تشخیص مولکولی (*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia) عامل بیماری جاروک لیموترش در تعدادی از ژنوتیپ‌های مرکبات

اسد اسدی آبکنار[*1]، الهام صالحی ابرقوئی[2]، پیام پتکی[3]، مسعود معصومی[4]، حیدر امین پور[5]

[*1] بخش کشت بافت گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه شمال کشور، رشت

[2] دکتری پروکاریوتهای بیمایزای گیاهی، دانشجوی سابق بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

[3] بخش جانوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه شمال کشور، رشت

[4] پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، ایستگاه شهید یاسینی، کترا، مازندران

[5] بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

[*] نویسنده مسئول: asadiabkenarasad@gmail.com

چکیده

در دو دهه اخیر بیماری جاروک لیموترش که عامل آن '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' می‌باشد هزاران اصله از درختان لیموترش را در جنوب ایران نابود کرده است. تشخیص درست و سریع عامل بیماری جاروک با استفاده از روش‌های مولکولی و ارزیابی بیماری‌زایی آن در ژنوتیپ‌های مختلف ژرم پلاسم مرکبات نقش مهمی در به‌کارگیری ارقام مقاوم و متحمل و مدیریت بیماری جاروک لیموترش دارد. هدف از این پژوهش تشخیص فیتوپلاسمای عامل جاروک با استفاده از سه جفت آغازگر شامل P_1/P_7 در PCR مستقیم، $R_{16}F_2n/R_{16}R_2$ و re_1/rf_1 در PCR آشیانه‌ای و همچنین بررسی میزان بیماری‌زایی عامل جاروک در هشت ژنوتیپ از مرکبات بوده است. برای این منظور گیاهان مورد نظر به روش پیوند جانبی با استفاده از پیوندک آلوده به عامل بیماری جاروک لیموترش مایه‌زنی شدند و طی دو سال از نظر ظهور علائم بیماری جاروک ارزیابی و با PCR مستقیم و آشیانه‌ای مورد تشخیص قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با هر سه جفت آغازگر قطعات مورد انتظار در نهال‌های دارای علائم ظاهری جاروک و نمونه های برداشت شده از قسمت جاروک اینوکلوم تکثیر شدند.

کلمات کلیدی: به‌نژادی، جنوب ایران، فیتوپلاسما، مرکبات اسیدی (ترش)

مقدمه

تولید کل انواع لیمو ترش (لایم‌ها و لمون‌ها) در ایران در سال ۲۰۱۴-۲۰۱۳ حدود ۱/۰۲ میلیون تن برآورد شده است (FAO 2016). در بین مرکبات اسیدی، لیموترش یا مکزیکن لایم که با نام‌های تجاری لیموآب، لیمو شیراز و لیمو عمانی شناخته می‌شود، در نواحی مرکبات خیز جنوب ایران مانند استان‌های هرمزگان، سیستان و بلوچستان، فارس، بوشهر و کرمان دارای تاریخچه طولانی کاشت و پرورش بوده و اهمیت اقتصادی و اکولوژیکی قابل توجهی دارد. در دو دهه اخیر بیماری ویرانگر جاروک لیموترش که عامل آن نوعی فیتوپلاسما با نام علمی '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' (Zreik *et al.* 1995) می‌باشد صدها هزار اصله از درختان لیموترش را در جنوب ایران نابود کرده است (Faghihi *et al.*, 2011). عامل بیماری جاروک لیموترش مانند سایر فیتوپلاسماها می‌تواند توسط سمپاشی‌های منظم علیه زنجرک ناقل (*Hishimonus phycitis*) (Salehi *et al.* 2005)، اعمال قوانین قرنطینه‌ای در مناطق آلوده، حذف درختان و سایر گیاهان آلوده و به‌کارگیری ارقام مقاوم و متحمل کنترل شود. ارقام مرکبات مقاوم و متحمل به بیماری جاروک لیموترش را می‌توان با روش‌های مختلفی بدست آورد مانند انتخاب درختان غیرآلوده‌ای که در مناطق آلوده وجود دارند، به‌نژادی، القای جهش و دست ورزی ژن‌ها (Roose 2000). هدف از این پژوهش تشخیص فیتوپلاسمای عامل جاروک با استفاده از سه جفت آغازگر در PCR مستقیم و آشیانه‌ای و همچنین بررسی میزان بیماری‌زایی عامل جاروک در هشت ژنوتیپ از مرکبات بوده است.

