارقام و لاین‌های نخود به بیماری مزبور انجام شده است (Bolandandam *et al.*, 1998؛ Shahriari and Izadyar, 1998؛ Nourallahi *et al.*, 2000؛ Shokouhifar *et al.*, 2001؛ صباغ‌پور و همکاران، ۲۰۰۳). شکوهی‌فر و همکاران (۲۰۰۳)، ۲۶ جدایه را از ۱۶ استان کشور جمع‌آوری و تنوع ژنومی آن‌ها را با استفاده از نشانگرهای RAPD ارزیابی و ۲۲ گروه ژنوتیپی برای این عامل بیماری گزارش کردند. تاکنون هیچ تحقیقی در مورد مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به برق‌زدگی در نخود در داخل کشور انجام نشده است.

اهداف این بررسی عبارت بودند از (۱) مکان‌یابی ژن‌ها (QTLها) ی مقاومت به بیماری برق‌زدگی (پاتوتیپ III) در نخود، با استفاده از نشانگرهای SSR، (۲) تعیین نوع عمل ژن در

درجه) در ظرف‌های مخصوص درون آب قرار گرفتند. قبل از مایه‌زنی سوسپانسیون کنیدی به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد و سه جفت از برگچه‌های نزدیک‌تر به قسمت دم‌برگ با قرار دادن ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور مایه‌زنی شدند. نمونه‌ها به مدت ده روز در ۹۷ تا ۱۰۰ درصد رطوبت نسبی، در دمای ۲۰ و ۱۶ درجه سانتی‌گراد (روز/شب) و ۱۶ ساعت فتوپریود (۳۰ میکرومول  $\text{PAR m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) در اتاقک رشد قرار داده شدند. برای هر برگ، تعداد برگچه‌های حاوی زخم آسکوکیتا هر روز، از روز سوم تا روز دهم پس از مایه‌زنی ثبت و سطح زیر منحنی گسترش بیماری (Area under disease progress curve: AUDPC) در دو مرحله محاسبه شد: (الف) AUDPC برای تعداد برگچه‌های دارای لکه یا زخم، و (ب) AUDPC برای متوسط AUDPC مرحله اول برای سه تکرار.

در روش دوم، هفت بوته از هر کدام از خانواده‌های F2:3 مورد ارزیابی قرار گرفتند. والدین تلاقی به همراه سه لاین ILC 263 (حساس)، ILC 3279 (مقاوم به پاتوتیپ‌های I و II) و ILC 1929 (حساس) جمعاً به تعداد ۸۸ ژنوتیپ برای بررسی فنوتیپی در این آزمایش منظور شدند. طرح آزمایشی مورد استفاده بلوک‌های کامل تصادفی با هفت تکرار بود. بوته‌های آزمایشی در هفت جفت سینی به ابعاد ۵۰ × ۵۰ و به عمق ۱۲ سانتی‌متر کاشته شدند. هر جفت سینی یک بلوک یا تکرار آزمایشی را

آزمایشگاه با دستگاه مذکور سطح آن‌ها بر حسب سانتی‌متر مربع اندازه‌گیری و ثبت شد. غربال برای برقراری در دو نسل متوالی و به دو روش مختلف انجام شد. در نسل F2، سه روش برگ جداشده (Buchwaldt et al., 2007) در داخل اتاقک رشد مدل E19 ساخت شرکت مانتوبا کشور کانادا، و در نسل F3، به روش مقیاس رتبه بندی ۹-۱ (Singh and Reddy, 1993) در محیط کنترل شده اطاق رشد.

در هر دو روش از جدایه شماره ۱۳ پاتوتیپ III برای مایه‌زنی استفاده شد (ادوپا و همکاران، ۱۹۹۸). این جدایه در دمای اطاق و زیر نور فلورسنت به روش چو و همکاران (۲۰۰۴) کشت داده شد. مایه قارچ اولیه با رقیق‌سازی کلنی‌های چهارده روزه با آب مقطر استریل، در داخل یک همزن برقی آماده شد. سپس سوسپانسیون حاصله با استفاده از صافی مخصوص فیلتر شده و به وسیله لوپ هماسایتومتر در غلظت  $2 \times 10^5$  کنیدی در میلی‌لیتر تنظیم شد، سپس چند قطره (یک قطره به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون) توین ۲۰ به عنوان افزایش‌دهنده جذب سطحی به آن افزوده شد.

در روش برگ جدا شده، ۳۵ تا ۴۵ روز بعد از کاشت (اوایل مرحله گلدهی) از هر کدام از والدین تلاقی و بوته‌های F2 برگ‌های چهارم، پنجم و ششم از شاخه‌های جانبی با پنس تمیز جدا شده و به حالت افقی (حداکثر با زاویه ۳۰

بیماری برای هر بوته  $F_2$  و برای خانواده‌های  $F_{2:3}$  در تجزیه QTL به کار گرفته شدند.

#### کنترل ژنتیکی مقاومت به برق زدگی

برای تعیین این که مقاومت به بیماری برق‌زدگی توسط یک ژن بزرگ اثر کنترل می‌شود یا تعدادی ژن کوچک اثر، از آزمون Fain استفاده شد (Lynch and Walsh, 1997). برای این کار، رگرسیون واریانس خانواده‌ها روی میانگین خانواده‌ها بر اساس مدل رگرسیونی زیر برآورد شد:

$$V = b_0 + b_1\mu + b_2\mu^2$$

که در آن  $V$  واریانس درون خانواده و  $\mu$  میانگین خانواده است.

