

## تنوع ژنتیکی قارچ *Alternaria alternata* عامل پوسیدگی بنه زعفران در استان‌های خراسان رضوی و جنوبی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

قاسم نجاری<sup>۱</sup> و خشنود نوراللهی<sup>۲\*</sup>

تاریخ پذیرش: ۵ تیر ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۴ دی ۱۳۹۶

نجاری، ق. و نوراللهی، خ. ۱۳۹۸. تنوع ژنتیکی قارچ *Alternaria alternata* عامل پوسیدگی بنه زعفران در استان‌های خراسان رضوی و جنوبی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. زراعت و فناوری زعفران، ۷(۳): ۳۳۱-۳۴۵.

### چکیده

بیماری پوسیدگی بنه با عامل *Alternaria alternata* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گیاهی در دنیا به شمار می‌رود. برای تعیین تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های قارچ *Alternaria* ۵۰ نمونه در سطح مزارع زعفران در استان خراسان رضوی (کاشمر، تربت‌جام، تربت‌حیدریه، مه‌ولت، بردسکن) و استان خراسان جنوبی (قائنات، سرایان، بیرجند) جمع‌آوری گردید. در نهایت ۵۰ جدایه قارچ *A. alternata* از نمونه‌های آلوده با استفاده از محیط کشت سیب زمینی، دکستروز، آگار جداسازی گردید. آزمایش مولکولی جدایه‌ها بعد از خالص‌سازی و شناسایی بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی، با استفاده از پنج جفت آغازگر ریز ماهوره (AEM3, AEM5, AEM6, AEM9, AEM13) انجام گرفت. در مجموع ۲۲ آلل با میانگین ۱۱٫۱ آلل در تمام جمعیت‌های قائنات، بیرجند، سرایان، تربت‌جام، تربت‌حیدریه، کاشمر، بردسکن و مه‌ولت توسط آغازگرهای ریزماهوره تولید شد. بیشترین مقدار آلل مربوط به جمعیت مه‌ولت با ۱۴ آلل و و کمترین جمعیت‌های سرایان، بیرجند و قائن با ۱۰ آلل بود. مقایسه پارامترهای تنوع ژنتیکی در هشت جمعیت نشان داد که جمعیت تربت‌جام بیشترین تنوع ژنتیکی را دارند. اما مقادیر پایینی برای قائنات محاسبه شده است. براساس ضریب تشابه دایس بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی بین قائن - مه‌ولت (۰/۳۲۸) و بردسکن - مه‌ولت (۰/۵۴) دیده شد. بر اساس دندروگرام جمعیت‌ها، دو گروه از همدیگر متمایز شدند؛ یک گروه شامل قائنات و دیگری بیرجند، مه‌ولت، سرایان، بردسکن، کاشمر، تربت‌جام و تربت‌حیدریه بود. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که میزان تنوع ژنتیکی در درون جمعیت ۷۱٪ و بین جمعیت‌ها ۲۹٪ می‌باشد. شباهت ژنتیکی زیادی بین جدایه‌ها از مناطق مختلف وجود داشت. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه می‌تواند در اصلاح ارقام مقاوم زعفران و گسترش اقدام قرنطینه‌ای بسیار مفید باشد.

**کلمات کلیدی:** تشابه ژنتیکی، نشانگر مولکولی، SSR.

۱- کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ایلام  
۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ایلام  
\* - نویسنده مسئول: (k.nourollahi@ilam.ac.ir)

## مقدمه

برگریزی می‌شود (Chaerani et al., 2007). بهترین روش مدیریت بیماری پیشگیری از آن می‌باشد (Izadpanah et al., 2011). نشانگر مولکولی ریزماهوره شامل توالی‌های تکراری ساده با واحدهای یک تا شش نوکلئوتیدی است که به دلیل مزایای ویژه نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. از جمله محاسن آن می‌توان به کاربرد ساده و تفسیر نتایج آسان، میزان بالای چندشکلی حتی در سطح ارقام و ژنوتیپ‌های یک گونه، فراوانی و تنوع زیاد آل‌های ریزماهوره در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها، وجود الگوی تظاهر هم بارز تکرارپذیر بودن نتایج و در نهایت قابل انتقال بودن آن در سطح جنس و یا دیگر گونه‌های نزدیک اشاره کرد، از جمله معایب این مارکر پیچیدگی، هزینه‌بر و وقت‌گیر بودن فرآیند شناسایی توالی‌های تکراری ساده و تعیین ردیف بازی آن‌ها که مقدمه کار با این نشانگر است را می‌توان نام برد (Naghavi et al., 2005).

در زمینه تنوع ژنتیکی قارچ در دنیا مطالعات مختلفی صورت گرفته است: ۱۱۲ جدایه از گونه‌های *A. solani*، *A. alternata* و *Curvularia* sp. جدا شده از سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی از کشورهای مختلف با استفاده از روش چند شکلی 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 (Martinezi et al., 2004). در ۶۹ جدایه *A. alternata* از کالیفرنیا با استفاده از ۲۹ آغازگر رپید (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 (Morris et al., 2000).

زعفران زراعی گیاهی است با نام علمی *Crocus sativus* L. از تیره زنبقیان (Iridaceae)، است و یکی از ارزشمندترین رستنی‌های ایران و جهان است، که دارای بنه می‌باشد. پوشش روی بنه از نوع الیاف طولی موازی به رنگ قهوه‌ای است (Behnia, 1990). موارد استفاده از زعفران در جهان بسیار متعدد است و کاربردهای زیادی دارد، از زعفران به صورت ادویه. در تهیه شیرینی‌جات و نوشابه و شربت بکار می‌رود.

بیماری لکه‌برگی ناشی از قارچ *Alternaria* sp. یکی از بیماری‌های قارچی مهم در سراسر جهان به شمار می‌آید (Ghosh, 2004). این بیماری انتشار جهانی دارد و در بسیاری از کشورها اهمیت ویژه‌ای دارد. عامل بیماری علاوه بر برگ، به طوقه و بنه زعفران نیز حمله می‌کند، در اثر این بیماری لکه‌های قهوه‌ای رنگی بر سطح بنه و یا برگ‌ها ایجاد می‌شود. بیماری سطح فتوستنتزکننده گیاه را کاهش می‌دهد و در صورت شدت بیماری ممکن است باعث برگ‌ریزی گردد (Chaerani et al., 2007).

علائم این بیماری در زعفران ابتدا روی بنه ایجاد می‌گردد و در اوایل فصل رشدی زعفران (آبان ماه) در اندام‌های هوایی طوقه و برگ‌ها ظاهر می‌گردد که لکه‌های اولیه ریز به قطر ۲-۱ میلی‌متر بوده، بافت آلوده خشک و کاغذی است، لکه‌ها بعداً گسترش یافته در نهایت به شکل گرد و یا بیضوی سیاه می‌شوند، لکه‌های بزرگ حاشیه زاویه‌دار داشته و محدود به رگبرگ‌ها می‌باشند، همچنین این لکه‌ها بافت آلوده را برآمده یا فرورفته می‌کند و بصورت لکه‌های سپری شکل، ظاهر می‌گردند (Okhvat & Zad, 2005).

