

شناسایی مولکولی فیتوپلاسمای همراه جاروک سنجد از برخی مناطق استان آذربایجان شرقی

اباصلت حاجی‌زاده^۱، رضا خاکور^۲، نعمت سخندان بشیر^۲ و بهرام باغبان^۳

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه تبریز.

۲- استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه تبریز.

۳- دانشیار گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه تبریز.

* مسئول مکاتبه E-mail: khakvar@tabrizu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۹

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۴

چکیده

در بازدیدهای سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ علایم مشابه بیماری‌های فیتوپلاسمایی از قبیل زرد شدن برگ‌ها، ریزبرگی، کاهش فاصله میان‌گره‌ها و جاروک در تعدادی از درختان سنجد در استان آذربایجان شرقی مشاهده شد. در همین راستا، پس از نمونه‌برداری، از رگبرگ درختان سنجد مشکوک به آلودگی با فیتوپلاسمای از درختان بدون علایم به طور جداگانه DNA کل استخراج گردید. نمونه‌های DNA از نظر آلودگی به فیتوپلاسمای با آزمون واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (PCR) مستقیم و آزمون PCR دو مرحله‌ای (Nested-PCR) مورد بررسی قرار گرفتند و قطعات مورد انتظار به ترتیب با اندازه‌های تقریبی ۱۶۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز از ۱۴ نمونه دارای علایم بیماری تکثیر شد در حالی که قطعه‌ای از نمونه‌های سالم در PCR تکثیر نیافت. به منظور تعیین جایگاه فیلوژنتیکی، محصول PCR یکی از نمونه‌های مثبت تعیین ترادف شد. جستجو در بانک جهانی ژن و آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که ترادف به دست آمده با فیتوپلاسمای گروه زردی مینا (16SrI) طبقه‌بندی می‌شود. بر اساس علائم بیماری، تکثیر قطعه‌ی مورد انتظار در آزمون PCR و آنالیز فیلوژنتیکی، بیماری جاروک سنجد در استان آذربایجان شرقی ماهیت فیتوپلاسمایی دارد و فیتوپلاسمای همراه متعلق به گروه RNA ریپوزومی 16SrI می‌باشد. این اولین گزارش از وجود بیماری جاروک سنجد از استان آذربایجان شرقی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: جاروک، زردی مینا، سنجد، فیتوپلاسمای.

مقدمه

شیوه‌ی پایا و تکثیری منتقل می‌شوند. شناسایی، مطالعه و طبقه‌بندی این موجودات، به دلیل غیر قابل کشت بودن آنها براساس خصوصیات مورفولوژیکی و نیز بیوشیمیایی مشکل و یا غیرممکن می‌باشد. شناسایی آنها در بیش از دو دهه اخیر براساس ویژگی‌های زیستی نظیر بروز علائم روی گیاهان آلوده، انتقال با پیوند، دامنه‌ی میزبانی گیاهی، ارتباط آنها با ناقلین حشره‌ای و بررسی میکروسکوپ الکترونی بوده است. ولی این روش‌ها پرحمت، وقت‌گیر و به امکانات زیادی نیاز دارند (لی و همکاران ۲۰۰۰). از طرف دیگر، از این نوع بررسی‌ها اطلاعات دقیق در مورد تشخیص این پروکاریوت‌ها

فیتوپلاسمایا به سلسله‌ی پروکاریوت‌ها^۱ و رده‌ی مولیکوت‌ها^۲ تعلق دارند. این موجودات فاقد دیواره‌ی سلولی بوده، اندازه ژنوم آنها بین ۵۳۰ تا ۱۳۵۰ کیلو جفت باز و در صد سیتوزین و گوانین آنها پایین است (لی و همکاران ۲۰۰۰). فیتوپلاسمای محدود به آوندهای آبکش هستند و تاکنون موفق به کشت آنها در محیط کشت مصنوعی نشده‌اند. این بیمارگرها اغلب به وسیله‌ی زنجیرک‌های خانواده Cicadelidae و Fulgoridae به

¹Prokaryotes

²Mollicutes

این منظور، پس از شستشوی برگ‌های مورد نظر در آب مقطر استریل، ۰/۲ گرم از رگبرگ میانی با ازت مایع و در هاون چینی استریل پودر شده و هر نمونه در داخل یک ریز لوله ۱/۵ میکرولیتری استریل قرار داده شدند. پس از اضافه کردن ۸۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide)، لوله‌ها چند بار وارونه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتیگراد در داخل حمام آب‌گرم نگهداری شدند. سپس ریز لوله‌ها در دمای آزمایشگاه قرار داده شده و مقدار ۶۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت حجمی ۲۴ به ۱) به هر نمونه اضافه گردید. پس از چند بار وارونه کردن، در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۶ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد سانتریفوژ شدند.

برای رسوب دادن DNA کل، رونشین هر ریز لوله به یک ریز لوله استریل دیگر منتقل و پس از اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد (۲۰- درجه‌ی سانتیگراد)، به مدت هشت دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند. سپس قسمت رویی دور ریخته شد و قسمت ته نشین با ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد بوسیله سانتریفوژ به مدت سه دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه شستشو گردید. پس از دور ریختن اتانول، ریزلوله‌ها به صورت وارونه در دمای آزمایشگاه روی دستمال کاغذی تمیز خشک شدند. DNA کل استخراج شده در ۵۰ میکرولیتر آب د-یونیزه استریل حل گردیده و برای استفاده به عنوان دی-ان‌ای الگو در آزمون PCR در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

حاصل نمی‌شود. ولی امروزه روش‌های مولکولی شناسایی، توصیف، طبقه بندی و روابط شجره شناسی فیتوپلاسم‌ها را بهبود بخشیده است (اشنایدر و همکاران ۱۹۹۳، گاندرسون و همکاران ۱۹۹۴، هینریچ و همکاران ۲۰۰۱، لی و همکاران ۱۹۹۸).

