ردیابی و شناسایی کانون‌های آلوده به بیماری پیرس انگور در استان قزوین

شکراله حاجی وند[1*] ،عباس داودی[1]

۱- استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین ۲- مربی پژوهش، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین

*نویسنده مسئول: Shokrollah2006@gmail.com

چکیده

بیماری پیرس با عامل باکتریایی *Xylella fastidiosa* یک بیماری محدود به آوندهای چوبی است. از میزبان های مهم باکتری می توان بادام، هلو، انگور و بلوط را نام برد. از آنجا که در استان قزوین انگور بیشترین سطح زیر کشت را دربین سایر درختان میوه دارد واز محصولات استراتژیک استان می باشد و با توجه به اینکه علائم مشکوک به آلودگی به این باکتری در استان دیده شده و قابل انتقال به گیاهان سالم نیز می باشد، لذا شناسایی دقیق عامل بیماری و کانون های آلوده به آن ضروری به نظر می‌رسید. در این راستا باغاتی که دارای علائم شاخص بیماری بودند، طی سال های۱۳۹۲-۱۳۹۱ شناسایی و کدگذاری شدند. از درختان انگور سطح استان با علائم شاخص بیماری نمونه برداری شد. نمونه ها با استفاده از آزمون PCR برای وجود این باکتری مورد سنجش قرار گرفتند. با استفاده از آغازگرهای عمومی*Xylella fastidiosa* بیماری پیرس در نمونه های بررسی شده جدا سازی نشد.. بررسی نمونه های با آغازگرهای عمومی فایتوپلاسماها نشان داد که تعدادی از نمونه‌ها به عامل بیماری فایتوپلاسمای زردی انگور آلوده بودند. مطالعه تکمیلی برای تعیین عوامل زنده و غیر زنده دخیل در عارضه زوال انگور تاکستان لازم به نظر می رسد.

کلمات کلیدی: پیرس، انگور، *Xylella fastidiosa* ، قزوین، تاکستان

مقدمه

باکتری *Xylella fastidiosa* باعث کاهش عملکرد محصول، زوال تدریجی گیاهان میزبان، مستعد کردن گیاهان برای خسارت سایر عوامل زنده و گاهی مرگ گیاه می شود. عامل بیماری گیاهان جوان و مسن را آلوده می کند. بنابراین در نهالستانهای درختان میوه و غیرمثمر نیز واجد اهمیت است. در طبیعت این پاتوژن با زنجرک و پیوندک آلوده منتقل می شود. از آنجایی که دوره کمون بیماری نسبتاً طولانی است ممکن است با نهال های آلوده بدون علائم ظاهری بیماری به مناطق غیرآلوده منتقل شود. میزان آلودگی خسارت بیماری بسته به شرایط محیطی، فعالیت ناقل و حساسیت میزبان متفاوت است و از چند درصد تا ۳۰٪ گزارش شده است(Gould & Lashomb, 2005). علائم مشکوک به سوختگی باکتریایی برگ (Bacteria leaf scorch , BLS) در درختان انگور استان قزوین مشاهده می‌شود ، لذا ضرورت بررسی و شناسایی دقیق عامل بیماری اجتناب ناپذیر است.

مواد و روش‌ها

از گیاهان انگور موجود در تاکستانهای استان که شامل موستان‌های سطح شهرستان تاکستان بود، علائم مشکوک به این بیماری نمونه برداری شد. پس از استریل کردن قطعات گیاهی به دو روش نسبت به استخراج شیره گیاهی آلوده به پاتوژن اقدام گردید در روش اول نمونه‌هایی به ضخامت ۲-۳ میلی‌متر از بافر PBS به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق استفاده شد و از هر نمونه ۴۵ میکرولیتر