#### ارزیابی ژنوتیپی

DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهچه‌های  $F_2$  با استفاده از پروتکل CTAB استخراج شدند (Weising *et al.*, 1998). چند شکلی والدین با استفاده از ۱۲۵ جفت آغازگر SSR طراحی شده به وسیله وینتر و همکاران (Winter *et al.*, 1999) و ۲۴ جفت آغازگر SSR ایجاد شده توسط ستی و همکاران (Sethy *et al.*, 2003) ارزیابی شد و آغازگرهای چند شکل بین والدین برای غربال جمعیت مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرو لیتر بر اساس روش وینتر و همکاران (۱۹۹۹)، انجام

تشکیل داده و حاوی یک بوته منفرد از ۸۸ ژنوتیپ‌های آزمایشی بودند. دو هفته پس از کاشت، سوسپانسیون آماده شده به میزان لازم (تا زمانی که قطرات از نوک برگ‌ها شروع به چکیدن کنند)، با اسپری پاش اتومایزر بر روی شاخه و برگ بوته‌ها پاشیده شد. بلافاصله پس از مایه‌زنی، به منظور حفظ رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد در طول دوره آلودگی، سینی‌های مربوط با پلاستیک نیمه شفاف پوشانده شده و در اطاق رشد با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۴۸ ساعت پوشش پلاستیک حذف و دمای محفظه روی ۲۰ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۶ درجه سانتی‌گراد در شب با فتوپریود ۱۶ ساعت تنظیم شد. واکنش بوته‌ها در برابر بیماری، دو هفته پس از مایه‌زنی به روش مقیاس‌بندی ۱ تا ۹ امتیازدهی شد (سینگ و ردی، ۱۹۹۳).

این مقیاس‌بندی پنج بار متوالی به فواصل هفت روز انجام و سطح زیر منحنی گسترش بیماری با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$AUDPC = \sum [(x_i + x_{i+1})/2] (t_{i+1} - t_i)$$

در این فرمول  $x_i$  امتیاز برق‌زدگی  $i$  امین ارزیابی؛  $x_{i+1}$  امتیاز برق‌زدگی  $i+1$  یکمین ارزیابی؛ و  $(t_{i+1} - t_i)$  تعداد روزهای بین دو ارزیابی هستند (Campbell and Madden, 1990).

تجزیه واریانس صفات با استفاده از رویه PROC GLM نرم‌افزار SAS انجام شد. میانگین اندازه سطح برگ و یادداشت‌برداری

نرم افزارهای SAS و QTL Cartographer نسخه ۲/۵، انجام شد. حد بحرانی LOD از طریق آزمون جایگشت داده‌ها، پس از ۱۰۰۰ مرتبه تکرار برابر یا بزرگ‌تر از ۲/۵ به دست آمد (Churchill and Doerge, 1994) و سپس فرض اثرگذار بودن مکان ژنی بر صفت مورد نظر ( $H_1$ )، در برابر این فرض که مکان ژنی بر صفت مؤثر نیست ( $H_0$ ) مورد آزمون قرار گرفت. نهایتاً، برای تعیین اپیستازی در تجزیه همزمان QTLها در یک مدل رگرسیون چندگانه، روش مکان‌یابی فاصله‌ای چندگانه (Multiple interval mapping) در برنامه QTL Cartographer انجام شد. برای برآورد این مدل از QTLهای تعیین شده به روش CIM استفاده شد.

#### نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در نسل  $F_2$  نشان داد که ژنوتیپ‌های آزمایشی از نظر اندازه برگ و سطح زیر منحنی گسترش بیماری با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند. تمامی ۸۳ خانواده  $F_3$  مشتق شده از ژنوتیپ‌های  $F_2$  نیز برای واکنش در برابر بیماری مورد ارزیابی قرار گرفتند. تفاوت سطح زیر منحنی گسترش بیماری بین خانواده‌های  $F_2:3$  نیز معنی‌دار بود (نتایج نشان داده نشده‌اند). توزیع فراوانی میانگین تکرارها برای هر صفت به شکل پیوسته و در برگیرنده دامنه کاملی از اندازه‌های مربوط به هر صفت بود. این توزیع‌ها در شکل ۱

شد. اجزای این واکنشگر شامل ۴۰ نانوگرم DNA الگو، بافر (۵۰ میلی‌مول KCl، ۱۰ میلی‌مول تریس HCl، ۰/۱ درصد تریتون X-۱۰۰)، ۱/۵ میلی‌مول  $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومول از هر کدام از dNTPها، ۰/۲ میکرومول از آغازگر مورد نظر و یک واحد *Taq* DNA پلیمرز بود. چرخه‌های حرارتی شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، تکثیر در ۳۵ چرخه (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه) و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه بود. فرآورده‌های حاصل از تکثیر، با استفاده از ژل پلی‌آکریل واسرشته‌ساز ۶ درصد تفکیک شده و رنگ‌آمیزی ژل با نترات نقره انجام شد.

#### تجزیه پیوستگی و QTL

تجزیه پیوستگی بر اساس LOD (logarithm of odds) برابر با ۳ و حداکثر فاصله ۵۰ سانتی مورگان بین دو نشانگر مجاور، با استفاده از برنامه MAPMAKER/EXP نسخه ۳/۰ (Lander *et al.*, 1987)، انجام شد. مکان‌یابی QTLها بر اساس تجزیه تک‌نشانگری (Single marker analysis)، مکان‌یابی فاصله‌ای (Interval mapping) و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (Composite interval mapping) با استفاده از

واریانس ناچیزی در درون هر خانواده وجود خواهد داشت. از طرف دیگر، خانواده‌های دارای فنوتیپ حد متوسط، هتروزیگوت هستند و واریانس درون هر خانواده بالا است، بنابراین در این بررسی رابطه بین میانگین AUDPC برای خانواده‌های  $F_3$  و واریانس درون هر خانواده با استفاده از یک مدل درجه دوم، برآورد و در شکل ۲ نشان داده شده است. نتیجه این تجزیه حاکی از معنی‌دار بودن ضریب  $b_2$  بود ( $P = 0.0001$ ) و نشان می‌دهد که در جمعیت مورد مطالعه یک یا چند ژن بزرگ اثر برای مقاومت به برق‌زدگی در حال تفرق هستند. چنین نتیجه‌ای توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (تکه اوغلو و همکاران، ۲۰۰۰؛ فلاندز-گالوز و همکاران، ۲۰۰۳؛ ادوپا و باوم، ۲۰۰۳؛ چو و همکاران، ۲۰۰۴؛ ایرولا و همکاران، ۲۰۰۶؛ تاران و همکاران، ۲۰۰۷).

