گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۵ شماره ۳، پاییز ۹۱

ردیابی سریع *Armillaria mellea* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه درختان از نمونه-های خاک و چوب با استفاده از تکنیک PCR آشیانه‌ای

الهام یوسفی همدانی[1]*، بهرام شریف نبی[2] و مسعود بهار[3]

۱*- **نویسنده مسؤول:** دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
(yousefi_1387@yahoo.com)

۲- استاد بیماری شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- دانشیار بیماری شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳

چکیده

بیماری پوسیدگی آرمیلاریایی ریشه و طوقه که توسط گونه‌های *Armillaria* ایجاد می‌شود، یکی از بیماری-های مهم گیاهان چوبی اعم از درختان میوه، جنگلی و زینتی در مناطق مختلف می‌باشد. این بیماری در استان اصفهان به شدت شیوع دارد و همه ساله خسارت فراوانی را به درختان میوه وارد می‌سازد. از آنجا که در میان درختان میوه تعداد کمی رقم مقاوم به بیماری یافت می‌شود و هیچ اقدام موثری نیز در کنترل کامل بیماری وجود ندارد، ردیابی عامل بیماری در خاک جهت پایه‌ریزی یک طرح مدیریتی و کاهش خسارت بیماری حائز اهمیت است. در این تحقیق جهت ردیابی سریع، حساس و اختصاصی جدایه‌های *Armillaria* از نمونه‌های خاک و چوب، از آغازگرهای اختصاصی AR1 و AR2 با موفقیت استفاده شد. استخراج DNA به طور مستقیم از نمونه-های خاک و چوب انجام گرفت و ناحیه ITS در مرحله اول به وسیله آغازگرهای عمومی ITS1 و ITS4 در واکنش PCR و در مرحله دوم توسط آغازگرهای اختصاصی AR1 و AR2 در واکنش nested PCR تکثیر شد. با استفاده از روش nested PCR، ردیابی بیمارگر به طور مستقیم در نمونه‌های خاک و ریشه بدون نیاز به جداسازی و کشت میسلیوم آرمیلاریا و در مراحل اولیه بیماری امکان‌پذیر می‌باشد.

کلید واژه ها: پوسیدگی آرمیلاریایی ریشه و طوقه، PCR آشیانه‌ای، ردیابی، آغازگرهای اختصاصی

مقدمه

بیماری پوسیدگی آرمیلاریایی ریشه و طوقه از بیماری‌های مهم گیاهان چوبی می‌باشد که به وسیله برخی گونه‌های *Armillaria* موسوم به قارچ عسلی ایجاد می‌گردد (بهداد، ۱۳۶۱؛ بی نام،[1] ۲۰۰۰). گونه‌های مختلف این قارچ به صورت بیمارگر،گندرو و یا مرده-خوار روی دامنه وسیعی از گیاهان میزبان ایجاد آلودگی می‌نمایند (کوتز و همکاران[2]، ۲۰۰۳). در میان گونه‌های بیماری‌زای آرمیلاریا گونه *Armillaria mellea* (Vahl : Fr. Kummer) در آب و هوای مدیترانه‌ای شایع‌تر است و علت عمده مرگ درختان میوه، جنگلی و زینتی می‌باشد (دلیلی و همکاران[3]، ۲۰۱۰). این گونه نه تنها در باغ‌ها و تاکستان‌ها، بلکه در جنگل‌ها و مناطق شهری نیز شایع است (بوم گارتنر و همکاران[4]، ۲۰۱۰). در ایران *A. mellea* به طور وسیعی در سراسر کشور گسترش دارد و به عنوان عامل پوسیدگی ریشه به خوبی شناخته شده است (آصف و همکاران، ۲۰۰۳ و دلیلی و همکاران، ۲۰۱۰). بر اساس گزارش بهداد (۱۳۶۱)

