پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی/ جلد ۵ شماره ۲/ سال ۱۳۹۵

تشخیص مولکولی گونه‌ی *Biscogniauxia mediterranea*، عامل بیماری ذغالی بلوط، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

مهدی ارزنلو[۱*]، سعید قاسمی اسفهلان[۲]، سیما خدایی[۳]، مجید توکلی[۴] و اسدالله بابای اهری[۱]

۱- به ترتیب دانشیار و استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، رشته بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
۳- دانشجوی دکتری، رشته بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
۴- دانشجوی دکتری، رشته حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
*نویسنده مسئول: arzanlou@hotmail.com
تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۹ تاریخ پذیرش : ۹۵/۳/۵

چکیده

گونه‌ی *Biscogniauxia mediterranea*، عامل بیماری ذغالی بلوط، به عنوان یکی از عوامل اصلی دخیل در زوال بلوط در ایران معرفی شده است. با این حال اطلاعاتی در مورد پراکنش، دامنه‌ی میزبانی، روش‌های انتشار و انتقال عامل بیماری در مناطق آلوده و همچنین احتمال شیوع بیماری در سایر مناطق جنگلی ایران در دسترس نمی‌باشد. تحقیق حاضر با هدف توسعه‌ی یک روش مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی جهت تشخیص گونه‌ی *B. mediterranea* براساس آغازگرهای اختصاصی گونه، اجرا گردید. بدین منظور نمونه‌برداری از درختان بلوط با علایم بیماری ذغالی در استان ایلام صورت گرفت. عامل بیماری با استفاده از تکنیک‌های متعارف در بیماری‌شناسی گیاهی جداسازی و خالص سازی گردید. جدایه‌های *Biscogniauxia* براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی مرحله‌ی جنسی و توالی یابی ناحیه ITS-rDNA گونه‌ی *B. mediterranea* شناسایی گردیدند. داده‌های توالی ناحیه‌ی ITS-rDNA برای کلیه‌ی گونه‌های *Biscogniauxia* موجود در بانک ژن دریافت و همراه با توالی‌های ایجاد شده در این تحقیق زیر هم چینی و یک جفت آغازگر اختصاصی (BmF/BmR) با طول قطعه‌ی مورد انتظار ۴۰۰ جفت باز، برای تشخیص مولکولی *B. mediterranea* طراحی گردید. کارایی جفت آغازگر طراحی شده با استفاده از DNA جدایه‌های *B. mediterranea* و دیگر گروه‌های قارچی جداسازی شده از بافت‌های درختان بلوط طی واکنش زنجیره‌ای پلی-مرازی ارزیابی گردید. نتایج حاصل از بررسی محصول واکنش روی ژل آگارز نشان داد که قطعه ۴۰۰ جفت بازی فقط از جدایه‌های گونه‌ی *B. mediterranea* تکثیر می‌شود. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در این تحقیق در برنامه‌های مربوط به ردیابی عامل بیماری، مطالعه‌ی پراکنش، دامنه‌ی میزبانی و روش‌های انتشار عامل بیماری قابل استفاده خواهند بود.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، بیماری نوظهور، زوال بلوط، زایلاریاسه.

مقدمه

گونه‌ی *Biscogniauxia* (De Not.) Kuntze *mediterranea* به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب گونه‌های بلوط به شمار می‌رود. عامل بیماری باعث ایجاد زخم‌های نکروتیک روی ساقه، شاخه و تنه اصلی بلوط می‌شود که تحت عنوان بیماری ذغالی شناخته شده است (مازاگلیا و همکاران ۲۰۰۱، لوچی و همکاران ۲۰۰۵). بیماری ذغالی روی گونه‌های مختلف بلوط شامل *Quercus cerris* L.، *Q. ruber*، *Q. pubescens* L. و *Q. frainetto* L. ایجاد خسارت شدید می‌کند

Archive of SID
www.SID.ir

(وانینی و اسکارسیا موگنوزا ۱۹۹۱، جورک و اگریس ۲۰۰۵ و راگازی و همکاران ۲۰۱۲). با این وجود خسارت بیماری روی گونه‌ی *Q suber* L. به مراتب بیشتر است (مازاگلیا و همکاران ۲۰۰۱). علایم بیماری عموما به صورت زوال و مرگ، قهوه‌ای شدن و خزان زودتر از موعد در درختان آلوده می‌باشد. علایم اولیه-ی بیماری به صورت زردی و پژمردگی برگ‌ها ظاهر می‌شود و همزمان با پیشرفت بیماری برگ‌ها قهوه‌ای رنگ شده و خشکیدگی سرشاخه ها اتفاق می‌افتد (مازاگلیا و همکاران ۲۰۰۱). در این مرحله تشخیص بیماری به راحتی امکان پذیر نبوده و این علایم ممکن است به دیگر عوامل نسبت داده شوند. بیماری در مراحل بعد به ناحیه‌ی تنه سرایت کرده و ایجاد شانکر در محل تنه ممکن است منجر به مرگ کامل درخت شود. علایم بیماری در بافت های چوبی به صورت قهوه‌ای رنگ شدن آوندهای آبکشی قابل مشاهده است همزمان با مرگ شاخه‌ها و تنه، در زیر پوست بافت استرومایی بالشتکی شکل و تیره رنگ قارچ توسعه پیدا می‌کند که در اثر رشد آن و فشار ایجاد شده، پوست در محل بافت استرومایی ترک برداشته و به صورت نواری از تنه جدا می شود و بافت استرومایی در معرض دید واقع می شود (میرابوالفتحی ۲۰۱۳). در داخل این بافت استرومایی پریتس‌های عامل بیماری تشکیل می‌شوند. آسکوسپورهای قارچ به عنوان مایه تلقیح اولیه در ایجاد آلودگی عمل می‌کنند (مازاگلیا و همکاران ۲۰۰۱). در محل شروع آلودگی روی شاخه‌ها ترشح شیرابه سفید رنگ مشهود می‌باشد و در محل تنه حجم زیادی از صمغ سیاه تیره در درختان مسن قابل رویت می‌باشد (میرابوالفتحی وهمکاران ۲۰۱۱، میرابوالفتحی ۲۰۱۳).

