استفاده از روش‌های کلاسیک و مولکولی در ردیابی *Armillaria mellea* عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه درختان از خاک و چوب*

APPLICATION OF CLASSICAL AND MOLECULAR TECHNIQUES IN DETECTION OF *Armillaria mellea* THE CAUSAL AGENT OF ROOT AND CROWN ROT DISEASE FROM SOIL AND WOOD

الهام یوسفی همدانی، بهرام شریف‌نبی** و مسعود بهار[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۲۹؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۱۱/۱۲)

چکیده

قارچ *Armillaria mellea* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه درختان دارای انتشار جهانی است و خسارت قابل توجهی را به دامنه وسیعی از درختان باغی، جنگلی و فضای سبز وارد می‌سازد. قارچ عامل بیماری می‌تواند به عنوان یک منبع آلودگی در زیر پوست باقی بماند و از سویی کنترل مؤثری علیه این بیماری وجود ندارد، بنابراین ردیابی بیمارگر از خاک و طوقه درختان در پیش‌بینی شدت آلودگی قارچی و جلوگیری از پراکنش به درختان مجاور اهمیت دارد. در این تحقیق به منظور دستیابی به یک روش حساس و سریع جهت ردیابی *A. mellea* در نمونه‌های خاک و چوب، نمونه‌برداری از اندام بارده قارچ، خاک و طوقه درختان انجام گرفت و پس از جداسازی عامل بیماری روی محیط کشت، مقایسه‌ای میان روش‌های مختلف ردیابی بیمارگر با استفاده از محیط‌های کشت نیمه‌انتخابی، گیاه تله و روش مولکولی صورت گرفت. مایه تلقیح بیمارگر برای دو جدایه *A. mellea* تهیه و به میزان سه درصد به خاک تلقیح گردید و سپس ردیابی بیمارگر با استفاده از سه روش محیط کشت، تله‌گذاری و nested PCR به‌طور همزمان، انجام گرفت. روش محیط کشت نیمه‌انتخابی در ردیابی بیمارگر در درازمدت کارایی نداشت. در روش تله‌گذاری از گیاه شمعدانی استفاده گردید که به مدت زمان طولانی جهت ردیابی بیمارگر از خاک نیاز داشت. براساس نتایج به‌دست آمده، روش nested PCR در ردیابی بیمارگر کارآمد تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: ردیابی، *Armillaria mellea*، روش‌های کلاسیک، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

---

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

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sharifna@cc.iut.ir

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد، استاد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

مقدمه

بیماری پوسیدگی آرمیلاریایی ریشه و طوقه از بیماری‌های مهم گیاهان چوبی می‌باشد که به‌وسیله برخی گونه‌های *Armillaria* موسوم به قارچ عسلی ایجاد می‌گردد (Behdad 1981, Anonymous 2000). قارچ عسلی دارای انتشار جهانی است و در باغ‌ها و جنگل‌های مناطق معتدل و حاره‌ای در سطح وسیعی یافت می‌شود (Behdad 1981, Schulze & Bahnweg 1998). گونه‌های مختلف این قارچ به صورت بیمارگر و یا گندرو روی دامنه وسیعی از گیاهان میزبان ایجاد آلودگی می‌نمایند (Coetzee *et al.* 2003) که در میان آنها گونه *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer از دیرباز به دلیل بیماری‌زایی شناخته شده است و توانایی ایجاد آلودگی و پوسیدگی ریشه و طوقه را در درختان پهن‌برگ و سوزنی‌برگ، درختچه‌ها و برخی گیاهان علفی دارا می‌باشد (Asef *et al*. 2003, Downer 2004, Lushaj *et al*. 2010).

در مناطقی که جنگل‌ها به باغ تبدیل می‌شوند، آرمیلاریا قادر است در ریشه‌های آلوده زیرزمینی به عنوان یک منبع آلودگی باقی بماند و درختان جدید را آلوده نماید (Baumgartner 2004, Baumgartner & Warnock 2006). براساس گزارش *بهداد* (۱۹۸۱) 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 مؤثری 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 (Downer 2004). 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 (Baumgartner 2004, Baumgartner & Warnock 2006, Baumgartner *et al*. 2010). لذا ردیابی بیمارگر از خاک باغ‌ها، نهالستان‌ها و فضای سبز شهری می‌تواند در پایه‌ریزی یک طرح مدیریتی جهت پیشگیری از آلودگی و کاهش خسارت بیماری نقش مهمی داشته باشد (Guglielmo *et al*. 2007, Nicolotti *et al.* 2009). تاکنون روش‌های متعددی برای ردیابی قارچ‌های خاک زاد استفاده شده‌اند که شامل استفاده از محیط کشت نیمه‌انتخابی، تله‌گذاری، روش‌های سرولوژیکی و روش‌های مولکولی می‌باشند (Bahnweg *et al*. 1998; Singleton *et al.* 1992). با توجه به 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 (Bahnweg *et al*. 1998).

