

## تنوع ژنتیکی جدایه‌های گونه *Colletotrichum fructicola* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و بررسی کارآمدی این تکنیک در تفکیک این گونه از برخی از گونه‌های جنس *Colletotrichum*

سمیه اکبرزاده<sup>۱</sup>، علیرضا علیزاده<sup>۲</sup>، عبدالله احمدپور<sup>۳</sup> و اکبر شیرزاد<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. <sup>۲</sup> مرکز آموزش عالی شهید باکری میان‌دوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. [alizadeh.al2021@gmail.com](mailto:alizadeh.al2021@gmail.com)

پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۱۲

بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۲

دریافت: ۱۴۰۰/۹/۸

### چکیده

در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۷۰ جدایه *Colletotrichum fructicola* بدست آمده از علائم لکه‌برگی روی انواع گیاهان اهلی و وحشی در مناطق مختلف سه استان شمالی ایران شامل گیلان، مازندران و گلستان با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR بررسی شد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نتایج حاصل از انگشت‌نگاری DNA با استفاده از پنج آغازگر ISSR برای ۷۰ جدایه *C. fructicola* به خوبی توانست روابط ژنتیکی بین جدایه‌ها را نشان دهد. بر این اساس تعداد ۷۰ جدایه در قالب هشت دودمان همسانه‌ای از هم تفکیک شدند. این نتایج نشان داد تنوع ژنتیکی زیادی بین جدایه‌های این گونه قارچی وجود دارد. هیچ ارتباط مستقیمی بین گروه‌های انگشت‌نگاری DNA و منشاء جغرافیایی و میزبانی جدایه‌ها مشاهده نشد. به منظور ارزیابی کارآمدی نشانگر مولکولی ISSR در تمایز و تفکیک جدایه‌های *C. fructicola* از جدایه‌های، برخی گونه‌های نزدیک و غالب جنس *Colletotrichum*، انگشت‌نگاری DNA با استفاده از این نشانگر مولکولی برای ۸۹ جدایه شامل ۸۵ جدایه *C. fructicola*، دو جدایه *C. gloeosporioides*، یک جدایه *C. aenigma* و یک جدایه *C. karstii* انجام شد. بر اساس مقایسه الگوی انگشت‌نگاری DNA و فنوگرام ترسیم شده تعداد ۸۹ جدایه در سطح تشابه ژنتیکی ۷۰ درصد در چهار گروه اصلی (A-D) قرار گرفتند. به طوری که جدایه‌های دودمان‌های همسانه‌ای A-D به ترتیب به گونه‌های *C. karstii*، *C. fructicola*، *C. gloeosporioides* و *C. aenigma* تعلق داشتند. برای اطمینان از صحت شناسایی، تعداد ۲۸ جدایه از دودمان‌های کلونی مختلف به عنوان نماینده برای شناسایی مولکولی بر اساس تعیین توالی ناحیه ژنی بتاتوبولین (*TUB2*) و فاصله بین ژنی (*APN2/MAT1*) انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل تبارزایی صحت شناسایی و نیز کارآمدی نشانگر مولکولی ISSR به عنوان یک ابزار مفید در گروه‌بندی و تفکیک برخی گونه‌های غالب جنس *Colletotrichum* را نشان داد.

کلمات کلیدی: انگشت‌نگاری DNA، آرایه‌بندی، توالی‌یابی ژنومی، نشانگر مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز

## Genetic diversity of *Colletotrichum fructicola* isolates using ISSR molecular marker and efficiency of this technique in differentiating this species from several *Colletotrichum* species

Somayeh Akbarzadeh<sup>1</sup>, Alireza Alizadeh<sup>2</sup>✉, Abdollah Ahmadpour<sup>3</sup> and Akbar Shirzad<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tbariz, Iran. <sup>2</sup>Higher Education Center Shahid Bakeri Miyandoab, Urmia University. Urmia, Iran. [alizadeh.al2021@gmail.com](mailto:alizadeh.al2021@gmail.com)

Received: 29 Nov 2021

Revised: 23 Dec 2021

Accepted: 3 Aug 2022

### Abstract

In this study, genetic diversity of 70 isolates of *Colletotrichum fructicola* obtained from the leaf spot symptoms on a variety of cultivated and wild plants in different regions of three northern provinces of Iran, including Gilan, Mazandaran and Golestan, was investigated using the ISSR molecular marker. Cluster analysis of the results of DNA fingerprinting using five ISSR primers for 70 isolates of *C. fructicola* clearly revealed genetic diversity among the isolates. Based on this, 70 isolates were differentiated into eight clonal lineages. These results showed that there is a high level of genetic diversity among isolates of this fungal species. No direct correlation between DNA fingerprinting groups and geographical origin and host of the isolates was observed. In order to evaluate the efficiency of ISSR molecular marker in differentiating *C. fructicola* isolates from isolates of some close and dominant species of the genus *Colletotrichum*, DNA fingerprinting using this molecular marker for 89 isolates including 85 *C. fructicola* isolates, two *C. gloeosporioides* isolates, one isolate for each of *C. aenigma* and *C. karstii* was performed. Based on the comparison of the DNA fingerprinting pattern and the drawn phenogram, 89 isolates were placed in four main groups (A-D) at the genetic similarity level of 70%. So that the isolates of clonal lineages A-D belonged to *C. karstii*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* and *C. aenigma* species, respectively. To ensure the accuracy of the identification, 28 isolates from different clonal lineages were selected as representatives for molecular identification based on the sequencing of the *beta-tubulin* (*TUB2*) gene region and the *APN2/MAT1* (*ApMAT*) intergenic space. Phylogenetic analysis showed the accuracy of identification and the efficiency of ISSR molecular marker as a useful tool in grouping and separating the dominant species of the genus *Colletotrichum*.

**Keywords:** DNA fingerprinting, Genomic sequencing, Molecular markers, PCR, Taxonom

### How to cite:

Akbarzadeh S, Alizadeh A, Ahmadpour A, Shirzad A, 2023. Genetic diversity of *Colletotrichum fructicola* isolates using ISSR molecular marker and evaluation of the efficiency of this technique in differentiating this species from several *Colletotrichum* species. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (4): 43-61.

## مقدمه

جنس *Colletotrichum* Corda (1831) یکی از جنس‌های مهم قارچی است که تعداد زیادی از گونه‌های آن روی انواع گیاهان چوبی و علفی ایجاد بیماری می‌کنند (Cannon et al. 2012). اعضای این جنس باعث ایجاد خسارت اقتصادی فراوان در تولید و صادرات محصولات مختلف از قبیل انواع میوه‌ها، سبزیجات و گیاهان زینتی می‌شوند (Cannon et al. 2012; Alizadeh et al. 2015, 2022). به طور معمول، هر محصول تولید شده در هر نقطه از جهان حداقل به یک و یا بیش از یک گونه از جنس *Colletotrichum* حساس است (Hyde et al. 2009). علاوه بر بیماری‌زایی در باغ، مزرعه و گلخانه‌ها، برخی از گونه‌های این جنس قارچی از عوامل مهم بیماری‌های پس از برداشت محصولات کشاورزی و بیمارگرهای مخرب چمن زمین‌های ورزشی و فضای سبز محسوب شده و سالانه خسارت هنگفتی را از این بابت به جوامع بشری تحمیل می‌کنند (Hyde et al. 2009). این جنس به لحاظ اهمیت اقتصادی، هشتمین جنس قارچی بیمارگر گیاهی در دنیا محسوب می‌شود (Dean et al. 2012).

شناسایی قارچ‌های بیمارگر گیاهی اولین قدم اساسی در شناخت زیست‌شناسی بیمارگر و در نهایت مدیریت بیماری‌های گیاهی است (Shenoy et al. 2007). از آنجایی که بسیاری از گونه‌های جنس *Colletotrichum* بیمارگرهای مهم و زیان‌بار گیاهی محسوب می‌شوند (Cai et al. 2009)، از این‌رو شناسایی صحیح گونه‌ها برای توسعه و فراهم کردن راهکارهای مناسب مدیریت بیماری‌های ایجاد شده و انجام پژوهش‌های بیشتر ضروری است.

تاکنون بیش از ۲۸۰ گونه در این جنس توصیف و پذیرفته شده است که اکثر آنها بیمارگرهای مهم گیاهی تلقی می‌شوند. گونه *C. fruticola* یکی از گونه‌های مهم جنس *Colletotrichum* بوده و به عنوان خسارت‌زاترین گونه از این جنس روی میوه‌ها و درختان میوه معرفی شده است (Fu et al. 2016; Han et al. 2016; Velho et al. 2016; 2014). این گونه قارچی همه جازی با دامنه میزبانی وسیع است که از مناطق جغرافیایی مختلف و از گیاهان مختلف در سطح جهان گزارش شده است (Weir et al. 2012; Arzanlou et al. 2015; Atghia et al. 2017; Niu et al. 2016; Shi et al. 2017; Wang et al. 2015). طبق مطالعات اخیر این آرایه در کنار برخی آرایه‌های دیگر نظیر *C. gloeosporioides* به عنوان یکی از گونه‌های غالب جنس *Colletotrichum* در استان‌های شمالی کشور شناخته شده است

(Alizadeh 2015). تاکنون مطالعه جامعی در رابطه با جنبه‌های مختلف این بیمارگر گیاهی نظیر تنوع ژنتیکی و پتانسیل خسارت‌زایی آن در ایران صورت نگرفته و تنها مطالعات پراکنده‌ای که اغلب محدود به گزارش‌های قدیمی از این آرایه روی برخی گیاهان است، انجام شده است (Ershad 2009; Arzanlou et al. 2015; Atghia et al. 2015; Taheri et al. 2016).

از دیرباز شناسایی گونه‌های قارچی با استفاده از صفات ریخت‌شناسی صورت می‌پذیرفت ولی امروزه مشخص شده است که این صفات به تنهایی قادر به بازتاب روابط تکاملی در بسیاری از گونه‌های قارچ‌ها نیستند (Hyde et al. 2009). علاوه بر اینکه تعداد این صفات برای مقایسه و شناسایی قارچ‌ها محدود است، تغییرات قابل توجه این ویژگی‌ها در اثر تغییر نوع محیط کشت، شرایط دمایی و محیطی، سن رشد، میزان و شدت نور محیط و غیره نیز از دیگر موارد محدودکننده استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی برای درک روابط تکاملی آرایه‌های قارچی به شمار می‌روند (Cai et al. 2009). بدلیل همپوشانی در صفات ریخت‌شناختی، شناسایی و تفکیک جدایه‌های متعلق به آرایه *C. fruticola* از سایر گونه‌های نزدیک مثل *C. aenigma* و نیز گونه‌های دیگر که با فراوانی زیاد از گیاهان جداسازی می‌شوند نظیر *C. karstii* و *C. gloeosporioides* مشکل می‌باشد. در طی چند سال گذشته با پیشرفت علوم در زمینه زیست‌شناسی مولکولی، استفاده از روش‌های توالی‌یابی نواحی ژنومی حفاظت شده از طریق یک راهبرد شناسایی چند مرحله‌ای که مبتنی بر ادغام داده‌های حاصل از توالی‌یابی نواحی ژنومی و نتایج آزمون‌های ریخت‌شناسی و بیماری‌زایی است، برای شناسایی و شناخت روابط تکاملی آرایه‌های قارچی فراگیر شده است (Cannon et al. 2012). این راهبرد باعث پیشرفت‌های شگرف در علم رده‌بندی و حل بسیاری از مشکلات آرایه‌بندی در علم قارچ‌شناسی شده است (Damm et al. 2012a, b; Tao et al. 2017; Liu et al. 2015; Marin-Felix et al. 2013). با وجود کارا بودن داده‌های حاصل از توالی‌یابی ژنومی، صرف هزینه بسیار زیاد برای مطالعات کلان قارچ‌شناسی که در آن ده‌ها، صدها و هزاران جدایه قارچی مورد مطالعه قرار می‌گیرند، از محدودیت‌های استفاده از این روش به شمار می‌رود. بنابراین همواره نگاه‌ها به سمت توسعه و استفاده از روش‌ها و ابزارهایی کارآمد معطوف بوده است که در گروه‌بندی و شناسایی افراد بر اساس روابط تکاملی مفید باشند.

