

همراهی استرینی از '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' با بیماری جاروک درختان گز (*Tamarix aphylla*) روییده در اطراف باغ‌های پسته منطقه چاه‌افضل اردکان در استان یزد

سید علیرضا اسمعیل زاده حسینی^{۱*} و قباد بابائی^۲

تاریخ ارسال: ۱۴۰۲/۰۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵

چکیده

بیماری فیتوپلاسمایی جاروک درختان گز در منطقه چاه‌افضل اردکان در استان یزد به دلیل سطح گسترده آلودگی و خسارت به درختان گز از اهمیت زیادی برخوردار است. درخت گز به عنوان بادشکن باغ‌های پسته در چاه‌افضل کاشته شده و شیوع گسترده بیماری این گیاه را به عنوان منبع آلودگی برای سایر میزبان‌ها از جمله پسته تبدیل می‌کند. بر این اساس درختان گز در اطراف باغ‌های پسته منطقه چاه‌افضل با علایم آلودگی به فیتوپلاسمها شامل زردی، ریزبرگی و جاروک در سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۱ بررسی گردید. از درختان دارای علایم مشکوک به فیتوپلاسمها نمونه‌برداری و پس از استخراج DNA کل نمونه‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز یک مرحله‌ای (مستقیم) با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز دومرحله‌ای (آشیا‌نه‌ای) با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 و پس از آن R16mF2/R16mR2 و R16F2n/R16R2 در مرحله دوم انجام شد. نتایج این پژوهش وجود فیتوپلاسمای زیرگروه D از گروه جاروک بادام زمینی همراه با بیماری جاروک گز را نشان داد. فیتوپلاسمهای گروه جاروک بادام زمینی در پژوهش‌های پیشین از پسته گزارش شده و پسته می‌تواند میزبان این گروه فیتوپلاسمایی باشد. گیاهان شورزیست زیادی مثل گز به عنوان بادشکن و کاهنده فرسایش بادی خاک در بیشتر مزارع، باغ‌ها و مناطق مجاور آن‌ها در استان یزد کاشته می‌شود. گیاه گز می‌تواند به عنوان منبع احتمالی پایداری برای فیتوپلاسمها و ناقلین آن، در آلودگی به فیتوپلاسمهای گروه جاروک بادام زمینی درختان پسته و سایر محصولات کشاورزی و گیاهان دیگر در منابع طبیعی نقش داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: فیتوپلاسم، زنجرک، گروه جاروک بادام زمینی

^۱ بخش تحقیقات گیاه پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یزد، ایران
* نویسنده مسئول: phytoplasma.iran@gmail.com

^۲ بخش تحقیقات گیاه پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شهرکرد، ایران

مقدمه

کوتولگی، کاهش رشد میانگره‌ها، کاهش اندازه گل‌ها، سبز شدن اندام‌های گل، برگ مانند شدن اجزای گل، جارویی شدن در اثر رشد اندام‌های رویشی در اندام‌های گل دارای علایم فیلودی و یا در اثر افزولش شاخه‌های جانبی، بدشکلی برگ‌ها، تغییر رنگ برگ‌ها، نکروز برگ یا ریشه، افزولش جوانه‌های جانبی، تغییر در اندازه میان‌گره‌ها و تولید گل‌های غیرطبیعی مهم‌ترین علایم ظاهری بیماری‌های ناشی از فیتوپلاسم‌ها می‌باشند. این بیماری‌ها دارای پراکنش گسترده بوده و حداقل از ۱۰۰ کشور جهان بر روی گیاهان زراعی، سبزی، صیفی، درختان میوه، درختان جنگلی و مرتعی گزارش شده‌اند (Bertaccini *et al.*, 2014). بیماری‌های فیتوپلاسمایی در کشور به خصوص در استان یزد خسارت‌های زیادی به محصولات کشاورزی وارد نموده‌اند و در بسیاری از موارد کشاورزان به دلیل شدت خسارت وارده الگوی کشت خود را تغییر داده‌اند (Esmailzadeh Hosseini *et al.*, 2017). طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی به فیتوپلاسم‌های گروه جاروک بادام زمینی آلوده می‌شوند. این گروه فیتوپلاسم‌ها شامل زیرگروه‌های 16SrII-A، 16SrII-B، ('Ca. P. aurantifolia')، 16SrII-C، 16SrII-D، ('Ca. P. australasia')، 16SrII-E، 16SrII-F، 16SrII-G، 16SrII-H، 16SrII-I، 16SrII-J، Bertaccini *et al.*, 2014; 16SrII-K، 16SrII-L، Lee *et al.*, 1998 و 16SrII-M (Salehi *et al.*, 2015)

