

کمیت سنجی قارچ *Verticillium dahliae* در ریشه چهار رقم زیتون با استفاده از تکنیک Real-time PCR

سحر خان محمدی^{۱*}، حسین جعفری^۲، محمد سالاری^۳ و سیده مهری جوادی^۴

^۱- نویسنده مسوول: دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه زابل (Sahar_khanmohammadi@yahoo.com)

^۲- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان

^۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

^۴- عضو گروه بیوتکنولوژی جهاد دانشگاهی زنجان

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۶

چکیده

پژمردگی ورتیسلیومی یکی از بیماری‌های مهم زیتون است. در این پژوهش ابتدا از درختان زیتون مشکوک به پژمردگی ورتیسلیومی در منطقه طارم در استان زنجان نمونه برداری شد. پس از کشت و خالص سازی قارچ، استخراج DNA با روش سی تب انجام شد. برای ارزیابی واکنش ارقام زیتون، ریشه نهال‌های پنج ماهه ارقام زرد، آریکن، آبلونکا و کرونایکی به روش غوطه ور سازی با سوسپانسیون ۱۰^۷ اسپور جدایه برگریز قارچ عامل بیماری تلقیح گردید. استخراج DNA از ریشه نهال‌های تلقیح شده بلافاصله و سپس در زمان‌های ۲، ۷، ۱۵، ۲۷، ۴۱، ۵۶ و ۷۷ روز بعد از تلقیح انجام گردید. روند افزایش تدریجی میزان DNA قارچ موجود در ریشه نهال‌ها با روش Real-time PCR و با استفاده از سایبرگرین همراه با آغازگرهای اختصاصی کمیت سنجی گردید. نتایج بررسی نشان داد که در طول زمان، نسبت DNA قارچ به DNA کل در ارقام زرد و آریکن نسبت به آبلونکا و کرونایکی افزایش بیشتری داشتند و رقم کرونایکی محدودیت بیشتری برای استقرار بیمارگر در روی ریشه ایجاد نمود. با این حال در روی ریشه رقم زرد، قارچ عامل بیماری توانست با سرعت بیشتری تکثیر یافته و علائم شدیدتری از بیماری را ظاهر سازد. نتایج این بررسی نشان داد که تکنیک Real-time PCR ابزار مناسبی برای ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف زیتون نسبت به بیماری پژمردگی ورتیسلیومی است که می‌تواند در کنار روش‌های معمول برای غربالگری ارقام مقاوم به بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: زیتون، قارچ *Verticillium dahliae*، مقاومت ارقام، تکنیک Real-time PCR

مقدمه

آن از سطح عملکرد جهانی این محصول پایین‌تر است. یکی از عوامل اصلی کاهش عملکرد زیتون، ابتلاء آن به انواع بیماری‌ها و آفات می‌باشد. از بیماری‌های مهم قارچی زیتون، بیماری پژمردگی ورتیسلیومی است.

این بیماری توسط قارچ *Verticillium dahliae* ایجاد می‌شود (موارفاق^۱، ۲۰۰۶) که اولین بار در سال ۱۹۴۶ در ایتالیا توصیف شده است و بسیار پلی فاژ است

زیتون با نام علمی *Olea europaea L.* تنها گونه خوراکی تیره *Oleaceae* است که همراه با گندم و انگور یکی از پایه‌های کشاورزی حوزه مدیترانه را در طول قرن‌ها تشکیل داده است (درویشیان، ۱۳۷۶). شهرستان طارم در استان زنجان از نظر مساحت باغات بارور و تولید زیتون رتبه اول را در کشور به خود اختصاص داده است (بی‌نام، ۱۳۸۹). با این حال عملکرد

PCR برای شناسایی و کمیت سنجی مستقیم DNA ژنومی بیمارگر عامل *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* استفاده نمودند.

هدف از این بررسی ارایه روشی نوین برای ارزیابی مقاومت یا حساسیت ارقام مختلف زیتون به بیماری پژمردگی ورتیسلیومی با استفاده از کمیت سنجی DNA قارچ بیمارگر در گیاه و میزان احاطه شدن گیاه توسط قارچ در طول دوره زمانی معین به وسیله تکنیک Real time PCR – بوده است تا بتوان از نتایج آن در برنامه های مدیریت بیماری، به خصوص در زمینه غربالگری مقاومت به بیماری و معرفی ارقام مقاوم برای کاشت در قلمستان‌های تازه تأسیس استفاده نمود. در صورت ارایه روش مطمئن و دقیق در ارزیابی مقاومت ارقام و با توجه به وجود ذخایر غنی ژنتیکی زیتون در منطقه طارم امکان جستجو و گزینش برای استفاده از ارقام مقاوم در مدیریت بیماری فراهم خواهد شد.

مواد و روش ها

نمونه برداری و کشت قارچ عامل بیماری

نمونه برداری از سرشاخه‌ها و ساقه‌های مشکوک به آلودگی با داشتن علائمی مانند پژمردگی، سبز خشک شدن و ریزش برگها و قهوه ای شدن آوندی از باغات زیتون شهرستان طارم در طول سال‌های ۸۷-۸۹ انجام گرفت. پس از ضدعفونی سطحی نمونه های گیاهی قطعاتی به طول تقریبی حدود ۳ سانتی متر از نمونه های آلوده تهیه و با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ به مدت ۲ دقیقه ضد عفونی سطحی شدند و پس از سه بار شستشو با آب مقطر به محیط کشت اختصاصی زاپک^۹ منتقل و در شرایط تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ روز نگهداری شدند. محیط کشت فوق بر اساس روش پیشنهادی کیم و همکاران^{۱۰} (۲۰۰۵) تهیه شد. بعد از تشکیل پرگنه‌های قارچ عامل بیماری در اطراف قطعات ساقه کشت شده، جهت خالص سازی از کشت تک

(لاچکیور و سدرا^۱، ۲۰۰۲). آلودگی درختان زیتون به این بیماری برای اولین بار در ایران توسط رهنما و همکاران، (۱۳۷۷) در استان گلستان و بر روی درختان موجود در ایستگاه تحقیقات هاشم آباد گرگان گزارش شده است. در منطقه طارم نیز این بیماری، اولین بار توسط افشاری آزاد و همکاران (۱۳۷۹) گزارش گردید.

