

Rapid Molecular detection of citrus brown spot disease using ACT gene in *Alternaria alternata*

Hamid Moghimi*

Assistant professor in Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran hmoghimi@ut.ac.ir

Amir Moradi

M.Sc. student in Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, moradi@ut.ac.ir

Javad Hamed

Professor of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, jhamed@ut.ac.ir

Abstract

Introduction: Using rapid detection methods is important for detection of plant pathogens and also prevention through spreading pests in agriculture. Citrus brown spot disease caused by pathogenic isolates of *Alternaria alternata* is a common disease in Iran.

Materials and methods: In this study, for the first time a PCR based molecular method was used for rapid diagnosis of brown spot disease. Nine isolates of *A. Alternata* were isolated in PDA medium from different citrus gardens. The plant pathogenic activity was examined in tangerine leaves for isolates. Results showed that these isolates are the agents of brown spot disease. PCR amplification of specific ACT-toxin gene was performed for DNA extracted from *A. alternata* isolates, with 11 different fungal isolates as negative controls and 5 DNA samples extracted from soil.

Results: Results showed that *A. alternata*, the causal agent of brown spot disease, can be carefully distinguished from other pathogenic agents by performing PCR amplification with specific primers for ACT toxin gene. Also, the results from Nested-PCR method confirmed the primary reaction and the specificity of *A. alternata* for brown spot disease. PCR results to control samples of the other standard fungal isolates, showed no amplification band. In addition, PCR with the DNA extracted from contaminated soils confirmed the presence of ACT toxin gene.

Discussion and conclusion: Molecular procedure presented here can be used in rapid identification and prevention of brown spot infection in citrus gardens all over the country.

Key words: Brown spot, Molecular identification, *Alternaria alternata*, ACT toxin

* Corresponding author

Received: September 24, 2014 / **Accepted:** July 4, 2015

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۲، تابستان ۱۳۹۶، صفحه ۸۹-۹۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۱۳

تشخیص مولکولی سریع بیماری لکه قهوه‌ای مرکبات با استفاده از ژن ACT در *Alternaria alternata*

حمید مقیمی*: استادیار میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران، hmoghimii@ut.ac.ir
امیر مرادی: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران، moradi@ut.ac.ir
جواد حامدی: استادیار میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران، jhamedi@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: امروزه استفاده از روش‌های شناسایی سریع عوامل بیماری‌زای گیاهی در پیشگیری از شیوع آفت‌ها در کشاورزی اهمیت بسیاری دارد. بیماری لکه قهوه‌ای از رایج‌ترین بیماری‌های مرکبات در کشور است که جدایه‌های بیماری‌زای *Alternaria alternata* آن را ایجاد می‌کنند.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، برای نخستین بار روش مولکولی مبتنی بر PCR برای تشخیص سریع بیماری لکه قهوه‌ای ارائه شده است. به این منظور، از باغ‌های مرکبات کشور نمونه‌گیری و ۹ جدایه *A. alternata* در محیط PDA حاصل شدند. بررسی فعالیت بیماری‌زایی گیاهی جدایه‌های حاصل روی برگ‌های نارنگی نشان داد که این جدایه‌ها عامل ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای هستند. واکنش PCR برای ژن توکسین اختصاصی ACT روی DNA استخراج‌شده جدایه‌های *A. alternata* همراه با ۱۱ نمونه قارچ غیر از *A. alternata* (شاهد منفی) و ۵ نمونه DNA استخراج‌شده از خاک انجام شد.

نتایج: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با پرایمرهای طراحی شده و انجام PCR اختصاصی روی ژن ACT توکسین، *A. alternata* عامل بیماری لکه قهوه‌ای با دقت زیادی نسبت به انواع غیربیماری‌زا شناسایی می‌شود. نتایج روش PCR آشیانه‌ای نیز تأییدکننده واکنش اولیه و اختصاصی بودن واکنش برای *A. alternata* عامل لکه قهوه‌ای بود. براساس نتایج PCR، برای نمونه شاهد هیچ‌یک از جدایه‌های استاندارد قارچی بجز *A. alternata* باند تکثیری مشاهده نشد. همچنین نمونه DNA استخراج‌شده از خاک باغ‌های آلوده حضور توکسین ACT را تأیید کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: روش مولکولی ارائه‌شده در این پژوهش در تشخیص سریع و پیشگیری از عفونت لکه قهوه‌ای در باغ‌های مرکبات کشور استفاده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: لکه قهوه‌ای، تشخیص مولکولی، *Alternaria alternata*، توکسین ACT

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

آفت‌ها مهم‌ترین چالش و عامل اصلی کاهش محصولات مختلف کشاورزی در دنیا محسوب می‌شوند. امروزه از آفت‌کش‌های شیمیایی مختلف نظیر انواع علف‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها و قارچ‌کش‌ها به‌وفور استفاده می‌شود (۱). از مهم‌ترین مشکلات استفاده از ترکیبات یادشده، مشکلات زیست‌محیطی و سمیت این ترکیبات و نیز مقاوم‌شدن عوامل بیماری‌زا نسبت به آنها هستند. جلوگیری از شیوع بیماری با شناسایی سریع و دقیق عوامل بیماری‌زا در مراحل ابتدایی بیماری و یا پیش از آن از جمله راهکارهای مؤثر برای کاهش میزان استفاده از آفت‌کش‌ها و مشکلات ناشی از مصرف آنها و نیز کاهش میزان هدررفت محصول است. بر اساس این، روش‌های مختلفی پیشنهاد شده که به‌کارگیری روش‌های