روش‌های مولکولی به‌کار رفته در مورد گونه‌های آرمیلاریا بیشتر در زمینه مطالعات تاکسونومیکی و فیلوژنتیکی بوده است. تنها در یک مورد، روش nested PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی مستقیم گونه‌های آرمیلاریای اروپایی از نمونه‌های خاک به کار رفته است (Lochman *et al*. 2004). هدف از تحقیق حاضر، مقایسه‌ای میان روش‌های مختلف ردیابی *Armillaria mellea* و دستیابی به یک روش ردیابی اختصاصی، حساس و سریع بیمارگر از خاک و طوقه بود.

روش بررسی

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 غیرمثمر چنار نمونه‌برداری به‌عمل آمد. در صورت مشاهده کلاهک‌های دسته‌جمعی 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 C °۸-۶ نگهداری شدند. هم‌چنین از خاک اطراف درختان آلوده و یا خاک باغ‌ها، به صورت تصادفی نمونه‌برداری شد.

جداسازی عامل بیماری

جداسازی قارچ از اندام گیاهی (ریشه و طوقه) آلوده

در این حالت سطح اندام گیاهی مورد نظر توسط پنبه آغشته به اتانول ضدعفونی شده، قسمتی از پوست آن با اسکالپل سترون کنار زده شد و بخشی از پوشش میسلیومی جدا و به محیط کشت BSMA (Benomyl streptomycin malt agar) (به ازای یک لیتر از محیط کشت MEA (۳۰ گرم عصاره مالت به همراه ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب) پس از اتوکلاو و خنک شدن، ۱۴ میلی‌گرم بنومیل و ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین اضافه گردید) (Worrall 1991) منتقل گردید و در C °۲۵ در انکوباتور قرار گرفت.

جداسازی قارچ از اندام بارده

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

تهیه زادمایه

جهت تهیه زادمایه قارچ *A. mellea*، از بذرهای گندم استفاده گردید. قطعاتی از محیط کشت MEA (Malt extract agar) حاوی قارچ *A. mellea* به بذرهای گندم اضافه شد و در انکوباتور در شرایط تاریکی و دمای C ° ۲۵ و به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. این آزمایش با استفاده از دو جدایه انجام گرفت. جدایه اول (IRAN 295C) به‌دست آمده از مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، جدایه‌ای از *A. mellea* بود که پیش از این توسط روش آزمون‌های تلاقی تشخیص داده شده بود. جدایه دوم (A2)، جدایه‌ای از میان نمونه‌های جمع‌آوری شده بود که توسط آزمون مولکولی PCR (جدول ۱) و توالی‌یابی به عنوان *A. mellea* شناسایی شده بود. پس از آماده شدن مایه تلقیح و سترون کردن خاک (به مدت ۴۵ دقیقه در ۱۲۱°C و فشار Psi ۱۵) به میزان سه درصد از مایه تلقیح به خاک گلدان‌ها اضافه شد. 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 (*Pelargonium hortorum*) به عنوان گیاه تله استفاده شد (Robinson-Bax & Fox 2002). 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

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

Table 1. Primers used in detection of *Armillaria. mellea*

نام آغازگر	توالی (5′ ⟶ 3′)
Primer	Sequence (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

زمانی یک ماه کاشته شد. گلدان‌ها در گلخانه قرار گرفت و هر سه تا چهار روز یک بار آبیاری شد. نمونه‌برداری از خاک‌ها در زمان صفر و 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 انجام شد و ردیابی قارچ به‌طور همزمان با استفاده از سه روش استفاده از محیط کشت، تله‌گذاری و آزمون PCR صورت گرفت.