گونه‌ی *B. mediterranea* در شرایطی که میزبان تحت تاثیر تنش های محیطی باشد، ایجاد بیماری می-کند. حساسیت به این قارچ با وقوع دوره‌های بحرانی خشکسالی و آتش سوزی در جنگل های بلوط مرتبط می‌باشد. وقتی میزبان تحت تنش کم آبی واقع می‌شود، عامل بیماری از طریق بافت‌های آوندی وارد شده و بافت‌های چوب و پوست را کلونیزه می‌کند که ممکن است منجر به مرگ میزبان در طول یک فصل رویشی شود (وانینی و اسکارسیا موگنوزا ۱۹۹۱، وانینی و والانتینی ۱۹۹٤). این گونه بخشی از چرخه‌ی زندگی خود را به صورت اندوفیت در بافت‌های بلوط سپری می‌کند (مازاگلیا و همکاران ۲۰۰۱). عامل بیماری مرحله‌ی اندوفیتی خود را در اندام‌های مختلف میزبان از قبیل چوب، پوست، جوانه، سرشاخه و برگ بدون ایجاد علایم سپری می‌کند. دارا بودن مرحله‌ی اندوفیتی و بقا در میزبان سالم یک استراتژی مهم برای این بیمارگر به حساب می‌آید، به این ترتیب که در میزبان-های متاثر از تنش‌های محیطی، عامل بیماری با تغییر فاز از اندوفیتی به بیمارگری، به سرعت بافت‌های میزبان را کلونیزه کرده و تخریب می‌نماید (آنسلیمی و همکاران ۲۰۰۰).

با توجه به طولانی بودن مرحله‌ی اندوفیتی عامل بیماری (آلودگی نهان) و سرعت عمل پایین روش‌های سنتی در ردیابی عامل بیماری در مراحل اولیه‌ی آلودگی، شناسایی و ردیابی عامل بیماری با استفاده از راه‌کارهای مولکولی که از سرعت عمل و دقت بالاتری برخوردار می‌باشند، مورد توجه واقع شده است. در این راستا روش‌های مولکولی برای شناسایی گونه‌ی *B. mediterranea* و دیگر گونه‌های این جنس از قبیل *B. nummularia* (De Not.) Kuntze که روی گونه‌های جنس راش (*Fagus* L.) ایجاد بیماری می کند، ابداع شده است (مازاگلیا و همکاران ۲۰۰۱، لوچی و همکاران ۲۰۰۵، ۲۰۰٦). مازاگلیا و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر ناحیه ITS-rDNA امکان تشخیص *B. mediterranea* را از کشت‌های خالص و بافت‌های گیاهی بدون علایم فراهم نمودند. لوچی و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از تکنیک PCR Real-time گونه‌ی *B. mediterranea* را از درختان بلوط بدون علایم ردیابی کردند. این محققین در یک تحقیق دیگر، گونه *B. nummularia* را با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

تکنیک Real-time PCR از درختان راش (*Fagus sylvestris* Gaertn.) بدون علایم بیماری ردیابی نمودند (لوچی و همکاران ۲۰۰۶).

در ایران قارچ *B. mediterranea* به عنوان یکی از عوامل اصلی دخیل در زوال بلوط معرفی شده است (میرابوالفتحی ۲۰۱۳). با وجود این اطلاعاتی در خصوص پراکنش، دامنه‌ی میزبانی و روش‌های انتشار و انتقال عامل بیماری در مناطق آلوده و همچنین احتمال شیوع بیماری در سایر مناطق جنگلی ایران در دسترس نمی باشد. هدف این تحقیق تشخیص و ردیابی گونه *B. mediterranea* براساس آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر ITS-rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری،جداسازی عامل بیماری و شناسایی

طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۲ نمونه‌برداری از درختان بلوط دارای علایم بیماری ذغالی در جنگل‌های منطقه ایلام صورت پذیرفت (شکل ۱). بافت‌های پوست و تنه دارای استرومای قارچی در داخل پاکت‌های کاغذی جمع‌آوری گردیدند. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و تا موقع جداسازی در شرایط خشک و خنک نگهداری شدند. جهت جداسازی عامل بیماری، قطعات به طول ۰/۵ × ۰/۵ سانتی‌متر از حد فاصل بافت سالم و آلوده با استفاده از تیغ اسکالپل جداسازی گردید. قطعات بافت با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد تجاری به مدت دو دقیقه ضدعفونی شدند، سپس به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درجه قرار داده شدند و بدنبال آن با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. بافت‌های ضدعفونی شده با استفاده از کاغذ صافی سترون خشک شده و تعداد پنج قطعه بافت به محیط کشت عصاره مالت آگار (MEA[1]: Merck, Hamburg, Germany) انتقال داده شد. تشتک های پتری در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان ظاهر شدن پرگنه قارچی نگهداری شدند. نمونه‌های رشد کرده به محیط کشت جدید انتقال داده‌شدند و به‌مدت ۵-۳ روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. کشت‌های قارچی در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد جهت استفاده‌های بعدی نگهداری شدند.

