

استفاده از تکنیک PCR آشیانه‌ای برای ردیابی سریع قارچ *Rosellinia necatrix* عامل پوسیدگی سفید ریشه درختان از خاک و ریشه^o

The Use of Nested PCR Method for Rapid Detection of *Rosellinia necatrix* Causal Agent of White Root Disease From Soil and Root

سید مرتضی محمدی میمند^۱، بهرام شریف نبی^{۱*} و مسعود بهار^۱

چکیده

بیماری پوسیدگی سفید ریشه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه در دنیا و ایران می‌باشد که توسط قارچ *Rosellinia necatrix* ایجاد می‌شود. به منظور ردیابی سریع بیمارگر از خاک و ریشه، شش سری خاک از کنار طوقه درختان آلبالو آلوده و دو نمونه خاک به عنوان شاهد منفی و مثبت جمع‌آوری گردید. استخراج مستقیم DNA از هشت سری خاک مذکور و ریشه‌های آلبالو دارای میسلیوم‌های سفید و خاکستری روی پوست، ریشه‌های دارای میسلیوم‌های بادبزنی مانند و ریشه بدون علائم و هم-چنین دو ریشه باقلا (گیاه آزمون) دارای ریشه‌های آغشته به میسلیوم روی سطح ریشه و ریشه‌های فاقد علائم صورت گرفت. ردیابی بیمارگر از خاک و ریشه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی R2، R8 و R7 در R10 Nested PCR انجام شد. طبق نتایج به دست آمده، از تمام شش سری خاک، ریشه‌های آلبالوی دارای میسلیوم‌های سفید و خاکستری و میسلیوم‌های بادبزنی مانند و ریشه‌های باقلا دارای علائم، بیمارگر ردیابی شد. ردیابی قارچ از ریشه‌های بدون علائم در مورد هر دو میزبان امکان‌پذیر نشد. در ادامه توالی ناحیه ITS جدایه مورد آزمایش تکثیر، همسانه سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی گردید. نتایج هم‌ردیف سازی توالی مورد نظر با توالی *R. necatrix* ثبت شده موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه به دست آمده از خاک حداکثر شباهت (۹۸/۹۹٪) را با جدایه شناخته شده *R. necatrix* دارد. با توجه به یافته‌های این پژوهش به نظر می‌رسد تکنیک Nested PCR توانایی خوبی در ردیابی سریع و مقادیر کم قارچ در خاک‌های آلوده و ریشه گیاهان را دارد.

واژه‌های کلیدی: تکنیک Nested PCR، پوسیدگی سفید ریشه، ردیابی، *Rosellinia necatrix*

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان
o: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*: نویسنده مسئول

وجود دارد که یکی از این روش‌ها، استفاده از ستون PVPP است (Wilson 1997; Ruano-Rosa et al. 2007). در این پژوهش از روش ردیابی با کمک Nested PCR برای شناسایی هر چه سریع‌تر *Rosellinia necatrix* در باغ‌ها و مزارع آلوده به بیمارگر استفاده شده است که در مدیریت این بیمارگر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری از باغ‌های آلوده

در تابستان ۱۳۸۷ از باغ‌ها و نهالستان‌های آلبالو، هلو، گیلان، بادام و گلابی استان اصفهان نمونه‌برداری به عمل آمد. ریشه گیاهان مشکوک به بیماری مورد بررسی قرار گرفت و در صورت مشاهده میسلیوم‌های قارچ عامل بیماری روی این ریشه‌ها، با قرار دادن هر یک داخل پاکت‌های جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند. هم‌زمان با آن، از خاک کنار طوقه درختان آلوده حدود یک کیلوگرم خاک جمع‌آوری شد و یک نمونه خاک هم که از خاک مزرعه گندم جمع‌آوری شد و در فشار ۱۵ PSI و دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد و به‌عنوان شاهد منفی انتخاب گردید. برای شاهد مثبت از نمونه خاکی که در گلخانه به قارچ مذکور آلوده شده بود استفاده شد. نمونه خاک‌های جمع‌آوری شده در دمای اتاق به مدت ۱۰ روز قرار داده شدند، تا خشک شوند. سپس خاک کوبیده شد تا خوب نرم شود و بعد آن‌ها را از الک دو میلی‌متری گذرانده تا سنگریزه‌ها و بقایای گیاهی آن حذف شود (Scheda et al. 2002; Scheda & Ippolito 2003).

