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

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. به‌منظور 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 ریشه-های آلبالو دارای میسلیوم‌های سفید و خاکستری روی پوست، ریشه‌های دارای میسلیوم‌های بادبزن 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 ازآغازگرهای اختصاصی R2، R8 و R7، R10 در Nested PCR انجام شد. طبق نتایج به‌دست آمده، از تمام شش سری خاک، ریشه‌های آلبالوی دارای میسلیوم‌های سفید و خاکستری و میسلیوم‌های بادبزن 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 به‌دست 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 توانائی 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*

Archive of SID

---

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان ، اصفهان

°: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*: نویسنده مسئول

www.SID.ir

مقدمه

بیماری پوسیدگی سفید ریشه یکی از مهم‌ترین 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 به‌صورت 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 (Schena *et al* 2008). برای شناسایی و ردیابی این بیمارگر روش‌های مختلفی وجود دارد که این روش‌ها معمولاً بر پایه جداسازی بیمارگر ازخاک و ریشه روی محیط کشت‌های اختصاصی و یا استفاده از تله برای جداسازی آن‌ها استوار است (Freeman & Sztejnberg 1992). این روش‌های جداسازی معمولاً وقت‌گیر بوده و از حساسیت کمی نیز برخودار هستند. تکنیک Nested PCR یکی از روش‌های ردیابی بیمارگرهای خاک‌زی است که از لحاظ زمانی سریع‌تر و از حساسیت بیشتری نسبت به سایر روش‌ها بر خوردار است (Schena *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 میکروارگانیسم‌ها 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 وجود دارد که یکی از این روش‌ها، استفاده از ستون PVPP است (Ruano-Rosa *et al.* 2007; Wilson 1997). 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،گیلاس، 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 ۱۵PSI و دمای ۱۲۱°c به‌مدت 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 بقایایی گیاهی آن حذف شود (Schena *et al.* 2002; Schena & 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 ۱۵PSI و دمای ۱۲۱°c به‌مدت 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 به‌مدت دو دقیقه در محلول هیپوکلریدسدیم ۵٪ ضد عفونی سطحی

Archive of SID

www.SID.ir

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 & Sztejnberg, 1992; Behdad 1975a). پس از جداسازی و خالص‌سازی نمودن قارچ از ریشه آلوده، برای شناسایی قارچ، از وجود تورم‌های گلابی‌شکل در محل دیواره عرضی میسلیوم‌های قارچ استفاده شد (Behdad 1975b).

آزمایش‌های گلخانه‌ای

از آزمایش‌های گلخانه‌ای به منظور اطمینان از ردیابی بیمارگر و مقایسه نتایج به‌دست 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 & Sztejnberg 1992) و پس از قرار دادن بذرهای باقلا (گیاه آزمون)، با خاک سترون مزبور روی سطح آنها پوشانده شد. گلدان ها در گلخانه قرار داده شدند و هر سه تا چهار روز یک بار آبیاری شدند و پس از بروز علائم روی باقلا از خاک گلدان ها و ریشه باقلا در آزمایش ها مورد استفاده قرار گرفت (Behdad 1975).

استخراج DNA از خاک

به‌منظور استخراج DNA از خاک، مقدار ۰/۵ گرم خاک ، ۰/۵ گرم ساچمه شیشه‌ای سترون (اندازه۶۰۰-۴۲۵ میکرومتر)، دو عدد ساچمه فلزی پنج میلی‌متری سترون به همراه ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (12 M NA_2HPO_4، M 1.5 NaCl، 2٪ CTAB) که در حمام آب گرم ۶۵°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 به‌وسیله 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 ۲۰°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) Polyvinyl poly pyrrolidone خالص‌سازی شد (Schena *et al.* 2002; Schena & Ippolito 2003; Schena & Ippolito 2003).

استخراج DNA از ریشه

از ریشه‌های آلبالو دارای میسلیوم‌های سفید و خاکستری روی پوست، ریشه‌های دارای میسلیوم‌های بادبزن 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 (Schena *et al.* 2002) با دو تکرار از هر نمونه انجام گرفت: DNA استخراج شده قبل از استفاده، روی ستون PVPP خالص‌سازی شد.

خالص سازی DNA بر روی ستون PVPP

به‌منظور 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 قبلا" 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 سانتریفیوژ شدند. سپس لوله‌های ۰/۵ میلی-لیتری 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 سانتریفیوژ گردید. سپس لوله‌های ۰/۵ میلی-لیتری حذف شد و DNA خالص شده داخل لوله‌های ۱/۵

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌لیتری در دمای ۲۰C- نگهداری شد (Schena & Ippolito 2003; Ruano-Rosa *et al.* 2007).

