مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

گزارش کوتاه علمی

شناسایی و تعیین ویژگی‌های مولکولی فیتوپلاسمای همراه زردی و ریز برگی هلو در استان‌های خراسان رضوی و شمالی

سعید طریقی*[1]، مجتبی دهقان نیری[2]، عبادالله عبادی [3]

[1]دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[2] دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[3]دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۶

چکیده

در بازدیدهای تابستان ۱۳۹۶ از باغات درختان میوه در استان‌های خراسان رضوی و شمالی، علائم زردی و ریز برگی در درختان هلو در سطح باغات دیده شد. نمونه‌های دارای علائم فوق از باغات جمع‌آوری و برای شناسایی عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند. عامل بیماری به وسیله پیوند به نهال‌های سالم هلو انتقال یافت و در گیاه مایه‌زنی شده با پیوند، علائم زردی و ریز برگی مشاهده شد. ردیابی عامل بیماری توسط آزمون‌های دو مرحله‌ای PCR با جفت آغازگرهای P1/P7 (دور اول) و R16F2n/R16R2 (دور دوم) صورت گرفت. قطعه‌های حدود ۱۲۵۰ جفت بازی حاصل از PCR دو مرحله‌ای توالی‌یابی شدند. مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در NCBI توسط نرم افزار BLAST و بررسی چندشکلی طولی قطعات برشی مجازی ناحیه تکثیر شده، نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با زردی هلو در استان‌های خراسان رضوی و شمالی شباهت بالایی با *Candidatus* Phytoplasma phoenicium مربوط به گروه جاروک نخود کبوتر (Pigeon pea witches broom) یا 16SrIX آر ان ای ریبوزومی دارند. این اولین گزارش از بیماری زردی و ریز برگی هلو و تعیین ویژگی‌های فیتوپلاسمای همراه با آن در این مناطق می‌باشد.

کلمات کلیدی: *فیتوپلاسما، آنالیز مولکولی، گروه 16SrIX.*

*نویسنده مسئول: سعید طریقی تلفن: 05138805815 Email: starighi@um.ac.ir

مقدمه

فیتوپلاسماها بیمارگر باکتریایی گیاهان هستند که سبب کاهش عملکرد اقتصادی در چندین محصول یکساله و چندساله از جمله درختان چوبی و میوه می‌شوند (Bertaccini & Duduk, 2009). فیتوپلاسماها محدود به آوندهای آبکش گیاهان هستند که از ابتدای کشف آن در سال ۱۹۶۷، بیماری‌های مختلفی در دنیا با این موجودات گزارش شده است (Lee *et al*., 2000). فیتوپلاسماها در طبیعت توسط زنجرک-های برگی، زنجرک‌های بوته‌ای و پسیل بین گیاهان منتقل می‌شوند (Weintraub & Beanland, 2006).

