ردیابی و شناسایی *Phytophthora drechsleri* از خاک، آب و بافت آلوده درختان پسته با استفاده از روش PCR

صغری درودی[۱]، حسین علایی*[۲]، روح اله صابری ریسه[۲] و محمد گرجی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۵

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاک‌زاد پسته به‌شمار می‌رود. از این رو تشخیص به موقع بیمارگر نقش مهمی در مدیریت مؤثر این بیماری دارد. به همین منظور شناسایی و ردیابی مولکولی *Phytophthora drechsleri* از آب، خاک و بافت آلوده بر اساس تکثیر قطعه‌ی اختصاصی از ناحیه rDNA-ITS با استفاده از آغازگر اختصاصی DF2/DR2 انجام گرفت. طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۹۰، تعداد ۴۶ جدایه *P. drechsleri* و ۱۷ جدایه *Phytophthora citrophthora* جداسازی و شناسایی گردید. حساسیت و اختصاصیت جفت آغازگر به ترتیب با استفاده از ۱۵ جدایه *P. drechsleri* و ۲۵ جدایه از سایر گونه‌های *Phytophthora* و همچنین قارچ‌های خاک‌زاد پسته بررسی شد. نتایج نشان داد که این جفت آغازگر قادر به تکثیر اختصاصی قطعه ۵۶۷ جفت بازی از ژنوم دی.ان.ای بیمارگر می‌باشد درحالی‌که هیچ باندی همراه با دی.ان.ای سایر گونه‌های قارچی خاک‌زاد تکثیر نشد. حساسیت جفت آغازگر، در ردیابی بیمارگر با استفاده از PCR معمولی، ۱۰۰پیکوگرم از دی.ان.ای خالص بیمارگر بود. جفت آغازگر قادر به ردیابی مستقیم 17×10^{3} زئوسپور در هر میلی‌لیتر (تعداد ۸۵ زئوسپور) و تکثیر باند ۵۶۷ جفت بازی با دی.ان.ای استخراج شده از نمونه خاک آلوده بود. ردیابی مستقیم بیمارگر از بافت آلوده پسته به‌علت حضور مواد بازدارنده امکان‌پذیر نشد بدین منظور ردیابی بیمارگر به روش تله با استفاده از میوه سیب سه روز پس از مایه‌زنی مصنوعی با بافت و خاک آلوده پسته انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، این روش ردیابی بیمارگر، به دلیل حساسیت، اختصاصی بودن و سرعت بالا به عنوان مناسب‌ترین روش جهت ردیابی *P. drechsleri* از نمونه‌های خاک و آب تشخیص داده شد که می‌تواند کمکی برای تشخیص بیماری به عنوان بخشی از راهکار کنترل این بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج)رفسنجان، ایران
[۲] دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج)رفسنجان، ایران
[۳] مدیریت حفظ نباتات،جهادکشاورزی شهرستان انار، ایران
* نویسنده مسئول: (hossein.alaei@vru.ac.ir)

واژگان کلیدی: پسته، پوسیدگی ریشه و طوقه، ردیابی، *Phytophthora drechsleri* ، *Phytophthora citrophthora*

مقدمه

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاک‌برد پسته به‌شمار می‌رود. نشانه‌های بیماری انگومک یا گموز پسته در ایران اولین بار از استان کرمان گزارش شد. تاکنون گونه‌های مختلفی از جنس *Phytophthora* شامل *Phytophthora megasperma*، *P. drechsleri*، *P. citrophthora*، *P. nicotianae* و *P. cryptogea* از مناطق پسته‌کاری کشور گزارش شده است (۲، ۳، ۴، ۵، ۷، ۸، ۱۰، ۱۳، ۳۵). استفاده از روش‌های کلاسیک جهت ردیابی و شناسایی عامل بیماری شامل استفاده از محیط کشت انتخابی، روش تله و استفاده از کشت خالص و بررسی‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژی، نیازمند نیروی متخصص با تجربه بوده و مستلزم صرف زمان و دستیابی به مقدار کافی نمونه می‌باشد. به‌منظور بهبود بخشیدن کارایی و صحت تشخیص بیمارگر، استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر اسید نوکلئیک به‌خصوص PCR به‌طور گسترده رو به افزایش است (۳۷). ردیابی اامیست‌ها از بافت گیاهی به‌خصوص در مواردی که هنوز نشانه‌های بیماری ظاهر نشده است و سطح آلودگی گیاه یا گسترش عامل بیماری محدود است مشکل می‌باشد. در این موارد نیاز به کاربرد روش‌های خیلی حساس و اختصاصی است تا حضور دیگر قارچ‌ها موجب بروز واکنش غیر اختصاصی نگردد. نخستین بار تشخیص *Phytophthora* در سطح گونه با استفاده از شناساگر اختصاص گونه‌ای دی.ان.ای برای تشخیص *P. nicotianae* استفاده شد (۲۲،۲۱). شناسایی گونه‌هایی از *Phytophthora* با استفاده از ترادف‌های نوکلئوتیدی اختصاصی از دی.ان.ای توسط ارسک[1] و همکاران (۲۰) توصیف گردید. آغازگرهای این گروه، جدایه‌های *P. citrophthora* و *P. nicotianae* را به‌طور اختصاصی تشخیص می‌دادند، و ترادف‌های انتخاب شده جهت تکثیر با PCR نامعین بوده و ممکن بود در همه جدایه‌های یک گونه وجود نداشته و ناپایدار باشند. لیو[2] و همکاران (۳۰) با استفاده از بخشی از ترادف نوکلئوتیدی و تکنیک PCR روشی جهت تشخیص اختصاصی *P. medicaginis* ارائه کردند. ردیابی *P. citrophthora* و *P. nicotianae* در خاک و همچنین ریشه مرکبات و به‌وسیله‌ی Nested PCR انجام شده است (۲۴). برای تشخیص اختصاصی دو گونه‌ی اصلی عامل انگومک پسته از روش PCR بر اساس توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS1 و ITS2 نواحی rRNA استفاده شده است. در این مورد هضم آنزیمی قطعه‌ی حاصل از PCR در جدایه‌های پسته با اندونوکلئاز *Bsl1* به دو قطعه‌ی ۳۷۰ و ۳۱۰ جفت بازی برش داده شده است که این محل برش به طور اختصاصی در جدایه‌های *P. megasperma* از پسته انجام شده است (۳۳). با

[1] Ersek
[2] Liew

توجه به خسارت بالای بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه پسته در نهالستان و باغ و لزوم پیش آگاهی از وضعیت آلودگی خاک و آب قبل از احداث باغ و نهالستان، هدف از این تحقیق دستیابی به یک روش ردیابی اختصاصی، حساس و سریع بیمارگر از خاک، آب و بافت‌های آلوده بود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی عامل بیماری

نمونه‌برداری در بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ و از مناطق مشکوک آلوده به گموز پسته در شهرستان‌های رفسنجان و انار که دارای پوسیدگی در ناحیه ریشه و طوقه، ضعف اندام‌های هوایی و حالت سبز خشک بودن برگ‌ها بودند به‌صورت تصادفی انجام شد. جداسازی عامل بیمارگر مورد نظر از خاک اطراف تنه درختان آلوده طبق روش بنی‌هاشمی (۱۳) و به‌صورت تله‌گذاری با برگ مرکبات انجام گردید. برای جداسازی عامل بیماری از بافت آلوده درختان نیز از محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP، استفاده گردید (۲۶).