روی محیط های کشت پخش شدند (Costa et al., 2004). و در روش دوم قطعاتی به طول ۱-۰/۵ سانتی متر بریده و با پنس یا انبردست استریل به آنها فشار تا شیره آوندی از آنها خارج شد سپس شیره خارج شده روی محیط های کشت قرار داده شد (Almedia et al., 2003.) و ظروف پتری در دمای C ° ۲۸ به مدت چهار هفته نگهداری شدند. از محیط های کشت اختصاصی PW و PD2 برای هر نمونه استفاده گردید. از نهال‌های یکساله انگور برای اثبات بیماریزایی در گلخانه استفاده شد. سوسپانسیونی با غلظت $۱۰^{۸}$- $۱۰^{۹}$ CFU/ml در بافر succinate citrate (کدر شده) تهیه شد و قطره ای (حدود ml ۰/۰۲) روی ساقه کنار جوانه (یا بین دو گره) قرار داده شد و نتایج پس ۶-۲ ماه بررسی شد. و همچنین اثبات انتقال بیماری با پیوند بوته ها با علائم بیماری بر روی نهال های یکساله از دو رقم رایج منطقه انجام گرفت. بستر PCR شامل Tris- Hcl mM10، Kcl mM 50، $MgCl_2$ mM 1.5، مخلوط dNTP از هر کدام µm200 و ۳ واحد از TaqDNA polymerase می باشد. برای تکثیر از پرایمر RST31/RST33 که برای باکتری *Xf* عمومی است استفاده شد. به هر کدام از بسترهای ۰/۲۵µl PCR از هر پرایمرو ۵ µL از DNA استخراج شده و مقداری آب مقطر اضافه شد تا حجم هر لوله (tube) به ۲۵ µl رسانده شود.محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داک مورد ارزیابی قرار گرفت.

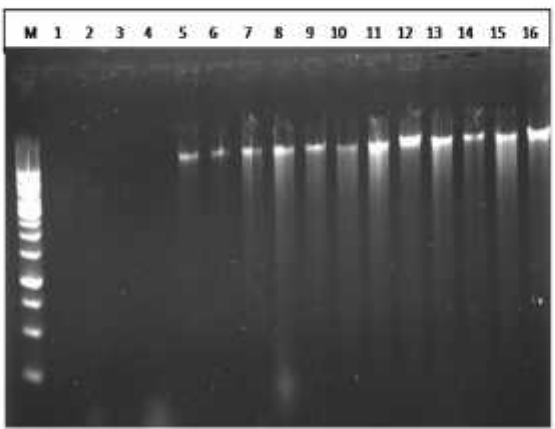
به منظور ردیابی احتمالی آلودگی های فایتوپلاسمایی در انگور به روش nested PCR از پرایمرهای یونیورسال P1/P7 و R16mF2n/R16mR1 یا R16F2n/R16R2 استفاده گردید. پرایمرهای P1/P7 قطعه تقریبا ۱۸۰۰ جفت بازی، از ناحیه انتهایی ۵ً از ۱۶S RNA تا ناحیه انتهایی ۵ً از ۲۳S RNA را تکثیر میکنند. برای انجام مرحله اول واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم نهایی ۲۰ماکرولیتر ۲۰۰میلی مولار dNTP، ۰/۵ ماکرومولار از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم Taq polymerase و ۱X بافر این آنزیم، ۲ میلی مولار کلرید منیزیوم و ۲ ماکرولیتر از DNA کل استفاده شد.

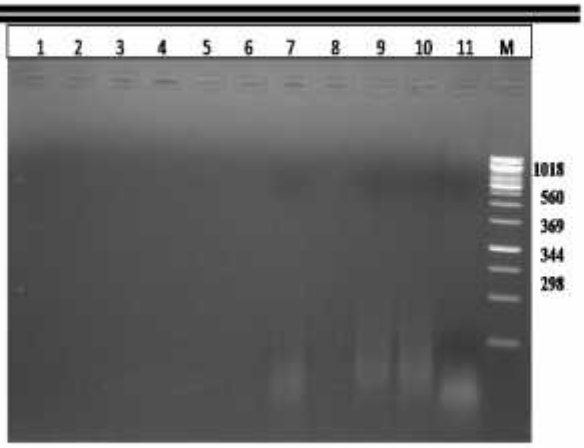
پس از انجام این مرحله، فرآورده های حاصل از واکنش در ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز شدند و در صورتی که باند مربوطه (۱۷۸۴bp) مشاهده شد، نمونه ها به نسبت ۱:۴۰ یا ۱:۳۰ رقیق شدند ولی اگر باندی در این مرحله مشاهده نشد، نمونه ها به نسبت ۱:۲۰ یا ۱:۱۰ رقیق می شدند و در مرحله دوم یا nested PCR مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله دوم از پرایمرهای R16mF2n/R16mR1یا R16F2n/R16R2 به میزان ۰/۵ ماکرومولار در حجم نهایی ۲۰ماکرولیتر همراه با ۲۰۰میلی مولار dNTP، ۱ واحد آنزیم Taq polymerase و ۱X بافر این آنزیم، ۲ میلی مولار کلرید منیزیوم و ۲ ماکرولیتر از فرآورده PCR رقیق شده مرحله قبل در واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده شد. فرآورده های حاصل از واکنش در ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز شدند.