بیماری ناشی از قارچ *A. alternata* سطح فتوستنتزکننده گیاه را کاهش می‌دهد که در صورت شدت بیماری باعث

ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *A. alternata* عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران با استفاده از نشانگر ریزوماهوره و میزان تغییرپذیری این قارچ در مناطق نمونه‌بردای است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری

نمونه‌برداری در اواخر فصل زمستان (اواخر اسفند ماه) طی فصل زراعی ۱۳۹۲-۹۳ از اندام‌های مختلف زعفران از جمله بنه، طوقه و برگ‌های زعفران در سطح مزارع استان‌های خراسان رضوی و جنوبی انجام گرفت. نمونه‌برداری در مناطق مختلف این استان‌ها انجام گرفت (جدول ۲). نمونه‌ها را درون پاکت‌های کاغذی گذاشته و روی پاکت مشخصات محل نمونه‌برداری شامل مناطق قائنات، بیرجند، سرایان، تربت‌جام، تربت‌حیدریه، کاشمر، بردسکن و مه‌ولات درج گردید. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه ایلام منتقل شد. نمونه‌ها درون یخچال در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

### جداسازی قارچ عامل بیماری

برای جداسازی قارچ، ابتدا بافت‌های گیاهی آلوده از حدواسط بافت آلوده و سالم به قطعات نیم سانتی‌متری تقسیم شدند. پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده (۱٪ ماده فعال) به مدت یک تا سه 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<sup>۲</sup> (۲۰۰ گرم)، دکستروز (۲۰ گرم)، آگار (۲۰ گرم) منتقل گردیدند. تشتک‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پرگنه قارچ بعد از ۳-۵ روز ظاهر شد. بعد از خالص سازی به روش تک اسپور در محیط

منتظری و همکاران (Montazeri et al., 2005) تعداد ۲۴ جدایه از قارچ *A. alternata* را به‌عنوان علف‌کش قارچی<sup>۱</sup> که برای کنترل علف‌هرز تاج‌خروس بکار می‌رود، را با روش AFLP بررسی کردند، در این روش ۲۹٪ چند شکلی در بین جدایه‌های مورد مطالعه تشخیص داده شد.

مطالعاتی بر روی جمعیت *A. solani* با نشانگر RAPD توسط محققین مختلفی از جمله: واندروالس و همکاران (Van der Waals et al., 2004) در جنوب آفریقا، ویر و همکاران (Weir et al., 1998) در آمریکا، لورنزو و همکاران (Lourenzo et al., 2011) انجام گرفت در این مطالعات تنوع زیادی در درون و میان جمعیت‌ها نشان داده شد که برای قارچ-های دارای تولید مثل غیرجنسی غیر معمول است. تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی ممکن است اطلاعات ارزشمندی در مورد طیف وسیعی از پراکندگی کنیدی‌ها بین مناطق مختلف نشان دهد.

با وجود پیشرفت علم بیوتکنولوژی، گزارش بسیار کمی در بکارگیری آن در زمینه این بیماری در روی زعفران در سرتاسر کشور به‌ویژه استان خراسان وجود دارد و می‌توان از ظرفیت آن در جهت کنترل این بیماری استفاده کرد. نشانگرهای ریزوماهوره به دلیل چندشکلی بالا، توارث پذیری، همباز بودن و فراوانی بالا، نشانگرهای مناسبی برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی، مطالعه ژنتیک جمعیت، انگشت‌نگاری ژنتیکی، و میزان تغییرات تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم هستند (Kolliker et al., 2001).

تعیین تنوع ژنتیکی یکی از اهداف مهم این تحقیق می‌باشد که می‌توان اطلاعات مفیدی جهت رسیدن به ارقام مقاوم به این بیماری را بدست آورد تا با کمک آن برای رسیدن به ارقام مقاوم مطابق با تنوع ژنتیکی عامل بیماری در جهت کنترل آن اقدام کرد، بنابراین تحقیقات گسترده برای مطالعه تنوع ژنتیکی ضروری بوده و هدف از این پژوهش شناسایی و ارزیابی تنوع

2- Potato Dextrose Agar (PDA)

1 - Mycoherbicide

نمونه سدیم استات و ۰/۶ ایزوپروپانول سرد اضافه گردید سپس نمونه‌ها به آرامی به مدت ۵ دقیقه زیر و رو شده و به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر نگهداری شدند. این نمونه‌ها در مرحله بعدی به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. فاز محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب ته‌نشین شده ۵۰۰ میکرولیتر الکل اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و سپس به آرامی و با زدن ضربه انگشت رسوب حاصل از ته ویال جدا شده و در الکل به خوبی شسته شد. سپس این نمونه‌ها به مدت یک دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول الکل را دور ریخته و رسوب ته ویال در معرض هوا به مدت ۳۰ دقیقه خشک شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE به رسوب ته ویال اضافه شد و این ویال‌ها در یخچال در دمای ۴ درجه نگهداری شدند و بعد از ۲۴ ساعت به دمای ۲۰- انتقال و نگهداری شدند. بررسی کیفیت نمونه‌های DNA از طریق الکتروفورز انجام گرفت. همچنین غلظت DNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید.

#### بررسی تنوع ژنتیکی *A. alternata* با استفاده از نشانگر ریز ماهواره ریزماهوره

برای این منظور، ابتدا پنج جفت آغازگر ریزماهوره اختصاصی برای گونه *A. alternata* که چند شکلی زیادی داشتند از شرکت سیناکلون<sup>۳</sup> خریداری گردید (جدول ۱). سپس تکثیر DNA توسط واکنش PCR اختصاصی با استفاده از پنج جفت آغازگر به صورت جداگانه برای نشان دادن تنوع در نمونه‌ها انجام شد (Tran-Dinh & Hocking, 2006). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی با استفاده از پنج آغازگر AEM3، AEM5، AEM6، AEM9، AEM13 و به طور جداگانه برای تمامی ۵۰ جدایه با حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل غلظت ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10x<sup>۴</sup> از شرکت سیناکلون، ۱/۵

آب-آگار، قارچ به محیط کشت عصاره سیب‌زمینی، هویج و آگار<sup>۱</sup> جهت شناسایی آن‌ها براساس مشخصات ظاهری و ریخت-شناسی و استخراج DNA منتقل گردید، همچنین آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها برای حصول اطمینان از توانایی جدایه در ایجاد بیماری بر روی بنه زعفران زراعی انجام گرفت (Nourollahi & Hasani, 2017).

