



## تعیین فراوانی آلل های تیپ های آمیزشی در جمعیت های آلترناریا آلترناتا مرکبات جنوب کشور با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز

علیرضا نیازمند<sup>۱\*</sup>، شهاب حاج منصور<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> استادیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، آکارشناس ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** تاکنون فرم جنسی برای گونه آلترناریا آلترناتا گزارش نشده است. اما سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی و ریخت شناسی مشاهده شده در بین جمعیت های این قارچ بیانگر وجود مکانیسم های ناشناخته و مرموز تولید مثل جنسی است. در قارچ های آسکومیستی مشابه با این قارچ، تولید مثل جنسی توسط یک ژن گاه منفرد به نام MATI کنترل می شود که دارای دو آلل MATI-1 و MATI-2 می باشند. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی و نحوه پراکنش آلل های ژن MATI در جمعیت قارچ آلترناریا آلترناتا مرکبات جنوب کشور انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه مقطعی - توصیفی، استخراج DNA با روش CTAB، از ریشه های جوان نمونه های برگگی ۴۵ جدایه قارچ آلترناریا آلترناتا که قبلاً از گونه ها و ارقام مختلف باغات مرکبات جنوب کشور جمع آوری و خالص سازی شده بودند، انجام گردید. به منظور تعیین تیپ های آمیزشی، از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ناحیه های MATI-1 و MATI-2 در واکنش زنجیره ای پلی مراز استفاده شد.

**یافته ها:** جدایه های تیپ های آمیزشی MATI-1 و MATI-2 به ترتیب تکثیر قطعات ۶۴۲ و ۸۸۲ جفت بازی را داشتند. به طور کلی تیپ های آمیزشی در این ناحیه از فراوانی مساوی برخوردار نبودند. در مجموع، ۱۶ جدایه دارای تیپ آمیزشی MATI-1 و ۲۹ جدایه دارای تیپ آمیزشی MATI-2 بودند. فراوانی های آمیزشی در شهرستان های مختلف و در گونه های مختلف مرکبات متفاوت بود.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که در برخی از مناطق جنوب کشور و در برخی از میزبان ها عوامل ناشناخته ای در القای مرحله جنسی قارچ آلترناریا آلترناتا دخالت دارند.

**واژگان کلیدی:** تولید مثل جنسی، تیپ آمیزشی، واکنش زنجیره ای پلی مراز، ژن MATI-1، ژن MATI-2.

پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۵

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۴

### مقدمه

آلترناریایی راف لمون، پوسیدگی سیاه آلترناریایی پس از برداشت میوه و بیماری مانچای شاخساره ای در لیمو است. عامل سه بیماری اول قارچ آلترناریا آلترناتا (*Alternaria alternata*) و عامل بیماری مانچای شاخساره ای در لیمو آلترناریا لیمی کولا (*Alternaria limicola*) می باشد (۱). تولید مثل جنسی و تولید آسکوسپور در قارچ های آسکومیست رشته ای مانند آلترناریا آلترناتا توسط یک ژن گاه منفرد که

بیماری لکه برگگی مرکبات توسط قارچ آلترناریا (*Alternaria*) به وجود می آید و یکی از بیماری های مهم مرکبات است که در بسیاری از نقاط جهان شیوع دارد. این قارچ عامل تولید بیماری های لکه قهوه ای آلترناریایی نارنگی، لکه برگگی

\* آدرس برای مکاتبه: جهرم، سایت دانشگاهی مهدی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی. تلفن: ۰۹۱۷۷۱۰۴۸۷۷۰ پست الکترونیک: niazmand2003@yahoo.com

آلترناریا (که گونه‌های غیر جنسی فرض می‌شوند) انجام گرفته است. آری (Arie) و همکاران در سال ۲۰۰۰ بیان ژن‌های تیپ آمیزشی در گونه آلترناریا آلترناتا را گزارش نمودند (۴). نتایج به دست آمده از تحقیقات نشان می‌دهد که این نواحی ژنتیکی در این قارچ‌ها به طور طبیعی در حال تکامل و انتخاب نیستند و این موضوع در رابطه با قارچ‌هایی که تولید مثل جنسی ندارند قابل انتظار است.

همچنین پیش‌بینی می‌شود که در این گونه از قارچ‌ها ژن‌های تیپ آمیزشی غیر فعال باشند. وجود این نوع الگوهای انتخابی برای چنین ژن‌هایی بیانگر وجود یک سیکل جنسی هم‌زمان و مرموز در این قارچ‌ها است. همچنین وجود این مکان‌های ژنی در این قارچ‌ها بیانگر وجود سایر عملکردهای حیاتی این ژن‌ها درون سلول است.

تحقیقات انجام گرفته روی جدایه‌های آلترناریا آلترناتا جمع‌آوری شده از باغات مرکبات فلوریدا نشان می‌دهد که هر دو نوع آلل مربوط به ژن‌های تیپ‌های آمیزشی (*MATI-1* و *MATI-2*) با نسبت‌های مختلف در جمعیت‌های این قارچ وجود دارد (۱۳ و ۱۴). مطالعات مربوط به ساختار جمعیتی قارچ آلترناریا آلترناتا مرکبات نشان می‌دهد که جمعیت این قارچ یک جمعیت غیر جنسی می‌باشد (۱۵) و (۱۶). اما تا کنون سیستم‌های مربوط به تیپ‌های آمیزشی این گونه قارچی مورد مطالعه جدی قرار نگرفته است. تحقیقات انجام شده بر روی اعضای اسپور کوچک قارچ آلترناریا شامل جدایه‌هایی از عوامل ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای مرکبات نشان داده است که نوترکیبی‌های ژنتیکی در نواحی به خصوصی از ژنوم قارچ آلترناریا آلترناتا مرکبات اتفاق می‌افتد (۱۷).

مرکبات گونه‌هایی از گیاهان همیشه سبز هستند که در مدت سالیان طولانی مورد حمله قارچ آلترناریا قرار گرفته‌اند و واکنش‌های متقابلی میان این قارچ و میزبان اتفاق افتاده که این موضوع قارچ آلترناریای مرکبات را مدل خوبی برای انجام تحقیقات مربوط به تیپ‌های آمیزشی می‌نماید. تعیین تیپ‌های آمیزشی و فراوانی آلل‌های این ژن‌ها در جمعیت‌های قارچ آلترناریا آلترناتا مرکبات امکان فهم نحوه

MAT نامیده می‌شود کنترل می‌گردد. اطلاعات موجود نشان می‌دهد که سیستم تیپ‌های آمیزشی در این قارچ‌ها دو قطبی بوده و این ژن دارای دو آلل مختلف با توالی‌های متفاوت می‌باشد. به دلیل وجود تفاوت در توالی‌های این دو آلل در اصطلاح به آن‌ها ایدیومورف (*idiomorph*) می‌گویند (۲).