1- Anonymous.
2- Coetzee *et al.*
3- Dalili *et al.*
4- Baumgartner *et al.*

بیماری مزبور در اصفهان به شدت شیوع دارد و سالیانه خسارت شدیدی را به محصولات باغی وارد می‌سازد. با وجود اهمیت بسیار زیاد این بیماری، کنترل موثری علیه آن وجود ندارد. در میان درختان میوه تعداد کمی رقم مقاوم به بیماری وجود دارد و گاه هیچ رقم مقاومی یافت نمی‌شود. از سوی دیگر در صورتی که عملیات زراعی ضعیف باشد درختان آمادگی ابتلای به بیماری را پیدا خواهند کرد و انتخاب رقم مقاوم سودی نخواهد داشت (دونر، ۲۰۰۴ [1]). استفاده پیش از کاشت از سموم تدخینی، مایه تلقیح را در ریشه‌های پوسیده از بین می‌برد، اما نمی‌تواند تا عمق لازم در خاک نفوذ کند و به همه ریشه‌های آلوده برسد. از سویی قارچ عامل بیماری در زیر پوست رشد می‌کند و سموم زنده‌کش (Biocide) یا قارچ‌کش و نیز عوامل کنترل بیولوژیک نمی‌توانند کنترل موثری فراهم نمایند (بوم گارتنر، ۲۰۰۴، بوم گارتنر و وارنوک [2]، ۲۰۰۶؛ بوم گارتنر و همکاران، ۲۰۱۰). لذا ردیابی بیمارگر از خاک باغ‌ها، نهالستان‌ها و فضای سبز شهری می تواند در پایه ریزی یک طرح مدیریتی جهت پیشگیری و کاهش خسارت بیماری نقش مهمی داشته باشد (گوگلیلمو و همکاران [3]، ۲۰۰۷ ؛ نیکولوتی و همکاران [4]، ۲۰۰۹). تاکنون روش‌های متعددی برای ردیابی قارچ‌های خاک زاد استفاده شده اند که به دلیل محدودیت‌های روش‌های مبتنی بر محیط کشت و طعمه‌گذاری، استفاده از روش‌های جدید تشخیصی همچون روش‌های سرولوژیکی و مولکولی برای ردیابی و شناسایی موجودات هدف افزایش قابل توجهی داشته است (باهنوگ و همکاران [5]، ۱۹۹۸؛ روبینسون باکس و فاکس، ۲۰۰۲ [6]). روش nested PCR در ردیابی مستقیم گونه‌های آرمیلاریای اروپایی از نمونه‌های خاک به کار رفته است (لاکمن و همکاران، ۲۰۰۴ [7]). در این روش، تکثیر DNA طی دو مرحله صورت می‌گیرد و اختصاصی بودن و حساسیت تکثیر افزایش می‌یابد. به این ترتیب، فرآورده‌های تکثیری کاذب و غیر اختصاصی حذف می‌شوند و توالی هدف به طور ترجیحی تکثیر می‌گردد (نیوتن و گراهام، ۱۹۹۷). در این تحقیق، به منظور ردیابی اختصاصی، حساس و سریع بیمارگر از نمونه‌های خاک و چوب، از روش nested PCR استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در آبان ماه ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ از درختان مختلف باغات میوه استان اصفهان شامل درختان زردآلو، آلبالو، آلو، گیلاس، گردو، گلابی، انگور و همچنین درختان غیر مثمر چنار نمونه‌برداری به عمل آمد. در صورت مشاهده کلاهک‌های دسته جمعی قارچ، نمونه‌برداری از آن‌ها انجام گرفت. در درختان دارای علایم مشکوک به بیماری نیز با استفاده از چاقوی باغبانی، قطعاتی از پوست ناحیه طوقه درخت کنار زده شد و در صورت مشاهده پوشش میسلیومی سفید رنگ بین پوست و چوب، نمونه‌برداری از چوب آلوده انجام گرفت. نمونه‌ها داخل پاکت‌های جداگانه به آزمایشگاه منتقل و تا زمان جداسازی (حداکثر تا ۴۸ ساعت) در دمای ۸-۶ °C نگهداری شدند. همچنین از خاک اطراف درختان آلوده و یا خاک باغ‌ها، به صورت تصادفی نمونه‌برداری گردید.

جداسازی عامل بیماری

جداسازی قارچ از اندام گیاهی (ریشه و طوقه) آلوده

ابتدا سطح اندام گیاهی مورد نظر توسط اتانول ضدعفونی شده، قسمتی از پوست آن با اسکالپل سترون کنار زده شد و بخشی از پوشش میسلیومی جدا و به

1- Downer
2- Baumgartner & Warnock
3- Guglielmo *et al.*
4- Nicolotti *et al.*
5- Bahnweg *et al.*
6- Robinson-bax & Fox
7- Lochman *et al.*

محیط کشت BSMA [1] (ورال[2]، ۱۹۹۱) منتقل گردید و در دمای ۲۵ °C در انکوباتور قرار گرفت.

جداسازی قارچ از اندام بارده

بخش گوشتی و سالمی از پایه کلاهک به شکل موضعی توسط اتانول سترون شد. به وسیله اسکالپل سترون برشی در آن ناحیه ایجاد و قطعه ای از بافت گوشتی مغز پایه به ابعاد حدود سه میلیمتر جدا شده و روی محیط کشت BSMA منتقل گردید و در انکوباتور با دمای ۲۵ °C قرار گرفت.

تهیه زاد مایه تلقیحی

جهت تهیه زاد مایه تلقیحی قارچ *A. mellea*، از بذور گندم استفاده گردید. قطعاتی از محیط کشت MEA[3] حاوی قارچ *A. mellea* به بذور گندم اضافه شد و در انکوباتور در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ °C و به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند.

این آزمایش با استفاده از دو جدایه انجام گرفت. جدایه اول (IRAN 295C) به دست آمده از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، جدایه‌ای از *A. mellea* بود که پیش از این توسط روش آزمون‌های تلاقی تشخیص داده شده بود و در این تحقیق به عنوان جدایه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. جدایه دوم (A2)، جدایه‌ای از میان نمونه‌های جمع آوری شده بود که توسط آزمون‌های مولکولی و توالی یابی به عنوان *A. mellea* شناسایی شد. پس از آماده شدن مایه تلقیح و سترون کردن خاک (به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱۵ PSI) به میزان سه درصد از مایه تلقیحی به خاک گلدان‌ها اضافه گردید. همچنین یک گلدان حاوی گندم عاری از قارچ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و در یک گلدان هم از خاک باغی که آلوده به قارچ بود، استفاده گردید. سپس از قلمه‌های شمعدانی[4] به عنوان گیاه محک[5] استفاده شد (روبینسون (روبینسون باکس و فاکس، ۲۰۰۲). به این صورت که تعداد ۳-۲ قلمه شمعدانی در گلدان شاهد قرار گرفت و به همین تعداد نیز در هر یک از گلدان‌های تیمار با فاصله زمانی یک ماه کاشته شد. گلدان‌ها در گلخانه قرار داده شدند و هر سه تا چهار روز یک بار آبیاری شدند. نمونه‌برداری از خاک‌ها در زمان صفر و سپس در زمان-های معین به مدت شش ماه برای جدایه اول و سه ماه برای جدایه دوم انجام شد و استخراج DNA به طور مستقیم از نمونه‌های خاک صورت گرفت.