ردیابی با استفاده از محیط‌کشت

جهت تهیه یک محیط‌کشت نیمه انتخابی برای ردیابی قارچ از خاک، محیط کشت مالت آگار (MEA)، در ترکیب با قارچ کش‌های بنومیل (۱۴ میلی‌گرم در لیتر)، کاربندازیم (۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، رورال تی اس (۲۵ و۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، رزبنگال (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و PCNB (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین و کانامایسین (هر کدام۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تهیه گردید و تأثیر جداگانه و همزمان آنها در جداسازی بیمارگر از خاک، مورد آزمون قرار گرفت. جهت انجام این کار، مایه تلقیحی تعدادی از جدایه‌ها به میزان سه درصد به خاک سترون تلقیح شد و پس از یک ماه روی محیط‌های کشت تهیه شده منتقل گردید تا توانایی آنها در جداسازی آرمیلاریا و ممانعت از رشد عوامل گندرو بررسی شود. در نهایت محیط‌کشتی که در جداسازی قارچ بهتر از بقیه عمل نمود، در ردیابی بیمارگر از نمونه‌های خاک و چوب استفاده شد. پس از تعیین مناسب‌ترین محیط کشت، جهت ردیابی بیمارگر از خاک، هر هفت روز یک‌بار نمونه‌برداری از عمق حدود ۱۰- ۵ سانتی‌متری خاک گلدان‌ها صورت گرفت. حدود دو گرم از خاک به روی محیط مذکور پخش شد و مقداری جهت استخراج DNA و آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت. دو گرم از خاک گلدان شاهد نیز در زمان صفر روی محیط کشت قرار گرفت. قطعاتی از نمونه‌های چوب جمع‌آوری شده دارای پوشش میسلیومی سفیدرنگ نیز پس از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت تهیه شده قرار گرفتند.

ردیابی با استفاده از گیاه تله

همان‌طور که در بالا اشاره شد، از میان میزبان‌های علفی شناخته شده برای *A. mellea*، گیاه شمعدانی به عنوان گیاه تله انتخاب شد تا در صورت آلودگی آن توسط قارچ، مدت زمان زنده‌مانی قارچ در خاک، مورد بررسی قرار گیرد.

ردیابی با استفاده از آزمون‌های مولکولی

استخراج DNA از خاک

از خاک گلدان‌هایی که قبلاً با گندم آلوده به قارچ مایه‌زنی 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* (Schena *et al*. 2002) 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 شود. استخراج با سه تکرار از هر خاک به‌صورت زیر انجام شد: مقدار ۰/۵ گرم خاک ،۰/۵ گرم ساچمه شیشه‌ای 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، ۲٪ CTAB) 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 و 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 ۰/۶حجم محلول به آن ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و چندین مرتبه محلول داخل لوله‌ها به آرامی مخلوط شدند و به مدت۲۰–۱۰ دقیقه در فریزر ۲۰°C– 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، به‌طوری‌که 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) خالص‌سازی شد (Schena & Ippolito 2003).

استخراج DNA قارچ از ریشه و چوب آلوده

استخراج DNA قارچ از چوب و ریشه گیاهان آلوده به روش *شنا و ایپولیتو* (Schena & Ippolito 2003) با اندکی تغییرات انجام شد. از چوب ناحیه طوقه و ریشه‌های گیاهان آلوده دارای میسلیوم‌های سفید زیر پوست و ریشه بدون علایم نمونه‌برداری شد و استخراج DNA با سه تکرار از هر نمونه انجام گرفت. ابتدا نمونه‌ها با آب شسته و به اندازه ۴–۳ سانتی‌متر با چاقوی باغبانی بریده و روی کاغذ صافی سترون خشک شدند. سپس ۳ گرم از بافت ریشه در هاون چینی سترون که از قبل در فریزر سرد شده بود، ریخته شد و به کمک نیتروژن مایع پودر گردید. ۰/۱ گرم پودر و هم حجم آن پودر PVP (Polyvinylpyrrolidone) 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، 25 mM EDTA، 200 mM Tris-HCl و 0.5 SDS %) که در حمام آب گرم ۶۵°C 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 C ° ۴ سانتریفوژ شدند. مقدار یک میلی‌لیتر 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 به‌وسیله 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 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 شد. سپس فاز رویی بیرون ریخته شد و لوله‌ها به مدت یک شب به‌صورت 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 قبل از استفاده روی ستون PVPP خالص‌سازی شد (Schena & Ippolito 2003). بدین منظور یک سوراخ کوچک با نوک سوزن در انتهای یک لوله ۰/۵ میلی‌لیتری اپندورف ایجاد شد و یک قطعه ساچمه شیشه‌ای که قبلاً اتوکلاو شده و در بافر TE نگهداری شده بود به داخل لوله اضافه گردید. لوله تا حجم ۲۵۰ میکرولیتر از پودر PVPP پر شد و به داخل لوله دو میلی‌لیتری منتقل گردید. به لوله ۰/۵ میلی‌لیتری به‌ترتیب طی دو مرحله یک بار ۴۰۰ میکرولیتر و مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر آب اضافه گردید و هر مرحله در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس لوله‌های ۰/۵ میلی‌لیتری به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و DNA استخراج شده به آن اضافه گردید. پس از آن، سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه انجام گرفت. لوله‌های ۰/۵ میلی‌لیتری حذف و DNA خالص شده که در داخل لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داشت در C ° ۲۰- جهت انجام واکنش‌های PCR نگهداری شد.

