

مقاله پژوهشی

غربالگری مقاومت به قارچ *Verticillium dahliae* در ارقام امیدبخش و کلکسیون ژنوتیپ‌های بومی زیتون ایرانحسین جعفری^۱، ندا زند^۱، مهدی طاهری^۲، علی اصغر زینانلو^۳، شمس الله نجفی^۱

۱ و ۲- به ترتیب بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی و بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران؛ ۳- پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت آبان ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۹)

چکیده

بیماری پژمردگی ورتیسلیومی در اثر قارچ *Verticillium dahliae* یکی از مخربترین عوامل بیماری‌زای زیتون در دنیا و مناطق مختلف زیتون‌کاری ایران محسوب می‌شود. در این تحقیق عکس‌العمل ۱۵ رقم امیدبخش و ۱۵ ژنوتیپ بومی زیتون نسبت به قارچ عامل بیماری بررسی شد. نهال‌های نه ماهه زیتون برای ارزیابی کمی قارچ عامل بیماری و تعیین میزان حساسیت یا مقاومت نسبت به بیماری با روش فرو بردن ریشه در زاد مایه انجام شد. میزان افزایش کمی DNA قارچ موجود در نهال‌ها با استفاده از تکنیک Real time PCR و سیستم SYBR Green همراه با آغازگرهای اختصاصی برای ژن بتا توبولین ۲ در فواصل زمانی صفر، ۲، ۱۵، ۴۵ و ۸۰ روز پس از مایه زنی، ارزیابی شد. ژنوتیپ‌های DD2-، QG-11، PS-5، 1 و رقم مانزانیا به ترتیب بالاترین حساسیت را نسبت به سایر ارقام و ژنوتیپ‌ها در برابر بیماری داشتند. ژنوتیپ‌های KH-13، TTS-1، کد ۵ لرستان و DS-5 به ترتیب کم‌ترین غلظت DNA قارچ در DNA کل ریشه را به خود اختصاص دادند. علاوه بر این، در این تحقیق مشخص گردید نتایج روش متعارف ارزیابی مقاومت ارقام زیتون مبتنی بر ثبت علائم ظاهری بیماری با نتایج حاصل از کمیت‌سنجی قارچ با استفاده از Real time PCR دارای هم‌پوشانی نسبتاً بالایی است به طوری که ارقامی که در روش ارزیابی متعارف جزء ارقام مقاوم یا بسیار حساس طبقه‌بندی شدند، در روش ارزیابی ملکولی نیز در گروه‌های مشابهی قرار گرفتند. با توجه به دقت و حساسیت بالای روش ارزیابی ملکولی می‌توان از روش اخیر برای غربالگری منابع مختلف زیتون برای مقاومت به بیماری پژمردگی ورتیسلیومی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: ارزیابی کمی، ارقام زیتون، مقاومت، Real time PCR

Screening of promising olive cultivars and local genotypes for resistance to *Verticillium dahliae* in Iranian collectionH. JAFARY¹*, N. ZAND¹, M. TAHERI², A. ZEINANLOO³, S. NAJAFI¹

1 and 2. respectively; Plant Protection Research Department and Soil and Water Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran; 3. Horticultural Sciences Research Institute, AREEO, Karaj, Iran

Abstract

Verticillium wilt of olive (VWO) caused by fungus *Verticillium dahliae*, is one of the most important diseases of olive worldwide. The response of 15 promising olive cultivars and 15 local varieties was evaluated to the fungus. The olive saplings of each genotype were inoculated with suspension of the fungus using root dip method. The degree of susceptibility/resistance of each genotype was evaluated based on both morphological feature and quantification of fungus in the root system of different genotypes. Total DNA was extracted from root of saplings at different sampling intervals: 0, 2, 12, 45 and 80 days post inoculation. The gradual increase for DNA of fungus in saplings was quantified by Real-time PCR technique and utilizing of SYBR Green system with specific primer pairs for β -tubulin2 gene. Based on both morphological and quantitative Real-time PCR assays: QG-11, DD2-1, treeNo2, PS-5 and Manzanilla were highly susceptible and KH-13, TTS-1, DS-5 code 5 Lorestan and DS-5 were evaluated as resistant genotypes to the VWO. Moreover, we found parallel results for conventional method of screening (based on disease symptoms) and quantification of DNA in root system of olive by Real-time PCR technique. Olive genotypes evaluated as highly susceptible or resistant to the disease in conventional method showed the similar reaction to the fungus in Q-PCR method. This may suggest that conventional method of evaluation for resistance could be replaced by Q-PCR molecular method in high throughput screening of olive germplasm.

Keywords: Olive cultivars, Quantitative assessment, Real time PCR, Resistance

مقدمه

بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی در اثر قارچ *Verticillium dahlia* یکی از مهم‌ترین تنش‌های زیستی زیتون محسوب می‌شود که می‌تواند باعث افت کمی و کیفی شدید محصول زیتون شود. این بیماری دارای گسترش جهانی است و یکی از مهمترین بیماری‌های زیتون در دنیا محسوب می‌شود (Ai-Ahmad and Mosli, 1993; Blanco-Lopez et al., 1984; Cirulli and Blanco-Lopez, Montemurro, 1976; Lopez-Escudero and 2001; Hiemstra and Harris, 1998; Rodriguez-Jurado et al., 1993; Serrhini and Zeroual, 1995; Thanassolopoulos et al., 1979). شدت و بروز بیماری معمولاً در درختان جوان بیشتر می‌باشد (Blanco-Lopez et al., 1984; Al-Ahmad and Mosli, 1993; Serrhini and Zeroual, 1995; Wilhelm and Taylor, 1965). در ایران نیز این بیماری به‌علت توسعه زیتون‌کاری در خاک‌های آلوده و نیز تهیه قلمه از درختان مادری آلوده به بیماری در حال گسترش است به‌طوری‌که در سال‌های اخیر موارد متعددی از آلودگی درختان در منطقه طارم (استان زنجان) و استان گلستان مشاهده شده است (Sanei et al., 2003; Jafary et al., 2014). آلودگی درختان زیتون به این بیماری برای اولین بار در استان گلستان در درختان موجود در ایستگاه تحقیقات هاشم‌آباد گرگان مشاهده شد (رهنما و همکاران، ۱۳۷۷). ویژگی پایداری بیمارگر ورتیسیلیوم در خاک به‌مدت طولانی، کنترل آن را دشوار کرده است (Blanco-Lopez and Jimenez- Diaz, 1995; Tjamos and Jimenez-Diaz, 1998). قدرت بالای بقاء پاتوژن در خاک (Wilhelm, 1955)، دامنه میزبانی گسترده (Heale, 1988; Sinclair et al., 1987; Vargas-Machuca, 1987) کاهش و یا عدم کارایی روش‌های توصیه شده برای مدیریت بیماری از محدودیت‌های کنترل بیماری ورتیسیلیومی می‌باشد. براساس خصوصیات ظاهری و بیماری‌زایی جدایه‌های *Verticillium dahlia* متعلق به پنبه و زیتون در دو پاتوتایپ برگ‌ریز (Defoliating) و غیر برگ‌ریز (Non-Defoliating) طبقه‌بندی شده‌اند (Schnathorst, 1973 Perez-Artes et al., 2000).

