

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

مونس بخشی¹، مهدی ارزنلو^{2*} و اسدالله بابای اهری³

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 پذیرش: 91/7/25

تاریخ دریافت: 91/3/18

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 چغندر قند منطقه مغان (استان اردبیل)، نمونه‌برداری به عمل آمد. کشت‌های تک اسپور به صورت مستقیم از لکه‌های برگ‌ی تهیه و DNA جدایه‌های قارچی استخراج گردید. تیپ‌های آمیزشی از طریق تغییرات اعمال شده در آغازگرهای طراحی شده قبلی و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس چندگانه تعیین شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس 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 در جدایه‌های 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 به دست آمده، 52 جدایه تیپ آمیزشی MAT1-1 و 18 جدایه تیپ آمیزشی MAT1-2 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. به نظر می‌رسد که فاکتورهای ناشناخته‌ای در القای مرحله جنسی این قارچ دخیل بوده و یا نقصان ژنتیکی در ژن‌های دخیل در چرخه تولیدمثلی منجر به عدم تشکیل مرحله جنسی در شرایط مزرعه و یا شرایط کنترل شده می‌گردد.

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

مقدمه

بیماری لکه‌برگی سرکوسپوریایی که عامل آن قارچ *Cercospora beticola* Sacc. می‌باشد، یکی از شایع‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های اندام‌های هوایی چغندر قند در سطح جهان است که تحت شرایط محیطی گرم و مرطوب بیشترین خسارت را به محصول چغندر قند وارد می‌کند (خان و همکاران 2008 و 2009، لارتنی 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 اعتباری 1376). این بیماری منجر به کاهش معنی‌دار در میزان محصول، قند ریشه، قند استحصالی و قابلیت انبارداری ریشه می‌گردد. در ضمن به دلیل 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 این حال 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). در ضمن 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 صورتی که 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 هتروئال 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 هرز¹ 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 تکثیر کردند. 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

کنیدیوم‌ها 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 مدت 8-10 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* و جفت که بر اساس ناحیه حفاظت شده ژن MAT1-1 و جفت آغازگر *CercosporaMat2f* و *CercosporaMat2r* که بر اساس ناحیه حفاظت شده 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 به- صورت هرز طراحی گردیده بود (جدول 1).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ابتدا به صورت مجزا با استفاده از آغازگرهای طراحی شده 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 به صورت

به‌عنوان نشان‌گر مولکولی برای شناسایی اختصاصی و غربال‌کردن آلل‌های تیپ آمیزشی به صورت توأم 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 پلی‌مران چندگانه¹ 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 علائم لکه‌برگی سرکوسپوریایی در گیاهان چغندر قند طی ماه‌های شهریور و مهر سال 1388 در منطقه مغان (استان اردبیل) انجام شد. لکه‌های برگ‌ها 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 برگ‌ها 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 کاملاً به هم زده شد تا

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 $40.1 \times$ 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 افزار Mega5 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 BioMath - Tm Calculations for Oligos - Promega ارزیابی گردید.

مخلوط اصلی¹ 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 5-10 نانوگرم DNA ژنومی، بافر واکنش با غلظت نهایی $40.1 \times$ میکرومولار dNTPs، $0/5$ پیکومول از هر آغازگر، $1/5$ میلی‌مولار 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 واسرشت‌سازی در 94°C به مدت 20 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

تلاش برای القای تولیدمثل جنسی

الف- روش استفاده از قطعات برگ چغندر قند

جدایه‌های قارچی تستر با تیپ آمیزشی مخالف روی محیط کشت آب-آگار کشت شدند. قطعات برگ چغندر قند در اتوکلاو استریل و در حد فاصل بین جدایه-های قارچی مطابق شکل 1 قرار داده شدند. درب تشتک-های پتری با پارافیلیم 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 پریتمیس کاذب در زیر بینوکولر بررسی گردیدند.



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

ب- روش استفاده از قارچ کش

جدایه‌های قارچی تستر با تیپ آمیزشی مخالف در مقابل هم روی محیط کشت MEA کشت شدند. قارچ کش کاربندازیم به غلظت چهار پی‌پی‌ام در 100 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.