IrHC2019

مواد و روش‌ها

نهال‌های مرکبات (جدول ۱) در یک گلخانه ایزوله با روش پیوند جانبی با استفاده از یک شاخه جاروکی لیمو ترش مایه‌کوبی شدند. بعضی از قسمت‌های بالایی نهال‌های مایه زده شده برای القاء رشد جدید دو بار هرس شدند. طی دوره ای دو ساله بعد از مایه‌زنی موفقیت آمیز، نهال‌ها از نظر علائم ظاهری بیماری جاروک مانند ظهور برگ‌های کوچک و زرد روشن، کوتاه شدن فاصله میان گره‌ها در شاخه‌های جدید و جاروک ارزیابی شدند. از دور تا دور و وسط تاج نهال‌ها نمونه‌های برگی جمع‌آوری و از ۰/۲ تا ۰/۵ گرم بافت رگبرگ و دمبرگ با استفاده از روش Murray and Thompson (1980) DNA استخراج شد. برای تشخیص عامل جاروک لیموترش از روش‌های PCR مستقیم با جفت آغازگر عمومی P_1/P_7 (Schneider 1995) و آشیانه‌ای با جفت آغازگر های عمومی R16F2n/R16R2 و اختصاصی fe_1/re_1 Askari *et al.*, 2011) استفاده شد. محصول واکنش‌های PCR در ژل آگارز یک درصد با استفاده از بافر TAE الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) زیر دستگاه مستند ساز ژل بررسی و عکس برداری شد.

نتایج و بحث

جفت آغازگر P_1/P_7 در PCR مستقیم قطعه‌ای از DNA ریبوزومی با اندازه ۱۸۰۰ جفت باز و جفت آغازگرهای R16F2n/R16R2 و fe_1/re_1 به ترتیب قطعاتی با اندازه های ۱۲۰۰ و ۱۳۶ جفت باز را تکثیر کردند (شکل ۱). در پژوهش حاضر بیست و چهار ماه پس از مایه‌زنی وجود این قطعات در تمامی نمونه های جاروک اینوکلوم مشاهد گردید. گیاهان مایه زده شده‌ای که علایم بیماری را نشان دادند قطعات مورد انتظار را نیز ظاهر نمودند. درحالی‌که نهال‌های شاهد (نهال نارنج سالم بدون اینوکلوم)، هیچ علائمی از بیماری و قطعات PCR نشان ندادند.

جدول۱. ردیابی فیتو پلاسمای جاروک لیمو ترش در هشت نمونه از مرکبات و پنج نمونه از بخش جاروک اینوکلوم

نمونه گیاهی/آغازگر	U_1	U_1 جاروک	T	T جاروک	دورگ خرم آباد	جاروک دورگ خرم آباد	کوسه لایم۱	جاروک کوسه لایم۱	کوسه لایم۲	جاروک کوسه لایم۲	B_1	6/24	6/1 آلوده
P_1/P_7	−	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
$R_{16}F_2n/R_{16}R_2$	−	+	−	+	−	+	+	−	+	+	+	+	+
re_1/rf_1	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+

دورگ کلمانتین و اورکا لمون : U_1، دورگ شانگشا و یوزو : T، دورگ سیترومیلو و شل محله : B_1، ۲۴/۶: دورگ نا شناخته، ۱/۶: دورگ خرم آباد

IrHC2019

شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR آشیانه‌ای(۱۳۶جفت باز) با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 در دور اول وfe_1/re_1 در دور دوم جهت ردیابی فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در مرکبات به کار رفته در این پژوهش. ۱:U_1، ۲: جاروک U_1، ۳: T، ۴: جاروک T، ۵: دورگ خرم آباد، ۶: جاروک دورگ خرم آباد، ۷: کوسه لایم۱، ۸: جاروک کوسه لایم۱، ۹: کوسه لایم۲، ۱۰: جاروک کوسه لایم۲، ۱۱: B_1، ۱۲: ۲۴/۶، ۱۳: ۱/۶. پائین ترین باند در مارکر سمت چپ ۲۰۰ جفت باز دارد. دورگ کلمانتین و اورکا لمون : U_1، دورگ شانگشا و یوزو : T، دورگ سیترومیلو و شل محله : B_1، ۲۴/۶: دورگ نا شناخته، ۱/۶: دورگ خرم آباد.

با استفاده از روش‌های تشخیصی به کار رفته در این پژوهش اطلاعاتی در مورد میزان غلظت فیتولاسما در گیاهان آلوده به دست نمی‌آید و باید از روش PCR در زمان واقعی (Real-time PCR) برای اندازه‌گیری کمّی فیتو پلاسما به ویژه در دو گروه از گیاهان شامل نهال های دارای علائم جاروک با PCR مثبت و نهال‌های فاقد علائم با PCR مثبت استفاده نمود. اطلاعاتی که توسط روش‌های PCR در زمان واقعی به دست می آیند به‌نژادگران مرکبات را قادر خواهد ساخت تا مناسب‌ترین ارقام والد را برای تلاقی‌های بین دو گروه از ژنوتیپ‌های فاقد علائم با PCR مثبت و فاقد علائم با PCR منفی انتخاب کنند.

