

DOI: <https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.13324>**ردیابی و شناسایی *Candidatus phytoplasma trifolii* از درختان سیب در ایران**رضا برازنده آق‌کاریز^۱، ناصر رادمان^۱، محمودرضا کریمی شهری^۲، مهدی پیرنیا^۱، عبدالحسین طاهری^۳، سیدمهدی فاطمی^۴

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل. بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران. گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. کارشناس بخش مدیریت آب و خاک، سازمان جهاد کشاورزی استان خراسان رضوی- مشهد، ایران. Reza_barazandeh@yahoo.com

پذیرش: ۹۹/۱۱/۱۹

بازنگری: ۹۹/۱۰/۲۰

دریافت: ۹۹/۱۰/۲

چکیده

در بازدیدهای بهار و تابستان سال ۱۳۹۷ از باغات درختان سیب در استان خراسان رضوی، علائم مشکوک به بیماری فیتوپلاسمایی مانند زردی، ریزبرگی، و همچنین برگ‌هایی که گوشوارک در آن به طور غیرعادی کشیده شده بود در سطح باغات مشاهده شد و ۳۳ نمونه از برگ درختان جمع‌آوری گردید. با استفاده از آغازگرهای عمومی P1 / P7 و آغازگرهای آشیانه‌ای R16F2n / R16R2، fU5 / rU3، R16MF2 / R16MR2 در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) از کلیه نمونه‌های دارای علائم، قطعات ۱۸۰۰ جفت باز در PCR عمومی و در PCRهای آشیانه‌ای به ترتیب قطعات ۱۲۵۰، ۸۷۶ و ۱۴۰۰ جفت باز تکثیر شدند. در نتایج حاصله مشخص گردید ۱۸ نمونه آلوده به فیتوپلاسم مثبت بودند. محصول PCR دومرحله‌ای با جفت آغازگرهای R16F2n / R16R2 همسانه‌سازی و تعیین ترادف شده و در بانک جهانی ژن ثبت گردید. مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در NCBI توسط نرم افزار BLAST و همچنین بررسی چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) حقیقی با محصول PCR دومرحله‌ای با استفاده از آنزیم‌های *AluI*، *RsaI* و *TruI* (*MseI*)، نشان داد که فیتوپلاسمای همراه درختان سیب بیشترین شباهت را با *Candidatus Phytoplasma trifolii* مربوط به گروه افزولش شیدر (Clover proliferation group, 16SrVI) دارند. آنالیز توالی‌ها با استفاده از نرم افزار PhyClassifier، تعیین میزان تشابه نوکلئوتیدی و آنالیز تبارزایی با استفاده از ترادف کامل ژن RNA ریبوزومی 16S نیز تعلق فیتوپلاسمای همراه درختان سیب در استان خراسان رضوی را در گروه 16SrVI-A تایید کرد. این اولین گزارش از سیب‌های آلوده به *Ca. Phytoplasma trifolii* در ایران و سایر نقاط جهان است.

کلمات کلیدی: آنالیز فیلوژنتیکی، آنزیم برشی، چند شکلی طولی قطعات برشی، زردی، گروه 16SrVI

Detection and identification of *Candidatus phytoplasma trifolii* on apple trees in IranReza Barazandeh Aghkariz¹✉, Naser Radman¹, Mahmoud Reza Karimi Shahri², Mahdi Pirnia¹, Abdolhossein Taheri³, Seyed Mahdi Fatemi⁴

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural, University of Zabol. ²Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Mashhad, Iran. ³Department of Plant Protection, Agricultural and Natural Science University of Gorgan, Gorgan, Iran. ⁴Water and Soil Management Department Agriculture Jihad Organization, Khorasan Razavi Province, Mashhad, Iran. ✉Reza_barazandeh@yahoo.com

Received: 22 Dec 2020

Revised: 9 Jan 2021

Accepted: 7 Feb 2021

Abstract

During spring and summer of 2018, suspected symptoms of the phytoplasma disease such as leaf shrinkage and yellowing as well as leaves with abnormally-enlarged stipules were observed in apple orchards in Khorasan Razavi province and 33 leaf samples were collected. Samples of symptomatic apple tree were assayed for infection with phytoplasma, using universal primer pairs P1 / P7 and nested PCR using primer pair R16F2n / R16R2, fU5 / rU3 and R16MF2 / R16MR2 in Polymerase Chain Reaction (PCR). The universal PCR products were 1800 bp fragments and the nested-PCR products were 1250, 876 and 1400 bp fragments, respectively, which were amplified by primer pairs. Of 33 leaf samples from apple, 18 samples were tested positive for phytoplasmas. The R16MF2/R16MR2 primed nested PCR products were cloned, sequenced and submitted into GenBank. Comparison of the obtained sequences with the sequences of NCBI using BLAST software and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis of the nested PCR products using the enzymes *AluI*, *RsaI* and *TruI* (*MseI*) indicated that phytoplasma in apple trees in Razavi Khorasan province was most similar to *Candidatus Phytoplasma trifolii* related to Clover Proliferation (CP) 16SrVI group. Analysis of sequences using iPhyClassifier software, determination of nucleotide similarity, and phylogenetic analysis of full-length 16S rDNA showed that phytoplasma in apple trees of Razavi Khorasan province belongs to 16SrVI-A subgroup. This is the first report on *Ca. Phytoplasma trifolii* infections in apple trees in Iran and other regions across the world.

Keywords: Phylogenetic analysis, Restriction enzyme, RFLP, Yellowing, 16SrVI group**How to cite:**Barazandeh Aghkariz R, Radman N, Karimi Shahri MR, Pirnia M, Taheri AH, Fatemi SM, 2021. Detection and identification of *Candidatus phytoplasma trifolii* on apple trees in Iran. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (41-50).

