

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه *Sphaerulina frondicola* عامل بیماری لکه برگی صنوبر در استان آذربایجان شرقی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR

پذیرش: ۹۹/۹/۱

بازنگری: ۹۷/۱۱/۲۷

دریافت: ۹۷/۶/۱۱

مینا میرزائی، اسداله بابای اهری، ابوالفضل نرمانی، مهدی ارزنلو ✉

به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، پژوهشگر پسا دکتری بیماری شناسی گیاهی، استاد (✉ arzanlou@tabrizu.ac.ir)، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

بیماری لکه برگی صنوبر، با عامل *Sphaerulina frondicola* (syn: *Septoria populi*) از جمله بیماری‌های مهم و جدی درختان صنوبر می‌باشد که خسارت زیادی به این میزبان وارد می‌نماید. در این بررسی تنوع ژنتیکی ۱۳۸ جدایه *S. frondicola* بدست آمده از درختان صنوبر در مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی و غربی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR ارزیابی شد. نتایج این بررسی نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در بین جمعیت‌های مورد مطالعه وجود دارد. میانگین تنوع ژنتیکی برآورد شده برای کل جمعیت‌ها با استفاده از داده‌های همه آغازگرها ۰/۱۹۹ در سطح احتمال ۰/۰۰۱ برآورد گردید. کمترین تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های هوراند و کلیبر (۰/۳۵۲) با بیشترین جریان ژنی (۵۴/۹۵۶) و بیشترین تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های خوی و بستان آباد (۰/۵۱۶) با کمترین جریان ژنی (۰/۴۶۸) مشاهده شد که با فاصله جغرافیایی همخوانی دارد. بر اساس فاصله ژنتیکی Nei، جمعیت بستان آباد بیشترین فاصله را با شش جمعیت دیگر نشان داد. آنالیز هاپلوتیپ‌ها، جدایه‌های به دست آمده از یک درخت و یا حتی از یک لکه را در گروه‌های متفاوتی قرار داد که نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در یک مقیاس کوچک می‌باشد. به طور کلی وجود هاپلوتیپ‌های مختلف و توزیع تنوع ژنی در یک مقیاس کوچک، فرضیه حضور آسکوسپور جنسی هوازاد به عنوان مایه تلقیح اولیه در چرخه بیماری را نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: آذربایجان شرقی، تنوع ژنتیکی، لکه برگی، *Septoria*، ISSR-PCR، *Populus*، RAPD-PCR.

Genetic diversity among *Sphaerulina frondicola* populations, the causal agent of poplar leaf spot disease in East Azarbaijan Province using RAPD and ISSR molecular markers

Received: 2 Sep 2018

Revised: 16 Feb 2019

Accepted: 21 Nov 2020

Mina Mirzaei, Asadollah Babai-Ahari, Abolfazl Narmani, Mahdi Arzanlou ✉^{ID}

Respectively, MSc, Professor, Postdoctoral Researcher, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Professor (✉ arzanlou@tabrizu.ac.ir), University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Abstract

Poplar leaf spot disease, caused by *Sphaerulina frondicola* (syn: *Septoria populi*), is one of the important and serious diseases of populus trees, which causes significant loss on this host. Considering the importance of this disease, in the present study, the genetic diversity of 138 *S. frondicola* isolates obtained from populus trees in different regions of East and West Azarbaijan Provinces was analysed using RAPD and ISSR molecular markers. The results indicated considerable genetic variation amongst the studied populations. The mean genetic diversity for all of the populations using data from all primers was 0.199 at the probability level of 0.001. The lowest genetic differentiation was observed between Hurand and Kaleyber populations (0.352) with the highest gene flow (54.956) and the highest genetic differentiation was observed between Khoy and Bostanabad populations (0.516) with the lowest gene flow (0.468) which is consistent with geographical distance. Based on Nei's genetic distance, the Bostanabad population showed the highest genetic distance from the other six populations. Haplotype analysis clustered the isolates from a single tree or even single spot in different groups, suggesting the existence of high genetic diversity in a small scale. Overall, the existence of different haplotypes and distribution of genetic diversity in a small scale observed in this study, suggests occurrence of regular sexual cycle in *S. frondicola* populations and highlights the role of airborne ascospores as primary inoculum source in disease cycle.

Keywords: East Azarbaijan Province, Genetic diversity, ISSR-PCR, Leaf spot, *Populus*, *Septoria*, RAPD-PCR.

How to cite:

Mirzaei M, Babai-Ahari A, Narmani A, Arzanlou M, 2021. Genetic diversity among *Sphaerulina frondicola* populations, the causal agent of poplar leaf spot disease in East Azarbaijan Province using RAPD and ISSR molecular markers. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 9 (4): 1-15.

مقدمه

درخت صنوبر با نام لاتین *Populus deltoids* (W. Bartram ex Marshall) به خانواده Salicaceae تعلق دارد. کشت این گونه درختی به دلیل سازگاری زیاد و رشد سریع، برای ممانعت از کاهش سطح جنگل‌های طبیعی کشور و نیز برای رفع نیاز به چوب در اولویت قرار گرفته است. با این وجود صنوبر در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا زنده و تنش‌های غیر زنده حساس می‌باشد (Ramezani Gourabi & Shirzad 2009). بیماری‌های لکه‌برگی از مهمترین بیماری‌های اندام‌های هوایی صنوبر به شمار می‌روند. عوامل قارچی متنوعی در ایجاد بیماری‌های لکه‌برگی صنوبر دخیل هستند که در این بین نقش گونه‌های جنس *Septoria* قابل توجه می‌باشد (Maxwell et al. 1997; Golmohammadi et al. 2015; Babai Ahari et al. 2017). علائم اولیه آلودگی به صورت زخم‌های برگ منظم به رنگ قهوه‌ای با مرکز روشن یا نسبتاً زرد ظاهر می‌شوند، این لکه‌ها نهایتاً به هم می‌پیوندند و باعث از بین رفتن بخش وسیعی از بافت پهنک برگ می‌شوند. علائم بیماری ابتدا روی برگ‌های پایینی ظاهر می‌شوند. عامل بیماری به تدریج تمام تاج درخت را آلوده کرده و باعث ریزش زودتر از موعد برگ‌ها می‌شود. تاکنون ۱۴ گونه از جنس *Septoria* روی اعضای جنس *Populus* گزارش شده‌اند (Bakhshi et al. 2018, 2019). مطالعات فیلوژنتیک اخیر نشان داده است که جنس *Septoria* چندنیایی می‌باشد و بر این اساس تعدادی از گونه‌های این جنس به جنس‌های دیگر انتقال داده شده‌اند (Verkley et al. 2013; Quaedvlieg et al. 2013). سه گونه *Sphaerulina musiva* (Peck) Quaedvlieg, Verkley, and Crous (Syn. = *Septoria Sphaerulina frondicola* (Fr.) Verkley, *musiva* Peck) و Quaedvlieg & Crous, (Syn. *Septoria populi* Desm *Sphaerulina populicola*, quaedv. verkley & crous (syn: *Septoria populicola* Peck.) روی صنوبر ایجاد خسارت اقتصادی می‌کنند.

گونه *S. musiva* مهمترین و مخربترین گونه خسارت‌زا روی صنوبر و هیبریدهای آن می‌باشد، با این وجود این گونه محدود به امریکای شمالی می‌باشد (Golmohammadi et al. 2015; Babai Ahari et al. 2017). اما گونه *S. frondicola* در کشورهای آسیایی و اروپایی شایع می‌باشد. گونه *S. frondicola* به عنوان عامل اصلی لکه‌برگی صنوبر در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی گزارش شده است (Golmohammadi et al. 2016).

کنیدی‌های *S. populi* توسط باران پخش می‌شوند بنابراین دارای محدودیت حرکت در مسیرهای طولانی می‌باشند، درحالیکه آسکوسپورها توسط باد پخش می‌شوند. مرحله سودوتسیومی در برگ‌ها به صورت فرم زمستان‌گذران مشاهده شده است. علاوه بر این، اهمیت تولید مثل جنسی و غیر جنسی در ژنتیک جمعیت و پویایی این گونه همچنان نامشخص است. مطالعات اپیدمیولوژیک شواهدی را ارائه می‌دهد که مایه تلقیح اولیه ایجاد کننده بیماری در صنوبر هیبرید، منشا هوازاد دارد و این نشان می‌دهد که آسکوسپورها می‌توانند نقش عمده‌ای در آلودگی اولیه داشته باشند (Cellerino 1999).