نتایج و بحث

بررسی نمونه ها در محیط کشت: پس از کشت بر روی محیط های اختصاصی باکتری عامل پیرس از نمونه های مورد بررسی جداسازی نگردید. در آزمون بیماریزایی و انتقال از طریق پیوند نیز نتایج مثبتی حاصل نشد.

بررسی مولکولی:DNA با استفاده از کیت سیناژن و CTAB ده درصد استخراج شد. تست کیفی آن با استفاده از الکتروفروز ۱٪ انجام گردید. کیفیت DNA استخراج شده از برگ انگور با استفاده از CTAB ده درصد قابل قبول و از باند های شفاف برخوردار بود (شکل ۱).

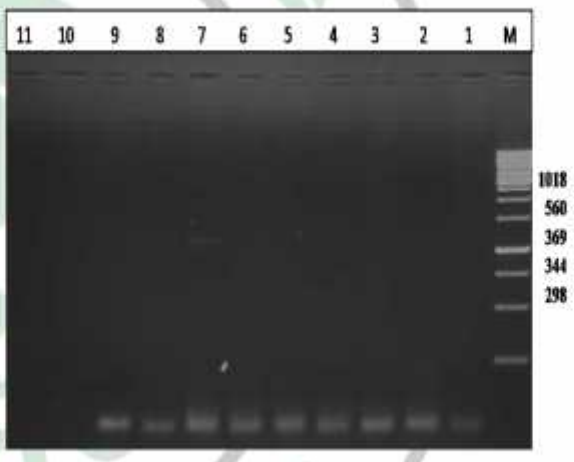


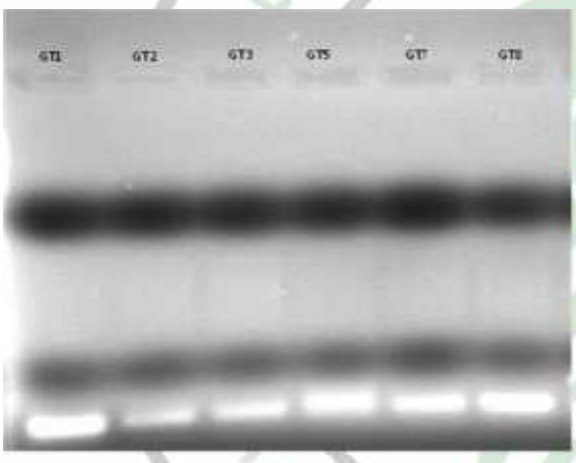


شکل۱ - تست کیفی DNA استخراج شده با روش CTAB

شکل۲ - اولین تست PCR جهت تشخیص *X. fastidiosa*

نتایج ردیابی نمونه ها با پرایمرهای اختصاصی باکتری *X. fastidiosa* نشان داد که آلودگی به عامل بیماری پیرس در نمونه های مورد بررسی وجود ندارد (شکل ۲)



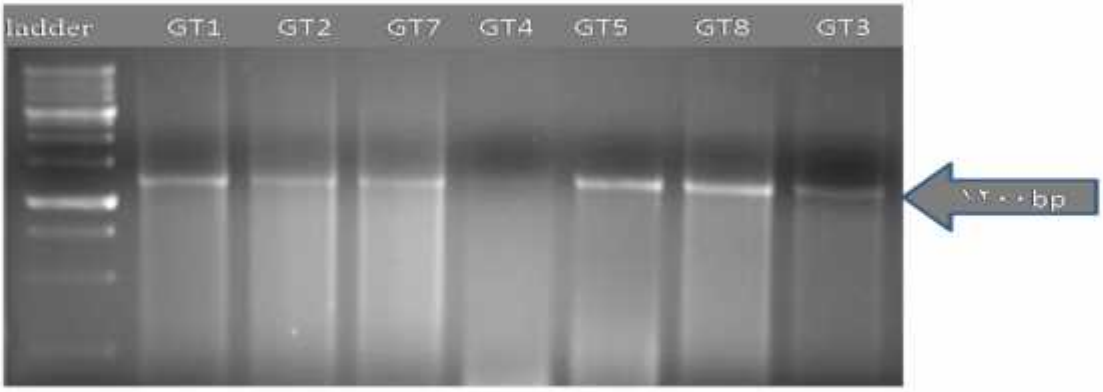


شکل۳- دومین تست PCR جهت تشخیص *X. fadtidiusa*

شکل۴- نتایج الکتروفورز فرآورده‌های PCR با استفاده از آغازگرهای P1/P7 روی نمونه‌های انگور

