تعیین تیپ‌های آمیزشی قارچ *Cercospora beticola*، عامل بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی چغندرقند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و امکان تشکیل مرحله جنسی آن در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

مونس بخشی[1]، مهدی ارزنلو[2*] و اسدالله بابای اهری[3]

[1] دانشجوی دوره دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز
[2] استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز
[3] استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز
[*] مسول مکاتبه: arzanlou@hotmail.com

تاریخ دریافت: 91/3/18 تاریخ پذیرش: 91/7/25

چکیده

مرحله جنسی گونه *Cercospora beticola* تاکنون شناخته نشده است، با این وجود سطوح بالایی از تنوع ریخت شناختی، ژنتیکی و مقاومت به قارچ‌کش‌ها در بین جمعیت‌های این قارچ گزارش شده است. در تحقیق حاضر تیپ‌های آمیزشی 70 جدایه ایرانی گونه *C. beticola* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تعیین و امکان تشکیل مرحله جنسی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی گردید. برای این منظور در مهر و آبان سال 1388 از مزارع چغندرقند منطقه مغان (استان اردبیل)، نمونه‌برداری به‌عمل آمد. کشت‌های تک اسپور به‌صورت مستقیم از لکه‌های برگی تهیه و DNA جدایه های قارچی استخراج گردید. تیپ‌های آمیزشی از طریق تغییرات اعمال شده درآغازگرهای طراحی شده قبلی و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه تعیین شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز 0/8 درصد، تکثیر قطعه‌ای به طول 800 جفت باز را تنها در جدایه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-1 و قطعه‌ای به اندازه 440 جفت باز را تنها درجدایه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-2 تایید نمود. نتایج بررسی نشان داد که تیپ‌های آمیزشی در این ناحیه از فراوانی مساوی برخوردار نیستند. در مجموع از 70 جدایه قارچی به‌دست آمده، 52 جدایه تیپ آمیزشی MAT1-1 و 18 جدایه تیپ آمیزشیMAT1-2 داشتند. در این بررسی شش روش برای القای مرحله جنسی بین جدایه‌های با تیپ آمیزشی مخالف مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل در شرایط آزمایشگاه و گلخانه موفقیت آمیز نبود. به‌نظر می‌رسد که فاکتورهای ناشناخته‌ای در القای مرحله جنسی این قارچ دخیل بوده و یا نقصان‌ژنتیکی در ژن‌های دخیل در چرخه تولیدمثلی منجر به عدم تشکیل مرحله جنسی در شرایط مزرعه و یا شرایط کنترل شده می گردد.

واژه‌های کلیدی: تولید مثل جنسی، ژن‌های تیپ آمیزشی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه، MAT1-1، MAT1-2

مقدمه

بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی که عامل آن قارچ *Cercospora beticola* Sacc. می‌باشد، یکی از شایع‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های اندام‌های هوایی چغندرقند در سطح جهان است که تحت شرایط محیطی گرم و مرطوب بیشترین خسارت را به محصول چغندرقند وارد می‌کند (خان و همکاران 2008 و 2009، لارتی و همکاران 2003 و 2005). در ایران بیماری مزبور ابتدا توسط اسفندیاری در سال 1326 گزارش شد و مناطق انتشار آن شامل اردبیل، بندرعباس، خوزستان، بجنورد، سواحل دریای خزر، کازرون، خرم‌آباد، خوی و ارومیه می‌باشند (به نقل از منبع اعتباریان 1376). این بیماری منجر به کاهش معنی‌دار در میزان محصول، قند ریشه، قند استحصالی و قابلیت انبارداری ریشه می‌گردد. در ضمن به‌دلیل افزایش میزان ناخالصی در ریشه، هزینه‌های پردازش افزایش می‌یابد (اسمیت و راپل 1973، شان و تنگ 1992).

قارچ *C. beticola* از طریق کنیدیوم‌زائی به روش غیر جنسی تکثیر می‌یابد و مرحله جنسی برای آن شناخته نشده است. با این‌حال جدایه‌های این قارچ تنوع فنوتیپی بالایی از نظر ریخت‌شناسی کنیدیوم‌ها، پرگنه، گسترش علایم بیماری و مقاومت نسبت به قارچ‌کش‌ها از خود نشان می‌دهند (مورتی و همکاران 2004، ویلند و کخ 2004). درضمن مطالعات انجام شده مبتنی بر نشانگر-های مولکولی حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالا در داخل جمعیت‌های این قارچ می‌باشد (ویلند و کخ 2004، مورتی و همکاران 2006، خرونوالد و همکاران 2008).

به صورت سنتی تیپ‌های آمیزشی از طریق تلاقی های جنسی دو جدایه از یک گونه با تیپ آمیزشی مخالف شناخته می‌شوند. در غیاب مرحله جنسی مشخص، چندین روش می‌تواند برای بررسی امکان تولیدمثل جنسی به‌کار رود. جمعیت‌هایی که به صورت منظم تولید مثل جنسی دارند، بایستی سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در مقایسه با گونه‌هایی که فقط تولید مثل غیرجنسی دارند، نشان دهند (میلگروم 1996). روش دیگر برای آزمون امکان تولیدمثل جنسی، بررسی وقوع و فراوانی ژن‌های تیپ آمیزشی است. حضور ژن‌های تیپ آمیزشی برای اثبات حضور مرحله جنسی یا تایید آمیزش تصادفی کافی نیست. با این حال در صورتی‌که انتخاب وابسته به فراوانی در ژن‌های تیپ آمیزشی فراهم باشد، آن وقت آلل‌های تیپ‌های آمیزشی از فراوانی مساوی برخوردار خواهند بود (هالیدی و همکاران 1999، میلگروم 1996، والویک و همکاران 2002، لینده و همکاران 2003).

امروزه روش‌های مولکولی تعیین تیپ‌های سازگاری جنسی، شناسایی این خصوصیت را بدون نیاز به تلاقی-های جنسی بین جدایه‌ها امکان‌پذیر ساخته و اجازه تشخیص سریع‌تر تیپ‌های آمیزشی را نسبت به روش-های آزمون‌های تلاقی قدیمی می‌دهد. ژن‌های تیپ آمیزشی گونه *C. beticola* توسط خرونوالد و همکاران (2006) شناسایی و همسانه‌سازی گردیده است و نتایج این بررسی نشان داد که گونه قارچی مذکور هتروتال بوده و دارای سیستم آمیزشی دو قطبی است. ماهیت تیپ‌های آمیزشی به اندازه کافی در بین گونه‌ها حفاظت شده است که بتوان آغازگرهای مبتنی بر ناحیه حفاظت-شده ژن‌های تیپ آمیزشی را برای تکثیر آن‌ها طراحی کرد (آری و همکاران 2000، کوپین و همکاران 1997). بنابراین راه‌کار ساده‌تر برای کلون کردن ژن‌های تیپ آمیزشی قارچی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز می‌باشد. خرونوالد و همکاران (2006) از طریق طراحی آغازگر-های هرز[1] بر اساس توالی ژن‌های تیپ آمیزشی گونه-های جنس *Mycosphaerella* و با به‌کارگیری این آغازگر-های هرز بخشی از ژن‌های تیپ آمیزشی قارچ *C. beticola* را با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیرکردند. آغازگرهای هرز طراحی شده، علاوه بر این گونه، قادر به تکثیر بخشی از ناحیه تیپ آمیزشی از دیگر گونه‌های جنس *Cercospora* می‌باشند. یکی از مشکلات استفاده از آغازگرهای هرز، امکان تکثیر غیر اختصاصی نواحی ژنومی از گونه هدف و دیگر گونه‌های قارچی و نیاز به استفاده از غلظت بالای آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز می‌باشد که هزینه‌بر است. از آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر ژن‌های تیپ آمیزشی