راه مؤثر و مطلوب زراعی برای کنترل *V. dahliae* ارایه نشده است زیرا میکروواسکلروت‌های این بیمارگر در خاک برای چندین سال متوالی زنده می‌ماند (کیبر^۲ و همکاران، ۲۰۰۴). بنابراین، بیشتر روش‌های کنترلی برای مدیریت قارچ ورتیسلیوم در زیتون روی کاشت ارقام مقاوم متمرکز شده است (رودریگز و همکاران^۳، ۲۰۰۸). در حال حاضر تکنیک^۴ Real-time PCR روشی سریع برای تشخیص و کمیت سنجی *V. dahliae* بدون نیاز به جداسازی بیمارگر است (هیتالا و همکاران^۵، ۲۰۰۴). با استفاده از این تکنیک می‌توان به طور همزمان DNA قارچ و گیاه میزبان را کمیت سنجی کرد و بدین ترتیب به جای ارزیابی روند توسعه بیماری در ژنوتیپ-های مورد بررسی با استفاده از علائم بیماری، می‌توان میزان DNA قارچ بیمارگر در نمونه گیاهی و میزان احاطه شدن بافت گیاه با بیمارگر را مشخص نمود (گایسو و پومار^۶، ۲۰۰۷).

این روش برای معرفی و شناسایی بیمارگرهای پژمردگی آوندی گوجه فرنگی *F. oxysporum* f. *lycopersici*، *V. albo-atrum* sp و *V. dahliae* نیز به کار رفته است که اسپوره‌های این سه قارچ خطرناک می‌توانند از طریق گیاه، آب و خاک منتقل شوند (لی ونز و همکاران^۷، ۲۰۰۳). در مطالعه‌ای دیگر (فیلیون و همکاران^۸، ۲۰۰۳) از Real-time

- 1- Lachquire & Sedra
- 2- Kabir *et al*
- 3- Rodriguez *et al*
- 4- Polymerase chain reaction
- 5- Hietala *et al*.
- 6- Gayso & pomar
- 7- Lievens *et al*.
- 8- Filion *et al*

9- Czapec-Dox agar
10- Kim *et al*

شدت بیماریزایی بالای این جدایه نسبت به جدایه غیر برگریز) استفاده گردید. برای این منظور ابتدا قلمه‌های ۵ ماهه زیتون به آرامی از پرلیت خارج شد، سپس ریشه هر کدام از ارقام زیتون به نام های زرد (رقم محلی) کرونا بکی، آبلونکا و آریکن (ارقام خارجی موجود در ایستگاه تحقیقات زیتون طارم) پس از خارج شدن از پرلیت برای آلوده سازی به طور جداگانه در بشر حاوی سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و در گلدان هایی حاوی خاک استریل کشت شدند و بلافاصله آبیاری صورت گرفت. آبیاری قلمه‌ها در ۷ روز اول به مدت هر روز دوبار و بعد از این مدت آبیاری ۲ روز یک بار انجام گردید. قلمه‌های ریشه دار شده شاهد نیز در آب مقطر قرار داده شدند. از هر رقم ۴۲ نهال آلوده و ۱۶ نهال به عنوان شاهد انتخاب شد. نمونه برداری از تمامی قسمت‌های ریشه ارقام مختلف زیتون شاهد و آلوده بلافاصله بعد از تلقیح انجام شد و نمونه‌ها در ازت مایع قرار گرفتند. سپس نمونه برداری‌ها در زمان‌های ۲، ۷، ۱۵، ۲۷، ۴۱، ۵۶ و ۷۷ روز برای قلمه‌های آلوده و در زمان‌های ۵۲ و ۷۲ روز بعد از تلقیح برای قلمه‌های شاهد به همین ترتیب انجام شد. این فواصل زمانی بر اساس کار مشابه انجام شده در اسپانیا توسط (مرکادو- بلانکو و همکاران^{۱۱}، ۲۰۰۳) تعیین و انجام گرفت. از ریشه تعدادی از نهال‌های آلوده و نیز نهال‌های سالم در زمان ۲ روز پس از تلقیح قطعاتی برش داده شد و بر روی محیط زاپک طبق روشی که قبلاً ذکر شد کشت شدند. این عمل برای اثبات بیماری‌زایی و اطمینان از درستی روش تلقیح و فرآیند آلوده سازی و فقط یک بار صورت گرفت.

استخراج DNA از ریشه‌های آلوده زیتون به

ورتیسیلوم

برای استخراج DNA از ریشه نهال‌های زیتون از روش سی‌تب اصلاح شده توسط نوآز و همکاران^{۱۲} (۲۰۰۹) استفاده شد. برای این کار ابتدا ۲ گرم از بافت ریشه

اسپور مطابق روش پیشنهادی نصر اصفهانی (۱۳۷۶) استفاده گردید.

استخراج DNA قارچ ورتیسیلوم

وجود DNA ورتیسیلوم خالص برای انجام مراحل بعدی و کار با Real-time PCR ضروری است. برای استخراج DNA ورتیسیلوم رشد یافته بر روی محیط مایع پی‌دی بی^۱ از روش سی‌تب^۲ پیشنهاد شده توسط (روگر و بندیک^۳، ۱۹۸۵) با اندکی تغییر استفاده شد. ابتدا برای جداسازی میسلیم قارچ از محیط کشت مایع، محتوای ویال حاوی قارچ را از پارچه ممل سترون عبور داده و نمونه‌ها در سانتریفیوژ ۳۰۰۰g به مدت ۲ دقیقه آب گیری شدند. سپس به آرامی روی یخ پارچه‌ها را از فالكون‌ها خارج کرده تا پارچه‌ها با آب تماس نیابند. میسلیم قارچ آب گیری شده در یک هاون ریخته شده و با ازت مایع به پودر نرمی تبدیل گردید. بافر استخراج شامل [۱/۴ میلی مولار کلرید سدیم^۴، ۲۰ میلی مولار اتیلن دی آمین تترااستیک اسید^۵، ۱۰۰ میلی مولار تریس هیدروکلراید^۶، ۱٪ پلی وینیل پیرولیدون^۷ و ۲٪ سی تب] است که در حمام بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه گرم می‌شود. پس از استخراج DNA، کمیت آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر^۸ تعیین شد. همچنین بررسی کیفیت DNA قارچ نیز روی ژل آگارز ۱٪ انجام گرفت.

