مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۲
صفحه ۱۳۰-۱۲۳

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1402.12.1.1.5

DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.1.5

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023
Volume 12, Number 1, Pages: 123-130

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

شناسایی مولکولی و ردیابی فیتوپلاسمای عامل بیماری تورم جوانهٔ گوجه فرنگی

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

مهنازشکری[۱]، حسین جعفری[۲*]، محمدرضا عظیمی مقدم[۳]

Mahnaz Shokri[1], Hossein Jafari[2], Mohammadreza Azimi Moghadam[3]

۱- کارشناس ارشد مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۲- موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۳- گروه مهندسی تولید و ژنتیک کشاورزی، دانشگاه زنجان

1. MSc. of Agricultural Biotechnology Engineering, University of Zanjan
2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
3. Department of Plant Production and Genetics. University of Zanjan

*Corresponding Author, Email: نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی *
hjafaryir@gmail.com
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۱۱)

چکیده

بیماری تورم جوانهٔ گوجه‌فرنگی یکی ازبیماری‌های مهم فیتوپلاسمایی گوجه‌فرنگی در ایران و درجهان محسوب می شود که درآن جوانه‌های گیاهان آلوده به حالت متورم درآمده و در صورت شدت بیماری بوته تغییر شکل و رنگ داده و خسارت شدیدی به محصول وارد می شود. به منظور شناسایی و ردیابی عامل بیماری ابتدا از برگ، جوانه‌های متورم و میوه بوته‌های آلوده در مزارع گوجه فرنگی زنجان نمونه‌برداری گردید. DNA کل از اندام‌های آلوده و سالم و از علف-های هرز مزارع مانند گل جالیز، اسپرک، توق، تاج خروس و پیچک استخراج شد. همچنین برای بررسی امکان انتقال بیماری با بذر و حشرات ناقل در مزرعه، DNA کل بذور گوجه‌فرنگی بوته-های آلوده و گونه‌هایی از مگس سفید و زنجره‌ها استخراج شد. ردیابی فیتوپلاسما با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7، اختصاصی فیتوپلاسماها انجام گردید. بررسی نتایج حاصل از تکثیر اختصاصی ژنوم عامل بیماری نشان داد که در نمونه‌های گوجه‌فرنگی دارای علائم بیماری، قطعهٔ DNA ریبوزومی اختصاصی فیتوپلاسما با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت تکثیر شد. ردیابی عامل بیماری تنها در زنجره‌های ناقل و در گیاه انگل گل‌جالیز متصل به ریشه گیاهان بیمار با موفقیت همراه بود و از بقیه علفهای هرز موجود فیتوپلاسمای عامل بیماری جداسازی نشد. با انجام این تحقیق برای اولین بار ردیابی مولکولی عامل بیماری فیتوپلاسمایی بر روی مگس سفید و گل جالیز انجام گردید و ضمن تایید عدم امکان انتقال عامل بیماری از طریق بذر و مگس های سفید، روشی سریع و دقیق برای ردیابی عامل بیماری در بوته-های آلوده گوجه فرنگی و در حشرات ناقل بیماری، ارایه گردید که میتواند در پایش این بیماری در کشور استفاده شود.

واژه‌های کلیدی

تورم جوانه،
تشخیص مولکولی،
فیتوپلاسما،
گوجه‌فرنگی،
PCR

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.1.5]