جداسازی قارچ *R. necatrix* از ریشه‌های آلوده جمع‌آوری شده از باغ‌ها

برای جداسازی قارچ *R. necatrix* از نمونه ریشه‌های جمع‌آوری شده، از محیط کشت MEAS (Malt Extract Agar + streptomycin) استفاده شد. برای تهیه این محیط کشت ۳۳/۶ گرم پودر مالت-دکستروز آگار (Merck آلمان) در آب مقطر حل گردید و حجم نهایی به یک لیتر رسانیده شد. این محیط کشت قبل از استفاده در فشار ۱۵ PSI و دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد و در دمای ۶۰°C به آن ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین اضافه شد (Ruano-Rosa et al. 2007). برای جداسازی قارچ، قطعه‌های یک تا دو سانتی‌متری از ریشه که دارای میسلیوم‌های خاکستری و سفید رنگ بودند به مدت دو دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۰.۵٪ ضد عفونی سطحی

بیماری پوسیدگی سفید ریشه یکی از مه‌ترین بیماری‌های درختان میوه در دنیا و ایران می‌باشد که توسط قارچ *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill. (1904) ایجاد می‌شود. علی‌رغم وقوع این بیماری در بیش از ۱۷۰ گونه گیاهی، خسارت وارده از آن به صورت پژمردگی و مرگ درختان میوه از اهمیت خاصی برخوردار است (Behdad 1975a). خسارات ناشی از این بیمارگر همواره مورد توجه بوده و مدیریت بیماری‌های ناشی از آن‌ها در کوتاه‌ترین زمان از اهداف پژوهشگران می‌باشد. به‌منظور کاهش خسارات ناشی از این بیمارگرها، ردیابی و شناسایی دقیق و سریع بیمارگر امری لازم و ضروری است (Scheda et al 2008). برای شناسایی و ردیابی این بیمارگر روش‌های مختلفی وجود دارد که این روش‌ها معمولاً بر پایه جداسازی بیمارگر از خاک و ریشه روی محیط کشت‌های اختصاصی و یا استفاده از تله برای جداسازی آن‌ها استوار است (Freeman & Szejnberg 1992). این روش‌های جداسازی معمولاً وقت‌گیر بوده و از حساسیت کمی نیز برخوردار هستند. تکنیک Nested PCR یکی از روش‌های ردیابی بیمارگرهای خاک‌زی است که از لحاظ زمانی سریع‌تر و از حساسیت بیشتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار است (Scheda et al. 2008; Ruano-Rosa et al. 2007). بدین منظور استخراج DNA از خاک به دو روش مستقیم و غیرمستقیم انجام می‌شود، که در روش غیرمستقیم ابتدا میکروارگانیزم‌ها از خاک جداسازی شده و سپس استخراج DNA صورت می‌گیرد ولی در روش مستقیم، کل DNA موجود در خاک از سلول‌های زنده و سلول‌های مرده موجود در خاک استخراج می‌شود. اغلب به دلیل مقدار بیشتر DNA استخراج شده در روش مستقیم نسبت به روش غیرمستقیم، از روش مستقیم برای استخراج DNA از خاک استفاده می‌شود (Chenard 2003). در این روش پس از استخراج مستقیم DNA بیمارگر از خاک، به منظور ردیابی بیمارگر از آغازگرهای اختصاصی بیمارگر استفاده می‌شود (Chenard 2003; Cullen & Hirsch 1998). یکی از مهم‌ترین مشکلات این روش وجود موادی مانند ترکیبات فنولی، اسید هومیک و فلزات سنگین است که در ضمن استخراج از خاک جداسازی می‌شوند که این ترکیبات در واکنش PCR، به‌عنوان مواد بازدارنده عمل می‌کنند که به منظور حذف آن‌ها ابتدا باید DNA استخراجی را خالص‌سازی کرد. به‌منظور خالص‌سازی DNA استخراجی از این مواد، روش‌های مختلفی

