

## ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. عامل خشکیدگی سرشاخه‌های درختان مرکبات در شمال ایران

حسین طاهری<sup>۱\*</sup>، محمد جوان نیک‌خواه<sup>۲</sup>، سید علی الهی‌نیا<sup>۳</sup>، سید اکبر خداپرست<sup>۴</sup> و مرتضی گل‌محمدی<sup>۵</sup>  
 ۱. دانشجوی دکتری، گروه قارچ‌شناسی و بیماری‌های قارچی گیاهان دانشگاه گیلان و پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، رامسر  
 ۲. استاد، گروه قارچ‌شناسی و بیماری‌های قارچی گیاهان، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
 ۳. استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان  
 ۴. دانشیار، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان  
 ۵. استادیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، رامسر  
 (تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۲۵)

### چکیده

خشکیدگی سرشاخه‌ها و ریزش میوه پس از گلدهی ناشی از قارچ *Colletotrichum gloeosporioides*، از چالش‌های شایع تولید محصول در درختان مرکبات منطقه شمال کشور هستند. به علت افزایش آسیب و زیان بیماری در سال‌های اخیر که می‌تواند ناشی از تغییرپذیری ژنتیکی بیمارگر باشد، ساختار ژنتیکی این قارچ در جمعیت‌های شمال کشور بررسی شد. بدین منظور از چهارباغ در چهار منطقه رحیم‌آباد گیلان، رامسر، ساری و گرگان بازدید و نمونه‌های دارای نشانه‌های آلودگی درختان مرکبات گردآوری شد. پس از شناسایی جدایه‌ها، انگشت‌نگاری DNA برای ۱۴۴ جدایه قارچ با استفاده از هفت نشانگر ISSR به روش PCR انجام و شاخص‌های مربوط به تنوع ژنتیکی محاسبه شدند. تجزیه خوشه‌ای بر پایه ضریب همسانی جاکارد و روش UPGMA جدایه‌ها را در سیزده گروه قرار داد. میانگین تنوع ژنی و ژنوتیپی کل جمعیت‌ها به ترتیب برابر ۰/۳۳ و ۰/۴۹ محاسبه شد. میانگین تمایز ژنتیکی کم بین جمعیت‌ها (۰/۱۲۷)، توسط میزان جریان ژنی زیاد حاصل از نشانگرها (۳/۴۳۷) تأیید شد. بیشترین همانندی ژنتیکی بین دو جمعیت گیلان و گرگان و کمترین آن بین دو جمعیت رامسر و ساری مشاهده شد. بنابراین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مرکبات رحیم‌آباد و رامسر و بین نمونه‌های رامسر و ساری با توجه به مسافت کمتر رحیم‌آباد تا رامسر نسبت به فاصله رامسر تا ساری منطقی بود ولی نمونه‌های گیلان و گرگان در این رابطه روند غیرمعمول داشتند. بنابراین تحقیق، جمعیت‌های *C. gloeosporioides* مرکبات شمال کشور تنوع ژنتیکی دارند و پایین بودن میزان تمایز ژنتیکی و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها مؤید وجود جریان ژنی بالا بین این جمعیت‌ها است.

واژه‌های کلیدی: انگشت‌نگاری DNA، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنی، جریان ژنی.

## Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. populations, the causal agent of citrus anthracnose in North of Iran

Hossein Taheri<sup>1\*</sup>, Mohammad Javan Nikkhah<sup>2</sup>, Seyed Ali Elahinia<sup>3</sup>,  
 Seyed Akbar Khodaparast<sup>4</sup> and Morteza Golmohammadi<sup>5</sup>

1. Ph. D. Student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture Guilan University and Instructor, Iran Citrus Research Institute, Ramsar, Iran
2. Professor, Department of Plant Pathology, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Guilan University, Iran
4. Associate Professor, Department of Mycology, College of Agriculture, Guilan University, Iran
5. Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Iran Citrus Research Institute, Ramsar, Iran

(Received: Dec. 20, 2015 - Accepted: May 14, 2016)

### ABSTRACT

Citrus dieback and postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* are common diseases of citrus trees in North of Iran. According to increasing of disease damage in recent years, which can be due to the genetical alteration of pathogen, genetic structure of the fungus population in North of Iran was studied. So, four citrus orchards in Rahim Abad (Guilan), Ramsar, Sari and Gorgan were surveyed and symptomatic tissues were sampled. After identification of fungal isolates, DNA fingerprinting for 144 isolates were done by seven ISSR markers and PCR method. According to cluster analyses by UPGMA method and Jacard coefficient, thirteen groups were found. The mean of gene and genotype diversities across all populations were 0.33 and 0.49 respectively. There were low genetic differentiation (0.127) among populations and high gene flow (3.437) proved the low genetic differentiation. Maximum genetic identity observed between Guilan and Gorgan and the minimum observed between Ramsar and Sari populations. Distance between Rahim Abad and Ramsar is less than between Ramsar and Sari. So, genetic distance between Guilan and Ramsar and between Ramsar and Sari populations correlated to their geographical distance, but it was irregular for Guilan and Gorgan isolates. According to this study *C. gloeosporioides* populations derived from citrus orchards in North of Iran have genetic diversity and low genetic differentiation and Genetic distance among populations confirm the high gene flow among them.

**Keywords:** cluster analysis, DNA fingerprinting, gene diversity, gene flow.

## مقدمه

ایران با داشتن ۲۷۶۰۰۰ هکتار سطح زیر کشت مرکبات و تولید سالانه ۴۲۹۳۰۰۰ تن میوه، از جمله ده کشور برتر جهان در تولید مرکبات است. استان‌های مازندران، گیلان و گلستان به ترتیب ۱۱۲۵۶۳، ۸۸۱۷ و ۵۴۶۰ هکتار سطح زیر کشت و ۱۹۱۴۰۰۰، ۱۱۱۸۰۰ و ۷۸۰۰۰ تن تولید میوه را به خود اختصاص داده‌اند (Anonymous, 2014). خشکیدگی سرشاخه‌های (آنتراکنوز) ناشی از قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. s.l. شایع‌ترین بیماری‌های مرکبات در جهان و ایران است (Whiteside et al., 2000; Jiang et al., 2012; Elahinia, 2007). در درختان آلوده خشکیدگی شاخه به آرامی گسترش یافته و باعث پژمردگی و زرد شدن و ریزش برگ‌ها می‌شود (Benyahia, 2003). روی برگ، لکه‌های بافت مرده (نکروزه) همراه با نقاط سیاه‌رنگ و منظم (آسروول) تشکیل می‌شود (Whiteside et al., 2000). روی میوه‌ها لکه‌های سطحی به رنگ خاکستری مایل به نقره‌ای و در انتها قهوه‌ای مایل به خاکستری مشاهده می‌شود و در انبار نیز باعث پوسیدگی میوه می‌شود (Whiteside et al., 2000; Agrios, 2005). ریزش میوه پس از گلدهی<sup>۱</sup> توسط عامل بیماری باعث کاهش بازده محصول می‌شود که از لحاظ اقتصادی بسیار مهم است (McGovern et al., 2012; Lima et al., 2011).

