



Investigation of Genetic Diversity in *Fusarium of Elegans* and *Martiella-Ventricosum* Sections related to Cucurbits using ISSR markers in Tehran province

Forood Ali Khazae 

Ph.D. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail address: fkhazaii63@gmail.com

Mostafa Darvishnia 

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail address: darvishnia.m@lu.ac.ir

Eidi Bazgir

Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail address: bazgir.ei@lu.ac.ir

Abstract

Objective

This research aimed to identify *Fusariums* belonging to *Elegans* and *Martiella-Ventricosum* sections related to cucurbit plants in Tehran province and to evaluate the ability of ISSR markers to investigate the kinship relationships of these groups of *Fusariums*.

Materials and methods

In this research, five ISSR primers (AG)₈C, (AG)₈G, (AC)₈YA, (ATG)₆ and BHB(GA)₇ were selected. Fungal isolates identified based on morphological and microscopic characteristics. For ISSR markers, the statistics of polymorphism information content (PIC), Marker Index (MI) and Effective Multiplex Ratio (EMR) were calculated. Relationships and similarity between *Fusarium* isolates were analyzed using NTSYS-PC V2.02.

Results

Out of 96 *Fusarium* isolates, 48 isolates were identified as *Fusarium solani*, 25 isolates as *Fusarium oxysporum* and 23 isolates as *Fusarium redolens*. A total of 408 bands were obtained

from ISSR amplifications. 130 different bands were produced, of which 83 were polymorphic and 47 were monomorphic. The size of PCR fragments produced varied from 273 to 2428 bp. The polymorphism percentage, ranged from the highest (73%) for (ATG)₆ to the lowest (56%) for (AG)₈C. Primers (ATG)₆ and BHB(GA)₇ performed better in differentiation *Elegans* and *Martiella-Ventricosum* sections from each other. Primers (AG)₈C with 26 gene loci, and BHB(GA)₇ with 25 gene loci, produced the most bands in *Elegans* isolates and *Martiella-Ventricosum* isolates, respectively.

Conclusions

The results of this research showed that there was a high genetic diversity among the investigated *Fusarium* isolates and that the ISSR markers are efficient markers to reveal the molecular relationships between *Fusarium* populations.

Keywords: Cucurbits, *Fusarium*, ISSR marker, *Elegans*, *Martiella-Ventricosum*

Paper Type: Research Paper.

Citation: Khazae FA, Darvishnia M, Bazgir E (2023) Investigation of Genetic Diversity in *Fusarium* of *Elegans* and *Martiella-Ventricosum* Sections related to Cucurbits using ISSR markers in Tehran province. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 125-144.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 125-144. DOI: 10.22103/jab.2023.19915.1418

Received: December 11, 2022.

Received in revised form: February 07, 2023.

Accepted: February 08, 2023.

Published online: February 18, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors




بررسی تنوع ژنتیکی فوزاریوم‌های بخش *Elegans* و *Martiella-Ventricosum* مرتبط با

کدویان با استفاده از نشانگرهای ISSR در استان تهران

فرودعلی خزایی 

دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
رایانامه: fkhazaii63@gmail.com

مصطفی درویش‌نیا 

*نویسنده مسئول: استاد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: Darvishnia.m@lu.ac.ir

عیدی بازگیر

دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: bazgir.ei@lu.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۹

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق شناسایی فوزاریوم‌های بخش‌های *Elegans* و *Martiella-Ventricosum* مرتبط با گیاهان تیره کدویان در استان تهران و ارزیابی توانایی نشانگرهای ISSR در بررسی روابط خویشاوندی این گروه از فوزاریوم‌ها بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تعداد پنج آغازگر $(ATG)_6$ ، $(AC)_8YA$ ، $(AG)_8G$ ، $(AG)_8C$ و $BHB(GA)_7$ که بر اساس مطالعات محققین مختلف، در تمایز نژادهای مختلف فوزاریوم، کارایی خوبی از خود نشان داده بودند، جهت انجام این آزمایش‌ها انتخاب شد. جدایه‌های قارچی پس از جداسازی و خالص‌سازی بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و میکروسکوپی مورد شناسایی قرار گرفتند. جهت بررسی میزان کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، آماره‌های محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها Polymorphism Information Content (PIC)، شاخص نشانگری Marker Index (MI) و نسبت چندگانه مؤثر Effective Multiplex Ratio (EMR) محاسبه شد. روابط داخل گونه‌های *Fusarium* با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-PC V2.02 و ضریب تشابه SM، و ترسیم دندوگرام به‌روش UPGMA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: از مجموع ۹۶ جدایه قارچی، تعداد ۴۸ جدایه به‌عنوان *Fusarium solani*، تعداد ۲۵ جدایه به‌عنوان *Fusarium oxysporum* و تعداد ۲۳ جدایه به‌عنوان *Fusarium redolens* تشخیص داده شدند. تمامی پنج آغازگر ISSR در طول

آزمایشات PCR، باندهایی پایدار و قابل تکرار تولید کردند. از تکثیرهای ISSR مجموعاً ۴۰۸ باند به دست آمد. تعداد ۱۳۰ نوع باند متفاوت تولید شد که از این تعداد، ۸۳ باند پلی مورفیک و ۴۷ باند مونومورفیک بود. اندازه‌ی قطعات PCR تولید شده از ۲۷۳ تا ۲۴۲۸ جفت باز متغیر بود. درصد چندشکلی به دست آمده از بیشترین (۷۳ درصد) برای UBC-864 تا کمترین (۵۶ درصد) برای UBC-808 متغیر بود. آغازگرهای $(ATG)_6$ و $(BHB(GA))_7$ در تفکیک بخش‌های *Martiella-Ventricosum* و *Elegans* از همدیگر عملکرد بهتری داشتند. آغازگر $(AG)_8C$ با UBC-808 با تولید ۲۶ جایگاه ژنی بیشترین تولید باند را در جدایه‌های بخش *Elegans* و آغازگر $(BHB(GA))_7$ با UBC-885 با تولید ۲۵ باند بیشترین تولید باند را در مورد جدایه‌های بخش *Martiella-Ventricosum* داشت.

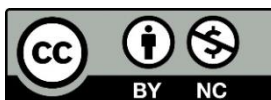
نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر ISSR یک نشانگر کارآمد جهت آشکارسازی روابط مولکولی بین توده‌ها و جدایه‌های قارچ فوزاریوم می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: فوزاریوم، کدوئیان، نشانگر ISSR، *Martiella-Ventricosum*، *Section Elegans*

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: خزایی فرودعلی، درویش‌نیا مصطفی، بازگیر عیدی (۱۴۰۱) بررسی تنوع ژنتیکی فوزاریوم‌های بخش *Elegans* و *Martiella-Ventricosum* مرتبط با کدوییان با استفاده از نشانگرهای ISSR در استان تهران. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۱۴۴-۱۲۵.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

گیاهان خانواده کدوییان (Cucurbitaceae) یا گیاهان جالیزی، یکی از مهم‌ترین گروه‌های گیاهی هستند که در ایران و بخصوص استان تهران کشت می‌شوند. از مهم‌ترین گونه‌های اقتصادی این خانواده می‌توان به هندوانه (*Citrullus lunatus* L.)، خیار (*Cucumis sativus* L.)، طالبی (*C. melo var cantalupenses*) و خربزه (*C. melo var inodorus*) اشاره کرد. استان تهران با داشتن بالغ بر ۶۵۵۷ هکتار سطح زیر کشت صیفی‌جات و تولید سالانه ۸۱۳۳۰۷ تن یکی از تولیدکنندگان مهم محصولات جالیزی به صورت کشت باز و گلخانه‌ای بوده که به ترتیب ۲/۲۵ درصد سطح و ۸/۲۵ درصد عملکرد کشور را دارا می‌باشد (Ahmadi et al. 2020). قارچ فوزاریوم یکی از مهم‌ترین جنس‌های بیمارگر گیاهان است که باعث خسارات جدی در گیاهان تیره کدوییان می‌شود. مهم‌ترین بیمارگری که باعث پوسیدگی‌های ریشه و ساقه در کدوییان می‌شود، فوزاریوم است و همچنین