انجام واکنش‌های PCR

در این تحقیق از جفت آغازگر ITS1- for و ITS4- rev برای واکنش PCR (White *et al.* 1990) و از جفت آغازگر AR1-for و AR2 - rev برای Nested PCR (Lochman *et al.* 2004) استفاده گردید (جدول۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ X)، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۲میلی مول از مخلوط dNTPs، ۲۰ نانو مول 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 واسرشته‌سازی اولیه در دمای C°۹۴ به مدت ۲/۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل C°۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، C°۵۵ به مدت ۴۰ ثانیه و C°۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. در پایان یک مرحله گسترش نهایی در C ° ۷۲ 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 میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۱ میلی‌مول از مخلوط dNTPs، ۰/۵ میکرومول 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 واسرشته‌سازی 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 TBE 1X با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز گردید.

تعیین توالی نمونه ردیابی شده

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

نتایج و بحث

تهیه محیط کشت نیمه انتخابی

جهت دستیابی به یک محیط کشت نیمه انتخابی برای جداسازی بیمارگر از خاک و اندام آلوده گیاهی، سموم قارچ‌کش و آنتی بیوتیک‌های مختلف مورد آزمون قرار گرفتند. در نهایت محیط کشت BSMA+ PP شامل مالت آگار به همراه بنومیل، استرپتومایسین، پنی سیلین و PCNB در رشد آرمیلاریا و ممانعت از رشد عوامل گندرو، بهتر از بقیه عمل نمود و مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت مذکور به نوعی معادل با محیط کشت BDS شامل بنومیل، دیکلران، استرپتومایسین بود که پیش از این توسط *ورال* (Worrall 1991) معرفی شده بود و به دلیل منسوخ شدن دیکلران، از PCNB در آن استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد درحالتی‌که به همراه نمونه خاک تلقیحی، مایه تلقیح (گندم آلوده به بیمارگر) نیز حضور داشت، بیمارگر از گندم آلوده به قارچ، روی محیط کشت رشد نمود و در صورت عدم حضور مایه تلقیح به همراه خاک مایه‌زنی شده روی محیط کشت، رشد بیمارگر و ردیابی آن امکان‌پذیر نبود. این امر نشان‌دهنده این نکته است که میسلیوم‌ها و ریزومورف‌های *A. mellea* در داخل خاک به میزان زیادی رشد نمی‌کنند و عموماً به‌طور متمرکز در محل آلودگی باقی می‌مانند (Volk & Burdsall 1995, Downer 2004).

ردیابی قارچ *A. mellea* از خاک و چوب آلوده روی محیط کشت نیمه انتخابی

در ردیابی بیمارگر از نمونه‌های خاک تلقیح شده، مدت زمان لازم برای رشد و تشخیص بیمارگر روی محیط کشت نیمه انتخابی BSMA+ PP، هفت تا ده روز بود. بیمارگر تا روز

۱۴ در جدایه شاهد (IRAN 295C) و تا یک ماه در جدایه A2 قابل ردیابی بود و پس از آن به دلیل شدت آلودگی قارچی و باکتریایی، ردیابی بیمارگر امکان پذیر نشد (شکل ۱). بنابراین محیط کشت BSMA+ PP توانایی ردیابی بیمارگر را در دراز مدت نداشت. از هفت گروه خاک طبیعی جمع‌آوری شده از کنار طوقه درختان آلوده، دو گرم خاک روی محیط کشت انتقال یافت و تا مدت یک ماه مورد بررسی قرار گرفت، ولی بیمارگر قادر به رشد نبود و ردیابی آن با این روش ممکن نگردید. هم‌چنین در کشت نمونه‌های چوب، به دلیل رشد سریع باکتری‌های گندرو، ردیابی بیمارگر با استفاده از محیط کشت امکان‌پذیر نبود.

ردیابی بیمارگر با استفاده از گیاه تله

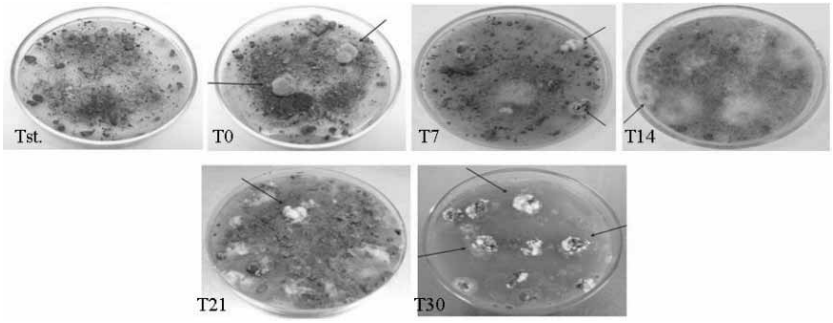
در ردیابی *A. mellea* با استفاده از قلمه‌های شمعدانی، نشانه‌هایی از پوشش سفید رنگ جدایه A2 پس از ۳۰ روز روی ریشه و طوقه گیاه شمعدانی مشاهده گردید (شکل ۲). اما هیچ نشانه‌ای مبنی بر آلودگی توسط جدایه Iran 295C روی شمعدانی‌ها دیده نشد. در مواردی نیز مرگ شمعدانی‌ها مشاهده گردید، ولی قارچ جدا شده از آنها آرمیلاریا نبود و عامل دیگری موجب مرگ آنها شده بود. برای اطمینان از آلودگی شمعدانی توسط آرمیلاریا، از آزمون nested PCR استفاده شد (شکل ۶). بنابراین به نظر می‌رسد روش تله‌گذاری علاوه بر اینکه به زمان طولانی جهت ردیابی بیمارگر از خاک نیاز دارد، نتایج حاصل از آن نیز به تنهایی نمی‌تواند اطمینان بخش باشد و لازم است با آزمون PCR مورد ارزیابی قرار گیرد.