استخراج DNA از خاک

از خاک گلدان‌هایی که قبلا با گندم آلوده به قارچ مایه زنی شده بودند، خاک شاهد و خاک‌هایی که از باغات مختلف از کنار طوقه درختان آلوده جمع‌آوری شده بودند، استخراج DNA مطابق روش شنا و همکاران [6] (۲۰۰۲) با اندکی تغییرات انجام شد. به این منظور مقداری از هر نمونه خاک کوبیده شد تا خوب نرم شود و سپس با استفاده از الک دو میلی‌متری سنگ و بقایای گیاهی آن حذف گردید. استخراج با سه تکرار از هر خاک به صورت زیر انجام شد:

مقدار ۰/۵ گرم خاک، ۰/۵ گرم ساچمه شیشه‌ای[7] سترون با اندازه یک میلی‌متر، دو عدد ساچمه فلزی پنج میلی‌متری سترون به همراه ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (0.12 M Na_2HPO_4، 1.5 M NaCl، CTAB ۲٪) که در حمام آب گرم ۶۵ °C نگهداری شده بود، در داخل لوله‌های۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شدند و روی شیکر در ۲۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰-۱۵ 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

1- Benomyl streptomycin malt agar
2- Worrall
3 - Malt extract agar
4- *Pelargonium hortorum*
5- Test plant -
6- Schena *et al*. 2002
7- Glass beads

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 ۰/۶حجم محلول به آن ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و چندین مرتبه محلول داخل لوله‌ها به آرامی مخلوط شدند و به مدت۲۰-۱۰ دقیقه در فریزر $^{\circ}$C ۲۰- قرار گرفتند. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند تا DNA در قسمت پایین لوله رسوب کند. مایع بالایی رسوب DNA به آرامی خارج شد، به طوری که DNA داخل لوله دست نخورده باقی بماند. به لوله‌های محتوی DNA ، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده شد و به مدت پنج دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس فاز رویی بیرون ریخته شد و لوله‌ها به مدت یک شب به صورت وارونه روی کاغذ جاذب رطوبت قرار گرفتند تا رسوب حاصله خشک گردد. در مرحله بعد 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 (Polyvinylpolypyrrolidone) خالص-سازی شد (شنا و ایپولیتو[1]، ۲۰۰۳).

استخراج DNA قارچ از ریشه و چوب آلوده

استخراج DNA قارچ از چوب و ریشه گیاهان آلوده به روش شنا و ایپولیتو (۲۰۰۳) با اندکی تغییرات انجام شد. از چوب ناحیه طوقه و ریشه‌های گیاهان آلوده دارای میسلیوم‌های سفید زیر پوست و ریشه بدون علائم نمونه‌برداری شد و استخراج DNA با سه تکرار از هر نمونه انجام گرفت.

ابتدا نمونه‌ها با آب شسته و به اندازه سه تا چهار سانتی‌متر با چاقوی باغبانی بریده و روی کاغذ صافی سترون خشک شدند. سپس سه گرم از بافت ریشه در هاون چینی سترون که از قبل در فریزر سرد شده بودند، ریخته شد و با نیتروژن مایع پودر گردید. ۰/۱ گرم پودر و هم حجم آن پودر (Polyvinylpyrrolidone) PVP به همراه دو عدد ساچمه پنج میلی‌متری سترون و ۰/۵ گرم ساچمه شیشه‌ای یک میلی‌متری سترون و ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (250 mM NaCl، mM 25 EDTA، 200mM Tris-HCl و SDS % 0/5) که در حمام آب گرم $^{\circ}$C ۶۵ نگهداری شده بود در داخل لوله‌های دو میلی‌متری ریخته شد و به مدت چهار دقیقه روی شیکر در ۲۶۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. محتویات لوله‌ها پس از اختلاط کامل به مدت پنج دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای$^{\circ}$C ۴ سانتریفوژ شدند. مقدار یک میلی لیتر از مخلوط فنول-کلروفرم (۱:۱) به هر لوله محتوی نمونه اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرارگرفتند و طی این مدت لوله‌ها چندین مرتبه تکان داده شدند. محتویات لوله‌ها پس از اختلاط کامل به مدت ۱۵ 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 هم 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 $^{\circ}$C ۲۰- قرار گرفتند. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند تا DNA در قسمت پایین لوله رسوب کند. مایع بالایی رسوب DNA به آرامی خالی شد، به طوری که DNA داخل لوله دست نخورده باقی بماند. به لوله‌های محتوی DNA، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده شد و به مدت پنج دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس فاز رویی بیرون ریخته شد و لوله‌ها به مدت یک شب به صورت وارونه روی کاغذ جاذب رطوبت قرار گرفتند تا رسوب حاصله خشک گردد. در مرحله بعد به هر لوله ۴۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار سترون افزوده شد و نمونه‌ها به مدت یک شب درون

1- Schena & Ippolito

یخچال قرار گرفتند تا رسوب DNA در آب مقطر حل شود. DNA قبل از استفاده روی ستون PVPP خالص-سازی شد (شنا و ایپولیتو، ۲۰۰۳).

