



## اولین گزارش از آلودگی طبیعی بالنگ (*Citrus medica* L.) به *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* در ایران

مهدی آزادوار<sup>۱\*</sup>، سمیه رنجبر<sup>۱</sup>، موسی نجفی نیا<sup>۱</sup>، و ک. بارانوال<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، جیرفت، ۷۸۶۱۵-۱۱۵، ایران.  
<sup>۲</sup> واحد ویروس شناسی گیاهی، بخش بیماری شناسی گیاهی، انستیتو تحقیقات کشاورزی هندوستان، دهلی نو، ۱۱۰۰۱۲، هندوستان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۴/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۰۸

### چکیده

'*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' قبلاً به عنوان عامل بیماری جاروک لیموترش (*Citrus aurantifolia* L.)، بکرایی (*Citrus* sp.) و گریپ فروت (*Citrus paradisi* Macfad) از ایران گزارش شده است. در حال حاضر تقریباً تمامی باغات لیموترش استان های هرمزگان، سیستان و بلوچستان و کرمان به این بیماری مبتلا هستند. این بیماری روی سایر ارقام مرکبات در ایران گزارش نشده است. در سال ۱۳۸۹ علائم جاروک روی تعدادی درخت بالنگ (*Citrus medica* L.) در برخی از باغات مرکبات جنوب استان کرمان، ایران مشاهده شد. به منظور ردیابی و شناسایی فیتوپلاسمای عامل بیماری، استخراج اسید نوکلئیک از رگبرگ میانی برگ درختان بالنگ دارای علائم جاروک، درختان بالنگ سالم بدون علائم (شاهد منفی) و درختان لیموترش دارای علائم جاروک (شاهد مثبت) انجام گرفت. در آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز آشیانه ای (nested PCR) با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی فیتوپلاسمای P1/P7 و R16F2n/R16R2، قطعه با اندازه مورد انتظار در نمونه های بالنگ و لیموترش دارای علائم جاروک تکثیر شد. در نمونه های بالنگ سالم این باند تکثیر نشد. توالی نوکلئوتیدی باند حاصل از PCR در تمام نمونه ها یکسان و شامل ۱۲۵۰ جفت باز بود که ۹۹/۸٪ تشابه با توالی نوکلئوتیدی '*Ca. Phytoplasma aurantifolia*' نشان دادند. این اولین گزارش از آلودگی طبیعی بالنگ به فیتوپلاسمای در ایران است.

واژه های کلیدی: بالنگ، جاروک، فیتوپلاسمای، '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*'.

## مقدمه

مرکبات در برگیرنده گروه بزرگی از میوه‌ها شامل پرتقال، نارنگی، لایم، لیمو، گریپ‌فروت، دارابی، تانجلو، کامکوات، نارنج، سه‌برگ، بالنگ، سیترنج و سایر میوه‌ها می‌باشد. گسترش وسیع جغرافیایی و میزان بالای تولید مرکبات موجب شده است که این محصول از اهمیت اقتصادی زیادی در جهان برخوردار باشد (Ray, 2002). ایران با دارا بودن ۲۶۷ هزار هکتار و تولید بیش از ۴/۲ میلیون تن مرکبات از نظر میزان تولید و سطح زیرکشت در بین کشورهای تولید کننده مرکبات مقام هفتم را به خود اختصاص داده است و این جایگاه نسبتاً خوبی در بین ۱۴۰ کشور مرکبات خیز دنیا است.

حدود ۴۰ بیماری ناشی از عوامل مختلف بیماریزای گیاهی از مرکبات گزارش شده است (Alizadeh Aliabadi, 2009). بیماری جاروک لیموترش (witches' broom disease of lime)، ناشی از فیتوپلاسمای 'Ca. Phytoplasma aurantifolia'، یکی از بیماریهای مهم مرکبات است که از اهمیت قرنطینه‌ای داخلی و خارجی برخوردار است. این بیماری تاکنون از کشورهای عمان و ایران و عمدتاً از درختان لیموترش گزارش شده است (Bové, 2000). جواهری و رحیمیان (Djavaheri & Rahimian, 2004) و باقری و همکاران (Bagheri et al., 2010) بترتیب بکرایی و گریپ فروت را نیز

