تعیین پاتوتیپ‌های قارچ *Verticillium dahliae* عامل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی در باغات زیتون طارم با استفاده از تکنیک Nested-PCR

حسین جعفری[1*]، سحر خان محمدی[2] و نسترن مهری[3]

[1] عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان
[2] کارشناس ارشد مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان خرمدره
[3] دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
[*] مسئول مکاتبه hjafaryir@yahoo.com

تاریخ دریافت: 92/04/22 تاریخ پذیرش: 92/12/21

چکیده

پژمردگی ورتیسیلیومی یکی از بیماری‌های مهم زیتون می‌باشد که توسط گونه *Verticillium dahliae* ایجاد می شود. عامل بیماری با تخریب آوندها باعث خشکیدگی شاخه‌ها، کاهش عملکرد و در نهایت مرگ درختان بیمار می‌شود. جدایه‌های قارچ عامل بیماری، با وجود تشابه ظاهری، از نظر علایم و شدت بیماری‌زایی در دو گروه متمایز تحت عنوان پاتوتیپ‌های برگ‌ریز (Defoliating) و غیر برگ‌ریز (Non-defoliating) دسته بندی می‌شوند. شناخت پاتوتیپ‌های قارچ *V. dahliae* دارای اهمیت زیادی در تعیین استراتژی کنترل بیماری با استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. برای شناسایی پاتوتیپ‌های این قارچ، از درختان زیتون مشکوک به پژمردگی ورتیسیلیومی در منطقه طارم در استان زنجان نمونه برداری شد. با استفاده از روش‌های معمول کشت و خالص سازی قارچ‌ها، تعداد 12 جدایه قارچ ورتیسیلیوم از ساقه‌های آلوده درختان زیتون جداسازی گردید. متعاقباً DNA کل از میسلیوم و نیز از نهال‌های مایه‌زنی شده با جدایه قارچی استخراج گردید و واکنش‌های PCR معمولی و Nested-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای دو نوع پاتوتیپ انجام شد. با توجه به طول قطعات DNA تکثیر یافته، از بین 12 جدایه قارچ ورتیسیلیوم جداسازی شده بیشتر آنها (تعداد 11 جدایه) از نوع پاتوتیپ غیر برگ‌ریز و تنها یک جدایه از نوع برگ‌ریز تعیین شد. براین اساس پاتوتیپ غیر برگ‌ریز از بیشترین فراوانی و توزیع در مناطق زیتون‌کاری طارم برخوردار است. نتایج این تحقیق نشان داد که به دلیل حساسیت بالای روش Nested-PCR در فاصله زمانی کوتاهی پس از مایه زنی می‌توان قارچ عامل بیماری را در روی ریشه نهال‌های آلوده زیتون ردیابی و پاتوتیپ آن را تعیین نمود.

لغات کلیدی: زیتون، پژمردگی ورتیسیلیومی، پاتوتیپ برگ‌ریز، پاتوتیپ غیربرگ‌ریز، تکنیک Nested-PCR

مقدمه

زیتون با نام علمی *Olea europaea* L. از خانواده Oleaceae و راسته Terebinthales می‌باشد که در نقاط مختلف دنیا به عنوان یک محصول باغی با ارزش کشت می‌شود. بر اساس آمار موجود، استان زنجان از نظر مساحت باغات بارور و تولید زیتون رتبه اول را در کشور به خود اختصاص داده است. در حال حاضر سطح زیر کشت زیتون در شهرستان طارم در استان زنجان بالغ بر 16000 هزار هکتار (سطح زیرکشت درختان بارور معادل 6700 هکتار) و میزان تولید آن بالغ بر26800 تن می‌باشد (آمارنامه کشاورزی 1389). بیماری پژمردگی ورتیسلیومی یکی از بیماری‌های مهم قارچی زیتون است که دارای اهمیت جهانی است (موارفاق 2006).

قارچ عامل بیماری *Verticillium dahliae* Kleb. دارای دامنه میزبانی وسیعی است و علاوه بر زیتون روی میزبان‌های مختلف دیگری مانند پنبه، سیب زمینی، هلو، زرد آلو، بادام نیز بیماری‌زا می‌باشد. علایم بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی شامل پژمردگی، زردی، کوتولگی، نکروز و زردی رگبرگ‌ها است (گایوسو و همکاران 2007).

آلودگی درخت‌های زیتون به این بیماری برای اولین بار در ایران توسط رهنما و همکاران (1377) در استان گلستان و در روی درخت‌های موجود در ایستگاه تحقیقات هاشم آباد گرگان مشاهده گردید. متعاقبا وقوع بیماری در سال 1379 در منطقه طارم گزارش شد (افشاری آزاد و همکاران 1379).

جدایه‌های قارچ *V. dahliae* در میزبان‌های مختلف دارای تفاوت‌های ظاهری، تفاوت در بیماری‌زایی و نیز تنوع ژنتیکی هستند. تاکنون روش‌های مختلفی برای تفکیک و شناسایی جدایه‌های مختلف این قارچ در میزبان‌های مختلف به‌کار برده شده است. جدایه‌های این قارچ اغلب به وسیله ویژگی‌های اختصاصی فیزیولوژیکی، گروه‌های سازگار رویشی و آزمون‌های بیماری‌زایی متمایز شده‌اند (بات و سوبارائو1999، دیف و همکاران 1995). روش‌های فوق معمولا زمان‌بر بوده و از دقت کمی در تشخیص جدایه‌های قارچ برخوردارند (مرکادو-بلانکو و همکاران 2001). در سال‌های اخیر با توجه به معایب روش‌های معمول، تکنیک‌های مولکولی متعددی با سرعت و دقت بالا در شناسایی، توصیف و کمیت سنجی جدایه‌های قارچ *V. dahliae* در میزبان‌های مختلف توسعه یافته است. جدایه‌های این قارچ در روی پنبه با استفاده از تکنیک های مبتنی بر واکنش زنجیری پلیمراز (Polymerase PCR = Chain Reaction) به دو دسته برگ‌ریز (D = Defoliating) و غیر برگ‌ریز (ND = Non defoliating) تفکیک شده است (پرز-آرتس و همکاران 2000).

