Specificity of Different PCR Primers for *Verticillium dahliae* Isolated from Olive Trees in Jordan

خصوصية بادئات تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR) لعزلات فطر الفيرتسيليوم دالي من أشجار زيتون في الأردن

Sameer Ahmad Masoud

سمير احمد مسعود

Three pairs of polymerase chain reaction (PCR) primers were compared to amplify characteristic DNA fingerprints of *Verticillium dahliae* Kleb. (the causal agent of olive vascular wilt disease). The primers include several combinations of the internal transcribed spacer (ITS) regions of nuclear ribosomal RNA (rRNA) genes and one pair from repetitive nuclear DNA sequences. Deoxyoligonucleotide primers specific to *V. dahliae* were synthesized based on the identified variable nucleotide sequences of the nuclear ITS regions of different Verticillium species that cause vascular wilt diseases. The PCR primers of nuclear repetitive DNA showed variable band intensities for the different isolates of *V. dahliae* isolated from olive trees in Jordan. This suggests genetic variabilities of the local isolates collected from olive. Primers based on the ITS sequences produced more consistently homogeneous and characteristic fingerprints using purified DNA from *V. dahliae* isolates. The detection limit of these ITS primers was further improved using nested PCR and to show the high specificity of the ITS primers. The first amplification reaction of nested PCR contained primers from the highly conserved DNA sequences of the 18S and 28S genes that flank the ITS regions. No PCR amplification produced using DNA isolated from different fungi in the same taxonomic class or other classes. These

ITS-specific primer pair may be useful in developing diagnostic procedures of Verticillium wilt disease using single or nested PCR.

تمت مقارنة ثلاثة أزواج من بادئات تفاعل البلمرة التسلسلي(PCR) لتضخيم بصمات وراثية خاصة بفطر الفيرتسيليوم دالي المسبب لمرض الذبول الوعائي في الزيتون . أشتملت البادئات على مزيج من تسلسل المناطق المستنسخة والفاصلة بين جينات بناء الريبوسومات (ITS) وزوج بادئات من تسلسل النيوكليتدات المكررة في الحامض النووي الريبوزي منقوص الأوكسجين (DNA) . تم تحديد وبناء بادئات من مناطق (ITS) خاصة بالفيرتسيليوم دالي وفي المناطق التي تختلف بالتسلسل عن الفطريات الأخرى التي تسبب الذبول الوعائي . أنتجت البادئات من تسلسل النيوكليتدات المكررة وباستعمال أل (PCR) حزم تختلف من حيث الحدة للعزلات المختلفة من الزيتون في الأردن ، ومما يشير لاختلافات وراثية بين عزلات الفطر المختلفة ، بينما أنتجت بادئات أل(ITS) حزم متجانسة لهذه العزلات . كما تم زيادة الحد الأدنى للكشف عن DNA الفطر باستعمال(PCR) مزدوج وباستعمال بادئات في التفاعل الأول من جينات (18S) و (28S) المحيطة في منطقة أل (ITS) واستعمال بادئات أل(ITS) في التفاعل الثاني . استعمل هذا الفحص لتأكيد خصوصية البادئات لفطر الفيرتسيليوم دالي وليس لفطريات أخرى في نفس الصف التصنيفي أو صفوف أخرى . وسيكون استعمال هذه البادئات في تفاعل مفرد أو مزدوج من أل(PCR) مفيداً في تطوير طرق تشخيصية لمرض الذبول الوعائي في الزيتون .