بعنوان میزبان طبیعی عامل این بیماری در ایران گزارش کرده اند. این پاتوژن از سایر ارقام مرکبات در ایران گزارش نشده است. عامل بیماری جاروک مرکبات پارازیت اجباری و غیرقابل کشت در محیط کشت های مصنوعی بوده و لذا ردیابی آن در گیاه میزبان عمدتاً با واکنش زنجیره ای پلیمرز و استفاده از آغازگرهای عمومی فیتوپلاسمای انجام می گیرد (Zhao et al., 2010).

طی بازدیدهای بعمل آمده از باغات مرکبات جنوب استان کرمان در نیمه دوم سال ۱۳۸۹ تعدادی درخت بالنگ (Citrus medica L.) دارای علائم جاروک در برخی از باغات مرکبات و عمدتاً در نزدیکی درختان لیموترش مبتلا به جاروک مشاهده شد. این تحقیق با هدف ردیابی فیتوپلاسمای احتمالی عامل این بیماری با استفاده از تکنیک PCR و شناسایی دقیق و تعیین ارتباط آن با عامل بیماری جاروک لیموترش از طریق تعیین توالی قطعه ژنومی تکثیر شده 16S rRNA انجام گرفت.

## مواد و روش ها

نمونه برداری از درختان آلوده: طی نیمه دوم سال ۱۳۸۹ در بازدید از باغات مرکبات جنوب استان کرمان، تعدادی درخت بالنگ دارای علائم جاروک مشاهده شد. نمونه برداری از برگ‌های شاخه های دارای علائم جاروک انجام

گرفت. نمونه برداری از درختان بالنگ سالم و درختان لیموترش مبتلا به جاروک، بترتیب به عنوان شاهد منفی و شاهد مثبت، انجام گرفت. نمونه های جمع آوری شده با ذکر مشخصات لازم در کیسه های پلاستیکی مجزا نگهداری و در شرایط مناسب به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج DNA از بافت گیاهی: استخراج DNA از رگبرگ میانی برگهای جمع آوری شده با استفاده از کیت آزمایشگاهی استخراج DNA از گیاه (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

تعیین توالی نوکلئوتیدی محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز و آنالیز داده ها: به منظور شناسایی دقیق فیتوپلاسمای عامل بیماری، محصولات PCR مستقیماً برای تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی تکثیر شده مورد استفاده قرار گرفتند. داده های حاصل از تعیین توالی نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار بیولوژیکی BioEdit (Hall, 1999) و اطلاعات موجود در بانک ژن (NCBI)

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. شناسایی گونه و تعیین گروه فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بالنگ با استفاده از داده های حاصل از تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی تکثیر شده و با کمک نرم افزار *iPhyClassifier* (Zhao et al., 2009) انجام گرفت.

استخراج DNA از بافت گیاهی: استخراج DNA از رگبرگ میانی برگهای جمع آوری شده با استفاده از کیت آزمایشگاهی استخراج DNA از گیاه (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز آشیانه ای (nested PCR): ردیابی عامل بیماری در نمونه های جمع آوری شده با واکنش زنجیره ای پلیمرز آشیانه ای و استفاده از جفت آغازگرهای عمومی فیتوپلاسمای P1/P7 (Schneider et al., 1995) در مرحله اول و جفت آغازگر R16F2n/R16R2 (Gundersen & Lee, 1996) در مرحله دوم که منجر به تکثیر ناحیه ای از ژن 16S rRNA می گردد انجام گرفت. هر واکنش PCR شامل 1x 200، 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>، Tris-Hcl PCR buffer، ۲۰۰ μM dNTPs از آغازگرها، ۲/۵ واحد آنزیم Taq polymerase (Fermentas) و ۵ میکرولیتر DNA در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر بود. پروفیل دمایی ترموسایکلر بصورت: ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۹۴ °C به مدت ۳۵ ثانیه، ۵۵ °C به مدت یک دقیقه (۵۶ °C برای مرحله دوم) و

