ارزیابی واکنش تعدادی از ژنوتیپ های منتخب مرکبات نسبت به بیماری جاروک لیمو ترش

اسد اسدی آبکنار [1*]، محمد صالحی [2]، عطاالله شرفی [3]، پیام پتکی [4]، حیدر امین پور [5]، مرتضی گل محمدی [6]
۱-استادیار، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت، صندوق پستی ۴۱۱۵-۴۱۶۳۵.
۲ و ۵- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، زرقان. ۳ و ۴- مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت. ۶- موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر.

چکیده

بیماری فیتوپلاسمایی جاروک لیموترش با نام علمی *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* بیماری کشنده ای در لیمو ترش و سایر مرکبات حساس می باشد. استفاده از ارقام مقاوم، اقتصادی ترین و سالم ترین راه کنترل این بیماری به شمار می رود. به منظور معرفی ارقام مرکبات متحمل و یا مقاوم نسبت به این بیماری، برای استفاده در به نژادی و یا در کشت های جایگزین، بیست تیپ از مرکبات به روش مایه زنی با پیوند مورد محک قرار گرفتند. نهال های مایه زده دو بار (پس از ۱۴ و ۲۶ ماه)، از نظر ظهور علائم بیماری ارزیابی شدند. واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) مستقیم با جفت پرایمر fe1-re1 و آشیانه ای (Nested-PCR) نیز با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2 برای ردیابی فیتوپلاسمای جاروک انجام پذیرفت. نتایج ارزیابی های ظاهری و مولکولی نشان داد که ارقام بررسی شده در سه گروه حساس، متحمل و مقاوم قرار گرفتند. در ارقام حساس PCR و علائم ظاهری هردو مثبت، در ارقام متحمل PCR مثبت ولی علائم ظاهری منفی و در ارقام مقاوم PCR و علائم ظاهری هر دو منفی بود. تعدادی از ژنوتیپ های مقاوم ارزیابی شده در این تحقیق می توانند در تلاقی ها با لیمو ترش برای تولید ارقام مقاوم جدید مورد استفاده قرار گیرند و یا به عنوان جایگزین ارقام حساس مد نظر باشند.

مقدمه

بیماری جاروک لیمو ترش اولین بار در سال ۱۳۷۶ در سیستان و بلوچستان و متعاقب آن در استان های هرمزگان، کرمان، فارس و برخی دیگر از مناطق جنوبی ایران گزارش شد (۳). گسترش روز افزون این بیماری در نواحی مرکبات خیز جنوب کشور تهدیدی جدی برای اقتصاد کشاورزی این نواحی محسوب می شود. گسترش بیماری بسیار سریع بوده طوری که طی مدت کوتاهی با آلوده شدن چند درخت تمام باغ آلوده می شود. درصورتیکه با این موضوع به صورت جدی و مستمر برخورد نگردد تولید لیمو ترش در استان هرمزگان که آلوده ترین استان است به صفر نزدیک خواهد شد و عملا اقتصاد روستایی در بسیاری از نقاط استان هرمزگان و پیرو آن اشتغالزایی روستانشینان این منطقه با خطر جدی مواجه می‌شود (www.iwbdln.ir). برای کنترل بیماری های فایتوپلاسمائی موثرترین و اقتصادی ترین راه استفاده از ارقام مقاوم می باشد. ارزیابی (محک زدن) ژنوتیپ های یک ژرم پلاسم معین نسبت به این بیماری و سپس انتخاب یکی از راه های معرفی مقاوم ها و متحمل هاست. هدف این تحقیق آن است که ارقامی از مرکبات که نسبت به این بیماری مقاوم می باشند معرفی گردند تا بتواند در برنامه های به نژادی در تلاقی ها مورد استفاده قرار گیرند و یا به عنوان یکی از گزینه های پیشنهادی در سیاست معرفی ارقام مقاوم برای جایگزینی ارقام حساس مطرح باشند.