تلقیح نهال های زیتون

به منظور تلقیح نهال‌ها تراکم اسپورها با استفاده از لام هماسیتومتر^۹ تعیین و از سوسپانسیون اسپور^{۱۰} در میلی لیتر قارچ جدایه برگریز^{۱۱} (به علت خطرناک بودن

- 1- Potato dextrose broth (PDB)
- 2- (CTAB) Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
- 3- Roger & Bendich
- 4- NaCl
- 5- EDTA
- 6- Tris-HCl
- 7- Polyvinylpyrrolidone
- 8- Spectrophotometer
- 9- Hemocytometer
- 10- Defoliation (D)

11- Mercado-Blanco *et al*

12- Novaes *et al*

استفاده قرار گرفتند. برای شبیه سازی بهتر شرایط تکثیر به این غلظت‌های مختلف از نمونه DNA رقیق شده قارچ، مقدار ۸۰ نانوگرم از DNA زیتون شاهد (آلوده نشده) در سری رقت به هر نمونه اضافه شد تا هر گونه تغییر پذیری فرآیندهای داخلی با وجود DNA گیاه نیز بررسی شود (مرکادو-بلانکو و همکاران، ۲۰۰۳). آزمایش با استفاده از سری‌های رقیق سازی شده ۵ گانه، اجرا گردید. هر کدام از نمونه‌های مجهول و شاهد نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. آزمایش برای نمونه ورتیسلیوم خالص به عنوان کنترل مثبت تکرار شد. داده‌های حاصل از آزمایش همزمان با توجه به نوع روش مورد استفاده برای کمیت سنجی، با استفاده از نسخه ۶/۱ نرم افزار Rotor-Gene Real-time Analysis Software مورد تجزیه قرار گرفت.

انجام واکنش‌های Real-time PCR

برای انجام واکنش‌های Real-time PCR در این مطالعه از دستگاه Rotor-Gene مدل ۶۰۰۰ ساخت شرکت Corbet Research استفاده شد. همچنین برای تعیین رقم مقاوم زیتون به قارچ *V. dahliae* از روش ترسیم نمودار استاندارد با استفاده از سیستم SYBER Green I Dye استفاده گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این سیستم، با استفاده از روش مرکادو-بلانکو و همکاران (۲۰۰۳) در جدول شماره ۱ آورده شده است.

این دو آغازگر در جدایه‌های برگریز و غیر برگریز به ترتیب قطعه‌ای به طول ۵۳۹ و ۵۲۳ جفت باز از ژنوم *V. dahliae* را تکثیر می‌کنند. اگرچه استفاده از قطعات کوچکتر باعث افزایش کارایی واکنش می‌شود با این حال به دلیل اینکه قبلاً کارایی این آغازگرها در مطالعات قبلی مرکادو-بلانکو و همکاران (۲۰۰۳) به اثبات رسیده بود و همچنین در بررسی منابع، آغازگر اختصاصی دیگری با اندازه باند کوچکتر پیدا نشد و طراحی آغازگر جدید از اهداف این تحقیق نبود از آغازگرهای فوق استفاده گردید.

علاوه بر این دو آغازگر از آغازگر Ias22r/Ias22f: (GA)₆(GT)₅GACCT(GA)₅ که یک نشانگر اس

پس از ضدعفونی سطحی با اتانل ۷۰٪ در ازت مایع کوبیده شد. بلافاصله و قبل از ذوب شدن نمونه ها ۱ میلی لیتر بافر استخراج سی تب به هر یک از نمونه‌ها اضافه گردید. در این مرحله از پی وی پی ۲٪ استفاده شد. بعد از کوبیدن نمونه‌ها، ۳۵ میکرولیتر بافر اس دی اس^۱ ۲۰٪ به آن اضافه گردید تا مخلوط نهایی به شکل یکنواخت درآید. در ادامه محلول به تیوپ ۱/۵ میلی لیتر منتقل گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در بنماری ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از سرد شدن نمونه‌ها، در دمای اتاق به آنها ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفورم- ایزوآمیل آلکل (۱:۲۴) اضافه کرده و تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه به آرامی به هم زده شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۶۰۰۰g سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل شد. در ادامه مقدار ۱۴۰ میکرولیتر سی تب ۱۰٪ و ۲۸۰ میکرولیتر کلرید سدیم پنج مولار به تیوپ اضافه کرده و با تکان دادن به طور یکنواخت مخلوط شد. سپس هم حجم محلول رویی ایزوپروپانول سرد اضافه شد و تیوپ‌ها را چند بار سرو ته کرده سپس به مدت یک شب در ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس سانتریفیوژ با دور ۱۶۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید و محلول رویی دور ریخته شد. پالت^۲ حاصل ۲ بار با اتانل ۷۰٪ سرد شسته شده در ۳۰ میکرو لیتر بافر تی ای^۳ حل شده و در نهایت با اضافه کردن یک میکرولیتر RNase به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

تهیه منحنی استاندارد

سری رقت‌های DNA قارچ ورتیسلیوم خالص شده از محیط کشت مایع پی دی بی (بر اساس روش سانگ و همکاران^۴، ۲۰۰۲) با غلظت‌های ۱۰، ۱، ۱/۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۱، (به مقدار ۴ میکرولیتر در هر واکنش) آماده شدند و در Real-time PCR برای ترسیم منحنی استاندارد مورد

- 1- Sodium Dodecyle Sulfate (SDS)
- 2- Pellet
- 3- (TE) Tris-EDTA
- 4- Song *et al*

پراکنه قارچ در محیط زاپک 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 افرشته و بی رنگ بوده و با زاویه قائم منشعب می‌شدند. هر کنیدی بر واجد سه فیالید به اندازه‌های ۲/۵-۱×۳-۱۶ میکرومتر بود که از یک نقطه آن خارج و روی آنها تشکیل شد. کنیدی‌های قارچ به ابعاد ۴/۹-۷×۲/۸-۴/۲ میکرومتر بودند که به‌طور منفرد یا در دستجات کوچک در انتهای کنیدیوفورها به وجود می‌آمدند. کنیدی‌ها بیضوی تا تقریباً استوانه‌ای نامنظم، شفاف و نوعاً تک حجره ای بودند. میسلیم‌های با رنگدانه قهوه‌ای منحصراً در محل اتصال به ریزسختینه‌ها در محیط کشت مشاهده شدند. ریزسختینه‌ها در شکل و اندازه متغیر و قطر آنها از ۱۵ تا ۵۰ میکرومتر متفاوت بود.

توسعه علائم بیماری در ارقام زیتون

در رقم کرونایکی توسعه علائم به طور معنی داری از ارقام دیگر کمتر بود و در روزهای آخر این علائم توسعه نیافت. از طرفی شدت آن نیز در طول دوره زمانی کمتر شد. اولین علائم برای رقم کرونایکی و آبلونکا دیرتر از دو رقم دیگر اتفاق افتاد. در رقم آبلونکا توسعه علائم شدت بیشتری نسبت به رقم کرونایکی داشت و در برخی از قلمه‌ها خشک شدن برگها و ریزش آنها نیز مشاهده شد. توسعه علائم در دو رقم آریکن و زرد علاوه بر اینکه در زمان زودتری بعد از تلقیح اتفاق افتاد، از شدت بیشتری نسبت به دو رقم قبلی نیز برخوردار بود و تا آخرین روز نمونه برداری نیز ادامه یافت.