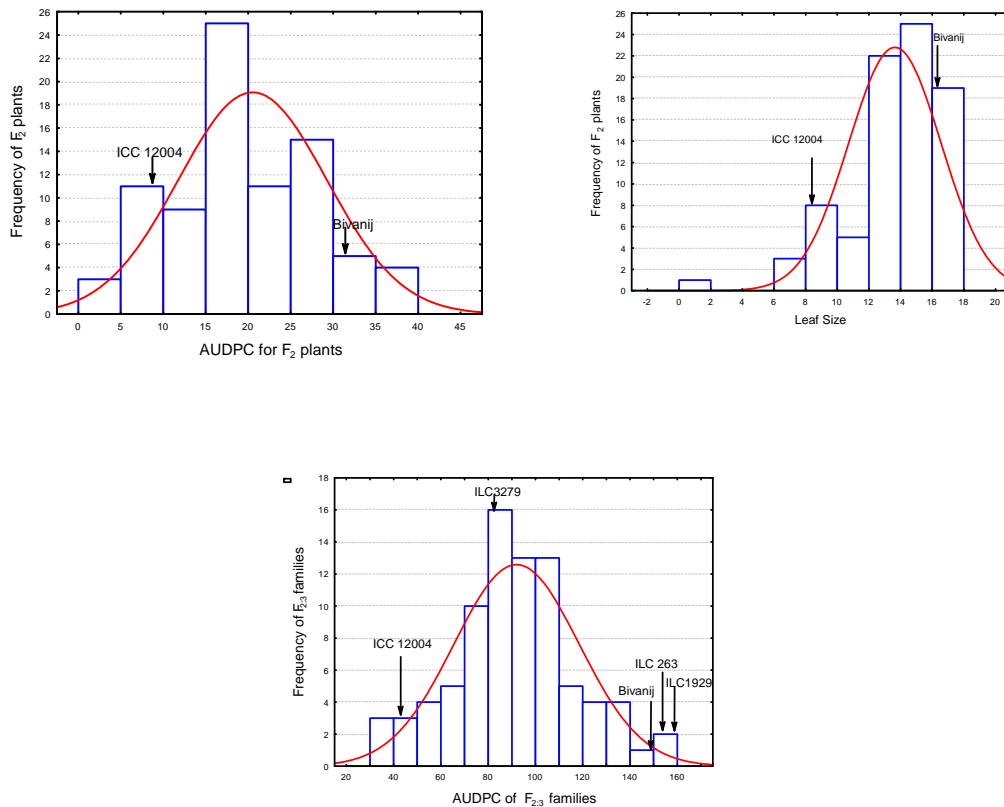
از ۱۴۹ جفت آغازگر مورد استفاده برای ارزیابی چندشکلی بین بیونج و ICC12004، تعداد ۵۸ جفت از آن‌ها (۳۹٪) باندهای چند شکل واضح بین دو لاین مذکور ایجاد کردند. ادوپا و باوم (۲۰۰۳) و چو و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که سطح چند شکلی SSR بین دو والد از گونه *C. arietinum* در دامنه ۳۰ تا ۵۰ درصد بود. با این وجود سطح بالاتری از پلی مورفیسم (۷۰٪) بین والدین تلاقی از گونه‌های *C. reticulatum* و *C. arietinum* به دست آمده است (تکه اوغلو و همکاران، ۲۰۰۰). در این ارتباط، ابو و همکاران

نشان داده شده‌اند. به دلیل نرمال نبودن توزیع داده‌های مربوط به اندازه برگ و AUDPC در جمعیت  $F_2$ ، تبدیل داده‌ها انجام شد.

همبستگی بین میانگین AUDPC در نسل‌های  $F_2$  و  $F_3$  معنی‌دار نبود. سطح زیر منحنی گسترش بیماری در نسل  $F_2$  با اندازه برگ رابطه منفی و معنی‌دار داشت ( $r = -0.46^{**}$ ). این رابطه نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های دارای اندازه برگ بزرگ‌تر، حساسیت کمتری به برق‌زدگی نشان داده‌اند. تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که با افزایش اندازه برگ در نخود، از میزان کرک روی برگ‌ها و سایر اندام‌های گیاه کاسته می‌شود (Anonymous, 2000). لذا با توجه به نتایج حاصل از این بررسی می‌توان استدلال کرد که در نخود، ژنوتیپ‌هایی که از کرک‌های غده‌دار پوشیده شده‌اند محیط مرطوب و مناسبی را برای رشد و فعالیت عوامل قارچی، از جمله عامل بیماری برق‌زدگی فراهم کرده و لذا به برق‌زدگی حساس‌تر هستند.

به طور کلی، چنانچه در جمعیت‌های  $F_2$  یک ژن بزرگ اثر در حال تفرق باشد، انتظار بر این است که در خانواده‌های  $F_{2:3}$  غیر یکنواختی واریانس حاکم بوده و بین میانگین و واریانس خانواده‌ها رابطه‌ای برقرار باشد (لینچ و والش، ۱۹۹۸). بنابراین، در صورتی که صفت توسط یک یا تعداد کمی ژن بزرگ اثر کنترل شود، خانواده‌های واجد فنوتیپ دو حد نهایی به احتمال قوی هموزیگوت بوده، و در نتیجه



