

شناسایی جدایه‌های *Cercospora beticola* عامل بیماری لکه برگ
سرکوسپورایی چغندر قند 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 برگ سرکوسپورایی چغندر قند با عامل *Cercospora beticola* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های اندام‌های هوایی چغندر قند 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 این گونه مورد استفاده واقع شد. برای این منظور جدایه‌های استاندارد *C. beticola* همراه با دیگر جدایه‌های این گونه که از گیاهان چغندر قند 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 پلی‌مراز چندگانه، سرکوسپورا

*: 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

کردن یک گونه گیاهی هستند. در سال‌های اخیر علاوه بر *C. beticola*، گونه *C. apii* Fresen. نیز از گیاهان چغندر قند با علائم لکه برگگی 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 ریخت‌شناختی تا حدودی مشکلات همراه با شناسایی عوامل بیماری‌زای گیاهان مرتفع شده است (Arzanlou et al. 2007). لارتهی 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 برگگی آلوده چغندر قند 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 برگگی چغندر قند در ایران و محدودیت‌های موجود در شناسایی این گونه و گونه‌های نزدیک بر اساس داده‌های ریخت‌شناسی 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

گونه‌های جنس *Cercospora s. l.* یا قارچ‌های سرکوسپورویید عمدتاً 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 برگگی سرکوسپورایی چغندر قند با عامل *C. beticola* Sacc. یکی از شایع‌ترین بیماری‌های بخش‌های هوایی چغندر قند در دنیا است 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 (*Plantago major* L.) و بارهنگ کبیر (*Malva rotundifolia* 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 نتیجه‌گیری‌های 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

رفت و برگشت، ۰/۵ واحد آنزیم Taq 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 95°C ، ۴۰ چرخه واسرشت سازی در 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 54°C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در 72°C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در 72°C انجام گرفت.

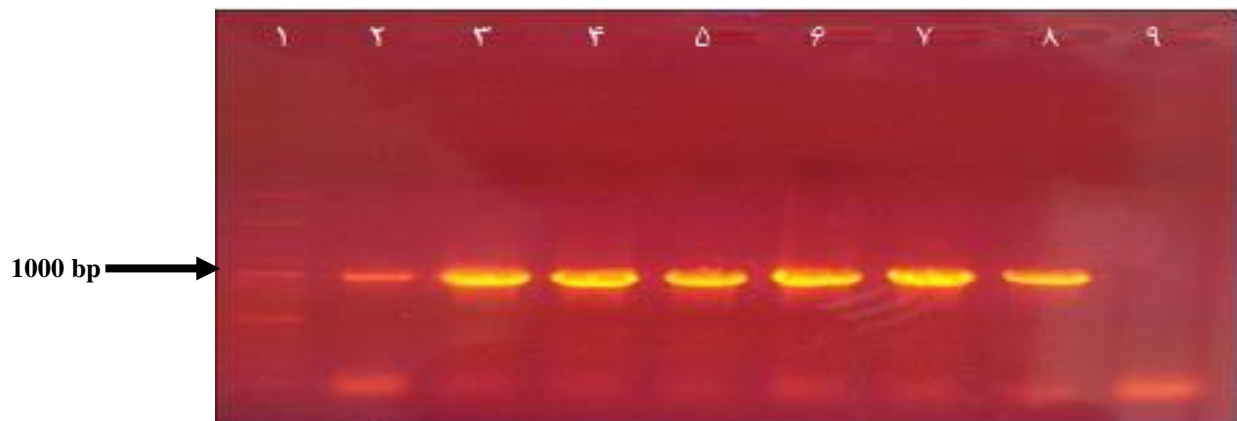
در ادامه برای تشخیص افتراقی گونه‌های *Cercospora* از همدیگر از دو آغازگر Cercocal-F (CGCGAGGGCAGAGCTAACGA) و Cercocal-R (GTGAGGAATTCGGGGAAATC) که به ترتیب آغازگرهای رفت و برگشت بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن کالمودولین می‌باشند و یک آغازگر Cercocal-beta (GCCACCCCTCTGCGAATGTA) که آغازگر داخلی این ناحیه و اختصاصی *C. beticola* که توسط خرونوالد و همکاران (۲۰۰۵) طراحی شده بودند، به طور هم‌زمان در یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز 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-R و Cercocal-beta، ۰/۵ پیکومول آغازگر Cercocal-F استفاده گردید. چرخه‌های حرارتی همانند مرحله قبل بود، با این تفاوت که اتصال آغازگر در دمای 58°C اعمال شد. در هر دو 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 $0.1 \mu\text{g/ml}$ ایدیوم بروماید در بافر $1 \times \text{TAE}$ بررسی و تحت نور UV مشاهده شدند.