از بین عوامل بیماری‌زای گیاهی مولیکوت‌ها از اهمیت زیادی برخوردار هستند (Bertaccini *et al.*, 2014) و روی طیف وسیعی از گیاهان از جمله گیاهان رشد یافته در مناطق شور گسترش یافته‌اند. فیتوپلاسم‌ها و سه گونه اسپروپلاسم‌ها، مولیکوت‌های بیماری‌زا در گیاهان می‌باشند. مولیکوت‌ها پروکاریوت‌های ریز، فاقد دیواره‌ی سلولی، چندریختی، دارای ژنوم کوچک (۶۰۰-۱۲۰۰ کیلوگفت باز)، مقاوم به آنتی‌بیوتیک پنیسیلین و حساس به آنتی‌بیوتیک‌های گروه تتراسیکلین و دارای درصد G+C پایین می‌باشند که با انشعاب از یک گروه از باکتری‌های گرم مثبت G+C پایین به نام لاکتوباسیلوس‌ها به وجود آمده‌اند (Weisburg *et al.*, 1989). فیتوپلاسم‌ها در داخل مولیکوت‌ها یک شاخه تک‌تبار جنس پیشنهادی 'Candidatus Phytoplasma' را تشکیل می‌دهند. این بیمارگرها غیرقابل کشت و محدود به آوند آبکشی گیاهان میزبان و همولف حشرات ناقل می‌باشند و در طبیعت توسط حشرات ناقل (زنجبرک‌ها و پسیل) با رابطه پایا و تکثیری منتقل می‌شوند. از زمان کشف فیتوپلاسم‌ها در سال ۱۹۶۷ میلادی صدها بیماری همراه با فیتوپلاسم‌ها گزارش شده‌اند. اکثر بیماری‌های ناشی از فیتوپلاسم‌ها بسیار مهم می‌باشند (McCoy *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2000; Bertaccini *et al.*, 2014)

می‌باشد که یکی از مهم‌ترین گروه‌های شناخته شده در دنیا و ایران بر روی بسیاری از گونه‌های مهم گیاهی است. خصوصیات اقلیمی حاکم بر مناطق خشک و نیمه خشک فلات ایران شرایط حساس و شکننده‌ای را در این مناطق ایجاد کرده است. در این مناطق فرسایش خاک و کویری شدن از جمله فرآیندهایی است که منابع آب و خاک را به صورت مستقیم و غیرمستقیم به شدت تهدید می‌کند. احیای پوشش گیاهی در اراضی تخریب‌یافته و کویری تاثیر زیادی در کاهش فرسایش و تخریب اراضی دارد. بر این اساس در منطقه چاه‌افضل اردکان طرح‌های جنگل‌کاری با گونه‌هایی مثل گز شاهی انجام شده است. با توسعه کاشت پسته در این مناطق هم اکنون مناطقی وجود دارد که درختان گز با علایم آلودگی به بیماری‌های فیتوپلاسمایی در کنار باغ‌های پسته قرار گرفته‌اند. قبل از گزارش‌هایی از آلودگی درختان پسته به فیتوپلاسماهای گروه جاروک بادام زمینی با علایم زردی، افزولش و زوال منتشر شده است (Karimi et al., 2009; Khodaygan et al., 2013). بر این اساس لازم بود که شناسایی فیتوپلاسماهای همراه با علایم آلودگی بر روی درختان گز بادشکن باغ‌های پسته انجام گیرد.

موارد و روش‌ها

نمونه برداری

طی بازدید از درختان گز در چاه‌افضل اردکان از ۲۰ گیاه مشکوک به آلودگی به بیماری‌های

فیتوپلاسمایی در مجاور ۴ باغ پسته و ۴ گیاه بدون علایم آلودگی نمونه‌برداری و برای مطالعات بعدی به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه برای تشخیص نوع استرین فیتوپلاسمای بررسی شد.

تشخیص مولکولی

استخراج DNA کل

استخراج DNA کل از نمونه‌های مشکوک به روش Zhang و همکاران (۱۹۹۸) با تغییرات جزئی انجام شد. برای استخراج DNA از گیاه، به ۰/۲ گرم بافت پودر شده در ازت مایع درون لوله ۱/۵ میلی‌لیتری، مقدار ۷۰۰ میکرو لیتر بافر CTAB (- Tris 100mM HCl, CTAB 2 gr, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA) اضافه شد و لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵°C در بن‌ماری قرار داده شدند. به هر لوله ۷۰۰ میکرو لیتر مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شد. روشن‌ترین هر لوله به یک لوله جدید منتقل و به هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شدند. رسوب حاصل با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و پس از خشک شدن در ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر حل شد و از آن به عنوان DNA قالب در آزمون‌های PCR استفاده شد.

بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

برای تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. برای تخمین مقدار DNA هر نمونه، غلظت DNA هر یک از نمونه‌ها با غلظت نوارهای DNA نمونه تجاری فاژ لامبدا بریده شده با آنزیم‌های محدودگر *HindIII* و *EcoRI* (Marker III) تهیه شده از شرکت فرمنتاس پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۷٪ TAE مقایسه شد. به این منظور مقدار سه میکرولیتر از DNA استخراج شده با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و در ژل آگارز ۰/۷٪ TAE به مدت دو ساعت در ولتاژ ۷۵ ولت الکتروفورز گردید. سه میکرولیتر از نشانگر III نیز با همان شرایط به کار گرفته شد. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، DNA در زیر نور ماوراءبنفش (UV) با طول موج ۲۵۴ نانومتر در دستگاه UviTEC مدل CambridgeCB4 مشاهده و عکس برداری گردید. علاوه بر کیفیت DNA، تراکم باندهای DNA ژنومی با تراکم قطعات مختلف نشانگر III که بر اساس پروتکل شرکت سازنده شامل باندهای ۲۱۸ نانوگرم تا ۵/۸ نانوگرم در ۶ میکرولیتر از بافر بود مقایسه و مقدار DNA استخراجی تخمین زده شد. پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده اصلی، با افزودن آب دو بار تقطیر استریل، غلظت همه نمونه‌ها در حد ۲۵ ng/μl تنظیم گردید. نمونه‌های DNA تا قبل از استفاده در واکنش‌های PCR در فریزر -۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آزمون PCR مستقیم و دومرحله ای