ردیابی بیمارگر از خاک مایه‌زنی شده با استفاده از Nested PCR

DNA استخراج شده از نمونه‌های خاک، پس از خالص‌سازی روی ستون PVPP به‌طور مستقیم در واکنش PCR با جفت آغازگر ITS1/ITS4 استفاده گردید. در این مرحله هیچ باند DNA روی ژل آگارز دیده نشد. بنابراین فرآورده آن بدون رقیق‌سازی، وارد واکنش nested PCR با جفت آغازگر AR1/AR2 گردید و یک قطعه با اندازه تقریبی ۷۲۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۳ و ۴). نتایج حاصل در این مرحله با نتایج به‌دست آمده توسط *لاک من و همکاران* (Lochman *et al*. 2004) که تکثیر یک قطعه ۷۲۴-۶۹۰ جفت بازی را در گونه‌های *Armillaria* گزارش نموده بود، مطابقت داشت.

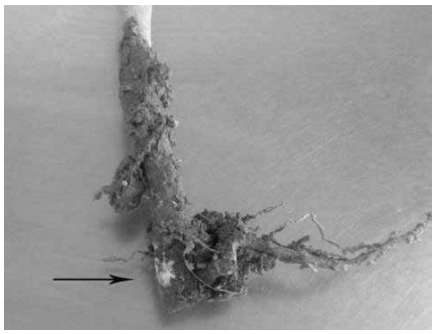
ردیابی بیمارگر از خاک باغ و نهالستان با استفاده از Nested PCR

استخراج DNA از ۲۰ نمونه خاک جمع‌آوری 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 خالص‌سازی به‌طور مستقیم وارد واکنش PCR با جفت آغازگر ITS1/ITS4 گردید و سپس فرآورده واکنش بدون رقیق‌سازی به عنوان رشته الگو در nested PCR با جفت آغازگر اختصاصی AR1/AR2 مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۵). همان‌گونه‌که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد، در ۱۵ نمونه از ۲۰ نمونه خاک جمع‌آوری 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 نمونه‌های ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰ مربوط به یک باغ در خمینی شهر می‌باشند. از سه نمونه اول که از کنار طوقه درختان جمع‌آوری شده‌اند، بیمارگر ردیابی شد، ولی در نمونه ۲۰ که نمونه‌برداری از سه منطقه باغ به‌طور تصادفی و از کنار



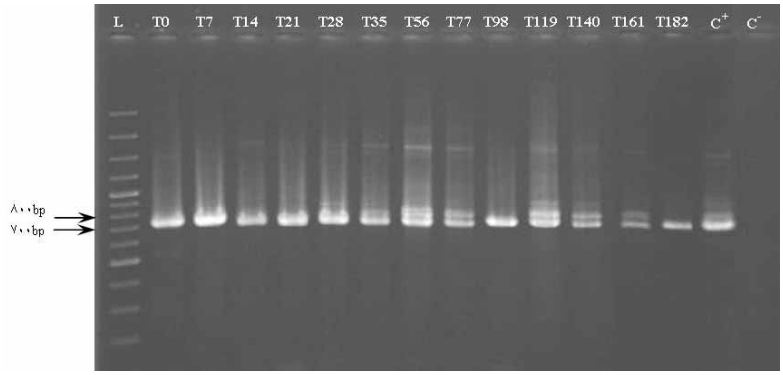
شکل۱. ردیابی بیمارگر با استفاده از محیط کشت نیمه انتخابی BSMA+ PP. بالا از چپ به راست: خاک سترون (شاهد)، ردیابی در زمان صفر، هفت و ۱۴ روز پس از مایه‌زنی در جدایه IRAN 295C. پایین: ردیابی جدایه A2 ، ۲۱ و ۳۰ روز پس از مایه‌زنی به خاک

Fig. 1. Pathogen detection with semi-selective medium BSMA+ PP. Top from left to right: Sterile soil (Control), detection in 0, 7 and 14 days after soil inoculation in isolate IRAN 295C. Down: Detection of isolate A2 in 21 and 30 days after soil inoculation.