مواد و روشها

بیست تیپ از مرکبات (جدول ۱) از ایستگاه تحقیقات مرکبات شهید یاسینی کترا انتخاب و روی پایه نارنج و یا سیترومله، پیوند شدند (پیوند تی واژگون و بهاره). دو رگ های طبیعی انتخاب شده با کد مشخص شده اند که در هر کد رقم سمت راست شماره درخت و

رقم سمت چپ شماره ردیف در ژرم پلاسم می باشد. ویژگی های کمی و کیفی میوه ها به روش های استاندارد و معمول اندازه گیری شدند. نهال های پیوندی پس از یک سال و دو ماه رشد و نمو به عامل بیماری جاروک لیمو ترش آلوده شدند (مایه کوبی). عمل مایه کوبی از طریق انجام عمل پیوند به روش جانبی انجام پذیرفت. نهال های مایه کوبی شده در یک گلخانه ایزوله با کلیه مراقبت های داشت تا ظهور علائم ظاهری بیماری نگهداری شدند. حضور و یا عدم حضور فایتوپلاسمای عامل جاروک لیمو ترش در ژنوتیپ های مورد محک (ردیابی) با انجام PCR مستقیم توسط آغازگر های fe1/re1 و Nested-PCR (آشیانه ای) با پرایمر های عمومی فایتوپلاسما (P1/P7 و R16F2n/R16R2) آن طور که صالحی و همکاران (۱) توضیح داده اند؛ انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

صفات کمی و کیفی میوه ی دورگ های طبیعی

در جدول ۱، ویژگی های کمی و کیفی میوه های دورگ های طبیعی انتخاب شده درج گردیده است. به طوری که از این جدول بر می آید از بین دورگ های طبیعی جمع آوری شده در ژرم پلاسم کترا عمدتاً ژنوتیپ های اسیدی و تک جنین (حداقل ۶۶ درصد) انتخاب شده اند. چون متوسط تعداد بذر در میوه ی این ارقام بالاست (تا ۵۸ عدد) اگر در تلاقی ها به عنوان والد مادر مورد استفاده قرار گیرند احتمال دست یابی به بذرهای هیبرید زیادتر نیز بسیار بالاخواهد بود و همچنین مشکل جداسازی نهال نوسلار از جنسی در ژنوتیپ هایی که ۱۰۰٪ تک جنین هستند وجود نخواهد داشت. ارقام فورچون، تمپل، کلمانتین، کینگ و سلطان مرکبات یا پوملو از ارقام تجاری در دنیا می باشندکه عمدتاً به صورت تازه خوری مورد استفاده قرار می گیرند و کلیه صفات کمی و کیفی آنها شناخته می باشد. این پنج رقم صد در صد تک جنین می باشند.