## نتایج و بحث

علائم جاروک و همچنین درختان لیموترش مبتلا به بیماری جاروک، قطعه ای با اندازه حدود ۱/۸ کیلوباز در مرحله اول و با اندازه حدود ۱/۲ کیلوباز در مرحله دوم تکثیر شد. در نمونه‌های درخت بالنگ سالم هیچ گونه بانندی تکثیر نشد (شکل ۲). جفت آغازگر عمومی فیتوپلازما R16F2n/R16R2 قادر به تکثیر قطعه ای در حدود ۱۲۵۰ جفت باز از ناحیه ژنی 16S rRNA فیتوپلازماها می باشد ( Zhao et al., 2009 and (2010).

علائم بیماری جاروک در درختان بالنگ بصورت کوچک و زرد شدن برگها، ایجاد جوانه های جانبی فراوان، کوتاه شدن فاصله میانگره ها و تولید شاخه های جاروک مانند مشاهده شد (شکل ۱). در جاروک ها خار، گل و یا میوه مشاهده نشد. این علائم با علائم بیماری فیتوپلازمایی جاروک لیموترش مشابه است. در آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز آشیانه ای با استفاده از آغازگرهای عمومی فیتوپلازما، از نمونه های جمع آوری شده درختان بالنگ دارای



شکل ۱- علائم بیماری جاروک در درخت بالنگ شامل کوچک و زرد شدن برگها، کاهش فاصله میان گره‌ها و تولید جوانه های جانبی فراوان.

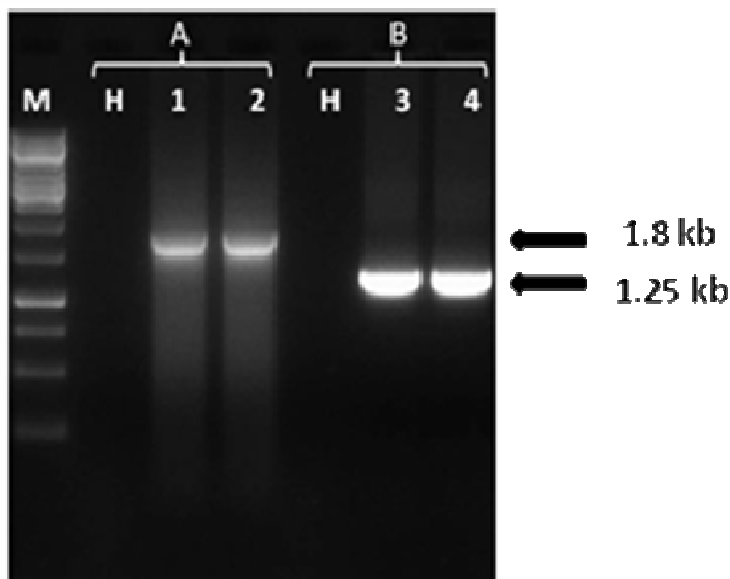
**Figure 1- Citron witches' broom symptoms including yellow and little leaves, reducing internodes and proliferation of axillary buds.**