شدت بیماری‌زایی پاتوتایپ D بیشتر از پاتوتایپ ND است و حتی احتمال مرگ برای گیاهان آلوده شده نیز وجود دارد (Mercado-Blanco et al., 2002; Lopez-Escudero, 1999). در حال حاضر با توجه به پراکندگی و وجود پاتوتایپ D در باغات زیتون کشور، تعیین ارقام زیتون با حساسیت کمتر به این پاتوتایپ از *Verticillium dahliae* ضروری می‌باشد. برای کنترل این بیماری روش مبارزه شیمیایی قاطع و اثر بخشی ارایه نشده است و سموم شیمیایی تأثیر چندانی در کاهش خسارت بیماری ندارند و روش‌های مبارزه زراعی، مانند استفاده از تناوب زراعی، در باغات کاربرد ندارد. در حال حاضر مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین روش کنترل بیماری در دنیا استفاده از نهال‌های سالم و نیز کاشت ارقام مقاوم می‌باشد (Rodríguez et al., 2008).

ارزیابی دقیق و کمی بیوماس (زیست توده) بیمارگر برای شناسایی واریته‌های مقاوم یا متحمل زیتون، غربالگری بین ژرم پلاسما زیتون (Mercado- Blanco et al., 2003) و همچنین انتخاب ژنوتیپ‌های وحشی زیتون که به‌طور بالقوه می‌توانند به‌عنوان پایه زیتون استفاده شوند بسیار مهم می‌باشد و یکی از راهکارهای مهم مدیریتی برای کنترل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی زیتون محسوب می‌شود (Jimenez- Diaz et al., 2012; Colella et al., 2008).

به‌همین منظور در این تحقیق عکس‌العمل ۱۵ رقم امیدبخش و در دست معرفی زیتون و نیز تعداد ۱۵ ژنوتیپ بومی زیتون موجود در ایستگاه تحقیقات زیتون طارم استان زنجان نسبت به قارچ عامل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی با روش کمی Real time PCR بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جدایه *Verticillium dahliae*

در این تحقیق برای مایه زنی نهال‌های زیتون از جدایه خالص پاتوتایپ D قارچ *Verticillium dahliae* موجود

شده شاهد نیز در آب مقطر سترون قرار داده شدند. نهال‌های مایه‌زنی شده به مدت سه روز در گلخانه با شرایط دمایی ۲۲ و رطوبت ۹۵ درصد و تاریکی قرار گرفتند تا تلفات ناشی از روند مایه زنی کاهش یابد. پس از سه روز گیاهان در گلخانه با نور طبیعی و رطوبت ۸۰ درصد قرار گرفتند.

ارزیابی مقاومت ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون به *Verticillium dahliae* در شرایط گلخانه‌ای

هر تیمار شامل ۱۵ نهال مایه زنی شده و ۱۵ نهال شاهد (مایه زنی با آب مقطر سترون) بود. نمونه برداری از کل ریشه و قسمت انتهایی ساقه نهال‌های شاهد و آلوده در زمان صفر (زمان مایه زنی) و در زمان‌های ۲ و ۵ و ۴۵ و ۸۰ روز بعد از مایه زنی قارچ از نهال‌های آلوده و شاهد صورت گرفت سپس نمونه‌ها داخل فویل آلومینیومی سریعاً درون ازت مایع قرار گرفتند و به آزمایشگاه منتقل و در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس برای انجام مراحل بعد نگهداری شدند.

۱- شدت بیماری

برای ارزیابی مقاومت به پژمردگی، شدت بیماری به صورت هفتگی به مدت ۱۰ هفته (شروع دو هفته پس از مایه زنی) با استفاده از شاخص ۵ درجه‌ای پیشنهادی لوپز اسکودرو و همکاران (۲۰۰۴) براساس میزان کلروز بافت گیاه، نکروز برگ و جوانه و یا برگ‌ریزی استفاده شد. گیاه سالم بدون علائم بیماری = ۰، ۱-۳۳ درصد علائم بیماری = ۱، ۳۴-۶۶ درصد علائم بیماری = ۲، ۶۷-۹۹ درصد علائم بیماری = ۳، مرگ گیاه = ۴. سپس میانگین شدت بیماری برای هر تیمار (ارقام و ژنوتیپ‌ها) در هر تکرار محاسبه شد. در این پژوهش، تجزیه و تحلیل آماری داده‌های اندازه‌گیری شده با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح پنج درصد انجام گرفت.

۲- کمیت سنجی DNA بیمارگر در ریشه ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون استخراج DNA کل از ریشه‌های زیتون

مراحل استخراج DNA از ریشه قلمه‌های آلوده زیتون با روش CTAB (Novaes et al., 2009) با اندکی تغییرات انجام

در آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان (کد IRAN 1431C) استفاده شد. این جدایه با نمونه برداری از سرشاخه‌ها و ساقه‌های مشکوک به آلودگی ورتیسیلیومی با داشتن علائمی مانند پژمردگی، سبز خشک شدن و ریزش برگ‌ها از درختان زیتون باغات شهرستان طارم و کشت در محیط کشت مصنوعی (Czapec-Dox agar (Kim et al., 2005) جداسازی و با روش Nested-PCR و استفاده از آغازگرهای اختصاصی نوع پاتوتایپ آن مشخص و بیماری-زایی آن اثبات شده است (Jafary et al., 2014).

ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون مورد استفاده در تحقیق

برای انجام این تحقیق ارقام امیدبخش و در دست معرفی و برخی از ژنوتیپ‌های بومی ایران (جدول ۱)، مستقر در کلکسیون ژنوتیپ‌های زیتون بومی ایران در ایستگاه تحقیقات زیتون طارم انتخاب و در سیستم میست (تأمین رطوبت مورد نیاز قلمه‌ها برای ریشه‌دار کردن) موجود در گلخانه مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی ریشه‌دار شد. نهال‌های ریشه‌دار شده به گلدان (حاوی مخلوط خاک، کود دامی و پرلیت یا ماسه سترون) منتقل شده و جهت انجام آزمون بیماری‌زایی و ارزیابی مقاومت نسبی، در گلخانه نگهداری شدند.

مایه‌زنی

برای مایه‌زنی نهال‌های زیتون از روش غوطه‌ورکردن نهال درسوسپانسیون اسپور (Rodriguez-Jurado et al., 1993) استفاده شد برای این منظور سوسپانسیون اسپور جدایه D (برگریز) با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر تهیه و برای تعیین تراکم اسپور از لام هموسایتومتر استفاده شد. برای مایه زنی، نهال‌های نه ماهه زیتون به آرامی و بدون آسیب به ریشه آنها از پرلیت خارج شد و ریشه هر کدام از ارقام و ژنوتیپ‌های انتخاب شده زیتون به‌طور جداگانه در بشر حاوی سوسپانسیون اسپور به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. متعاقباً نهال‌ها به درون گلدان‌های حاوی خاک سترون (خاک، شن، پرلیت با نسبت ۱: ۱: ۱) منتقل و بلافاصله آبیاری شدند. قلمه‌های ریشه‌دار

واکنش در دمای ۹۵-۶۰ درجه سلسیوس با اختلاف ۰/۵ درجه سلسیوس در هر چرخه انجام گرفت. برای اطمینان از درستی انجام واکنش و اختصاصی بودن واکنش، فرآورده‌های واکنش Real time PCR بر روی ژل متافور آگارز (۲ درصد) بارگذاری شدند. عمل الکتروفورز با شدت ولتاژ ۷ V ۸۰ در مدت زمان یک ساعت انجام شد. برای رنگ آمیزی ژل از محلول اتیدیوم بروماید استفاده شد. سپس ژل تحت نور ماوراء بنفش (UV) در دستگاه Gel document مورد بررسی قرار گرفت.

