مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره دوم (پیاپی ۲۷) تابستان ۱۳۹۵
صفحات ۱۲۰-۱۰۸

Original Article

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

علیرضا نیازمند*[۱]، شهاب حاج منصور[۲]

[۱] استادیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، [۲]کارشناس 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 *MAT1* کنترل می شود که دارای دو آلل *MAT1-1* و *MAT1-2* می باشند. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی و نحوه پراکنش آلل های ژن *MAT1* 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 ریسه های جوان نمونه های برگی 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 *MAT1-1* و *MAT1-2* در واکنش زنجیره ای پلی مراز استفاده شد.

یافته ها: جدایه های تیپ های آمیزشی *MAT1-1* و *MAT1-2* 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 *MAT1-1* و ۲۹ جدایه دارای تیپ آمیزشی *MAT1-2* بودند. فراوانی های تیپ 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 *MAT1-1*، ژن *MAT1-2*

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۵

مقدمه

بیماری لکه برگی 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 برگی 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

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

MAT نامیده می شود کنترل می گردد. اطلاعات موجود نشان می دهد که سیستم تیپ های آمیزشی در این قارچ ها دو قطبی بوده و این ژن دارای دو آلل مختلف با توالی های متفاوت می باشد. به دلیل وجود تفاوت در توالی های این دو آلل در اصطلاح به آن ها ایدیومورف (idiomorph) می گویند (۲).

در قارچ های هتروتال آسکومیستی، تولید مثل جنسی توسط یک ژن گاه به نام MAT1 کنترل می شود. برای ژن گاه MAT1 دو ایدیومورف MAT1-1 و MAT1-2 شناخته شده است (۳). تعداد زیادی از قارچ های ناقص بیماری زای گیاهی همانند گونه های مختلف جنس *آلترناریا* حامل ژن MAT1 هستند و توانایی بیان شدن را دارا می باشند (٤). 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 گونه های آلترناریا مانند *آلترناریا اینفکتوریا* (*Alternaria infectoria*) بیانگر آن است که بسیاری از گونه های *آلترناریا* دارای اجدادی با فرم جنسی هستند (۵).

بسیاری از گونه های *آلترناریا* از طریق تولید مثل غیر جنسی تکثیر می شوند (٦ و ۷). تا کنون فرم جنسی برای بسیاری از گونه های 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 قارچ ها مشاهده نشده است، اما وجود تفاوت های زیاد ژنتیکی در جمعیت های این قارچ با استفاده از نشانگرهای مختلف مولکولی گزارش شده است (۱۰ و ۱۱). از تحقیقات جدید انجام گرفته در رابطه با مراحل جنسی قارچ هایی که قبلاً جزو قارچ های ناقص به حساب می آمدند، مانند قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (*Aspergillus fumigatus*) می توان چنین نتیجه گیری نمود که تفاوت های بسیار زیاد ژنتیکی که در جمعیت های قارچ *آلترناریا آلترناتا* مشاهده می شود ناشی از مکانیسم های ناشناخته و مرموز تولید مثل جنسی یا مکانیسم های نوترکیبی میتوزی مانند سیکل شبه جنسی است (۱۲). چندین مطالعه در رابطه با نقش ژن های تیپ آمیزشی (Mating type genes) در رابطه با گونه های مختلف جنس *آلترناریا* (که گونه های غیر جنسی فرض می شوند) انجام گرفته است. آری (Arie) و همکاران در سال ۲۰۰۰ بیان ژن های تیپ آمیزشی در گونه *آلترناریا آلترناتا* را گزارش نمودند (٤). نتایج به دست آمده از تحقیقات نشان می دهد که این نواحی ژنتیکی در این قارچ ها به طور طبیعی در حال تکامل و انتخاب نیستند و این موضوع در رابطه با قارچ هایی که تولید مثل جنسی ندارند قابل انتظار است.

همچنین پیش بینی می شود که در این گونه از قارچ ها ژن های تیپ آمیزشی غیر فعال باشند. وجود این نوع الگوهای انتخابی برای چنین ژن هایی بیانگر وجود یک سیکل جنسی هم زمان و مرموز در این قارچ ها است. همچنین وجود این مکان های ژنی در این قارچ ها بیانگر وجود سایر عملکردهای حیاتی این ژن ها درون سلول است.