مقدمه

اند. به طور مثال، در برزیل نتایج PCR و بررسی‌های RFLP توالی‌های 16S rDNA نشان داد که فیتوپلاسمای خسارت‌زا بر روی درختان سیب مربوط به گروه 16SrXII (گونه *Ca. P. solani*) می‌باشد (Eckstein *et al.* 2017). در مطالعه دیگری (Cieślińska & Kruczyńska 2014)، بیش از ۱۲۰ درصد سیب در مناطق مختلف لهستان از نظر حضور فیتوپلاسمای مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج PCR-RFLP و تجزیه و تحلیل توالی‌ها، گونه‌های *Ca. P. mali* و *Ca. P. asteris* را شناسایی و ردیابی کردند. در ایران نیز در تحقیقی که بر روی درختان سیب در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری انجام شد (Hashemi-Tameh *et al.* 2014)، نتایج آنالیزهای مولکولی نشان داد که گونه‌های *Ca. P. aurantifolia* و *Ca. P. asteris* عامل بیماری فیتوپلاسمایی درختان سیب در این استان‌ها بودند.

بعد از بازدید از باغات سیب استان خراسان رضوی نمونه‌هایی با علائم مشکوک به بیماری فیتوپلاسمایی مشاهده گردید. اما از آنجائیکه در مورد فیتوپلاسمایی که درختان سیب را در این مناطق آلوده می‌کنند هیچ گونه اطلاعاتی در دست نبود، هدف از این مطالعه ردیابی و شناسایی فیتوپلاسمای همراه درختان سیب که باعث ایجاد علائم بیماری زردی، ریزبرگی، پر رشدی شاخه‌ها شده است، با استفاده از تکنیک‌های PCR، آزمون RFLP و تعیین ترادف RNA ریبوزومی 16s بود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری از باغات سیب

جهت مطالعه و بررسی درختان سیب با علائم مشکوک به بیماری فیتوپلاسمایی، نمونه‌های دارای علائم زردی، ریزبرگی و همچنین برگ‌هایی که گوشوارک در آنها به طور غیر عادی کشیده شده و دم‌برگ نسبتاً کوتاه داشتند از ۳۳ درخت سیب باغات استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری گردید (جدول ۱).

استخراج DNA و آزمون PCR

از نمونه‌های برگ‌های دارای علائم، ۰/۳ گرم از بافت رگ‌برگ میانی و دم‌برگ به روش (Murray & Thompson 1980) اصلاح شده توسط (Rogers *et al.* 1989) و (Kim *et al.* 1990) DNA کل استخراج گردید. بعد از خشک شدن رسوب نهایی در دمای اتاق، ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر سترون به آن اضافه و در دمای ۲۰°C نگهداری شد تا از آن به عنوان DNA الگو در آزمایش‌های PCR استفاده شود. آزمون PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگر

سیب (*Malus domestica* Borkh) یکی از مهمترین محصولات میوه در ایران و سایر کشورها است. بر طبق آمار فائو، ایران در رده ششم بین کشورهای مهم تولید کننده سیب با میزان تولید ۲۵۱۹۲۴۹ تن قرار گرفته است (FAO 2018) و از این میزان تولید، استان خراسان رضوی با سهم ۷/۵ درصدی در بین چهار استان مهم تولید کننده سیب قرار دارد (Agricultural Statistics 2018). درختان سیب تحت تأثیر چندین عامل بیماری‌زای گیاهی از جمله فیتوپلاسمای در سراسر جهان قرار می‌گیرند (Seemuller & Schneider 2004). فیتوپلاسمای پروکاریوت‌های غیر قابل کشت، فاقد دیواره سلولی و متعلق به رده مولیکوت‌ها (Mollicutes) هستند که در بسیاری از گیاهان ایجاد بیماری می‌کنند (Lee *et al.* 2000). فیتوپلاسمای پاتوژن‌های اجباری محدود به آوند آبکش هستند که اولین بار در سال ۱۹۶۷ در گیاهان مبتلا به زردی تشخیص داده شدند و اکثر آنها با زنج‌رک و برخی با پسپس‌ها منتقل می‌شوند (Dickinson *et al.* 2013) و از نظر جایگاه در جنس موقت *Candidatus Phytoplasma* طبقه‌بندی می‌شوند (IRPCM 2004). گسترش روز افزون بیماری‌های فیتوپلاسمایی در محصولات مختلف سیب شده تا این عوامل بیمارگر به عنوان یک تهدید جدی مورد توجه محققین قرار گیرند (Dickinson *et al.* 2013).

جاروک سیب (*Candidatus Phytoplasma mali*) به عنوان مهمترین بیماری فیتوپلاسمای سیب به طور بالقوه با کاهش اندازه، کیفیت و عملکرد کلی میوه می‌تواند خسارت اقتصادی قابل توجهی ایجاد کند و در حال حاضر در بسیاری از مناطق رشد سیب در اروپا شیوع دارد (Loi *et al.* 1995; Seemuller *et al.* 1998; Seemuller & Schneider 2004). علائم این بیماری شامل تغییر شکل غیر عادی و دندان‌های شدن برگ‌ها، ضعف درخت و زردی برگ‌ها، برگ‌های کلروزه با گوشوارک‌های طویل، میوه‌های کوچک با دم باریک و بلند و همچنین جاروئی شدن شاخه‌ها می‌باشد (Seemuller *et al.* 2004; Seemuller & Schneider 1998). علاوه بر این، فیتوپلاسمای مربوط به گروه stolbur (Duduk *et al.* 2010; Krizanac *et al.* 2010; Eckstein *et al.* 2017) و گروه aster yellows (Bertaccini *et al.* 1998; Jomantiene & Davis 2005; Cieślińska & Kruczyńska 2014) و گروه Peanut witches-broom (Hashemi-Tameh *et al.* 2013) که باعث ایجاد بیماری و خسارت به درختان سیب در اروپا و آسیا می‌شوند نیز گزارش شده-

دست آمده از روش Nested PCR با یک ترکیب آغازگری و به تنهایی برای تشخیص و ردیابی فیتوپلازماها در باغات و مزارع کفایت نمی‌کند و استفاده از چند ترکیب پرایمری مختلف، تعیین توالی و یا هضم آنزیمی به منظور اجتناب از واکنش مثبت دروغین توصیه می‌گردد (Moslemkhani *et al.* 2016). بنابراین در این تحقیق واکنش PCR آشیانه‌ای (nested) با استفاده از آغازگرهای R16F2n / R16R2 (Lee *et al.* 1995)، fU5 / rU3، (Lorenz *et al.* 1995) و R16MF2 / R16MR2 (Gundersen & Lee 1996) انجام شد (جدول ۲).