#### استخراج DNA

برای تهیه توده میسیلیوم مورد نیاز برای استخراج DNA، از محیط کشت مایع سیب‌زمینی (PDB) سترون شده به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات استریتومایسین استفاده شد. استخراج DNA به روش CTAB (Doyle & Doyle, 1990) با اندکی تغییرات صورت گرفت. ابتدا توده میسیلیومی درون هاون با کمک دسته هاون کاملاً ساییده شده سپس مقدار ۷۰۰ میکرولیتر از بافر تجزیه‌کننده به توده میسیلیومی نمونه‌ها در هاون چینی اضافه شد و با توده میسیلیومی مخلوط گردید و مخلوط حاصل به ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری سترون انتقال داده شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه در حمام آب گرم قرار داده شدند. در این مدت برای حل شدن بهتر مخلوط هر ۱۰ دقیقه یکبار ویال‌ها وارونه<sup>۲</sup> شدند. پس از خارج کردن ویال‌ها از حمام آب ۷۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل به نسبت ۲۴:۱ به مخلوط اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه به آرامی ورتکس شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد فاز رویی و شفاف آنها برداشته و به ویال سترون دیگری انتقال داده شد. سپس با افزودن آنزیم RNAase با غلظت نهایی ۲۰ میکروگرم در میکرولیتر به نمونه‌ها، به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه نگهداری شدند. به فاز رویی شفاف ۰/۱ حجم

3 - Sina clone

4 - PCR buffer 10X

1 - Potato Carrot Agar (PCA)

2 - Vortex

نرم‌افزار NTSYS-pc ver. 2.02 ترسیم شد (Rolhf, 1998). به منظور تشخیص تنوع ژنتیکی پارامترهایی از جمله: تعداد آل‌های مشاهده شده، تعداد آل‌های مؤثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، تنوع ژنتیکی و ضریب شانون<sup>۱۰</sup> مورد محاسبه قرار گرفت. بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های قارچ نیز توسط تجزیه واریانس مولکولی<sup>۱۱</sup> به دست آمد. همچنین میانگین تنوع ژنی، میزان چندشکلی، میانگین تعداد آل مشاهده شده و تعداد آل مؤثر<sup>۱۲</sup> در هر جایگاه ژنی<sup>۱۳</sup>، محاسبه گردید. همه اطلاعات بالا از طریق نرم‌افزار GenAlex ver. 6.501 بدست آمد (Peakall & Smouse, 2012). برای رسم دندروگرام فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها از روش UPGMA و از نرم‌افزار popGene ver. 1.31 استفاده گردید. برای محاسبه تعیین میزان جریان ژنی نیز از نرم‌افزار popGene ver. 1.31 استفاده گردید (Yeh et al., 1999).

### نتایج و بحث

از کشت نمونه‌های بنه زعفران آلوده با علائم لکه‌های سیاه مایل به قهوه‌ای رنگ، ۵۰ جدایه *A. alternata* بدست آمد. تعداد جدایه‌های حاصل به تفکیک منشأ جغرافیایی در جدول دو آورده شده است کد جدایه‌ها بر اساس منطقه نمونه‌برداری شده انتخاب گردیده‌اند. در مورد آزمون بیماری‌زایی اولین علائم بیماری ۳۰ روز بعد از اسپور پاشی ظاهر گردید که علائم آن در مقدمه اشاره شده است.

### چند شکلی مشاهده شده و نتایج واکنش زنجیره‌های پلیمرز در جمعیت‌های مورد بررسی

ریزماهورها نشانگرهای ژنتیکی هم بارز دارای تکرارهای

میلی مولار کلرید منیزیم<sup>۱</sup>، ۰/۲ میلی مولار مخلوط نوکلئوتیدها<sup>۲</sup>، یک میکرومولار از هر جفت آغازگر<sup>۳</sup> (مستقیم و معکوس)، ۰/۶ واحد از آنزیم تک DNA پلیمرز<sup>۴</sup>، DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم در میکرولیتر) در یک برنامه حرارتی شامل ۳۵ چرخه به صورت زیر انجام شد. واسرشت سازی<sup>۵</sup> اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه و واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه اتصال<sup>۶</sup> و هیبرید شدن آغازگرها در دمای بین ۵۸-۵۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه توسعه<sup>۷</sup> در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و توسعه نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، برای مشاهده محصول PCR مقدار پنج میکرولیتر از آن در ژل آگارز ۱/۵٪ به مدت ۷۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ ولت و شدت جریانی حدود ۸۰ تا ۹۰ میلی آمپر، از طریق الکتروفورز تفکیک گردید. برای رنگ آمیزی باندها از محلول سیف استین به مقدار شش میکرولیتر در ۱۰۰ سی سی محلول آگارز و قبل از انجام مراحل الکتروفورز استفاده شد. برای مشخص شدن باندهای DNA از دستگاه ژل داک مدل Intas (شرکت اینتاس آلمان) استفاده شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تعیین تشابه جدایه‌های *A. alternata* ابتدا باندهای واضح در تصاویر ژل‌ها مشخص شدند. سپس داده‌ها به صورت حضور باند (۱) یا عدم حضور باند (۰) وارد نرم افزار Excel شدند. ماتریس تشابه بین جفت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد<sup>۸</sup> با نرم افزار NTSYS-pc ver. 2.02 محاسبه گردید. همچنین تجزیه خوشه‌ای<sup>۹</sup> داده‌ها با روش UPGMA و با

- 1 - 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2 - 0.2 mM of dNTPs mix (100 mM of each dNTPs)
- 3 - 1 μl of each forward and reversed primer
- 4 - 0.6 U of Taq polymerase
- 5 - Denaturing
- 6 - Annealing
- 7 - Extension
- 8 - Jaccard coefficient
- 9 - Cluster Analysis

- 10 - Shannon's information index (I)
- 11 - Analysis of Molecular Variance (AMOVA)
- 12 - Effective number of alleles (Ne)
- 13 - Locus

ریز ماهواره مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کل آلل‌های مشاهده شده در جدایه‌ها ۲۲ آلل بود که به وسیله نشانگر ریز ماهواره‌ها تکثیر شدند و همگی چندشکلی نشان دادند (شکل ۱).

ساده یک تا شش جفت باز پشت سر هم می‌باشند که در ژنوم همه یوکاریوت‌ها و برخی پروکاریوت‌ها وجود دارد (Litt & Luty, 1989; Nourollahi et al., 2014; Naghavi et al., 2005). این تکرارها درون گونه‌ها نیز چند شکلی نشان می‌دهند. تنوع ژنتیکی ۵۰ جدایه *A. alternata* با استفاده از جفت نشانگر

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ریز ماهواره مورد استفاده (Tran-Dinh & Hocking, 2006)

Table 1-SSRs primers used in this study (Tran-Dinh & Hocking, 2006)

آغازگر Primer	توالی Sequence 5' -3'	اندازه باندها (جفت باز) Band size (bp)	دمای اتصال Annealing temperature (°C)
AEM3	TGATCCCACGTCACAGAAAG GGTTGTCCAAGTACCCCATAGA	267-461	55
AEM5	TACAGACGGAGGGAGGACAC CACAGCTCGTCATCCGAGTA	123-147	59.5
AEM6	TGACGAGCTGTGAGGAGTGT CGTGTGTAGGGTCTTCGTCTC	159-183	55
AEM9	GAAGCCCATTCCACTCACA GCTCCATCTCCCACAGTAACA	279-306	55
AEM13	TGCGAAACCGTGGATACTG TCGGAAATGGCTGCAATAG	199-253	55

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های *A. alternata* مورد استفاده در این تحقیق