شناسایی جدایه‌ها بر اساس صفات ریخت‌شناسی

خالص‌سازی جدایه‌های *Phytophthora* به روش نوک ریسه[1] (۴۰) انجام شد. شناسایی جدایه‌ها بر اساس شکل ظاهری اسپورانژیوم، تولید اُاُسپور، شکل پرگنه، تورم ریسه، تولید یا عدم تولید کلامیدوسپور و دماهای کمینه، بهینه و بیشینه رشد انجام گردید. به‌منظور تعیین دامنه حرارتی رشد جدایه‌ها، به میزان رشد آن‌ها روی محیط CMA در دماهای ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۷ درجه سلسیوس مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷ و ۳۶) برای تولید اُاُسپور نیز از محیط کشت مایع لوبیا[2] استفاده شد (۱).

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میوه سیب و نهال پسته

بدین منظور میوه‌های سیب که از لحاظ شکل و اندازه نسبتاً مشابه بودند انتخاب و پس از ضدعفونی سطحی، قطعاتی به ابعاد ۵×۵ و عمق سه میلی‌متر از نسوج آن‌ها برداشته شد و به جای آن قطعه‌ای از محیط کشت CMA حاوی میسیلیوم‌های جوان سه روزه در محل مورد نظر قرار گرفت، قسمت برداشته شده بعد از عمل مایه‌زنی مجدداً در محل اولیه قرار داده شدند، میوه‌های مایه‌زنی شده در داخل دسیکاتور و دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس قرار داده

[1] Hyphal tip
[2] Lima Bean Broth

شدند. بعد از گذشت یک هفته بافت‌های تغییر رنگ یافته روی محیط کشت CMA کشت و نفوذ عامل بیماری در سطح میوه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۴۰، ۹).

مایه‌زنی نهال‌های سه ماهه پسته رقم بادامی ریز زرند با استفاده از مایه تلقیح جدایه‌های اامیست *P. drechsleri* و *P.citrophthora*، در شرایط گلخانه انجام شد. بدین منظور خاک سطحی گلدان‌ها برداشته شد و تعداد ۳۰ عدد شاهدانه کلونیزه شده با جدایه‌های مورد نظر از کشت‌های ۴۸ ساعته (۳ گرم مایه تلقیح به ازای هر کیلوگرم خاک گلدان) در ناحیه اطراف ریشه نهال‌های پسته قرار گرفت و مجدداً با همان خاک پوشانده شد و رطوبت نسبی اطراف نهال‌ها با کشیدن سلوفون اطراف نهال‌ها حدود ۹۰ درصد فراهم شد (۱۵).

شناسایی مولکولی بیمارگر غالب

تهیه توده میسیلیومی: توده میسیلیومی جدایه‌ها در محیط کشت مایع ذرت[1] (عصاره ۴۰ گرم ذرت خرد شده که به مدت یک ساعت جوشیده به حجم یک لیتر رسانده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجـه سلسیـوس و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند) تهیه شد. برای این کار یک تا دو قرص میسیلیومی (به قطر شش میلی‌متر) از حاشیه پرگنه‌های سه روزه بر روی محیط کشت CMA، به فلاسک‌های حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر از محیط سترون شده CMB منتقل گردید. فلاسک‌ها به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجـه سلسیـوس و بر روی شیکر با rpm ۲۰۰، قرار داده شدند و در مرحه‌ی بعد میسیلیوم‌های به‌دست آمده با rpm ۵۰۰۰ به مدت سه دقیقه سانتریفوژ و پس از حذف مایع رویی با آب مقطر سترون دو بار شستشو داده شدند و تا زمان استخراج دی.ان.ای در دمای ۸۰- درجـه سلسیـوس نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج دی.ان.ای از میسیلیوم‌های تولید شده به روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) دو درصد طبق روش تغییر یافته موری و تامپسون (۳۹) انجام شد. برای استخراج دی.ان.ای، نیم گرم از میسیلیوم هر جدایه مورد نظر با استفاده از نیتروژن مایع کاملاً پودر گردید، سپس ۴۵۰ میکرولیتر از بافر استخراج (۵۰ میلی‌مولار تریس‌اسید کلریدریک، pH ۸ ، ۱/۴ مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ مولار Na-EDTA، یک درصد حجمی مرکاپتواتانول و دو درصد CTAB) به میسیلیوم پودر شده اضافه گردید. سوسپانسیون به‌دست آمده به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجـه سلسیـوس نگهداری شدند. در این مدت لوله‌ها چند بار تکان

[1] Corn Meal Broth

داده شدند و سپس ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوآمیل‌الکل (v/v ۱:۲۴) به سوسپانسیون حاصل اضافه و بعد از چند دقیقه ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰rpm در دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی (حاوی دی.ان.ای) با نمونه بردار برداشته شد و به لوله جدید منتقل گردید. در مرحله‌ی بعد ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد و ۱۰ دقیقه در یخ قرار داده شد، سپس لوله‌ها به مدت پنج دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند و بعد از حذف فاز رویی ۲۰۰ میکرولیتر اتانول سرد ۷۰ درصد به رسوب حاصل که حاوی دی.ان.ای است اضافه و به مدت یک دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید با حذف مایع رویی، رسوب دی.ان.ای در دمای اتاق خشک گردید. دی.ان.ای حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی‌مولار تریس‌اسید کلریدریک، pH ۸ ، ۱۰ میلی‌مولار Na-EDTA یک میلی-مولار و کلرید سدیم یک مولار) حل گردید و به مدت یک شب در دمای یخچال و سپس تا انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد.

تکثیر دی.ان.ای با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

برای اطمینان از درستی شناسایی گونه‌ی غالب بیماری‌زای پوسیدگی طوقه و ریشه پسته که بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی *P. drechsleri* تشخیص داده شده بود، تکثیر ناحیه rDNA-ITS با استفاده از آغازگرهای اختصاصی DF2/DR2 (۳۲) با اندکی تغییر انجام شد. بدین منظور ۱۰ جدایه از *P. drechsleri* انتخاب گردید آغازگرها با ترادف نوکلئوتیدی DF2 (3'-CTCTATCATGGCGACCGCC-5') و DR2 (5'-CACCAGTCCATCCCGCCG-3') توسط شرکت SPL کره جنوبی تهیه گردید. مخلوط هر واکنش (۵۰ میکرولیتر) شامل بافر PCR (۱۰ mM تریس‌اسیدکلریدریک و ۵۰ mM کلرید پتاسیم pH ۹)، ۰/۲ mM از هر dNTP، ۰/۲ µM از هر آغازگر، ۲/۵ mM از $MgCl_2$ و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به همراه مقدار پنج میکرولیتر از دی.ان.ای استخراج شده بود. آب دو بار تقطیر سترون به‌عنوان کنترل منفی به جای دی.ان.ای مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر ناحیه ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر C-1000 (Bio-Rad) و با برنامه حرارتی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، ۶۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه (۳۴) و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. درجه حرارت دستگاه پس از انجام واکنش بر روی درجه حرارت ۴ درجه سلسیوس برای مدت نامحدود به‌منظور جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول PCR تنظیم گردید. محصول حاصل از واکنش PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در دستگاه الکتروفورز (Bio-Rad) با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شد. برای محاسبه اندازه قطعات دی.ان.ای تکثیر شده از نشانگر استاندارد ۱۰۰bp استفاده

گردید. نقوش الکتروفورزی حاصل زیر نور UV مشاهده گردید و نتایج به‌دست آمده توسط دستگاه Gel Documentation (Uvidoc) عکس‌برداری و ثبت شد.