عمومی P1 و P7 (جدول ۲) جهت تکثیر توالی اپرون ریبوزومی 16S-23S rRNA فیتوپلازماها استفاده شد (Schneider *et al.* 1995; Deng & Hiruki 1991). بدلیل وجود باندهای غیر اختصاصی در PCR مستقیم، نبود کیفیت لازم برای توالی‌یابی باندها، غلظت پایین فیتوپلازما در درختان و بعضی از گیاهان و وجود ممانعت کننده‌های گیاهی، ردیابی فیتوپلازماها بوسیله PCR مشکل است و مانع از عملکرد صحیح PCR می‌شود به همین منظور از PCR دومرحله‌ای (Nested PCR) استفاده می‌شود (Hajizadeh *et al.* 2016; Moslemkhani *et al.* 2016). نتایج به

جدول ۱- اطلاعات مربوط به نمونه‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف استان خراسان رضوی.

Table 1. Information of samples obtained from different regions of Khorasan Razavi province.

Sampling site	Plant organ	Number of Samples
Mashhad	Leaf	7
Torghabeh	Leaf	3
Shandiz	Leaf	3
Chenaran (Kahoo, Akhlamad)	Leaf	7
Golbahar	Leaf	2
Quchan (Aghkariz, Chalaki)	Leaf	6
Nyshabour (Bouzhan Fooshenjan)	Leaf	5

ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز و از نوارهای DNA عکس تهیه شد.

آزمون چندشکلی طول قطعات برشی (RFLP)

در این آزمون محصول PCR دومرحله‌ای با جفت آغازگرهای R16F2n / R16R2 مربوط به هر نمونه به طور جداگانه با آنزیم‌های *AluI*، *RsaI* و *TruI* (*MseI*) (Thermo Fisher Scientific) هضم شدند (Lee *et al.* 1998). برای انجام آزمون طبق دستور شرکت سازنده آنزیم‌ها عمل شد. از این رو در یک واکنش ۳۰ میکرولیتری، شامل ۱۸ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز، ۲ میکرولیتر بافر مناسب هر آنزیم به همراه ۱-۲ میکرولیتر آنزیم برشی به ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR دومرحله‌ای اضافه گردید. لوله محتوی این مواد در مورد آنزیم‌های *AluI* و *RsaI* ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد (برای آنزیم *TruI* ۶۵ درجه سانتی-گراد) قرار داده شد. دما و زمان غیر فعال شدن بعد از واکنش هضم برای همه آنزیم‌ها طبق دستور شرکت سازنده اعمال شد. محصول هضم آنزیمی با آنزیم‌های مختلف در ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل مورد بررسی قرار گرفته و عکس برداری گردید.

در این واکنش محصول PCR مستقیم را به عنوان الگو در واکنش PCR دو مرحله‌ای جهت تکثیر بخشی از ژن 16S ریبوزومی استفاده شد. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر بود که شامل ۰/۷۵ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت پایه ۱۰ پیکومولار، یک میکرولیتر DNA الگو با غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم و ۱۲ میکرولیتر مستر میکس PCR آمپلیکون (2X Red PCR mastermix) که با افزودن آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. لوله‌ها برای PCR در دستگاه ترموسایکلر (Biorad) قرار داده شدند چرخه دمایی PCR شامل دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد جهت واسرشته سازی اولیه، ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه، ۷۵ ثانیه دمای ۵۰ درجه و سه دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه جهت طویل شدن نهایی تنظیم شد. در آزمون PCR دو مرحله‌ای، ابتدا محصول PCR مستقیم با استفاده از آب دوبار تقطیر سترون به نسبت ۱:۳۰ رقیق گردید و از آن به عنوان دی‌ان‌ای الگو استفاده شد. شرایط PCR دو مرحله‌ای مانند شرایط PCR مستقیم بود. فقط برای چرخه دمایی در مرحله اتصال از دمای ۵۵ درجه سانتی-گراد استفاده شد. محصول PCR حاصل از هر دو آزمون در

جدول ۲- اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در آزمون های PCR و Nested PCR.

Table 2. Primer information's used in PCR and Nested PCR methods.

Primer name	Sequence 5'→3'	Amplified fragment size	Reference
P1: Forward	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	1800 bp	Deng & Hiruki 1991
P7: Reverse	CGT CCT TCA TCG GCT CTT		Schneider <i>et al.</i> 1995
R16F2n: Forward	GAAACGACTGCTAAGACTGG	1250 bp	Lee <i>et al.</i> 1995
R16R2: Reverse	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG		
FU5: Forward	CGGCAATGGAGGAAACT	876 bp	Lorenz <i>et al.</i> 1995
RU3: Reverse	TTCAGCTACTCTTTGTAACA		
R16mF2: Forward	CATGCAAGTCGAACGGA	1400 bp	Gundersen & Lee 1996
R16mR1: Forward	CTTAACCCCAATCATCGAC		

ترادف‌های موجود در بانک ژن (GenBank) مقایسه و نزدیک‌ترین ترادف با آنها جستجو شد و به دلیل شباهت کامل هر سه ترادف، فقط یکی از آنها در بانک ژن ثبت و شماره دسترسی دریافت شد. همچنین توالی‌ها نیز با استفاده از نرم افزار iPhyClassifier آنالیز شدند. آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی (بخشی از ژن RNA ریپوزومی 16S) جدایه‌ها و نزدیکی آنها با گروه‌های فیتوپلاسمایی و زیرگروه‌های فیتوپلاسمایی (جدول ۳) با استفاده از نرم افزار Mega7 نسخه β و به روش الحاق همسایه‌ها با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شد (Kumar *et al.* 2016). از *Acholeplasma laidlawii* نیز به عنوان گروه خارجی استفاده گردید.