برای تکثیر DNA فیتوپلاسمایی از جفت آغازگرهای عمومی فیتوپلاسمایی در واکنش PCR استفاده شد. در این تحقیق برای ردیابی فیتوپلاسمها از PCR مستقیم و دو مرحله‌ای استفاده گردید. به این منظور در واکنش PCR دور اول DNA استخراج شده توسط آغازگرهای عمومی فیتوپلاسمایی تکثیر شد. محصول این واکنش‌ها به نسبت ۳۰ برابر رقیق شد و سه میکرولیتر از آن در واکنش PCR دو مرحله ای توسط جفت آغازگرهای عمومی فیتوپلاسمایی به کار گرفته شد.

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق جفت آغازگر (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) P1/P7 و R16F2n/R16R2 و R16mF2/R16mR2 (دوراو) (Gunderen and Lee 1996) در PCR دو مرحله‌ای بود. جفت آغازگر P1/P7 حدود ۱۸۰۰ جفت باز از اپرون RNA ریبوزومی شامل ژن RNA ریبوزومی 16S، ناحیه بین ژن‌های RNA ریبوزومی 16S و 23S و ابتدای ژن RNA ریبوزومی 23S و جفت آغازگر R16F2n/R16R2 و R16mF2/R16mR2 به ترتیب حدود ۱۴۰۰ و ۱۲۵۰ جفت باز از ژن RNA ریبوزومی 16S را تکثیر می‌کنند. جفت آغازگرها به میزان توصیه شده توسط شرکت سازنده در آب مقطر استریل دو بار تقطیر حل گردید و ۱۰۰ μl از آن پس از تنظیم غلظت در ۲۰ pmol/μl در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد

آزمون چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP)

در این آزمون محصول PCR دو مرحله‌ای (۱۲۵۰ جفت باز از DNA ریبوزومی 16S) با آنزیم‌های برشی شامل *AluI* و *HaeIII*، *HhaI*، *RsaI*، *TaqI* بر اساس روش Lee و همکاران (۱۹۹۸) برش داده شد. محصول پایه واکنش ۳۰ میکرولیتری تنظیم شد. برای برش با هر آنزیم یک میکرولیتر از آن آنزیم به همراه دو میکرولیتر بافر همان آنزیم و ۱۹ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر سترون به هشت میکرولیتر محصول PCR اضافه شد و سپس به مدت چهار ساعت در ترموبلاک با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (در مورد آنزیم *TaqI* چهار ساعت در ۶۵ درجه سانتیگراد) قرار داده شد. به منظور تفکیک دقیق قطعات حاصل از برش آنزیمی از ژل اکریل آمید ۸٪ (اکریل آمید ۳۰٪ ده میلی لیتر، بافر TBE (5X) پنج میلی لیتر، آب دو بار تقطیر ۵ میلی لیتر، آمونیوم پر سولفات ۱۰٪ دو پست میکرولیتر و تمد بیست میکرولیتر) استفاده شد. برای آماده شدن قالب مخصوص ژل، ابتدا صفحه‌های شیشه‌ای قالب با آب مقطر شست و شو داده شده و سپس با اتانول ۷۰ درصد کاملاً تمیز شدند. پس از خشک شدن شیشه‌ها، فاصله انداز بین دو شیشه قرار داده شدند و به وسیله چند گیره محکم به هم متصل شدند. محلول ژل پلی‌آکریل آمید به صورت تازه تهیه شد و بین قالب ریخته شد و بلافاصله شانه ایجادکننده چاهک بین دو شیشه قرار گرفت. نیم ساعت پس از ریختن ژل شانه، شانه به

نگهداری شدند. PCR مستقیم و دو مرحله‌ای به صورت واکنش ۱۵ میکرولیتری شامل ۳ میکرولیتر DNA با غلظت پایه ۱۰ تا ۵۰ نانوگرم، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۳۵ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت با غلظت پایه pmol/μl ۲۰، ۰/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم پلی‌مراز با غلظت پایه ۵ واحد در میکرولیتر و ۸/۱۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر بود. محصول PCR مستقیم ۳۰ بار رقیق شد و از آن به عنوان DNA قالب در آزمون PCR دو مرحله‌ای استفاده گردید. لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad ساخت آمریکا) قرار داده شدند و ۳۵ چرخه دمایی شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد برای واسرشتگی DNA (اولین چرخه ۲ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد)، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتیگراد برای اتصال آغازگر، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ساختن DNA انجام گرفت. در آخر به منظور توسعه طول رشته DNA، لوله‌ها ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید از باندهای حاصل عکس برداری شد. در کلیه آزمون‌های PCR از آب و گیاه سالم به عنوان شاهد‌های منفی استفاده شد. از DNA استخراج شده از پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید.