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از کیت the Axygene® PCR purification (Roche Molecular Biochemicals) بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت خالص‌سازی شد. تعیین توالی محصول PCR توسط شرکت Macrogen (کره‌جنوبی) در هر دو جهت انجام شد. اطلاعات مربوط به توالی توسط نرم افزار Chromas 1.45 (Conor McCarty, 1996-1998) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. توالی دی.ان.ای‌های به‌دست آمده در این مطالعه در بانک ژن قرار داده شد و با توالی‌های یکسان ثبت شده با استفاده از دستورالعمل (standard nucleotide BLAST protocol (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مقایسه شدند.

ردیابی مولکولی بیمارگر با استفاده از PCR معمولی

- بررسی حساسیت و اختصاصیت آغازگرها

برای تعیین حساسیت آغازگرهای اختصاصی DF2/DR2 در ردیابی *P. drechsleri*، سری رقت‌های ۱۰ برابر از دی.ان.ای خالص این اومیست با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم تا یک پیکوگرم تهیه گردید و برای PCR معمولی مورد استفاده قرار گرفت. غلظت دی.ان.ای به کمک نانودراپ اندازه‌گیری گردید، آب دو بار تقطیر سترون به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. واکنش و برنامه‌ی حرارتی PCR به روش شرح داده شده در بالا مورد استفاده قرار گرفت. برای ایجاد اطمینان از اختصاصی بودن و عدم تشابه آغازگرهای مورد استفاده با توالی‌های دیگر موجود در بانک ژن توالی آغازگرها ابتدا با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. علاوه بر آن واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌منظور بررسی عدم ایجاد باند بین آغازگرها (DF2/DR2) و گونه‌های دیگر فیتوفتورا (*P. citrophthora, P. melonis*، *P. cactorum* و *P. citricola*) و عوامل بیماری‌زای ساکن در خاک شامل *Fusarium solani*، *Fusarium oxysporum* , *Rhizoctonia solani*، *Verticillium albo-atrum* و *P. aphanidermatum* مورد بررسی قرار گرفتند.

-ردیابی بیمارگر از خاک و آب آلوده

ردیابی بیمارگر از خاک به دو روش مستقیم و غیر مستقیم انجام شد. در روش غیر مستقیم ابتدا بیمارگر از خاک به روش طعمه‌گذاری (۱۳) جداسازی و سپس استخراج دی.ان.ای صورت می‌گیرد ولی در روش مستقیم، کل دی.ان.ای موجود در خاک از سلول‌های زنده و سلول‌های مرده موجود در خاک استخراج می‌شود. اغلب به دلیل مقدار بیشتر دی.ان.ای استخراج شده در روش مستقیم نسبت به روش غیر مستقیم، از روش مستقیم برای استخراج دی.ان.ای از خاک استفاده می‌شود (۱۸). استخراج دی.ان.ای از خاکی که به‌طور مصنوعی آلوده به *P. drechsleri* بود

با استفاده از روش شرح داده شده توسط کاجیاما و همکاران (۲۸) با اندکی تغییر انجام گرفت. در ابتدا به‌منظور کاهش اثر هومیک خاک در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آمونیوم آلومینیوم سولفات، هومیک حذف و به‌منظور حذف این ماده نیز، تغییر اسیدیته (قلیایی) خاک انجام گرفت. در مرحله بعد به‌منظور استخراج دی.ان.ای ابتدا ۰/۱ گرم خاک آلوده به کمک نیتروژن مایع به مدت پنج دقیقه کاملاً پودر گردید. در مرحله بعد ۲۵۰ میکرولیتر بافر استخراج (۱۰۰ mM تریس‌اسید کلریدریک، ۴۰ mM EDTA، ۲٪ SDS، ۰/۸٪ Skim milk و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر RNase) به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها با شدت به مدت یک دقیقه ورتکس شدند. لوله‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجـه سلسیـوس قرار گرفتند. ۱۵۰ میکرولیتر استات سدیم به سوسپانسیون اضافه و مخلوط به آرامی ورتکس گردید. نمونه‌ها ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند سپس با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ فاز رویی به لوله جدید منتقل گردید، این مرحله دو بار دیگر نیز تکرار شد. سپس ایزوپروپانول هم حجم با سوسپانسیون به لوله اضافه شد. دی.ان.ای رسوب و در نهایت رسوب با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد. رسوب دی.ان.ای در معرض هوا خشک و در بافر TE (۱۰۰ mM تریس‌اسید کلریدریک pH ۷.۵، EDTA۱ mM) حل گردید. به‌منظور کاهش اثر بازدارنده‌های PCR (ترکیبات فنولی، اسید هومیک و فلزات سنگین) که در ضمن استخراج از خاک جداسازی می‌شوند دی.ان.ای جدا شده با آب دو بار تقطیر سترون ۱۰۰ برابر رقیق گردید.

در روش ردیابی از آب ابتدا گلدان‌های آلوده به *P. drechsleri* به‌مدت ۲۴ ساعت در حالت اشباع قرار گرفتند و در روز بعد (پس از آبیاری مجدد) آب خارج شده از ته گلدان‌ها جمع‌آوری گردید و مقدار یک میلی‌لیتر از آب در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به‌منظور استخراج دی.ان.ای مورد استفاده قرار گرفت. استخراج دی.ان.ای به روش CTAB صورت گرفت. در روش ردیابی با PCR معمولی در یک روش آب آلوده مستقیماً در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت و در روش دیگر دی.ان.ای استخراج شده از آب آلوده به *P. drechsleri* در واکنش PCR به کار گرفته شد. واکنش و برنامه‌ی حرارتی PCR به روش شرح داده شده در بالا مورد استفاده قرار گرفت.

ردیابی زئوسپور

برای تهیه سوسپانسیون زئوسپور، ابتدا ۵۰ عدد بذر شاهدانه به مدت ۲۰ دقیقه در آب مقطر جوشانده شد و پس از خشک شدن، روی پرگنه سه روزه *P. drechsleri* روی محیط CMA قرار داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجـه سلسیـوس بذرهای کلونیزه شده به یک تشتک پتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل و به مدت دو تا سه روز در زیر نور فلورسنت قرار گرفتند. پس از تشکیل زئوسپورانژیوم حاوی زئوسپور، سوسپانسیون

حاصل از پارچه ململ عبور داده شد و سوسپانسیون حاصل به کمک لام هموسایتومتر[1] تعیین غلظت گردید. برای ردیابی زئوسپور رقت‌های ۱۰ برابر از سوسپانسیون زئوسپور از $۱۰^{۳}$ ×۱۷ تا ۱۷ زئوسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد از تمام رقت‌های تهیه شده دی.ان.ای به روش CTAB دو درصد به روش شرح داده شده استخراج گردید. در واکنش PCR معمولی از سوسپانسیون زئوسپور به طور مستقیم و یا دی.ان.ای استخراج شده از سوسپانسیون زئوسپور در رقت‌های مختلف به طور غیرمستقیم استفاده شد واکنش و برنامه‌ی حرارتی PCR به روش شرح داده شده در بالا مورد استفاده قرار گرفت.