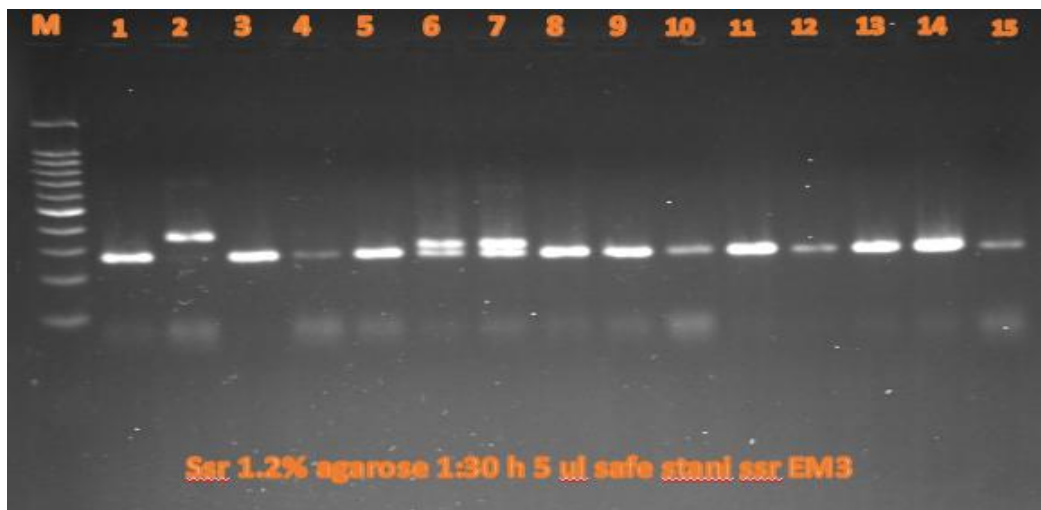
Table 2- Characteristics of *A. alternata* isolates used in this study

مناطق نمونه برداری Sampling region	تعداد جدایه‌ها No. isolates	کد جدایه‌ها Isolates code
قائنات Qaen	6	Qaen (1-2-3-4-5-6)
بیرجند Birjand	6	Bir (1-2-3-4-5-6)
سرایان Saraian	6	Sara (1-2-3-4-5-6)
تربت جام Torbat jam	6	Kariz (1-2-3-4), kariat (1-2)
تربت حیدریه Torbat haidaryeh	6	Bardu (1-2), Qale (1-2-3-4)
کاشمر Kashmar	5	tor (1-2-3-4-5)
بردسکن Bardaskan	6	Kond (1-2-3-4-5-6)
مهولات Mahvellat	9	Hansan (1-2-3-4-5), Mve1, Argha (1-2-3)

بیشترین و در جمعیت‌های بیرجند، سرایان، قائنات با ۱۰ آلل میزان فراوانی را داشتند. با بررسی تنوع آلل‌ها در جمعیت‌ها،

میانگین تنوع آلل‌ها در جمعیت‌های مورد مطالعه در (جدول ۵) آمده است. تعداد آلل‌ها در جمعیت مهولات با ۱۴ آلل

تربت جام با ۰/۲۲۷ بیشترین تنوع آلی و جمعیت قائنات با ۰/۱۳۱ دارای کمترین میزان تنوع آلی در باندها است.



شکل ۱- الگوی باندی تکثیر شده توسط آغازگر AEM3 در قارچ *A. alternata* (جدایه ها: شماره ۱-۱۲، M اندازه مارکر)   
 Figure 1- Banding pattern reproduced by the primer AEM3 in *A. alternata* (Isolate: number 1-12, M: Ladder size marker 1kb).

بین جمعیت های بردسکن و مهولات دیده شد (جدول ۴). بیشترین شباهت ژنتیکی ۰/۹۴ است که بین جمعیت های بردسکن و مهولات دیده می شود، که این شباهت های زیاد نشان دهنده جریان ژنی بین جمعیت های موجود است و همچنین نشان می دهد که این جمعیت ها ممکن است منابع مشترک منشأ گرفته باشند. جریان ژنی ممکن است از طریق مکانیسم های پراکنش طبیعی با جابجایی اندام های تکثیری قارچ روی داده باشد.

**تنوع ژنتیکی و جریان ژنی در جمعیت های *A. alternata***  
جریان ژنی فرایندی طبیعی است که در طی آن ژن ها از جمعیتی به جمعیت دیگری انتقال می یابند. نتایج بدست آمده نشان می دهد که میزان جریان ژنی با میزان تمایز ژنتیکی رابطه معکوس دارد. یعنی زمانی که جریان ژنی زیاد باشد، تمایز ژنتیکی در پایین ترین میزان خود قرار می گیرد. میزان تنوع کل (Ht) و تنوع جمعیت ها (Hs) به ترتیب ۰/۲۸۶۱ و ۰/۱۸۱۵ بدست آمد (جدول ۵). همچنین میزان جریان ژنی (Nm)

آنالیز تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در جمعیت ها برای بررسی سهم تنوع آلی درون و بین جمعیت ها تجزیه واریانس مولکولی انجام شد. نتایج جدول تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۷۱ درصد از تنوع ژنتیکی در درون جمعیت ها و ۲۹ درصد آن در میان جمعیت های مورد مطالعه وجود دارد (جدول ۳). این نتیجه نشان دهنده نزدیک بودن افراد درون جمعیت ها از لحاظ ژنتیکی می باشد. بیشترین تنوع درون جمعیت مربوط به جمعیت تربت جام که برابر با ۰/۲۲۷ درصد بود. همچنین تنوع درون جمعیت های کاشمر، بردسکن، مهولات، بیرجند، سرایان، قائنات به ترتیب برابر با ۰/۱۷۵، ۰/۱۹۷، ۰/۲۰۷، ۰/۱۶۷، ۰/۱۷۲، ۰/۱۳۱ درصد به دست آمد (جدول ۶).

**بررسی فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی در جمعیت های *A. alternata***  
بررسی فاصله ژنتیکی درون جمعیت ها نشان داد که بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۳۲۸) در بین جمعیت های قائنات و مهولات مشاهده گردید و کمترین فاصله ژنتیکی ۰/۰۵۴ بوده است که در

۰/۸۶۷۳ محاسبه گردید. تمایز ژنتیکی (Gst) در این تحقیق ۰/۳۶۵۷ مشاهده گردید.

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) مربوط به ارتباط ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های *A. alternata*

Table 3- Molecular variance analysis of genetics relationship between and among *A. alternata* populations

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of square	میانگین مربعات Mean square	درصد واریانس Variance Percent	نسبت واریانس بین جمعیت‌ها PhiPT
بین جمعیت‌ها Among population	7	58.56	8.36	29	0.286
درون جمعیت‌ها Within population	42	100.71	2.39	71	
کل Total	49	159.28	10.75	100	

جدول ۴- فاصله ژنتیکی بین زوج جمعیت‌های *A. alternata*

Table 4- Genetic distance between pairs of *A. alternata* populations

جمعیت Population	قائنات Qaen	بیرجند Birjand	سرایان Saraian	تربت‌جام Torbatjam	تربت- حیدریه Torbat Haidaryeh	کاشمر Kashmar	بردسکن Bardaskan	مه‌ولات Mavellat
قائنات Qaen	0							
بیرجند Birjand	0.1744	0						
سرایان Saraian	0.2409	0.0692	0					
تربت‌جام Torbatjam	0.2567	0.1230	0.0579	0				
تربت‌حیدریه Torbat Haidaryeh	0.2608	0.1799	0.0664	0.0548	0			
کاشمر Kashmar	0.2809	0.1231	0.0915	0.0608	0.805	0		
بردسکن Bardaskan	0.2216	0.1602	0.1427	0.1152	0.2100	0.1686	0	
مه‌ولات Mavellat	0.3287	0.2037	0.1906	0.1164	0.2578	0.1818	0.0545	0