آرامی از ژل خارج گردید و فاصله انداز از شیشه جدا شد قالب شیشه وارد مخزن تانک الکتروفورز شد و مخزن از بافر TBE 1X پر گردید. ژل آماده شده به مدت نیم ساعت با ولتاژ ثابت ۲۵۰ ولت پیش الکتروفورز شد تا ترکیبات اضافی و نمکها از ژل خارج شوند. سپس هشت میکرولیتر از محصول برش با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شد و در چاهکها تزریق شد. عمل الکتروفورز به مدت سه ساعت با ولتاژ ۲۵۰ الکتروفورز گردید. برای تخمین اندازه باندها از مارکر ۱۰۰ جفت بازی (ساخت شرکت فرمنتاس) استفاده شد. با پایان پذیرفتن الکتروفورز، شیشهها با قاشک از هم جدا شدند و به منظور مشاهده باندهای مربوط به قطعات DNA در ژل، رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام گرفت.

تعیین توالی نوکلئوتیدی

حدود ۲۵ میکرولیتر از محصول PCR دو مرحله ای با جفت آغازگر R16mF2/R16mR2 در مورد جدایه هایی که در آزمون چند شکلی طولی قطعات برشی با هم تفاوت داشتند برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. پس از دریافت توالیها، کیفیت توالی یابی نمونهها با بررسی کروماتوگرام آنها با نرم افزار کروماتس بررسی و پس از اطمینان از کیفیت مناسب آنها، توالیهای تکثیر شده هر جدایه با آغازگر مستقیم و معکوس توسط نرم افزار DNA Baser Price Calculator 4.7.0 یکنواخت گردیدند.

جستجو با برنامه بلاست و آنالیز فیلوژنتیکی

با استفاده از برنامه بلاست نزدیکترین مترادفهای فیتوپلاسمایی به فیتوپلاسمهای مورد بررسی در این تحقیق جستجو شد. با استفاده از نرم افزار (Kumar et al., MEGA software version 7 (2016) ۱۲۰۰ جفت باز از ژن RNA ریبوزومی 16S فیتوپلاسمهای مورد بررسی با مترادف مشابه فیتوپلاسمهایی از گروههای RNA ریبوزومی مختلف و *Acholoplasma laidlawii* به عنوان out group مقایسه شد و درخت فیلوژنتیکی مربوطه ترسیم گردید.

چند شکلی طولی قطعات برشی مجازی

چند شکلی طولی قطعات برشی مترادف محصول PCR دو مرحله ای با استفاده از نرم افزار *iphyClassifier* (Zhao et al., 2009) انجام شد. مترادفهای ناحیه تکثیر شده با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 در فیتوپلاسمهای مورد نظر با ۱۷ آنزیم برشی شامل *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *Bstul*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. الگوهای برشی حاصل با الگوهای حاصل از برش با این آنزیمها در فیتوپلاسمهای دیگر (Lee et al., 1998) مقایسه شد.

نتایج و بحث

در اطراف بسیاری از باغهای پسته چاهافضل اردکان درختان گز (*Tamarix aphylla*) به عنوان بادشکن

در بفروییه میبد فیتوپلاسمهای گروه جاروک بادام زمینی از روی درختان پسته با علائم زردی و ریزبرگی شناسایی و در دست مطالعه است (اسمعیل‌زاده حسینی، منتشر نشده) که زنگ خطری برای انتقال بیماری از درختان گز به پسته کاری‌های منطقه چاه‌افضل اردکان است.

کاشته شده‌اند که علائم بیماری شامل جاروک، زردی و ریزبرگی روی آنها مشهود بود (شکل ۱). بیشترین درصد آلودگی بیماری تا ۱۶ درصد بر روی درختان گز که به عنوان بادشکن بودند ثبت شد. اگرچه در چاه‌افضل اردکان علائم آلودگی به بیماری‌های فیتوپلاسمایی بر روی درختان پسته مشاهده نگردید و ردیابی نشد ولی