مسئول پژمردگی های آوندی در گروه ملون‌ها (طالبی و کدو) *F. oxysporum* f.sp. *melonis* است. قارچ‌های *F. proliferatum* و *F. solani* f.sp. *cucurbitae* باعث پوسیدگی طوقه و ریشه کدوی تابستانه، طالبی، کدوتنبل و پوسیدگی میوه در کدوتنبل هستند (Namiki et al. 1994; Pivonia et al. 1997). تشخیص سریع و قابل اعتماد عامل بیماری برای انجام اقدامات به‌موقع و مناسب برنامه‌های مدیریت بیماری ضروری می‌باشد. شناسایی ساختار جمعیتی قارچ‌های بیمارگر در فهم زیست‌شناسی موجود و همچنین توسعه راهبردهای کنترل بیماری (Malvick & Percich 1998) و همچنین برای مطالعات مولکولی بین افراد که اجزای تشکیل دهنده‌ی ساختار جمعیت هستند نیز ضروری می‌باشد (Leung et al. 1993). اکنون روش‌های شناسایی پر زحمت و زمانبر سنتی به‌طور روزافزون در حال جایگزین شدن با روش‌های مولکولی غیر وابسته به محیط کشت هستند که بسیار سریعتر، اختصاصی‌تر و حساس‌تر هستند. نشانگرهای مولکولی ثابت کرده‌اند که می‌توانند ابزار مناسبی در تشخیص و ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین و داخل گونه‌ها و جمعیت‌ها باشند. نشان داده شده‌است که نشانگرهای مختلف ممکن است طبقات متفاوتی از تنوع (تغییرات) را نشان دهند. که این امر با بخش ژنومی مورد بررسی توسط هر نشانگر، میزان توزیع آنها در سراسر ژنوم و همچنین مقدار DNA هدف که در این روش خاص مورد آزمایش قرار می‌گیرد، ارتباط دارد (Davila et al. 1999). از میان این روش‌های مولکولی، نشانگرهای بین توالی‌های ساده‌ی تکراری (ISSR)^۱ ابزاری بسیار قوی هستند که می‌توانند جهت دستیابی به تنوع اطراف نواحی ریزماهورهای که در سراسر ژنوم پراکنده هستند، استفاده شوند (Zietkiewicz et al. 1994). تکرارپذیری بیشتر یکی از مزیت‌هایی است که ISSR را نسبت به RAPD بسیار امیدبخش‌تر می‌کند. به‌دلیل استفاده از آغازگرهای بلندتر که امکان استفاده از دمای اتصال بالاتر (۶۰-۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) را فراهم می‌کند منجر به سخت‌گیری بالاتر و افزایش تکرارپذیری آزمایش می‌شود. تنوع بالای موجود در گونه‌ی *F. oxysporum* با پیچیدگی‌های موجود در این گونه مرتبط است (Bayraktar & Dolar 2009). روش‌های مولکولی مانند نواحی بین توالی‌های ساده‌ی تکراری (ISSR) و DNA چندشکلی تکثیر شده‌ی تصادفی (RAPD) در حال حاضر به‌طور گسترده‌ای در مطالعات رده‌بندی قارچ‌ها (Dubey & Singh 2008) بررسی تنوع ژنتیکی عوامل بیماریزای گیاهی مختلف از جمله فوزاریوم مورد استفاده قرار می‌گیرند (Khairy et al. 2016; Katkar et al. 2015; Arif et al. 2008; Arpita et al. 2012; Akbar et al. 2018; Lin et al. 2012; Rakhonde et al. 2017; Shahnazi et al. 2014). این نشانگرها علاوه بر گیاهان در دامنه وسیعی از جانوران، از جمله گاو، گوسفند، بز، ماهی و زنبور عسل برای تعیین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Askari et al. 2010; Ghasemi et al. 2010; Askari et al. 2011; Zamani et al. 2011; Mohammadabadi and Askari 2012; Zamani et al. 2015; Bahador et al. 2016; Mohammadabadi et al. 2017; Mohammadabadi et al. 2021). لذا، هدف از این مطالعه، بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های فوزاریوم بخش‌های *Elegans* و *Martiella-Ventricosum* جدا شده از کدویان استان تهران با استفاده از آغازگرهای ISSR بود.

¹. Inter Simple Sequence Repeat

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ‌ها، خالص‌سازی و شناسایی: در طول فصل زراعی از مناطق عمده‌ی کشت محصولات جالیزی استان

تهران، نمونه‌برداری به عمل آمد. از ریشه، طوقه و ساقه تا ارتفاع ۱۵ سانتی‌متری و همچنین از خاک اطراف گیاه (ریزوسفر تا عمق ۱۰-۲۰ سانتی‌متری و فاصله ۱۵ سانتی‌متری از گیاه)، به‌عنوان نمونه جمع‌آوری شد. از خاک‌های آماده شده به‌نسبت ۱g:۵۰ cc در آب مقطر استریل حاوی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین ۵۰۰ ppm، در ارلن‌های با حجم ۱۰۰ سی‌سی یک سوسپانسیون تهیه‌شد و سپس جهت آزاد شدن بهتر اجزاء قارچی در سوسپانسیون حاصله، ارلن‌ها به‌مدت ۲ ساعت بر روی دستگاه شیکر با دور ۱۵۰ rpm قرار داده شدند. در مورد نمونه‌های ریشه و ساقه نیز، ابتدا آنها را با اسکالپل به‌قطعات ریز چند میلی‌متری برش داده و سپس مانند مرحله بالا مقدار یک گرم از این قطعات به ۵۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد. مقدار یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون‌ها بر روی پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متری حاوی محیط کشت Peptone PCNB Agar (PPA) حاوی ۵۰۰ ppm آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin 500 mg) پخش شد. پلیت‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای 27 ± 2 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس از این مدت در زیر میکروسکوپ تک پرگنه‌های فوزاریوم با سوزن جداسازی شده و به‌یک محیط کشت جدید PPA انتقال داده شدند. خالص‌سازی جدایه‌های قارچی به‌روش تک اسپور کردن انجام شد. جدایه‌های قارچی پس از خالص‌سازی بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی پرگنه (قطر، رنگ، بافت و رنگدانه‌ها و ...) و میکروسکوپی مانند تولید ماکرو و میکروکنیدیوم، نوع فیالیدها، شکل و تعداد سلول‌های ماکرو و میکروکنیدی، شکل، نحوه تشکیل و تعداد سلول‌های کلامیدوسپورها مورد بررسی قرار گرفتند (Leslie & Summerell 2006; Nelson et al. 1983).

تهیه توده میسیلیوم: یک قطعه‌ی ۵ میلی‌متری از حاشیه‌ی پرگنه‌های هفت روزه‌ی قارچ از روی محیط کشت PDA، به

یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط سیب‌زمینی‌دکستروز برات (PDB) منتقل شد. ارلن‌ها به‌مدت سه روز بر روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm در دمای محیط قرار داده شدند. سپس جهت حذف محیط‌کشت اضافی، توده‌ی میسیلیوم حاصله بر روی پارچه‌ی توری استریل با آب مقطر استریل چند بار شست‌وشو داده‌شد و میسیلیوم‌ها جهت آزمایشات بعدی در ویال‌های ۲ میلی‌لیتری نگهداری شدند.

