

شناسایی مولکولی و ردیابی فیتوپلاسمای عامل بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی

Molecular detection and survey of tomato big bud phytoplasma in Zanjan province

مهنازشکری^۱، حسین جعفری^{۲*}، محمدرضا عظیمی مقدم^۳

Mahnaz Shokri¹, Hossein Jafari², Mohammadreza Azimi Moghadam³

۱- کارشناس ارشد مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۲- موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- گروه مهندسی تولید و ژنتیک کشاورزی، دانشگاه زنجان

1. MSc. of Agricultural Biotechnology Engineering, University of Zanjan

2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

3. Department of Plant Production and Genetics, University of Zanjan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email:

h.jafaryir@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۱۱)

چکیده

بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی یکی از بیماری های مهم فیتوپلاسمایی گوجه فرنگی در ایران و درجهان محسوب می شود که در آن جوانه های گیاهان آلوده به حالت متورم درآمده و در صورت شدت بیماری بوته تغییر شکل و رنگ داده و خسارت شدیدی به محصول وارد می شود. به منظور شناسایی و ردیابی عامل بیماری ابتدا از برگ، جوانه های متورم و میوه بوته های آلوده در مزارع گوجه فرنگی زنجان نمونه برداری گردید. DNA کل از اندام های آلوده و سالم و از علف های هرز مزارع مانند گل جالیز، اسپرک، توق، تاج خروس و پیچک استخراج شد. همچنین برای بررسی امکان انتقال بیماری با بذر و حشرات ناقل در مزرعه، DNA کل بذور گوجه فرنگی بوته های آلوده و گونه هایی از مگس سفید و زنجره ها استخراج شد. ردیابی فیتوپلاسمای با واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7، اختصاصی فیتوپلاسمای انجام گردید. بررسی نتایج حاصل از تکثیر اختصاصی ژنوم عامل بیماری نشان داد که در نمونه های گوجه فرنگی دارای علائم بیماری، قطعه DNA ریبوزومی اختصاصی فیتوپلاسمای با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت تکثیر شد. ردیابی عامل بیماری تنها در زنجره های ناقل و در گیاه انگل گل جالیز متصل به ریشه گیاهان بیمار با موفقیت همراه بود و از بقیه علف های هرز موجود فیتوپلاسمای عامل بیماری جداسازی نشد. با انجام این تحقیق برای اولین بار ردیابی مولکولی عامل بیماری فیتوپلاسمایی بر روی مگس سفید و گل جالیز انجام گردید و ضمن تایید عدم امکان انتقال عامل بیماری از طریق بذر و مگس های سفید، روشی سریع و دقیق برای ردیابی عامل بیماری در بوته های آلوده گوجه فرنگی و در حشرات ناقل بیماری، ارائه گردید که میتواند در پایش این بیماری در کشور استفاده شود.

واژه های کلیدی

تورم جوانه،

تشخیص مولکولی،

فیتوپلاسمای

گوجه فرنگی،

PCR

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 1, 2023

Abstract

Tomato big bud is one of the most important diseases of tomato caused by phytoplasma in Iran and all over the world. In infected tomato plants, leaves turn to purple and buds become large, swollen and green that fail to develop normally and do not set fruit. For detection of the causal pathogen, we collected some samples from leaves and swollen buds of infected tomato plants as well as from leaves of some weeds in tomato fields such as *Orobanche purpurea*, *Reseda sp*, *Amaranthus sp*, *Xanthium strumarium*. Total DNA from all collected samples was extracted. To survey the pathogen in the body of some insects that are known as vectors, samples of two species that appeared more frequently in the tomato fields (leafhoppers and whiteflies) were collected and the total DNA was extracted. Molecular detection of the big bud phytoplasma in all samples was carried out by PCR using two specific primers (P1/P7). The results showed that in infected samples of the tomato plants, a DNA fragment of 1800 bp in size was multiplied while in the control plant no DNA fragment was observed when the PCR products were visualized in the gel electrophoresis. The same size specific DNA fragment was detected only in PCR reaction coming from leafhoppers and samples of the Orbanche plant parasite. This research showed that the pathogen can be transmitted by leafhoppers and Orbanche while it cannot be transmitted by seeds and whiteflies. This molecular approach could be an effective and fast method for detection and survey of phytoplasma and other fastidious plant pathogens.