استخراج DNA از قارچ ورتیسلیوم

برای انجام واکنش‌های Real-time PCR و رسم منحنی استاندارد داشتن DNA ژنومی ورتیسلیوم ضروری است. کمیت DNA محاسبه شده بین ۱۲۵-۳۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر متفاوت بود که کمیت مناسبی برای انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز

اس آر^۱ می‌باشد به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. این آغازگر قطعه‌ای به طول ۱۳۰ جفت باز از ژنوم زیتون را تکثیر می‌نماید (رالو و همکاران^۲، ۲۰۰۰). آغازگرهای فوق به شرکت متابیون^۳ فرانسه سفارش و در آنجا سنتز گردید. مقدار مواد استفاده شده نیز برای یک واکنش ۲۰ مولار Real-time PCR شامل (۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۵/۵ میکرولیتر آغازگر مستقیم^۴، ۵/۵ میکرولیتر آغازگر معکوس^۵، ۴ میکرولیتر نمونه DNA و ۱۰ میکرولیتر مخلوط آماده سایبر^۶) بود. برای تسریع در کار از یک مخلوط آماده (کیت) جهت انجام واکنش به نام SYBR Premix Ex TaqTM (۲x) ساخت شرکت تاکارا^۷ ژاپن استفاده گردید. برای هر تیمار در این واکنش ۳ تکرار تیوب واکنش در نظر گرفته شد.

در واکنش Real-time PCR محصولات از طریق آنالیز منحنی ذوب ارزیابی شدند تا اطمینان حاصل شود که نتایج به دست آمده مربوط به محصول مورد انتظار است و ناشی از تشکیل محصولات غیر اختصاصی یا آغازگرهای دیمر نیست و حتی برای بررسی بیشتر بعد از اتمام فرآیند تکثیر، محصول ایجاد شده توسط تکنیک الکتروفورز از نظر وجود و یا عدم وجود باندهای غیر اختصاصی ارزیابی شدند. در این مطالعه از آنالیز منحنی ذوب و تکنیک الکتروفورز برای تأیید محصول مورد انتظار استفاده شد. دمای متوسط ذوب محصول مورد انتظار برای تکثیر ورتیسلیوم در حدود ۹۰ درجه سانتی گراد بود. آنالیز منحنی ذوب تأیید کرد که هیچ گونه محصول غیر اختصاصی ایجاد نشده است و شرایط آزمایش برای تکثیر مطلوب بوده است.

نتایج و بحث

مشخصات گونه قارچی جدا سازی شده

- 1 (SSR) Simple sequence repeat
- 2 Rallo *et al*
- 3 Metabion
- 4 Forward(f)
- 5 Reverse(R)
- 6 TM SYBR Premix Ex Taq
- 7 TAKARA

خان محمدی و همکاران: کمیت سنجی قارچ *Verticillium dahliae* در ریشه...

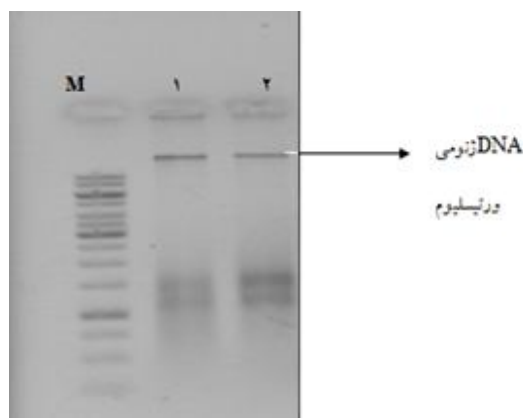
نمودار استاندارد با استفاده از ایجاد یک سری رقت از نمونه استاندارد رسم شد. از DNA ورتیسلیوم نیز به عنوان کنترل مثبت در رسم منحنی استاندارد استفاده شد. ارزیابی نمودار استاندارد بر اساس مقدار R^2 سنجیده می‌شود. اگر این مقدار بالای ۹۵٪ باشد قابل قبول است. میزان R^2 گزارش شده برای نمودار استاندارد تهیه شده از سری رقت‌های ورتیسلیوم در این مطالعه برابر ۹۹٪ بود که نشانگر بالا بودن سطح دقت واکنش بر اساس نمودار استاندارد است.

معمولی و نیز Real-time PCR محسوب می‌شود. البته مقادیر فوق متعاقباً برای استفاده‌های بعدی با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر رقیق گردید. بررسی DNA ژنومی جدایه‌ها در روی ژل آگارز نیز نشان داد که DNA جدا سازی شده از جدایه‌های قارچی از کیفیت مطلوبی برخوردار بود (شکل ۱).

بررسی نتایج واکنش‌های Real-time PCR و ارزیابی منحنی استاندارد

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Rael-Time PCR

| توالی آغازگر | اسامی آغازگر |
|------------------------------|--------------|
| 5'- CGGTGACATAAATACTGAGAG-3' | DB19 |
| 5'-GACGATGCGGATTGAACGAA-3' | DB22 |

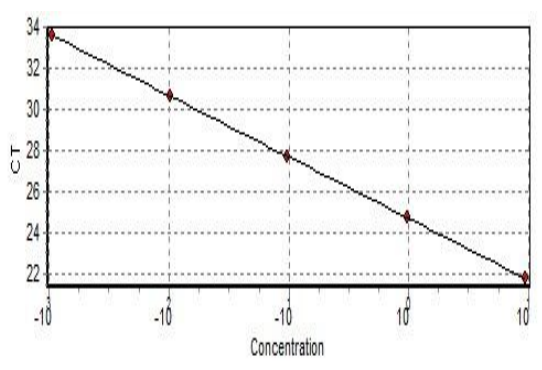


شکل ۱- DNA ژنومی استخراج شده از ورتیسلیوم رشد یافته روی محیط کشت بر روی آگارز ۱٪ پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید. M مارکر مولکولی.

PCR نشان داد که یک قطعه اختصاصی جدایه برگریز به اندازه ۵۳۹ bp در واکنش تکثیر شده است (شکل ۵). این نتایج نشان داد که هیچ گونه محصول غیراختصاصی تولید نشده و شرایط آزمایش برای تکثیر مطلوب بوده است.