1. Degenerate primers

به‌عنوان نشان‌گر مولکولی برای شناسایی اختصاصی و غربال‌کردن آلل‌های تیپ آمیزشی به‌صورت توام نیز استفاده گردیده است که منجر به صرفه‌جویی در وقت و هزینه می‌گردد (ور و همکاران 2007).

تاکنون مطالعات محدودی روی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این گونه قارچی در ایران انجام شده است و اطلاعات اندکی درباره پتانسیل ایجاد مرحله جنسی و اهمیت تکثیر جنسی در چرخه زندگی این گونه قارچی به ظاهر غیرجنسی وجود دارد. بنابراین در پژوهش حاضر به‌عنوان اولین قدم در بررسی امکان وقوع مرحله جنسی این قارچ در ایران، آغازگرهای اختصاصی برای تعیین تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های ایرانی قارچ *C. beticola* طراحی، شرایط واکنش برای انجام یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه[1] بهینه‌سازی و توزیع تیپ‌های آمیزشی تعیین گردید. در ضمن امکان القای مرحله جنسی این قارچ در شرایط آزمایشگاه و گلخانه با استفاده از روش‌های مختلف بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی قارچ‌ها

نمونه‌برداری از برگ‌های دارای علایم لکه‌برگی سرکوسپورایی در گیاهان چغندرقند طی ماه‌های شهریور و مهر سال 1388 در منطقه مغان (استان اردبیل) انجام شد. لکه‌های برگی در زیر بینوکولر مورد بررسی قرار گرفتند و پس از تایید حضور قارچ *C. beticola*، کشت‌های تک‌اسپور مطابق روش توضیح داده شده توسط ارزنلو و بخشی (2011) ایجاد شدند. به این صورت که تشتک پتری حاوی محیط کشت عصاره مخمر آگار (MEA) اسیدی شده، به صورت مورب قرار گرفته و حدود 10 میلی‌لیتر آب مقطر استریل در یک گوشه محیط کشت اضافه شد. سپس بافت‌های برگی در زیر بینوکولر بررسی و با استفاده از یک سوزن تیز و استریل توده کنیدیوم و کنیدیوفور با دقت از سطح لکه برگ خراش داده شد و سپس در داخل آب اضافه شده به تشتک پتری قرار گرفته و کاملا به‌هم زده شد تا کنیدیوم ها آزاد و پخش شوند. تشتک پتری به حالت مورب به مدت یک شب نگهداری و آب اضافی تشتک‌های پتری خالی شده و در زیر بینوکولر مورد بررسی قرار گرفت. سپس کنیدیوم‌های جوانه‌زده به تشتک‌های حاوی محیط کشت انتقال یافته و در اتاقک رشد با درجه حرارت 25°C در تاریکی نگهداری شدند. در ضمن پنج جدایه تستر (با تیپ آمیزشی مشخص) از موسسه قارچ شناسی فرهنگستان علوم کشور هلند، واقع در شهر اوترخت تهیه گردید.

استخراج DNA

برای این منظور، جدایه‌ها بر روی محیط کشت MEA به مدت10-8 روز در دمای 25°C در تاریکی رشد داده شدند و پس از رشد کافی، برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. برای استخراج DNA از بافت قارچ، از روش مولر و همکاران (1992) استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استحصالی به روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

لیست آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین تیپ‌های آمیزشی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

برای تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌های گونه *C. beticola* از جفت آغازگر CercosporaMat1f و CercosporaMat1r که بر اساس ناحیه حفاظت شده ژن MAT1-1 و جفت آغازگر CercosporaMat2f و CercosporaMat2r که بر اساس ناحیه حفاظت‌شده ژن MAT1-2 توسط خرونوالد و همکاران (2006) برای تکثیر بخش‌هایی از ژن‌های تیپ آمیزشی در *Cercospora* طراحی شده بودند، استفاده گردید. آغازگر CercosporaMat2f در دو نوکلئوتید به‌صورت هرز طراحی گردیده بود (جدول 1).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ابتدا به صورت مجزا با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده برای تکثیر ناحیه تیپ آمیزشی انجام گردید. کلیه واکنش‌ها در حجم نهایی 12/5 میکرولیتر و در غلظت‌های استاندارد از اجزای واکنش صورت گرفت. ابتدا بافر واکنش به‌صورت

1. Multiplex PCR

مخلوط اصلی[1] تهیه و پس از مخلوط کردن، 11/5 میکرولیتر به هر لوله افزوده شد. سپس پنج الی 10 نانوگرم DNA ژنومی داخل لوله‌های 200 میکرولیتری PCR افزوده شد تا حجم نهایی در هر لوله به 12/5 میکرولیتر برسد. پس از مخلوط کردن مخلوط واکنش و DNA الگو، لوله‌ها به داخل دستگاه ترموسایکلر انتقال داده شدند و چرخه‌های حرارتی مورد نظر برای تکثیر قطعات هدف اعمال گردید.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای مبتنی بر ژن MAT1-1

آغازگرهای CercosporaMat1f و CercosporaMat1r برای تکثیر ناحیه تیپ آمیزشی جدایه‌های MAT1-1 مورد استفاده قرار گرفتند. مخلوط واکنش دارای 10-5 نانوگرم DNA ژنومی، بافر واکنش با غلظت نهایی ×1،40 میکرومولار dNTPs، 0/5 پیکومول از هر آغازگر، 1/5 میلی مولار $MgCl_2$ و 0/05 واحد آنزیم Taq Polymerase بود. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشت-سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در 95°C، 40 چرخه واسرشت سازی در 94°C به مدت20 ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 52°C به مدت 30 ثانیه و بسط در 72°C به مدت 30 ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در 72°C بود. در ضمن این واکنش‌ها در چرخه حرارتی با دمای اتصال آغازگر 60°C نیز آزموده شدند.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای مبتنی بر ژن MAT1-2