ردیابی بیمارگر از بافت آلوده گیاه

ردیابی مستقیم بیمارگر از بافت آلوده پسته به‌علت حضور مواد بازدارنده امکان‌پذیر نشد. بدین منظور ردیابی بیمارگر به روش تله با استفاده از میوه سیب پس از سه روز مایه‌زنی مصنوعی با بافت و خاک آلوده پسته انجام گرفت. واکنش و برنامه‌ی حرارتی PCR به روش شرح داده شده در بالا مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی عامل بیماری

در این پژوهش، ۶۳ جدایه *Phytophthora* شامل گونه‌های *P. drechsleri* و *P. citrophthora* از خاک اطراف طوقه درختان آلوده جداسازی و شناسایی گردید که ۴۶ جدایه *P. drechsleri* و ۱۷جدایه نیز *P.citrophthora* بود (جدول ۱). در مطالعه‌ای که توسط بنی‌هاشمی و مرادی (۶) در رفسنجان انجام شد ۶۵ جدایه *Phytophthora* از طوقه و ریشه درختان پسته و همچنین آب و خاک جداسازی گردید که ۴۳ جدایه به عنوان *P. drechsleri* شناسایی گردید. در حالی‌که اشکان و همکاران فراوانی و پراکندگی گونه‌های فیتوفتورا را در رفسنجان و سیرجان بررسی کردند و گونه‌های جداسازی شده را به ترتیب فراوانی *P. megasperma*، *P. drechsleri* و *P. cryptogea* گزارش کردند (۲). صابری ریسه و همکاران (۴۱) *P. drechsleri* را به‌عنوان گونه‌ی غالب در مناطق مختلف رفسنجان معرفی کردند. در این پژوهش علاوه بر گونه‌ی *P. drechsleri* گونه‌ی *P. citrophthora* نیز با فراوانی کمتری جداسازی گردید که بنی‌هاشمی (۱۴) نیز این گونه را در رفسنجان جداسازی کرده بود. بنی‌هاشمی و مرادی (۶) نیز با مطالعه فراوانی گونه‌های مختلف *Phytophthora* در استان‌های کرمان و فارس نشان دادند که از نظر فراوانی گونه‌های *P. drechsleri*، *P. cryptogea* و *P. citrophthora* به ترتیب در رتبه‌های اول تا سوم قرار دارند.

[1] Hemocytometer

جدول ۱- محل، زمان و تعداد گونه‌های *Phytophthora drechsleri* و *Phytophthora citrophthora* جداسازی شده از خاک در این مطالعه

کدجدایه	تعداد جدایه	منبع جدایه	تاریخ نمونه‌برداری	گونه شناسایی شده	محل نمونه‌برداری
PdA1-PdA4	۴	خاک	۱۳۸۹/۲/۴	*P. drechsleri*	انار
PdA5	۱	خاک	۱۳۸۹/۳/۱۲	*P. drechsleri*	انار
PdA6-PdA8	۳	خاک	۱۳۸۹/۳/۱۲	*P. drechsleri*	انار
PdA9-PdA12	۴	خاک	۱۳۸۹/۳/۱۲	*P. drechsleri*	انار
PdR10-PdR13	۴	خاک	۱۳۸۹/۲/۲۵	*P. drechsleri*	قاسم‌آباد رفسنجان
PdR14-PdR15	۲	خاک	۱۳۸۹/۲/۲۵	*P. drechsleri*	قاسم‌آباد رفسنجان
PdR16-PdR21	۶	خاک	۱۳۸۹/۳/۱۲	*P. drechsleri*	هاشم‌آباد رفسنجان
PdR1-PdR4	۴	خاک	۱۳۸۹/۲/۱۸	*P. drechsleri*	احمدآباد رفسنجان
PdR5-PdR6	۲	خاک	۱۳۸۹/۲/۱۸	*P. drechsleri*	احمدآباد رفسنجان
PdR7-PdR9	۳	خاک	۱۳۸۹/۲/۱۸	*P. drechsleri*	احمدآباد رفسنجان
PdA13-PdA14	۲	خاک	۱۳۸۹/۴/۱۷	*P. drechsleri*	انار
PdA15	۱	خاک	۱۳۸۹/۴/۱۷	*P. drechsleri*	انار
PdR22-PdR23	۲	خاک	۱۳۸۹/۳/۱۲	*P. drechsleri*	هاشم‌آباد رفسنجان
PdR24-PdR25	۲	خاک	۱۳۸۹/۳/۱۲	*P. drechsleri*	خیرآباد رفسنجان
PdR26-PdR30	۵	خاک	۱۳۸۹/٤/۱۷	*P. drechsleri*	نوق رفسنجان
PdR31	۱	خاک	۱۳۸۹/٤/۱۷	*P. drechsleri*	نوق رفسنجان
PcR8	۱	خاک	۱۳۸۹/٤/۱۷	*P. citrophthora*	نوق رفسنجان
PcR4	۱	خاک	۱۳۸۹/۲/۲۵	*P. citrophthora*	قاسم‌آباد رفسنجان
PcR5	۱	خاک	۱۳۸۹/۳/۱۲	*P. citrophthora*	هاشم‌آباد رفسنجان
PcR1-PcR3	۳	خاک	۱۳۸۹/۲/۱۸	*P. citrophthora*	احمدآباد رفسنجان
PcR9-PcR10	۲	خاک	۱۳۸۹/٤/۱۷	*P. citrophthora*	احمدآباد رفسنجان
PcA1-PcA2	۲	خاک	۱۳۸۹/۳/۱۲	*P. citrophthora*	انار
PcA3-PcA5	۳	خاک	۱۳۸۹/۳/۱۲	*P. citrophthora*	انار
PcR6-PcR7	۲	خاک	۱۳۸۹/۳/۱۲	*P. citrophthora*	هاشم‌آباد رفسنجان
PcA6-PcA7	۲	خاک	۱۳۸۹/۴/۱۷	*P. citrophthora*	انار

فتاحی اردکانی و همکاران (۸) گونه‌های *P. cryptogea*، *P. megasperma* و *P. nicotianae* را از پسته‌کاری‌های استان یزد جداسازی و گزارش کردند که *P. cryptogea* و *P. megasperma* به ترتیب بیشترین و

کمترین فراوانی را داشتند. ماترون[1] و همکاران (۳۲) نشان دادند که دما فاکتور مهم فیزیکی بر اسپوردهی و رشد *P. citrophthora* و *P. parasitica* بوده و در گسترش پوسیدگی طوقه و ریشه روی مرکبات تأثیر دارد.

گراهام و منگی[2] (۲۳) گزارش کردند که پایداری کم اندام‌های رویشی و تشکیل کم اندام‌های مقاوم *P. citrophthora* در خاک و در فصل تابستان و طولانی بودن دوره رکود این اومیست به علت مناسب نبودن دما از عوامل مهمی است که از گسترش آن در مناطق گرم جلوگیری می‌کند.

میزان جداسازی گونه فوق در تابستان بسیار ناچیز گزارش گردیده است. در این پژوهش نیز *P. citrophthora* با فراوانی کمتری جداسازی گردید و به نظر می‌رسد که شرایط محیطی برای گسترش *P. drechsleri* مناسب‌تر بوده است.