همانند هر بیماری دیگر مدیریت موثر این بیماری نیز نیازمند داشتن اطلاع کافی از بیمارگر، از جمله شناسایی دقیق راه‌های بقا، طیف میزبانی، بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی مرحله جنسی آن می‌باشد (Narmani et al. 2014). اطلاعات اندکی در مورد پتانسیل وقوع مرحله جنسی و اهمیت مرحله تولید مثل جنسی در چرخه زندگی این گونه قارچی در دسترس می‌باشد (Golmohammadi et al. 2015). تولید مثل جنسی همراه با جهش‌ها، نوترکیبی و انتخاب طبیعی عوامل اصلی تکامل به شمار می‌روند (Zhan et al. 2003; Kuck & Poggeler 2009). در قارچ‌های بیمارگر گیاهی، تولید مثل جنسی به دلیل اهمیت آن در نوترکیبی نقش مهمی در اپیدمیولوژی بیماری‌های گیاهی ایفا می‌کند (Casselton 2008). از طرف دیگر تولید مثل جنسی در انتشار بیمارگر از طریق تولید آسکوسپورهای هوازاد ایفای نقش نموده و باعث افزایش تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها از طریق نوترکیبی جنسی می‌شود. آگاهی در زمینه پتانسیل وقوع چرخه تولید مثل جنسی در قارچ‌ها جهت مدیریت بیماری ضروری می‌باشد. در بیماری شناسی گیاهی، نوترکیبی برای پیش‌بینی پتانسیل وقوع ژنوتیپ‌های ویژه در جمعیت بیمارگر مهم است؛ به عنوان مثال می‌توان به پاتوتیپ‌های سازگار با کولتیوارهای مقاوم و یا افراد مقاوم به قارچ‌کش‌های متعدد اشاره کرد (Milgroom 1996; Turgeon 1998; Arzanlou et al. 2010; Arzanlou & Narmani 2016; Narmani et al. 2016).

هدف کلی این پژوهش تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *S. frondicola* در استان آذربایجان شرقی بود. در بررسی تنوع ژنتیکی این بیمارگر سعی شد که امکان وقوع یا عدم وقوع تولید مثل جنسی مورد بررسی قرار گیرد و برای این منظور مقیاس فضایی مختلف از جمله: (۱) مناطق مختلف مورد نمونه‌برداری، (۲)

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی

جهت کشت نمونه‌ها، قطعات برگی حاوی لکه‌برگی در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱۵-۳۰ ثانیه ضدعفونی شده و جداسازی ۸-۱۲ ساعت بعد با استفاده از روش اتاقل مرطوب در زیر بینوکلر و انتقال کنیدی به روی محیط کشت PDA حاوی چند قطره اسید لاکتیک (حدود یک میلی‌لیتر در لیتر) جهت جلوگیری از رشد باکتری انجام گرفت. تشتک‌های پتری در تناوب ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. رشد جدایه‌های قارچی ۱۴-۱۰ روز به طول انجامید. جدایه‌های قارچی در تیوب‌های دو میلی‌لیتری حاوی محیط کشت سیب زمینی-هویج-آگار (PCA) Potato Carrot Agar (به میزان ۲۰-۲۰-۲۰) کشت داده شدند و جهت نگهداری برای مطالعات بعدی در داخل یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌ها، قطعات محیط کشت حاوی اندام قارچی تهیه و درون تیوب‌های دو میلی‌لیتری حاوی مخلوط آب مقطر استریل + گلیسرول به میزان ۵۰ درصد منتقل شدند. تیوب‌های مذکور در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (جدول ۱).

درختان مختلف یک منطقه، ۳ برگ‌های مختلف یک درخت، ۴ لکه‌های مختلف یک برگ و ۵ پیکنیده‌های مختلف یک لکه به صورت تصادفی تحت پوشش قرار گرفت تا تنوع ژنتیکی جمعیت به صورت وسیع ارزیابی شود.

مواد و روش

نمونه برداری

نمونه برداری در تابستان سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۴ از مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی (اطراف شهرهای اهر، هوراند، کلبر، جلفا، بستان آباد، مرند، میانه، شبستر، سراب، خامنه، ملکان، مراغه) و نیز برخی از مناطق استان آذربایجان غربی شامل شهرستان خوی (به عنوان نمونه خارجی) انجام گرفت. زمان نمونه برداری از اواخر تیرماه تا شهریور ماه همزمان با ظهور علائم و البته تشکیل پیکنیدها بر روی لکه‌های برگی بوده است. نمونه‌ها با ثبت موقعیت جغرافیایی و اطلاعات باغ مورد نمونه برداری و گرفتن عکس از علائم ظاهری درختان صنوبر آلوده جمع‌آوری شده و در پاکت‌های جداگانه به آزمایشگاه منتقل و تا بررسی‌های بعدی در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱. لیست مناطق نمونه برداری شده و تعداد جدایه‌های *Sphaerulina frondicola*Table 1. List of the sampling areas and number of *Sphaerulina frondicola* isolates.

Number of isolates	Sampling area	Number of isolates	Sampling area
14	Mianeh	41	Ahar
8	Bostanabad	11	Hurand
4	Marand	24	Kaleybar
17	Khoy	19	Jolfa

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌ها

مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها مطابق شرایط پیشنهاد شده توسط Verkley et al. (2013) ثبت گردید. از آنجائیکه کنیدیوم‌های دو گونه *S. frondicola* و *S. populicola* از نظر ریخت‌شناختی و به‌ویژه ابعاد و تعداد دیواره‌های عرضی کنیدیوم هم‌پوشانی دارند (Callen et al. 2007) و تمایز دقیق آنها از همدیگر با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی مشکل می‌باشد، به‌منظور حصول اطمینان از صحت تشخیص جدایه‌ها، از آغازگرهای اختصاصی استفاده

گردید. برای شناسایی مولکولی جدایه‌های دو گونه *S. frondicola* و *S. populicola* از دو جفت آغازگر اختصاصی گونه طراحی شده توسط Feu et al. (2005b) براساس ناحیه فاصله انداز داخلی DNA ریبوزومی (ITS-rDNA) استفاده شد. برای این منظور DNA جدایه‌های قارچی مطابق روش Baradaran et al. (2015) استخراج گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۶/۲۵ میکرولیتر مستر میکس ۲x Master Mix Taq DNA Pol 2X، ۰/۵ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای رفت

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Sphaerulina frondicola* در این مطالعه تعداد پنج آغازگر OPA13, OPB10, OPB01, SAT2, SAT1 (سه آغازگر تصادفی و دو عدد آغازگر ریز ماهواره) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *S. frondicola* مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲).
تعداد ۵۴ جدایه *S. frondicola* از مناطق مختلف نمونه برداری شده جهت بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده نشانگرهای Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) و (ISSR) Inter-Simple Sequence Repeat انتخاب شدند. جدایه‌های قارچی به صورت تصادفی و بر اساس مناطق مختلف نمونه- برداری، درختان مختلف یک منطقه، برگ‌های مختلف یک درخت، لکه‌های مختلف یک برگ و حتی پیکنیده‌های مختلف یک لکه انتخاب شدند.

و برگشت، ۱۵-۱۰ نانوگرم DNA ژنومی و آب دیونیزه استریل بود.

تکثیر قطعات DNA طبق برنامه پیشنهادی Feau *et al.* (2005b)، یک چرخه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه، ۳۶ چرخه تکثیر شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای جفت آغازگر Spnr و Spnf و دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای جفت آغازگر Spopr و Spopf و بسط در ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. فرآورده‌های واکنش بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم بروماید در بافر TAE IX با استفاده از دستگاه عکس برداری از ژل داک (Gel documentation) تحت نور ماوراء بنفش مشاهده و بررسی شدند.

جدول ۲. لیست و توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Sphaerulina frondicola*

Table 2. List and sequence of the primers used for the evaluation of genetic diversity among *Sphaerulina frondicola* isolates.