از لحاظ بیماری‌زایی فیتوپلاسم‌ها یکی از عوامل محدودکننده‌ی تولید بسیاری از محصولات کشاورزی در سراسر دنیا می‌باشند و در گیاهان مختلف باعث بیماری می‌شوند (سی‌مولر و همکاران ۱۹۹۴). درخت سنجد با نام انگلیسی "زیتون روسی"^۱ از جمله میزبان‌های این موجودات می‌باشد به طوری که بیماری جاروک سنجد برای اولین بار در سال ۱۳۸۹ در برخی استان‌های کشور گزارش گردیده است (رشیدی و همکاران ۲۰۱۰). به دلیل اهمیت اقتصادی و دارویی سنجد در استان آذربایجان شرقی و مشاهده علائم جاروک در این درخت تحقیق حاضر به منظور ردیابی، ترادف‌یابی و بررسی جایگاه فیلوژنتیک عامل جاروک انجام گردید.

روش بررسی

نمونه‌برداری و استخراج DNA کل از درختان سنجد

از اوایل خرداد ماه سال ۱۳۹۱ لغایت آخر شهریورماه سال ۱۳۹۲ به تدریج و در فصول مختلف از مناطق استان آذربایجان شرقی بازدید به عمل آمد و با بررسی باغ‌ها و فضاهای سبز، از برگ و شاخه‌های جوان درختان سنجد دارای علائم مشکوک و سالم نمونه برداری انجام گرفت و موقعیت مکانی محل نمونه برداری به وسیله دستگاه موقعیت سنج ثبت گردید. نمونه‌ها در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شدند و DNA کل با روش CTAB (ژانگ و همکاران ۱۹۹۸) از رگبرگ‌های میانی برگ‌های درختان سنجد دارای علائم مشکوک و همچنین از نمونه‌های فاقد علائم استخراج گردید. برای

^۱Russian Olive

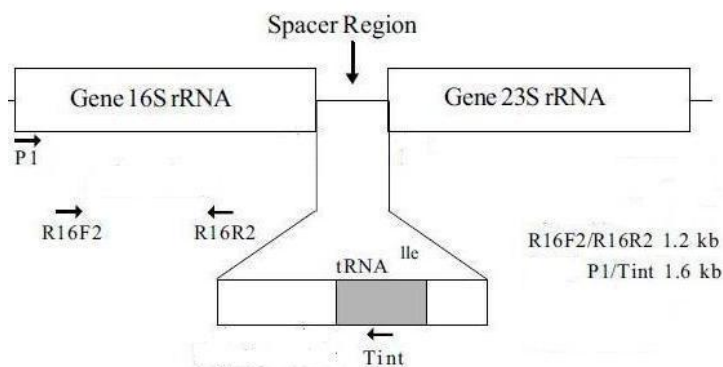
آزمون‌های PCR و Nested PCR

آزمون PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگر عمومی P1/Tint انجام گرفت (اسمارت و همکاران ۱۹۹۶). بدلیل وجود باندهای غیر اختصاصی در PCR مستقیم و نبود کیفیت لازم برای توالی‌یابی باندها، استفاده از PCR دو مرحله‌ای (Nested PCR) انجام گرفت (گوندرسون و لی ۱۹۹۶). در این تحقیق برای آزمون Nested PCR از محصول PCR مستقیم در مرحله‌ی اول استفاده گردید؛ سپس برای مرحله‌ی دوم از آغازگر R16F2/R16R2 برای تکثیر باند مورد نظر استفاده شد (گوندرسون و لی ۱۹۹۶). جفت آغازگر P1/Pint منجر به تکثیر قطعه‌ای با اندازه ۱۶۰۰ جفت باز شامل بخشی از ژن 16S rRNA و بخشی از ناحیه بین ژن‌های 16S rRNA و 23S rRNA می‌شود و جفت آغازگر R16F2/R1R2 به تکثیر قطعه‌ای از ژن 16S rRNA (شکل ۱) با اندازه تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز می‌انجامد. مشخصات آغازگرها در جدول شماره ۱ آمده است.

حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۱۵ میکرولیتر و شامل دو میکرولیتر (۵۰ نانو گرم) DNA الگو، ۲/۵ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP) با غلظت پایه‌ی ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر و ۱/۱ واحد از آنزیم تک

DNA پلیمرز بود که با افزودن مقدار لازم از آب مقطر دوبار تقطیر سترون در ابتدای تهیه واکنش حجم آن در نهایت پس از افزودن تمام اجزای واکنش به ۱۵ میکرو لیتر رسانده شد. سپس در دستگاه ترموسایکلر (BioRad) با چرخه‌ی دمایی مشتمل بر یک چرخه متشکل از 94°C به مدت چهار دقیقه واسرشتی اولیه (Initial denaturation)، ۳۵ چرخه شامل 94°C به مدت یک دقیقه (Denaturation)، 56°C (در PCR دو مرحله‌ای 58°C به مدت ۴۵ ثانیه (اتصال یا Annealing) و 72°C به مدت نود ثانیه (بسط یا Extension) و چرخه نهایی در 72°C به مدت پنج دقیقه (Final extension) قرار داده شد.

در آزمون PCR دو مرحله‌ای، ابتدا محصول PCR مستقیم با استفاده از آب دو بار تقطیر سترون به نسبت ۱:۳۰ رقیق گردید و دو میکرولیتر از آن به عنوان DNA الگو استفاده شد. شرایط PCR دو مرحله‌ای مانند شرایط PCR مستقیم بود. محصول PCR مستقیم و Nested PCR در ژل آگاروز ۱/۲ درصد و در بافر 0.5X (Tris borat EDTA) الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید از باندهای حاصل عکسبرداری شد (گرین و سم بروک ۲۰۱۲).



شکل ۱- جایگاه تکثیری آغازگرهای مورد استفاده در آزمون‌های Nested PCR, PCR (اسمارت و همکاران ۱۹۹۶).

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای بکار برده شده در آزمون های PCR مستقیم و دو مرحله‌ای.