هلو (*Prunus persica*) یکی از محصولات مهم در جهان و ایران می‌باشد. درختان میوه هسته‌دار نظیر هلو به چندین بیماری مرتبط با فیتوپلاسماها حساس هستند. در جنوب لبنان، گیاهان هلو و شلیلی که به طور قابل توجه به فیتوپلاسما با علائم ازدیاد جوانه آلوده بودند با استفاده از PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2 مورد ارزیابی قرار گرفتند و *Ca*. Phytoplasma phoenicium در ارتباط با بیماری فیتوپلاسمایی هلو و شلیل در این مناطق گزارش گردید (Abou-Jawdah *et al*., 2009). این فیتوپلاسما که متعلق به گروه جاروک نخود کبوتر (16SrIX) می‌باشد سبب خسارت به شمار زیادی از درختان بادام در ایران و لبنان شده است (Abou-Jawdah *et al*., 2002; Salehi *et al*., 2006). تنوع ژنتیکی استرین‌های *Ca*. Phytoplasma phoenicium همراه با درختان هلو و شلیل در لبنان با تفاوت در طول قطعات برشی (RFLP) محصول PCR بررسی و حضور دو گروه جدید F و G را از گروه 16SrIX اعلام کردند (Molino Lova *et al*., 2011). در آنالیز مولکولی نمونه‌های به دست آمده از باغات هلو در مناطق مرکزی و شمال غرب ایران با استفاده از توالی‌یابی بخشی از ناحیه 16S rRNA و ناحیه فاصله انداز بین ژنی 16S-23S rDNA مشاهده شده که *Ca*. Phytoplasma aurantifolia، *Ca*. Phytoplasma solani و *Ca*. Phytoplasma trifolii در این مناطق شایع هستند (Zirak *et al*., 2010). در بررسی نمونه‌های جمع آوری شده از درختان هلوی دارای علائم زردی و ریز برگی در استان کردستان، آنالیزهای مولکولی توالی به دست آمده توسط PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2، نزدیکی این توالی را با *Ca*. Phytoplasma phoenicium نشان داد (Ghayeb zamharir, 2014). در تحقیق حاضر در مناطقی از باغات استان‌های خراسان رضوی و شمالی علائم زردی و ریز برگی هلو مشاهده گردید. در این راستا بررسی‌های مولکولی با استفاده از PCR دو مرحله‌ای با جفت

آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2 و بررسی چنـد شـکلی طـولی قطعـات برشـی مجـازی (Virtual-RFLP) جهت شناسـایی فیتوپلاسـمای همراه با زردی و ریز برگـی هلـو در ایـن منـاطق انجام شد.

نمونه‌های دارای علائم زردی و ریز برگـی، از درختان هلو باغات استان‌های خراسان رضـوی و شـمالی جمـع آوری گردیـد. نمونـه‌هـا جهـت استفاده در تهیه پیونـدک آلـوده در آزمـایش‌هـای انتقال عامل بیماری و استخراج DNA کل جهـت آزمون‌های مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند.

برای انتقال عامل بیماری با استفاده از روش پیوند جانبی، از سرشاخه‌های ظریف نمونـه‌هـای بیماری جمع آوری شده بـه عنـوان پیونـدک و از نهال‌های سالم هلو به عنوان پایـه اسـتفاده شـد و پس از انجام پیوند، نهال‌ها در شرایط گلخانـه بـا دوره نـوری ۱۵ سـاعت روشـنایی و ۹ سـاعت تـاریکی بـا دمـای ۲۶±۲ °C بـه مـدت ۵ مـاه نگهداری شدند.

جهـت بررسـی‌هـای مولکـولی، اسـتخراج DNA از نمونه‌ها به روش Zhang *et al.* (1998) انجام شد. از آزمون PCR جهت بررسـی نمونـه-های DNA از نظـر وجـود فیتوپلاسـما، اسـتفاده شـد. در آزمـون PCR دو مرحلـه‌ای از جفـت آغازگرهای P1/P7 (Schneider *et al.*, 1995) در مرحله اول و R16F2n/R16R2 (Gundersen & Lee, 1996) در مرحله دوم استفاده گردید. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر بود که شامل یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت پایـه ۱۰ پیکومولار، دو میکرولیتر DNA الگو با غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم و ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس PCR آمپلیکون[۱] که با افزودن آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. محصولات PCR به دست آمده در ژل آگارز ۱/۲ درصد بـه همـراه نشانگر DNA بارگذاری و به مدت یک ساعت با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولـت الکتروفـورز شـدند. رنـگ آمیزی ژل آگـارز بـا رنـگ DNA green viewer انجام و عکسبرداری از ژل با اسـتفاده از دسـتگاه ژل داکیومنت[۲] انجام شد.

