مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۸۹ (۲۱۶-۲۰۷)

تشخیص مولکولی گونه‌های *Mycosphaerella* ایجادکننده بیماری مرکب سیگاتوکا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

مهدی ارزنلو
استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
(تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۹ - تاریخ تصویب: ۸۹/۸/۱۹)

چکیده

بیماری سیگاتوکای موز یک بیماری مرکب می‌باشد که سه گونه *M. musicola,* *M. fijiensis* و *M. eumusae* بعنوان عوامل اولیه ایجادکننده این بیماری به شمار می‌روند. شناسایی کلاسیک این سه گونه به خاطر همپوشانی علایم بیماری، عدم وجود تفاوت مورفولوژیک بارز در مرحله تلئومورف و عدم اسپورزایی آنها روی محیط‌های کشت مصنوعی مشکل می‌باشد. پراکنش دقیق گونه‌های فوق و اپیدمیولوژی این بیماری هنوز به طور کامل مشخص نگردیده است. علاوه بر این، دو گونه *M. fijiensis* و *M. eumusae* در بسیاری از کشورهای تولیدکننده موز حضور نداشته و گونه‌های قرنطینه‌ای به حساب می‌آیند. بنابراین، شناسایی سریع و دقیق آنها جهت به کارگیری استراتژی مناسب مدیریتی ضروری به نظر می‌رسد. در تحقیق حاضر آغازگرهای اختصاصی برای هریک از گونه‌های فوق بر اساس توالی بخشی از ژن کدکننده اکتین طراحی گردیدند که به ترتیب قطعاتی به طول‌های ۵۰۰ جفت باز (*M . fijiensis*)، ۲۰۰ جفت باز (*M. musicola*) و ۶۳۰ جفت باز (*M. eumusae*) را تکثیر کردند. کارآیی آغازگرهای اختصاصی هرگونه روی DNA استخراج شده از کشت‌های خالص و بافت‌های برگ‌های آلوده گیاه میزبان، آزمایش و تأیید شدند. نتایج حاصل از بررسی میزان حساسیت آغازگرها نشان داد که آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای هر یک از گونه‌های *M. Musicola*، *M. fijiensis* و *M. eumusae* به ترتیب توانایی تکثیر قطعه مورد نظر با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۰ و یک پیکوگرم DNA از گونه هدف را دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: ***M. musicola*، *M. fijiensis*، *M. eumusae*، شناسایی مولکولی، ژن اکتین.**

مقدمه

موز به عنوان یک ماده غذایی اصلی در سبد غذایی میلیون‌ها انسان درکشورهای واقع در جنوب شرق آسیا و آفریقا قرار می‌گیرد. علاوه بر این، موز به عنوان یک فرآورده باغی تجملاتی، سهم عمده‌ای در تجارت بین المللی ایفا می‌کند. میزان صادرات جهانی موز در بین محصولات باغی از نظر حجم در رتبه اول و از نظر ارزش ارزی بعد از مرکبات در جایگاه دوم قرار دارد (Balint-Kurti *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2003). گیاه موز در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا، حساس می‌باشد. در حال حاضر بیماری لکه برگی مایکوسفرلایی به عنوان یکی از جدی‌ترین بیماری‌های موز در مناطق کشت و

تلفن: ۰۹۱۴-۴۴۳۳۱۰۹
E-mail: arzanlou@ hotmail.com

پرورش این محصول به شمار می‌رود. بیماری لکه برگی مایکوسفرلایی، یک بیماری مرکب به حساب می‌آید، زیرا گونه‌های متعددی از جنس مایکوسفرلا در ایجاد این بیماری دخیل می‌باشند. تا کنون ۲۰ گونه از *Mycosphaerella* از گیاهان موز مبتلا به بیماری لکه برگی گزارش شده است (Marin *et al.*, 2003; Arzanlou *et al.*, 2008) با وجود این، سه گونه شامل *M. musicola*، *M. fijiensis* و *M. eumusae* به عنوان عوامل اولیه و اصلی ایجاد کننده بیماری به حساب می‌آیند که از این بین، خسارت گونه *M. fijiensis* بیشتر از بقیه گونه‌ها می‌باشد. خسارت این عوامل به صورت کاهش سطح فتوسنتز گیاه بوده که در نتیجه ایجاد لکه و نقاط نکروزه در سطح برگ حادث می‌شود. کاهش سطح فتوسنتز گیاه باعث افت میزان محصول می‌گردد. برخی از گونه‌ها مانند گونه *M. fijiensis* علاوه بر کاهش سطح فتوسنتز با ایجاد تغییرات فیزیولوژیک در میزبان، باعث رسیده شدن زودتر از موعد میوه نیز می‌گردد. رسیده شدن زودتر از موعد، ارزش صادراتی میوه موز را به شدت کاهش می‌دهد (Marin *et al.*, 2003; Arzanlou *et al.*, 2007a, 2009). خاستگاه بیماری لکه برگی مایکوسفرلایی موز منطقه جنوب شرق آسیا می‌باشد و هر سه گونه عامل این بیماری برای اولین بار از این منطقه گزارش شده‌اند. منطقه جنوب شرق آسیا خاستگاه گونه‌های جنس *Musa* نیز می‌باشد (Balint-Kurti *et al.*, 2001; Arzanlou *et al.*, 2007a).