Number of groups with similarity coefficient of 70%	Number of amplified fragments	Sequence	Primer
9	19	5'-CAGCACCCAC-3'	OPA 13
13	15	5'-GTTTCGCTCC-3'	OPB 01
19	23	5'-CTGCTGGGAC-3'	OPB 10
20	24	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	SAT1
18	21	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'	SAT2

واسرشت سازی اولیه، ۳۶ چرخه به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود. برنامه چرخه حرارتی آغازگرهای ریزماهواره نیز به صورت واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۳۶ چرخه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت

پس از بهینه سازی کلیه پارامترهای فیزیکی و بیوشیمیایی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتری انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس ۲x حاوی دو میلی‌مولار منیزیم کلرید (MgCl₂) برای آغازگرهای تصادفی و مستر میکس ۲x حاوی یک و نیم میلی‌مولار منیزیم کلرید برای آغازگرهای ریزماهواره، ۰/۶-۰/۷ میکرولیتر به ازای ۱۵ میکرولیتر واکنش از هر کدام از آغازگرهای تصادفی و آغازگرهای ریز ماهواره، ۵۰-۴۰ نانوگرم DNA ژنومی و آب دیونیزه استریل بود. تکثیر قطعات DNA به صورت یک چرخه مقدماتی شامل پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت

نتایج

جداسازی، خالص سازی و شناسایی جدایه ها

از مجموع ۱۰۰ باغ مورد بازدید از ۱۲ شهرستان استان آذربایجان شرقی و نیز شهرستان خوی از استان آذربایجان غربی، در ۳۰ باغ از هشت شهرستان وجود بیماری لکه برگ سیتوریایی به اثبات رسید. در بخشی از مناطق مورد نمونه برداری از جمله شهرستان‌های شبستر، خامنه، سراب، ملکان و مراغه لکه‌برگی سیتوریایی شناسایی نگردید. با توجه به شرایط دمایی و رطوبتی مناطق مورد بررسی به نظر می‌رسد که علائم لکه‌برگی سیتوریایی بیشتر در مناطقی با رطوبت بالا و دمای بالا رایج‌تر می‌باشد. از میان مناطق آلوده به بیماری، تعداد ۱۳۸ جدایه *S. frondicola* با استفاده از روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس بر روی ژل آگارز نشان دهنده تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۳۹ جفت باز توسط جفت آغازگر Spnr و Spnf برای همه جدایه‌ها بود. در حالیکه، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای تشخیص افتراقی *S. populiicola* تکثیری صورت نگرفت. بنابراین گونه *S. frondicola* به عنوان تنها عامل بیماری سیتوریوز صنوبر در مناطق مذکور مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱).

یک دقیقه، بسط به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد و بسط نهایی به مدت شش دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

الکتروفورز فرآورده‌های PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی ۱. میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم بروماید در بافر TAE 1X، با ولتاژ ۹۰ v/cm (وات بر سانتی متر) به مدت دو ساعت انجام شد. برای تشخیص اندازه نوارهای تکثیر شده جدایه‌های مختلف از نشانگر ژنومی (DNA Ladder 100bp) با وزن یک کیلو بایت و ۱۰۰ جفت باز استفاده شد. محصولات حاصل از الکتروفورز توسط دستگاه عکس برداری از ژل (ژل داگ) تحت نور ماوراء بنفش مشاهده و بررسی شدند.

تجزیه داده‌ها

پس از ظهور ژل، برای باندهای واضح و تکرار پذیر عدد یک و برای عدم وجود باند در ردیف هم وزن، عدد صفر منظور گردید. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزارهای NTSYS Pc-2.02e و Gen Alex و Pop Gen و Haplotype Analyse-1.05 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR با آغازگرهای اختصاصی گونه *Sphaerulina frondicola* (Spnf/Spnr). تکثیر قطعه اختصاصی به طول ۴۳۹ جفت باز در جدایه‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف (ستون‌های ۱ الی ۱۹)، ستون ۲۰ (شاهد منفی).

Figure 1. Gel electrophoresis of PCR products using *Sphaerulina frondicola* specific primers (Spnf /Spnr). Amplification of a 439 bp specific fragment in isolates collected from different regions (columns 1- 19), column 20 (negative control).

استفاده از نرم افزار NTSYS و رسم دندروگرام، کمترین خوشه‌بندی متعلق به آغازگر OPA13 (تعداد ۹ خوشه) و بیشترین خوشه‌بندی متعلق به آغازگر SAT1 (تعداد ۲۰ خوشه) می‌باشد. دو آغازگر ریز ماهواره در مقایسه با آغازگرهای

بررسی تنوع ژنتیکی

از مجموع الگوهای باندهای حاصل از آغازگرهای ISSR و RAPD، ۱۰۲ نوار چندشکلی ایجاد شد. بیشترین نوار چندشکلی توسط آغازگر SAT1 (۲۴ نوار) و کمترین توسط آغازگر OPB01 (۱۵ نوار) حاصل شد (شکل ۲). در تجزیه و تحلیل داده‌ها با

در آغازگر OPB10 در چهار نوار (نوارهای ۱۷۰۰ با اندازه‌های، ۱۳۰۰، ۸۵۰، ۴۰۰) و در آغازگر OPA13 در پنج نوار (نوارهای با اندازه‌های ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰) با هم متفاوت بودند.

تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها

کمترین تمایز بین جمعیت‌های هوراند و کلیبر با میزان احتمال ۰/۳۵۲ مشاهده شد به طوری که بیشترین جریان ژنی با میزان ۵۴/۹۵۶ را دارا می‌باشند. در مقابل بیشترین تمایز بین جمعیت‌های خوی و بستان آباد محاسبه شد که دلیل آن جریان ژنی کم بین آن‌ها (۰/۴۶۸) می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت هر چقدر جریان ژنی بین جمعیت‌ها بیشتر باشد تمایز ژنی کمتری در بین شان وجود خواهد داشت (جدول ۵ و ۶).

راه‌های مختلفی از قبیل تولید و رهاسازی آسکوسپورهای هوازاد، ناقلین حشره‌ای و انتقال قلمه می‌تواند در وقوع جریان ژنی نقش داشته باشند. البته باید متذکر شد اغلب قلمستان‌های استان آذربایجان شرقی در منطقه بستان‌آباد واقع می‌باشد و چنانکه این جریان ژنی از طریق قلمه‌ها تامین شده باشد باید در بیشترین سطح خود و در نتیجه تمایز ژنی در کمترین سطح بین جمعیت خوی و جمعیت بستان‌آباد باشد در حالی که همانطور که در جداول شماره ۴ و ۵ مشاهده می‌شود، بیشترین فاصله ژنتیکی، بیشترین تمایز و کمترین جریان ژنی بین جمعیت بستان‌آباد با جمعیت‌های دیگر محاسبه شده است بنابراین وجود جریان ژنی توسط قلمه‌ها از بستان‌آباد به سایر نقاط منتفی می‌گردد.

هاپلو تیپ‌های جمعیت‌ها

تعداد هاپلو تیپ‌ها با تعداد جدایه‌های هر جمعیت برابر می‌باشد و حتی این هاپلو تیپ‌ها اختصاصی آن جمعیت می‌باشد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های مورد بررسی از هر جمعیت تولید مثل غیر جنسی نداشته‌اند چرا که این جدایه‌ها حاوی هاپلو تیپ‌های یکسان نیستند و در نتیجه می‌توان فرضیه حضور تولید مثل جنسی در جمعیت *S. frondicola* را مورد بررسی قرار داد (جدول ۷).