استخراج DNA: DNA ژنومی قارچ‌ها بر اساس روش González et al. (2010) استخراج شد. بدین نحو که ابتدا

میکروتیوب‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس قسمت رویی (سوپرناتانت) دور ریخته شد و به‌قسمت ته‌نشین شده (پلت) مقدار ۰/۵ mL از بافر استخراج [SDS 3% w/v, EDTA 0.5 mM, NaCl 1 M, Tris-HCl 0.1 mM pH:8] داغ (۶۵ °C) اضافه شد و با عمل برگرداندن متناوب کاملاً یکنواخت شدند. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم (۶۵ °C) قرار داده‌شدند مجدداً با آرام برگرداندن متناوب (صد مرتبه) محتویات آنها مخلوط شده و سپس ۰/۴ mL از مخلوط کلروفرم/فنول (۱:۱ v/v) به آنها اضافه شد. با عمل برگرداندن میکرو تیوپ‌ها مخلوط شده و سپس

به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. محتویات ویال‌ها سه فاز شده که فاز رویی حاوی DNA می‌باشد. فاز رویی (۰/۸ mL) به یک ویال جدید انتقال داده شد و ۰/۸ mL پروپانول خنک در حد یخ به آن اضافه شد. پس از یکنواخت کردن محتویات میکروتیوب‌ها با عمل برگرداندن متناوب، به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. (به منظور رسوب بیشتر DNA، بهتر است قبل از انجام این سانتریفیوژ، ویال‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای -20°C نگهداری شوند). پس از سانتریفیوژ، ایزوپروپانول رویی با دقت و به آرامی کشیده شد و ۱ ml اتانول ۷۵٪ به DNA رسوب شده در ته ویال‌ها اضافه شد و با عمل برگرداندن متناوب DNA رسوب شده کاملاً شسته شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی با دقت و با کج کردن آرام تیوب‌ها دور ریخته شد تا پلت DNA در ته تیوب باقی بماند. سپس در معرض هوا (حدود ۳۰ دقیقه) خشک گردید. به پلت DNA کاملاً خشک شده $50\ \mu\text{L}$ از بافر [0.122 w/v Tris-Base pH:8 10mM, %0.02 w/v EDTA 1mM] اضافه شد و اجازه داد تا DNA کاملاً در آن حل شده و سپس در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از دستگاه اسپکتروفوتومتر جهت بررسی کیفیت و غلظت DNA ژنومی استفاده شد (González et al. 2010).

طراحی پرایمرها: تعداد پنج آغازگر که بر اساس مطالعات انجام شده توسط سایر محققین بر روی گونه‌های مختلف فوزاریوم، بیشترین تکثیرهای پایدار، باندهای جداگانه و چندشکلی‌های بهتری را ارائه داده بودند، جهت انجام این آزمایش‌ها انتخاب شد (Khairy et al. 2016; Arpita et al. 2012; Katkar et al. 2015; Shahnazi et al. 2014; Thangavelu et al. 2012).

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های ISSR-PCR

Table 1. Characteristics of primers used in ISSR-PCR reactions

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'-3')	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
Primer name	Primer sequences	Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)
UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	51
UBC-809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	51
UBC-856	ACACACACACACACACYA	53.7
UBC-864	ATGATGATGATGATGATG	49
UBC-885	BHBGAGAGAGAGAGAGA	53.4

B= C,G or T / H= A,C or T / Y= C ,T

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): تکثیرها در یک واکنش با حجم $25\ \mu\text{L}$ ، حاوی $10\ \mu\text{L}$ ماستر میکس (2X، SinaclonTM)، $1\ \mu\text{L}$ از هر پرایمر (0.5 μM)، $3\ \mu\text{L}$ از DNA الگو و $11\ \mu\text{L}$ آب مقطر مناسب PCR انجام شد. ویال‌های حاوی مخلوط واکنش در دستگاه PCR (Bioer®) قرار داده شدند. مراحل واکنش PCR بدین نحو انجام شد: واسرشته‌سازی اول

به مدت ۵ دقیقه در دمای °C ۹۴، سپس ۳۵ چرخه از سه مرحله‌ی واسرشته سازی دوم به مدت ۱ دقیقه در دمای °C ۹۴، اتصال پرایمرها به مدت ۱ دقیقه در دمای مورد نظر برای هر آغازگر (جدول ۱) و بسط رشته‌ها به مدت ۱ دقیقه در دمای °C ۷۲. و در نهایت ۱۰ دقیقه در بسط نهایی در دمای °C ۷۲ انجام شد (Khairy et al. 2016). جهت بررسی قطعات ژنومی تکثیری احتمالی، محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی DNA Safe Stain (Sinaclon™) (۱/۵ μL در ۱۰۰ mL ژل) در دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت و مقاومت ۱۰۰ میلی آمپر به مدت ۳۰ دقیقه بارگذاری شد. سپس جهت آشکار سازی باندها، ژل‌ها بر روی دستگاه ژل داکيومنت با نور UV و شدت نور ۳۲۰ قرار داده شدند. جهت بررسی اندازه‌ی مولکولی قطعات تکثیر شده، با استفاده از نرم‌افزار Digimizer®، بر اساس منحنی استاندارد بدست آمده از حرکت هر باند در مقابل لگاریتم اندازه مولکولی آن باند از خط‌کش مولکولی 1 Kb، طول قطعات ژنومی تکثیر شده، محاسبه شد. قطعاتی که بر روی ژل آگارز، فاصله یکسانی را طی کرده بودند به‌عنوان یک باند مشترک در نظر گرفته شدند. یک ماتریکس داده از وجود (۱) یا عدم وجود (۰) هر باند برای هر جدایه در نرم‌افزار Excel 2007 ترسیم شد.

تجزیه داده‌ها: جهت تجزیه و تحلیل روابط داخل گونه‌های *Fusarium* از نرم‌افزار NTSYS-PC V2.02 استفاده شد. در برنامه‌ی SIMQUAL جهت محاسبه‌ی شباهت از ضریب SM استفاده شد. جهت رسم دندوگرام از ماتریکس‌های شباهت حاصله، از روش UPGMA استفاده شد. جهت بررسی میزان کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، آماره‌های محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها (PIC^۲) شاخص نشانگری (MI^۳) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR^۴) محاسبه شد. مقدار PIC از رابطه‌ی (۱) می‌شود:

$$PIC = 1 - (p^2 + q^2) \quad \text{رابطه (۱)}$$

در این رابطه: P_i = فراوانی الل i ام (حضور باند) و q_i فراوانی عدم وجود باند (نبود باند) است و PIC نهایی آغازگر، میانگین همی این PIC ها خواهد بود (Lemos et al. 2019). فاکتور نسبت چندگانه مؤثر (EMR) که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در مجموعه ژرمپلاسما مورد مطالعه است بر حسب رابطه‌ی $EMR = n_p \times \beta$ محاسبه شد. که در این رابطه n_p تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل و β از رابطه‌ی $\beta = n_p / (n_p + n_{np})$ به دست می‌آید. n_p تعداد باندهای چندشکل و n_{np} تعداد باندهای غیر چندشکل (یک‌شکل^۵) می‌باشد (Karimi et al. 2010). شاخص نشانگری (MI) که می‌تواند به‌عنوان شاخصی در برآورد کارایی یک نشانگر در یک توده‌ی ژنتیکی استفاده شود، از رابطه‌ی زیر به‌دست آمد (Chesnokov & Artemyeva 2015).