توالی یابی قطعه‌های به دست آمـده توسـط شرکت بایونیر[۳] کـره جنـوبی انجـام شـد. سـپس توالی‌ها بـا اسـتفاده از نـرم افـزار BioEdit ver. 7.0.9.0 اصلاح گردید. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار BLAST[۴] موجود در NCBI بـا تـوالی موجـود در ژن بانـک مقایسـه گردیـد. همچنین درخت فیلوژنی با استفاده از تـوالی‌هـای

[۱] Ampliqon

[۲] Gel Documentation

[۳] Bioneer

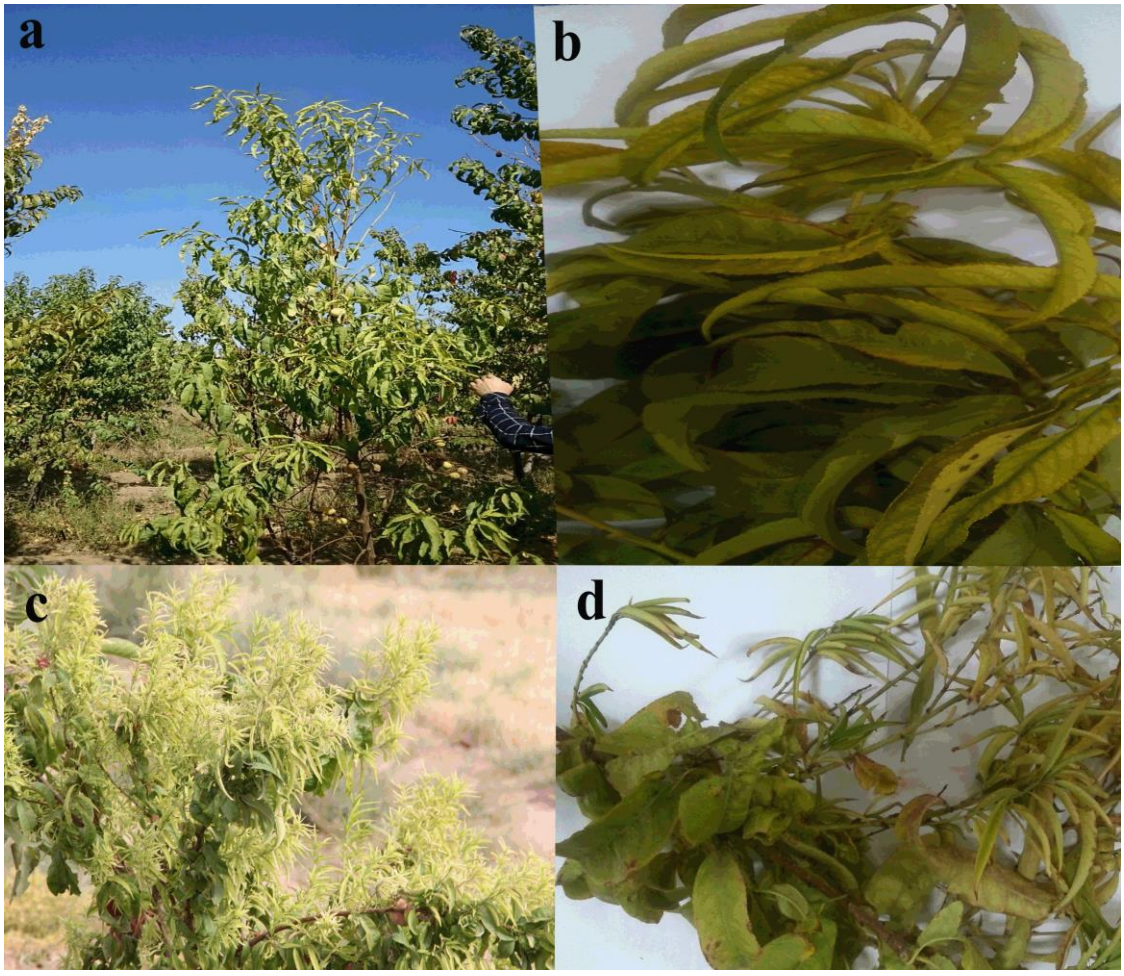
[۴] Basic local alignment search tool

به دست آمده و توالی‌های موجود در ژن بانک توسط نرم افزار MEGA 5.05 ترسیم گردید.