تحقیقات انجام گرفته روی جدایه های *آلترناریا آلترناتا* جمع آوری شده از باغات مرکبات فلوریدا نشان می دهد که هر دو نوع آلل مربوط به ژن های تیپ های آمیزشی (*MAT1-1* و *MAT1-2*) با نسبت های مختلف در جمعیت های این قارچ وجود دارد (۱۳ و ١٤). مطالعات مربوط به ساختار جمعیتی قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات نشان می دهد که جمعیت این قارچ یک جمعیت غیر جنسی می باشد (۱۵ و ١٦). اما تا کنون سیستم های مربوط به تیپ های آمیزشی این گونه قارچی مورد مطالعه جدی قرار نگرفته است. تحقیقات انجام شده بر روی اعضای اسپور کوچک قارچ *آلترناریا* شامل جدایه هایی از عوامل ایجاد بیماری لکه قهوه ای مرکبات نشان داده است که نوترکیبی های ژنتیکی در نواحی به خصوصی از ژنوم قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات اتفاق می افتد (۱۷).

مرکبات گونه هایی از گیاهان همیشه سبز هستند که در مدت سالیان طولانی مورد حمله قارچ *آلترناریا* قرار گرفته اند و واکنش های متقابلی میان این قارچ و میزبانش اتفاق افتاده که این موضوع قارچ *آلترناریای* مرکبات را مدل خوبی برای انجام تحقیقات مربوط به تیپ های آمیزشی می نماید.

تعیین تیپ های آمیزشی و فراوانی آلل های این ژن ها در جمعیت های قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات امکان فهم نحوه

تکامل بیماری زایی و سازگاری جدایه های مختلف این قارچ با محیط ها و میزبانان جدید را امکان پذیر می نماید و امکان مبارزه بهتر با این قارچ را فراهم می آورد. تا کنون در رابطه با تعیین تیپ های آمیزشی این قارچ در ایران تحقیقی انجام نگرفته است. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی و نحوه پراکنش آلل های *MAT1-1* و *MAT1-2* جمعیت های قارچ *آلترناریا آلترناتا* در استان های مختلف جنوبی کشور و بر حسب گونه میزبان بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه های مورد استفاده: در این مطالعه در مجموع از ٤٥ نمونه برگی قارچ *آلترناریا آلترناتا* موجود در کلکسیون قارچ های دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، که قبلاً از مناطق مختلف مرکبات کاری جنوب کشور و از گونه های مختلف مرکبات جمع آوری و اثبات بیماری زایی شده بودند، استفاده گردید (جدول ۱).

ب) تکثیر جدایه ها: از محیط کشت PDA (سیب زمینی دکستروز آگار، دیفکو آمریکا) به منظور تکثیر جدایه ها استفاده گردید. قطعه ای از محیط کشت حاوی قارچ از لوله های آزمایش برداشته شد و بر روی محیط کشت PDA درون تشتک ها قرار داده شد. تشتک ها به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ثابت ۲۵ درجه سلیسیوس قرار گرفتند.

ج) خالص سازی جدایه ها: از روش تک اسپور برای خالص سازی جدایه ها استفاده گردید. تشتک های حاوی جدایه های 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 ریسه های جوان قارچ استفاده گردید. جدایه های خالص شده قارچ در نقاط مختلف یک تشتک حاوی محیط کشت PDA قرار داده شدند. این تشتک ها درون گرمخانه به مدت ٤٨ ساعت قرار گرفتند. سپس ریسه های سفید قارچ قبل از تغییر رنگ توسط تیغ جراحی استریل از سطح محیط کشت خراش دهی شدند. به نحوی که تا حد امکان تنها ریسه های قارچ بدون محیط کشت برداشته شدند.

جدول ۱: لیست جدایه های قارچ *آلترناریا آلترناتا* جمع آوری شده از مناطق مختلف جنوب کشور.

