بأسمه تعالی

دانشگاه زابل

مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

صفحه الف

این پایان‌نامه با عنوان: « **برآورد کمی *Verticillium dahliae* درزیتون های آلوده و ارزیابی مقاومت به بیماری با استفاده از تکنیک Real- time PCR** » قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی‌ارشد رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیماری شناسی گیاهی توسط دانشجو سحر خان‌محمدی تحت راهنمایی اساتید پایان‌نامه آقای دکتر محمد سالاری و آقای دکتر حسین جعفری تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل مجاز است.

امضاء دانشجو

این پایان‌نامه ۶ واحد درسی شناخته می‌شود و در تاریخ ۸۸/۱۱/۷ توسط هیئت داوران بررسی و نمره ۱۹/۷۵ و درجه عالی به آن تعلق گرفت.

نام و نام خانوادگی	امضاء	تاریخ
۱– استاد راهنمای اول: دکتر محمد سالاری		۸۸/۱۱/۷
۲– استاد راهنمای دوم: دکتر حسین جعفری		۸۸/۱۱/۷
۳– استاد مشاور اول: دکتر ناصر پنجه که		۸۸/۱۱/۷
۴– استاد مشاور دوم: مهندس سیده مهری جوادی		۸۸/۱۱/۷
۵– استاد داور: دکتر سید کاظم صباغ		۸۸/۱۱/۷
۶– نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر سلطان رون		۸۸/۱۱/۷
۷– مدیر گروه: دکتر محمد سالاری		۸۸/۱۱/۷

تحصیلات تکمیلی دانشگاه
دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد (M.Sc) در رشته بیماری شناسی گیاهی

برآورد کمی *Verticillium dahliae* در زیتون‌های آلوده و ارزیابی مقاومت به بیماری با استفاده از تکنیک Real- time PCR

استادان راهنما
دکتر محمد سالاری
دکتر حسین جعفری

استادان مشاور
دکتر ناصر پنجه‌که
مهندس سیده مهری جوادی

نگارش
سحر خان‌محمدی

بهمن‌ماه ۱۳۸۸

تقدیم به

پدر مهربان و مادر فداکارم

ستارگان درخشنده و هدایتگر آسمان زندگیم

که همواره سختی های طاقت فرسای آنرا آسان نمودند

امید که همیشه تابنده باد

و همسر عزیزم

به پاس بردباری، تشویق و همکاریهای بی دریغش

تقدیر و تشکر

سپاس بی کران یگانه خالقم را که مرا به رفیع ترین روشنایی ها هدایت کرد و راهم را به نور همیشه فروزان دانش روشن ساخت. پس از در بندگی خاضعانه ستایشش می کنم و در ادامه این راه معرفت نفس خویش را از او طلب می نمایم.

در مسیر که برگزیدم همسفرانی راهبرم بودند که حضورشان همچون ستارگانی پرنور فروزنده راهم بود و از اینرو بر خود واجب می دانم مراتب بی پایان سپاس و تقدیرم را نثارشان نمایم. بیش از همه استادان راهنمایم جناب آقای **دکتر محمد سالاری** و جناب آقای **دکتر حسین جعفری** که هدایت ها و راهنمایی هایشان چراغی شد فرا رویم که تا پایان راه روشنگر لحظه هایم خواهد بود و اگر رهنمود ها و هدایت هایشان نبود بی شک طی این مسیر پر مشکل و چه بسا ناممکن می گردید. صبر، سعه صدر و نیک اندیشی ایشان درس هایی است که هرگز از یاد نخواهم برد.