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

توضیح	توالی (3'→5')	آغازگر
مستقیم	CTTGCAGTGAGGACAT GG	Cercospora Mat1f
معکوس	GAGGCCATGGTGAGTG AG	Cercospora Mat1r
مستقیم	GATNTACCNTCTCGAC CTC	Cercospora Mat2f
معکوس	CTGTGGAGCAGTGGTC TC	Cercospora Mat2r
طراحی شده در این تحقیق	GATCTACCGTCTCGAC CTC	Cercospora Mat2f-beticola

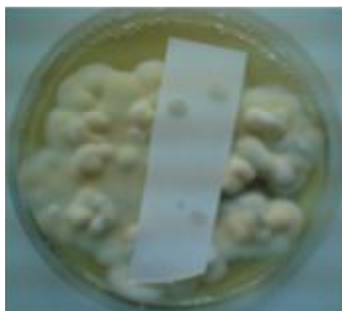
تعیین تیپ آمیزشی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

جفت آغازگر مبتنی بر ژن MAT1-1 (CercosporaMat1f /CercosporaMat1r) همراه با جفت آغازگر مبتنی بر ژن MAT1-2 [CercosporaMat2f-] و CercosporaMat2r و beticola [در یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران چندگانه برای تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌های C. beticola به صورت هم‌زمان به کار رفتند. مخلوط واکنش 5-10 نانوگرم DNA ژنومی، بافر واکنش $40,1 \times$ 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 واسرشت‌سازی در 94°C به مدت 20 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 0/8 درصد (وزن / حجم) حاوی 0/1 میکروگرم بر میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید در بافر TAE $1 \times$ با اعمال ولتاژ 90 به مدت یک ساعت الکتروفورز و زیر نور UV مشاهده شدند.



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



شکل 2- روش استفاده از قارچ کش در القای مرحله جنسی

ه- روش القای مرحله جنسی در شرایط گلخانه

گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های دو ماهه چغندر قند رشد یافته در شرایط گلخانه، با جدایه‌های تستر با تیپ آمیزشی گونه مخالف *C. beticola* مایه‌زنی شدند. برای این منظور حجم مساوی از میسلیم جدایه‌های قارچی با تیپ آمیزشی مخالف در داخل آب مقطر استریل با هم مخلوط (میسلیم جمع آوری شده از سطح سه سانتی-متر مربع محیط کشت) و بدون ایجاد زخم بر روی برگ‌ها پاشیده شد. به منظور 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 علائم ایجاد شده پس از 8-10 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 پیریتیس کاذب بررسی گردید.



شکل 5- گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های تستر با تیپ آمیزشی مخالف

ج- روش استفاده از لینولئیک اسید

برای این منظور، قرص‌های آگار کلنی رشد کرده 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 میسلیم‌های قارچی رشد کرده اضافه و به خوبی پخش گردید (شکل 3). تشتهک‌های پتری در 25°C و در تاریکی قرار گرفتند. پس از یک ماه جدایه‌ها به منظور تشکیل مرحله جنسی بررسی شدند.



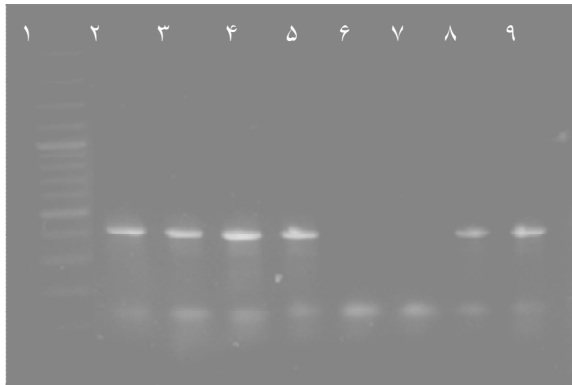
شکل 3- روش استفاده از لینولئیک اسید در القای مرحله جنسی

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). تشتهک‌های پتری در 25°C و در تاریکی قرار گرفتند. پس از یک ماه جدایه‌ها به منظور تشکیل مرحله جنسی بررسی گردیدند.

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 CercosporaMat1r و CercosporaMat1f 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 آمیزشی MAT1-2 نبودند (نتایج نشان داده نشده است). به دلیل هرزبودن این آغازگرها، غلظت مورد استفاده به چهار پیکومول رسانده شد. با افزایش غلظت نهایی آغازگر به چهار پیکومول در مخلوط واکنش، قطعه مورد نظر 440 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.