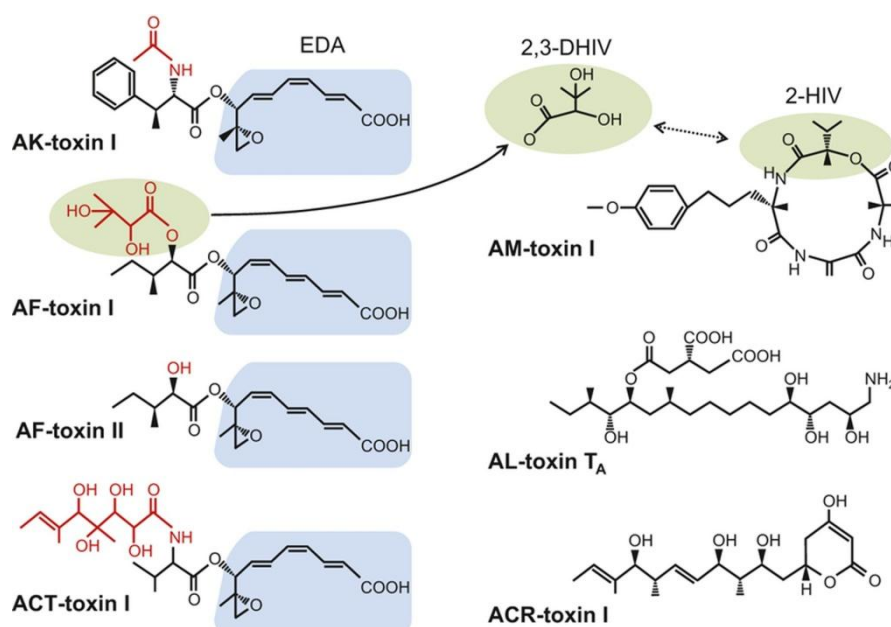
شناسایی مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک و به‌ویژه روش PCR بیشترین توجه و موفقیت را داشته است (۲). عوامل بیماری‌زای قارچی براساس توکسین‌هایی که تولید می‌کنند به دو دسته عوامل بیماری‌زای اختصاصی برای میزبان و انواع غیراختصاصی دسته‌بندی می‌شوند (۳). تا کنون، ۲۰ توکسین اختصاصی میزبان در قارچ‌ها شناسایی شده‌اند که *Alternaria alternata* ۷ نمونه از آنها را تولید می‌کند (۴). جدول ۱، طبقه‌بندی پاتوتایپ‌های گونه *A. alternata* را براساس توکسین‌های اختصاصی نشان می‌دهد؛ جدایه‌های مختلف *A. alternata* با تولید توکسین‌های متفاوت می‌توانند گیاهان مختلف را بیمار کنند و تقسیم‌بندی براساس الگوی تولید توکسین و بیماری‌زایی اختصاصی در گیاه تنها راه تشخیص این جدایه‌ها از یکدیگر است (۵).

جدول ۱- انواع پاتوتایپ‌های تولیدکننده توکسین‌های اختصاصی میزبان در *Alternaria alternata*

منبع	توکسین	پاتوتایپ	میزبان	بیماری
۴	AM توکسین II, I و III	پاتوتایپ سیب	سیب	بیماری لکه سیب
۴	AF توکسین d, II و III	پاتوتایپ توت‌فرنگی	توت‌فرنگی	بیماری لکه سیاه توت‌فرنگی
۷	AK توکسین I و II	پاتوتایپ گلابی ژاپنی	گلابی ژاپنی	بیماری لکه سیاه گلابی ژاپنی
۵ و ۶	ACT توکسین I و II	پاتوتایپ نارنگی	نارنگی	بیماری لکه قهوه‌ای نارنگی
۶ و ۸	ACR توکسین I	پاتوتایپ لیمو	لیمو	بیماری لکه برگ لیمو
۷	AAL توکسین Ta و Tb	پاتوتایپ گوجه	گوجه فرنگی	<i>Alternaria</i> ایجادکننده غده در ساقه گوجه
۶	AT توکسین	پاتوتایپ تنباکو	تنباکو	بیماری لکه قهوه‌ای تنباکو

بیماری لکه قهوه‌ای از بیماری‌های رایج مرکبات به‌ویژه نارنگی در سراسر دنیا است که پاتوتایپ بیماری‌زای نارنگی *A. alternata* آن را ایجاد می‌کند. این بیماری میزان محصول را کاهش می‌دهد و به‌ویژه در کشورهای آفریقای جنوبی، ترکیه، فلسطین اشغالی، ایران، اسپانیا، ایتالیا، یونان، برزیل، آرژانتین، پرو و کلمبیا بسیار گزارش شده است (۵). ACT توکسین اختصاصی و عامل بیماری‌زای اصلی این پاتوتایپ است که روی درخت نارنگی و میوه آن تأثیر می‌گذارد (۳). این توکسین از سه بخش اپوکسی دکاتری‌انوئیک اسید^۱ (EDA)، آمینو اسید والین و یک پلی‌کتاید با همکاری آنزیم‌های مختلف ساخته می‌شود (۶). شکل ۱، تصویر توکسین‌های اختصاصی میزبان از جمله ACT توکسینی را نشان می‌دهد که پاتوتایپ‌های *A. alternata* تولید می‌کنند.