علایم بیماری ایجاد شده توسط جدایه‌های متعلق به پاتوتیپ D شدید تر از ND است و ممکن است منجر به مرگ گیاهان آلوده شود (مرکادو-بلانکو و همکاران 2002). چنین طبقه‌بندی امروزه در مورد جدایه‌های زیتون نیز معتبر می‌باشد. این دو دسته (برگ‌ریز و غیر برگ‌ریز) در تقسیم بندی‌های پایین‌تر از گونه به عنوان پاتوتیپ مورد استناد قرار می‌گیرند و در واقع فرم‌هایی از گونه *V. dahliae* هستند که از نظر خصوصیات ریخت شناسی شباهت زیادی به هم داشته ولی از نظر ایجاد علایم بر روی زیتون دارای تفاوت‌های مشخصی با یکدیگر هستند (مرکادو-بلانکو و همکاران 2002).

در یک تحقیق، از گروه‌های سازگار رویشی، نشانگرهای ملکولی و آغازگرهای اختصاصی پاتوتیپ های D وND در واکنش‌های PCR برای مطالعه ساختار ژنتیکی و بیماری‌زایی جمعیت‌های *V.dahliae* در روی زیتون استفاده شد. نتیجه این تحقیق نشان داد که استفاده از تکنیک‌های مولکولی با سرعت و دقت بیشتری قادر است تا پاتوتیپ‌های D و ND را متمایز نماید (بل احسن و همکاران 2005).

شناخت پاتوتیپ‌های قارچ *V. dahliae* دارای اهمیت زیادی در تعیین استراتژی کنترل بیماری، خصوصاً در

استفاده از ارقام مقاوم، است. علاوه بر این می‌تواند در جلوگیری از انتشار پاتوتیپ D به مناطق دیگر، و به خصوص در مناطق عاری از قارچ *V. dahliae* کمک شایانی بنماید (مرکادو-بلانکو و همکاران 2002). در روش‌های معمول شناسایی پاتوتیپ قارچ، از بررسی علایم بیماری، چگونگی شروع بیماری و توسعه آن در روی میزبان و نیز عکس‌العمل میزبان نسبت به بیماری برای تعیین پاتوتیپ استفاده می‌شود. تعیین پاتوتیپ *V. dahliae*، هم‌چنین ممکن است با استفاده از ویژگی‌هایی نظیر دمای مناسب برای رشد میسلیوم، سرعت جوانه زنی کنیدی‌ها و تولید میکرواسکلروت در آزمون‌های بیماری‌زایی انجام گردد. با این حال روی میزبان‌هایی مانند زیتون، بروزعلایم پژمردگی به وسیله آلودگی‌های مصنوعی ممکن است به چندین ماه زمان نیاز داشته باشد. از طرف دیگر علایم بیماری ممکن است تحت تاثیر عوامل محیطی و رقم در آزمون‌های بیماری‌زایی قرار گرفته و بسیار متغیر باشد (مرکادو-بلانکو و همکاران 2001).

در حال حاضر آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی جدایه‌های *V. dahliae* با استفاده از واکنش PCR طراحی شده‌اند که بررسی وجود آلودگی به قارچ ورتیسیلیوم در روی ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی را امکان‌پذیر می‌سازد (اوسامی و همکاران 2002). نوعی از PCR برای شناسایی اختصاصی پاتوتیپ-های *V. dahliae* در پنبه و زیتون به نام Nested-PCR معرفی شده است که در آن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی داخلی و خارجی پاتوتیپ‌های D و ND از هم دیگر متمایز می‌شوند (مرکادو-بلانکو و همکاران 2002). به نظر می‌رسد استفاده از روش‌های مولکولی برای تعیین پاتوتیپ قارچ عامل بیماری روش جایگزین مناسبی برای روش‌های متداول تعیین پاتوتیپ باشد. با استفاده از روش‌های ملکولی، در یک مدت زمانی کوتاه و تنها با استفاده از مقدار اندکی DNA قارچ می‌توان پاتوتیپ قارچ عامل بیماری را مشخص نمود (مرکادو-بلانکو و همکاران 2001).

هدف از انجام این تحقیق تعیین پاتوتیپ‌های جدایه‌های قارچ *V. dahliae* جداسازی شده از روی زیتون از منطقه طارم با استفاده از تکنیک Nested-PCR می‌باشد تا بتوان از نتایج آن در برنامه‌های مدیریت بیماری، به خصوص جهت غربالگری مقاومت به بیماری استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، کشت و اثبات بیماری‌زایی

نمونه‌برداری از سرشاخه‌ها و ساقه‌های مشکوک به آلودگی با داشتن علایمی مانند پژمردگی، سبز خشک شدن، ریزش برگ‌ها و قهوه‌ای شدن آوندی از باغات زیتون شهرستان طارم در طول سال‌های 90-87 انجام گرفت.