شناسایی جدایه‌های قارچی براساس ویژگی‌های مرحله‌ی جنسی روی بافت‌های گیاهی آلوده صورت گرفت. برای این منظور برش‌های عرضی از بافت استرومایی تهیه و ویژگی‌هایی از قبیل شکل بافت استروما، پریتسیوم، آسک و اسکوسپور با استفاده از میکروسکوپ نوری مطالعه گردید. ویژگی‌های مرحله‌ی غیر جنسی بر اساس کشت‌های خالص قارچی رشده داده شده روی محیط کشت عصاره سیب زمینی آگار (PDA[2]) صورت گرفت.

تشخیص مولکولی *B. mediterranea*

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از کشت‌های خالص، جدایه‌ها بر روی محیط کشت MEA مخطط شده و پس از دو هفته زمانیکه به اندازه کافی رشد کردند، DNA جدایه‌ها با استفاده از روش مولر و همکاران (۱۹۹۱) استخراج گردید. غلظت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. DNA استخراج شده به نسبت‌های ۱۰ برابر (۱:۱۰) و صد برابر (۱:۱۰۰) ترقیق و مورد استفاده قرار گرفت. محلول DNA پایه در منفی ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

تکثیر ناحیه ITS-rDNA

در مورد تعدادی از جدایه‌های *B. mediterranea* جداسازی شده در این تحقیق،ناحیه ITS-rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید. جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA آغازگر رفت (ITS1 = 5'TCCGTAGTTGGACCTGCGG3') و برگشت (ITS4 = 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') در جدایه‌ها مورد استفاده واقع شد (وایت و همکاران

[1] Malt Extract Agar (MEA).

[2] Potato Dextrose Agar (PDA).

Archive of SID

www.SID.ir

۱۹۹۰). این آغازگرها بخشی از ناحیه ٔ۳ زیر واحد کوچک DNA ریبوزومی (SSU-rDNA)، ناحیه ITS1 و ۵/۸S، ITS2 و بخشی از ناحیه ٔ۵ زیر واحد بزرگ DNA ریبوزومی (LSU-rDNA) را تکثیر می‌کنند. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز شامل ۰/۵ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq DNA polymerase)، بافر واکنش (1X PCR buffer)، ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۰/۲میلی‌مول از هر یک از dNTP، پنج پیکومول از هر یک از اغازگرها و ۱۰ الی ۱۵ نانو گرم از DNA بود که حجم نهایی مخلوط واکنش با استفاده از آب دیونیزه سترون به مقدار ۲۵ میکرولیتر تنظیم شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio RAD– Mj Mini) و با اعمال حرارت ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت اولیه و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه به مدت هفت دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. جهت جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول واکنش دمای دستگاه پس از انجام واکنش بر روی ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت نامعلوم، تنظیم گردید. فرآورده‌های واکنش روی ژل آگارز یک درصد حاوی ۱/. میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم‌بروماید در بافر 1X TAE[۲] توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل (Gel documentation) تحت نور ماورا بنفش (طول موج ۳۱۲ نانومتر) مشاهده و بررسی شدند.

توالی یابی

واکنش ترادف‌یابی نوکلئوتیدی بوسیله کیت تجارتی بیگ‌دای BigDye ® Terminator V301 Cycle Sequencing kit ساخت کارخانه Applied Biosystems کالیفرنیا (آمریکا) و مطابق دستورالعمل کارخانه صورت‌گرفت. تجزیه تحلیل نتایج با استفاده از دستگاه ABI persim.® 3700 انجام شد. توالی نوکلئوتیدی با نرم‌افزار SeqMan (Lasergene package, DNAstar, Madison, USA) بررسی و ویرایش شد و با استفاده از نرم افزار برخط بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) با توالی‌های موجود در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه و هویت گونه تایید گردید. توالی جدایه‌های نماینده در بانک ژن (GenBank) ارایه و راس شمار دریافت گردید (جدول ۱)

طراحی آغازگر اختصاصی

جهت طراحی آغازگر اختصاصی برای تشخیص گونه‌ی *B. mediterranea*، تمامی توالی‌های ثبت شده در بانک ژن برای ناحیه ITS-rDNA گونه‌های *Biscogniauxia* دریافت و ذخیره شدند. توالی ایجاد شده در این تحقیق همراه با توالی‌های دریافت شده از بانک ژن، با استفاده از نرم افزار MEGA6 (تامورا و همکاران ۲۰۱۳) رجبندی و براساس الگوی هم ترازی چند گانه توالی‌ها، یک جفت آغازگر اختصاصی برای گونه‌ی *B. mediterranea* طراحی گردید. جهت حصول اطمینان از کارایی جفت آغازگر اختصاصی در تشخیص تمامی جدایه‌های *B. mediterranea*، توالی برایند از توالی‌های موجود برای جدایه‌های *B. mediterranea* ایجاد و موقعیت جفت آغازگر طراحی شده روی توالی برایند ارزیابی شد. ویژگی‌های جفت آغازگر شامل دمای ذوب، درصد گوانین به سیتوزین، امکان تشکیل ساختارهای ثانویه، تشکیل پرایمر دایمر و... با استفاده از نرم افزار برخط سایت سیگما (https://www.sigmaaldrich.com) بررسی شد (جدول ۲).