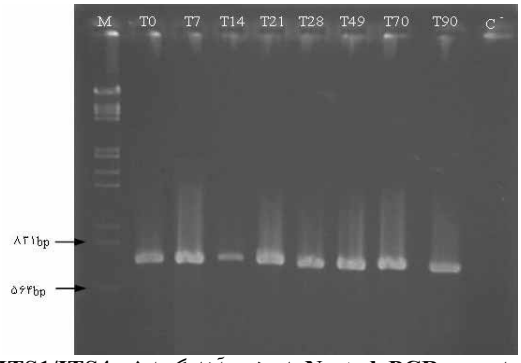
شکل ۲. پوشش میسلیومی *Armillaria mellea* روی ریشه و طوقه شمعدانی

Fig. 2. Mycelial fan of *Armillaria mellea* on geranium root and crown.



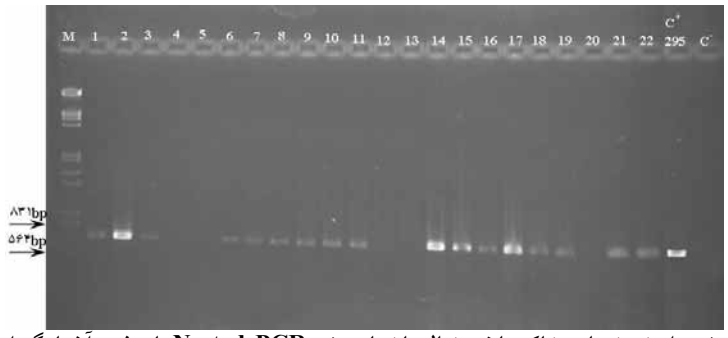
شکل۳. الگوی باندی DNA تکثیر شده با روش Nested PCR با جفت آغازگر اولیه ITS1/ITS4 و جفت آغـازگر ثانویـه AR1/AR2 از نمونه‌های خاک مایه‌زنی شده بـا جدایـه *Armillaria mellea* (IRAN 295C). (L: نـشانگر ۱۰۰bp DNA Ladder plus، Tn: نمونه‌های خاک در زمان‌های مختلف برحسب روز پس از تلقیح، C^+: شاهد مثبت جدایه IRAN 295C، C^-: نمونه خاک شاهد).

Fig. 3. Amplified DNA pattern using universal primers ITS1/ITS4 and specific primers AR1/AR2 in nested PCR from inoculated soil samples with isolate *Armillaria mellea* (IRAN 295C). (L: 100 bp DNA Ladder plus, Tn: Soil samples in different days after inoculation, C^+: Positive DNA control, C^-: Sterile soil as negative control).



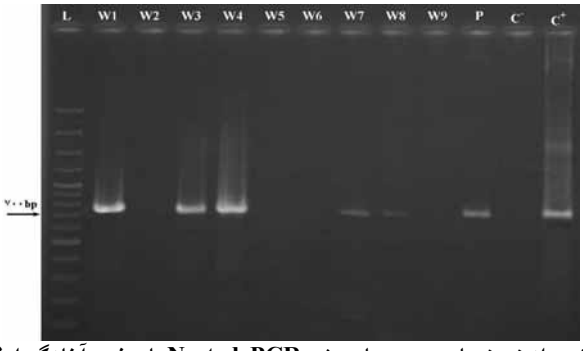
شکل ۴. الگوی باندی DNA تکثیر شده با روش Nested PCR با جفت آغازگر اولیه ITS1/ITS4 و جفت آغازگر ثانویه AR1/AR2 از نمونه‌های خاک مایه‌زنی شده با جدایه *Armillaria mellea* (A2). (M: نشانگر III ، Tn: نمونه‌های خاک در زمان‌های مختلف برحسب روز، C^-: نمونه خاک شاهد).

Fig. 4. Amplified DNA Pattern using universal primers ITS1/ITS4 and specific primers AR1/AR2 in nested PCR from inoculated soil samples with isolate *Armillaria mellea* (A2). (M: Molecular marker III, Tn: Soil samples in different days after inoculation, C^-: Sterile soil as negative control).



شکل ۵. الگوی DNA تکثیر شده 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).

Fig. 5. Amplified DNA pattern using universal primers ITS1/ITS4 and specific primers AR1/AR2 in nested PCR from garden and nursery soil samples (M: Molecular marker III, C^+: Positive DNA control, C^- : Water as negative control).