ردیابی فیتوپلاسما و ظهور علائم ظاهری

پس از انجام PCR مستقیم و آشیانه ای تکثیر قطعات مورد انتظار به ترتیب 136bp و 1250bp در تعدادی از ژنوتیپ ها مشاهده شد (جدول ۲). با در نظر گرفتن ترکیب حالات ظهور و یا عدم ظهور علائم ظاهری بیماری و مثبت یا منفی بودن تست های مولکولی، ژنوتیپ های ارزیابی شده را می توان به سه دسته تقسیم بندی کرد: حساس (دارای علائم ظاهری و PCR مثبت)، متحمل (فاقد علائم ظاهری ولی PCR مثبت) و مقاوم (علائم ظاهری و PCR هر دو منفی) (جدول ۲). نتایج این تحقیق نشان داد که واکنش ژنوتیپ های مختلف مرکبات نسبت به بیماری جاروک لیمو ترش، از نظر ظهور علائم ظاهری و PCR، متفاوت است. عدم ظهور علائم ظاهری بیماری و عدم تکثیر فیتوپلاسما در نارنگی کلمانتین در تحقیق اخیر گواه مقاومت آن نسبت به این بیماری می باشد که با نتایج صالحی و همکاران (۱) همخوانی دارد. طبق گزارش چان و همکاران (۲)، Pummelo نیز به عنوان گیاه فاقد علائم پس از آلوده سازی مصنوعی در نظر گرفته شده است. در این تحقیق نیز اگر چه این گیاه وجود فیتوپلاسما را در خود نشان داد ولی علائم ظاهری بیماری را بروز نداد. واکنش دیگر ژنوتیپ ها و دورگ های طبیعی نسبت به بیماری جاروک لیمو ترش برای اولین بار در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفته است. برای ظهور علائم ظاهری بیماری جاروک فراهم بودن شرایط دمایی ثابت (۲۷ درجه سانتی گراد) ضروری می باشد، در نتیجه اگر در گلخانه این شرایط فراهم نبوده در ژنوتیپ هایی که در آنها فایتو پلاسما مشاهده نشده است حتی با فراهم آمدن شرایط محیطی مناسب نیز علائم ظاهری بیماری بروز نخواهد کرد ولی این احتمال وجود دارد که واکنش ژنوتیپ های متحمل تغییر کند. با توجه به تک جنینی و مقاومت تعدادی از ژنوتیپ های ارزیابی شده (۱۱/۲، ۲۶/ ۷ و ۶/۲۴) آنها می توانند در تلاقی ها (به عنوان والد مادر) با لیمو ترش (والد پدر) برای تولید شبه لیمو های مقاوم استفاده شوند و یا در صنعت آبگیری (تولید آب لیمو) مطرح بوده و به عنوان جایگزین ارقام حساس مد نظر قرار گیرند.

جدول **۱**. صفات کمی و کیفی میوه در ژنوتیپ های مورد مطالعه (دورگ های طبیعی).

(تک جنینی) (%)	(تعداد بذر)	شاخص بلوغ میوه	اسید کل (%)	کل مواد جامد محلول (Brix)	(ضخامت پوست) (mm)	L/W (قطر/طول)	(وزن) (g)	(رنگ پوست)	کد
۱۰۰	۱۲	۱/۸۶	۴/۸۴	۹	۱۲/۶۸	۱/۱۷	۳۷۳/۶۲	زرد	۱/۱۵
۱۰۰	۱۱/۶	۲/۴۵	۴/۲۸	۱۰/۵	۲/۲۲	۰/۹۷	۷۸/۷۸	نارنجی	۱/۱۷
۹۶/۶	۲۲/۴	۲/۳۱	۳/۸۱	۸/۸	۱۰	۱/۲۵	۳۴۱/۱۲	زرد	۲/۱۸
۹۶/۶	۲۷/۲	۱/۸۴	۴/۶۱	۸/۵	۹/۸۷	۱/۳۰	۳۱۱/۶	زرد	۶/۲۴
۱۰۰	۰/۸	۱/۳۹	۴/۶۸	۶/۵	۶/۳۹	۱/۰۶	۱۶۷/۷۷	زرد	۷/۲۶
۱۰۰	۵۸	۳/۲۹	۲/۲۸	۷/۵	۱/۱۷	۰/۸۸	۸۹۶/۲	زرد	۸/۲۶
۱۰۰	۴۵/۵	۲/۴۸	۳/۴۳	۸/۵	۱۲/۸۵	۱/۲۸	۹۰۳/۲	زرد	۹/۱
۹۶/۶	۲۶	۲/۰۷	۳/۴۷	۷/۲	۱۴/۱۲	۱/۱۲	۸۸۸	زرد	۹/۲۱
۹۳	۲۰	۱/۹۱	۴/۴۴	۸/۵	۱۰/۱۴	۱/۲۵	۳۸۸/۴۳	زرد	۱۱/۲
۶۶	۴۵/۲	۲/۷۶	۳/۶۲	۱۰	۹/۲۵	۰/۹۴	۳۳۴/۰۵	زرد	۱۲/۱
۱۰۰	۱۹/۷۵	۱/۵۵	۵/۶۸	۸/۸	۱۳/۳۱	۰/۷۲	۸۱۸/۱۴	زرد	۱۳/۷