ردیف	نام جدایه	علامت اختصاری جدایه ها	محل جمع آوری
۱	تو سرخ (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	سالوتسیا	Alt14	جهرم
۱۵	پاین اپل	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	پیج (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 اولا (نارنگی)	Alt37	جهرم
۳۸	فورچون (نارنگی)	Alt38	جهرم
۳۹	محلی (نارنگی)	Alt39	جهرم
۴۰	پرتقال نافی	Alt40	ممسنی
۴۱	لیموترش	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

سپس ریسه ها 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 نمونه های 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 ٤ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ و ۵۸ درجه سیلیسیوس (بر حسب نوع آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شدند. سپس ژل ها در زیر دستگاه UV ترانس ایلومیناتور مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته ها

الف) انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز با آغازگر های ایدیومورف MAT1-1: نتایج حاصل از تکثیر DNA جدایه های قارچی با استفاده از آغازگرهای ALMAT-L و AA-MAT 1-867 نشان داد که این آغازگرها توانستند که در دمای اتصال ۵۵ درجه سلیسیوس یک قطعه ٦٤۲ جفت بازی را در جدایه هایی که دارای تیپ آمیزشی *MAT1-1* بودند را تکثیر کنند (شکل ۱). جدایه های 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 ۱٦ جدایه) جزو جدایه هایی بودند که دارای تیپ آمیزشی MAT1-1 بودند.

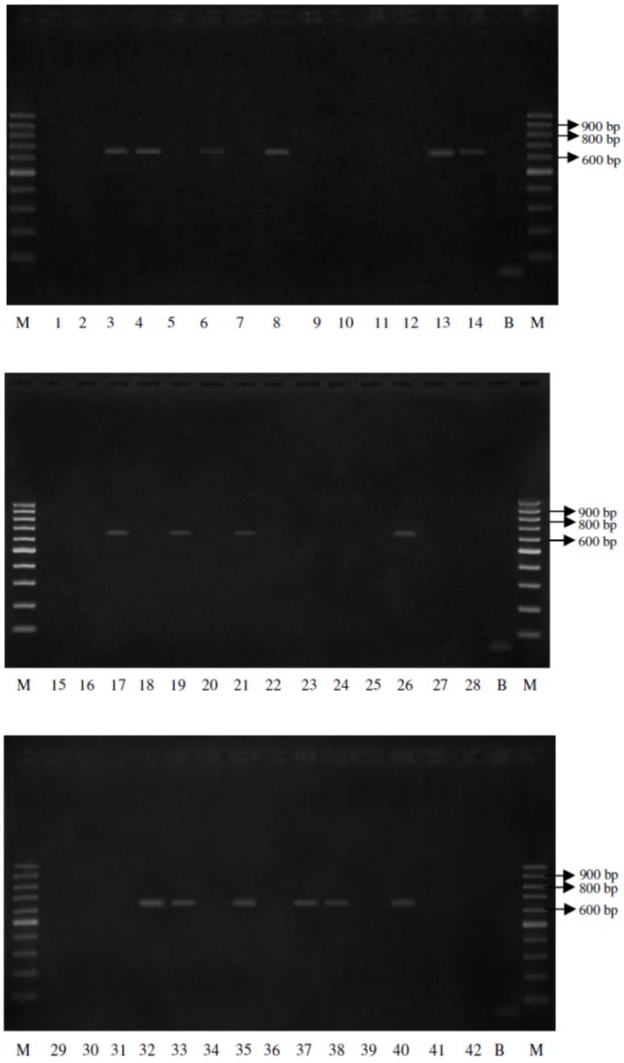
ب) انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز با آغازگرهای ایدیومورف: MAT1-2 نتایج حاصل ازتکثیر DNA جدایه های قارچی با استفاده از آغازگرهای AA-MAT 2-1691 و AsM1-8 نشان داد که این آغازگرها توانستند که در دمای اتصال ۵۸ درجه سلیسیوس یک قطعه ۸۸۲ جفت بازی را در جدایه هایی که دارای تیپ آمیزشی MAT1-2 بودند را تکثیر کنند (شکل ۲). جدایه های 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 پاین 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 بندر عباس، پرتقال

جدول ۲: توالی آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش برای تکثیر نواحی MAT1-1 و MAT1-2 (٤).