تقدیر و سپاس نثار استادان مشاورم جناب آقای **دکتر ناصر بچه کی** و خانم **مهندس سیده مهری جوادی** دستیاران بزرگی که مصاحبت و مشورت با ایشان را مایه فخر خویش می دانم و شاگردی در مکتب ایشان افتخاری است که به آن می بالم. از داور گرامی جناب آقای **دکتر کاظم صباغ** که زحمت باز خوانی پایان نامه را قبل از ارائه تقبل نمودند و بار همنودهای ارزشمندشان مرا در ارائه مطالب یاری کردند سپاسگزارم و از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای **دکتر سلطان رون** نیز تشکر می کنم. از کلیه اساتید و کارمندان گروه گیاهپزشکی دانشگاه زابل برای همکاری ها و محبتی که نسبت به اینجانب نمودند قدردانی می نمایم. از جناب آقای دکتر رستگار ریاست محترم اداره غذا و دارو کشور و آقایان مهندس سید حسین کاظمی، محمود ملکی و خانم مهندس ندا جوادیان و کلیه کارمندان بخش تحقیقات گیاهپزشکی زنجان به پاس همکاری های بی دریغشان تشکر می نمایم. همچنین از خانواده ارجمندم به ویژه پدر و مادر مهربانم و همسر عزیزم به واسطه تشویق ها و حمایت های بی پایان شان که برای من در وادی دانش اندوزی همدل و همراه همیشگی بودند، سپاس گزاری می نمایم و از خداوند همیشه سلامتی و سربلندی شان را طلب می کنم. در پایان از خانمها مهندس ندا اسد فلسفی ، مهندس فاطمه یار دهنوی ، مهندس فاطمه خدادادی و کلیه دوستان و عزیزانی که مرا در انجام این پایان نامه یاری نموده اند تقدیر و تشکر می نمایم.

سحر خان محمدی

بهمن ۸۸

برآورد کمی *Verticillium dahliae* درزیتون‌های آلوده و ارزیابی مقاومت به بیماری با استفاده از تکنیک Real- time PCR

چکیده

پژمردگی ورتیسلیومی یکی از بیماری‌های مهم زیتون است که باعث تخریب سیستم آوندی و در نهایت مرگ گیاه می‌شود. استفاده از ارقام مقاوم یکی از مؤثرترین روش‌های کنترل بیماری محسوب می‌شود. دراین بررسی ابتدا از زیتون‌های آلوده منطقه طارم در استان زنجان نمونه برداری صورت گرفت. پس از ضدعفونی سطحی، قطعات نمونه برداری شده بر روی محیط کشت‌های عمومی PDA و اختصاصی Czapec dox agar دردمای ۲۴°C و شرایط تاریکی در انکوباتورکشت داده شدند. پس از جدا سازی قارچ با استفاده از روش‌های استاندارد تک اسپور کردن عمل خالص سازی در محیط آب آگار انجام گرفت. استخراج DNA از ورتیسلیوم رشد یافته بر روی محیط مایع PDB انجام شد و نوع پاتوتیپ قارچ عامل بیماری‌زا در منطقه با استفاده از تکنیک Nested-PCR و آغازگرهای اختصاصی نوع D تعیین گردید. در ادامه نهال‌های پنج ماهه ارقام زرد (بومی طارم)، آربیکن، آبلونکا و کرونایکی موجود در ایستگاه تحقیقات زیتون طارم برای ارزیابی کمی قارچ عامل بیماری و تعیین میزان حساسیت یا مقاومت آنها نسبت به بیماری با سوسپانسیون 10^7 قارچ عامل بیماری به روش Root dip تلقیح گردیدند. تعدادی از قلمه‌ها به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. استخراج DNA از ریشه نهال‌های تلقیح شده و شاهد که در فواصل زمانی معین نمونه برداری شده بودند انجام گرفت. روند افزایش تدریجی میزان DNA قارچ موجود در نهال‌ها با استفاده از تکنیک Real- time PCR و به کارگیری سیستم Sybr Green همراه با آغازگرهای اختصاصی کمیت سنجی گردید. پس از جداسازی قارچ عامل بیماری از درختان آلوده، نتایج بررسی‌ها نشان داد که ارقام زرد، آربیکن و آبلونکا با توجه به بالا بودن غلظت DNA قارچ در کل DNA استخراج شده در فواصل زمانی معین بعد از تلقیح به ترتیب حساسیت بیشتری نسبت به رقم کرونایکی در برابر بیماری دارند و رقم کرونایکی تا حدودی در برابر بیماری مقاوم بود. همچنین نتایج حاصله نشان داد که Real-time PCR تکنیک مناسبی برای ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف زیتون نسبت به بیماری پژمردگی ورتیسلیومی است که می‌تواند در کنار روش‌های معمول برای غربالگری ارقام مقاوم به بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی : *Verticillium dahliae*، مقاومت، Real – time PCR، زیتون

