Archive of SID

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی و آزمون بیماری‌زایی گونه‌های سپتوریا دخیل در بیماری لکه‌برگی گونه‌های جنس *Populus* در استان‌های آذربایجان شرقی، غربی و اردبیل*

روژین گل‌محمدی[۱]، اسداله بابای اهری[۲]**، مهدی ارزنلو[۳] و سیما خدایی[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۲۱)

چکیده

اعضای جنس *Septoria* رایج‌ترین گونه‌های قارچی عامل بیماری لکه‌برگی درختان صنوبر و یکی از خسارت‌زاترین بیمارگرهای اندام‌های هوایی این درختان می‌باشند. با وجود شیوع این بیماری در منطقه شمالغرب ایران، هویت گونه‌های *Septoria* دخیل در این بیماری ناشناخته باقی مانده‌اند. هدف از انجام این تحقیق شناسایی گونه‌های *Septoria* عامل بیماری لکه‌برگی درختان تبریزی در استان آذربایجان شرقی و بخش‌هایی از استان‌های آذربایجان غربی و اردبیل بر اساس صفات ریخت‌شناختی و داده‌های مولکولی بود. برای این منظور، در طول تابستان ۱۳۹۲ از برگ‌های آلوده گونه‌های جنس *Populus* که عمدتا گونه *P. nigra* یا شالک بودند، نمونه‌برداری صورت گرفت و بعد از جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های متعلق به جنس *Septoria*، شناسایی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و آغازگرهای اختصاصی معرفی شده برای دو گونه *S. populi* و *S. populicola* انجام گرفت. نتایج مطالعات ریخت‌شناختی نشان داد که گونه *S. populi* تنها گونه دخیل در بیماری لکه برگی سپتوریایی روی گونه‌های جنس *Populus* در مناطق نمونه‌برداری شده می‌باشد. در آزمون PCR به وسیله آغازگرهای اختصاصی گونه *S. populi* قطعه‌ای به طول ۴۳۹ جفت باز از تمامی جدایه‌های *Septoria* تکثیر شد، در حالی‌که قطعه اختصاصی (به طول ۳۲۹ جفت باز) *S. populicola* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این گونه در هیچ یک از جدایه‌ها تکثیرنشد. بنابراین، گونه *S. populi* به عنوان تنها عامل بیماری لکه برگی سپتوریایی درختان جنس *Populus* در مناطق مورد مطالعه شناسایی شد. آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب با استفاده از روش برگ بریده روی گونه *P.nigra* انجام گرفت و نتایج بررسی نشان داد که همه جدایه‌های بدست آمده بر روی رقم نیگرا بیماری‌زا بودند.

کلیدواژه: درختان تبریزی، سپتوریوز، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

---

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول ارائه شده به دانشگاه تبریز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ababaiahari@yahoo.com

۱. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۳. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۴. دانشجوی دکترای گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

www.SID.ir

Archive of SID

Morphological and molecular identification and pathogenicity of *Septoria* species involved in leaf spot disease on *Populus* species in East Azerbaijan, West Azerbaijan and Ardabil provinces*

R. Golmohammadi[1], A. Babai-Ahari[2], M. Arzanlou[3] and S. Khodaei[4]**

(Received: 12.1.2015; Accepted: 12.9.2015)

Abstract

Species belonging to the genus *Populus* are widely used for log production, landscape design, and windbreak plantations. *Septoria* spp. are the most prevalent fungi causing leaf spot on poplars, which is one of the most damaging foliar diseases of these trees. However, identification of species belonging to this genus through morphological analysis is often problematic. The present work aimed to identify *Septoria* spp. causing leaf spot disease on poplars in East Azarbaijan, West Azerbaijan and Ardabil Provinces by using species specific primers as well as morphological features. Primers have been designed based on nr ITS rDNA sequences of *S. populi* and *S. populicola*. For this purpose, during summer 2013 symptomatic leaves were sampled from poplars in these regions, and pure cultures of isolates belonging to the genus *Septoria* were established. Genomic DNA of the isolates was extracted using CTAB method, and efficacy of the primers in identification of causative agent(s) of the disease was evaluated. With species-specific primer set of *S. populicola* we failed to obtain specific amplification products (329 bp). Species-specific primer set of *S. populi*, however, amplified a 439 bp fragment of all *Septoria* isolates. Hence, the results revealed *S. populi* as the only causal agent of *Septoria* leaf spot disease of poplars in these regions. Finally, on the basis of pathogenicity test all chosen strain caused disease on popular leaves.

