مقاله کوتاه

شناسایی جدایه‌های *Cercospora beticola* عامل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی*

IDENTIFICATION OF *Cercospora beticola* ISOLATES, THE CAUSAL AGENT OF CERCOSPORA LEAF SPOT DISEASE OF SUGAR BEET, USING SPECIES-SPECIFIC PRIMERS

مونس بخشی، مهدی ارزنلو** و اسداله بابای اهری [۱]

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۲۸)

چکیده

لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند با عامل *Cercospora beticola* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های اندام‌های هوایی چغندرقند می‌باشد. با توجه به مشکلات موجود در شناسایی گونه‌های مختلف *Cercospora* بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی، در این تحقیق دو مجموعه آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی ژن کالمودولین و اکتین جهت تشخیص مولکولی این‌گونه مورد استفاده واقع شد. برای این منظور جدایه‌های استاندارد *C. beticola* همراه با دیگر جدایه‌های این گونه که از گیاهان چغندرقند جداسازی شدند، مورد استفاده قرار گرفتند. کارایی این آغازگرها روی جدایه‌های *Cercospora* جمع‌آوری شده از علف‌های هرز نیز ارزیابی گردید. جفت آغازگر طراحی شده بر اساس توالی ژن اکتین قادر به تشخیص اختصاصی *C. beticola* از دیگر گونه‌های این جنس و دیگر گروه‌های قارچی نبود. آغازگرهای مبتنی بر ژن کالمودولین قطعه‌ای به طول ۲۳۴ جفت باز از تمامی جدایه‌های *Cercospora* و قطعه‌ای به طول ۱۷۶ جفت باز را به صورت اختصاصی از جدایه‌های *C. beticola* تکثیر و با موفقیت گونه *C. beticola* را از دیگر گونه‌های این جنس تفکیک نمودند. بنابراین از این مجموعه آغازگر می‌توان برای غربال کردن گونه *C. beticola* از دیگر گونه‌های این جنس و ردیابی و تعیین دامنه میزبانی گونه *C. beticola* استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: کالمودولین، اکتین، علف‌های هرز، چغندر قند، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه، سرکسسپورا

*: بخشی از رساله دکتری نویسنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arzanlou@hotmail.com

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

مقدمه

گونه‌های جنس *Cercospora s. l.* یا قارچ‌های سرکوسپوروئید عمدتا شکل‌های غیر جنسی جنس آسکومیست *Mycosphaerella* Johnson می‌باشند. این گروه از قارچ‌ها، یکی از بزرگ‌ترین گروه‌های هیفومیست را تشکیل می‌دهند و دارای انتشار جهانی هستند (Goodwin *et al.* 2001; Crous *et al.* 2009). خسارت عمده این قارچ‌ها، از طریق تخریب برگ‌ها یا کاهش سطح فروغ آمایی به دلیل ایجاد بافت‌های نکروزه وارد می‌شود (Arzanlou *et al.* 2007, 2008, 2010; Goodwin *et al.* 2001). بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند با عامل *C. beticola* Sacc. یکی از شایع‌ترین بیماری‌های بخش‌های هوایی چغندرقند در دنیاست که در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب بیشترین خسارت را به این محصول وارد می‌کند (Weiland & Koch 2004; Bakhshi *et al.* 2011). *Cercospora beticola* از برخی علف‌های هرز مانند سلمک (*Chenopodium album* L.)، تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.)، پنیرک (*Malva rotundifolia* L.) و بارهنگ کبیر (*Plantago major* L.) نیز جداسازی شده است (Crous & Braun 2003; Lartey *et al.* 2005).

ویژگی‌های مختلفی از قبیل خصوصیات ریختی، تولید زهرابه و تخصص میزبانی برای شناسایی گونه‌های مختلف *Cercospora* استفاده شده است (Crous & Braun 2003). شناسایی بر اساس دامنه میزبانی منجر به نتیجه گیری‌های نادرست در شناسایی گونه‌ها و توصیف گونه‌های جدید شده است. بر اساس مطالعات انجام شده، گیاهان مختلفی ممکن است توسط یک گونه از *Cercospora* آلوده شوند (Lartey *et al.* 2003; Groenewald *et al.* 2005) و از طرفی گونه‌های مختلفی از *Cercospora* قادر به آلوده کردن یک گونه گیاهی هستند. در سال‌های اخیر علاوه بر *C. beticola*، گونه *C. apii* Fresen. نیز از گیاهان چغندرقند با علایم لکه برگی جداسازی شده است (Groenewald *et al.* 2005). شناسایی گونه‌های *Cercospora* عمدتاً بر اساس خصوصیات ظاهری ساختارهای تولید کننده کنیدیوم از قبیل خصوصیات ظاهری کنیدیوفور، سلول مولد کنیدیوم، محل کنیدیوم زایی، شکل و اندازه کنیدیوم صورت می‌گیرد (Crous & Braun 2003). با توجه به هم پوشانی خصوصیات ریختی بین گونه‌های مختلف و محدود بودن صفات ریخت‌شناختی بارز در تفکیک گونه‌ها، استفاده از این خصوصیات تشخیص گونه‌ها را با مشکل مواجه می‌سازد.