پس از ضدعفونی سطحی، قطعاتی به طول تقریبی حدود سه سانتی‌متر از چوب شاخه‌های آلوده تهیه و سپس با هیپوکلریت سدیم تجاری و آب مقطر (1:9) به مدت دو دقیقه ضدعفونی سطحی شد. سپس به‌وسیله قیچی ضدعفونی شده بالا و پایین نمونه‌ها را بریده و باقی مانده نمونه‌های فاقد پوست به شکل مثلثی به قطعات کوچکتر تقسیم شده و به محیط کشت Czapek Dox agar منتقل و در شرایط تاریکی و دمای 24 درجه سانتی‌گراد به مدت 12 روز نگهداری شدند. محیط کشت فوق از مواد زیر و بر اساس روش پیشنهادی کیم و همکاران (2005) تهیه شد: مقدار 0/1 گرم سولفات آهن، 5/. گرم کلرید پتاسیم، 5/. گرم سولفات منیزیم، 2 گرم نیترات سدیم و 1 گرم فسفات پتاسیم را در 1 لیتر آب دیونیزه حل کرده و به مدت 15 دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد. پس از سرد شدن 30 گرم سوکروز و 15 گرم آگار اضافه گردید. بعد از رشد کلنی‌های قارچ عامل بیماری در اطراف قطعات ساقه کشت شده، جهت خالص سازی از روش تک اسپور استفاده شد.

برای اثبات بیماری‌زایی از نهال‌های هفت ماهه رقم زرد موجود در ایستگاه تحقیقات زیتون طارم استفاده شد. برای هر یک از جدایه‌های قارچ تعداد شش نهال گلدانی برای مایه زنی و سه نهال نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سه نهال از مجموع شش نهال برای کشت قطعات ریشه و سه نهال دیگر برای جدا سازی DNA کل (DNA ریشه و قارچ) انتخاب گردید. برای اثبات بیماری‌زایی از پنج جدایه قارچ استفاده شد. از کشت هفت روزه قارچ برای تهیه سوسپانسیون اسپور استفاده گردید. برای این منظور از کشت‌های خالص قارچ یک قطعه به قطر پنج میلی‌متر را برداشته و در ارلن‌های 250 میلی لیتری که هر یک محتوی 150 میلی لیتر محیط کشت مایع (عصاره سیب زمینی+ قند دکستروز) استریل شده بودند اضافه و به مدت سه روز روی شیکر با سرعت 120 دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس محتویات هر ارلن با استفاده از پارچه ململ استریل صاف گردید. پس از آن با استفاده از لام گلبول‌شمار تراکم اسپورها تعیین و از سوسپانسیون اسپور 10^7 برای مایه زنی استفاده شد. برای این منظور ابتدا قلمه‌های هفت ماهه زیتون به آرامی از پرلیت خارج گردید و ریشه‌های آن به آرامی درون بشر حاوی سوسپانسیون اسپور قارچ به مدت 20 دقیقه قرار داده شد. سپس نهال‌ها به درون گلدان‌های جدید حاوی خاک استریل منتقل و بلافاصله آبیاری گردید. آبیاری نهال‌ها در هفت روز اول به تعداد دو بار در روز و بعد از این مدت دو روز یکبار انجام گردید. نهال‌های شاهد نیز به مدت 20 دقیقه در آب مقطر فرو برده شدند. چهار و هشت هفته بعد از نگهداری نهال ها در دمای 30-25 درجه سانتی‌گراد و رطوبت حدود 70-60 درصد از ریشه و ساقه نهال‌های مایه زنی شده و شاهد قطعاتی برش داده شد و در محیط کشت Czapek Dox agar کشت گردید.

استخراج DNA از جدایه‌های قارچ *V. dahliae* و ریشه نهال های مایه زنی شده

برای استخراج DNA از جدایه‌های قارچ، از روش بی و همکاران (1996) استفاده شد. پس از استخراج DNA از تعداد 12جدایه قارچ، کمیت آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین شد. همچنین بررسی کیفیت DNA قارچ نیز روی ژل آگارز 1% انجام گرفت.

مراحل نمونه‌برداری و استخراج DNA از ریشه نهال‌های مایه زنی شده با استفاده از روش پیشنهادی مرکادو- بلانکو و همکاران (2002) انجام شد با این تفاوت که به جای کیت از بافر استخراج CTAB استفاده شد.

تعیین پاتوتیپ (های) قارچ *V. dahliae*

پس از استخراج DNA از جدایه‌های قارچ *V. dahliae* و نیز از ریشه نهال‌های زیتون استفاده شده برای اثبات بیماری‌زایی، واکنش PCR ابتداء با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پاتوتیپ D انجام گرفت (مرکادو-بلانکو و همکاران 2002). توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR در جدول 1 آمده است.

هر دو جفت این آغازگرها قطعاتی از ژنوم پاتوتیپ D قارچ *V. dahliae* را در PCR تکثیر می‌کنند. جفت اول (VD1F/VD1R) در واکنش PCR منفرد 548 جفت باز و جفت دوم (INTD2R/INTD2F) در Nested- PCR قطعه‌ای به طول 462 جفت باز تولید می‌کند (مرکادو-بلانکو و همکاران 2002). سنتزآغازگرها (جدول 1) در شرکت Biolegio BV هلند انجام شد و کلیه مواد مورد نیاز برای PCR از شرکت سیناژن تهیه شد.

اجزا و میزان مواد مورد نیاز در یک واکنش شامل: DNA ژنومی با غلظت ng/µl 20-10 به میزان دو میکرولیتر، آغازگر اختصاصی با غلظت 20µMol به میزان µl 0/75 ، $MgCl_2$ با غلظت 50µMol به میزان µl 1/25، dNTP با غلظت 10mMol به میزان µl 0/5، بافر PCR به میزان µl 2/5 میکرولیتر بود که در نهایت با

اضافه کردن آب مقطر یون گرفته شده به میزانμl 17/8حجم نهایی به 25 میکرولیتر رسید.