$$MI = PIC \times EMR \quad \text{رابطه (۲)}$$

1. Polymorphism Information Content

2. Marker Index

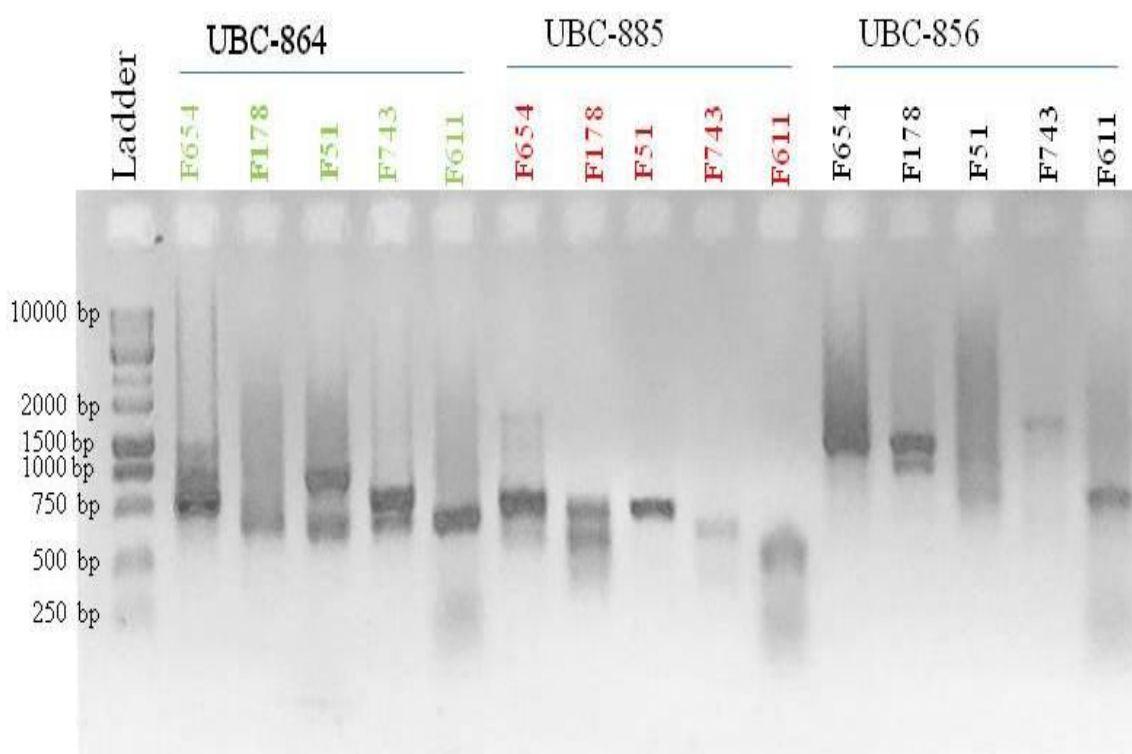
3. Effective Multiplex Ratio

5. Monomorph

جهت ارزیابی میزان شباهت درخت‌واره‌های به‌دست‌آمده از آغازگرهای مختلف از آزمون مانتل استفاده شد (Rakhonde et al. 2017).

نتایج و بحث

شناسایی مورفولوژیک جدایه‌های قارچی: از مجموع ۹۶ جدایه، تعداد ۴۸ جدایه به‌عنوان *Fusarium solani*، تعداد ۲۵ جدایه به‌عنوان *F. oxysporum* و تعداد ۲۳ جدایه به‌عنوان *F. redolens* تشخیص داده شدند. از تکثیرهای ISSR ۹۶ جدایه از فوزاریوم با استفاده از ۵ آغازگر $(ATG)_6$, $(AC)_8YA$, $(AG)_8G$, $(AG)_8C$ و $BHB(GA)_7$ مجموعاً ۴۰۸ باند به‌دست آمد. تعداد ۱۳۰ نوع باند متفاوت تولید شد که از این تعداد، ۸۳ باند پلی‌مورفیک و ۴۷ باند مونومورفیک بود. (باند‌هایی که فقط در یک جدایه‌ی قارچی تولید شده بودند به‌عنوان مونومورف یا یک‌شکل لحاظ شدند). اندازه‌ی قطعات PCR تولید شده از ۲۷۳ تا ۲۴۲۸ جفت‌باز متغیر بود. میانگین جایگاه ژنی چندشکل به ازای هر آغازگر معادل ۱۶/۶ باند بود. از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر UBC-808 با تعداد ۱۱۱ باند و بعد از آن آغازگر UBC-809 با تعداد ۸۹ باند بیشترین تولید باند و آغازگر UBC-856 با تعداد ۴۶ باند کمترین تولید باند را داشتند (جدول ۲). بیشترین تنوع باند برای آغازگر UBC-808 با ۳۲ باند و سپس UBC-885 با ۲۹ باند و کمترین تنوع باند برای آغازگر UBC-856 با ۲۰ باند بود. همچنین بیشترین باند چندشکل برای آغازگر UBC885 با ۱۹ باند و سپس UBC-808 با ۱۸ باند و کمترین باند چندشکل برای آغازگر UBC856 با ۱۳ باند بود. درصد چندشکلی به‌دست‌آمده از بیشترین (۷۳ درصد) برای UBC-864 تا کمترین (۵۶ درصد) برای UBC808 متغیر بود. در این پژوهش در مجموع ۱۳۰ باند مختلف با ۶۴ درصد چندشکلی تولید شد (۸۳ باند). محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و همچنین شاخص نشانگری (MI) برای هر یک از آغازگرها محاسبه و در جدول شماره ۲ ارائه شد. محتوای اطلاعات چندشکل در این تحقیق بین ۰/۰۵ تا ۰/۰۸ متغیر بود و بالاترین میزان PIC برای آغازگر UBC-864 به‌میزان ۰/۰۸ و کمترین میزان PIC برای آغازگر UBC-856 به‌مقدار ۰/۰۵ بود. هرچه این آماره بیشتر باشد بهتر می‌تواند تفاوت ژنوتیپ‌ها را نشان دهد. بیشترین میزان EMR مربوط به آغازگر UBC-885 (۱۲/۴۵) و کمترین برای آغازگر UBC-856 (۸/۴۵) بود. بیشترین میزان MI مربوط به آغازگر UBC-864 (۰/۸۷) و کمترین میزان MI برای آغازگر UBC-856 (۰/۳۹) بود. بررسی کارایی آغازگرها در مقایسات جداگانه درون هر بخش نشان داد که بیشترین باند چندشکل در جدایه‌های مربوط به بخش *Elegans* توسط آغازگر UBC-808، (۱۴ باند) و کمترین توسط UBC-856 با تولید ۷ باند بود. بهترین شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانگی مؤثر (EMR) باز هم مربوط به آغازگر UBC-808 (به‌ترتیب، ۰/۶۶ و ۷/۵۳) بود (جدول ۳).



شکل ۱. الگوی باندهای حاصل از ISSR-PCR برخی جدایه‌های *Fusarium* 1Kb Ladder خط کش مولکولی، F654، F178، F51، F743 و F611 جدایه‌های قارچ، UBC-864((ATG)₆), UBC-885(BHB(GA)₇) و UBC-856((AC)₈YA) آغازگرهای ISSR

Figure 1. ISSR-PCR banding pattern. DNA Ladder 1Kb. F654, F178, F51, F743, F611 *Fusarium* isolates. UBC-864((ATG)₆), UBC-885(BHB(GA)₇), UBC-856((AC)₈YA), primers