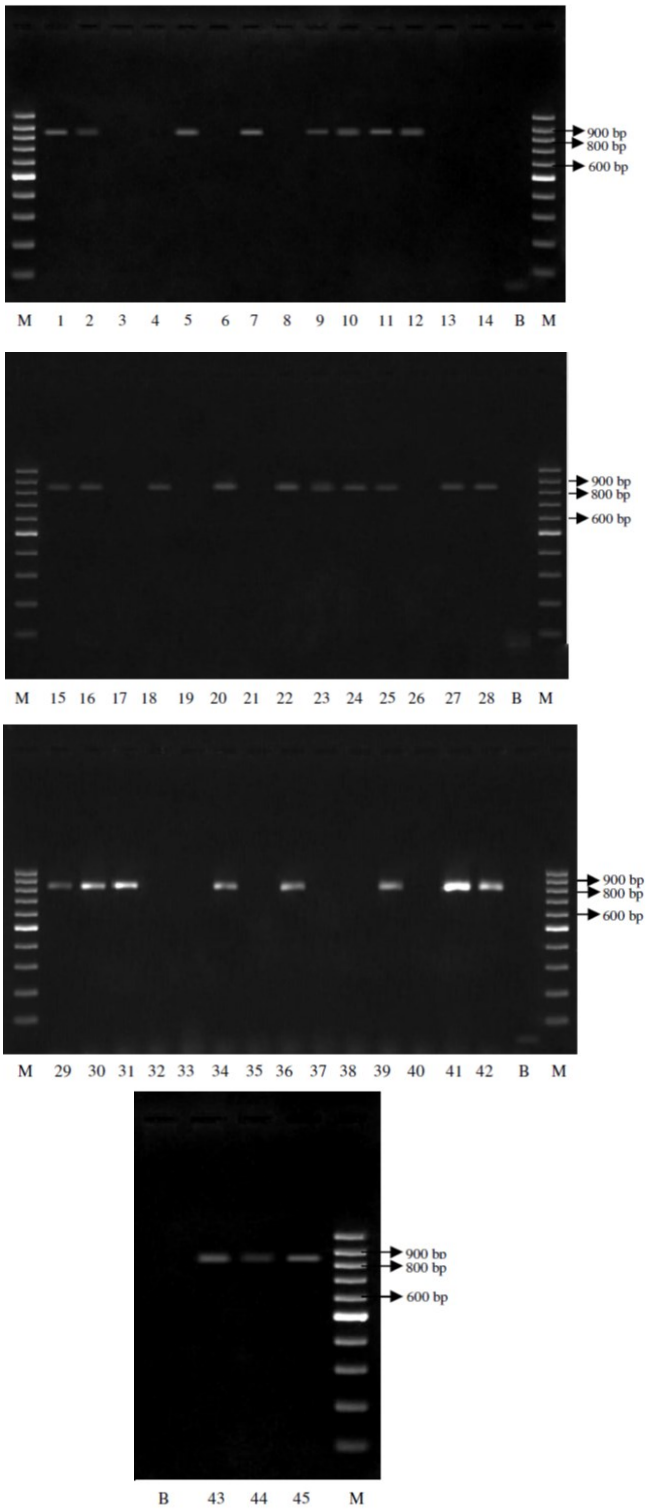
اندازه قطعه (جفت باز)	توالی (3----5)	نام آغازگر	ناحیه مورد تکثیر
۶۴۲	GCAAGATTCTAGGCCCAACG	ALMAT-L	MAT1-1-1
	TGCGGTGGGGAGTAGTGT	AA-MAT1-867	
۸۸۲	CAGCACCCCGACTACAAGTAT	AA-MAT2-1691	MAT1-2-1
	GGTCGTGAGTCGTGATCG	AsM1-8	

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، لیموشیرین رقم ویکوا ممسنی، لیموشیرین معمولی ممسنی و پرتقال رقم والنسیا ممسنی (جمعاً ۲۹ جدایه) جزو جدایه هایی بودند که دارای تیپ آمیزشی MAT1-2 بودند.