امروزه با استفاده از روش‌های مولکولی در کنار روش‌های ریخت شناختی تا حدودی مشکلات همراه با شناسایی عوامل بیماری‌زای گیاهان مرتفع شده است (Arzanlou *et al.* 2007). *لارتی و همکاران* (Lartey *et al.* 2003) از طریق طراحی آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی ژن اکتین، *C. beticola* را به صورت موفقیت آمیز از بافت‌های برگی آلوده چغندرقند تشخیص و ردیابی نمودند. *خرونوالد و همکاران* (۲۰۰۵) با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر توالی ژن کالمودولین، *C. beticola* را از دیگر گونه‌های این جنس تفکیک نمودند. با توجه به اهمیت بیماری لکه برگی چغندرقند در ایران و محدودیت‌های موجود در شناسایی این گونه و گونه‌های نزدیک بر اساس داده‌های ریخت شناسی و عدم آگاهی از دامنه میزبانی *C. beticola* در ایران، این تحقیق به منظور ۱) شناسایی مولکولی *C. beticola* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر توالی ژن اکتین و کالمودولین و ۲) بررسی کارایی این

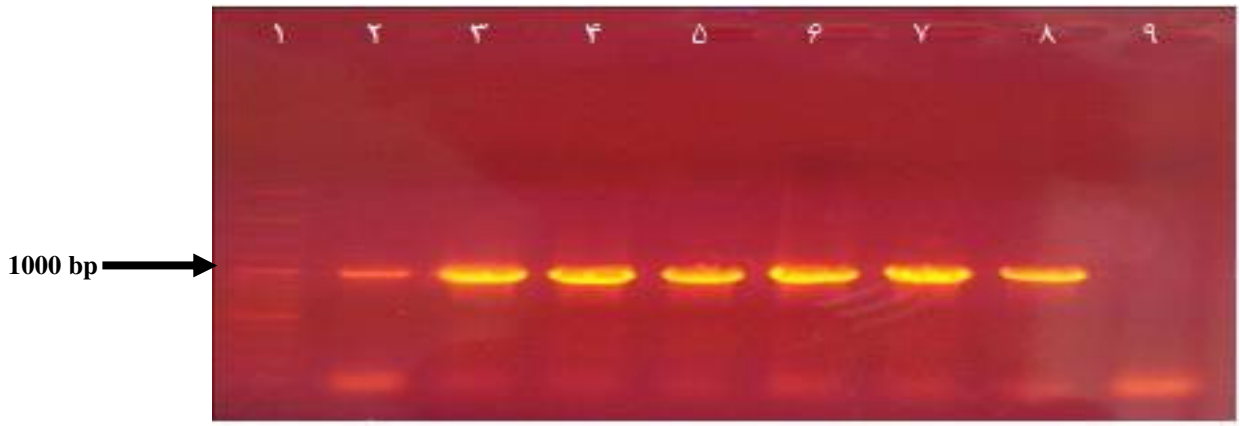
آغازگرها در ردیابی *C. beticola* روی علف‌های هرز انجام شده است.

روش بررسی

جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق از گیاهان چغندر قند با علایم بیماری لکه برگی، پیچک صحرایی (*Convolvulus arvensis*)، هفت بند پیچ (*Fallopia convolvulus*)، کاسنی (*Cichorium intybus*) و سلمک (*Chenopodium* sp.) مطابق روش توضیح داده شده توسط *بخشی و همکاران* (Bakhshi *et al.* 2011) جداسازی و خالص سازی شدند. علاوه بر این جدایه‌ها، دو جدایه معتبر و شناسایی شده قبلی از *C. beticola* تهیه شده از موسسه قارچ شناسی فرهنگستان علوم کشور هلند به عنوان جدایه مرجع و یک جدایه مربوط به W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai *Phaeoacremonium aleophilum* جداسازی شده از انگور به عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفتند. جدایه‌ها روی محیط کشت عصاره مخمر آگار (MEA) به مدت ۱۰-۸ روز در ۲۵ °C در تاریکی رشد داده شدند و استخراج DNA از بافت قارچ با استفاده از روش *مولر و همکاران* (Moller *et al.* 1992) صورت گرفت.