گونه *M. musicola* عامل بیماری سیگاتوکا (سیگاتوکای زرد) می‌باشد. این بیماری برای اولین بار در سال میلادی ۱۹۰۲ از دره سیگاتوکا در جاوه واقع در کشور اندونزی گزارش گردید (Marin *et al.*, 2003). بیماری در طی یک دوره چهل ساله به اغلب نواحی موزکاری جهان گسترش پیدا کرد و به عنوان جدی‌ترین بیماری موز مطرح گردید. در حال حاضر این بیماری از اکثر مناطق کشت و پرورش موز در جهان به استثنای جزایر قناری در اسپانیا و فلسطین اشغالی گزارش شده است. بیماری سیگاتوکا در نواحی معتدل و نیمه‌معتدل، بیشترین مقدار خسارت را روی گیاه میزبان موز وارد می‌کند. در نواحی گرمسیری نیز این بیماری در مناطق مرتفع و کوهپایه‌ای بر روی موز ایجاد خسارت می‌کند (Johanson & Jeger 1993; Johanson *et al.*, 1994; Crous & Mourichon 2002; Marin *et al.*, 2003; Arzanlou *et al.*, 2007a, 2009).

گونه *M. fijiensis* عامل بیماری سیگاتوکای سیاه و یا رگه سیاه برگی برای اولین بار در سال ۱۹۶۳ از جزایر فیجی گزارش شد (Ploetz, 2000; Marin *et al.*, 2003). عامل بیماری در مقایسه با *M. musicola* از درجه بیماری‌زایی بیشتر و دامنه میزبانی وسیع‌تری در بین گونه‌های جنس *Musa* برخوردار می‌باشد. خسارت این گونه در مناطق گرمسیری و پست (با ارتفاع کمتر از سطح دریا) زیاد می‌باشد. با وجود این، گزارشاتی مبنی بر آلودگی گیاه میزبان توسط این گونه در نواحی مرتفع به همراه گونه *M. musicola* وجود دارد (Arzanlou *et al.*, 2007a; Marin *et al.*, 2003). این بیماری از طریق کاهش سطح فتوسنتزکننده میزبان باعث کاهش میزان محصول و با ایجاد اختلال در فیزیولوژی میزبان، باعث رسیده شدن زودتر از موعد میوه می‌شود. بیشتر ارقام تجاری موز در برابر این بیماری حساس می‌باشند و میزان خسارت بیماری تا حدود ۵۰ درصد محصول نیز گزارش گردیده است. عامل بیماری پس از اولین گزارش از منطقه جنوب شرق آسیا، به سرعت اغلب مناطق کشت و پرورش موز در قاره آمریکا را تحت تأثیر قرار داده است. عامل بیماری در اغلب مناطق موزکاری در منطقه آمریکای لاتین و سواحل اقیانوس آرام، جایگزین گونه *M. musicola* گردیده است. این بیماری در حال گسترش به مناطق موزکاری عاری از بیماری در قاره‌های آمریکا و آفریقا می‌باشد (Johanson & Jeger 1993; Johanson *et al.*, 1994; Carlier *et al.*, 2000; Ploetz, 2000; Balint-Kurti *et al.*, 2001; Crous & Mourichon 2002; Marin *et al.*, 2003; Arzanlou *et al.*, 2007a, 2008, 2009). این گونه در بسیاری از کشورهای تولیدکننده به عنوان موجود قرنطینه‌ای به حساب می‌آید. در استرالیا اقدامات ریشه‌کنی در سطح وسیع جهت کنترل این بیماری به عمل آمده و موفقیت‌آمیز بوده است (Arzanlou *et al.*, 2007a). کنترل این بیماری عمدتاً با استفاده از ترکیبات

شیمیایی قارچ‌کش انجام می‌پذیرد و در کشت‌های تجاری موز تعداد دفعات سمپاشی تا ۳۰ مرتبه هم انجام می پذیرد (Ploetz, 2000; Arzanlou *et al.*, 2007a).

گونه *M. eumusae* عامل بیماری لکه برگی ائوموزایی می‌باشد و برای اولین بار در دهه ۹۰ قرن بیستم از جنوب شرق آسیا گزارش گردید (Crous & Mourichon 2002). این بیماری ابتدا به عنوان بیماری لکه برگی سپتوریایی شناسایی شد ولی مطالعات بعدی نشان داد که عامل بیماری گونه‌ای از جنس *Mycosphaerella* می‌باشد. این بیماری در حال حاضر محدود به جنوب شرق آسیا و بخش هایی از آفریقا می‌باشد. اطلاعات دقیقی مبنی بر پراکنش جغرافیایی و بیماریزایی این گونه وجود ندارد. مشاهدات و گزارشات اولیه نشان می‌دهد که این گونه از شدت بیماری‌زایی بالاتری در مقایسه با دو گونه دیگر برخوردار است. بیماری‌زایی این گونه روی ارقام موز مقاوم به *M. fijiensis* گزارش گردیده است (Crous & Mourichon 2002; Arzanlou *et al.*, 2007a, 2008, 2009).

بیماری سیگاتوکای موز تاکنون در ایران مورد بررسی واقع نشده و اهمیت بیماری برای تولیدکنندگان این محصول ناشناخته باقی مانده است. با توجه به این که بیماری سیگاتوکا از پراکنش جهانی برخوردار می‌باشد، لذا احتمال حضور این بیماری در مناطق موزکاری ایران دور از انتظار نیست.