ج) بررسی توزیع تیپ های آمیزشی: در مجموع از ٤٥ جدایه قارچی مورد بررسی ٣٦ درصد جدایه ها دارای تیپ آمیزشی MAT1-1 و ٦٤ درصد جدایه ها 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، ستون های ۳، ٤، ٦، ٨، ١٣، ١٤، ١٧، ١٩، ٢١، ٢٦، ٣٢، ٣٣، ٣٥، ٣٧، ٣٨ و ٤٠) نمونه های با تیپ آمیزشی MAT1-1.



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، ستون های ۱، ۲، ۵، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۵، ١٦، ١٨، ٢٠، ٢٢، ٢٣، ، ٢٤، ٢٥، ٢٧، ٢٨، ٢٩، ٣٠، ٣١، ٣٤، ٣٦، ٣٩، ٤١، ٤٢، ٤٣، ٤٤ و ٤٥) نمونه های با تیپ آمیزشی MAT1-2.

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

د) فراوانی تیپ های آمیزشی جدایه های جمع آوری شده از شهرستان ها و ارقام مرکبات: فراوانی آلل های MAT1-1 و MAT1-2 جدایه های جمع آوری شده از شهرستان ها و ارقام مختلف مرکبات در جداول ۳ و ٤ نشان داده شده است. توزیع درصد فراوانی آلل های تیپ های آمیزشی در شهرستان های مختلف مورد بررسی تنها در جدایه های جمع آوری شده از شهرستان جهرم دارای توزیع یکسانی داشت و در مورد جدایه های سایر شهرستان ها توزیع یکسانی نداشتند. به طور کلی درصد فراوانی آلل MAT1-2 به جز در شهرستان جهرم، در سایر شهرستان ها فراوانی بیشتری داشت. توزیع درصد فراوانی آلل های تیپ های آمیزشی جدایه های جمع آوری شده از ارقام مختلف مرکبات نشان داد که درصد فراوانی آلل های MAT1-1 و MAT1-2 در رابطه با جدایه های جمع آوری شده از نارنج و گریپ فروت از توزیع یکسانی برخوردار بودند. جدایه های جمع آوری شده از ارقام مختلف لیموشیرین، لیموترش و بالنگ فقط دارای تیپ آمیزشی MAT1-2 بودند. در رابطه با جدایه های جمع آوری شده از سایر ارقام مرکبات توزیع درصد فراوانی آلل های تیپ های آمیزشی تفاوت بود. اما جدایه های 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 تیپ های آمیزشی جدایه های جمع آوری شده از شهرستان ها به تفکیک ارقام مرکبات: نتایج نشان داد که در خوزستان فراوانی آلل MAT1-2 در پرتقال بیشتر از آلل MAT1-1 می باشد 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 MAT 1-1 بیشتر از MAT1-2 بود. در بندر عباس فراوانی آلل MAT 1-2 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).

جدول ۳: درصد فراوانی آلل ها تیپ های آمیزشی به تفکیک شهرستان.

شهرستان	آلل های مورد بررسی	
	درصد فراوانی MAT1-2	درصد فراوانی MAT1-1
خوزستان	٦٠	٤٠
جهرم	٥٠	٥٠
بندر عباس	٨٢	١٨
ممسنی	٨٤	١٦

جدول ۴: درصد فراوانی آلل های تیپ های آمیزشی به تفکیک نوع محصول.

میزبان	آلل های مورد بررسی	
	درصد فراوانی MAT1-2	درصد فراوانی MAT1-1
پرتقال	٧٣	٢٧
نارنگی	٣٩	٦١
نارنج	٥٠	٥٠
لیمو شیرین	١٠٠	–
لیمو ترش	١٠٠	–
گریپ فروت	٥٠	٥٠
بالنگ	١٠٠	–

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 تیپ های آمیزشی جدایه های جمع آوری شده از شهرستان ها به تفکیک گونه مرکبات.