در جدایه‌های مربوط به بخش‌های *Martiella-Ventricosum* بیشترین چندشکلی توسط آغازگر UBC-809 با ۶۴ درصد و کمترین توسط آغازگر UBC-864 با ۴۷ درصد بود (جدول ۴). ارزیابی میزان شباهت درخت‌واره‌های حاصل از دندوگرام‌ها بر اساس آزمون ماتیل نشان داد که درخت‌واره مورفولوژیک بیشترین شباهت را با آغازگر UBC-864 به میزان ۵۳ درصد و کمترین شباهت را با درخت‌واره حاصل از آغازگر UBC-808 به میزان ۳۱ درصد داشت (جدول ۵). روش خوشه‌بندی UPGMA جهت تخمین روابط خویشاوندی بین جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. درخت‌واره حاصله از تجزیه و تحلیل خوشه‌ی UPGMA بر اساس ضریب شباهت SM، حاصل از مجموع پنج آغازگر گروه‌بندی مشخصی که بتواند جدایه‌های هر سه گونه را در سه گروه مجزا دسته‌بندی کند، تولید نکرد (شکل ۲). روش خوشه‌بندی UPGMA جهت تخمین روابط خویشاوندی بین جدایه‌های هر بخش مورد استفاده قرار گرفت. درخت‌واره حاصله از تجزیه و تحلیل خوشه‌ی UPGMA بر اساس ضریب شباهت SM، در بخش *Elegans*

در سطح تشابه ۹۸ درصد یک گروه بزرگ تولید کرد که اغلب جدایه‌های *F. oxysporum* را شامل می‌شد. و یک گروه از *F. redolens* (۸ جدایه) با سطح تشابه ۹۱ تا ۹۵ درصد با جدایه‌های *F. oxysporum* در گروه دیگر قرار گرفتند و بقیه جدایه‌ها (۱۵ جدایه) بدون گروه‌بندی خاصی در شاخه‌های مختلف قرار گرفتند (شکل ۳).

جدول ۲. ویژگی باند‌های تکثیر شده و میزان شاخص‌های PIC, EMR و MI برای هر یک از آغازگرهای

ISSR برای ۹۶ جدایه *Fusarium*

Table 2. Characteristics of amplified bands. PIC, EMR and MI indices for each of the ISSR primers for 96 *Fusarium* isolates

نام آغازگر Primer name	مجموع باند‌های تکثیر شده Total bands	اندازه باند‌ها (bp) Band length (bp)		تعداد جایگاه ژنی Number of alleles	تعداد جایگاه ژنی Number of polymorphic alleles	درصد چندشکلی Polymorphism (%)	PIC	EMR	MI
		Min.	Max.						
UBC-808	111	273	2420	32	18	56	0.07	10.13	0.69
UBC-809	89	362	2420	27	17	63	0.07	10.70	0.70
UBC-856	46	566	2182	20	13	65	0.05	8.45	0.39
UBC-864	85	495	1729	22	16	73	0.08	11.64	0.87
UBC-885	77	325	1654	29	19	66	0.05	12.45	0.66

جدول ۳. ویژگی باند‌های تکثیر شده و میزان شاخص‌های PIC, EMR و MI برای هر یک از آغازگرهای

ISSR در ۴۸ جدایه متعلق به گونه‌های *Fusarium redolens* و *Fusarium oxysporum*

Table 3. Characteristics of amplified bands. PIC, EMR and MI indices for each of the ISSR primers for 48 isolates of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium redolens*

نام آغازگر Primer name	مجموع باند‌های تکثیر شده Total bands	تعداد جایگاه ژنی Number of alleles	تعداد جایگاه ژنی Number of polymorphic alleles	درصد چندشکلی Polymorphism (%)	PIC	EMR	MI
UBC-809	38	20	8	40	0.07	3.20	0.24
UBC-856	24	14	7	50	0.07	3.50	0.24
UBC-864	44	16	10	63	0.10	6.25	0.66
UBC-885	28	14	9	64	0.08	5.78	0.46

جدول ۴. ویژگی باندهای تکثیر شده و میزان شاخص‌های PIC, EMR و MI برای هر یک از آغازگرهای

ISSR در ۴۸ جدایه متعلق به گونه‌ی *Fusarium solani*

Table 4. Characteristics of amplified bands. PIC, EMR and MI indices for each of the ISSR primers for 48 isolates of *Fusarium solani*

نام آغازگر Primer name	مجموع باندهای تکثیر شده Total bands	تعداد جایگاه ژنی Number of alleles	تعداد جایگاه ژنی چندشکل Number of polymorphic alleles	درصد چندشکلی Polymorphism (%)	PIC	EMR	MI
UBC-809	51	22	14	64	0.10	8.9	0.80
UBC-856	22	12	7	58	0.07	4.1	0.30
UBC-864	41	19	9	47	0.07	4.3	0.35
UBC-885	47	25	13	52	0.07	6.76	0.50

جدول ۵. میزان شباهت بین درخت‌واره‌های به‌دست آمده از آغازگرهای مختلف و درخت‌واره مورفولوژیک بر

اساس آزمون مانتل

Table 5. The similarity between the phylogenetic trees obtained from different primers and the morphological tree based on Mantel's test

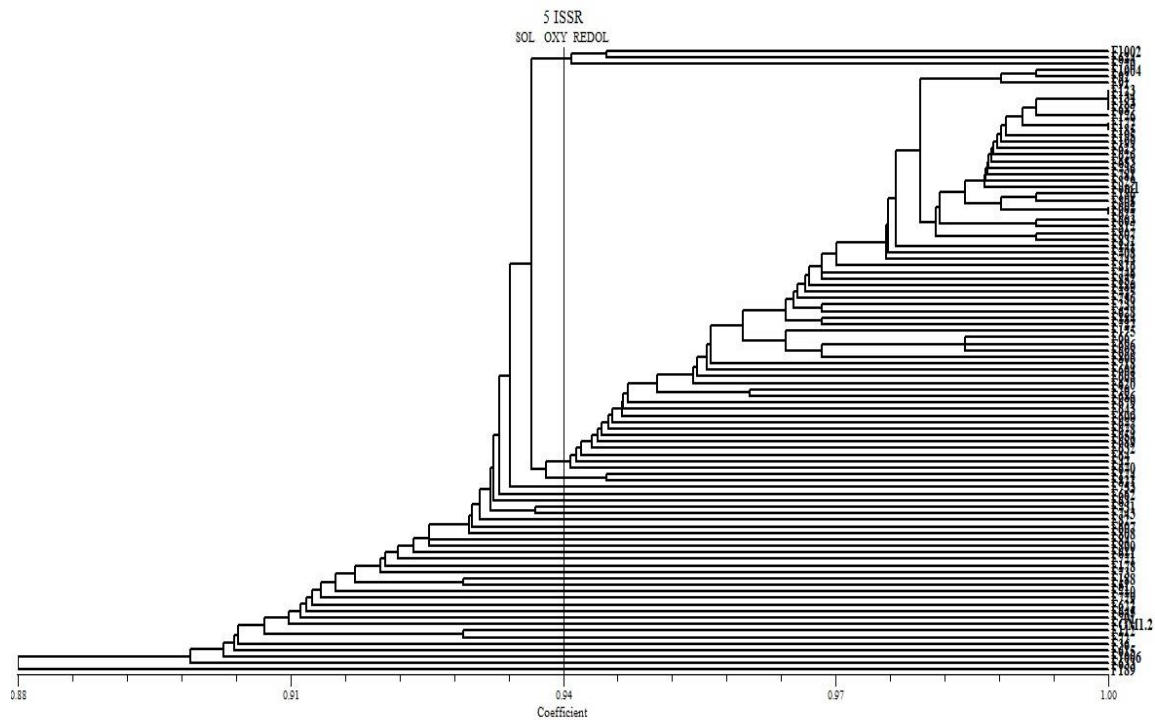
	UBC-808	UBC-809	UBC-856	UBC-864	UBC-885	Morphology
UBC-808	----					
UBC-809	0.58136	----				
UBC-856	0.27266	0.30202	----			
UBC-864	0.43978	0.55413	0.47771	----		
UBC-885	0.39571	0.47619	0.45821	0.54640	----	
Morphology	0.31141	0.38186	0.37948	0.53393	0.47917	----

درخت‌واره حاصله از تجزیه و تحلیل خوشه‌ی UPGMA بر اساس ضریب شباهت SM، در بخش *Martiella*-