در قارچ‌های هتروتال آسکومیستی، تولید مثل جنسی توسط یک ژن‌گاه به نام *MATI* کنترل می‌شود. برای ژن‌گاه *MATI* دو ایدیومورف *MATI-1* و *MATI-2* شناخته شده است (۳). تعداد زیادی از قارچ‌های ناقص بیماری زای گیاهی همانند گونه‌های مختلف جنس آلترناریا حامل ژن *MATI* هستند و توانایی بیان شدن را دارا می‌باشند (۴). وجود این ژن بیانگر این امر است که امکان وجود تولید مثل جنسی در قارچ آلترناریا وجود دارد. همچنین وجود فرم جنسی در رابطه با برخی از گونه‌های آلترناریا مانند آلترناریا اینفکتوریا (*Alternaria infectoria*) بیانگر آن است که بسیاری از گونه‌های آلترناریا دارای اجدادی با فرم جنسی هستند (۵).

بسیاری از گونه‌های آلترناریا از طریق تولید مثل غیر جنسی تکثیر می‌شوند (۶ و ۷). تا کنون فرم جنسی برای بسیاری از گونه‌های این قارچ گزارش نشده و همچنین در شرایط آزمایشگاهی نیز امکان آمیزش و تولید مثل جنسی برای این قارچ فراهم نگردیده است (۸ و ۹). هر چند به ظاهر تولید مثل جنسی در این قارچ‌ها مشاهده نشده است، اما وجود تفاوت‌های زیاد ژنتیکی در جمعیت‌های این قارچ با استفاده از نشانگرهای مختلف مولکولی گزارش شده است (۱۰ و ۱۱). از تحقیقات جدید انجام گرفته در رابطه با مراحل جنسی قارچ‌هایی که قبلاً جزو قارچ‌های ناقص به حساب می‌آمدند، مانند قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس (*Aspergillus fumigatus*) می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که تفاوت‌های بسیار زیاد ژنتیکی که در جمعیت‌های قارچ آلترناریا آلترناتا مشاهده می‌شود ناشی از مکانیسم‌های ناشناخته و مرموز تولید مثل جنسی یا مکانیسم‌های نوترکیبی میتوزی مانند سیکل شبه جنسی است (۱۲). چندین مطالعه در رابطه با نقش ژن‌های تیپ آمیزشی (*Mating type genes*) در رابطه با گونه‌های مختلف جنس

**جدول ۱:** لیست جدایه‌های قارچ آلترناریا آلترناتا جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جنوب کشور.

ردیف	نام جدایه	علامت اختصاری جدایه‌ها	محل جمع‌آوری
۱	توسرخ (پرتقال)	Alt1	خوزستان
۲	مینولا (نارنگی)	Alt2	خوزستان
۳	نارنج	Alt3	خوزستان
۴	پر (نارنگی)	Alt4	خوزستان
۵	تانجلو (نارنگی)	Alt5	خوزستان
۶	لیس بن (پرتقال)	Alt6	خوزستان
۷	دبه (بالنگ محلی)	Alt7	خوزستان
۸	کینو (نارنگی)	Alt8	خوزستان
۹	پارسون براون (پرتقال)	Alt9	خوزستان
۱۰	مارس (پرتقال)	Alt10	خوزستان
۱۱	فراست والنسیا (پرتقال)	Alt11	جهرم
۱۲	کمپل والنسیا (پرتقال)	Alt12	جهرم
۱۳	پارسون براون (پرتقال)	Alt13	جهرم
۱۴	سالونسیا	Alt14	جهرم
۱۵	پاین ابل	Alt15	جهرم
۱۶	تامسون ناول (پرتقال)	Alt16	جهرم
۱۷	هاملین (پرتقال)	Alt17	جهرم
۱۸	مارس (پرتقال)	Alt18	جهرم
۱۹	تاروسکو	Alt19	جهرم
۲۰	اتودارالی ناول	Alt20	جهرم
۲۱	نارنگی کینو	Alt21	بندرعباس
۲۲	لیمو ترش	Alt22	بندرعباس
۲۳	نارنج خوشه‌ای	Alt23	بندرعباس
۲۴	پرتقال	Alt24	بندرعباس
۲۵	پرتقال پرچال	Alt25	بندرعباس
۲۶	گریپ فروت سفید	Alt26	بندرعباس
۲۷	گریپ فروت قرمز	Alt27	بندرعباس
۲۸	لیمو شیرین شیرازی	Alt28	بندرعباس
۲۹	پرتقال والنسیا	Alt29	بندرعباس
۳۰	پرتقال واشنگتن ناول	Alt30	بندرعباس
۳۱	پرتقال واشنگتن ناول	Alt31	بندرعباس
۳۲	پیچ (نارنگی)	Alt32	جهرم
۳۳	پونکن (نارنگی)	Alt33	جهرم
۳۴	لی (نارنگی)	Alt34	جهرم
۳۵	کلمانتین (نارنگی)	Alt35	جهرم
۳۶	کینو (نارنگی)	Alt36	جهرم
۳۷	اوسه اول (نارنگی)	Alt37	جهرم
۳۸	فورچون (نارنگی)	Alt38	جهرم
۳۹	محلی (نارنگی)	Alt39	جهرم
۴۰	پرتقال نافی	Alt40	ممسنی
۴۱	لیموتروش	Alt41	ممسنی
۴۲	پرتقال قاشقی	Alt42	ممسنی
۴۳	لیمو شیرین ویکوا	Alt43	ممسنی
۴۴	لیمو شیرین معمولی	Alt44	ممسنی
۴۵	پرتقال والنسیا (R8-2)	Alt45	ممسنی

تکامل بیماری زایی و سازگاری جدایه‌های مختلف این قارچ با محیط‌ها و میزبانان جدید را امکان‌پذیر می‌نماید و امکان مبارزه بهتر با این قارچ را فراهم می‌آورد. تا کنون در رابطه با تعیین تیپ‌های آمیزشی این قارچ در ایران تحقیقی انجام نگرفته است. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی و نحوه پراکنش آلل‌های MATI-1 و MATI-2 جمعیت‌های قارچ آلترناریا آلترناتا در استان‌های مختلف جنوبی کشور و بر حسب گونه میزبان بود.

### مواد و روش‌ها

**الف) نمونه‌های مورد استفاده:** در این مطالعه در مجموع از ۴۵ نمونه برگی قارچ آلترناریا آلترناتا موجود در کلکسیون قارچ‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، که قبلاً از مناطق مختلف مرکبات کاری جنوب کشور و از گونه‌های مختلف مرکبات جمع‌آوری و اثبات بیماری زایی شده بودند، استفاده گردید (جدول ۱).