نام شهرستان	درصد فراوانی MAT 1-1	درصد فراوانی MAT 1-2	نام میزبان
خوزستان	١٥	٧٥	پرتقال
	٥٠	٥٠	نارنگی
جهرم	٤٠	٦٠	پرتقال
	٦٢/٥	٣٧/٥	نارنگی
بندر عباس	–	١٠٠	پرتقال
	١٠٠	–	نارنگی
ممسنی	–	١٠٠	لیمو
	–	١٠٠	پرتقال
	–	١٠٠	لیمو

تیپ های آمیزشی MAT1-1 و MAT1-2 جدایه های قارچ *آلترناریا آلترناتا* استفاده گردید. سایر محققین نیز از این دو جفت آعازگر برای تشخیص تیپ های آمیزشی جدایه های قارچ *آلترناریا آلترناتا* گلابی ژاپنی (٤) و مرکبات (٢٠) استفاده نموده اند. در تحقیق انجام شده توسط استیوارت (Stewart) و همکاران در سال ۲۰۱۳، مشابه با نتایج حاصل از این تحقیق یک قطعه ٦٤٢ و ٨٨٢ جفت بازی به ترتیب برای تیپ های آمیزشی MAT1-1 و MAT1-2 تکثیر گردید. اما در تحقیق انجام گرفته توسط آری (Arie) و همکاران در سال ۲۰۰۰، برای تیپ های آمیزشی MAT1-1 و MAT1-2 به ترتیب قطعاتی با اندازه های ۱/۹ و ۲/۲ کیلو جفت باز تکثیر شد. از آنجایی که در هر جدایه مورد بررسی تنها یکی از ژن های تیپ آمیزشی موجود بود، بنابراین می توان چنین نتیجه گیری نمود که قارچ مورد بررسی یک قارچ هتروتال است.

در این پژوهش پراکنش و فراوانی آلل های تیپ های آمیزشی جدایه های قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات جنوب کشور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو تیپ آمیزشی MAT1-1 (٣٦٪) و MAT 1-2 (٦٤٪) 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 جدایه های قارچ *آلترناریا آلترناتا* جمع آوری شده از باغات مرکبات فلوریدا مشاهده نمودند که تمامی ۱۰۵ جدایه جمع آوری شده از نوع تیپ آمیزشی MAT1-2 می باشند (۲۰). در تحقیق دیگری جدایه های جمع آوری شده قارچ *آلترناریا آلترناتا* از باغات نارنگی مینولای قسمت های مرکزی ایالت فلوریدای آمریکا که بر اساس توالی یابی های ژن داخلی اندوپلی گالاکتوروناز (endoPG) به دو زیر جمعیت SH1 و SH4 طبقه بندی 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).

نتایج تحقیق بیانگر وجود نسبت های یکسان ۱:۱ فراوانی هر دو تیپ آمیزشی در جمعیت جدایه های جمع آوری شده از شهرستان جهرم بود. توزیع برابر تیپ های آمیزشی برای رینکوسپوریوم سیکالیس (*Rhynchosporium secalis*) که تاکنون فرم جنسی آن شناسایی نشده، گزارش گردیده است (۱۱). توزیع برابر تیپ های آمیزشی در جمعیت های یک قارچ بیانگر وجود تولید مثل جنسی داخل جمعیت آن قارچ است (۲۱). فراوانی برابر تیپ های آمیزشی در جمعیت مزرعه ای یک قارچ، بیانگر کارا بودن ژن های تیپ های آمیزشی است. یا به عبارت دیگر بیانگر وقوع تولید مثل جنسی در جمعیت آن قارچ می باشد (۲۲).

مطالعات انجام گرفته بر روی ساختار جمعیتی قارچ *آلترناریا آلترناتا* عامل بیماری لکه قهوه ای مرکبات نشان داده است که روش تولید مثل این قارچ به صورت غیرجنسی یا کلونال است (۱۵ و ١٦).

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). فرضیه ای که در این خصوص مطرح می شود احتمال وجود تشکیل مرحله جنسی پنهان یا انجام نوترکیبی از طریق سیکل های شبه جنسی در این قارچ می باشد (٤).