Keywords: poplars, Septoriosis, polymerase chain reaction

---

* Part of MSc. Thesis of The First Author Submitted to College of Agric., Tabriz Univ., Tabriz, Iran

** Corresponding author's E-mail: ababaiahari@yahoo.com

1. Former MSc. Student of Plant Pathol., College of Agric., Tabriz Univ., Tabriz, Iran.

2, 3. Prof. and Associ. Prof. of Plant Pathol., College of Agric., Tabriz Univ., Tabriz, Iran.

4. PhD Student of Plant Pathology. College of Agric., Tabriz Univ., Tabriz, Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

درختان متعلق به جنس *Populus* L. به خانواده بید (Salicaceae) تعلق دارند. خواص ویژه اعضای این جنس نظیر سرعت رشد سریع، سهولت تکثیر، بازدهی زیاد محصولات متنوع چوبی، امکان دورگ‌گیری و ترکیب خواص ممتاز گونه‌ای و سازگاری آن‌ها به شرایط نامطلوب آب و هوایی آن‌ها را برای استفاده در سیستم‌های جنگل-داری از سایر گونه‌های جنگلی متمایز کرده است (Tavassoli Asgari *et al.* 2012). کاهش سطح جنگل-های طبیعی کشور و محدودیت استفاده از این منابع، کاشت گونه‌های گیاهی با رشد سریع به ویژه گونه‌های صنوبر را در اولویت قرار داده است (Babmorad *et al.* 2004). گونه‌های این جنس در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماری زا، آفات و تنش‌های محیطی حساس می باشند که روی این محصول ایجاد خسارت اقتصادی می-کنند (Coyle *et al.* 2006). بیماری‌های لکه برگی نیز که از بیماری‌های مهم این درختان است، توسعه یافته و همه-ساله خسارت زیادی به این گیاهان وارد می‌نمایند (Maxwell *et al.* 1997). لکه‌برگی از جمله بیماری‌هایی است که در شاخسار این درختان توسط عوامل قارچی مختلف به وجود می‌آید و می‌تواند باعث کاهش فتوسنتز و مرگ زودرس درختان شود (Maxwell *et al.* 1997). لکه-برگی و شانکر سپتوریایی یکی از بیماری‌های جدی شاخ و برگ و تنه در گونه‌های جنس *Populus* و هیبریدهای آن است (Luley and McNabb 1989). شانکرهای روی تنه اصلی می‌توانند باعث کاهش رشد شده و زمینه را برای آلودگی درخت توسط میکروارگانیسم‌های ثانوی و پوسیدگی و شکستن تنه اصلی درخت فراهم سازند (Stanosz *et al.* 2002). سه گونه *Septoria musiva* Peck، *S. populicola* Peck و *S. populi* Desm. به عنوان عوامل سپتوریوز در این درختان دراکثر نقاط دنیا شناسایی شده‌اند (Cellerrino 1999) ، لازم به ذکر است که هر سه گونه فوق اخیرا در جنس *Sphaerolina* ادغام شده‌اند (Quaedvlieg 2013). لکه‌برگی و شانکر سپتوریائی شاخه یک بیماری همه جا گیر است که توسط *S. musiva* ایجاد می‌شود و به عنوان یک بیماری بسیار مهم در هیبریدهای این گونه در شمال شرقی آمریکا شناخته شده است (Feau *et al.* 2005). *S. musiva* یکی از بیمارگرهایی است که اتحادیه اروپا قوانین قرنطینه‌ای را برای جلوگیری از ورود آن به قاره اروپا وضع کرده است. این گونه در ایران نیز جزو قارچ‌های قرنطینه است. گونه *S. populicola* در اکثر کشورهای اروپایی، آسیایی، آمریکایی و افریقای جنوبی وجود دارد. گونه *S. populi* مشابه *S. populicola* است و از اروپا به خصوص فرانسه و روسیه گزارش شده است، اما در آسیا به صورت نامنظم در ترکیه و ایران و نیز ایالات متحده آمریکا مشاهده شده است (Cellerino 1999). همچنین بر اساس گزارشات ارشاد (Ershad 2009) گونه *S. populi* در خوزستان، ارومیه و اردبیل از روی چند گونه متعلق به جنس *Populus* گزارش شده است. علیرغم کاهش کمیت و کیفیت چوب درختان آلوده به این گونه قارچی در شمال غرب کشور هنوز گونه قارچی دخیل در این بیماری با استفاده از روش‌های مولکولی شناسائی نشده است. از این رو، در بررسی حاضر تلاش شد گونه (های) عامل لکه سپتوریائی درختان جنس *Populus* در استان‌های آذربایجان غربی و شرقی و اردبیل جداسازی شده و به دو روش ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شوند.