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول_ مقدمه

۱- مقدمه ۲

۲-۱- تاریخچه کاشت زیتون درجهان و ایران ۲

۳-۱- سطح زیر کشت و میزان تولید زیتون در ایران و جهان ۲

۴-۱- اهمیت اقتصادی محصولات زیتون ۳

۵-۱- بیماری پژمردگی ورتیسلیومی زیتون ۳

۱-۵-۱- علایم بیماری ۵

۲-۵-۱- چرخه عامل بیماری ۵

۳-۵-۱- دامنه میزبانی ورتیسلیوم و کنترل بیماری ۵

۶-۱- هدف بررسی ۷

فصل دوم- مروری بر تحقیقات انجام شده

۱-۲- مقدمه ۹

۲ -۲- روش‌های معمول شناسایی قارچ *Verticillium dahliae* و ارزیابی مقاومت به بیماری ۹

۳-۲- روش‌های مولکولی ۱۳

۱-۳-۲- بررسی تکنیک‌های DNA در بیماری شناسی گیاهی ۱۳

۲-۳-۲- نشانگرهای ملکولی مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) ۱۳

۱- ۲-۳-۲- مزایای روش PCR ۱۴

۲-۲-۳-۲- معایب روش PCR ۱۴

۳- ۳-۲- تکنیک‌های انگشت نگاری ۱۶

۴-۳-۲- توصیف روش Nested-PCR ۱۷

۴-۲- مبانی Real-time PCR ۱۸

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۱-۴-۲- مزایای تکنیک Real-time PCR ۱۹

۲- ۴-۲- الگوی غیر اختصاصی ۲۰

۱-۲-۴-۲- تجزیه منحنی ذوب ۲۱

۳- ۴-۲- الگوی اختصاصی ۲۲

۴- ۴-۲- مهمترین کاربردهای Real-time PCR ۲۳

۱-۴-۴-۲- کمیت سنجی مطلق ۲۳

۲-۴-۴-۲- فازهای تکثیر ۲۳

۳-۴-۴-۲-سیکل آستانه ۲۳

۴-۴-۴-۲-منحنی استاندارد ۲۴

۵ -۴-۲- ارزیابی کیفی قارچ‌ها ۲۵

۶- ۴-۲- ارزیابی کمی قارچ‌ها ۲۶

۷-۴-۲- کمیت سنجی DNA قارچ در بافت میزبان ۲۷

فصل سوم- مواد و روش ها

۱-۳- نمونه برداری ۳۰

۲-۳- جداسازی قارچ از گیاه ۳۰

۱-۲-۳- طرز تهیه محیط کشت Czapec dox agar ۳۰

۳-۳- خالص سازی قارچ ۳۱

۴-۳- آزمون بیماری زایی ۳۱

۱-۴-۳- جداسازی قارچ *Verticillium dahliae* از گیاهان تلقیح شده ۳۳

۵-۳- تهیه بافرها و مواد استخراج DNA و کاربرد آنها ۳۳

۶-۳- آماده سازی قارچ جهت استخراج DNA ۳۵

۷-۳- روش استخراج DNA از محیط مایع Potato dextrose broth ۳۶

۸-۳- استخراج DNA کل از ریشه‌های آلوده زیتون به وتیسلیوم ۳۷

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۳-۹- کمیت سنجی DNA توسط اسپکتروفتومتر ۳۹