دامنه میزبانی گونه‌های فوق‌الذکر محدود به گونه‌های جنس *Musa* می‌باشد، با وجود این، گزارش‌هایی مبنی بر آلودگی برگ‌های مرکبات توسط گونه *M. fijiensis* وجود دارد (Crous *et al.*, 2004; Crous & Groenewald 2005; Arzanlou *et al.*, 2007a, 2008, 2009). این که گونه *M. fijiensis* ر روی مرکبات به عنوان بیمارگر اولیه، قدرت ایجاد بیماری دارد و یا به عنوان بیمارگر ثانوی از لکه‌های نکروزه به عنوان بستر غذایی استفاده می کند، نیاز به بررسی دارد. نکته مهم این است که آلودگی توام یک لکه و یا یک برگ توسط گونه‌های متعدد جنس *Mycosphaerella* امکان برهم‌کنش بین گونه‌ای را افزایش می‌دهد (Crous *et al.*, 2004; Crous & Groenewald 2005; Arzanlou *et al.*, 2008).

در گذشته شناسایی گونه‌های جنس *Mycosphaerella* بر اساس نوع میزبان و مشخصات ریخت شناسی استوار بوده است. شناسایی بر اساس نوع میزبان منجر به نتیجه‌گیری‌های نادرست شده و غیرمعتبر می‌شود. در حال حاضر شناسایی گونه‌های این جنس بر اساس خصوصیات مرحله آنامورف استوار می‌باشد. تنوع ریخت‌شناسی کمتری در خصوصیات مورفولوژیک مرحله تلئومورف در بین گونه‌های مختلف این جنس وجود دارد و به این خاطر دارای ارزش تاکسونومیکی ناچیزی می‌باشد. ویژگی‌های مرحله آنامورف شامل رنگ کنیدیوفور، مشخصات محل کنیدیزایی روی سلول کنیدی‌زا (رنگ، ضخامت و شکل) در شناسایی گونه‌های جنس مفید می‌باشند (Crous 1998; Crous *et al.*, 2004; Arzanlou *et al.*, 2008). با این حال گونه‌های این جنس روی محیط کشت از سرعت رشد پایینی برخوردار هستند و اسپورزایی قارچ روی محیط کشت به سختی صورت می‌گیرد و معمولاً پس از تجدید کشت جدایه‌ها قدرت اسپورزایی خود را از دست می‌دهند.

در مورد گونه‌های *Mycosphaerella* دخیل در بیماری سیگاتوکا، به خاطر همپوشانی علایم بیماری روی میزبان، آلودگی توأم میزبان توسط گونه‌های متعدد این جنس و هم‌پوشانی خصوصیات ریخت‌شناسی گونه‌های دخیل، شناسایی مبتنی بر روش‌های کلاسیک دشوار بوده و نیاز به دانش فنی لازم دارد (Johanson & Jeger 1993; Johanson *et al.*, 1994; Carlier *et al.*, 2000; Arzanlou *et al.*, 2007a, 2008, 2009) از طرف دیگر شناسایی گونه‌ها بر اساس روش‌های کلاسیک زمان‌بر می‌باشد و بررسی تعداد زیاد نمونه در مدت زمان کم در عمل غیرممکن است. با عنایت به این که دو گونه *M. eumusae* و *M. fijiensis* در بسیاری از کشورهای تولیدکننده این محصول قرنطینه می‌باشند، شناسایی سریع و دقیق این گونه‌ها جهت اعمال به موقع استراتژی‌های مدیریتی ضروری می‌باشد. پس هدف‌های این بررسی شامل: ۱) طراحی آغازگرهای اختصاصی

جهت شناسایی سریع، دقیق سه گونه اصلی ایجادکننده بیماری مرکب سیگاتوکا با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز؛ و ۲) بررسی کارآیی این آغازگرها در تکثیر DNA گونه هدف از بافت‌های آلوده میزبان بودند.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی

تعدادی از جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون مؤسسه قارچ‌شناسی فرهنگستان علوم کشور هلند (CBS Fungal Biodiversity Centre) تهیه شدند. بقیه جدایه‌ها از نمونه‌های گیاهی آلوده و دارای علایم، جمع‌آوری شده از مناطق کشت و پرورش موز جداسازی و خالص‌سازی شدند. جدایه‌ها با استفاده از دو روش زیر از بافت‌های گیاهی آلوده و دارای علایم جداسازی شدند:

جداسازی از مرحله تلئومورف

در مواردی‌که اندام‌های باردهی جنسی قارچ عامل بیماری در بافت‌های نکروزه گیاه وجود داشت، جداسازی مطابق روش کراوس (Crous, 1998) با اندکی تغییرات انجام شد، به این ترتیب که قطعات کوچکی از بافت‌های برگی دارای پریتسیوم کاذب به مدت یک الی دو ساعت در داخل ظرف پتری محتوی آب قرار داده شدند تا به صورت کامل آب جذب کنند. سپس قطعات برگ در سطح داخلی درب تشتک پتری قرار داده شدند و تشتک پتری حاوی محیط کشت عصاره مالت آگار دو درصد (Fulka, Germany) دارای آنتی بیوتیک استرپتومایسین و آمپی سیلین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، به صورت معکوس روی درب تشتک پتری قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت تشتک پتری حاوی محیط کشت در زیر استرئومیکروسکوپ با تابش نور از سطح زیرین بررسی شده و آسکوسپورهای پرتاب شده به سطح محیط کشت که جوانه زده بودند به محیط کشت جدید منتقل شدند.