تمام پاتوتایپ‌های *A. alternata* که توکسین اختصاصی میزبان تولید می‌کنند آنامورف بوده و از نظر ریخت‌شناسی بسیار به یکدیگر شبیه هستند (۵). شناسایی نشدن از راه ریخت‌شناسی و ویژگی‌های میکروسکوپی از جمله مشکلات شناسایی پاتوتایپ‌های مختلف *A. alternata* است و دلیل اصلی آن وجود تنها عامل تمایزی ژن‌های تولید توکسین اختصاصی است؛ بر این اساس به‌طور رایج از روش سنجش فعالیت بیماری‌زایی و سنجش زیستی در گیاه میزبان برای شناسایی پاتوتایپ‌های مختلف *A. alternata* استفاده می‌شود که روشی زمان‌بر و همراه با خطاست (۵). امروزه ثابت شده توکسین‌های اختصاصی که این جدایه‌ها روی برگ و میوه گیاه تولید می‌کنند از جمله عوامل ایجاد سرطان در انسان هستند.



شکل ۱- ساختار توکسین‌های اختصاصی میزبان که پاتوتایپ‌های *A. alternata* تولید می‌کنند

بررسی ریخت‌شناسی جدایه‌ها: شناسایی جدایه‌های جنس *Alternaria* با بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌های حاصل از طریق تهیه اسلاید کالچر و رنگ‌آمیزی با لاکتوفنول کاتن بلو زیر میکروسکوپ و براساس کلید شناسایی (۱۰) انجام شد.

سنجش زیستی بیماری‌زایی در گیاه: ابتدا، جدایه‌ها همراه با ۴ نمونه قارچ استاندارد غیربیماری‌زا در محیط PCA کشت شدند. نمونه‌های تشخیص داده شده جنس *Alternaria* ۷ روز در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و سایر نمونه‌های شاهد در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس با اسپورکش، کنیدی‌های قارچ‌ها جمع‌آوری و با لام نئوبار شمارش شدند و غلظت ۱۰^۵ اسپور در میلی‌لیتر در محلول بافر فسفات با اسیدیت ۷ آماده شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول اسپوری آماده‌شده روی برگ‌های جوان و ضدعفونی‌شده نارنگی اسپری و برگ‌های تلقیح‌شده در محفظه‌های دارای رطوبت اشباع قرار داده شدند. برای نمونه شاهد منفی از قارچ‌های استاندارد و غیر از *Alternaria* به‌همراه محلول بافر فسفات به‌تنهایی استفاده شد. پلیت‌های آماده‌شده ۳ روز در تاریکی نگهداری شدند و هر روز از نظر بروز علائم بیماری ارزیابی شدند. سنجش بیماری‌زایی روی برگ‌های نارنگی برای ۲۰ جدایه بیماری‌زا و غیربیماری‌زا در دو آزمایش مستقل و در سه تکرار انجام شد.

استخراج DNA از نمونه‌های جداشده و خالص‌شده:

جدایه‌های حاصل و نمونه‌های شاهد ۴۸ ساعت در محیط PDB^۹ و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و سپس با سانتریفیوژ، میسیلیوم‌های قارچ از محیط کشت جدا شدند. زیست‌توده حاصل با سرم فیزیولوژی شسته شد و سلول‌ها با روش کوییدن

پژوهش‌های میاموتو^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۰ و آجیرو^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند ژن‌های *actts2* و *actts3* که به‌ترتیب کدکننده آنزیم‌های انویل‌ردکتاز^۴ و پلی‌کتایدستناز^۵ هستند فقط در پاتوتایپ تولیدکننده توکسین اختصاصی ACT دیده می‌شوند (۷ و ۸).

براساس اطلاعات موجود، هدف پژوهش حاضر استفاده از ژن *actts2* مولد توکسین ACT به‌عنوان نشانگر مولکولی برای تشخیص مولکولی مبتنی بر PCR قارچ بیماری‌زای گیاهی *A. alternata* عامل بیماری لکه قهوه‌ای در مرکبات است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: ۲۰ نمونه آلوده برگ و میوه نارنگی از مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور در شهر رامسر برای جداسازی جدایه‌های بیماری‌زا جمع‌آوری شد. از عمق ۳ تا ۱۵ سانتی‌متری سطح خاک درختان سالم و بیمار مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور نیز ۵ نمونه برای استخراج DNA از خاک جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

کشت و جداسازی جدایه‌های بیماری‌زا: برای

حذف کردن میکروفلور بومی، برگ‌های نکروزه و بیمار گیاه و بافت‌های آسیب‌دیده با محلول هیپوکلرید سدیم ۵ درصد ضدعفونی سطحی شدند (۹). سپس، نمونه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط کشت PDA^۶ و PCA^۷ کشت و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۷ روز انکوباسیون جدایه، کلنی‌های حاصل خالص و در مجموعه میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران UTMC^۸ ثبت و نگهداری شدند.

طراحی پرایمر و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز:

طراحی پرایمرهای اختصاصی براساس ابتدا و انتهای ژن *actts2* و با نرم‌افزار پرایمر-بلاست^{۱۱} انجام و دمای اتصال پرایمرها ۵۲ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد. همچنین، برای تأیید و شناسایی مولکولی جدایه‌های مثبت و بیماری‌زا از PCR ژن *18S rRNA* به کمک پرایمرهای عمومی این ژن استفاده شد. هر واکنش PCR، حاوی ۲۰۰ نانوگرم DNA به همراه ۲۰ پیکومول از هر پرایمر بود و واکنش PCR برای ژن ACT توکسین در دمای اتصال پرایمر ۵۲ درجه سانتی‌گراد و برای ژن *18S rRNA* در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد انجام شد. جدول ۲، پرایمرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر را نشان می‌دهد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای^{۱۲}: برای تأیید

تکثیر اختصاصی ژن *actts2*، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای با پرایمرهای داخلی طراحی شده و به کمک نرم‌افزار پرایمر-بلاست انجام و دمای اتصال پرایمرها ۵۴ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد؛ ترتیب پرایمرها در جدول ۲ مشاهده می‌شود و طول قطعه‌ای که این دو تکثیر انجام می‌دهند، ۶۶۳ نوکلئوتید در نظر گرفته شد.