Keywords: Phytoplasma, BigBud, tomato, Molecular detection, PCR

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) یک گیاه زراعی خوراکی است که عمده‌تاً در قرن گذشته محبوبیت و اهمیت یافته است. سطح زیرکشت گوجه‌فرنگی در استان زنجان ۱۲۱۸ هکتار و کل تولید گوجه‌فرنگی این استان ۸۱۹۶۵ تن در سال ۱۳۹۹-۱۴۰۰ و متوسط عملکرد آن ۶۷۲۸۹ کیلوگرم در هکتار می‌باشد (Agricultural Statistics, 2021). گوجه‌فرنگی (*L. esculentum*)، از خانواده Solanaceae بومی نواحی گرمسیری آمریکا بوده و از پرو به ایتالیا و سپس به کلیه نقاط دنیا انتشار یافته‌است (Heydari et al. 2004). گوجه‌فرنگی زراعی عضوی از جنس نسبتاً کوچک *Lycopersicon* در خانواده بسیار پرتنوع و دارای اهمیت اقتصادی Solanaceae می‌باشد. این گروه به خانواده تجاریزی نیز معروف است. گوجه‌فرنگی زراعی را اغلب *L. Karsten* و *L. esculentum* Mill می‌نامند، البته از نام‌های دیگری (*L. lycopersicum*، *L. Solanum lycopersicon*) نیز استفاده شده است (Heydari et al. 2004). بیماری تورم جوانه گوجه-فرنگی (Big Bud) به علت داشتن علائم مشخصی از جمله تورم

جوانه، ارغوانی شدن و تغییر رنگ برگ‌ها و تشکیل جوانه‌های گل که هرگز تبدیل به گل‌های معمولی نخواهند شد به نام بیماری تورم جوانه گوجه‌فرنگی نامیده شده‌است (Ghandi et al. 2003). این بیماری اولین بار در سال ۱۹۳۳ از استرالیا گزارش شد (Seemuller et al. 1994). در بررسی‌های انجام شده در کشورهای مختلف، ناقلین طبیعی متعددی که همگی زنجبرک هستند برای این بیماری گزارش شده‌اند که مهمترین آنها عبارتند از: *Neotalitrus tenellus*, *Batrachomorphus Punctatus*, *Euscelis*, *Orosius argentatus*, Baker (Shaw et al. 1993).

فیتوپلاسم‌ها، بیمارگرهای گیاهی هستند که با بیماری‌های مختلفی در سراسر جهان مرتبط می‌باشند (McCoey et al. 1989; Kumari et al. 2023). فیتوپلاسم‌ها انگل اجباری بافت آوند آبکش گیاهان بوده و با حشرات منتقل می‌شوند (Bertaccini et al. 1998; Inaba et al. 2023). حشرات ناقل فیتوپلاسم‌ها، حشراتی مانند: حشرات خانواده‌های جوربالان (Hemiptera)، زنجبرک‌ها (leafhopper) و پسپیل‌ها هستند که از آوند آبکشی تغذیه می‌کنند (McCoey et al. 1989). فیتوپلاسم‌ها از طریق روده

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: طی سالهای ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ از مزارع گوجه‌فرنگی شهرستان زنجان بازدید و نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌های دارای علائم واضح بیماری و مشکوک (در مراحل اولیه آلودگی) جمع‌آوری و نیز نمونه سالم گیاه گوجه‌فرنگی نیز به عنوان شاهد انتخاب شدند. اندام‌های بیمار شامل برگ، میوه، ساقه و گل آلوده بود. حشرات موجود در مزارع آلوده که مشکوک به انتقال بیماری از بوته‌های آلوده به سالم بودند نیز به روش دستی و با استفاده از تور حشره‌گیری جمع‌آوری گردید. از جمعیت علف‌های هرز غالب مزارع گوجه‌فرنگی شامل: گل جالیز، تاج خروس، اسپرک، پیچک و توق نیز نمونه‌هایی تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید.