Ventricosum در سطح تشابه ۸۹ درصد به دو گروه تقسیم شد. یک گروه بزرگ (۴۳ جدایه) و یک گروه با تک جدایه F112. در

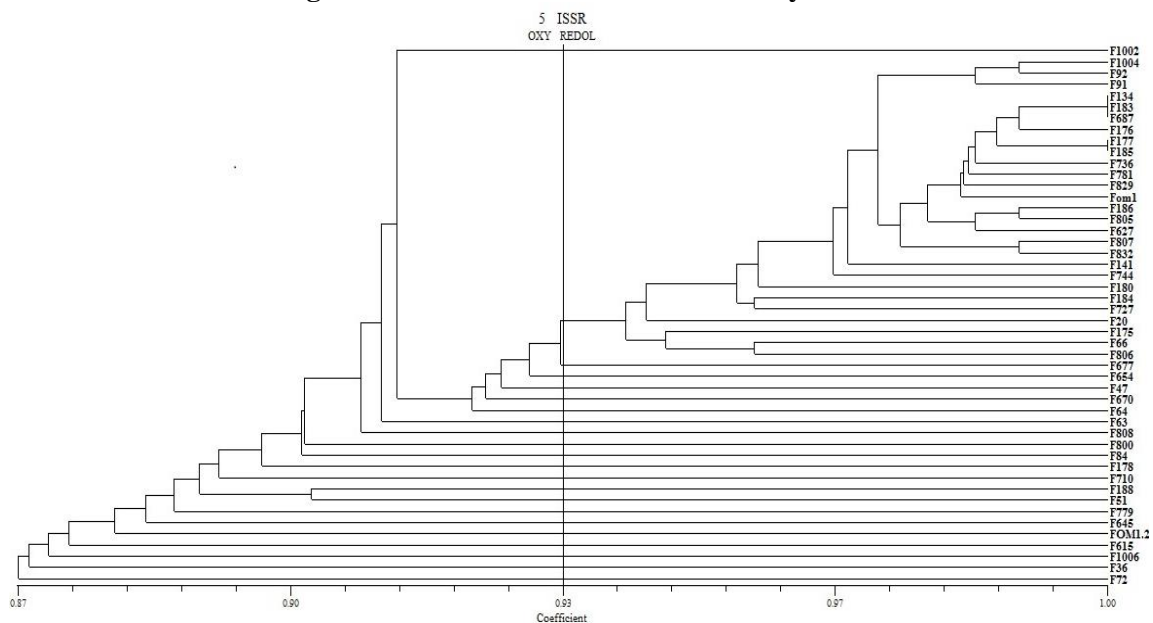
گروه بزرگ، ضریب تشابه از ۸۹ تا ۹۹ درصد متغیر بود. چهار جدایه‌ی F189, F633, F791 و F622 هر کدام با ضریب تشابه‌های

کمتر در گروه‌های مجزا از هم قرار گرفتند.



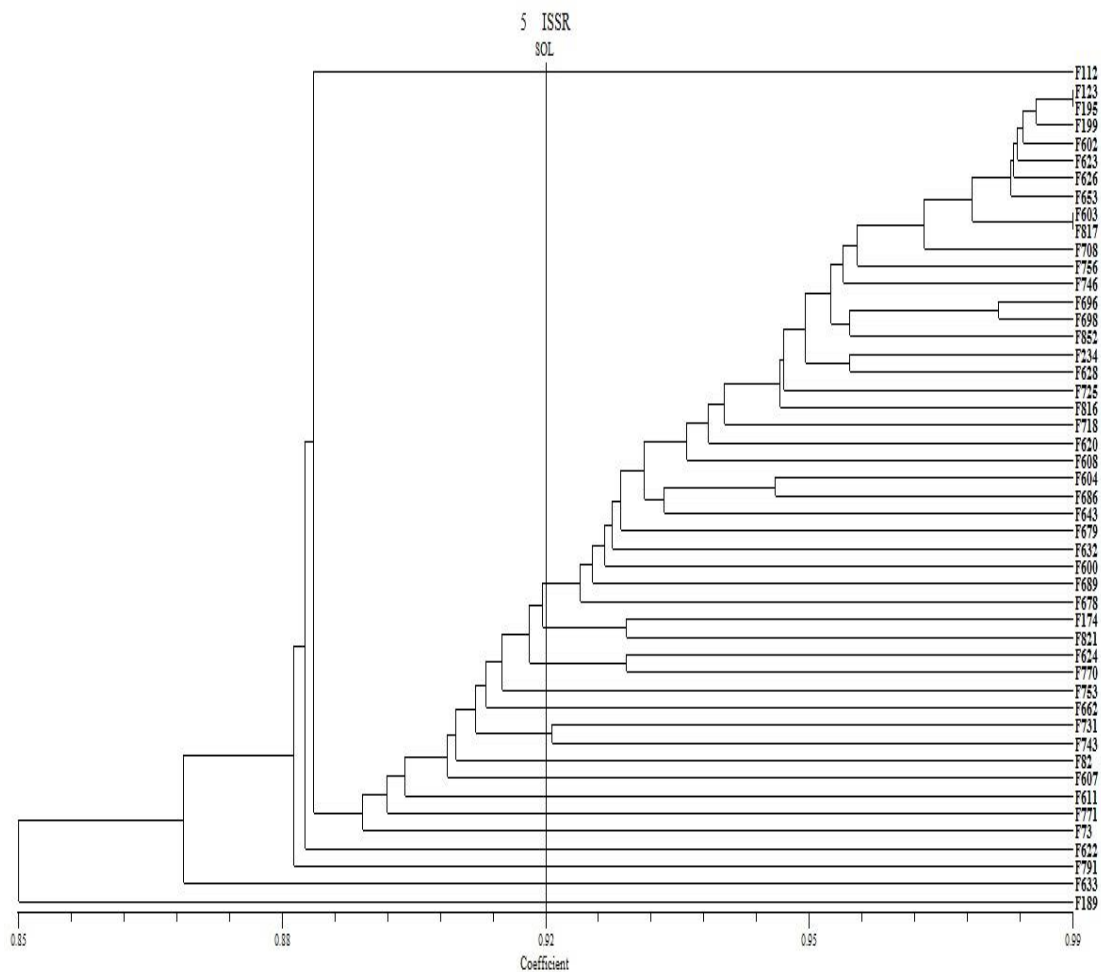
شکل ۲. درختواره حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA برای ۹۶ جدایه از قارچهای *Fusarium solani* و *Fusarium oxysporum* و *Fusarium redolens* با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه SM

Figure 2. UPGMA Dendrogram of 96 isolates of *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium redolens* using ISSR markers based on SM similarity coefficient



شکل ۳. دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA برای جدایه‌های متعلق به گونه‌های *Fusarium oxysporum* و *Fusarium redolens* با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه SM

Figure 3. UPGMA Dendrogram of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium redolens* isolates using ISSR markers based on SM similarity coefficient



شکل ۴. دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA برای جدایه‌های متعلق به بخش *Martiella-Ventricosum*

با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه SM

Figure 4. UPGMA Dendrogram of *Fusarium* isolates belonging to *Martiella-Ventricosum* section using ISSR markers based on SM similarity coefficient

فوزاریوم‌ها از مهمترین عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند که باعث خسارات جدی به کدویان می‌شوند و مسئول پوسیدگی‌های طوقه و ریشه در ملون‌ها می‌باشند. گونه‌های فوزاریوم مسئول پوسیدگی‌های قبل و بعد از برداشت در میوه‌های کدویان می‌باشند. دانستن تنوع ژنتیکی جدایه‌های فوزاریوم جهت طرح‌ریزی و توسعه راهبردهای مؤثر و بلندمدت مدیریت بیماری شامل ارقام مقاوم و همچنین توسعه نشانگرهای مولکولی اختصاصی برای فرم‌های بیماری‌زای قارچ ضروری می‌باشد (Thangavelu et al. 2012). نشانگرهای ISSR جهت مطالعه ژنتیک جمعیت یوکاریوت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند و اطلاعات ژنتیکی مهمی در جهت حل ویژگی‌های مهم ژنتیکی و تکاملی در قارچ‌ها ارائه کرده‌اند (Mishra et al. 2003). در این آزمایشات از پنج آغازگر