رسم منحنی استاندارد

سری رقت‌های DNA قارچ *Verticillium dahliae* خالص شده از محیط کشت مایع براساس روش (Song et al., 2002) با غلظت‌های ۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱. نانوگرم آماده شدند و در Real time PCR برای ترسیم منحنی استاندارد با سه تکرار استفاده شد. برای رقیق‌سازی از DNA گیاهان شاهد استفاده شد تا تغییر پذیری احتمالی واکنش Real time PCR با استفاده از DNA گیاه نیز بررسی شود. آزمایش با استفاده از سری‌های رقیق‌سازی شده پنج‌گانه، اجرا گردید. هر کدام از نمونه‌های مجهول و شاهد نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. آزمایش برای نمونه ورتیسلیوم خالص به‌عنوان کنترل مثبت تکرار شد. تخمین غلظت‌های مجهول DNA ورتیسلیوم در کل نمونه‌های ریشه گیاه آلوده توسط این تکنیک با قرار دادن Ct به‌دست آمده از نمونه‌های مجهول در معادله خطی نمودار استاندارد به‌دست می‌آید. براساس مقدار Ct، غلظت *Verticillium dahliae* DNA در نمونه‌های ناشناخته با در نظر گرفتن دوره زمانی بعد از آلوده سازی با استفاده از این روش برآورده شده است.

داده‌ها براساس طرح آماری کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح یک درصد انجام گردید. در نهایت واکنش ارقام زیتون بر مبنای شدت بروز علائم بیماری با داده‌های حاصل از کمیت‌سنجی DNA قارچ در روی ریشه مطابقت داده شد.

شد. جهت تعیین درجه خلوص و غلظت نمونه‌های DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ و ژل آگارز استفاده و کیفیت و کمیت نمونه‌ها بررسی شد. تمام نمونه‌های DNA استخراج شده از ریشه نهال‌های زیتون بعد از کمیت‌سنجی با نانودراپ همگی تا غلظت ۲۰۰ نانوگرم DNA رقیق شدند تا ارزیابی دقیقی در شرایط یکسان از میزان DNA پاتوژن در ریشه انجام شود (Mercado-Blanco et al., 2003).

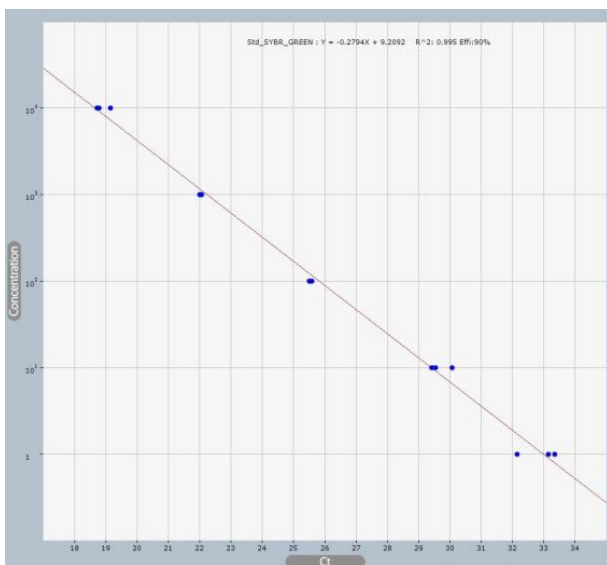
واکنش‌های Real time PCR

کمیت‌سنجی میزان DNA قارچ *Verticillium dahliae* با استفاده از دستگاه Real time PCR مدل EXI-05C-1303021 شرکت Bioneer انجام شد. در این تحقیق، برای تعیین رقم و ژنوتیپ مقاوم زیتون به قارچ *Verticillium dahliae* از روش ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از سیستم SYBER Green استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده بر اساس مطالعات انجام شده توسط Gramaje و همکاران (۲۰۱۳) انتخاب شد و برای اطمینان از درستی آغازگرها، بلاست در پایگاه NCBI برای ژن بتا توبولین انجام شد.

هر واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر از مخلوط آماده (Master Mix) شرکت JenaBioscience، ۰/۱ میکرومولار از هر آغازگر VertBt-F (5'-AACAACAGTCCGATGGATAATTC-3' و آغازگر VertBt-R (5'-GTACCGGGCTCGAGATCG-3') و ۴ میکرولیتر از DNA بافت ریشه زیتون بود. واکنش Real time PCR با سه تکرار به‌صورت مجزا، برای هر یک از تکرارها انجام شد.

برنامه Real time PCR شامل یک مرحله ابتدائی به‌مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و به‌منظور واسرشت‌سازی اولیه و یک برنامه ۴۰ چرخه‌ای شامل دمای ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها در دمای ۶۳ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه بود. پس از آخرین چرخه مخلوط به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس نگهداری گردید. پس از پایان واکنش رسم منحنی ذوب

بیمارگر در نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی منحنی استاندارد بر اساس مقدار R^2 سنجیده می‌شود. اگر این مقدار بالای ۹۷ درصد باشد قابل قبول است. میزان R^2 گزارش شده برای منحنی استاندارد تهیه شده از سری رقت‌های ورتیسلیوم در این مطالعه برابر ۹۹۵٪ بود که نشانگر بالا بودن سطح دقت و توانایی واکنش براساس این نمودار استاندارد است (شکل ۱).



شکل ۱- منحنی استاندارد با $R^2 = 0.995$ و معادله $Ct = -0.2794 \text{ Log [DNA]} + 9.2092$ همچنین $\text{Efficiency} = 90\%$ که محور عمودی لگاریتم غلظت DNA و محور افقی سیکل آستانه می باشد.

Fig. 1. Standard curve with $R^2 = 0.995$ and equation of $Ct = -0.2794 \text{ Log [DNA]} + 9.2092$. Efficiency = 90% vertical axis refers to the threshold cycle and the horizontal axis shows the logarithm of the DNA concentration.

واکنش Real time PCR

به منظور انجام واکنش Real time PCR از آغازگرهای VertBt-R و VertBt-F، که قطعه اختصاصی از ژن بتا توپولین ۲ بیمارگر به اندازه ۱۱۵bp را در واکنش تکثیر می‌نماید، برای کمیت‌سنجی DNA قارچ استفاده و از آغازگرهای AB101 و AB102 (Sun et al., 1994) در واکنش‌های زنجیره‌ای پلسی‌مرز برای کیفیت‌سنجی DNA ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون استفاده گردید. در واکنش Real time PCR با آغازگرهای VertBt-F و VertBt-R قطعه اختصاصی از ژن بتا توپولین ۲ بیمارگر به اندازه

نتایج و بحث

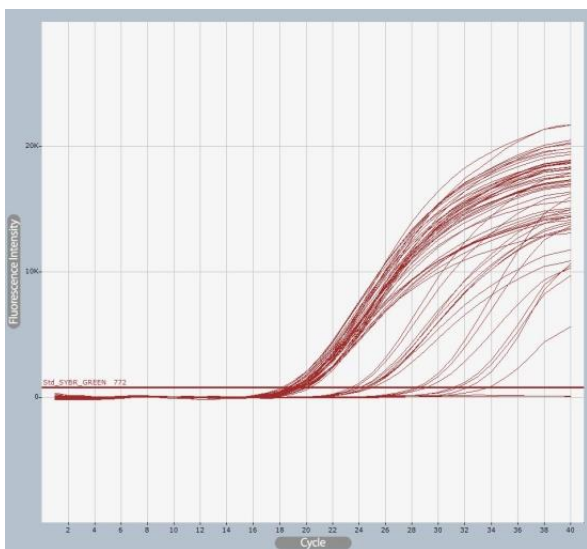
ارزیابی علائم بیماری و شدت آلودگی ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون نسبت به قارچ *Verticillium dahliae* در شرایط گلخانه‌ای

با توجه به جدول تجزیه واریانس غربالگری حساسیت ارقام زیتون به قارچ ورتیسلیوم مشاهده می‌شود که بین ارقام مختلف از لحاظ میزان حساسیت و علائم بیماری و شدت آلودگی نسبت به بیماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۱).