۳-۱۰- کیفیت سنجی DNA روی ژل آگارز ۴۰

۳-۱۰-۱- مواد تشکیل دهنده بافر بارگذاری ۴۱

۳-۱۰-۲- تهیه ژل آگارز ۱٪ ۴۱

۳-۱۰-۳- طرز تهیه بافر TBE۱۰ X ۴۱

۳-۱۱- انجام واکنش‌های Nested-PCR ۴۲

۳-۱۱-۱- آغازگرها و سایر مواد مورد استفاده درآزمون Nested-PCR ۴۲

۳-۱۱-۲- برنامه حرارتی به کار رفته در تکنیک Nested-PCR ۴۴

۳-۱۱-۳- الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده در آزمون Nested-PCR ۴۴

۳-۱۱-۴- انجام واکنش Nested-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پاتوتیپ نوع ND ۴۵

۳-۱۲- انجام واکنش‌های Real-time PCR ۴۶

۳-۱۲- ۱- توصیف سیستم SYBR Green I Dye ۴۶

۳-۱۲- ۲- الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده در آزمون Real-time PCR ۴۷

۳-۱۲- ۳- رسم منحنی استاندارد ۴۸

فصل چهارم- نتایج

۴- ۱- قارچ جداسازی شده از بافت آلوده ۵۰

۴-۲- شناسایی و مشخصات گونه *Verticillium dahliae* ۵۰

۴-۳- قارچ *Verticillium dahliae* جداسازی شده از گیاهان تلقیح شده ۵۲

۴-۴- نتایج DNA استخراج شده از ورتیسلیوم کشت داده شده در محیط کشت Potato dextrose broth ۵۳

۴-۵- شناسایی نوع پاتوتیپ *Verticillium dahliae* با استفاده از واکنش PCR ۵۵

۴-۶- شناسایی نوع پاتوتیپ *Verticillium dahliae* در گیاه در طول دوره زمانی مشخص با استفاده از تکنیک Nested-PCR ۵۷

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۴-۷- توسعه علایم پژمردگی ورتیسلیومی در ژنوتیپ‌های زیتون ۵۹

۴-۸- بررسی نتایج واکنش‌های Real-time PCR برای کمیت‌سنجی *Verticillium dahliae* درزیتون‌های آلوده ۶۰

۴-۸-۱- ارزیابی منحنی استاندارد ۶۰

۴-۸-۲- استفاده از سیستم SYBR Green در واکنش Real-time PCR برای تکثیر نمونه‌ها ۶۳

۴-۹- بررسی نتایج واکنش‌های کمیت سنجی Real-time PCR برای تعیین مقاومت ارقام مختلف به *Verticillium dahliae* ۶۶

فصل پنجم – بحث و پیشنهادات

۵-بحث ۷۲

پیشنهادات ۷۸

فهرست منابع ۷۹

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول۱-۳- توالی آغازگرهای اختصاصی پاتوتیپ D مورد استفاده در آزمون Nested-PCR ۴۲

جدول۲-۳- اجزا و میزان مواد مورد نیاز برای آزمون Nested–PCR ۴۲

جدول۳-۳- اجزا و میزان مواد مورد نیاز برای Nested-PCR با استفاده از کیت ۴۳

جدول ۴-۳- توالی آغازگرهای اختصاصی پاتوتیپ ND مورد استفاده در آزمونNested-PCR ۴۶

جدول۵-۳- مقدار مواد استفاده شده برای هر واکنش در سیستم SYBR Green I Dye ۴۶

جدول۶-۳- برنامه حرارتی به کار رفته در سیستم SYBR Green I Dye ۴۷

جدول۱-۴- تعیین غلظت نمونه‌های ناشناخته در سیستم SYBR Green I به روش منحنی استاندارد..... ۶۲