بررسی نتایج حاصل از کمیت سنجی Real-time PCR برای تعیین حساسیت یا مقاومت ارقام مختلف به *V.dahliae*

در تحقیق حاضر، واکنش چهار رقم زیتون (آبلونکا، آریبکن، زرد و کرونایکی) نسبت به بیماری ایجاد شده توسط جدایه برگریز گونه *V. dahliae* با کمیت سنجی مقدار DNA بیمارگر در یک دوره زمانی بعد از آلوده سازی با استفاده از تکنیک Real-time PCR ارزیابی شده است. نتایج کمیت سنجی‌های Real-time PCR با استفاده از نمونه‌های DNA کل ریشه آلوده در چهار رقم متفاوت در شکل ۶ نشان داده شده است. بیشترین مقدار DNA (میزان DNA: ۱/۹ نانوگرم) در در رقم کرونایکی در زمان ۲۷ روز بعد از آلوده سازی اتفاق افتاده است و این مقدار ۲ هفته زودتر از مشاهده علائم در گیاه بوده است.



شکل ۲- منحنی استاندارد با $R^2 = .99$ و ضریب کارایی (Efficiency) برابر ۱/۱۶. محور افقی لگاریتم غلظت DNA و محور عمودی سیکل آستانه می باشد.

در شکل ۲ نمودار استاندارد با معادله (سیکل آستانه) $Ct^1 = -2.984 \text{ Log}[\text{DNA}] + 24.728$ آورده شده است.

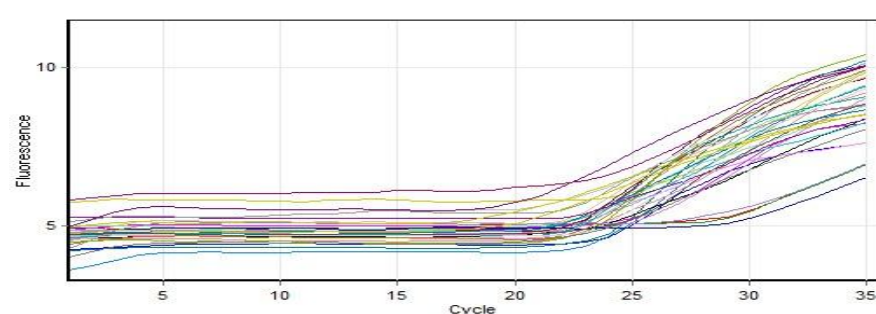
تخمین غلظت‌های مجهول DNA ورتیسلیوم در نمونه‌های ریشه نهال‌های آلوده توسط این تکنیک با قرار دادن سیکل آستانه به دست آمده از نمونه‌های مجهول در معادله خطی نمودار استاندارد طبق روش مرکادو-بلانکو (۲۰۰۳) حاصل شد. مقدار سیکل آستانه و غلظت *V. dahliae* قارچ DNA در نمونه‌های ناشناخته با در نظر گرفتن دوره زمانی بعد از آلوده سازی در جدول ۲ با استفاده از این روش محاسبه گردید. به منظور کمیت سنجی DNA قارچ در ریشه نهالهای آلوده زیتون در بازه‌های زمانی متفاوت، تمام نمونه‌های DNA استخراج شده از ریشه گیاه به غلظت ۱۰۰ نانوگرم رسانده شد.

برای این منظور از آغازگر DB19/DB22 برای کمیت سنجی DNA قارچ و از آغازگر Ias22f/Ias22r در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز برای کمیت سنجی DNA گیاه استفاده گردیده است. در شکل ۳ منحنی تکثیر در این سیستم آورده شده است. در این مطالعه دمای متوسط ذوب محصول مورد انتظار برای تکثیر DNA ورتیسلیوم در حدود ۹۰ درجه سانتی گراد بود. این دما احتمال تکثیر غیراختصاصی را پایین می‌آورد و تولیدات غیر اختصاصی تخریب می‌شوند و فلنورسنت انتشار یافته فقط قطعه تکثیر شده هدف متصل شده به سایبرگرین را نشان داده و اجازه کمیت سنجی قطعه تکثیر شده با جفت آغازگرهای DB19/DB22 را می‌دهد. بررسی منحنی ذوب نشان داد که هیچ تکثیر غیر اختصاصی یا دایمر-پرایمر انجام نشده است (شکل ۴). برای اطمینان بیشتر و تایید نتایج حاصل از تکثیر در واکنش Real-time PCR محصولات حاصله در روی ژل آگارز بارگذاری شد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات Real-time

خان محمدی و همکاران: کمیت سنجی قارچ *Verticillium dahliae* در ریشه...

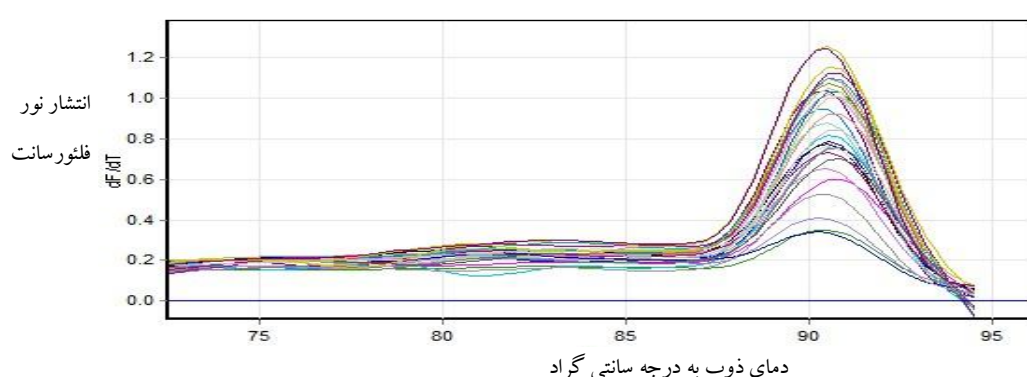
جدول ۲- غلظت DNA قارچ *V. dahliae* در ۱۰۰ نانو گرم از DNA کل استخراج شده از ریشه نهالهای تلقیح شده ارقام زیتون در فواصل زمانی مختلف بعد از تلقیح