جداسازی از مرحله غیر جنسی

تشتک پتری حاوی محیط کشت عصاره مخمر آگار دو درصد دارای آنتی‌بیوتیک (استرپتومایسن و آمپی‌سیلین به میزان یکصد میلی‌گرم در لیتر) به صورت مورب قرار داده شد و حدود ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون در یک گوشه محیط کشت ریخته شد. سپس بافت‌های برگی در زیر استرئومیکروسکوپ بررسی شده و با استفاده از اسکالپل سترون، توده کنیدی و کنیدیوفور با دقت از سطح لکه برگ برداشته شد و سپس در آب ریخته شده درون تشتک پتری قرار داه شد و کاملاً هم زده شد تا کنیدی‌ها آزاد شده و پخش شوند. سپس تشتک پتری به حالت مورب به مدت یک شب نگهداری شد. آب اضافی تشتک‌های پتری خالی شده و در زیر استرئومیکروسکوپ بررسی شده و کنیدی‌های جوانه زده به تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصاره مالت آگار انتقال داده شدند. جدایه‌های قارچی در داخل روغن معدنی در ۱۰ الی ۱۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جدایه‌های مورد استفاده در این بررسی در جدول ۱ فهرست شده اند.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از پرگنه‌های خالص، جدایه‌ها روی محیط کشت عصاره مالت آگار مخطط شده و پس از دو هفته زمانی که به اندازه کافی رشد کردند، DNA جدایه‌ها با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA[1]، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت استخراج گردید. مقدار DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ[2] اندازه‌گیری شد. جهت استخراج DNA از بافت‌های گیاه میزبان سالم و آلوده، از کیت تجاری مخصوص استخراج DNA از بافت‌های گیاهی DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)، مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده، استفاده شد. DNA استخراج شده به نسبت‌های ۱۰ برابر (۱:۱۰)، و صد برابر (۱:۱۰۰) رقیق شدند و مخلوط DNA اولیه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

طراحی آغازگر عمومی

یک جفت آغازگر عمومی (ACTF/ACTR) بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن اکتین گونه *M. graminicola*

1. Mobio, USA
2. NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA

طراحی شد که طول قطعه مورد انتظار تکثیر حدود ۸۲۰ جفت باز بود (http://genome.jgi-psf.org/ Mycgr3 /Mycgr3.home.html). این آغازگرها جهت تکثیر قطعه ژنی مورد نظر روی DNA گونه‌های *Mycosphaerella* گزارش شده از گیاه موز و DNA دیگر گونه‌های قارچی گزارش شده از گیاه موز با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد آزمایش واقع شدند (جدول ۱). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مزار شامل ۰/۵ واحد آنزیم پلی‌مزار[1]، بافر واکنش[2]، ۰/۵ میلی‌مول کلریدمنیزیم (۰/۵mMMgcl2)، ۰/۲ میلی‌مول از هر یک از dNTP، ۵ پیکو مول از هر یک از آغازگرها و ۱۰ الی ۱۵ نانو گرم از DNA بود که حجم نهایی مخلوط واکنش با استفاده از آب دیونیزه استریل به مقدار ۲۵ میکرولیتر تنظیم شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر[3] و با اعمال حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه جهت بسط نهایی انجام شد. درجه حرارت دستگاه پس از انجام واکنش بر روی درجه حرارت ۱۰ درجه برای مدت نامحدود، جهت جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول PCR تنظیم گردید. محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داک بررسی شدند. قطعات تکثیر شده تعیین توالی شدند. واکنش تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده با استفاده از کیت تجاری BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Roosendal, the Netherlands) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام گردید و تجزیه تحلیل نتایج با استفاده از دستگاه (ABI Persim 3700 DNA sequencer) انجام گردید.

1. Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
2. 1X PCR buffer
3. GenAmp PCR System 9700, Applied biosystem, USA

جدول ۱- جدایه‌های جنس *Mycosphaerella* و دیگر گونه‌های قارچی جداسازی شده از گیاه موز که در تحقیق حاضر مورد استفاده واقع شدند

جدایه	گونه قارچی	منشاء جغرافیایی
X845	*Mycosphaerella fijiensis*	اندونزی
X848	*Mycosphaerella fijiensis*	کالدونیای نو
X842	*Mycosphaerella fijiensis*	کاستاریکا
X841	*Mycosphaerella fijiensis*	کلمبیا
X843	*Mycosphaerella fijiensis*	هندوراس
CIRAD89	*Mycosphaerella fijiensis*	گابن
X858	*Mycosphaerella musicola*	استرالیا
X862	*Mycosphaerella musicola*	کامرون
X856	*Mycosphaerella musicola*	موریتانی
X954	*Mycosphaerella musicola*	کاستاریکا
X62	*Mycosphaerella musicola*	جزایر ویند وارد
CIRAD318	*Mycosphaerella musicola*	ناشناخته
X871	*Mycosphaerella eumusae*	هندوستان
X869	*Mycosphaerella eumusae*	سریلانکا
S1037D	*Mycosphaerella eumusae*	موریتانی
S1037E	*Mycosphaerella eumusae*	موریتانی
S1031B	*Mycosphaerella eumusae*	موریتانی
CIRAD670	*Mycosphaerella eumusae*	ویتنام
X38	*Mycosphaerella musae*	موزامبیک
X1023	*Mycosphaerella lateralis*	هندوستان
X881	*Mycosphaerella thailandica*	موریتانی
CBS 151.34	*Cordana musae*	ناشناخته
X1071	*Cordana johnstonii*	اندونزی
CBS 161.74	*Metulocladosporiella musae*	ناشناخته
CBS 113862	*Metulocladosporiella musicola*	کنیا

توالی‌های خام با استفاده از نرم‌افزار SeqMan (Lasergene package; DNAstar, Madison,WI) بررسی شده و ویرایش شدند. توالی‌های ایجاد شده در این بررسی با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI Blast Search) مقایسه شده و رجبندی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega 4 انجام گردید و الگوی هم‌ترازی چند گانه بررسی گردید.