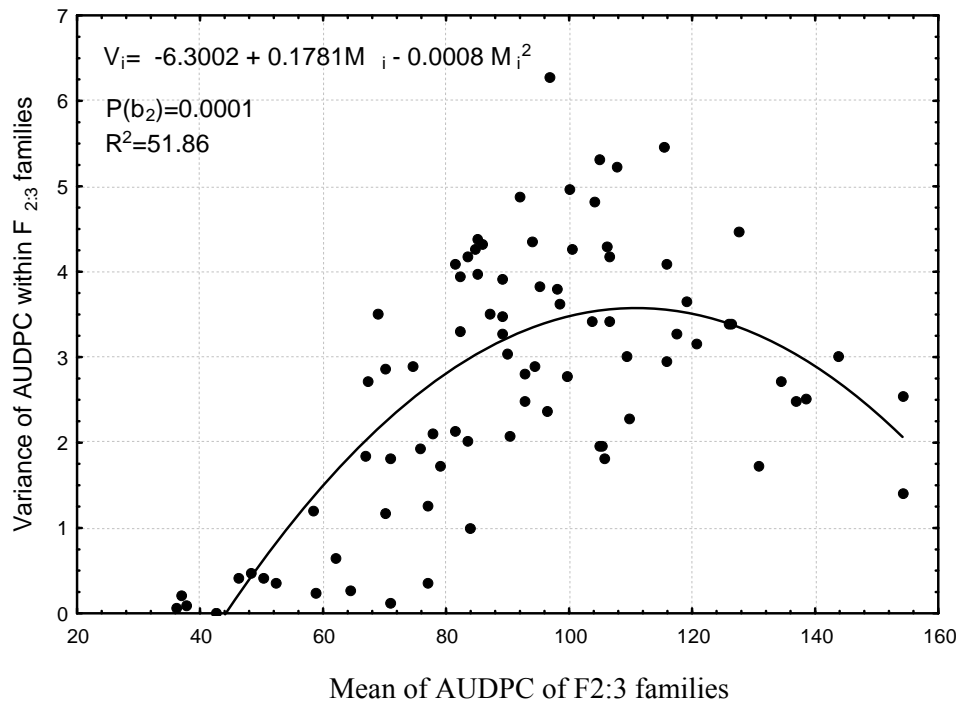


شکل ۱- توزیع فراوانی اندازه برگ (a)، سطح زیر منحنی گسترش بیماری در نسل  $F_2$  (b) و سطح زیر منحنی گسترش بیماری در نسل  $F_{2:3}$  (c)

Fig. 1. Frequency distributions for Leaf size (a), Area under disease progress curve in  $F_2$  population (b) and  $F_{2:3}$  generation(c)

همبارز تفاوت داشت ( $P \cdot 0.05$ ). این نشانگر فراوانی هموزیگوتی بیشتری نسبت به هتروزیگوتی از نظر آلل‌های والد مقاوم به بیماری (ICC12004) داشت. ضمناً نشانگر مورفولوژیک رنگ گل در هیچ کدام از گروه‌های لینکاژی قرار نگرفت. نقشه‌های پیوستگی متعددی برای نخود ارائه شده‌اند (وینتر و همکاران، ۲۰۰۰؛ تکه اوغلو و

(Abbo *et al.*, 2003) گزارش کرده‌اند که سطح پائین تنوع ژنتیکی در درون خزانه ژنی اولیه نخود ناشی از تنگناهای متعددی است که گونه زراعی در طول فرآیند اهلی شدن با آن روبرو بوده است. از ۵۸ نشانگر SSR و یک نشانگر مورفولوژیک (رنگ گل) به کار رفته در تجزیه لینکاژ فقط TR1 انحراف از تفرق نشان داد و با نسبت ۱:۲:۱، برای نشانگرهای



شکل ۲- رابطه میانگین سطح زیر منحنی گسترش بیماری برق‌زدگی خانواده‌های F<sub>2:3</sub> با واریانس آن‌ها در جمعیت حاصل از تلاقی ICC12004 و نخود محلی بیونج

Fig. 2. Relationship between mean of AUDPC of F<sub>2:3</sub> families and their variances in the population derived from cross of ICC12004 × Bivanj

همکاران، ۲۰۰۰؛ فلاندز-گالوز و همکاران، ۲۰۰۳؛ اودوپا و باوم، ۲۰۰۳؛ چو و همکاران، ۲۰۰۴؛ تاران و همکاران، ۲۰۰۷). در این تحقیق، ۵۸ نشانگر SSR به هشت گروه پیوستگی، برابر با تعداد کروموزوم‌های نخود (2n=2x=16)، با طول پیوستگی معادل ۹۶۱ سانتی مورگان اختصاص یافتند (شکل ۳). متوسط فاصله پیوستگی بین جفت نشانگرهای مجاور برابر با ۲۴/۳۲ سانتی مورگان بود. حداکثر فاصله جداکننده دو نشانگر در گروه لینک‌سازی ۶ بین TA14 و GA26

۴۹ سانتی مورگان)، و حداقل فاصله در گروه لینک‌سازی ۴ بین TS104 و TA146 (۱/۹ سانتی مورگان) مشاهده شد. در بررسی‌های دیگر، با استفاده از سیستم‌های نشانگری مختلف نقشه‌های کامل تری ارائه شده‌اند (تکه اوغلو و همکاران، ۲۰۰۰، وینتر و همکاران، ۲۰۰۰؛ تاران و همکاران، ۲۰۰۷). ادوپا و باوم (۲۰۰۳) پیشنهاد کرده‌اند که برای تهیه یک نقشه اشباع نخود لازم است ترکیبی از SSRها با نشانگرهای جدیدی مانند (Single nucleotide polymorphism) SNP