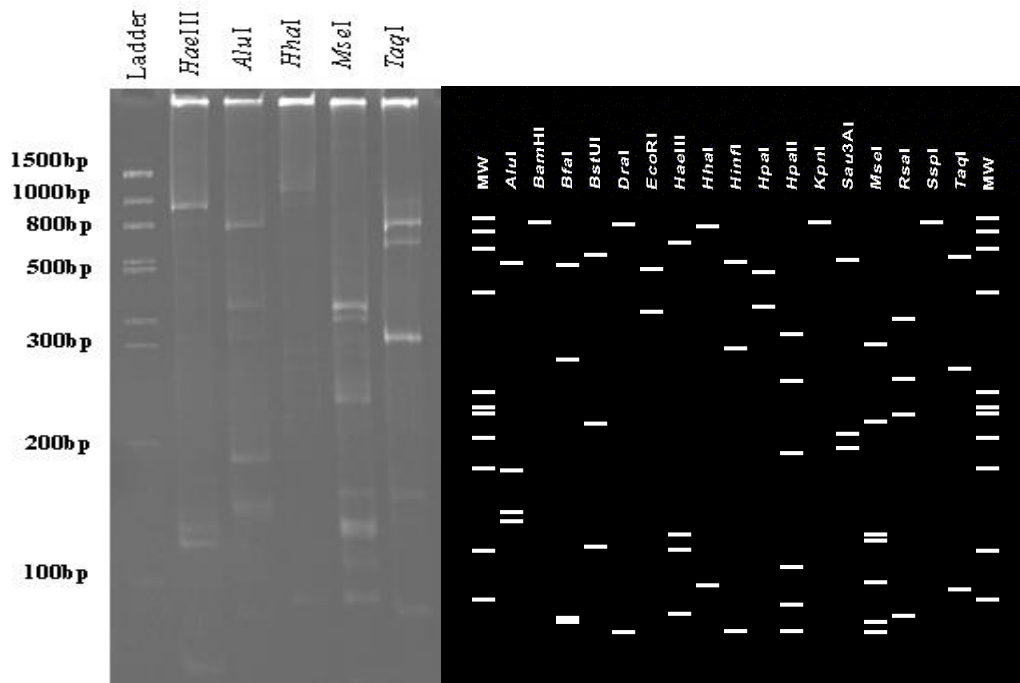
شکل ۱- a: جاروک و زردی شدید درختان گز در اثر بیماری جاروک، b: درختان گز کاشته شده به عنوان بادشکن در اطراف باغ‌های پسته منطقه چاه‌افضل اردکان در استان یزد با علائم آلودگی به بیماری

فیتوپلاسمای شناسایی شده تحت رس‌شمار PP753998 به میزان ۹۹ درصد مرتبط با فیتوپلاسمهای گروه جاروک بادام زمینی بود. آنالیز فیلوژنتیکی ۱/۲ کیلو جفت باز RNA ریبوزومی 16S نشان داد که PP753998 در کلاستر '*Ca. P. aurantifolia*' (16SrII group) (U15442) قرار گرفت (شکل ۳). نتایج RFLP مجازی با استفاده از نرم افزار *iPhyClassifier* نشان داد که استرین شناسایی شده در گز الگوی یکسان با زیر گروه 16SrII-D دارد و بنابراین

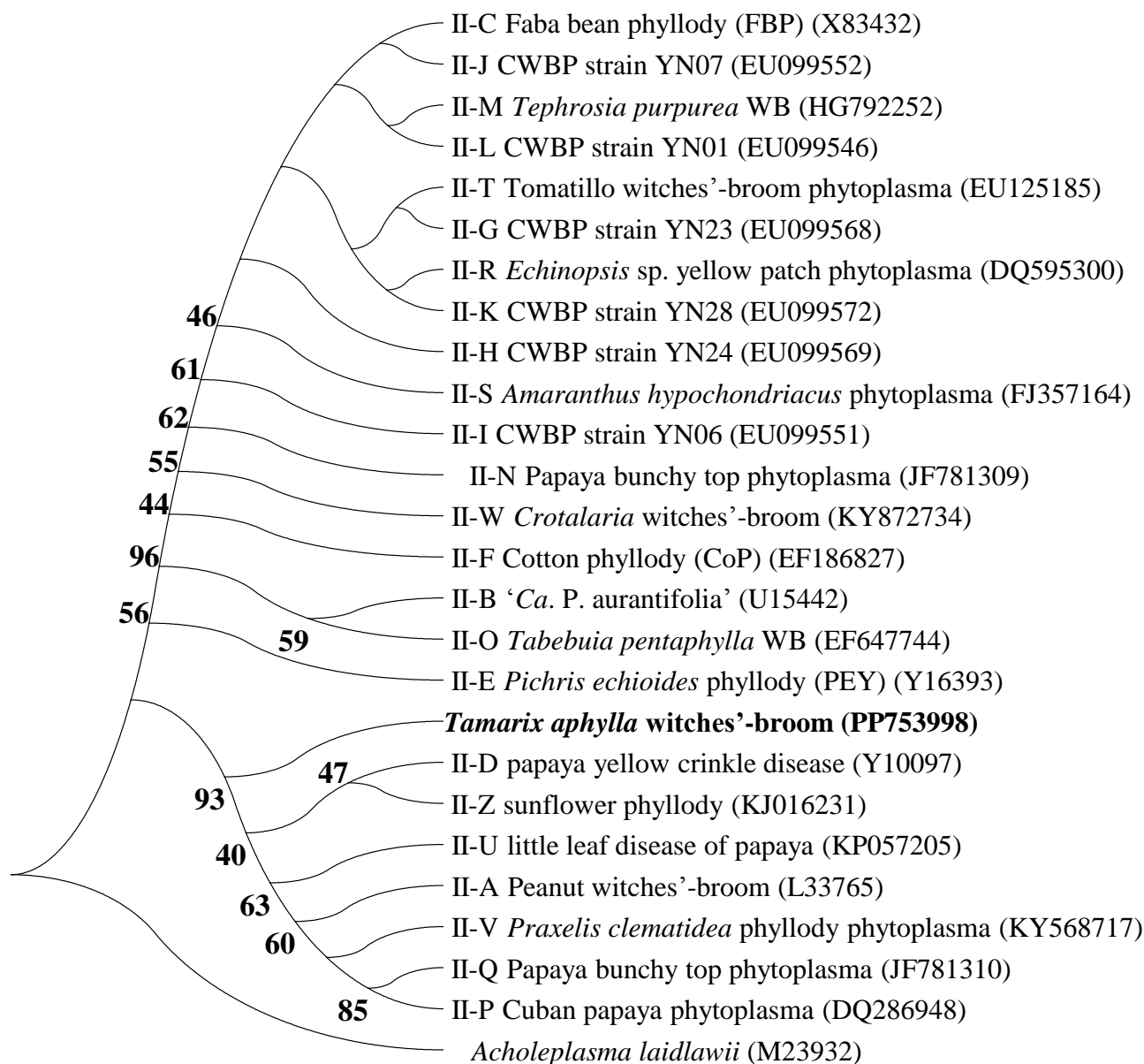
در PCR مستقیم و آشیانه‌ای محصول ۱/۸، ۱/۴ و ۱/۲ کیلو جفت باز از درختان علائم‌دار به دست آمد. بر اساس RFLP ژن RNA ریبوزومی 16S فیتوپلاسمای شناسایی شده در همه نمونه‌ها یکسان و در گروه ریبوزومی جاروک بادام زمینی قرار گرفت (شکل ۲). ۶ نمونه محصول PCR تعیین توالی و با توجه به تشابه ۱۰۰ درصدی آن‌ها یک نمونه در بانک جهانی ژن تحت رس‌شمار PP753998 قرار داده شد.