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

استیوارت (Stewart) و همکاران در سال ۲۰۱۳، نشان دادند که این نوع از الگوهای انتخاب می تواند توسط وجود سیکل های جنسی پنهانی که در سال های اخیر اتفاق افتاده، سیکل های تولید مثل جنسی که احتمالاً در زمان های گذشته اتفاق افتاده و یا درگیر بودن ژن های مربوط به تیپ های آمیزشی در سایر عملکرد های حیاتی سلول قابل توصیف باشد. عدم وجود چرخه

تولید مثل جنسی و به دنبال آن انتخاب مربوط به تیپ آمیزشی در طول زمان منجر به تغییر فراوانی تیپ های آمیزشی در جمعیت های این گونه قارچی در شهرستان های مختلف گردیده است. مشابه با این نتایج در رابطه با قارچ *سرکوسپورا بتیکولا* (*Cercospora beticola*) عامل بیماری لکه برگی 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 می رسد که شاید انجام تحقیقات بیشتر در رابطه با این قارچ در شهرستان جهرم بتواند منجر به شناسایی فرم جنسی این قارچ گردد (۱۲).

جرونوالد (Groenewald) و همکاران در سال ۲۰۰۸، نشان دادند که در رابطه با قارچ هایی که دارای توزیع تیپ های آمیزشی برابر داخل جمعیت خود هستند اما فرم جنسی برای آن ها هنوز شناسایی نشده، احتمال تشکیل چرخه های جنسی در میزبان های ثانویه وجود دارد (۲٤). بر اساس این نظریه ممکن است با توجه به سابقه طولانی کشت مرکبات در شهرستان جهرم و تنوع گونه های گیاهی در این منطقه احتمال وقوع میزبان های ثانویه ای که فرم جنسی این قارچ روی آن ها تشکیل می شود وجود دارد.

نتایج نشان داد که توزیع تیپ های جنسی روی گونه های 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 می تواند این فرضیه را مطرح نماید که احتمال وقوع سیکل جنسی در رابطه با جدایه هایی که روی این دو میزبان فعالیت می کنند وجود دارد. باید توجه داشت که بر اساس اطلاعات ما تاکنون وقوع بیماری *آلترناریا* روی نارنج تا کنون گزارش نشده است. شاید دلیل این امر آن باشد که مکانیسم های دفاعی این گیاه به گونه ای است که مانع از فعالیت عوامل بیماری زا روی این میزبان می شود. بنابراین عوامل بیماری زایی که توانایی تولید بیماری روی گیاه نارنج را دارا باشند باید از نظر ژنتیکی نسبت به سایر جدایه ها متفاوت باشند. شاید وقوع تولید مثل جنسی در بین جدایه های قارچی *آلترناریای* فعال روی نارنج بتواند سبب تولید ژنوتیپ هایی از قارچ شود که توانایی تولید بیماری را روی نارنج پیدا کرده باشند. وجود تفاوت های ژنتیکی در جمعیت قارچ *آلترناریا آلترناتا* با استفاده از مارکرهای RAPD، AFLP، RFLP و ریزماهوارک ها در رابطه با مرکبات (۲۵) و سایر میزبانانی مانند گوجه فرنگی(۲٦)، 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 می دهد که اولاً تکثیر جدایه های مربوط به این میزبانان به صورت غیرجنسی است و دوم این که احتمالاً جدایه های فعال روی این میزبانان از لحاظ ژنتیکی از جدایه های سایر مرکبات متمایز هستند. پیویر (Peever) و همکاران در سال ۱۹۹۹، قبلاً اختصاصیت میزبانی جدایه های *آلترناریا آلترناتا* فعال روی لیمو را گزارش نموده اند (۱٦).

نتایج نشان داد که توزیع فراوانی تیپ های آمیزشی روی گونه های مرکبات در شهرستان های مورد بررسی متفاوت بود. این امر نشان می دهد که احتمالاً برحسب شرایط محیطی و آب و هوایی هر منطقه، نحوه تکثیر و انتخاب طبیعی تیپ های آمیزشی متفاوت است. جدایه های نارنگی خوزستان دارای توزیع تیپ آمیزشی برابر هستند.