خالص‌سازی DNA با ستون PVPP

از آنجایی که DNA استخراج شده از خاک و ریشه گیاهان آلوده دارای موادی مانند ترکیبات فنولی، اسید هیومیک[1] و فلزات سنگین[2] است که در واکنش PCRبه عنوان مواد بازدارنده عمل می‌کنند، ابتدا DNA با ستون PVPP ، خالص گردید.

انجام واکنش‌های PCR

در این تحقیق از جفت آغازگر ITS1- for و ITS4- rev برای واکنش PCR (سینگلتون و همکاران[3]، ۱۹۹۲) و از جفت آغازگر AR1-for و AR2 - rev برای Nested PCR (شنا و همکاران، ۲۰۰۲) استفاده گردید.

جدول ۱- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در ردیابی *Armillaria mellea*

نام آغازگر	توالی (5′ ⟶ 3′)
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
AR1	CTG ACC TGT TAA AGG GTA TGT GC
AR2	AAG CTG AAT CCT TCT ACA AAG TCA A

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (X ۱۰)، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲میلی مولار از مخلوط dNTPs، ۲۰ نانو مولار از هر یک از آغازگرهای ITS1 و ITS4، یک واحد از آنزیم *Taq* DNA Polymerase ، یک میکرولیتر DNA الگو و ۱۹/۰۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Techne-TC-512) با برنامه دمایی شامل مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۲/۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵°C به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. در پایان یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

در ادامه از فرآورده PCR به عنوان رشته الگو در Nested PCR استفاده گردید. واکنش Nested PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (X ۱۰)، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۱ میلی مولار از مخلوط dNTPs، ۰/۵ میکرو مولار از هر یک از آغازگرهای AR1 و AR2، ۱/۵ واحد از آنزیم *Taq* DNA Polymerase، دو میکرولیتر DNA الگو و ۳۸/۲ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Techne-TC-512) با برنامه دمایی شامل مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۲/۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. در پایان یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد.

پنج میکرولیتر از محصول PCR با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و روی ژل آگارز ۱/۲٪ در بافر XTBE ۱ با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز گردید.

تعیین توالی نمونه ردیابی شده

جهت اطمینان از صحت ردیابی *A. mellea* از خاک، پس از انجام nested PCR با آغازگرهای عمومی ITS1 و ITS4 و سپس با آغازگرهای اختصاصی AR1 و AR2 ، مقدار ۳۰ میکرولیتر از فرآورده واکنش نمونه ردیابی شده مربوط به جدایه A2، برای تعیین توالی به شرکت Macrogen کره جنوبی فرستاده شد. توالی *A. mellea* جدا شده از خاک با استفاده از ابزار جستجوی BLAST موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI با توالی جدایه *A. mellea* (کد

1- Humic acid -
2 -Heavy metals -
3- Singleton *et al.*

دسترسی AF163583.1) موجود در بانک ژن، مقایسه شد. از رج بندی دوتایی با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN ver.4.02 برای تعیین درصد یکنواختی توالی‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

ردیابی بیمارگر از خاک مایه زنی شده با استفاده از Nested PCR

از خاک مایه زنی شده با گندم آلوده، ابتدا در فاصله‌های زمانی هفت روز (تا روز ۳۵) و سپس در فاصله‌های متناوب ۲۱ روز به مدت شش ماه برای جدایه IRAN 295C و به مدت سه ماه برای جدایه A2 نمونه برداری به عمل آمد و استخراج DNA انجام گرفت. DNA استخراج شده، پس از خالص سازی روی ستون PVPP به طور مستقیم در واکنش PCR با جفت آغازگر ITS1/ITS4 استفاده گردید. در این مرحله هیچ باند DNA روی ژل آگارز مشاهده نشد. لذا فرآورده آن بدون رقیق سازی، وارد واکنش nested PCR با جفت آغازگر AR1/AR2 گردید و یک قطعه با اندازه تقریبی ۷۲۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۱ و ۲).

نتایج حاصل در این مرحله با نتایج به دست آمده توسط لاک من و همکاران[1] (۲۰۰۴) که تکثیر یک قطعه ۷۲۴-۶۹۰ جفت بازی را در گونه‌های *Armillaria* گزارش نموده بود، مطابقت داشت.

ردیابی بیمارگر از خاک باغ و نهالستان با استفاده از Nested PCR

استخراج DNA از ۲۰ نمونه خاک جمع آوری شده از کنار طوقه درختان در باغ‌های مختلف و دو نمونه خاک از دو نهالستان به روش شنا و همکاران (۲۰۰۲) انجام گرفت. مطابق بخش قبل DNA استخراجی پس از خالص سازی به طور مستقیم وارد واکنش PCR با جفت آغازگر ITS1/ITS4 گردید و سپس فرآورده واکنش بدون رقیق سازی به عنوان رشته الگو در nested PCR با جفت آغازگر AR1/AR2 مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳).