جدول 1- توالی آغازگرهای اختصاصی پاتوتیپ برگ‌ریز مورد استفاده در واکنش PCR

اسامی آغازگر	توالی آغازگر
VD1R	5′-GACACGGTATCTTTGCTGAA -3′
VD1F	5′- CATGTTGCTCTGTTGACTGG -3′
INTD2F	5- ACTGGGTATGGATGGCTTTCAGGACT-3′
INTD2R	5′-TCTCGACTATTGGAAAATCCAGCGAC-3′

برنامه حرارتی مورد استفاده شامل: مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه (یک چرخه)، مرحله واسرشت سازی در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای 58 درجه به مدت یک دقیقه و بسط در دمای 72 درجه به مدت یک دقیقه (30 چرخه)، مرحله بسط نهایی در دمای 72 درجه به مدت شش دقیقه (یک چرخه) و نگهداری در دمای چهار درجه بود.

واکنش Nested-PCR با استفاده از یک میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول و برنامه حرارتی به شرح زیر انجام شد: مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه (یک چرخه)، مرحله واسرشت سازی در دمای 94 درجه به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای 64 درجه به مدت یک دقیقه و بسط در دمای 72 درجه به مدت یک دقیقه (30 چرخه)، مرحله بسط نهایی در دمای 72 درجه به مدت شش دقیقه (یک چرخه) و نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد.

اجزا و میزان مواد مورد نیاز برای آزمون Nested-PCR همانند PCR مرحله اول است که در بالا شرح داده شد با این تفاوت که جفت آغازگرهای INTD2F و INTD2R در Nested- PCR مورد استفاده قرار گرفت (مرکادو-بلانکو و همکاران 2002).

برای پاتوتیپ ND، از آغازگرهای مخصوص این پاتوتیپ استفاده گردید (مرکادو-بلانکو و همکاران 2001). این آغازگرهادر شرکت Metabion فرانسه سنتز شد. واکنش Nested-PCR با همان برنامه حرارتی که برای آغازگرهای پاتوتیپ D قبلاً شرح داده شد انجام گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR در جدول 2 آمده است.

هر سه جفت این آغازگرها قطعاتی از ژنوم پاتوتیپ ND قارچ *V. dahliae* را درفرآیند PCR تکثیر می‌کنند. به نحوی که جفت اول (NDf/NDr) در PCR اولیه قطعه‌ای به طول 1410 و دو جفت بعدی (INTND2F/ INTND2R) و (INTNDr /INTNDf) در Nested-PCR به ترتیب قطعاتی به طول 1163و824 جفت باز را تکثیر می‌کنند. این آغازگرها توسط مرکادو بلانکو و همکاران در سال 2001 از روی توالی اختصاصی قطعه‌ای از ژنوم پاتوتیپ ND قارچ *V. dahliae* به طول 1958 جفت باز که با استفاده از آغازگر RAPD با نام OPH-19 تکثیر شده بود، طراحی گردیده است (مرکادو-بلانکو و همکاران 2001).

جدول 2- توالی آغازگر های اختصاصی پاتوتیپ غیر برگ‌ریز مورد استفاده در واکنش PCR

اسامی آغازگر	توالی آغازگر
NDf	5′ ATCAGGGGATACTGGTACGAGA 3′
NDr	5′ GAGTATTGCCGATAAGAACATG 3′
INTNDf	5′CCACCGCCAAGCGACAAGAC 3′
INTNDr	5′ TAAAACTCCTTGGGGCCAGC 3′
INTND2f	5′CTCTTCGTACATGGCCATAGATGTGC3′
INTND2r	5′CAATGACAATGTCCTGGGTGTGCCA 3′

نتایج و بحث

علایم بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی در باغات زیتون طارم:

علایم عمده بیماری در باغات زیتون منطقه طارم شامل مرگ ناگهانی سر شاخه‌ها در طول فصل رشد،

خشک شدن، قهوه‌ای شدن و گاهاً ریزش برگ‌ها بود. در مواردی مرگ ناگهانی درخت در یک فاصله زمانی یک ماه نیز مشاهده شد. اغلب تنها قسمتی از یک درخت علایم بیماری را نشان می‌داد. نکروز حلقه آوندی درزیتون (بر خلاف دیگر میزبان‌های قارچ ورتیسلیوم) مشهود نبود. علایم بیماری در منطقه طارم با علایم توصیف شده بیماری در نقاط دیگر دنیا مانند اسپانیا (لوپز-اسکودرو و همکاران 2004) مطابقت داشت. معمولا علایم بیماری در دو مقطع زمانی در سال بروز و ظهور بیشتری داشت؛ یکی در اوایل بهار و هم‌زمان با شروع رشد رویشی درخت و دیگری در اواخر شهریور و اوایل مهر ماه بعد از بر طرف شدن فصل گرما در منطقه. بیماری در طول فصل تابستان که با گرمای شدید هوا در منطقه همراه است پیشرفت محسوسی نداشت. همچنین نمونه‌برداری در مواقع گرم سال با موفقیت زیادی در جدا سازی قارچ همراه نبود.

علی رغم وجود علایم مشابه در تعدادی از درختان، به دلایل نامعلومی امکان جداسازی قارچ از همه درختانی که مشکوک به بیماری بودند با استفاده از روش معمول فراهم نشد. در مجموع از بین 29 نمونه مشکوک به بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی که مشخصات آنها ثبت و به آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان منتقل گردید، تنها از 12 نمونه قارچ ورتیسیلیوم جدا سازی گردید.

مشخصات گونه قارچی جدا سازی شده

پرگنه قارچ در محیط Czapek Dox Agar از نظر رنگ و شکل در مراحل مختلف رشد متفاوت بود. رنگ آن ابتدا سفید، کرم و در نهایت به دلیل تشکیل ریز سختینه‌ها سیاه رنگ گردید.