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

Abstract

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

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

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) یک گیاه زراعی خوراکی است که عمدتاً در قرن گذشته محبوبیت و اهمیت یافته است. سطح زیرکشت گوجه‌فرنگی در استان زنجان ۱۲۱۸ هکتار و کل تولید گوجه‌فرنگی این استان ۸۱۹۶۵ تن در سال ۱۳۹۹-۱۴۰۰ و متوسط عملکرد آن ۶۷۲۸۹ کیلوگرم در هکتار می‌باشد (Agricultural Statistics, 2021). گوجه‌فرنگی (*L. esculentum*)، از خانواده Solanaceae بومی نواحی گرمسیری آمریکا بوده و از پرو به ایتالیا و سپس به کلیه نقاط دنیا انتشار یافته‌است (Heydari et al. 2004). گوجه‌فرنگی زراعی عضوی از جنس نسبتا کوچک Lycopersicon در خانواده بسیار پرتنوع و دارای اهمیت اقتصادی Solanaceae می‌باشد. این گروه به خانواده تاجریزی نیز معروف است. گوجه‌فرنگی زراعی را اغلب *L. esculentum* Mill می‌نامند، البته از نام‌های دیگری (*L. Karsten* و *L. Solanum lycopersicon* ، *L. lycopersicum*) نیز استفاده شده است (Heydari et al. 2004). بیماری تورم جوانهٔ گوجه-فرنگی (Big Bud) به علت داشتن علائم مشخصی از جمله تورم جوانه، ارغوانی شدن و تغییر رنگ برگ‌ها و تشکیل جوانه‌های گل که هرگز تبدیل به گل‌های معمولی نخواهند شد به نام بیماری تورم جوانه گوجه‌فرنگی نامیده شده‌است (Ghandi et al. 2003). این بیماری اولین بار در سال ۱۹۳۳ از استرالیا گزارش شد (Seemuller et al. 1994). در بررسی‌های انجام شده در کشورهای مختلف، ناقلین طبیعی متعددی که همگی زنجرک هستند برای این بیماری گزارش شده‌اند که مهمترین آنها عبارتند از: *Neoaliturus tenellus*، *Batrachomorphus Punctatus*، Baker، *Orosius argentatus*، *Euscelis* (Shaw et al. 1993).

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.1.5]

و غدد بزاقی حشره وارد بزاق شده و در آنجا از طریق تغذیه حشره از گیاه وارد آوندآبکش گیاه می‌شود (Lee et al. 1993). علائم بیماری تقریباً ۷ روز بعد از تغذیه حشره ناقل از گیاه در گیاه ظاهر می‌شود که البته این مدت بستگی به فتیوپلاسما و گونهٔ گیاه متفاوت بوده و بین ۲٤-٦ ماه می‌تواند به طول بیانجامد (Mccoy et al. 1989). مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داده که فتیوپلاسماهای مختلف موجود درآوندها دارای اشکال میله‌ای‌شکل هستند (Lee et al. 1993) و تفکیک آنها براساس ریخت‌شناسی و ساختمانی غیرممکن است (Mccoy et al. 1989). فیتوپلاسماها درگیاهان با علائمی مانند اختلال در رشد گیاه خود را نشان می‌دهند. علائم معمول شامل: جارویی‌شدن (کپه‌ای‌شدن شاخه‌ها)، سبزشدن قسمت‌های غیر سبزگل، پیچ خوردن (رشد طولی ساقه‌ها)، تشکیل فیبر ثانویه فشرده در ریشه، قرمز شدن ساقه و برگ، زردی، زوال و کوتولگی گیاه و نکروز آوند است (Mccoy et al. 1989). از روش‌های مولکولی می‌توان برای شناسایی عامل بیماری استفاده کرد. تعیین وجود فیتوپلاسماها در آوندهای یک گیاه به روش میکروسکوپی الکترونی توجیهی مناسب برای نسبت دادن یک بیماری ناشناخته به این عوامل است ولی این روش وقت‌گیر و پرهزینه است. همچنین می‌توان وجود فیتوپلاسماها را بوسیله میکروسکوپ نوری و با استفاده از رنگ‌آمیزی هایکروماتیک (رنگ‌آمیزی دینس) و فلورسنت تایید کرد (Davis et al. 2001).