بهینه‌سازی و راست‌آزمایی واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز تعیین دمای اتصال بهینه برای جفت آغازگر با استفاده از برنامه شیب دمای دستگاه ترموسایکلر و غلظت بهینه کلرید منیزیم برای واکنش از طریق اعمال غلظت های مختلف کلرید منیزیم (۰/۵ الی ۲/۵ میلی مول) صورت پذیرفت. به منظور ارزیابی کارایی جفت آغازگر طراحی شده در تکثیر اختصاصی گونه‌ی هدف، ابتدا DNA جدایه‌های تایید شده گونه‌های

[3]Tris-acetate-EDTA (TAE).

Archive of SID

www.SID.ir

B. mediterranea براساس داده‌های توالی ناحیه ITS، از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی مراز تکثیر شدند. راست‌آزمایی آغازگرهای طراحی شده از طریق تکثیر DNA سایر جدایه‌های گونه‌ی هدف و دیگر گونه‌های رایج جداسازی شده از بلوط ارزیابی گردید (جدول ۱). برای این منظور DNA استخراج شده از دیگر گروه-های قارچی جداسازی شده از درختان بلوط همراه با DNA جدایه‌های *Biscogniauxia* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی تکثیر گردید.

نتایج

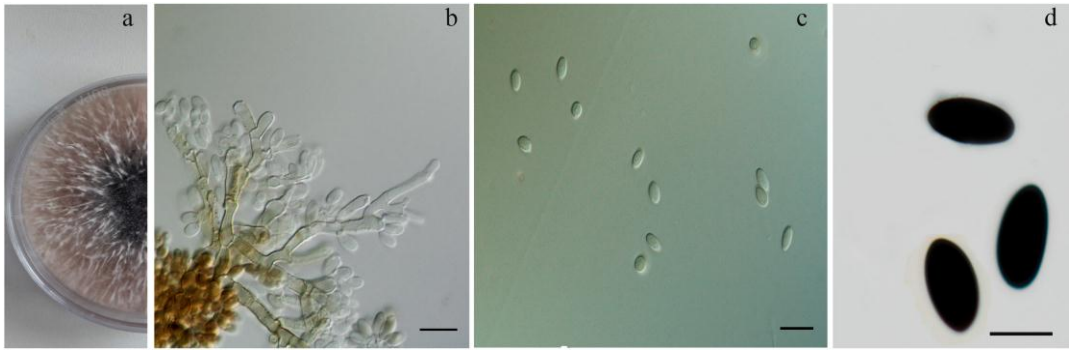
ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌ها

در بافت‌های آلوده میزبان: استروما مسطح، تیره رنگ، با طول متغیر، ضخامت استروما تا یک میلی‌متر، پریتسیوم‌ها تخم‌مرغی وارونه تا غده‌ای، استیول برجسته و سیاه، بالاتر از سطح استروما، آسک‌ها استوانه‌ای، دارای هشت اسپور، دارای حلقه انتهایی آمیلوئیدی صفحه‌ای، آسکوسپورها قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره، بدون دیواره، بیضوی، با دو انتهای گرد، دارای شکاف تندشی مستقیم در جهت طول آسکوسپور بودند. ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌ها با توصیف ارایه شده برای گونه‌ی *B. mediterranea* توسط میرابوالفتحی و همکاران (۲۰۱۱) و راعی و همکاران (۲۰۱٤) مطابقت داشت. پرگنه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط تاریکی، سفید و خاکستری رنگ، سریع‌الرشد و قطر آن پس از هفت روز به ۹۰ میلی‌متر می‌رسید. میسلیوم متشکل از ریسه‌های هوایی، شفاف تا قهوه‌ای رنگ، منشعب، دیواره‌دار و به قطر ۷-۳ میکرومتر بود. کنیدیوفورها شفاف تا رنگی، منشعب، دارای ۲-۱ انشعاب با ۵-۲ سلول کنیدی‌زا در انتها و به ابعاد ٤-۳ × ۸۵-۵۰ میکرومتر بودند. سلول‌های کنیدی‌زا بصورت پلی-بلاستیک، استوانه‌ای شکل، شفاف، صاف تا زبر و دارای خمیدگی‌های زانویی شکل در محل کنیدی‌زایی بودند، و در ابعاد ٤-۳ × (۱۰)۷-٦(-٤) میکرومتر بودند. کنیدی‌ها شفاف، منفرد، تک سلولی و در اندازه‌های ۳-۲ × (٦-)٥-٤(-۳) میکرومتر بودند (شکل ۳). مشخصات میکروسکوپی جدایه‌های به دست آمده با مشخصات ذکر شده برای مرحله‌ی غیرجنسی این قارچ (*Periconiella*-like) مطابقت داشت (کالان و راجرز ۱۹۸٦). مرحله‌ی جنسی عامل بیماری در محیط کشت مشاهده نشد.

شکل ۱-نمونه‌های درختان بلوط با علایم بیماری ذغالی. جداسازی عامل بیماری از بافت‌های چوب و پوست نمونه‌های دارای علایم بیماری صورت گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- *Biscogniauxia mediterranea* a:پرگنه قارچ روی محیط کشت **PDA**، **b**: کنیدیوفورها و سلول‌های کنیدی‌زا. **c**: کنیدی‌ها، **d**: آسکوسپورها (از میزبان آلوده) مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

قطعه‌ای به طول تقریبی ۵۵۰ جفت باز از شش جدایه *B. mediterranea*، با استفاده از جفت آغازگر ITS1 و ITS4، تکثیر گردید (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه‌ی داده‌های توالی ایجاد شده با داده‌های توالی موجود در بانک ژن نشان داد که توالی‌های ایجاد شده در این بررسی با توالی‌های موجود برای گونه‌ی *B. mediterranea* در بانک ژن ۹۹ الی ۱۰۰ درصد مشابهت دارند. توالی‌های ایجاد شده در این تحقیق در بانک ژن ارایه و راس شمار برای هریک از شش توالی دریافت گردید (جدول ۱).

