

## تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Alternaria alternata* عامل لکه‌موجی گوجه‌فرنگی در استان خوزستان با کمک نشانگرهای ریزماهوره

خشنود نوراللهی<sup>\*۱</sup> - محسن حسینی<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۹

### چکیده

بیماری لکه موجی با عامل *Alternaria alternata* یکی از بیماری‌های مهم گوجه فرنگی در استان خوزستان می‌باشد. به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. alternata* نمونه‌برداری از مزارع گوجه فرنگی در مناطق مختلف انجام گرفت. تعداد ۶۴ جدایه جداسازی گردید. پس از جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جدایه‌ها، آزمون مولکولی با استفاده از پنج جفت آغازگر ریزماهوره انجام گردید. در نهایت ۲۱ آلل در همه جمعیت‌ها شناسایی شد. میانگین تعداد آلل در هر لوکوس برابر با ۴/۲ بود. بیشترین و کمترین تعداد آلل به ترتیب مربوط به لوکوس AEM13 با هشت آلل و لوکوس‌های AEM6 و AEM9 با دو آلل بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۸۵ درصد از تنوع ژنتیکی در بین کلیه جدایه‌ها و ۱۴ درصد، به مناطق مختلف جغرافیایی اختصاص دارد. بین جدایه‌ها از مناطق مختلف شباهت ژنتیکی بالایی وجود داشت. شباهت ژنتیکی بالا را می‌توان به مهاجرت ژن یا ژنوتیپ در اثر عوامل مختلف نسبت داد. بیشترین و کمترین تنوع درون جمعیت به ترتیب مربوط به جمعیت شوشتر و جمعیت امیدیه بود. پس از تجزیه دندروگرام داده‌ها بر اساس UPGMA و ضریب تشابه دایس در سطح ۶۲ درصد، جدایه‌ها در هشت گروه قرار گرفتند. وجود تنوع بالا به علت جهش، نوترکیبی و تولید مثل جنسی می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه برای اصلاح ارقام مقاوم و گسترش روش‌های کنترل بیماری لکه موجی مفید خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: شباهت ژنتیکی، لکه موجی، واریانس مولکولی، SSR

### مقدمه

و شاخه Ascomycota قرار می‌گیرد (۱۲). این قارچ به اندام‌های هوایی گوجه فرنگی حمله می‌کند، در خزانه موجب مرگ گیاهچه می‌شود، علائم بیماری روی برگ‌ها بصورت لکه‌های قهوه‌ای مدور با هاله زرد رنگ ظاهر می‌گردند، لکه‌ها ابتدا در برگ‌های پیر ظاهر می‌شوند، با توسعه بیماری ساقه و میوه‌ها هم آلوده می‌شوند (۲). لکه‌ها در روی میوه‌ها به رنگ قهوه‌ای و بصورت دوایر متحدالمرکز می‌باشند (۹). قارچ می‌تواند در خاک، بقایای گیاهی و علف‌های هرز زنده بماند، این قارچ ممکن است بذرزاد باشد و همچنین اسپورها توسط باد، آب، حشرات، کارگران و ادوات کشاورزی انتشار یابند (۱۵). قارچ در شرایط مرطوب دمای معتدل تا گرم بسیار فعال است (۶). این بیماری به گیاهان خانواده سیب زمینی و بیش از دوازده خانواده دیگر حمله می‌کند (۲). بهترین روش مدیریت بیماری پیشگیری از آن می‌باشد، (۱۵). در زمینه تنوع ژنتیکی قارچ در دنیا مطالعات مختلفی صورت گرفته است: ۱۱۲ جدایه از گونه‌های *A. alternata* و *A. porri solani* جدا شده از سیب‌زمینی و گوجه فرنگی از کشورهای مختلف با استفاده از روش چند شکلی

گوجه فرنگی یکی از گیاهان عالی است، که برای استفاده از میوه و تزئینات آن کشت می‌گردد (۱۶). لکه موجی یکی از مهمترین بیماری‌های گوجه فرنگی است که در شرایط گرم و مرطوب ظاهر شده و در مناطق مختلف دنیا خسارت می‌زند، خسارت این بیماری در پنسیلوانیا در صورتی که با آن مبارزه نشود، ۳۰ درصد برآورد گردیده است (۲). در ایران در سال ۱۳۲۶ *Alternaria solani* به عنوان عامل بیماری از روی گوجه فرنگی گزارش شد (۱۰). سال ۱۳۷۶ در ورامین قارچ *Alternaria alternata* بعنوان عامل بیماری شانکر ساقه گوجه فرنگی گزارش گردید (۳۸). قارچ *A. alternata* به عنوان عامل بیماری لکه موجی در سال ۱۸۱۷ میلادی توسط نیس معرفی شد (۳۹). مرحله جنسی آن *Lewia* sp. در خانواده Pleosporaceae

۱ و ۲- استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه ایلام

\*- نویسنده مسئول: Email: k.nourollahi@ilam.ac.ir

رسیدن به ارقام مقاوم به این بیماری اقدام کرد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی

در طول فصل کشت گوجه فرنگی در سال‌های ۹۰ و ۹۱ از مزارع گوجه فرنگی مختلف از جمله گلخانه‌ها، کشت‌های زیر پلاستیک و کشت‌های عادی در شهرستان‌های مختلف بازدید بعمل آمد و از هر محل چهار مزرعه به صورت تصادفی انتخاب و از بوته‌های بیمار نمونه‌برداری انجام گرفت. نمونه‌ها پس از ثبت مشخصات آنها در درون پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، سپس در مدت یک تا دو روز اقدام به جداسازی عامل بیماری گردید. مشخصات جدایه‌ها شامل شهرستان‌های محل نمونه‌برداری، رقم کشت شده، در جدول ۱ (پیوست) آمده است.

به منظور تسهیل در بررسی و آنالیز ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *A. alternata*، جدایه‌ها در شش جمعیت شامل شوشتر، امیدیه، باغملک، دشت‌آزادگان، اهواز و دزفول قرار داده شدند (جدول ۲).

جدول ۲- مشخصات جمعیت‌های قارچ *A. alternata* مورد مطالعه  
Table 2- Selected *A. alternata* population's for the study

کد جمعیت Population Code	نام جمعیت Population Name	تعداد جدایه‌ها NO. Isolates
1	Shoshtar	11
2	Omidiyeh	12
3	Dashte Azadagan	12
4	Ahvaz	13
5	Dezful	16
-	Total	64

برای جداسازی قارچ، ابتدا نمونه‌ها از حدواسط بافت آلوده و سالم به قطعات نیم تا یک سانتی‌متری تقسیم شدند. پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده (۱٪ ماده فعال) به مدت ۲ دقیقه، با آب مقطر سترون سه بار شستشو داده شدند، سپس این قطعات را با کاغذ صافی سترون خشک کرده و تعداد ۳-۵ قطعه از هر نمونه روی محیط کشت عصاره سیب زمینی (۲۰۰ گرم)، دکستروز (۲۰ گرم)، آگار (۲۰ گرم) منتقل گردیدند. تستک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۷ °C نگهداری شدند. پرگنه قارچ بعد از ۳-۵ روز ظاهر شد. جدایه‌ها بعد از خالص‌سازی به روش تک اسپور به محیط کشت عصاره سیب زمینی، هویج و آگار<sup>۳</sup> جهت شناسایی و استخراج DNA منتقل گردیدند.