استخراج DNA از گوجه‌فرنگی و علف‌های هرز: با استفاده از روش تغییر یافته ژانک از برگ‌های بوته‌های سالم و بوته‌های کاملاً آلوده که هیچگونه میوه‌ای تولید نکرده بود و نیز از بوته‌های آلوده‌ای که میوه تشکیل داده‌اند DNA استخراج شد (Zhang et al. 1998). برای این منظور مقدار ۰/۲۵ گرم از بافت مورد نظر در هاون استریل با ازت مایع کوبیده شد و درون لوله‌های میکروپایپت ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. لوله‌های محتوی بافت پودر شده پس از افزودن بافر CTAB به میزان ۸۰۰ میکرولیتر در حمام آبگرم در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. محتویات لوله در این مدت چند دقیقه یکبار ورتکس شد. ۶۰۰ ماکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل به نسبت ۱:۲۴ به لوله‌ها اضافه و ورتکس شد. لوله‌ها با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ شد. فاز شفاف رویی هر لوله برداشته شد و به یک لوله سترون دیگر اضافه شد. هم حجم محتویات هر لوله ایزوپروپانول سرد افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در فریزر ۲۰- قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه در سانتیفریوژ با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. فاز رویی مایع حذف شد. به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد به منظور شستشوی لوله‌ها اضافه شده و با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ شد. فاز رویی حذف شد. به هر لوله ۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و رسوب در آن حل شد و به عنوان DNA الگو در آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای

و غدد بزاقی حشره وارد بزاق شده و در آنجا از طریق تغذیه حشره از گیاه وارد آوندآبکش گیاه می‌شود (Lee et al. 1993). علائم بیماری تقریباً ۷ روز بعد از تغذیه حشره ناقل از گیاه در گیاه ظاهر می‌شود که البته این مدت بستگی به فیتوپلاسم و گونه گیاه متفاوت بوده و بین ۶-۲۴ ماه می‌تواند به طول بیانجامد (Mccoy et al. 1989). مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داده که فیتوپلاسم‌های مختلف موجود در آوندها دارای اشکال میله‌ای شکل هستند (Lee et al. 1993) و تفکیک آنها براساس ریخت‌شناسی و ساختمانی غیرممکن است (Mccoy et al. 1989). فیتوپلاسم‌ها در گیاهان با علائمی مانند اختلال در رشد گیاه خود را نشان می‌دهند. علائم معمول شامل: جارویی شدن (کپه‌ای شدن شاخه‌ها)، سبز شدن قسمت‌های غیر سبزل، پیچ خوردن (رشد طولی ساقه‌ها)، تشکیل فیبر ثانویه فشرده در ریشه، قرمز شدن ساقه و برگ، زردی، زوال و کوتولگی گیاه و نکروز آوند است (Mccoy et al. 1989). از روش‌های مولکولی می‌توان برای شناسایی عامل بیماری استفاده کرد. تعیین وجود فیتوپلاسم‌ها در آوندهای یک گیاه به روش میکروسکوپی الکترونی توجیهی مناسب برای نسبت دادن یک بیماری ناشناخته به این عوامل است ولی این روش وقت‌گیر و پرهزینه است. همچنین می‌توان وجود فیتوپلاسم‌ها را بوسیله میکروسکوپ نوری و با استفاده از رنگ‌آمیزی هایکروماتیک (رنگ‌آمیزی دینس) و فلورسنت تایید کرد (Davis et al. 2001).

با توجه به اهمیت اقتصادی و سطح بالای کشت و کار گوجه فرنگی در استان زنجان و در کشور و خسارت‌های شدید گزارش شده از بروز بیماری در نقاط مختلف استان و با عنایت به اینکه در رابطه با این بیماری تحقیق جامع و کاملی در کشور انجام نگرفته است و همچنین به دلیل مشکلات روش‌های معمول شناسایی و ردیابی عامل بیماری، لازم است تا روش مولکولی سریع و دقیقی برای شناسایی عامل بیماری ارایه شود. علاوه بر این ردیابی عامل بیماری در مزارع، بررسی روشهای انتقال بیماری توسط بذر و نیز بررسی نقش احتمالی علف‌های هرز، گیاهان انگل و حشرات در انتقال بیماری می‌تواند در اتخاذ روش‌های مدیریت بیماری راهگشا باشد.

طول ۱۸۰۰ جفت باز نتیجه می‌دهد (Eric Verdin et al. 2003). پرایمرها در شرکت تکاپوزیست سنتز شدند. DNA استخراج شده به عنوان DNA الگو برای تکثیر با جفت آغازگر P1/P7 استفاده شد.