فهرست شکل‌ها و نمودارها

عنوان صفحه

شکل۱-۲- نحوه عمل SYBR Green I به عنوان عامل اتصال شونده به DNA ۲۲
شکل ۲-۲- سیکل آستانه و ارتباط آن با میزان الگوی اولیه ۲۴
شکل ۱-۴- کلنی ورتیسلیوم رشد یافته بر روی محیط کشت‌هایPotato dextrose agar و Czapec dox agar۵۱
شکل ۲-۴- تصویر کنیدی‌بر، فیالیدها و کنیدی‌های قارچ ورتیسلیوم رؤیت شده زیر میکروسکوپ ۵۲
شکل ۳-۴-تصویر میکرواسکلروت تشکیل یافته بعد از یک ماه در زیر میکروسکوپ ۵۲
شکل۴-۴- ورتیسلیوم رشد یافته بر روی رقم زرد آلوده شده بعد از گذشت ۱۵ روز از زمان تلقیح ۵۳
شکل ۵-۴- DNA ژنومی استخراج شده از ورتیسلیوم خالص بر روی آگارز ۱٪ پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم . ۵۴
شکل ۶-۴- DNA استخراج شده از بافت ریشه آلوده بر روی آگارز ۱٪ پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید . ۵۵
شکل۷-۴- شناسایی نوع پاتوتیپ *Verticillium dahliae* ۵۶
شکل۸-۴- آنالیز Nested-PCR با استفاده از نمونه‌های DNA ریشه چهار زیتون رقم ۲۴ روز بعد از تلقیح..۵۸
شکل ۹-۴- منحنی استاندارد ۶۲
شکل ۱۰-۴- منحنی تکثیر ۶۵
شکل ۱۱-۴- نمودار مشتق منحنی تکثیر ۶۵
شکل۱۲-۴- منحنی دمای ذوب نمونه‌های آلوده شده با *Verticillium dahliae* ۶۵
شکل ۱۳-۴- الکتروفورز محصولات تکثیر شده در سیستم Real–Time PCR ۶۵
نمودار ۱-۴- نتایج حاصل از کمیت سنجی DNA ورتیسلیوم در ریشه آلوده رقم کروناکی ۶۶
نمودار ۲-۴- نتایج حاصل از کمیت سنجی DNA ورتیسلیوم در ریشه آلوده رقم آبلونکا ۶۷
نمودار ۳-۴- نتایج حاصل از کمیت سنجی DNA ورتیسلیوم در ریشه آلوده رقم آربیکن ۶۸
نمودار ۲-۴- نتایج حاصل از کمیت سنجی DNA ورتیسلیوم در ریشه آلوده رقم زرد ۶۹
نمودار ۳-۴- نتایج حاصل از کمیت سنجی DNA ورتیسلیوم در ریشه آلوده چهار رقم زیتون ۷۰

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

زیتون با نام علمی *Olea europaea L.* تنها گونه خوراکی خانواده *Oleaceae* است که همراه با گندم و انگور یکی از پایه‌ها و ستون‌های کشاورزی حوزه مدیترانه را در طول قرنها تشکیل داده است (درویشیان، ۱۳۷٦). در قرآن مجید به این گیاه مقدس سوگند یاد شده است در موارد متعدد (سوره تین آیه ۱/٤، مؤمنون ۲۰، انعام ۹۹/۱٤۱) از آن یاد شده است.

۱-۲- تاریخچه کاشت زیتون درجهان و ایران

سابقه کاشت زیتون به ۳۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح بر می‌گردد. مبدأ آن سوریه است که تدریجاً به کشورهای اطراف دریای مدیترانه انتقال یافته و در آن مناطق سازگاری پیدا کرده است (طباطبایی، ۱۳۷٤). در ایران نیز زیتون از زمان‌های دور وجود داشته است. بعضی نویسندگان آن را مربوط به دوره‌ای می‌دانند که امپراطوری ایران تا سواحل دریای مریترانه گسترش داشته است. عده‌ای نیز معتقدند که این درخت به هنگام تسلط و نفوذ یونانیان (سلوکیه) در ایران گسترش داده شده است. در برخی از منابع، تاریخ ورود زیتون به شمال کشور ۹۰۰ سال قبل تخمین زده شده است (میرنظامی ضیابری، ۱۳۷۷).