جدول ۱- لیست جدایه‌های قارچی (جداسازی شده از میزبان بلوط) مورد استفاده در این تحقیق جهت راست آزمایی و بررسی کارایی آغازگرهای اختصاصی گونه‌ی *Biscogniauxia mediterranea*

کد جدایه	نام قارچ	منطقه جغرافیایی	راس شمار (ناحیهITS)
CCTU 120	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	**KX267747**
CCTU 121	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	**KX267748**
CCTU 122	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	**KX267749**
CCTU 123	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	**KX267750**
CCTU 124	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	**KX267751**
CCTU 125	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	**KX267752**
CCTU 126	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	
CCTU 127	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	
CCTU 128	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	
CCTU 129	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	
CCTU 130	***Biscogniauxia mediterranea***	ایلام	
CCTU 131	***Daldinia effuse***	کلیبر	
CCTU 132	***Penicillium commune***	کلیبر	

Archive of SID

www.SID.ir

طراحی آغازگر اختصاصی برای تشخیص گونه‌ی *Biscogniauxia mediterranea*

مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی جفت آغازگر اختصاصی از قبل طراحی شده (MED1 و MED2) برای گونه‌ی *B. mediterranea* (مازاگلیا و همکاران ۲۰۰۱) با توالی‌های موجود برای *B. mediterranea* در بانک ژن نشان داد که محل اتصال آغازگر مستقیم (MED1 = 5' GCTATAAGGGATCACCGCCTC 3') در تعدادی از توالی‌های موجود در بانک‌ژن شامل GQ377490.1، AJ390414.1، AJ390413.1 و EF026134.1 تفاوت نشان می‌دهد، لذا یک جفت آغازگر جدید که امکان شناسایی تمامی جدایه‌ها را فراهم نماید، طراحی گردید. زیرهم‌چینی داده‌های توالی ناحیه ITS-rDNA گونه‌های جنس *Biscogniauxia* امکان طراحی آغازگر اختصاصی برای گونه *B. mediterranea* را فراهم ساخت. فایل زیرهم چینی شده ۳۰ توالی را شامل می‌شد که توالی‌ها متعلق به ۱۶ گونه *Biscogniauxia* بودند که از این بین ۱۵ توالی متعلق به جدایه‌های گونه *B. mediterranea* بودند. یک جفت آغازگر شامل آغازگر رفت (BmF = 5' GGTCGTGGTGTGTAGCGTGA 3') و آغازگر برگشت (BmR = 5' GCTGCAGAAGCGAGAGTGTG 3') که طول قطعه‌ی مورد انتظار تکثیر حدود ۴۰۰ جفت باز بود، طراحی شد. جهت حصول اطمینان از اینکه جفت آغازگر طراحی شده امکان تکثیر قطعه مورد انتظار از تمامی جدایه‌های گونه‌ی *B. mediterranea* را فراهم می کنند، یک فایل برایند از داده‌های توالی ۱۵ جدایه این گونه ایجاد و موقعیت جفت آغازگر طراحی شده روی فایل برایند ارزیابی و قابلیت تکثیر از قطعه هدف، از تمامی جدایه‌های این گونه تایید گردید. ویژگی‌های جفت آغازگر شامل دمای ذوب، درصد گوانین به سیتوزین، امکان تشکیل ساختارهای ثانویه، تشکیل پرایمر دایمر در جدول شماره ۲ خلاصه شده است.

جدول ۲- ویژگی‌های جفت آغازگر طراحی شده در این تحقیق جهت تشخیص اختصاصی گونه‌ی ***Biscogniauxia mediterranea***

آغازگر	جهت	درصد G/C	دمای ذوب (°C)	طول (جفت باز)	تشکیل ساختار ثانویه	تشکیل دایمر
BmF	رفت	۶۰	۶۷/۵	۲۰	وجود ندارد	وجود ندارد
BmR	برگشت	۶۰	۶۶/۶	۲۰	ضعیف	وجود ندارد

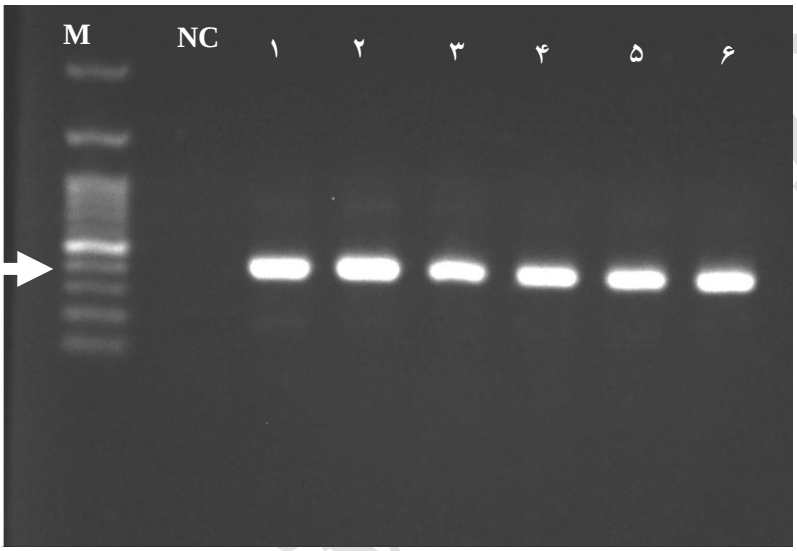
بهینه‌سازی و راست آزمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