واکنش PCR: برای انجام PCR محلول پایه واکنش تهیه شد. حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. محتویات هر لوله واکنش شامل ۵/۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱ میکرولیتر dNTP، ۳ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱۲/۱ میکرولیتر آب مقطر ۲ بار استریل بود. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل: مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (۱ چرخه)، مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (۳ چرخه)، اتصال در دمای ۵۳ درجه به مدت ۵۰ ثانیه (۳ چرخه) و گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه (۳ چرخه)، مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه (۱ چرخه) و نگهداری در دمای ۴ درجه بود. برای بررسی آزمون PCR، از محصولات PCR برگ، جوانه گل، بافت میوه، بذر گیاه و حشره به عنوان محلول پایه الکتروفورز گردید و ژل بدست‌آمده را در داخل دستگاه Gel Documentation گذاشته و از آن عکسبرداری شد.

نتایج و بحث

آلودگی در مراحل ابتدایی رشد گیاه با کوتاه ماندن بوته، رشد زیاد و انبوه شدن قسمت‌های انتهایی گیاه، زردی و عقیمی کامل بوته‌های آلوده همراه بود. رشد انبوه و فشردگی قسمت‌های انتهایی نبات نتیجه کاهش فاصله‌ی بین برگ‌ها و رشد جوانه‌های جانبی آن است. بوته‌های آلوده برگ‌های بسیار کوچکتر از حالت طبیعی داشتند (شکل ۱). براساس مطالعات انجام یافته کمبود هورمون سیتوکینین علائم زردی را روی بوته‌های آلوده تشدید می‌نماید (Davis et al. 2001).

برگ‌ها علائمی بصورت ارغوانی شدن رگ‌برگ‌ها و ضخیم شدن رگ‌ها (شکل ۱)، پیچ خوردن برگ‌ها در نتیجه تجمع آنتوسیانین‌ها و ریزبرگی را نشان دادند که در نتیجه بهم خوردن هورمون سیتوکینین می‌باشد (Davis et al. 2001).

استخراج DNA از بافت میوه‌های گوجه‌فرنگی دارای علائم بیماری و جوانه‌های متورم گل نیز از روش تغییر یافته ژانک استفاده شد (Zhang et al. 1998). استخراج DNA کل از بذر گوجه‌فرنگی دارای علائم بیماری با استفاده از روش تغییر یافته روش دلاروزا انجام گرفت (De la Rosa et al. 2002). برای استخراج DNA کل از علف‌های هرز جمع‌آوری شده از مزارع از روش ژانک استفاده شد (Zhang et al. 1998). در این روش از تمام قسمت‌های ساقه و گل‌برگ گل جالیز، از برگ‌های تاج خروس، از برگ‌های اسپرک، برگ‌های پیچک و برگ‌های توق استخراج DNA انجام شد.

استخراج DNA از حشرات ناقل: استخراج DNA کل از زنجبرک و مگس سفید بر اساس روش تغییر یافته مارگاریتوپلوس انجام گرفت (Margarito poulos et al. 2003). ابتدا حشرات در هاون چینی خرد شدند سپس ۴۷۵ میکرولیتر بافر استخراج اضافه شد (۲۵ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K) و در دمای اتاق به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. ۸۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولاریته، ۶۰ ماکرولیتر CTAB ۱۰ درصد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد جهت حذف پلی‌ساکاریدها قرار داده شد. سه مرحله محلول کلروفرم + ایزوآمیل‌الکل + فنول و ۲۰ ماکرولیتر آب مقطر به منظور کاهش غلظت NaCl اضافه شد و در سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دقیقه قرار گرفت. فاز رویی کشیده شد و هم حجم محلول بالایی ایزوپروپانول سرد اضافه شد و سانتریفیوژ شد. شستشوی رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد (۱۰ دقیقه درون سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ در دقیقه) انجام شد. الکل تخلیه شد و نمونه تا خشک شدن DNA در محیط باز گذاشته شد. پنجاه ماکرولیتر آب مقطر اضافه و نمونه در یخچال نگهداری شد. برای تهیه بافر استخراج از حشره ۱۰ cc Tris-HCl ۰/۵ مولار، ۲۵ cc EDTA ۰/۱ مولار و ۵ cc EDTA ۰/۵ مولار استفاده شد. برای ارزیابی کیفی DNA استخراج شده از ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد. برای ردیابی عامل بیماری در گیاه و حشره و بذر گیاه از آزمون PCR با جفت پرایمر P1(Forward): AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT و P7 (Revers): CGTCCTTCATCGGCTCTT استفاده شد که محصولی به