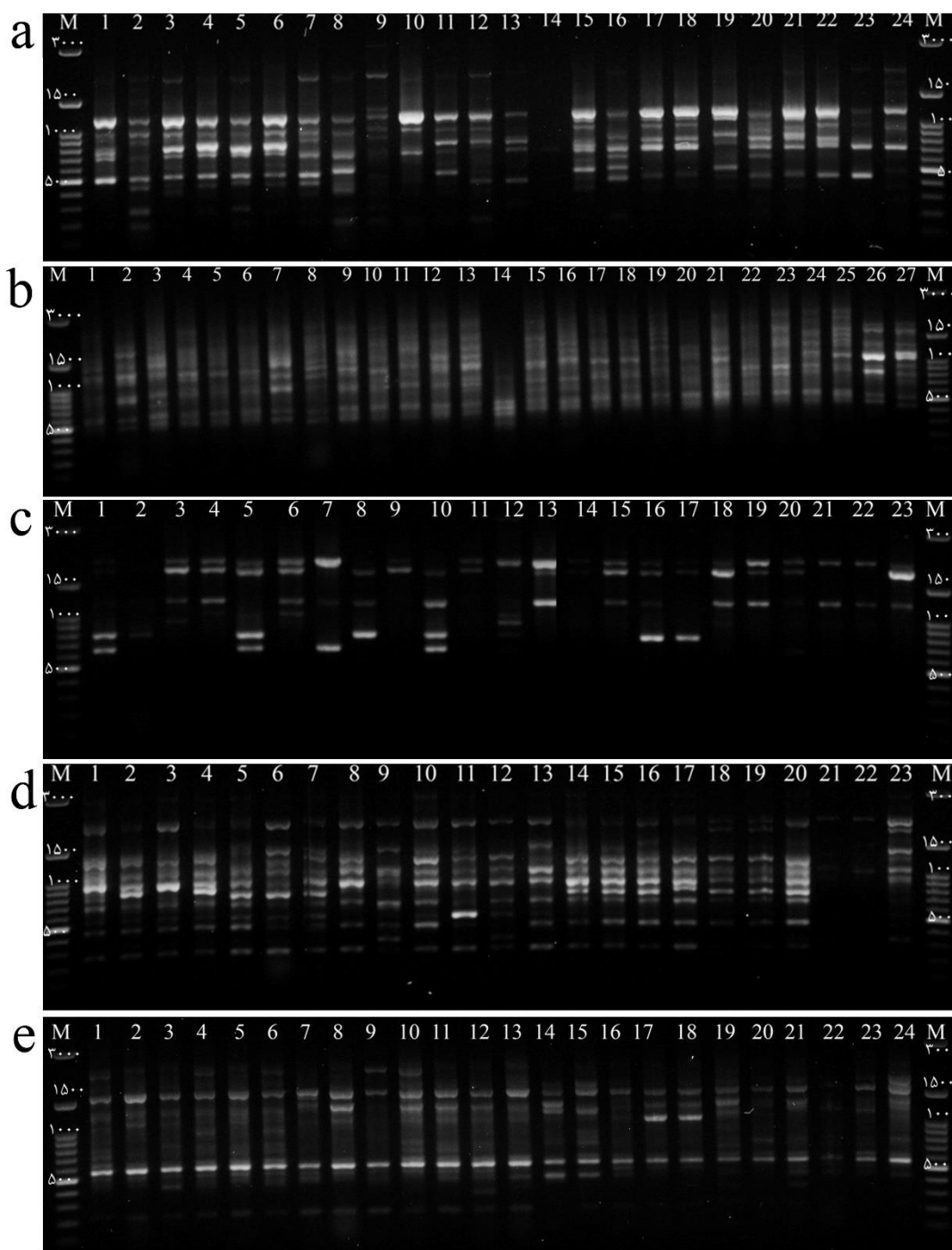
تصادفی تنوع ژنتیکی بالاتری را در جمعیت‌های مورد مطالعه گونه *S. frondicola* نشان دادند.

در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها بر اساس داده‌های حاصل از دو آغازگر ریزماهوره؛ دندروگرام رسم شده با ضریب شباهت ۷۰ درصد طبقه‌بندی، جدایه‌ها را در ۲۵ خوشه و دندروگرام رسم شده بر اساس داده‌های سه آغازگر تصادفی، طبقه‌بندی جدایه‌ها را در ۱۷ خوشه نشان می‌دهد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت دو آغازگر ریزماهوره تنوع بیشتری نسبت به سه آغازگر تصادفی نشان دادند (شکل ۳ و ۴).

همچنین دندروگرام رسم شده بر اساس داده‌های حاصل از پنج آغازگر بر اساس ضریب شباهت ۷۰ درصد طبقه‌بندی جدایه‌ها را در ۲۰ خوشه نشان می‌دهد که خود نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در بین جدایه‌های *S. frondicola* می‌باشد. این دندروگرام گروه‌بندی بر اساس محل جغرافیایی جدایه‌ها را نشان نداد. در این گروه‌بندی جدایه Sep14 از منطقه هوراند بیشترین تفاوت را با جدایه‌های دیگر داشته است چرا که با شباهت ۴۰ درصدی در دندروگرام رسم شده قرار گرفته است. (شکل ۵، جدول ۳).

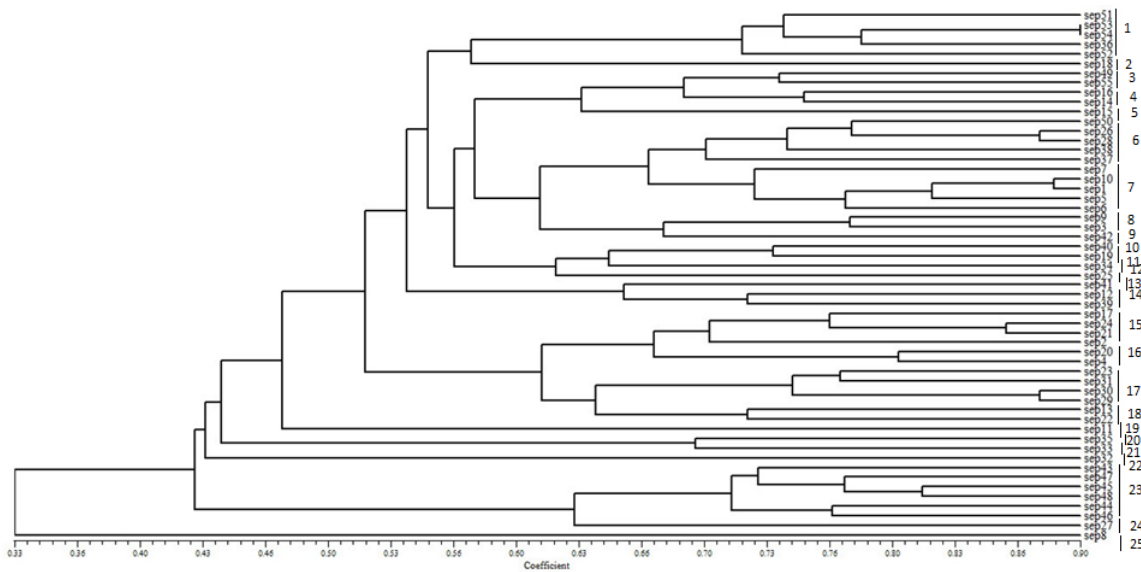
تنوع ژنتیکی محاسبه شده با استفاده از نرم افزارهای ژنتیک جمعیت

میزان تنوع تخمینی برای کل جمعیت‌ها با استفاده از داده‌های همه آغازگرها ۰/۱۹۹ در سطح احتمال ۰/۰۰۱ می‌باشد (جدول ۴). در تنوع تخمینی توسط آغازگر SAT1 تنوع ژنتیکی جمعیت‌های خوی و کلیبر مشابه هم بودند ($h = 0.201$ $p = 0.001$). ولی فاصله ژنتیکی و تمایز ژنتیکی بین این دو جمعیت در سطح متوسط به بالا می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت بر خلاف تنوع ژنتیکی مشابه، این دو جمعیت از ساختار ژنتیکی متفاوتی برخوردار می‌باشند. تمایز ژنتیکی بین این دو جمعیت به خاطر وجود یا عدم وجود برخی نوارها در مجموع نوارهای چند شکلی در بین جدایه‌های مربوط به این دو جمعیت می‌باشد به طوری که در آلل‌های مربوط به نوارهای چند شکلی آغازگر SAT1 در هفت نوار (نوار چندشکلی) (نوارهای با اندازه ۲۲۰۰، ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۲۵۰، ۶۰۰، ۵۵۰، ۳۰۰) در آغازگر SAT2 در چهار نوار (نوارهای با اندازه ۲۱۰۰، ۷۵۰، ۷۰۰، ۱۲۰۰) در آغازگر OPB01 در سه نوار (نوارهای با اندازه‌های ۱۰۰۰، ۹۰۰، ۶۵۰)



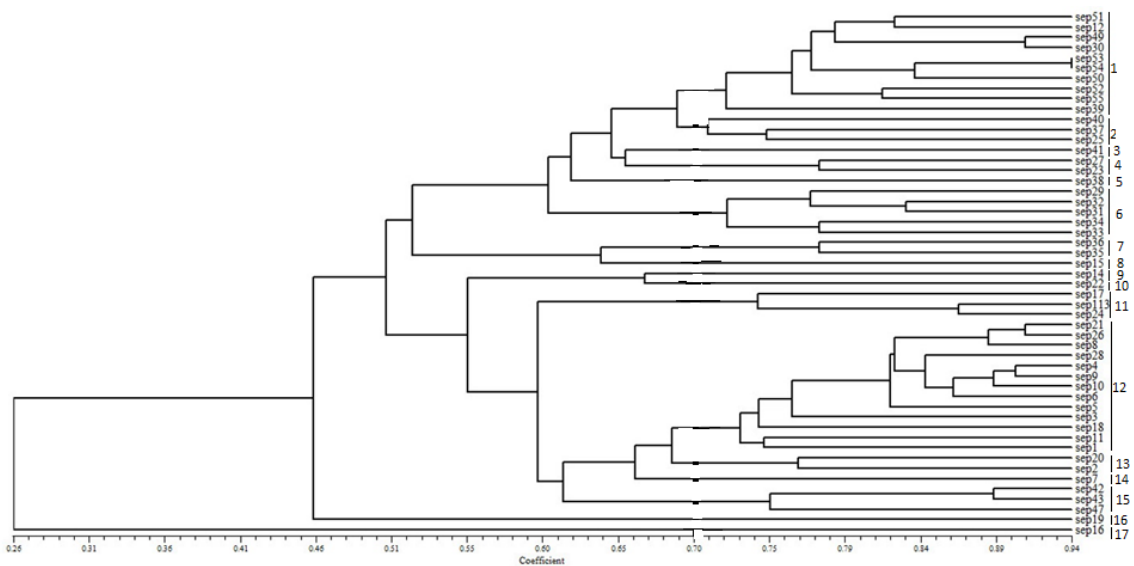
شکل ۲. الگوی نوارهای تکثیر شده جدایه‌های گونه *Sphaerulina frondicola* با آغازگرهای RAPD و ISSR. **a.** AST1، **b.** SAT2، **c.** OPB01، **d.** OPB10، **e.** OPA13.