**ب) تکثیر جدایه‌ها:** از محیط کشت PDA (سیب زمینی دکستروز آگار، دیفکو آمریکا) به منظور تکثیر جدایه‌ها استفاده گردید. قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ از لوله‌های آزمایش برداشته شد و بر روی محیط کشت PDA درون تشتک‌ها قرار داده شد. تشتک‌ها به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ثابت ۲۵ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. **ج) خالص‌سازی جدایه‌ها:** از روش تک اسپور برای خالص‌سازی جدایه‌ها استفاده گردید. تشتک‌های حاوی جدایه‌های خالص شده قارچ به مدت یک هفته درون گرمخانه در دمای ثابت ۲۵ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. تمامی مراحل در زیر دستگاه هود لامینار و در کنار شعله چراغ الکلی انجام گرفت.

**د) استخراج DNA:** به منظور استخراج DNA از ریشه‌های جوان قارچ استفاده گردید. جدایه‌های خالص شده قارچ در نقاط مختلف یک تشتک حاوی محیط کشت PDA قرار داده شدند. این تشتک‌ها درون گرمخانه به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سپس ریشه‌های سفید قارچ قبل از تغییر رنگ توسط تیغ جراحی استریل از سطح محیط کشت خراش دهی شدند. به نحوی که تا حد امکان تنها ریشه‌های قارچ بدون محیط کشت برداشته شدند.

AA-MAT 1-867 نشان داد که این آغازگرها توانستند که در دمای اتصال ۵۵ درجه سلیسیوس یک قطعه ۶۴۲ جفت بازی را در جدایه‌هایی که دارای تیپ آمیژی *MAT1-1* بودند را تکثیر کنند (شکل ۱). جدایه‌های نارنج خوزستان، نارنگی رقم پر خوزستان، پرتقال رقم لیسبون خوزستان، نارنگی رقم کینو خوزستان، پرتقال رقم پارسون براون جهرم، پرتقال رقم سالوتسیا جهرم، پرتقال رقم هاملین جهرم، پرتقال رقم تارسکو جهرم، نارنگی رقم کینو بندرعباس، گریپ فروت تو سفید بندرعباس، نارنگی رقم پیچ جهرم، نارنگی رقم پونکن جهرم، نارنگی رقم کلمانتین جهرم، نارنگی رقم اوسه اولا جهرم، نارنگی رقم فورچون جهرم و پرتقال رقم نافی ممسنی (جمعاً ۱۶ جدایه) جزو جدایه‌هایی بودند که دارای تیپ آمیژی *MAT1-1* بودند.

ب) انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز با آغازگرهای *MAT1-2* ایدیومورف: نتایج حاصل از تکثیر DNA جدایه‌های قارچی با استفاده از آغازگرهای AA-MAT 2-1691 و AsM1-8 نشان داد که این آغازگرها توانستند که در دمای اتصال ۵۸ درجه سلیسیوس یک قطعه ۸۸۲ جفت بازی را در جدایه‌هایی که دارای تیپ آمیژی *MAT1-2* بودند را تکثیر کنند (شکل ۲). جدایه‌های پرتقال رقم تو سرخ خوزستان، نارنگی رقم مینولا خوزستان، نارنگی رقم تانجلو خوزستان، بالنگ خوزستان، پرتقال رقم پارسون براون خوزستان، پرتقال رقم مارس خوزستان، پرتقال رقم فراست والنسیا جهرم، پرتقال رقم کمپل والنسیا جهرم، پرتقال رقم پایین اپل جهرم، پرتقال رقم تامسون ناول جهرم، پرتقال رقم مارس جهرم، پرتقال رقم اتودارلی ناول جهرم، لیمو ترش بندرعباس، نارنج خوشه ای بندرعباس، پرتقال بندرعباس، پرتقال رقم پرچال بندرعباس، گریپ فروت تو قرمز بندرعباس، لیمو شیرین بندرعباس، پرتقال

سپس ریشه‌ها درون یک هاون کوچک استریل قرار گرفتند و استخراج DNA با روش CTAB انجام پذیرفت (۱۸ و ۱۹). به منظور کنترل کیفی و میزان خلوص نمونه‌های DNA از الکتروفورز استفاده شد.

ه) انجام PCR در این مطالعه از آغازگرهای اختصاصی ALMAT-L/AA-MAT1-867 برای تکثیر ناحیه *MAT1-1* و آغازگرهای اختصاصی AA-MAT2-1691/AsM1-8 برای تکثیر ناحیه *MAT1-2* استفاده گردید (جدول ۲).

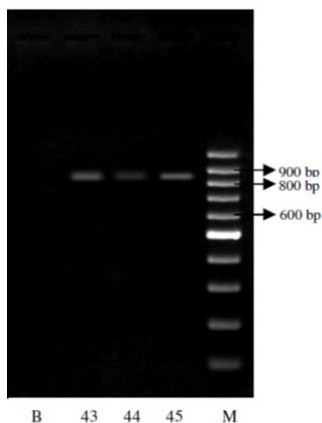
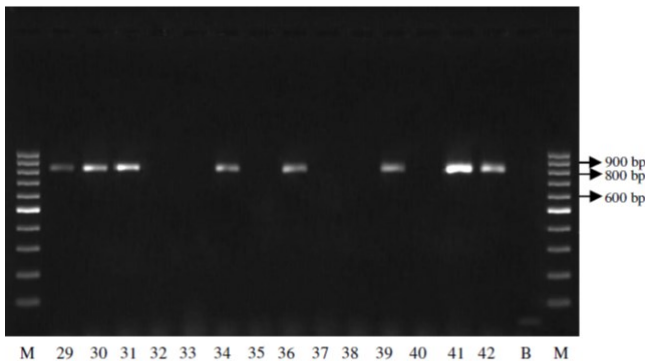
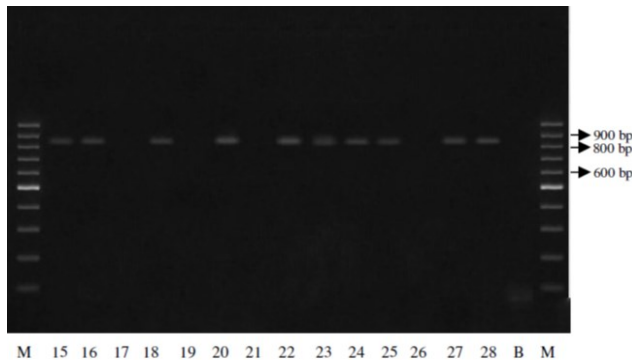
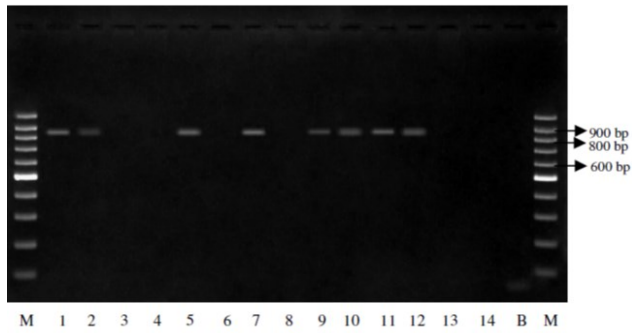
واکنش PCR با حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از بافر 1x PCR، ۱ میکرولیتر از dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر از  $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم *Taq DNA polymerase* و ۱ میکرولیتر از DNA الگو انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر بیوراد (Bio-Rad، آمریکا) با شرایط دمایی ۴ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ و ۵۸ درجه سلیسیوس (بر حسب نوع آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شدند. سپس ژل‌ها در زیر دستگاه UV ترانس ایلومیناتور مورد مطالعه قرار گرفتند.