زیست‌توده منجمدشده با ازت مایع به شکل فیزیکی شکسته شدند. DNA قارچ از مخلوط سلولی حاصل به روش استخراج فنل و کلروفرم جداسازی شد (۱۱).

استخراج DNA از خاک:

برای بررسی وجود داشتن یا نداشتن قارچ مدنظر، ۵ نمونه خاک جداشده از مناطق مختلف جمع‌آوری و روش زیر برای استخراج DNA از خاک استفاده شد: ۰/۱ گرم خاک در هاون ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافر Z (Na_2HPO_4 ، NaH_2PO_4 ، MgSO_4 ، KCl ، β -مرکاپتواتانول) و ۱۰۰ میلی‌لیتر ازت مایع به آن اضافه و در حالت انجماد کوبیده شد. مخلوط حاصل به داخل ویال منتقل و هم‌وزن نمونه اولیه خاک، گلوله‌های شیشه‌ای (سیگما، آمریکا) به آن اضافه شد؛ ویال ۵ مرتبه و هر بار ۲ دقیقه ورتکس شد. در مرحله بعد، به محلول واکنش ۱ درصد CTAB^{۱۱} اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس، ۱۳۰ میکرولیتر محلول SDS ۲۰ درصد به آن اضافه و ۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. محلول حاصل در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و پروتئین و لیپیدهای سلولی با افزودن فنل و کلروفرم از سوپرناتانت استخراج و DNA باقیمانده با اتانول رسوب داده شد (۱۲).

جدول ۲- پرایمرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر

پرایمر	توالی (5'-3')	اندازه (باز)	ژن هدف
پرایمرهای ژن <i>actts2</i>			
Ac-F	ATGTTGACTCGTCGTGCTCTC	۲۱	<i>ACTTS2</i>
Ac-R	TTAATCGATCTGTACACC	۱۹	<i>ACTTS2</i>
پرایمرهای ژن <i>18S rRNA</i>			
Nu-SSU-0717	TGGAATAATRRAATAGGAGCATTA	۲۴	<i>18S rDNA</i>
Nu-SSU-1536	ATTGCAATGCYCTATCCCCA	۲۰	<i>18S rDNA</i>
پرایمرهای PCR آشیانه‌ای			
Acn-F	CAAAGTCAAAGCTGTAGCC	۱۹	<i>ACTTS2</i>
Acn-R	ATAGGTAGCAGCGCAGTG	۱۸	<i>ACTTS2</i>

alternata استاندارد و بیماری زا در سایر گیاهان استفاده شد و سویه‌های استاندارد قارچی غیر از *Alternaria* نمونه‌های شاهد بودند.

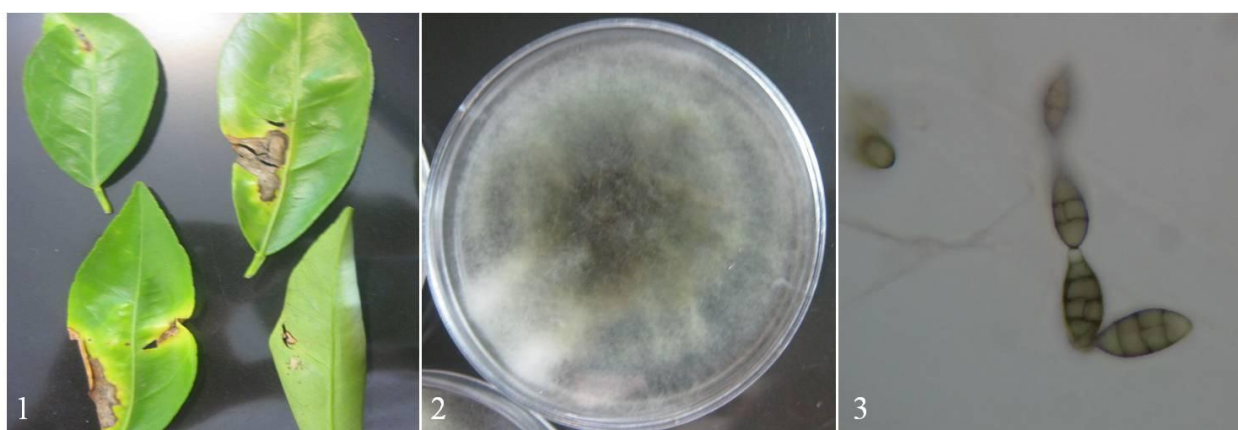
سنجش زیستی بیماری‌زایی جدایه‌ها روی برگ گیاه: برای بررسی توانایی تولید توکسین و قابلیت جدایه‌ها برای ایجاد بیماری در گیاه، آزمایش فیتوپاتوژنسی روی برگ‌های تازه نارنگی با اسپور ۲۰ قارچ مختلف لیست‌شده در جدول ۳ انجام شد. شکل ۳، نتیجه تست بیماری‌زایی تعدادی از جدایه‌ها را روی برگ‌های نارنگی نشان می‌دهد؛ پس از ۵ روز، در برگ‌های شاهد که تنها با بافر اسپری شده بودند و برگ‌های تلقیح‌شده با جدایه‌هایی غیر از *A. alternata* پاتوتایپ نارنگی تغییری مشاهده نشد ولی در برگ‌های تلقیح‌شده با اسپورهای جدایه‌های جداشده از نمونه‌های بیمار تغییر رنگ و بافت برگ و ایجاد بیماری به‌وضوح دیده شد. نتایج سنجش بیماری‌زایی جدایه‌های آزمایش‌شده روی برگ‌های نارنگی در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

توالی‌یابی محصول تکثیرشده: برای بررسی نتایج، محصول تکثیرشده PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی، عکس ژل تهیه شد. همچنین برای توالی‌یابی باندهای مدنظر از ژل با کمک کیت استخراج از ژل (ژل آل-کره جنوبی^{۱۳}) استخراج انجام و به شرکت ماکروژن کره جنوبی^{۱۴} ارسال شد. نتایج تعیین ترادف در بانک ژنی و از طریق هم‌ردیفی توالی ارزیابی شدند.