قارچ *C. gloeosporioides* s. l. نخستین بار توسط پنزیک به‌عنوان *Vermicularia gloeosporioides* از روی مرکبات در ایتالیا توصیف شد (Penzig, 1882) و در سال ۱۸۸۷ به *C. gloeosporioides* تغییر نام یافت (Burger, 1921). این قارچ از روی بسیاری از نهاندانگان شامل ۱۹۷ گونه باغی و زراعی و علف‌های هرز و رقم‌های مختلف مرکبات گزارش شده است (Farr et al., 1989; Ershad, 2009; Davarian et al., 2006).

به‌طور سنتی شناسایی گونه‌های جنس *Colletotrichum* بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) و دامنه میزبانی آن‌هاست و تأکید

بیشتر روی میزبان‌ها و شمار زیاد آن‌ها باعث ایجاد نام‌های اضافی شده است (Freeman et al., 1998). امروزه با بررسی‌های چندژنی، ۲۲ گونه و یک زیرگونه در گونه کمپلکس *C. gloeosporioides* مشخص شده است. گونه‌های *C. musae*، *C. gloeosporioides* s.s. و *C. fructicola* موجود در این کمپلکس از روی مرکبات جداسازی شده‌اند (Weir et al., 2012). نشانگرهای مولکولی مختلف مانند RAPD، RFLP، AFLP-PCR و AP-PCR برای بررسی گونه کمپلکس *C. gloeosporioides* به‌کاربرده شده است که میزان موفقیت آن‌ها متفاوت بوده است (Hyde et al., 1993; Freeman et al., 2009). بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت در مقیاس‌های مکانی و زمانی، از جمله اساسی‌ترین و مهم‌ترین تحقیقات، برای شناخت توانایی انتشار بیمارگر و شکست مقاومت میزبان است (McDonald & Linde, 2002; Ranathunge et al., 2009). بهترین روش برای بررسی تنوع ژنتیکی، استفاده از نشانگرهای مولکولی است (Watt, 1994). نشانگر ISSR-PCR یک روش انگشت‌نگاری DNA است که در آن ناحیه بین دو ریزماهوره، که یکی توالی عادی و دیگری توالی معکوس دارد، افزایش می‌شود (Brown, 1996). از سودمندی‌های عمده ISSR-PCR، هزینه کم، سادگی، ثبات بالا و تکرارپذیری آن است (Wolfe & Liston, 1998). از نشان‌گرهای ISSR-PCR برای تمایز جدایه‌های *C. acutatum* آلوده‌کننده بادام استرالیا از بادام کالیفرنیا و اسرائیل (Milgroom, 1996; McKay et al., 2009) و بررسی تنوع درون‌گونه‌ای بین جدایه‌های *Colletotrichum* گویان و برزیل (Lu et al., 2010; Nascimento et al., 2004) استفاده شده است. ساختار جمعیت قارچ *C. gloeosporioides* s. l. جدا شده از خربزه درختی (پاپایا) توسط پنج نشانگر ISSR بررسی و سه زیرجمعیت بیمارگر با تنوع ژنتیکی بالا در باغ‌های خربزه درختی ترینیداد تشخیص داده شد (Rampersad, 2013). Ciampi et al. (2011) با بررسی کتابخانه ژنی، ۲۷ جفت آغازگر برای توالی‌های مجاور ریزماهوره‌های *C. acutatum*، عامل ریزش میوه پس از گل‌دهی مرکبات طراحی کردند.

استان مازندران)، ساری (باغ ۴ هکتاری در شرق استان مازندران) و گرگان (باغ ۹ هکتاری در استان گلستان) بازدید و از برگ، شاخه و میوه درختان مرکبات دارای نشانه‌های بیماری خشکیدگی سرشاخه‌ها نمونه‌برداری شد. هر منطقه نمونه‌برداری به‌عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری در باغ به‌صورت تصادفی و از چهار سمت هر درخت بر پایه نشانه‌های بیماری صورت گرفت. نمونه‌ها درون کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفتند و پس از ثبت مشخصات بی‌درنگ به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها پس از سترون شدن با سدیم ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه روی محیط غذایی PDA کشت شدند. پس از رشد اولیه، با روش‌های تک اسپور کردن و نوک ریشه، جدایه‌های خالص به دست آمدند. جدایه‌های خالص شده برای استفاده کوتاه‌مدت روی محیط کشت PDA درون لوله در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس و در درازمدت روی کاغذ صافی سترون در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

#### شناسایی قارچ

شناسایی قارچ بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناسی شامل شکل و اندازه کنیدیوم، شکل آپرسوریوم، رنگ پرگنه و بود یا نبود خار با استفاده از منابع قارچ‌شناسی صورت گرفت (Sutton, 1980; Weir et al., 2012). پس از انتخاب نشانگرها، همه نمونه‌ها با پنج نشانگر ISSR3، ISSR4، ISSR5، ISSR7 و ISSR9 بررسی شدند و درختواره حاصل از تنوع ژنتیکی آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ver2.02 (Rohlf, 1998) رسم و بر پایه آن، برای تأیید شناسایی ریخت‌شناسی، توالی بخشی از ژن بتاتوبولین شماری از جدایه‌ها با ارسال به شرکت تکاپوزیست، توسط شرکت Bioneer کره جنوبی تعیین شد.

#### استخراج DNA

استخراج DNA جدایه‌های قارچ بر پایه روش rapid mini preparation بنا بر توصیف لیو و همکاران صورت گرفت (Liu et al., 2000) و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ ND-1000 و الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد.

در ایران عامل بیماری خشکیدگی سرشاخه‌های مرکبات در آغاز در سال ۱۳۲۰ از سواحل دریای خزر توسط پتراک و اسفندیاری و سپس در سال ۱۳۷۴ توسط ارشاد از فارس، خوزستان و میناب گزارش شد (Ershad, 2009). میزبان‌های این قارچ در ایران شامل پرتقال‌خونی، دارابی، تامسون ناول، لیمو و ... هستند و در رقم‌های مختلف مرکبات به سرشاخه، برگ، گل و میوه آسیب می‌زند (Elahinia, 2007). در شمال کشور، سبب‌شناسی (اتیولوژی) و پراکنش عامل این بیماری در مرکبات (Babri et al., 2008)، شدت بیماریزایی جدایه‌های قارچ *C. gloeosporioides* (Babri et al., 2009)، حساسیت رقم‌های مختلف مرکبات نسبت به عامل بیماری (Babri et al., 2007)، ویژگی‌های ریخت‌شناختی و بیماریزایی جدایه‌های قارچ عامل خشکیدگی سرشاخه‌های مرکبات استان گلستان (Davarian et al., 2006) باروری جنسی و سازگاری رویشی جدایه‌های *Glomerella cingulata* حاصل از درختان مرکبات استان مازندران (Khansari et al., 2010) بررسی شده‌اند.

این بیماری به درختان ضعیف و تحت تنش حمله می‌کند. ولی در سال‌های اخیر، افزایش آسیب حتی در باغ‌هایی با مدیریت مناسب دیده شده است. این امر می‌تواند ناشی از تغییر محیطی تنش‌زا و یا تغییر ژنتیکی بیمارگر باشد. لذا بررسی ساختار ژنتیکی عامل بیماری برای تدوین راهکارهای مناسب رویارویی و مدیریت بیماری اهمیت دارد. این پژوهش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *C. gloeosporioides* در مناطق مختلف کشت مرکبات در شمال ایران و وجود جریان ژنی بین جمعیت‌ها با استفاده از نشانگر ISSR انجام یافته است.

#### مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی

در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ از چهار باغ مرکبات در استان‌های شمالی کشور از چهار منطقه شامل رحیم‌آباد (باغ ۴ هکتاری در استان گیلان)، مؤسسه تحقیقات مرکبات رامسر (باغ ۱۲ هکتاری در غرب

## انتخاب نشانگر ISSR-PCR و افزایش DNA

آغازگرهای ISSR2، ISSR3، ISSR4، ISSR5، ISSR7، ISSR9 و ISSR12 به دلیل تولید باندهای DNA پرشمار و چندشکلی، برای آزمایش انتخاب شدند (جدول ۱).

بسیست آغازگر ISSR با استفاده از DNA استخراج شده هفت جداییه قارچ از لحاظ شمار و تنوع باندی آزمایش و

جدول ۱. ویژگی‌های آغازگرهای ISSR انتخاب شده برای جداییه‌های قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* s. l.

Table 1. Characteristics of ISSR primers for *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. isolates

| Primers | Sequence (5'-3') <sup>a</sup> | Reference                        |
|---------|-------------------------------|----------------------------------|
| ISSR2   | HVHCACACACACACAT              | Fang and Roose, 1997             |
| ISSR3   | HVHTGTGTGTGTGTGTGT            | Fang and Roose, 1997             |
| ISSR4   | ACACACACACACACACYA            | Noorolahi and Shahbazi, 2015     |
| ISSR5   | GAGAGAGAGAGAGAGAYG            | Malekzadeh <i>et al.</i> , 2011  |
| ISSR7   | AGAGAGAGAGAGAGAGYC            | Wang <i>et al.</i> , 2005        |
| ISSR9   | AGAGAGAGAGAGAGAGC             | Bagherabadi <i>et al.</i> , 2015 |
| ISSR12  | AGAGAGAGAGAGAGAGYA            | Malekzadeh <i>et al.</i> , 2011  |

\* Y= pyrimidine, H= non-G, V= non-T

افزایش شده  $i$  در همه افراد،  $Pi$  شمار افراد دارای نوار  $i$  و  $N$  شمار کل افراد است.

میزان محتوای چندشکلی با رابطه  $PIC = 2piqi$  به دست آمد که در آن  $pi$  فراوانی وجود نوار و  $qi$  فراوانی نبود نوار در هر جایگاه است. شمار همردیف‌های ژنی (الل) مؤثر و مشاهده شده و نیز تنوع ژنی بر پایه شاخص نی (Nei, 1973)، میزان تنوع ژنوتیپی بر پایه شاخص اطلاعاتی شانون، جریان ژنی بر پایه رابطه  $Nm = 0.5 (1-Gst) / Gst$  که در آن  $Gst$  میزان تمایز ژنی است، تنوع ژنی، همانندی و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، بر پایه روش نی (Nei, 1973) و با در نظر گرفتن اریبی و بدون اریبی توسط نرم‌افزار OPGENE به دست آمدند (Yeh *et al.* 1999). تنوع ژنتیکی بین و میان جمعیت‌ها با نرم‌افزار GenALEX ver 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با نرم‌افزارهای GenALEX و Multilocus ver.1.3 (Agapow & Burt, 2001) انجام شدند.

## نتایج

## شناسایی قارچ

رنگ و شکل پرگنه جداییه‌های قارچ متنوع است. رنگ پرگنه بعضی جداییه‌ها در آغاز سفید، بعد از خاکستری روشن تا خاکستری تیره متغیر است. در برخی دیگر در آغاز ریسه (هیف)‌های سفید قارچ رشد کرده و با تولید اسپوره‌های نارنجی، پرگنه به رنگ نارنجی در می‌آید (شکل ۱). در بعضی از جداییه‌های با پرگنه

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای بالا به صورت زیر انجام شد. برای افزایش، ۵ میکرولیتر Master mix شرکت توپاز ژن کاوش، ۰/۸ میکرولیتر نشانگر ۱۰ پیکومولار، ۳ میکرولیتر DNA (۲۵ نانوگرم) الگو و ۱/۲ میکرولیتر آب مقطر سترون با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر استفاده شد. افزایش به کمک دستگاه PCR (MJ Research) مدل PTC-200 و بر پایه برنامه گرمایی زیر انجام شد، واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت پنج دقیقه، واسرشت‌سازی ثانویه در دمای ۹۴°C به مدت سی ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، افزایش در دمای ۷۲°C به مدت دو دقیقه در چهل چرخه؛ افزایش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت هفت دقیقه، باندهای DNA حاصل در الکتروفورز با ژل آگاروز ۱ درصد با ولتاژ ۱۰۰ و مدت یک تا یک‌ونیم ساعت از هم جداسازی شد. سپس از ژل با دستگاه عکس‌برداری (UVP, USA) عکس‌برداری شد.

## تجزیه و تحلیل داده‌ها

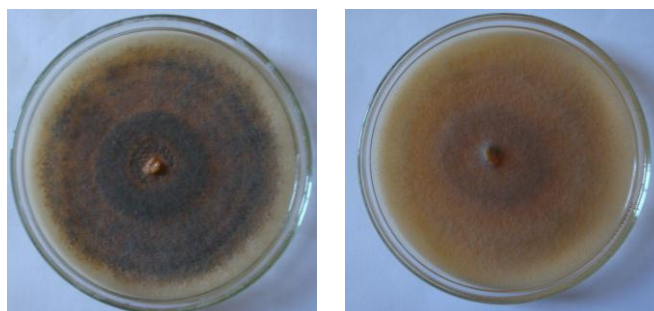
جدول داده‌ها با نرم‌دهی باندهای DNA در نرم‌افزار اکسل تشکیل شد. برای وجود باند عدد یک و نبود آن عدد صفر در نظر گرفته شد. جدول همسانی بر پایه ضریب تشابه جاکارد تشکیل شد و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای با الگوریتم (UPGMA) با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ver2.02 (Rohlf, 1998) صورت گرفت. فراوانی جایگاه‌های افزایش شده بر پایه رابطه  $Fi = Pi/N$  محاسبه شد. در این رابطه  $Fi$  فراوانی جایگاه‌های

شناسایی شدند. هر منطقه نمونه‌برداری به‌عنوان یک جمعیت در تجزیه و تحلیل‌های بعدی در نظر گرفته شد.