کنیدی‌برهای قارچ به فراوانی در محیط کشت تشکیل می‌شدند. آنها افراشته و بی رنگ بوده و با زاویه قائم منشعب می‌شدند. هر کنیدی‌بر واجد سه فیالید به اندازه‌های 2/5-1×35-16 میکرومتر بود که از یک نقطه آن خارج و روی آنها تشکیل می‌شود. کنیدی‌های قارچ به ابعاد4/9- 2/8×7-4/2 میکرومتر بودند که به‌طور منفرد یا در دستجات کوچک در انتهای کنیدیوفورها به وجود می‌آمدند. کنیدی‌ها بیضوی تا تقریباً استوانه‌ای نامنظم، شفاف و نوعا تک حجره ای بودند. میسلیوم‌های با رنگدانه قهوه‌ای منحصراً در محل اتصال به ریزسختینه-ها در محیط کشت مشاهده شدند. ریزسختینه‌ها در شکل و اندازه متغیر و قطر آنها از 15 تا 50 میکرومتر متفاوت بود.

شناسایی و تایید قارچ *V. dahliae*

شناسایی گونه قارچ ورتیسیلیوم از روی مشخصات مرفولوژیک و مرفومتریک فیالید، کنیدی و میکرواسکلروت و با استفاده از کلید ارائه شده توسط هیلوکس (1992) انجام گرفت. برای تأیید، نمونه‌ای از قارچ شناسایی شده به موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور ارسال شد که تعلق آن به گونه *V. dahliae* مورد تایید قرار گرفت. نمونه جدا سازی شده از زنجان با شماره IRAN 1431C در کلکسیون بخش رستنی‌های موسسه تحقیقات گیاه پزشکی ثبت شد.

اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *V. dahliae*

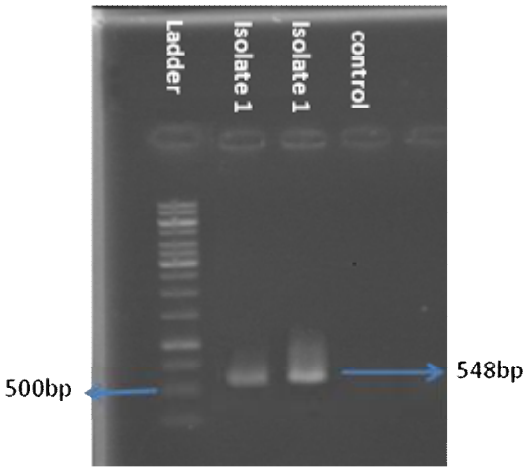
نمونه‌برداری از نهال‌های مایه‌زنی شده با سوسپانسیون قارچ در دو مرحله انجام گرفت. نمونه برداری اول چهار هفته و نمونه برداری دوم هشت هفته پس از مایه زنی انجام شد. در نمونه برداری اولیه جدا سازی سه جدایه قارچی از نمونه‌های برداشت شده از ریشه با موفقیت انجام شد. در نمونه برداری دوم (هشت هفته پس از مایه زنی) جداسازی هر پنج جدایه قارچی با موفقیت همراه بود. علایم اولیه آلودگی حدود 27 روز بعد از مایه زنی نهال‌ها ظاهر شد. این علایم در ابتداء با زردی و پژمردگی نهال‌ها شروع شد. در سه مورد نهال‌ها بعد از بروز علایم زردی بهبود یافته و

علایم بیماری بعد از هشت هفته ناپدید شد. با این حال در بقیه نهال‌ها، علایم بیماری ادامه یافت. علایم بیماری در سه نهالی که با جدایه یک مایه‌زنی شده بودند شدیدتر بود و با بروز علایم ریزش برگ‌ها همراه شد. بررسی‌های بعدی با استفاده از تکنیک Nested-PCR نشان داد که جدایه فوق متعلق به پاتوتیپ D می‌باشد و بقیه جدایه‌ها از نوع ND می‌باشد. هر چند علایم ریزش برگ در بعضی از نهال‌های مایه زنی شده با جدایه‌های دیگر نیز مشاهد شد ولی به نظر می‌رسد در مجموع جدایه شماره یک از قدرت تهاجمی بیشتری برخوردار است. از ریشه نهال‌های شاهد، قارچ ورتیسیلیوم جدا سازی نشد.

شناسایی پاتوتیپ های *V. dahliae* با استفاده از واکنش Nested-PCR

واکنش PCR که با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی مربوطه و DNA قارچ جدا سازی شده از ریشه نهال‌های رقم زرد، که برای اثبات بیماری‌زایی استفاده شده بود، و نیز با استفاده از DNA ورتیسیلیوم خالص رشد یافته روی محیط کشت ، با موفقیت همرا بود. انجام واکنش Nested-PCR با استفاده از DNA کل نشان داد که نوع پاتوتیپ در هر دو مرحله (چهار و هشت هفته بعد از آلودگی) قابل تشخیص است. درهر دو مرحله استخراج از نهال‌های شاهد هیچ محصول PCR تکثیر نشد.

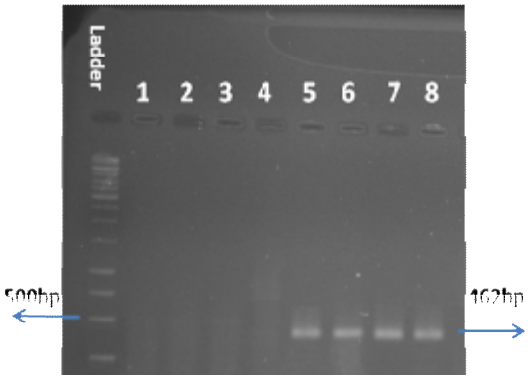
برای نمونه‌های DNA استخراج شده از قارچ و ریشه نهال‌های مایه‌زنی شده، مراحل تکثیر با PCR معمولی و با استفاده از آغازگرهای پاتوتیپ D نشان داد که تنها یکی از جدایه‌ها (جدایه شماره یک) دراولین PCR قطعه‌ای به طول 548 جفت باز را تکثیر نمود (شکل 1).