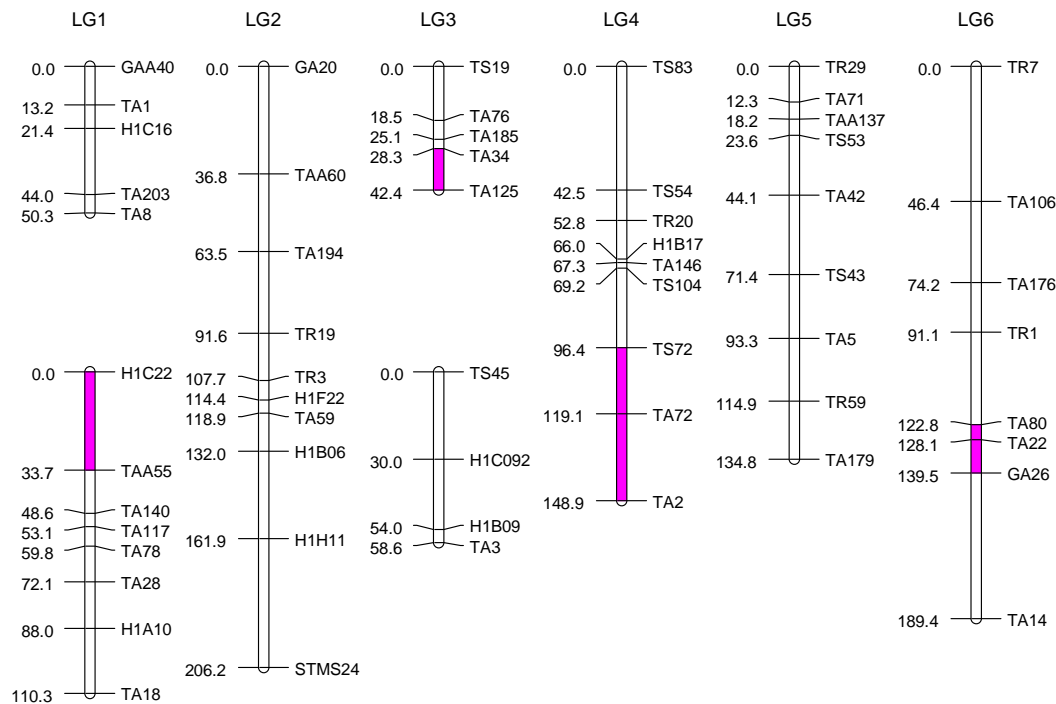
۶ به ترتیب حدود ۱۷ و ۱۹ درصد از تنوع فنوتیپی مربوط به این صفت را تبیین کردند. محققین متعددی در گزارش‌های خود نتیجه‌گیری کرده‌اند که QTL بزرگ اثر برای مقاومت کمی به *A. rabiei* روی LG4 قرار دارد (ادوپا و باوم، ۲۰۰۳؛ چو و همکاران، ۲۰۰۴؛ ایرولا و همکاران، ۲۰۰۶؛ تاران و همکاران، ۲۰۰۷). علاوه بر این، چو و همکاران (۲۰۰۴) و تاران و همکاران (۲۰۰۷) وجود یک QTL دیگر را روی LG6 گزارش کرده‌اند که با نتایج بررسی حاضر همخوانی دارد. همچنین برای AUDPC در نسل F<sub>2</sub> وجود یک QTL روی LG3 بین نشانگرهای TAA55 و H1C22 مشخص شد که حدود ۱۱ درصد از کل تنوع فنوتیپی مربوطه را در برداشت. این QTL قبلاً فقط توسط تاران و همکاران (۲۰۰۷) در جمعیت F<sub>2</sub> حاصل از تلاقی درون گونه‌ای uCDC Frontier ICCV96029 گزارش شده بود. به نظر این محققین مکان‌های ژنی خاصی که در برخی مطالعات به طور اتفاقی مشخص می‌شوند و قبلاً گزارش نشده‌اند، اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های اصلاحی تجمع ژن‌ها، مخصوصاً برای تقویت یا حفظ ماندگاری مقاومت به بیماری دارند.

به منظور برآورد اثر متقابل احتمالی QTL‌های مکان‌یابی شده، روش مکان‌یابی فاصله‌ای چند گانه (MIM) به کار گرفته شد. نتایج روش MIM حاکی از وجود اپیستازی QTL به اشکال افزایشی و افزایشی و

مورد استفاده قرار گیرند. دو عامل اندازه جمعیت و تعداد نشانگر مورد استفاده، از اصلی‌ترین عوامل ایجاد کننده تفاوت در پوشش نقشه‌های ارائه شده هستند (وینتر و همکاران، ۲۰۰۰). به طور کلی، SSRهای مشترک بین نقشه حاضر و نقشه‌های قبلی (وینتر و همکاران، ۲۰۰۰؛ اودوپا و باوم، ۲۰۰۳؛ و تاران و همکاران، ۲۰۰۷)، هر چند با قدری تفاوت در محل و فاصله، در گروه‌های پیوستگی مشابهی استقرار یافتند.

بر اساس تجزیه تک نشانگری، سه نشانگر با رابطه معنی‌دار برای اندازه برگ در گروه‌های پیوستگی ۴ و ۸، و یازده نشانگر در گروه‌های پیوستگی ۲، ۳ و ۴ با رابطه معنی‌دار با تغییرات سطح زیر منحنی گسترش بیماری در نسل F<sub>2</sub> شناسایی شدند. در خانواده‌های F<sub>2:3</sub> همه نشانگرهای روی گروه لینکاژ ۴ با AUDPC همبستگی معنی‌دار داشتند و گذشته از آن هفت نشانگر دیگر در گروه‌های پیوستگی ۱، ۲ و ۶ QTL معنی‌دار نشان دادند.

بر اساس روش مکان‌یابی فاصله‌ای، یک QTL برای اندازه برگ در گروه پیوستگی ۷ و چهار QTL برای سطح زیر منحنی گسترش بیماری در گروه‌های پیوستگی ۳، ۴ و ۶ مکان‌یابی شدند (شکل ۳). این نتایج، صرف نظر از تفاوت‌ها در منبع مقاومت و جدایه *A. rabiei* مورد استفاده، تشابهات محسوسی با گزارش‌های قبلی داشت. QTL‌های مربوط به مقاومت به برق‌زدگی در نسل F<sub>2</sub> در گروه‌های پیوستگی ۴



شکل ۳- نقشه پیوستگی نشانگرهای نخود و مکان QTL های شناسایی شده برای اندازه برگ و مقاومت به برقزدگی در نسل های  $F_2$  و  $F_{2:3}$  حاصل از تلاقی ICC12004 و رقم بیونج

Fig. 3. Linkage map of chickpea and identified QTLs for leaf size and resistance to ascochyta blight in  $F_2$  /  $F_{2:3}$  generations derived from a cross between ICC12004 and Bivanij

اپیستاتیک معنی دار را شناسایی کرده و اظهار نظر کردند که اثر اپیستاتیک به اشکال غالبیت (در شرایط مزرعه) و غالبیت افزایشی (در شرایط کنترل شده) مؤلفه های ژنتیکی مهمی برای مقاومت به برقزدگی در نخود هستند.