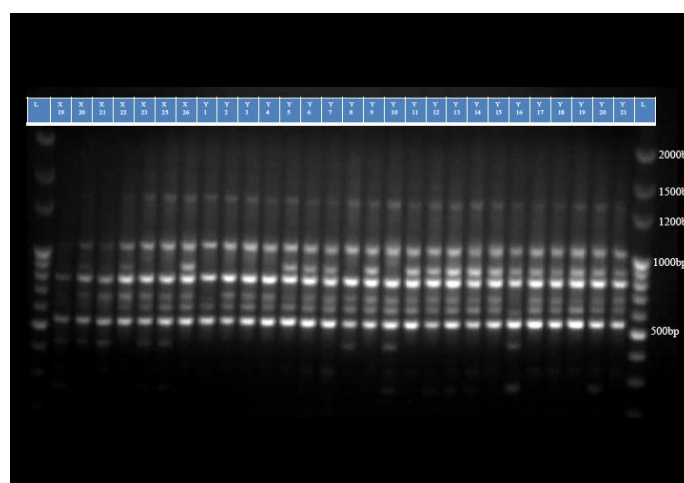
#### نشانه‌های ISSR

با استفاده از هفت آغازگر ISSR در مجموع ۸۶ هم‌دیف‌های ژنی DNA افزایش شد که ۸۲ باند چندشکلی<sup>۱</sup> (۹۵/۳۵ درصد) و ۴ باند تک‌شکلی<sup>۲</sup> در محدوده ۱۵۰ تا ۱۸۵۰ جفت باز بودند (شکل ۲). نشانه‌های ISSR2 و ISSR12 با ۹ باند کمترین و ISSR5 با ۱۷ باند بیشترین باند را تولید کردند. میانگین ایجاد باند برای نشانه‌ها ۱۲/۳ باند بود. نشانه‌های ISSR4 با ۰/۳۷۲ و ISSR7 با ۰/۳۰۵ به ترتیب بیشترین و کمترین محتوای چندشکلی را داشتند (جدول ۲).

خاکستری، پس از مدتی سختینه (اسکلرت)‌های تیره‌رنگ مشاهده می‌شود که گاهی اسپوره‌های نارنجی‌رنگ روی آن‌ها دیده می‌شود. آسروول به‌صورت بافتی فشرده درون تشتک پتری تشکیل می‌شود که حامل اسپوره‌های تک‌یاخته‌ای بی‌رنگ و استوانه‌ای شکل با دو انتهای گرد و ستا است. ابعاد کنیدیوم ۸-۱/۵×۳×۴/۵ میکرومتر است. از ۱۸۸ نمونه مختلف در مجموع ۱۴۴ جدایه شامل، ۳۰ جدایه رحیم‌آباد (نمونه‌های X1 الی X30)، ۴۰ جدایه پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیر در رامسر (نمونه‌های W1 الی W40)، ۳۰ جدایه ساری (نمونه‌های Z1 الی Z30) و ۴۴ جدایه گرگان (نمونه‌های Y1 الی Y44) *C. gloeosporioides* s.l. به‌عنوان قارچ (شکل ۳)



شکل ۱. پرگنه‌های ده روزه قارچ *Colletotrichum gloeosporioides*  
Figure 1. Ten-day colonies of *Colletotrichum gloeosporioides*



#### ISSR2

شکل ۲. باندهای DNA حاصل از افزایش با نشانه‌های ISSR در شماری از جدایه‌های *Colletotrichum gloeosporioides* s. l.  
DNA ladder 100bp:L

Figure 2. Amplified DNA bands by ISSR primers in some *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. isolates. L= DNA ladder 100bp

1. Polymorphic
2. Monomorphic

### تنوع ژنی و ژنوتیپی

بیشترین تنوع ژنی و تنوع ژنوتیپی (شاخص شانون) به ترتیب با میزان ۰/۳۲ و ۰/۴۸ مربوط به جمعیت‌های گیلان و گرگان و کمترین آن‌ها با مقادیر ۰/۲۵ و ۰/۳۹، مربوط به جمعیت پژوهشکده مرکبات است. بیشینه همردیف ژنی مشاهده شده و همردیف ژنی مؤثر نیز در جمعیت‌های گیلان و گرگان است. ولی کمترین همردیف ژنی مشاهده شده و همردیف ژنی مؤثر به ترتیب مربوط به جمعیت ساری و پژوهشکده مرکبات است. جمعیت گیلان با ۹۳/۰۲ درصد و جمعیت ساری با ۸۲/۵۶ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین میزان چندشکلی را دارد (جدول ۳).

میانگین تنوع ژنی کل، میانگین تنوع ژنی درون جمعیتی و میانگین میزان جریان ژنی جمعیت‌ها در نشانگر ISSR4 بیشتر و میانگین میزان تمایز ژنتیکی آن کمتر از دیگران بود. کمینه میانگین تنوع ژنی کل مربوط به نشانگر ISSR9 و کمینه میانگین تنوع ژنی درون جمعیتی و میانگین میزان جریان ژنی جمعیت‌ها مربوط به نشانگر ISSR2 بود (جدول ۴). میانگین تمایز ژنتیکی به دست‌آمده حاصل از نشانگرها، در جمعیت‌ها ۰/۱۲۷ است که بیانگر تمایز ژنتیکی کم بین آن‌ها است.

بیشترین جریان ژنی بین جمعیت‌های گیلان و گرگان و کمترین آن بین جمعیت‌های پژوهشکده مرکبات و ساری بود. عکس این حالت در رابطه با تمایز ژنتیکی صادق بود (جدول ۵).

بیشترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های گیلان و گرگان و کمترین آن بین جمعیت پژوهشکده مرکبات و ساری بود. بنابراین، فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مرکبات رحیم‌آباد گیلان و پژوهشکده مرکبات رامسر و بین نمونه‌های پژوهشکده مرکبات و ساری با توجه به مسافت جغرافیایی کمتر رحیم‌آباد تا رامسر نسبت به فاصله رامسر تا ساری منطقی بود ولی نمونه‌های گیلان و گرگان در این رابطه روند غیرمعمول داشتند. (جدول ۶). نمودار درختواره تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از آغازگرها (شکل ۳)، نیز این مسئله را تأیید کرد.

بنابر تجزیه خوشه‌ای داده‌های به دست‌آمده از آغازگرها با استفاده از روش UPGMA و ضریب جاکارد در سطح همانندی ۷۰ درصد جدایه‌ها به سیزده گروه جداگانه تقسیم شدند (شکل ۳). گروه اول شامل دوازده جدایه از باغ‌های مرکبات گیلان بود. گروه دوم، سوم و سیزدهم تک عضو بودند، گروه چهارم ۴۴ جدایه از جمعیت‌های باغ‌های مرکبات گیلان و گرگان، را در بر گرفت. هر کدام از گروه‌های پنجم، هشتم و نهم ۲۱ عضو داشتند که اولی جدایه‌های گرگان و ساری، دومی جدایه‌های گیلان و گرگان و سومی غیر از یک مورد، جدایه‌های ساری را شامل می‌شدند. گروه ششم با چهار عضو، تنها شامل جدایه‌های گیلان بود. در گروه هفتم ۱۲ جدایه مربوط به جمعیت‌های گیلان و گرگان وجود داشت. گروه‌های دهم، دوازدهم و یازدهم هر کدام دو عضو داشتند. دو گروه اول مشتمل بر جدایه‌های ساری و گروه آخر شامل یک جدایه ساری و یک جدایه گیلان بود (شکل ۳).

جدول ۲. ویژگی‌های باندهای DNA افزایش‌شده با استفاده از هفت آغازگر ISSR برای ۱۴۴ جدایه از چهار جمعیت *Colletotrichum gloeosporioides* s. l.  
Table 2. Characteristics of amplified DNA by seven ISSR primers for 144 isolates from populations of *Colletotrichum gloeosporioides* s. l.