شکل ۱- سمت چپ: علائم بیماری تورم جوانه روی بوته‌های آلوده گوجه‌فرنگی سمت راست: تغییر رنگ برگ‌های بوته‌های آلوده در اثر بیماری
Fig 1. Left: Symptoms of Big bud disease on infected tomato plants Right: colour changes of leaf of infected plants

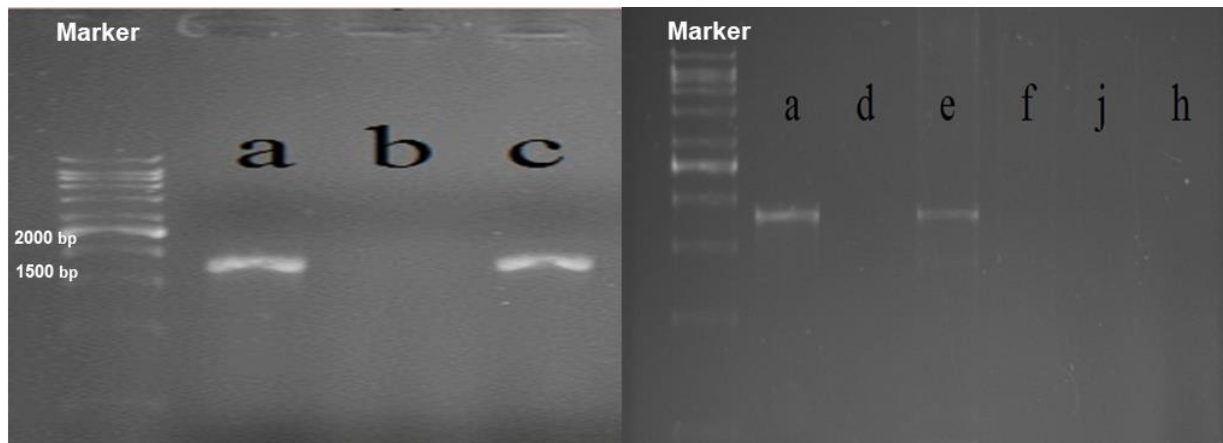


شکل ۲- سمت راست: تشکیل گیاه جدید روی جوانه‌های گل از علائم بیماری فیتوپلاسمایی گوجه‌فرنگی سمت چپ: بدشکلی میوه، سفید شدن درون میوه و عدم تشکیل بذر در میوه‌های آلوده به بیماری

Fig 2. Right: The formation of a new plant on flower buds is a sign of the phytoplasmic disease of tomatoes Left: Fruit deformation, changes in flesh colour and lack of seed formation in infected tomato fruits

علائم بیماری روی میوه‌های تشکیل شده بصورت بدشکلی و دفرمه شدن، تغییر طعم طبیعی میوه، تاوولی شدن پوست میوه و سفت شدن میوه ظاهر می‌گردد. در برش عرضی میوه گوجه-فرنگی تغییر شکل بافت میوه و عدم تشکیل بذر مشاهده گردید (شکل ۲). این علائم نیز با علائمی که شاوو در سال ۱۹۹۳، سیمولر در سال ۱۹۹۴، لی در سال ۲۰۰۰ و وردین در سال ۲۰۰۳ گزارش داده‌اند مطابقت دارد. برای اطمینان از استخراج محصول استخراج DNA برگ بوته‌های بطور کامل بیمار، برگ بوته‌های دارای علائم اولیه بیماری، برگ سالم، جوانه‌های گل، بافت میوه و بذر در ژل آگارز و بافر TAE^۱x الکتروفورز شد.