بود که ۹۹٪ تشابه با توالی نوکلئوتیدی فیتوپلازمای همراه با جاروک لیموترش

توالی نوکلئوتیدی باند حاصل از PCR در تمام نمونه ها یکسان و شامل ۱۲۵۰ جفت باز

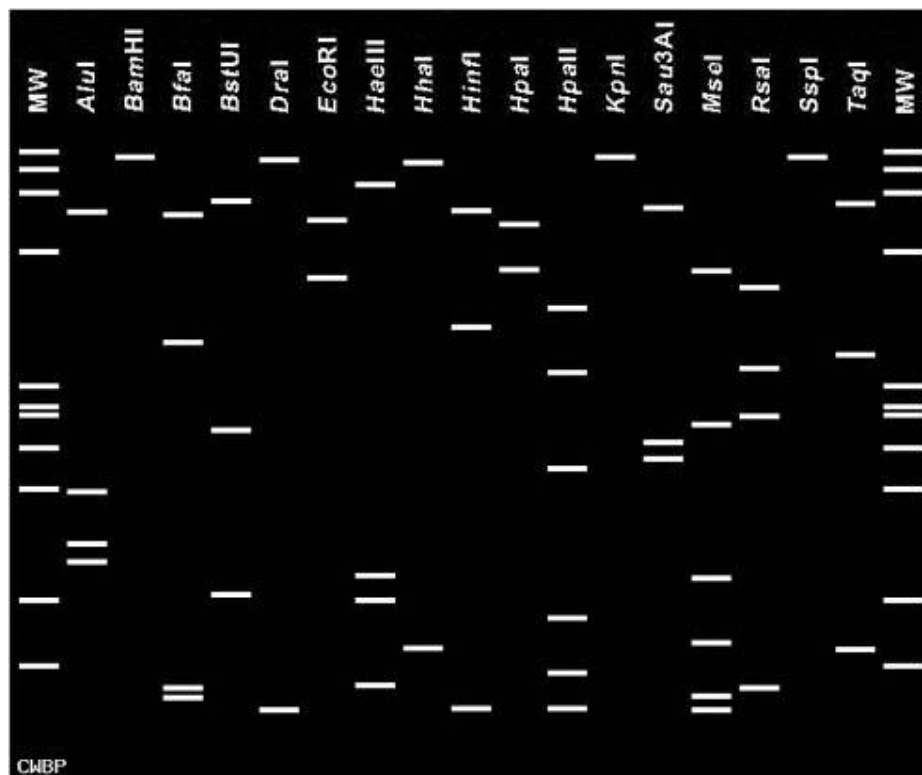
جنوب استان کرمان ماهیت فیتوپلاسمایی داشته و بعنوان فیتوپلاسمای گروه 16SrII-C و گونه 'Ca. Phytoplasma aurantifolia' شناسایی و معرفی می‌شود. این فیتوپلازما قبلاً به عنوان عامل بیماری جاروک لیموترش (Bové *et al.*, 2000)، جاروک بکرایی (Djavaheri & Rahimian, 2004) و جاروک گریپ فروت (Bagheri, *et al.*, 2010) از ایران گزارش شده است. این اولین گزارش از آلودگی طبیعی بالنگ به فیتوپلاسمای گروه 16SrII-C (Ca. 'Phytoplasma aurantifolia') در ایران است.

نشان (GenBank accession no. EF186828) دادند. با استفاده از نرم افزار *iPhyClassifier* مشخص شد که فیتوپلاسمای عامل جاروک بالنگ در ایران دارای ۹۹/۸٪ تشابه با استرین گونه 'Ca. Phytoplasma aurantifolia' (GenBank accession no. AJ293216) می‌باشد. الگوی مجازی برش آنزیمی توالی حاصل از این فیتوپلازما (شکل ۳) بیشترین شباهت (۹۹٪) را با استرین رفرنس زیرگروه C از گروه 16SrII (GenBank accession no. AJ293216) دارد. براین اساس بیماری جاروک بالنگ در



شکل ۲- ژل آگارز حاصل از الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز درختان بالنگ و لیموترش مبتلا به جاروک. A: با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 ، B: با استفاده از جفت آغازگر R16F2n/R16R2 ( ۱ و ۳: بالنگ مبتلا به جاروک، ۲ و ۴ : لیموترش مبتلا به جاروک، H: بالنگ سالم، M: مارکر ۱ کیلو جفت باز).

**Figure 2-** Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from phytoplasma infected citron and mexican lime. A) using P1/P7 primer pair, B) using R16F2n/R16R2 primer pair. (Lanes 1 and 3: citron witches' broom; Lanes 2 and 4: lime witches' broom; H: healthy citron; M: 1 kb DNA ladder).



شکل ۳- الگوی مجازی حاصل از هضم آنزیمی قطعه ۱/۲۵ کیلو بازی ناحیه ژنی 16S rDNA محدود به توالی بین جفت آغازگر R16F2n/R16R2 فیتوپلاسمای عامل جاروک بالنگ (CWBP) با استفاده از ۱۷ آنزیم محدودگر در ژل آگارز ۳٪.