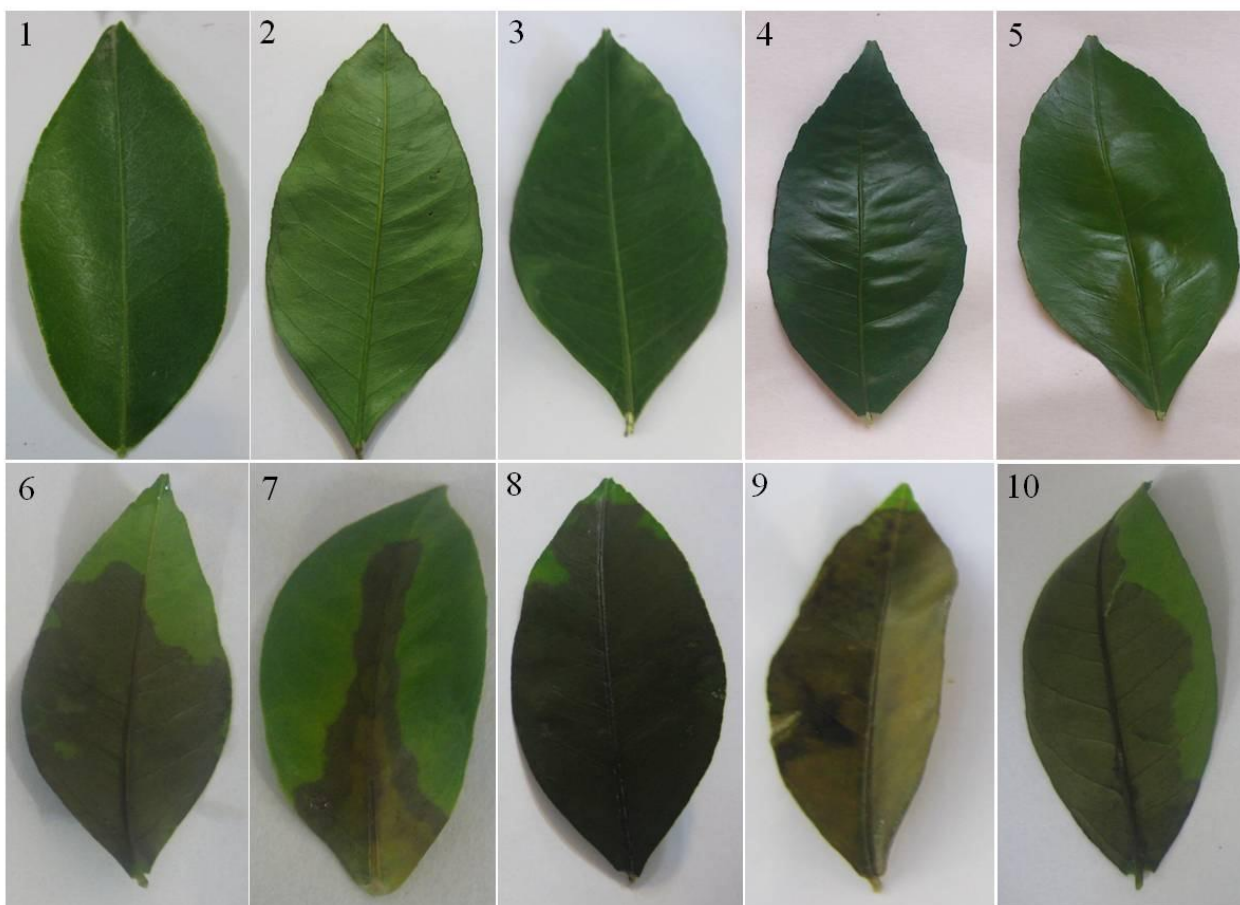
نتایج

کشت و جداسازی جدایه‌های قارچی بیماری‌زا: در

مرحله جداسازی قارچ بیماری‌زا، ۱۵ جدایه حاصل شد که پس از مشاهدات میکروسکوپی و بررسی ویژگی‌های کلنی و شناسایی مولکولی، ۹ نمونه از آنها به‌عنوان *A. alternata* شناسایی شدند. شکل ۲، ریخت‌شناسی کلنی در محیط PDA و تصویر میکروسکوپی یکی از جدایه‌ها را نشان می‌دهد. جدایه‌های حاصل در مجموعه میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران ثبت و نگهداری شدند. از سویه *A.*



شکل ۲-۱- برگ‌های بیمار گیاه نارنگی استفاده‌شده برای جداسازی *Alternaria*، ۲. میسلیم‌های رشد‌کرده قارچ *A. alternata* روی پلیت‌های PDA پس از ۷ روز انکوباسیون، ۳. کئیدی‌های *A. alternata* زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰

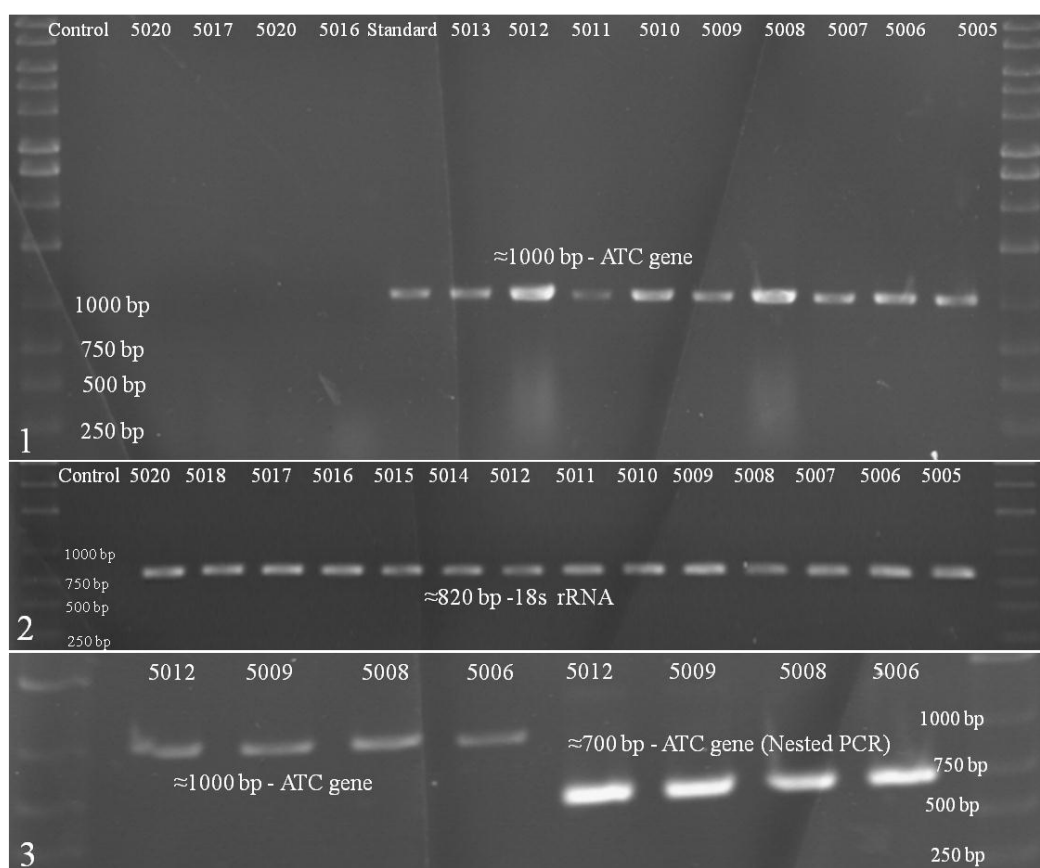


شکل ۳- نتایج حاصل از سنجش بیماری‌زایی روی برگ‌های نارنگی پس از ۵ روز؛ ۱. برگ اسپری‌شده با بافر به‌تنهایی، ۲. برگ اسپری‌شده با *A. alternata*، ۳. برگ اسپری‌شده با *A. alternata* UTMC 5014 (پاتوتایپ گلابی)، ۴. برگ اسپری‌شده با *Aspergillus niger* UTMC 5014 (پاتوتایپ گلابی)، ۵. برگ اسپری‌شده با *Fusarium oxysporum* UTMC 5019، ۶. برگ اسپری‌شده با *A. alternata* UTMC 5005 (پاتوتایپ نارنگی)، ۷. برگ اسپری‌شده با *A. alternata* UTMC 5006 (پاتوتایپ نارنگی)، ۸. برگ اسپری‌شده با *A. alternata* UTMC 5009 (پاتوتایپ نارنگی)، ۹. برگ اسپری‌شده با *A. alternata* UTMC 5010 (پاتوتایپ نارنگی) و ۱۰. برگ اسپری‌شده با *A. alternata* UTMC 5012 (پاتوتایپ نارنگی)

سایر قارچ‌های شاهد غیر از *A. alternata* منفی بود و هیچ تکثیری مشاهده نشد. تعیین توالی محصول PCR حاصل از ژن *actts2* و انجام هم‌ردیفی آن در بانک ژنی نشان داد که محصول حاصل ژن مولد توکسین ACT بوده و توالی حاصل با شماره دسترسی KM198326 در بانک ژنی به ثبت رسید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و PCR آشیانه‌ای ۱۵ با

پرایمرهای اختصاصی ژن ACT توکسین: در شکل ۴-۱ نتایج واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن ACT توکسین در ۱۴ نمونه مشاهده می‌شود. نتیجه PCR برای ۸ جدایه بیماری‌زا و ۲ نمونه خاک، حضور یک باند ۱۰۰۰ نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد. نتیجه PCR ژن اختصاصی *actts2* برای پاتوتایپ‌های سیب، گوجه، لیمو و گلابی *A. alternata* و همچنین



شکل ۴-۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR ژن *actts2* در تعدادی از جدایه‌های آزمایش شده، ۲. تصویر محصول تکثیر شده PCR مربوط به ژن *18S rRNA* و نام کامل جدایه در جدول ۳ آورده شده است. نمونه‌های خاک نیز با S_1 تا S_5 نشانه‌گذاری شده‌اند. شکل ۴-۲- نتیجه انجام PCR ژن *18S rRNA* با پرایمرهای nu-SSU-0817 و nu-SSU-1536 را برای تعدادی از جدایه‌های آزمایش شده روی ژل ۱ درصد آگارز نشان می‌دهد. تکثیر ژن *18S rRNA* در این جدایه‌ها، شاهد مثبت واکنش PCR و کیفی بودن نمونه‌های DNA استخراج شده از جدایه‌های مختلف در نظر گرفته شد و درستی شناسایی جدایه‌ها با تعیین ترادف ژن تکثیر شده در نمونه‌های جداسازی شده و انطباق توالی با بانک ژنی تأیید شد. شکل ۴-۳- نتایج حاصل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای با پرایمرهای طراحی شده در قسمت داخلی ژن *actts2* برای چهار جدایه مثبت *A. alternata* پاتوتایپ نارنگی را نشان می‌دهد. طبق انتظار واکنش انجام شده، قطعه‌ای به طول ۶۶۳ نوکلئوتید تکثیر شد که بسیار اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