| رقم و زمان نمونه برداری پس از تلقیح | سیکل آستانه | DNA غلظت <i>V. dahliae</i> (ng) کل ۱۰۰ نانوگرم / گیاه DNA | رقم و زمان نمونه برداری پس از تلقیح | سیکل آستانه | DNA غلظت <i>V. dahliae</i> (ng) کل ۱۰۰ نانوگرم / گیاه DNA |
|--|-------------|--|---|-------------|--|
| زرد صفر | ۳۰/۵۷ | ۰/۰۱ | آبلونکا صفر | ۳۱ | ۰/۰۰۷ |
| زرد زمان ۲ | ۲۵/۹۰ | ۰/۰۴ | آبلونکا زمان ۲ | ۲۶/۲۵ | ۰/۳۰ |
| زرد زمان ۷ | ۲۳/۱۶ | ۳/۳۱ | آبلونکا زمان ۷ | ۲۴/۸۵ | ۰/۹۱ |
| زرد زمان ۱۵ | ۲۳/۲۱ | ۳/۱۶ | آبلونکا زمان ۱۵ | ۲۴/۰۵ | ۱/۶۵ |
| زرد زمان ۲۷ | ۲۳/۲۶ | ۳/۰۹ | آبلونکا زمان ۲۷ | ۲۳/۶۵ | ۲/۲۹ |
| زرد زمان ۴۱ | ۲۳/۰۴ | ۳/۶۳ | آبلونکا زمان ۴۱ | ۲۳/۷۰ | ۲/۱۸ |
| زرد زمان ۵۶ | ۲۳/۱۹ | ۳/۲۳ | آبلونکا زمان ۵۶ | ۲۳/۸۵ | ۱/۹۴ |
| زرد زمان ۷۷ | ۲۳/۳۴ | ۲/۸۸ | آبلونکا زمان ۷۷ | ۲۴/۱۱ | ۱/۵۸ |
| کروناکی صفر | ۳۱/۵۶ | ۰/۰۰۵ | آرییکن صفر | ۳۰/۸۸ | ۰/۰۰۸ |
| کروناکی زمان ۲ | ۲۵/۴۰ | ۰/۰۶ | آرییکن زمان ۲ | ۲۶/۸۹ | ۰/۱۹ |
| کروناکی زمان ۷ | ۲۴/۸۸ | ۰/۸۹ | آرییکن زمان ۷ | ۲۴/۶۴ | ۱/۰۶ |
| کروناکی ۱۵ | ۲۴/۳۱ | ۱/۳۸ | آرییکن زمان ۱۵ | ۳۰/۸۸ | ۲/۷۵ |
| کروناکی ۲۷ | ۲۳/۸۹ | ۱/۹۰ | آرییکن زمان ۲۷ | ۲۶/۸۹ | ۲/۳۹ |
| کروناکی ۴۱ | ۲۴/۰۶ | ۱/۶۵ | آرییکن زمان ۴۱ | ۲۴/۶۴ | ۲/۱۸ |
| کروناکی ۵۶ | ۲۴/۲۲ | ۱/۴۷ | آرییکن زمان ۵۶ | ۲۳/۵۳ | ۲/۵۱ |
| کروناکی ۷۷ | ۲۵/۰۴ | ۰/۷۹ | آرییکن زمان ۷۷ | ۲۳/۸۵ | ۱/۹۴ |

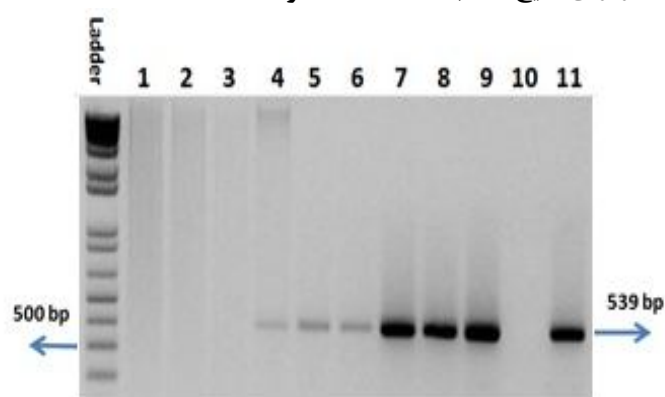


شکل ۳- منحنی تکثیر برای ریشه‌های آلوده شده زیتون، توسط دستگاه Rotor Gene 6000 در سیستم سایبرگرین، محور افقی تعداد سیکل و محور عمودی میزان فلئورسنت قرائت شده توسط دستگاه می باشد.

گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۸ شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴



شکل ۴- منحنی دمای ذوب قطعات تکثیری در مرحله کمیت سنجی نمونه‌های DNA قارچ *V. dahliae* استخراج شده از ریشه نهالهای تلقیح شده با استفاده از آغازگر DB19/DB22.



شکل ۵- الکتروفورز محصولات تکثیر شده در واکنش Real - Time PCR در روی ژل آگارز. سمت چپ: مارکر اندازه، نمونه های ۲، ۱ و ۳: شاهد، نمونه های ۴، ۵ و ۶: مربوط به DNA استخراج شده از ریشه آلوده رقم آبلونکا در زمان های ۲۰ و ۷ روز بعد از تلقیح و نمونه های ۷، ۸ و ۹: مربوط به DNA ریشه آلوده رقم زرد در زمان های ۱۵، ۴۱ و ۲۷ روز بعد از آلوده سازی می باشد. نمونه ۱۰ آب است و نمونه ۱۱ مربوط به زمان ۵۶ روز بعد از آلوده سازی در رقم کروناکی است.

از آلوده سازی از روند تقریباً ثابتی پیروی می کند. در نهایت بیشترین مقدار DNA (میزان DNA: نانوگرم ۳/۶۳) در رقم زرد در زمان ۴۱ روز بعد از آلوده سازی اتفاق افتاده است.

مقدار بالایی از DNA در زمان هفت روز بعد از آلوده سازی یعنی یک هفته قبل از مشاهده اولین علائم وجود داشت که این مقدار از بیشترین مقدار DNA ذکر شده برای هر سه رقم دیگر نیز افزون تر بود. نتایج به دست آمده

در رقم آبلونکا مقدار DNA (میزان DNA: ۲/۲۹ نانوگرم) در زمان ۲۷ روز بعد از آلوده سازی اتفاق افتاده است و این مقدار DNA، ۱۰ روز زودتر از مشاهده علائم در گیاه بوده است. در مورد رقم آبلونکا مقدار DNA (میزان DNA: ۲/۷۵ نانوگرم) در زمان ۱۵ روز بعد از آلوده سازی اتفاق افتاده است و این نشان می دهد بیشترین مقدار DNA ۱۳ روز زودتر از مشاهده علائم در گیاه روی داده است. البته این بالا بودن مقدار DNA تا زمان ۵۶ روز بعد

برگریز *V. dahliae* گزارش شده است. رقم آریکن که از مهم‌ترین کولتیوارهای کشت شده در جنوب اسپانیا محسوب می‌شود با سرعت بیشتری توسط قارچ *V. dahliae* کلونیزه می‌شود و علائم برگ ریزی در آن شدید است (رودریگوز و همکاران، ۲۰۰۸).