آزمون بلاست ۱/۲ کیلو جفت باز اپرون RNA ریبوزومی نمونه‌های شناسایی شده نشان داد که استرین

فیتوپلاسمای زیرگروه D جاروک بادام زمینی همراه با بیماری جاروک گز ردیابی و شناسایی گردید.



شکل ۲- الگوی RFLP حقیقی (چپ) و مجازی پروفایل ۱/۲ کیلو جفت بازی قطعه‌ی rDNA در آزمون PCR دو مرحله‌ای با استفاده از آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2 از استرین فیتوپلاسمایی جاروک گز قابل ارجاع به گروه 16SrII. چاهک M مارکر DNA. محصول DNA با آنزیم‌هایی هضم شده که در بالای هر چاهک درج شده است.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تطابق نوکلئوتیدی فیتوپلاسمای کاندید و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup با استفاده از گزینه درخت فیلوژنتیکی و روش Neighbor joining در نرم‌افزار DNAMAN بر اساس ترادف نوکلئوتیدی محصول PCR دو مرحله ای (F2nR2) نمونه جاروک گز. 'Ca. P. Candidatus Phytoplasma'، اعداد جلو هر شاخه رس شمار در بانک جهانی ترادفها و اعداد بالای شاخه‌ها، اعتبارسنجی (bootstrap) برای ۱۰۰ تکرار می‌باشند.

گونه‌های مختلف گیاهی در ایران و به شرح زیر
شناسایی شده است:

استرین فیتوپلاسمای شناسایی شده در درختان
گز به عنوان بادشکن درختان پسته در طیف وسیعی از

Artemisia sieberi; *Beta vulgaris* ssp. *esculenta*; *Beta vulgaris* ssp. *Vulgaris*; *Calendula officinalis*; *Capsicum annuum*; *Catharanthus roseus*; *Cosmos bipinnatus*; *Cucumis sativus*; *Cucurbita pepo*; *Heliopsis helianthoides*; *Medicago sativa*; *Peganum harmala*; *Petroselinum crispum*; *Petunia hybrid*; *Punica granatum*; *Saccharum officinarum*; *Sesamum indicum*; *Solanum lycopersicum*; *Solanum melongena*; *Sophora alopecuroides*; *Taverniera cuneifolia*; *Vicia faba*; *Zinnia elegans*

(Babaei *et al.*, 2022; Esmailzadeh-Hosseini *et al.*, 2023; Faghihi *et al.*, 2014; Hemmati and Nikooei, 2017, 2019; Jadidi *et al.*, 2017; Nikooei *et al.*, 2017; Salehi *et al.*, 2015, 2016, 2019; Siampour *et al.*, 2019).