آغازگرهای CercosporaMat2f و CercosporaMat2r برای تکثیر ناحیه تیپ آمیزشی جدایه‌های MAT1-2 مورد استفاده قرار گرفتند. مخلوط واکنش و شرایط واکنش همانند شرایط مورد استفاده برای تکثیر MAT1-1 بود. در ضمن به دلیل هرز بودن آغازگر مستقیم، واکنش با غلظت چهار پیکومول این آغازگرها نیز انجام گردید. این واکنش‌ها نیز در چرخه حرارتی با دمای اتصال آغازگر 60°C آزموده شدند.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه

آغازگر مستقیم و معکوس مبتنی بر ژن MAT1-1 (CercosporaMat1f / CercosporaMat1r) همراه با آغازگر مستقیم و معکوس مبتنی بر ژن MAT1-2 (CercosporaMat2r / CercosporaMat2f) در یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه برای تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌های *C. beticola* به صورت همزمان به‌کار رفتند. هر چهار آغازگر با غلظت برابر استفاده شدند. مخلوط واکنش دارای پنج الی 10 نانوگرم DNA ژنومی، بافر واکنش با غلظت نهایی ×1،40 میکرومولار dNTPs، چهار پیکومول از هر آغازگر، 1/5 میلی‌مولار $MgCl_2$ و 0/05 واحد آنزیم Taq Polymerase بود.

طراحی آغازگرهای اختصاصی

برای طراحی آغازگر اختصاصی مستقیم جهت تکثیر بخشی از ایدیومورف MAT1-2، توالی نوکلئوتیدی این ایدیومورف از بانک ژن دریافت شد و با استفاده از نرم افزارMega5 مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن توالی نوکلئوتیدی ایدیومورف MAT1-2 از دیگر گروه‌های قارچی با درصد همولوژی بالا از بانک ژن دریافت و رج‌بندی با استفاده از گزینه Clustal W نرم افزار Mega5 انجام شد. موقعیت آغازگر هرز روی توالی MAT1-2 گونه *C. beticola* مشخص و آغازگر اختصاصی مستقیم طراحی گردید (جدول 1).

خصوصیات آغازگر طراحی شده (از نظر دمای ذوب، طول آغازگر و محتوی GC) با استفاده از نرم افزار برخط BioMath - Tm Calculations for Oligos - Promega ارزیابی گردید.

1. Master mix

جدول 1- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های تیپ آمیزشی و توالی نوکلئوتیدی آن‌ها

آغازگر	توالی (5`→3`)	توضیح
Cercospora Mat1f	CTTGCAGTGAGGACATGG	مستقیم
Cercospora Mat1r	GAGGCCATGGTGAGTGAG	معکوس
Cercospora Mat2f	GATNTACCNTCTCGACCTC	مستقیم
Cercospora Mat2r	CTGTGGAGCAGTGGTCTC	معکوس
Cercospora Mat2f-beticola	GATCTACCGTCTCGACCTC	طراحی شده در این تحقیق

تعیین تیپ آمیزشی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

جفت آغازگر مبتنی بر ژن MAT1-1 (CercosporaMat1f /CercosporaMat1r) همراه با جفت آغازگر مبتنی بر ژن MAT1-2 [CercosporaMat2f- beticola و CercosporaMat2r] در یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه برای تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌های *C. beticola* به صورت هم‌زمان به‌کار رفتند. مخلوط واکنش 5-10 نانوگرم DNA ژنومی، بافر واکنش ×1،40 میکرومولار dNTPs، 0/5 پیکومول از هر آغازگر، 1/5 میلی‌مولار $MgCl_2$ و 0/05 واحد آنزیم Taq Polymerase را شامل می‌شد.

چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در 95°C، 40 چرخه واسرشت سازی در 94°C به مدت20 ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 52°C به مدت 30 ثانیه و بسط در 72°C به مدت 30 ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در 72°C بود.

مشاهده محصولات PCR روی ژل آگارز

قطعات تکثیر یافته روی ژل آگارز 0/8درصد (وزن / حجم) حاوی 0/1 میکروگرم بر میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید در بافر TAE ×1 با اعمال ولتاژ90 به مدت یک ساعت الکتروفورز و زیر نورUV مشاهده شدند.

تلاش برای القای تولیدمثل جنسی

الف- روش استفاده از قطعات برگ چغندرقند

جدایه‌های قارچی تستر با تیپ آمیزشی مخالف روی محیط کشت آب-آگار کشت شدند. قطعات برگ چغندرقند در اتوکلاو استریل و در حد فاصل بین جدایه-های قارچی مطابق شکل 1 قرار داده شدند. درب تشتک-های پتری با پارافیلم محکم گردید تا رطوبت داخل آن حفظ شود. پتری‌ها به مدت یک ماه در 25°C و در تاریکی قرار داده شدند. پس از این مدت نمونه‌ها برای تشکیل پریتیس کاذب در زیر بینوکولر بررسی گردیدند.

شکل 1- روش استفاده از قطعات برگ چغندرقند در القای مرحله جنسی

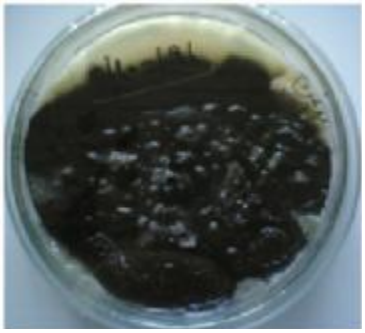
ب- روش استفاده از قارچکش

جدایه‌های قارچی تستر با تیپ آمیزشی مخالف در مقابل هم روی محیط کشت MEA کشت شدند. قارچکش کاربندازیم به غلظت چهار پی‌پی‌ام در100 میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید. پس از غوطه‌ور کردن قطعات کاغذ صافی استریل در داخل محلول قارچکش، در هر پتری دو قطعه کاغذ صافی آغشته به قارچکش مطابق شکل 2، در حاشیه پتری به منظور ایجاد استرس قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت یک ماه در 25°C و در تاریکی قرار گرفتند. پس از این مدت نمونه‌ها به منظور تشکیل مرحله جنسی در زیر بینوکولر بررسی شدند.

شکل 2-روش استفاده از قارچ‌کش در القای مرحله جنسی

ج- روش استفاده از لینولئیک اسید

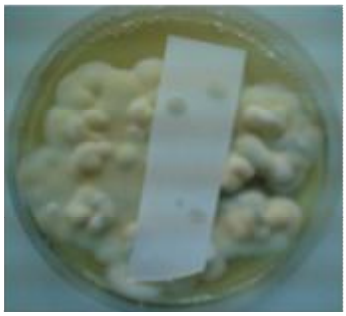
برای این منظور، قرص‌های آگار کلنی رشدکرده روی محیط MEA از جدایه‌های قارچی تستر با تیپ آمیزشی مخالف با همدیگر مخلوط و روی محیط کشت MEA پخش شدند. پس از سه روز، حدود 10 میلی‌لیتر روغن آفتاب‌گردان که حاوی لینولئیک اسید می‌باشد، استریل شده و بر روی میسلیوم‌های قارچی رشد کرده اضافه و به خوبی پخش گردید (شکل 3). تشتک‌های پتری در 25°C و در تاریکی قرار گرفتند. پس از یک ماه جدایه‌ها به منظور تشکیل مرحله جنسی بررسی شدند.