شناسایی بیمارگر بر اساس صفات ریخت‌شناسی

بر اساس نتایج حاصل از بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، جدایه‌های به‌دست آمده در دو گروه قرار گرفتند.

جدایه‌های گروه اول

در این گروه ۴۶ جدایه (۱۵ جدایه از خاک‌های آلوده شهرستان انار و ۳۱ جدایه از خاک‌های آلوده شهرستان رفسنجان) جداسازی گردید که روی محیط‌های کشت آگاردار دارای رشد نسبتاً سریع، ریسه‌های هوایی و کرک مانند و کمی شعله‌ای شکل بودند. ریسه‌های جوان تقریباً یکنواخت و انشعابات آن‌ها با زاویه حاده یا قائمه بودند.

آماس ریسه در محیط کشت مایع به تعداد زیاد تشکیل شد که شبکه‌وار یا زنجیروار به هم متصل بودند و اکثراً میانی و به ندرت به شکل انتهایی روی ریسه‌ها قرار داشتند.

جدایه‌های این گروه قادر به رشد در دماهای۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ درجه سلسیوس بودند و بهینه رشد در دمای ۳۰ درجـه سلسیـوس مشاهده گردید.

اسپورانژیوفورها عموماً کمی باریک‌تر از ریسه‌های معمولی بودند، اسپورانژیوم روی محیط کشت آگاردار مشاهده نشد ولی در محیط کشت مایع در زیر نور مهتابی بعد از ۲۴ ساعت به تعداد فراوان تولید شدند.

اسپورانژیوم‌ها انتهایی و به اشکال تخم‌مرغی تا بیضی شکل و در رأس فاقد پاپیل یا پستانک بودند و متوسط ابعاد آن‌ها ۲۳/۵×۳۹/۱ میکرومتر بود، این جدایه‌ها در ابتدا به عنوان *P. drechsleri* شناسایی گردیدند.

[1] Matheron
[2] Graham and Menge

جدایه‌های گروه دوم

در این گروه ۱۷ جدایه (هفت جدایه از خاک‌های آلوده شهرستان انار و ۱۰ جدایه از خاک آلوده شهرستان رفسنجان) جداسازی گردید که پرگنه‌های این گروه روی محیط کشت CMA دارای رشد سریع بودند. این جدایه‌ها در ابتدا فاقد ریسه‌های هوایی بودند ولی به تدریج ریسه‌های هوایی بر روی پرگنه‌ها ظاهر گردیدند. ریسه‌ها رشته‌ای، کمی ضخیم و دارای شاخه‌های جانبی گره‌دار بودند، انشعابات آن اغلب با زاویه حاده مشاهده شد. جدایه‌های این گروه قادر به رشد در دماهای۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ درجه سلسیوس بودند ولی در دمای ۳۵ درجـه سلسیـوس بعد از هفت روز هیچ گونه رشدی نداشتند. بهینه رشد این جدایه‌ها نیز دمای ۲۵ درجـه سلسیـوس ارزیابی گردید. اسپورانژیوفورها ظریف و اغلب نازک‌تر از ریسه‌های معمولی بودند. اسپورانژیوم‌ها روی محیط کشت‌های جامد به مقدار کمی تشکیل شدند در حالی‌که به مقدار فراوان در محیط کشت مایع ایجاد گردیدند و به اشکال تخم‌مرغی، گلابی شکل و یا کروی و در رأس دارای پاپیل یا پستانک بودند، متوسط ابعاد اسپورانژیوم‌ها ۲۹/۵×۵۱ میکرومتر بود. ساختارهای جنسی در این جدایه‌ها مشاهده نشد. این جدایه‌ها در ابتدا به عنوان *P. citrophthora* شناسایی گردیدند.

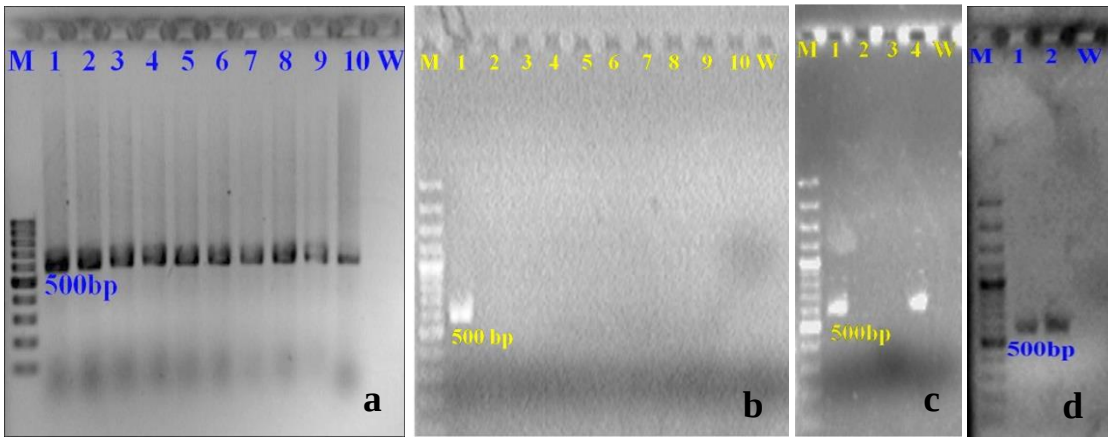
بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی میوه سیب و نهال‌های پسته

مایه‌زنی میوه‌های سیب با جدایه‌های *P. drechsleri*، *P. citrophthora* و شاهد برای تعیین بیماری‌زایی جدایه‌ها بعد از یک هفته مورد بررسی قرار گرفت، شـدت بیمـاری‌زایـی *P. citrophthora* نسبـت به *P. drechsleri* روی میوه‌های سیب با توجه به اندازه‌گیری ناحیه پوسیدگی میوه بیشتر بود که با نتایج بنی‌هاشمی (۱۴) مطابقت داشت و از بین گونه‌های فیتوفتورای درختان پسته، گونه *P. citrophthora* از شدت بیماری‌زایی بیشتری برخوردار است. مرادی و بنی هاشمی (۹) سه گونه *P. citrophthora*، *P. drechsleri* و *P. cryptogea* را از باغ‌های پسته آلوده به گموز در استان‌های کرمان و فارس جداسازی و شناسایی نمودند و بیماری‌زایی هر سه گونه را روی میوه سیب مورد ارزیابی قرار دادند، نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که از بین سه گونه‌ی مطالعه شده *P.citrophthora* و *P.drechsleri* به ترتیب بیشترین و کمترین شدت بیماری‌زایی را روی میوه‌های مایه‌زنی شده داشتند که این نتایج در مورد بیماری‌زایی جدایه‌های *P .citrophthora* در تحقیق انجام شده مطابقت دارد.

در نهال‌های سه ماهه پسته مایه‌زنی شده با جدایه‌های اامیست *P. drechsleri* و *P.citrophthora*، علائم بیماری ظاهر و گیاهان خشک شدند.