طراحی آغازگرهای اختصاصی

آغازگرهای اختصاصی برای هر یک از گونه‌های *M. musicola*، *M. fijiensis* و*M. eumusae* بر اساس الگوی هم‌ترازی چند گانه گونه‌ها طراحی شدند که طول قطعه تکثیر یافته مورد انتظار برای هر جفت آغازگر در جدول ۲ آورده شده است. آغازگرهای طراحی شده جهت حصول اطمینان از اختصاصی بودن و عدم تشابه آنها با توالی‌های دیگر موجودات زنده موجود در بانک ژن، با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. عملکرد اختصاصی آغازگرهای هر یک از گونه‌ها در حضور DNA حاصل از دوگونه دیگر و DNA گیاه میزبان با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد آزمایش واقع شدند. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مطابق شرایط واکنش آغازگرهای عمومی بودند. به منظور مطالعه کارآیی آغازگرهای اختصاصی هر گونه، آغازگرهای اختصاصی هر گونه بر روی DNA استخراج شده از بافت‌های آلوده میزبان مورد آزمایش واقع شدند.

آزمون حساسیت آغازگرها

جهت بررسی میزان حساسیت آغازگرهای طراحی شده برای هر یک از گونه‌ها، سری رقت (۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰پیکوگرم) از DNA هر یک از گونه‌ها تهیه شد و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حضور آغازگرهای اختصاصی هر یک از گونه‌ها آزمایش گردید.

نتایج و بحث

مقایسه توالی ژن اکتین گونه *M. grminicola* با توالی موجود در بانک ژن (NCBI GenBank) با استفاده از نرم‌افزار اینترنتی (NCBI Blast Search) و ذخیره توالی‌های با درصد همولوژی زیاد و به دنبال آن زیر هم چینی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega 4 و بررسی الگوی هم‌ترازی چند گانه بین توالی‌ها، امکان طراحی یک جفت آغازگر عمومی با توانایی تکثیر قطعه ۸۲۰ جفت بازی از گونه‌های قارچی را فراهم آورد. جفت آغازگر عمومی طراحی شده ACTF/ACTR قطعه‌ای به طول ۸۲۰ جفت باز از DNA گونه‌های فهرست شده در جدول ۱ طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر کردند. نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از جفت آغازگر ACTF/ACTR در حضور DNA گیاه میزبان منفی بود، به این معنی که آغازگرهای طراحی شده اختصاصی گونه‌های قارچی بوده و برهم‌کنشی با DAN میزبان نداشته‌اند (نتایج نشان داده نشده است). تعیین توالی قطعه ۸۲۰ جفت بازی تکثیر شده، و رجبندی توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل، طراحی آغازگرهای اختصاصی برای هر یک از گونه‌های *M. musicola*، *M. fijiensis* و *M. eumusae* را امکان‌پذیر ساخت.

آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای هر گونه به ترتیب؛ ACTR/MFactF قطعه‌ای به طول ۵۰۰ جفت باز از گونه *M. fijiensis*؛ MMactF2/MMactRb قطعه‌ای به طول ۲۰۰ جفت باز از گونه *M. musicola* و جفت آغازگر ACTF/MEactR قطعه‌ای به طول ۶۳۰ جفت باز از گونه *M. eumusae* تکثیر کردند. آغازگر اختصاصی طراحی شده برای هر یک از گونه‌ها در حضور DNA استخراج شده از کشت خالص دو گونه دیگر مورد

جدول ۲- آغازگرهای عمومی و اختصاصی طراحی شده در این تحقیق

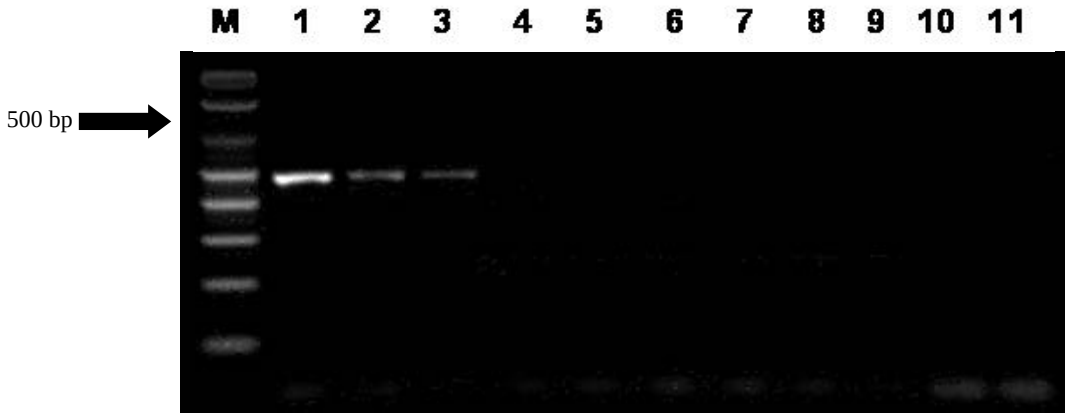
آغازگز	توالی (5’ → 3’)	گونه هدف	طول قطعه هدف (جفت باز)	ژن مورد استفاده
ACTF*	TCCAACCGTGAGAAGATGAC	General	۸۲۰	Actin
ACTR**	GCAATGATCTTGACCTTCAT	General		Actin
MFactF	CTCATGAAGATCTTGGCTGAG	*Mycosphaerella fijiensis*	۵۰۰	Actin
MMactF2	ACGGCCAGGTCATCACT	*M. musicola*	۲۰۰	Actin
MMactRb	GCGCATGGAAACATGA	*M. musicola*		Actin
MEactR	GAGTGCGCATGCGAG	*M. eumusae*	۶۳۰	Actin