علائم بیماری روی جوانه‌های گل به صورت تورم جوانه، تغییر رنگ، عدم تشکیل میوه، بزرگ شدن کاسبرگ‌هایی که در انتها به هم چسبیده‌اند، تبدیل کاسه گل به یک جسم کیسه مانند، تحلیل رفتن مادگی و پرچم‌ها و سبز شدن گلبرگ‌ها می‌باشد که بر اثر تجمع سطوح بالای سیتوکینین در قسمت‌های گل می‌باشد و همچنین هورمون سیتوکینین می‌تواند در توسعه کلروپلاست و ممانعت از شکستن کلروفیل موثر باشد (Davis et al. 2001). علائم جدیدی از بیماری شامل تشکیل گیاه جدید روی جوانه‌ها نیز در بررسی‌های میدانی مشاهده گردید که تاکنون در منابع گزارش نشده است (شکل ۲).



شکل ۳- سمت چپ: الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز، a برگ بوته کاملاً آلوده، b برگ بوته سالم (به عنوان کنترل منفی) و c برگ بوته با آلودگی متوسط، M نشانگر (1kb ladder) سمت راست: الکتروفورز محصول PCR، a کنترل مثبت، d علف هرز پیچک صحرایی، e علف هرز گل جالیز، f علف هرز اسپرک، j علف هرز توق، h علف هرز تاج خروس، M نشانگر (1kb ladder)

Figure 3. left: Electrophoresis of PCR product on agarose gel: (a) completely infected plant leaf, (b) healthy plant leaf (as negative control) and (c) moderate plant leaf, M: 1kb ladder. **Right:** Electrophoresis of PCR product on agarose gel (a) positive control, (d) *Convolvulus arvensis* (e) *Orobanche* Sp. (f) *Reseda*. (j) *Xanthium strumarium* (h) *Amaranthus* sp. (M) 1kb ladder

آبکشی ندارند قادر به رشد نمی‌باشند و به همین دلیل عوامل بیماری‌زای فیتوپلاسمایی با بذر منتقل نمی‌شوند (Bertaccini et al. 1998).

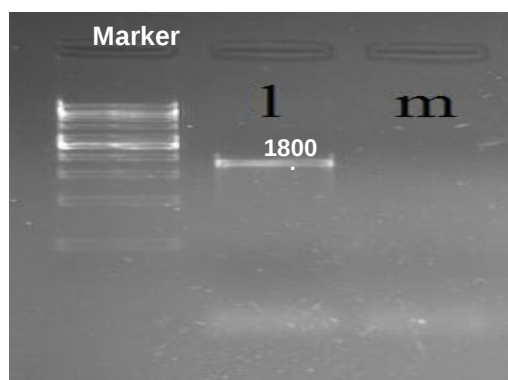
ردیابی مولکولی عامل بیماری در فون علف‌های هرز مزارع

علف‌های هرز گل جالیز که از مزارع شهرستان زنجان جمع‌آوری شده بودند علائم ظاهری بیماری تورم جوانه را نشان نمی‌دادند. با روش ژانک DNA کل از علف‌های هرز فوق استخراج شد و با پرایمر P1/P7 تکثیر شد (Zhang et al. 1998). نتایج بدست آمده از الکتروفورز محصول PCR (شکل ۳) تنها در علف هرز گل جالیز باند موردنظر (۱۸۰۰ جفت باز) مشاهده شد و در علف‌های هرز دیگر که مورد آزمایش قرار گرفتند هیچ باندهی مشاهده نشد. در صربستان برای اولین بار عامل بیماری فیتوپلاسمایی از روی علف هرز hiera با نام علمی *Hieracium albiflorum* گزارش شده‌است (Mitrovic et al. 2011). در هند برای اولین بار عامل فیتوپلاسمایی با نشانه‌های ریزبرگی و جاروی جادوگر از روی علف هرز داتوره با نام علمی *Datura stramonium* مشاهده شد (Sing et al. 2013). در برزیل عامل بیماری فیتوپلاسمایی از روی honeyweed با نام علمی