مشاهدات متعدد در جنوب ایران، وجود درختان لیموترش فاقد علائم بیماری جاروک در باغ‌های کاملاً آلوده به این بیماری را تایید می‌نماید. برای کنترل بیماری جاروک لیموترش یکی از راه‌حل‌های مناسب می‌تواند استفاده از چنین ارقام احتمالاً مقاوم یا متحمل موجود باشد. از آن‌جا که لیموترش (مکزیکن لایم) چندین دهه در مناطق جنوب کشور توسط کاشت مستقیم بذر تکثیر و گسترش یافته، منشاء این درختان فاقد علائم به احتمال زیاد جنین‌های جنسی لیموترش (تقریبا ۲۰-۲۵ ٪) می‌باشد که در اثر تفرق صفات به وجود آمده‌اند. به همین دلیل بررسی دقیقی از وضعیت ظاهری درختان لیموترش در مناطق آلوده و انجام آزمون‌های مولکولی دقیق به منظور شناسایی، انتخاب و جدا سازی ژنوتیپ‌های متحمل و مقاوم ضروری می‌باشد. این راهبرد پیش‌تر نیز در کشور عمان برای دست‌یابی به لیموترش‌های مقاوم و متحمل به عامل بیماری جاروک پیشنهاد شده بود (Khan 2000).

منابع

Askari N., Salehi Jouzani Gh., Mousivand M., Foroutan A., Hagh Nazari A., Abbasalizadeh S., Soheilivand S. and Mardi M. 2011. Evaluation of anti-phytoplasma properties of surfactin and tetracycline towards lime witches' broom disease using real-time PCR. Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 81-88.

Faghihi M. M., Bagheri A. N., Bahrami H. R., Hasanzadeh H., Rezazadeh R., Siampour M., Samavi S., Salehi M. and Izadpanah K. 2011. Witches'-broom disease of lime affects seed germination and seedling growth but is not seed transmissible. Plant Disease 95: 419-422.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2016. Citrus fruit statistics 2015. http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus/en/.

Khan I. A. 2000. Present status of lime and investigations on the witches' broom disease of lime in Oman. Proceedings of the International Society of Citriculture. IX Congress. 935-938.

Murray M. G. and Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.

Roose M. L. 2000. Identification and use of genetic resistance and tolerance to new disease. Proceedings of the International Society of Citriculture. IX Congress. 952-954.

Salehi M., Nejat N., Tavakoli A. R. and Izadpanah K. 2005. Reaction of citrus cultivars to *Candidatus* phytoplasma aurantifolia in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 363-376.

Schneider B., Seemüller E., Smart C. D. and Kirkpatrick B. C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. pp. 369-380. In: R. Razin and J.G. Tully (Eds), Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology, Volum 1, Academic Press, San Diego, California.

Zreik L., Carle P., Bove J. M. and Garnier M. 1995. Characterization of the mycoplasmalike organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, *'Candidatus Phytoplasma* aurantifolia'. International Journal of Systematic Bacteriology 45: 449-453.

IrHC2019

Molecular Detection of '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia', the Causing Agent of Witches' Broom Disease of Lime in a Number of Citrus Genotypes

Asad Asadi Abkenar[1]*, Elham Salehi Abarghouei[2], Payam Potki[3], Masoud Masumi[4], Heidar Aminpur[5]
[1*] Department of Plant Tissue Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Branch of North Region, Rasht, Guilan
[2]Graduated PhD Student of Plant Pathology, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz
[3]Department of Animal Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Branch of North Region, Rasht, Guilan
[4]Research Institute of Citrus and Subtropical Trees, Shahid Yasini Station, Kotra, Mazandaran
[5]Plant Protection Research Department, Fars Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz
[*]*Corresponding Author: asadiabkenarasad@gmail.com*

Abstract

In two recent decades due to witches' broom disease of lime (WBDL), caused by '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia', thousands of acid lime trees have been killed in the south of Iran. Accurate and fast detection of WBDL agent using molecular methods and pathogenicity evaluation of different genotypes of citrus germplasm have an important role for applying tolerant or resistant cultivars in management of this disease. The aim of this study was detection of phytoplasma of WBDL using three primers including P_1/P_7 in direct, $R_{16}F_2n/R_{16}R_2$ and re_1/rf_1 in nested PCR, also pathogenicity evaluation of the agent in eight citrus genotypes. The experimental plants were inoculated using side grafting of scion containing the phytoplasma. After two years they were evaluated for symptoms of the disease (WBDL), and tested with direct and nested PCR. Results showed that using all of the three primer pairs the expected fragments were found in both of broom of the inoculums and those plants showing symptoms of the disease.

Keywords: Breeding, South of Iran, Phytoplasma, Acid Citrus

11th IrHC 2019
IrHC2019