کشاورزی و مناطق مجاور آنها در استان یزد به دلیل بالا بودن مقدار تبخیر و تعرق و پایین بودن میزان نزولات جوی جزو مناطق خشک و نیمه خشک بوده و گیاهان شورزیست زیادی مثل گز در آنها رشد می‌کنند این احتمال وجود دارد که این گیاه به عنوان میزبان‌های زمستان‌گذران و تابستان‌گذران ناقلین بیماری‌های فیتوپلاسمایی و همچنین استرین‌های مختلف فیتوپلاسمها باشد و نقش مهمی در همه‌گیری آلودگی‌های فیتوپلاسمایی گیاهان زراعی و باغی به خصوص پسته داشته باشد. بر این اساس مدیریت کاشت درختان گز در مناطق خشک و نیمه‌خشک و مطالعه همه‌گیرشناسی بیماری در ارتباط با باغ‌های پسته ضروری است. بنابراین بایستی از کاشت درختان گز به عنوان بادشکن در حاشیه باغ‌های پسته اردکان خودداری گردد. با توجه به آلودگی بالای درختان گز روییده در اطراف باغ‌های پسته منطقه چاه‌افضل اردکان در استان یزد در صورتی که علایم جاروک و ریزبرگی در شاخه‌های یک درخت مشاهده گردید ابتدا آن درخت با سموم حشره‌کش مناسب سمپاشی شده سپس ریشه‌کن و معدوم گردد. همچنین از قلمه‌گیری از

به نظر می‌رسد درختان گز نقش مهمی در همه‌گیری این بیماری‌ها دارند. همچنین زنجبرک *Orosius albicinctus* که یکی از ناقلین مهم بیماری‌های فیتوپلاسمایی در ایران هست (Esmailzadeh Hosseini *et al.*, 2011, 2017) بر روی درختان گز تابستان‌گذرانی و زمستان‌گذرانی می‌کند و نقش مهمی در همه‌گیرشناسی بیماری دارد. این مساله از این جهت اهمیت بیشتری دارد که در بسیاری از موارد (شکل ۱) کانون آلودگی در مجاور باغ‌های پسته قرار دارد و فیتوپلاسمهای این گروه قبلاً از روی درختان پسته با علایم زردی، افژولش و زوال گزارش شده است (Karimi *et al.*, 2009; Khodaygan *et al.*, 2013 و وجود آنها در پسته‌کاری‌های استان یزد در بفرویه میبد ردیابی شده است (اسمعیل زاده حسینی، منتشر نشده). گسترش این فیتوپلاسمها با توجه به این که بر اساس مطالعات ناقل بیماری مراحل مختلف پورگی زنجبرک *Orosius albicinctus* بر روی درختان گز در تابستان و زمستان شناسایی شده است و بیشترین جمعیت ناقلین شناسایی شده در گزهای دست‌کاشت مجاور مزارع و باغ‌ها بوده از اهمیت زیادی برخوردار است. با توجه به این که بسیاری از اراضی

- winter hosts of its vector *Orosius albicinctus* in Yazd-Iran. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): 247-248.
7. Faghihi, M., Taghavi, S., Salehi, M., Sadeghi, M., Samavi, S., & Siampour, M. (2014). Characterisation of a phytoplasma associated with *Petunia* witches' broom disease in Iran. *New Dis. Rep.* 30, 21.
 8. Gundersen, D.E., & Lee, I-M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer sets. *Phytopath Medit* 35:144-151.
 9. Hemmati, C., & Nikooei, M. (2017). Molecular characterization of a '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'-related strain associated with *Zinnia elegans* phyllody disease in Iran. *Au. Pl. Dis. Notes* 12, 11.
 10. Hemmati, C., & Nikooei, M. (2019). Phytoplasma infection could affect chemical composition of *Artemisia sieberi*. *Plant Pathol J.* 35, 274-279.
 11. Jadidi, O., Esmailzadeh Hosseini, S.A., Mirrahimi, S.R., & Salehi, M. (2017). First report of a 16SrII-D phytoplasma strain associated with *Prunus dulcis* dieback in Iran. *Proc. 6th Asian Conf. Pl. Pathol. Jeju, South Korea*, 126.
 12. Karimi, M.R., Contaldo, N., Hagian, M., Vojdanifar, M., Taymori, A., Aliakbari, R., & Bertaccini, A. (2010). Phytoplasma detection in declining pistachio orchards in Iran. In: Bertaccini A., Lavina A., Batlle A., editors. *Current Status and Perspectives of Phytoplasma Disease Research and Management*. Sitges, Spain, 20.
 13. Khodaygan, P., Moslemkhani, K., Shahbazi, R., Moradi, M., & Habibi, H. (2013). Molecular identification of 16SrII phytoplasma group in commercial pistachio cultivars in Iran. *Arch. Phytopath. Pl. Prot.* 47, 1400-1407.
 14. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870-1874.
 15. Lee, I.-M., Davis, R.E., & Ganderson, D.E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-254.
 16. Lee, I-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., & Bartoszyk, I.M. (1998).

درختان گز با علائم جاروک و ریزبرگی اکیدا" خودداری شود.