دمای اتصال بهینه برای جفت آغازگر با استفاده از برنامه شیب درجه‌ی حرارت دستگاه ترموسایکلر، ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و غلظت بهینه کلرید منیزیم برای واکنش از طریق اعمال غلظت های مختلف کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مول تعیین گردید. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز شامل ۰/۵ واحد آنزیم پلی مراز (Taq DNA polymerase)، بافر واکنش 1X PCR buffer، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مول از هر یک از dNTP، پنج پیکو مول از هر یک از اغازگر ها و ۱۰ الی ۱۵ نانو گرم از DNA بود که حجم نهایی مخلوط واکنش با استفاده از آب دیونیزه سترون به مقدار ۲۵ میکرولیتر تنظیم شد. برنامه دمایی واکنش شامل اعمال حرارت ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت اولیه و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. ارزیابی الگوی باندی تکثیر یافته طی واکنش

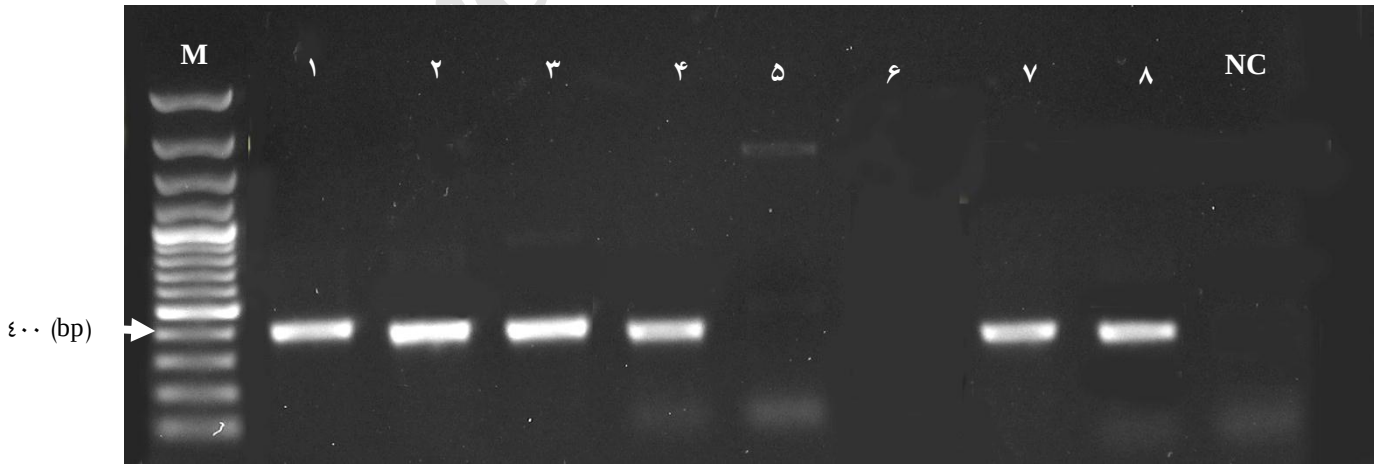
Archive of SID

www.SID.ir

زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز نشان داد، جفت آغازگر طراحی شده از کارایی لازم در تشخیص گونه هدف برخوردار می باشد، به این صورت که قطعه ٤٠٠ جفت بازی از DNA جدایه‌های تایید شده گونه *B. mediterranea* براساس داده‌های توالی ناحیه ITS و دیگر جدایه‌های این گونه (جدول ۱)، تکثیر گردید (شکل ۳). نتایج حاصل از راست آزمایی آغازگرهای طراحی شده نشان داد که جفت آغازگر BmF/BmR به طور اختصاصی قطعه ٤٠٠ جفت بازی را از جدایه‌های گونه *B. mediterranea* تکثیر می‌نمایند و تکثیری از DNA دیگر گونه‌های قارچی جداسازی شده از بلوط که در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفت، صورت نگرفت (شکل ٤).



شکل ۳- تشخیص مولکولی گونه *Biscogniauxia mediterranea* با استفاده از آغازگر اختصاصی. محصول واکنش رنجیره‌ای پلی مراز حاصل از تکثیر DNA گونه *B. mediterranea* با استفاده از جفت آغازگر BmF/BmR. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز؛ NC شاهد منفی؛ ۱ الی ٦: جدایه‌های تایید شده گونه *B. mediterranea*.



شکل ٤- ارزیابی کارایی آغازهای اختصاصی طراحی شده برای تشخیص گونه *B. mediterranea* . محصول واکنش رنجیره‌ای پلی‌مراز حاصل از تکثیر DNA گونه جدایه های *B. mediterranea* با استفاده از جفت آغازگر BmF/BmR. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز؛ ۱: جدایه تایید شده گونه *B. mediterranea*؛ ۲،۳، ٤، ۷، ۸: جدایه‌های مشکوک به گونه *B. mediterranea*؛ ۵: *Penicillium commune*؛ ٦: *Daldinia effusa*؛ NC: شاهد منفی.