گردید و پس از شستشو با آب مقطر سترون و خشک شدن بر روی کاغذ صافی سترون در سطح محیط کشت MEAS قرار داده شدند (Freeman & Szejnberg, 1992; Behdad, 1975a). پس از جداسازی و خالص سازی نمودن قارچ از ریشه آلوده، برای شناسایی قارچ، از وجود تورم‌های گلابی شکل در محل دیواره عرضی میسلیوم‌های قارچ استفاده شد (Behdad, 1975b).

آزمایش‌های گلخانه‌ای

از آزمایش‌های گلخانه‌ای به منظور اطمینان از ردیابی بیمارگر و مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج خاک مزرعه بهره گرفته شد. به منظور آلوده کردن خاک در گلخانه از بذر گندم آلوده به قارچ مذکور به عنوان مایه تلقیح یا زادمایه استفاده شد. در داخل هر گلدان مقدار ۳۰ گرم دانه گندم برای هر کیلوگرم خاک استفاده شد. دانه‌های گندم با خاک سطحی تا عمق سه سانتیمتری سطح گلدان مخلوط گردید (Freeman & Szejnberg 1992) و پس از قرار دادن بذرها باقلا (گیاه آزمون)، با خاک سترون مزبور روی سطح آنها پوشانده شد. گلدان‌ها در گلخانه قرار داده شدند و هر سه تا چهار روز یک بار آبیاری شدند و پس از بروز علائم روی باقلا از خاک گلدان‌ها و ریشه باقلا در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Behdad 1975).

استخراج DNA از خاک

به منظور استخراج DNA از خاک، مقدار ۰/۵ گرم خاک، ۰/۵ گرم ساچمه شیشه‌ای سترون (اندازه ۶۰۰-۴۲۵ میکرومتر)، دو عدد ساچمه فلزی پنج میلی‌متری سترون به همراه ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۱۲ M Na_2HPO_4 ، ۱.۵ M NaCl، ۰.۰۲ CTAB) که در حمام آب گرم 65°C نگهداری شده بود در داخل لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و بر روی شیکر در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. محتویات لوله‌ها پس از اختلاط کامل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع فوقانی برداشته شد و به لوله سترون جدیدی انتقال یافت. مقدار ۷۵۰ میکرولیتر کلروفرم به هر نمونه اضافه شد و نمونه‌ها چندین مرتبه به شدت تکان داده شدند. محتویات لوله‌ها پس از اختلاط کامل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و به وسیله تیپ‌های نوک بریده مایع فوقانی برداشته شد و درون لوله سترون جدیدی انتقال یافت. به اندازه ۰/۶ حجم محلول به آن ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و چندین مرتبه محلول داخل لوله‌ها به آرامی

مخلوط شدند و به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در فریزر 20°C - قرار گرفتند. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند سپس مایع بالایی رسوب DNA به آرامی خارج شد. به لوله‌های محتوی DNA، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده شد و به مدت پنج دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از بیرون ریختن فاز رویی و خشک شدن رسوب ته لوله‌ها به هر لوله ۴۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار سترون افزوده شد و نمونه‌ها به مدت یک شب درون یخچال قرار گرفتند تا رسوب DNA در آب مقطر حل شود. DNA استخراج شده قبل از استفاده، با ستون (PVPP) (Schna *et al.* 2002; Schna & Ippolito 2003; Schna & Ippolito 2003).

استخراج DNA از ریشه

از ریشه‌های آلبالو دارای میسلیوم‌های سفید و خاکستری روی پوست، ریشه‌های دارای میسلیوم‌های بادبزنی مانند و ریشه بدون علائم و هم‌چنین دو ریشه باقلا (گیاه آزمون) شامل ریشه‌های دارای میسلیوم‌های سفید بر روی سطح ریشه و ریشه‌های فاقد علائم، استخراج DNA به روش شنا و همکاران (Schna *et al.* 2002) با دو تکرار از هر نمونه انجام گرفت: DNA استخراج شده قبل از استفاده، روی ستون PVPP خالص سازی شد.