مطالعه ژنتیک جمعیت در گونه‌های قارچی بیماری‌زای

به طور فزاینده‌ای برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تفکیک قارچ‌های بیمارگر گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Srisuttee & Ratanacherdchai *et al.* 2010; Atghia Nalumpang 2007; *et al.* 2015).

با توجه به اهمیت آرایه *C. fruticola* از نظر خسارت‌زایی روی انواع محصولات کشاورزی بخصوص میوه‌ها، ارزیابی ساختار ژنتیکی جدایه‌های این گونه به منظور درک صحیح از تنوع ژنتیکی که مستقیماً با پتانسیل خسارت‌زایی این آرایه بیمارگر در ارتباط است، حایز اهمیت می‌باشد. همچنین با توجه به شباهت‌های ریخت‌شناختی زیاد برخی گونه‌های دیگر که در کنار این گونه به عنوان آرایه‌های غالب جنس *Colletotrichum* از انواع گیاهان جداسازی می‌شوند، توسعه و استفاده از ابزارهایی کارآمد که بتواند آرایه‌های مختلف را به طور موفقیت آمیز از هم تفکیک نماید بسیار پراهمیت می‌باشد. لذا این مطالعه با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچی *C. fruticola* به دست آمده از انواع گیاهان چوبی و علفی از مناطق مختلف سه استان شمالی کشور شامل گیلان، مازندران و گلستان و همچنین بررسی کارایی نشانگر مولکولی ISSR در تفکیک جدایه‌های *C. fruticola* از برخی از گونه‌های نزدیک و یا غالب جنس *Colletotrichum* نظیر *C. gloeosporioides*، *C. karstii* و *C. aenigma* انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌های قارچی

در این پژوهش برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، از ۷۰ جدایه *C. fruticola* که توسط (Alizadeh 2015) در طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۳ از روی بیش از ۵۰ گونه گیاهی شامل انواع گیاهان اهلی و وحشی چوبی و علفی در مناطق مختلف سه استان گیلان، مازندران و گلستان جداسازی و در کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان نگهداری شده‌اند، استفاده شد (جدول ۱). همچنین برای بررسی کارآمدی نشانگر مولکولی ISSR در تفکیک جدایه‌های *C. fruticola* از برخی از گونه‌های نزدیک و یا غالب جنس *Colletotrichum* به ترتیب از یک جدایه از *C. aenigma*، دو جدایه از *C. gloeosporioides* و یک جدایه از *C. karstii* که توسط (Alizadeh 2015) از روی گیاهان مختلف دارای علایم آنتراکنوز و لکه‌برگی جداسازی و شناسایی شده بودند، استفاده گردید (جدول ۱).

گیاهی جهت دستیابی به روش‌های مناسب برای مدیریت بیماری‌های گیاهی، امری مهم و ضروری است (Alizadeh *et al.* 2017). بیمارگرهای گیاهی برای بقاء باید در مقابل تغییراتی که در محیط زیست آن‌ها رخ می‌دهد سازگار شوند. در زیست‌بوم‌های کشاورزی ممکن است برخی تغییرات نظیر کشت ارقام مقاوم، استفاده از قارچ‌کش‌ها و کودهای شیمیایی، روش‌های آبیاری و تناوب زراعی رخ دهد. پر واضح است که سیستم‌های کشاورزی فشار انتخابی شدیدی را به جمعیت‌های بیمارگرها وارد می‌سازند. روش‌های کنترل و مدیریت برای اینکه موفق و کارآمد باشند باید به جای یک فرد، جمعیت یک بیمارگر را مورد هدف قرار دهند. بنابراین برای اعمال یک مدیریت موفق و برای درک اینکه چگونه جمعیت‌ها در مقابل راهکارهای مختلف کنترلی دچار تغییرات می‌شوند، آگاهی از ژنتیک جمعیت‌های یک بیمارگر ضرورت دارد (McDonald & Linde 2002). در مطالعات ساختار ژنتیک جمعیت‌های بیمارگرها، مقدار و توزیع تغییرات ژنتیکی در داخل و بین جمعیت‌ها بررسی می‌شود. بنابراین درک ساختار ژنتیکی جمعیت اولین قدم منطقی در مطالعات ژنتیک جمعیت قارچ‌ها است، زیرا ساختار ژنتیکی یک جمعیت تاریخچه تکاملی و پتانسیل بیمارگر برای تکامل و تغییرات را منعکس می‌کند (McDonald 1997).

عوامل متعددی از قبیل جهش، انتخاب طبیعی، مهاجرت، ریزش ژنی، جریان ژنی و سیستم آمیزشی در بروز تغییرات ژنتیکی در جمعیت‌ها دخیل هستند. هدف اصلی از این مطالعات پی بردن به این موضوع است که کدام یک از نیروهای مذکور بیشترین تاثیر را در ساختار ژنتیکی جمعیت‌های بیمارگر ایفا می‌کند (McDonald 1997). در طی چند سال گذشته با پیشرفت علوم در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک، استفاده از روش‌های مختلف برای بررسی تنوع ژنتیکی در موجودات زنده، به ویژه قارچ‌ها رواج یافته است. توسعه فنون مولکولی، ابزارهایی را برای پیشرفت مطالعه تنوع ژنتیکی، روابط تبارشناختی بین و درون گونه‌ای و همچنین تشخیص نژادها و پاتوتیپ‌های قارچ‌ها فراهم کرده است (Mullis & Faloona 1987; Bruns *et al.* 1991; Batista 1993). تنوع ژنتیکی قارچ‌های بیمارگر گیاهی عمدتاً با استفاده از نشانگرهای مختلف مولکولی مبتنی بر DNA نظیر ISSR، SSR، rep-PCR، RAPD، RFLP، AFLP و غیره بررسی شده است (Moretti *et al.* 2005; Ratanacherdchai *et al.* 2010). در میان آنها، نشانگرهای ISSR به دلیل تکثیر تعداد زیاد باندهای DNA، تکرارپذیری، در دسترس و کم هزینه بودن

جدول ۱. اطلاعات مربوط به جدایه‌های *Colletotrichum* استفاده شده در این پژوهش.Table 1. Information of *Colletotrichum* isolates used in this study.

ردیف	نام جدایه	کد کلکسیون	نام گونه	نام میزبان	اندام گیاهی	محل جمع آوری	تاریخ جمع آوری
۱	10 C	AZFC 1	<i>C. fruticola</i>	خرزهره	برگ	گیلان - رشت	شهریور ۱۳۹۱
۲	14 C	AZFC 2	<i>C. fruticola</i>	انجیلی	برگ	مازندران - چالوس	تیر ۱۳۹۱
۳	16 C	AZFC 3	<i>C. fruticola</i>	انجیر	برگ	مازندران - نوشهر	مهر ۱۳۹۱
۴	19 C	AZFC 4	<i>C. fruticola</i>	آقطنی	برگ	گلستان - گرگان	شهریور ۱۳۹۱
۵	28 C	AZFC 5	<i>C. fruticola</i>	جل	برگ	گلستان - گرگان	شهریور ۱۳۹۱
۶	32 C	AZFC 6	<i>C. fruticola</i>	انجیلی	برگ	مازندران - چالوس	تیر ۱۳۹۱
۷	34 C	AZFC 7	<i>C. fruticola</i>	نارنج	برگ	گیلان - لاهیجان	مرداد ۱۳۹۱
۸	46 C	AZFC 9	<i>C. fruticola</i>	پرنده بهستی	برگ	مازندران - آمل	شهریور ۱۳۹۱
۹	50 C	AZFC 10	<i>C. fruticola</i>	توت سفید	برگ	گلستان - گرگان	مهر ۱۳۹۰
۱۰	55 C	AZFC 11	<i>C. fruticola</i>	توسکا بیلاقی	برگ	مازندران - نوشهر	مهر ۱۳۹۱
۱۱	56 C	AZFC 12	<i>C. fruticola</i>	نمدار برگ درشت	برگ	مازندران - نوشهر	مهر ۱۳۹۱
۱۲	58 C	AZFC 13	<i>C. fruticola</i>	هلو	برگ	گلستان - گرگان	مرداد ۱۳۹۱
۱۳	62 C	AZFC 14	<i>C. fruticola</i>	ازملک	برگ	گیلان - لاهیجان	مرداد ۱۳۹۱
۱۴	78 C	AZFC 15	<i>C. fruticola</i>	زرشک	برگ	گیلان - انزلی	شهریور ۱۳۹۱
۱۵	83 C	AZFC 16	<i>C. fruticola</i>	صنوبر شرقی	برگ	گیلان - آستارا	مرداد ۱۳۹۱
۱۶	102 C	AZFC 18	<i>C. fruticola</i>	زغال اخته	برگ	گیلان - لاهیجان	مرداد ۱۳۹۱
۱۷	104 C	AZFC 19	<i>C. fruticola</i>	گیاه ناشناخته	برگ	گیلان - رشت	شهریور ۱۳۹۱
۱۸	106 C	AZFC 20	<i>C. fruticola</i>	گیاه ناشناخته	برگ	گیلان - رشت	شهریور ۱۳۹۱
۱۹	109 C	AZFC 21	<i>C. fruticola</i>	خرزهره	برگ	گیلان - رشت	شهریور ۱۳۹۱
۲۰	111 C	AZFC 22	<i>C. fruticola</i>	خرزهره	برگ	گیلان - رشت	شهریور ۱۳۹۱
۲۱	112 C	AZFC 23	<i>C. fruticola</i>	گزنه	برگ	گلستان - گرگان	شهریور ۱۳۹۱
۲۲	115 C	AZFC 24	<i>C. fruticola</i>	نارنج	برگ	گیلان - لاهیجان	مرداد ۱۳۹۱
۲۳	121 C	AZFC 26	<i>C. fruticola</i>	شمشاد ژاپنی	برگ	گیلان - انزلی	مرداد ۱۳۹۱
۲۴	122 C	AZFC 27	<i>C. fruticola</i>	گزنه	برگ	گلستان - گرگان	شهریور ۱۳۹۱
۲۵	125 C	AZFC 28	<i>C. fruticola</i>	اسپاتی فیوم	برگ	گلستان - گرگان	مرداد ۱۳۹۱
۲۶	153 C	AZFC 30	<i>C. fruticola</i>	کیوی کرکی	برگ	مازندران - رامسر	مهر ۱۳۹۰
۲۷	159 C	AZFC 31	<i>C. fruticola</i>	توسکای سیاه اروپایی	برگ	گلستان - گرگان	مهر ۱۳۹۰
۲۸	160 C	AZFC 32	<i>C. fruticola</i>	ازگیل ژاپنی	برگ	مازندران - ساری	مهر ۱۳۹۰
۲۹	170 C	AZFC 34	<i>C. fruticola</i>	زبان گنجشک	برگ	مازندران - نوشهر	مهر ۱۳۹۱
۳۰	173 C	AZFC 35	<i>C. fruticola</i>	درختچه فردوسی	برگ	گلستان - گرگان	شهریور ۱۳۹۱
۳۱	175 C	AZFC 36	<i>C. fruticola</i>	لرگ	برگ	مازندران - کردکوی	اردیبهشت ۱۳۹۲
۳۲	177 C	AZFC 37	<i>C. fruticola</i>	بیدمشک	برگ	گیلان - لاهیجان	شهریور ۱۳۹۱
۳۳	191 C	AZFC 38	<i>C. fruticola</i>	توت سفید	برگ	گیلان - رشت	اردیبهشت ۱۳۹۲
۳۴	195 C	AZFC 39	<i>C. fruticola</i>	انار	برگ	گیلان - رشت	اردیبهشت ۱۳۹۲
۳۵	200 C	AZFC 40	<i>C. fruticola</i>	علف چای	برگ	گیلان - دیلمان	اردیبهشت ۱۳۹۲
۳۶	204 C	AZFC 41	<i>C. fruticola</i>	ارغوان	برگ	مازندران - نور	آبان ۱۳۹۲
۳۷	205 C	AZFC 42	<i>C. fruticola</i>	زبان گنجشک	برگ	مازندران - ساری	آبان ۱۳۹۲
۳۸	210 C	AZFC 43	<i>C. fruticola</i>	برگ نو	برگ	مازندران - آمل	آبان ۱۳۹۲

ادامه جدول ۱.