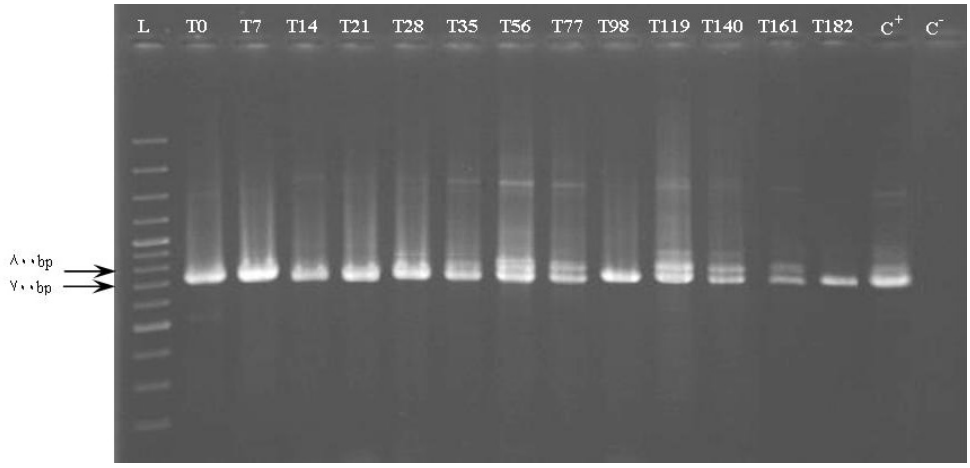
همان گونه که در شکل ۳ مشاهده می گردد، در ۱۵ نمونه خاک از ۲۰ نمونه خاک جمع آوری شده، بیمارگر ردیابی شد. احتمال دارد عدم ردیابی قطعه DNA در پنج نمونه دیگر در واکنش nested PCR دلیلی بر عدم آلودگی این باغ‌ها به *A. mellea* باشد. زیرا نمونه‌های۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰ مربوط به یک باغ در خمینی شهر می‌باشند. از سه نمونه اول که از کنار طوقه درختان جمع آوری شده‌اند، بیمارگر ردیابی شد، ولی در نمونه ۲۰ که نمونه برداری از سه منطقه باغ به طور تصادفی و از کنار طوقه درختان است، بیمارگر با این روش ردیابی نشد. این امر می تواند دو علت داشته باشد؛ اول اینکه مقدار مایه آلودگی در خاک، بر بازدهی و میزان استخراج DNA و در نتیجه بر تکثیر آن در طی PCR به شدت تاثیرگذار است و در نمونه‌برداری از خاک، در صورتی که میزان مایه آلودگی از حد معینی کاهش یابد، روش حاضر قادر به ردیابی آن نخواهد بود. دوم آنکه میسلیوم‌های *A. mellea* عمدتا در زیر پوست درخت و ریزومورف‌های آن در خاک نزدیک به درخت باقی می مانند (دونر[2]، ۲۰۰۴؛ ولک و بوردسال[3]، ۱۹۹۵). لذا بهتر است نمونه‌ها از خاک نزدیک به درختان انتخاب شوند و به صورت جداگانه مورد آزمون قرار گیرند.

در تحقیق انجام شده توسط لاکمن و همکاران (۲۰۰۴) با استفاده از روش nested PCR با جفت آغازگر اولیه ITS1/ITS4 و جفت آغازگر ثانویه AR1/AR2، در ۱۱ نمونه از ۲۰ نمونه خاک جمع آوری شده از نزدیکی درختان و کنده‌ها در جنگل که پیش از این کلاهک‌های آرمیلاریا در آنجا مشاهده شده بود، موفق به ردیابی بیمارگر شدند (لاکمن و همکاران، ۲۰۰۴). نمونه‌های ۲۱ و ۲۲ مربوط به دو نهالستان