نکته قابل توجه در مورد حساسیت ارقام مورد مطالعه، به حساسیت شدید رقم ایرانی زرد به این بیماری مربوط می‌شود. در رقم زرد در زمان ۷ و ۴۱ روز بعد از آلوده سازی بیشترین مقدار DNA قارچ مشاهده گردید (شکل ۶). در این رقم قارچ با سرعت بیشتری (در مقایسه با ارقام دیگر) توانست ریشه نهال‌های تلقیح شده را کلونیزه نماید. این نتایج با بررسی‌هایی که در استان گلستان انجام گرفته است (عطار و همکاران، ۱۳۸۹) مطابقت دارد. در تحقیق فوق ارقام زرد، میشن و کنسروالیا بیشترین نشانه بیماری را در مقابل جدایه‌های برگریز و غیر برگریز نشان دادند و با بروز علائمی مانند پژمردگی شدید، واکنش مشابهی را در برابر هر دو جدایه از خود نشان دادند. در حالی که ارقام دیگری که مقاوم‌تر بودند، واکنش متفاوتی نسبت به جدایه‌های برگریز و غیر برگریز از خود نشان دادند.

نتایج بررسی مقاومت ارقام با استفاده از روش سنتی (تلقیح نهالها و بررسی شدت بروز علائم در آنها) با نتایج حاصل از کمیت سنجی DNA قارچ در سیستم ریشه گیاه میزبان با استفاده از تکنیک *Real-time PCR*، با وجود اجرا در دو استان متفاوت (استان گلستان و استان زنجان) دارای مطابقت‌های قابل توجهی می‌باشد. به این ترتیب، شاید بتوان به کمک تکنیک به کار رفته در این تحقیق در آینده نسبت به غربالگری ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون برای

نشان می‌دهد که مقدار DNA در یک بازه زمان طولانی از زمان ۷ روز بعد از آلوده سازی به بعد، بالا بوده است. بر اساس نتایج به دست آمده از کمیت سنجی واکنش-*Real-time PCR* از آغاز آلوده سازی نهال‌ها تا ۷۷ روز پس از آن می‌توان گفت که حساسیت رقم زرد بیشتر از سایر ارقام بوده و سپس رقم آریکن و در نهایت رقم آبلونکا نسبت به این قارچ حساسیت نشان داده‌اند و رقم کروناکیکی نسبت به سه رقم دیگر مقاوم‌تر بود. بر اساس مطالعات قبلی (مارتوس-مرنو و همکاران^۱، ۲۰۰۶؛ مارکاکیس و همکاران^۲، ۲۰۰۹) نیز رقم کروناکیکی رقم نسبتاً مقاوم به این بیماری ارزیابی شده است. در این مطالعه نیز نشان داده شده است که رقم کروناکیکی محدودیت بیشتری برای استقرار بیمارگر در روی ریشه ایجاد کرده است. در مطالعه‌ای که در داخل کشور نیز انجام شده است، رقم کروناکیکی جزء ارقام مقاوم گروه بندی شده است (عطار و همکاران، ۱۳۸۹). بنابراین نتایج تحقیق با استفاده از روش *Real-time PCR* با روش‌های معمول ارزیابی مقاومت همپوشانی مناسبی داشته است.

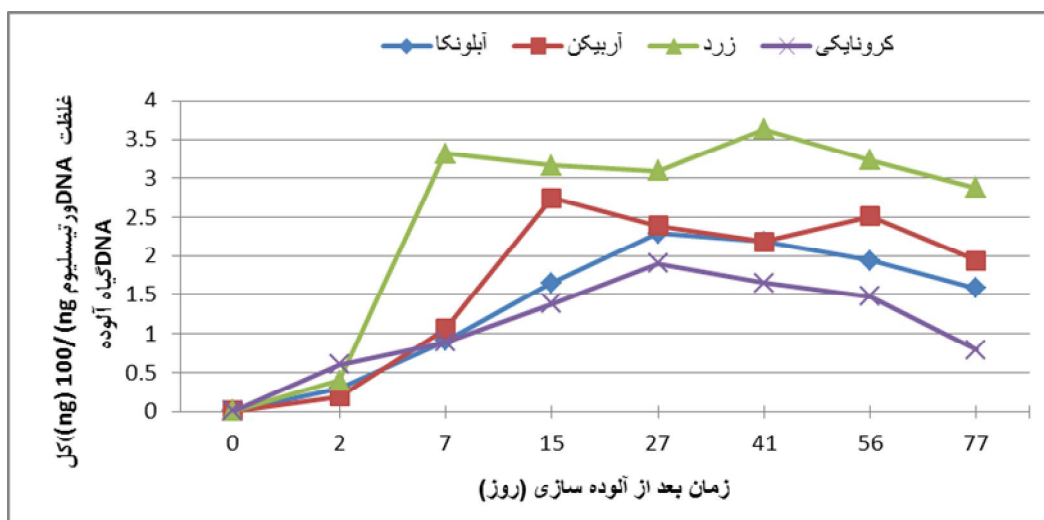
بررسی توسعه بیماری در رقم کروناکیکی همچنین نشان داد که در رقم مذکور علائم بیماری با شدت کمتری بروز پیدا می‌کند و احتمالاً آلودگی رقم مذکور با جدایه برگریز منجر به مرگ آن نخواهد شد. همچنین نتایج توسعه پژمردگی ورتیسلیوم در ارقام آریکن و آبلونکا با گزارشات قبلی (مرکادو-بلانکو و همکاران، ۲۰۰۲، ۲۰۰۳؛ لوپز-اسکودرو و همکاران، ۲۰۰۴) مطابقت دارد.