www.SID.ir

Archive of SID

روش بررسی

جمع آوری نمونه‌ها، جداسازی و شناسایی بر اساس صفات ریخت شناختی

جهت نمونه‌برداری بازدیدهایی از باغات و صنوبرکاری‌های واقع در استان‌های آذربایجان‌شرقی و غربی و اردبیل طی مرداد و شهریور سال ۱۳۹۲ به عمل آمد. نمونه‌های برگی مشکوک به آلودگی سپتوریایی از برگهای درختان متعلق به جنس *Populus* که گونه غالب و رایج کشت *Populus nigra* می باشد، پس از انتقال به آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفتند. بخش‌های آلوده در زیر استریو میکروسکوپ بررسی شدند و جداسازی و خالص‌سازی قارچ به روش تک اسپور انجام شد. برای این منظورحدود ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به داخل تشتک پتری حاوی محیط‌کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA؛ ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز، ۲۰ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) حاوی ۰/۲ درصد اسیدلاکتیک اضافه شد. در زیر استریومیکروسکوپ، اسپورهای قارچ توسط سوزنی ظریف و استریل از روی لکه‌های برگی برداشته و به طور کامل در داخل آب موجود در تشتک پتری پخش شدند. تشتک‌های پتری به مدت ۴۸-۲۴ ساعت به حالت مورب در دمای اتاق نگه‌داری شدند. سپس تشتک‌ها زیر استریومیکروسکوپ بررسی شدند و اسپورهای جوانه‌زده همراه با قطعه کوچکی از محیط غذایی اطراف آن توسط سوزن استریل به محیط‌کشت PDAمنتقل شدند. قارچ‌های خالص شده در لوله‌های دو میلی‌لیتری حاوی محیط‌کشت سیب‌زمینی هویج آگار (PCA؛ ۲: گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم هویج، ۲۰ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) در دمای چهار درجه سلسیوس و همچنین بلوک‌های PCA حاوی ریسه قارچی در گلیسرول ۵۰ درصد در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری و بدبن طریق تعداد ۱۱۶ جدایه قارچی متعلق به جنس *Septoria* از شهرستان‌های اهر، بستان آباد، تبریز، کلیبر، مرند، میانه، مشکین شهر و خوی جدا سازی شدند. شناسایی جدایه‌ها در سطح گونه بر اساس صفات ریخت-شناختی با بررسی اندام‌های بارده مانند صفات پیکنیدیوم، کنیدیوم و کنیدیوفور بر روی میزبان انجام گرفت (Callan *et al.* 2007, Verkley *et al.* 2013).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