بعدی جمعیت‌ها بکار می‌رود. نتایج این نمودار نشان می‌دهد که محورهای اصلی اول، دوم و سوم به ترتیب ۲۵/۷۴ و ۲۳/۷۹ و ۱۶/۹۸ درصد از اطلاعات را در بر داشتند و در مجموع سه محور قادر به تبیین ۶۶/۵۱ درصد از اطلاعات نشانگر بودند. این تبیین حاکی از عدم همبستگی بین نشانگرهای ریز ماهواره است. مفهوم ژنومی این عدم همبستگی، پراکنده بودن فواصل قابل

تجزیه به مختصات اصلی در جدایه‌های *A. alternata* برای بررسی تنوع آلی در جمعیت‌های مورد مطالعه از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در جهت تکمیل تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت. تجزیه به مختصات اصلی روش آماری چند متغیره مشابه با تجزیه به مؤلف اصلی در مورد داده‌های کمی است که کاربرد زیادی در تنوع ژنتیکی دارد. این روش برای نمایش نمودار سه



خوبی در تفکیک گونه‌های مختلف موفق عمل می‌کنند و همچنین برای اختلاف درون گونه‌ای نیز این نشانگر به خوبی عمل می‌نماید.

تکثیر بین جایگاه‌های ریزماهواره در سراسر ژنوم می‌باشد. اما جدایه‌هایی که از مناطق یکسان جمع‌آوری شده‌اند نیز به خوبی از یکدیگر تفکیک نشده‌اند (شکل ۲). چنین استنباط می‌شود که نشانگر ریزماهواره اگر پراکنش مناسبی در ژنوم داشته باشند به

جدول ۵- تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی زیر مجموعه جمعیت‌های قارچ *A. alternata*  
**Table 5- Analysis of gene diversity in *A. alternata* subdivided populations**

جایگاه	تعداد جدایه‌ها	تنوع کل	تنوع جمعیت‌ها	تمایز ژنی	جریان ژنی
Origin	No. Isolates	Ht	Hs	Gst	Nm
1	50	0.799	0.0694	0.1304	3.3333
2	50	0.3299	0.0694	0.7895	0.1333
3	50	0.4629	0.2864	0.3802	0.8149
4	50	0.3722	0.1943	0.4779	0.5462
5	50	0.0274	0.0247	0.0986	4.5714
6	50	0.0799	0.0694	0.1304	3.3333
7	50	0	0	0	0
8	50	0.1411	0.1289	0.0868	5.2598
9	50	0.4998	0.4096	0.1805	0.2702
10	50	0.4911	0.3872	0.2115	1.8636
11	50	0.5	0.3386	0.3227	1.0493
12	50	0.4989	0.3818	0.2347	1.6308
13	50	0.054	0.0432	0.2	0.2
14	50	0.2118	0	1	0
15	50	0.4979	0.1858	0.6262	0.2984
16	50	0.3988	0.2206	0.4469	0.6189
17	50	0.1172	0.0903	0.2296	1.6774
18	50	0.2703	0.2004	0.2585	1.6774
19	50	0.368	0.1844	0.4988	0.5024
20	50	0.4407	0.3578	0.1880	2.1598
21	50	0.3217	0.24	0.2540	1.4687
22	50	0.1244	0.1094	0.1205	3.6481
Mean	50	0.2861	0.1815	0.3657	0.8673

Nm = estimate of gene flow

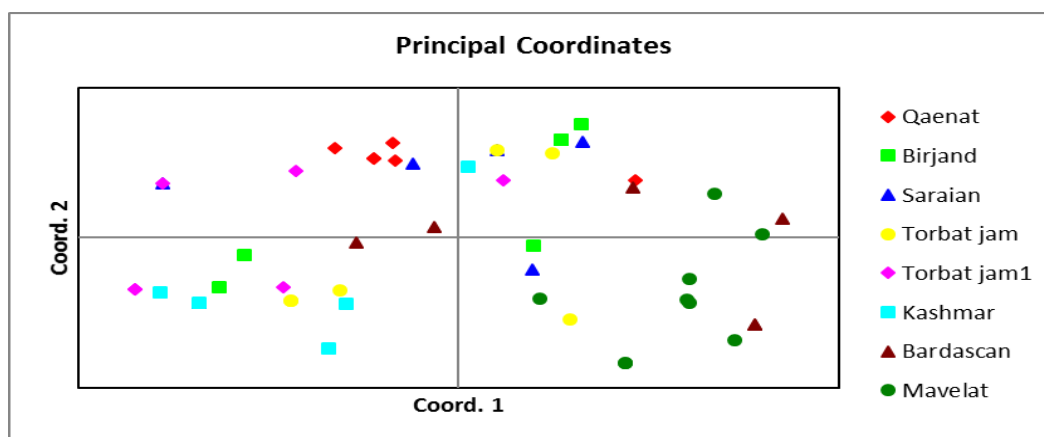
تخمین جری‌ان‌ژنی

The number of polymorphic loci is: 21

تعداد مکان‌های ژنی چندشکل

The percentage of polymorphic loci is: 95.45

درصد مکان‌های چند شکل



شکل ۲- نمودار دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی ارتباط ژنتیکی جمعیت‌های *A. alternata*

Figure 2- Two dimension plot of Principal Coordinates Analysis (PCoA) of genetic relationships between *A. alternata* populations.

اطلاعات تنوع ژنتیکی جایگاه ریزماهوره برای جمعیت‌های

#### *A. alternata*

زیاد بودن تعداد آل‌ها، تعداد آل‌های مؤثر و شاخص تنوع شانون نشان‌دهنده چند شکلی زیادتر می‌باشد. جمعیت تربت‌جام بیشترین شاخص تنوع شانون (۰/۳۲۳) و همچنین بالاترین تنوع ژنی (۰/۲۲۷) را داشت و جمعیت قائنات کمترین ضریب شانون (۰/۲۰۴) و کمترین تنوع ژنی (۰/۱۳۱) را دارد. با توجه به تنوع ژنتیکی زیاد بیمارگر در بعضی از مناطق، می‌توان آزمون‌های مزرحه‌ای بررسی مقاومت ارقام به این بیماری را در این نواحی انجام داد. و همچنین می‌توان برهمکنش رقم-جدایه را با استفاده از جدایه‌های این مناطق انجام داد. به‌خاطر کم بودن تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها، همان‌گونه که مشاهده می‌شود ضرایب مربوط به اندازه جمعیت، تعداد آل‌های مؤثر، درصد مکان‌های چندشکلی و شاخص تنوع شانون به یکدیگر بسیار نزدیک‌اند (جدول ۶). میانگین ضریب شانون محاسبه شده در این بررسی برابر با ۰/۲۶۷ می‌باشد.