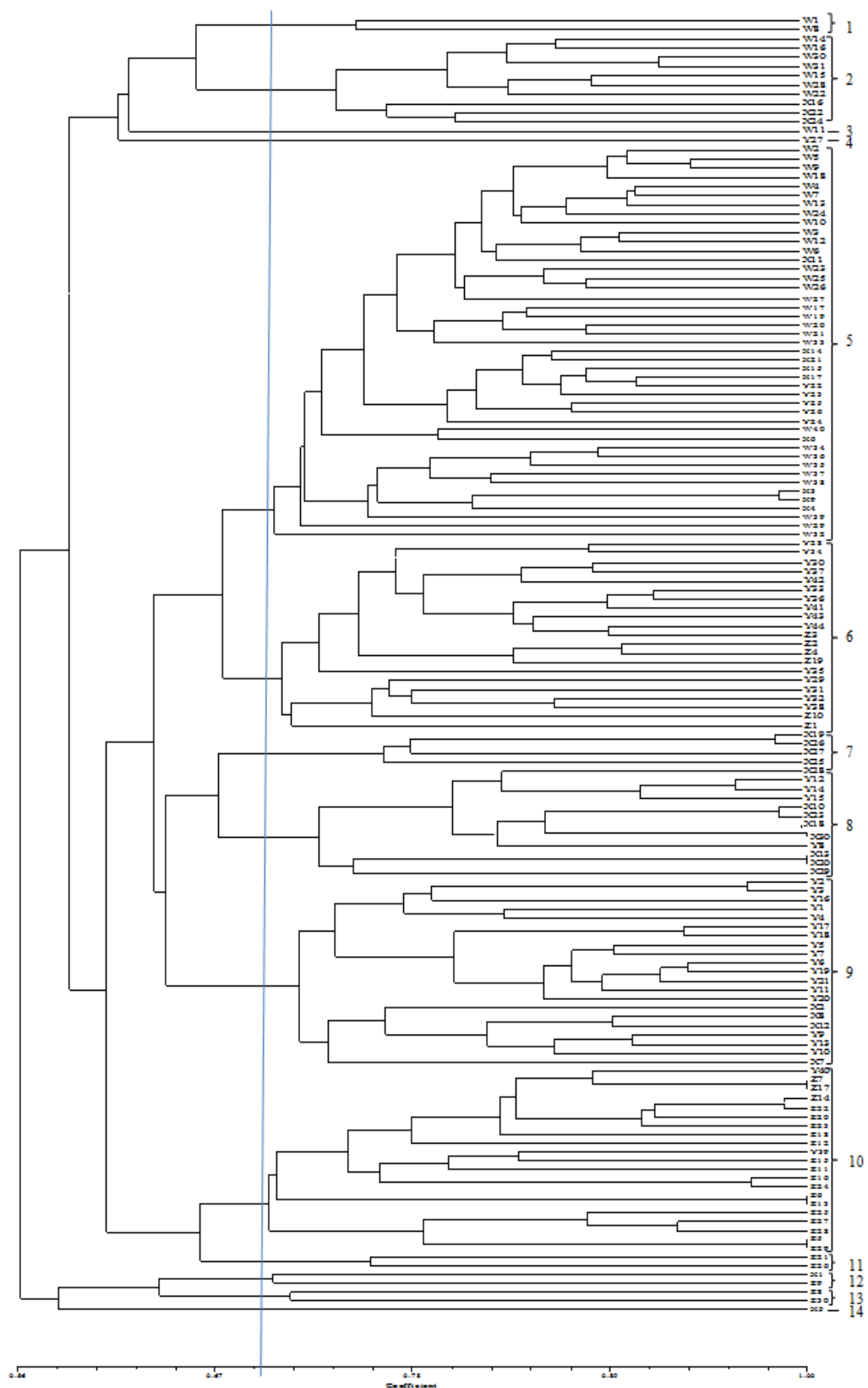
| Primer | PIC   | Band (frequency) | Number of bands |
|--------|-------|------------------|-----------------|
| ISSR2  | 0.327 | 0.584            | 9               |
| ISSR3  | 0.317 | 0.539            | 10              |
| ISSR4  | 0.372 | 0.435            | 11              |
| ISSR5  | 0.338 | 0.42             | 17              |
| ISSR7  | 0.305 | 0.362            | 14              |
| ISSR9  | 0.316 | 0.427            | 16              |
| ISSR12 | 0.347 | 0.653            | 9               |

### گروه‌بندی جمعیت‌ها

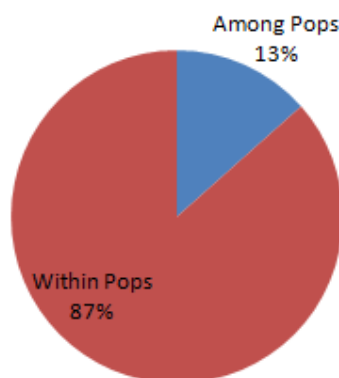
تجزیه به مختصات اصلی و رسم نمودار جمعیت‌ها

تجزیه واریانس مولکولی<sup>۱</sup> (AMOVA)

تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۱۳ درصد واریانس به تفاوت بین جمعیت‌ها و ۸۷ درصد آن به تنوع درون جمعیتی مربوط بود و تنوع درون جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌ها بود (شکل ۴). پایین بودن واریانس افراد موجود بین گروه‌ها بیانگر این است که افراد جمعیت‌های مختلف از لحاظ ژنتیکی به هم نزدیک هستند.



شکل ۳. دندروگرام رسم شده به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۱۴۴ جدایه *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. به دست آمده از درختان مرکبات در شمال ایران براساس الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA با استفاده از هفت آغازگر ISSR. Figure 3. Dendrogram for 144 *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. isolates derived from citrus in North of Iran using seven ISSR primers data, by UPGMA method and Jaccard's coefficient.



شکل ۴. نمودار تجزیه واریانس مولکولی مربوط به تنوع ژنتیکی در بین و درون

چهار جمعیت *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. شمال ایران

Figure 4. AMOVA Chart of genetic diversity within and among four populations of *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. in North of Iran

جدول ۳. مقادیر همردیف‌های ژنی مشاهده‌شده و مؤثر، تنوع ژنی، شاخص شانون و درصد چندشکلی در چهار جمعیت

*Colletotrichum gloeosporioides* s. l. به‌دست‌آمده از درختان مرکبات در شمال ایران

Table 3. Number of observed and effective alleles, gene diversity, Shannon's Information index and percentage of polymorphic loci among four populations of *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. in North of Iran

| Population       | Number of Isolates | Observed number of alleles | Effective number of alleles | Gene diversity | Shannon's Information index | percentage of polymorphic loci |
|------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Guilan           | 30                 | 1.93                       | 1.55                        | 0.32           | 0.48                        | 93.02                          |
| Citrus Institute | 40                 | 1.90                       | 1.41                        | 0.25           | 0.39                        | 90.70                          |
| Sari             | 30                 | 1.82                       | 1.44                        | 0.26           | 0.40                        | 82.56                          |
| Gorgan           | 44                 | 1.90                       | 1.57                        | 0.32           | 0.48                        | 90.70                          |
| Mean             | 36                 | 1.88                       | 1.49                        | 0.28           | 0.44                        | 89.25                          |
| Total            | 144                | 1.98                       | 1.56                        | 0.33           | 0.49                        | 97.67                          |