از آنجائیکه کنیدیوم‌های دو گونه *S. populi* و *S. populicola*از نظر ریخت شناختی و بویژه ابعاد و تعداد دیواره‌های عرضی کنیدیوم همپوشانی دارند و تمایز دقیق آن‌ها از همدیگر با استفاده از ویژگی‌های ریخت شناختی مشکل می باشد، بنابراین برای تعیین دقیق هویت جدایه‌های تهیه شده از لکه برگی‌های درختان مورد مطالعه شناسایی با استفاده از روش‌های مولکولی نیز انجام پذیرفت. برای این کار جدایه‌های قارچی در تشتک‌های پتری حاوی محیط‌غذایی PDA کشت شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند. پس از استخراج DNA مطابق روش *کراوس و همکاران* (Crous *et al.* 2009) به منظور شناسایی گونه‌های جنس *Septoria* از دو جفت آغازگر اختصاصی گونه طراحی شده توسط فو و همکاران (Feau *et al.* 2005) در واکنش زنجیره ای مجزا استفاده شد (جدول ۱). طول قطعه مورد انتظار حاصل از تکثیر توسط آغازگرهای Spnr و Spnf ۴۳۹ جفت باز و توسط آغازگرهای Spopr و Spopf ۳۲۹ جفت باز بود (Feau *et al.* 2005). واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۶/۲۵ میکرولیتر Taq DNA Pol 2x Master

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- فهرست آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی جدایه‌های *Septoria*.

Table 1. List of primers used for identification of *Septoria* isolates.

Used for	Primer sequences	Primer names
Specific identification of *S. populi*	5'-TCCGGAGCGATTACGGAAAT-3'	Spnr
Specific identification of *S. populi*	5'-ATCATTACAGAGAAGCACGGC-3'	Spnf
Specific identification of *S. populicola*	5'-CCAGGCTTGAGTGGTGAAAT-3'	Spopr
Specific identification of *S. populicola*	5'-AGAGAAGCGTGGCGCCCT-3'	Spopf

Mix، ۰/۵ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱۵-۱۰ نانوگرم DNA ژنومی و آب دیونیزه استریل بود. تکثیر قطعات مورد نظر پس از تک رشته کردن DNA الگو، با انجام عمل واسرشت سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، طی سه مرحله: واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه‌سلسیوس برای جفت آغازگر Spnr و Spnf و دمای ۵۹ درجه سانتی گراد برای جفت آغازگر Spopr و Spopf و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. این سه مرحله ۳۶ بار تکرار شد و در نهایت یک بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت. فرآورده‌های واکنش روی ژل آگارز یک درصد حاوی ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم بروماید در بافر TAE 1X توسط دستگاه عکس-برداری از ژل تحت نور ماوراء بنفش مشاهده و بررسی شدند.

آزمون بیماریزائی جدایه‌ها

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی بدست آمده از لکه برگی‌ها، و با روش برگ بریده توصیف شده توسط *آرایانو* و *همکاران* (Arraiano 2001) و با انجام تغییراتی اندک انجام شد. برای این منظور، برگ‌های جوان و سالم از درختان شالک جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از ضدعفونی برگ‌ها با استفاده از اتانول ۷۰٪ در داخل تشتک‌های پتری حاوی آب آگار ۰/۱۶ درصد و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر قارچکش کاربندازیم (جهت ممانعت از پیری زودرس برگ‌ها) قرار گرفتند. سپس از کشت‌های جوان هر کدام از جدایه‌ها با استفاده از یک چوب پنبه سوراخ کن سه دیسک میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر سه بلوک با فواصل مساوی از هم بر روی برگ‌های داخل تشتک پتری قرار داده شدند و دهانه تشتک‌های پتری با نوار پارافیلم بسته شدند. از بلوک PDA بدون قارچ برای تشتک پتری شاهد استفاده شد. علایم مشابه لکه برگی‌های جمع آوری شده از گونه‌های مختلف جنس *Populus* ۱۰روز پس از نگه‌داری در شرایط تاریکی و درون تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ظاهر گردید و در نهایت جدایه‌های قارچی مطابق اصول کخ از لکه‌های حاصل مجددا جداسازی شدند.