عدم وجود تفاوت معنی دار بین میانگین یادداشت برداری بیماری بوته های  $F_1$  و والد مقاوم به بیماری، ICC12004 (Kanouni *et al.*, 2008) دلالت بر آن دارد که مؤلفه های اصلی مقاومت در

غالبیت افزایشی برای AUDPC در خانواده های  $F_{2:3}$  بود. ولی هیچ کدام از آن ها، اثر معنی داری در کنترل مقاومت به بیماری برقزدگی نداشتند. باقیمانده تنوع را می توان به اثر محیطی، خطاهای آزمایشی و همچنین سایر ژن های مقاومت با اثر کوچک و اثر اپیستاتیک آنها نسبت داد. فلاندز- گالوز و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه روی خانواده های  $F_{2:3}$  حاصل از تلاقی نخود لاین ICC12004 (مقاوم) و رقم زراعی Lasseter (بسیار حساس به برقزدگی) QTL های متعددی با اثر

جدول ۱- QTL های مکان یابی شده برای سطح برگ و مقاومت به برق زدگی به روش CIM در جمعیت های F<sub>2</sub> و F<sub>2:3</sub> نخود

Table 1. Mapped QTLs for leaf size and resistance to ascochyta blight with CIM method in F<sub>2</sub> و F<sub>2:3</sub> generations of chickpea

Parameter	پارامتر مورد آزمون	گروه لینکاژی	طول فاصله (cM) <sup>a</sup>	نشانه های مجاور	موقعیت QTL (eM) <sup>b</sup>	LOD <sup>c</sup>	اثر ژنتیکی <sup>d</sup>		عمل ژن <sup>e</sup>	R <sub>2</sub> (%) <sup>f</sup>
							افزایشی	غالبیت		
Leaf size		LG7	12.5	H1C22- TAA55	94.0	2.91	-1.99	0.50	A	15.38
AUDPC-F <sub>2</sub>		LG3	14.1	TA125-TA34	0.81	2.50	-4.82	1.96	PD	10.98
AUDPC-F <sub>2:3</sub>		LG4	29.8	TA2-TA72	23.8	4.15	-6.42	-14.43	OD	16.96
		LG6	6.7	GA26-TA80	45.7	4.57	2.69	19.39	OD	18.61

<sup>a</sup> فاصله بین دو نشانگر مجاور

<sup>b</sup> موقعیت QTL از سمت چپ نشانگر مجاور

<sup>c</sup> مقدار قله بر حسب آماره آزمون LOD برای QTL مورد نظر

<sup>d</sup> اثر افزایشی و غالبیت ژن

<sup>e</sup> A: عمل افزایشی ژن ( $|d/a| < 0.2$ )، PD: غالبیت نسبی ( $0.2 < |d/a| < 0.8$ )، D: غالبیت ( $0.8 < |d/a| < 1.2$ )، و OD: فوق غالبیت ( $|d/a| > 1.2$ )

<sup>f</sup> نسبتی از واریانس فنوتیپی که به وسیله QTL مورد نظر توجیه شده است

<sup>a</sup> interval between two flanking markers(cM)

<sup>b</sup>QTL position from the left flanking marker(cM)

<sup>c</sup> Peak value of LOD test statistic observed for the QTL in question

<sup>d</sup> Additive and dominance gene effects

<sup>e</sup> A: additive gene action ( $|d/a| < 0.2$ ) , PD: partial dominance ( $0.2 < |d/a| < 0.8$ ) , D: dominance ( $0.8 < |d/a| < 1.2$ ), and OD : over dominance ( $|d/a| > 1.2$ )

<sup>f</sup> proportion of phenotypic variance explained by the QTL

جدول ۲ - برآورد اثر QTL های مکان یابی شده و اثر متقابل آن ها به روش MIM در جمعیت های F<sub>2</sub> و F<sub>2:3</sub> نخود

Table 2. Estimates of QTL effects and their interactions by MIM method in F<sub>2</sub> & F<sub>2:3</sub> generations of chickpea

پارامتر مورد آزمون Parameter	ف <sub>p</sub> <sup>a</sup>	موقعیت نشانهگر <sup>b</sup>		LOD <sup>d</sup>	اثر ژنتیکی <sup>e</sup>					عمل ژن <sup>f</sup>	R <sup>2</sup> (%) <sup>g</sup>			
		QTL	Marker		QTL (cM) <sup>c</sup>	افزایشی		غالبیت				اپیستازی		
						ف <sub>A</sub>	ارزش	ف <sub>D</sub>	ارزش			ف <sub>I</sub>	ارزش	
Leaf Size	8.34	1	H1C22	93.18	2.21	1.01	-1.53	0.09	0.61		A	13.25		
AUDPC-F <sub>2</sub>	74.46	1	TA125	0.10	2.72	9.89	-4.32	0.51	1.43		A	13.96		
AUDPC-F <sub>2:3</sub>	684.1	1	TA72	24.28	3.48	93.84	-15.06	32.40	-9.67		PD	18.46		
			GA26	45.20									2.57	62.50
				1x2		0.00					1.60	1.14	AD	0.00
				1x2		0.23					4.88	7.67	AA	0.04
<b>مجموع</b>					6.64	156.39		81.66		6.48		35.74		

<sup>a</sup>  $f_p$  = واریانس فنوتیپی

<sup>b</sup> نزدیک ترین نشانهگر مجاور

<sup>c</sup> موقعیت QTL نسبت به نزدیک ترین نشانهگر مجاور

<sup>d</sup> مقدار قله بر حسب حداکثر آماره آزمون LOD برای QTL مورد نظر

<sup>e</sup> واریانس های ژنتیکی  $f_A$ : افزایشی،  $f_D$ : غالبیت، و  $f_I$ : اپیستازی

<sup>f</sup> A: عمل افزایشی ژن ( $|d/a| < 0.2$ )، PD: غالبیت نسبی ( $0.2 < |d/a| < 0.8$ )، D: غالبیت ( $0.8 < |d/a| < 1.2$ )، و OD: فوق غالبیت ( $|d/a| > 1.2$ )؛ AA: افزایشی u افزایشی، AD: افزایشی u غالبیت