PCR، تمامی پنج آغازگر BHB(GA)₇ و (AG)₈C, (AG)₈G, (AC)₈YA, (ATG)₆ در طول آزمایشات، باند‌هایی پایدار و قابل تکرار تولید کردند. آغازگرهای (ATG)₆ و BHB(GA)₇ در تفکیک بخش‌های *Elegans* و *Martiella-Ventricosum* از همدیگر نتیجه‌ی بهتر و واقعی‌تری داشتند به طوری که بیشترین تولید باند را در گونه‌های متعلق به *F. solani* داشتند و این نتایج با یافته‌های محققین دیگر مطابقت داشت (Shahnazi et al. 2014). آغازگر (BHB(GA)₇) UBC-885 با تولید ۲۵ باند بیشترین تولید باند را در مورد *F. solani* داشت که با یافته‌های (Shahnazi et al. 2014) مطابقت داشت. ولی مجموع پنج آغازگر توانایی تفکیک گونه‌های متعلق به این بخش‌ها را در گروه‌های مختلف از خود نشان ندادند به همین دلیل در تفکیک گونه‌های مختلف باید از آغازگرهایی با تولید باندهای مشخص یا عدم تولید باند در یک گونه و تولید باند در گونه‌ی دیگر استفاده کرد. مجموع پنج آغازگر توانایی تفکیک و تمایز داخل گونه‌ای خوبی از خود نشان دادند. در بخش *Elegans* جدایه‌های مرتبط با *F. oxysporum* و *F. redolens* تقریباً از هم جداگانه گروه‌بندی شدند. تنوع درون گونه‌ای *F. redolens* بسیار بیشتر از *F. oxysporum* بود. نکته دیگر اینکه برخی جدایه‌هایی که به نام *F. oxysporum* شناسایی شده بودند از جمله *F. o. melonis* race 1.2 (FOM1.2) در گروه *F. redolens* قرار گرفتند.

در بخش *Martiella-Ventricosum* تنوع بسیار بالا مشاهده شد. جدایه F112 به تنهایی در یک گروه جداگانه قرار داشت. این جدایه با داشتن میسلیوم پرپشت، سفید پنبه‌ای روشن و رشد سریع از دیگر جدایه‌های *F. solani* متمایز بود. جدایه F189 با کمترین تشابه (۸۵ درصد) از سایر اعضاء، به صورت یک عضو جدا از گروه دیده می‌شود. این جدایه از لحاظ ریخت شناسی ماکرو و میکروکنیدیوم، *F. solani* تشخیص داده شد ولی از لحاظ تولید رنگدانه در محیط و تغییر رنگ محیط کشت به رنگ صورتی شبیه به *F. oxysporum* بود و در این گروه‌بندی کاملاً جدا از دیگر جدایه‌ها قرار گرفته است. وجود تنوع بالا در بین جدایه‌های *F. solani* با نتایج دیگر محققان مطابقت داشت (Shahnazi et al. 2014). فقدان تنوع ژنتیکی، توان یک گونه‌ی خاص را در زنده‌مانی در برابر تغییرات زیست‌محیطی کاهش می‌دهد (Cao 2006). در گونه‌های فوزاریوم مشابه آنچه دیگر محققین ذکر کرده‌اند تنوع ژنتیکی در سطح گونه و جمعیت بالا است (Shahnazi et al. 2014; Dinolfo et al. 2010; Mishra et al. 2006; Nagarajan et al. 2004). قرار گرفتن جدایه‌هایی با شکل شناسی یکسان، در گروه‌های مولکولی مختلف بیانگر این مطلب است که شکل شناسی تنها، شاخصی مطمئن برای تفکیک کامل جدایه‌ها از همدیگر نمی‌باشد (Rabbaninasab et al. 2013). اگرچه نشانگرهای مولکولی ابزاری مفید برای اهداف تاکسونومیک است، اما کاربرد آن‌ها در کشاورزی زمانی مفیدتر است که با دیگر شاخص‌های بیولوژیکی مانند آزمون بیماری‌زایی و یا ژنتیکی مانند آزمون سازگاری ریشی همراه باشد (Rabbaninasab et al. 2013). در این تحقیق رابطه‌ی خاصی بین جدایه‌های مربوط به هر منطقه جغرافیایی مشاهده نشد و هر جدایه در گروه‌بندی مستقل از دیگر جدایه همان منطقه بود. از این رو می‌توان این فرضیه را پیشنهاد کرد که جدایه‌های هر منطقه از لحاظ ژنتیکی تفاوت‌هایی با همدیگر دارند (Shahnazi et al. 2014; Lak et al. 2018; Khairy et al. 2016). و علت این امر را نیز می‌توان به کشت طولانی مدت صیفی‌جات در این مناطق و تنوع کشت و کاشت گیاهان میزبان متفاوت و حساس به پژمردگی‌های فوزاریومی

مانند خربزه، طالبی، ارقام مختلف ملون، خیار، گوجه و بادمجان نسبت داد. بیشترین آلودگی قارچی فوزاریومی در منطقه جوادآباد دیده شد. که علت آن را می‌توان سطح زیر کشت بالای صیفی‌جات از جمله طالبی در این منطقه دانست. بیشترین فراوانی گونه‌های فوزاریوم مورد بررسی متعلق به گونه‌ی *F. solani* روی گیاه طالبی و کدو بود و همچنین روی گیاه خربزه بیشترین فراوانی مربوط به قارچ *F. oxysporum* و گونه‌ی *F. redolens* نیز بیشترین فراوانی را بر روی خیار گلخانه‌ای و سپس گیاه خربزه داشت.

نتیجه‌گیری: ما معتقدیم که این مطالعه، یک دستاورد روبه‌جلو در جهت توسعه نشانگرهای ساده و کارآمد برای تشخیص و کمی‌سازی جمعیت‌های این عوامل بیماری‌زا در کشت گیاهان جالیزی فراهم می‌کند. در مطالعات آینده، قطعات تکثیر شده که امکان تمایز را فراهم کرده‌اند با استفاده از توالی‌یابی و مقایسه آنها با پایگاه‌های داده ژن، می‌توانند تنوع و قابلیت‌های زیستی بیمارگر را بیشتر تفسیر کنند. شایان ذکر است که با توجه به اطلاعات کم و یا پراکندگی اطلاعات موجود در مورد این عوامل بیماری‌زا، بنابراین انجام تحقیقات گسترده، روش‌های سریع و دقیق تشخیص عامل بیماری جهت دستیابی به مدیریت بیماری بسیار ضروری به نظر می‌رسد. نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در میان جدایه‌های فوزاریوم مورد بررسی وجود داشت و این که نشانگر ISSR یک نشانگر کارآمد جهت آشکارسازی روابط مولکولی بین توده‌ها و جدایه‌های قارچ فوزاریوم، می‌باشد.

سپاسگزاری: از مسئولین آزمایشگاه بیماری‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، جهت همکاری صمیمانه‌اشان در انجام گرفتن برخی آزمایش‌ها، از جناب آقای مهندس داریوش شهریار- مرکز تحقیقات کشاورزی ورامین- جهت دریافت جدایه‌های فوزاریوم FOM1 و FOM1.2 و همچنین از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ارزشمند ساختاری و علمی سپاسگزاری ویژه به عمل می‌آید.