جنس *Alternaria* دارای گونه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا است. ۷ سویه از *A. alternata* که به سویه‌های Keissler شهرت دارند قابلیت تولید مایکوتوکسین‌های اختصاصی گیاه را دارند و نمی‌توان آنها را براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی تشخیص داد (۸)؛ به همین دلیل، این سویه‌ها به نام پاتوتایپ‌های مختلف *A. alternata* شناخته می‌شوند. این پاتوتایپ‌ها

میزبان‌های محدودی دارند و براساس توکسین‌های اختصاصی طبقه‌بندی می‌شوند که در آنها برای ایجاد بیماری ضروری هستند (۳).
به‌طور کلی، پذیرش عمومی برای دسته‌بندی پاتوتایپ‌های تولیدکننده توکسین اختصاصی میزبان در *A. alternata* وجود ندارد (۱۳ و ۱۴) و دلیل این امر، طبقه‌بندی براساس ریخت‌شناسی کندی است که برای تشخیص پاتوتایپ‌ها ناتوان است (۸).

جدول ۳- فهرست جدایه‌های استفاده‌شده در آزمایش بیماری‌زایی روی برگ‌های نارنگی و نتیجه حاصل از انجام واکنش PCR روی ژن *actts2* آنها

نوع قارچ	پاتوتایپ	نوع بیماری	توکسین اختصاصی	بیماری‌زایی در گیاه نارنگی	PCR
<i>A. alternata</i> (UTMC 5005)	نارنگی	لکه قهوه‌ای	ACT توکسین	+	+
جدایه ۱ (UTMC 5006)	نارنگی	لکه قهوه‌ای	ACT توکسین	+	+
جدایه ۲ (UTMC 5007)	نارنگی	لکه قهوه‌ای	ACT توکسین	+	+
جدایه ۳ (UTMC 5008)	نارنگی	لکه قهوه‌ای	ACT توکسین	+	+
جدایه ۴ (UTMC 5009)	نارنگی	لکه قهوه‌ای	ACT توکسین	+	+
جدایه ۵ (UTMC 5010)	نارنگی	لکه قهوه‌ای	ACT توکسین	+	+
جدایه ۶ (UTMC 5011)	نارنگی	لکه قهوه‌ای	ACT توکسین	+	+
جدایه ۷ (UTMC 5012)	نارنگی	لکه قهوه‌ای	ACT توکسین	+	+
جدایه ۸ (UTMC 5013)	نارنگی	لکه قهوه‌ای	ACT توکسین	+	+
<i>A. alternata</i> (UTMC 5016)	سیب	خال و لکه سیب	توکسین AM	-	-
<i>A. alternata</i> (UTMC 5015)	گوجه	خوره ساقه گوجه	توکسین AAL	-	-
<i>A. alternata</i> (UTMC 5017)	لیمو	لکه برگ لیمو	توکسین ACR	-	-
<i>A. alternata</i> (UTMC 5014)	گل‌ابی	لکه سیاه	توکسین AK	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> (UTMC 5019)	گوجه فرنگی	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> (UTMC 5020)	-	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i> (UTMC 5022)	لوبیا	-	-	-	-
<i>Ulocladium Sp</i> (UTMC 5018)	-	-	-	-	-
<i>Fusarium equiseti</i> (UTMC 5001)	-	-	-	-	-
<i>Metarhizium anisopliae</i> (UTMC 5002)	-	-	-	-	-
<i>Phaeosphaeria Sp</i> (UTMC 5003)	-	-	-	-	-
نمونه خاک ۱	-	-	-	-	-
نمونه خاک ۲	-	-	-	-	+
نمونه خاک ۳	-	-	-	-	-
نمونه خاک ۴	-	-	-	-	-
نمونه خاک ۵	-	-	-	-	+

در خاک وجود داشته باشد می‌توان حضور آن را ثابت کرد (شکل ۴). براساس نتایج بررسی DNA حاصل از خاک، دو نمونه خاک حضور ژن *actts2* را نشان دادند و ۳ نمونه حضور ژن مدنظر را نشان ندادند. این نتایج نشان داد که می‌توان حضور میکروارگانیسم بیماری‌زا در خاک را با این روش تشخیص داد و این نتیجه می‌تواند در پیشگیری از گسترش بیماری در مراحل ابتدایی شیوع آن مفید باشد. گفتنی است که نمونه‌های قارچی نسبت به نمونه‌های خاک با دقت بیشتری حضور عامل بیماری لکه قهوه‌ای را نشان می‌دهند.