۱-۳- سطح زیر کشت و میزان تولید زیتون در ایران و جهان

طبق آمار نامه FAO جمع کل درختان زیتون در دنیا در سال ۲۰۰۰، ۸۵۰ میلیون اصله و سطح زیر کشت آن ۱۰/۵میلیون هکتار است. در این میان اسپانیا بزرگترین تولید کننده و صادر کننده زیتون (۳۳٪) می‌باشد و سپس ترکیه (۱٤٪)، آمریکا (۱۱٪)، مراکش (۹٪)، سوریه (۷/٦) و ایتالیا (۷٪) در مقام‌های بعدی قرار می گیرند. طبق آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۸٤ بیش از ۹٤۰۰۰ هکتار از

اراضی کشور زیر کشت زیتون قرارگرفته که ۷۱۰۰۰ هکتار از آن زیر کشت نهال و مابقی، درخت بارور می‌باشد که نشان دهنده توسعه روز افزون کشت این محصول است. شهرستان طارم با در اختیار داشتن ۹۲۱۲ هکتار باغات و متوسط عملکرد۳۹۰۰ کیلوگرم در هر هکتار به عنوان تنها شهرستان تولید کننده این محصول در استان زنجان به شمار می رود که رتبه اول در تولید زیتون کشور را داراست (آمار نامه کشاورزی، ۱۳۸٤).

٤-۱- اهمیت اقتصادی محصولات زیتون

عموماً از زیتون دو فرآورده اصلی روغن زیتون و زیتون کنسروی تهیه می‌شود (میرمنصوری، ۱۳٦٦). روغن زیتون نسبت به سایر روغن‌های گیاهی از نظر سلامت اهمیت زیادی دارد (Rallo *et al*., 2000) و در برابر بیماری‌های قلبی و سرطان محافظت کننده است که این ناشی از نوع اسید چرب و مقدار کمی از مواد متشکله فنولیک است (Luaces *et al*., 2005). چوب درخت زیتون به دلیل نقش‌های زیبا و استحکام زیاد برای ساخت وسایل تزئینی و تهیه روکش‌های لوکس کاربرد فراوانی دارد (طباطبائی، ۱۳۷٤). برگ زیتون دارای ۹٪ پروتئین است که علوفه خوبی برای دامها محسوب می‌شود. این میوه ارزشمند دارای چربی و مواد معدنی گوناگون نظیر فسفر، پتاسیم، گوگرد، منیزیم، کلسیم، ویتامین‌های گوناگون و به خصوص کاروتن می باشد (میرنظامی ضیابری،۱۳۷۷).

٥-۱- بیماری پژمردگی ورتیسلیومی زیتون

عامل پژمردگی ورتیسلیومی زیتون *Verticillium dahliae* می‌باشد که اولین بار توسط Ruggieri (۱۹٤٦) در ایتالیا توصیف شده است (Lachqure and Sedra, 2002). گونه‌هایی از جنس *Verticillium* که دارای تولید مثل جنسی شناخته شده هستند متعلق به شاخه Ascomycota، رده Sordoriomycete و راسته Phyllachorales می‌باشند (Fradin and Thomma., 2006). گونه فوق فاقد مرحله تولید مثل جنسی شناخته شده است و شناسایی آن در حد زیرگونه، نژاد، فرم مخصوص یا پاتوتیپ انجام می‌گیرد

(Lachqure and Sedra, 2002). این قارچ میسلیوم‌های بی رنگ خوابیده بر سطح محیط کشت تولید می-کند که با گذشت زمان به شکل پنبه ای ظریف و سفید در می‌آید بعد از یک هفته کرم رنگ شده و به تدریج که میکرواسکلروت تیره رنگ و جدار ضخیم قارچ تشکیل می‌شود رنگ پرگنه به تیرگی تمایل پیدا می‌کند (اشکان،۱۳۸۱). کنیدی‌ها یک سلولی و تخم مرغی شکل، دوک مانند یا کروی بی‌رنگ بوده و به صورت منفرد یا مجتمع در انتهای فیالیدهای مجتمع تشکیل می‌گردند (الهی نیا، ۱۳۸۳). کنیدیوفورها عمودی، جداگانه و شاخه شاخه هستند و تعداد کمی از شاخه‌ها به صورت مارپیچی درآمده‌اند. انتهای فیالیدها معمولاً فلاسکی شکل بوده و در نوک نقطه مانند است (Issak, 1967).