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 برگگی، 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 ۸-۱۰ روز در 25°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 لارتری و همکاران (۲۰۰۳) برای تکثیر اختصاصی ژن اکتین *C. beticola* طراحی شده بودند، استفاده شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل ۱/۲۵ میکرولیتر بافر $10 \times \text{PCR}$ ، ۱،۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۴۰ میکرومول مخلوط dNTPs، ۰/۵ پیکومول از هریک از آغازگرهای



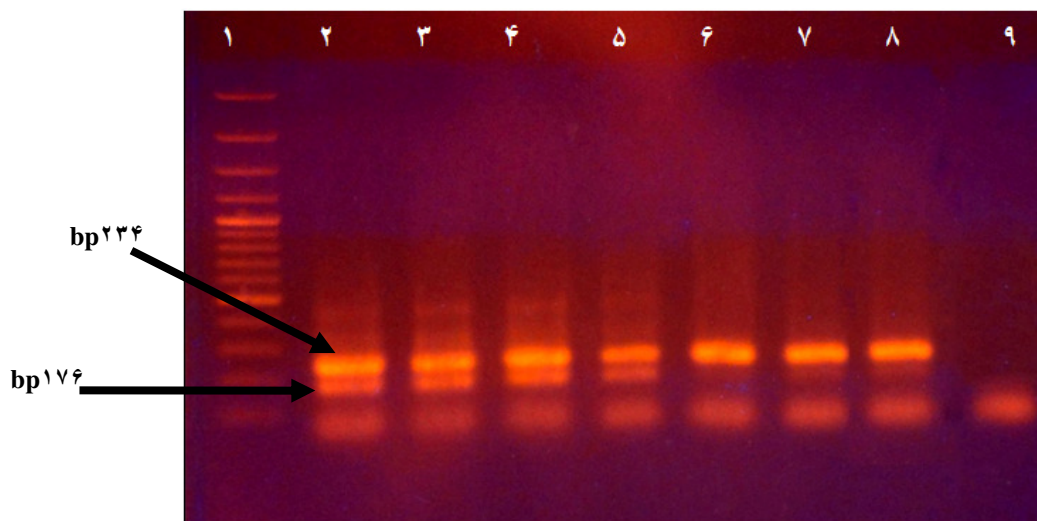
شکل ۱. الگوی باندهای تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای ژن اکتین در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز. چاهک ۱- مارکر 100bp DNA ladder؛ چاهک ۲- جدایه استاندارد؛ ۳، ۴- جدایه محلی *C. beticola* روی چغندر قند؛ چاهک ۵- جدایه *Cercospora sp.* از گیاه هفت بند پیچ؛ چاهک ۶- جدایه *Cercospora sp.* جداسازی شده از *Chenopodium sp.*؛ چاهک ۷- 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 (100 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- *Phaeoacremonium aleophilum* from grapevine; 9- negative control (water and no template DNA).

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 لارتری 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 ایترون می‌باشد در طراحی آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی گونه‌ها حدود و ثغور ایترون‌ها بایستی مد نظر قرار گرفته شوند.

نتایج و بحث

در این بررسی تعداد ۱۵ جدایه *Cercospora* از چغندر قند و چهار جدایه از علف‌های هرز با علایم لکه برگی جداسازی گردید. مشخصات میکروسکوپی جدایه‌های چغندر قند 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 پلی‌مراز 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 چغندر قند، جدایه‌های *Cercospora* مربوط به علف‌های هرز و *aleophilum*



شکل ۲. الگوی باندهای تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای ژن کالمودولین در واکنش زنجیره ای پلی مرز. چاهک ۱- مارکر DNA 100bp ladder؛ چاهک ۲، ۳- جدایه‌های استاندارد؛ ۴، ۵- جدایه‌های محلی *C. beticola* روی چغندر قند؛ 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 (100 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).

علف‌های هرز استفاده شد. با این حال نیاز است در مطالعات بعدی تحقیق روی جدایه‌های بیشتر نیز در برنامه کار قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از دکتر مریم زت خرونوالد به خاطر اهدای جدایه‌های قارچ *C. beticola* اعلام می‌نمایند.

منابع

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

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