www.SID.ir

بحث

شناسایی صحیح عامل بیماری، اصل اولیه در مدیریت بیماری محسوب می‌شود. به‌ویژه در مورد عوامل بیماری‌زای قرنطینه‌ای، شناسایی سریع و دقیق از نقش به سزایی در مدیریت موثر آنها برخوردار می باشد. با توجه به محدودیت‌ها و نارسایی‌های موجود در روش‌های شناسایی سنتتی آن عوامل، امروزه ابزار مولکولی شناسایی بطور رایج در تشخیص عوامل بیماریزای گیاهی، مطالعه پراکنش این عوامل و مطالعات اکولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرند (لیونس و توما ۲۰۰۵، ماکسول و همکاران ۲۰۰۵، ارزنلو و همکاران ۲۰۰۷، بخشی و همکاران ۲۰۱۱ و ارزنلو و نرمانی ۲۰۱٤). هدف این پژوهش، طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت شناسایی سریع و دقیق گونه *B. mediterranea* عامل بیماری ذغالی بلوط با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و بررسی کارایی این آغازگرها در تکثیر DNA گونه *B. mediterranea* بود. جهت تهیه‌ی جدایه‌های قارچ عامل بیماری، نمونه‌برداری از درختان بلوط دارای علایم (شکل ۱) از جنگل‌های بلوط استان ایلام صورت پذیرفت. هویت جدایه‌ها با استفاده از داده‌های ریخت شناسی مرحله‌ی جنسی و توالی ناحیه ITS-rDNA تایید و مقایسه‌ی داده‌های توالی این گونه با سایر گونه‌های این جنس، طراحی یک جفت اغازگر اختصاصی (BmF/BmR) برای تشخیص اختصاصی این گونه را فراهم ساخت. در تحقیقات قبلی آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی این گونه طراحی شده بودند (مازاگلیا و همکاران ۲۰۰۱)، با وجود این، با توجه به تنوع داخل گونه‌ای در ناحیه ITS1 جدایه‌های این گونه، طراحی آغازگرهای جدید برای تشخیص اختصاصی همه جدایه‌های این گونه ضروری به نظر می‌رسید. مقایسه توالی نوکلئوتیدی جفت آغازگر اختصاصی از قبل طراحی شده (MED1 و MED2) برای گونه *B. mediterranea* (مازاگلیا و همکاران ۲۰۰۱) با توالی‌های موجود برای *B. mediterranea* در بانک ژن نشان داد که محل اتصال آغازگر مستقیم (MED1 = 5' GCTATAAGGGATCACCGCCTC 3') در تعدادی از توالی‌های موجود در بانک‌ژن شامل GQ377490.1، AJ390414.1، AJ390413.1 و EF026134.1 تفاوت دارد. در تحقیق حاضر با ایجاد توالی برایند از ناحیه ITS تمامی جدایه‌های در دسترس گونه *B. mediterranea*، منطبق بودن توالی آغازگر با توالی تایید گردید. نتایج حاصل از راست آزمایی جفت آغازگر اختصاصی (BmF/BmR) نشان داد که این آغازگرها به طور اختصاصی قطعه ٤۰۰ جفت بازی را از تمامی جدایه‌های گونه *B. mediterranea*، تکثیر نمود. علاوه بر جدایه‌های قارچی ذکر شده در شکل ٦، جفت آغازگر (BmF/BmR) روی گروه‌های متعددی از قارچ های جداسازی شده از بلوط مورد آزمایش قرار گرفت و اختصاصی بودن این جفت آغازگر مورد تایید قرار گرفت (داده ها نشان داده نشده اند).

در ایران قارچ *B. mediterranea* به عنوان یکی از عوامل اصلی دخیل در زوال بلوط معرفی شده است. بیماری ذغالی بلوط در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۸۷ از جنگل های استان ایلام گزارش گردید (میرابوالفتحی ۲۰۱۳). این بیماری تاکنون از استان های لرستان، فارس و کهکیلویه و بویر احمد از روی بلوط و از استان گرگان روی درختان آزاد و بلند مازور گزارش گردیده است (میرابوالفتحی ۲۰۱۳، راعی و همکاران ۲۰۱٤). با این حال، اطلاعاتی در خصوص پراکنش، دامنه میزبانی و روش‌های انتشار و انتقال عامل بیماری در مناطق آلوده و همچنین احتمال شیوع بیماری در سایر مناطق جنگلی ایران شامل استان های کردستان، آذربایجان غربی (سردشت) و جنگل های ارسباران در دسترس نمی باشد. با توجه به اینکه شناسایی اعضای خانواده Xylariaceae بر پایه ویژگی‌های ساختارهای جنسی شامل شکل بافت استروما، پریتسیوم، اسک و اسکوسپور استوار می-

Archive of SID

www.SID.ir

باشد و با توجه به اینکه این ساختارها در مراحل پیشرفته توسعه بیماری روی بافت‌های میزبان تشکیل می‌شوند (هسیه و همکاران ۲۰۰۵)، استفاده از راهکارهای مولکولی برای شناسایی بیماری‌های ایجاد شده توسط این گروه قارچ ها ضروری به نظر می رسد. روش مولکولی ارایه شده در این تحقیق شناسایی سریع و دقیق عامل بیماری را عملاً میسر می‌سازد.

منابع

Anselmi N, Mazzaglia A and Vannini A, 2000. The role of endophytes in oak decline. pp: 131-144. In Ragazzi A and Dellavalle I (eds.), Decline of oak species in Italy, Accademia Italiana de Scienze Forestali, Firenze.

Arzanlou M, Abeln ECA, Kema GHJ, Waalwijk C, Carlier J, Vries I de, Guzmán M and Crous PW, 2007. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. Phytopathology 97: 1112-1118.

Arzanlou M and Narmani A, 2014. Multiplex PCR for specific identification and determination of mating type in *Togninia minima* (anamorph *Phaeoacremonium aleophilum*), a causal agent of esca disease of grapevine. Phytopathologia Mediterranea 53: 240-249.