جدول ۴. میانگین تنوع و جریان ژنی در چهار جمعیت *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. به‌دست‌آمده از درختان مرکبات

در شمال ایران بر پایه نوع نشانگر ISSR

Table 4. Mean of gene diversity and gene flow among four populations of *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. in North of Iran by ISSR markers

| Primer | Total gene diversity (Ht) | Gene diversity within subpopulations (Hs) | Mean of gene differentiation (Gst) | Gene flow (Nm) |
|--------|---------------------------|---|------------------------------------|----------------|
| ISSR2  | 0.332                     | 0.254                                     | 0.187                              | 4.725          |
| ISSR3  | 0.318                     | 0.275                                     | 0.109                              | 12.075         |
| ISSR4  | 0.373                     | 0.350                                     | 0.057                              | 18.091         |
| ISSR5  | 0.336                     | 0.295                                     | 0.113                              | 10.050         |
| ISSR7  | 0.306                     | 0.297                                     | 0.092                              | 10.952         |
| ISSR9  | 0.316                     | 0.292                                     | 0.063                              | 15.784         |
| ISSR12 | 0.350                     | 0.299                                     | 0.215                              | 6.112          |
| Total  | 0.331                     | 0.289                                     | 0.127                              | 3.437          |

جدول ۵. مقادیر شاخص تمایز ژنتیکی (ستون پایین) و جریان ژنی (ستون بالا) بین چهار جمعیت *Colletotrichum*

*gloeosporioides* s. l. به‌دست‌آمده از درختان مرکبات در شمال ایران بر پایه نشانگرهای ISSR

Table 5. Gene differentiation (column below) and gene flow (column above) among four populations of *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. in North of Iran by ISSR markers

| Population       | Citrus Institute | Guilan | Gorgan | Sari  |
|------------------|------------------|--------|--------|-------|
| Citrus Institute | ****             | 7.81   | 5.643  | 2.432 |
| Guilan           | 0.06             | ****   | 14.89  | 4.12  |
| Gorgan           | 0.081            | 0.032  | ****   | 5.73  |
| Sari             | 0.17             | 0.108  | 0.08   | ****  |



جدول ۶. فاصله و همسانی ژنتیکی اصلاح‌شده چهار جمعیت *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. به دست آمده از درختان مرکبات در شمال ایران

Table 6. Genetic distance and genetic identity among four populations of *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. in North of Iran

| Population       | Citrus Institute | Guilan  | Gorgan  | Sari   |
|------------------|------------------|---------|---------|--------|
| Citrus Institute | --               | 0.955*  | 0.934*  | 0.862* |
| Guilan           | 0.045**          | --      | 0.974*  | 0.907* |
| Gorgan           | 0.068**          | 0.025** | --      | 0.934* |
| Sari             | 0.148**          | 0.096** | 0.068** | --     |

\* Genetic identity

\*\* Genetic distance

یا غیره بین آن‌ها قرار ندارد و از سوی دیگر انتقال نهال و پیوندک در کل این منطقه به سادگی و به میزان زیادی صورت می‌گیرد، جریان ژنی بین آن‌ها بالا است. بنابراین جداسازی نشدن جدایه‌های این جمعیت‌ها قابل توجیه است. در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۱ جدایه قارچ *Glomerella cingulata* (فرم جنسی قارچ *C. gloeosporioides*) حاصل از درختان مرکبات سه شهر رامسر، ساری و گرگان با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR و دو آغازگر REP و BOX، جدایه‌های قارچ بر مبنای مناطق جغرافیایی از یکدیگر جداسازی نشدند (Behnia, 2011) که با آزمایش ما همخوانی داشت.

بنابر تجزیه واریانس مولکولی، تنوع درون جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌ها بود و مشخص شد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها زیاد است ولی افراد جمعیت‌های مختلف از لحاظ ژنتیکی به هم نزدیک هستند. در بررسی ساختار ژنتیکی جدایه‌های *C. gloeosporioides* بیمارگر خربزه درختی با استفاده از نشانگرهای ISSR میانگین تنوع ژنی کل، میانگین تنوع ژنی درون جمعیتی و میانگین میزان جریان ژنی جمعیت‌ها به ترتیب برابر ۰/۲۷۹، ۰/۲۱۶۱ و ۰/۲۲۵ بود (Rampersad, 2013).

بیشترین تنوع ژنی و ژنوتیپی (شاخص شانون)، همردیف ژنی مشاهده شده و همردیف ژنی مؤثر در جمعیت‌های گیلان و گرگان مشاهده شد. در تحقیقی روی جدایه‌های *C. gloeosporioides* گیاه خربزه درختی میزان تنوع ژنتیکی جدایه‌های شمال و جنوب به ترتیب برابر ۰/۲ و ۰/۲۶۸ بود. در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Pyrenophora graminea* با استفاده از نشانگرهای ISSR بیشترین همردیف ژنی مؤثر، تنوع ژنتیکی و شاخص شانون مربوط به یک جمعیت بود در حالی که کمترین میزان آن‌ها مربوط به

## بحث

این تحقیق برای نخستین بار برای تعیین تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی چهار جمعیت *C. gloeosporioides* s. l. به دست آمده از درختان مرکبات در شمال ایران انجام شده است. بهترین روش برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، استفاده از نشانگرهای مولکولی مناسب است (Watt, 1994). در این تحقیق هفت نشانگر ISSR-PCR استفاده شدند و ۸۶ باند DNA با میانگین ۱۲/۳ باند، با استفاده از هفت آغازگر ISSR تشکیل شد. در تحقیقی روی *C. gloeosporioides* استفاده از پنج آغازگر ISSR، ۱۲۱ باند چندشکلی ایجاد شد (Rampersad, 2013). در بررسی تنوع ژنتیکی *Colletotrichum* spp. لگومینوز با آغازگرهای ISSR، ۱۱۶ باند با میانگین ۱۶/۵ باند برای هر نشانگر تولید شد (Mahmodi et al., 2014).

میزان چندشکلی حاصل از این نشانگرها در جمعیت‌های مورد بررسی ۹۷/۶۷ درصد بود. هر چه میزان چندشکلی ناشی از نشانگرها بیشتر باشد، در صورت وجود تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها قدرت جداسازی و تمایز آن‌ها از یکدیگر بیشتر می‌شود. بنابراین این نشانگرها، ابزار مناسبی برای بررسی‌های تنوع ژنتیکی در جدایه‌های قارچ *C. gloeosporioides* s. l. هستند. با تجزیه خوشه‌ای، ۱۴۴ جدایه متعلق به چهار جمعیت در سیزده گروه انگشت‌نگاری قرار می‌گیرند. گروه چهارم دارای جدایه‌های سه جمعیت و دیگر گروه‌ها شامل جدایه‌های یک یا دو جمعیت قارچ هستند. لذا جدایه‌های چهار جمعیت مختلف از لحاظ منطقه جغرافیایی، به صورت بسیار مشخص از یکدیگر جدا نشدند. با توجه به اینکه در شمال کشور مناطق مرکبات کاری در طول ساحل دریای خزر قرار دارند و بازدارنده جغرافیایی مشخصی مانند کوه