* آغازگر مستقیم؛ ** آغازگر معکوس

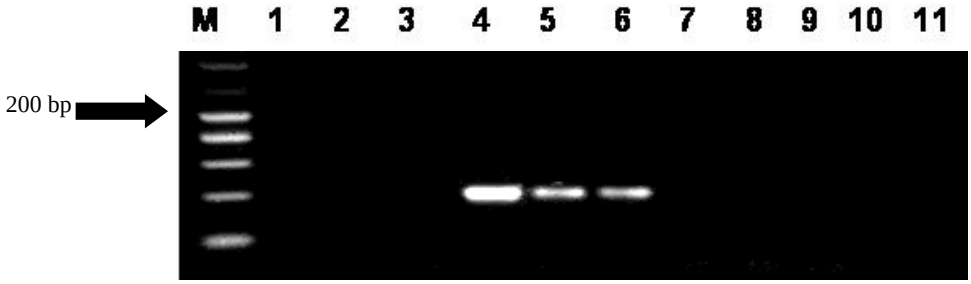
بررسی قرار گرفته و نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نشان داد که آغازگرهای هرگونه به صورت اختصاصی عمل می‌کنند (شکل‌های ۱، ۲، ۳). در ضمن آغازگر اختصاصی طراحی شده برای هر یک از گونه‌ها در حضور DNA استخراج شده از کشت خالص دیگر گونه‌های قارچی فهرست شده در جدول ۱ مورد بررسی واقع شدند، که نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز منفی بود (نتایج نشان داده نشده است).

پس از حصول اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرهای هر یک از ۳ گونه هدف بر اساس DNA استخراج شده از کشت خالص هر یک از گونه‌ها، کارآیی و عملکرد اختصاصی هر یک از آغازگرهای طراحی شده روی DNA استخراج شده از گیاهان میزبان آلوده در شرایط طبیعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی نشان داد که آغازگرهای اختصاصی هر یک از گونه‌ها، گونه هدف را به صورت اختصاصی از بافت‌های آلوده تکثیر کردند (شکل‌های ۱، ۲، ۳).

به منظور بررسی میزان حساسیت آغازگرهای طراحی



شکل ۱- نتایج آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه *Mycosphaerella fijiensis* (ACTR/ MFactF). چاهک‌های 1، 4، 7 به ترتیب DNA استخراج شده از کشت‌های خالص گونه‌های *M. fijiensis* ، *M. musicala* و *M. eumusae*؛ چاهک‌های 2 و 3 DNA استخراج شده از برگ‌های آلوده گیاه موز با گونه *M. fijiensis*؛ چاهک‌های 5 و 6 DNA استخراج شده از برگ‌های آلوده گیاه موز با گونه *M. musicola*؛ چاهک‌های 8 و 9 DNA استخراج شده از برگ‌های آلوده گیاه موز با گونه *M. eumusae*؛ چاهک 10 DNA گیاه موز؛ چاهک 11 شاهد منفی؛ نشانگر اندازه DNA (۱kb plus) =M

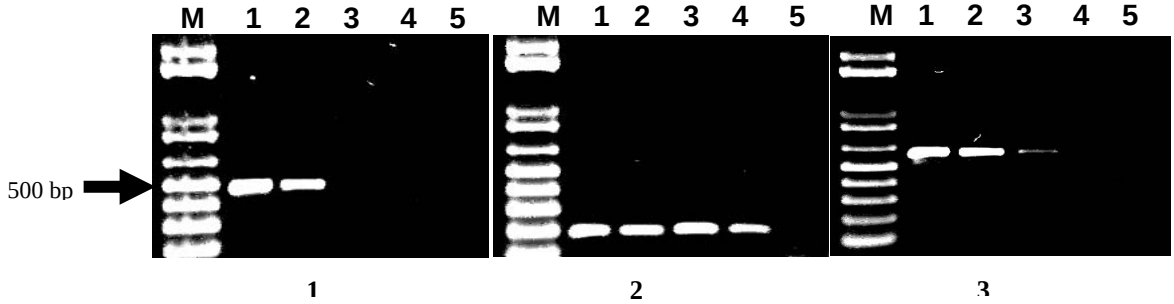


شکل۲- نتایج آزمونPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه *Mycosphaerella musicola* (MMactF2/ MMactRb). چاهک‌های 1، 4، 7 به ترتیب DNA استخراج شده از کشت‌های خالص گونه‌های *M. fijiensis*، *M. musicola* و *M. eumusae*؛ چاهک‌های 2 و 3 DNA استخراج شده از برگ‌های آلوده گیاه موز با گونه *M. fijiensis*؛ چاهک‌های 5 و 6 DNA استخراج شده از برگ‌های آلوده گیاه موز با گونه *M. musicola*؛ چاهک‌های 8 و 9 DNA استخراج شده از برگ‌های آلوده گیاه موز با گونه *M. eumusae*؛ چاهک 10 DNA گیاه موز؛ چاهک 11 شاهد منفی؛ نشانگر اندازه DNA (۱kb plus) =M