شکل 3- روش استفاده از لینولئیک اسید در القای مرحله جنسی

د- روش استفاده از کاغذ صافی

کشت‌های قارچی مشابه روش ج تهیه شدند. پس از رشد، یک قطعه کاغذ صافی استریل روی محیط کشت قرار گرفت (شکل 4). تشتک‌های پتری در 25°C و در تاریکی قرار گرفتند. پس از یک ماه جدایه‌ها به منظور تشکیل مرحله جنسی بررسی گردیدند.



شکل 4- روش استفاده از کاغذ صافی در القای مرحله جنسی

ه- روش القای مرحله جنسی در شرایط گلخانه

گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های دو ماهه چغندرقند رشد یافته درشرایط گلخانه، با جدایه‌های تستر با تیپ آمیزشی گونه مخالف *C. beticola* مایه‌زنی شدند. برای این منظور حجم مساوی از میسلیوم جدایه‌های قارچی با تیپ آمیزشی مخالف در داخل آب مقطر استریل باهم مخلوط (میسلیوم جمع آوری شده از سطح سه سانتی-متر مربع محیط کشت) و بدون ایجاد زخم بر روی برگ-ها پاشیده شد. به‌منظور تامین رطوبت مورد نیاز برای ایجاد آلودگی، گلدان‌ها با نایلون پوشانده شدند. تیمار شاهد نیز که با آب مقطر استریل مایه‌زنی شده بود، با نایلون پوشانده شد (شکل 5). بیماری‌زایی این جدایه‌ها و علایم ایجاد شده پس از 10-8 روز بررسی گردید. لکه‌ها در زیر بینوکولر مشاهده و مشخصات جدایه‌های قارچی در زیر میکروسکوپ مطالعه شد. گلدان‌ها به مدت پنج ماه در گلخانه نگهداری و امکان تشکیل پریتیس کاذب بررسی گردید.

شکل 5- گیاهان مایه‌زنی‌شده با جدایه‌های تستر با تیپ آمیزشی مخالف

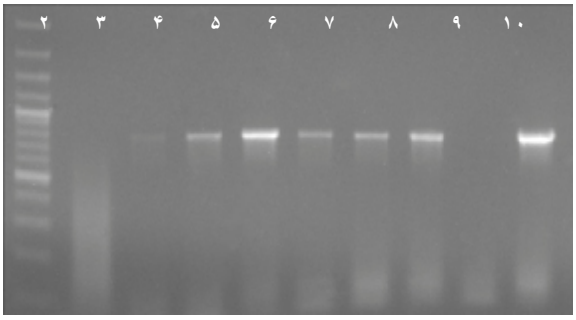
و- بررسی بقایای گیاهی و خاک

به‌منظور مطالعه امکان تشکیل مرحله جنسی قارچ روی بقایای چغندرقند و خاک، حجم کوچکی (حدود 15 تا 20 گرم) از بقایا و خاک آلوده در درب ظروف پتری حاوی محیط کشت MEA قرار داده شد و ظروف پتری به‌صورت معکوس روی درب قرار گرفتند. سطح محیط کشت به‌صورت روزانه و به‌مدت یک هفته در زیر بینوکلر جهت مشاهده آسکوسپورهای پرتاب‌شده و جوانه‌زده بررسی گردید.

نتایج

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای مبتنی بر ایدیومورف MAT1-1

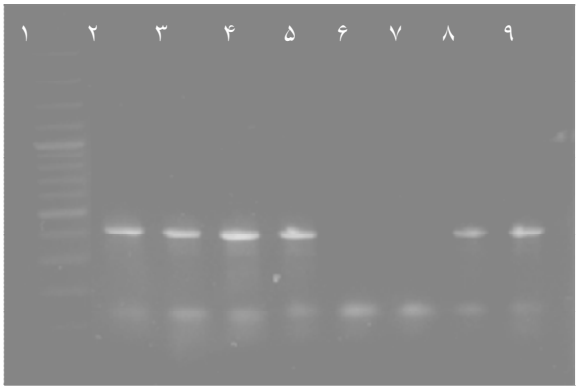
نتایج حاصل از تکثیر DNA جدایه‌های قارچی با استفاده از این جفت آغازگر نشان داد که این آغازگرها قادرند با غلظت 0/5 پیکومول در دمای اتصال آغازگر 52°C یک قطعه 800 bp را در جدایه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-1 تکثیر کنند. با رساندن دما به 60°C نیز تغییری در عملکرد این آغازگرها مشاهده نشد (شکل 6).



شکل 6- الگوی باندهای تکثیر شده با آغازگرهای MAT1-1F/R در دمای اتصال آغازگر 60°C در ژل آگارز 0/8%. چاهک1- نشانگرDNA ladder 100 bp؛ چاهک2- نمونه با تیپ آمیزشی MAT1-2؛ چاهک‌های 3، 4، 5، 6، 7 و 8- نمونه‌های با تیپ آمیزشی Mat1-1؛ چاهک9- نمونه CPC19190 شاهد منفی با تیپ آمیزشی MAT1-2؛ چاهک10- نمونه CPC12191 شاهد مثبت با تیپ آمیزشی MAT1-1

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای مبتنی بر ایدیومورف MAT1-2

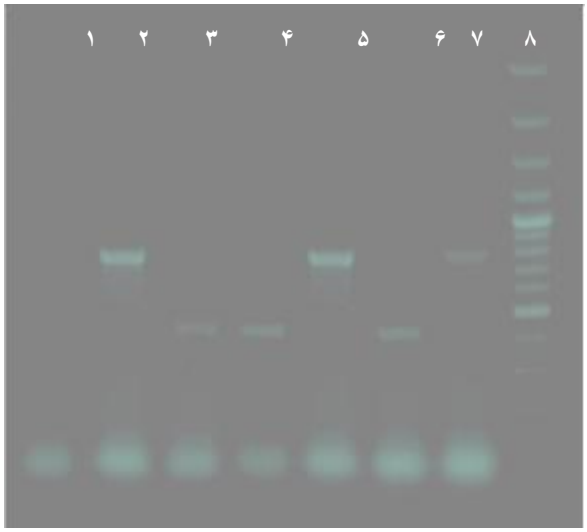
نتایج بررسی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز نشان داد که این آغازگرها برخلاف آغازگرهای CercosporaMat1f و CercosporaMat1r با غلظت 0/5 پیکومول در دمای اتصال آغازگر 52°C تعداد زیادی باند غیر اختصاصی در تمامی جدایه‌ها تکثیر کردند. با افزایش دما به 60°C با همین غلظت قادر به تکثیر هیچ باندی در جدایه‌های با تیپ آمیزشیMAT1-2 نبودند (نتایج نشان داده نشده است). به‌دلیل هرزبودن این آغازگرها، غلظت مورد استفاده به چهار پیکومول رسانده شد. با افزایش غلظت نهایی آغازگر به چهار پیکومول در مخلوط واکنش، قطعه مورد نظر440 جفت بازی فقط در جدایه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-2 به صورت اختصاصی تکثیر یافتند (شکل 7). در ضمن کاهش دمای اتصال از 60°C به 52°C منجر به تکثیر تعداد زیادی باند غیر اختصاصی گردید.