هماهنگ نبودن بین مسافت بین دو شهر و فاصله ژنتیکی آن‌ها در اینجا نیز مشهود است (Behnia, 2011).  
 رقم‌های تجاری امروزی مرکبات در سال ۱۳۰۹ وارد ایران و در فضای سبز کاخ‌های بابلسر و رامسر کشت شدند و از آنجا به دیگر قسمت‌ها منتقل شده‌اند (Golein & Adoli, 2011). یکی از چالش‌های عمده صنعت مرکبات ایران نبود قرنطینه و قوانین لازم برای انتقال منابع افزایشی مانند نهال و پیوندک مرکبات است و این مسئله در شمال کشور به علت نزدیکی شهرها و زیادی ارتباطات، شدت بیشتری دارد. باغ‌های اولیه مرکبات استان گیلان اغلب توسط نهال‌های شهرستان رامسر احداث شده‌اند و در مورد باغ رحیم‌آباد نیز این مسئله صادق بود. منشأ اولیه درختان ساری نیز از همان شهر بود ولی نهال‌های باغ‌گران از یک واسطه خریداری شده بود. این افراد نهال‌ها را از نهال‌کاران مناطق مختلف خریداری می‌کنند. در این موارد اغلب، محل تولید نهال نامشخص است و امکان اختلاط نهال‌های تولیدشده در مناطق مختلف وجود دارد. نزدیکی فاصله ژنتیکی جدایه‌های گیلان و گرگان می‌تواند به علت همانندی احتمالی منبع آلودگی اولیه باشد. یعنی نهال‌هایی که برای احداث باغ به کار رفته‌اند از آغاز آلودگی به قارچ را داشته و محل تولید آن‌ها در یک منطقه بوده است. هرچند که قارچ عامل بیماری هوزاد است و انتشار آن با باد صورت می‌گیرد، ولی منبع ژنتیکی اولیه قارچ در اینجا تأثیر بیشتری داشته است.

امکان ظهور ژنوتیپ‌های جدید در مناطقی که تنوع زیستی بالایی دارند زیاد است. وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های این قارچ در مرکبات کاری‌های شمال کشور باعث افزایش قابلیت سازگاری آن‌ها نسبت به شرایط محیطی و مقاومت به قارچ‌کش‌هایی که به دلایل مختلف استفاده می‌شوند، می‌شود. این امر باعث افزایش آسیب این قارچ در طول زمان می‌شود.

*C. gloeosporioides* یکی از عامل‌های عمده قارچی ریزش میوه پس از گلدهی مرکبات است و در چند سال اخیر باعث آسیب و زیان شایان توجهی در باغ‌های مرکبات شمال کشور شده است. مشاهده شده است که باغداران برای مبارزه با این بیماری از قارچ‌کش‌ها استفاده

جمعیت‌های مختلف بود (Noorolahi & Shahbazi, 2015). بیشتر قارچ‌های آسکومیست تولیدمثل جنسی و غیرجنسی دارند (Taylor et al., 1999). نحوه تولیدمثل قارچ، در شیوه انتشار، بقا و ساختار ژنتیکی آن در طول زمان و مکان مؤثر است (Milgroom, 1999; Taylor et al., 1999). در ضمن، عامل‌هایی مانند جهش، رانش ژنتیکی (genetic drift) و انتخاب طبیعی نیز در چگونگی تنوع ژنتیکی دخیل هستند.  
 پایین بودن واریانس بین جمعیت‌ها بر پایه تجزیه واریانس مولکولی، قرار گرفتن برخی از جدایه‌های دو یا سه جمعیت موردبررسی در یک گروه تجزیه خوشه‌ای و کم بودن تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها، وجود جریان ژنی در بین جمعیت‌های مختلف را اثبات می‌کند. جریان ژنی فرآیندی است که در طی آن ژن‌ها و ژنوتیپ‌ها در بین جمعیت‌ها تبادل می‌یابند. بیمارگرهایی که جریان ژنی بیشتری دارند میزان تنوع ژنتیکی بالاتری هم دارند (McDonald & Linde, 2002). در این تحقیق جریان ژنی به نسبت بالایی بین جمعیت‌های *C. gloeosporioides* شمال ایران مشاهده می‌شود. در حالت کلی عامل‌های بیماریزایی که زادمایه‌هایی با قابلیت انتشار بالا تولید می‌کنند، از لحاظ تنوع ژنتیکی گستره بیشتری را در بر می‌گیرند (McDonald & Linde, 2002). در شمال کشور در حاشیه دریای خزر مناطق جلگه‌ای هستند و نبود موانع طبیعی مانند کوه یا غیره بین شهرها باعث انتشار آسان اسپورهای قارچ توسط باد می‌شود. این امر می‌تواند باعث افزایش جریان ژنی در این منطقه شود.

فاصله ژنتیکی نمونه‌های مرکبات گیلان و پژوهشکده مرکبات و ساری هماهنگ با مسافت بین مکان‌های جغرافیایی آن‌ها بود ولی جدایه‌های گیلان و گرگان کمترین فاصله ژنتیکی را داشتند. بهنیا، تنوع ژنتیکی ۵۱ جدایه قارچ *Glomerella cingulata* (فرم جنسی قارچ *C. gloeosporioides*) حاصل از درختان مرکبات سه شهر رامسر، ساری و گرگان را با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR و دو آغازگر REP و BOX بررسی کرد. و با توجه به نتایج، کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های رامسر و گرگان و بیشترین آن بین جمعیت‌های ساری و گرگان مشاهده شد. بنابراین

ISSR است، توصیه می‌شود. این کار در دیگر مناطق مرکبات کاری ایران نیز انجام شود.

### سیاسگزاری

از ریاست پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری و اعضای گروه گیاه‌پزشکی آن به خاطر فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی اجرای تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

می‌کنند. با توجه به تنوع ژنتیکی قارچ در جمعیت‌های این منطقه، برای جلوگیری از ایجاد رقم (واریت‌های مقاوم قارچ به قارچ‌کش‌ها، مبارزه شیمیایی با آن باید با احتیاط و رعایت تناوب در نوع قارچ‌کش صورت گیرد و همچنین تدوین پروژه‌هایی برای یافتن رقم‌های مرکبات مقاوم به این عامل ضروری به نظر می‌رسد. این تحقیق نخستین پژوهش ساختار ژنتیکی *C. gloeosporioides* در باغ‌های مرکبات شمال ایران با استفاده از نشانگر