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

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: طی سالهای ۱۳۹۳ و ۱۳۹٤ از مزارع گوجه‌فرنگی شهرستان زنجان بازدید و نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌های دارای علائم واضح بیماری و مشکوک (در مراحل اولیه آلودگی) جمع‌آوری و نیز نمونه سالم گیاه گوجه‌فرنگی نیز به عنوان شاهد انتخاب شدند. اندام‌های بیمار شامل برگ، میوه، ساقه و گل آلوده بود. حشرات موجود در مزارع آلوده که مشکوک به انتقال بیماری از بوته‌های آلوده به سالم بودند نیز به روش دستی و با استفاده از تور حشره‌گیری جمع‌آوری گردید. از جمعیت علف‌های هرز غالب مزارع گوجه‌فرنگی شامل: گل جالیز، تاج خروس، اسپرک، پیچک و توق نیز نمونه‌هایی تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید.

استخراج DNA از گوجه‌فرنگی و علف‌های هرز: با استفاده از روش تغییر یافته ژانک از برگ‌های بوته‌های سالم و بوته‌های کاملا آلوده که هیچگونه میوه‌ای تولید نکرده بود و نیز از بوته‌های آلوده‌ای که میوه تشکیل داده‌اند DNA استخراج شد (Zhang et al. 1998). برای این منظور مقدار ۰/۲۵ گرم از بافت مورد نظر در هاون استریل با ازت مایع کوبیده شد و درون لوله‌های میکروپایپت ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. لوله‌های محتوی بافت پودر شده پس از افزودن بافر CTAB به میزان ۸۰۰ میکرولیتر در حمام آبگرم در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. محتویات لوله در این مدت چند دقیقه یکبار ورتکس شد. ٦۰۰ ماکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل به نسبت ۲٤:۱ به لوله‌ها اضافه و ورتکس شد. لوله‌ها با سرعت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز شفاف رویی هر لوله برداشته شد و به یک لوله سترون دیگر اضافه شد. هم حجم محتویات هر لوله ایزوپروپانول سرد افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در فریزر ۲۰- قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه درسانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. فاز رویی مایع حذف شد. به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتراتانول ۸۰ درصد به منظور شستشوی لوله‌ها اضافه شده و با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی حذف شد. به هر لوله ۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و رسوب در آن حل شد و به عنوان DNA الگو درآزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.1.5]

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

استخراج DNA از حشرات ناقل: استخراج DNA کل از زنجرک و مگس سفید بر اساس روش تغییریافته مارگاریتوپلوس انجام گرفت (Margarito poulos et al. 2003). ابتدا حشرات در هاون چینی خرد شدند سپس ٤٧٥ میکرولیتر بافر استخراج اضافه شد (٢٥ میکرولیتر SDS ١٠ درصد و ٢٠ میکرولیتر پروتیئنازK) و در دمای اتاق به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. ٨٠ میکرولیتر NaCl ٥ مولاریته، ٦٠ ماکرولیتر CTAB ١٠ درصد اضافه شد و به مدت ١٠ دقیقه در ٦٥ درجه سانتی‌گراد جهت حذف پلی‌ساکاریدها قرار داده شد. سه مرحله محلول کلروفرم + ایزوآمیل‌الکل + فنول و ٢٠ ماکرولیتر آب مقطر به منظور کاهش غلظت NaCl اضافه شد و در سانتریفیوژ به مدت ٢٠ دقیقه با دور ٥٠٠٠ در دقیقه قرار گرفت. فاز رویی کشیده شد و هم حجم محلول بالایی ایزوپروپانول سرد اضافه شد و سانتریفیوژ شد.شستشوی رسوب DNA با اتانول ٧٠ درصد (١٠ دقیقه درون سانتریفیوژ با دور ٥٠٠٠ در دقیقه) انجام شد. الکل تخلیه شد و نمونه تا خشک شدن DNA در محیط باز گذاشته شد. پنجاه ماکرولیتر آب مقطر اضافه و نمونه در یخچال نگهداری شد. برای تهیهٔ بافر استخراج از حشره ١٠ cc Tric-HCl ٠/٥ مولار، ٢٥ cc NaCl ٠/١ مولار و ٥ cc EDTA ٠/٥ مولار استفاده شد. برای ارزیابی کیفی DNA استخراج شده از ژل آگارز ١/٢ درصد استفاده شد. برای ردیابی عامل بیماری در گیاه و حشره و بذر گیاه از آزمون PCR با جفت پرایمر P1(Forward): AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT و P7 (Revers): CGTCCTTCATCGGCTCTT استفاده شد که محصولی به طول ١٨٠٠ جفت باز نتیجه می‌دهد (Eric Verdin et al. 2003). پرایمرها در شرکت تکاپوزیست سنتز شدند. DNA استخراج شده به عنوان DNA الگو برای تکثیر با جفت آغازگر P1/P7 استفاده شد.