نام آغازگر	توالی آغازگر	Tm (°C)	منطقه مورد تکثیر	منابع
P1(F)	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT	۵۸/۲	16SrRNA, SR	(اسمارت و همکاران ۱۹۹۶)
Tint(R)	TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C	۶۱/۸	16SrRNA, SR	(اسمارت و همکاران ۱۹۹۶)
R16F2	ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG	۶۳/۸۲	16SrRNA	(گوندرسون و لی ۱۹۹۶)
R16R2	TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC A	۶۳/۹۲	16SrRNA	(گوندرسون و لی ۱۹۹۶)

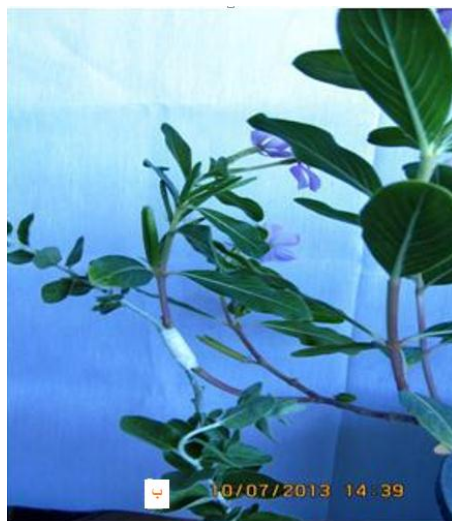
تولید قلمه از درختان دارای علائم

پس از ردیابی مولکولی فیتوپلاسما در نمونه‌های مشکوک، برای انجام آزمون‌های گلخانه‌ای و تهیه نهال آلوده از درختان سنجد آلوده دانشگاه تبریز (P29)، بزرگراه پاسداران (P21)، عون بن علی (P50)، گلپارک (P90) بزرگراه شهید کسایی تبریز (P31) و ایلخچی (P30) قلمه تازه تهیه و در گلخانه (دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰٪) کشت داده شد. ضمن آبیاری مرتب، پس از سپری شدن یک ماه از زمان قلمه زنی، علائم بوجود آمده هر پانزده روز یک بار بررسی و ثبت گردید. پس از سپری شدن ۱۰۰ روز از زمان کاشت، برای اثبات انتقال فیتوپلاسما از طریق قلمه، DNA کل استخراج گردید. آزمون PCR مستقیم و دو مرحله‌ای برای ردیابی فیتوپلاسما انجام گرفت. برای بررسی نتایج هر دو آزمون PCR، فرآورده‌های PCR الکتروفورز گردیدند.

مایه‌زنی و انتقال بیماری از طریق پیوند

برای انتقال با روش پیوند جانبی و پیوند ارتباطی از سرشاخه‌های ظریف و کوچک نمونه‌های آلوده به عنوان پیوندک و گیاه علفی پرپوش دارای ۶-۸ برگ به عنوان پایه استفاده شد. قبل از پیوندزنی، از طریق آزمون های

مولکولی از سالم بودن نهال‌های پایه اطمینان حاصل گردید. پس از انتخاب و جدا کردن پیوندک از نمونه‌های جمع‌آوری شده، قسمت انتهایی آن (محل جدا کردن پیوندک از گیاه آلوده) به وسیله یک تیغ تیز و استریل به صورت مورب برش داده شد و سپس درون شکافی که در ساقه گیاه پایه (پرپوش) ایجاد شده بود، قرار گرفت (شکل ۲). برای تامین دما و رطوبت لازم جهت پیوندک و گرایش بهتر پیوندک‌ها، موضع پیوند به وسیله پارافیلیم بسته و ناحیه‌ی پیوند شده به وسیله یک کیسه نایلونی شفاف و دارای سوراخ های ریز پوشانده شد. هر ۲۴ ساعت یکبار کیسه های نایلونی باز شده و گیاهان هوادهی شدند. جهت حصول اطمینان از گرایش قطعی پیوندک ها، کیسه‌های نایلونی در همین وضعیت و به مدت دو هفته نگهداری شدند. در پیوند با روش ارتباطی شرایط و روش کار همان روش پیوند جانبی بود با این تفاوت که در این روش پیوندک به مدت دو هفته از گیاه اصلی جدا نمی شود. بررسی و ثبت علائم هر ۱۵ روز یکبار انجام گرفت. بعد از سپری شدن سه ماه از پیوندزنی و ظهور علائم تیپیک فیتوپلاسمایی، استخراج DNA کل و آزمون‌های PCR مستقیم، PCR دو مرحله-ای و الکتروفورز انجام گرفت.



شکل ۲- پیوند زنی برای مایه زنی گیاه علفی پرپوش با فیتوپلاسمای همراه جاروک سنجد (الف) پیوند جانبی ارتباطی (ب).

برای تعیین توالی به بخش توالی‌یابی انستیتوپاستور ایران ارسال گردید تا تعیین توالی توسط دستگاه Genetic Analyzer 3130 (ساخت کمپانی ABI آمریکا) انجام گیرد.

توالی جدایه‌ی P29 با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) با استفاده از نرم افزار بلاست (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) مقایسه گردید (آلت‌شول و همکاران ۱۹۹۰) و توالی جدایه‌ی های با بیشترین مشابهت به جدایه‌ی در دست بررسی، برای زیر هم‌چینی و بررسی روابط فیلوژنتیک از بانک جهانی ژن دریافت و به صورت فرمت فاستا (FASTA) ذخیره شدند. ترادف ۱۲۰۰ bp منطقه 16SrRNA از جدایه‌ی P29 با مشابه‌ترین ترادف‌ها در بانک جهانی ژن (جدول ۲) و همچنین توالی مولیکوت *Acholeplasma laidlawii* به عنوان Outgroup (پورعلی و صالحی ۱۳۹۱، رؤوفی و صالحی ۱۳۹۱، وردین و همکاران، ۲۰۰۳، آل‌سعدی و همکاران ۲۰۰۸) مقایسه و زیرهم‌چینی توالی‌ها و رسم درخت فیلوژنتیک به وسیله نرم‌افزار Mega5 با مدل UPGMA tree و اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد. موقعیت

خالص‌سازی محصول PCR دو مرحله‌ای از ژل آگارز ژل آگارز (Merck آلمان) با دمای ذوب پایین با غلظت ۱٪ در بافر TAE تهیه شد. برای تعیین اندازه قطعات تفکیک شده، از مارکر 1Kbp Ladder استفاده گردید. الکتروفورز به مدت یک ساعت در ۱۰۰ ولت انجام گرفت. بعد از انتقال ژل به روی دستگاه ساطع کننده نور ماورای بنفش (UV)، سریعاً با استفاده از یک تیغ تمیز، استریل و تیز قطعه مورد نظر زیر دستگاه ژل داک با رعایت کلیه اصول ایمنی بریده شد. برای اطمینان از جدا سازی باند مورد نظر از ژل، در ابتدا و انتهای عمل جدا سازی باند از ژل، عکس برداری نیز انجام گرفت. بقیه‌ی مراحل با استفاده از کیت (QI Aquick (QIAGEN، آلمان) صورت گرفت.