شکل ۳- نتایج آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه *Mycosphaerella eumusae* (ACTF/ MEactR). چاهک‌های 1، 4، 7 به ترتیب DNA استخراج شده از کشت‌های خالص گونه‌های *M. fijiensis, M. musicola* و *M. eumusae*؛ چاهک‌های 2 و 3 DNA استخراج شده از برگ‌های آلوده گیاه موز با گونه *M. fijiensis*؛ چاهک‌های 5 و 6 DNA استخراج شده از برگ‌های آلوده گیاه موز با گونه *M. musicola*؛ چاهک‌های 8 و 9 DNA استخراج شده از برگ‌های آلوده گیاه موز با گونه *M. eumusae*؛ چاهک 10 DNA گیاه موز؛ چاهک 11 شاهد منفی؛ نشانگر اندازه DNA (۱kb plus)=M

شده برای هر یک از گونه‌ها، آغازگر اختصاصی هر گونه در غلظت‌های مختلف DNA هر گونه بررسی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حضور آغازگر اختصاصی هر گونه و سری رقت‌های ۱۰۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ پیکوگرم از DNA استخراج شده از کشت خالص هر گونه انجام شد. نتایج حاصل از بررسی میزان حساسیت آغازگرها نشان داد که میزان حساسیت آغازگرهای اختصاصی گونه *M. fijiensis* (ACTR/MfactF) حداقل ۱۰۰ پیکوگرم DNA می‌باشد. در مورد گونه *M. eumusae* جفت آغازگر اختصاصی این گونه (ACTF/MEactR) میزان حساسیت حداقل ۱۰ پیکوگرم DNA بود. در حالی که میزان حساسیت جفت آغازگر اختصاصی گونه *M. musicola* (MMactF2/MMactRb) حداقل یک پیکوگرم DNA بود که در مقایسه با دو گونه دیگر از میزان حساسیت بالاتری برخوردار بود (شکل ۴).

گونه‌های متعددی از جنس *Mycosphaerella* و یا آنامورف‌های آن در ایجاد بیماری مرکب سیگاتوکا روی موز دخیل هستند. با توجه به پراکنش جغرافیایی وسیع گیاه موز در اغلب اقلیم‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، امکان مطالعه پراکنش این بیماری مرکب و گونه‌های دخیل در این بیماری با اتکا به روش‌های کلاسیک امکان‌پذیر نمی‌باشد (Johanson & Jeger 1993; Johanson *et al.*, 1994; Crous & Mourichon 2002; Marin *et al.*, 2003; Arzanlou *et al.*, 2007a, 2009). شناسایی صحیح عامل بیماری به عنوان یک اصل اولیه و مهم در مدیریت یک بیماری به حساب می‌آید. هدف این پژوهش، طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت شناسایی



شکل ۴- آزمون حساسیت آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای هر یک از سه گونه بررسی شده در این تحقیق. چاهک‌های 1 الی 5 سری رقت ۱۰ برابر DAN (۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ پیکوگرم در هرمیکرولیتر) از 1) *Mycosphaerella fijiensis*، 2) *M. musicola*، 3) *M. eumusae*؛ نشانگر اندازه DNA (۱kb plus)=M

سریع و دقیق سه گونه اصلی ایجادکننده بیماری مرکب سیگاتوکا با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و بررسی کارآیی این آغازگرها در تکثیر DNA گونه هدف از بافت‌های آلوده میزبان بود. با وجود اینکه در بررسی‌های قبلی آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص دو گونه *M. fijiensis* و *M. musicola* طراحی شده‌اند، کارآیی این آغازگرها در تکثیر گونه‌های هدف ار بافت‌های آلوده و در حضور DNA سایر گونه‌های *Mycosphaerella* بر روی گیاه موز مورد ارزیابی واقع نشده‌اند (Johanson & Jeger 1993). Arzanlou *et al.* (2007a) آغازگر و کاوشگر اختصاصی جهت تشخیص و کمیت‌سنجی هر یک از گونه‌های *M. musicola*، *M. fijiensis* و *M. eumusae* را بر اساس تکنولوژی (TaqMan real time PCR) طراحی کردند که قدرت تکثیر مقادیر اندک DNA گونه‌های هدف را از بافت‌های آلوده میزبان در شرایط طبیعی امکان‌پذیر می‌ساخت. با عنایت به اینکه امکان استفاده از تکنولوژی (TaqMan real time PCR) در همه آزمایشگاه‌های تشخیص بیماری‌های گیاهی وجود ندارد، در این تحقیق آغازگرهای اختصاصی جهت تشخیص هر یک از سه گونه بر اساس رجبندی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن اکتین گونه‌های قارچی فهرست شده در جدول ۱ و دیگر گونه‌های قارچی گزارش شده از گیاه میزبان موز طراحی گردیدند. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در این پژوهش علاوه بر DNA گونه‌های قارچی فهرست شده در جدول ۱ روی دیگر گونه‌های جنس *Mycosphaerella* در موز که حدود ۲۰ گونه را شامل می‌شوند، آزمایش شدند (Arzanlou *et al.*, 2007a,b, 2008, 2009) که نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز منفی بود. بنابراین امکان تکثیر DNA گونه‌های غیر هدف وجود نداشت. با توجه به همپوشانی علایم بیماری بین سه گونه روی میزبان، مخصوصاً دو گونه *M. musicola* و *M. eumusae* آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در شناسایی سریع و دقیق این گونه‌ها می‌توانند مفید باشند. گونه *M. eumusae* در حال حاضر از جنوب شرق آسیا و بخش‌هایی از آفریقا گزارش شده است، با این حال اطلاعات چندانی از محدوده دقیق پراکنش این گونه وجود ندارد. دو گونه *M. fijiensis* و *M. eumusae* به عنوان عوامل قرنطینه‌ای در بسیاری از مناطق تولیدکننده موز به شمار می‌روند (Carlier *et al.*, 2000; Arzanlou *et al.*, 2007a, 2008, 2009). شناسایی سریع و دقیق موجودات قرنطینه‌ای در مدیریت بیماری‌های قرنطینه‌ای نقش اساسی دارد. امروزه ابزار مولکولی شناسایی به طور رایج در تشخیص عوامل بیماریزای گیاهی، مطالعه پراکنش عوامل بیماریزا و مطالعات اکولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Lievens & Thomma, 2005; Maxwell *et al.*, 2005; Arzanlou *et al.*, 2007a, 2009).