خالص سازی DNA بر روی ستون PVPP

به منظور خالص سازی از ستون PVPP استفاده گردید. به این منظور ابتدا یک سوراخ کوچک ته یک لوله اپندورف ۰/۵ میلی‌لیتری ایجاد کرده و درب آن را بریده و یک قطره ساچمه شیشه‌ای که قبلاً اتوکلاو شده و در بافر TE نگهداری شده در داخل لوله ریخته و نصف آن را با پودر PVPP پر کرده و در داخل لوله دو میلی‌لیتری قرار داده شد. به لوله ۰/۵ میلی‌لیتری به ترتیب طی دو مرحله یک بار ۴۰۰ میکرولیتر و مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر آب اضافه کرده و هر مرحله لوله‌های ۰/۵ میلی‌لیتری که در داخل لوله‌های ۲ میلی‌لیتری قرار داده شده بود در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس لوله‌های ۰/۵ میلی‌لیتری داخل لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و به آن DNA استخراج شده اضافه شد و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس لوله‌های ۰/۵ میلی‌لیتری حذف شد و DNA خالص شده داخل لوله‌های ۱/۵

مرحله نیز ۲۵ میکرو لیتر بود که شامل ۱۹/۴۵ میکرو لیتر آب دیونیزه، ۲/۵ میکرو لیتر بافر PCR (10X)، ۰/۲۵ میکرو لیتر از محلول ۱۰ میلی مول dNTPs که حاوی ۲/۵ میلی مول از هر یک از هر یک از نوکلئوتیدها شامل dATP، dCTP، dGTP و dTTP بود ۰/۵ میکرو لیتر محلول حاوی ۵۰ میلی مول $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرو لیتر محلول حاوی پنج واحد آنزیم *Taq DNA Polymerase*، ۰/۴ میکرو لیتر محلول حاوی ۲۰ پیکومول آغازگرهای R7 و R10 و یک میکرو لیتر از DNA انجام گرفت. چرخه دمایی برای واکنش Nested PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه DNA ژنومی در دمای $94^{\circ}C$ به مدت پنج دقیقه و $40^{\circ}C$ چرخه شامل $95^{\circ}C$ ، به مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشته سازی؛ $60^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه برای اتصال و $72^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه برای گسترش و گسترش نهایی در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ده دقیقه انجام گرفت. تکثیر قطعات DNA در دستگاه ترموسایکلر شرکت Eppendorf مدل Gradient Master cycler انجام شد. محصول Nested PCR پس از مخلوط کردن با بافر بارگذاری در ژل آگارز ۲/۴٪ TBE بارگذاری و به مدت ۳ ساعت با ولتاژ ثابت ۶۵ در بافر ۱x الکتروفورز شد.

همسانه سازی قطعه مورد نظر (محصول PCR) در پلاسمید pTZ57R/T

قطعه DNA ۵۰۰ نوکلئوتیدی حاصل از واکنش PCR با جفت آغازگر R2 و R8 برای همسانه سازی در پلاسمید pTZ57R/T مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور پنج میکرو لیتر از واکنش PCR حاوی قطعه مزبور با سه میکرو لیتر بافر، پنج میکرو لیتر آب، ۱/۵ میکرو لیتر پلاسمید و ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم لیگاز T_4DNA مخلوط شده و به مدت دو ساعت در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. پس از این مدت واکنش اتصال یا Ligation به سلولهای *E. coli* Mc1061 انجام شد. پس از همسانه سازی توالی مورد نظر به منظور تایید همسانه سازی از دو روش غربال سازی سریع و PCR استفاده شد. پس از توالی یابی، توالی *R. necatrix* جدا شده از خاک با استفاده از ابزار جستجوی BLAST موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (www.NCBI.nlm.nih.gov) با توالی جدایه *R. necatrix* (شماره دسترسی AB462493.1) موجود در بانک ژن مقایسه شد. از هم‌ردیف سازی دوتایی با استفاده از نرم افزار DNAMAN ver 4.02 برای تعیین درصد یکنواختی توالی‌ها استفاده شد.