شکل 7- الگوی باندهای تکثیر شده با آغازگرهای MAT1-2F/Rدر دمای اتصال آغازگر 60°C با غلظت چهار پیکومول آغازگر در ژل آگارز 0/8%. چاهک1-نشانگر DNA ladder 100 bp؛ چاهک2- نمونه CPC19190 نمونه شاهد مثبت با تیپ آمیزشی MAT1-2؛ چاهک‌های 3،4،5،8 و9-نمونه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-2؛ چاهک‌های 6و7- نمونه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-1

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه با استفاده از آغازگرهای هرز و آغازگر اختصاصی طراحی شده در این تحقیق

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه در هر دو حالت استفاده از آغازگرهای هرز و اختصاصی نشان داد که این آغازگرها قادر هستند به دقت تیپ‌های آمیزشی این قارچ را از همدیگر تفکیک نمایند. در هر جدایه تنها یک قطعه 800 یا قطعه 440 جفت بازی به ترتیب از ژن‌های MAT1-1 و MAT1-2 تکثیر شدند و در هیچ‌کدام از جدایه‌ها تکثیر دو باند و یا عدم تشکیل باند مشاهده نگردید که با هتروتالیک بودن *C. beticola* هم-خوانی داشت. با این‌حال، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مقرون به صرفه‌تر بوده و میزان آغازگر مورد استفاده به یک هشتم کاهش یافت، در ضمن باندهای غیر اختصاصی در دمای اتصال آغازگر52°C تشکیل نگردید (شکل 8).



شکل 8- الگوی باندهای تکثیرشده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در PCR چندگانه در دمای اتصال آغازگر 52°C با غلظت 0/5 پیکومول آغازگر در ژل آگارز 0/8درصد چاهک 1- شاهد منفی (master mix)؛ چاهک‌های 2و5- نمونه‌های با تیپ-آمیزشی MAT1-1؛ چاهک‌های 3و4– نمونه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-2؛ چاهک 6- نمونه CPC19190 شاهد مثبت با تیپ آمیزشی MAT1-2. چاهک 7- نمونه CPC19191 شاهد مثبت با تیپ آمیزشی MAT1-1؛ چاهک 8- نشانگر DNA 100 bp ladder

نتایج بررسی توزیع تیپ‌های آمیزشی

در مجموع از 70 جدایه قارچی به‌دست آمده، 52 جدایه تیپ آمیزشی MAT1-1 و 18 جدایه تیپ آمیزشی MAT1-2 داشتند. بنابراین توزیع تیپ‌های آمیزشی در این ناحیه از میزان مساوی برخوردار نبوده و جدایه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-1 از فراوانی بیشتری برخوردار بودند.

نتایج القای مرحله جنسی

در این بررسی شش روش برای القای مرحله جنسی بین جدایه‌های تستر گونه *C. beticola* مورد استفاده قرار گرفت که هیچ‌کدام از این‌ها در القای مرحله جنسی موفقیت‌آمیز نبودند و ساختارهای جنسی مشاهده نگردیدند. مایه‌زنی گیاه‌چه‌های دوماهه چغندرقند با میسلیوم جدایه‌های قارچی علایم تیپیک بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی را روی برگ‌ها بعد از حدود 10 روز ایجاد نمود. با این وجود پس از پنج ماه نگهداری گیاهان در شرایط گلخانه، ساختار جنسی در محل لکه‌ها مشاهده نگردید. نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از سوسپانسیون میسلیوم در آزمون‌های بیماری‌زایی این قارچ عملی می‌باشد. بررسی علایم و نشانه‌های بیماری موفقیت‌آمیز بودن این روش در بیماری‌زایی قارچ روی چغندرقند را در شرایط گلخانه‌ای نشان داد. قارچ *C. beticola* مانند دیگر قارچ‌های سرکوسپوروئید روی محیط‌های کشت مصنوعی به سختی اسپورزایی می‌کند. بنابراین با بهینه‌سازی روش فوق امکان استفاده از سوسپانسیون میسلیوم در اجرای آزمون‌های بیماری‌زایی این قارچ فراهم خواهد گردید.

بحث

در این بررسی تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های گونه *C. beticola* از طریق تغییرات در روش ارایه‌شده توسط خرونوالد و همکاران (2006) با استفاده از فناوری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه تعیین گردید. آن‌ها برای تعیین تیپ‌های آمیزشی گونه *C. beticola* دو جفت آغازگر طراحی کردند که آغازگر مستقیم طراحی‌شده برای تیپ آمیزشی MAT1-2 (= CercosporaMat2f