Figure 2. DNA fingerprinting profiles of *Sphaerulina frondicola* isolates using RAPD and ISSR primers. **a.** AST1, **b.** SAT2, **c.** OPB01, **d.** OPB10, **e.** OPA13.



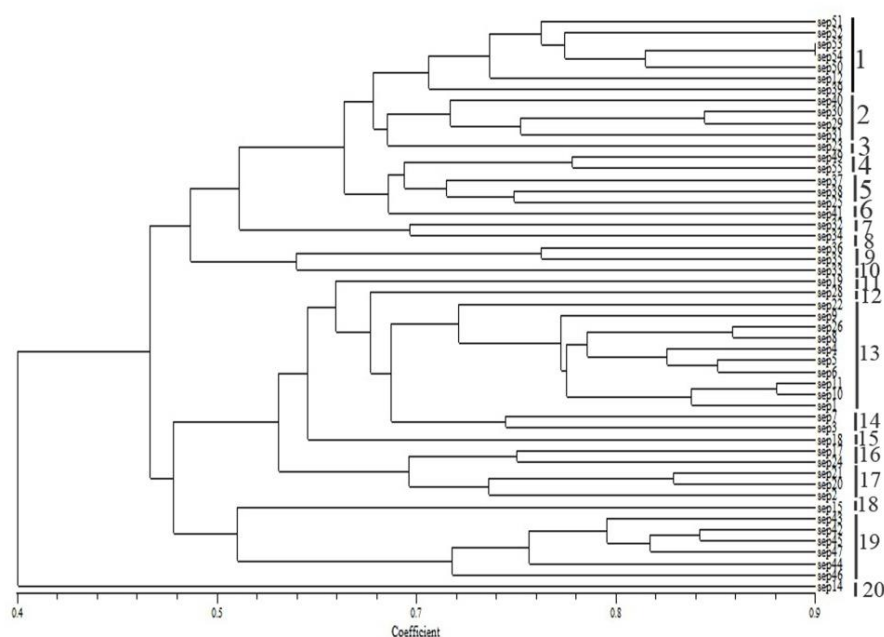
شکل ۳. دندروگرام حاصل از داده‌های دو آغازگر SAT1 و SAT2 با استفاده از نرم افزار NTSYS بر اساس روش Unweighted (UPGMA) Pair Group Method with Arithmetic mean و ضریب DICE برای جدایه‌های *Sphaerulina frondicola* با سطح شباهت ۰/۷۰.

Figure 3. Dendrogram generated from the data of two primers SAT1 and SAT2 using NTSYS software based on UPGMA method and DICE coefficient for *Sphaerulina frondicola* isolates at the similarity level of 0.70.



شکل ۴. دندروگرام حاصل از داده‌های سه آغازگر OPB01، OPB10، OPA13 با استفاده از نرم افزار NTSYS بر اساس روش UPGMA و ضریب DICE برای جدایه‌های *Sphaerulina frondicola* با سطح شباهت ۰/۷۰.

Figure 4. Dendrogram generated from the data of three primers OPB01, OPB10 and OPA13 using NTSYS software based on UPGMA method and DICE coefficient for *Sphaerulina frondicola* isolates at the similarity level of 0.70.



شکل ۵. دندروگرام حاصل از داده‌های پنج آغازگر OPA13، OPB01، OPB10، SAT2 و SAT1 با استفاده از نرم افزار NTSYS بر اساس روش UPGMA و ضریب DICE برای جدایه‌های *Sphaerulina frondicola* با سطح شباهت ۰/۷۰.

Figure 5. Dendrogram generated from the data of five primers SAT1, SAT2, OPB01, OPB10 and OPA13 using NTSYS software based on UPGMA method and DICE coefficient for *Sphaerulina frondicola* isolates at the similarity level of 0.70.

جدول ۳. گروه‌بندی ایجاد شده با استفاده از داده‌های پنج پرایمر SAT1، SAT2، OPB01، OPB10 و OPA13 برای جدایه‌های *Sphaerulina frondicola* بر اساس ضریب شباهت ۷۰ درصد.

Table 3. Grouping created by using the data of five primers SAT1, SAT2, OPB01, OPB10 and OPA13 for *Sphaerulina frondicola* isolates based on 70% similarity coefficient.

region	Isolate code	Number of isolate	Group number
Khoy (5), Ahar, Mianeh	Sep51, Sep12, Sep50, Sep54, Sep53, Sep52 Sep39	7	1
Jolfa (3), Mianeh	Sep29, Sep30, Sep31, Sep40	4	2
Kaleybar	Sep23	1	3
Khoy, Meshgin Shahr	Sep49, Sep55	2	4
Mianeh (2), Kaleybar	Sep25, Sep38, Sep37	3	5
Mianeh	Sep41	1	6
Jolfa	Sep32	1	7
Jolfa	Sep34	1	8
Jolfa	Sep35, Sep36	2	9
Jolfa	Sep33	1	10
Hurand	Sep19	1	11
Kaleybar	Sep28	1	12
Ahar (8), Kaleybar	Sep5, Sep6, Sep22, Sep9, Sep26, Sep8, Sep4 Sep11, Sep10, Sep1	10	13
Ahar	Sep3, Sep7	2	14
Hurand	Sep18	1	15
Hurand, Kaleybar	Sep17, Sep24	2	16
Kaleybar (2), Ahar	Sep20, Sep21, Sep2	3	17
Hurand	Sep15	3	18
Marand (2), Bostanabad (4)	Sep43, Sep42, Sep45, Sep47, Sep44, Sep46	6	19
Hurand	Sep14	1	20

جدول ۴. تنوع ژنتیکی تخمینی هر کدام از جمعیت‌های *Sphaerulina frondicola*.

Table 4. Estimated genetic diversity of each populations of *Sphaerulina frondicola*.

Total	Bostanabad	Ahar	Hurand	Jolfa	Kaleybar	Mianeh	Khoy	Primer
0.219	0.193	0.233	0.253	0.243	0.201	0.207	0.201	SAT1
0.214	0.083	0.236	0.312	0.241	0.271	0.198	0.156	SAT2
0.142	0.200	0.084	0.128	0.119	0.146	0.171	0.144	OPB01
0.221	0.223	0.190	0.313	0.220	0.221	0.243	0.138	OPB10
0.177	0.059	0.164	0.219	0.206	0.271	0.177	0.146	OPA13
0.199	0.153	0.189	0.251	0.212	0.224	0.202	0.159	Mean

جدول ۵. تمایز ژنتیکی جمعیت‌های *Sphaerulina frondicola*.

Table 5. Genetic differentiation of *Sphaerulina frondicola* populations.

Khoy	Mianeh	Kaleybar	Jolfa	Hurand	Ahar	Bostanabad	
0	0.008	0.001	0.001	0.004	0.001	0.001	Khoy
0.178	0	0.007	0.002	0.007	0.002	0.01	Mianeh
0.277	0.177	-	0.001	0.352	0.038	0.005	Kaleybar
0.285	0.159	0.169	0	0.001	0.001	0.002	Jolfa
0.287	0.175	0.009	0.15	0	0.006	0.011	Hurand
0.323	0.269	0.06	0.285	0.115	0	0.004	Ahar
0.516	0.429	0.326	0.405	0.227	0.403	0	Bostanabad

جدول ۶. جریان ژنی بین جمعیت‌های *Sphaerulina frondicola* براساس ارزش و مقدار تمایز ژنی.