### یافته‌ها

الف) انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز با آغازگرهای ایدیومورف *MAT1-1*: نتایج حاصل از تکثیر DNA جدایه‌های قارچی با استفاده از آغازگرهای ALMAT-L و

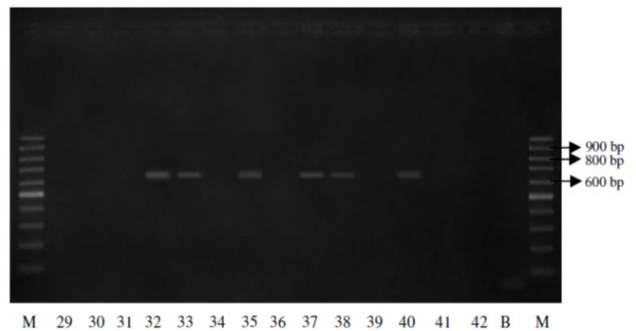
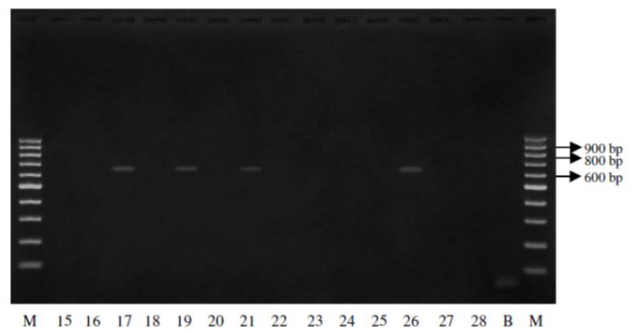
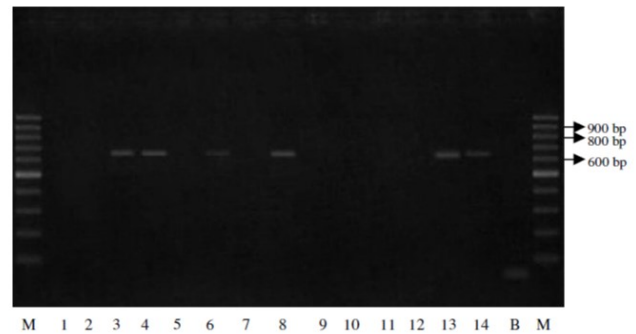
جدول ۲: توالی آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش برای تکثیر نواحی *MAT1-1* و *MAT1-2* (۴).

اندازه قطعه (جفت باز)	توالی (3---5)	نام آغازگر	ناحیه مورد تکثیر
۶۴۲	GCAAGATTCTAGGCCCAACG	ALMAT-L	MAT1-1-1
	TGCGGTGGGGAGTAGTGT	AA-MAT1-867	
۸۸۲	CAGCACCCCGACTACAAGTAT	AA-MAT2-1691	MAT1-2-1
	GGTCGTGAGTCGTGATCG	AsM1-8	



**شکل ۲:** الگوی باندهای تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای MAT1-2 F/R در دمای اتصال ۵۸ درجه سلیسیوس. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، (B) چاهک خالی، ستون‌های ۱، ۲، ۵، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۴، ۳۶، ۳۹، ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴ و ۴۵) نمونه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-2.

رقم والنسیا بندرعباس، پرتقال رقم واشنگتن ناول بندرعباس، نارنگی رقم لی جهرم، نارنگی رقم کینو جهرم، نارنگی رقم محلی جهرم، لیمو شیرین ممسنی، پرتقال رقم برگ قاشقی ممسنی، لیمو شیرین رقم ویکوا ممسنی، لیمو شیرین معمولی ممسنی و پرتقال رقم والنسیا ممسنی (جمعاً ۲۹ جدایه) جزو جدایه‌هایی بودند که دارای تیپ آمیزشی MAT1-2 بودند. (ج) بررسی توزیع تیپ‌های آمیزشی: در مجموع از ۴۵ جدایه قارچی مورد بررسی ۳۶ درصد جدایه‌ها دارای تیپ آمیزشی MAT1-1 و ۶۴ درصد جدایه‌ها دارای تیپ آمیزشی



**شکل ۱:** الگوی باندهای تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای MAT1-1 F/R در دمای اتصال ۵۵ درجه سلیسیوس. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، (B) چاهک خالی، ستون‌های ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۳، ۱۴، ۱۷، ۱۹، ۲۱، ۲۶، ۳۲، ۳۳، ۳۵، ۳۷، ۳۸ و ۴۰) نمونه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-1.

گریپ فروت از توزیع یکسانی برخوردار بودند. جدایه‌های جمع‌آوری شده از ارقام مختلف لیموشیرین، لیموترش و بالنگ فقط دارای تیپ آمیزشی MAT1-2 بودند. در رابطه با جدایه‌های جمع‌آوری شده از سایر ارقام مرکبات توزیع درصد فراوانی آلل‌های تیپ‌های آمیزشی تفاوت بود. اما جدایه‌های ارقام مختلف پرتقال درصد فراوانی آلل MAT1-2 بیشتر بود، اما در مورد ارقام مختلف نارنگی درصد فراوانی آلل MAT1-1 بیشتر بود.

ه) فراوانی تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان‌ها به تفکیک ارقام مرکبات: نتایج نشان داد که در خوزستان فراوانی آلل MAT1-2 در پرتقال بیشتر از آلل MAT1-1 می‌باشد و فراوانی هر دو آلل روی نارنگی یکسان است. در شهرستان جهرم نیز در پرتقال فراوانی آلل MAT1-2 بیشتر از آلل MAT1-1 و در نارنگی فراوانی آلل MAT1-1 بیشتر از MAT1-2 بود. در بندر عباس فراوانی آلل MAT1-2 در پرتقال و لیمو ۱۰۰ درصد و در نارنگی فراوانی آلل MAT1-1 ۱۰۰ درصد بود. در شهرستان ممسنی نیز آلل MAT1-2 در هر دو میزبان پرتقال و لیمو فراوانی ۱۰۰ درصد داشت (جدول ۵).