نتایج مطالعه اخیر نشان داد که رقم آریکن حساس به این بیماری است. این نتایج با مطالعات انجام شده در اسپانیا تا حدودی مطابقت دارد. در تحقیق انجام گرفته در این کشور (لوپز-اسکودرو و بلانکو-لوپز^۳، ۲۰۰۵) آریکن شدیداً حساس و آبلونکا به طور متوسط حساس به جدایه

1- Martos-Moreno *et al.*

2- Markakis *et al.*

3- Lopez-Escudero & Blanco-Lopez



شکل ۶- نتایج حاصل از کمیت سنجی DNA ورتیسلیوم پاتوتیپ برگریز در ریشه چهار رقم زرد، کروناکی، آبلونکا و آریکن در فواصل زمانی مشخص بعد از فرآیند آلوده سازی

سپاس‌گزاری

مراحل مختلف این پژوهش در آزمایشگاه بیولوژی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان و گلخانه ایستگاه تحقیقات زیتون طارم به انجام رسیده که نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از مسئولین محترم ایستگاه تحقیقات زیتون طارم و بخش تحقیقات گیاهپزشکی مرکز تحقیقات زنجان به خاطر همکاری‌های بی‌دریغ در تمام مراحل تحقیق قدردانی نمایند.

مقاومت به قارچ ورتیسلیوم در سطح وسیع اقدام نمود. بی‌شک به دلیل وجود منابع غنی ژنتیکی در منطقه طارم و نیز وجود بزرگترین ژرم پلاسما زیتون خاورمیانه در ایستگاه تحقیقات زیتون طارم، بهینه سازی روش غربالگری ملکولی ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون می‌تواند نقش مهمی در شناسایی منابع مقاومت به بیماری و به کارگیری آنها در کولتیوارهای تجاری ایفاء نماید.

منابع

۱. افشاری آزاد، ه.، معینی، م.، ر.، صلاتی، م.، و میر حسینی مقدم، س. ع. ۱۳۷۹. بررسی وضعیت آلودگی درختان مادری زیتون به عوامل خسارت زای قارچی، باکتریایی و ویروسی استانهای مختلف کشور. گزارش پژوهشی موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی کشور. ۱۲۰ ص.

خان محمدی و همکاران: کمیت سنجی قارچ *Verticillium dahliae* در ریشه...

۲. بی نام، ۱۳۸۹. آمارنامه کشاورزی. وزارت جهاد کشاورزی، دفتر آمار و فن آوری اطلاعات، قابل دسترس در: <http://www.maj.ir>
۳. درویشیان، م. ۱۳۷۶. زیتون. نشر آموزش کشاورزی، کرج. ۲۹۵ ص.
۴. رهنما، ک.، رضوی، س.، ر.، لطیفی، ن. و زارعی، ح. ۱۳۷۷. بررسی وقوع خشکیدگی درختان زیتون در استان گلستان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ۲۲۲ ص.
۵. عطار، ل.، رهنما، ک.، عراقی، م. م.، صدروی، م. و صلاتی، م. ۱۳۸۹. بررسی واکنش ارقام مختلف زیتون به جدایه های برگریز و غیر برگ ریز قارچ *V. dahlia* در استان گلستان. نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)، ۲۴(۴): ۴۰۶-۴۱۲.
۶. نصر اصفهانی، م. ۱۳۷۶. اصول و روشهای تشخیص در بیماری شناسی گیاهی. ترجمه (آر، تی، وی، فاکس). انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان. ۲۹۶ ص.
7. Filion, M. M., Arnaud, S. T., and Jabaji-Hare, S. H. 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 53: 67-76.
8. Gayoso, C., and pomar, F. 2007. Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivares. *European Journal of Plant pathology*, 118: 199-209.
9. Hietala, A. M., Kvaalen, H., Schmidt, A., Johnk, N., Solheim, H., and Fossdal, C. G. 2004. Temporal and spatial profiles of chitinase expression by Norway spruce in response to bark colonization by *Heterobasidion annosum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7): 3948-3953.
10. Kabir, Z., Bhat, R. G., and Subbarao, K. V. 2004. Comparison of media for recovery of *Verticillium dahliae* from soil. *Plant Disease*, 88: 49-55.
11. Kim, K. Y., Xiao, C. L., and Rogers, D. J. 2005. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphaeropsis pyripitrescens*. *Mycologia*, 97: 25-32.
12. Lachure, K., and Sedra, M. H. 2002. Characterization of *Verticillium dahliae* isolates from europe using RAPD markers. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 170-178.
13. Lievens, B., M. Brouwer, A. C. R. C., Vanachter, C. A., Levesque, B. P. A., and Thomma, B. P. H. J. 2003. Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 223: 113-122.

14. L'opez-Escudero, L. F. J., del Rio, C., Caballero, J. M., and Blanco-L'opez, M. A. 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. European Journal of Plant Pathology, 110: 79–85.
15. Lo'pez-Escudero, L. F. J., and Blanco-Lo'pez .M .A. 2005. Recovery of young olive trees from *Verticillium dahliae*. European Journal of Plant Pathology, 113: 367–375.
16. Markakis, E. A., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Paplomatas, E. J., and Tjamos, E. C. 2009. Symptom development, pathogen isolation and Real-Time QPCR quantification as factors for evaluating the resistance of olive cultivars to *Verticillium* pathotypes. European Journal of Plant Pathology, 82: 47-51.
17. Martos-Moreno, C., Lopez-Esquero, F. J., and Blanco-Lopez, M. A. 2006. Resistance of olive cultivars to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. Horticultural Science 41: 313–1316.
18. Mercado-Blanco, J., Rodr'iguez-Jurado, D., P'erez-Art'es, E., and Jim'enez-D'iaz1, R. M. 2002. Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by Nested-PCR. European Journal of Plant Pathology, 108: 1–13.
19. Mercado-Blanco, J., Collado-Romero, M., Parrilla-Araujo, S., Rodrigues-Jurado, D., and Jimenes-Diaz, D. 2003. Quantitive monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. Physiological and Molecular Plant Pathology, 63: 91-105.
20. Muwarfaq, R. K. 2006. Seed transmission of *Verticillium dahliae* in olive as detected by a highly sensitive Nested-PCR based assay. Phytopathologia Mediterranea, 45: 15-23.
21. Novaes, R. M. L., Rodrigues, J.G., and Lovato, M. B. 2009. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. Genetics and Molecular Research, 8: 86-96.
22. Rallo, P., Dorado, G., and Mart'ın, A. 2000. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive trees (*Olea europaea* L.). Theoretical and Applied Genetics, 101:984–989.
23. Rodr'iguez, E., Garc'ia-garrido, J., Garc'ia, M., and Campos, M. 2008. Agricultural factors affecting *Verticillium* wilt in olive orchards in Spain. European Journal of Plant Pathology 22: 287–295.
24. Rogers, S. O., and Bendich, A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology, 5: 69–76.
25. Song, P., Cai, C. Q., Skokut, M., Kosegi, B. D., and Petoline, J. F. 2002. Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in maize. PCR Plant Cellule Reproduction 20: 948-954.