همساز سازی، تعیین ترادف

محصول PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای R16F2n / R16R2 با استفاده از کیت شرکت فرمنتاس Ins TA Clone PCR product Cloning Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania) و دستورالعمل این شرکت در پلاسمید pTZ57R/T همساز سازی و به باکتری *Escherichia coli* سویه DH5a منتقل شد (Sambrook *et al.* 1989). پس از رشد باکتری حامل همساز، پلاسمید نو ترکیب جدا و خالص سازی شد (Sambrook *et al.* 1989). پس از خالص سازی، سه جدایه انتخاب و جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کشور کره جنوبی ارسال گردید. سپس ترادف‌ها با استفاده از نرم افزار BioEdit ver. 7.0.9.0 اصلاح گردید. ترادف‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار برخط بلاست موجود در سایت NCBI

جدول ۳- نام و شماره دسترسی گروه‌های فیتوپلاسمایی استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی.

Table 3. List of Phytoplasmas groups and GenBank accession numbers used in phylogenetic analysis.

Phytoplasma strain designation	RFLP Group	Host	Origin	Accession number
<i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris	16SrI	Apple	Iran	KC902802
<i>Candidatus</i> Phytoplasma aurantifolia	16SrII	Apple	Iran	KC902796
<i>Candidatus</i> Phytoplasma ulmi	16SrV	Elm	Czech Republic	EU184021
<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifolii	16SrVI-A	Apple	Iran	MT981209
<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifolii	16SrVI-A	Peach	Iran	FJ204395
<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifolii	16SrVI-A	Alsike Clover	Canada	AY390261
<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifolii	16SrVI-A	Cowpea	Iran	KC633094
<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifolii	16SrVI-C	American Elm	USA	AF409070
<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifolii	16SrVI-D	Eggplant	India	EF186820
<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifolii	16SrVI-E	Yellow Star-Thistle	Italy	AY270156
<i>Candidatus</i> Phytoplasma phoenicium	16SrIX	Tomato	Iran	JF508513
<i>Candidatus</i> Phytoplasma mali	16SrX	Apple	Italy	AJ542541
<i>Acholeplasma laidlawii</i>				M23932

نتایج

علائم بیماری

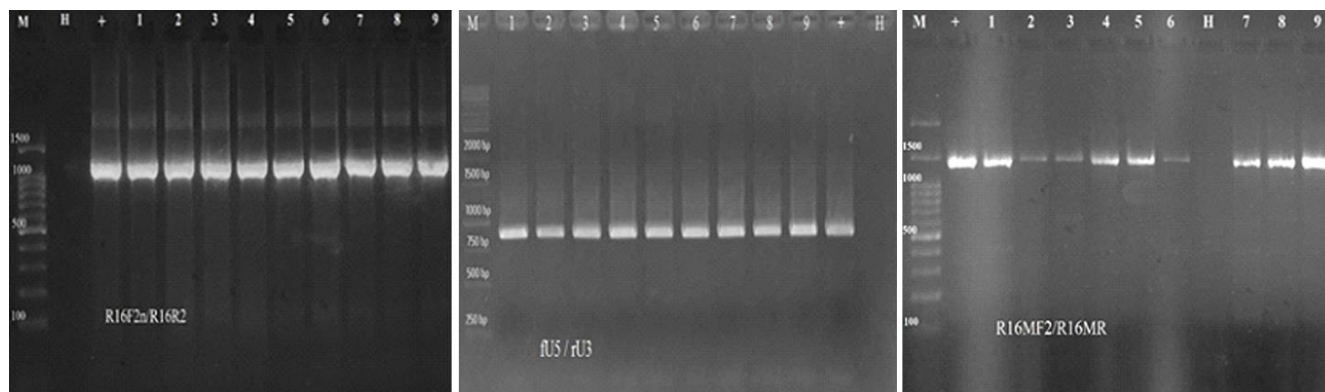
در این بررسی نمونه‌هایی با علائم مشکوک به بیماری فیتوپلاسمایی در باغات آلوده استان خراسان رضوی مشاهده گردید. علائم بیماری شامل زردی، ریزبرگی، پررشدی شاخه‌ها و همچنین برگ‌های که گوشوارک در آن به طور غیر عادی کشیده شده و دم‌برگ آنها نسبتاً کوتاه بود (شکل ۱).

نمونه‌های جمع‌آوری شده دارای علائم با آزمون PCR مستقیم و دومرحله‌ای از نظر آلودگی به فیتوپلاسمای بررسی گردیدند. در هر دو آزمون پس از الکتروفورز محصول PCR در نمونه DNA قطعات مورد انتظار ۱۸۰۰ جفت بازی (آغازگر P1/P7)، ۱۲۵۰ جفت بازی (آغازگر R16F2n / R16R2)، ۸۷۶ جفت بازی (آغازگر fU5 / rU3) و ۱۴۰۰ جفت بازی (آغازگر R16MF2/R16MR2) تکثیر شدند. در همین راستا هیچ بانندی از نمونه‌های تهیه شده از درختان سالم و بدون علائم (کنترل منفی) مشاهده نگردید (شکل ۲). سرانجام از مجموع ۳۳ نمونه جمع‌آوری شده، ۱۸ نمونه آلوده به فیتوپلاسمای شناسایی شدند.



شکل ۱. علائم درختان سیب آلوده به بیماری فیتوپلاسمای در باغات استان خراسان رضوی، A. جارویی شدن شاخه‌ها، B. کم‌برگی (زوال)، C. برگ‌ها با گوشوارک‌های بزرگ، D. زردی برگ‌ها.

Figure 1. Symptoms of apple trees infected with phytoplasma diseases in Khorasan Razavi province, A. Proliferation (Witches, broom), B. Defoliation, C. Stipule enlargement, D. Yellowing.