تعیین توالی جدایه‌ها و بررسی فیلوژنتیک

فیتوپلاسمای همراه جاروک سنجد جدایه دانشگاه تبریز (P29) بدلیل داشتن علائم شدید مزرعه‌ای و نیز باند بسیار قوی، به عنوان نماینده‌ی نمونه‌های مورد بررسی انتخاب و پس از خالص سازی از ژل آگارز،

فیلوژنتیک فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک سنجد در استان آذربایجان شرقی (ایران) تعیین و هویت و

موقعیت جدایه P29 مشخص گردید.

جدول ۲- فهرست جدایه‌های مورد استفاده در ترسیم درخت فیلوژنتیک.

کد شناسایی	نژاد یا جدایه فیتوپلاسمای منتخب	محل جمع‌آوری	کد دسترسی (Accession number)
<i>A.laidlawii</i>	<i>Acoleplasma laidlawii</i>	Japan	D13260
<i>EaWB-29</i>	<i>Elaeagnus angustifolia</i> witches- broom phytoplasma strain 29	Iran	KJ920334
ROWBp-T	Russian olive witches- broom phytoplasma strain Tehran	Iran	FJ788515
IAP-PAP36	Iranian apple phytoplasma PAP36	Iran	KC902800
IPP-PAD36	Iranian pear phytoplasma PAD36	Iran	KC902811
ROWBp-U	Russian olive witches- broom phytoplasma strain Urmia	Iran	EU886968
AYp-RZW14	Aster yellows phytoplasma strain RZW14	Poland	HM561990
CrLYp-BN1	Cryostachys renda lipstick yellow frond disease phytoplasma Isolate BN1	Malaysia	KC924727
StWBp-YM1	Salix tetradenia witches-broom phytoplasma strain YM-1	China	KC117308
PLLp	Periwinkle little leaf phytoplasma	China	EU375834
MsP	Macrosteles striifrons phytoplasma	Japan	AB819333
IAp-M21	Iranian alfalfa phytoplasma strain M21	Iran	JQ412100
<i>Ca. p. phoenicium</i> – N13-1	<i>Candidatus</i> phytoplasma phoenicium strain N13-1	Lebanon	HQ407535
AWBp-22	Almond witches-broom phytoplasma strain 22	Iran	KJ920335
<i>EaWBV-25</i>	<i>Elaeagnus angustifolia</i> witches- broom phytoplasma vector strain 25	Iran	KJ920334

نتایج

علایم مشاهده شده در روی نمونه های جمع آوری

شده

میان، عون بن علی تبریز، یاغچیان تبریز، ایلخچی، خامنه شبستر، پاسداران تبریز و آذرشهر) شدیدتر بود. در جدایه‌ی گل‌پارک تبریز ضمن بروز جاروک شدید، جاروک‌های سال‌های قبل خشک شده و در درختان آلوده که دارای گل و میوه بودند میوه‌های سال قبل بر روی آنها چروکیده و قسمت گوشتی کم و روی درختان آویزان بودند. در جدایه ائل‌گلی تبریز توسعه جاروک با شدت زیاد مشاهده گردید، پس از سپری شدن سه ماه از ایجاد اولین علائم جاروک مرتبط با این جدایه، در اکثر سرشاخه‌ها جاروک قابل مشاهده بود. علائم عقیمی و

علایم مشترک بر روی کلیه‌ی درختان مورد بررسی عبارت از ریزبرگی، کاهش فاصله میان‌گره‌ها، جاروک، کاهش گلدهی و میوه، پرشاخه و برگ‌گی شدن، خشک شدن جاروک‌ها و شاخه‌ها، نکروز و مسدود شدن آوندها و در نهایت مرگ درختان بودند. علایم جاروک مرتبط با جدایه‌های ائل‌گلی تبریز، گل‌پارک تبریز و باغ گیاهشناسی دانشگاه تبریز نسبت به علایم سایر جدایه‌ها

عدم شکوفه‌دهی در جدایه‌های ائل‌گلی و باغ گیاه شناسی دانشگاه تبریز مشاهده شد (شکل ۳).

نتایج آزمون PCR

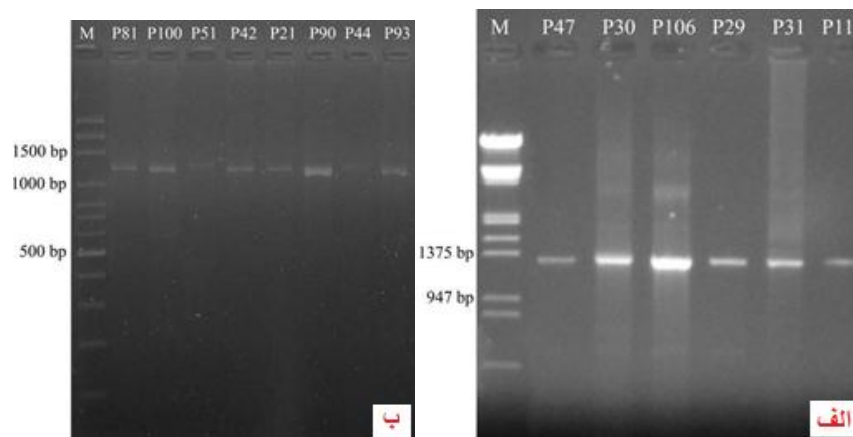
الکتروفورز محصولات PCR مستقیم در ژل آگارز ۱/۲٪ نشان دهنده‌ی تکثیر قطعه مورد نظر با اندازه تقریبی ۱۶۰۰ جفت باز از نمونه‌های P۲۱ (سنجد پاسداران تبریز)، P۲۹ (سنجد دانشگاه تبریز)، P۱۰۶ و P۱۱۶ (سنجد ائل‌گلی تبریز) بود. ولی هیچ باندهای از نمونه‌های فاقد علائم مشاهده نگردید.