### بحث

در این مطالعه از جفت آغازگرهای ALMAT-L/AA-MAT1-867 و AA-MAT2-1691/AsM1-8 به ترتیب برای تشخیص

جدول ۵: درصد فراوانی تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان‌ها به تفکیک گونه مرکبات.

نام شهرستان	درصد فراوانی		
	MAT 1-2	MAT 1-1	
خوزستان	پرتقال	۷۵	۱۵
	نارنگی	۵۰	۵۰
جهرم	پرتقال	۶۰	۴۰
	نارنگی	۳۷/۵	۶۲/۵
بندر عباس	پرتقال	۱۰۰	-
	نارنگی	-	۱۰۰
ممسنی	لیمو	۱۰۰	-
	پرتقال	۱۰۰	-
	لیمو	۱۰۰	-

MAT1-2 بودند. بنابراین توزیع تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های قارچ آلترناریا آلترناتا مرکبات جنوب کشور از توزیع یکسانی برخوردار نبودند و جدایه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-2 از فراوانی بیشتری داشتند.

د) فراوانی تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان‌ها و ارقام مرکبات: فراوانی آلل‌های MAT1-1 و MAT1-2 جدایه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان‌ها و ارقام مختلف مرکبات در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است. توزیع درصد فراوانی آلل‌های تیپ‌های آمیزشی در شهرستان‌های مختلف مورد بررسی تنها در جدایه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان جهرم دارای توزیع یکسانی داشت و در مورد جدایه‌های سایر شهرستان‌ها توزیع یکسانی نداشتند. به طور کلی درصد فراوانی آلل MAT1-2 به جز در شهرستان جهرم، در سایر شهرستان‌ها فراوانی بیشتری داشت. توزیع درصد فراوانی آلل‌های تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های جمع‌آوری شده از ارقام مختلف مرکبات نشان داد که درصد فراوانی آلل‌های MAT1-1 و MAT1-2 در رابطه با جدایه‌های جمع‌آوری شده از نارنج و جدول ۳: درصد فراوانی آلل‌ها تیپ‌های آمیزشی به تفکیک شهرستان.

شهرستان	آلل‌های مورد بررسی	
	درصد فراوانی MAT1-1	درصد فراوانی MAT1-2
خوزستان	۴۰	۶۰
جهرم	۵۰	۵۰
بندر عباس	۱۸	۸۲
ممسنی	۱۶	۸۴

جدول ۴: درصد فراوانی آلل‌های تیپ‌های آمیزشی به تفکیک نوع محصول.

میزبان	آلل‌های مورد بررسی	
	درصد فراوانی MAT1-1	درصد فراوانی MAT1-2
پرتقال	۲۷	۷۳
نارنگی	۶۱	۳۹
نارنج	۵۰	۵۰
لیمو شیرین	-	۱۰۰
لیمو ترش	-	۱۰۰
گریپ فروت	۵۰	۵۰
بالنگ	-	۱۰۰

نتایج تحقیق بیانگر وجود نسبت‌های یکسان ۱:۱ فراوانی هر دو تیپ آمیزشی در جمعیت جدایه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان جهرم بود. توزیع برابر تیپ‌های آمیزشی برای رینکوسپوریوم سیکالیس (*Rhynchosporium secalis*) که تاکنون فرم جنسی آن شناسایی نشده، گزارش گردیده است (۱۱). توزیع برابر تیپ‌های آمیزشی در جمعیت‌های یک قارچ بیانگر وجود تولید مثل جنسی داخل جمعیت آن قارچ است (۲۱). فراوانی برابر تیپ‌های آمیزشی در جمعیت مزرعه‌ای یک قارچ، بیانگر کارا بودن ژن‌های تیپ‌های آمیزشی است. یا به عبارت دیگر بیانگر وقوع تولید مثل جنسی در جمعیت آن قارچ می‌باشد (۲۲).

مطالعات انجام گرفته بر روی ساختار جمعیتی قارچ آلترناریا آلترناتا عامل بیماری لکه قهوه‌ای مرکبات نشان داده است که روش تولید مثل این قارچ به صورت غیرجنسی یا کلونال است (۱۵ و ۱۶).

دلایل عدم وجود تولید مثل جنسی در این قارچ شامل وجود نداشتن فرم جنسی در طبیعت و تولید ناموفق مرحله جنسی این قارچ در شرایط آزمایشگاهی است (۸ و ۹). فرضیه‌ای که در این خصوص مطرح می‌شود احتمال وجود تشکیل مرحله جنسی پنهان یا انجام نوترکیبی از طریق سیکل‌های شبه جنسی در این قارچ می‌باشد (۴).

همان‌گونه که در این تحقیق مشخص گردید به جز شهرستان جهرم در سایر شهرستان‌های مورد مطالعه فراوانی برابر تیپ‌های آمیزشی در جمعیت این قارچ مشاهده نشد. هرچند که غالبیت تیپ‌های آمیزشی در شهرستان‌های مختلف متفاوت بود. این امر بیانگر وجود یک انتخاب طبیعی وابسته به تیپ‌های آمیزشی در شهرستان‌های مختلف است.

استیوارت (Stewart) و همکاران در سال ۲۰۱۳، نشان دادند که این نوع از الگوهای انتخاب می‌تواند توسط وجود سیکل‌های جنسی پنهانی که در سال‌های اخیر اتفاق افتاده، سیکل‌های تولید مثل جنسی که احتمالاً در زمان‌های گذشته اتفاق افتاده و یا درگیر بودن ژن‌های مربوط به تیپ‌های آمیزشی در سایر عملکردهای حیاتی سلول قابل توصیف باشد. عدم وجود چرخه

تیپ‌های آمیزشی MAT1-1 و MAT1-2 جدایه‌های قارچ آلترناریا آلترناتا استفاده گردید. سایر محققین نیز از این دو جفت آغازگر برای تشخیص تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های قارچ آلترناریا آلترناتا گلابی ژاپنی (۴) و مرکبات (۲۰) استفاده نموده‌اند. در تحقیق انجام شده توسط استیوارت (Stewart) و همکاران در سال ۲۰۱۳، مشابه با نتایج حاصل از این تحقیق یک قطعه ۶۴۲ و ۸۸۲ جفت بازی به ترتیب برای تیپ‌های آمیزشی MAT1-1 و MAT1-2 تکثیر گردید. اما در تحقیق انجام گرفته توسط آری (Arie) و همکاران در سال ۲۰۰۰، برای تیپ‌های آمیزشی MAT1-1 و MAT1-2 به ترتیب قطعاتی با اندازه‌های ۱/۹ و ۲/۲ کیلو جفت باز تکثیر شد. از آنجایی که در هر جدایه مورد بررسی تنها یکی از ژن‌های تیپ آمیزشی موجود بود، بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که قارچ مورد بررسی یک قارچ هتروتال است.