شکل ۶. الگوی باندی DNA تکثیر شده از نمونه‌های چوب با روش Nested PCR با جفت آغازگر اولیه ITS1/ITS4 و جفت آغازگر ثانویه AR1/AR2 (L: نشانگر ۱۰۰bp DNA Ladder plus، W_{1-9}: نمونه‌های چوب، P: نمونه ریشه و طوقه شمعدانی، C^+: شاهد مثبت جدایه *Armillaria mellea* (IRAN 295C)، C^-: ریشه شمعدانی سالم).

Fig. 6. Amplified DNA pattern using universal primers ITS1/ITS4 and specific primers AR1/AR2 in nested PCR from wood samples (L: 100 bp DNA Ladder plus, W_{1-9}: Wood samples, C^+: Positive DNA control *Armillaria mellea* (IRAN 295C), C^-: Geranium healthy root).

طوقه درختان است، بیمارگر با روش nested PCR ردیابی نشد. این امر می‌تواند 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 تأثیرگذار است و در نمونه‌برداری از خاک، درصورتی‌که میزان مایه آلودگی از حد معینی کاهش یابد، روش حاضر قادر به ردیابی آن نخواهد بود. دوم آن‌که میسلیوم‌های *A. mellea* عمدتاً در زیر پوست درخت و ریزومورف‌های آن در خاک نزدیک به درخت باقی می‌مانند (Volk & Burdsall 1995, Downer 2004). لذا بهتر است نمونه‌ها از خاک نزدیک به درختان انتخاب شوند و به‌صورت جداگانه مورد آزمون قرار گیرند. در تحقیق انجام شده توسط *لاک من 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 جمع‌آوری شده از نزدیکی درختان و کنده‌ها در جنگل که پیش از این کلاهک‌های آرمیلاریا در آنجا مشاهده شده بود، موفق به ردیابی بیمارگر شدند. نمونه‌های ۲۱ و ۲۲ مربوط به دو نهالستان می‌باشند که بیمارگر در آنها ردیابی شد. این امر نشان‌دهنده امکان حضور بیماری پوسیدگی ریشه آرمیلاریایی در نهالستان‌ها و اهمیت ردیابی و مدیریت این بیماری در این مناطق می‌باشد.

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

استخراج DNA از چوب ناحیه طوقه درختان (جدول ۲) و نیز ریشه و طوقه شمعدانی دارای میسلیوم سفید و ریشه فاقد علایم صورت گرفت. ماده DNA استخراج شده، پس از خالص‌سازی روی ستون PVPP به‌طور 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 رقیق‌سازی، وارد واکنش nested PCR با جفت آغازگر AR1/AR2 گردید. نتایج حاصل در شکل ۶ نشان داده شده است. 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. این درحالی است که بیمارگر در نمونه‌های خاک مربوط به آنها ردیابی شد (شکل ۵). 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 بگیرد.

نتایج توالی‌یابی 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 نرم‌افزار BLAST (www.NCBI.nlm.nih.gov) با اطلاعات موجود در GenBank مقایسه شدند. همردیف‌سازی دوتایی توالی تکثیر یافته با توالی موجود در GenBank جدایه *A. mellea* (شماره دسترسی AF163583.1) با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN انجام شد. نتایج حاصل از همردیف‌سازی، 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 ۷). براساس این نتایج قطعه تکثیر یافته از DNA استخراج شده از خاک مربوط به *A. mellea* می‌باشد و تأییدی بر صحت ردیابی بیمارگر از خاک است.

جدول۲. مشخصات نمونه‌های چوب جمع‌آوری شده از ناحیه طوقه درختان آلوده به *Armillaria mellea*

Table 2. Characteristics of wood samples collected from crown infected by *Armillaria mellea*.

نمونه چوب Wood sample	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9
میزبان	گلابی	گلابی	آلو برغانی	آلو برغانی	زالزالک	گلابی	آلبالو	گلابی	گلابی
Host	*Pyrus communis*	*Pyrus communis*	*Prunus domestica*	*Prunus domestica*	*Crataegus azarolus*	*Pyrus communis*	*Cerasus vulgaris*	*Pyrus communis*	*Pyrus communis*

شکل ۷. نتایج همردیف‌سازی بخشی از توالی نوکلئوتیدی قطعه bp ۷۰۰ قارچ *Armillaria mellea* ردیابی شده از خاک با توالی جدایه *A. mellea* ثبت شده در پایگاه BLAST. علامت فلش جایگاه نوکلئوتید متفاوت را نشان می‌دهد.

Fig. 7. Pairwise alignment of nucleotide sequences of 700 bp band in *Armillaria mellea* detected from soil with *A. mellea* registered in GenBank. The arrow shows different nucleotide site.