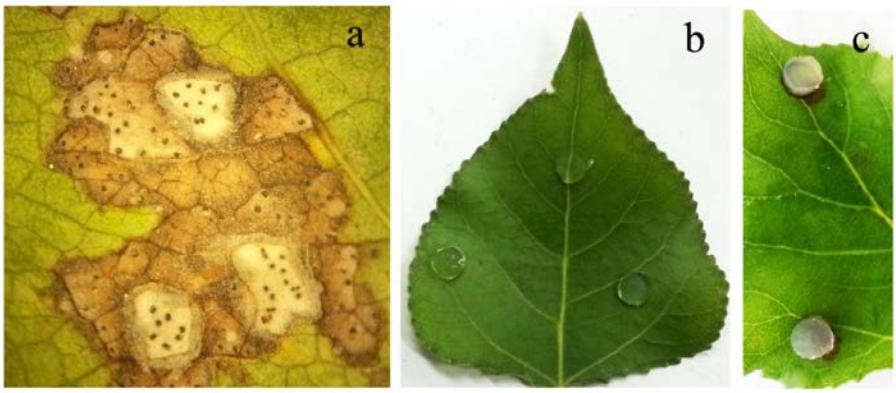
نتیجه و بحث

شناسایی ریخت شناختی جدایه‌ها

در این بررسی تعداد ۱۱۶ جدایه *Septoria* از درختان متعلق به گونه‌های مختلف جنس *Populus* با علایم لکه-برگی جداسازی و خالص سازی شد. تمامی جدایه‌ها دارای لکه‌های زاویه‌دار نامنظم، پراکنده، با حاشیه به رنگ قهوه‌ای روشن و مرکز به رنگ سفید و به عرض ۳-۱

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- a: علایم ناشی از *Septoria populi* در شرایط طبیعی. b-c: آزمون بیماری‌زایی *Septoria populi*. b: برگ شاهد. c: علایم ناشی از *Septoria populi* در شرایط آزمایشگاهی ۱۰ روز پس از مایه‌زنی به روش برگ بریده.

Fig. 1. a: Symptoms of *Septoria populi* in natural conditions. b-c: pathogenicity test of *Septoria populi.* b*:* Control leaf. c: Symptoms of *Septoria populi* on poplar leaf 10 days after inoculation by using detached leaf assay in laboratory conditions.