نتایج آزمون PCR دو مرحله‌ای (Nested PCR)

زمانی که کلیه‌ی نمونه‌های دارای علائم آشکار آلودگی (نمونه‌های با واکنش مثبت و منفی در آزمون PCR مستقیم) از طریق واکنش PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای R16F2/R16R2 مورد بررسی قرار گرفتند علاوه بر نمونه‌هایی که در آزمون PCR مستقیم واکنش مثبت نشان دادند (P21، P29، P106 و P114)، از نمونه‌های دیگر هم مطابق جدول سه قطعه تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز به دست آمد (شکل ۴).



شکل ۳- علائم بیماری فیتوپلاسمایی جاروک بر روی درختان سنجد استان آذربایجان شرقی: الف - جاروک در سر شاخه‌های جدایه‌ی ائل‌گلی تبریز در اواخر فصل بهار ب- جاروک شدید در اکثر سرشاخه‌های جدایه‌ی ائل‌گلی تبریز در اوایل فصل پائیز ج- پریشتی و تولید جاروک شدید در جدایه‌ی گلپارک تبریز د - پرشاخه و برگ‌ی زیاد در جدایه‌ی دانشگاه تبریز.



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگر R16F2/R16R2 روی درختان سنجد آلوده به بیماری فیتوپلاسمایی در ژل آگارز ۱/۲٪. M- مارکر اندازه DNA، از نوع Lambda DNA برش یافته شده با آنزیم‌های *EcoRI*، *HindIII* (الف) و مارکر از نوع Ladder 100bp (ب).

جدول ۳- مشخصات جدایه های ردیابی شده با آزمون PCR دو مرحله‌ای.

کد نمونه	نام میزبان	محل نمونه برداری	موقعیت جغرافیایی	تاریخ نمونه برداری	علائم مشاهده شده
P21	سنجد	پارک پاسداران جدایه ۱	N38 ⁰ 5'85"-E46 ⁰ 20'22" 1517m	تیرماه ۹۱	ریزبرگی - جاروک-عدم میوه دهی
P29	سنجد	باغ گیاهشناسی دانشگاه تبریز	N38 ⁰ 3'28"-E46 ⁰ 19'58" 1511m	مردادماه ۹۱	ریزبرگی - جاروک-عدم میوه دهی
P30	سنجد	ایلخچی	N37 ⁰ 59'45"-E46 ⁰ 5'36" 1318m	شهریور ما ۹۱	خشک شدن سر شاخه ها- جاروک
P31	سنجد	کنارگذر شهید کسایی	N38 ⁰ 2'44"-E46 ⁰ 12'53" 1451m	شهریور ما ۹۱	ریزبرگی - جاروک - عدم میوه دهی
P42	سنجد	شهر خامنه	N38 ⁰ 11'10"-E45 ⁰ 36'44" 1520m	مهرماه ۹۱	زردی عمومی-ریزبرگی - جاروک
P44	سنجد	پارک پاسداران جدایه ۲	---	مهرماه ۹۱	ریزبرگی، جاروک
P47	سنجد	فضای سبز عون بن علی	N38 ⁰ 6'6"-E46 ⁰ 19'49" 1801m	مهرماه ۹۱	ریزبرگی، جاروک
P51	سنجد	میانه	N37 ⁰ 29'1"-E47 ⁰ 34'37" 1250m	مهرماه ۹۱	ریزبرگی، جاروک
P81	سنجد	پارک یاغچیان	N38 ⁰ 1'32"-E46 ⁰ 23'4" 1639m	خرداد۹۲	ریزبرگی، کاهش فاصله میان گرهها
P90	سنجد	پارک سنجد گلپارک	N38 ⁰ 3'52"-E46 ⁰ 21'2" 1540m	خرداد ۹۲	جاروک، کاهش فاصله میان گرهها
P93	قلمه سنجد	پارک سنجد گلپارک تبریز	N38 ⁰ 3'31"-E46 ⁰ 19'4" 1490m	بهار ۹۲	ریزبرگی
P100	سنجد	آذرشهر	N37 ⁰ 51'36"-E45 ⁰ 56'34" 1320m	خرداد ۹۲	ریزبرگی، کاهش فاصله میان گرهها، جاروک شدید
P106	سنجد	اتل گلی ۱	N38 ⁰ 2'51"-E46 ⁰ 21'8" 1542m	تیر ۹۲	ریزبرگی، جاروک شدید، عدم میوه دهی
P114	سنجد	اتل گلی ۲	N38 ⁰ 02'51.3"-E046 ⁰ 21'08.1" 1542m	تیر ۹۲	ریزبرگی، جاروک شدید، عدم میوه دهی

استخراج PCR کل به روش CTAB از نهال‌های به وجود آمده از قلمه زنی درختان سنجد دارای علایم، و انجام PCR مستقیم منجر به تکثیر DNA از آنها نشد اما در PCR دو مرحله‌ای از همه‌ی نمونه‌های دارای علائم تیپیک فیتوپلاسمایی (شکل ۵) قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز تکثیر و در الکتروفورز مشاهده گردید.

نتایج مایه‌زنی و انتقال بیماری از طریق قلمه و پیوند به گیاه پروانش

علایم بر روی نهال‌های بوجود آمده از قلمه‌زنی درختان سنجد دارای علایم جاروک (جدایه‌های دانشگاه تبریز، گلپارک تبریز، پاسداران تبریز و جدایه‌ی ایلخچی) به صورت ریزبرگی، جاروک و در نهایت خشک شدن و مرگ نهال‌ها بود (شکل ۵).



شکل ۵- نهال‌های سنجد به وجود آمده از قلمه‌های آلوده. الف- گلدان‌ها به ترتیب از سمت راست، جدایه‌ی دانشگاه تبریز، پاسداران ۱، گلپارک و جدایه‌ی پاسداران ۲ ب- جدایه‌ی یاغچیان ج- جدایه‌ی ایلخچی.