شکل 1- باندهای حاصل از الکتروفورز قطعات تکثیر یافته در دور اول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پاتوتیپ برگ‌ریز (D1/D2) که در آن جدایه شماره 1 و 2 (چاهک شماره 2و3 از چپ)محصولی به طول bp 548 تولید کرد. چاهک سوم به عنوان کنترل منفی و بدون DNA است.

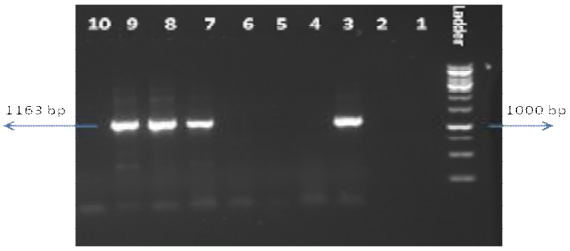
متعاقبا واکنش Nested-PCR با محصول به دست آمده از PCR مرحله قبل به عنوان الگو و با استفاده از جفت آغازگرهای INTD2f/INTD2r انجام شد که در این مرحله قطعاتی به اندازه 462 bp تکثیر یافت (شکل 2).

برای تعداد 12 نمونه DNA استخراج شده، مراحل تکثیر با استفاده ازPCR معمولی و نیز Nested-PCR با استفاده از آغازگرهای پاتوتیپ ND نیز انجام شد. در اولین دور PCR معمولی با استفاده از آغازگر NDf/NDr قطعه‌ای به طول1410 جفت باز تکثیر یافت. در مرحله بعد، انجام واکنش Nested-PCR با استفاده از آغازگرهایINTNDf/INTNDr وINTND2f/INTND2r قطعاتی به ترتیب به اندازه های 1163 جفت باز و 824 جفت باز تکثیر نمود (شکل 3 و شکل 4).



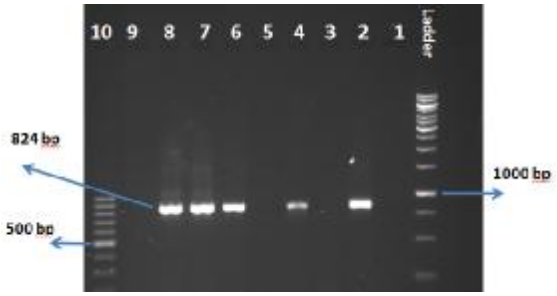
شکل 2- باندهای حاصل از الکتروفورز قطعات تکثیر یافته در **Nested-PCR** با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پاتوتیپ برگ‌ریز **(INTD2f/INTD2r)** که در آن قطعه‌ای به طول تقریبی **bp** 462 تکثیرشد. چاهک شماره 1 شاهد منفی (بدون**DNA**) می‌باشد. چاهک-های شماره2، 3 و 4 مربوط است به جدایه‌های غیر برگ‌ریز که محصولی تولید نکردند و چاهک‌های شماره 5، 6، 7 و 8 مربوط به جدایه‌های متعلق به پاتوتیپ برگ‌ریز قارچ می‌باشد.

نتایج فوق نشان داد که هر دو پاتوتیپ D و ND در مناطق زیتون‌کاری طارم وجود دارند. با این حال به نظر می‌رسد پاتوتیپ ND از پراکنش بیشتری برخوردار است. هر چند نتایج مشاهدات مربوط به علایم بیماری در باغات زیتون منطقه با نتایج داده‌های ملکولی مطابقت دارد، با این حال تعیین پاتوتیپ جدایه‌های بیشتری از قارچ توصیه می‌گردد. در باغات زیتون طارم، نمونه-هایی از درختان آلوده زیتون به قارچ ورتیسیلیوم که علایم برگ ریزی شدید داشته یا به‌طور کامل خشک شوند نادر است. اغلب علایم قابل رویت با خشکیدگی یک طرفه و مرگ قسمتی از یک درخت یا تک شاخه‌ها همراه است که به نظر می رسد این علایم در اثر آلودگی به جدایه های متعلق به پاتوتیپND ایجاد شده باشند. ممکن است در اثر نقل و انتقال نهال‌های زیتون، پاتوتیپ D از مناطق دیگر کشور(مانند استان گلستان) به منطقه وارد شده باشد. در کشورهای زیتون خیز دنیا مانند اسپانیا نیز وجود هر دو نوع پاتوتیپ گزارش شده است. در این کشور اولین بار پاتوتیپ D در مناطقی که قبلا در آنها پنبه در سطح وسیعی کشت می‌شد مشاهده گردید ولی متعاقباً این پاتوتیپ در اغلب نواحی زیتون‌کاری اسپانیا گسترش یافت و به عنوان یکی از عوامل اصلی تهدید کننده تولید زیتون در این کشور مطرح گردید (مرکادو-بلانکو و همکاران 2002).



شکل 3- باندهای حاصل از الکتروفورز قطعات تکثیر یافته در **Nested-PCR** با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پاتوتیپ غیربرگ‌ریز **(INTNDf/INTNDr)** که در آن قطعه‌ای به طول تقریبی **bp** 1160تکثیرشد. چاهک شماره 1 بعد از مارکر، شاهد منفی (بدون**DNA**) می‌باشد. چاهک شماره 2 مربوط است به **DNA** جدایه 1 (پاتوتیپ برگ‌ریز) و چاهک های 7، 8 و 9 به ترتیب مربوط به جدایه‌های 3، 4 و 5 قارچ (پاتوتیپ‌های غیر برگ‌ریز) می‌باشد. چاهک‌های شماره 4، 5 و 6 نمونه های **DNA** استخراج شده از ساقه نهال‌های آلوده شده با قارچ می‌باشند.