حاصل از قطعات طولی تکثیر شده<sup>۱</sup> مورد بررسی قرار گرفت و معلوم گردید که بین جدایه‌های *A. solani* و دیگر جدایه‌ها تفاوت ژنتیکی وجود دارد (۲۶). در ۶۹ جدایه *A. alternata* از کالیفرنیا با استفاده از ۲۹ آغازگر ریپید (Random Amplified Polymorphic DNA) سطح بالایی از تنوع ژنتیکی گزارش گردید و مطابق دندروگرام رسم شده، دو گروه مستقل، یکی با ۵۵ جدایه و دومی با ۱۴ جدایه، مشخص شدند (۳۰). نسیم و همکاران (۳۱) در پاکستان ده جدایه از قارچ *A. alternata* را براساس ریپید مورد بررسی قرار دادند، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نشان داد که جدایه‌های قارچ مورد مطالعه در دو گروه متمایز قرار گرفته‌اند. در مطالعه‌ای که در کشور مصر بر روی نه گونه مختلف آترناریا از ۲۷ جدایه، انجام گرفت مشخص گردید که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در میان جدایه‌های آترناریا، حتی در گروه‌های مشابه وجود دارد (۵۰). ۱۱۲ جدایه *A. alternata* با استفاده از RAMS<sup>۲</sup> مورد بررسی قرار گرفت و ضریب تشابه ژنتیکی بین جفت جدایه‌ها از ۰/۳ تا ۱ متغیر بود (۲۳). تعداد ۲۴ جدایه *A. alternata* با روش AFLP مورد بررسی قرار گرفت و ۲۹٪ چند شکلی در بین جدایه‌ها مورد مطالعه مشخص شد (۲۸). مطالعاتی با نشانگر ریپید روی جمعیت *A. solani* در جنوب آفریقا، آمریکا و برزیل انجام گرفت و نشان داده شد که تنوع زیادی در داخل جمعیت و در میان جمعیت‌های بین مزارع وجود دارد که برای قارچ با تولید مثل غیرجنسی غیر معمول است (۲۵، ۴۴ و ۴۷). در مطالعاتی که در سوئد روی قارچ *A. alternata* (۴۳) و روی *A. duci* (۳) با استفاده از نشانگر SSR، انجام گرفت، نشان داده شد که تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های یک مزرعه نیز وجود دارد. تنوع ژنتیکی میان جدایه *A. solani* جدا شده از مزارع مختلف سیب زمینی با استفاده از نشانگر ریپید در جنوب آلمان مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که قارچ از لحاظ ژنتیکی بسیار متغیر می‌باشد (۲۲). مطالعه‌ای در ایران روی ۸۷ جدایه *A. alternata* جدا شده از مرکبات انجام گرفت نتایج حاصل نشان داد که جدایه‌ها در پنج گروه با سطح شباهت ۸۵٪ قرار دارند (۱۸). نشانگرهای ریزوماهواره به دلیل چندشکلی بالا، توارث پذیری، همباز بودن و فراوانی بالا، نشانگرهای مناسبی برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی، مطالعه ژنتیک جمعیت، انگشت نگاری ژنتیکی، و میزان تغییرات تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما هستند (۲۰). با شناسایی تنوع ژنتیکی *A. alternata* در مزارع گوجه فرنگی می‌توان اطلاعات مفیدی جهت رسیدن به ارقام مقاوم به این بیماری را بدست آورد. هدف از انجام این مطالعه شناسایی تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری در مناطق مختلف استان خوزستان و میزان تغییرپذیری این قارچ در این مناطق است تا بتوان با تکیه بر تنوع ژنتیکی این قارچ در جهت

1- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)  
2- Random amplified microsatellites (RAMS)

کاغذ صافی واتمن و پمپ تخلیه، از محیط کشت مایع جداسازی و با آب مقطر سترون شستشو داده شدند تا باقی مانده محیط مایع از سطح میسیلیوم شسته شود. توده‌های میسیلیومی در درون ویال‌های سترون تا مرحله استخراج DNA در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA به روش CTAB دوپل و دوپل (۸) با اندکی تغییرات صورت گرفت. بررسی کیفیت نمونه‌های DNA از طریق الکتروفورز، همچنین غلظت DNA توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر تعیین گردید.

برای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *A. alternata* به روش PCR، پنج جفت آغازگر ریزماهوره اختصاصی برای *A. alternata* که در مطالعات قبلی چندشکلی بالایی نشان دادند استفاده شد (۴۳) (جدول ۳). برای نشان دادن تنوع در تمامی جدایه‌ها، تکثیر DNA توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرها، بطور جداگانه با حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل: بافر PCR x 10، کلرید منیزیم<sup>۱</sup> با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، نوکلئوتیدها<sup>۲</sup> با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، از هر جفت آغازگر<sup>۳</sup>، آنزیم تک DNA پلیمرز<sup>۴</sup> با غلظت ۲۵۰ واحد، DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم در میکرولیتر)، در یک برنامه حرارتی شامل: ۳۰ چرخه بصورت واسرشت‌سازی<sup>۵</sup> اولیه در ۹۵°C بمدت ۳ دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴°C بمدت ۱ دقیقه، اتصال<sup>۶</sup> و هیبرید شدن آغازگرها در دمای بین ۵۲-۵۸°C بسته به نوع آغازگر بمدت ۱ دقیقه، توسعه<sup>۷</sup> در ۷۲°C بمدت ۱ دقیقه و توسعه نهایی<sup>۸</sup> در ۷۲°C بمدت ۵ دقیقه، انجام شد.

برای مشاهده محصول از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده گردید تا باندهای DNA پدیدار شوند. برای رنگ‌آمیزی ژل از محلول سیف استین به مقدار ۳ میکرولیتر در ۱۰۰ سی سی محلول آگارز و قبل از انجام مراحل الکتروفورز استفاده شد. برای مشاهده باندها، از ژل داکيومنت مدل INTAS استفاده گردید.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تعیین میزان تشابه جدایه‌های *A. alternata* ابتدا باندهای واضح در تصاویر ژل‌ها مشخص شدند. سپس داده‌ها به صورت حضور باند (یک) و یا عدم حضور باند (صفر) وارد نرم افزار Excel شدند. ماتریس تشابه بین جفت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس با نرم افزار NTSys ver 2.02 محاسبه گردید. همچنین

برای بررسی مشخصات ریخت‌شناسی، حلقه‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه در حال رشد پرگنه‌های مربوط به هر جدایه برداشته شد و به تشتک‌های حاوی محیط غذایی سیب زمینی هویج آگار منتقل شدند. این تشتک‌ها در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت نور سفید فلورسنت با تناوب نوری ۸ ساعت و تاریکی ۱۶ ساعت نگهداری و بعد از ۷-۵ روز مورد بررسی قرار گرفتند. برای تامین نور از دو عدد لامپ مهتابی سفید رنگ ۴۰ وات در فاصله ۴۰ سانتی‌متری از سطح تشتک‌ها استفاده گردید.

الگوهای کلی اسپورزایی که شامل آرایش اسپور روی اسپوربر، تعداد اسپور در هر زنجیره و الگوی انشعاب یافتن زنجیره‌ها با استفاده از بینوکلر و بدون تخریب حالت طبیعی آنها مشخص گردید. برای بررسی مشخصات ریز ریخت‌شناسی، صفات مختلفی از جمله اندازه اسپورها، آرایش بندها، وجود یا عدم وجود نوک و طول آن، ترتینات سطح اسپورها و ابعاد اسپوربر مورد مطالعه قرار گرفت. برای به دست آوردن ابعاد، در هر مورد، ۵۰ نمونه اندازه‌گیری و میانگین آنها محاسبه گردید. برای شناسایی از جداول راهنمای تشخیص کتاب جنس‌های آلترناریا استفاده شد (۱۴ و ۳۷).

برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده، تعدادی بذر رقم چیف و سان‌سید از کشاورزان گوجه‌کار که بذر خود مصرفی داشتند تهیه شد. بعد از ضدعفونی خاک اقدام به کشت بذر گردید. پس از دو هفته بوته‌های ۵-۶ برگی گوجه‌فرنگی با سوسپانسیون اسپور با غلظت  $1 \times 10^6$  اسپور در میلی‌لیتر در آب مقطر سترون با مه‌پاش دستی و بطور یکنواخت تا ریزش اولین قطره از سطح برگ اسپری شدند. برای حفظ رطوبت بعد از مایه‌زنی، هر یک از گلدان‌ها به مدت ۴۸ ساعت با کیسه‌های نایلونی پوشانده شدند، گلدان‌ها به صورت یک روز در میان آبیاری شده و به مدت یک ماه در این شرایط نگهداری شدند. بعد از ایجاد علائم مجدداً عامل بیماری جداسازی و شناسایی گردید. گلدان‌های شاهد با آب مقطر سترون محلول‌پاشی شدند.

### بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها

#### تهیه توده میسیلیومی، استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

برای تهیه توده میسیلیوم مورد نیاز جهت استخراج DNA، از حاشیه پرگنه در حال رشد هر جدایه، سه قطعه شش میلی‌متری به ارلن‌مایر حاوی محیط کشت مایع سترون شده عصاره سیب زمینی، دکستروز (عصاره ۲۰۰ گرم سیب زمینی و ۱۵ گرم دکستروز در یک لیتر آب مقطر) به همراه  $100 \text{ ppm}$  سولفات استرپتومایسین انتقال داده شدند. ارلن‌ها به مدت چهار تا هفت روز در دمای ۲۵ سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار قرار داده شدند.

پس از رشد کافی قارچ، توده میسیلیومی هر یک از ارلن‌ها با

- 1- MgCl<sub>2</sub> (50mM)
- 2- dNTP(10mM)
- 3- Forward, Reverse
- 4- Taq DNA polymerase (250 unit)
- 5- Denaturing
- 6- Annealing
- 7- Extension

تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها با روش UPGMA، روش اتصال مجاور (Neighbor joining) و آزمون ماتنل با نرم‌افزار NTsys ver 2.02 ترسیم شد (۳۶).

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای ریز ماهواره مورد استفاده در این مطالعه (۴۳)

Table 3- SSRs primers used in this study (43)

آغازگر Primer	توالی (5-3) Sequence	اندازه باندها Band size	تعداد آلل Allel	دمای اتصال Annealing temperature
AEM3	TGATCCCACGTCACAGAAAG GGTTGTCCAAGTACCCCATAGA	247-461	24	55°C
AEM5	TACAGACGGAGGGGAGGACAC CACAGCTCGTCATCCGAGTA	123-147	8	55°C
AEM6	TGACGAGCTGTGAGGAGTGT CGTGTGTAGGGTCTTCGTCTC	159-183	9	55°C
AEM9	GAAGCCCATTCCTCACA GCTCCATCTCCCACAGTAACA	279-306	8	55°C
AEM13	TGCGAAACCGTGGATACTG TCGAAATGGCTGCAATAGT	109-253	24	55°C

برای بدست آوردن شاخص نشانگر تعداد نوارهای چندشکل با قطعات مختلف در شاخص محتوای چندشکلی ضرب شد (۲۱).

### نتایج و بحث

#### A. نتایج آزمایشات مولکولی در جدایه‌ها و جمعیت های *alternata*

در این مطالعه پس از جداسازی و شناسایی، تعداد ۶۴ جدایه *A. alternata* از مناطق مختلف (جدول ۱ پیوست) بدست آمد. برای بررسی تنوع ژنتیکی ۶۴ جدایه *A. alternata* از پنج جفت نشانگر ریز ماهواره که تنوع آلی خوبی را نشان داده‌اند استفاده شد. تعداد کل آلل‌های مشاهده شده ۲۱ آلل بود که بوسیله آغازگرها تکثیر شدند و همه آغازگرها چند شکلی مناسب از خود نشان دادند. جایگاه AEM13 با هشت باند بیشترین آلل را در میان آلل‌های تولیدی آغازگرها داشت (جدول ۴). میانگین تعداد آلل در کل جایگاه‌ها برابر با ۴/۲ بود. میانگین تعداد آلل‌ها برای هر آغازگر بین ۰/۴ تا ۱/۶ متفاوت بود بطوری که میانگین تعداد آلل برای پرایمرهای AEM6 و AEM9 برابر با ۰/۴ و برای پرایمر AEM13 برابر با ۱/۶ بود.

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای جدایه‌ها با نرم‌افزار DARwin 5.0158 محاسبه گردید (۳۴). برای آنالیز مربوط به جمعیت‌ها از نرم افزارهای GenALEx ver 6.501 و POPGENE, ver.1.31 استفاده شد (۳۳ و ۵۰)، همچنین معیارهای برآورد و مقایسه کارایی نشانگر مطابق زیر بدست آمد.

#### معیارهای سودمندی نشانگرها

#### محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC (Polymorphic Information Content)

محتوای اطلاعات چندشکلی نشان دهنده میزان چندشکلی یک نشانگر می‌باشد که می‌تواند از صفر تا یک متغیر باشد. هر چه این عدد بزرگتر باشد، بیانگر فراوانی زیاد چندشکلی برای جمعیت مورد مطالعه است (۳۰). برای بررسی قدرت تفکیک نشانگرها، محتوای اطلاعاتی چندشکلی هر نشانگر با استفاده از نرم افزار Excel و فرمول  $PIC=1-\sum(p^2-q^2)$  محاسبه شد، در این رابطه p تعداد افرادی که دارای باند هستند به تعداد کل افراد می‌باشد، و q نیز از  $(1-p)$  بدست می‌آید.

#### شاخص نشانگر (MI)

جدول ۴- میانگین تعداد آلل برای هر جایگاه *A. alternata*

Table 4- Mean of alleles in *A. alternata* locus

جایگاه Locus	تعداد آلل Allele	میانگین تعداد آلل Allele mean	فراوانی نسبی (درصد) Frequency	فراوانی تجمعی Accumulative frequency
AEM6	2	0.4	9.52	9.52
AEM9	2	0.4	9.52	19.05
AEM5	4	0.8	19.05	38.1
AEM3	5	1	23.81	61.9
AEM13	8	1.6	38.1	100
Total	21	4.2	100	

مورد استفاده در اینجا چندشکلی مناسب از خود نشان داده است. از اینرو می‌توان گفت نشانگر ریز ماهواره نشانگری قدرتمند در نشان دادن چندشکلی محسوب می‌شود. از طرف دیگر تفاوت در نمونه قارچی، تعداد جدایه، تعداد نشانگر و نوع نشانگر از جمله عواملی هستند که در تعداد باند و آلل مشاهده شده تأثیر دارند.

#### محتوای اطلاعات چند شکلی و شاخص نشانگر ریز ماهواره

دامنه اندازه باندها در نشانگرها بین ۱۰۹ تا ۴۶۱ جفت باز متغیر بود. کوچکترین باند مربوط به نشانگر AEM13 و بزرگترین باند مربوط به نشانگر AEM3 بود. بیشترین محتوای اطلاعات چند شکلی مربوط به نشانگرهای AEM6 و AEM9 بود. همچنین بیشترین مقدار شاخص نشانگر مربوط به نشانگر AEM13 بود. در مطالعات انجام شده بوسیله کال و همکاران (۲۰) ارزش محتوای اطلاعات چند شکلی دامنه‌ای بین ۰/۰۹ تا ۰/۵ داشت. نشانگرهایی که تعداد آلل و شاخص نشانگر بالاتری دارند تفکیک بهتری در بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌ها انجام می‌دهند از اینرو می‌توان از آنها در سایر مطالعات مربوط به جدایه‌های *A. alternata* و گونه‌های نزدیک به این جنس استفاده کرد (جدول ۶).

همچنین میانگین تعداد آلل برای هر جمعیت محاسبه شد (جدول ۵). جمعیت دزفول با میانگین ۲/۲ و جمعیت شوشتر با میانگین ۲/۸ به ترتیب کمترین و بیشترین میانگین تعداد آلل را به تفکیک هر جمعیت داشتند.