Con. Table 1.

ردیف	نام جدایه	کد کلکسیون	نام گونه	نام میزبان	اندام گیاهی	محل جمع آوری	تاریخ جمع آوری
۳۹	220 C	AZFC 44	<i>C. fruticola</i>	افرای سیاه	برگ	مازندران - آمل	آبان ۱۳۹۲
۴۰	223 C	AZFC 45	<i>C. fruticola</i>	انگور	برگ	مازندران - متل قو	آبان ۱۳۹۲
۴۱	230 C	AZFC 46	<i>C. fruticola</i>	سنجد آلبالویی	برگ	مازندران - آمل	آبان ۱۳۹۲
۴۲	243 C	AZFC 47	<i>C. fruticola</i>	افرا پلت	برگ	مازندران - آمل	آبان ۱۳۹۲
۴۳	253 C	AZFC 48	<i>C. fruticola</i>	تمشک کبود	برگ	مازندران - نکا	آبان ۱۳۹۲
۴۴	254 C	AZFC 49	<i>C. fruticola</i>	برگ نو	برگ	مازندران - آمل	آبان ۱۳۹۲
۴۵	263 C	AZFC 50	<i>C. fruticola</i>	زغال اخته	برگ	مازندران - رامسر	آبان ۱۳۹۲
۴۶	266 C	AZFC 52	<i>C. fruticola</i>	گل برجینا	برگ	مازندران - رامسر	آبان ۱۳۹۲
۴۷	270 C	AZFC 54	<i>C. fruticola</i>	انجیر	برگ	مازندران - رامسر	آبان ۱۳۹۲
۴۸	274 C	AZFC 55	<i>C. fruticola</i>	گل صدتومانی	برگ	مازندران - رامسر	آبان ۱۳۹۲
۴۹	275 C	AZFC 56	<i>C. fruticola</i>	شمشاد ژاپنی	برگ	مازندران - رامسر	مهر ۱۳۹۳
۵۰	277 C	AZFC 57	<i>C. fruticola</i>	انجیلی	برگ	گلستان - کردکوی	آبان ۱۳۹۲
۵۱	282 C	AZFC 59	<i>C. fruticola</i>	توسکای بیلاقی	برگ	گلستان - کردکوی	مهر ۱۳۹۲
۵۲	283 C	AZFC 60	<i>C. fruticola</i>	توسکای بیلاقی	برگ	گلستان - کردکوی	مهر ۱۳۹۲
۵۳	284 C	AZFC 61	<i>C. fruticola</i>	توسکای بیلاقی	برگ	گلستان - کردکوی	مهر ۱۳۹۲
۵۴	286 C	AZFC 62	<i>C. fruticola</i>	کیوی کرکی	برگ	مازندران - رامسر	مهر ۱۳۹۲
۵۵	287 C	AZFC 63	<i>C. fruticola</i>	ازمک	برگ	مازندران - رامسر	مهر ۱۳۹۲
۵۶	288 C	AZFC 64	<i>C. fruticola</i>	علف هفت‌بند زمینی	برگ	گلستان - کردکوی	مهر ۱۳۹۲
۵۷	290 C	AZFC 65	<i>C. fruticola</i>	علف هفت‌بند زمینی	برگ	گلستان - کردکوی	مهر ۱۳۹۲
۵۸	294 C	AZFC 67	<i>C. fruticola</i>	توسکای بیلاقی	برگ	گلستان - کردکوی	مهر ۱۳۹۲
۵۹	295 C	AZFC 68	<i>C. fruticola</i>	انجیر	برگ	گلستان - کردکوی	مهر ۱۳۹۲
۶۰	296 C	AZFC 69	<i>C. fruticola</i>	راش شرقی	برگ	گلستان - کردکوی	آبان ۱۳۹۲
۶۱	316 C	AZFC 72	<i>C. fruticola</i>	انگور وحشی سیاه	برگ	گلستان - کردکوی	آبان ۱۳۹۲
۶۲	346 C	AZFC 73	<i>C. fruticola</i>	بادنجان	برگ	گیلان - کوچصفهان	آبان ۱۳۹۲
۶۳	353 C	AZFC 74	<i>C. fruticola</i>	بلوط	برگ	گلستان - آزادشهر	آبان ۱۳۹۲
۶۴	376 C	AZFC 76	<i>C. fruticola</i>	ارزن باتلاقی	برگ	گلستان - گرگان	آبان ۱۳۹۲
۶۵	381 C	AZFC 77	<i>C. fruticola</i>	افرای سیاه	برگ	مازندران - آمل	آبان ۱۳۹۲
۶۶	407 C	AZFC 78	<i>C. fruticola</i>	فندق استرالیایی	برگ	مازندران - تنکابن	دی ۱۳۹۳
۶۷	417 C	AZFC 79	<i>C. fruticola</i>	زیتون روسی	برگ	مازندران - نمک آبرود	دی ۱۳۹۳
۶۸	419 C	AZFC 80	<i>C. fruticola</i>	دراسنا	برگ	مازندران - تنکابن	دی ۱۳۹۳
۶۹	431 C	AZFC 82	<i>C. fruticola</i>	شمشاد ژاپنی	برگ	مازندران - نمک آبرود	دی ۱۳۹۳
۷۰	441 C	AZFC 83	<i>C. fruticola</i>	سویا	برگ	گلستان - گرگان	آبان ۱۳۹۲
۷۱	451 C	AZFC 84	<i>C. fruticola</i>	باقلا	برگ	گلستان - گرگان	آبان ۱۳۹۲
۷۲	452 C	AZFC 85	<i>C. fruticola</i>	باقلا	برگ	گلستان - گرگان	مهر ۱۳۹۳
۷۳	454 C	AZFC 87	<i>C. fruticola</i>	لوبیا چشم‌بلبلی	برگ	گیلان - لنگرود	تیر ۱۳۹۲
۷۴	455 C	AZFC 88	<i>C. fruticola</i>	لوبیا چشم‌بلبلی	برگ	گیلان - لنگرود	تیر ۱۳۹۲
۷۵	456 C	AZFC 89	<i>C. fruticola</i>	لوبیا سبز	برگ	گیلان - لنگرود	تیر ۱۳۹۲
۷۶	458 C	AZFC 90	<i>C. fruticola</i>	لوبیا سبز	برگ	گیلان - لنگرود	تیر ۱۳۹۲

ادامه جدول ۱.

Con. Table 1.

ردیف	نام جدایه	کد کلکسیون	نام گونه	نام میزبان	اندام گیاهی	محل جمع آوری	تاریخ جمع آوری
۷۷	459 C	AZFC 91	<i>C. fructicola</i>	لوبیا سبز	برگ	گیلان - لنگرود	تیر ۱۳۹۲
۷۸	461 C	AZFC 93	<i>C. fructicola</i>	لوبیا چشم‌بلبلی	برگ	گیلان - آستانه اشرفیه	آبان ۱۳۹۲
۷۹	505 C	AZFC 97	<i>C. fructicola</i>	لوبیا سبز	برگ	گیلان - رودسر	آبان ۱۳۹۲
۸۰	509 C	AZFC 98	<i>C. fructicola</i>	لوبیا سبز	برگ	گیلان - رودسر	آبان ۱۳۹۲
۸۱	533 C	AZFC 99	<i>C. fructicola</i>	لوبیا سبز	برگ	زنجان - زنجان	آبان ۱۳۹۲
۸۲	534 C	AZFC 100	<i>C. fructicola</i>	لوبیا چشم‌بلبلی	برگ	گیلان - رشت	تیر ۱۳۹۲
۸۳	535 C	AZFC 101	<i>C. fructicola</i>	لوبیا چشم‌بلبلی	برگ	گیلان - رشت	تیر ۱۳۹۲
۸۴	536 C	AZFC 102	<i>C. fructicola</i>	لوبیا سبز	برگ	گیلان - رشت	تیر ۱۳۹۲
۸۵	540 C	AZFC 106	<i>C. fructicola</i>	لوبیا چشم‌بلبلی	برگ	گیلان - رشت	تیر ۱۳۹۲
۸۶	421 C	AZFC 81	<i>C. aenigma</i>	گل‌ساعتی	برگ	مازندران - تنکابن	دی ۱۳۹۳
۸۷	39 C	AZFC 8	<i>C. gloeosporioides</i>	توسکا بیلاقی	برگ	گیلان - رشت	شهریور ۱۳۹۱
۸۸	293 C	AZFC 66	<i>C. gloeosporioides</i>	انجیر	برگ	گلستان - کردکوی	مهر ۱۳۹۲
۸۹	77 C	AZFC 82.4	<i>C. karstii</i>	ازملک	برگ	گیلان - رشت	مهر ۱۳۹۶

انگشت‌نگاری DNA با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

استخراج DNA ژنومی به روش Zhong & Steffenson (2001) انجام شد. تنوع ژنتیکی ۷۰ جدایه *C. fructicola* با استفاده از مقایسه الگوی انگشت‌نگاری DNA بدست آمده از نشانگر مولکولی ISSR و پنج آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. مشخصات پنج آغازگر ISSR استفاده شده در جدول (۲)

آمده است. به منظور بررسی کارآمدی نشانگر مولکولی ISSR در تفکیک برخی گونه‌های جنس *Colletotrichum* از یکدیگر، الگوی انگشت‌نگاری DNA برای ۸۹ جدایه از این جنس شامل ۸۵ جدایه از *C. fructicola*، یک جدایه از *C. aenigma*، دو جدایه از *C. gloeosporioides* و یک جدایه از *C. karstii* با استفاده از آغازگر (GA)5YC (جدول ۲) مقایسه شد.

جدول ۲. آغازگرهای استفاده شده برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *C. fructicola* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR.Table 2. The primers used to assess the genetic diversity of *C. fructicola* isolates using the ISSR molecular marker.

Primer	Annealing temperature (°C)	Sequence (5'→3')	Number of amplified bands	Source
(AG)5YC	40	AGAGAGAGAGYC	14	Nabi et al. 2018
(GA)5YC	40	GAGAGAGAGAYC	26	Nabi et al. 2018
(AAC)8	51	AACAACAACAACAACAACAAC	26	Ma & Michailides 2005
(AG)8C	49	AGAGAGAGAGAGAGAGC	15	Ma & Michailides 2005
(GACA)4	42	GACAGACAGACAGACA	11	Ma & Michailides 2005

نانوگرم در میکرولیتر در حجم نهائی ۱۰ میکرولیتر است. پس از تهیه مخلوط PCR میکروتیوب‌ها درون دستگاه ترموسایکلر (TPProfessional Thermocycler, Biometra, Germany) قرار داده شدند. برنامه حرارتی PCR جهت تکثیر DNA با استفاده از آغازگرهای ISSR طبق جدول (۳) تنظیم شد.

غلظت و مقادیر حجمی مواد به کار رفته برای تهیه مخلوط PCR با استفاده از آغازگرهای ISSR شامل چهار میکرولیتر آب دیونیزه سترون، چهار میکرولیتر مخلوط آماده PCR (Master Mix 2X، شرکت پیشگام، ایران)، ۰/۸ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱/۲ میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت ۵۰

اندازه‌های DNA با نام تجاری Gene Ruler™ DNA ladder mix (Fermentas, Germany) در دو چاهک ابتدا و انتهای ژل ریخته شد. در ادامه، تانک الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه به منبع جریان الکتریکی با ولتاژ ۸۰-۷۰ ولت و شدت جریان ۳۰-۱۵ میلی‌آمپر متصل شد.

به منظور مشاهده محصول PCR از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. برای این منظور پنج میکرولیتر از محصول PCR با یک میکرولیتر بافر نمونه (Safe Stain) جهت رنگ آمیزی قطعات DNA مخلوط و در چاهک‌ها بارگذاری شد. به منظور تعیین وزن قطعات تکثیر شده، سه میکرولیتر از نشانگر

جدول ۳. برنامه حرارتی PCR جهت تکثیر DNA با استفاده از آغازگرهای ISSR.

Table 3. PCR program for DNA amplification using ISSR primers.

