Diagnosis of *Verticillium dahliae* Kleb. Latent Infection on Olive using DNA-Fingerprinting Techniques in Jordan

Sameer Masoud and Muwaffaq Karajeh

Fifty-six isolates of *Verticillium dahliae* Kleb., collected from olive trees in Jordan, were used to develop a polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostic assay. *V. dahliae* was indicated as the only causal agent of olive vascular wilt disease as supported by PCR results and through cultural characteristics, growth patterns, colony morphology, microscopic examinations and a pathogenicity test followed by re-isolation on a selective medium. Three primer pairs of PCR were evaluated for their usefulness in the diagnostic assay. Deoxyoligonucleotide primers of the internal transcribed spacer (ITS) regions of nuclear ribosomal RNA (rRNA) genes, were the most appropriate to identify all *V. dahliae* isolates from olive in Jordan without amplifying products from other tested fungi. The PCR detection was very sensitive to small amounts of template DNA but still showed negative results of some samples containing trace amounts of template DNA. The PCR signal in general was relatively stronger for samples taken from infected olive trees at heights closer to the soil surface. Using only vascular tissues for DNA extraction, has also enriched the extracted DNA with *V. dahliae* DNA as shown by more consistent PCR amplification results. The detection limit was further improved using nested PCR, where the first amplification reaction contained primers from the highly conservative DNA sequences of the 18S and 28S genes that flank the ITS regions, and the second reaction contains the more stringent ITS primers. The nested PCR signal of *V. dahliae* was much stronger and more consistent at different sampling heights. Detection of *V. dahliae* in olive

tissues using PCR assay, was obviously more sensitive compared with the traditional standardized plating assay at five heights above the ground surface of symptomatic and non-symptomatic infected olive trees. Such a diagnostic PCR assay could be an effective tool to early detect infected olive plantlets before symptom development and could allow adapting a successful disease management strategy. An additional pair of PCR primers designed from nuclear repetitive DNA was also used but had a lower potential for diagnostic applications because it showed variable DNA band intensities for the different *V. dahliae* isolates from olive trees in Jordan. This has suggested the presence of genetic variability among the local olive isolates. Correlating such genetic variability to host specificity or geographical origins of the isolates may also have a potential practical application in controlling olive vascular wilt.

تشخيص الإصابة الكامنة بفطر الفيرتسيليوم (*Verticillium dahliae* Kleb.)في أشتال الزيتون باستخدام تقنيات بصمات المادة الوراثية (DNA) في الأردن

سمير مسعود و موفق كراجـــــة

استخدمت ست وخمسون عزلة من فطر *Verticillium dahliae* Kleb. تم جمعها من أشجار الزيتون في الأردن لتطوير فحص تشخيصي مبني على تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR). وقد ظهر أن *V. dahliae* هو المسبب الوحيد لمرض ذبول الزيتون الوعائي مدعم ذلك بنتائج الـــ PCR، من خلال ميزات التربية، و أنماط النمو، و مظهر المستعمرة ، و الفحص الميكروسكوبي، والقدرة التطفلية التي تلاها إعادة العزل على البيئة الاختيارية. تم تقييم أهمية ثلاثة أزواج من الـــ PCR في الفحص التشخيصي. كانت بادئات تسلسل النيوكلتيدات المكررة منقوصة الأوكسجين للمناطق الفاصلة بين جينات بناء الرايبوزومات(ITS) هي الأكثر ملاءمة في التعرف على جميع عزلات *V. dahliae* من الزيتون في الأردن، وبدون تضخيم ناتج من الفطريات المختبرة الأخرى، و كانت حساسة لكمية قليلة من DNA الـــــقالب، ولكن أظهرت نتائج سلبية في بعض العينات عند استعمال كميات ضئيلة من

DNA الـــــقالب. كانت إشارة الـــ PCR بشكل عام أقوى نسبياً في العينات التي أخذت من أشجار الزيتون على ارتفاع اقرب إلى سطح التربة. إن اقتصار الاستخدام على الأنسجة الوعائية في استخلاص الـــ DNA زاد في كمية الـــ DNA الذي يحوي الـــ DNA الخاص بـــ *V. dahliae* ، و بالتالـــي انتج الـــ DNA القالـــــب المستخلـــص نتائـــج اكـــــثر دقـــة في التضـــخيم. تم زيـــادة مستـــــوى التـــحري من خـــــــلال استـــــخدام الـــ Nested PCR ، حيث احتوى التفاعل الأول على بادئات من تسلسل الـــ DNA عالي الحفظ لجينات الـــ 18S و 28S التي تحصر مناطق الـــ ITS، و احتوى التفاعل الثاني على بادئات الـــ ITS الأكثر تخصصاً و حصراً. كانت إشارة ال Nested PCR لفطر *V. dahliae* أقوى كثيراً و اكثر دقة، حيث كان كشف الـــ PCRاكثر حساسية بالمقارنة مع فحص الأطباق القياسي التقليدي على خمسة ارتفاعات فوق سطح التربة في أشجار زيتون مصابة تظهر عليها أعراض المرض و أخرى لا تظهر عليها. أن فحص الـــ PCR التشخيصي سيكون مفيداً للكشف المبكر عن أشتال الزيتون المصابة وقبل ظهور الأعراض، وقد يسمح بتطبيق إستراتيجية مكافحة ناجحة. استخدم زوج إضافي من بادئات الـــ PCR مصمم من الـــ DNA النووي المتكرر، تبين أن استعماله التشخيصي أقل فاعليه بسبب أنه أعطى حزمة متقلبة في الشدة بحسب عزلات الزيتون المحلية، ومما يشير إلى وجود تنوع وراثي. أن ربط هذا التنوع مع خصوصية العائل و المنشأ الجغرافي للعزلة قد يسمح بعمل استخدامات عملية واعدة بمكافحة المرض.