چند شکلی طولی قطعات برشی مجازی (Virtual-RFLP) با استفاده از برنامه iphyclassifier (Zhao *et al*., 2009) انجام شد که ناحیه تکثیر شده با جفت آغازگر R16F2n/R16R2، در جدایه‌های زردی هلو و فیتوپلاسماهای مربوط به گروه 16SrIX با ۱۷ آنزیم شامل AluI، BamHI، BfaI، BstUI، DraI، EcoRI، HaeIII، HhaI، HinfI، HpaI، HpaII، KpnI، Sau3AI، MseI، RsaI، SspI و TaqI بطور شماتیک برش داده شده و جایگاه فیتوپلاسمای مورد بررسی در گروه مورد نظر تعیین گردید.

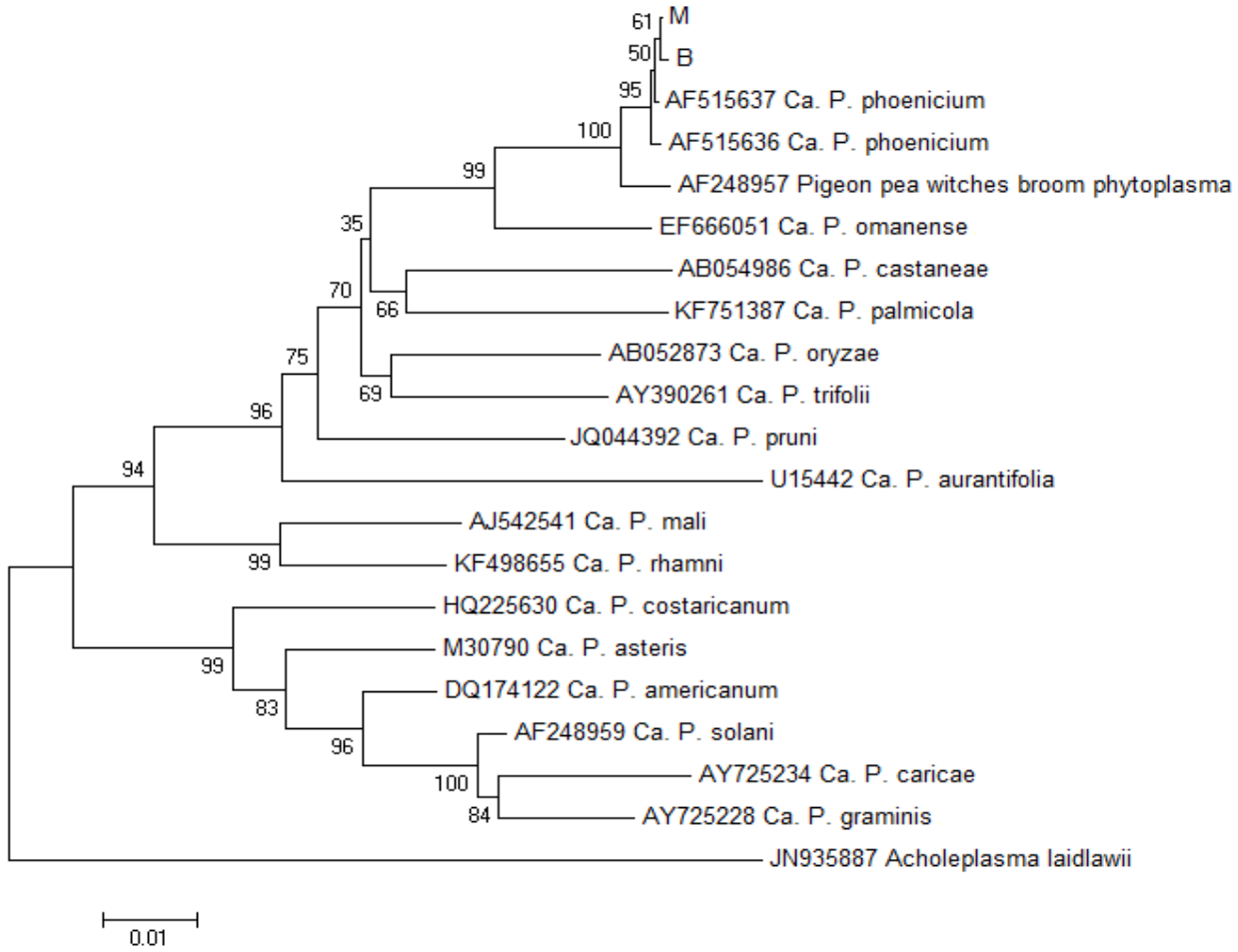
در این بررسی نمونه‌هایی با علائم مشکوک به بیماری فیتوپلاسمایی در باغات آلوده استان-های خراسان رضوی و شمالی مشاهده گردید. علائم بیماری شامل زردی و ریز برگی همراه با پر رشدی شاخه‌ها بود (شکل ۱). درختان آلوده ضعیف‌تر از سایر درختان بوده و در نتیجه با محصول کمتر و یا عدم تولید محصول همراه می‌باشند. همچنین در انتقال با پیوند نمونه‌های دارای علائم زردی به نهال‌های سالم هلو، بعد از پنج ماه نشانه‌های زردی و ریز برگی مشاهده گردید.