سپاسگزاری

این مقاله قسمتی از نتایج پروژه تحقیقاتی شماره ۲-۹۴۱۰۱-۲۳-۲۳ مصوب سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی می باشد که از آن سازمان و موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Babaei, G., Esmailzadeh-Hosseini, S.A., Soltani-Gerdefaramarzi, M., & Bertaccini, A. (2022). First report of a 16SrII-D phytoplasma associated with phyllody in *Heliopsis helianthoides*. *Australasian Plant Pathology* 51(117-122).
2. Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., Contaldo, N. (2014). Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *Am J Pl Sci* 5:1763-1788.
3. Deng, S., Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J Microbiol Meth* 14:53-61.
4. Esmailzadeh-Hosseini, S.A., Azadvar, M., Babaei, G., Salehi, M. and Bertaccini, A. (2023). Diversity, distribution and status of phytoplasma diseases in Iran. In: *Phytoplasma Diseases in Asian countries. Vol. 1: Diversity, Distribution and Current Status*. Eds. Tiwari AK, Caglayan K, Al-Sadi A, Azadvar M and Abeysinghe S. Academic Press. 368p.
5. Esmailzadeh Hosseini, S.A., Khodakaramian, G., Salehi, M., Bertaccini, A. (2017). Biological, serological and molecular characteristics of two 16SrII-C related phytoplasma strains associated with alfalfa witches' broom disease in Yazd and Fars provinces, Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 53(2): 165-174.
6. Esmailzadeh Hosseini, S.A., Salehi, M., & Mirzaie, A. (2011). Alternate hosts of alfalfa witches' broom phytoplasma and

- T.G., Van Eten, J., Maniloff, J., & Woese, C.R. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 171: 6455-6467
25. Zhang, Y.P., Uyemoto, J.K., & Kirkpatrick, B.C. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytoplasmas for PCR assay. *J Virol Meth* 71:45-50.
26. Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.M., Shao, J., Suo, X., & Davis, R.E. (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2582-2593.
- Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 48:1153-1169.
17. McCoy, R.E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Cousin, M.T., Dale, J.L., De Leeuw, G.T.N., Golino, D.A., Hackett, K.J., Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R.C., Sugiura, M., Whitcomb, R.F., Yang, I.L., Zhu, B.M., Seemüller, E. (1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms, pp. 545-640 In: R.F. Whitcomb, J.G Tully. (Eds.). *The Mycoplasmas*. Vol. V, Academic Press, San Diego.
18. Nikooei, M., Hemmati, C., & Bagheri, A. (2017). Association of 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' with *Cosmos bipinnatus* phyllody disease in Iran. *J. Pl. Prot. Res.* 57, 314–317.
19. Salehi, M., Esmailzadeh Hosseini, S.A., Rasoulpour, R., Salehi, E., & Bertaccini, A. (2016). Identification of a phytoplasma associated with pomegranate little leaf disease in Iran. *Crop Prot.* 87: 50-54.
20. Salehi, M., Esmailzadeh Hosseini, S.A., & Salehi, E. (2019). First report of association of a 16SrII-D phytoplasma with sugarcane white leaf disease in Iran. *Ir. J. Pl. Pathol.* 54, 367-370.
21. Salehi, M., Siampour, M., Esmailzadeh Hosseini, S.A., & Bertaccini, A. (2015). Characterization and vector identification of phytoplasmas associated with cucumber and squash phyllody in Iran. *Bull. Insectol.* 68, 311-319.
22. Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D., & Kirkpatrick, B.C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmaology*. S Razin and JG Tully (Eds), pp. 369–380. Academic Press. San Diego, CA (USA).
23. Siampour, M., Izadpanah, K., Martini, M., & Salehi, M. (2019). Multilocus sequence analysis of phytoplasma strains of 16SrII group in Iran and their comparison with related strains. *Ann. Appl. Biol.* 175(1): 83-97.
24. Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence,

The association of a related phytoplasma strain to ‘*Ca. Phytoplasma aurantifolia*’ with symptomatic tamarisk trees grown around pistachio orchards in the Chah Afzal area of Ardakan, Yazd province

Seyyed Alireza Esmailzadeh-Hosseini^{1*} and Ghobad Babaei²

Abstract

Phytoplasma disease of tamarisk witches' broom in the Chah Afzal region of Yazd province has a great importance due to the widespread and damage to tamarisk trees. The tamarisk trees are planted in Chah Afzal as windbreaks for pistachio orchards, and the extensive spread of this phytoplasma disease turns them into a source of contamination for other hosts including pistachios. The infected tamarisk trees showed phytoplasma disease symptoms, including yellowing, leaf reduction, and witches' broom were observed and investigated during 2019 to 2022. Plant samples with suspicious symptoms of phytoplasma were collected, and after extracting the total DNA of the samples, a one-step polymerase chain reaction (PCR) (using the primer pair P1/P7) or two-step PCR (using the primer pairs P1/P7 and then R16mF2/R16mR2 and R16F2n/R16R2) were performed. The results of this research indicated the presence of phytoplasma subgroup D associated with tamarisk witches' broom disease. Phytoplasma of the peanut witches' broom group have been previously reported in pistachios, suggesting that pistachios also can be host of this phytoplasma group. Salt-tolerant plants like tamarisk are grown as windbreaks and soil erosion reducers in most farms, orchards, and adjacent areas in the arid and semi-arid regions of Yazd province. Tamarisk plants can serve as a potential source of reservoir for phytoplasma and their vectors, contributing to the contamination of pistachio trees and other agricultural and natural resources plants with peanut witches' broom phytoplasma.

Keywords: leafhopper, Peanut witches' broom group, Phytoplasma

¹ Plant Protection Research Dept., Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre, AREEO, Yazd, Iran.

* Corresponding author: phytoplasma.iran@gmail.com

² Plant Protection Research Department, Chaharmahal and Bakhtiari Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre, AREEO, Shahrekord, Iran