به منظور شناسایی اختصاصی قارچ *C. beticola* از دو آغازگر رفت و برگشت CBACTIN959R (CACTGATCCAGACGGAGTACTT) و CBACTIN959L (AGCACAGTATCATGATTGGTATG) که توسط *لارتی و همکاران* (۲۰۰۳) برای تکثیر اختصاصی ژن اکتین *C. beticola* طراحی شده بودند، استفاده شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز شامل ۱/۲۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰x، ۱،۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۴۰ میکرومول مخلوط dNTPs ، ۰/۵پیکومول از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت، ۰/۵ واحد آنزیمTaq DNA polymerase (سیناژن، ایران) ۲۰-۱۵ نانوگرم DNA الگو بود که حجم واکنش با استفاده از آب دیونیزه استریل به ۱۲،۵ میکرولیتر تنظیم شد. تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و با اعمال چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵°C، ۴۰ چرخه واسرشت سازی در ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ °C انجام گرفت.

در ادامه برای تشخیص افتراقی گونه‌های *Cercospora* از همدیگر از دو آغازگر Cercocal-F (CGCGAGGGCAGAGCTAACGA) و Cercocal-R (GTGAGGAATTCGGGGAAATC) که به ترتیب آغازگرهای رفت و برگشت بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن کالمودولین می‌باشند و یک آغازگر Cercocal-beta (GCCCACCCTCTGCGAATGTA) که آغازگر داخلی این ناحیه و اختصاصی *C. beticola* که توسط *خرونوالد و همکاران* (۲۰۰۵) طراحی شده بودند، به طور هم‌زمان در یک واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چندگانه مورد استفاده قرار گرفت. تمامی ترکیبات واکنش همانند مرحله قبل بود با این تفاوت که ۱/۵ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای Cercocal-beta و Cercocal-R، ۰/۵ پیکومول آغازگر Cercocal-F استفاده گردید. چرخه‌های حرارتی همانند مرحله قبل بود، با این تفاوت که اتصال آغازگر در دمای ۵۸ °C اعمال شد. در هردو واکنش، محصولات PCR حاصل از تکثیر با استفاده از الکتروفورز ۹۰ ولت به مدت ۴۰ الی ۹۰ دقیقه روی ژل آگارز ۱٪ (w/v) حاوی ۰/۱ µg/ml اتیدیوم بروماید در بافر TAE ×۱ بررسی و تحت نورUV مشاهده شدند.



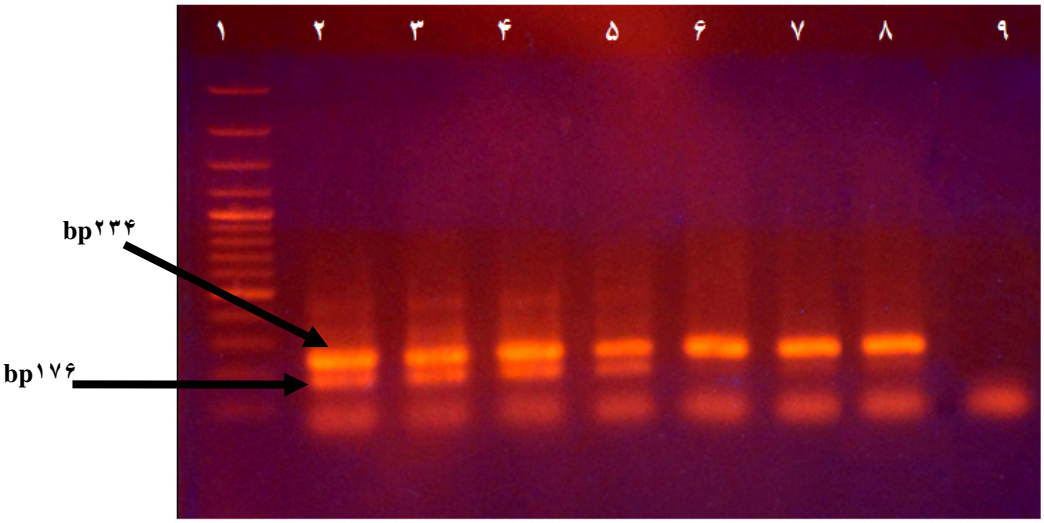
شکل ۱. الگوی باندهای تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای ژن اکتین در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز. چاهک ۱- مارکر 100bp DNA ladder؛ چاهک۲- جدایه استاندارد؛ ۳، ۴- جدایه محلی *C. beticola* روی چغندرقند؛ چاهک ۵- جدایه *Cercospora* sp. از گیاه هفت بند پیچ؛ چاهک ۶-جدایه *Cercospora* sp. جداسازی شده از *Chenopodium* sp.؛ چاهک۷- جدایه *Cercospora sp.* جداسازی شده از گیاه کاسنی؛ چاهک ۸- جدایه قارچ *Phaeoacremonium aleophilum* از درخت انگور؛ چاهک ۹- شاهد منفی (ترکیبات PCR فاقد DNA).