Number of cycles	Stage	(AG)5YC	(GA)5YC	(AAC)8	(AG)8C	(GACA)4
1	Denaturation	95 °C 5 min.	95 °C 5 min.	95 °C 5 min.	95 °C 5 min.	95 °C 45 sec.
35	Denaturation	95 °C 45 sec.	95 °C 30 sec.	95 °C 45 sec.	95 °C 45 sec.	95 °C 45 sec.
	Annealing	40 °C 45 sec.	40 °C 45 sec.	51 °C 45 sec.	49 °C 45 sec.	42 °C 45 sec.
	Extension	72 °C 80 sec.	72 °C 45 sec.	72 °C 80 sec.	72 °C 80 sec.	72 °C 80 sec.
1	Final Extension	72 °C 5 min.	72 °C 10 min.	72 °C 5 min.	72 °C 10 min.	72 °C 5 min.

#### مطالعه فیلوژنتیکی

پس از انجام گروه‌بندی ۸۹ جدایه *Colletotrichum* توسط نشانگر مولکولی ISSR و آغازگر (GA)5YC و شناسایی گروه‌ها، از هر گروه نماینده‌هایی برای شناسایی مولکولی بر اساس تعیین توالی نواحی ژنومی بتاتوبولین (*TUB2*) و فاصله بین ژنی *APN2/MAT1* (ApMAT) انتخاب شدند. در مجموع تعداد ۲۸ جدایه به عنوان جدایه‌های نماینده جهت تکثیر قسمتی از ژن *TUB2* و ناحیه ژنومی ApMAT انتخاب و برای توالی آنها پس از تکثیر برای تعیین توالی ارسال شدند.

از آغازگرهای T1 (AACATGCGTGAGATTGTAAGT) (O'Donnell & Cigelnik 1997) و Bt-2b (ACCCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC) (Glass & Donaldson 1995) و آغازگرهای AM-F (TCATTCTACGTATGTGCCCG) (Silva et al. 2012) و AM-R (CCAGAAATACACCGAACTTGC) (Silva et al. 2012) به ترتیب برای تکثیر نواحی ژنومی فوق استفاده شد. غلظت و مقادیر حجمی مواد به کار رفته در مخلوط PCR شامل ۱۴ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۱۲ میکرولیتر Taq DNA Polymerase 2X Master Mix RED (Ampliqon co., South Korea)، یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومولار و سه میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت حدود ۵۰

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از انگشت‌نگاری DNA با نشانگر ISSR امتیازدهی باندها: پس از مرئی شدن باندهای DNA تکثیر یافته و تعیین چندشکلی‌ها برای هر آغازگر، نسبت به نمره‌دهی باندها و یا قطعات تکثیر یافته DNA براساس سیستم دو گانه (صفر برای عدم وجود و یک برای وجود آن باند) با استفاده از نرم‌افزار Adobe Photoshop CS4 انجام و سپس اعداد در نرم‌افزار Microsoft Excel 2003 وارد شدند.

#### محاسبه ماتریس تشابه و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای

از ماتریس داده‌ها جهت ایجاد جدول تشابه (similarity matrix) بین جدایه‌ها بر مبنای ضریب تشابه دایس (Dice's coefficient) استفاده شد. فرمول ضریب تشابه دایس عبارت است از  $dij = \frac{2a+(b+c)}{b+c}$  که در آن i و j دو فردی هستند که شباهت میان آنها محاسبه می‌شود، a نشان دهنده تعداد باندهای مشترک در هر دو فرد، b نشان دهنده تعداد باندهای موجود فقط در فرد i و c نشانگر تعداد باندهای موجود فقط در فرد j است. بر اساس جدول تشابه، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بر اساس الگوریتم UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) و نرم‌افزار کامپیوتری NTSYSpc-2.02e انجام و فنوگرام رسم گردید (Vallarino et al. 2012).

بعد از دریافت نتایج حاصل از تعیین توالی نواحی ژنومی، کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas pro 1.7.6 و نرم‌افزار Editseq 5.01 مشاهده و در صورت لزوم به صورت دستی ویرایش شدند. آزمون مشابهت‌یابی توالی‌ها در بانک داده‌های ژنومی (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) و GenBank (<http://www.q-bank.eu>) صورت پذیرفت (Altschul *et al.* 1990). توالی‌های دارای بیشترین شباهت به همراه توالی جدایه تیپ گونه‌ها از بانک ژن اخذ و در کنار توالی‌های مورد مطالعه در این پژوهش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (جدول ۴). همچنین از گونه *Monilochaetes infuscans* به عنوان گروه خارجی در تبارنما استفاده شد.

نانوگرم بر میکرولیتر و در حجم نهائی ۳۰ میکرولیتر تهیه شد. واکنش PCR برای هر دو جفت آغازگر طی چرخه‌های دمایی مشابه شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال (annealing) در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام گردید. نمونه‌ها پس از تعیین غلظت برای انجام تعیین توالی به شرکت بیومجیک ژن (Bio Magic Gene Co., Iran) ارسال شدند.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی داده‌ها و ترسیم تبارنما

جدول ۴. گونه‌های جنس *Colletotrichum* و شماره‌های دستیابی بانک ژنی توالی‌های استفاده شده در تجزیه و تحلیل تبارشناختی.

**Table 4.** *Colletotrichum* species and the GenBank accession numbers of reference sequences used in phylogenetic analysis.

Species	Strain	Locality	GenBank accessions	
			TUB2	ApMAT
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608	Israel	JX010389	KM360143
	AZFC 81-421C	Iran	OP032233	-
<i>C. aeshynomenes</i>	ICMP 17673, ATCC 201874	USA	JX010392	KM360145
<i>C. alatae</i>	CBS 304.67, ICMP 17919	India	JX010383	KC888932
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071	New Zealand	JX010411	KM360144
<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18537	New Zealand	JX010420	KC888930
<i>C. asianum</i>	ICMP 18580, CBS 130418	Thailand	JX010406	FR718814
<i>C. artocarpicola</i>	MFLUCC 18-1167	-	MN435567	-
<i>C. boninense</i>	CBS 123755, MAFF 305972	Japan	JQ005588	-
<i>C. camellia</i>	CGMCC 3.14925, LC1364	China	KJ955230	KJ954497
<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18658	USA	JX010438	KC888929
<i>C. cordylinicola</i>	LC0886, ICMP 18579	Thailand	JX010440	JQ899274
<i>C. conoides</i>	CAUG17	China	KP890174	-
<i>C. chrysophilum</i>	CMM 4268, URM 7362	Brazil	KX094285	-
	RR12-3	Saluda/SC	MN741066	MN741073
<i>C. cymbidiicola</i>	IMI 347923	Australia	JQ005600	-
<i>C. dianesei</i>	CMM4083, MFLU 1300058	Brazil	KC517254	-
<i>C. endophyticum</i>	CAUG28	China	KP145469	-
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18581, CBS 130416*	Thailand	JX010405	JQ807838
	CBS 125395, ICMP 18645	Panama	JX010408	-
	CBS 238.49, ICMP 17921	Germany	JX010400	-
	AZFC 1-10C	Iran	OP032210	ON972654
	AZFC 46-230C	Iran	OP032219	-
	AZFC 47-243C	Iran	OP032220	-
	AZFC 54-270C	Iran	OP032221	-
	AZFC 64-288C	Iran	OP032222	-
	AZFC 68-295C	Iran	OP032224	ON972659
	AZFC 72-316C	Iran	OP032225	-
	AZFC 79-417C	Iran	OP032226	ON972660
	AZFC 82-431C	Iran	OP032227	-
	AZFC 90-458C	Iran	OP032228	ON972661



ادامه جدول ۴.

Con. Table 4.

Species	Strain	Locality	GenBank accessions	
			TUB2	ApMAT
<i>C. fruticicola</i>	AZFC 6-32C	Iran	OP032211	-
	AZFC 98-509C	Iran	OP032229	ON972662
	AZFC 100-534C	Iran	OP032230	-
	AZFC 30-153C	Iran	OP032231	-
	AZFC 41-204C	Iran	OP032232	-
	AZFC 11-55C	Iran	OP032213	-
	AZFC 13-58C	Iran	OP032214	-
	AZFC 14-62C	Iran	OP032215	-
	AZFC 15-78C	Iran	OP032216	ON972656
	AZFC 16-83C	Iran	OP032217	-
	AZFC 43-210C	Iran	OP032218	ON972657
<i>C. gloeosporioides</i>	IMI 356878, ICMP 17821, CBS 112999*	Italy	JX010445	JQ807843
	AZFC 8-39C	Iran	OP032212	ON972655
	AZFC 66-293C	Iran	OP032223	ON972658
<i>C. hebeiense</i>	MFLUCC13 0726, JZB330028	China	KF288975	-
<i>C. helleniense</i>	CBS 142418, CPC 26844	Greece	KY856528	-
<i>C. henanense</i>	LC3030, CGMCC 3.17354, LF238	China	KJ955257	KJ954524
<i>C. horii</i>	NBRC 7478, ICMP 10492, MTCC 10841	Japan	JX010450	JQ807840
<i>C. hystricis</i>	CBS 142411, CPC 28153	Italy	KY856532	-
<i>C. jiangxiense</i>	LC3463, CGMCC 3.17363, LF687	China	KJ955348	KJ954607
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>kahawae</i>	IMI 319418, ICMP 17816	Kenya	JX010444	JQ894579
<i>C. karstii</i>	CBS 128500, ICMP 18585	New Zealand	JQ005636	-
	AZFC 82.4-77C	Iran	OP032234a	-
	CORCG6 (CGMCC3.14194) *	China	HM585428	-
<i>C. makassarensis</i>	CBS 143664, CPC 28612	Indonesia	MH846563	MH728831
<i>C. melanocaulon</i>	Coll131, BPI 884113, CBS 133251	USA	JX145195	JX145313
<i>C. musae</i>	CBS 116870, ICMP 19119, MTCC 11349	USA	HQ596280	KC888926
<i>C. noveboracense</i>	AFKH109	Columbia/NY	MN640569	MN640564
<i>C. nupharicola</i>	CBS 470.96, ICMP 18187	USA	JX010398	JX145319
<i>C. oncidii</i>	CBS 129828	Germany	JQ005603	-
<i>C. pandanicola</i>	MFLUCC 17-0571	-	MG646926	-
<i>C. perseae</i>	GA100	Israel	KX620341	KX620177
<i>C. petchii</i>	CBS 378.94	Italy	JQ005657	-
<i>C. phyllanthi</i>	CBS 175.67, MACS 271	India	JQ005655	-
<i>C. proteae</i>	CBS 132882, CPC 14859	South Africa	KC297101	-
<i>C. pseudotheobromicola</i>	JZB330119	-	MG812559	-
<i>C. psidii</i>	CBS 145.29, ICMP 19120	Italy	JX010443	KC888931
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778	Australia	JX010414	KC888928
<i>C. rhexiae</i>	Coll1026, BPI 884112, CBS 133134	USA	JX145179	JX145290
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051	Hungary	JX010403	KC888925
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578, CBS 130417	Thailand	JX010404	JQ899289
<i>C. tainanense</i>	CBS 143666, CPC 30245, UOM 1120, Coll	Taiwan	MH846558	MH728836
<i>C. temperatum</i>	Coll883, BPI 884100,	USA	JX145211	JX145298
<i>C. theobromicola</i>	MTCC 11350, CBS 124945, ICMP 18649	Panama	JX010447	KC790726
<i>C. ti</i>	ICMP 4832	New Zealand	JX010442	KM360146
<i>C. torulosum</i>	CBS 128544, ICMP 18586	New Zealand	JQ005598	-
<i>C. tropicale</i>	CBS 124949, ICMP 18653, MTCC 11371	Panama	JX010407	KC790728
<i>C. viniferum</i>	GZAAS 5.08601, yg1	China	JN412813	-
<i>C. wuxiense</i>	CGMCC 3.17894	China	KU252200	KU251722
<i>C. xanthorrhoeae</i>	BRIP 45094, ICMP 17903, CBS 127831	Australia	JX010448	KC790689

در بانک ژن ثبت و شماره دستیابی اخذ شد (جدول ۴).