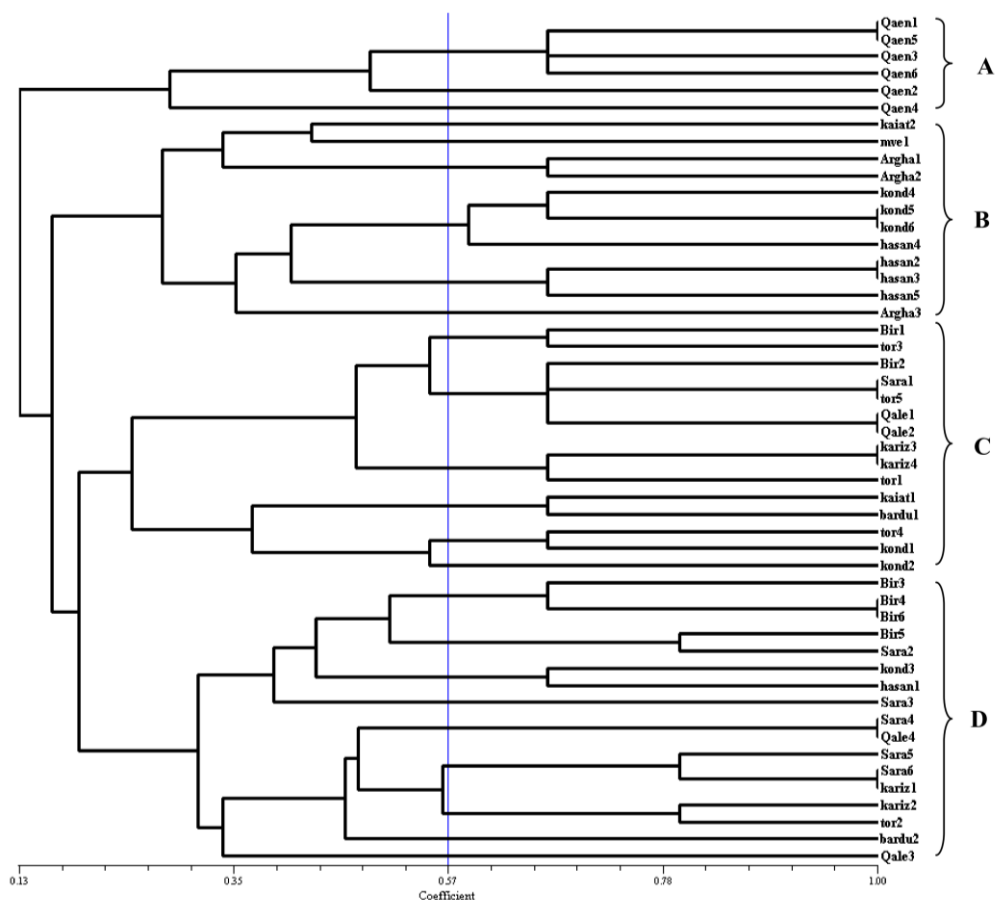
#### رسم دندروگرام جمعیت‌های *A. alternata*

در تجزیه خوشه‌ای، جمعیت‌ها به‌طور کلی در دو گروه مشخص قرار گرفتند. در گروه اول و گروه A جمعیت قائنات قرار دارد و در گروه دوم و گروه B به‌ترتیب جمعیت‌های بیرجند، سراپان، تربت‌جام، تربت‌حیدریه، کاشمر، بردسکن و مه‌ولات قرار دارد. بر این اساس کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های تربت‌جام و تربت‌حیدریه می‌باشد (شکل ۴).

این مطالعه به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. alternata* بر روی زعفران انجام گرفت. بسیاری از گونه‌های *sp. Alternaria* ساپروفیت هستند اما برخی از آن‌ها بیمارگر بوده و باعث بروز بیماری در گیاهان می‌شوند. گونه *A. alternata* یکی از گونه‌هایی ساپروفیت هستند که باعث بروز بیماری در بیش از صد گیاه زراعی می‌شود.

#### دندروگرام روابط جدایه‌های *A. alternata*

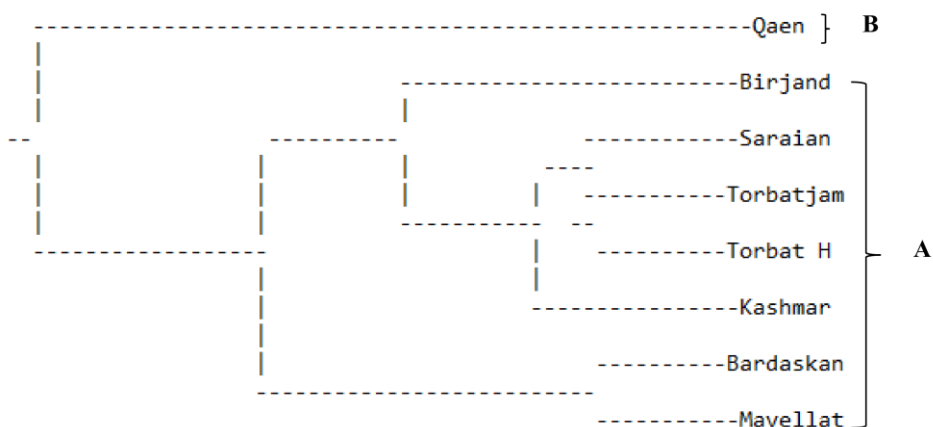
جدایه‌ها براساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA مورد بررسی قرار گرفتند در این دندروگرام جدایه‌ها در چهار گروه قرار گرفتند (شکل ۳). گروه A با شش عضو، گروه B با دوازده عضو، گروه C با پانزده عضو و گروه D با هفده عضو مشاهده شد. در گروه‌های گزارش شده همه جدایه‌های مختلفی با مناطق جغرافیایی مختلف دیده می‌شود و نشان می‌دهد تشابه زیادی از لحاظ تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌ها وجود دارد. قرار گرفتن جدایه‌های مختلف با منشاء جغرافیایی متفاوت در گروه‌های مختلف (گروه‌های B, C, D) و یا جدایه‌های یک منطقه (قائنات) در یک گروه (A) نشانگر این است که منطقه جغرافیایی با وجود مفید بودن در گروه‌بندی جدایه‌ها نمی‌تواند به‌عنوان فاکتور کامل و مستقل در این زمینه مورد استفاده قرار گیرد، و همچنین نشان می‌دهد که استفاده از این نشانگرهای ریزماهوره، نتوانسته است جدایه‌ها را بر مبنای نواحی جغرافیایی آن‌ها از یکدیگر تفکیک نماید. ممکن است با توجه به شرایط جغرافیایی و شرایط محیطی و شرایط میزبان جدایه‌های مختلف تحت تأثیر فشار انتخابی میزبان و جهش ژنتیکی قرار گیرند عدم ارتباط بین جدایه و منشاء 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 (Sharma & Tewari, 1998). در مطالعه‌ای که با استفاده از نشانگر ISSR روی جدایه‌های *A. alternata* انجام گرفت نیز هیچ‌گونه ارتباطی بین مناطق جغرافیایی و خوشه‌بندی مشاهده نشد (Kale et al., 2012). ولی ممکن است با استفاده از تعداد زیادی نمونه که در منطقه گسترده‌ای قرار داشته باشند بتوان ارتباطی بین مناطق جغرافیایی و خوشه‌بندی مشاهده کرد.



شکل ۳- دندروگرام ترسیم شده به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد براساس داده‌های حاصل از آغازگرهای ریزماهواره در

جدایه‌های قارچ *A. alternata*

Figure 3- Dendrogram generated by UPGMA method using Jaccard's similarity coefficient based on the data of SSR primers in *A. alternata* isolates.



شکل ۴- دندروگرام ترسیم شده به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد براساس داده‌های حاصل از آغازگرهای ریزماهواره در

جمعیت‌های قارچ *A. alternata*

Figure 4- Dendrogram generated by UPGMA method using Jaccard's similarity coefficient based on the data of SSR primers in *A. alternata* populations.