جدول ۵- میانگین تعداد آلل برای هر جمعیت *A. alternata*  
Table 5- Mean of allele numbers in each *A. alternata* population

جمعیت Population	تعداد آلل Allele	میانگین تعداد آلل Allele
Shoshtar	14	2.8
Omidyeh	13	2.6
Dashte Azadagan	13	2.6
Ahvaz	12	2.4
Dezful	11	2.2
Average		2.4

مطالعه‌ای که بر روی *A. alternata* به منظور بررسی تنوع ژنتیکی توسط کال و همکارانش (۲۰) انجام گرفت در نهایت ۸۷ آلل توسط نشانگر ISSR مشاهده شد که ۹۸ درصد از باندها چندشکل بودند. همچنین میانگین آلل‌های تکثیر شده ۹/۶ بود. در مقایسه با سایر مطالعات در این مطالعه تمام نشانگرهای مورد استفاده چندشکل بودند این موضوع نشان دهنده این مطلب است که نشانگر ریز ماهواره

جدول ۶- داده‌های بدست آمده از آغازگرهای SSR استفاده شده برای جدایه‌های *A. alternata*  
Table 6- Data obtained from ISSR primers used for studying of *A. alternata* isolates

ردیف No	جایگاه ژنی Locus	تعداد آلل Allele	محتوای اطلاعات		اندازه باندها Band Size
			چند شکلی Polymorphic information content	شاخص نشانگر Marker Index	
1	AEM3	5	0.943	4.716	461-247
2	AEM5	4	0.964	3.585	147-123
3	AEM6	2	0.999	1.982	183-159
4	AEM9	2	0.999	1.982	306-279
5	AEM13	8	0.854	6.839	253-109

#### تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA<sup>1</sup>) حاصل از نشانگر ریز ماهواره

یکی از مهمترین جنبه‌های تجزیه خوشه، تعیین تعداد مطلوب خوشه است، به منظور تعیین تعداد مطلوب خوشه و تعیین بهترین نقطه برش دندروگرام، تجزیه واریانس ملکولی داخل و بین جمعیت‌ها

درصد مکان‌های چندشکل برای هر جمعیت محاسبه شد. میانگین مکان‌های چندشکل برای هر جمعیت دامنه‌ای از ۵۲/۳۸ تا ۶۶/۶۷ متغیر بود که به ترتیب به جمعیت‌های اهواز و شوشتر مربوط می‌شد. میانگین درصد مکان‌های چند شکلی برای تمام جمعیت‌ها ۵۹/۰۵ بود (جدول ۷). وجود مکان‌های چند شکلی یکی از عواملی است که نشان دهنده بالا بودن تنوع در جمعیت می‌باشد. در اینجا نیز جمعیت مربوط به شوشتر با میانگین ۶۶/۶۷ بیشترین مکان‌های چند شکل را به خود اختصاص داد.

سورت گرفت (شکل ۲). الگوی توزیع تنوع ژنتیکی برای نشانگر ریزماهواره نشان داد که واریانس ژنتیکی درون جمعیت ۸۶ درصد و واریانس ژنتیکی بین جمعیت ها برابر با ۱۴ درصد بود (جدول ۸).

جدول ۷- تخمین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *A. alternata* بر اساس نشانگر SSR

Table 7- Estimation of genetic diversity in *A. alternata* populations based on SSR marker

جمعیت	اندازه جمعیت	تعداد آلل	تعداد آلل موثر	شاخص شانون	درصد مکان‌های چندشکل
Population	Population size	Allele	Effective allele	Shanon Index	Polymorphic loci percent
Shoshtar	11	1.333	1.291	0.288	66.67
Omidyeh	12	1.238	1.301	0.286	61.9
Dashte Azadagan	12	1.19	1.235	0.230	57.14
Ahvaz	13	1.095	1.239	0.227	52.38
Dezful	16	1.143	1.278	0.252	57.14
Average	-	-	-	0.257	59.05

جدول ۸- تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) مربوط به ارتباط ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های *A. alternata*

Table 8- Molecular variance analysis of genetics relationship between and among *A. alternata* populations

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس	PhiPT
Source	df	SS	MS	Est. Var.	
Among Population	4	26.232	6.558	14	0.139
Within Population	59	126.424	2.143	86	
Total	63	152.656		100	

بیشترین چندشکلی را دارد. از اینرو می‌توان گفت جدایه‌های مربوط به شوشتر احتمالاً قابلیت بیماری‌زایی بیشتری روی گوجه‌فرنگی و همچنین احتمالاً مقاومت بیشتر به قارچ کش را خواهند داشت. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای بیمارگر در شوشتر، می‌توان آزمون‌های مزرعه ای و برهمکنش رقم- جدایه برای بررسی مقاومت ارقام را با استفاده از جدایه‌های این منطقه انجام داد.

به خاطر پایین بودن تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها همانگونه که مشاهده می‌شود ضرایب مربوط به تعداد آلل‌ها، تعداد آلل‌های مؤثر، درصد مکان‌های چندشکل و شاخص تنوع شانون به یکدیگر بسیار نزدیکند (جدول ۷). میانگین ضریب شانون محاسبه شده در اینجا برابر با ۰/۲۵۷ بود اما در مطالعه انجام شده بوسیله کال و همکاران (۲۰) بر روی *A. alternata* با استفاده از نشانگر ISSR برابر با ۰/۴۸ بود. فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌های مورد محاسبه نشان داد بیشترین تنوع مربوط به جمعیت شوشتر و کمترین تنوع مربوط به جمعیت امیدیه می‌باشد. در جمعیت‌های *A. alternata* مورد بررسی بیشترین فاصله مربوط به جمعیت‌های دزفول و اهواز (۰/۰۶۶) و کمترین فاصله مربوط به جمعیت‌های امیدیه و شوشتر (۰/۰۰۵) بود.

شباهت ژنتیکی بالا بین جمعیت‌های امیدیه و شوشتر نشان دهنده جریان ژنی می‌باشد، این جریان ژنی ممکن است از طریق مکانیسم‌های پراکنش طبیعی روی داده باشد که ممکن است با جابجایی اندام‌های تکثیر قارچ تسهیل شده باشد. جریان ژنی فرآیندی طبیعی است که در طی آن ژن‌ها از جمعیتی به جمعیت دیگر

واریانس ژنتیکی درون جمعیت نشان دهنده تنوع درون جدایه‌های مربوط به هر جمعیت می‌باشد. تنوع درون جمعیت به دلایل مختلف از جمله جهش، سیستم تلاقی و جریان ژن می‌باشد. تنوع بین جمعیت‌های مختلف در اینجا برابر با ۱۴ درصد بود که نشان می‌دهد جمعیت‌ها از لحاظ ژنتیکی بسیار به یکدیگر نزدیکند. تمایز کمتر بین جمعیت نسبت به داخل جمعیت‌ها نشان دهنده اینست که گروه‌بندی صورت گرفته برای جدایه‌ها در تفکیک جدایه‌ها بر اساس شباهت آنها موفق عمل کرده است و جمعیت‌ها در دندروگرام حاصل، از افراد متفاوتی تشکیل شده‌اند، اما بین این جمعیت‌ها تنوع کم و در عین حال معنی‌داری وجود دارد.

با توجه به این نتایج تنوع ژنتیکی بالایی در میان جمعیت‌ها مشاهده گردید و این نشان دهنده اینست که پتانسیل ایجاد خسارت در مزارع گوجه فرنگی وجود دارد. افزایش تنوع ژنتیکی در هر جمعیت بیمارگر باعث افزایش پتانسیل سازگاری آن جمعیت در مقابل تغییرات شرایط آب و هوایی می‌شود و ورود چند جدایه با قدرت تهاجمی بالا به این جمعیت‌ها ممکن است باعث ایجاد اپیدمی و شدت بالای بیماری شود و در اینصورت کنترل بیماری دشوار خواهد بود.

#### تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *A. alternata*

بالا بودن تعداد آلل‌ها، تعداد آلل‌های مؤثر، هتروزیگوسیتی و شاخص تنوع شانون نشان دهنده چند شکلی بالاتر می‌باشد. در اینجا جمعیت شوشتر بیشترین مقدار ضریب تنوع شانون، تعداد آلل و

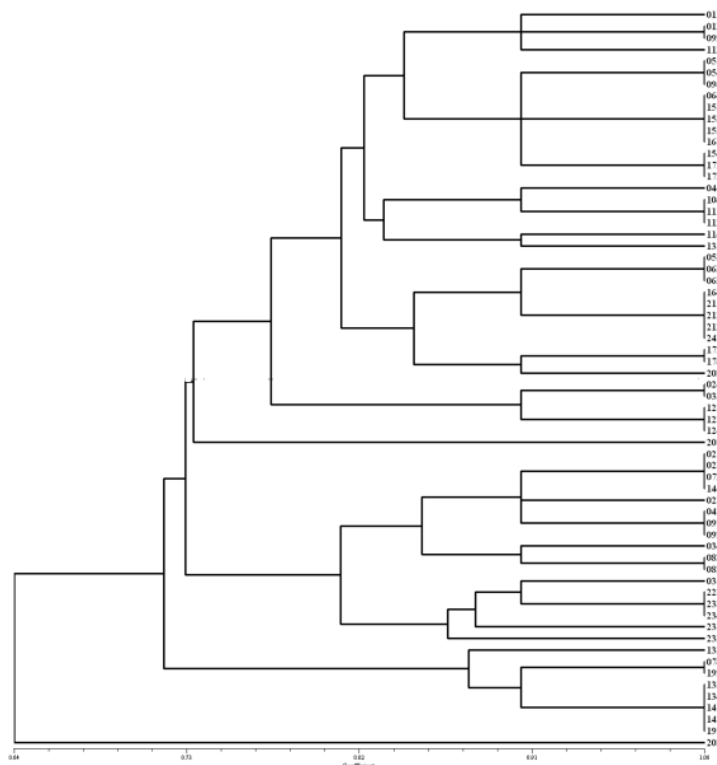
دزفول را شامل شد. گروه سوم جمعیت‌های شوشتر و دشت آزادگان را در بر گرفت. گروه چهارم و هشتم تنها یک جدایه از دزفول را در برداشتند. گروه پنجم جدایه‌های تمام جمعیت‌ها بجز جدایه مربوط به دزفول را شامل شد. گروه ششم جدایه‌های دزفول و شوشتر و گروه هفتم جدایه‌های اهواز، امیدیه و دزفول را شامل شد. نتایج بررسی با استفاده از این نشانگر نتوانست جدایه‌ها را بر مبنای نواحی جغرافیایی آنها از یکدیگر تفکیک کند.

عدم ارتباط بین جدایه و منشأ جغرافیایی می‌تواند ناشی از غلبه جریان ژنی بر تأثیرات رانش ژنتیکی و جلوگیری از تفکیک و تمایز محدود به یک منطقه بین جمعیت‌ها باشد. به عبارتی دیگر، مهاجرت جدایه‌ها و اختلاط مداوم ژنوتیپ‌ها بین زیر جمعیت‌ها و تبادل ژنتیکی فراوان تفکیک و تمایز محدود به یک منطقه را کاهش می‌دهد (۳۹). در مطالعه‌ای که با استفاده از نشانگر ISSR بر روی *A. alternata* انجام گرفت نیز هیچ‌گونه ارتباطی بین مناطق جغرافیایی و خوشه‌بندی مشاهده نشد (۱۹). با استفاده از تعداد زیاد نمونه که در منطقه گسترده‌ای قرار دارند شاید بتوان ارتباطی بین مناطق جغرافیایی و خوشه‌بندی مشاهده کرد.

منتقل می‌شوند. نتایج نشان داد که میزان جریان ژنی با میزان تمایز ژنتیکی رابطه معکوس دارد، هنگامی که جریان ژنی بالا باشد تمایز ژنتیکی در پایین‌ترین مقدار خود قرار می‌گیرد. در جایگاه‌های مورد بررسی در این پژوهش بیشترین جریان ژنی مربوط به جایگاه ۱۸ با مقدار ۱۳/۸۵ و کمترین میزان جریان ژنی مربوط به جایگاه ۱ با مقدار ۰/۳۹ بود و متوسط جریان ژنی ۲/۶۲ محاسبه شد و متوسط تمایز ژنتیکی در این تحقیق ۰/۱۶ بود.

#### دندروگرام روابط ژنتیکی بین جدایه‌های مورد مطالعه

برای بررسی روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی از ماتریس ظریب تشابه دایس استفاده شد (شکل ۱). دندروگرام بدست آمده جدایه‌ها را در فاصله ۰/۶۲ در هشت گروه قرار داد. نمونه‌ها بر اساس مناطق جغرافیایی از یکدیگر بخوبی تفکیک نشدند. وجود تنوع ژنتیکی کم بین جمعیت‌ها یکی از دلایل عدم تفکیک بین نمونه‌ها می‌باشد. نبود تمایز جغرافیایی مناسب بین جدایه‌های مورد بررسی به خاطر پراکندگی گسترده اسپوره‌های قارچ و فشار انتخاب ضعیف میزبان درون و بین جمعیت‌ها می‌باشد (۱ و ۳۹) در گروه اول جدایه‌هایی از پنج جمعیت قرار داشتند. گروه دوم جدایه‌های مربوط به امیدیه و

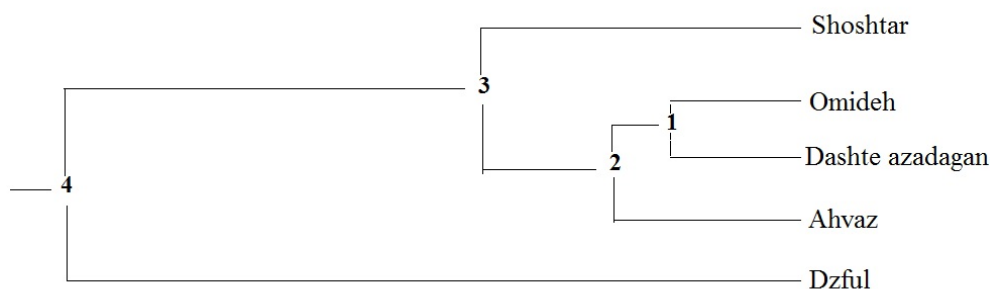


شکل ۱- دندروگرام ایجاد شده بوسیله UPGMA از ضریب دایس براساس داده‌های حاصل از آغازگرها در جدایه‌های *A. alternata*  
Figure 1- Dendrogram generated by UPGMA of Dice coefficient based on the data from *A. alternata* isolates using SSR primers

در گروه دوم جمعیت دزفول قرار گرفت. در گروه اول شوشتر از سه جمعیت دیگر متمایز شد. بر این اساس کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های امیدیه و دشت آزادگان دیده شد (شکل ۲).