انتخاب و هر دو تکرار، نتایج مشابه هم داشتند. پس از گذشت سه ماه از زمان پیوند زنی، DNA کل از گیاهان پروانش دارای علائم و شاهد منفی به روش CTAB استخراج و هر دو آزمون PCR (مستقیم و دو مرحله‌ای) انجام گرفت که در آنالیز الکتروفورز محصول PCR مستقیم هیچ بانندی مشاهده نگردید، اما در PCR دو مرحله‌ای، قطعه‌ای به اندازه ۱۲۰۰

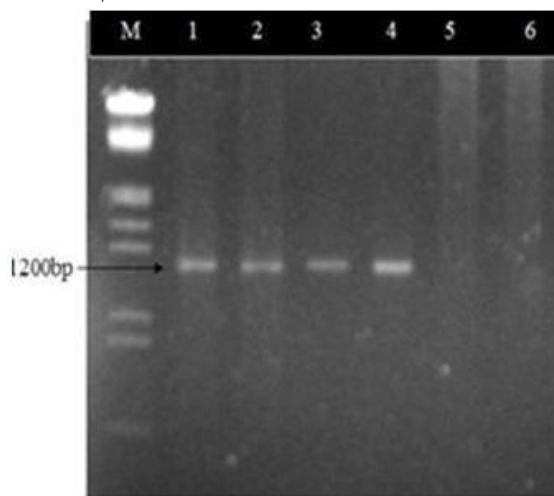
یک ماه پس از انجام عمل پیوند زنی، طی بازدیدهای مکرر ۱۵ روزه و ثبت نتایج، در گیاه پیروش مایه زنی شده با جدایه‌ی P29 (فیتوپلاسمای همراه با جاروک سنجد دانشگاه تبریز) و جدایه‌ی P21 (فیتوپلاسمای همراه با جاروک سنجد پاسداران تبریز) علایم ریزبرگی و کاهش فاصله‌ی میان‌گره‌ها مشاهده گردید (شکل ۶). از هر نمونه دو تکرار

شاهد منفی (گیاه پروانش بدون پیوند) هیچ بانندی مشاهده نگردید (شکل ۷).

جفت باز از گیاه پریش مایه زنی شده با جدایه‌های P21 و P29 تکثیر گردید در حالیکه از گیاه پروانش



شکل ۶- مایه زنی و انتقال بیماری از طریق پیوند به گیاه پروانش. الف، ب و ج- علایم ریزبرگی و کاهش فاصله میانگره ها د- سمت راست گیاه پروانش کنترل (بدون پیوند)، سمت چپ علایم ریزبرگی و عقیمی.

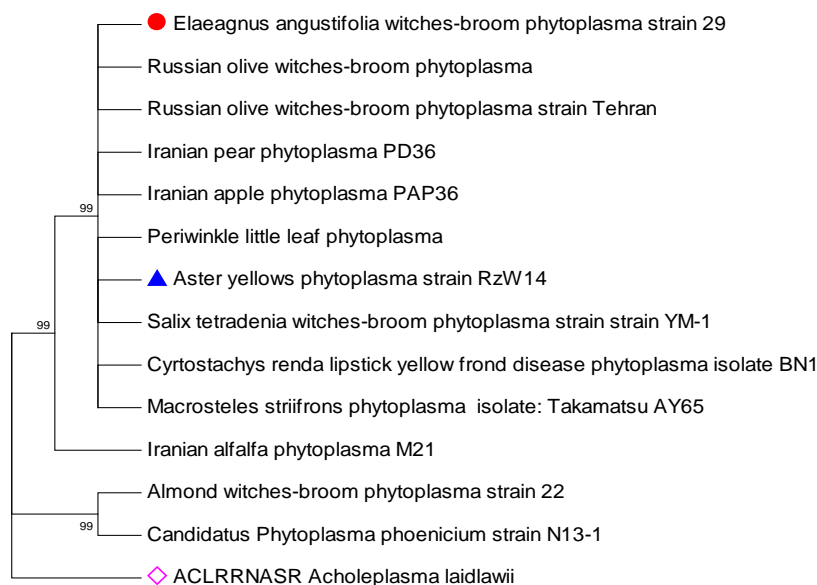


شکل ۷- نتایج ردیابی فیتوپلازما از گیاهان پروانش مایه زنی شده (الکتروفورز محصول Nested PCR در ژل آگارز). M- نشانگر دی ان ای از نوع Lambda DNA برش یافته شده با آنزیم‌های *EcoRI*, *HindIII* چاهک‌های ۱ و ۲، پروانش پیوند شده با جدایه P22 در دو تکرار. چاهک‌های ۳ و ۴، پروانش پیوند شده با جدایه P21 در دو تکرار. چاهک‌های ۵ و ۶، پروانش بدون پیوند (کنترل منفی).

جدایه‌ی ارومیه و جدایه‌ی تهران (۹۹٪) دارد. همچنین این جدایه با جدایه‌های Iranian pear phytoplasma, Iranian apple phytoplasma, Zarghan rapessed phyllody و فیتوپلاسمای همراه با زوال گلابی اروپایی (*Candidatus phytoplasma pyri*) شباهت ۹۸٪ نشان داد. بر اساس درخت فیلوژنتیک رسم شده (شکل ۸)، جدایه P29 (فیتوپلاسمای همراه با جاروک سنجد جداسازی شده از محوطه‌ی دانشگاه تبریز) در گروه زردی گل‌مینا (16SrI) قرار گرفت. همچنین این جدایه با جدایه‌های تهران و ارومیه با ۹۹٪ اعتبار سنجی در یک خوشه قرار گرفتند.

نتایج تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنتیکی

قطعه ۱۲۰۰ جفت‌باز از ناحیه 16SrRNA فیتوپلاسمای همراه با جاروک سنجد جداسازی شده از محوطه‌ی دانشگاه تبریز (P29) تعیین توالی شده و در بانک جهانی ترادف‌ها تحت کد دسترسی به شماره KJ920334 ثبت گردید. جستجو با برنامه بلاست نشان داد که در بین ترادف‌های فیتوپلاسمایی موجود در بانک جهانی، جدایه‌ی دانشگاه تبریز (P29) بیشترین نزدیکی را با فیتوپلاسماهای گروه یک یعنی گروه زردی مینا (16SrI) دارد. همچنین، در بین فیتوپلاسماهای همراه با جاروک سنجد در گروه زردی مینا، بیشترین شباهت را با فیتوپلاسماهای عامل جاروک سنجد در ایران،



شکل ۸- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده بر اساس توالی 16SrRNA با استفاده از نرم افزار Mega5 به روش UPGMA.