جدول ۶- داده های بدست آمده از آغازگرهای ریزماهوره استفاده شده برای جدایه های *A. alternata*Table 6- Data obtained from SSR primers used for *A. alternata* isolates.

جمعیت Population	اندازه جمعیت Population size	تعداد آلله‌ها No. of Alleles	فراوانی آلله‌ها Na	فراوانی آلله‌های مؤثر Ne	ضریب شانون I	تنوع ژنتیکی H (gene diversity)	درصد چند شکلی Polymorphism%
قائنات Qaen	6	10	0.864	1.204	0.204	0.131	41
بیرجند Birjand	6	10	0.864	1.298	0.243	0.167	41
سرایان Saraian	6	10	0.864	1.308	0.249	0.172	40.91
تربت جام Torbatjam	6	12	1	1.427	0.323	0.227	50
تربت حیدریه Torbat Haidaryeh	6	11	1.091	1.276	1.274	0.177	54.5
کاشمر Kashmar	5	12	1	1.276	0.266	0.175	50
بردسکن Bardaskan	6	14	1	1.343	0.290	0.197	50
مهولات Mavellat	9	11	1.273	1.329	0.318	0.207	63.6
Mean		11.25	0.992	1.302	0.267	0.177	48.8

بفرد تمرکز کنیم (Nagaty et al., 2011). 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 زیاد به این جمعیت ممکن است باعث ایجاد اپیدمی و شدت زیاد بیماری گردد. از طرف دیگر این موضوع باعث می‌شود که کنترل بیماری با مشکل مواجه شود به نظر می‌رسد که اثر متقابل بین بیمارگر و میزبان 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 (Weber & May, 1989). همچنین اطلاع از میزان تنوع بیماری به اصلاح کنندگان کمک می‌کند وارسته‌های که دارای پتانسیل مقاومت هستند را مطابق با تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ برای رسیدن به ارقام با مقاومت پایدار آزمایش کنند. نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع درون جمعیت‌ها بسیار

یکی از مهم‌ترین فاکتورها برای اعمال روش‌های کنترل مناسب، داشتن اطلاعات کافی در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت بیمارگر است و داشتن این اطلاعات در انتخاب استراتژی مناسب جهت کنترل بیمارگر تأثیر بسزایی دارد (Timmer et al., 2003). همچنین اطلاع از روش‌های تکثیر جنسی بیمارگر که باعث نوترکیبی و مبادله آلله‌ها، افزایش تنوع در جمعیت بیمارگر و همچنین موجب ایجاد پتانسیل سازگاری با شرایط محیطی و میزبان می‌گردد نقش مهمی دارد (Nourollahi et al., 2014). بنابراین می‌توان با بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت این بیمارگر، و کاربرد ترکیب‌های مختلف ژن‌های مقاوم برای رسیدن به مقاومت پایدار گام برداشت. در محصولات مختلف جمعیت بیمارگرها در حال رشد و تکثیر هستند و باید با تغییر شرایط محیطی از جمله تناوب زراعی، تغییر مقاومت گیاه به بیمارگر، قارچ‌کش‌ها و رژیم آبیاری سازگار شوند. از این‌رو برای کنترل مؤثر یک بیمارگر، باید روی جمعیت آن بیمارگر بصورت منحصراً

بیمارگر ایفا کند. 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 تجزیه و تحلیل شده و ماهیت مکانیسم تکاملی و واریانس تکاملی اندازه‌گیری شده را نام برد (Dini-Andreote et al., 2009).

جریان ژنی یکی از دیگر نیروهای تکاملی است که نقش بسیار مهمی در تنوع ژنتیکی یک جمعیت دارد. در غیاب جریان ژنی، ریزش ژنتیکی باعث تفاوت در فراوانی آلل‌ها در جایگاه‌های ژنی خنثی درون جمعیت می‌گردد و باعث افزایش تمایز جدایه‌ها در جمعیت‌ها می‌شود (Nourollahi & Hasani, 2017). در جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق تمایز ژنتیکی زیاد وجود دارد. در تحقیق حاضر میزان جریان ژنی (Nm) کم و برابر با  $0/8673$  به‌دست آمد بنابراین تمایز ژنتیکی (Gst) به میزان نسبتاً بالایی  $0/3657$  مشاهده گردید. نتیجه اینکه با جریان ژنی کم قارچ عامل بیماری تقریباً در هر منطقه ثابت بوده و باعث بالا رفتن تمایز ژنتیکی جدایه‌ها در هر منطقه شده است.

بالا بودن تعداد آلل‌های مؤثر و همچنین تنوع و شاخص شانون نشان‌دهنده چند شکلی بالاتر است. در بین جمعیت‌های مورد بررسی شاخص شانون جمعیت تربت‌جام از همه بالاتر بوده که می‌توان گفت جدایه‌های مربوط به این جمعیت احتمالاً قابلیت بیماری‌زایی بیشتری بر روی زعفران دارند و ممکن است مقاومت بیشتری نسبت به قارچ‌کش‌ها داشته باشد. میانگین ضریب شانون محاسبه شده در اینجا برابر با  $0/323$  است. در مطالعه‌ای که توسط قوستا (Ghоста, 2004) بر روی *A. alternata* با استفاده از نشانگر RAMs انجام گرفت، ضریب شانون بدست آمده  $2/79$  بود.

ریزماهورها دارای تکرارهای ساده و پشت سر هم می‌باشند و بدلیل اینکه جهش‌ها سبب ایجاد تنوع در تعدادی از واحدهای تکراری می‌شوند، این تکرارها حتی در درون گونه‌ها نیز چند-شکلی نشان می‌دهند، آن‌ها عمدتاً در مناطق کدکننده و غیر

زیاد بود که علت تنوع زیاد میان جمعیت‌ها ممکن است در اثر عواملی مانند جهش، هیبریداسیون و مهاجرت ژن‌ها که عوامل مؤثر در تغییرات ژنتیکی هستند بوجود آید. همچنین وجود شرایط آب و هوایی مطلوب بیمارگر در هر منطقه ممکن است باعث افزایش و گسترش بیماری شود و این شدت بیماری در مناطق ممکن است با تنوع ژنتیکی همراه باشد، تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت‌های قارچ یک منطقه نشان‌دهنده چندشکلی زیاد جدایه‌های آن منطقه و احتمال پتانسیل ایجاد بیماری‌زایی زیاد بر روی ارقام مختلف زعفران و مقاومت به قارچ‌کش‌ها در این‌گونه مناطق است. در این مطالعه مطابق با تجزیه واریانس مولکولی الگوی توزیع تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها  $71\%$  و واریانس ژنتیکی بین جمعیت‌ها برابر با  $29\%$  گزارش شد. در مطالعه‌ای مشابه این تحقیق که بر روی تنوع ژنتیکی قارچ *A. alternata* در سال ۱۳۹۲ در خوزستان با استفاده از نشانگر ریزماهوره انجام گردید تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها  $14\%$  و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها  $86\%$  گزارش گردید (Nourollahi & Hasani, 2017). تجزیه و تحلیل PCoA یا آزمون تجزیه به مؤلفه اصلی یکی از روش‌های گروه‌بندی چند متغیره بر اساس ضرایب تشابه است. به نظر می‌رسد که این روش در تمایز میان گروه‌های اصلی مفید باشد در حالی که تجزیه خوشه‌ای وضوح بیشتری میان جمعیت‌های نزدیک به هم را نشان می‌دهد (Abdel-Sattar et al., 2003). نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که جدایه‌ها براساس منطقه جغرافیایی تفکیک شده‌اند. نتایج بدست آمده از PCoA و دندروگرام در اینجا با یکدیگر منطبق بودند و در هر دو مورد نمی‌توان الگوی تفکیک شده‌ای از جمعیت‌ها مشاهده کرد همچنین پراکنش جدایه‌ها در تمام محورهای مختصات معرف تنوع ژنتیکی زیاد جدایه‌ها در جمعیت است و عدم پراکندگی مناسب نشانگر بر روی کل ژنوم یکی از دلایل عدم تفکیک آن‌ها می‌باشد. همچنین ممکن است گیاه میزبان نقش مهمی در تنوع ژنتیکی