#### رسم دندروگرام جمعیت‌های *A. alternata*

در تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها به طور کلی دو گروه مشخص قرار گرفتند. یک گروه از آنها چهار عضو و گروه دیگر تک عضوی بود. گروه اول شامل جمعیت‌های شوشتر، امیدیه، دشت آزادگان و اهواز، و

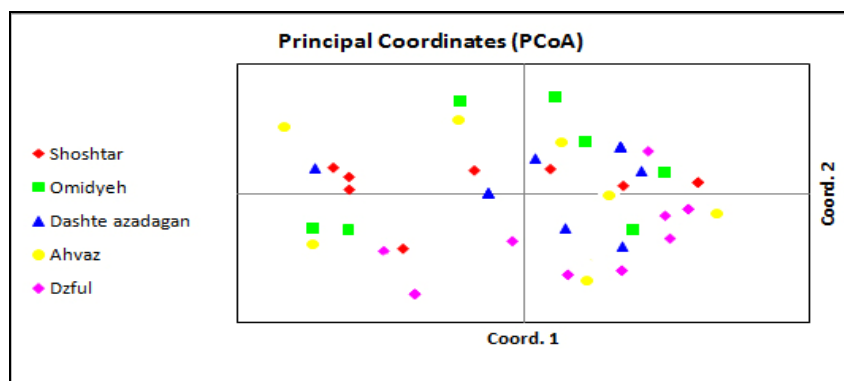


شکل ۲- گروه‌بندی جمعیت‌های *A. alternata* براساس UPGMA  
Figure 2- Grouping of *A. alternata* Populations based on UPGMA

می‌باشد. مفهوم ژنومی این عدم همبستگی، پراکنده بودن فواصل قابل تکثیر بین جایگاه‌های ریز ماهواره در سراسر ژنوم می‌باشد. جدایی‌هایی که از مناطق یکسان جمع‌آوری شده‌اند نیز بخوبی از یکدیگر تفکیک نشدند. چنین استنباط می‌شود که نشانگرهای ریز ماهواره اگر پراکنش مناسبی در ژنوم داشته باشند در تفکیک گونه‌های مختلف موفق عمل می‌کنند و همچنین برای اختلافات درون گونه‌ای نیز این نشانگر به خوبی عمل می‌نماید. از اینرو می‌توان گفت عدم پراکندگی مناسب نشانگر بر روی کل ژنوم یکی از دلایل عدم تفکیک آنها می‌باشد.

#### تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) جمعیت‌های مورد مطالعه

ارزیابی اطلاعات باروش تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که جدایه‌ها در تمامی محورهای مختصات پراکنده‌اند و این معرف تنوع ژنتیکی بالای جدایه‌ها می‌باشد. نتایج این تجزیه آماری نشان می‌دهد که محورهای اصلی اول، دوم و سوم به ترتیب ۲۲/۸، ۲۱/۶۵ و ۱۴/۲۲ درصد از اطلاعات را در بر داشتند. در مجموع سه محور قادر به تبیین ۵۸/۶۷ درصد از اطلاعات نشانگرها بود. این تبیین حاکی از عدم همبستگی بین نشانگرهای ریزماهواره



شکل ۳- نمودار دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی ارتباط ژنتیکی جمعیت‌های *A. alternata*  
Figure 3- Two dimension plot of Principal Coordinates Analysis (PCoA) of genetic relationships between *A. alternata* populations



و احتمال مهاجرت همزمان آل‌ها وجود دارد. از این رو بعلت مهاجرت همزمان آل‌ها، استفاده از نشانگرهای غالب برای ارزیابی جمعیت‌های غیر جنسی در قارچ‌های هاپلوئید، کاربرد بیشتری دارد (۴). منبع واریانس ژنتیکی از جمله جهش، هیبریداسیون سوماتیکی و هتروکاریوت در بسیاری از قارچ‌های غیر جنسی ناشناخته است (۴) و (۵). و سطح نوترکیبی می‌تواند نوعی از سیستم جنسی باشد (۱۳) و (۲۷).

ریزماهواره یک نشانگر ژنتیکی هم بارز دارای تکرارهای ساده یک تا شش جفت باز پشت سر هم می‌باشند که در ژنوم همه یوکاریوت‌ها و برخی پروکاریوت‌ها وجود دارد (۲۴، ۴۱ و ۴۶). این تکرارها حتی در درون گونه‌ها نیز چندشکلی نشان می‌دهند، بدلیل اینکه جهش‌ها سبب ایجاد تنوع در تعدادی از واحدهای تکراری می‌باشند، آنها عمدتاً در مناطق کد کننده و غیر کد کننده در DNA و به طور تصادفی در سراسر ژنوم توزیع شده‌اند (۳۴ و ۵۰). جایگاه‌های ریزماهواره با تعداد تکرارهای بزرگ بیشتر چندشکلی از خود نشان می‌دهند. از تکنیک‌های ریزماهواره و همچنین نشانگرهایی که تعداد آل بیشتری را نشان می‌دهند می‌توان بصورت گسترده در ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت استفاده کرد، از این رو از تکنیک ریزماهواره برای این تحقیق استفاده گردید که تنوع و تغییرات بیمارگر را به روشنی بیان نماید.

اصلاح ارقام مقاوم یکی از مؤثرترین و اقتصادی ترین روش‌های کنترل در بیماری‌ها می‌باشد. برای بررسی روش‌های کنترل و تأثیر آنها در کاهش شدت بیماری، اطلاع از تنوع ژنتیکی جمعیت بیمارگر بسیار مهم است. همچنین اطلاع از تولیدمثل جنسی که باعث نوترکیبی و مبادله آل‌ها، افزایش تنوع در جمعیت‌ها می‌شود و این تنوع موجب ایجاد پتانسیل سازگاری با شرایط محیطی و میزبان می‌گردد، نقش مهمی دارد (۳۲).

بنابراین می‌توان با بررسی ساختار بیولوژیکی و ژنتیکی جمعیت این بیمارگر با کاربرد ژن‌های مقاوم برای رسیدن به مقاومت پایدار گام برداشت. همچنین تنوع بیماری‌زایی و تعیین نژادهای غالب در مناطق شیوع این بیماری در کشور و تعیین تیپ‌های جنسی قارچ برای اطلاع از وضعیت پایداری قارچ در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌گردد، تا متخصصین به نژادی با اطمینان بیشتر بتوانند مطابق با تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ وارسته‌هایی که دارای پتانسیل مقاومت و سازگاری با شرایط محیطی هستند برای رسیدن به مقاومت پایدار آزمایش کنند. از طرف دیگر رعایت قرنطینه در این منطقه از کشور به خاطر تنوع بالای قارچ و شرایط محیطی مناسب برای گسترش مناسب بیماری، پیشنهاد می‌شود تا از اپیدمی شدن این قارچ جلوگیری شود.

باید به این نکته توجه کرد که چندین عامل در تخمین روابط ژنتیکی تأثیر دارند که از بین آنها می‌توان تعداد نشانگر مورد استفاده، توزیع نشانگرها در ژنوم نمونه‌های آنالیز شده و ماهیت مکانیسم تکاملی واریانس اندازه‌گیری شده را نام برد (۷). نتایج بدست آمده از تجزیه به مختصات اصلی و دندروگرام در اینجا با یکدیگر منطبق بودند و در هر دو مورد نمی‌توان الگوی تفکیک شده‌ای از جمعیت‌ها مشاهده کرد (شکل ۳).

## نتیجه‌گیری کلی

بسیاری از گونه‌های *Alternaria* ساپروفیت هستند و در اکثر محیط‌ها زندگی می‌کنند اما برخی از آنها بیمارگر بوده و باعث بروز بیماری در گیاهان می‌شوند. *A. alternata* یکی از گونه‌هایی است که باعث بروز بیماری در بیش از صد گیاه زراعی از جمله گوجه فرنگی می‌شود. این مطالعه برای اولین بار برای تعیین تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های *A. alternata* در استان خوزستان انجام گرفت. در این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۶۴ جدایه که از ۱۳ شهرستان استان خوزستان جمع‌آوری شده بودند از پنج نشانگر ریزماهواره استفاده شد. در نهایت ۲۱ آل شناسایی گردید. به خاطر تنوع بسیار بالایی که در بین جدایه‌ها وجود داشت این تعداد آل نتوانست نمونه‌ها را بر اساس مناطق جغرافیایی از یکدیگر تفکیک کند.