Table 6. Gene flow between *Sphaerulina frondicola* populations based on the value and amount of gene differentiation.

Khoy	Mianeh	Kaleybar	Jolfa	Hurand	Ahar	Bostanabad	
0							Khoy
2.313	0						Mianeh
1.308	2.318	0					Kaleybar
1.435	2.649	2.466	0				Jolfa
1.24	2.353	54.956	2.825	0			Hurand
1.046	1.362	7.875	1.257	3.846	0		Ahar
0.468	0.665	1.032	0.734	1.698	0.742	0	Bostanabad

جدول ۷. هاپلوتیپ‌های محاسبه شده برای هر یک از جمعیت‌های *Sphaerulina frondicola*.

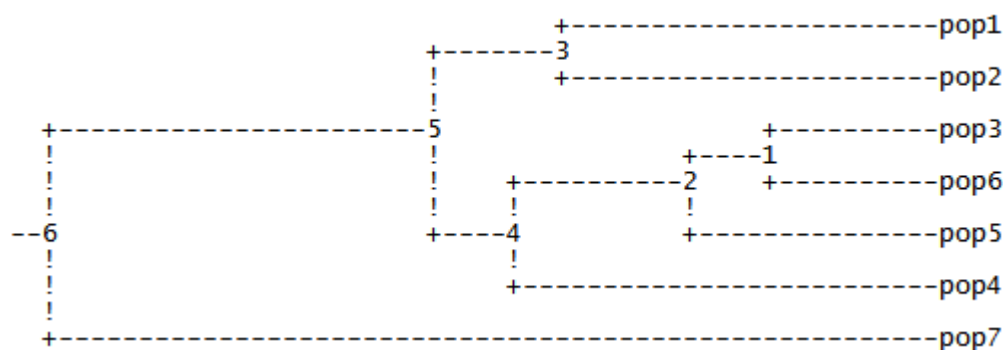
Table 7. Calculated haplotype for each population of *Sphaerulina frondicola*.

Number of specific haplotype	Number of haplotype	Number of isolate	Population
7	6	6	Khoy
5	5	5	Mianeh
8	8	8	Kaleybar
8	8	8	Jolfa
5	5	5	Hurand
12	12	12	Ahar
4	4	4	Bostanabad

کرده است. سپس جمعیت هوراند بیشترین شباهت را با دو جمعیت اهر و کلیبر نشان می‌دهد. از طرفی، جمعیت خوی و میانه شباهت قابل توجهی با هم داشته و در یک خوشه قرار گرفته‌اند. در درجه بعدی شباهت بین جمعیت‌های کلیبر، اهر و هوراند با جلفا برقرار بوده است. در حقیقت، این چهار جمعیت با جمعیت‌های خوی و میانه در یک خوشه قرار گرفته‌اند. و جمعیت بستان آباد بیشترین فاصله را با شش جمعیت دیگر دارا می‌باشد.

دندروگرام رسم شده با نرم افزار Pop Gen

این دندروگرام جدایه‌های هر جمعیت را در کنار هم قرار داده و در واقع جمعیت‌ها را با هم مقایسه می‌نماید. این نوع دندروگرام براساس فاصله ژنتیکی Nei رسم می‌شود و کلیه نتایج به دست آمده از این نوع پژوهش‌ها را به زبانی ساده بیان می‌نماید (شکل ۶). این دندروگرام در درجه اول دو جمعیت کلیبر و اهر را در یک خوشه و نزدیک هم با بیشترین شباهت رسم



شکل ۶. دندروگرام رسم شده با استفاده از نرم افزار Pop Gen. برای جمعیت‌های *Sphaerulina frondicola*. POP1 (جمعیت خوی)، POP2 (جمعیت میانه)، POP3 (جمعیت کلیبر)، POP4 (جمعیت جلفا)، POP5 (جمعیت هوراند)، POP6 (جمعیت اهر)، POP7 (جمعیت بستان آباد).

Figure 6. Dendrogram generated by Pop Gen software for populations of *Sphaerulina frondicola*. POP1 (Khoy population), POP2 (Mianeh population), POP3 (Kaleybar population), POP4 (Jolfa population), POP5 (Hurand population), POP6 (Ahar population) and POP7 (Bostanabad population).

بحث

استان آذربایجان شرقی معرفی کردند. در مطالعه حاضر نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه *S. frondicola* این گونه با ۱۳۸ جدایه از هشت منطقه مختلف، به عنوان تنها عامل بیماری سپتوریوز صنوبر در استان آذربایجان شرقی و بخشی از استان آذربایجان غربی شناسایی شد. به عنوان یک اصل کلی، جهت مدیریت موثر یک بیماری داشتن اطلاعات کافی از

لکه برگی صنوبر یکی از بیماری‌های مهم و جدی شاخ و برگ صنوبر می‌باشد، که موجب ریزش پیش از موعد برگ‌ها و خشکیدگی سرشاخه‌ها و حتی در مواردی باعث شانکر می‌گردد (Ostry 1987). (Golmohammadi et al. (2015) گونه *S. frondicola* را به عنوان تنها عامل لکه‌برگی سپتوریایی صنوبر در

جمعیت‌های مناطق مختلف ندارد و جدایه‌های مختلف هر جمعیت در گروه‌های مختلف به صورت مجزا از هم و یا حتی در کنار جدایه‌های جمعیت‌های مناطق دیگر قرار می‌گیرند، که این نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌ها و نیز شباهت بالای بین جمعیت‌ها می‌باشد و تنوع درون گونه‌ای قابل توجهی در جمعیت‌های مختلف را نشان می‌دهد.

همچنین نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های آغازگرها با استفاده از نرم افزارهای Gen Alex و Pop Gen و Haplotype Analyse-1.05، سطح بالایی از تنوع هاپلوتیپی و سطح متوسطی از تنوع ژنی را در جمعیت‌های مورد مطالعه *S. frondicola* نشان می‌دهند به طوری که حتی با وجود تعداد کم جدایه‌های مورد بررسی در هر جمعیت، تعداد هاپلوتیپ‌ها برابر با تعداد جدایه‌های موجود در هر جمعیت بوده و هر هاپلوتیپ تنها حاوی یک جدایه است که اختصاصی هر جمعیت می‌باشد با توجه به این نتایج می‌توان فرضیه وجود مرحله جنسی در جمعیت *S. frondicola* را دور از انتظار ندانست. زیرا که تنوع ژنتیکی مشاهده شده در *S. frondicola* برای یک میگرورگانسیم تنها با تولید مثل غیر جنسی در این حد غیر معقول به نظر می‌رسد. در صورتی که میزان زیاد تنوع ژنتیکی در یک مقیاس کوچک، می‌تواند شاهی بر نوترکیبی جنسی در این منطقه باشد. در صورتی که تنوع ژنتیکی کم باشد با امکان وجود تولید مثل جنسی و نوترکیبی جنسی در این منطقه تطابق نخواهد داشت. ولی همانطور که مشاهده شده است جدایه‌های جداسازی شده از یک درخت و یا حتی از یک لکه، هاپلوتیپ‌های مختلفی را نشان می‌دهند و در گروه‌بندی‌های ایجاد شده توسط آغازگرهای RAPD و ISSR مختلف نیز در گروه‌های مختلف قرار می‌گیرند که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالا در یک مقیاس کوچک می‌باشد.