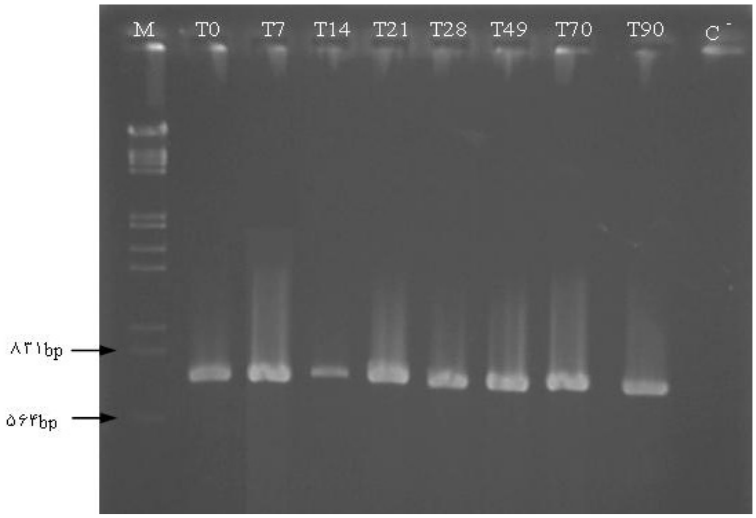
1- Lochman *et al.*

2- Downer

3- Volk & Burdsall



شکل ۱- الگوی باندی DNA تکثیر شده با روش Nested PCR با جفت آغازگر اولیه ITS1/ITS4 و جفت آغازگر ثانویه AR1/AR2 از نمونه‌های خاک مایه زنی شده با *Armillaria mellea* جدایه 295c (L: نشانگر ۱۰۰bp DNA Ladder plus ، Tn: نمونه‌های خاک در زمان‌های مختلف بر حسب روز پس از تلقیح، C^+: شاهد مثبت جدایه ۲۹۵، C^-: نمونه خاک شاهد)



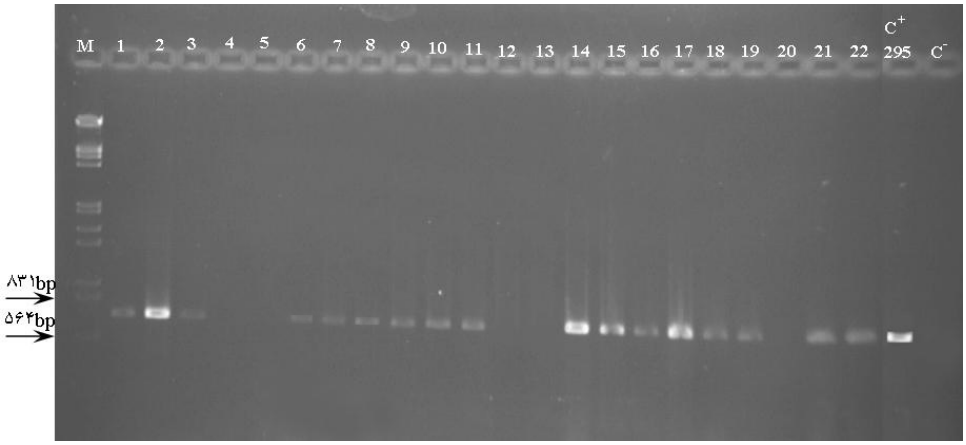
شکل ۲- الگوی باندی DNA تکثیر شده با روش Nested PCR با جفت آغازگر اولیه ITS1/ITS4 و جفت آغازگر ثانویه AR1/AR2 از نمونه‌های خاک مایه زنی شده با *Armillaria mellea* جدایه A2 (M: نشانگر III ، Tn: نمونه‌های خاک در زمان‌های مختلف بر حسب روز، C^-: نمونه خاک شاهد)

می باشند که بیمارگر در آنها ردیابی شد. این امر نشان-دهنده امکان حضور بیماری پوسیدگی ریشه آرمیلاریایی در نهالستان‌ها و اهمیت ردیابی و مدیریت این بیماری در این مناطق می باشد.

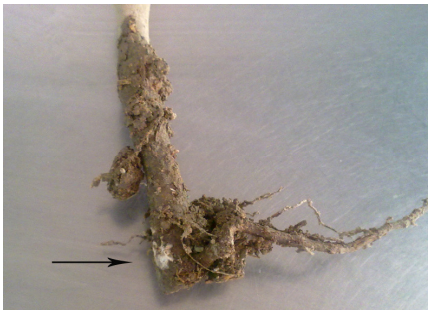
ردیابی بیمارگر از ریشه و طوقه گیاهان با استفاده از Nested PCR

در ردیابی *A. mellea* با استفاده از قلمه‌های شمعدانی، پس از ۳۰ روز نشانه‌هایی از پوشش سفید رنگ در گلدان حاوی جدایه A2 روی ریشه و طوقه گیاه شمعدانی مشاهده گردید (شکل ۴). اما هیچ نشانه‌ای مبنی بر آلودگی توسط جدایه IRAN 295C روی شمعدانی‌ها دیده نشد.

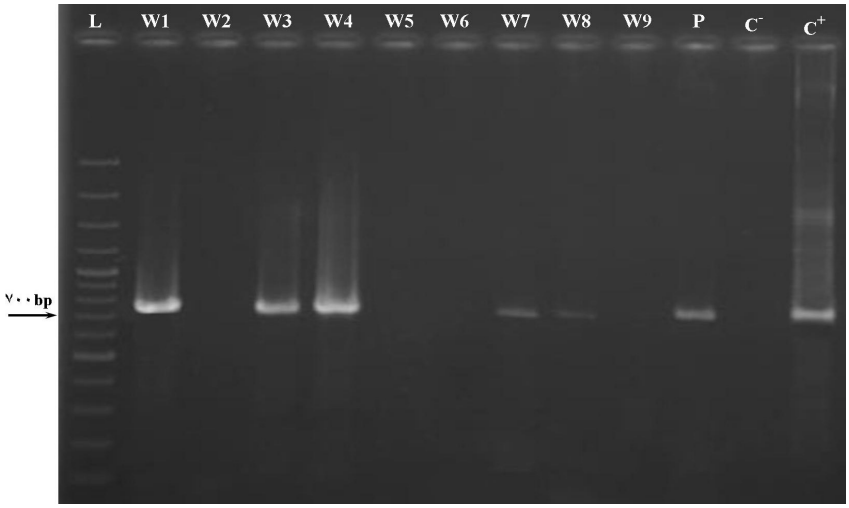
استخراج DNA از چوب ناحیه طوقه درختان آلوده و نیز ریشه و طوقه شمعدانی دارای میسلیوم سفید و ریشه فاقد علایم صورت گرفت. ماده DNA استخراج شده، پس از خالص سازی روی ستون PVPP به طور مستقیم در واکنش PCR با جفت آغازگر ITS1/ITS4 استفاده شد. در این مرحله هیچ باند DNA در ژل آگارز مشاهده نشد. لذا فرآورده آن بدون رقیق سازی، وارد واکنش nested PCR با جفت آغازگر AR1/AR2 گردید. نتایج حاصل در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۳- الگوی DNA تکثیر شده مربوط به *Armillaria mellea* از نمونه‌های خاک باغ و نهالستان با روش Nested PCR با جفت آغازگر اولیه ITS1/ITS4 و جفت آغازگر ثانویه AR1/AR2 (M: نشانگر III، C-: شاهد منفی آب)