GATNTACCNTCTCGACCTC) در دو موقعیت نوکلئوتید هرز داشت. در این بررسی ابتدا آغازگرهای مورد استفاده توسط خرونوالد و همکاران (2006) در واکنش‌های مجزا و استفاده از غلظت‌های متفاوت آغازگر و با اعمال چرخه‌های حرارتی متفاوت برای تکثیر تیپ-های آمیزشی مورد آزمایش قرار گرفتند. جفت آغازگر Mat1-1 (CercosporaMat1f / CercosporaMat1r) در غلظت نهایی 0/5 پیکومول و دمای اتصال 52°C و 60°C به‌صورت موفقیت‌آمیز قطعه 800 جفت بازی را به‌حالت اختصاصی از جدایه‌های Mat1-1 تکثیر نمودند. در حالی-که جفت آغازگر MAT1-2 (CercosporaMat2f / CercosporaMat2r) در غلظت نهایی 0/5 پیکومول و در دماهای اتصال 52°C و 60°C قادر به تکثیر اختصاصی از DNA جدایه‌های Mat1-2 نبودند و تنها موقع افزایش غلظت نهایی آغازگر به میزان چهار پیکومول و اعمال دمای اتصال 60°C قطعه 400 جفت بازی را به صورت اختصاصی از جدایه‌های تیپ آمیزشی MAT1-2 تکثیر نمودند (شکل 7). با طراحی آغازگر جدید CercosporaMat2f-beticola (GATCTACCGTCTCGACCTC)، به جای آغازگر مستقیم هرز برای تکثیر تیپ آمیزشی MAT1-2، امکان تکثیر قطعه موردنظر با غلظت نهایی آغازگر 0/5 پیکومول و در دمای اتصال 52°C فراهم گردید (شکل 8). هر دو جفت آغازگر تیپ آمیزشی به صورت اختصاصی بخش‌هایی از ژن‌های تیپ آمیزشی را از ایدیومورف مربوط در دمای اتصال 52°C تکثیر نمودند. استفاده هم‌زمان از دو جفت آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه به صورت موفقیت آمیز قطعات DNA هدف را از هریک از تیپ‌های آمیزشی تکثیر نمودند. دمای اتصال آغازگرها در واکنش، 52°C و غلظت دو جفت آغازگر به صورت مساوی و 0/5پیکو مول در نظر گرفته شد. طراحی آغازگر اختصاصی مستقیم برای MAT1-2 در این تحقیق امکان کاهش درجه حرارت اتصال از 60°C به 52°C را فراهم آورد. به طور کلی استفاده از آغازگرهای هرز در دماهای اتصال پایین، باعث اتصال غیراختصاصی آغازگر به DNA الگو شده و محصول غیراختصاصی ایجاد گردید. طراحی آغازگر جدید امکان تکثیر اختصاصی DNA هدف در دمای اتصال پایین بدون کاهش در عملکرد اختصاصی آغازگرها را امکان پذیر ساخت. در این تحقیق هم‌چنین غلظت آغازگرهای مورد استفاده در واکنش چندگانه برای MAT1-2 از چهار به 0/5 پیکومول کاهش داده شد. کاهش غلظت آغازگر خللی در تکثیر اختصاصی DNA هدف ایجاد نکرد، در حالی‌که موقع استفاده از آغازگرهای قبلی، جفت آغازگر (CercosporaMat2f / CercosporaMat2r) در غلظت‌های نهایی 0/5 پیکومول قادر به تکثیر قطعه مورد نظرنبودند. با توجه به این‌که غلظت نهایی الیگونوکلئوتیدهای مختلف در مخلوط پایه آغازگر هرز پایین می‌باشد، امکان تکثیر قطعه هدف موقع استفاده از غلظت‌های کم آغازگر فراهم نمی شود. به طورکلی بهینه‌سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه برای تعیین تیپ‌های سازگاری جنسی در جمعیت‌های گونه *C. beticola* با موفقیت انجام گردید و استفاده از این ترکیب آغازگرها و شرایط واکنش برای غربال جمعیت‌های این گونه برای تیپ‌های آمیزشی در مطالعات بعدی قابل توصیه می‌باشد که در مقایسه با روش ارایه شده توسط خرونوالد و همکاران (2006) مقرون به صرفه بوده و از عملکرد بالایی در دمای اتصال پایین برخوردار می‌باشد.

تمامی تلاش‌های صورت گرفته برای القای مرحله جنسی *C. beticola* با استفاده از جدایه های تستر این گونه در این تحقیق ناموفق بود. تا کنون هیچ تلئومورفی برای *C. beticola* شناسایی نشده است و ساختار جمعیتی این بیمارگر کلونال تلقی می‌شود. با این‌حال سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های به‌دست آمده از یک زخم در یک گیاه چغندرقند در ایتالیا (مورتی و همکاران 2004، 2006) مشاهده شده است. خرونوالد و همکاران (2008) نیز تنوع ژنتیکی بالایی را در جمعیت-های این گونه بین کشورهای مختلف مشاهده کردند. جمعیت‌هایی که به‌طور منظم تولیدمثل جنسی دارند، بایستی ژنوتیپ‌های بیشتری داشته باشند که باعث سطوح بالای تنوع ژنتیکی در مقایسه با جمعیت‌هایی که تنها تولیدمثل غیرجنسی دارند، می‌شود (میلگروم 1996). بنابراین میزان تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده در *C. beticola*

برای یک میکروارگانیسم با تولیدمثل غیرجنسی بسیار زیاد است.

در مورد وقوع یا اهمیت تولیدمثل جنسی در مورد گونه‌های به ظاهر غیرجنسی *Cercospora* از جمله *C. beticola* اطلاعات کمی وجود دارد. در طی مطالعات قبلی مشخص شده است که گونه *C. beticola* یک قارچ هتروتالیک می‌باشد، در نتیجه برای وقوع تولیدمثل جنسی در *C. beticola* بایستی هر دو ژن تیپ آمیزشی در داخل جمعیت حضور داشته باشند. در مطالعات خرونوالد و همکاران (2006) در نمونه‌برداری از قاره-های مختلف، توزیع برابر از تیپ‌های آمیزشی مشاهده شده بود. در صورتی‌که تولیدمثل جنسی در جمعیت رخ دهد، نرخ تقریبی 1:1 بین تیپ‌های آمیزشی می‌تواند با استفاده از انتخاب وابسته به فراوانی، یک نوع از انتخاب تعادلی برقرار شود (ریچمن 2000). به‌علاوه، غیرمحتمل به‌نظر می‌رسد که هر دو ژن تیپ آمیزشی با فراوانی برابر در میان جمعیت مزرعه‌ای به‌دست آیند، مگر اینکه این ژن‌ها کارا باشند یعنی این‌که تولیدمثل جنسی رخ دهد (گودوین و همکاران 2003). بنابراین احتمال دارد جمعیت‌های *C. beticola* که دارای هر دو آلل تیپ آمیزشی با فراوانی برابر هستند، قادر به تولیدمثل جنسی باشند، اما تلئومورف آن‌ها به‌آسانی در طبیعت مشاهده نمی‌شود. فرضیه‌ای که در این خصوص مطرح می‌باشد، تشکیل مرحله جنسی به صورت پنهان[1] در جمعیت‌های این قارچ می باشد (خرونوالد و همکاران 2007). مطابق فرضیه فوق امکان تشکیل چرخه جنسی این گونه روی میزبان‌های ثانوی وجود دارد که منجر به توزیع برابر تیپ‌های آمیزشی در داخل جمعیت‌ها گردیده است. با این‌حال، نتایج این تحقیق نشان داد تیپ‌های آمیزشی در منطقه مغان از توزیع مساوی برخوردار نبوده و از نرخ 1:1 انحراف دارد. توزیع نابرابر تیپ آمیزشی با عدم مشاهده مرحله جنسی این قارچ هم‌خوانی دارد. با توجه به شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب منطقه مغان که برای رشد و توسعه *C. beticola* مناسب بوده و کشت مداوم چغندرقند در این منطقه، شرایط برای افزایش جمعیت قارچ از طریق تولیدمثل غیرجنسی مساعد بوده و قارچ عامل بیماری وارد چرخه تولیدمثل جنسی نمی-گردد. عدم تشکیل چرخه جنسی و به دنبال آن انتخاب وابسته به تیپ آمیزشی (به‌عنوان مثال تفاوت در پرآزاری بین جدایه‌های با تیپ آمیزشی مخالف) در طول زمان منجر به تغییر فراوانی تیپ‌های آمیزشی در جمعیت‌های این گونه گردیده است.