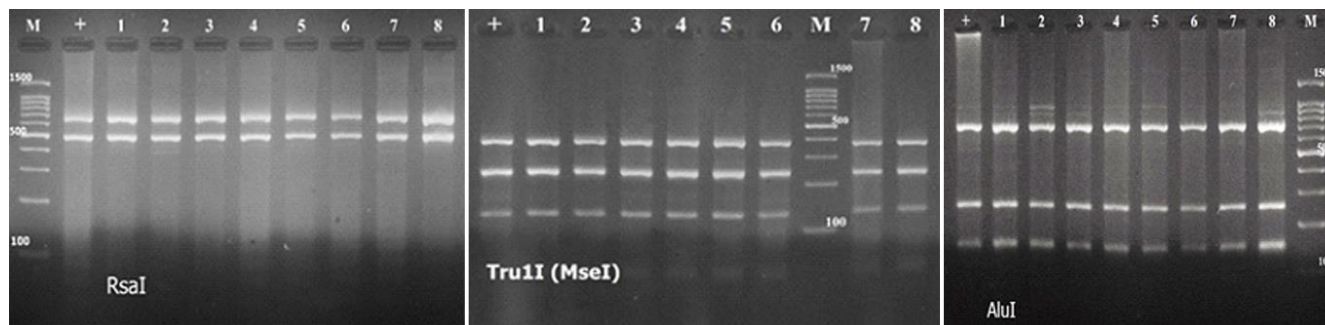
شکل ۲. نقوش الکتروفورزی محصول PCR با آغازگرهای R16F2n/R16R2، fU5/rU3 و R16MF2/R16MR2 از درختان سیب آلوده در ژل آگارز ۱/۲ درصد، چاهک با علامت (M) نشانگر، چاهک (H) نمونه سالم سیب، چاهک (+) کنترل مثبت و چاهک ها ۱ تا ۹ نمونه‌های سیب آلوده به فیتوپلاسم.

Figure 2. Electrophoresis pattern of nested PCR using primers pairs R16F2n / R16R2, fU5 / rU3 and R16MF2 / R16MR2 from infected apple in 1.2 % agarose gel. lane marked (M) DNA ladder, lane (H) healthy apple sample, lane (+) positive control and lanes 1 to 9 samples of apples infected with phytoplasma.

از باغات سیب استان خراسان رضوی نشان داد (شکل ۳). مقایسه الگوهای برشی با الگوهای گروه‌های فیتوپلاسمایی با هدفه آنزیم برشی (Lee *et al.* 1998) نشان داد که جدایه‌های استان خراسان رضوی با هم مشابه و بیشترین شباهت را با گروه افزولش شبدر (Clover proliferation group (16SrVI) داشتند.

چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP)

نقوش قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR آشیانه با استفاده از آنزیم‌های *RsaI*، *AluI* و *TruI* (MseI) در ژل آگارز ۲ درصد، الگوهای برشی مشابهی از نظر تعداد باندهای حاصل و همچنین موقعیت قرار گرفتن باندها در جدایه‌های جمع آوری شده



شکل ۳. نقوش الکتروفورزی چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) محصول PCR آشیانه‌ای با جفت آغازگر (R16F2n / R16R2)، در ژل آگارز ۲ درصد. چاهک با علامت (M) نشانگر ۱۰۰b، چاهک (+) شاهد مثبت و چاهک‌ها ۱ تا ۸ جدایه‌های استان خراسان رضوی با آنزیم‌های برشی *RsaI*، *AluI* و *TruI* (MseI).

Figure 3. RFLP pattern of nested PCR using R16F2n/R16R2 primer pair in 2 % agarose gel. lane marked (M) 100bp DNA ladder, lane (+) positive control and and lanes 1 to 8 isolates of Khorasan Razavi province with *RsaI*، *AluI* and *TruI* (MseI) restriction enzymes.

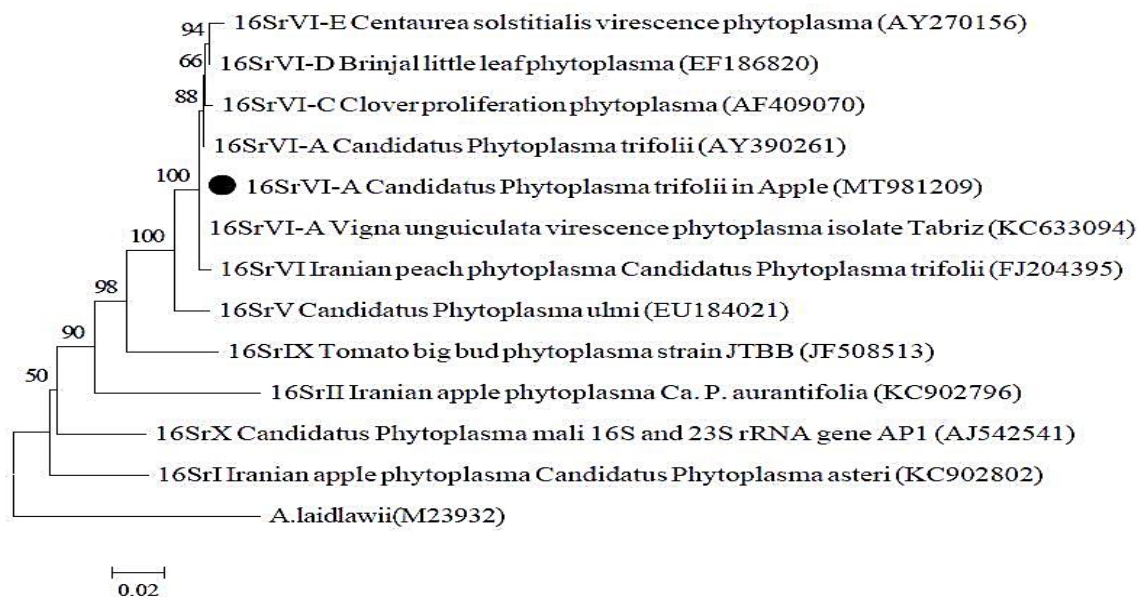
شده، نشان داد که مترادف مورد مطالعه در این تحقیق در میان فیتوپلاسماهای موجود در بانک ژن، بیشترین نزدیکی را با (*Candidatus* Phytoplasma trifolii GenBank accession: AY390261)، فیتوپلاسمایی زیرگروه 16SrVI-A دارند. با استفاده از مترادف‌های جدایه‌های مورد مطالعه و مترادف‌های مشابه از بانک