جدایه‌های *V. dahlia* از نظر مورفولوژی و بیماری زایی نیز تنوع نشان داده‌اند. بر اساس تفاوت بیماری‌زایی بین ایزوله‌های *V. dahlia* در پنبه، این قارچ به دو دسته برگریز(D^1) و غیر برگریز (ND^2) طبقه‌بندی شد (P´erez-Art´es *et al.*, 2000). شدت بیماری‌زایی با پاتوتیپ D خطرناکتر از پاتوتیپ ND است و حتی احتمال مرگ برای گیاهان آلوده شده با این نوع پاتوتیپ وجود دارد (Mercado- 2002 Blanco *et al.*,).

در ایران نیز این بیماری به علت توسعه زیتونکاری در خاکهای آلوده و همچنین تهیه قلمه‌های آلوده رو به گسترش است. به طوریکه موارد متعددی از آلودگی درختان در منطقه طارم (استان زنجان) و استان گلستان مشاهد شده است (صانعی و همکاران،۱۳۸۳). آلودگی درختان زیتون به این بیماری برای اولین بار در ایران توسط (رهنما و همکاران، ۱۹۹۸) در استان گلستان و در درختان موجود در ایستگاه تحقیقات هاشم آباد گرگان مشاهده شد.

1Defoliation

2 Nondefoliation

۱-۵-۱-علایم بیماری

گونه‌های ورتیسلیوم با تولید آنزیم‌های پکتولیتیک دیواره سلولی را تجزیه کرده و باعث نکروزه شدن گیاه و بروز علایم پژمردگی آوندی می‌شوند (Fradin and Thomma, 2006). از علایم بیماری پژمردگی ورتیسلیومی شامل پژمردگی، کلروز، کوتولگی، نکروز و زردی رگبرگ‌ها است (Gayoso and Pomar, 2007). در برخی ازموارد، برگهای پژمرده، ترد و شکننده و پیچیده روی شاخه‌های پژمرده و جوان باقی می‌مانند. استرس خشکی و پیرشدگی طبیعی علائم را توسعه می‌دهد (الهی نیا، ۱۳۸۳).

۲-۵-۱- چرخه عامل بیماری

این قارچ بیماری تک چرخه‌ای ایجاد می‌کند که پیشرفت و توسعه بیماری توسط آن در دمای ۲۱ تا C ۲۷° اتفاق می‌افتد (الهی نیا، ۱۳۸۳).هر میکرواسکلروت به عنوان منبع مهم مایه تلقیح توانایی جوانه‌زنی دارد. قارچ در مرحله پارازیتی نوک ریشه را آلوده می‌کند و در حین حرکت به بافت آوند چوبی از آندودرم به عنوان یک سد فیزیکی در مقابل آلودگی عبور کرده سپس وارد بافت آوندی می‌شوند یعنی جایی که کنیدی‌ها جوانه می‌زنند و اسپورز زایی برای سیکل دیگر بیماری اتفاق می‌افتد. در طول نکروزه شدن بافت یا پیر شدن گیاه قارچ وارد مرحله ساپروفیتی شده و صرفنظر از بافت‌های آوندی، ریشه‌های گیاه نیز مسدود می‌شوند. در این مرحله قارچ *V. dahliae* مقدار بسیار زیادی از میکرواسکلروت‌ها را تولید خواهد کرد که در خاک جا گرفته و مواد گیاهی را از بین می‌برند (Fradin and Thomma, 2006).