### نتایج

تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Colletotrichum fructicola* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

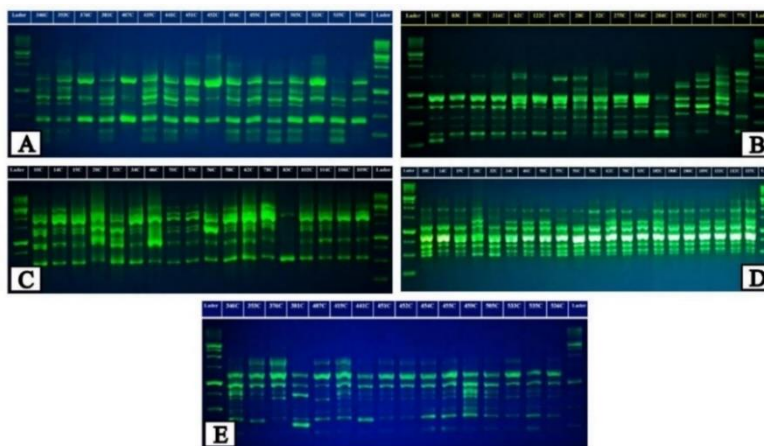
در طی آزمون انگشت‌نگاری DNA با استفاده از روش ISSR، ۸۲ باندها با استفاده از پنج آغازگر تولید شد که اندازه آنها بین ۳۵۰ تا ۵۰۰۰ جفت باز متغیر بود. میانگین تعداد باندهای چند شکل تکثیر شده به ازای هر جفت آغازگر ۷۵/۶ درصد برآورد شد (جدول ۵). بر این اساس بیشترین تعداد باندها و بیشترین تعداد باندهای چند شکل تکثیر یافته به آغازگر ۸ (AAC) اختصاص داشت. همچنین کمترین تعداد باندها و کمترین تعداد باندهای چند شکل توسط آغازگر ۸ (GACA) تولید شد. در شکل ۱ الگوی انگشت‌نگاری DNA برای برخی از جدایه‌های *C. fructicola* با استفاده از پنج آغازگر ISSR نشان داده شده است.

هم‌دیف‌سازی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA v.6 (Tamura *et al.* 2013) و روش هم‌دیف‌سازی چندگانه (Muscle) صورت پذیرفت (Edgar, 2004). توالی‌های هم‌دیف شده بررسی و در صورت نیاز اصلاح شدند. ترسیم تبارنما با استفاده از نرم‌افزار MEGA v.6 تحت ویندوز انجام شد (2013 Tamura *et al.*). برای ارزیابی توالی‌ها گروه خارجی مناسب انتخاب و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ترسیم تبارنما، روش Maximum-Likelihood (ML) (Nei & Kumar 2000) مورد استفاده قرار گرفت. برای ارزیابی توالی‌ها به روش ML، تخمین فواصل بین توالی‌ها از روش Kimura 2-parameter model (Kimura *et al.* 1980) و الگوی از پیش تعیین شده (Default) (Kimura *et al.* 1980) استفاده شد. برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در تبارنمای حاصل، تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار انجام گرفت (Felsenstein 1985). توالی‌های مربوط به جدایه‌های مختلف گونه‌های توالی‌یابی شده

جدول ۵. تعداد باندهای تکثیر شده و تعداد باندهای چندشکل تکثیر شده توسط آغازگرهای ISSR.

**Table 5.** Number of amplified bands and number of polymorphic bands generated by ISSR primers.

No.	Primer	Number of amplified bands	Number of polymorphic bands	Percentage of polymorphic bands
1	(AG)5YC	14	11	78.57
2	(GA)5YC	16	10	62.5
3	(AAC)8	26	25	96.15
4	(GACA)8	11	5	45.45
5	(AG)8C	15	11	73.33
	Total	82	62	75.6



شکل ۱. الگوی انگشت‌نگاری DNA در تعدادی از جدایه‌های *Colletotrichum fructicola* با استفاده از آغازگرهای ISSR: A- (AG) 5YC، B- (GA) 5YC، C- (AAC) 8، D- (GACA) 8، E- (AG)8C.

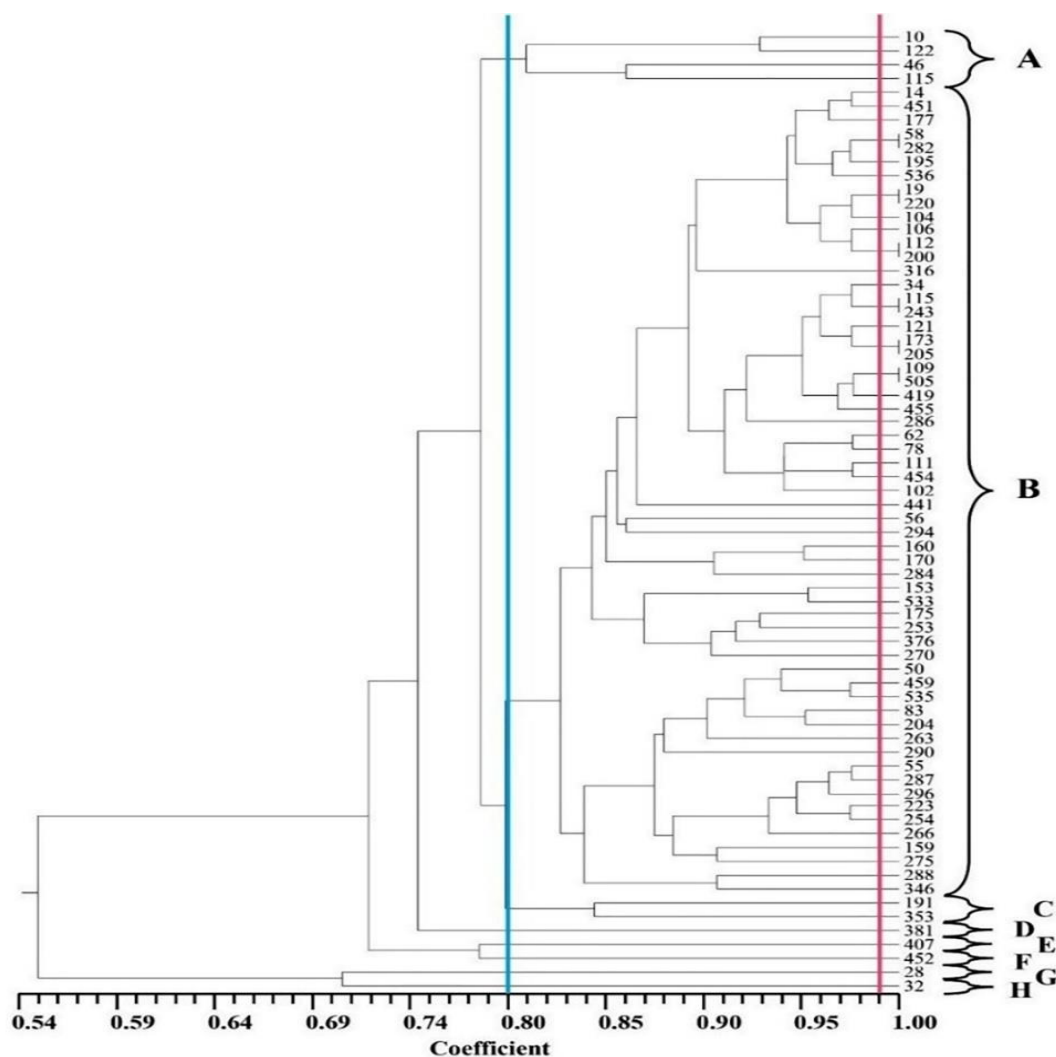
**Figure 1.** DNA fingerprinting patterns of some *Colletotrichum fructicola* isolates using ISSR primers: A- (AG) 5YC, B- (GA) 5YC, C- (AAC) 8, D- (GACA) 8, E- (AG)8C.

که جدایه‌ها در سطح تشابه ژنتیکی ۸۰ درصد در قالب هشت

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای ۷۰ جدایه *C. fructicola* نشان داد

شد هیچ رابطه‌ای بین تنوع ژنتیکی جدایه‌ها و مناطق جغرافیایی و منشأ میزبانی جدایه‌ها وجود ندارد. به طوری که هر دو دودمان همسانه‌ای غالب در این مطالعه (A و B) جدایه‌هایی را شامل می‌شوند که از مناطق مختلف هر سه استان شمالی کشور و از میزبان‌های گیاهی متفاوت به دست آمده‌اند. همچنین دو جدایه قرار گرفته در دودمان کلونی C از دو استان گلستان و گیلان از روی دو میزبان گیاهی متفاوت جداسازی شده‌اند.

دودمان همسانه‌ای تفکیک می‌شوند (شکل ۲). بر این اساس دودمان B با داشتن تعداد ۵۹ جدایه به عنوان دودمان غالب شناخته شد. دودمان‌های A و C هر کدام با داشتن به ترتیب چهار جدایه و دو جدایه از سایر دودمان‌ها جدا شدند. هر کدام از دودمان‌های D, E, F, G و H با داشتن یک جدایه سایر دودمان‌ها را تشکیل دادند. بیشترین میزان از تنوع ژنتیکی در داخل دودمان کلونی B مشاهده شد به طوری که تعداد ۵۳ هاپلوتایپ در داخل این دودمان شناسایی شد. بر اساس فنوگرام ترسیم شده مشخص

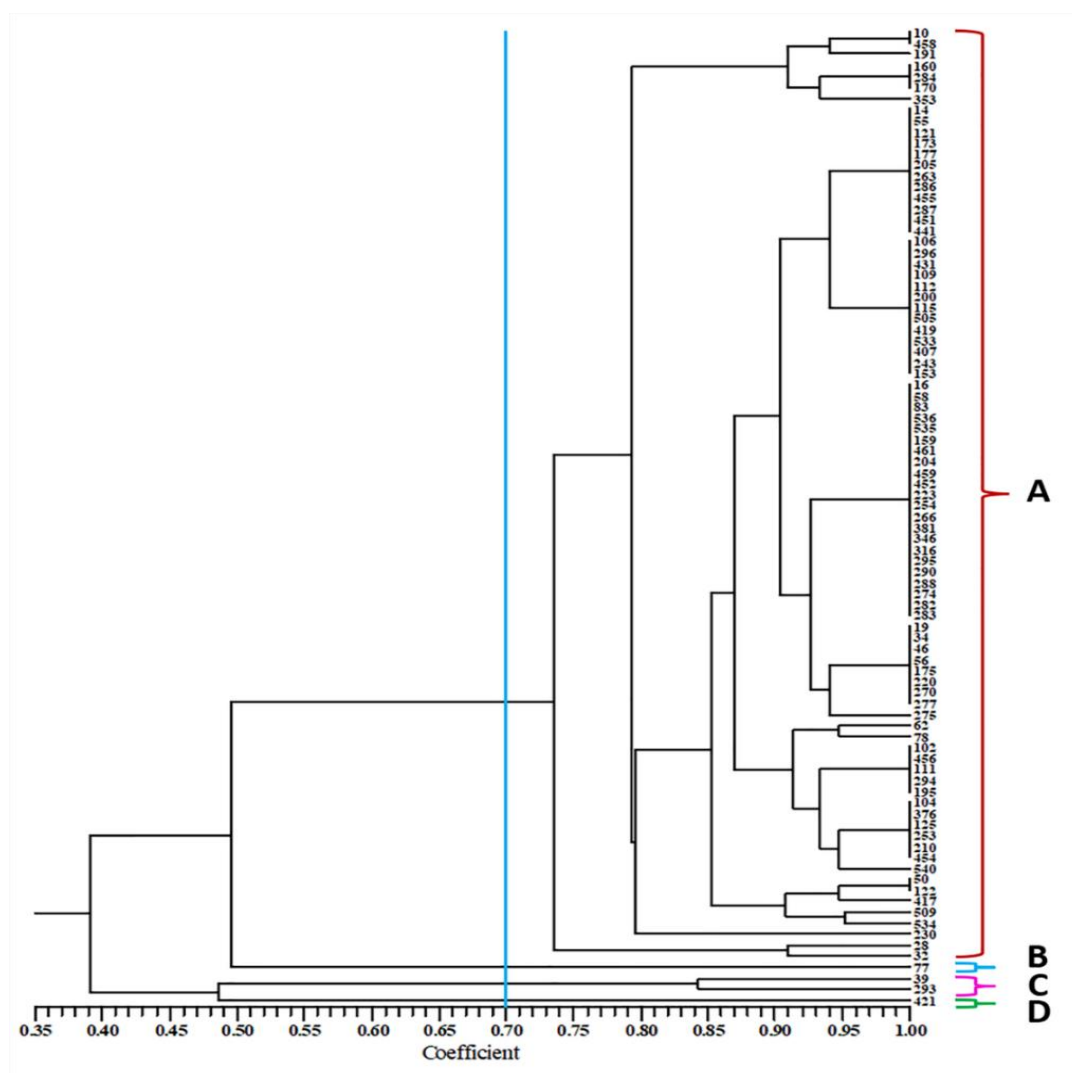


شکل ۲. فنوگرام تنوع ژنتیکی ترسیم شده برای ۷۰ جدایه *Colletotrichum fructicola* بر اساس روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد پس از ادغام داده‌های حاصل از انگشت‌نگاری توسط پنج آغازگر ((AG)5YC-(GA)5YC-(AAC)8-(GACA)8 و (AG)8C). خط عمود آبی رنگ تعداد دودمان‌های کلونی را در سطح تشابه ژنتیکی ۸۰ درصد نشان می‌دهد. دودمان‌های کلونی با حروف انگلیسی A-H مشخص شده‌اند. خط عمود صورتی تعداد هاپلوتایپ‌های مشخص شده در داخل هر یک از دودمان‌های کلونی را در سطح تشابه ژنتیکی ۹۹ درصد نشان می‌دهد.