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 معنا داری نداشت و از این رو اختصاصی بودن این آغازگرها برای *Armillaria* spp. مورد تأیید قرار گرفت. پیش از این نیز *لاک من 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 را که عموماً در خاک یافت می‌شوند، به عنوان شاهد منفی در آزمون PCR مورد استفاده قرار دادند. قطعه مربوط به ناحیه ITS در این قارچ‌ها تکثیر یافت، اما در nested PCR هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد که نشان‌دهنده اختصاصی بودن آغازگرهای مزبور برای گونه‌های *Armillaria* بود.

مقایسه روش‌های ردیابی قارچ *A. mellea* از خاک و چوب

به منظور ردیابی بیمارگر از ناحیه طوقه درختان، از روش

جداسازی میسلیوم از چوب روی محیط کشت BSMA و روش nested PCR استفاده شد. از بین این دو روش، روش اول به دلیل شدت آلودگی باکتریایی، برای جداسازی مناسب تشخیص داده نشد؛ اما روش nested PCR قادر به ردیابی و تشخیص آلودگی در مدت زمان اندکی بود. هم‌چنین این روش مولکولی به دلیل حساسیت و اختصاصیت بالا قادر به تشخیص قارچ آرمیلاریا از سایر قارچ‌های عامل پوسیدگی می‌باشد. برای ردیابی بیمارگر از خاک، از سه روش کشت مستقیم خاک روی محیط کشت BSMA+PP، روش تله‌گذاری و روش nested PCR استفاده گردید. روش کشت خاک روی محیط کشت برای ردیابی بیمارگر مناسب تشخیص داده نشد. روش تله‌گذاری نیز موفقیت چندانی در ردیابی بیمارگر نداشت و به مدت زمان طولانی نیاز داشت؛ ولی روش nested PCR به دلیل حساسیت بالا در ردیابی مقادیر اندک مایه آلودگی در خاک، به خوبی عمل نمود، هر چند این روش درباره زنده بودن یا نبودن بیمارگر در خاک، اطلاعاتی را در اختیار ما نمی‌گذارد.

به‌طورکلی در انتخاب یک آزمون تشخیصی برای ردیابی یک بیمارگر باید ساده بودن، صرفه‌جویی در وقت و هزینه، حساسیت و اختصاصی بودن آن را مدنظر قرار داد. روش‌های تلقیحی، استفاده از گیاهان تله و محیط کشت که برای دیگر عوامل بیماری‌زای ریشه‌ای مانند *Phytophthora*، *Pythium* و *Rhizoctonia* به کار رفته‌اند (Singleton *et al.* 1992)، کمک به فهم و مطالعه بیشتر بیماری‌های ناشی از آنها نموده‌اند، اما چنین پیشرفت‌هایی برای *A. mellea* با توجه به خصوصیات کشتی و بیولوژی این قارچ، هنوز حاصل نشده‌اند. علاوه بر آن موانع متعددی نیز در برابر تحقیقات گلخانه‌ای در مورد بیماری پوسیدگی آرمیلاریایی ریشه وجود دارد. یکی از این موانع، آلودگی آهسته و نامطمئن گیاهان در گلخانه است. در آزمون‌های آلودگی موجود، آلودگی قابل ردیابی براساس محیط کشت ۱۲-۴ ماه پس از تلقیح اتفاق می‌افتد و در این مدت غالباً زادمایه تلقیحی، خشک شده، از بین می‌رود. از سویی ظهور علایم و مرگ و میر نیز به ندرت روی می‌دهند و برای تشخیص وجود یا عدم وجود آلودگی، باید از روش محیط کشت یا آزمون PCR استفاده نمود. این موانع، ردیابی بیمارگر و نیز مقایسه بیماری‌زایی گونه‌ها و یا جدایه‌ها را با مشکل مواجه می‌سازند (Baumgartner *et al.* 2010). روش استفاده از محیط کشت نیز برای گونه‌های تولیدکننده اسپور در خاک و با توانایی رشد گندرویی بالا، مناسب می‌باشد، ولی برای گونه‌هایی که به شکل میسلیوم در خاک وجود دارند و یا خاک‌های دارای آلودگی ضعیف مناسب نیست. لذا بازیدیومیست‌های گندرو به ندرت از خاک جداسازی شده‌اند. تلاش‌هایی برای تهیه محیط‌های کشت انتخابی برای بازیدیومیست‌های گندرو براساس بازدارنده‌های انتخابی و بسترهای پیچیده که به‌طور اختصاصی توسط موجودات هدف تجزیه می‌شوند، صورت گرفته است؛ ولی به نظر می‌رسد در جداسازی *Armillaria* spp. کارایی چندانی نداشته‌اند (Thorn *et al.* 1996).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (82-81) متن انگلیسی مراجعه شود.