یکی از مهمترین فاکتورها در حفظ نباتات داشتن اطلاعات کافی در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت بیمارگر عامل بیماری است. داشتن اطلاعات بیشتر بطور یقین در انتخاب استراتژی مناسب جهت کنترل بیمارگر تأثیر بسزایی دارد (۴۲). به نظر می‌رسد که اثر متقابل بین بیمارگر و میزبان که دارای تنوع بالایی باشد باعث ایجاد تنوع در بیمارگر شود. نبود فشار میزبان مقاوم نقش مهمی در تنوع کنترل شده جمعیت بیمارگر دارد. اولین مرحله در بررسی میزان حساسیت وارسته‌ها آگاهی از ساختار جمعیت بیمارگر می‌باشد (۴۶) در این تحقیق به بررسی تنوع ژنتیکی *A. alternata* پرداخته شده و نتایج نشان داد که به خاطر شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌ها و کم بودن تعداد نشانگر، جمعیت‌ها به خوبی از یکدیگر تفکیک نشدند. اما تنوع درون جمعیت‌ها بسیار بالا بود که ممکن است به خاطر جهش و یا هیبریداسیون باشد. همچنین تنوع ژنتیکی بالا درون جمعیت قارچ نشان دهنده توان بیماری‌زایی بالا در آنها است. به همین دلیل استفاده از ارقام مقاوم متناسب با این تنوع در منطقه از اهمیت بالایی برخوردار است.

در قارچ‌های با تولیدمثل غیر جنسی تفکیک میتوزی رخ نمی‌دهد

## منابع

1. Aradhya M.K., Chan H.M., and Parfitt D.E. 2001. Genetic variability in the pistachio late blight fungus, *Alternaria alternata*. Mycological Research, 105: 300–306.
2. Baymani M. 2012. Determination of dominant causal agent of early blight of tomato and loss estimation and its chemical control in Khuzestan province. M.Sc thesis, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
3. Benichou S.A., Dongo D.E., Henni P., and Simoneau P. 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers from the phytopathogenic fungus *Alternaria dauci*. Molecular Ecology Resources, 9: 390–392.
4. Bock C.H., Thrall P.H., Brubaker C.L., and Burdon J.J. 2002. Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprinting. Mycological Research, 106: 428-434.
5. Burdon J.J., and Silk J. 1997. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. Phytopathology, 87: 664-669.
6. Chowdhury A.K., Yonemoto Y., Kato H., and Macha M.M. 2005. Cultivar identification by morphometric descriptors and RAPD markers among some Acerola (*Malpighia glabra* Linn.) cultivars. Japanese Journal Of Tropical Agriculture, 49: 41-42.
7. Dini-Andreote F., Cristina Pietrobon V., Andreote F.D., Romao A.S, BellatoSposito M., and Araujo W.L. 2009. Genetic variability of Brazilian Isolates of *Alternaria alternata* detected by AFLP and RAPD techniques. Brazilian Journal of Microbiology, 40: 670-677.
8. Doyle J.J., and Doyle J.L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus, 12: 13-15.
9. Eatebarian H. 2006. Vegetable disease and their control. Third edition. Tehran University Press. (In Persian).
10. Esphandiari A. 1947. Field crop and fruit tree disease in north subtropical region of Iran. Issues No. 5, Institute Of Plant Pests And Diseases. (In Persian).
11. Geisler D.M., Pitt J.I., and Taylor J.W. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. Proceedings of National Academy of Sciences, USA, 95: 388-393.
12. Ghosta Y. 2004. A taxonomic study on the genus *Alternaria* from Iran, Ph.D Thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.
13. Hajianfar R., and Zarbakhsh A. 2006. Identification of causal organism of early blight and stem canker diseases on tomato in major production regions of country. Iranian Plant Protection Journal, 17: 182. (In Persian with English abstract)
14. Hajipour Jarchelo Z., Ghosta Y., and Rezaee S. 2012. Study of pathogenic species of *Alternaria* on tomato and potato in West Azerbaijan province. Journal of Plant Protection Science, 43: 155-163. (In Persian with English abstract).
15. Izadpanah K., Ashkan M., Banihashemi Z., Rahimian H., and Minasian V. 2011. Plant pathology. Volume II, Fifth Edition (translation), Tehran Aeezh publication. (Translated in Persian).
16. Jaafarnia S., and Homae M. 2008. Comprehensive Illustrated Guide greenhouse cucumber and tomato. Cultivaton, Sokhan Gostare Publishing, Mashhad. (in Persian with English abstract)
17. Jaliani N. 1992. Tomato early blight disease and its chemical control in Jiroft and Bam. 10<sup>th</sup> plant protection congress Kerman. Iran 118p (in Persian).
18. Kakvan N., Zamanizadeh H., Morid B., Taheri H., and Hajmansor S. 2012. Study on pathogenic and genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from citrus hybrids of Iran, based on RAPD-PCR technique. European Journal of Experimental Biology, 2 (3): 570-576.
19. Kale M.S., Pardeshi V.C., Gurjar G.S., Gupta V.S., Gohokar, R.S., Ghoropade P.B., and Kadoo N.Y. 2012. Inter simple sequence repeat markers reveal high genetic diversity among *A. alternata* isolates of Indian origin. Journal of Mycology and Plant Pathology, 42(2): 194-200.
20. Kolliker R., Jones E.S., Drayton M.C., Dupal M. P., and Forster J. W. 2001. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) marker for white clover (*Trifolium repens* L.). Theoretical and Applied Genetics, 102: 416-424.
21. Kumar M., Mishra G. P., Singh R., Kumar J., Naik P.K., and Singh S. B. 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. Physiology and Molecular Biology of Plants, 15: 225-236.
22. Leiminger J., Bahnweg G., and Hausladen H. 2010. Population genetics consequences on early blight disease. Twelfth EuroBlight workshop.
23. Liang-Dong G., and Li X. 2004. Genetic variation of *alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS). Fungal Diversity, 16: 53-65.
24. Litt M., and Luty J.A. 1989. A hyper variable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. American Journal of Human Genetics. 44: 397-401.

25. Lourenzo V., Rodriguez T., Campos A., Braganza C., Scheuermann K., Reis A., Brommonschenkel S., Maffia L., and Mizubuti S. 2011. Genetic structure of the population of *Alternaria solani* in Brazil. *Journal of Phytopathology*, 159: 233-240.
26. Martinez S.P., Snowdon R., and Kuhnemann J.P. 2004. Variability of Cuban and international populations of *Alternaria solani* from different hosts and localities AFLP genetic analysis. *European Journal of Plant Pathology* 110: 399-409.
27. McDonald B.A., Zhan J., and Burdon J.J. 1999. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. *Phytopathology*, 89: 639-645.
28. Mohammadi S.A., and Prasanna B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plant: Salien statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43: 1248-1235.
29. Montazeri M., Greaves M.P., Pei M.H., and Ruiz C. 2005. An analysis of genetic diversity in hyphal tip isolates of promising mycoherbicide *Alternaria alternata* for control of *Amaranthus retroflexus*. *Iranian Journal of Weed Science*, 1: 51-65.
30. Morris P.F., Connolly M.S., and St-Clair D.A. 2000. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycological Research Journal*, 104: 286-292.
31. Nasim G.H., Khan S., and Khokhar I. 2012. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship of some *Alternaria alternata* isolates. *Pakistan Journal of Botany*, 44: 1267-1270.
32. Nourollahi K., Haghi Z., and Mehrabi Oladi A. 2014. Study of genetic diversity of *Fusarium verticillioides* isolates the causal agent of crown and root rot in rice in ilam province using SSR marker. *Iranian Journal of plant protection science*, 45: 29-37. (In Persian with English abstract)
33. Peakall R., and Smouse P.E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
34. Perrier X., and Jacquemoud-Collet J.P. 2006. DARwin software, <http://darwin.cirad.fr/darwin>
35. Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., and Ganal M.W. 1998. A microsatellite map of wheat, *Genetics*, 149:20-23.
36. Rohlf F.J. 1998. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.02, Exeter Software, Setauket, NY.
37. Rotem J. 1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity. St Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, 326 pp.
38. Shahryari D., and Karimi Rozbahani A. 1998. Stem canker of tomato in Varamin. *Journal of Plant Pests and Diseases*, 65: 12-19.
39. Sharma T.R.T., and Tewari J.P. 1998. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycological Research*, 102: 807-814.
40. Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236: 787-792.
41. Tautz D. 1989. Hyper variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6470.
42. Timmer L.W., Peever T.L., Solel Z., and Akimitsu K. 2003. *Alternaria* diseases of citrus – novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea*, 42: 99-112.
43. Tran-Dinh N., and Hocking A. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for *Alternaria alternata*. *Molecular Ecology*, 6: 405-407.
44. Vander Waals J. E., Korsten L., and Slippers B. 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease*, 88: 959-964.
45. Vicent A., Armengol J., and Garcia Jimenez J. 2007. Rain fastness and persistence of fungicides for control of *Alternaria* brown spot of citrus. *Plant Disease*, 91: 393-399.
46. Weber J. L., and May P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 338-396.
47. Weir T.L., Huff D. R., Christ B.J., and Romaine C.P. 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *A. alternata* from potato and tomato. *Mycologia*, 90: 813-821.
48. Yeh F.C., Yang R.C., and Boyle T. 1999. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis (POPGENE), ver.1.31, <ftp://ftp.microsoft.com/softlib/MSLFILES/HPGL.EXE>.
49. Youssuf A.M., and Gherbawy H. 2005. Genetic variation among isolates of *Alternaria* spp. from select Egyptian crops. *Phytopathology and Plant Protection*, 38: 77- 89.
50. Zane L., Bargelloni L., and Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation. A review, *Molecular Ecology*, 11:1-16.