تکنیک ریزماهواره برای این تحقیق استفاده گردید که تنوع و تغییرات بیمارگر را به روشنی بیان نماید و در آینده مطابق با این تنوع مطالعات مختلف در زمینه اصلاح ارقام با اطمینان بیشتری انجام گیرد از طرف دیگر رعایت قرنطینه در این منطقه از کشور به خاطر تنوع بالای این گونه قارچ و همچنین شرایط محیطی پیشنهاد می‌شود تا از اپیدمی شدن این قارچ جلوگیری شود.

کدکننده در DNA و به طور تصادفی در سراسر ژنوم توزیع شده‌اند (Zane et al., 2002). جایگاه‌های ریزماهواره با تعداد تکرارهای بسیار بزرگ چندشکلی بیشتری نشان می‌دهند. از تکنیک‌های ریز ماهواره و همچنین نشانگرهایی که تعداد آلل بیشتری را نشان می‌دهند می‌توان بصورت گسترده در ارزیابی‌های تنوع ژنتیکی جمعیت استفاده کرد، از این رو از

## منابع

- Abdel-Sattar, M.A., Khalil, M.S., Mohmed, I.N., Abd-Elsalam, K.A., and Verreet, J.A. 2003. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. *African Journal of Biotechnology* 2 (3): 51-56.
- Behnia, M. 1990. *Saffron Agronomy*. Tehran University Publications. Tehran, Iran. 480 p.
- Chaerani, R.R., Groenwold, P., and Stam, R.E. 2007. Assessment of early blight *Alternaria solani* resistance in tomato using a droplet inoculation method. *Journal of General Plant Pathology* 73 (2): 96-103.
- 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 (3): 670-677.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Ghosta, Y. 2004. A taxonomic study on the genus *Alternaria* from Iran: doctoral thesis. Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran. (In Persian).
- Izadpanah, K., Ashkan, M., Banihashemi, Z., Rahimian, H., and Minasian V. 2011. *Plant Pathology*. Volume II, Fifth Edition (translation), Tehran Aeezh publication. 360 p. (In Persian).
- 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.
- 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 (2): 416-424.
- 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 (3): 397-401.
- 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 (4): 233-240.
- Martinezi, 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 (4): 399-409.

- 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 (1): 51-65.
- 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 (3): 286-292.
- Nagaty, M.A., El-Assal, E.D., and Rifaat, M.M. 2011. Characterization of the genetic diversity of peach cultivars in taif by RAPD-PCR, American Journal of Applied Sciences 8 (7): 708-715.
- Naghavi, M., Gharayazi B., and Hosseini, G. 2005. Molecular Markers. Tehran University Press. 350 p. (In Persian).
- 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 (1): 29-37. (In Persian).
- Nourollahi, K., and Hasani, M. 2017. Genetic diversity of *Alternaria alternata* causal agent of early blight of tomato in Khuzestan province using SSRs marker. Journal of Plant Protection 30 (4): 573-586.
- Okhvat, M., and Javad Zad, S. 2005. Mycology and Fungi Diseases in Plants. Vol 1, Aeej Publication, Tehran, Iran.
- 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 (19): 2537-2539.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.02, Exeter Software, Setauket, NY. USA.
- Sharma, T.R.T., and Tewari, J.P. 1998. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers, Mycological Research 102 (7): 807-814.
- Timmer, L.W., Peever, T.L., Solel, Z., and Akimitsu, K. 2003. *Alternaria* diseases of citrus – novel pathosystems, Phytopathologia Mediterranea 42 (2): 99-112.
- Tran-Dinh, N., and Hocking, A. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for *Alternaria alternata*. Molecular Ecology 6 (2): 405-407.
- Van der, Waals, J.E., Korsten, L., and Slippers, B. 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. Plant disease 88 (9): 959-964.
- 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 (3): 338-396.
- 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 (5): 813-821.
- 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/MSLFI LES/HPGL.EXE.
- Zane, L., Bargelloni, L., and Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation, a review. Molecular Ecology 11 (1) : 1-16.

## Genetic Diversity of *Alternaria alternata* the Causal Agent of Saffron Corm Rot in Southern and Razavi Khorasan Provinces Using Microsatellite Markers

Ghasem Najari<sup>1</sup> and Khoshnood Nourollahi<sup>2\*</sup>

Submitted: 4 January 2018

Accepted: 26 June 2018

Najari, Gh., and Nourollahi, Kh. 2019. Genetic Diversity of *Alternaria alternata* the Causal Agent of Saffron Corm Rot in Southern and Razavi Khorasan Provinces Using Microsatellite Markers. *Saffron Agronomy & Technology* 7(3): 331-345.

### Abstract

*Alternaria* leaf spot caused by *Alternaria alternata* is one of the most important plant diseases in the world. In order to determine genetic diversity, 50 samples were collected from saffron farms of different regions in the Razavi Khorasan province (Kashmar, Torbat Jam, Torbat Heydarieh, Mahvellat, Bardaskan) and South Khorasan province (Qaen, Saraian, Brjand). *A. alternata* isolates were isolated with Potato Dextrose Agar media, Molecular test was carried out with a set of five pairs of SSR primers after purification and identification of isolates. A total of 22 alleles were produced by SSR primers with an average of 11.1 alleles in all populations. The highest amounts of alleles were related to locus Mavellat with 14 alleles and lowest of Saraian, Birjand and Qaen with 10 alleles. A Comparison of genetic diversity parameters in eight population showed that Torbat Jam population has the highest genetic diversity but lower values were estimated for Qaenat. The highest and lowest genetic distance was detected between Qaen-Mahvellat (0.328) and Bardaskan-Mahvellat (0.054), respectively. Based on dendrogram of populations revealed two distinct groups, one group contained Qaen and the other Birjand, Mavellat, Saraian, Bardaskan, Kashmar, Torbat Jam and Torbat Heydarieh. Analysis of molecular variance showed that 71 percent of the genetic diversity belongs to within populations and 29% is located among populations. There was the high genetic similarity between isolates from different regions. The results in this study will be useful in breeding for saffron resistant cultivars and developing necessary control measures.

**Keywords:** Genetic Similarity, Molecular Marker, SSR.

---

1 - Master of plant protection department, Ilam University

2 - Associate professor of plant protection department, Ilam University

(\*- Corresponding author. Email: k.nourollahi@ilam.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2018.113230.1277