انجام واکنش‌های PCR آشیانه‌ای

ردیابی بیمارگر از خاک و ریشه با استفاده ازآغازگرهای اختصاصی R2، R8 و R7، R10 در آزمون PCR آشیانه‌ای یا Nested PCR انجام شد. توالی این دو جفت آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است:

جدول۱: آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در ردیابی قارچ *Rosellinia necatrix*

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

نام آغازگر Primer	توالی 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 میکرولیتر از مخلوط واکنش شامل ۱۵/۲۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۲۵ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌مول dNTPs که حاوی ۲/۵ میلی‌مول از هریک از هر یک از نوکلئوتید ها شامل dATP، dCTP، dGTP و dTTP بود، ۰/۵ میکرولیتر محلول حاوی ۵۰ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر محلول حاوی پنج واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase، ۲/۵میکرولیتر محلول حاوی ۲۰ پیکومول آغازگرهای R2 و R8 و یک میکرولیتر 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 ۹۵°c به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۹۵°c، به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشته سازی؛ ۵۰°c به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال و ۷۲°c به مدت یک دقیقه برای گسترش و گسترش نهایی در دمای ۷۲°c به مدت ده دقیقه انجام گرفت.

در ادامه از محصول PCR اولیه به‌عنوان رشته الگو در Nested PCR استفاده شد. حجم کل مواد به‌کار رفته در این مرحله نیز ۲۵ میکرو لیتر بود که شامل ۱۹/۴۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۲۵ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌مول dNTPs که حاوی ۲/۵ میلی‌مول از هر یک از هر یک از نوکلئوتیدها شامل dATP، dCTP، dGTP و dTTP بود ۰/۵ میکرولیتر محلول حاوی ۵۰ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر محلول حاوی پنج واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase، ۰/۴ میکرولیتر محلول حاوی ۲۰ پیکومول آغازگرهای R7 و R10 و یک میکرولیتر از DNA انجام گرفت. چرخه دمایی برای واکنش Nested PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه DNA ژنومی در دمای ۹۴°c به‌مدت پنج دقیقه و ۴۰ چرخه شامل ۹۵ °c، به‌مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشته سازی؛ ۶۰ °c به مدت ۴۵ ثانیه برای اتصال و ۷۲°c به مدت ۳۰ ثانیه برای گسترش و گسترش نهایی در دمای ۷۲°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 ٪ بارگذاری و به مدت ۳ ساعت با ولتاژ ثابت ۶۵ در بافر TBE 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 میکرولیتر پلاسمیدو ۰/۵ میکرولیتر 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.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

جدا سازی و شناسایی قارچ *R. necatrix*

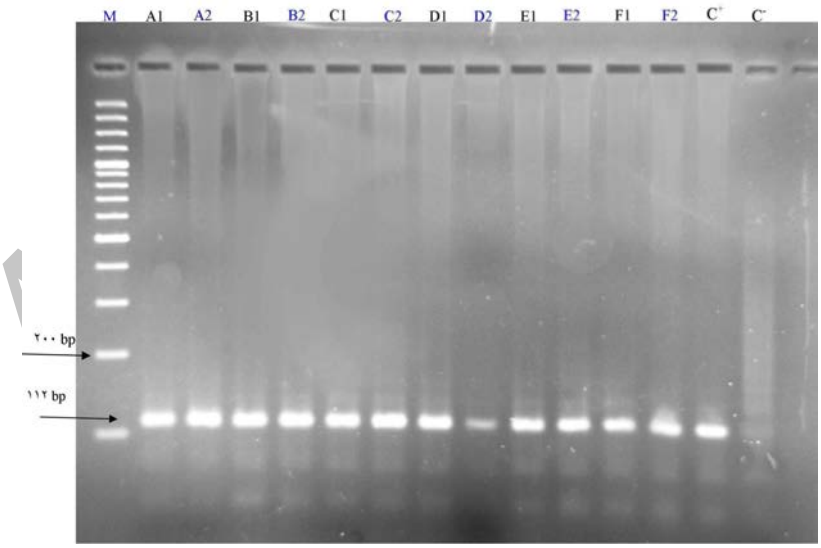
جدایه قارچ جداسازی شده از ریشه آلوده، قارچ *R. necatrix* شناسایی گردید که میسلیوم‌های آن دارای تورم‌های گلابی‌شکل در محل دیواره عرضی بودند که مشخصه اصلی در شناسایی قارچ *R. necatrix* است (شکل ۱).

شکل ۱: حضور تورم‌های گلابی‌شکل در محل دیواره عرضی هیف *Rosellinia necatrix*

Fig 1: Presence of typical pear-shaped hyphal swelling in *Rosellinia necatrix*.

استخراج DNA از خاک

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



شکل ۲: تکثیر باند ۱۱۲ جفت بازی *Rosellinia necatrix* بر اساس Nested PCR با جفت آغازگر R7 و R10 از خاک. A_1,A_2: خاک باغ اول، B_1,B_2: خاک باغ دوم، C_1,C_2: خاک باغ سوم، D_1,D_2: خاک باغ چهارم، E_1,E_2: خاک باغ پنجم، F_1,F_2: 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.