براساس ارزیابی علائم بیماری ارقام و ژنوتیپ‌های آلوده شده به ورتیسلیوم مشخص شد که هیچکدام از ارقام و ژنوتیپ‌هایی که در این طرح مورد بررسی قرار گرفتند، در مقابل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی ایمن نبوده و تمامی آنها درجاتی از حساسیت را نشان دادند. همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود براساس مقایسه میانگین تیمارهای موجود، تمامی ژنوتیپ‌ها و ارقام داخلی و خارجی مورد مطالعه در این بررسی، بر مبنای میزان حساسیت نسبت به این بیماری با استفاده از شاخص ۵ درجه‌ای پیشنهادی لویز اسکودرو و همکاران (Lopez-Escudero et al., 2004) در ۶ گروه قرار گرفتند. هرچند بیشتر این نهال‌ها در مقابله با قارچ *Verticillium dahliae* حساسیت و یا مقاومت متوسطی را از خود نشان دادند ولی تعدادی از ژنوتیپ‌ها هم واکنش‌های متفاوتی از حساسیت در مقابل این قارچ از خود بروز دادند: ژنوتیپ QG-11 به‌عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ شناخته شد و در درجه بعدی از حساسیت، ژنوتیپ‌های DS-9 و DS-5 و D-1 و رقم کنسروالیا قرار داشتند. در مقابل ژنوتیپ‌های T-TS-1 و KH-13 به‌عنوان مقاوم‌ترین در میان تمامی ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد مطالعه در این طرح شناخته شدند. در درجه بعدی مقاومت نیز ژنوتیپ‌های T-MO4، T-H4، KH-10، KH-11، QG-18، دکل و رقم ماری درشت قرار داشتند.

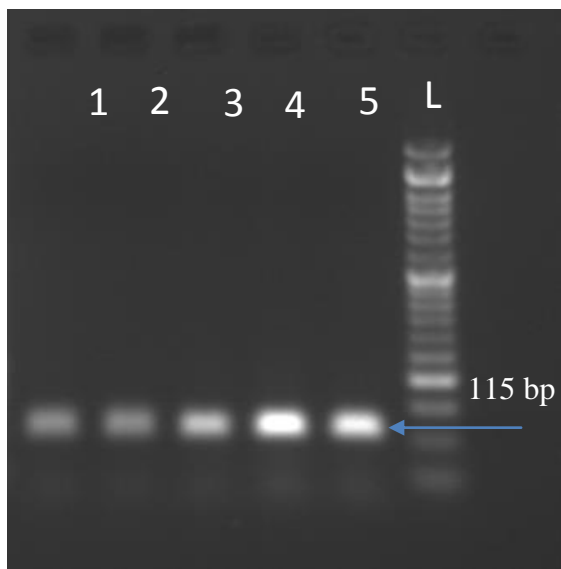
ارزیابی منحنی استاندارد برای کمیت‌سنجی *Verticillium dahliae* در نهال‌های زیتون آلوده

منحنی استاندارد برای DNA قارچ *Verticillium dahliae* با روش Real time PCR رسم شد و برای تعیین مقدار DNA



شکل ۳- منحنی تکثیر برای ریشه‌های آلوده شده زیتون، توسط دستگاه Bioneer در سیستم SYBR Green، محور افقی تعداد سیکل و محور عمودی میزان فلورسنت قرائت شده توسط دستگاه می باشد.

Fig. 3. Proliferation curve for infected olive root by Bioneer, vertical axis refers to the number of cycles and the horizontal axis shows the fluorescence read by device.



شکل ۴- الکتروفورز محصولات تکثیر شده در واکنش Real time PCR روی ژل متافور آگارز. L: Orang Ruler 50 bp DNA Ladder. ۱: زمان مایه زنی، ۲: دو روز بعد از مایه زنی، ۳: ۱۵ روز بعد از مایه زنی، ۴: ۴۵ روز بعد از مایه زنی، ۵: ۸۰ روز بعد از مایه زنی.

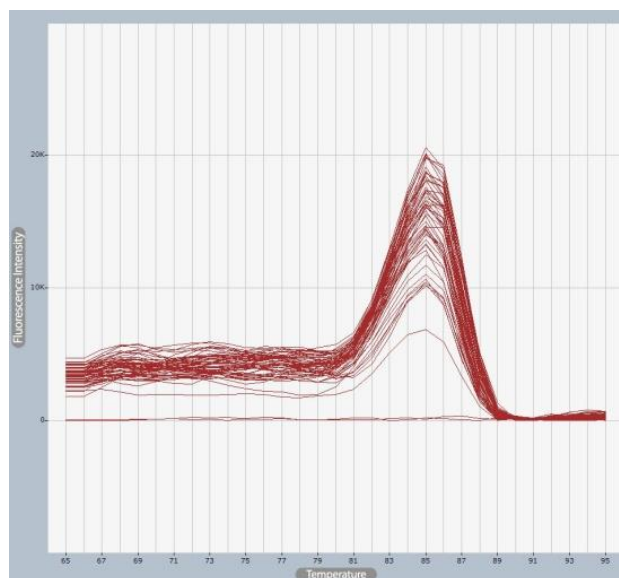
Fig. 4. Electrophoresis of amplified DNA products in Real time PCR reaction on MetaPhor agarose gel.

L: O'Range Ruler 50 bp DNA Ladder. 1: Inoculation time, 2: Two days after inoculation 3: 15 days after inoculation 4: 45 days after inoculation. 5: 80 days after inoculation.

۱۱۵bp تکثیر که دمای متوسط ذوب محصول مورد انتظار در حدود ۸۵ درجه سلسیوس بود. آنالیز منحنی ذوب تأیید کرد که هیچ گونه محصول غیر اختصاصی ایجاد نشده و شرایط آزمایش برای تکثیر مطلوب بوده است (شکل ۲)، همچنین در شکل ۳ منحنی تکثیر در سیستم SYBR Green آورده شده است. نتایج آنالیز منحنی ذوب و منحنی تکثیر توسط تکنیک الکتروفورز تأیید گردید (شکل ۴). همانطور که در شکل ۴ دیده می شود محصولات Real time PCR به منظور تأیید بیشتر بر روی ژل متافور آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند که باند اختصاصی را به اندازه ۱۱۵ bp تولید نمودند.

نتایج حاصل از کمی‌سنجی مقدار DNA قارچ *Verticillium dahliae* در ریشه ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون

نتایج کمی‌سنجی‌های Real time PCR با استفاده از نمونه‌های DNA کل ریشه آلوده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در نمودارهای جداگانه نشان داده شده است. بیشترین مقدار DNA در اکثر ژنوتیپ‌ها در زمان ۴۵ روز بعد از مایه زنی کمی‌سنجی گردید.