علامت ●، P29 (فیتوپلاسمای همراه با جاروک سنجد جداسازی شده از محوطه‌ی دانشگاه تبریز). علامت ▲، گروه

فیتوپلاسمایی زردی گل‌مینا (16SrI) (Aster Yellows group). علامت ◇، *Acholeplasma laidlawii* به عنوان

Outgroup

اساس ایجاد و توسعه جاروک در جدایه‌های ائیل گلی و باغ گیاه‌شناسی دانشگاه تبریز و همچنین جدایه‌ی گلپارک نسبت به سایر جدایه‌های مورد مطالعه بیشتر و شدیدتر

بحث

در این بررسی تنوع علائم بیماری جاروک سنجد در استان آذربایجان شرقی مشاهده گردید (شکل ۳). براین

ردیابی کننده فیتوپلازما، توانست از همه ۲۶ جدایه دارای علائم تیپیک فیتوپلاسمائی از گروههای مختلف گیاهان میزبان (علفی، زینتی، چند ساله و درختی) فیتوپلازما را ردیابی کند (اسمارت و همکاران ۱۹۹۶). همچنین، جفت آغازگر R16F2/R1R2 توسط رشیدی و همکاران (۲۰۱۰) برای ردیابی فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک سنجد استفاده شده است. در پژوهش حاضر، برای ردیابی فیتوپلازما در جدایه‌های مورد مطالعه از طریق واکنش Nested PCR با استفاده از آغازگرهای P1/Tint (دور اول) و R16F2/R16R2 (دور دوم) از همه ۱۴ نمونه دارای علائم تیپیک فیتوپلاسمایی مورد مطالعه، فیتوپلازما ردیابی گردید. استفاده از جفت آغازگر P1/Pint منجر به تکثیر قطعه ای با اندازه ۱۶۰۰ جفت باز شامل ناحیه 16S rRNA و ناحیه بین 16S rRNA و 23S rRNA شد و جفت آغازگر R16F2/R1R2 منجر به تکثیر قطعه ای از ناحیه 16S rRNA (شکل ۱) با اندازه تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز گردید.

به علت وجود مواد بازدارنده در درختان و همچنین غلظت پایین ذرات فیتوپلازما، تکثیر و ردیابی از طریق PCR دو مرحله‌ای (Nested-PCR) نسبت به PCR مستقیم حساس تر می باشد. براساس مطالعات قبلی نیز مشخص شده که به دلیل پایین بودن غلظت فیتوپلازما و وجود بازدارنده‌ها در درختان میوه ردیابی با Nested PCR دقیق‌تر است (هین‌ریچ و همکاران ۲۰۰۱). در این تحقیق از ۱۴ جدایه فیتوپلاسمای ردیابی شده از طریق آزمون PCR دو مرحله‌ای (Nested-PCR)، فقط چهار جدایه از طریق PCR مستقیم قابل ردیابی بودند. در نتیجه، برای ردیابی ذرات فیتوپلازما و حصول اطمینان از سالم بودن نمونه‌های گیاهی وارداتی در مراکز قرنطینه‌ای و همچنین در ازدیاد گیاهی از طریق قلمه و پیوندنی، (پایه و پیوندک)، بکاربردن هر دو آزمون PCR

بود. علاوه براین، درختان سنجد آلوده مناطق ائل گلی و باغ گیاهشناسی دانشگاه تبریز قادر به تولید گل و میوه نبودند.

جلوگیری از گل‌دهی و عقیم شدن گیاهان با جارویی شدن ارتباط دارد و به آن کمک می‌نماید، فیتوپلازماها باعث افزایش رشد رویشی گیاهان شده و از گسترش جنسی گیاه آلوده ممانعت به عمل آورده و باعث اختلال در دورگی می‌شوند. اگر آلودگی در اوائل فصل رویشی اتفاق بیافتد ممکن است گیاه آلوده عقیم شده و هرگز گل تولید نکند (سخندان ۱۳۸۳). براساس تحقیقات لی و همکاران (۱۹۹۸) ثابت شده است که در شرایط گلخانه‌ای و آزمایشگاهی یک گونه گیاهی قابلیت آلوده شدن به بیش از یک نوع فیتوپلازما را دارد. گیاه علفی پروانش (پریوش) میزبان مناسبی برای نگهداری اکثر فیتوپلازماها می‌باشد. در شرایط طبیعی توانایی یک گونه گیاهی جهت میزبان بودن برای بیش از یک تیپ فیتوپلازما، به شرایط مختلف بستگی دارد. این شرایط علاوه بر حساسیت گونه گیاهی به نتیجه تعامل گیاه - فیتوپلازما و حشره ناقل وابسته می‌باشد. در این تعامل سه طرفه و انتقال ذرات فیتوپلازما و همچنین ایجاد آلودگی و بیماری، حشره ناقل نقش مهمی دارد. رفتار تغذیه‌ای ناقل و ترجیح میزبانی مهمترین عوامل جهت تعیین جایگاه اکولوژیکی برای هر فیتوپلازما می‌باشند (لی و همکاران ۲۰۰۰). در این بررسی نیز عامل بیماری جاروک سنجد از دو نمونه آلوده از طریق پیوند جانبی به بوته‌های سالم پروانش در دو تکرار انتقال داده شد و در آنها علائم بیماری فیتوپلاسمایی شامل ریزبرگی، کاهش فاصله میان‌گره‌ها، کوتولگی و عقیمی مشاهده شد (شکل ۶).

در مطالعات اسمارت و همکاران، جفت آغازگر P1/Tint، در مقایسه با ۹ جفت آغازگر عمومی

فیتوپلاسمها استفاده می‌شود. رشیدی و همکاران براساس آنالیز فیلوژنتیکی نشان دادند که فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک سنجد در گروه Aster yellows قرار دارد (رشیدی و همکاران ۲۰۱۰). در این تحقیق نیز، درخت فیلوژنتیکی رسم شده براساس توالی ناحیه 16SrRNA، جدایه P29 (فیتوپلاسمای همراه با جاروک سنجد جدایه‌ی دانشگاه تبریز) بعنوان نماینده‌ی جدایه‌های مورد مطالعه در گروه زردی مینا (Aster yellows group, 16SrI) قرار داده شد.