پس از انجام آزمون PCR مستقیم با جفت آغازگر P1/P7 و PCR مرحله دوم با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 از نمونه‌های دارای علائم، قطعاتی به ترتیب حدود ۱۸۰۰ و ۱۲۵۰ جفت باز مشاهده شد. در همین راستا هیچ باندی از نمونه‌های تهیه شده از درختان سالم و بدون علائم (کنترل منفی) مشاهده نگردید. محصولات PCR حاصل از جفت آغازگر R16F2n/R16R2 تعیین توالی گردید و با استفاده از نرم افزار BLAST موجود در NCBI با سایر توالی‌های موجود در ژن بانک مقایسه شد. نتایج نشان داد که توالی‌های مورد بررسی (GenBank accession no. MH084725, MH084726) بیشترین شباهت را با فیتوپلاسماهای گروه 16SrIX (جاروک نخود کبوتر) دارند. توالی‌های به دست آمده در ژن بانک بر اساس درخت فیلوژنی ترسیم شده با توالی‌های مربوط به گروه-های مختلف و همچنین توالی‌های مربوط به گروه 16SrIX، توالی‌های مورد بررسی در کنار *Candidatus* Phytoplasma phoenicium طبقه بندی شدند (شکل ۲). همچنین آنالیز RFLP مجازی توالی تکثیر شده حاصل از جفت آغازگر R16F2n/R16R2 نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با زردی هلو در مناطق مورد بررسی بیشترین شباهت را با *Ca*. Phytoplasma phoenicium مربوط به زیرگروه B در گروه 16SrIX (ضریب تشابه ۰/۹۷) دارد.



شکل ۱- علائم بیماری زردی و ریز برگی درختان هلو در باغات استان‌های خراسان رضوی و شمالی: A و B، علائم زردی و ریز برگی در باغات مشهد، C و D، علائم زردی و ریز برگی در در باغات بجنورد.

Figure 1- Symptoms of leaf stunting and yellowing in peach trees in Razavi and North Khorasan provinces: A, B: leaf stunting and yellowing symptoms in Mashhad orchards, C, D: leaf stunting and yellowing symptoms in Bojnord orchards.