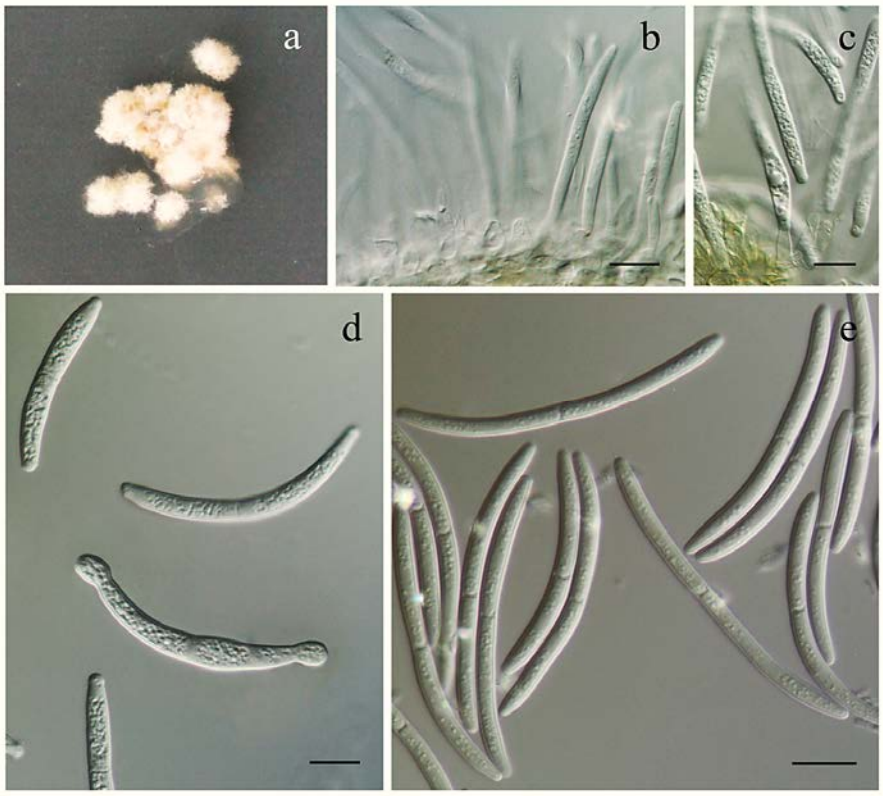
میلی‌متر بودند (شکل ۱). پیکنیدیوم‌ها، تک حفره‌ای، کروی تا نیمه‌کروی، به عرض ۲۵۰-۲۰۰ میکرومتر، به طور کامل در داخل بافت گیاهی قرار داشتند و تنها روزنه آن‌ها از سطح رویی برگ مشخص بود. منفذ پیکنیدیوم از بالا دایره‌ای شکل و به عرض ۵۰-۳۰ میکرومتر بود. در هر لکه تعداد ۱۰-۳ عدد پیکنیدیوم وجود داشت. کنیدیوفورها کاهش یافته و تبدیل به سلول‌های کنیدیوم زا شده بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا کل سطح داخلی حفره پیکنیدوم را پوشانده بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا یک تا دو سلولی، فلاسکی شکل تا استوانه‌ای پهن، بی‌رنگ، دارای سطحی صاف و به ابعاد ۸-۳ × ۱۲-۵ میکرومتر بوده و یک کنیدیوم در انتهای خود تولید می‌کردند. کنیدیوم‌ها دارای ۲-۱ دیواره عرضی، بی‌رنگ، صاف، به ابعاد ۴-۳ × ۵۵-۴۰ میکرومتر، دوکی شکل، خمیده و به ندرت راست، در پایه مسطح و به سمت انتها باریک‌تر می‌شدند. در سطح محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی پیکنیدیوم تمایز یافته ایجاد نمی‌شد. کنیدیوم‌ها در داخل تجمعات ریسه‌ای سست و تمایز نیافته ایجاد می‌شدند و کوتاه‌تر از کنیدیوم‌های تشکیل شده در شرایط طبیعی بودند. همچنین، محتویات درون سلول‌های این کنیدیوم‌ها گرانوله شده و نسبتا شکل معمول خود را از دست داده بودند (شکل ۲). مشخصات فوق با توصیف ارائه شده برای گونه *S. populi* توسط کالن و همکاران (۲۰۰۷) و نیز ورکلی و همکاران (۲۰۱۳) همخوانی داشت.

آزمون بیماری زایی

جدایه انتخابی این گونه بر روی برگ‌های گونه *P. nigra* پس از سه روز باعث بروز ناحیه کلروز در محل قرارگیری دیسک میسلیومی شد. این ناحیه کلروز پنج روز پس از تلقیح نکروز شده و به تدریج توسعه یافت. ۱۰ روز پس از تلقیح لکه‌های کوچک، قهوه‌ای روشن، با حاشیه منظم و به قطر حداکثر نه میلی‌متر در محل مایه‌زنی قابل رویت بودند. پیکنید پس از ۱۰ روز در محل لکه‌ها تولید نشد. جدایه قارچی مورد استفاده مطابق اصول کخ از محل لکه‌ها جداسازی شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- *Septoria populi*. a: پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA. b-c: کنیدی‌ها و کنیدیوفورها؛ b: بر روی گیاه میزبان. c: بر روی محیط غذایی PDA. d-e: کنیدی‌ها؛ d: بر روی محیط غذایی PDA. c: بر روی گیاه میزبان .e مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