نتایج حاصل از شناسایی گونه‌ی غالب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

نتایج واکنش PCR معمولی با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی DF2/DR2 برای تأیید شناسایی مورفولوژی گونه‌ی غالب *P. drechsleri* نشان داد که در تمامی جدایه‌ها باندی به اندازه ۵۶۷ جفت بازی تکثیر و مشاهده می‌شود (شکل a-۱). نتایج این تحقیق به‌طور قاطع نشان داد که جدایه‌های گروه اول که از خاک باغ‌های پسته جدا شده بود متعلق به گونه‌ی *P. drechsleri* است. مقایسه‌ی نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی محصول PCR، با استفاده از نرم‌افزار Clustal X و پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص کرد که جدایه‌های *P. drechsleri* با توالی‌های مرجع معتبر با درصد تشابه ۹۹ درصد منطبق می‌باشند.



شکل۱- الگوی باندهای حاصل از ردیابی *Phytophthora drechsleri* با استفاده از جفت آغازگر DF2/DR2 از منابع مختلف آلودگی. (M) نشانگر DNA ۱۰۰ جفت باز، (W) کنترل منفی. (a) تکثیر DNA استخراج شده از جدایه‌های بدست آمده از مناطق مختلف (ردیف ۲ تا ۱۰)، کنترل مثبت (ردیف ۱). (b) بررسی اختصاصیت جفت آغازگر DF2/DR2: کنترل مثبت *P. drechsleri* (۱)، *Phytophthora melonis* (۲)، *Phytophthora nicotianae* (۳)، *Phytophthora citrophthora* (۴) ، *Phytophthora citricola* (۵)، *Phytophthora capsici* (۶)، *Pythium aphanidermatum* (۷)، *Fusarium solani* (۸)، *Fusarium oxysporum* (۹)، *Verticillium albo-atrum* (۱۰)، *Rhizoctonia solani*. (۱۱). (c) تکثیر DNA استخراج شده از خاک آلوده تا رقت $۱:۱۰^{۲}$

ردیابی عامل بیماری

بررسی حساسیت و اختصاصیت آغازگرهای اختصاصی در PCR

با توجه به این‌که هنگام ردیابی بیمارگر مورد نظر از خاک، آب و بافت آلوده، طیف وسیعی از قارچ‌های دیگر نیز جداسازی می‌شوند انتخاب آغازگرهای اختصاصی که تنها قادر به ردیابی گونه‌ی مورد نظر باشند از اهمیت بالایی

برخوردار است، از این رو اختصاصیت برای ردیابی *P. drechsleri* ضروری است. جفت آغازگر DF2/DR2 قادر به تکثیر قطعه دی ان ای به اندازه ۵۶۷ جفت بازی در تمام جدایه‌های *P. drechsleri* بود. این درحالی است که این آغازگرها هیچ باند دی ان ای را در گونه‌های دیگر فیتوفتورا و قارچ‌های دیگر (عوامل ایجاد کننده بوته‌میری و پژمردگی) تکثیر نکردند. با توجه به نتایج به‌دست آمده آغازگرهای مورد استفاده دارای اختصاصیت بالایی برای ردیابی و تشخیص *P. drechsleri* هستند (شکل b -۱).

نتایج بررسی حساسیت آغازگرها نشان داد که در PCR معمولی، جفت آغازگر DF2/DR2 قادر به تشکیل باند ۵۶۷ جفت بازی تا غلظت ۱۰۰ پیکوگرم است که با نتایج مستوفی‌زاده قلمفرسا و همکاران (۳۴) مطابقت داشت. در مورد *P. ramorum* محدوده‌ی ردیابی دی. ان. ای خالص بیمارگر حدود دو فمتوگرم گزارش گردیده است، البته در صورتی‌که دی. ان. ای خالص بیمارگر با دی. ان. ای گیاه سالم مخلوط شود حساسیت ردیابی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر کمتر می‌شود (۳۴). جودلسون[1] و تولی (۲۷) میزان حساسیت ردیابی*P. infestans* با آغازگرهای ناحیه ITS را ۱۰ فمتوگرم گزارش کردند. بالا بودن میزان حساسیت آغازگر، سبب ردیابی بهتر بیمارگر قبل از ظهور علائم می‌گردد، با توجه به بالا بودن قدرت بیماری‌زایی و خسارت این اامیست، شناسایی عامل بیماری قبل از ظهور علائم بسیار مهم می‌باشد. غالباً باغدار زمانی متوجه بیماری می‌گردد که این بیمارگر عمده خسارت خود را وارد نموده است و همچنین برای احداث نهالستان‌ها و باغ‌های جدید معرفی روشی با حساسیت بالا برای شناسایی بیمارگر در خاک و آب مورد استفاده بسیار مورد توجه است.

بررسی ردیابی زئوسپور *P. drechsleri*

در بررسی ردیابی زئوسپور، به‌عنوان یکی از عوامل مهم در گسترش بیماری، جفت آغازگرهای DF2/DR2 از نظر توانایی ردیابی مقدارهای مختلف زئوسپور به کمک PCR معمولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آغازگرها قادر به ردیابی مستقیم زئوسپور در غلظت ۱۷×۱۰^{۳} زئوسپور در هر میلی‌لیتر (۸۵ زئوسپور) بودند، اما در ردیابی DNA استخراج شده از غلظت‌های مختلف زئوسپور جفت آغازگرهای DF2/DR2، ۱۷×۱۰^{۲} زئوسپور در هر میلی‌لیتر (۹ زئوسپور) را ردیابی نمودند. در مطالعات انجام شده بین میزان زئوسپور و شدت باندها رابطه‌ای مشاهده نشده است (۴۴). در بررسی ردیابی *P. alni* از آب و خاک آلوده به این بیمارگر، میزان ردیابی در آب تا ۵×۱۰^{۱} زئوسپور و در خاک ۵×۱۰^{۲} زئوسپور گزارش

[1] Judelson and Tooley

شده است (۴۲)، بنابراین می‌توان ردیابی اختصاصی بیمارگر را از چاه‌های آب و خاک باغ‌های پسته قبل از ظهور علائم انجام داد.

بررسی ردیابی *P. drechsleri* از آب آلوده

با استفاده از جفت آغازگرهای DF2/DR2، زمینه برای ردیابی *P. drechsleri* از آب آلوده، مستقیم و بدون نیاز به استخراج دی. ان. ای فراهم گردید. این آغازگرها قادر به ردیابی دی. ان. ای استخراج شده از آب آلوده به بیمارگر مورد نظر بودند. در آب بدون آلودگی، به‌عنوان کنترل منفی، باندی مشاهده نگردید. به‌منظور اطمینان از آلودگی آب به بیمارگر، با کمک تله، *P. drechsleri* از آب جداسازی گردید. ردیابی از آب، به‌عنوان عامل مهم انتقال زئوسپورها از اهمیت بالایی برخوردار است. برخی مطالعات نشان دهنده همبستگی مثبت بین آبیاری با آب آلوده به بیمارگر و بیمارهای گیاهی است. از آنجایی‌که آب آبیاری به عنوان منبع قابل توجهی از اندام‌های بارور قارچی در آبیاری محصول عمل می‌کند و کیفیت آب آبیاری در بیشتر شرایط به‌صورت بالقوه در افزایش فشار بیماری نقش دارد (۱۶) بنابراین ردیابی عوامل بیماری‌زا در آب آبیاری برای کنترل بیماری‌های قابل انتقال با آب اهمیت زیادی دارد (۲۴).