شکل ٤- پوشش میسلیومی قارچ *Armillaria mellea* روی ریشه و طوقه شمعدانی



شکل ۵- الگوی باندی DNA تکثیر شده *Armillaria mellea* از نمونه‌های چوب با روش Nested PCR با جفت آغازگر اولیه ITS1/ITS4 و جفت آغازگر ثانویه AR1/AR2 (L: نشانگر bp DNA ۱۰۰Ladder plus ، Wn: نمونه‌های چوب، P: نمونه ریشه و طوقه شمعدانی، C^+: شاهد مثبت جدایه ۲۹۵، C^-: ریشه شمعدانی سالم)

از میان نمونه‌های W2، W5، W6 و W9 که باند مورد نظر در آنها مشاهده نگردید، تنها نمونه W5 از درخت مشکوک به بیماری و فاقد نشانه‌های عامل بیماری جمع‌آوری شده بود و سایر نمونه‌های چوب دارای نشانه‌های پوسیدگی بودند. اما بیمارگر در نمونه-های خاک مربوط به آنها ردیابی شد (شکل ۳). این مطلب بیانگر این نکته است که برای اطمینان بیشتر از حضور یا عدم حضور بیمارگر در یک منطقه، لازم است ردیابی بیمارگر هم از نمونه‌های خاک و هم از نمونه‌های چوب صورت گیرد.

نتایج توالی یابی DNA استخراج شده از خاک

قسمتی از توالی نواحی ITS1 و ITS2 و توالی 5.8S مربوط به جدایه A2 که توسط آغازگرهای AR1/AR2 تکثیر یافته بود، با استفاده از نرم افزار BLAST قابل دسترسی در آدرس اینترنتی www.NCBI. nlm.nih. gov با اطلاعات موجود در GenBank مقایسه شدند.

رج بندی دوتایی توالی تکثیر یافته با توالی موجود در GenBank جدایه *A. mellea* (شماره دسترسی AF163583.1) با استفاده از نرم افزار DNAMAN انجام شد. نتایج حاصل از همردیف سازی، ۹۹ درصد شباهت میان توالی جدایه ردیابی شده از خاک با توالی موجود در GenBank نشان می‌داد که تنها در یک نوکلئوتید با یکدیگر متفاوت بودند (شکل ۶).

ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای AR1/AR2

به منظور ارزیابی میزان اختصاصی بودن آغازگرهای AR1/AR2 داده‌های موجود در بانک ژن جهت یافتن توالی‌های مکمل، جستجو شد. طول قطعه تکثیری توسط این آغازگرها در جنس *Armillaria*، ۸۰۵- ۶۱۸ نوکلئوتید بود که با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن شباهت معناداری نداشت و از این رو اختصاصی بودن این آغازگرها برای *Armillaria* spp. مورد تایید قرار گرفت. پیش از این نیز در تحقیق دیگری (لاکمن و همکاران، ۲۰۰۴) جهت تعیین اختصاصی بودن آغازگرهای AR1/AR2، علاوه بر استفاده از داده‌های موجود در بانک ژن، تعدادی از قارچ‌های نزدیک به *Armillaria* و نیز قارچ‌هایی که عموما در خاک یافت

```
Query: 448 ttagcagaaaccgtttgactttggctgctaggctgtgataatatctacgctttggtagtc 507
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 512 ttagcagaaaccgtttgactttggctgctaggctgtgataatatctacgctttggtagtc 571

Query: 508 gggttggaatataaagtgttagagtggtaaggaaactggcttaggatcggtttggagggt 567
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 572 gggttggaatataaagtgttagagtggtaaggaaactggcttaggatcggtttggagggt 631

Query: 568 tgcttaacggctccttctactttctccctttgttggagatacttgtccgattgtaagaga 627
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 632 tgcttaacggctccttctactttctccctttgttggagatacttgtccgattgtaagaga 691

Query: 628 ggaaaagcttagcgcaagcttagctttccaagagtttcttgttaccgcttgactttg 684
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct: 692 ggaaaagcttagcgcaagcttagctttccaagagtttcttgttacggcttgactttg 748
```

شکل ٦- نتایج رج بندی بخشی از توالی نوکلئوتیدی قطعه bp ۷۰۰ قارچ *Armillaria mellea* ردیابی شده از خاک با توالی جدایه *Armillaria mellea* ثبت شده در پایگاه BLAST. علامت فلش جایگاه نوکلئوتید متفاوت را نشان می‌دهد

می‌شوند، به عنوان شاهد منفی در آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفتند. قطعه مربوط به ناحیه ITS در این قارچ‌ها تکثیر یافت، اما در nested PCR هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد که نشان دهنده اختصاصی بودن آغازگرهای مزبور برای گونه‌های *Armillaria* دارد.