واکنش PCR : برای انجام PCR محلول پایه واکنش تهیه شد. حجم کلی واکنش ٢٥ میکرولیتر بود. محتویات هر لوله واکنش شامل ٥/٢ میکرولیتر بافر ١٠X، ١ میکرولیتر dNTP،٣ میکرولیتر از هر آغازگر، ٠/٣ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA Polymerase و ١٢/١ میکرولیتر آب مقطر ٢ بار استریل بود. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل: مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ٩٥ سانتی گراد به مدت ٥ دقیقه (١ چرخه)، مرحله واسرشت‌سازی در دمای ٩٤ درجه به مدت ٣٠ ثانیه (٣ چرخه)، اتصال در دمای ٥٣ درجه به مدت ٥٠ ثانیه (٣ چرخه) و گسترش در دمای ٧٢ درجه به مدت ٩٠ ثانیه (٣ چرخه)، مرحله گسترش نهایی در دمای ٧٢ درجه به مدت ١٠ دقیقه (١ چرخه) و نگهداری در دمای ٤ درجه بود. برای بررسی آزمون PCR، از محصولات PCR برگ، جوانهٔ گل، بافت میوه، بذر گیاه و حشره به عنوان محلول پایه الکتروفورز گردید و ژل بدست‌آمده را در داخل دستگاه Gel Documentation گذاشته و از آن عکسبرداری شد.

نتایج و بحث

آلودگی در مراحل ابتدایی رشد گیاه با کوتاه ماندن بوته، رشد زیاد و انبوه شدن قسمت‌های انتهایی گیاه، زردی و عقیمی کامل بوته‌های آلوده همراه بود. رشد انبوه و فشردگی قسمت‌های انتهایی نبات نتیجهٔ کاهش فاصله‌ی بین برگ‌ها و رشد جوانه‌های جانبی آن است. بوته‌های آلوده برگ‌های بسیار کوچکتر از حالت طبیعی داشتند (شکل١). براساس مطالعات انجام یافته کمبود هورمون سیتوکینین علایم زردی را روی بوته‌های آلوده تشدید می‌نماید (Davis et al. 2001).

برگ‌ها علائمی بصورت ارغوانی شدن رگ‌برگ‌ها و ضخیم شدگی برگ‌ها (شکل١)، پیچ خوردن برگ‌ها در نتیجهٔ تجمع آنتوسیانین‌ها و ریزبرگی را نشان دادند که در نتیجهٔ بهم خوردن هورمون سیتوکینین می‌باشد (Davis et al. 2001).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.1.5]

شکل ۱- سمت چپ : علائم بیماری تورم جوانه روی بوته‌های آلودهٔ گوجه‌فرنگی **سمت راست**: تغییر رنگ برگ‌های بوته‌های آلودهٔ در اثر بیماری

Fig 1. Left: Symptoms of Big bud disease on infected tomato plants Right: colour changes of leaf of infected plants