در این بررسی از روش‌های متعددی برای القای مرحله جنسی بین جدایه‌های با تیپ آمیزشی مخالف استفاده گردید. تاکنون مطالعه جامعی در خصوص امکان القای مرحله جنسی در این گونه قارچی صورت نگرفته بود. به‌طور رایج در شرایط طبیعی وقتی گونه-های قارچی با فاکتورهای محیطی تهدید کننده رشد مواجه می‌شوند، وارد فاز تولید مثل جنسی شده و از این طریق بقای خود را به نسل های بعدی تضمین می‌کنند. باروری روی محیط کشت گاهی می‌تواند با قرار دادن یک قطعه از کاغذ صافی واتمن استریل روی بخشی از محیط کشت قبل از اتوکلاو کردن و یا قراردادن یک یا دو قطره اسید لینولئیک بر روی کاغذ افزایش یابد (دایر و همکاران 1993، لزلی و سامرل 2006، ارزنلو و همکاران 2010). در این بررسی به‌جای اسید لینولئیک خالص از روغن آفتابگردان که حاوی مقادیر قابل توجهی اسید لینولئیک می باشد استفاده گردید، ولی نتایج آزمایش منفی بود.

ایجاد استرس با استفاده از قارچ‌کش در القای مرحله جنسی برخی از قارچ‌ها موثر شناخته شده است. ارزنلو و همکاران (2000) از طریق قرار دادن دیسک‌های کاغذ صافی آغشته به قارچ‌کش کاربندازیم (شرکت بایر، آلمان) روی محیط کشت در مسیر رشد جدایه‌های *Rhizoctonia solani* جداسازی شده از چغندرقند، مرحله جنسی این قارچ را برای اولین بار در ایران القا و گزارش نمودند. نتایج استفاده از قارچ‌کش برای القای مرحله جنسی *C. beticola* موفقیتی به‌همراه نداشت.

مایه‌زنی میزبان گیاهی جو با جدایه‌های با تیپ آمیزشی مخالف در شرایط گلخانه‌ای برای القای مرحله جنسی گونه *Septoria passerinii* با موفقیت همراه بوده است (ور و همکاران 2007). در بررسی حاضر گیاهچه-

[1] Clandestine sexual reproduction

هـــای دوماهـــه چغندرقنـــد در شـــرایط گلخانـــه بـــا سوسپانسیون میسلیوم جدایه‌های با تیپ سازگار جنسی مخالف قارچ *C. beticola* مایه زنی شدند. علایم تیپیک لکه برگی حدود 10 روز روی برگ‌هـا مشـاهده گردیـد ولـی حتـی تـا پـس از پـنج مـاه نگهـداری گیاهـان در شـرایط گلخانه، مرحله جنسی مشاهده نگردید.

بـه طـور کلـی عـدم تشـکیل مرحلـه جنسـی قـارچ *C. betciola* در شـرایط طبیعـی و آزمایشـگاهی نـامعقول می‌باشد. زیرا چنان‌که نتـایج مطالعـات قبلـی نشـان داده است قارچ عامل بیماری هتروتال بوده و در داخـل اغلـب جمعیت‌های بررسی شده، تیـپ‌هـای آمیزشـی از توزیـع یکسان برخوردار می باشند (خرونوالد و همکاران 2007) و از طرف دیگر سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی و فنـوتیپی در بین جمعیت‌های مختلف این قارچ گزارش شـده اسـت (مورتی و همکاران 2004، ویلند و کخ 2004، خرونوالد و همکاران 2008). این شواهد فرضیه وجود چرخه جنسی فعال در داخل جمعیت‌های ایـن گونـه را تقویـت مـی کنـد (خرونوالـد و همکـاران 2008). گونـه *C. beticola* از نظـر تبارزایی با جنس تلئومورف *Mycosphaerella* مرتبط می-باشد. با این حال مرحله جنسی بـرای تعـداد معـدودی از گونه‌های جنس *Cercospora* گزارش شده است (بخشی و همکاران 2012) و اغلب گونـه‌هـای ایـن جـنس از طریـق تولید کنیدی تکثیر می یابند.

هر چند حضور ایدیومورف‌هـای تیـپ‌هـای آمیزشـی برای تولیدمثل جنسی در قـارچ‌هـای هتروتـال ضـروری می‌باشد ولی شاید برای تکمیل موفق چرخه جنسی کافی نباشد. چرخه تولیدمثل جنسی فوق‌العاده پیچیده می‌باشد و ژن‌های متعددی در تولیدمثل جنسی دخیل هستند. هـر نوع نقصان در ژن‌های دخیل در چرخه تولیدمثل جنسـی می‌تواند منجـر بـه اخـتلال در چرخـه تولیـدمثل جنسـی قـارچ‌هـا شـود (تورگئـون و همکـاران 1993، کـوپین و همکاران 1997، تورگئون 1998، آری و همکـاران 2000، دوباکی و تورگئون 2006).

نتایج تحقیق حاضـر بـه‌عنـوان نقطـه شـروعی بـرای تحقیقات بعدی در خصوص غربال تیپ‌های آمیزشـی در داخل جمعیت‌های مختلف این گونه با استفاده از واکـنش زنجیره‌ای چندگانه به‌حساب می‌آید و از طرف دیگر نیـاز به تلاش‌های جدید برای فهم چرخه زنـدگی ایـن قـارچ و سازوکارهای دخیل در تنوع ژنتیکـی جمعیـت‌هـای آن را نشان می‌دهد.

منابع

اعتباریان ح ر، 1376. بیماری‌های سبزی و صیفی و روش-های مبارزه با آن‌ها. چاپ اول، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.

Bakhshi M, Arzanlou M and Babai-Ahari A, 2012. Comprehensive check list of Cercosporoid fungi from Iran. Plant Pathology and Quarantines 2: 44-55.

Coppin E, Debuchy R, Arnaise S and Picard M, 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61: 411-428.

Debuchy R and Turgeon BG, 2006. Mating-type structure, evolution, and function in Euascomycetes. pp. 293-323. In: The Mycota Kues I U and Fischer R (eds). Springer-Verlag.

Dyer PS, Ingram DS and Johnstone K, 1993. Evidence for the involvement of linoleic-acid and other endogenous lipid factors in perithecial development of *Nectria haematococca* mating population. Mycological Research 97: 485-496.