شکل ۲- منحنی دمای ذوب قطعات تکثیر شده در نمونه‌های تلقیح شده با *Verticillium dahliae*.

Fig. 2. Melting curve of DNA isolated from root samples infected with *Verticillium dahliae*.

گرفتند که نشان دهنده حساسیت بالا به قارچ ورتیسلیوم می‌باشد. همچنین مشخص شد که کمترین میزان تجمع غلظت DNA ورتیسلیوم به ترتیب در ژنوتیپ‌های KH-13، TTS-1 و کد ۵ لرستان می‌باشد که حاکی از حساسیت کم آنها به آلودگی می‌باشد. هرچه میزان تجمع و غلظت DNA ورتیسلیوم نسبت به DNA کل ریشه گیاه آلوده افزایش یابد، توانایی قارچ در ایجاد بیماری بیشتر خواهد بود. به عبارت دیگر میزان بالای مقدار DNA ورتیسلیوم در ریشه گیاه نشان دهنده حساسیت بیشتر رقم (یا ژنوتیپ) می‌باشد (نمودار ۴). بقیه ارقام و یا ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ حساسیت به قارچ ورتیسلیوم دارای حالت حد واسط (حساسیت متوسط) هستند (نمودار ۴).

در بررسی جدول تجزیه واریانس غلظت DNA ورتیسلیوم (جدول ۲) مشاهده می‌شود که در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری ۲ (نمودار ۱)، ۱۵ (نمودار ۲)، ۴۵ (نمودار ۳) و ۸۰ (نمودار ۴) روز پس از مایه زنی بین ارقام مختلف تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد. یعنی بین ارقام مورد بررسی زیتون از لحاظ میزان غلظت DNA ورتیسلیوم و یا حساسیت به این قارچ تفاوت بالایی وجود دارد. مقایسه میانگین میزان آلودگی ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون ۸۰ روز پس از مایه زنی (نمودار ۴)، نشان داد که میزان غلظت DNA ورتیسلیوم در ژنوتیپ‌های QG-11 و DD2-1 بسیار بیشتر از سایر ارقام مورد بررسی بود و پس از آن به ترتیب ژنوتیپ‌های درخت شماره ۲، PS-54 و رقم مانزانیا قرار

جدول ۱- مقایسه میانگین شدت علائم بیماری روی ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف زیتون مایه زنی شده با *Verticillium dahliae* در شرایط گلخانه‌ای.

Table 1. Comparison of mean of the disease severity index in different cultivars and genotypes of olive inoculated with *Verticillium dahliae* in greenhouse conditions

Cultivar/Genotype	Mean of disease severity index (%)	Cultivar/Genotype	Mean of disease severity index (%)	Cultivar/Genotype	Mean of disease severity index (%)
Tree No 2	bcd 0.8	DS - 5	ab 1.8	Besh	bcd 1.2
T - Mo4	cd 0.4	KH - 13	d 0.2	PS - 5	abc 1.4
QG - 4	bcd 1.2	QG - 18	cd 0.4	Little mary	bcd 1
QG - 11	a 2.6	KH - 11	cd 0.4	D 1	ab 1.8
DS - 9	ab 1.8	T - TS1	d 0.2	Cod 5 Lorestan	bcd 1
Big mary	cd 0.4	T - H 4	cd 0.4	No 11	bcd 1
RD	bcd 1	Shiraz	bcd 0.8	Dd - 2	abc 1.4
T - Mo3	abc 1.4	Manzanila	ab 1.6	QG - 17	bcd 0.8
B n-2	bcd 0.8	KH - 10	cd 0.4	Roghani (small)	bcd 0.8
QG - 12	bcd 1	Dakal	cd 0.4	Roghani (big)	bcd 0.8

در هر ستون اعدادی که دارای حروف مشترکند در یک گروه آماری قرار دارند (۱ درصد α). (شدت علائم بیماری: گیاه سالم بدون علائم بیماری = ۰، ۱-۳۳ درصد شدت بیماری = ۱، ۳۴-۶۶ درصد شدت بیماری = ۲، ۶۷-۹۹ درصد شدت بیماری = ۳، مرگ گیاه = ۴).

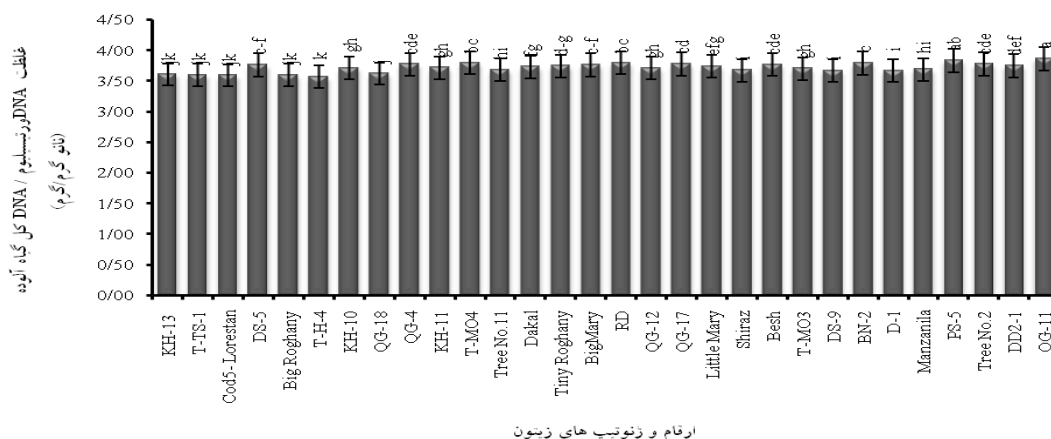
Disease severity Index: 0= healthy plant; 1= disease severity 1-33%; 2= disease severity 34- 66%; 3= disease severity 67-99%; 4= dead plant

جدول ۲- تجزیه واریانس میزان غلظت DNA ورتیسلیوم در ریشه ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون در فواصل زمانی مختلف بعد از مایه زنی.

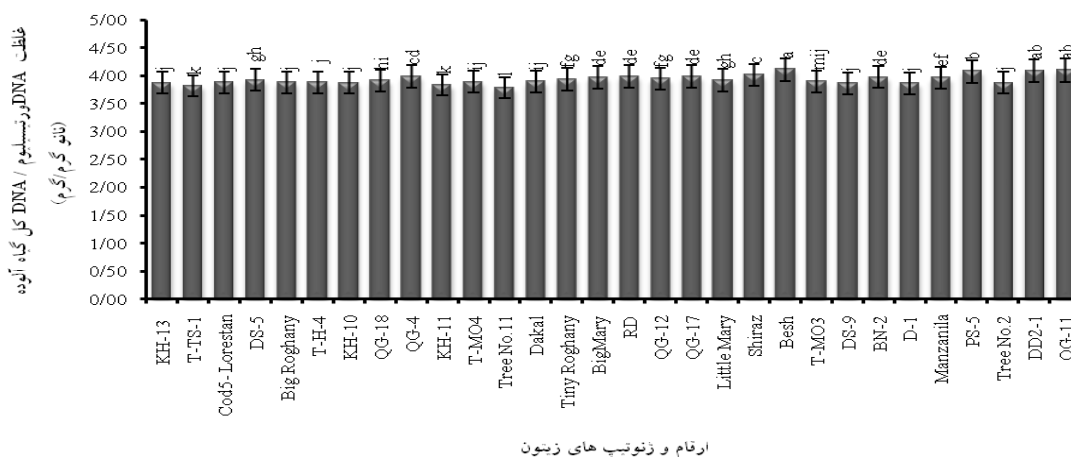
Table 2. Analysis of variance of DNA concentration of *Verticillium dahliae* in the root of olive cultivars and genotypes in time courses post inoculation.