در ایران به منظور خودکفایی در تولید داخلی موز از یک طرف و حساسیت مرکبات مخصوصاً لیموی ترش به بیماری فیتو پلاسمایی جاروی جادوگر از طرف دیگر، در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به کشت و پروش موز به عنوان یک محصول جایگزین مرکبات در اقلیم‌های نیمه‌گرمسیری و معتدل ایران شده است. بیماری سیگاتوکای موز تاکنون در ایران مورد بررسی واقع نشده و اهمیت بیماری برای تولیدکنندگان این محصول ناشناخته باقی مانده است. با توجه به این که بیماری سیگاتوکا از پراکنش جهانی برخوردار می‌باشد، لذا احتمال حضور این بیماری در مناطق موزکاری ایران دور از انتظار نیست. لذا آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در این پژوهش در مطالعه بیماری لکه برگی مایکوسفرلایی موز در ایران می‌تواند مفید باشد.

نتیجه‌گیری کلی

آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در این پژوهش برای سه گونه اصلی ایجادکننده بیماری مرکب سیکاتوگای موز را می‌توان در برنامه‌های مدیریت این بیماری در جهت تشخیص سریع و مطالعه پراکنش گونه‌های دخیل مورد استفاده قرار داد.

REFERENCES

1. Arzanlou, M., Abeln, E. C. A., Kema, G. H. J., Waalwijk, C., Carlier, J., Vries, I de, Guzmán, M. & Crous, P. W. (2007a). Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology*, 97, 1112-1118.
2. Arzanlou, M., Groenewald, J. Z., Gams, W., Braun, U., Shin, H. D. & Crous, P. W. (2007b).

Phylogenetic and morphotaxonomic revision of *Ramichloridium* and allied genera. *Studies in Mycology*, 58, 57-93.

3. Arzanlou, M., Groenewald, J. Z., Fullerton, R. A., Abeln, E. C. A., Carlier, J., Zapater, M-F., Buddenhagen, I. W., Viljoen A. & Crous, P. W. (2008). Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia*, 20, 19-37.
4. Arzanlou, M., Kema, G. H. J., Waalwijk, C., Carlier, J., Vries, I. de, Guzmán, M., Vargas, M. A., Helder, J. & Crous, P. W. (2009). Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex and *Radopholus similis* in banana. *Acta Horticulture*, 828, 237-234.
5. Balint-Kurti, P. J., May, G. D. & Churchill, A. C. L. (2001). Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. *FEMS Microbiology Letters*, 195, 9-15.
6. Carlier, J., Zapater, M. F., Lapeyre, F., Jones, D. R. & Mourichon, X. (2000). Septoria leaf spot of banana: a newly discovered disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (anamorph *Septoria eumusae*). *Phytopathology*, 90, 884-890.
7. Crous, P. W. (1998). *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. *Mycological Memories*, 21, 1-170.
8. Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Pongpanich, K., Himaman, W., Arzanlou, M. & Wingfield, M. J. (2004). Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian Acacia species grown as exotics in the tropics. *Studies in Mycology*, 50, 457-469.
9. Crous, P. W. & Groenewald, J. Z. (2005). Hosts, species and genotypes: opinions versus data. *Australasian Plant Pathology*, 34, 463-470.
10. Crous, P. W. & Mourichon, X. (2002). *Mycosphaerella eumusae* and its anamorph *Pseudocercospora eumusae* spp. nov.: causal agent of eumusae leaf spot disease of banana. *Sydowia*, 54, 35-43.
11. Johanson, A. & Jeger, M. J. (1993). Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of sigatoka leaf spot in banana and plantain. *Mycological Research*, 97, 670-674.
12. Johanson, A., Crowhurst, R. N., Rikkerink, E. H. A., Fullerton R. A. & Templeton, M. D. (1994). The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. *Plant Pathology*, 43, 701-707.
13. Lievens, B. & Thomma, B. P. H. J. (2005). Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant pathogens and use in practice. *Phytopathology*, 95, 1374-1380.
14. Marin, D. H., Romero, R. A., Guzman M. & Sutton, T. B. (2003). Black Sigatoka an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87, 208-222.
15. Maxwell, A., Jackson, S. L., Dell B. & Hardy, G. E. S. J. (2005). PCR-identification of *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of Eucalyptus. *Mycological Research*, 109, 992-1004.
16. Ploetz, R. (2000). Black Sigatoka. *Pesticide Outlook*, 11, 19-23.