References

- (1) Bull D. *A growing problem: pesticides and the Third World poor*. Oxford: 1982.
- (2) Henson JM., French RC. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 1993; 31(1): 81-109.
- (3) Tsuge T., Harimoto Y., Akimitsu K., Ohtani K., Kodama M., Akagi Y., et al. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS microbiology reviews* 2013; 37(1): 44-66.
- (4) Walton JD. Host-selective toxins: agents of compatibility. *The plant cell* 1996; 8(10): 1723-1733.
- (5) Johnson R., Johnson L., Kohmoto K., Otani H., Lane C., Kodama M. A polymerase chain reaction-based method to specifically detect *Alternaria alternata* apple pathotype (*A. mali*), the causal agent of *Alternaria* blotch of apple. *Phytopathology* 2000; 90(9): 973-976.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که PCR با پرایمرهای ژن *actts2* می‌تواند به‌طور اختصاصی در تشخیص پاتوتایپ نارنگی استفاده شود. همچنین، برای تشخیص مولکولی سویه‌های بیماری‌زای *A. alternata* نیز تلاش‌هایی انجام شده است؛ برای مثال، کونیناگا^{۱۶} و همکاران نشان دادند که هیبرید کردن DNA با DNA بین سویه‌های *A. alternata* غیربیماری‌زا و سویه‌های تولیدکننده توکسین ارتباط نزدیکی وجود دارد (۱۵). همچنین آنالیزهای RFLP بین سویه‌های تولیدکننده توکسین اختصاصی میزبان و گونه‌های غیربیماری‌زا نشان داد که با این روش نمی‌توان گونه‌های مختلف را از یکدیگر جدا کرد (۱۶). نتایج تکثیر نواحی ITS نیز در تشخیص پاتوتایپ‌ها ناتوان بود (۱۷). نمونه‌های موفقی نیز گزارش شده است؛ برای مثال، امباگا^{۱۷} و همکاران در سال ۲۰۱۱ از PCR نواحی ITS برای تشخیص *A. alternata* عامل بیماری از انواع غیربیماری‌زا در گیاه یاس خوشه‌ای استفاده کردند (۱۸). در سال ۲۰۰۰ نیز در پژوهش جانسون^{۱۸} و همکاران *A. alternata* پاتوتایپ سبب به‌شکل اختصاصی با PCR و پرایمرهای اختصاصی برای AM-toxin شناسایی شد (۵). در مطالعه دیگری که با روش RAPD-PCR و مقایسه الگوی DNA بین پاتوتایپ‌های مختلف *A. alternata* انجام شد، ۵ الگوی مختلف با میزان شباهت بیش از ۸۵ درصد گزارش شد (۱۹). براساس نتایج جدول ۳ و شکل ۴ می‌توان گفت که انجام PCR روی ژن *actts2* کاملاً اختصاصی بوده و با این روش می‌توان به‌آسانی پاتوتایپ‌های *A. alternata* مولد بیماری در سیب، گلابی، لیمو و گوجه‌فرنگی را از پاتوتایپ نارنگی و همچنین سایر انواع قارچ‌ها تشخیص داد. همچنین، براساس نتایج DNA خاک، چنانچه سویه مولد بیماری

- (6) Kohmoto K., Itoh Y., Shimomura N., Kondoh Y., Otani H., Kodama M., et al. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 1993; 83(5): 495-502.
- (7) Ajiro N., Miyamoto Y., Masunaka A., Tsuge T., Yamamoto M., Ohtani K., et al. Role of the host-selective ACT-toxin synthesis gene *actts2* encoding an enoyl-reductase in pathogenicity of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 2010; 100(2): 120-126.
- (8) Miyamoto Y., Masunaka A., Tsuge T., Yamamoto M., Ohtani K., Fukumoto T., et al. *actts3* encoding a polyketide synthase is essential for the biosynthesis of ACT-toxin and pathogenicity in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular plant-microbe interactions* 2010; 23(4): 406-414.
- (9) Hamed J., Moghimi H., Papiran R., Mohammadipanah F. Screening of phytotoxic activity and *nlp* genes from rhizosphere actinomycetes. *Annals of Microbiology* 2014; 1-6.
- (10) Watanabe T. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor and Francis; 2010.
- (11) Green MR., Sambrook J. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
- (12) Zhou J., Bruns MA., Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and environmental microbiology* 1996; 62(2): 316-322.
- (13) Nishimura S., Kohmoto K. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual Review of Phytopathology* 1983; 21(1): 87-116.
- (14) Nishimura S., Sugihara M., Kohmoto K., Otani H. Two different phases in pathogenicity of the *Alternaria* pathogen causing black spot disease of Japanese pear. *Journal of the Faculty of Agriculture, Tottori University* 1978; 13(1): 1-10.
- (15) Kuninaga S., Yokosawa R. Studies on the taxonomy of plant pathogenic fungi by a comparison of DNA homology. I. Genetic relatedness among species in the genus *Alternaria*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 1987; 53(1): 368-369.
- (16) Kusaba M., Tsuge T. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins. *Applied and environmental microbiology* 1994; 60(9): 3055-3062.
- (17) Kusaba M., Tsuge T. Phology of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics* 1995; 28(5): 491-498.
- (18) Mmbaga MT., Kim MS. Identification of *Alternaria alternata* as a causal agent for leaf blight in *Syringa* species. *The Plant Pathology Journal* 2011; 27(2): 120-127.
- (19) Kakvan N., Zamanizadeh H., Morid B., Taheri H., Hajmansor S. Study on pathogenic and genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from citrus hybrids of Iran, based on RAPD-PCR technique. *European Journal of Experimental Biology* 2012; 2(3):570-576.

¹- Epoxy-decatrienoic acid

²- Miyamoto

³- Ajiro

⁴- Enoyl reductase

⁵- Polyketide synthase

⁶- Potato Dextrose Agar

⁷- Potato Carrot Agar

⁸- University of Tehran Microorganisms Collection

⁹- Potato Dextrose Broth

¹⁰- Cetyltrimethylammonium bromide

¹¹- Primer-BLAST

¹²- Nested PCR

¹³- Gene all, South Korea

¹⁴- Macro gene, South Korea

¹⁵- Nested PCR

¹⁶- Kuninaga

¹⁷- Mmbaga

¹⁸- Johnson