Source of variation	df	Mean of Square			
		80 DAI	45 DAI	15 DAI	2 DAI
Cultivare	29	** 0.03171	** 0.0578	** 0.01821 *	** 1.2714
Exp. Error	60	0.0009	0.00012	0.00024	0.0008
Coefficient of variation (CV)		0.25	0.29	0.42	1.48

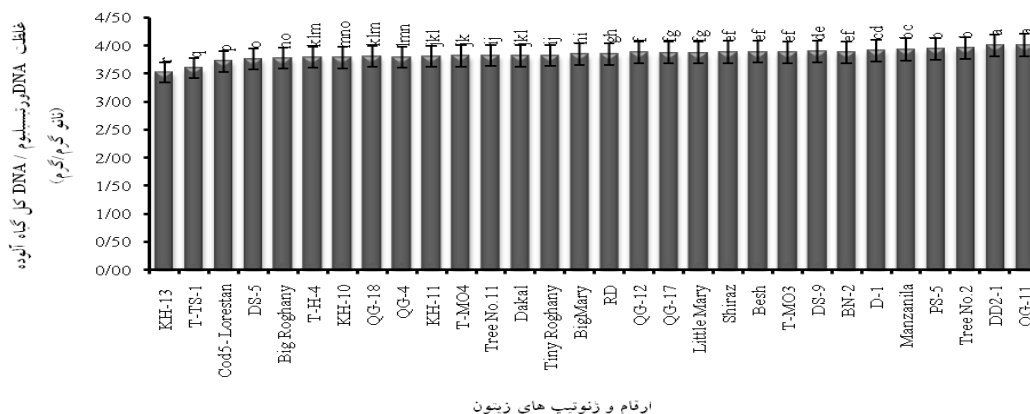
** نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد. *: Indicted significant differences at 1% level.



نمودار ۲- مقایسه میانگین میزان غلظت DNA بیمارگر *Verticillium dahliae* در ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون ۱۵ روز پس از مایه زنی.
 2. Comparison of different DNA concentrations of *Verticillium dahliae* in olive cultivars and genotypes 15 days after inoculation.

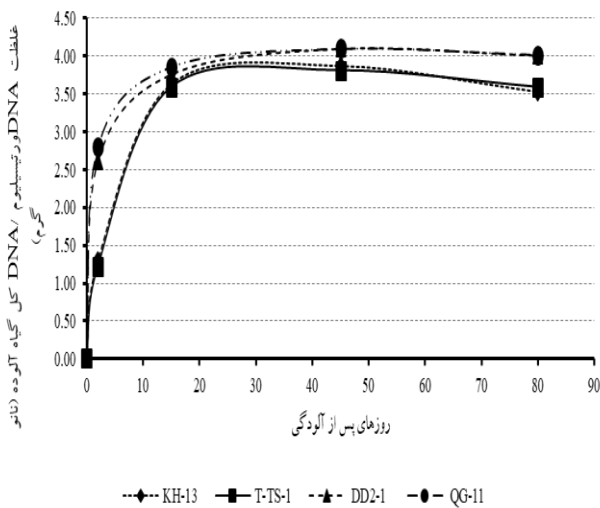


نمودار ۳- مقایسه میانگین میزان غلظت DNA بیمارگر *Verticillium dahliae* در ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون ۴۵ روز پس از مایه زنی.
 Chart 3. Comparison of different DNA concentrations of *Verticillium dahliae* in the olive cultivars and genotypes 45 days after inoculation.



نمودار ۴- مقایسه میانگین میزان غلظت DNA بیمارگر *Verticillium dahliae* در ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون ۸۰ روز پس از مایه زنی.
 Chart 4. Comparison of different DNA concentrations of *Verticillium dahliae* in the olive cultivars and genotypes 80 days after inoculation.

به منظور جلوگیری از گسترش بیمارگر با بذر لویا آلوده انجام شده است (Sousa et al., 2014). این تکنیک برای مطالعه میزان رشد و کمیت‌سنجی *Fusarium solani* f. sp. *glycines* در ریشه گیاه سویا استفاده و مشخص شده است که می‌تواند به عنوان یک روش مناسب برای ارزیابی مقاومت لاین‌های سویا در برابر این بیمارگر استفاده شود (Lie et al., 2008). همچنین این تکنیک به عنوان یک روش حساس و قوی برای ارزیابی روند رشد *Phytophthora infestans* در ریشه سیب‌زمینی و مقاومت میزبان در برابر بیماری در لاین‌های مختلف سیب‌زمینی استفاده شده است (Hussain et al., 2013). با استفاده از این روش وجود قارچ *Verticillium dahliae* در ارقام مختلف سولاناسه مورد بررسی قرار گرفته و ثابت شده است که نسبت DNA قارچ به گیاه در رقم مقاوم به ورتیسیلیوم کمتر از سایر ارقام بوده است. نتایج همچنین نشان داد که رابطه معنی‌داری بین شدت علائم گیاه آلوده در لاین‌های مختلف و مقدار DNA قارچ وجود دارد (Gayoso and Pomar, 2007).



نمودار ۵- نتایج حاصل از کمیت‌سنجی DNA بیمارگر

Verticillium dahliae در ریشه ژنوتیپ‌های حساس (QG-11 و DD2-1) و مقاوم (KH-13 و TTS-1) در فواصل زمانی مشخص بعد از فرآیند آلوده‌سازی.

Chart 5. DNA quantification of *Verticillium dahliae* in root samples of the partially resistant and susceptible genotypes in time courses.

نمودار ۵ مقایسه روند افزایش غلظت DNA ورتیسیلیوم در ژنوتیپ‌های حساس QG-11، DD2-1 و مقاوم KH-13. TTS-1 در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری را نشان می‌دهد. این نمودار نشان می‌دهد کمیت قارچ عامل بیماری بین زمان صفر تا ۲ روز در ارقام حساس نسبت به ارقام مقاوم سریع‌تر افزایش یافته است. همچنین تجمع بیمارگر تا ۱۵ روز پس از مایه زنی در ارقام حساس بیشتر و سریع‌تر و در ارقام مقاوم تجمع غلظت DNA با روند کندتری پیش رفته است. ۴۵ روز پس از مایه زنی غلظت DNA پاتوژن به بیشترین میزان خود می‌رسد و پس از آن میزان تجمع پاتوژن در ریشه گیاه زیتون کاهش پیدا می‌کند. در ارقام مقاوم (KH-13 و TTS-1) همان گونه که در نمودار ۵ مشخص می‌باشد، این روند به صورت نزولی می‌باشد اما در ارقام حساس (QG-11 و DD2-1) اگرچه کاهش غلظت DNA پاتوژن نزولی است ولی روند و سرعت کاهش بسیار ناچیز و کند می‌باشد. با توجه به این نتایج ارقام مقاوم توانستند سرعت رشد قارچ را پس از ۴۵ روز کند کنند و سرعت تجمع DNA سیر نزولی به خود گرفته است. اما در ارقام حساس سرعت کاهش تجمع DNA ورتیسیلیوم خیلی کند بوده که می‌تواند شاخص مهمی برای حساسیت ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون به آلودگی با ورتیسیلیوم می‌باشد.

بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی، یکی از جدی‌ترین بیماری‌هایی است که در جهان روی زیتون تأثیرگذار است و باعث خسارات شدید باغات زیتون در کل منطقه مدیترانه شده است (Muwarfaq, 2006). هیچ راه کنترل شیمیایی برای مقابله با این بیماری وجود ندارد. بنابراین روش‌های کنترل ورتیسیلیوم بر روی استفاده از ارقام مقاوم متمرکز شده است (Fradin and Thomma, 2006). اندازه‌گیری کمی DNA در گیاه به جای ارزیابی مستقیم قارچ عامل بیماری روش سریع و مطمئنی برای شناسایی ارقام مقاوم معرفی شده است (Mercado-Blanco et al., 2003).

استفاده از تکنیک Real time PCR برای تشخیص سریع و کمیت‌سنجی *Fusarium oxysporum* f. sp. *solani* در بذر لویا

در این مطالعه رقم مانزانیلا تقریباً حساس گزارش شده است که با مطالعات قبلی که روی مقاومت این رقم انجام شده است منطبق می‌باشد. در مطالعات قبلی رقم مانزانیلا به شدت حساس (Latife and Mehmet, 2011) و نسبتاً حساس (Sanei and Razavi, 2011; El Said et al., 2012) معرفی شده است.

نکته قابل توجه این است که مقدار DNA پس از گذشت یک مدت زمان طولانی در همه ارقام کاهش می‌یابد. این کاهش می‌تواند ناشی از پدیده طبیعی بهبود باشد که مرتبط با مکانیسم‌هایی است که به درخت اجازه می‌دهد به زخم و ضعیف شدن خود غلبه کند که این مکانیسم‌ها می‌تواند بعد از آلودگی توسط *Verticillium dahliae* فعال شود (Markakis et al., 2009).

در مورد پدیده بهبودی در ارقام مقاوم و حساس زیتون نسبت به پاتوتیپ D و ND مطالعات نشان می‌دهد بهبودی گیاه بستگی به بیماری زایی این جدایه‌ها، شدت علائم نشان داده شده توسط گیاه و سطح مقاومت کولتیوارها دارد. فاکتورهایی مانند قابلیت درخت برای انسداد آوندهای آلوده، ممانعت از آلودگی‌های جدید و افزایش سطح ترکیبات فنولیک در این بین از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (Blanco-Lopez and Lopez-Escudero, 2005; Markakis et al., 2009).

نتایج بررسی مقاومت ارقام با استفاده از روش سنتی (مایه زنی گیاهچه‌ها و بررسی شدت بروز علائم) با نتایج حاصل از کمی‌سنجی DNA بیمارگر در ریشه گیاه میزبان با استفاده از تکنیک Real time PCR همپوشانی مناسبی داشته است و در این مطالعه مشخص شد که مقدار DNA کمیته‌سنجی شده در هر ژنوتیپ زیتون با وقوع و شدت علائم بیماری پزمدگی ورتیسلیومی مرتبط است. بدین ترتیب، مقدار DNA پاتوژن کمیته‌سنجی شده در ریشه در طول دوره زمانی ۸۰ روزه در ژنوتیپ QG-11 و DD2-1 (ژنوتیپ‌های شدیدترین علائم بیماری) نسبت به ژنوتیپ‌های KH-13 و TTS-1 (ژنوتیپ با علائم کمتر) بالاتر بوده است.

در مجموع اندازه‌گیری DNA در گیاه به‌جای ارزیابی مستقیم قارچ عامل بیماری روش دقیق، کارآمد و مطمئنی برای شناسایی ارقام مقاوم گزارش شده است (Moretti et al., 2003; Gao et al., 2004; Mercado-Blanco et al., 2015). با توجه به پژوهش‌های انجام شده با این روش روی تعامل پاتوژن-میزبان در دنیا و نتایج این پژوهش می‌توان از این روش در آینده نسبت به غربالگری لاین‌های امیدبخش و ارقام زیتون به بیماری پزمدگی ورتیسلیومی در سطح وسیع‌تر اقدام کرد. تکنیک Real time PCR به‌عنوان یک روش مناسب برای مطالعه بیولوژی پاتوژن، اکولوژی، تعامل پاتوژن-میزبان و بسیاری دیگر از جنبه‌های قارچ‌های *Phytophthora nicotianae*، *Phytophthora citrophthora*، *Verticillium Rosellinia necatrix*، *Phytophthora citrophthora* به‌کار برده شده است (Schena et al., 2004). این روش به‌علت حساسیت بالا قادر است تا کوچکترین اندازه از قارچ را در میزبان ردیابی نماید (Muwarfaq, 2006).

طبق مطالعه‌ای که توسط Gramaje و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد میزان دقت، اختصاصیت و کارایی ۸ پروتکل Real time PCR کمی که از سال ۲۰۰۲ برای تشخیص اختصاصی و کمی *Verticillium dahliae* در گونه‌های گیاهی مختلف و خاک منتشر شده بود بر روی زیتون بررسی و بهترین پروتکل‌ها برای شناسایی کمی و اختصاصی را معرفی کردند. بر اساس این مطالعه دو پروتکل (بر اساس ناحیه IGS و Tag Man Prob) و SYBR 4 (بر اساس ژن β -tubulin 2 و SYBR-Green) حساس‌ترین و مناسب‌ترین پروتکل‌ها برای کمی‌سنجی *Verticillium dahliae* برای میزان کم DNA در بافت‌های مختلف زیتون (ریشه، برگ و ساقه) شناخته شدند که پروتکل SYBR-4 حداقل میزان ۱۸ fg از DNA، *Verticillium dahliae* را توانست شناسایی کند (Gramaje et al., 2013). بر همین اساس برای شناسایی ارقام و ژنوتیپ‌های مقاوم زیتون در این طرح از پروتکل SYBR 4 که کارایی بالایی برای تشخیص DNA پاتوژن *Verticillium dahliae* می‌باشد استفاده شد.

عوامل بیماری‌زا کمک نموده و کنترل پژمردگی ورتیسیلیومی را در زیتون امکان‌پذیر می‌سازد.

تکنیک Real time PCR می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مناسب برای تشخیص سریع و کمی عوامل بیماری‌زا و نیز ردیابی و توسعه بیماری و انسداد گیاه توسط این عوامل استفاده گردد. همچنین شناسایی سریع و قابل اعتماد پاتوتیپ‌های