شکل ۲- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی‌های نواحی 16S rRNA فیتوپلاسماهای جدا شده از زردی هلو در استان‌های خراسان رضوی (M) و شمالی (B) و توالی‌های موجود در ژن بانک NCBI با روش Neighbor joining و با برنامه MEGA5. اعداد ثبت شده در محل انشعاب‌ها نشانگر درصد تایید خوشه بندی با ۱۰۰۰ تکرار نمونه برداری (bootstrap) است. خط نشانه تغییر تعداد نوکلئوتید در هر محل است.

Figure 2- phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene nucleotide sequences of phytoplasmas. The tree was constructed by the neighbor-joining method using MEGA5 Software. The numerals represent the confidence level (bootstrap) from 1000 resampling. The bar indicates number of nucleotide changes per site.

مشاهده علائم در باغ‌های مورد بررسی و همچنین انجام آزمون‌های آزمایشگاهی اثبات کننده حضور بیمارگر فیتوپلاسمایی روی درختان هلو می‌باشد که می‌تواند تهدید جدی برای

درختان هلو و سایر درختان میوه هسته‌دار در این مناطق و حتی استان‌های مجاور باشد. در همین راستا شناسایی ناقل و یافتن راهکارهای مناسب برای مقابله با این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در ژن بانک، نشان دهنده شباهت بالای توالی‌ها با *Ca*. Phytoplasma phoenicium می‌باشد. این فیتوپلاسما ابتدا در ارتباط با جاروک بادام در لبنان و ایران معرفی گردید (Verdin *et al*., 2003) که به عنوان یک بیماری گسترده و مخرب از این مناطق گزارش شده بود (Abou-Jawdah *et al*., 2002; Salehi *et al*., 2006; Ghayeb Zamharir, 2011). در سال‌های اخیر نیز این فیتوپلاسما به عنوان همراه بیماری فیتوپلاسمایی زردی هلو از ایران و لبنان گزارش گردید (Abou-Jawdah *et al*., 2009; Ghayeb Zamharir, 2014). چندین استرین مختلف *Ca*. Phytoplasma phoenicium شناسایی شده‌اند که این استرین‌ها در زیرگروه-های B، D، F و G از گروه 16SrIX قرار گرفته-اند (Molino Lova *et al*., 2011). زیر گروه B در حال حاضر همچنین برای زیر گروه D نیز تعیین شده است (Quaglino *et al*., 2015). در مناطق مورد بررسی امکان وجود سایر فیتوپلاسماهای مربوط به گروه‌های دیگر، در درختان هلو نیز وجود دارد که نیازمند مطالعات گسترده‌تر جهت دستیابی به این مهم می‌باشد. با توجه به گسترش بیماری در مناطق مختلف ایران پیش بینی می‌شود این فیتوپلاسما یک ناقل حشره‌ای موثر داشته باشد. در نتیجه پژوهش‌های بیشتر جهت یافتن راهکارهای مناسب برای کنترل این بیماری الزامی به نظر می‌رسد. در این راستا می‌بایست در مناطق مختلف از نهال‌های تایید شده جهت کاشت استفاده کرد و اقدامات لازم جهت محدود کردن گسترش بیماری به مناطق مختلف را در دستور کار قرار داد. همچنین بررسی سایر درختان میوه هسته‌دار از نظر وجود فیتوپلاسما نیز از پژوهش‌های مهم پیش‌رو در این مناطق می‌باشد تا با تخمین پراکنش فیتوپلاسماها بر روی این میزبان‌ها اقدامات لازم جهت کاهش خسارت برنامه‌ریزی و انجام شود.

منابع

Abou-Jawdah Y, Karakashian A, Sobh H, Martini M, Lee IM (2002). An epidemic of almond witches'-broom in Lebanon: classification and phylogenetic relationship of the associated phytoplasma. Plant Disease 86: 477–484.

Abou-Jawdah Y, Sobh H, Akkary M (2009). First Report of Almond Witches Broom Phytoplasma (‘Candidatus Phytoplasma Phoenicium’) Causing a Severe Disease on Nectarine and Peach Trees in Lebanon. EPPO Bulletin 39: 94-98.