Arie T, Kaneko I, Yoshida T, Noguchi M, Nomura Y and Yamaguchi I, 2000. Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. Molecular Plant Microbe Interactions 13: 1330-1339.

Arzanlou M and Bakhshi M, 2011. *Microcyclospora rumicis*, a new species on *Rumex crispus* from Iran. Mycotaxon 118: 181-186.

Arzanlou M, Crous PW and Zwiers LH, 2010. Evolutionary dynamics of mating-type loci of *Mycosphaerella* spp. occurring on banana. Eukaryotic Cell 9: 164-172.

Arzanlou M, Hedjaroude GH and Okhovat M, 2000. First report for occurrence of teleomorph of *Rhizoctonia solani* (AG-4) sugar beet isolate in Iran. Iranian Journal of Phytopathology 35: 179-180 (in Persian with English Abstract).

Goodwin SB, Waalwijk C, Kema GHJ, Cavaletto JR and Zhang G, 2003. Cloning and analysis of the mating-type idiomorphs from the barley pathogen *Septoria passerinii*. Molecular Genetics and Genomics 269: 1-12.

Groenwald M, Groenwald JZ, Harrington TC, Ablen ECA and Crous PW, 2006. Mating type gene analysis in apparently asexual *Cercospora* species is suggestive of cryptic sex. Fungal Genetics and Biology 43: 813-825.

Groenewald M, Groenewald JZ, Linde CC and Crous PW, 2007. Development of polymorphic microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for *Cercospora beticola*. Molecular Ecology 7: 890-892.

Groenewald M, Linde CC, Groenewald JZ, Crous PW, 2008. Indirect evidence for sexual reproduction in *Cercospora beticola* populations from sugar beet. Plant Pathology 57: 25-32.

Halliday CL, Bui T, Krockenberger M, Malik R, Ellis DH and Carter DA, 1999. Presence of alpha and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. Journal of Clinical Microbiology 37: 2920-2926.

Khan J, del Rio LE, Nelson R, Rivera–Varas V, Secor GA and Khan MFR, 2008. Survival, dispersal, and primary infection site for *Cercospora beticola* in sugarbeet. Plant Disease 92: 741-745.

Khan J, Qi A and Khan MFR, 2009. Fluctuations in number of *Cercospora beticola* conidia in relationship to environment and disease severity in sugarbeet. Phytopathology 99: 798-801.

Lartey RT, Caesar–TonThat TC, Shelver WL, Sol, NI and Bergman JW, 2005. Safflower: A new host of *Cercospora beticola*. Plant Disease 89: 797-801.

Lartey RT, Weiland JJ, Caesar-TonThat C and Bucklin-Comiskey S, 2003. A PCR protocol for rapid detection of *Cercospora beticola* in sugarbeet tissues. Journal of Sugarbeet Research 40: 1-10.

Leslie JF, Summerell BA, 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Black Well Press.

Linde CC, Zala M, Ceccarelli S and McDonald BA, 2003. Further evidence for sexual reproduction in *Rhynchosporium secalis* based on distribution and frequency of mating-type alleles. Fungal Genetics and Biology 40:115-125.

Milgroom M, 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. Annual Review of Phytopathology 34: 457-477.

Moller EM, Bahnweg G and Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nuclear Acid Research 20: 6115.

Moretti M, Karaoglanidis G, Saracchi M, Fontana, A and Farina G, 2006. Analysis of genotypic diversity in *Cercospora beticola* Sacc. field isolates. Annals of Microbiology 56: 215-221.

Moretti M, Saracchi M and Farina J, 2004. Morphological, physiological and genetic diversity within a small population of *Cercospora beticola* Sacc. Annals of Microbiology 54: 129-150.

Richman A, 2000. Evolution of balanced genetic polymorphism. Molecular Ecology 9: 1953-1963.

Shane WW and Teng PS, 1992. Impact of Cercospora leaf spot on root weight, sugar yield and purity. Plant Disease 76: 812-820.

Smith GA and Rupple J, 1973. Association of Cercospora leaf spot, gross sucrose, percentage sucrose, and root weight in sugar beet. Canadian Journal of Plant Science 53: 695-696.

Turgeon, B.G. 1998. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. Annual Review of Phytopathology 36: 115-137.

Turgeon BG, Bohlman H, Ciuffetti LM, Christiansen SK, Yang G, Schafer W and Yoder OC, 1993. Cloning and analysis of the mating-type genes from *Cochliobolus heterestrophus*. Molecular Genetics and Genomics 238: 270-284.

Waalwijk C, Mendes O, Verstappen ECP, de Waard MA and Kema GHJ, 2002. Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat Septoria leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. Fungal Genetics and Biology 35: 277-286.

Ware SB, Verstappen ECP, Breeden J, Cavaletto JR, Goodwin SB, Waalwijk C, Crous PW and Kema GHJ, 2007. Discovery of a functional *Mycosphaerella* teleomorph in the presumed asexual barley pathogen *Septoria passerinii*. Fungal Genetics and Biology 44: 389 – 397.

Weiland J and Koch G, 2004. Sugarbeet leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.). Molecular Plant Pathology 5: 157-166.

Determining of Mating Type Alleles in *Cercospora beticola*, the Causal Agent of Cercospora Leaf Spot on Sugar Beet Using Specific Primers and Induction of Sexual Phase Under Laboratory and Greenhouse Conditions

M Bakhshi[1], M Arzanlou[2]* and A Babai-ahari[3]

[1] PhD Student of Plant Pathology, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2] Assistant Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
* Corresponding author: arzanlou@hotmail.com

Received: 7 Jun 2012 Accepted: 16 Oct 2012

Abstract

Sexual stage of *Cercospora beticola* has not yet been discovered; however, high levels of phenotypic and genetic diversity as well as resistance against fungicides have been reported in different populations of *C. beticola*. In present study, mating types of 70 Iranian isolates of *C. beticola* were determined using specific primer sets and formation of sexual reproduction cycle was evaluated under laboratory and greenhouse conditions. For this purpose, *C. beticola* isolates were recovered directly from sugar beet plants showing leaf spot disease symptoms in fields of Moghan region, Ardabil province. Pure cultures were established using a single spore technique and subsequently subjected to DNA extraction. Mating types were determined by a modification made in the already designed protocol using a multiplex PCR assay. Analysis of PCR products revealed a 400 bp amplicon specific only for Mat1-2 and an 800 bp amplicon specific for Mat1-1 isolates only. Six different methods were used to induce sexual structures by crossing opposite mating type strians under laboratory and greenhouse conditions. The results for the induction of sexual stage using different crossing protocols were unsuccessful. It seems that some unknown factors are involved in sexual induction or failure in other genes involved in sexual reproduction result in lack of sexual reproduction under field or controlled conditions.

Keywords:, Mat1-1, Mat1-2, Mating type genes, Multiplex PCR, Sexual reproduction