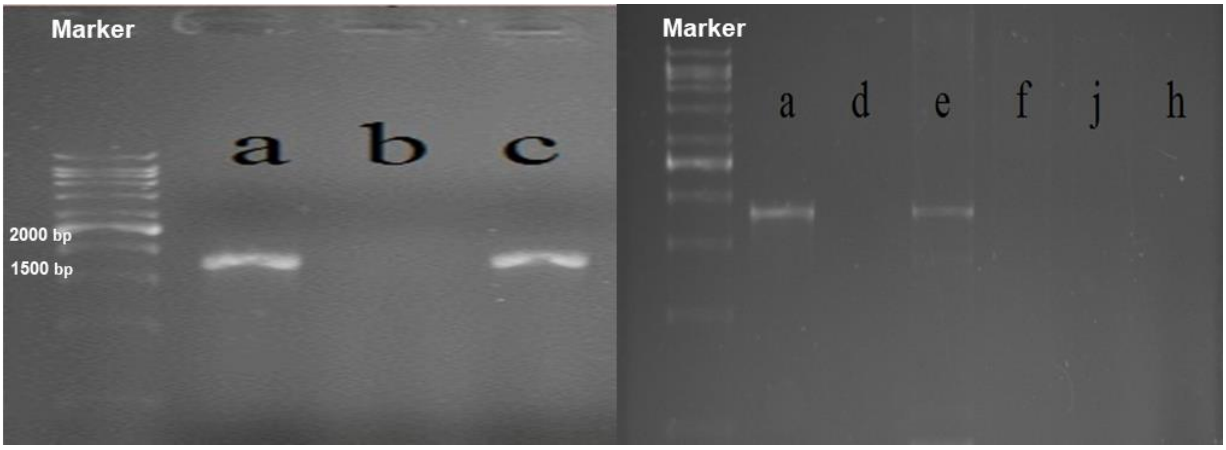
شکل ۲- سمت راست: تشکیل گیاه جدید روی جوانه‌های گل از علائم بیماری فیتوپلاسمایی گوجه‌فرنگی سمت چپ: بدشکلی میوه، سفید شدن درون میوه و عدم تشکیل بذر در میوه‌های آلوده به بیماری

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

علائم بیماری روی جوانه‌های گل به صورت تورم جوانه، تغییر رنگ، عدم تشکیل میوه، بزرگ شدن کاسبرگ‌هایی که در انتها به هم چسبیده‌اند، تبدیل کاسه گل به یک جسم کیسه مانند، تحلیل رفتن مادگی و پرچم‌ها و سبز شدن گلبرگ‌ها می‌باشد که بر اثر تجمع سطوح بالای سیتوکینین در قسمت‌های گل می‌باشد و همچنین هورمون سیتوکینین می‌تواند در توسعه کلروپلاست و ممانعت از شکستن کلروفیل موثر باشد (Davis et al. 2001). علائم جدیدی از بیماری شامل تشکیل گیاه جدید روی جوانه‌ها نیز در بررسی‌های میدانی مشاهده گردید که تاکنون در منابع گزارش نشده‌است (شکل۲).

علائم بیماری روی میوه‌های تشکیل شده بصورت بدشکلی و دفرمه شدن، تغییر طعم طبیعی میوه، تاولی شدن پوست میوه و سفت شدن میوه ظاهر می‌گردد. در برش عرضی میوه گوجه-فرنگی تغییر شکل بافت میوه و عدم تشکیل بذر مشاهده گردید (شکل۲). این علائم نیز با علائمی که شاوو در سال ۱۹۹۳، سیمولر در سال ۱۹۹٤، لی در سال ۲۰۰۰ و وردین در سال ۲۰۰۳ گزارش داده‌اند مطابقت دارد. برای اطمینان از استخراج، محصول استخراج DNA برگ بوته‌های بطور کامل بیمار، برگ بوته‌های دارای علائم اولیه بیماری، برگ سالم، جوانه‌های گل، بافت میوه و بذر در ژل آگارز و بافر TAE۱x الکتروفورز شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.1.5]



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

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

ردیابی مولکولی عامل بیماری از برگ بوته‌های آلوده و سالم

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

در این پژوهش برای اولین بار شناسایی فیتوپلاسما بر روی جوانهٔ متورم گل و بافت میوه انجام گرفته و امکان ردیابی مولکولی عامل بیماری در بافت جوانهٔ گل و میوه نیز فراهم شده‌است. نتایج پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد به دلیل این که فتیوپلاسماها انگل اجباری بافت آوند آبکش گیاهان هستند، در بافت‌هایی که آوند آبکشی ندارند قادر به رشد نمی‌باشند و به همین دلیل عوامل بیماری‌زای فیتوپلاسمایی با بذر منتقل نمی‌شوند (Bertaccini et al. 1998).