Bakhshi M, Arzanlou M and Babai-Ahari A, 2011. Uneven distribution of mating type alleles in Iranian populations of *Cercospora beticola*, the causal agent of Cercospora leaf spot disease of sugar beet. Phytopathologia Mediterranea 50: 101-109.

Callan BE and Rogers JD, 1986. Cultural characters and anamorphs of *Biscogniauxia* (= *Nummularia*) marginata, *B. dennisii*, and *B. repanda*. Canadian Journal of Botany 64: 842-847.

Hsieh H-M, Ju Y-M and Rogers JD, 2005. Molecular phylogeny of *Hypoxylon* and closely related genera. Mycologia 97: 844-865.

Jurc D and Ogris N. 2005. First reported outbreak of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Turkey oak in Slovenia. New Disease Reports 11: 42.

Lievens B and Thomma BPHJ, 2005. Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant pathogens and use in practice. Phytopathology 95: 1374-1380.

Luchi N, Capretti P, Pinzani P, Orlando C and Pazzagli M. 2005. Real-time PCR detection of *Biscogniauxia mediterranea* in symptomless oak tissue. Letters in Applied Microbiology 41: 61-68.

Luchi N, Capretti P, Vettraino AM, Vannini A, Pinzani P and Pazzagli M. 2006. Early detection of *Biscogniauxia nummularia* in symptomless European beech (Fagus sylvatica L.) by TaqManTM quantitative real-time PCR. Letters in Applied Microbiology 2006: 43:33-38.

Mazzaglia A, Anselmi N, Gasbarri A and Vannini A, 2001. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living as an endophyte in oak tissues. Mycolgical Research 105 : 952-956.

Maxwell A, Jackson SL, Dell B and Hardy GESJ, 2005. PCR-identification of Mycosphaerella species associated with leaf diseases of *Eucalyptus*. Mycological Research 109: 992-1004.

Archive of SID

www.SID.ir

Mirabolfathi M, 2013. Outbreak of charchoal diseaseon *Quercus* spp and *Zelkova carpinifolia* trees in forests of Zagros and Alborz mountains in Iran. Iranian Plant Pathotology, 49: 77-79 .

Mirabolfathi M, Groenewald JZ and Crous PW, 2011. The occurrence of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Chestnut leaved oak (*Quercus castaneifolia*) in the Golestan forests of Iran. Plant Diseases, 95: 876.

Raei S, Khodaparast SA and Abbasi M, 2014. More records of xylariaceous fungi from North of Iran. Rostaniha, 15(2): 110-121.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. Nucleic Acids Research, 20: 6115–6116.

Ragazzi A, Ginetti B and Moricca S, 2012. First report of *Biscogniauxia mediterranea* on English Ash in Italy. Plant Disease 96: 1694.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S, 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Vannini A and Scarascia Mugnozza G, 1991. Water stress : a predisposing factor in the athogenesis of *Hypoxylon mediterraneum* on *Quercus cerris*. European Journal of Forest Pathology 21: 193-202.

Vannini A and Valentini R, 1994. Influence of water relations in *Quercus cerris- Hypoxylon mediterraneum* interaction : a model of drought induced susceptibility to a weakness parasite. Tree Physiology 14: 129-139.

White T J, Bruns T, Lee S and Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), PCR Protocols : A guide to Methods and Applications Academic Press, New York, USA.

Archive of SID

www.SID.ir

Molecular Diagnostics of *Biscogniauxia mediterranea*, the Causal Agent of Charcoal Rot Disease on Oak Using Species-Specific Primers

M Arzanlou[1*], S Ghasemi Esfahlan[2], S Khoadei[3], M Tavakoli[4] and A Babai-Ahari[1]

[1]Respectively, Associate Professor and Professor of Plant Pathology and Mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Former MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]PhD Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4]PhD Student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
*Corresponding author: **arzanlou@hotmail.com; arzanlou@tabrizu.ac.ir**

Received: 31 Oct 2015 Accepted:25 May 2016

Abstract

Biscogniauxia mediterranea, the cause of charcoal rot disease on oak, is known as one of the main agents involved in oak decline in Iran. However, very little is known on the extent of distribution, host range and mechanisms of dispersal of the pathogen in infected areas as well as incidence of the disease in other regions of country. The present study was aimed to develop a diagnostic tool for molecular identification and detection of the causal agent of charcoal rot disease based on species-specific primer set using polymerase chain reaction. To this aim, samples were collected from oak trees with typical charcoal rot disease from Ilam province. The causal agent was isolated and purified using routine plant pathology methods. *Biscogniauxia* isolates were identified using a combination of morphological and sequence data from ITS-rDNA region. Blast search analysis of the sequence data obtained in this study against the sequence data in GenBank confirmed the identity of the isolates as *B. mediterranea*. Seqeunce data of ITS-rDNA region for all of *Biscogniauxia* were obtained from GenBank and aligned together with seqeunce data gnerated in this study. A pair of species-specific primer (BmF/BmR) with expcted amplicon size of 400 bp was designed for *B. mediterranea*. Efficacy of this primer set was tested and verified on DNA extracted from *B. mediterranea* and other fungal species isolated from oak tree tissues.The results of amplication profile showed that a 400 bp band was amplified only from *B. mediterranea* isolates. The species-specific primer set designed in this study can be used in monitoring programmes for the detection of the causal agent, the extent of distribution and mechanisms of dispersal of the pathogen.

Keywords: Endophyte, New emerging disease, Oak decline, Xylariaceae.

Archive of SID

www.SID.ir