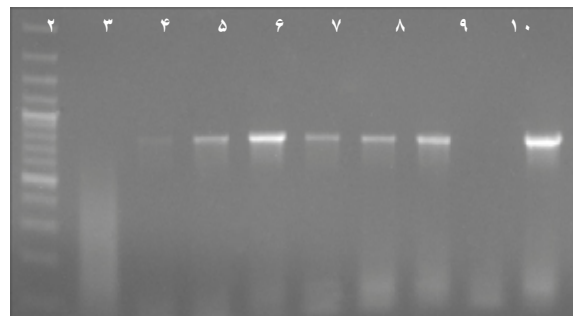
شکل 7- الگوی باندهای تکثیر شده با آغازگرهای MAT1-2 در 2F/R در دمای اتصال آغازگر 60°C با غلظت چهار پیکومول آغازگر در ژل آگارز 0/8%. چاهک 1- نشانگر DNA ladder 100 bp؛ چاهک 2- نمونه CPC19190 شاهد مثبت با تیپ آمیزشی MAT1-2؛ چاهک‌های 3، 4، 5، 6، 7 و 8- نمونه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-2؛ چاهک‌های 9 و 10- نمونه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-1؛ چاهک‌های 7 و 6- نمونه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-1

و- بررسی بقایای گیاهی و خاک

به منظور مطالعه امکان تشکیل مرحله جنسی قارچ روی بقایای چغندر قند 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 به صورت معکوس روی درب قرار گرفتند. سطح محیط کشت به صورت روزانه و به مدت یک هفته در زیر بینوکلر جهت مشاهده آسکوسپوره‌های پرتاب شده و جوانه زده 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 MAT1-1 در 1F/R در دمای اتصال آغازگر 60°C در ژل آگارز 0/8%. چاهک 1- نشانگر DNA ladder 100 bp؛ چاهک 2- نمونه با تیپ آمیزشی MAT1-2؛ چاهک‌های 3، 4، 5، 6، 7 و 8- نمونه‌های با تیپ آمیزشی MAT1-1؛ چاهک 9- نمونه CPC19190 شاهد منفی با تیپ آمیزشی MAT1-2؛ چاهک 10- نمونه CPC12191 شاهد مثبت با تیپ آمیزشی MAT1-1

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 چغندر قند با میسلیم جدایه‌های قارچی علایم تبییک 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 میسلیم در آزمون‌های بیماری‌زایی این قارچ عملی می‌باشد. بررسی علایم و نشانه‌های بیماری موفقیت‌آمیز بودن این روش در بیماری‌زایی قارچ روی چغندر قند 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 میسلیم 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 پلی‌مرز 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

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

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز 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* هم‌خوانی داشت. با این‌حال، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز 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 آغازگر 52°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 0/8 درصد چاهک 1- شاهد منفی (master mix)؛ چاهک‌های 2 و 5- نمونه‌های با تیپ- آمیزشی MAT1-1؛ چاهک‌های 3 و 4- 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

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 / CercosporaMat1r) در غلظت‌های نهایی 0/5 پیکومول قادر به تکثیر قطعه مورد نظر نبودند. با توجه به این‌که غلظت نهایی الیگونوکلوئوتیدهای مختلف در مخلوط پایه آغازگر هرز پایین می‌باشد، امکان تکثیر قطعه هدف موقع استفاده از غلظت‌های کم آغازگر فراهم نمی‌شود. به طور کلی 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 جدایه‌های تستر این گونه در این تحقیق ناموفق بود. تا کنون هیچ تلمومورفی برای *C. beticola* شناسایی نشده است و ساختار جمعیتی این بیمارگر کلونال تلقی می‌شود. با این حال سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های به دست آمده از یک زخم در یک گیاه چغندر قند در ایتالیا (مورتی و همکاران 2004، 2006) مشاهده شده است. خرونوالد و همکاران (2008) نیز تنوع ژنتیکی بالایی را در جمعیت‌های 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 مشاهده شده در *C. beticola*

در دو موقعیت (GATNTACCNTCTCGACCTC) 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 تیپ‌های 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 به صورت موفقیت‌آمیز قطعه 800 جفت بازی را به حالت اختصاصی از جدایه‌های Mat1-1 تکثیر نمودند. در حالی‌که 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 مورد نظر 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 موفقیت‌آمیز 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 0/5 پیکومول 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

جمعیت قارچ از طریق تولیدمثل غیرجنسی مساعد بوده و قارچ عامل بیماری وارد چرخه تولیدمثل جنسی نمی‌گردد. 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 گونه‌های قارچی با فاکتورهای محیطی تهدید کننده رشد مواجه می‌شوند، وارد فاز تولید مثل جنسی شده و از این طریق بقای خود را به نسل‌های بعدی تضمین می‌کنند. باروری روی محیط کشت گاهی می‌تواند با قرار دادن یک قطعه از کاغذ صافی و اتمن 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، لزی و سامرل 2006، ارزنلو و همکاران 2010). در این بررسی به‌جای اسید لینولئیک خالص از روغن آفتابگردان که حاوی مقادیر قابل توجهی اسید لینولئیک می‌باشد 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 چغندر قند، 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-

برای یک میکروارگانیزم با تولیدمثل غیرجنسی بسیار زیاد است.