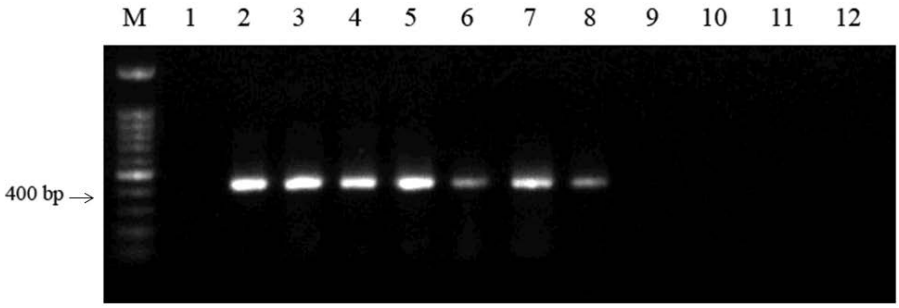
Fig. 2. *Septoria populi*. a: seven-day old colony on PDA. b-c: conidia and conidiophores; b: on host plant. c: on PDA. d-e: conidia; d: on PDA. e: on host plant. Scale bars = 10 µm.

شناسائی مولکولی جدایه‌ها

با توجه به همپوشانی در ویژگیهای ریخت شناختی گونه‌های *Septoria* بویژه دو گونه *S. populi* و *S. populicola* دخیل در بیماری لکه برگی درختان جنس *Populus*و جهت اطمینان از هویت جدایه‌های گونه ای که بر اساس ویژگیهای ریخت‌شناختی شناسائی شده بود تلاش شد تا این جدایه‌ها به روش مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه نیز شناسایی شوند. نتایج حاصل از بررسی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل آگارز نشان داد که جفت آغازگر Spnr و Spnf قطعه‌ای به طول ۴۳۹ جفت باز را برای تمام جدایه‌ها تکثیر نمودند. با این حال، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای تشخیص افتراقی گونه *S. populicola* تکثیری صورت نپذیرفت. بنابراین، گونه *S. populi* به عنوان تنها عامل بیماری سپتوریوز درختان جنس *Populus* در مناطق تحت بررسی شناسایی شد (شکل ۳). در نتیجه می‌توان از این مجموعه آغازگرها در برنامه‌های تعیین دامنه میزبانی عوامل دخیل در سپتوریوز درختان و نیز ردیابی سریع و دقیق این عوامل در سطح گونه استفاده نمود. گونه *S. populi* پیش از این نیز در ایران از روی گونه‌ها مختلف جنس *Populus* مانند (*P. alba* L. سپیدار)، *P. euphratica* Olivier (پده)، و *P.*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- شناسایی جدایه‌های *Septoria* به روش مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه. M = مارکر. ۱ و ۹= شاهد منفی فاقد DNA. ۸-۲: آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر Spnr/Spnf و به ترتیب DNA مربوط به جدایه‌های Ah-c، Mr-s-2-1، Msh-7-B، B-1-3، M-1-5، X-4-A و X-4-4. ۱۲-۱۰: آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر Spopf/Spopr و به ترتیب DNA مربوط به جدایه-های Ah-c، B-1-3 و X-4-A.

Fig. 3. Molecular identification of *Septoria* isolates using species specific primers. M = Marker. 1, 9 = Negative controls without DNA. 2-8: PCR assays using Spnr/Spnf primer pairs and DNA of isolates Ah-c, Mr-s-2-1, Msh-7-B, B-1-3, M-1-5, X-4-A and X-4-4, respectively. 10-12: PCR assays using Spopf/Spopr primer pairs and DNA of isolates Ah-c, B-1-3 and X-4-A, respectively.