بر اساس نتایج به دست آمده، روش nested PCR به دلیل حساسیت بالا در ردیابی مقادیر اندک مایه آلودگی در خاک، به خوبی عمل نمود. همچنین این روش مولکولی به دلیل حساسیت و اختصاصیت بالا قادر به تشخیص قارچ آرمیلاریا از سایر قارچ‌های عامل پوسیدگی می‌باشد. اما از معایب آزمون‌های مولکولی محض این است که اطلاعاتی در مورد زنده بودن یا نبودن بیمارگر در خاک در اختیار ما نمی‌گذارند. لذا در این راستا پیشنهاد می‌شود که از Real time PCR جهت تعیین زنده بودن یا نبودن بیمارگر در خاک و یا چوب استفاده گردد.

منابع

۱. بهداد، ا. ۱۳۶۱. بیماری‌های درختان میوه در ایران. چاپ نشاط. ۲۹۴ص.

۲. نیوتن، ک. و گراهام، ا. ۱۹۹۷. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR). (ترجمه فرج الله شهریاری و عباسعلی امام جمعه). انتشارات به نشر. ۲۲۸ص.

3. Anonymous. 2000. Armillaria root rot of trees and shrubs. RPD No. 602. University of Illinois Extension.

4. Asef, M.R., Mohammadi Goltapeh, E., and Aalizadeh, A. 2003. Identification of *Armillaria* biological species in Iran. Fungal Diversity, 14: 51-60.

5. Bahnweg, G., Schulze, S., Moller, E.M., Rosenbrock, H., Langebartels, C., and Sandermann, H. 1998. DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots,

bark, and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry, 262: 79–82.

6. Baumgartner, K. 2004. Root collar excavation for post infection control of *Armillaria* root disease of grapevine. Plant Disease, 88:1235-1240.

7. Baumgartner, K., and Warnock, A.E. 2006. A soil inoculant inhibits *Armillaria mellea in vitro* and improves productivity of grapevines with root disease. Plant Disease, 90:439-444.

8. Baumgartner, K., Bhat, R. and Fujiyoshi, P. 2010. A rapid infection assay for *Armillaria* and real-time PCR quantitation of the fungal biomass *in planta*. Fungal Biology, 114: 107 – 119.

9. Coetzee, M.P., Wingfield, B.D., Bloomer, P., Ridley, G.S., and Wingfield, M.J. 2003. Molecular identification and phylogeny of *Armillaria* isolates from South America and Indo-Malaysia. Mycologia, 95: 285–293.

10. Dalili, S.A.R., Nanagulyan, S.G., Alavi, S.V., and Razavi, M. 2010. Introduction of new hosts for *Armillaria mellea* and *Armillaria gallica* from north forests of Iran. World Applied Science Journal, 8: 217-223.

11. Downer, J. 2004. *Armillaria* root rot. Landscape Notes, 17: 1-6.

12. Guglielmo, F., Bergemann, S.E., Gonthier, P., Nicolotti, G., and Garbelotto, M. 2007. A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees. Journal of Applied Microbiology, 103: 1490-1507.

13. Lochman, J., Sery, O., and Mikes, V. 2004. The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR**.** FEMS Microbiology Letters, 237: 105-110.

14. Nicolotti, G., Gonthier, P., Guglielmo, F. and Garbelotto, M. M. 2009. A biomolecular method for the detection of wood decay fungi: a focus on tree stability assessment. Arboricultural Urban Forest, 35: 14-19.

15. Robinson-bax, C., and Fox, R.T.V. 2002. Root rots of herbaceous plants caused by *Armillaria mellea*. Mycologist, 16: 21-22.

16. Schena, L., Ippolito, A., and Nigro, F. 2002. Identification and detection of *Rosellinia necatrix* by conventional and real-time Scorpion-PCR. European Journal of Plant Pathology, 108**:** 355–366.

17. Schena, L., and Ippolito, A. 2003. Rapid and sensitive detection of *Rosellinia necatrix* in roots and soils by real time scorpion- PCR. Journal of Plant Pathology, 85: 15-25.

18. Singleton, L.L., Mihail, J.D., and Rush, C.M. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. The American Phytopathological Society (APS Press). Minnesota.

19. Volk, T.J., and Burdsall, H.H. 1995. A nomenclatural study of *Armillaria* and *Armillariella* species (Basidiomycotina, Tricholomataceae). Eko-trykk A/S, Førde, Norway.

20. Worrall, J. J. 1991. Media for selective isolation of *Hymenomycetes*. Mycologia, 83: 296-302.