با توجه به اینکه در دو نمونه باندهای مشکوک مشاهده شد نمونه ها به آزمایشگاه موسسه تحقیقات گیاه پزشکی برای بررسی بیشتر منتقل و با سه جفت آغازگر عمومی تست PCR انجام و سپس رنگ آمیزی شدند. در این بررسی تست بیماری پیرس مجدداً منفی گزارش شد (شکل ۳). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که هیچکدام از نمونه ها به این باکتری آلوده نبودند.

ردیابی عوامل فایتوپلاسمایی به روش nested-PCR در نمونه های مورد بررسی: با الکتروفورز فرآورده‌های PCR در مرحله اول با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 بر روی ژل آگارز هیچ باندی مشاهده نشد که دلیل آن غلظت کم فایتوپلاسما بود (شکل- ۴). با الکتروفورز فرآورده‌های مرحله Nested با استفاده از جفت آغازگر R16R2/R16F2n بر روی ژل آگارز باند با طول حدود ۱۲۰۰ جفت باز در تعداد زیادی از نمونه‌ها مشاهده گردید (شکل-۵)



شکل ۵: نتایج الکتروفورز فرآورده‌های Nested PCR با استفاده از آغازگرهای R16F2n/R16R2 روی نمونه‌های انگور

همچنین نمونه ها با استفاده از آغازگرهای عمومی فایتوپلاسمایی بررسی شدند که نتایج حاصل از این بررسی ها مثبت و از ۱۱ نمونه بررسی شده چهار نمونه آلوده بود. تعیین توالی قطعات حاصل از نمونه های آلوده نشان دهنده آلودگی نمونه ها به فایتوپلاسمای زردی انگور می باشد.

منابع

1. Almeida, R.P.P. and Purcell, A. H. 2003. Biological Traits of *Xylella fastidiosa* strains from grapes and almonds. APPL. Environ. Microbiol. 69:7447-7452.
2. Costa, H.S., Raez, E.,Pinckard, T.R.,Gispert, C., Hernandez-Martinez, R., Dumenyo, C.R., and Cooksey, D.A. 2004. Plant hosts of *Xylella fastidiosa* in and near southern California vineyards. Plant Dis. 88:1255-1261.
3. Hewitt, W.B., Hauston, B.R., Frazier, N.W. and Freitag, J.H.1946. Leafhopper transmission of the virus causing Pierce's disease of grape and dwarf of alfalfa. Phytopathology. 36:117-128.

Detection and identification infected area of grape pierce in Qazvin

S. Hajivand*, A. Davoodi

1-Department of Seed and Plant Improvement, Agriculture and Natural Resources Research Center of Qazvin, Shahid Beheshti BLV., Qazvin, Iran. 2-Department of Plant Protection , Agriculture and Natural Resources Research Center of Qazvin, Shahid Beheshti BLV., Qazvin, Iran.

*Corresponding author: Shokrollah2006@gmail.com

Abstract

Pierce's disease is a disease with bacterial cause of *Xylella fastidiosa* is restricted to xylem vessels. The bacteria are important hosts almonds, peaches, grapes and oak named. Because grapes in Qazvin province has the largest area under cultivation of fruit trees, among other strategic products from the province, And Since symptoms of these bacteria are found in the province and is also transmitted to healthy plants, the accurate identification of the pathogen and infected centers it seemed necessary. In this regard, gardens that have prominent symptoms of the disease, the years 1392-1391 were identified and coded. Grape trees with prominent symptoms of disease were sampled province. Using samples were tested by PCR for the presence of the bacteria. Pierce's disease using primers *Xylella fastidiosa* in the samples investigated were isolated. phytoplasma samples with universal primers showed that the number of samples to cause yellowing of phytoplasma grapes were infected. Further study to determine the factors involved in the effects of biotic and abiotic deterioration grape Takestan seems necessary.

Key words: pierce, *xylella fastidiosa*, grape, Qazvin, Takestan