میلی لیتری در دمای $20^{\circ}C$ - نگهداری شد (Schena & Ippolito 2003; Ruano-Rosa et al. 2007).

انجام واکنش های PCR آشیانه‌ای

ردیابی بیمارگر از خاک و ریشه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی R2، R7 و R8 در آزمون PCR آشیانه‌ای یا Nested PCR انجام شد. توالی این دو جفت آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است:

جدول ۱: آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در ردیابی

قارچ *Rosellinia necatrix*

Table 1: Primers and their sequences used in detection of *Rosellinia necatrix*

نام آغازگر	توالی
Primer	Sequence (5' – 3')
R2	5'CAA AAC CCA TGT GAA CAT ACC A3'
R8	5'CCG AGG TCA ACC TTT GGT ATA G3'
R7	5'AAC CAT AGG CGA GAT GAG AAA T3'
R10	5'CCC CTG TTG CTT AGT GTT GG3'

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرو لیتر از مخلوط واکنش شامل ۱۵/۲۵ میکرو لیتر آب دیونیزه، ۲/۵ میکرو لیتر بافر PCR (10X)، ۰/۲۵ میکرو لیتر از محلول ۱۰ میلی مول dNTPs که حاوی ۲/۵ میلی مول از هر یک از هر یک از نوکلئوتیدها شامل dATP، dCTP، dGTP و dTTP بود، ۰/۵ میکرو لیتر محلول حاوی ۵۰ میلی مول $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرو لیتر محلول حاوی پنج واحد آنزیم *Taq DNA Polymerase*، ۲/۵ میکرو لیتر محلول حاوی ۲۰ پیکومول آغازگرهای R2 و R8 و یک میکرو لیتر از DNA انجام گرفت. چرخه دمایی برای واکنش PCR و تکثیر قطعات DNA مطابق روش شنا و همکاران (Schena et al. 2002) تنظیم گردید: واسرشته سازی اولیه DNA ژنومی در دمای $95^{\circ}C$ به مدت پنج دقیقه و $35^{\circ}C$ چرخه شامل $95^{\circ}C$ ، به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشته سازی؛ $50^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال و $72^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه برای گسترش و گسترش نهایی در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ده دقیقه انجام گرفت.

در ادامه از محصول PCR اولیه به عنوان رشته الگو در Nested PCR استفاده شد. حجم کل مواد به کار رفته در این

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی قارچ *R. necatrix*

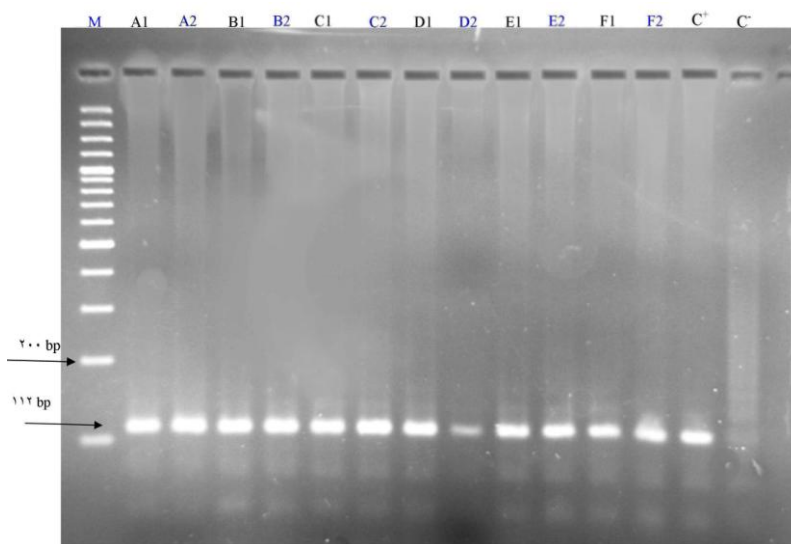
جدایه قارچ جداسازی شده از ریشه آلوده، قارچ *R. necatrix* شناسایی گردید که میسلیم‌های آن دارای تورم‌های گلابی‌شکل در محل دیواره عرضی بودند که مشخصه اصلی در شناسایی قارچ *R. necatrix* است (شکل ۱).