Fig. 1. Amplification profile using actin (CBACTIN959R and CBACTIN959L) primer set in PCR assay. 1- DNA marker (1oo bp), 2- standard isolate; 3-4 *Cercospora beticola* from sugar beet; 5-*Cercospora* sp. from *Fallopia convolvulus*; 6-*Cercospora* sp. from *Chenopodium* sp.; 7- *Cercospora* sp. from *Cichorium intybus*; 8- *Phaeacremonium aleophilum* from grapevine; 9- negative control (water and no template DNA).

نتایج و بحث

در این بررسی تعداد ۱۵ جدایه *Cercospora* از چغندرقند و چهار جدایه از علف‌های هرز با علایم لکه برگی جداسازی گردید. مشخصات میکروسکوپی جدایه-های چغندرقند با مشخصات *C. beticola* مطابقت داشت. مشخصات میکروسکوپی جدایه‌های مربوط به علف‌های هرز با خصوصیات *C. beticola* مشابهتی نشان ندادند.

نتایج حاصل از بررسی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز روی ژل آگارز نشان داد که جفت آغازگر CBACTIN959R و CBACTIN959L قطعه‌ای به اندازه ۹۵۹ جفت باز از تمامی جدایه‌ها شامل جدایه‌های متعلق به *C. beticola* مربوط به چغندرقند، جدایه‌های *Cercospora* مربوط به علف‌های هرز و *aleophilum Pm.* تکثیر کردند (شکل ۱). بنابراین آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی ژن اکتین قادر به تشخیص اختصاصی *C. beticola* از دیگر گونه‌های این جنس و دیگر گروه‌های قارچی نیست. نتایج این بررسی با نتایج گزارش شده توسط *لارتی و همکاران* (۲۰۰۳) مطابقت نداشت. ژن اکتین به صورت موفقیت آمیز به عنوان یک ژن هدف جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص گونه‌های *Mycosphaerella* عامل بیماری مرکب سیگاتوکای موز (Arzanlou *et al.* 2007) و برخی از گونه‌های *Phaeoacremonium* به کار رفته‌اند (Mostert *et al.* 2006). با توجه این‌که ژن اکتین دارای چندین اینترون می‌باشد در طراحی آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی گونه‌ها حدود و ثغور اینترون‌ها بایستی مد نظر قرار گرفته شوند.



شکل۲. الگوی باندهای تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای ژن کالمودولین در واکنش زنجیره ای پلی مراز. چاهک ۱- مارکر 100bp DNA ladder؛ چاهک۲، ۳- جدایه‌های استاندارد؛ ۴، ۵-جدایه‌های محلی *C. beticola* روی چغندرقند؛ چاهک ۶- جدایه *Cercospora* sp. از گیاه هفت بند پیچ؛ چاهک ۷-جدایه *Cercospora* sp. جداسازی شده از *Chenopodium* sp.؛ چاهک ۸- جدایه *Cercospora* sp. جداسازی شده از گیاه کاسنی؛ چاهک ۹- شاهد منفی (ترکیبات PCR فاقد DNA).

Fig. 2. Amplification profile using calmodulin primer sets (Cercocal-F ،Cercocal-and Cercocal-beta) in a multiplex PCR assay. 1- DNA marker (1oo bp): 2, 3- standard isolates; 4, 5- *Cercospora* beticola from sugar beet; 6- *Cercospora* sp. from *Fallopia convolvulus*; 7- *Cercospora* sp. from *Chenopodium* sp.; 8- *Cercospora* sp. from *Cichorium intybus*; 9- negative control (water and no template DNA).

در طی تکثیر جدایه‌ها با آغازگرهای مبتنی بر ژن کالمودولین قطعه‌ای به طول ۲۳۴ جفت باز در تمام جدایه‌های متعلق به *Cercospora* و قطعه‌ای به طول ۱۷۶ جفت باز به صورت اختصاصی در جدایه‌های متعلق به *C. beticola* تکثیر گردید (شکل ۲). بنابراین آغازگرهای اختصاصی طراحی شده توسط *خرونوالد و همکاران* (۲۰۰۵) به صورت موفقیت آمیز *C. beticola* را از دیگر گونه‌های این جنس تشخیص دادند. در این بررسی کارایی این آغازگرها روی جدایه‌های *Cercospora* جدا شده از علف‌های هرز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که هیچ یک از گونه‌های گیاهی هرز آلوده به این گونه نمی‌باشند، بنابراین می‌توان این مجموعه آغازگرها را در برنامه‌های مربوط به تعیین دامنه میزبانی *C. beticola* روی علف‌های هرز استفاده شد. با این‌حال نیاز است در مطالعات بعدی تحقیق روی جدایه‌های بیشتر نیز در برنامه کار قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردنی خود را از دکتر مریزت خرونوالد به خاطر اهدای جدایه‌های قارچ *C. beticola* اعلام می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (31-32) متن انگلیسی مراجعه شود.