تعیین مترادف و آنالیز فیلوژنتیکی

مترادف محصول PCR دومرحله‌ای با جفت آغازگر R16F2n / R16R2 پس از همسانه سازی تعیین مترادف شد و با رس شماره (GenBank accession no.) MT981209) در بانک ژن به ثبت رسید. جستجو با برنامه بلاست با استفاده از قطعه تعیین مترادف

در این پژوهش، بیشترین تشابه نوکلئوتیدی (۹۹/۹۹ تا ۱۰۰ درصد) را با *Vigna unguiculata virescence phytoplasma* isolate Tabriz (KC633094) و همچنین کمترین تشابه (۸۷/۷۳ درصد) را با فیتوپلاسمایی متعلق به *Iranian apple phytoplasma Candidatus Phytoplasma asteri* (KC902802) داشتند (شکل ۴).

ژن، آنالیز تبارزایی انجام شد. درخت تبارزایی ترسیم شده با توالی‌های مربوط به گروه‌های مختلف و همچنین توالی‌های مربوط به زیر گروه‌های موجود در گروه 16SrVI، فیتوپلاسمای همراه درختان سیب در استان خراسان رضوی دارای رابطه نزدیکی با اعضاء زیر گروه A از گروه 16SrVI را نشان داد (شکل ۴). ارزیابی درصد همولوژی بیانگر آن است که استرین‌های فیتوپلاسمایی ردیابی شده



شکل ۴. دندروگرام رسم شده در برنامه Mega7 با استفاده از الگوریتم الحاق همسایه‌ها Neighbor-joining (Bt×1000) بر اساس ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژن RNA ریبوزومی 16S، برای تعیین نزدیکی جدایه توالی‌یابی شده در تحقیق حاضر که با علامت ● مشخص شده با گروه‌های مختلف فیتوپلاسمایی و زیرگروه‌های گروه فیتوپلاسمایی 16SrVI. *Acholeplasma laidlawii* به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است. شماره دسترسی مربوط به هر جدایه در جدول ۳ آورده شده است.

Figure 4. A neighbor-joining tree (Bt × 1000) constructed by Mega7 program using the 16S rRNA gene, of the phytoplasma strain used in this study (showed with ●) associated with some phytoplasmas groups and subgroups of 16SrVI group, selected phytoplasmas from GenBank. The sequence of *Acholeplasma laidlawii* served as an out group. See Table 3 for abbreviations and accession numbers.

همراهی یک فیتوپلاسم با اینگونه علائم در باغات استان خراسان رضوی را به اثبات رساند (شکل ۲، ۳ و ۴). همچنین بر طبق نتایج ذکر شده، وجود این علائم در درختان سیب بیماری فیتوپلاسمایی را نشان می‌دهد. این مطالعه برای اولین بار عامل فیتوپلاسمای همراه درختان سیب در استان خراسان رضوی، گروه 16SrVI-A (*Ca. P. trifolii*) با استفاده از تکنیک‌های مولکولی را نشان می‌دهد. در ابتدا، با توجه به علائم شاخص *Ca. P. mali* که شامل تغییر شکل غیر عادی و دندانه‌ای شدن برگ‌ها، ضعف درخت و زردی برگ‌ها، برگ‌های کلروزه با گوشوارک‌های طولی، میوه‌های کوچک با دم باریک و بلند و همچنین جاروئی شدن شاخه‌ها

بحث

هدف از تحقیق حاضر شناسایی عوامل فیتوپلاسمای همراه درختان سیب در استان خراسان بود. تقریباً در تمامی مناطق مورد بازدید، علائم بیماری شامل زردی، ریزبرگی، پر رشدی شاخه‌ها و همچنین برگ‌هایی که گوشوارک در آن به طور غیر عادی کشیده شده که از علائم مشخص بیماری فیتوپلاسمای می‌باشد، در تعدادی از درختان سیب مشاهده گردید (شکل ۱). در تحقیق حاضر، نتایج به دست آمده از آزمون PCR، آزمون RFLP با آنزیم‌های *AluI*، *RsaI* و *TruII (MseI)* تعیین ترادف RNA ریبوزومی، میزان تشابه نوکلئوتیدی و آنالیز تبارزایی،

بختیاری داشتند (شکل ۴). همچنین در مطالعه انجام شده بر روی درختان نارون در امریکا، گرچه علائم بیماری‌زایی مانند زردی عمومی برگ‌ها و تغییر رنگ در آوندهای آبکش، نشان از حضور عمومی *Ca. P. ulmi* (16SrV-A) را میداد، اما نتایج حاصل از آزمون PCR وجود *Ca. P. trifolii* را در این میزبان اثبات کرد (Flower *et al.* 2018). در تحقیق حاضر نیز ابتدا علائم مشاهده شده نشان از همراهی *Ca. P. mali* را میداد اما نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مولکولی به وضوح وجود *Ca. P. trifolii* بر روی درختان سیب را تایید کرد. آنالیز فیلوژنی نیز نشان داد که جدایه‌های توالی‌یابی شده در تحقیق حاضر متعلق به گروه 16SrVI می‌باشد و درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس توالی‌های مربوط به گروه‌های مختلف و همچنین توالی‌های مربوط به زیر گروه‌های موجود در گروه 16SrVI، فیتوپلاسمای همراه درختان سیب استان خراسان رضوی دارای رابطه نزدیکی با اعضاء زیر گروه A از گروه 16SrVI بود (شکل ۴). ایزوله فیتوپلاسمای سیب در تحقیق حاضر (MT981209) از نظر توالی با سویه فیتوپلاسمای لوبیا چشم بلبلی (KC633094)، یک فیتوپلاسمای متعلق به زیر گروه A از گروه 16SrVI که قبلاً از استان آذربایجان شرقی گزارش شده بود (Gharouni Kardani & Jamshidi 2018)، شباهت زیادی دارد (شکل ۴).