استخراج DNA از خاک

طبق نتایج به‌دست آمده از PCR آشیانه‌ای تمام نمونه خاک‌های جمع‌آوری شده به‌جز شاهد منفی دارای باند تکثیری ۱۱۲ جفت بازی بودند که دلیلی بر ردیابی قارچ *Rosellinia necatrix* در خاک می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۱: حضور تورم‌های گلابی‌شکل در محل دیواره عرضی هیف *Rosellinia necatrix*.
Fig 1: Presence of typical pear-shaped hyphal swelling in *Rosellinia necatrix*.



شکل ۲: تکثیر باند ۱۱۲ جفت بازی *Rosellinia necatrix* بر اساس Nested PCR با آغازگر R7 و R10 از خاک. A₁, A₂: خاک باغ اول، B₁, B₂: خاک باغ دوم، C₁, C₂: خاک باغ سوم، D₁, D₂: خاک باغ چهارم، E₁, E₂: خاک باغ پنجم، F₁, F₂: خاک باغ ششم، C⁺: شاهد مثبت DNA قارچ *R. necatrix*، C⁻: شاهد منفی از خاک مزرعه گندم سترون شده انتخاب شد

M: نشانگر مولکولی اندازه 100bp plus

Fig 2: Amplification of 112 bp bands in Nested PCR using primers R7, R10 from soil confirming the existence of *Rosellinia necatrix*. A₁, A₂: Soil from orchard#1; B₁, B₂: Soil from orchard#2; C₁, C₂: Soil from orchard#3; D₁, D₂: Soil from orchard#4; E₁, E₂: Soil from orchard#5; F₁, F₂: Soil from orchard#6; C⁺: Positive DNA control; C⁻: Negative sterilized wheat field soil and M: Molecular marker 100bp ladder.

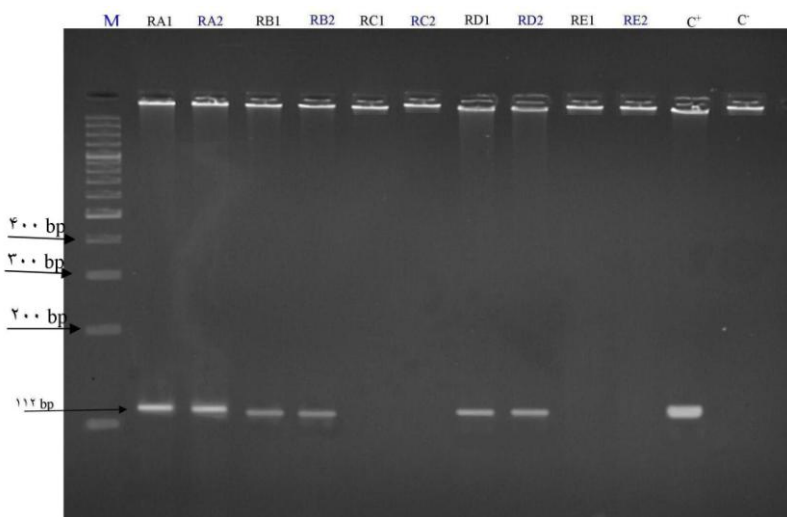
موجود در GenBank تفاوت داشت. بر اساس این نتایج، قطعه تکثیر شده از DNA استخراج شده از خاک، مربوط به قارچ *R. necatrix* است که دلیلی بر صحت ردیابی بیمارگر از خاک می‌باشد.