جدول ۱ پیوست- منبع، مناطق نمونه برداری و کد جدایه‌ها برای قارچ‌های جدا شده در این مطالعه

Table 1- Source, regions and code for isolated fungi in the study

No	کد جدایه‌ها Isolate Code	کد جدایه‌ها Isolate Code	شهرستان County	محل نمونه برداری Sampling Place	نوع رقم Variety
1	011	011	مسجد سلیمان Masjed Soliman	گلگیر Gelgir	بیتا Bita
2	013	013	مسجد سلیمان Masjed Soliman	گلگیر Gelgir	بیتا Bita
3	021	021	گتوند Gotvand	جنت مکان Janat Makan	بیتا Bita
4	022	022	گتوند Gotvand	جنت مکان Janat Makan	بیتا Bita
5	023	023	گتوند Gotvand	جنت مکان Janat Makan	پی اس P S
6	024	024	گتوند Gotvand	جنت مکان Janat Makan	پی اس P S
7	031	031	شوشتر Shoshtar	بورکی Boraki	پی اس P S
8	032	032	شوشتر Shoshtar	بورکی Boraki	فلات Falat
9	034	034	شوشتر Shoshtar	بورکی Boraki	سان سید Sunsid
10	042	042	شوشتر Shoshtar	عرب حسن Arab Hassan	سان سید Sunsid
11	044	044	شوشتر Shoshtar	عرب حسن Arab Hassan	سان سید Sunsid
12	051	051	ماهشهر Mahshahr	جراحی Jarahi	چیف Cheaf
13	053	053	ماهشهر Mahshahr	جراحی Jarahi	اینفینی تی
14	054	054	ماهشهر Mahshahr	جراحی Jarahi	شهرزاد
15	062	062	امیدیه Omidyeh	آسیاب Asyab	چیف Cheaf
16	063	063	امیدیه Omidyeh	آسیاب Asyab	چیف Cheaf
17	064	064	امیدیه Omidyeh	آسیاب Asyab	چیف Cheaf
18	072	072	امیدیه Omidyeh	جایزان Jayzan	فلات Falat
19	074	074	امیدیه Omidyeh	جایزان Jayzan	فلات Falat
20	082	082	باغملک Baghmalek	قلعه تل Ghalah tel	متین Matin
21	083	083	باغملک Baghmalek	قلعه تل Ghalah tel	فلات Falat
22	191	191	رامهرمز Ramhormoz	میداود Midavod	متین Matin

23	192	192	رامهرمز Ramhormoz	میدآود Midavod	فلات Falat
24	091	091	دشت آزادگان Dashte Azadagan	کوت Kout	سان سید Sunsid
25	092	092	دشت آزادگان Dashte Azadagan	کوت Kout	سان سید Sunsid
26	093	093	دشت آزادگان Dashte Azadagan	کوت Kout	سان سید Sunsid
27	094	094	دشت آزادگان Dashte Azadagan	کوت Kout	سان سید Sunsid
28	104	104	دشت آزادگان Dashte Azadagan	کوت Kout	سان سید Sunsid
29	111	111	حمیدیه Hamidyeh	طراح Tarah	سان سید Sunsid
30	112	112	حمیدیه Hamidyeh	طراح Tarah	سان سید Sunsid
31	113	113	حمیدیه Hamidyeh	طراح Tarah	سان سید Sunsid
32	114	114	حمیدیه Hamidyeh	طراح Tarah	سان سید Sunsid
33	122	122	حمیدیه Hamidyeh	گمبوعه Gomboaeh	چیف Cheaf
34	123	123	حمیدیه Hamidyeh	گمبوعه Gomboaeh	چیف Cheaf
35	124	124	حمیدیه Hamidyeh	گمبوعه Gomboaeh	چیف Cheaf
36	131	131	اهواز Ahvaz	گلخانه ۱ ملاثانی Molasani 1 Glasshouse	اینفینی تی Infinity
37	132	132	اهواز Ahvaz	گلخانه ۱ ملاثانی Molasani 1 Glasshouse	اینفینی تی Infinity
38	133	133	اهواز Ahvaz	گلخانه ۱ ملاثانی Molasani 1 Glasshouse	اینفینی تی Infinity
39	134	134	اهواز Ahvaz	گلخانه ۱ ملاثانی Molasani 1 Glasshouse	اینفینی تی Infinity
40	141	141	اهواز Ahvaz	گلخانه ۲ ملاثانی Molasani 2 Glasshouse	شهرزاد Shahrzad
41	142	142	اهواز Ahvaz	گلخانه ۲ ملاثانی Molasani 2 Glasshouse	شهرزاد Shahrzad
42	144	144	اهواز Ahvaz	گلخانه ۲ ملاثانی Molasani 2 Glasshouse	شهرزاد Shahrzad
43	151	151	اهواز Ahvaz	الهای Elhaee	چیف Cheaf
44	152	152	اهواز Ahvaz	الهای Elhaee	چیف Cheaf
45	153	153	اهواز Ahvaz	الهای Elhaee	چیف Cheaf
46	154	154	اهواز Ahvaz	الهای Elhaee	چیف Cheaf
47	161	161	اهواز Ahvaz	الهای Elhaee	چیف Cheaf
48	164	164	اهواز Ahvaz	الهای Elhaee	چیف Cheaf

49	171	171	شوش Shosh	سرخه Sorkkeh	چیف Cheaf
50	172	172	شوش Shosh	سرخه Sorkkeh	چیف Cheaf
51	173	173	شوش Shosh	سرخه Sorkkeh	چیف Cheaf
52	174	174	شوش Shosh	سرخه Sorkkeh	چیف Cheaf
53	201	201	دزفول Dezful	دولتی Dolati	متین Matin
54	202	202	دزفول Dezful	دولتی Dolati	متین Matin
55	203	203	دزفول Dezful	دولتی Dolati	متین Matin
56	211	211	دزفول Dezful	شمس آباد Shamsabad	فلات Falat
57	212	212	دزفول Dezful	شمس آباد Shamsabad	فلات Falat
58	213	213	دزفول Dezful	شمس آباد Shamsabad	فلات Falat
59	243	243	دزفول Dezful	صفی آباد Safiabad	فلات Falat
60	222	223	اندیمشک Andimeshk	لور Lour	متین Matin
61	231	231	اندیمشک Andimeshk	آزادی Azadi	فلات Falat
62	232	232	اندیمشک Andimeshk	آزادی Azadi	فلات Falat
63	233	233	اندیمشک Andimeshk	آزادی Azadi	فلات Falat
64	234	234	اندیمشک Andimeshk	آزادی Azadi	فلات Falat