با توجه به گستردگی محدوده میزبانی فیتوپلاسمای گروه 16SrVI (*Ca. P. trifolii*) بر روی درختان هلو، بادام و نارون و همچنین گیاهانی مانند کلم، گلرنگ، لوبیا و گوجه فرنگی که در ایران گزارش شده کرده‌اند (Salehi *et al.* 2005; Zirak *et al.* 2009, 2010; Jamshidi *et al.* 2014; Flower *et al.* 2018; Gharouni Kardani & Jamshidi 2018)، حضور این عامل بیماری‌زا بر روی سیب دور از انتظار نیست.

مشاهده علائم در باغ‌های مورد بررسی و انجام آزمون‌های آزمایشگاهی و همچنین مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن، نشان دهنده شباهت بالای توالی‌ها با *Ca. P. trifolii* و حضور بیمارگر فیتوپلاسمایی روی درختان سیب است که این موضوع می‌تواند تهدید جدی برای درختان سیب و حتی سایر درختان میوه در این مناطق و حتی استان‌های مجاور باشد. با توجه به گسترش فیتوپلاسمای گروه 16SrVI در مناطق مختلف ایران پیش بینی می‌شود که یک ناقل حشره‌ای موثر داشته باشد. در همین راستا مطالعه روی ناقلین و ارائه روش‌های مناسب برای مقابله با این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین، در

(Seemuller *et al.* 1998; Seemuller & Schneider 2004)، که در بررسی‌های انجام شده در تحقیق حاضر نیز اکثر این علائم مشاهده شدند، به نظر می‌رسید که احتمالاً گونه *Ca. P. mali* باعث ایجاد بیماری سیب در این مناطق می‌شود. این فرضیه با توجه به تشخیص *Ca. P. mali* در سایر کشورهای خاورمیانه از جمله ترکیه (Sertkaya *et al.* 2008) و سوریه (Al-Jabor *et al.* 2009) و همچنین نتایج تحقیقات بر روی درختان گل‌ابی در مناطق مرکزی ایران (Sharbatkhari *et al.* 2008) تقویت شد. در حالیکه نتایج PCR، هضم آنزیمی و تعیین ترادف و آنالیز فیلوژنتیکی در تحقیق حاضر این فرضیه را رد کرد.

در مطالعات گذشته از ایران، و سایر کشورها فیتوپلاسماهای مختلفی بر روی درختان سیب گزارش شده است. در تحقیقی که بر روی درختان سیب در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری انجام شد (Hashemi-Tameh *et al.* 2014)، علائم مشاهده شده در سطح باغات شامل جارویی شدن شاخه‌های درختان، کم‌برگی و زوال درختان، برگ‌ها با گوشوارک‌های بزرگ، زردی برگ‌ها و روزت بودند که با علائم مشاهده شده در تحقیق حاضر شباهت داشتند. اما نتایج آنالیزهای مولکولی (Hashemi-Tameh *et al.* 2014) نشان داد که گونه‌های *Ca. P. aurantifolia* و *Ca. P. asteris* عامل بیماری فیتوپلاسمایی درختان سیب در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری بودند در حالی که در تحقیق حاضر با استفاده از تکنیک‌های مولکولی، عامل فیتوپلاسمای همراه درختان سیب در استان خراسان رضوی، گروه 16SrVI-A (*Ca. P. trifolii*) را نشان داد. پیش از این نیز مطالعاتی وجود فیتوپلاسمای گروه 16SrVI (*Ca. P. trifolii*) را بر روی درختان هلو، بادام و نارون در ایران و سایر کشورها گزارش کردند (Zirak *et al.* 2009, 2010; Flower *et al.* 2018). استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری، درختان هلو و بادامی که به طور قابل توجه به فیتوپلاسمای علائم زردی و ریز برگگی و کم‌برگی آلوده بودند، با استفاده از PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n / R16R2 مورد ارزیابی قرار گرفتند و *Ca. P. trifolii* و چند گونه دیگر در ارتباط با بیماری فیتوپلاسمایی هلو و بادام گزارش شدند (Zirak *et al.* 2009). با توجه به تجزیه و تحلیل توالی ژن‌های 16S، جدایه‌های فیتوپلاسمای سیب در تحقیق حاضر شباهت زیادی به جدایه‌های هلو (رس شماره FJ204395) در استان‌های اصفهان و چهارمحال و

سیاسگزاری

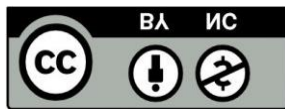
از ریاست و همکاران محترم بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی که شرایط اجرای تحقیق حاضر را میسر کردند، قدردانی می‌شود.

مناطق مورد بررسی امکان حضور سایر فیتوپلاسم‌های مربوط به گروه‌های دیگر، در درختان سیب وجود دارد که نیازمند تحقیقات بیشتر برای دستیابی به این مهم می‌باشد تا با تخمین پراکنش فیتوپلاسم‌ها بر روی این میزبان اقدامات لازم جهت کاهش خسارت برنامه‌ریزی و انجام شود.