پاتوتیپ D معمولا خسارت بیشتری به درختان آلوده وارد می‌کند و ممکن است با برگ ریزی شدید آنها منجر به مرگ در ختان بیمار شود. در حالی که درختان آلوده به پاتوتیپ ND ممکن است مدتی بعد از آلودگی بهبود یابند و یا گسترش آلودگی محدود به یک شاخه باقی بماند. بنابراین لازم است از گسترش پاتوتیپ مخرب D به مناطق غیرآلوده با این پاتوتیپ ممانعت به عمل آید. برای این کار لازم است تا ابتداء پاتوتیپ قارچ عامل بیماری در مناطق مختلف زیتون‌کاری کشور تعیین شود تا در جابجایی قلمه‌ها و نهال‌های زیتون بین مناطق مختلف، نوع پاتوتیپ قارچ درمنطقه نیز مورد توجه قرار گیرد.



شکل 4- باندهای حاصل از الکتروفورز قطعات تکثیر یافته در **Nested-PCR** با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پاتوتیپ غیر برگ‌ریز (**INTND2f/INTND2r**) که در آن قطعه‌ای به طول تقریبی **bp** 824 تکثیر شد. چاهک شماره 1 بعد از مارکر، شاهد منفی (بدون **DNA**) می‌باشد. چاهک شماره 3 مربوط است به **DNA** جدایه 1 (پاتوتیپ برگ‌ریز) و چاهک‌های 2، 6، 7 و 8 به ترتیب مربوط به جدایه‌های 2، 3، 4 و 5 قارچ ورتیسیلیوم داهلیا (پاتوتیپ‌های غیربرگ‌ریز) می‌باشد. در سمت راست و چپ مارکرهای نشان دهنده اندازه قطعات (**Size ladder**) قرار دارند. چاهک شماره 9 فاقد نمونه (**Blank**) می‌باشد.

نتایج این بررسی نشان داد که با استفاده از تکنیک-های مولکولی مانند Nested-PCR می‌توان حتی در مراحل اولیه آلودگی نیز نسبت به ردیابی پاتوژن و شناخت پاتوتیپ آن اقدام نمود. با شناخت پاتوتیپ قارچ عامل بیماری می‌توان از گسترش آن به مناطق دیگر کشور جلوگیری کرد و این امر امروزه به علت حجم وسیع مبادلات نهال‌ها و قلمه‌های زیتون در سطح ملی و بین المللی دارای اهمیت زیادی است.

استفاده از تکنیک ملکولی به کار رفته در این تحقیق علاوه بر این که امکان تشخیص پاتوتیپ قارچ در کشت-های خالص قارچ را فراهم می‌کند، این امکان در تشخیص پاتوتیپ قارچ از DNA استخراج شده از ریشه نهال‌های آلوده را نیز فراهم می‌سازد. کارآیی این روش همچنین برای تشخیص وجود آلودگی‌های طبیعی در نهال‌های یک الی دو ساله چندین رقم زیتون در نقاط مختلف زیتون‌کاری اسپانیا به اثبات رسیده است (مرکادو-بلانکو و همکاران 2002). بنا براین می‌توان از این روش به نحو موثری در تشخیص مراحل اولیه آلودگی در باغات مادری استفاده کرد و از قلمه‌گیری از باغات یا نهال‌های آلوده اجتناب کرد.

حساسیت روش‌های مبتنی بر PCR در تشخیص پاتوتیپ قارچ *V. dahliae*

نتایج بررسی‌های اخیر در مورد شناسایی پاتوتیپ *V. dahliae* با استفاده از DNA کل استخراج شده از ریشه گیاهان آلوده با استفاده از واکنش PCR معمولی و آغازگرهای اختصاصی آن با موفقیت زیادی همراه نبود (جعفری و همکاران، اطلاعات چاپ نشده). این ممکن است به علت پایین بودن نسبت DNA قارچ در کل DNA استخراج شده از نمونه بافت‌های گیاهی باشد و این مقدار از DNA ممکن است در روش PCR معمولی حساسیت لازم رابرای شناسایی پاتوتیپ‌های قارچ نداشته باشد. با این حال نتایج این بررسی نشان داد که روش Nested-PCR در ردیابی قارچ و شناسایی پاتوتیپ‌های آن از دقت و حساسیت بالاتری (نسبت به PCR معمولی) برخوردار است و می‌توان قارچ را در ریشه گیاهان آلوده زیتون در نهالستان‌ها با فاصله اندکی بعد از وقوع آلودگی ردیابی کرد. دراین تحقیق با استفاده از روش Nested-PCR به طور موفقیت آمیزی وجود پاتوتیپ D درریشه زیتون‌های آلوده ردیابی شد. روش فوق همچنین برای شناسایی مستقیم پاتوتیپ‌های قارچ در نمونه‌هایی از ساقه درختان بیمارنیز به کار گرفته شد که موفقیت آمیز نبود. به طور کلی استفاده از روش Nested-PCR انتظارات برای تشخیص کیفی قارچ را برآورده کرد ولی اطلاعات واقعی در مورد کمیت DNA پاتوژن در بافت‌های آلوده زیتون با این روش قابل حصول نیست. استفاده از تکنیک Real– time PCR توانسته است به نحو مطلوبی این نقیصه را بر طرف نماید و به عنوان روشی موثر در کمیت سنجی DNA قارچ موجود در زیتون به کار گرفته شود (موارفاق 2006).