بررسی ردیابی *P. drechsleri* از خاک آلوده

DNA استخراج شده از نمونه خاک آلوده به *P. drechsleri* توسط جفت آغازگرهای DF2/DR2 ردیابی شد و DNA جداسازی شده تا ۱۰۰ برابر رقیق گردید. در رقت $۱۰^{-۲}$ باندی به اندازه ۵۶۷ جفت بازی تکثیر شد در حالی‌که از DNA استخراج شده از خاک سالم و غلظت اولیه DNA استخراج شده از خاک آلوده و غلظت $۱۰^{-۱}$ هیچ باندی تشکیل نگردید (شکل c-۱). از نمونه خاک مورد استفاده به کمک تله، *P. drechsleri* جداسازی گردید با توجه به موفقیت جفت آغازگر DF2/DR2 در ردیابی عامل پوسیدگی ریشه و طوقه پسته از خاک آلوده برای جلوگیری از آلودگی در احداث باغ‌های جدید در مناطق آلوده بسیار کارآمد خواهد بود.

بررسی ردیابی *P. drechsleri* از بافت گیاه

ردیابی *P. drechsleri* از بافت آلوده به طور مستقیم به علت مواد بازدارنده بافت پسته امکان‌پذیر نشد که برای اثبات حضور مواد بازدارنده در بافت پسته DNA استخراج شده از بافت سالم با غلظت $۱۰^{-۲}$ از دی. ان. ای خالص عامل بیماری مخلوط شد و برای ردیابی از جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد ولی در این روش باندی مشاهده نشد. ردیابی عامل بیماری به طور غیر مستقیم از بافت میوه سیب مایه‌زنی شده با *P. drechsleri* با جفت آغازگرهای اختصاصی DF2/DR2 امکان‌پذیر شد و باندی به اندازه ۵۶۷ جفت بازی را تکثیر نمود (شکل d-۱).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش، آزمون PCR با جفت آغازگر اختصاصی DF2/DR2 ابزار مفیدی برای شناسایی و ردیابی *P. drechsleri* از خاک و آب آلوده در منطقه بوده و می‌تواند در مدیریت مؤثر بیمارگر قبل از ظهور علائم نقش به‌سزایی داشته باشد. بنابراین توصیه می‌شود که ردیابی اختصاصی بیمارگر با استفاده از جفت آغازگر DF2/DR2 از مناطق مشکوک به بیمارگر پوسیدگی ریشه و طوقه و نیز برای احداث نهالستان‌ها و باغ‌های جدید از خاک و آب مورد استفاده صورت گیرد تا خسارت ناشی از قارچ فیتوفتورا به‌عنوان مهم‌ترین عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه درختان پسته در ایران کاهش یابد.

منابع

۱- ارشاد، ج. ۱۳۷۱. گونه‌های فیتوفتورا در ایران (جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی). سازمان تحقیقات کشاورزی. تهران. ۲۱۷ صفحه.

۲- اشکان، م.، ابوسعیدی، د.، و ض. بنی‌هاشمی. ۱۳۷۴. بررسی پراکندگی گونه‌های *Phytophthora* عامل پوسیدگی طوقه و ریشه درختان پسته در رفسنجان. دوازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۱۱ تا ۱۶ شهریورماه، کرج، صفحه ۲۱۸.

۳- امینایی، م.م. و ج. ارشاد. ۱۳۷۰. جداسازی *Phytophthora drechsleri* از درختان پسته مبتلا به پوسیدگی طوقه (گموز) در استان کرمان. دهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۱۱ تا ۱۶ شهریورماه، کرج، صفحه ۱۰۶.

۴- بنی هاشمی، ض. ۱۳۶۸. مطالعه بیماری گموز پسته در استان‌های جنوبی ایران. نهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۱۳ تا ۱۸ شهریورماه، دانشگاه فردوسی مشهد، صفحه ۹۲.

۵- بنی هاشمی، ض. ۱۳۷۷. عکس العمل *Pistacia* spp. به گونه‌های قارچ فیتوفتورا عامل پوسیدگی طوقه و ریشه. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۳۴، ۲۱۳-۲۲۴.

۶- بنی هاشمی، ض. و م. مرادی. ۱۳۸۳. وفور نسبی گونه‌های فیتوفتورا در طوقه و ریشه درختان پسته و مقایسه نسبی مقاومت طوقه و ریشه به گونه‌های عامل بیماری. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۴۰، ۵۷-۷۵.

۷- فانی، س.ر.، میرابوالفتحی، م.، و ح.ر. زمانی‌زاده. ۱۳۸۳. سبب‌شناسی انگومک پسته در استان سیستان و بلوچستان. شانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۷ تا ۱۱ شهریورماه، تبریز، صفحه ۳۸۲.

۸- فتاحی‌اردکانی، م.، ارشاد، ج.، و م. میرابوالفتحی. ۱۳۷۹. شناسایی عامل بیماری انگومک (گموز) پسته در استان یزد. چهاردهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۱۴ تا ۱۷ شهریورماه، دانشگاه صنعتی اصفهان، صفحه ۱۲۶.

۹- مرادی، م و ض. بنی هاشمی. ۱۳۷۹. فراوانی نسبی گونه‌های فیتوفتورا از طوقه و ریشه درختان در استان‌های فارس و کرمان و تعیین مقاومت طوقه و ریشه و پایه‌های متداول پسته به آن‌ها. چهاردهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۱۴ تا ۱۷ شهریورماه، دانشگاه صنعتی اصفهان، صفحه ۱۲۷.

۱۰- میرابوالفتحی، م.، و ج. ارشاد. ۱۳۶۵. جداسازی *Phytophthora megasperma* از درختان پسته مبتلا به پوسیدگی طوقه (گموز). هشتمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۱ تا ۴ فروردین، دانشگاه صنعتی اصفهان، صفحه ۸۴.

۱۱- میرابوالفتحی، م. ۱۳۶۶. بررسی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه‌ی درختان پسته، پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تهران. ۱۴۰ صفحه.

۱۲- میرابوالفتحی، م.، داوودی، ع. و ع. یاسینی. ۱۳۸۳. مطالعه عوامل بیماری انگومک پسته در استان قزوین. شانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۷ تا ۱۱ شهریورماه، تبریز، صفحه ۳۷۵.

13- Banihashemi, Z. 1982. Recovery of *Phytophthora citrophthora* from soil. *Phytophthora* Newsletter. 10:1.

14- Banihashemi, Z. 1998. Assessment of *Pistacia* root stocks to *Phytophthora* spp. The causal agents of pistachio gummosis. Journal of Plant Pathology, 34: 63-66.

15- Banihashemi, Z. 2004. A method to monitor the activity of *Phytophthora* spp. in the root zone of *Pistacia* spp. Phytopathologia Mediterranea, 43: 411-414.

16- Bush, E.A. 2002. Characterization of *Phytophthora* species in recycled irrigation water at a container nursery in southwestern Virginia. Master's Thesis of Virginia Polytechnic Institute and State University.146 pp.

17- Bush, E.A. Stromberg, E.L. Hong, C. Richardson, P.A. and P. Kong. 2006. Illustration of key morphological characteristics of *Phytophthora* species identified in Virginia nursery irrigation water. Online. Plant Health Progress. doi:10.1094/PHP-*2006*-0621-01-RS. http://www.plantmanagementnetwork.org/php/default.asp.