### REFERENCES

1. Agapow, P. M. & Burt, A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1, 101-102.
2. Anonymous. (2014). Statistical Pocketbook of Agriculture. Planting area, production and yield report of horticultural fruits of Iran. *Ministry of Jihad-e-Agriculture*. Retrieved July 22, 2015, From: <http://amar.maj.ir>.
3. Babri, M., Javan Nikkhah, M., Taheri, H. & Alian, Y. (2007). Evaluation of relative susceptibility of selective citrus cultivars to the casual agent of Anthracnose disease in Mazandaran province. *Journal of Agricultural Science*, 40, 116-124. (in Farsi)
4. Babri, M., Javan Nikkhah, M., Taheri, H. & Alian, Y. (2009). Comparing Virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates the Causal Agent of Citrus Anthracnose in Mazandaran Province, Iran. *Journal of Agricultural Science*, 40(2), 27-34. (in Farsi)
5. Babri, M., Javan Nikkhah, M., Taheri, H., Alian, Y. & Fatahi moghadam, J. (2008). Etiological study and dispersion appointment of anthracnose disease agent of citrus in Mazandaran province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 44, 37-53. (in Farsi)
6. Bagherabadi, S., Zafari, D. & Soleimani, M.J. (2015). Genetic diversity of *Alternaria alternata* Isolates Causing Potato Brown Leaf Spot, Using ISSR Markers in Iran. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 6(7), 1-6.
7. Behnia, M. (2011). *Study on genetic relationship of Glomerella cingulata isolates from Citrus and determination of mating type alleles*. M.Sc. Thesis. Department of Entomology and Plant Pathology, Abouraihan Campus, University of Tehran. (in Farsi)
8. Brown, J.K.M. (1996). The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. *New Phytologist*, 133, 183-195.
9. Burger, O.F. (1921). Variations in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Agricultural Research*, 20, 723-736.
10. Ciampi, M.B., Baldauf, C., Vigna, B.B.Z., Souza, A.P., Sposito, M.B. & Amorim, L. (2011). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Colletotrichum acutatum*, the causal agent of postbloom fruit drop on citrus. *Conservation Genetics Resources*, 3, 651-654.
11. Davarian, T., Taheri, A. & Razavi, S.I. (2006). Study on morphological and pathological characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* the causal agent of citrus anthracnose. *Journal of Agricultural Sciences and National Resources*, 13(1), 1-9. (in Farsi)
12. Ershad, J. (2009). *Fungi of Iran*. Iranian Research Institute of Plant Protection Press.
13. Fang, D.Q. & Roose, M.L. (1997). Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeats markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 408-417
14. Farr, D., Bills, G.F., Chamuris, G.P. & Rossman, A.Y. (1989). *Fungi, on plants and plant products in the United States*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
15. Freeman, S., Katan, T. & Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82, 596-605.
16. Freeman, S., Phamand, M. & Rodriguez, R.J. (1993). Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. *Experimental Mycology*, 17, 309-322.
17. Golein, B. & Adoli, B. (2011). *Citrus (planting)*. Novin pouya press. (in Farsi)
18. Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L. & Zhang, J.Z. (2009). *Colletotrichum* names in current use. *Fungal Diversity*, 39, 147-182.

19. Jiang, Y. L., Tan, P., Zhou, X. Y., Hou, X. L. & Wang, Y. (2012). *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of citrus anthracnose in Guizhou Province. *Plant Pathology & Quarantine*, 2(1), 25–29
20. Khansari Atigh, M., JavanNikkhah, M., Khodaparast, A., Babri, M & Hazanfari, K. (2010). A Study on Sexual Fertility and a Determination of Vegetative Compatibility Groups among *Glomerella cingulata* Isolates from Citrus Trees in Mazandaran Province, Iran. *Journal of Agricultural Science*, 41(1), 71-79. (in Farsi)
21. Lima, W.G., Sposito, M.B., Amorim, L., Goncalves, F.P. & Filho, P.A.M. (2011). *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 157-165.
22. Liu, D., Coloe, S., Baird, R. & Pederson, J. (2000). Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 471.
23. Lu, G., Cannon, P. F., Reid, A. & Simmons, C. M. (2004). Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological Research*, 108, 53-63.
24. Mahmodi, F., Kadir J.B., Puteh, A., Pourdad, S.S., Nasehi, A. & Soleimani, N. (2014). Genetic diversity and differentiation of *Colletotrichum* spp. Isolates associated with Leguminosae using Multigene Loci, RAPD and ISSR. *Plant Pathology Journal*, 30(1), 10-24
25. Malekzadeh, K., Jalilzadeh Moghadam Shahri, B. & Mohsenifard, E. (2011). Use of issr markers for strain identification in the button Mushroom, *Agaricus bisporus*. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Product*, 30-34.
26. McDonald, B. A. (1997). The Population genetics of Fungi: Tools and techniques. *Phytopathology*, 87(4), 448-453.
27. McDonald, B.A. & Linde, C. (2002). Pathogens population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 349-379
28. McGovern, R.J., Seijo, T.E., Hendricks, K. & Roberts, P.D. (2012), New report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing postbloom fruit drop on citrus in Bermuda, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(2), 187-194.
29. McKay, S. F., Freeman, S., Minz, D., Maymon, M., Sedgley, M., Collins, G.C. & Scott, E.S. (2009). Morphological, genetic, and pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the cause of anthracnose of almond in Australia. *Phytopathology*, 99, 985-995.
30. Milgroom, M. G. 1996. Recombination of multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 457-477.
31. Muller-Starck, G., Baradat, P. & Bergmann, F. (1992). Genetic variation within European tree species. *New Forest*, 6, 23-47.
32. Nascimento, R.J., Mizubuti, E.S.G., Câmara, M.P.S., Ferreira, M.F., Maymon, M., Freeman, S. & Michereff, S.J. (2010). First report of papaya fruit rot caused by *Colletotrichum magna* in Brazil. *Plant Disease*, 94, 1506.
33. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 70, 3321-3323.
34. Nourollahi, K. & Shahbazi, M. (2015). Study on genetic structure of *Pyrenophora graminea*, populations the causal agent of barley leaf stripe disease using ISSR marker. *Journal of Agricultural Science*, 46(1), 161-177. (in Farsi)
35. Peakall, R. & Smouse, P.E. (2012). GenAIEx 6.5, genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
36. Penzig, A.G.O. (1882). Fungi agrumicoli. Contribuzione allo studio dei funghi parassiti degli agrumi. *Michelia*, 2, 385-508.
37. Rampersad, S.N. (2013). Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. *Phytopathology*, 103, 182-189.
38. Ranathunge, N. P., Ford, R. & Taylor, P. W. J. (2009). Development and optimization of sequence-tagged microsatellite site markers to detect genetic diversity within *Colletotrichum capsici*, a causal agent of chilli pepper anthracnose disease. *Molecular Ecology Resources*, 9(4), 1175-1179.
39. Rohlf, F.J. (1998). NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.02 User Guide.
40. Sutton, B.C. (1980). *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew.
41. Sutton, B.C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph, *Colletotrichum*. In Bailey, J.A. & Jeger, J.J. (Eds.). *Colletotrichum, Biology, Pathology and Control*. (pp 1-26) CAB International, Wallingford, UK.
42. Taylor, J.W., Jacobson, D.J. & Fisher, M.S. (1999). The evolution of asexual fungi: Reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 197-246.

43. Wang, S., Miao, X., Zhao, W., Huang, B., Fan, M & Li, Z. (2005). Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycological Research* 109 (12), 1364-1372
44. Watt, W. B. (1994). Allozymes in evolutionary genetics: Self-imposed burden or extraordinary tool? *Genetics*, 136, 11-16.
45. Weir, B.S., Johnston, P.R. & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 115-180.
46. Wolf, M. S. & Caten, C.E. (1987). *Populations of Plant Pathogens: Their Dynamics and Genetics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
47. Wolfe, A.D. & Liston, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology in D. E. Soltis, P. S. Soltis & Doyle, J. J. (eds.). *Plant Molecular Systematics II*. (pp. 43-86) Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
48. Yeh, F.C., Yang, R.C. & Boyle, T.B.J. (1999). *POPGENE version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide* Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Canada.