در مورد وقوع یا اهمیت تولیدمثل جنسی در مورد گونه‌های به‌ظاهر 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 خرونیوالد و همکاران (2006) در نمونه‌برداری از قاره‌های مختلف، توزیع برابر از تیپ‌های آمیزشی مشاهده شده بود. در صورتی که 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، غیرمحمتمل به‌نظر می‌رسد که هر دو ژن تیپ آمیزشی با فراوانی برابر در میان جمعیت مزرعه‌ای به‌دست آیند، مگر اینکه این ژن‌ها کارا باشند یعنی این که 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 تئو مورف آن‌ها به‌آسانی در طبیعت مشاهده نمی‌شود. فرضیه‌ای که در این خصوص مطرح می‌باشد، تشکیل مرحله جنسی به صورت پنهان¹ در جمعیت‌های این قارچ می‌باشد (خرونیوالد 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 این حال، 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 چغندر قند در این منطقه، شرایط برای افزایش

¹ Clandestine sexual reproduction

گونه‌های جنس *Cercospora* گزارش شده است (بخشی و همکاران 2012) و اغلب گونه‌های این جنس از طریق تولید کنیدی تکثیر می‌یابند.

هر چند حضور ایدیومورف‌های تیپ‌های آمیزشی برای تولیدمثل جنسی در قارچ‌های هتروتال ضروری می‌باشد ولی شاید برای تکمیل موفق چرخه جنسی کافی نباشد. چرخه تولیدمثل جنسی فوق‌العاده پیچیده می‌باشد و ژن‌های متعددی در تولیدمثل جنسی دخیل هستند. هر نوع نقصان در ژن‌های دخیل در چرخه تولیدمثل جنسی می‌تواند منجر به اختلال در چرخه تولیدمثل جنسی قارچ‌ها شود (تورگئون و همکاران 1993، کوپین و همکاران 1997، تورگئون 1998، آری و همکاران 2000، دوباک و تورگئون 2006).

نتایج تحقیق حاضر به‌عنوان نقطه شروعی برای تحقیقات بعدی در خصوص غربال تیپ‌های آمیزشی در داخل جمعیت‌های مختلف این گونه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای چندگانه به حساب می‌آید و از طرف دیگر نیاز به تلاش‌های جدید برای فهم چرخه زندگی این قارچ و سازوکارهای دخیل در تنوع ژنتیکی جمعیت‌های آن را نشان می‌دهد.

های دوماهه چغندر قند در شرایط گلخانه با سوسپانسیون میسلیم جدایه‌های با تیپ سازگار جنسی مخالف قارچ *C. beticola* مایه زنی شدند. علایم تیپیک لکه برگی حدود 10 روز روی برگ‌ها مشاهده گردید ولی حتی تا پس از پنج ماه نگهداری گیاهان در شرایط گلخانه، مرحله جنسی مشاهده نگردید.

به طور کلی عدم تشکیل مرحله جنسی قارچ *C. beticola* در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی نامعقول می‌باشد. زیرا چنان‌که نتایج مطالعات قبلی نشان داده است قارچ عامل بیماری هتروتال بوده و در داخل اغلب جمعیت‌های بررسی شده، تیپ‌های آمیزشی از توزیع یکسان برخوردار می‌باشند (خرونوالد و همکاران 2007) و از طرف دیگر سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی و فنوتیپی در بین جمعیت‌های مختلف این قارچ گزارش شده است (مورتی و همکاران 2004، ویلند و کخ 2004، خرونوالد و همکاران 2008). این شواهد فرضیه وجود چرخه جنسی فعال در داخل جمعیت‌های این گونه را تقویت می‌کند (خرونوالد و همکاران 2008). گونه *C. beticola* از نظر تبارزایی با جنس *Mycosphaerella* مرتبط می‌باشد. با این حال مرحله جنسی برای تعداد معدودی از

منابع

- اعتباریان ح ر، 1376. بیماری‌های سبزی و صیفی و روش‌های مبارزه با آن‌ها. چاپ اول، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.
- 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 Zwiars 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).
- 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, Arnais 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 Eucosmycetes. 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.

- 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.
- Groenewald M, Groenewald 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 Ruppel 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 Bakhshi¹, M Arzanlou^{2*} and A Babai-ahari³

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 strains 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