<sup>g</sup> واریانس فنوتیپی (نسبی) توجیه شده به وسیله QTL مورد نظر

<sup>a</sup>  $f_p$  = phenotypic variance

<sup>b</sup> Nearest flanking marker

<sup>c</sup> QTL position from the nearest flanking marker(cM)

<sup>d</sup> Peak value of the LOD test statistic observed for the QTL in question

<sup>e</sup>  $f_A$  = additive,  $f_D$  = dominance and  $f_I$  = epistatic genetic variances

<sup>f</sup> A = additive gene action ( $|d/a| < 0.2$ ), PD = partial dominance ( $0.2 < |d/a| < 0.8$ ), D = dominance ( $0.8 < |d/a| < 1.2$ ), and OD = over dominance ( $|d/a| > 1.2$ );

AA = additive × additive, DD = dominance × dominance, and AD = additive × dominance QTL epistatic interactions

<sup>g</sup> partial phenotypic variance explained by the QTL

کمی (QTLها) برای مقاومت به برقرزدگی نخود با استفاده از پاتوتیپ‌های I و II انجام شده و برای اولین بار در این پژوهش از پاتوتیپ III به این منظور استفاده شد.

### سپاسگزاری

نگارندگان مراتب تشکر و قدر دانی خود را از مسئول واحد پاتولوژی غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر که امکانات گلخانه را برای این تحقیق فراهم کرد، ابراز می‌دارند. همچنین از همکاری آقای مهندس حسین غفاری خلیق، محقق آن مؤسسه نیز سپاسگزاری می‌شود.

ICC12004 غالب هستند. نا متقارن بودن داده‌ها در آزمون نرمالیتیه برای AUDPC-F<sub>2</sub> و چولگی واکنش به بیماری بوته‌های F<sub>2</sub> به سمت والد مقاوم (شکل ۱)، صحت این نتیجه‌گیری را تأیید می‌کند. ضمناً QTL کنترل‌کننده مقاومت به برقرزدگی در نسل F<sub>2</sub> اثر افزایشی داشت. این نتایج می‌تواند کاربرد بالقوه‌ای در غربال برای آلل‌های هموزیگوس ICC12004 در مکان‌های ژنی TA125، TA72 و GA26، برای سرعت بخشیدن به برنامه‌های به‌نژادی نخود داشته باشد. این تحقیق در نوع خود منحصر به فرد بود، چرا که تا کنون تمامی مطالعات در مورد مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات

### References

- Abbo, S., Berger, J., and Turner, N. C. 2003.** Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology* 30: 1081-1087.
- Anonymous. 2000.** Germplasm program. Annual Report for 1999. ICARDA, Aleppo, Syria.
- Arumuganathan, K., and Earle, D.E. 1991.** Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular and Biological Report* 9:208-218.
- Banai, T. 1998.** Study of the yielding ability and adaptability of twelve chickpea varieties. *Seed and Plant* 13 (3): 1-11 (in Farsi).
- Bolandandam, J., Rouhani, H., and Alizadeh, A. 1999.** Evaluation of resistance in some chickpea cultivars to ascochyta blight. *Seed and Plant* 15: 184-191 (in Farsi).
- Buchwaldt, L., Booker, H., and Gali, K. 2007.** A detached leaf assay for phenotyping of chickpea-ascochyta interaction. Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon, Saskatchewan, S7N0X2.
- Campbell, C.L., and Madden, L. V. 1990.** Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, New York. 532 pp.

- Cho, S., Chen, W., and Muehlbauer, F. J. 2004.** Pathotype-specific genetic factors in chickpea (*Cicer arietinum* L.) for quantitative resistance to ascochyta blight. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 733–739.
- Churchill, G. A., and Doerge, R.W. 1994.** Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963–971.
- Dey, S. K., and Singh, G. 1993.** Resistance to ascochyta blight in chickpea-genetic basis. *Euphytica* 68:147–153.
- Flandez-Galvez, H., Ades, P. K., Ford, R., Pang, E. C. K., and Tayler, P. W. J. 2003.** QTL analysis for ascochyta blight resistance in an intraspecific population of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107:1257–1265.
- Flandez-Galvez, H., Ford, R., Pang, E., Brouwer, J. B., and Taylor, P. 2002.** Mapping and QTL analysis of ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) resistance genes in chickpea. *Plant, Animal and Microbe Genomes X Conference, San Diego, USA.* Page 478.
- Gan, Y. T., Siddique, K. H. M., MacLeod, W. J., and Jayakumar, P. 2005.** Management options of minimizing the damage by ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research* 97: 121-134.
- Iruela, M., Rubio, J., Barro, F., Cubero, J. I., Millan, T., and Gill, J. 2006.** Detection of two QTL for resistance to ascochyta blight in an intraspecific cross of chickpea(*Cicer arietinum* L.): development of SCAR markers associated to resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 112:278-287.
- Jayakumar, P., Gossen, B. D., Gan, Y. T., Warkentin, T. D., and Banniza, S. 2005.** Ascochyta blight of chickpea: infection and host resistance mechanisms. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 499-509.
- Kaiser, W. J., and Kusmenoglu, I. 1997.** Distribution of mating types and the teleomorph of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Turkey. *Plant Disease* 81: 1284–1287.
- Kanouni, H. 2001.** Study of the yielding ability and adaptability of chickpea cultivars under rainfall conditions of Kurdistan. *Seed and Plant* 17: 1-11 (in Farsi).
- Kanouni, H., Taleei, A., and Khalili, M. 2007.** Stability analysis of seed yield and one hundred-seed weight in desi type chickpea genotypes under dryland conditions. *Seed and Plant* 23: 297-310 (in Farsi).