Figure 3- Virtual RFLP pattern derived from *in silico* digestion of 1.25 kb R16F2n/R16R2 primer primed sequence of citron witches' broom phytoplasma (CWBP) using 17 restriction endonucleases. Restriction fragments were resolved by *in silico* electrophoresis through 3 % agarose gel. MW:  $\Phi$ X174 DNA-*Hae*III digestion.

#### منابع

- Alizadeh Aliabadi A (2009). Citrus greening disease caused by 'Candidatus Liberibacter spp.'. Educational Services and Technology Office, Agricultural Research, Education and Extension Organization. Tehran, Iran.
- Bagheri AN, Faghihi MM, Salehi M, Samavi S, Khanchezar A (2010). First report of natural infection of grapefruit trees to lime witches' broom phytoplasma. Proc. of 19<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress. 31 July – 3 August. Tehran, Iran. pp. 409.
- Bové JM, Danet JL, Bananej K, Hassanzadeh N, Taghizadeh M, Salehi M, Garnier M (2000). Witches' broom disease of lime in Iran. In: Proceedings of the 14<sup>th</sup> Conference of IOCV, pp. 207–212. IOCV, Riverside (US).
- Djavaheeri M, Rahimian H (2004). Witches' broom of Bakraee (*Citrus reticulata* hybrid) in Iran. Plant Disease 88: 683.

- Gundersen DE, Lee IM (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144-51.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-8.
- Ray PK (2002). *Breeding Tropical and Subtropical Fruits*. Narosa Publishing House, New Delhi, India.
- Schneider B, Seemüller E, Smart CD, Kirkpatrick BC (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas, In: Razin R, Tully JG, (Eds.). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, Vol. I. Academic Press, San Diego, CA, USA. pp. 369-380.
- Zhao Y, Wei W, Davis RE, Lee IM (2010). Recent advances in 16S rRNA gene based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy, In: Weintraub PG, Jones P (Eds.). *Phytoplasmas Genomes, Plant Hosts and Vectors*. CAB International, UK. pp. 64-92.
- Zhao Y, Wei W, Lee IM, Shao J, Suo X, Davis RE (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2582-2593.

**First report of natural infection of Citron (*Citrus medica* L.) by ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’ in Iran**

Azadvar M.<sup>1\*</sup>, Ranjbar S.<sup>1</sup>, Najafinia M.<sup>1</sup>, Baranwal V.K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Protection Research, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of South of Kerman, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Jiroft, 78615-115, Iran.

<sup>2</sup>Plant Virology Unit, Division of Plant Pathology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, 110 012, India.

**Abstract**

‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’ has been reported as causal agent of witches’ broom disease in Mexican lime (*Citrus aurantifolia* L.), Bakraee (*Citrus* sp.) and Grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad) trees in Iran. Almost all of the lime orchards in Hormozgan, Sistan & Baluchistan and Kerman provinces are infected by this pathogen now. The pathogen is not naturally associated with other citrus varieties in Iran. During 2010, a several number of Citron (*Citrus medica* L) trees in commercial citrus orchards in Southern Kerman, Iran with witches’ broom symptoms were found. In order to detection and identification of the associated phytoplasma, nucleic acid was extracted from leaf midribs of symptomatic citron plants showing witches’ broom symptoms. Healthy citron plants were used as negative control. Mexican lime trees infected with ‘*Ca. Phytoplasma aurantifolia*’ were used as positive control. Nested PCR analysis of symptomatic citron as well as mexican lime trees showing witches’ broom symptoms produced an amplicon of the expected size using phytoplasma universal p1/p7 primer pair in first step and 16F2n/16R2 in second step. The healthy citron trees did not. Sequences obtained from all the amplicons were identical and consisted of 1250 bp nucleotide which had a high sequence similarity (99.8%) with ‘*Ca. Phytoplasma aurantifolia*’. This is the first report of a natural phytoplasma infection on citron in Iran.

**Keywords:** ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’, Citron, *Phytoplasma*, witches’ broom.

\* Corresponding Author: Azadvar M.

Tel:09133480153

Email: mehdiiazadvar@gmail.com