nigra (شالک) گزارش شده است (Ershad 2009). باید یادآور شد که برای شناسایی سریع و تائید دقیق هویت گونه‌های قارچی استفاده از روش‌های مولکولی از اهمیت ویژه برخوردار می باشد، بطوریکه *ارزنلو* (۱۳۸۹) برای شناسائی دقیق و سریع سه گونه*Mycosphaerella* بنام‌های *M .fijiensis*, *M. eumusae* و *M .musicola* عوامل لکه برگی موز که از شباهت مورفولوژیکی و علائم بیماری بر روی میزبان از همپوشانی بالائی برخوردار هستند از آغازگرهای اختصاصی برای هر یک از گونه‌های فوق بر اساس توالی بخشی از ژن کدکننده اکتین استفاده کردند و نتیجه گرفتند که آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای هر یک از گونه‌های فوق توانائی تکثیر قطعه مورد نظر و شناسائی گونه مورد نظر را دارند. *فو و همکاران* (۲۰۰۵) نیز توانستند سه گونه *S . musiva*، *S. populicola* و *S. populi*با استفاده از روش‌های مولکولی و طراحی آغازگرهای اختصاصی براساس ناحیه فاصله انداز داخلی DNA ریبوزومی به آسانی مورد شناسائی قرار دهند.

سپاسگزاری

نگارندگان لازم می‌دانند که از همکاری‌های آقای مهندس حسین هاتف کارشناس آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز قدردانی نمایند.

منابع

Arraino L. S., Brading P. A. and Brown J. K. 2001. A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in wheat. Plant Pathology 50: 339-346.

Arzanlou M. 2011. Molecular detection of *Mycosphaerella* species involve in Sigatoka disease complex of banana using species specific primers sets. Iranian Journal of Plant Protection Science 41:207- 216.

Babmorad M., Bagheri-zenouz E. and Yarmand H. 2004. Life- history study of poplar lace bug, *Monosteira unicostata* (Muls. & Rey) Het.: Tingidae in Karaj. Pajouhesh Sazandaghi 62: 71-82.

Callan B. E., Leal I., Foord B., Dennis J. J. and van Oosten C. 2007. *Septoria musiva* isolated from cankered

www.SID.ir

Archive of SID

stems in hybrid poplar stool beds, Fraser Valley, British Columbia. Pacific Pacific Northwest Fungi 2: 1-9.
Cellerino G. P. 1999. Review of fungal diseases in poplar. FAO.
Coyle D. R., Coleman D. M., Durant J. and Newman L. A. 2006. Multiple factors affect pest and pathogen damage on 31 Populus clones in South Carolina. Biomass and Bioenergy 30: 759-768.
Crous P. W., Verkley G. J. M., Groenewald J. Z. and Samson R. A. 2009. Fungal biodiversity. CBS Laboratory Manual Series No. 1. 269 p.
Ershad D. J. 2009. Fungi of Iran. 3rd ed., Iranian Research Institute of Plant Protection. 531 pp.
Feau N., Weiland J. E., Stanos Z. G. R. and Brenier L. 2005. Specific and sensitive PCR-based detection of *Septoria musiva*, *S. populicola* and *S. populi*, the causes of leaf spot and stem canker on poplars. Mycological Research 109: 1015-1028.
Luley C.J. and Mcnabb H. S. J. 1989. Ascospore production, release, germination, and infection of *Populus* by *Mycosphaerella populorum*. Phytopathology 79: 1013-1018.
Maxwell D. L., Kruger E. L. and Stanosz G. R. 1997. Effects of water stress on colonization of poplar stems and excised leaf disks by *Septoria musiva*. Phytopathology 87: 381-388.
Quaedvlieg W., Verkley G. J. M., Shin H. D., Barreto R. W., Alfenas A. C., Swart W. J., Groenewald J. Z. and Crous P. W. 2013. Sizing up *Septoria*. Studies in Mycology 75: 307-390.
Stanosz G. R., Stanosz J. C. and Rousseau R. J. 2002. Hybrid poplar stem cankers caused by *Mycosphaerella populorum* in Kentucky, USA. Plant Pathology 51: 384.
Tavassoli Asgari S., Ghamari zare A., Shahrzad Sh., Khosroshahli M. and Sedaghati M. 2012. Micropropagation of Iranian *Populus alba* species. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 20 (2): 253-260.
Verkley G. J. M., Quaedvlieg W., Shin H. D. and Crous P. W. 2013. A new approach to species delimitation in *Septoria*. Studies in Mycology 75: 213-305.

www.SID.ir