**Figure 2.** Phenogram of genetic diversity for 70 *Colletotrichum fructicola* isolates based on UPGMA method and using Jaccard similarity coefficient after integration of fingerprint data generated by five ISSR primers ((AG)5YC-(GA)5YC-(AAC)8-(GACA)8 and (AG)8C). The blue vertical line shows the number of clonal lineages at the level of genetic similarity of 80%. Clonal lineages are marked with the English letters A-H. The pink vertical line shows the number of haplotypes identified within each of the clonal lineages at the 99% genetic similarity level.

جدایه به آرایه *C. fruticola* C. تعلق داشتند. دو جدایه از *C. gloeosporioides* در دودمان کلونی C و هر یک از دودمان های B و D به ترتیب حاوی یک جدایه از گونه های *C. karstii* و *C. aenigma* بودند (شکل ۳). به منظور اطمینان از صحت شناسایی آرایه ها، تعداد ۲۸ جدایه نماینده شامل ۲۴ جدایه از دودمان A، دو جدایه از دودمان C و تک جدایه های هر کدام از دودمان های B و D برای شناسایی مولکولی بر اساس تعیین توالی نواحی ژنومی *TUB2* و ApMAT انتخاب شدند.

ارزیابی کارآمدی نشانگر مولکولی ISSR در تفکیک برخی گونه های جنس *Colletotrichum* که با استفاده از ضریب تشابه دایس، روش UPGMA و نرم افزار کامپیوتری NTSYSpc-2.02e ترسیم شده است را نشان می دهد. بر اساس این دندروگرام تعداد ۸۹ جدایه در سطح تشابه ژنتیکی ۷۰ درصد در چهار گروه مجزا (A-D) قرار گرفتند. بر اساس این دندروگرام دودمان A به عنوان دودمان غالب شناخته شد که شامل ۸۵ جدایه می باشد. همگی این ۸۵



شکل ۳. فنوگرام حاصل از روش ISSR با استفاده از آغازگر (GA)5YC، الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس برای ۸۹ جدایه از جنس *Colletotrichum*. حروف انگلیسی A-D به ترتیب چهار دودمان کلونی در سطح تشابه ژنتیکی ۷۰ درصد را نشان می دهد.

**Figure 3.** Phenogram from ISSR test using (GA)5YC primer, UPGMA algorithm and Dice coefficient for 89 isolates of *Colletotrichum*. The letters A-D represent four colony lineages at the level of 70% genetic similarity, respectively.

اساس الگوی انگشتنگاری DNA نشان داد این جدایه ها به چهار گونه *C. gloeosporioides*، *C. fruticola*، *C. aenigma* و *C.*

مطالعات تبارشناختی تجزیه و تحلیل تبارزایی ۲۸ جدایه نماینده انتخاب شده بر

می‌شود ( Nazari et al. 2015; Behnia et al. 2016; Alizadeh et al. 2017). نشانگرهای مولکولی ISSR به دلیل سهولت، سرعت، کارایی و تکرارپذیری بالا به عنوان یک ابزار مفید و کارآمد در ارزیابی تنوع ژنتیکی و درک ارتباط فیلوژنتیک قارچ‌ها بسیار مورد استفاده قرار گرفته‌اند ( Zhou et al. 2001; Grünig et al. 2001; Ratanacherdchai et al. 2010; Arade et al. 2014; Bhatt et al. 2020; Longya et al. 2020).

در این مطالعه از پنج آغازگر ISSR به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *C. fruticola* به دست آمده از انواع گیاهان چوبی، علفی، اهلی و وحشی در مناطق مختلف سه استان شمالی ایران شامل گیلان، مازندران و گلستان استفاده شد. این نشانگر مولکولی به خوبی توانست روابط ژنتیکی بین گونه‌ها را نشان دهد. پس از ادغام داده‌های انگشت‌نگاری توسط پنج آغازگر تعداد ۷۰ جدایه در قالب هشت دودمان کلونی قرار گرفتند (شکل ۲). طبق فنوگرام ترسیم شده (شکل ۲) کمترین میزان از تشابه ژنتیکی ۵۵ درصد و بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین جدایه‌های این گونه ۱۰۰ درصد برآورد شد. این نتایج نشان داد تنوع ژنتیکی زیادی بین جدایه‌های این گونه وجود دارد. با توجه به اینکه جدایه‌ها از مناطق مختلف در سه استان شمالی کشور و از میزبان‌های گیاهی متفاوتی به دست آمده‌اند، این مقدار از تنوع ژنتیکی قابل توجیه است. مقایسه نتایج انگشت‌نگاری DNA جدایه‌ها نشان داد هیچ ارتباطی بین گروه‌های انگشت‌نگاری DNA و منشأ جغرافیایی و میزبانی جدایه‌ها وجود ندارد. به طوری که دودمان‌های کلونی چند عضوی جدایه‌هایی را شامل بودند که منشأ میزبانی و جغرافیایی متفاوتی دارند. این نتایج وجود جریان ژنی بالا بین جمعیت‌های جغرافیایی و میزبانی متفاوت را نشان می‌دهد. با کسب این نتایج این سوال مطرح می‌شود که آیا ارتباطی بین گروه‌های انگشت‌نگاری DNA جدایه‌ها و تخصص میزبانی جدایه‌ها وجود دارد؟ بنابراین انجام مطالعات بیماری‌زایی به منظور بررسی دامنه میزبانی و ارزیابی تخصص میزبانی جدایه‌های این گونه قارچی می‌تواند اطلاعات مفیدی را در زمینه ارتباط بین گروه‌های انگشت‌نگاری DNA جدایه‌ها و قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها را فراهم نماید.

به منظور ارزیابی کارایی نشانگر مولکولی ISSR در تفکیک جدایه‌های *C. fruticola* از برخی گونه‌های نزدیک و یا غالب این جنس *Colletotrichum*، الگوی انگشت‌نگاری DNA ۸۹ جدایه قارچی متعلق به *Colletotrichum* با استفاده از آغازگر (GA)5YC جهت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد این نشانگر با کارایی بالا قادر به تفکیک جدایه‌های *C. fruticola* از

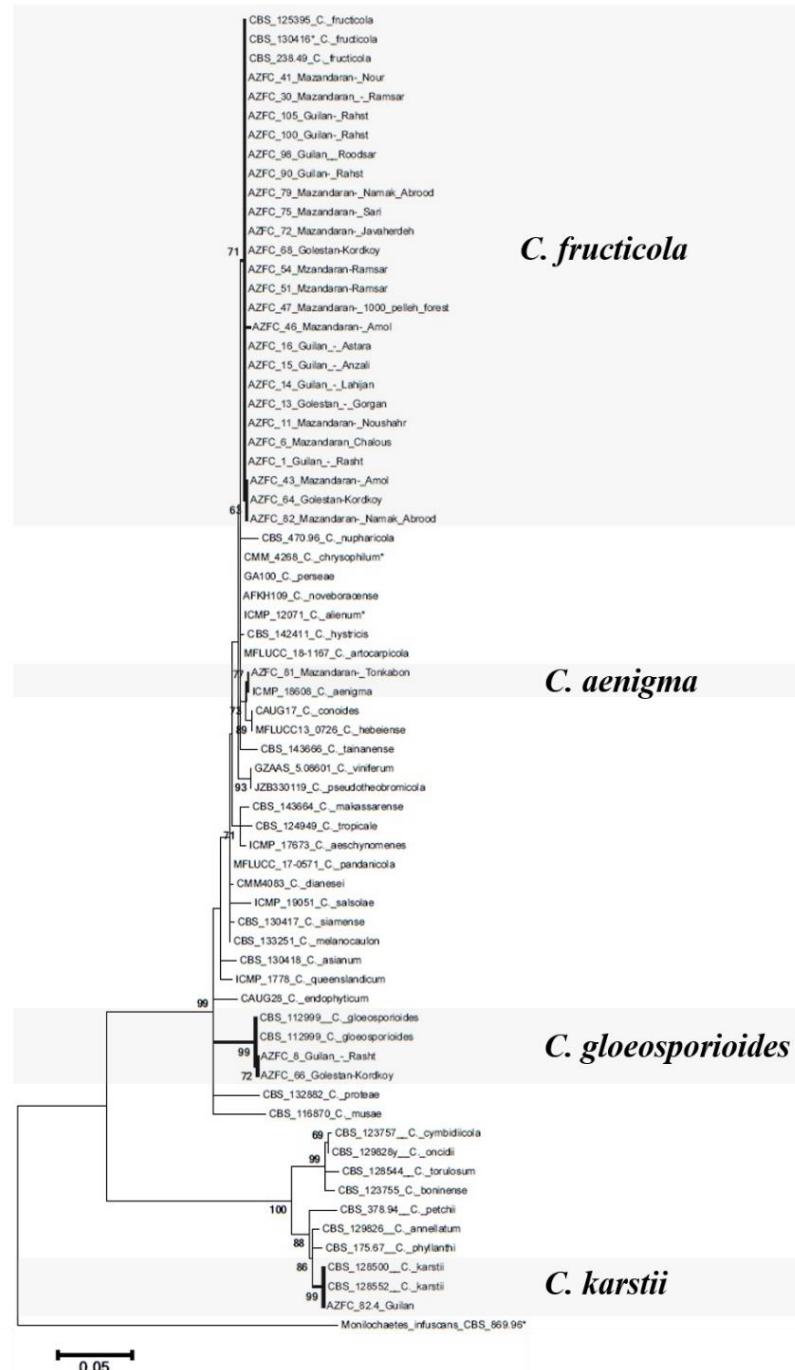
*karstii* تعلق دارند (شکل‌های ۴ و ۵). در تبارنمای ترسیم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *TUB2* (شکل ۴) همه ۲۴ جدایه نماینده از دودمان کلونی A به همراه جدایه تیپ *C. fruticola* CBS 130416 با درجه اعتبارسنجی ۷۱ درصد در یک کلاذ قرار گرفتند. جدایه 81 AZFC از دودمان کلونی B نیز با درجه اعتبارسنجی ۷۷ درصد با جدایه تیپ *C. aenigma* ICMP 18608 در یک کلاذ قرار گرفتند. دو جدایه 8 AZFC و 66 AZFC که در دندروگرام تنوع ژنتیکی از دودمان کلونی C را تشکیل می‌دادند، با درجه اعتبارسنجی ۹۹ درصد با جدایه تیپ *C. gloeosporioides* CBS 112999 یک گروه را تشکیل دادند. جدایه 82.4 AZFC نیز که در دندروگرام تنوع ژنتیکی دودمان کلونی D را تشکیل داده بود با درجه اعتبارسنجی ۹۹ درصد به همراه جدایه تیپ *C. karstii* CORCG6 در یک کلاذ قرار گرفت. در مطالعات تبارزایی ۲۸ جدایه منتخب از دودمان‌های همسانه‌ای مختلف بر اساس توالی ناحیه ژنومی ApMAT، پس از سه بار تکرار آزمایش تعداد ۱۵ جدایه قادر به تشکیل محصول DNA با کیفیت و کمیت مطلوب نبودند. بر این اساس تجزیه و تحلیل تبارزایی بر اساس توالی‌های ناحیه ژنومی ApMAT برای نه جدایه منتخب انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل تبارزایی ناحیه ژنومی ApMAT نتایج حاصل از ناحیه ژنی *TUB2* را تایید کرد (شکل ۵). تبارنمای ترسیم شده به روش Maximum Likelihood نشان می‌دهد تعداد هفت جدایه نماینده از دودمان کلونی A با جدایه‌های معتبر *C. fruticola* و همچنین تعداد دو جدایه نیز با جدایه تیپ *C. gloeosporioides* در یک گروه قرار می‌گیرند. این نتایج در تایید نتایج حاصل از مطالعات تبارزایی ناحیه ژنی *TUB2* می‌باشد.