این امر می تواند بیانگر امکان وقوع تولید مثل جنسی در بین جدایه های فعال نارنگی در این منطقه باشد. در شهرستان های جهرم، بندرعباس و ممسنی فراوانی تیپ های آمیزشی روی پرتقال و نارنگی متفاوت است. به نحوی که در جمعیت قارچ های *آلترناریا* فعال روی پرتقال تیپ غالب آمیزشی MAT1-2 و در رابطه با نارنگی تیپ غالب آمیزشی MAT1-1 بود. این امر نشان می دهد که جدایه های نارنگی و پرتقال از لحاظ نحوه تکثیر و احتمالاً از لحاظ خصوصیات ژنتیکی با یکدیگر متفاوت هستند. اختصاصیت میزبانی جدایه های

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

هر چند حضور ایدیومورف های تیپ های آمیزشی برای تولید مثل جنسی در قارچ ها ضروری می باشد، اما برای تکمیل موفق چرخه جنسی کافی نیست. چرخه تولید مثل جنسی چرخه بسیار پیچیده ای است که ژن های متعددی در آن موثر هستند. هر گونه نقصان در این ژن ها موجب اختلال در چرخه تولید مثل جنسی می شود (٤ و ۳۲).

علاوه بر وجود تیپ های آمیزشی حضور برخی از ترکیبات پیچیده مولکولی مانند کارتن ها، استروئیدها و سیگنال های مولکولی ناشناخته برای تکمیل چرخه تولید مثل جنسی یک قارچ لازم هستند. نقصان در هر کدام مانع از انجام و تکمیل سیکل جنسی قارچ ها می شود (۳۳). تولید مثل در بسیاری از گونه های جنس *آلترناریا* به صورت غیر جنسی است (۷ و ۳٤). بسیاری از قارچ هایی که تولید مثل جنسی در آن ها ناشناخته است دارای جمعیت های نوترکیبی هستند که نشان دهنده احتمال وجود تولید مثل جنسی در این قارچ ها است و برخی نیز وجود این جمعیت های نوترکیب را ناشی از نوترکیبی هایی می دانند که از طریق میتوزی ایجاد می شود (۲۰، ۳۵ و ۳٦).

استیوارت (Stewart) و همکاران در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که بسیاری از زیر جمعیت های قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات جمعیت های کلونال هستند. اما در برخی از جمعیت های این قارچ یک سیکل پنهان جنسی و یا سیکل شبه جنسی وجود دارد. آن ها همچنین به این نتیجه رسیدند که احتمال وجود نوترکیبی میتوزی در زیر جمعیت های 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 جدایه های فعال روی برخی از مرکبات وجود دارد. تحقیقات انجام گرفته روی جمعیت های قارچ *آلترناریا آلترناتا* عامل بیماری بلایت زودرس سیب زمینی چین، بیانگر وجود یک سیکل جنسی مرموز در برخی از جمعیت های این قارچ در برخی از مناطق چین است (۳۷). هر چند که در برخی از موارد تعداد نمونه های جمع آوری شده از حجم بالایی برخوردار نبودند و از این رو برای اثبات بیشتر این موضوع احتیاج به انجام تحقیقات بیشتر روی نمونه های بیشتری از قارچ *آلترناریای* مرکبات است. در مجموع چنین به نظر می رسد که در جمعیت قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات جنوب کشور جمعیت هایی وجود دارند که تنها از طریق تولید مثل غیرجنسی تکثیر می یابند. اما وقوع تولید مثل جنسی در برخی از مناطق و در برخی از میزبانان نیز محتمل است.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نقطه آغازی بود برای فهم نحوه تولید مثل قارچ *آلترناریا آلترناتا* مرکبات در مناطق مرکبات خیز جنوب کشور. فهم دقیق از نحوه تولید مثل یک قارچ کمک مهمی به اتخاذ دستورالعمل های مناسب برای کنترل بیماری می نماید. بررسی های مربوط به پراکنش تیپ های آمیزشی در یک جمعیت همگام با تجزیه و تحلیل های 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 قارچ ها 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 می باشد. با این وجود انجام تحقیقات بیشتر در رابطه با ارتباط بین ژن های تیپ های آمیزشی با ژن های بیماری زایی این قارچ ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

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

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. Metzenberg 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 *Euascomycetes*. 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.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 2, June 2016

Original Article

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

Alireza Niazmand[1], **Shahab Hajmansoor**[2]

[1]Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]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 MAT 1-2.* 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 pecificlly for *Mat1-1Mat1-2* 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

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