ردیابی مولکولی عامل بیماری از برگ بوته‌های آلوده و سالم

در الکتروفورز محصول PCR حاصل از DNA کل از برگ‌های بوته کاملاً آلوده (هیچ میوه‌ای تشکیل نشد)، بوته نیمه‌آلوده (دارای علائم بیماری و دارای میوه) و بوته سالم (به عنوان کنترل منفی) با جفت آغازگرهای اختصاصی فیتوپلاسمای (P1/P7) باندهای ۱۸۰۰ جفت باز مشاهده شد. در این پژوهش گیاه سالم به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. اندازه باند تشکیل شده در شکل ۳ با گزارش قندی و همکاران در سال ۲۰۰۳ و وردین و همکاران در سال ۲۰۰۳ با پرایمر P1/P7 مطابقت دارد. با انجام PCR محصول DNA کل استخراج شده از بافت میوه، جوانه متورم گل و بذر میوه، باند ۱۸۰۰ جفت باز تنها در بافت میوه و جوانه متورم گل مشاهده شد. در PCR محصول DNA کل استخراج شده از بذر میوه هیچ باندهی مشاهده نشد. در این آزمایش از گیاه سالم به عنوان کنترل منفی (e) و گیاه آلوده به عنوان کنترل مثبت (d) استفاده شد.

در این پژوهش برای اولین بار شناسایی فیتوپلاسمای بر روی جوانه متورم گل و بافت میوه انجام گرفته و امکان ردیابی مولکولی عامل بیماری در بافت جوانه گل و میوه نیز فراهم شده‌است. نتایج پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد به دلیل این که فیتوپلاسمای انگل اجباری بافت آوند آبکش گیاهان هستند، در بافت‌هایی که آوند



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR، l زنجرک، m مگس سفید، M نشانگر اندازه (1kb ladder)

Fig 4. Gel electrophoresis of PCR products from (1) *Orosius argenatatus* (m) whitefly. M 1 Kb size ladder

نتایج این پژوهش نشان داد با استفاده از تکنیک‌های مولکولی علاوه بر تشخیص و ردیابی سریع عامل بیماری در مزرعه، امکان ردیابی سریع عوامل سخت‌کشت مانند فیتوپلاسم در سایر گیاهان میزبان و حشرات ناقل نیز فراهم می‌شود. بررسی امکان استفاده فیتوپلاسمای عامل بیماری از سایر گونه‌های علف‌های هرز موجود در مزارع گوجه‌فرنگی به عنوان میزبان‌های ثانویه نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. ردیابی فیتوپلاسم در یک گونه از زنجرک‌ها (*Orosius argenatatus*) که فراوانی جمعیتی بیشتری در مزارع گوجه‌فرنگی استان داشت، نشان داد که این گونه می‌تواند به عنوان ناقل مهم در انتقال بیماری عمل نماید. با این حال احتمال دارد گونه‌های دیگری از زنجرک‌ها نیز در انتقال عامل بیماری نقش داشته باشند.

Leonurus sibiricus گزارش شده است (Flores et al. 2013). این اولین گزارش از عامل بیماری فیتوپلاسمایی از روی علف هرز گل جالیز با نام علمی *Orobancha ramos* L. در ایران می‌باشد.

ردیابی مولکولی عامل بیماری از فون حشرات مزارع گوجه‌فرنگی

حشره غالب بین بوته‌های گیاه آلوده مگس سفید از خانواده Aleyrodidae بود که DNA کل آن استخراج شد و محصول PCR آن هیچ بانندی را نشان نداد (شکل ۴). با توجه به اینکه حشره غالب در مزارع آلوده مگس سفید است، این اولین بار است که ردیابی مولکولی عامل بیماری فیتوپلاسمایی بر روی مگس سفید انجام می‌گیرد. در تکثیر قطعات اختصاصی فیتوپلاسم در DNA زنجرک‌های *Orosius argenatatus* جمع‌آوری شده از روی بوته‌های آلوده گوجه‌فرنگی با جفت آغازگرهای P1/P7 باند اختصاصی ۱۸۰۰ جفت باز (شکل ۴) مشاهده شد. نتایج این پژوهش در مورد گزارش عامل بیماری فیتوپلاسمایی از روی زنجرک *Orosius a.* با گزارش‌های قبلی همخوانی دارد. زنجرک گزارش شده در این پژوهش ناقل احتمالی این بیماری می‌باشد. عامل فیتوپلاسمایی از روی زنجرک‌های *Batrachomorphus punctatus*، *Orosius a.*، *Neoliturus tenellus*، گزارش شده است (Shaw et al. 1993).