## بحث

در طی سال‌های اخیر با پیشرفت علوم در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک، استفاده از روش‌های مختلف برای بررسی تنوع ژنتیکی در موجودات زنده و به ویژه قارچ‌ها رواج یافته است ( Alizadeh et al. 2010; Pironi et al. 2015; Salimi et al. 2016; Salimi et al. 2019). توسعه تکنیک‌های مولکولی، ابزارهایی را برای پیشرفت مطالعه تنوع ژنتیکی، روابط فیلوژنتیکی بین و درون گونه‌ای و همچنین تشخیص نژادها و پاتوتیپ‌های قارچ‌ها را فراهم کرده است ( Mullis & Faloona 1987; Bruns et al. 1991; Batista 1993). امروزه برای مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بیمارگرهای گیاهی و مطالعات فیلوژنتیکی از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR استفاده

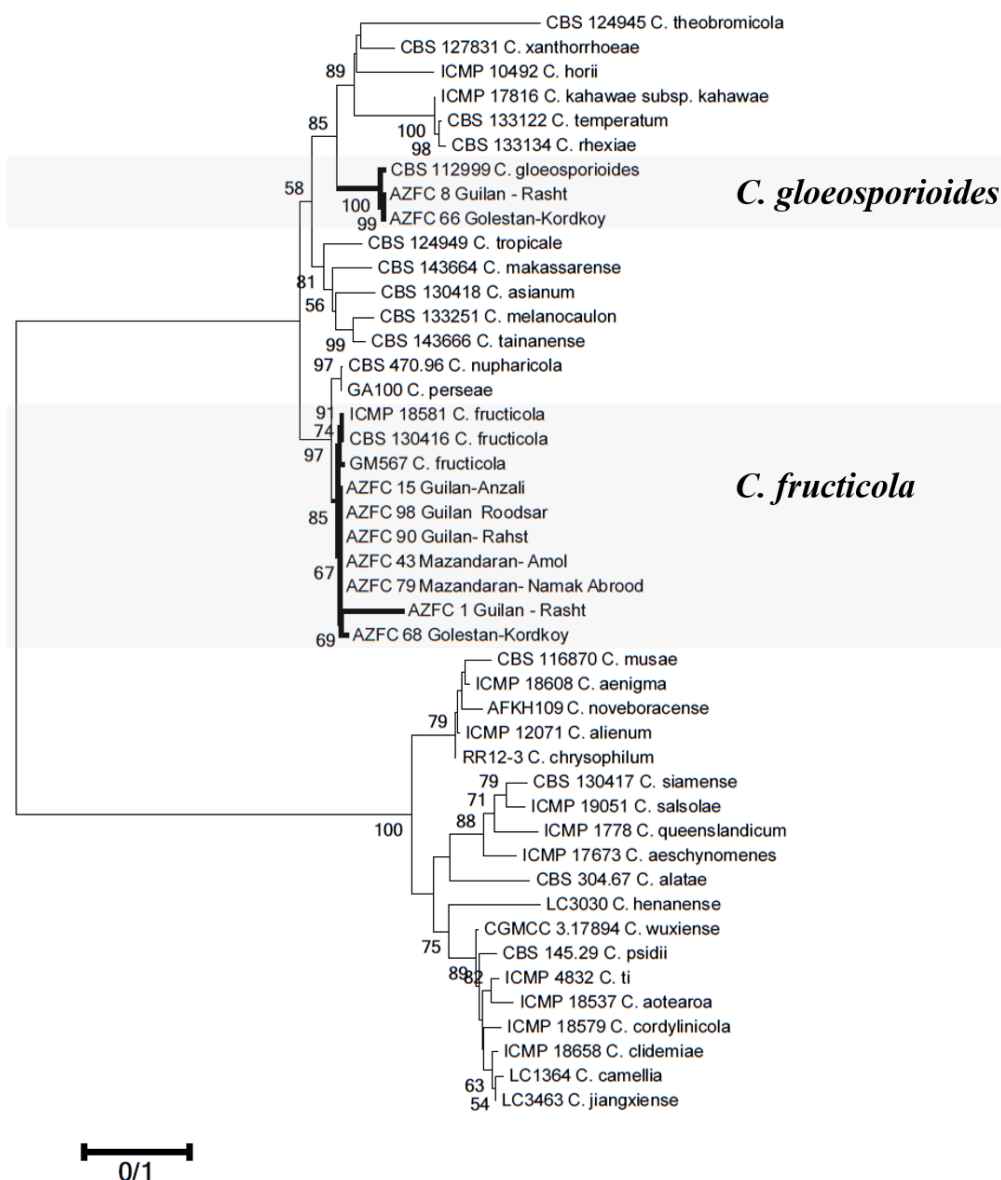
ارتباط ژنتیکی جدایه‌های چهار گونه از جنس *Colletotrichum* (*C. capsici* و *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. musae*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و شش آغازگر مورد بررسی قرار گرفت.

جدایه‌های سه گونه دیگر شامل *C. karstii*، *C. aenigma* و *C. fructicola* می‌باشد. کارایی نشانگر مولکولی ISSR در تفکیک گونه‌های جنس *Colletotrichum* در مطالعات مختلفی تایید شده است. در یکی از مهم‌ترین مطالعات،



شکل ۴. تبارنمای ترسیم شده بر اساس ژن *TUB2* برای گونه‌های جنس *Colletotrichum* به روش Maximum Likelihood. اعداد بالای شاخه‌ها، مقدار اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. استرین *Monilochaetes infuscans* CBS 869.96 به عنوان گروه خارجی در تبارنما استفاده شده است. جدایه‌های مورد استفاده در این مطالعه با نام استرین (AZFC...) در تبارنما نشان داده شده اند.

**Figure 4.** Phylogram of *Colletotrichum* species based on the *TUB2* gene and Maximum Likelihood method. The numbers above the branches represent the bootstrap values with 1000 replications. *Monilochaetes infuscans* CBS 869.96 was used as out group in the phylogram. The isolates used in this study are shown with strain code (AZFC...) in the progeny tree.



شکل ۵. تبارنمای ترسیم شده بر اساس ناحیه ApMAT در گونه‌های جنس *Colletotrichum* به روش Maximum Likelihood. اعداد بالای چاهک‌ها، نتایج اعتبارسنجی را با ۱۰۰۰ تکرار نشان می‌دهد. جدایه‌های مورد استفاده در این مطالعه با نام استرین (AZFC...) در درخت تبارزایی نشان داده شده است.

**Figure 5.** Phylogenetic tree based on ApMAT region sequences in *Colletotrichum* species using Maximum Likelihood method. The numbers above the branches represent the bootstrap values with 1000 replications. The isolates used in this study are shown with strain code (AZFC...) in the progeny tree.

(Ratanacherdchai *et al.* 2010). در مطالعه دیگری که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *C. gloeosporioides* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR انجام شد، علاوه بر کسب نتایج مطلوب، مشخص گردید این نشانگر به خوبی می‌تواند جدایه‌های *C. gloeosporioides* را از جدایه‌های *C. acutatum* و *C. sublineolum* تفکیک نماید (Medeiros *et al.* 2010). در مطالعه مشابهی نشانگر مولکولی ISSR به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تفکیک گونه‌های بیمارگر عامل آنتراکنوز در برخی از

نتایج نشان داد این گونه‌ها در چهار گروه انگشت‌نگاری DNA مجزا از هم قرار می‌گیرند (Srisuttee & Nalumpang 2007). در مطالعه دیگری الگوی انگشت‌نگاری ۳۴ جدایه از گونه‌های مختلف *Colletotrichum* به دست آمده از سه وارپته فلفل با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و شش آغازگر مورد ارزیابی قرار گرفت و بر این اساس این جدایه‌ها به دو دودمان مجزا گروه‌بندی شدند. مطالعات تبارزایی نشان داد اعضای دو دودمان مجزا به دو گونه *C. gloeosporioides* و *C. capsici* تعلق دارند

شدند. در مرحله اول از ناحیه ژنی *TUB2* برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و شناسایی جدایه‌ها استفاده شد. بر اساس مطالعات متعدد پیشین توالی نوکلئوتیدی این ناحیه ژنی برای تفکیک گونه‌های نزدیک به هم در جنس *Colletotrichum* بسیار کارآمد و مفید به شمار می‌رود و این ناحیه ژنی یکی از پرکاربردترین و کارآمدترین نواحی ژنومی در مطالعات تبارزایی محسوب می‌شود (Weir et al. 2012; Alizadeh et al. 2015, 2022). تجزیه و تحلیل تبارزایی بر اساس توالی نوکلئوتیدی این ناحیه ژنی به خوبی توانست گونه‌های قارچی متفاوت از هم را شناسایی کند. همچنین طبق پژوهش‌های گذشته ناحیه ژنومی *APN2/MAT1* به عنوان کارآمدترین ناحیه در تفکیک گونه‌های جنس *Colletotrichum* در داخل کمپلکس *Graminicola* معرفی شده است (Liu et al. 2015). لذا به منظور تأیید نتایج تجزیه و تحلیل تبارزایی ناحیه ژنی *TUB2*، از تعیین توالی ناحیه ژنی *APN2/MAT1* استفاده شد. نتایج این آزمون نیز نتایج حاصل از مطالعات تبارزایی بر اساس ناحیه ژنی *TUB2* و نتایج تحقیقات پیشین مبنی بر قدرت تمایز گونه‌های مختلف *Colletotrichum* از هم را تأیید کرد.

بر اساس اطلاعات موجود این اولین مطالعه جامع در مورد ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *C. fructicola* از انواع میزبان‌های اهلی و وحش، چوبی و علفی در مناطق جغرافیایی مختلف در سطح دنیا محسوب می‌شود. با توجه به اینکه این قارچ یک گونه بسیار مخرب روی محصولات کشاورزی به خصوص میوه‌ها محسوب می‌شود (Weir et al. 2012; Atghia et al. 2015; Ma et al. 2020; Sun et al. 2020; Zhou et al. 2020)، نتایج این پژوهش برای مدیریت بیماری‌های ناشی از این گونه قارچی بسیار مفید و ارزشمند خواهد بود.