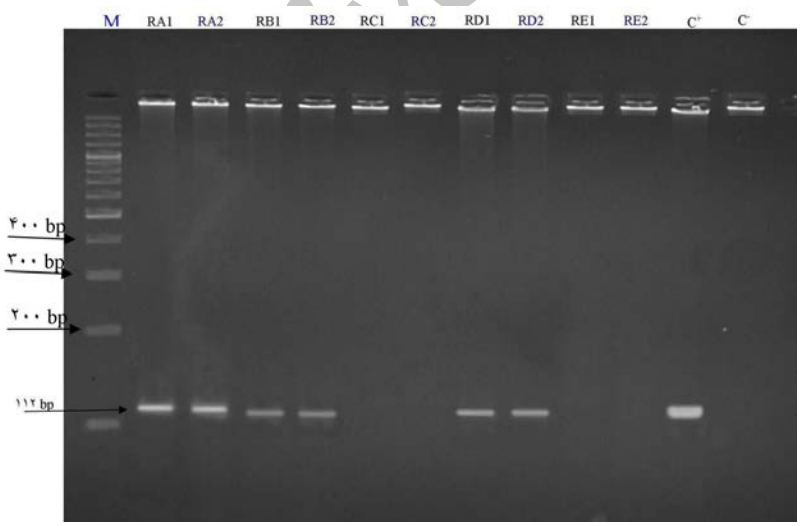
www.SID.ir

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 ریشه های 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 و 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 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.

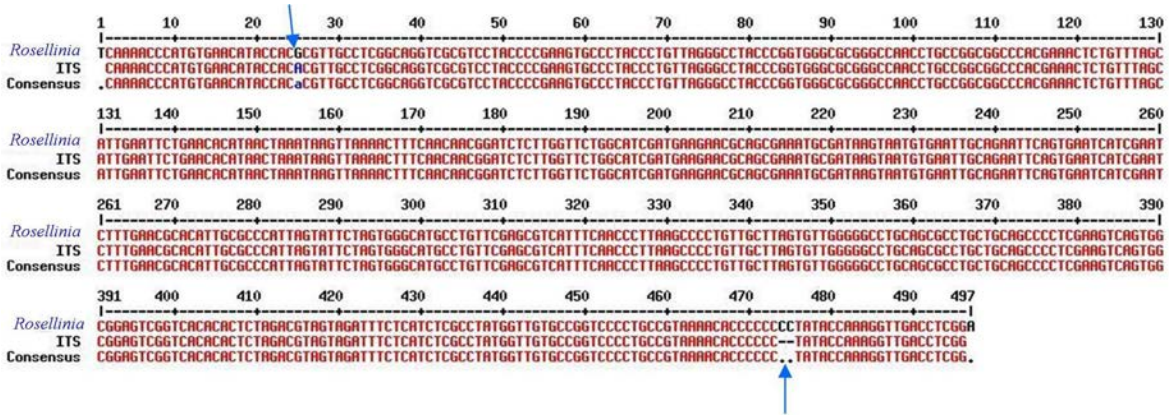
به‌منظور کاهش خسارت ناشی از این بیمارگر *R. necatrix*، ردیابی دقیق و سریع بیمارگر در خاک امری ضروری است که برای اینکار روش‌های مختلفی وجود دارد که این روش‌ها معمولاً بر پایه جداسازی بیمارگر از خاک و ریشه با استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی و یا استفاده از تله‌های مختلف برای جداسازی آن‌ها استوار است (Freeman & Sztejnberg, 1992). این روش‌های جداسازی معمولاً وقت‌گیر بوده و از حساسیت کمی نیز برخودار هستند. تکنیک Nested PCR یکی از روش‌های ردیابی این بیمارگر است که از لحاظ زمانی سریع‌تر و از حساسیت بیشتری نسبت به سایر روش‌ها بر خوردار 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 خزانه-های تولید نهال و باغات در دست احداث مفید واقع گردد.



شکل ۳: تکثیر باند ۱۱۲ جفت بازی *Rosellinia necatrix* بر اساس Nested PCR با جفت آغازگر R7 و R10 از ریشه. RA_1,RA_2 ریشه‌های آلبالو دارای میسلیوم سفید ، RB_1,RB_2 ریشه آلبالو دارای میسلیوم‌های باد بزن مانند، RC_1,RC_2 ریشه آلبالو فاقد علائم، RD_1,RD_2 ریشه باقلا دارای میسلیوم، RE_1,RE_2 ریشه باقلا فاقد علائم، +C شاهد مثبت، -C شاهد منفی، از ریشه باقلا سالم ، M: نشانگر مولکولی اندازه100bp 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.

www.SID.ir



شکل ۴: نتایج هم‌ردیف سازی توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS_1، ITS_2، 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 ITS_1 , ITS_2, 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.

Archive of SID

www.SID.ir