منابع

- احمدی کریم، عبادزاده حمیدرضا، حاتمی فرشاد و همکاران (۱۳۹۹) آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۹۸-۱۳۹۷، جلد اول، محصولات زراعی. ۸۹ صفحه.
- بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین، و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهش‌های تولیدات دامی، ۱۳، ۱۹۲-۱۸۶.
- خیری فاطمه، رهنما کامران و یامچی احد (۱۳۹۵) بررسی تنوع ژنتیکی در قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* با استفاده از سازگاری رویشی و نشانگرهای ISSR. ژنتیک نوین، ۱، ۵۵-۴۵.
- ربانی نسب حجت‌الله، سروری سعید و بخشی خانیکی غلامرضا (۱۳۹۲) تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* در استان خراسان رضوی با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP. زیست‌شناسی ایران، ۱، صفحه ۲۷-۱۸.

- کریمی الهام، صفایی ناصر و شمس‌بخش مسعود (۱۳۸۹) بررسی چندشکلی DNA بین گروه‌های سازگاری میسیلیومی *Sclerotinia sclerotiorum* با نشانگر ISSR. بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲، ۵۵-۴۱.
- عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین، ۵، ۵۶-۴۹.
- لک فرزانه، سرپله ابوالفضل و شهریاری داریوش (۱۳۹۷) بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* عامل پژمردگی طالبی و خربزه در ایران. پژوهش‌های کاربردی در گیاهپزشکی، ۱، ۸۳-۶۹.

References

- Ahmadi K, Ebadzadeh HR, Hatami F (2020) Agricultural Statistics. Crop year. 1397-98. Ministry of Agriculture, Deputy of Planning and Economy Volume 1, pp. 87 (In Persian).
- Akbar A, Hussain S, Ullah K et al. (2018) Detection, virulence and genetic diversity of *Fusarium* species infecting tomato in Northern Pakistan PLoS ONE 13(9), 1-21.
- Arif M, Zaidi NW, Rizwanul Haq QM, Singh US (2008) Genetic variability within *Fusarium solani* as revealed by PCR- fingerprinting based on ISSR markers. Indian Phytopathol 61 (3), 305-310.
- Arpita D, Venkataramana M, Chandranayaka S et al. (2012) Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates from banana. Pest Manage Horticult Ecsyst 18(2), 171-178.
- Askari N, A Baghizadeh, MR Mohammadabadi (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 5 (2), 49-56 (In Persian).
- Askari N, Mohammad Abadi MR, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iran J Biotechnol 9, 222-229.
- Bahador Y, MR Mohammadabadi, A Khezri, et al. (2016) Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. Res Anim Prod 7 (13), 186-192 (In Persian).
- Bayraktar H, Dolar FS (2009) Genetic Diversity of Wilt and Root Rot Pathogens of Chickpea, as Assessed by RAPD and ISSR. Turk J Agric For 33, 1-10.
- Cao PJ, Yao QF, Ding BY et al. (2006) Genetic diversity of *Sinojackia dolichocarpa* (Styracaceae), a species endangered and endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). Biochem Syst Ecol 34, 231- 239.
- Chesnokov YuV, Artemyeva AM (2015) Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. Agric Biol 50(5), 571-578.

- Davila JA, Loarce Y, Ferrer E (1999) Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley. *Theor Appl Genet* 98, 265-273.
- Dinolfo MI, Stenglein SA, Moreno MV et al. (2010) ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *Eur J Plant Pathol* 127, 483-491.
- Dubey SC, Singh SR (2008) Virulence analysis and oligonucleotide fingerprinting to detect diversity among Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. *Mycopathology* 165, 389-406.
- Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Aust J Basic Appl Sci* 4, 5758-5760.
- González Mendoza D, Argumedo-Delira R, Morales-Trejo A et al. (2010) A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. *Genet Mol Res* 9 (1), 162-166.
- Karimi E, Safaie N, Shamsbakhsh M (2010) DNA polymorphism among mycelial compatibility groups of *Sclerotinia sclerotiorum* using ISSR marker. *J Agric Biotech* 2, 41-55 (In Persian).
- Katkar M, Mane SS, Kadam N (2015) Molecular characterization races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* using RAPD and ISSR markers. *Legume Res* 38 (2), 246-252.
- Khairy F, Rahnema K, Yamchi A (2016). Study of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* based on VCG groups and ISSR marker. *J Mod Genet* 11(1), 45-55 (In Persian).
- Lak F, Sarpeleh A, Shahriyari D (2018) Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Isolates, The Causal Agent of Cantaloupe and Muskmelon Wilt in Iran. *Appl res plant pathol* 7(1), 69-83 (In Persian).
- Lemos SCM, Lia Rejane Silveira R, Karol Buuron S et al. (2019) Determining the Polymorphism Information Content of a Molecular Marker. *Gene* 2019, e144175.
- Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. UK, Blackwell Publish Ltd. pp. 388.
- Leung H, Nelson RJ, Leach JE (1993) Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. In: Andrews, J.H., Tomm-erup, I.C. (Eds.), *Advances in Plant Pathology*. Academic Press, London. pp. 157-204.
- Lin Y, Fuping L, Shanshan L et al. (2012) ISSR analysis of *Fusarium oxysporum* Schl. in Hebei province. *Procedia Environ Sci* 12, 1237-1242.

- Malvick DK, Percich JA (1998) Genotypic and pathogenic diversity among pea-infecting isolates of *Aphanomyces euteiches* from the central and western United States. *Phytopathol* 88, 915–921.
- Mishra PK, Fox RTV, Culham A (2003) Intersimple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Ann Appl Biol* 143, 291-301.
- Mishra PK, Tewari JP, Clear RM, Turkington TK (2006) Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada. *Int Microbiol* 9, 65-68.
- Mohammadabadi MR, Askari N (2012) Characterization of Genetic structure using ISSR-PCR markers: cattle, goat and sheep populations. LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrusken, Germany, 120pp.
- Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. *J Res Develop* 5 (2), e154.
- Mohammadabadi MR, Oleshko V, Oleshko O, et al. (2021) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Guppy Fish. *Turk J Fish Aquatic Sci* 21 (12), 603-613.
- Nagarajan G, Nam MH, Song JY et al. (2004) Genetic Variation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* populations based on RAPD and rDNA RFLP analyses. *J Plant Pathol* 20(4), 264-270.
- Namiki F, Shiomi T, Kayamura T, Tsuge T. (1994) Characterization of the Formae Speciales of *Fusarium oxysporum* Causing Wilts of Cucurbits by DNA Fingerprinting with Nuclear Repetitive DNA Sequences. *Appl Environ Microbiol* 60, 2684-2691.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Philadelphia. Pp. 193.
- Pivonia S, Cohen R, Kafkafi U et al. (1997) sudden wilt of melons in southern Israel: fungal agents and relationship with plant development. *Plant Dis* 81, 1264–1268.
- Rabbaninasab H, Sarvary S, Bakhshi khaniki Gh (2013) Determination of genetic variability of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* isolates in Khorasan Razavi province by AFLP molecular marker. *J Iran Biol* 26, 18-27 (In Persian).
- Rakhonde PN, Mane SS, Gawande AD et al. (2017) Molecular diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* by ISSR analysis. *J Pharmacogn Phytochem* SP1, 195-201.

- Shahnazi S, Meon S, Vadamalai G et al. (2014) Genetic Diversity of *Fusarium solani* Isolates from Black Pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia by ISSR marker. Trop Agric Sci 37(3), 363–374.
- Thangavelu RK, Muthu Kumar KP, Ganga Devi P, Mustaffa MM (2012) Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) Isolates of India by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Analysis. Mol Biotech 51, 203–211.
- Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, et al. (2011) Genetic variation of Mehraban sheep using two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Afr J Biotechnol 10, 1812–1817.
- Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Rumin Res 132, 123–127.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20(2), 176-183.