به‌منظور کاهش خسارت ناشی از این بیمارگر *R. necatrix*، ردیابی دقیق و سریع بیمارگر در خاک امری ضروری است که برای اینکار روش‌های مختلفی وجود دارد که این روش‌ها معمولاً بر پایه جداسازی بیمارگر از خاک و ریشه با استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی و یا استفاده از تله‌های مختلف برای جداسازی آن‌ها استوار است (Freeman & Szejnberg, 1992). این روش‌های جداسازی معمولاً وقت‌گیر بوده و از حساسیت کمی نیز برخوردار هستند. تکنیک Nested PCR یکی از روش‌های ردیابی این بیمارگر است که از لحاظ زمانی سریع‌تر و از حساسیت بیشتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار است. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که به‌دلیل حساسیت بالای تکنیک Nested PCR، می‌توان از آن برای ردیابی هر چه سریع‌تر و دقیق‌تر بیمارگر از خاک باغات آلوده و ریشه گیاهان آلوده بهره جست. کاربرد این روش می‌تواند در غربال سازی خزانه‌های تولید نهال و باغات در دست احداث مفید واقع گردد.

از میان ریشه‌های گیاهان آلبالو مورد بررسی، ردیابی قارچ تنها از ریشه‌های آلبالوی دارای میسلیوم‌های سفید و خاکستری و میسلیوم‌های باد بزن مانند امکان‌پذیر بود و در مورد باقلا نیز ردیابی قارچ فقط در ریشه‌های دارای علائم، ممکن شد. از ریشه‌های بدون علائم در مورد هر دو میزبان ردیابی قارچ امکان پذیر نشد (شکل ۳). قابل ذکر است که در پژوهش حاضر نیز عدم ردیابی قارچ در ریشه‌های فاقد علائم قابل مشاهده به معنای فقدان آلودگی به قارچ عامل بیماری نمی‌باشد. احتمال می‌رود که ردیابی قارچ از این نمونه‌ها با استفاده از تکنیک‌هایی با حساسیت بالاتر از جمله PCR کمی امکان‌پذیر باشد.

تعیین توالی قسمتی از نواحی ITS1, ITS2, 5.8S rRNA

هم‌ردیف سازی دوتایی توالی همسانه سازی شده با توالی موجود در GenBank جدایه *R. necatrix* (شماره دسترسی AB462493.1) با استفاده از نرم افزار DNAMAN انجام شد (شکل ۴). نتایج حاصل از هم-ردیف سازی دوتایی توالی همسانه سازی شده، ۹۸/۹۹ درصد یک‌نواختی با توالی موجود در GenBank دارد و همچنین توالی همسانه سازی شده در سه جایگاه نوکلوتیدی با توالی



شکل ۳: تکثیر باند ۱۱۲ جفت بازی *Rosellinia necatrix* بر اساس Nested PCR با جفت آغازگر R7 و R10 از ریشه. RA₁, RA₂ ریشه‌های آلبالو دارای میسلیوم سفید، RB₁, RB₂ ریشه آلبالو دارای میسلیوم‌های باد بزن مانند، RC₁, RC₂ ریشه آلبالو فاقد علائم، RD₁, RD₂ ریشه باقلا دارای میسلیوم، RE₁, RE₂ ریشه باقلا فاقد علائم، C+ شاهد مثبت، C- شاهد منفی، از ریشه باقلا سالم، M:

نشانه‌گر مولکولی اندازه 100bp plus

Fig 3: Amplification of 112 bp bands in Nested PCR using primers R7, R10 from root confirming the existence of *Rosellinia necatrix*. RA₁, RA₂: Cherry root covered by cottony mycelium, RB₁, RB₂: Cherry root covered by mycelial fans; RC₁, RC₂: Symptomless cherry root; RD₁, RD₂: Faba root covered by mycelia; RE₁, RE₂: Symptomless faba root; C⁺: Positive DNA control; C⁻: Healthy faba root as negative control and M: Molecular marker 100bp ladder.



شکل ۴: نتایج هم‌ردیف سازی توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS₁، ITS₂، 5.8S rRNA قارچ *Rosellinia necatrix* جدا شده از خاک اصفهان با توالی جدایه *R. necatrix* ثبت شده در بانک ژن.