در این پژوهش پراکنش و فراوانی آلل‌های تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های قارچ آلترناریا آلترناتا مرکبات جنوب کشور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو تیپ آمیزشی MAT1-1 (۳۶٪) و MAT1-2 (۶۴٪) در جمعیت این گونه قارچی از مرکبات جنوب کشور وجود دارند و فراوانی MAT1-2 نسبت به MAT1-1 بیشتر بود. استیوارت (Stewart) و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تحقیق انجام گرفته بر روی جدایه‌های قارچ آلترناریا آلترناتا جمع‌آوری شده از باغات مرکبات فلوریدا مشاهده نمودند که تمامی ۱۰۵ جدایه جمع‌آوری شده از نوع تیپ آمیزشی MAT1-2 می‌باشند (۲۰). در تحقیق دیگری جدایه‌های جمع‌آوری شده قارچ آلترناریا آلترناتا از باغات نارنگی مینولای قسمت‌های مرکزی ایالت فلوریدای آمریکا که بر اساس توالی یابی‌های ژن داخلی اندوپلی‌گالاکتوروناز (endoPG) به دو زیر جمعیت SH1 و SH4 طبقه‌بندی شده بودند هر دو تیپ آمیزشی مشاهده گردید. هر چند که در زیر جمعیت SH1 تیپ آمیزشی MAT1-1 و در زیر جمعیت SH4 تیپ آمیزشی MAT1-2 غالب بود (۱۳).

میزبان می‌شود. بنابراین عوامل بیماری‌زایی که توانایی تولید بیماری روی گیاه نارنج را دارا باشند باید از نظر ژنتیکی نسبت به سایر جدایه‌ها متفاوت باشند. شاید وقوع تولید مثل جنسی در بین جدایه‌های قارچی آلترناریا فعال روی نارنج بتواند سبب تولید ژنوتیپ‌هایی از قارچ شود که توانایی تولید بیماری را روی نارنج پیدا کرده باشند. وجود تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت قارچ آلترناریا آلترناتا با استفاده از مارکرهای RAPD، AFLP، RFLP و ریزوماوارک‌ها در رابطه با مرکبات (۲۵) و سایر میزبانانی مانند گوجه‌فرنگی (۲۶)، قهوه (۲۷) و کاج (۲۸) گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق روی میزبانان لیموترش، لیمو شیرین و بالنگ فقط تیپ آمیزشی MAT1-2 مشاهده گردید. این موضوع نشان می‌دهد که اولاً تکثیر جدایه‌های مربوط به این میزبانان به صورت غیرجنسی است و دوم این که احتمالاً جدایه‌های فعال روی این میزبانان از لحاظ ژنتیکی از جدایه‌های سایر مرکبات متمایز هستند. پیویر (Peever) و همکاران در سال ۱۹۹۹، قبلاً اختصاصیت میزبانی جدایه‌های آلترناریا آلترناتا فعال روی لیمو را گزارش نموده‌اند (۱۶).

نتایج نشان داد که توزیع فراوانی تیپ‌های آمیزشی روی گونه‌های مرکبات در شهرستان‌های مورد بررسی متفاوت بود. این امر نشان می‌دهد که احتمالاً برحسب شرایط محیطی و آب و هوایی هر منطقه، نحوه تکثیر و انتخاب طبیعی تیپ‌های آمیزشی متفاوت است. جدایه‌های نارنگی خوزستان دارای توزیع تیپ آمیزشی برابر هستند. این امر می‌تواند بیانگر امکان وقوع تولید مثل جنسی در بین جدایه‌های فعال نارنگی در این منطقه باشد. در شهرستان‌های جهرم، بندرعباس و ممسنی فراوانی تیپ‌های آمیزشی روی پرتقال و نارنگی متفاوت است. به نحوی که در جمعیت قارچ‌های آلترناریا فعال روی پرتقال تیپ غالب آمیزشی MAT1-2 و در رابطه با نارنگی تیپ غالب آمیزشی MAT1-1 بود. این امر نشان می‌دهد که جدایه‌های نارنگی و پرتقال از لحاظ نحوه تکثیر و احتمالاً از لحاظ خصوصیات ژنتیکی با یکدیگر متفاوت هستند. اختصاصیت میزبانی جدایه‌های

تولید مثل جنسی و به دنبال آن انتخاب مربوط به تیپ آمیزشی در طول زمان منجر به تغییر فراوانی تیپ‌های آمیزشی در جمعیت‌های این گونه قارچی در شهرستان‌های مختلف گردیده است. مشابه با این نتایج در رابطه با قارچ سرکوسپورا بتیکولا (*Cercospora beticola*) عامل بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی چغندر قند دشت مغان گزارش گردیده است (۲۳).

احتمال وقوع تولید مثل جنسی در جمعیت قارچ آلترناریا آلترناتا فعال در شهرستان جهرم قابل تأمل و بررسی است. با توجه به کشفیات جدید در رابطه با شناسایی فرم جنسی برای قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس (*Aspergillus fumigatus*) چنین به نظر می‌رسد که شاید انجام تحقیقات بیشتر در رابطه با این قارچ در شهرستان جهرم بتواند منجر به شناسایی فرم جنسی این قارچ گردد (۱۲).

جرنوالد (Groenewald) و همکاران در سال ۲۰۰۸، نشان دادند که در رابطه با قارچ‌هایی که دارای توزیع تیپ‌های آمیزشی برابر داخل جمعیت خود هستند اما فرم جنسی برای آن‌ها هنوز شناسایی نشده، احتمال تشکیل چرخه‌های جنسی در میزبان‌های ثانویه وجود دارد (۲۴). بر اساس این نظریه ممکن است با توجه به سابقه طولانی کشت مرکبات در شهرستان جهرم و تنوع گونه‌های گیاهی در این منطقه احتمال وقوع میزبان‌های ثانویه‌ای که فرم جنسی این قارچ روی آن‌ها تشکیل می‌شود وجود دارد.

نتایج نشان داد که توزیع تیپ‌های جنسی روی گونه‌های مختلف مرکبات دارای توزیع متفاوتی است. به نحوی که فراوانی هر دو تیپ آمیزشی در رابطه با میزبانان نارنج و گریپ فروت از توزیع یکسانی برخوردار بود. این امر می‌تواند این فرضیه را مطرح نماید که احتمال وقوع سیکل جنسی در رابطه با جدایه‌هایی که روی این دو میزبان فعالیت می‌کنند وجود دارد. باید توجه داشت که بر اساس اطلاعات ما تاکنون وقوع بیماری آلترناریا روی نارنج تاکنون گزارش نشده است. شاید دلیل این امر آن باشد که مکانیسم‌های دفاعی این گیاه به گونه‌ای است که مانع از فعالیت عوامل بیماری‌زا روی این



سیکل جنسی مرموز در برخی از جمعیت‌های این قارچ در برخی از مناطق چین است (۳۷). هر چند که در برخی از موارد تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده از حجم بالایی برخوردار نبودند و از این رو برای اثبات بیشتر این موضوع احتیاج به انجام تحقیقات بیشتر روی نمونه‌های بیشتری از قارچ آلترناریای مرکبات است. در مجموع چنین به نظر می‌رسد که در جمعیت قارچ آلترناریا آلترناتا مرکبات جنوب کشور جمعیت‌هایی وجود دارند که تنها از طریق تولید مثل غیرجنسی تکثیر می‌یابند. اما وقوع تولید مثل جنسی در برخی از مناطق و در برخی از میزبانان نیز محتمل است.

### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نقطه‌آغازی بود برای فهم نحوه تولید مثل قارچ آلترناریا آلترناتا مرکبات در مناطق خیز جنوب کشور. فهم دقیق از نحوه تولید مثل یک قارچ کمک مهمی به اتخاذ دستورالعمل‌های مناسب برای کنترل بیماری می‌نماید. بررسی‌های مربوط به پراکنش تیپ‌های آمیزشی در یک جمعیت همگام با تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی کمک مؤثری در یافتن تاریخ تکاملی آن جمعیت است. با توجه به نقش عمده تولید مثل جنسی و نوترکیبی حاصل از آن در بروز تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ‌ها و با توجه به این امر که مناطق جنوب کشور شرایط مساعدی برای تولید مرکبات را دارا هستند، بنابراین پژوهش حاضر راهگشای فهم بهتر از وضعیت قارچ آلترناریای مرکبات جنوب کشور می‌باشد. با این وجود انجام تحقیقات بیشتر در رابطه با ارتباط بین ژن‌های تیپ‌های آمیزشی با ژن‌های بیماری‌زایی این قارچ ضروری به نظر می‌رسد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی به دلیل حمایت مالی و از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و گروه بیماری‌شناسی گیاهی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

آلترناریای نارنگی و سیب زمینی قبلاً توسط محققین گزارش شده است (۳۱-۲۹).

هر چند حضور ایدیومورف‌های تیپ‌های آمیزشی برای تولید مثل جنسی در قارچ‌ها ضروری می‌باشد، اما برای تکمیل موفق چرخه جنسی کافی نیست. چرخه تولید مثل جنسی چرخه بسیار پیچیده‌ای است که ژن‌های متعددی در آن موثر هستند. هر گونه نقصان در این ژن‌ها موجب اختلال در چرخه تولید مثل جنسی می‌شود (۴ و ۳۲).

علاوه بر وجود تیپ‌های آمیزشی حضور برخی از ترکیبات پیچیده مولکولی مانند کارتن‌ها، استروئیدها و سیگنال‌های مولکولی ناشناخته برای تکمیل چرخه تولید مثل جنسی یک قارچ لازم هستند. نقصان در هر کدام مانع از انجام و تکمیل سیکل جنسی قارچ‌ها می‌شود (۳۳). تولید مثل در بسیاری از گونه‌های جنس آلترناریا به صورت غیر جنسی است (۷ و ۳۴). بسیاری از قارچ‌هایی که تولید مثل جنسی در آن‌ها ناشناخته است دارای جمعیت‌های نوترکیبی هستند که نشان‌دهنده احتمال وجود تولید مثل جنسی در این قارچ‌ها است و برخی نیز وجود این جمعیت‌های نوترکیب را ناشی از نوترکیبی‌هایی می‌دانند که از طریق میتوزی ایجاد می‌شود (۲۰، ۳۵ و ۳۶).

استیوارت (Stewart) و همکاران در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که بسیاری از زیر جمعیت‌های قارچ آلترناریا آلترناتا مرکبات جمعیت‌های کلونال هستند. اما در برخی از جمعیت‌های این قارچ یک سیکل پنهان جنسی و یا سیکل شبه جنسی وجود دارد. آن‌ها همچنین به این نتیجه رسیدند که احتمال وجود نوترکیبی میتوزی در زیر جمعیت‌های این قارچ بسیار زیاد است. برخلاف بسیاری از تحقیقات انجام شده روی قارچ آلترناریای مرکبات که بیانگر عدم وجود تولید مثل جنسی در این قارچ است، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که امکان وقوع تولید مثل جنسی در برخی از مناطق جنوب کشور و در رابطه با جدایه‌های فعال روی برخی از مرکبات وجود دارد. تحقیقات انجام گرفته روی جمعیت‌های قارچ آلترناریا آلترناتا عامل بیماری بلایت زودرس سیب زمینی چین، بیانگر وجود یک

## References

1. Timmer LW, Solel Z, Gottwald TR, Ibanez AM, Zitko SE. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. *Phytopathol.* 1998; 88(11): 1218-1223.
2. Metzberg RL, Glass NL. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays.* 1990; 12(2): 53-59.
3. Sun Y, Corcoran P, Menkis A, Whittle, CA, Andersson SGE, Johannesson H. Large scale introgression shapes the evolution of the mating-type chromosomes of the filamentous ascomycete *Neurospora tetrasperma*. *PLoS Genet.* 2012; 8(7): 1002820.
4. Thrall PH, Laine AL, Ravensdale M, Nemri A, Dodds PN, Barrett LG, Burdon JJ. Rapid genetic change underpins antagonistic coevolution in a natural host pathogen metapopulation. *Ecol Lett* 2012; 15(5): 425-435.
5. Stewart JE, Timmer LW, Lawrence CB, Pryor BM, Peever TL. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. *BMC Evol Biol.* 2014; 14(1): 38.
6. Simmons EG. *Alternaria themes and variations* (22-26). *Mycotaxon* 1986; 25(1): 287-308.
7. Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. *Rev I Med Trop.* 1996; 38(4): 272-272.
8. Berbee ML, Payne BP, Zhang G, Roberts RG, Turgeon BG. Shared ITS DNA substitutions in isolates of opposite mating type reveal a recombining history for three presumed asexual species in the filamentous ascomycete genus *Alternaria*. *Mycol Res.* 2003; 107(02): 169-182.
9. Chelkowski J, Visconti A. *Alternaria: biology, plant diseases and metabolites*: Elsevier Science Publishers; 1992.
10. Bock CH, Thrall PH, Burdon JJ. Genetic structure of populations of *Alternaria brassicicola* suggests the occurrence of sexual recombination. *Mycol Res.* 2005; 109(02): 227-236.
11. Linde CC, Liles JA, Thrall PH. Expansion of genetic diversity in randomly mating founder populations of *Alternaria brassicicola* infecting *Cakile maritima* in Australia. *Appl Environ Microb* 2010;76 (6): 1946-1954.
12. O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature.* 2009; 457(7228): 471-474.
13. Peever TL, Su G, Carpenter-Boggs L, Timmer LW. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia.* 2004; 96(1): 119-134.
14. Peever TL, Carpenter-Boggs L, Timmer LW, Carris LM, Bhatia A. Citrus black rot is caused by