۳-۵-۱- دامنه میزبانی ورتیسلیوم وکنترل بیماری

قارچ *V. dahliae* ویژگی پلی فاژی بسیار بالایی دارد و باعث پژمردگی در بسیاری از گیاهان مانند بادمجان، پنبه، سیب زمینی، زیتون، هلو و رز در سراسر جهان می‌شود (P´erez-Art´es *et al*, 2005). راهی برای کنترل مطلوب *V. dahliae* فراهم نشده است زیرا این پاتوژن یک اندام استراحتی چند سلولی و دارای ملانین به نام میکرواسکلروت تولید می‌کند که در خاک برای چندین سال حضور دارد (Kabir *et*

Conway *et al*., 2004). به این ترتیب تناوب زراعی برای کنترل اینچنین قارچ‌هایی غیرکارآمد است (1983). سموم شیمیایی تأثیر مطلوبی ندارد و به علت آسیب به محیط و سلامت عمومی محدود شده‌اند (Rodríguez *et al*, 2008). سایر روشهای کنترل مثل ضدعفونی خاک گران بوده و همیشه در دسترس نیستند (Schena *et al*, 2004). بنابراین، بیشتر روش‌های کنترلی برای مغلوب ساختن ورتیسلیوم در زیتون روی کاشت ارقام متمرکز شده است (Rodríguez *et al*, 2008). با این حال مراحل جداسازی قارچ عامل بیماری از گیاه و نیز ارزیابی مقاومت ارقام به بیماری از دشواری و پیچیدگی بالایی برخوردار بوده وکارایی این روش، که معمولاً در شرایط گلخانه یا باغ با تلقیح قارچ و مشاهده علائم انجام می‌شود اغلب تحت تأثیر روش‌های تلقیح و شرایط جغرافیایی است (Cristinzio *et al*., 1994). با توجه به معایب روش‌های متداول قدیمی تکنیک‌های مولکولی مختلف با سرعت ودقت بالا در شناسایی، کشف، توصیف و کمیت سنجی قارچ‌های خاکزاد پاتوژن گیاهی گسترش یافته‌اند مانند واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز PCR[1] برای شناسایی پاتوژن قارچی در بافت گیاهی آلوده، تشخیص آلودگی‌های مختلط، کنترل توسعه قارچ در میزبان، انجام کمیت سنجی‌های توده زنده قارچ در گیاه و تخمین مایه تلقیح در خاک به کار می-رود (Bridge and Arora, 1998).

در حال حاضر تکنیک مولکولی Real – time PCR برای کشف و کمیت سنجی *Verticillium dahliae* بدون نیاز به محیط کشت با حساسیت بالا رایج شده است (Hietala *et al*., 2003). تکنولوژی Real – time PCR این امکان را می‌دهد که بتوان به طور همزمان DNA قارچ و گیاه میزبان را کمیت سنجی کرد و بدین ترتیب به جای ارزیابی روند توسعه بیماری در ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از

1 Polymerase chain reaction

علائم بیماری، می‌توان میزان DNA قارچ بیمارگر در نمونه گیاهی و میزان احاطه شدن بافت گیاه با بیمارگر را مشخص نمود (Gayoso and Pomar, 2007).

٦-١- هدف بررسی

۱. جداسازی قارچ *V.dahliae* از زیتون‌های آلوده منطقه طارم و شناسایی سریع و دقیق نوع پاتوتیپ آن با استفاده از تکنیک Nested-PCR بدون نیاز به انجام مراحل کشت و خالص سازی قارچ عامل بیماری

۲. انجام آزمون بیماری زایی بر روی قلمه‌ها در گلخانه و مشاهده شدت بیماری زایی به منظور مقایسه نتایج با داده‌های حاصل از روش‌های مولکولی

۳. ارایه روشی برای ارزیابی مقاومت یا حساسیت ارقام مختلف زیتون با استفاده از کمیت سنجی DNA قارچ در طول دوره زمانی معین به وسیله Real – time PCR و معرفی ارقام مقاوم برای کاشت در قلمستان‌های تازه تأسیس

فصل دوم

مروری بر تحقیقات انجام شده