References

- Agricultural Statistics of Iran, 2018. Volume 3: Horticultural Products. Available at: <https://amar.maj.ir>. [accessed on 1 December 2018].
- Al-Jabor K, Gharz Eddin M, 2009. Detection of apple proliferation 'Candidatus Phytoplasma mali' (Abstract). 7th Conference of the general commission for scientific agricultural research (GCSAR). Internet Resource: <http://www.gcsar.gov.sy/gcsarEN/spip.php?article163>, [verified Nov 1, 2013].
- Bertaccini A, Vibio M, Franova Honetslegrova J, Janeckova M, 1998. Molecular detection of phytoplasmas in apple with rubbery wood symptoms. *Acta Horticulturae* 472: 693-700.
- Cieślińska M, Kruczynska D, 2014. Molecular detection of phytoplasmas infecting apple trees in Poland. *Horticultural Science* 41: 27-33.
- Deng S, Hiruki C, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.
- Dickinson M, Tuffen M, Hodgetts J, 2013. The phytoplasmas: an introduction. In: Dickinson M, Hodgetts J (eds). *Phytoplasma: Method and Protocols*. Humana press, New York. Pp. 1-14.
- Duduk B, Tian J, Contaldo N, Fan X, Paltrinieri S, et al., 2010. Occurrence of phytoplasmas related to stolbur and to 'Candidatus Phytoplasma japonicum' in woody host plants in China. *Journal of Phytopathology* 158(2): 100-104.
- Eckstein B, Regina Alves Botelho S, Luana Coelho Alves de Oliveira M, Rausch Fernandes F, Martinello Sanches M, 2017. Interception of 'Candidatus Phytoplasma solani' in Brazil in apple tree propagative material imported from France. *Arquivos do Instituto Biológico* 84: 1-4.
- FAOSTAT 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Internet Resource: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. [accessed on 2 December 2018].
- Flower CE, Hayes-Plazolles N, Slavicek JM, Rosa C, 2018. First report of 'Candidatus Phytoplasma trifolii'-related Strain of 16SrVI-A Phytoplasma Subgroup, associated with elm yellows disease in American elm (*Ulmus americana* L.) in Ohio, U.S.A. *Plant Disease* 102(2): 438-438.
- Gharouni Kardani S, Jamshidi E, 2018. Etiology and transmission of cowpea phyllody associated Phytoplasma in East Azarbaijan province of Iran. *Journal of Plant Protection* 32(2): 185-193 (in Persian with English abstract).
- Gundersen DE, Lee I-M, 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer sets. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144-151.
- Hajizadeh A, Khakvar R, Sokhand Bashir N, Baghban B, 2016. Molecular detection of Phytoplasma associated witches' broom disease of Russian olive in some regions of East Azerbaijan province. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 5(1): 127-141 (in Persian with English abstract).
- Hashemi-Tameh M, Bahar M, Zirak L, 2014. Candidatus Phytoplasma asteris and Candidatus Phytoplasma aurantifolia, new phytoplasma species infecting apple trees in Iran. *Journal of Phytopathology* 162(7-8): 472-480.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma taxonomygroup, 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(4):1243-125. doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02854-0>.
- Jamshidi E, Jafarpour B, Rouhani H, Salehi M, 2014. Association of members of clover proliferation (16SrVI) and pigeon pea witches' broom (16SrIX) phytoplasma groups with tomato big bud disease in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 50(2): 77-89.
- Jomantiene R, Davis RE, 2005. Apple sessile leaf: a new disease associated with a 'Candidatus Phytoplasma asteris' subgroup 16SrI-B phytoplasma in Lithuania. *Plant Pathology* 54(2): 237-237.
- Kim WK, Mauthe W, Hausner G, Klassen GR, 1990. Isolation of high molecular weight DNA and double stranded RNAs from fungi. *Canadian Journal of Botany* 68: 1898-1902.
- Križanac I, Mikec I, Budinščak Ž, Šeruga Musić M, Škorić D, 2010. Diversity of Phytoplasmas infecting fruit trees and their vectors in Croatia. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117(5): 206-213.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

- Lee IM, Bertaccini A, Vibio M, Gundersen DE, 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85:728–735.
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1153–1169.
- Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE, 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review Microbiology* 54: 221–255.
- Loi N, Carraro L, Musetti R, Firrao G, Osler R, 1995. Apple proliferation epidemics detected in scab-resistant apple trees. *Journal of Phytopathology* 143(10): 581–584.
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U, Seemüller E, 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771–776.
- Moslemkhani C, Baghaee Ravari S, Khodaygan P, 2016. Problems Encountered with nested PCR to diagnosis of Phytoplasmas. *Journal of Plant Protection* 29(4): 617–624 (in Persian with English abstract).
- Murray H.G, Thompson WF, 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acid Research* 8: 4321–4325.
- Rogers SO, Rehner S, Bledsoe C, Muller GJ, Ammirati JF, 1989. Extraction of DNA from Basidiomycetes for ribosomal DNA hybridization. *Canadian Journal of Botany* 67: 1235-1243.
- Salehi M, Heydarnejad J, Izadpanah K, 2005. Molecular characterization and grouping of 35 phytoplasmas from central and southern provinces in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41:62–65.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 545 pp.
- Schneider B, Seemüller E, Smart CD, Kirkpatrick BC, 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully J.G (eds). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Academic Press, San Diego, California. Vol. 1, Pp. 369–380.
- Seemüller E, Kison H, Lorenz KH, 1998. On the geographic distribution and prevalence of the apple proliferation phytoplasma in low-intensity orchards in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105: 404–410.
- Seemüller E, Schneider B, 2004. ‘Candidatus Phytoplasma mali’, ‘Candidatus Phytoplasma pyri’ and ‘Candidatus Phytoplasma prunorum’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(4): 1217–1226.
- Sertkaya G, Martini M, Osler R, 2008. First report of Candidatus phytoplasma mali in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 90:143–149.
- Sharbatkhari M, Bahar M, Ahoonmanesh A, 2008. Detection of the Phytoplasmal agent of pear decline in Iran, Isfahan province, using nested-PCR. *International Journal of Plant Production* 2:1735–8043.
- Zirak L, Bahar M, Ahoonmanesh A, 2009. Characterization of Phytoplasmas Aassociated with Almond diseases in Iran. *Journal of Phytopathology* 157: 736–741.
- Zirak L, Bahar M, Ahoonmanesh A, 2010. Molecular characterization of phytoplasmas associated with peach diseases in Iran. *Journal of Phytopathology* 158:105–110.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)