گیاهان تیره حبوبات در استان‌های شمالی ایران استفاده شد. نتایج نشان داد جدایه‌های بدست آمده از انواع حبوبات در نه گروه انگشت‌نگاری DNA قرار می‌گیرند. نتایج شناسایی گونه‌ها بر اساس تلفیق ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی نواحی ژنومی مختلف مشخص کرد که این جدایه‌ها به نه گونه از جنس *Colletotrichum* شامل *C. lindemuthianum*, *C. fructicola*, *C. glycines*, *C. gloeosporioides*, *C. aenigma*, *C. alienum*, *C. truncatum*, *C. cliviae* و *C. coccodes* تعلق دارند. این پژوهش نشانگر مولکولی ISSR را به عنوان یک ابزار کارآمد در تفکیک گونه‌های جنس *Colletotrichum* که از گیاهان تیره حبوبات جداسازی شده بودند، معرفی نمود (Atghia et al. 2015). با توجه به اینکه شناسایی دقیق گونه‌های جنس *Colletotrichum* صرفاً بر اساس صفات ریخت‌شناسی امکان‌پذیر نیست، مطالعات تاکسونومیک این جنس در طی چند سال گذشته بر تجزیه و تحلیل تبارزایی چندژنی استوار بوده است (Tao et al. 2013; Yan et al. 2015; Marin-Felix et al. 2017; Lee & Jung 2018; Damm et al. 2019; Fu et al. 2019). با وجود وقوع پیشرفت‌های فراوان در علم قارچ‌شناسی پس از استفاده از راهبرد تجزیه و تحلیل‌های چندژنی، تلاش برای دستیابی به ابزارهای آسان، سریع و کم هزینه‌تر برای گروه‌بندی جدایه‌های قارچی بر اساس ماهیت گونه‌های قارچی در حال انجام بوده است. در نهایت نتایج این مطالعه و نیز نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داد نشانگر مولکولی ISSR می‌تواند به عنوان یک ابزار بسیار مفید در گروه‌بندی گونه‌های جنس *Colletotrichum* مورد استفاده قرار گیرد.

در این پژوهش به منظور شناسایی جدایه‌های جنس *Colletotrichum*، از دو ناحیه ژنی *TUB2* و *APN2/MAT1* استفاده شد. پس از انجام گروه‌بندی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR تعداد ۲۸ جدایه به عنوان نماینده برای شناسایی انتخاب

## References

- Alizadeh A, Javan-Nikkhah M, Nourmohammadi Nazarian R, Liu F, Zare R, Fotouhifar KB, Stukenbrock EH, Damm U. 2022. New species of *Colletotrichum* from wild Poaceae and Cyperaceae plants in Iran. *Mycologia* 114 (1): 89–113.
- Alizadeh A, Javan-Nikkhah M, Salehi Jozani GR, Fotouhifar K, Roodbar Shojaei T, et al., 2017. AFLP, pathogenicity and mating type analysis of Iranian *Fusarium proliferatum* isolates recovered from maize, rice, sugarcane and onion. *Mycologia Iranica* 4 (1): 13–28.
- Alizadeh A, Javan-Nikkhah M, Zare R, Fotouhifar KB, Damm U, Stukenbrock EH. 2015. New records of *Colletotrichum* species for the mycobiota of Iran. *Mycologia Iranica* 2 (2): 95–109.
- Alizadeh A, Nikkhah MJ, Fotouhifar KB, Motlagh ER, Rahjoo V. 2010. Genetic diversity of *Fusarium proliferatum* populations from maize, onion, rice and sugarcane in Iran based on vegetative compatibility grouping. *Plant Pathology Journal* 26 (3): 216–22.
- Alizadeh A. 2015. Systematic study on *Colletotrichum* species in Southern Caspian coast. PhD Thesis. University of Tehran, 295 pp. (in Persian with English abstract).
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of*



- Molecular Biology* 215 (3): 403–410.
- Arade P, Singh P, Mahatma M, 2014. Characterization of *Colletotrichum falcatum* Went. causing red rot in sugarcane saccharum complex, *The Bioscan* 9 (1): 375–379.
- Arzanlou M, Bakhshi M, Karimi K, Torbati M, 2015. Multigene phylogeny reveals three new records of *Colletotrichum* spp. and several new host records for the mycobiota of Iran. *Journal of Plant Protection Research* 55 (2): 198–211.
- Atghia O, Alizadeh A, Fotouhifar KB, Damm U, Stukenbrock EH, et al., 2015. First report of *Colletotrichum fructicola* as the causal agent of anthracnose on common bean and cowpea. *Mycologia Iranica* 2 (2): 139–140.
- Behnia M, Javan-Nikkhah M, Aminian H, Razavi M, Alizadeh A, 2016. Population structure and sexual fertility of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato from citrus in Northern Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 18 (2): 561–574.
- Bhatt P, Rakhshiya P, Thaker V, 2020. Molecular marker development from ISSR for fungal pathogens of *Mangifera indica* L. *Indian Phytopathology* 73 (2): 257–265.
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW, 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22(1): 525–564.
- Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir B, Waller J, et al., 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39 (1): 183–204.
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS, 2012. *Colletotrichum*-current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181–213.
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Crous PW, 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73: 37–113.
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Shivas RG, Crous PW, 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73: 1–36.
- Damm U, Sato T, Alizadeh A, Groenewald JZ, Crous PW, 2019. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. *Studies in Mycology* 92: 1–46.
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, et al., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13 (4): 414–430.
- Edgar RC, 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5 (1): 113–120.
- Ershad J, 2009. Fungi of Iran. 3<sup>th</sup> edition. Publications of the Iranian Plant Protection Research Institute. Tehran, 531 pages.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Fu DD, Wang W, Qin RF, Zhang R, Sunb GY, et al., 2014. *Colletotrichum fructicola*, first record of bitter rot of apple in China. *Mycotaxon* 126 (1): 23–30.
- Fu M, Crous PW, Bai Q, Zhang PF, Xiang J, et al., 2019. *Colletotrichum* species associated with anthracnose of *Pyrus* spp. in China. *Persoonia* 42: 1–35.
- Glass NL, Donaldson GC, 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330.
- Grünig CR, Sieber TN, Holdenrieder O, 2001. Characterisation of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Mycological Research* 105 (1): 24–32.
- Han YC, Zeng XG, Xiang FY, Ren L, Chen FY, et al., 2016. Distribution and characteristics of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose of strawberry in Hubei, China. *Plant Disease* 100 (5): 996–1006.
- Hyde KD, Cai L, Cannon PF, Crouch JA, Crous PW, et al., 2009. *Colletotrichum*-names in current use. *Fungal Diversity* 39 (2): 147–183.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16 (2): 111–120.
- Lee SY, Jung HY, 2018. *Colletotrichum kakivorum* sp. nov., a new leaf spot pathogen of persimmon in Korea. *Mycological Progress* 17 (10): 1113–1121.
- Liu F, Weir BS, Damm U, Crous PW, Wang Y, et al., 2015. Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing ApMAT and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia* 35 (1): 63–86.
- Longya A, Talumphai S, Jantasuriyarat C, 2020. Morphological characterization and genetic diversity of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, from Thailand using ISSR and SRAP markers. *Journal of Fungi* 6 (1): 38.
- Ma J, Wang X, Guo M, 2020. First report of anthracnose on *Dendrobium officinale* caused by *Colletotrichum fructicola* in Anhui province, China. *Plant Disease* 104 (2): 574–574.
- Ma Z, Michailides TJJCP, 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24 (10): 853–863.

- Marin-Felix Y, Groenewald JZ, Cai L, Chen Q, Marincowitz S, *et al.*, 2017. Genera of Phytopathogenic Fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology* 86: 99–216.
- McDonald BA, 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87 (4): 448–453.
- McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40 (1): 349–379.
- Medeiros LV, Maciel DB, Medeiros VV, Kido LMH, Oliveira NT, 2010. *pelB* gene in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from several hosts. *Genetics and Molecular Research* 9: 661–673.
- Moretti A, Mulè G, Susca A, González-Jaén MT, Logrieco A, 2005. Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. Pages 601–609. In: Mulè G, ed. *Molecular diversity and PCR-detection of toxigenic Fusarium species and ochratoxigenic fungi*. Springer, Dordrecht.
- Mullis KB, Faloona FA, 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.
- Nabi A, Padder BA, Dar MS, Ahmad M, 2018. Morpho-cultural, pathological and molecular variability in *Thyrostroma carpophilum* causing shot hole of stone fruits in India. *European Journal of Plant Pathology* 151(3): 613–627.
- Nazari S, Javan-Nikkhah M, Fotouhifar KB, Khosravi V, Alizadeh A, 2015. *Bipolaris* species associated with rice plant: pathogenicity and genetic diversity of *Bipolaris oryzae* using rep-PCR in Mazandaran province of Iran. *Journal of Crop Protection* 4 (4): 497–508.
- Nei M, Kumar S, 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Niu XP, Gao H, Chen Y, Qi JM, 2016. First report of anthracnose on white jute (*Corchorus capsularis*) caused by *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* in China. *Plant Disease* 100(6): 1243–1243.
- O'Donnell K, Cigelnik E, 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103–116.
- Pirondi A, Kitner M, Iotti M, Sedláková B, Lebeda A, *et al.*, 2016. Genetic structure and phylogeny of Italian and Czech populations of the cucurbit powdery mildew fungus *Golovinomyces orontii* inferred by multilocus sequence typing. *Plant Pathology* 65(6): 959–967.
- Pirondi A, Vela-Corcía D, Dondini L, Brunelli A, Pérez-García A, *et al.*, 2015. Genetic diversity analysis of the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera xanthii* suggests a clonal population structure. *Fungal Biology* 119 (9): 791–801.
- Ratanacherdchai K, Wang HK, Lin FC, Soyong K, 2010. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. *African Journal of Microbiology Research* 4(2): 076–083.
- Salimi F, Javan-Nikkhah M, Padasht Dehkayi F, Alizadeh A, Soltanloo H, *et al.*, 2019. Dynamic of *Pyricularia oryzae* at the two stages, leaf, and panicle neck blast based on the assessment of population structure at leaf, tiller, and field levels. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 49(2): 187–201 (in Persian with English abstract).
- Shenoy BD, Jeewon R, Lam WH, Bhat DJ, Than PP, *et al.*, 2007. Morpho-molecular characterisation and epitypification of *Colletotrichum capsici* (Glomerellaceae, Sordariomycetes), the causative agent of anthracnose in chilli. *Fungal Diversity* 27: 197–211.
- Shi NN, Du YX, Chen FR, Ruan HC, Yang XJ, 2017. First report of leaf spot caused by *Colletotrichum fructicola* on Japanese fatsia (*Fatsia japonica*) in Fujian province in China. *Plant Disease* 101(8): 1552–1552.
- Silva DN, Talhinhos P, Várzea V, Cai L, Paulo OS, *et al.*, 2012. Application of the *Apn2/MAT1* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycologia* 104(2): 396–409.
- Srisuttee R, Nalumpang S, 2007. Genetic relationship of *Colletotrichum* spp. by morphology and ISSR technique. *Journal of Agriculture, A Technical Journal of Faculty of Agriculture, Chiang Mai University* 23: 89.
- Sun M, Zhao J, Li Q, Forte-Perri V, Bu Z, *et al.*, 2020. First report of anthracnose on *Hybrid Mandevilla* (*Mandevilla* × *amabilis*) caused by *Colletotrichum fructicola* in China. *Plant Disease* 102(12): 2653.
- Taheri H, Javan-Nikkhah M, Elahinia SA, Khodaparast SA, Golmohammadi M, 2016. Species of *Colletotrichum* associated with citrus trees in Iran. *Mycologia Iranica* 3 (1): 1–14.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S, 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12): 2725–2729.
- Tao G, Liu ZY, Liu F, Gao YH, Cai L, 2013. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new species. *Fungal Diversity* 61: 139–164.
- Velho AC, Rockenbach MF, Mondino P, Stadnik MJ, 2016. Modulation of oxidative responses by a virulent

- isolate of *Colletotrichum fructicola* in apple leaves. *Fungal Biology* 120(10): 1184–1193.
- Wang QH, Fan K, Li DW, Niu SG, Hou LQ, *et al.*, 2017. Walnut anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* in China. *Australasian Plant Pathology* 46 (6): 585–595.
- Weir BS, Johnston PR, Damm U, 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115–180.
- Yan JY, Jayawardena MMRS, Goonasekara ID, Wang Y, Zhang W, *et al.*, 2015. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. *Fungal Diversity* 71 (1): 233–246.
- Zhong S, Steffenson BJ, 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 91: 469–476.
- Zhou S, Smith DR, Stanosz GR, 2001. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research* 105 (8): 919–926.
- Zhou X, Li M, Rao B, Chen Y, Cai C, *et al.*, 2020. First report of anthracnose on *Paris polyphylla* var. *chinensis* caused by *Colletotrichum fructicola* in Northern Fujian, China. *Plant Disease* 104 (10): 2728.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)