مطالعات انجام گرفته در دنیا نشان می‌دهد ارقام مختلف زیتون دارای واکنش‌های متفاوتی نسبت به جدایه‌های مختلف قارچ ورتیسیلیوم هستند. گاهی ممکن است برخی ارقام نسبت به پاتوتیپ غیر برگ‌ریز مقاوم و به پاتوتیپ برگ‌ریز تا حدی حساس باشند (لوپز-اسکودرو و همکاران 2004). در این صورت ضرورت دارد تا قبل از غربالگری برای ارقام مقاوم در یک منطقه، اطلاعات کاملی از مناطق انتشار و اهمیت هر یک از پاتوتیپ‌های قارچ درآن منطقه تهیه شود. استفاده از تکنیک‌های ملکولی می تواند در این خصوص بسیار سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

مراحل مختلف این پژوهش در آزمایشگاه بیولوژی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان و گلخانه ایستگاه تحقیقات زیتون طارم به انجام رسیده و هزینه‌های مربوطه از محل اعتبارات دفتر زیتون وزارت جهاد کشاورزی در قالب بخشی از پروژه تحقیقات خاص استانی به شماره 88027-16-47-4 تأمین گردیده است. نگارندگان ازآقای مهندس ابراهیم دستکار به خاطر کمک در ویرایش ادبی متن تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

افشاری آزاد ه، معینی م ر، صلاتی م و میر حسینی مقدم س ع،1379 . بررسی وضعیت آلودگی درختان مادری زیتون به عوامل خسارت‌زای قارچی، باکتریایی و ویروسی استا نهای مختلف کشور . گزارش پژوهشی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور. 120 صفحه.

بی‌نام، 1389. آمارنامه کشاورزی. وزارت جهاد کشاورزی، دفتر آمار و فن‌آوری اطلاعات، قابل دسترس در: http://www.maj.ir.

رهنما ک، رضوی س ر، لطیفی ن و زارعی ح، 1377. بررسی وقوع خشکیدگی درختان زیتون در استان گلستان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. 222 صفحه.

Baht RG and Subbarao KV, 1999. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. Phytopathology, 89:1218–1225.

Bellahcene M, Assigbetse K, Fortaz Z, Geige JP, Nicole M and Fernandez D, 2005. Genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from olive trees in Algeria. Phytopathologia Mediterranea 43:266-274.

Bi IV, Harvengt L, Chandelier A, Mergeai G and Du Jardin P, 1996. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. Plant Breeding, 115:205–206

Daayf F, Nicole M and Geiger JP, 1995. Differentiation of *Verticillium dahliae* populations on the basis of vegetative compatibility and pathogenicity on cotton. European Journal of Plant Pathology, 101:69-79.

Gayoso C, Martínez de Ilárduya O, Pomar F and Merino de Cáceres F, 2007. Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different *Solanaceae* cultivars. European Journal of Plant pathology 118:199-209.

Hilloks RJ, 1992. Cotton Diseases. C.A.B. International, Wallingford, UK, 415pp.

L´opez-Escudero L F J, Del Rio C, Caballero JM and Blanco-L´opez MA, 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae.* European Journal of Plant Pathology 110: 79–85.

Kim KY, Xiao CL and Rogers DJ, 2005. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphaeropsis pyriputrescens.* Mycologia 97: 25-32.

Mercado-Blanco J, Rodryguez-Jurado D, Perez-Artes E and Jimenez-Dyaz RM, 2001. Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by Nested-PCR. Plant Pathology 50: 609-19.

Mercado-Blanco J, Rodrıguez-Jurado D, Perez-Artes E and Jimenez-Dıaz1 RM, 2002. Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by Nested-PCR. European Journal of Plant Pathology 108: 1-13.

Muwarfaq RK, 2006. Seed transmission of *Verticillium dahliae* in olive as detected by a highly sensitive Nested-PCR based assay. Phytopathologia Mediterranea 45: 15-23.

Perez-Artes E, Garcıa-Pedrajas MD, Bejarano-Alcazar J and Jimenez-Dıaz RM, 2000. Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. European Journal of Plant Pathology 106: 507-517.

Usami T, Mafumi A, Masahiro S and Yoshimiki A, 2002. Specific detection of tomato pathotype of *Verticillium dahliae* by PCR assays. Journal of General Plant Pathology 68: 134-140.

Detection of pathotypes of *Verticillium dahliae*, the causal agent of olive Verticillium wilt in olive orchards of Tarom using Nested-PCR technique

Hossein Jafary*[1], Sahar khanmohammadi[2] and Nastaran Mehri[3]

[1]Agricultural and Natural Resources Research Center of Zanjan Province.
[2]Agriculture Jihad office of Khorramdareh, Zanjan province.
[3]Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Zanjan University.
*Corresponding author: hjafaryir@yahoo.com

Received: 13 Jul 2013 Accepted: 12 Mar 2014

Abstract

Verticillim wilt is one of the most important olive vascular diseases caused by *Verticillium dahliae* Kleb. This fungal pathogen prompts wilting, yield loss and eventually death of the infected trees by devastating of their vascular system. The isolates of *V. dahliae* are grouped, based on the disease symptoms, in two distinct defoliating and non-defoliating pathotypes, although they are morphologically identical. Detection of the pathotype is an important step forward for selecting proper management strategies, especially for screening of resistant cultivars. In this study we used a PCR-based method to detect the pathotype of different isolates of the fungus, collected from Tarom region in Zanjan province. The wood samples collected from the infected olive trees were cultured and purified on solid medium using conventional methods. Total DNA was extracted both from mycelia and from artificially inoculated olive saplings. A nested-PCR assay was performed using specific primer pairs developed for detection of both pathotypes. Based on the size of the PCR products seperated on the agarose gel, most of the isolates (11 out of 12) belonged to the ND pathotype and only one isolate belonged to D pathotype. The results of this research showed that the ND pathotype is probably the most predominantly distributed pathotype of *V. dahliae* in Tarom region. Because of the high sensitivity of the nested –PCR, it is possible to survey and to detect the fungus Verticillium on olive, shortly after inoculation of the saplings.

Key words: Olive, verticillium wilt, pathotypes, defoliating and non-defoliating isolates, nestted-PCR technique