براساس علایم بیماری، انتقال با قلمه و پیوند، واکنش مثبت در آزمون‌های PCR، Nested-PCR و همچنین مشخص شدن توالی ناحیه 16S rRNA، عامل جاروک درختان سنجد در استان آذربایجان شرقی ماهیت فیتوپلاسمایی دارد و این اولین گزارش از وجود بیماری فیتوپلاسمایی درختان سنجد در استان آذربایجان شرقی می‌باشد.

مستقیم و دو مرحله‌ای (Nested-PCR) لازم می‌باشند. در بررسی مشابهی نیز که انجام گرفته، عامل بیماری جاروک در ارقام گوجه سبز هلندی و گیلاس مشکی مشهود از طریق آزمون Nested PCR با حساسیت بیشتر نسبت به آزمون PCR مستقیم ردیابی گردیده است (عباسیان و صالحی ۱۳۸۹).

مطالعات فیلوژنتیک فیتوپلاسمها براساس ناحیه 16SrRNA و سایر ژن‌ها صورت گرفته است. در طول دو دهه‌ی اخیر، ثابت شده است که برای شناسایی و طبقه‌بندی فیتوپلاسمها، تجزیه و تحلیل بر اساس مطالعات مولکولی نسبت به فیلوژنی مبتنی بر ویژگی‌های بیولوژیکی که زمان بر می‌باشد، دقیق‌تر و قابل اعتماد بوده است (لی و همکاران ۲۰۰۰). روش مبتنی بر PCR در اواخر دهه‌ی ۱۹۸۰ و اوائل ۱۹۹۰ میلادی برای تشخیص و طبقه‌بندی فیتوپلاسمها، به عنوان یک ابزار بسیار حساس و دقیق، توسعه یافته است. توالی ناحیه 16SrRNA بعنوان ابزار مولکولی اولیه برای طبقه‌بندی

منابع

- پورعلی ح و صالحی م، ۱۳۹۱. تنوع ژنتیکی جدایه‌های فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بادام در استان‌های فارس، کرمان کردستان. بیماری‌های گیاهی، جلد ۴۸، صفحه‌های ۳۵۳ تا ۳۶۶.
- رئوفی د و صالحی م، ۱۳۹۱. تعیین برخی از ویژگی‌های فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک یونجه در استان بوشهر. بیماری‌های گیاهی، جلد ۴۸، صفحه‌های ۴۲۳ تا ۴۳۱.
- سخندان ن، ۱۳۸۳. ویروس‌های گیاهی؛ عوامل بیماری‌زا بی همتا و گمراه کننده. ترجمه. دانشگاه تبریز. ۶۷۹ صفحه.
- عباسیان م و صالحی م، ۱۳۸۹. واکنش ارقام هسته دارها به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام. بیماری‌های گیاهی، جلد ۴۶، صفحه‌های ۱۵۳ تا ۱۶۰.
- Al-Saady NA, Khan AM and Bertaccini A, 2008. Candidatus phytoplasma omanense, associated with witches-broom of *cassia italica* (Mill.) spreng in Oman. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58:461-466.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215:403-410.

- Green MR and Sambrook J, 2012. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gundersen DE and Lee IM, 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144–151.
- Gundersen DE, Lee IM, Rehner SA, Davis RE and Kingsbury DT, 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal Bacteriology* 176:5244–5254.
- Heinrich M, Botti S, Caprara L, Arthfer W, Strommer S, Hanzer V, Katinger H, Bertaccini A and Laimer M, 2001. Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:169- 179.
- Lee IM, Davis RE and Gundersen DE, 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review Microbiology* 54:221-255.
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE and Bertaccini A, 1998. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88:1359-1366.
- Rashidi M, Chosta Y and Bahar M, 2010. Molecular identification of a phytoplasma associated with Russian olive witches broom in Iran. *Plant Pathology* 127:157-159.
- Seemuller E, Schneider B, Maurer R, Ahrens U, Daire X, Kison H, Lorenz KH, Firrao G, Avinent L, Sears BB and Stackebrandt E, 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44:440-446.
- Schneider B, Ahrens U, Kirkpatrick BC and Seemüller E, 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR- amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology* 139:519-527.
- Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemuller E and Kirkpatrick BC, 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environmental Microbiology* 62:2988-2993.
- Verdin E, Salar P, Danet JL, Choueiri E, Jreijiri F, Elzammar SL, Gelie B, Bove JM and Garnier M, 2003. '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium', a new phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:833-838.
- Zhang Y, Uyemoto Jk and Kirkpatrick BC, 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal Virological Methods* 71:45-50.

Molecular Detection of Phytoplasma Associated Witches' Broom Disease of Russian Olive in Some Regions of East Azerbaijan Province

A HajiZadeh¹, R Khakvar^{2*}, N Sokhandan Bashir² and B Baghban³

¹Former MSc Student, Department of Plant Protection, University of Tabriz.

²Assistant and Associate Professor, Department Plant Protection, University of Tabriz.

³Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz.

*Corresponding author: E-mail: khakvar@tabrizu.ac.ir

Received: 22 Feb 2015

Accepted: 31 Oct 2015

Abstract

During 2013-2014 surveys of Russian olive trees in East Azarbaijan province, phytoplasma-type symptoms including reduction of leaf size, yellowing, shortening of internodes and witches' broom were observed. Total DNA was extracted from midrib tissue of symptomatic and asymptomatic trees. The total DNA samples were examined for phytoplasma infection by direct PCR and nested PCR which resulted in amplification of the expected fragments of 1600 bp and 1200 bp, respectively, in all of 14 symptomatic samples. No PCR-amplified fragments were obtained from the tested asymptomatic plants. For phylogenetic analysis, a selected PCR product was sequenced. Phylogenetic analysis using the generated sequences showed that the Witches' broom disease of Russian olive - associated phytoplasma in this region can be classified with aster yellows (16SrI) phytoplasma group. Based on the disease symptoms, positive reaction in PCR and phylogenetic analysis, witches' broom disease of Russian olive has phytoplasma etiology and belongs to 16SrI phytoplasma group. This is the first report of a phytoplasma disease in Russian olive trees from East Azarbaijan province of Iran.

Keywords: Aster Yellow, Phytoplasma, Russian olive, Witches' broom.