Ghayeb Zamharir M (2011). Phytoplasmas Associated with Almond Witches’ Broom Disease: An Overview. African Journal of Microbiology Research 5: 6013-6017.

Ghayeb Zamharir M (2014). Molecular Study of a New Disease of Peach in Iran Associated with a Phytoplasma. Advances in Microbiology 2014: 20-24.

Gundersen DE, Lee IM (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathologia Mediterranea 35:144-151.

Lee IM, Davis RE, Gundersen Rindal DE (2000). Phytoplasmas: phytopathogenic molli-cutes. Annual Review of Microbiology 56: 1593–1597.

Molino Lova M, Quaglino F, Abou-Jawdah Y, Choueiri E, Sobh H, Alma A, Tedeschi R, Casati P, Bianco PA (2011). Identification of new 16SrIX subgroups, -F and -G, among 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' strains infecting almond, peach and nectarine in Lebanon. Phytopathologia Mediterranea 50: 273-282.

Quaglino F, Kube M, Jawhari M, Abou-Jawdah Y, Siewert C, Choueiri E, Sobh H, Casati P, Tedeschi R, Lova MM, Alma A, Bianco PA (2015). ‘Candidatus Phytoplasma phoenicium ’associated with almond witches’-broom disease: from draft genome to genetic diversity among strain populations. BMC microbiology 148: 1-15.

Salehi M, Izadpanah K, Heydarnejad J (2006). Characterization of a new almond witches’ broom phytoplasma in Iran. Journal of Phytopathology 154: 386–391.

Schneider B, Seemeider E, Smart CD, Kirkpatrick BC (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas, In: Razin S, Tully JG (Eds.), Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology. Academic Press., San Diego, pp. 369-380.

Verdin E, Salar P, Danet JL, Choueiri E, Jreijiri F, El Zammar S, Gelie B, Bove JM, Garnier M (2003). Candidatus Phytoplasma phoenicium sp. nov. a new phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. International Journal of Systematic Bacteriology 53: 833-838.

Weintraub PG, Beanland Le A (2006). Insect vectors of phytoplasmas. Annual Review of Entomology 51: 91–111.

Zhang YP, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytoplasmas for PCR assay. Journal of Virological Methods 71: 45-50.

Zhao Y, Wel 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.

Zirak L, Bahar M, Ahoonmanesh A (2010). Molecular Characterization of Phytoplasmas Aasociated with Peach Diseases in Iran. Journal of Phytopathology 158: 105-110.

Identification and molecular characterization of the phytoplasma associated with leaf stunting and yellowing disease in Razavi and North Khorasan provinces

Tarighi S. [1*], Dehghan Niri M.[2], Ebadi E.[3]

[1]Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[2]Ph.D. Student of plant pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[3]Ph.D. Student of plant pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

In 2017, leaf stunting and yellowing were observed on twigs and branches of stone fruit trees in production regions in Razavi and North Khorasan provinces of Iran. For diagnosis of disease and identification of the causal agent, symptomatic leaf samples were collected in these orchards and were carried to the laboratory. The disease agent was successfully transmitted by grafting from naturally symptomatic samples to peach (Prunus persica) seedlings. Total DNA was extracted from plant samples and indexed by nested PCR using phytoplasma generic primers, P1/P7 and R16F2n/R2. PCR products were sequenced and the nucleotide sequences were compared with those of other phytoplasmas in GenBank and analyzed by virtual restriction fragment length polymorphism (RFLP). The phytoplasmas associated with leaf stunting and yellowing disease in Razavi and North Khorasan provinces were identified as members of the 16SrIX group or Pigeon pea witches broom (Candidatus Phytoplasma phoenicium). This is the first report of leaf stunting and yellowing disease and characterization of associated phytoplasma in these regions.

Keywords: *Phytoplasma, molecular analysis, 16SrIX group.*

* Corresponding Author: Tarighi S. Tel: 05138805815 Email:starighi@um.ac.ir