منابع

- Agricultural Statistics. The level of harvest and production of crops in the Iran country, 2021. P:51. (In Farsi with English Abstract) available at : <https://ajkhz.ir/main/index.php/download/akj1-keshvar-1399-1400.pdf>
- Anfoka, G. H., Khalil, A. B., & Fattash, I. (2003). Detection and molecular characterization of a phytoplasma associated with big bud disease of tomatoes in Jordan. *Journal of Phytopathology*, 151(4), 223-227. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00709.x>
- Bertaccini, A., Voráčková, Z., Vibio, M., Fránová, J., Navrátil, M., Špak, J., & Nebesářová, J. (1998). Comparison of phytoplasmas infecting winter oilseed rape in the Czech

Republic with Italian Brassica phytoplasmas and their relationship to the aster yellows group. *Plant Pathology*, 47(3), 317-324. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00229.x>

Davis, R. E., & Dally, E. L. (2001). Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of flavescentia dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroups. *Plant Disease*, 85(7), 790-797. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.7.790>

De la Rosa, R., James, C., & Tobutt, K. (2002). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in

- the Oleaceae. *Molecular Ecology Notes*, 2(3), 265-267. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00217.x>
- Flôres, D., & Bedendo, I. P. (2013). A subgroup 16SrIII-B phytoplasma identified in honeyweed plants with leaf deformation in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 8, 59-62 <https://doi.org/10.1007/s13314-013-0095-9>
- Ghandi H. Anfoka, Amjad B. Khalil and Fattash I. (2003). Detection and Molecular Characterization of a Phytoplasma Associated with Big Bud Disease of Tomatoes in Jordan. *J. Phytopathology* 151: 223-227. (In Persian)
- Inaba, J., Shao, J., Trivellone, V., Zhao, Y., Dietrich, C. H., Bottner-Parker, K. D., Ivanauskas, A., & Wei, W. (2023). Guilt by Association: DNA Barcoding-Based Identification of Potential Plant Hosts of Phytoplasmas from Their Insect Carriers. *Phytopathology*®, 113(3), 413-422. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-22-0323-R>
- Kumari S., Sertkaya G., Krishnan N., Pandey K.K., Singh J., Çağlayan K., Rao G.P., Bertaccini A. 2023. Phytoplasma Diseases of Major Crops, Trees, and Weeds dedicated to the analysis of plant pathogenic phytoplasmas across Asia. 2: 19-44.
- Lee, I., Davis, R., Sinclair, W., DeWitt, N., & Conti, M. (1993). Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms detected in *Ulmus* spp. in the United States and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. *Phytopathology*, 83(8), 829-833.
- Lee, I.-M., Davis, R. E., & Gundersen-Rindal, D. E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 221-255. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.221>
- Margaritopoulos, J., Bacandritsos, N., Pekas, A., Stamatis, C., Mamuris, Z., & Tsitsipis, J. (2003). Genetic variation of *Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae) sampled from different hosts and localities in Greece. *Bulletin of entomological research*, 93(5), 447-453. <https://doi.org/10.1079/BER2003260>
- McCoy, R. (1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. *The mycoplasmas*, 545-640.
- Mitrović, M., Toševski, I., Krstić, O., Cvrković, T., Krnjajić, S., & Jović, J. (2011). A strain of phytoplasma related to 16SrII group in *Picris hieracioides* L. in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement).
- Qeshm R. and Dr. Kafi M. (1378), *Industrial Tomatoes from Planting to Harvest*, Mashhad University Press. (In Farsi)
- Seemüller, E., Schneider, B., Mäurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.-H., Firrao, G., Avinent, L., & Sears, B. B. (1994). Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(3), 440-446. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-440>
- Shaw, M., Kirkpatrick, B., & Golino, D. (1993). The beet leafhopper-transmitted virescence agent causes tomato big bud disease in California. *Plant Disease*, 77(3), 290-295 <https://doi.org/10.1094/PD-77-0290>
- Singh, N., Tiwari, R., & Upadhyaya, P. (2013). A strain of phytoplasma related to 16SrVI group in *Datura stramonium* in India. *Greener Journal of Biological Sciences*, 3, 253-257.
- Verdin, E., Salar, P., Danet, J.-L., Choueiri, E., Jreijiri, F., El Zammam, S., Gelie, B., Bove, J. M., & Garnier, M. (2003). 'Candidatus *Phytoplasma phoenicium*' sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 833-838. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02453-0>
- Zhang, Y.-p., Uyemoto, J., & Kirkpatrick, B. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71(1), 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)