18- Chenard, V. 2003. Evaluation of methods of soil DNA extraction for PCR. MSc. dissertation. Alberta University. Canada.

19- Cullen, D.W., Lees, A.K., Toth, I.K. and J.M. Duncan. 1999. Development of a PCR assay for specific detection of the three main pathogenes of potato blemish disease. *Proceeding of Crop Protection in North Britain Conference*, March 27-30, Dundee, Scotland, 261-265.

20- Ersek, T. Schoelz, J.E. and J.T. English. 1994. PCR amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. Applied and Environmental Microbiology, 60: 2616–2621.

21- Goodwin, P. Kirkpatrick, B. and J. Duniway. 1989. Cloned DNA probes for identification of *Phytophthora parasitica*. Phytopathology, 79(6): 716-721.

22- Goodwin, P.H., Kirkpatrick, B.C. and J.M. Duniway. 1990. Identification of *Phytophthora*

citrophthora with cloned DNA probes. Applied and Environmental Microbiology, 669-674.

23- Graham, J.H. and J.A. Menge. 2000. *Phytophthora*-induced diseases. pp. 12-15, In: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and J.H. Graham (eds.), *Compendium of Citrus Diseases*. APS Press, United States of America.

24- Hong, C.X. Bush, E.A. and E.L. Stromberg. 2003. Fluctuations of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in components of a recycling irrigation system. Plant Disease, 87:1500-1506.

25- Ippolito, A. Schena, L. and F. Nigro. 2002. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. European Journal of Plant Pathology, 108(9): 855-868.

26- Jeffers, S.N. and Martin, S.B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Disease. 70:1038-1043.

27- Judelson, H.S. and P.W. Tooley. 2000. Enhanced polymerase chain reaction methods for detecting and quantifying *Phytophthora infestans* in plants. Phytopathology, 90: 1112-1119.

28- Kageyama, K., Komatsu, T. and H. Suga. 2003. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. Journal of General Plant Pathology, 69: 153-160.

29- Kannwischer, M.E. and D.J. Mitchell. 1981. Relationships of numbers of spores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* to infection and mortality of tobacco. Phytopathology, 71: 69-73.

30- Liew, E.C.Y., Maclean, D.J. and J.A.G. Irwin. 1998. Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. Mycological Research, 102: 73-80.

31- Martin, F.N., Tooley, P.W. and C. Blomquist. 2004. Molecular detection of *Phytophthra ramorum* the causal agent of sudden oak death in California and two additional species commonly recovered from diseased plant material. Phytopathology, 94: 621-631.

32- Matheron, M.E. Gilbertson, R.L. and J.C. Matejka. 1992. *Coniophora* sp. implicated in rapid development of wood rot on living branches of lemon trees in Arizona. Phytopathology, 82:1083.

33- Mirabolfathy, M., Ershad, D., Alizadeh. A., Cooke, D.E.L., Duncan, J. M. and H. Rahimian. 2002. Detection of the causal agents of pistachio gummosis by the polymeras chain reaction. Iranian Journal of Plant Pathology, 38: 97-116.

34- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Cooke, D.E.L. and Z. Banihashemi 2007. Development of specific PCR primers based on ribosomal and mitochondrial genome for identification of *Phytophthora drechsleri* Tucker. *Proceedings Asian Mycology Congress*, 2–6 December, Parkroyal Penang, Malaysia. 199.

35- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa. R, Cooke, D. E. L. and Z. Banihashemi. 2008. *Phytophthora parsiana* sp. nov., a new high-temperature tolerant species. Mycological Research, 112: 783-794.

36- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Panabieres, F., Banihashemi, Z. and D.E.L. Cooke. 2010. Phylogenetic relationship of *Phytophthora cryptogea* pethybr & laff and *P. drechsleri* Tucker. Fungal Biology**,** 114: 325-339.

37- Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J. and I. Barker. 2006. Advances in molecular phytodiagnostics–new solutions for old problems. European Journal of Plant Pathology, 116(1): 1-19.

38- Mundkur, B.B. 1959. *Fungi and plant diseases*. Macmillan and Company. Ltd, London. 246 pp.

39- Murray, H. G. Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Research. 8:4321-4325.

40- Ouimette, D., Koike, S. and M. Coffey. 1988. Pathogenicity of isolates of *Phytophthora citricola* from different hosts on unripe fruit of Avocado. California Avocado Society Year book, 72: 249-254.

41- Saberi-Riseh, R., Hajieghrari, B., Rouhani, H. and A. Sharifi-Tehrani. 2004. Effects of inoculum density and substrate type on saprophytic survival of *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of gummosis (crown and root rot) on pistachio in Rafsanjan, Iran. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 69: 653.

42- Trzewik, A. and T. Orlikowska. 2010. Detection and identification of *Phytophthora alni.* Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences, 75: 699-704.

43- Tsao, P. H. 1983. Factors effecting isolation and quantitation of *Phytophthora* from soil. pp. 219-239, In: D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P.H. Tsao (eds.), *Phytophthora: Its, Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, APS Press.

44- Wang, Y., Ren, Z. and X. Zheng. 2007. Detection of *Phytophthora melonis* in samples of soil, water, and plant tissue with polymerase chain reaction. Canadian Journal of Plant Pathology, 29 (2): 172-181.

Detection and Identification of *Phytophthora drechsleri* in Soil, Water and Infected Pistachio Tissue through Conventional PCR

S. Daroodi [1], H. Alaei [2*], R. Saberi Riseh[2] and M. Gorji [3]

Abstract

Pistachio root and crown rot disease is one of the most important soil-borne diseases. Rapid detection of pathogens in different sources is a crucial stage in effective disease management strategies. Detection and molecular identification of Phytophthora drechsleri from infected water, soil and plant tissue were performed based on specific amplification fragments of rDNA-ITS region using the primer set DF2/DR2. Sampling and isolation was done during year 2010-2011 from pistachio orchards in Rafsanjan and Anar regions of Kerman province, Iran. A total number of 46 isolates of P.drechsleri and 17 isolates of Phytophthora citrophthora were obtained and identified using selective media method. Sensitivity and specificity of the primer set were studied using 15 predominant P. drechsleri isolates, 25 Phytophthora spp. and other closely pistachio soil-borne fungi. The results showed, this primer set is specific for detection of P. drechsleri and produced 567bp amplicon but there was no cross reaction with other pistachio soil borne fungal tested. In sensitivity test, the detection limit was 100pg of P. drechsleri pure genomic DNA in conventional PCR. As few as 17×103 ml-1 pure P. drechsleri zoospores (85 zoospores) could be detected by the primer set DF2/DR2. Amplification of genomic DNA extracted DNA from infected soil samples were also resulted in production of a 567 bp species specific band. The primers could not detect the target directly from infected pistachio tissue due to the presence of inhibitory compounds but the detection was successful from baiting method using apple fruit inoculated with infected soil and plant tissue after three days. However the detection system proved to be accurate and sensitive and could help in pathogen detection but also could be used as part of disease control strategy

.**Key words:** Detection, *Phytophthora Drechsleri* ، *Phytophthora Citrophthora*, Pistachio, Root and Crown Rot

[1] MSc student Department of Plant Protection, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran
[2] Department of Plant Protection, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran
[3] Plant Protection Management, Jihad-e-Agriculture, Anar, Iran
* Corresponding author, Email: (hossein.alaei@vru.ac.ir)