در تحقیق حاضر، میانگین تنوع ژنتیکی برآورد شده برای جمعیت *S. frondicola* برابر با ۰/۱۹۹ می‌باشد در حالی که تنوع ژنتیکی برآورد شده برای جمعیت *S. musiva* ۰/۲۸۹ (Feau et al. 2005a) می‌باشد که تقریباً در یک محدوده نزدیک به هم قرار دارند. البته در مورد گونه *S. musiva* تنوع میزبانی وجود دارد به طوری که در هر منطقه علائم مربوط به بیمارگر از روی دو گونه از جنس *Populus* (*P. nigra* L. و *P. euramericana* (Dode) Guinier) جداسازی شده است و این تنوع میزبانی می‌تواند در افزایش تنوع ژنتیکی تاثیرگذار باشد. مطابق آمار اداره منابع طبیعی، ارقام مورد کشت در منطقه استان آذربایجان شرقی سه گونه *P. nigra* L.، *P. alba* L. و گونه هیبرید *P. euramericana* می‌باشد که این گونه هیبرید به

بیمارگر، از جمله شناسایی دقیق راه‌های بقا، طیف میزبانی، بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی مرحله جنسی عامل بیماری ضروری می‌باشد. در طی مطالعاتی که تاکنون انجام پذیرفته، مشخص شده است که این گونه هتروتال می‌باشد و براساس شباهت‌های مولکولی، مرحله جنسی این گونه به گونه *Mycosphaerella populi* نسبت داده شده است. جهت وقوع تولید مثل جنسی در جمعیت *S. frondicola* لازم است که هر دو ژن تیپ آمیزشی در داخل جمعیت حضور داشته باشند. توزیع و فراوانی نسبی ژن‌های تیپ آمیزشی در داخل جمعیت شاخصی برای احتمال وقوع تولید مثل جنسی می‌باشد. جمعیت‌هایی که به طور منظم تولید مثل جنسی دارند، ژنوتیپ‌های بیشتری تولید می‌کنند که باعث به وجود آمدن سطوح بالای تنوع ژنتیکی در مقایسه با جمعیت‌هایی که تنها تولید مثل غیر جنسی دارند، می‌شود (Milgroom 1996). مطالعات زیادی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه‌های قارچی مهم در دنیا انجام شده است. به عنوان مثال تنوع ژنتیکی برای گونه *Zymoseptoria tritici* (Roberge ex Desm.) Quaedvl. & Crous عامل بیماری بلاچ برگی گندم، در یک سطح جغرافیایی کوچک‌تر در تونس ۰/۴۸۴ برآورد شده است که نتایج این تحقیق حاکی از وجود تولید مثل جنسی در بین جدایه‌های مربوط به گونه *Z. tritici* می‌باشد (Berraies et al. 2013). Cordo et al. (2006) تنوع ژنتیکی بالایی را برای جمعیت مورد مطالعه *Z. tritici* گزارش کردند. همچنین Kabbage et al. (2008) ساختار ژنتیکی *Zymoseptoria* را در کانزاس با استفاده از روش چند شکلی در طول قطعات تکثیر شده Amplified (AFLP) Fragment Length Polymorphism مورد بررسی قرار داده و وجود تنوع ژنتیکی بالای ۹۸ درصد در بین جمعیت‌ها را نشان دادند. (Trkulja & Hristov 2012) تنوع ژنتیکی قابل توجهی با استفاده از نشانگرهای RAPD در میان جدایه‌های *Sacc. Cercospora beticola* گزارش کردند. این مطالعه نیز با هدف بررسی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت *S. frondicola* با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ریز ماهواره ISSR انجام شد. در مطالعه حاضر سه آغازگر تصادفی و دو آغازگر ریز ماهواره مورد استفاده قرار گرفته که نتیجه آن ایجاد ۱۰۲ نوار با اندازه‌های مختلف برای جمعیت مورد مطالعه *S. frondicola* می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این آغازگرها پلی-مورفیک هستند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های این آغازگرها با استفاده از نرم افزار NTSYS نشان داد که گروه‌بندی ایجاد شده هیچ همبستگی با منطقه جغرافیایی جدایه‌های

جغرافیایی کمتری دارند از تمایز ژنتیکی برآورد شده کمتری نیز برخوردارند در حالی که جریان ژنی محاسبه شده برای این دو جمعیت نیز به طور قابل توجهی بالا است. بنابراین وجود جریان ژنی بین جمعیت‌ها اگرچه به صورت محدود، فرضیه وجود آسکوسپور در جمعیت *S. frondicola* را محکم‌تر می‌نمایند. به طور کلی وجود هاپلوتیپ‌های مختلف و توزیع تنوع ژنی در یک مقیاس کوچک، فرضیه حضور آسکوسپور جنسی هوازاد به عنوان مایه تلقیح اولیه در چرخه بیماری را نتیجه می‌دهد.

بیمارگرهایی که در شکستن ژن‌های مقاومت خطرناک تلقی شده‌اند دارای سیستم تولید مثلی پیچیده، پتانسیل جریان ژنوتیپ بالا، جمعیت موثر بزرگ و نرخ جهش بالا می‌باشند و کم خطرترین بیمارگرها آن‌هایی هستند که حاوی تولید مثل غیر جنسی قوی، پتانسیل پایین برای جریان ژنی، اندازه جمعیت موثر کوچک و نرخ جهش پایین هستند (McDonald et al. 2002). بنابراین می‌توان گفت که نوع سیستم تولیدمثلی در تکامل جمعیت بیمارگر و در نتیجه در شکستن مقاومت میزبان بسیار موثر می‌باشد.

Possiede et al. (2009) از مقاومت *Guignardia citricarpa* Kiely به قارچکش بنومیل در باغات مرکبات آفریقای جنوبی، بعد از ۱۰ سال کنترل خبر دادند و بعد از بررسی‌های آزمایشگاهی عامل مقاومت را به تنوع ژنتیکی بیمارگر نسبت داده‌اند. بنابراین پتانسیل تکاملی بالا در طول زمان منجر به تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت بیمارگر شده و بروز مقاومت نسبت به قارچکش شده است.

مطالعه‌ای که توسط Baysal et al. (2013) در جهت بررسی روابط ژنتیکی فرم‌های مخصوص گونه *Fusarium oxysporum* Schltdl. بر روی میزبان‌های گوجه فرنگی و بادمجان با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام پذیرفت نشان داده است که فرم مخصوص *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* Matuo & K. (FOM) Ishig. عامل پژمردگی بادمجان تنوع ژنتیکی بالاتری را نشان می‌دهد. Baysal et al. (2013) شدت بیماری‌زایی بالایی را برای جدایه‌های مختلف FOM گزارش کردند. بنابراین می‌توان بین تنوع ژنتیکی بالا و شدت بیماری‌زایی نیز رابطه‌ای تنگاتنگ قائل شد و اینکه تنوع ژنتیکی بالا می‌تواند در دامنه میزبانی بیمارگر تاثیر گذار باشد.

تغییرات ژنتیکی در ژن‌های در حال تکامل، توانایی جلوگیری از تشخیص میزبان را افزایش می‌دهند که برای حفظ جمعیت لازم می‌باشد. بیمارگر برای حفظ و دوام خود حتی اگر با میزبان خاص خود وارد تعامل نشود، برای آلوده سازی تلاش

تازگی از شمال ایران وارد استان آذربایجان شرقی شده است. یافته‌های Feu et al. (2005a) حاکی از حساسیت دو رقم صنوبر *P. nigra* و *P. euramericana* نسبت به *S. frondicola* می‌باشند و تنها یک گزارش از هند از آلودگی رقم *P. alba* توسط این بیمارگر حکایت دارد. بنابراین می‌توان گفت که گونه *P. alba* نسبت به این بیمارگر متحمل‌تر می‌باشد. در استان آذربایجان شرقی از بین ارقام صنوبر، گونه *P. nigra* قدیمی‌ترین گونه کشت شده در این منطقه بوده و از فراوانی و پراکنش و حساسیت بالاتری نیز نسبت به *S. frondicola* برخوردار است و در طول زمان بیمارگر با این میزبان سازگاری پیدا کرده است. با توجه به ورود گونه *P. euroammericana* به این منطقه باید شاهد اپیدمی و رواج هر چه بیشتر بیماری لکه برگی سپتوریایی در این مناطق باشیم چرا که تنوع و فراوانی میزبان حساس خود مقدمه-ای برای تنوع ژنتیکی بالای بیمارگر می‌باشد.

تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها ممکن است توسط یک جریان ژنی محدود بین جمعیت‌ها توضیح داده شود. تمایز ژنتیکی برآورد شده برای جمعیت‌های *S. frondicola* تقریباً مشابه با تمایز برآورد شده برای جمعیت *S. musiva* می‌باشد و به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از سایر قارچ‌های سلومیست مانند *Z. tritici* در شمال آمریکا با ارزش تمایز ۰/۰۸ (Zhan et al. 2003) و بین جمعیت‌های آمریکایی و سوئیسی *Phaeosphaeria nodorum* (E. Müll.) Hedjar. با ارزش تمایز ۰/۰۴ (Keller et al. 1997) می‌باشد. تمایز کم مشاهده شده بین جمعیت‌های قارچی فوق ممکن است با تولید مثل جنسی و رهاسازی آسکوسپورهای هوازاد قابل تفسیر باشد. در مورد *S. musiva* و *S. frondicola* ارزش تمایز برآورد شده بالا با وقوع یک پتانسیل انتشار شدید، متناقض می‌باشد. آسکوسپورهای *S. frondicola* به صورت بالقوه هوازاد توصیف شده است (Sivanesan 1990; Sinclair et al. 1987) اما به صورت بالقوه انتشار آن‌ها ناشناخته مانده است. مشابه همین مورد، سطح متوسط تمایز برای قارچ عامل بلایت شاه بلوط *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr مشاهده شده است (Milgroom & Lipari 1995). مقدار متوسط تمایز برای *C. parasitica* که برای بیش از ۱۳ جمعیت ۰/۲ برآورد شده بود نشان‌دهنده جریان ژنی محدود در شمال شرق آمریکا برای این قارچ علی‌رغم حضور آسکوسپورهای هوازاد و کنیدی‌هایی که توسط آب یا ناقلین حیوانی پخش می‌شوند بوده است، بنابراین تمایز ژنتیکی برآورد شده برای جمعیت *S. frondicola* را تا حدودی می‌توان با توجه به فاصله جغرافیایی توضیح داد. چرا که مثلاً دو منطقه هوراند و کلیبر که فاصله

می‌کند (McDonald & Linde 2002). بنابراین می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که با توجه به عدم شناخته شدن مرحله جنسی *S. frondicola* و تنوعی که در جمعیت‌های آن مشاهده شده است، احتمالاً تولید مثل جنسی این گونه قبلاً بر روی میزبان خاص دیگری میسر بوده ولی اینک به دلیل از دست دادن میزبان مذکور قابل تشخیص و شناسایی نمی‌باشد.

References

- Arzanlou M, Narmani A, 2016. Genetic diversity in Iranian populations of *Togninia minima*, one of the causal agents of leaf stripe disease on grapevines. *Eurasian Journal of Biosciences* 10: 41–50.
- Arzanlou M, Zwiers LH, Crous PWT, 2010. Evolutionary dynamics of mating-type loci of *Mycosphaerella* spp. occurring on banana. *Eukaryotic Cell* 9: 164–172.
- Babai Ahari A, Golmohammadi R, Arzanlou M, 2017. Identification of fungal species associated with leaf spot disease on poplar trees (*Populus* spp.) in East Azarbaijan province and some parts of west Azarbaijan and Ardabil provinces. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 5 (2): 105–117.
- Bakhshi M, Arzanlou M, 2018. Multigene phylogeny and morphotaxonomy of *Septoria* spp. from Iran along with a checklist of septoria-like taxa. *Rostaniha* 18(2): 122–41.
- Bakhshi M, Arzanlou M, Zare R, Groenewald JZ, Crous PW, 2019. New species of *Septoria* associated with leaf spot diseases in Iran. *Mycologia* 111(6):1056–71.
- Baradaran Baghery M, Arzanlou M, Babai-Ahari A, 2015. Identification of the fungal agents associated with Almond trunk diseases in East Azerbaijan Province. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 4(1): 13–27.
- Baysal Ö, Karaaslan Ç, Siragusa M, Alessandro R, Carimi F, De Pasquale F, da Silva JAT, 2013. Molecular markers reflect differentiation of *Fusarium oxysporum* forma speciales on tomato and forma on eggplant. *Biochemical Systematics and Ecology* 47: 139–147.
- Baysal Ö, Siragusa M, Gümrükcü E, Zengin S, Carimi F, Sajeve M, Teixeira d Silva JA, 2010. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. melongenae virulence by ISSR and RAPD markers on eggplant. *Biochemical Genetics* 48: 524–537.
- Berraies S, Gharbi M S, Belzile F, Yahyaoui A, Hajlaoui M R, Trifi M, Rezgui S, 2013. High genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola* (*Zymoseptoria tritici*) from a single wheat field in Tunisia as revealed by SSR markers. *African Journal of Biotechnology* 12(12): 1344–1349.
- Callen BE, leal I, Foord B, Dennis JJ, Van Oosten C, 2007. *Septoria musiva* isolated from cankerd stems in hybrid poplar stools beds, Fraser Vally, British Columbia. *Pacific Northwest Fungi* 2(7): 1–9.
- Casselton LA, 2008. Fungal sex genes-searching for the ancestors. *BioEssays* 30: 711–714.
- Cellerino GP, 1999. Review of fungal diseases in Poplar. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome (FAO). AC492/E.
- Cordo CA, Linde CC, Zhan J, McDonald B, 2006. Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen (*Septoria tritici*) in Buenos Aires Province. *Sociedad Argentina Botánica* 41: 293–305.
- Feau N, Hamelin RC, Vandecasteele C, Stanosz GR, Bernier L, 2005a. Genetic structure of *Mycosphaerella populorum* (anamorph *Septoria musiva*) populations in north-central and northeastern North America. *Phytopathology* 95(6): 608–616.
- Feau N, Weiland JE, Stanosz GR, BernierL, 2005b. Specific and sensitive PCR-based detection of *Septoria musiva*, *S. populicola* and *S. populi*, the causes of leaf spot and stem canker on poplars. *Mycology Research* 109(9): 1015–1028.
- Golmohammadi R, Babai-Ahari A, Arzanlou M, Khodaei S, 2015. Morphological and molecular identification and pathogenicity of *Septoria* species involved in leaf spot disease on *Populus* species in East Azerbaijan, West Azerbaijan and Ardabil provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51(3): 357–365.
- Kabbage M, Leslie JF, Zeller KA, Hulbert SH, Bockus WW, 2008. Genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola*, the causal agent of *Septoria tritici* Blotch. Kansas winter wheat. *Journal of Agricultural, Food, and Environmental Sciences* 2(1): 1–8.

- Keller SM, McDermott JM, Pettway RE, Wolfe MS, McDonald BA, 1997. Gene flow and sexual reproduction in the wheat glume blotch pathogen *Phaeosphaeria nodorum* (anamorph *Stagonospora nodorum*). *Phytopathology* 87: 353–358.
- Kuck U, Poggeler S, 2009. Cryptic sex in fungi. *Fungal Biology Reviews* 23: 86–90.
- Maxwell DL, Kruger EL, Stanosz GR, 1997. Effects of Water Stress on Colonization of Poplar Stems and Excised Leaf Disks by *Septoria musiva*. *The American Phytopathological Society* 87(4): 381–388.
- McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40(1): 349–379.
- Milgroom M, 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* 34: 457–477.
- Milgroom MG, Lipari SE, 1995. Population differentiation in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* in Eastern North America. *Phytopathology* 85:155–160.
- Narmani A, Arzanlou M, Babai-Ahari A, 2014. Induction of sexual stage and determination of mating types in *Phaeoacremonium aleophilum*, the causal agent of esca disease of grapevine in East Azarbaijan province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 50(3): 281–289.
- Narmani A, Arzanlou M, Babai-Ahari A, 2016. Uneven Distribution of Mating-Type Alleles Among *Togninia minima* Isolates, One of the Causal Agents of Leaf Stripe Disease on Grapevines in Northwest Iran. *Journal of Phytopathology* 164(7-8):441–447.
- Ostry ME, 1987. Biology of *Septoria* and *Marsonina brunnea* in hybrid *Populus* plantations and control of *Septoria* canker in nurseries. *European Journal of Plant Pathology* 17:158–165.
- Possiede YM, Gabardo J, Kava-Cordeiro V, Galli-Terasawa LV, Azevedo JL, Glienke C, 2009. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. *Brazilian Journal of Microbiology* 40(2): 308–313.
- Quaedvlieg W, Verkley GJ, Shin HD, Barreto RW, Alfenas AC, et al., 2013. Sizing up *Septoria*. *Studies in Mycology* 75: 307–90.
- Ramezani Gourabi B, Shirzad F, 2009. The study of drought effects on poplar tree ring growth in the Soome-e-sara Township – Guilan. *Physical Geography Research Quarterly* 41 (67): 107–117 (in Persian with English abstract).
- Sinclair WA, Lyon HH, Johnson WT, 1987. Diseases of Trees and Shrubs. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Sivanesan A, 1990. *Mycosphaerella populorum*. CMI description of pathogenic fungi and bacteria, no 988. *Mycopathologia* 109: 57–58.
- Turgeon BG, 1998. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology* 36: 115–137.
- Trkulja N, Hristov N, 2012. Morphological and genetic diversity of *Cercospora beticola* isolates. In: *International Conference on BioScience: Biotechnology and Biodiversity-Step in the Future, The Fourth Joint UNS-PSU Conference*, Book of Proceedings. pp. 18-20.
- Verkley GJM, Quaedvlieg W, Shin HD and Crous PW, 2013. A new approach to species delimitation in *Septoria*. *Studies in Mycology* 75(1): 213–305.
- Zhan J, Pettway RE, McDonald BA, 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology* 38: 286–297.



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