ردیابی مولکولی عامل بیماری در فون علف‌های هرز مزارع

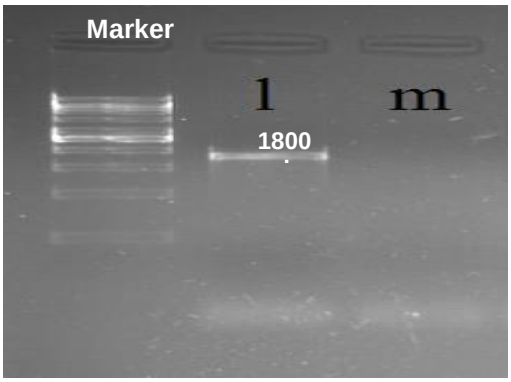
علف‌های هرز گل جالیز که از مزارع شهرستان زنجان جمع‌آوری شده بودند علائم ظاهری بیماری تورم جوانه را نشان نمی‌دادند. با روش ژانک DNA کل از علف‌های هرز فوق استخراج شد و با پرایمر P1/P7 تکثیر شد (Zhang et al. 1998). نتایج بدست آمده از الکتروفورز محصول PCR (شکل ۳) تنها در علف هرز گل جالیز باند موردنظر (۱۸۰۰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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.1.5]

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

ردیابی مولکولی عامل بیماری از فون حشرات مزارع گوجه‌فرنگی

حشره غالب بین بوته‌های گیاه آلوده مگس سفید از خانواده Aleyrodidae بود که DNA کل آن استخراج شد و محصول PCR آن هیچ باندی را نشان نداد (شکل٤). با توجه به اینکه حشره غالب در مزارع آلوده مگس سفید است، این اولین بار است که ردیابی مولکولی عامل بیماری فیتوپلاسمایی بر روی مگس سفید انجام می‌گیرد. در تکثیر قطعات اختصاصی فیتوپلاسما در DNA زنجرک‌های *Orosius argenatatus* جمع‌آوری شده از روی بوته‌های آلودهٔ گوجه‌فرنگی با جفت آغازگرهای P1/P7 باند اختصاصی ۱۸۰۰ جفت باز (شکل٤) مشاهده شد. نتایج این پژوهش در مورد گزارش عامل بیماری فیتوپلاسمایی از روی زنجرک *Orosius a.* با گزارش‌های قبلی همخوانی دارد. زنجرک گزارش شده در این پژوهش ناقل احتمالی این بیماری می‌باشد. عامل فیتوپلاسمایی از روی زنجرک‌های *Batrachomorphus Punctatus*، *Neoaliturus tenellus*، *Orosius a.*، گزارش شده‌است (Shaw et al. 1993).



شکل ٤- الکتروفورز محصول PCR ، l زنجرک، m مگس سفید ، M نشانگر اندازه (1kb ladder)

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

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

منابع

Agricultural Statistics. The level of harvest and production of crops in the Iran country, 2021. P:51. (In Farsi with English Abstract) available at : https://ajkhz.ir/main/index.php/download/akj1-keshvar-1399-1400.pdf

Anfoka, G. H., Khalil, A. B., & Fattash, I. (2003). Detection and molecular characterization of a phytoplasma associated with big bud disease of tomatoes in Jordan. Journal of Phytopathology, 151(4), 223-227. https://**doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00709.x**

Bertaccini, A., Voráčková, Z., Vibio, M., Fránová, J., Navrátil, M., Špak, J., & Nebesárová, J. (1998). Comparison of phytoplasmas infecting winter oilseed rape in the Czech Republic with Italian Brassica phytoplasmas and their relationship to the aster yellows group. Plant Pathology, 47(3), 317-324. https://**doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00229.x**

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

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.1.5]

McCoy, R. (1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organ-isms. The mycoplasmas, 545-640.