- phylogenetically distinct lineages of *Alternaria alternata*. *Phytopathol.* 2005; 95(5): 512-518.
15. Peever TL, Olsen L, Ibanez A, Timmer LW. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine x grapefruit hybrids in Florida. *Phytopathol.* 2000; 90(4): 407-414.
  16. Peever TL, Canihos Y, Olsen L, Ibanez A, Liu YC, Timmer LW. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola tangelo* and rough lemon in Florida. *Phytopathol.* 1999; 89(10): 851-860.
  17. Sommerhalder RJ, McDonald BA, Mascher F, Zhan J. Sexual recombinants make a significant contribution to epidemics caused by the wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum*. *Phytopathol.* 2010; 100(9): 855-862.
  18. Doyle J, Doyle JL. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull.* 1987; 19(11): 11-15.
  19. Cullings KW. Design and testing of a plant- specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol Ecol.* 1992; 1(4): 233-240.
  20. Stewart JE, Thomas KA, Lawrence CB, Dang HA, Pryor BM, Timmer LM, Peever TL. Signatures of recombination in clonal lineages of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata* sensu lato. *Phytopathol.* 2013; 103(7): 741-749.
  21. Zheng HH, Zhao J, Wang TY, Wu XH. Characterization of *Alternaria* species associated with potato foliar diseases in China. *Plant Pathol.* 2014; 64(2): 425-433.
  22. Goodwin SB, Waalwijk C, Kema GHJ, Cavaletto JR, Zhang G. Cloning and analysis of the mating -type idiomorphs from the barley pathogen *Septoria passerinii*. *Mol Genet Genomics* 2003; 269(1): 1-12.
  23. Bakhshi M, Arzanlou M, Babai Ahari A. Determining of mating type alleles in *Cercospora beticola*, the causal agent of *Cercospora* leaf spot on sugar beet using specific primers and induction of sexual phase under laboratory and greenhouse conditions. *J Appl Res Plant.* 2012; 1(1): 15-27.
  24. Groenewald M, Groenewald JZ, Harrington TC, Abeln ECA, Crous PW. Mating type gene analysis in apparently asexual *Cercospora* species is suggestive of cryptic sex. *Fungal Gene Biol.* 2006; 43(12): 813-825.
  25. Ghasemloee M, Niazmand AR. Genetic Diversity of *Alternaria alternata* Associated with *Citrus spp.* in Southern Iran Based on RAPD-PCR. *J Pure Appl Microb.* 2015; 9(1): 473-482.
  26. Morris PF, Connolly MS, St Clair DA. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycol Res.* 2000; 104(03): 286-292.

27. Cubry P, De Bellis F, Avia K. An initial assessment of linkage disequilibrium (LD) in coffee trees: LD patterns in groups of *Coffea canephora* Pierre using microsatellite analysis. BMC genomics. 2013; 14(1): 1.
28. Guo L-D, Xu L, Zheng WH, Hyde KD. Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS). Fungal Divers. 2004; 16: 53-65.
29. Pegg KG. Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the causal organism of brown spot of *Emperor mandarin*. Queensland J Agric Animal Sci. 1996; 23: 15-28.
30. Kohmoto K, Scheffer RP, Whiteside JO. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. Phytopathol. 1979; 69(6): 667-671.
31. Mmbaga MT, Shi A, Kim M-S. Identification of *Alternaria alternata* as a causal agent for leaf blight in *Syringa* species. Plant Pathol J. 2011; 27(2): 120-127.
32. Debuchy R, Turgeon BG. Mating-type structure, evolution, and function in *Euscomycetes*. In: Growth, Differentiation and Sexuality: Springer; 2006: 293-323.
33. Leslie JF, Klein KK. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. Genetics 1996; 144(2): 557-567.
34. Stewart JE, Timmer LW, Lawrence CB, Pryor BM, Peever TL. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. BMC Evol Biol. 2014; 14(1): 38.
35. Stewart JE, Kawabe M, Abdo Z, Arie T, Peever TL. Contrasting codon usage patterns and purifying selection at the mating locus in putatively asexual *Alternaria* fungal species. PloS one. 2011; 6(5): e20083.
36. Meng JW, Zhu W, He MH, Wu EJ, Yang LN, Shang LP, Zhan J. High genotype diversity and lack of isolation by distance in the *Alternaria solani* populations from China. Plant Pathol 2014; 64(2): 434-441.
37. Meng JW, Zhu W, He MH, Wu, EJ, Duan GH, Xie YK, Jin YJ, Yang LN, Shang LP, Zhan J. Population genetic analysis reveals cryptic sex in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. Scientific Rep. 2015; 5: 18250.



## Frequency of mating type alleles in *Alternaria alternata* isolated from citrus products collected from South of Iran based on PCR

Alireza Niazmand<sup>1</sup>, Shahab Hajmansoor<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

<sup>2</sup>MS.c., Department of Plant Pathology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** Sexual stage of *Alternaria alternata* has not been discovered yet. However, high levels of phenotypic and genetic diversity have been reported in different populations of *A. alternata*. In other Ascomycetes similar to this species, sexual reproduction is controlled by a single locus, named *MAT1*, with two alleles *MAT1-1* and *MAT1-2*. The aims of this research were identification of frequency and distribution of both alleles of *MAT1* in *A. alternata* population of citrus collected from South of Iran.

**Materials & Methods:** In this cross-sectional study, DNA was extracted from young mycelia of 45 isolates of *A. alternata* that previously were collected and isolated directly from different species and cultivars of the citrus plants showing leaf spot disease symptoms in different orchards of Southern region of Iran using CTAB method. Mating types were determined using specific primer sets for *MAT1-1* and *MAT1-2* idiomorphs and PCR assay.

**Results:** A 642 bp amplicon and a 882 bp amplicon were amplified specifically for *Mat1-1*/*Mat1-2* isolates, respectively. No equal frequency of both mating type idiomorphs were observed in studied samples. Totally 16 and 29 isolates showed the presence of *MAT1-1* and *MAT1-2* idiomorphs, respectively. Unequal frequency of both idiomorphs was observed in the citrus species and cultivars collected from different regions.

**Conclusion:** It seems that unknown factors are involved in sexual induction of *A. alternata* in some regions and citrus hosts in South of Iran.

**Keywords:** Sexual reproduction, Mating type genes, PCR, *Mat1-1* gene, *Mat1-2* gene.

---

Correspondence to: Alireza Niazmand

Tel: +98 9177104870

E-mail: [niazmand2003@yahoo.com](mailto:niazmand2003@yahoo.com)

Journal of Microbial World 2016, 9(2): 108-120.