Fig. 4: Alignment of nucleotide sequences of ITS₁، ITS₂، 5.8S rRNA in *Rosellinia necatrix* isolated from Isfahan soil with *R. necatrix* registered in GenBank.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه ۵۳ متن انگلیسی مراجعه شود.

The Use of Nested PCR Method for Rapid Detection of *Rosellinia necatrix* Causal Agent of White Root Disease From Soil and Root

Mohammadi Meymand¹, S. M., Sharifnabi^{1*}, B. and Bahar¹, M.

Abstract

White root rot disease, caused by *Rosellinia necatrix* is one of the most important disease of fruit trees in Iran and worldwide. To detect the pathogen from soil and root, six infected soil samples were collected from cherry crown trees and two samples were collected as positive and negative control. DNA Extraction from eight soil samples including infected cherry roots by white cottony mycelium, roots infected by white mycelial fans and symptom less roots and two faba roots, with white cottony mycelium and symptom less root was performed. Detection of the Pathogen was done by two specific primer pairs R2 .R8 and R7 .R10 in Nested PCR reaction. The results showed the detection from six infected soil, positive control and in roots colonized by white cottony mycelium and roots by white mycelial fans and faba roots colonized by white cottony mycelium. No detection was achieved from symptom less roots. To verify the accuracy of the used detection method, ITS region was amplified and cloned in pTZ57R/T vector and sequenced. Comparison of the sequence showed %98.99 similarities to the recognized isolate of *R. necatrix*. According to our findings, it seems that Nested PCR method could be useful to rapid detection of *R. necatrix* from soil and root of plants in orchards.

Keywords: *Rosellinia necatrix*, Nested PCR, White root rot, Detection

References

- BEHDAD, E. 1975a. Isolation and cultivation of *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl., *in vitro* and its identification. Iran journal of Plant Pathology. 11: 122-137.
- BEHDAD, E. 1975b. Morphology, distribution, importance and hosts of *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl., the cause of white root rot in Iran. Iran journal of Plant Pathology. 11: 30-71
- BEHDAD, E. 1976. Influence of soil amendments, water management and tree species on the growth of *Rosellinia necatrix* (Hartig) Berl., the cause of white root rot. Iran journal of Plant Pathology. 12: 27-41
- CHENARD, V. 2003. Evaluation of methods of soil DNA extraction for PCR. MSc. thesis submitted to Alberta University. 102 pp.
- CULLEN, D. W. AND HIRSCH, P.R. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. Soil Biology and Biochemistry 30: 983-993.
- FREEMAN, S. AND SZTEJNBERG, A. 1992. *Rosellinia*. PP. 71-73. In: L. L Singleton, J.D. Mihail and C. M. Rush (Eds), Method for research on soil borne phytopathogenic fungi. APS press, USA.
- RUANO-ROSA, D., SCHENA, L., IPPOLITO, A. AND LOPEZ-HERRERA, C.J 2007. Comparison of conventional and molecular method for the detection of *Rosellinia necatrix* in avocado orchards in southern Spain. journal of Plant Patholog. 56: 251-256.
- SCHENA, L. AND IPPOLITO, A. 2003. Rapid and sensitive detection of *Rosellinia necatrix* roots and soils by real time scorpion-PCR. Journal of Plant Pathology 85: 15-25.
- SCHENA, L., NIGRO, F. AND IPPOLITO, A. 2002. Identification and detection of *Rosellinia necatrix* by conventional and real time Scorpion – PCR. European Journal of Plant Pathology 108: 355-366.
- SCHENA, L., NIGRO, F. AND IPPOLITO, A. 2008. Integrated management of *Rosellinia necatrix* root rot on fruit tree crops PP. 137-158 In: Ciancio., A. and Mukerji., K.G. (Eds.), Integrated management of disease caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria. Springer Science.
- WILSON, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology 63: 3741-3751.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 9-15= ۹-۱۵).

1. Former MSc. Student and Associate Professors of Plant Pathology, Department. of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

*: Corresponding author