- Kanouni, H., Taleei, A., Peyghambari, S.A., Okhovat, S. M., Malhotra, R. S., and Ghaffari-Kahligh, H. 2008.** Genetic of resistance to *Ascochyta rabiei* in chickpea. Iranian Journal of Crop Science Vol. 8,(submitted)(in Farsi).
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, E., Daly, M. J., Lincoln, S. E., and Newberg, L. 1987.** MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174–181.
- Lichtenzveig, J., Shtienberg, D., Zhang, H. B., Bonfil, D. J., and Abbo, S. 2002.** Biometric analyses of the inheritance of resistance to *Didymella rabiei* in chickpea. *Phytopathology* 92: 417–423.
- Lynch, M. and Walsh, B. 1998.** Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sinauer Associates Inc., Sunderland MA. 980 pp.
- Malhotra, R. S., Baum, M., Udupa, S. M., Bayaa, B., Kabbabe, S., and Khalaf, G. 2003.** Ascochyta blight resistance in chickpea: Present status and future prospects. Proceedings of International Chickpea Congress: Chickpea Research for Millenium. Raipur, India.
- Millan, T., Clarke, H. J., Siddique, K. H. M., Buhariwalla, H. K., Gaur, P. M., Jagdish K., Gil, J., Kahl, G., and Winter, P. 2006.** Chickpea molecular breeding: New tools and concepts. *Euphytica* 147: 81-103.
- Nene, Y. L. 1984.** A review of ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). pp. 17-33. In: Saxena, M. C., and Singh, K. B. (eds.) Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpeas. Martinus Nijhoff/DR W. Junk Publishers, the Netherlands.
- Nene, Y. L., and Reddy, M. V. 1987.** Chickpea diseases and their control. pp. 237-270. In: Singh, K. B., and Saxena, M.C. (eds.) Disease Resistance Breeding in Chickpea. ICARDA, Aleppo, Syria.
- Nour-Allahi, K., Falahati-Rastgar, M., and Jafarpour, B. 2000.** Charactization of physiological races of *Ascochyta rabiei* pathogen of ascochyta blight of chickpea over some regions of Iran. *Science and Technology of Agriculture*. 4: 127-136 (in Farsi).
- Pande, S., Siddique, K. H. M., Kishore, G. K., Bayaa, B., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., Bretage, T. W., and Crouch, J. H. 2005.** Ascochyta blight of

- chickpea(*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity and disease management. Australian Journal of Agricultural Research 56: 317-332.
- Reddy, M. V., and Kabbabeh, S. 1985.** Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab. in Syria and Lebanon. Phytopathologia Mediterranea 24 : 265-266.
- Sabbaghpour, S. H., Sadeghi, E., and Malhotra, R. S. 2003.** Present status and future prospects of chickpea cultivation in Iran. International Chickpea Conference. IGAU, Raipur Chattisgarh, India.
- Santra, D. K., Tekeoglu, M., Ratnaparkhe, M., Kaiser, W. J. and Muehlbauer, F. J. 2000.** Identification and mapping of QTLs conferring resistance to ascochyta blight in chickpea. Crop Science 40: 1606–1612.
- Sethy, N. K., Shokeen, B. and Bhatia, S. 2003.** Isolation and characterization of sequence-tagged microsatellite site markers in chickpea(*Cicer arietinum* L.). Molecular and Ecological Notes 3: 428-430.
- Shahriari, D., and Izadyar, M. 1998.** Study of pathogenic difference of *Ascochyta rabiei* on chickpea cultivars. Proceedings of the 13<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, Ahvaz, Iran. Page 148 (in Farsi).
- Shokouhifar, F., Bagheri, A., and Rastgar, M. 2001.** Identification of genetic diversity of ascochyta blight [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.,] in Iran using RAPD. Journal of Agriculture and Natural Resources Sciences. 7: 192-204 (in Farsi).
- Shokouhifar, F., Bagheri, A., and Rastgar, M. 2003.** Identification of pathogenic isolates of *Ascochyta rabiei* in Iran. Journal of Agriculture and Natural Resources Sciences. 10: 217-232 (in Farsi).
- Singh, K. B., and Reddy, M. V. 1993.** Resistance to six races of *Ascochyta rabiei* in the world germplasm collection of chickpea. Crop Science 33 : 186-189.
- Singh, S. K., Rahman, S. J., Gupta, B. R., and Kalha, S. C. 1992.** Integration of pesticide application schedules for disease and insect pest management in chickpea under dryland conditions. Indian Journal of Plant Protection 20: 158–161.
- Taran, B., Warkentin, T. D., Tullu, A., and Vandenberg, A. 2007.** Genetic mapping of ascochyta blight resistance in chickpea(*Cicer arietinum* L.) using a simple sequence repeat linkage map. Genome, 50: 26-34.

- Tekeoglu, M., Santra, D. K., Kaiser, W. J., and Muehlbauer, F. J. 2000.** Ascochyta blight resistance inheritance in three chickpea recombinant inbred line populations. *Crop Science* 40:1251–1256.
- Udupa, S. M., and Baum, M. 2003.** Genetic dissection of pathotypespecific resistance to ascochyta blight disease in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1196–1202.
- Udupa, S. M., Weigand, F., Saxena, M. C. and Kahl, G. 1998.** Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 299–307.
- Warkentin, T. D., Banniza, S., and Vandenberg, A. 2005.** CDC Frontier kabuli chickpea. *Canadian Journal of Plant Science* 85: 909-910.
- Weising, K., Winter, P., Huttel, B., and Kahl, G. 1998.** Microsatellite markers for molecular breeding. *Journal of Crop Production* 1: 113–143.
- Winter, P., Benko-Iseppon, A. M., Huttel, B., Ratnaparkhe, M., Tullu, A., Sonnante, G., Pfaff, T., Tekeoglu, M., Santra, D., Sant, V. J., Rajesh, P. N., Kahl, G., and Muehlbauer, F. J. 2000.** A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on the recombinant inbred lines from a *C. arietinum* × *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for Fusarium races 4 and 5. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1155–1163.
- Winter, P., Pfaff, T., Udupa, S. M., Huttel, B., Sharma, P. C., Sahi, S., Arrequin-Espinoza, R., Weigand, F., Muehlbauer, F. J., and Kahl, G. 1999.** Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*C. arietinum* L.). *Molecular and General Genetics* 262: 90–101.