References

- AL-AHMAD, MA. and MOSLI, MN. 1993. Verticillium wilt of olive in Syria. EPPO Bulletin 23: 521–529.
- BLANCO-LOPEZ, MA. and JIMENEZ-DIAZ, RM. 1995. Una propuesta de lucha integrada contra la verticilosis del olivo. Fruticultura Profesional. Especial Produccion Integrada 70: 52–58.
- BLANCO-LOPEZ, MA. JIMENEZ-DIAZ, RM. and CABALLERO, JM. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of Verticillium wilt of olive trees in Andalucia. Phytopathologia Mediterranea, 23: 1–8.
- CIRULLI, M. and MONTEMURRO, G. 1976. A comparison of pathogenic isolates of *Verticillium dahliae* and sources of resistance in olive. Agriculturae Conspectus Scientificus, 39: 469–476.
- COLELLA, C. MIACOLA, C. AMENDUNI, M. DAMICO, M. BUBICI, G. and CIRULLI, M. 2008. Sources of Verticillium wilt resistance in wild olive germplasm from the Mediterranean region. Plant Pathology. 57:533-539.
- EL, SAID. S, HEGAZI AYMAN, A. HEGAZI, and ABDOU, M. ABD ALLATIF, 2012. Resistance of Some Olive Cultivars to Verticillium Wilt. Journal of Applied Sciences Research, 8(5): 2758-2765.
- FRADIN, E. F. and THOMMA, B. P. H. J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by of *Verticillium dahliae* and *Verticillium albo-atrum*. Molecular Plant Pathology 7(2): 71-86.
- GAO, X. JACKSON, T. A. LAMBERT, K. N. LI, S. 2004. Detection and Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in Soybean Roots with Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. Plant Disease, 88: 372- 380.
- 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.
- GRAMAJE, D. PÉREZ-SERRANO, V. MONTESBORREGO, M. NAVAS-CORTÉS, J. A. JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. and LANDA, B. B. 2013. A Comparison of Real-Time PCR Protocols for the Quantitative Monitoring of Asymptomatic Olive Infections by *Verticillium dahliae* Pathotypes. Phytopathology. 103(10):1058-68.
- HEALE, JB. 1988. *Verticillium* spp., the cause of vascular wilt diseases in many species. Advances in Plant Pathology, 6: 291–312.
- HIEMSTRA, J. and HARRIS, D. 1998. Compendium of Verticillium Wilt in Tree Species, Ponsen and Looijen, Wageningen, the Netherlands.
- HUSSAIN, T. SINGH and B. P. ANWAR, F. 2013. A Quantative Real-Time PCR of *Phytophthora infestans* in different Indian potato cultivars. Journal of Agriculture and Veterinary Science, 4:17- 26.
- JAFARY, H. KHANMOHAMMADI, S. and MEHRI, NASTARAN, 2014. Detection of pathotypes of *Verticillium dahliae*, the causal agent of olive Verticillium wilt in olive orchards of Tarom using Nested-PCR technique. Applied Researches in Plant Protection. 2(2): 47-58.
- JIMENEZ-DIAZ, R. M., BUBICI, G. JIMENEZ-GASCO, M. M. ANTONIOU, P. P. and TJAMOS, E. C., 2012. Verticillium wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. Plant Dis. 96:304-329.

- 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 pyriputrescens*. *Mycologia* 97: 25-32.
- LOPEZ-ESCUADERO, F. J. and BLANCO-LOPEZ, M.A. 2001. Effect of a single or double soil solarization to control *Verticillium* wilt in established olive orchards in Spain. *Plant Disease*, 85: 489-496
- LOPEZ-ESCUADERO, L. F. J. and BLANCO-LOPEZ, M. A. 2005. Recovery of young olive trees from *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 367-375.
- LOPEZ-ESCUADERO, L. F. J. DEL RIO, C. CABALLERO, J. M. and BLANCO-LOPEZ, M. A. 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 79-85.
- 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.
- MERCADO-BLANCO, J. COLLADO-ROMERO, M. PARRILLA-ARAUJO, S. RODRIGUES-JURADO, D. and JIMENES-DIAZ, D. 2003. Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63: 91-105.
- MERCADO-BLANCO, J. RODRIGUEZ-JURADO, D. PARRILLA-ARAUJO, S. and JIMENEZ-DIAZ, R. M., 2003. Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium* infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 87: 1487-1494.
- MORETTI, C. QUAGLIA, M. CERRI, M. NICOSIA, D. E. and BUONAURIO, R. 2015. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Botrytis cinerea* in *Pelargonium x hortorum* plants, and its use for evaluation of plant resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 143: 159.
- MUWARFAQ, R. K. 2006. Seed transmission of *Verticillium dahliae* in olive as detected by a highly sensitive Nested-PCR based assay. *European Journal of Phytopathology. Mediterr*, 45: 15-23.
- 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.
- PEREZ-ARTES, E. GARCIA-PEDRAJAS, M. D. BEJARANO-ALCAZAR, J. and JIMENEZ-DIAZ, R. M. 2000. Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 507-517.
- Rahnama, K. Razavi, S. R. Latifi, N. and Zarei, H. 1998. Investigation the occurrence of decay of branches and olive trees in Golestan province. The 13th Iranian Plant Protection Congress. P222. (In Persian with English summary).
- RODRIGUEZ, E. GARCIA-GARRIDO, J. GARCÍA, M. and CAMPOS, M. 2008. Agricultural factors affecting *Verticillium* wilt in olive orchards in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 22: 287-295.
- RODRIGUEZ-JURADO, D. 1993. Interacciones huesped-parasito en la marchitez del olivo (*Olea europaea* L.) inducida por *Verticillium dahliae* Kleb. Ph.D. Thesis, Universidad de Cordoba, Spain
- SANEI, S. J. OKHOVAT, S. M. HEJAROD, GH. A. SAREMI, H. and NIKKHAH, M. J. 2003. The role of therapeutic therapy of olive cuttings in reducing contamination with *Verticillium* wilt in Iran. The 16th Iranian Plant Protection Congress. P432. (In Persian with English summary).
- SANEI, S.J. and S.E. RAZAVI, 2011. Reaction of some olive cultivars to *verticillium dahliae* isolates agent of vascular wilt: A comparative study. *American Journal of Experimental Agriculture*, 1(4): 320-330.
- 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.
- SCHENA, L. NIGRO, F. IPPOLITO, A. and GALLITELLI, A. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. European Journal of Plant Pathology 110: 893–908.
- SERRHINI, M.N. and ZEROUAL, A. 1995. La Verticilosis del olivo en Marruecos. Olivae, 58: 58–61.
- SINCLAIR, W.A. LYON, H.H. and JOHNSON, W.T. 1987. Diseases of Trees and Shrubs, Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca and London.
- SONG, P. CAI, C. Q. SKOKUT, M. KOSEGI, B. D. and PETOLINE, J. F. 2002. Quantitative real- time PCR as a screeng tool for estimating transgen copy number in maze. PCR Plant Cellule Reproduction 20: 948-954.
- SOUSA, M. V. MACHADO, J. C. SIMMONS and H. E. MUNKVOLD, G. P. 2014. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. Plant Pathology, 64: 478-488.
- SUN Y, SKINNER DZ and LIANG GH, HULBERT SH. 1994. Phylogenetic analysis of sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. Theoretical and Applied Genetics 89:26–32.
- THANASSOULOPOULOS, C.C. BIRIS, D.A. and TJAMOS, E.C. 1979. Survey of Verticillium wilt of olive trees in Greece. Plant Disease Reporter, 63: 936–940
- TJAMOS, E.C. and JIMENEZ-DIAZ, R.M. 1998. Management of disease. In: Hiemstra J and Harris D (eds) Compendium of VerticilliumWilt in Tree Species (pp 55–57) Ponsen&Looijen, Wageningen, the Netherlands
- VARGAS-MACHUCA, R. MARTIN, C. and GALINDEZ, W. 1987. Recovery of *Verticillium dahliae* from weed plants in farmers fields in Peru. Plant Disease, 71: 756–758
- WILHELM, S .1955. Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and field. Phytopathology, 45: 180–181
- WILHELM, S. and TAYLOR, J.B. 1965. Control of Verticillium wilt in olive trough natural recovery and resistance. Phytopathology, 55: 310–316