Mitrović, M., Toševski, I., Krstić, O., Cvrković, T., Krnjajić, S., & Jović, J. (2011). A strain of phytoplasma related to 16SrII group in Picris hieracioides L. in Serbia. Bulletin of Insectology, 64 (Supplement).

Qeshm R. and Dr. Kafi M. (1378), Industrial Tomatoes from Planting to Harvest, Mashhad University Press. (In Farsi)

Seemüller, E., Schneider, B., Mäurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.-H., Firrao, G., Avinent, L., & Sears, B. B. (1994). Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 44(3), 440-446. https://**doi.org/10.1099/00207713-44-3-440**

Shaw, M., Kirkpatrick, B., & Golino, D. (1993). The beet leafhopper-transmitted virescence agent causes tomato big bud disease in California. Plant Disease, 77(3), 290-295 https://doi.org/10.1094/PD-77-0290

Singh, N., Tiwari, R., & Upadhyaya, P. (2013). A strain of phytoplasma related to 16SrVI group in Datura stramonium in India. Greener Journal of Biological Sciences, 3, 253-257.

Verdin, E., Salar, P., Danet, J.-L., Choueiri, E., Jreijiri, F., El Zammar, S., Gelie, B., Bove, J. M., & Garnier, M. (2003). 'Candidatus Phytoplasma phoenicium'sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(3), 833-838. https://**doi.org/10.1099/ijs.0.02453-0**

Zhang, Y.-p., Uyemoto, J., & Kirkpatrick, B. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. Journal of Virological Methods, 71(1), 45-50. https://**doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0**

the Oleaceae. Molecular Ecology Notes, 2(3), 265-267. https://**doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00217.x**

Flôres, D., & Bedendo, I. P. (2013). A subgroup 16SrIII-B phytoplasma identified in honeyweed plants with leaf deformation in Brazil. Australasian Plant Disease Notes, 8, 59-62 https://doi.org/10.1007/s13314-013-0095-9

Ghandi H. Anfoka, Amjad B. Khalil and Fattash I. (2003). Detection and Molecular Characterization of a Phytoplasma Associatedwith Big Bud Disease of Tomatoes in Jordan.J. Phytopathology 151: 223–227. (In Persian)

Inaba, J., Shao, J., Trivellone, V., Zhao, Y., Dietrich, C. H., Bottner-Parker, K. D., Ivanauskas, A., & Wei, W. (2023). Guilt by Association: DNA Barcoding-Based Identification of Potential Plant Hosts of Phytoplasmas from Their Insect Carriers. Phytopathology®, 113(3), 413-422. https://**doi.org/10.1094/PHYTO-09-22-0323-R**

Kumari S., Sertkaya G., Krishnan N., Pandey K.K., Singh J., Çağlayan K., Rao G.P., Bertaccini A. 2023. Phytoplasma Diseases of Major Crops, Trees, and Weeds dedicated to the analysis of plant pathogenic phytoplasmas across Asia. 2: 19-44.

Lee, I., Davis, R., Sinclair, W., DeWitt, N., & Conti, M. (1993). Genetic relatedness of mycoplasmalike organisms detected in Ulmus spp. in the United States and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. Phytopathology, 83(8), 829-833.

Lee, I.-M., Davis, R. E., & Gundersen-Rindal, D. E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. Annual Reviews in Microbiology, 54(1), 221-255. https://**doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.221**

Margaritopoulos, J., Bacandritsos, N., Pekas, A., Stamatis, C., Mamuris, Z., & Tsitsipis, J. (2003). Genetic variation of Marchalina hellenica (Hemiptera: Margarodidae) sampled from different hosts and localities in Greece. Bulletin of entomological research, 93(5), 447-453. https://**doi.org/10.1079/BER2003260**

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.1.5]