جدول **۲**. نتیجه نهایی واکنش ارقام و ژنوتیپ های ارزیابی شده نسبت به بیماری جاروک لیمو ترش

ارزیابی نهایی(حساس، متحمل، مقاوم)	نتیجه تست PCR (+ یا -)	ظهور (+) یا عدم ظهور (-) علائم ظاهری	تعداد نهال های مایه کوبی شده	پایه	کد یا اسم ژنوتیپ
متحمل	+	-	۵	نارنج	۱/۱۵
متحمل	+	-	۸	نارنج	۱/۱۷
مقاوم	-	-	۳	نارنج	۲/۱۸
متحمل	+	-	۲	نارنج	۶/۲۴
مقاوم	-	-	۵	نارنج	۷/۲۶
متحمل	+	-	۶	نارنج	۸/۲۶
متحمل	+	-	۷	نارنج	۹/۱
مقاوم	-	-	۴	نارنج	۹/۲۱
متحمل	+	-	۵	نارنج	۱۱/۲
مقاوم	-	-	۳	نارنج	۱۲/۱
مقاوم	-	-	۵	نارنج	۱۳/۷
مقاوم	-	-	۲	نارنج	اتابکی
مقاوم	-	-	۶	سیتروملو	Fortune
مقاوم	-	-	۵	سیتروملو	Temple
مقاوم	-	-	۴	سیتروملو	Clementine
متحمل	+	-	۶	سیتروملو	Pummelo
متحمل	+	-	۴	سیتروملو	King
مقاوم	-	-	۴	سیتروملو	پرتقال کربلایی
متحمل	+	۲ تا مشکوک	۷	نهال بذری	کوسه لایم
حساس	+	+	۳	نارنج	۶/۱ خرم آباد

تصویر ۱. PCR مستقیم با جفت آغازگر fe1– re1 برای ردیابی فیتوپلاسما.
۱. دورگ؛ ۲،۴،۶ و ۸. بخش جاروک (کنترل مثبت)؛ ۳. دورگ؛ ۵. ژنوتیپ ۶/۱؛ ۷. کوسه لایم۱ ؛
۹. کوسه لایم۲؛ ۱۱. دورگ؛ ۱۲.ژنوتیپ ۶/۲۴؛ ۱۳. ژنوتیپ ۶/۱ آلوده.

منابع

۱- صالحی، م.، ن. نجات، ا. ر. توکلی، ک. ایزد پناه. ۱۳۸۴. واکنش ارقام مرکبات به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیمو ترش در ایران. بیماریهای گیاهی. ۴۱: ۳۶۳-۳۷۶.

2- Chung, K. R., Khan, I. A. and Brlansky, R. H. 2006. Citrus diseases exotic to Florida: Witches' Broom Disease of Lime. Fact Sheet PP-228, http://edis.ifas.ufl.edu.

3- Salehi, M., K. Izadpanah, and M. Taghizadeh. 2002. Witches' broom disease of lime in Iran: New distribution areas, experimental herbaceous hosts and transmission trials. Proceeding of Fifteenth IOCV Conference. 293-296.

Reaction Assessment of a Number of Citrus Genotypes to Witches' Broom Disease of Lime (WBDL)

A. Asadi Abkenar[1*], M. Salehi[2], A. A. Sharafi[3], P. Potki[4] and H. Aminpour[5], M. Golmohammadi[6]

1, 3 & 4 - Agricultural Biotechnology Research Institute of North Region of Iran, Rasht, P. O. Box 41635-4115.
2 & 5- Fars Research Center of Agriculture and Natural Resources, Zarqan Station, Iran.
6- Iran Citrus Research Institute, Ramsar
*Corresponding author

Abstract

Witches' broom disease of Mexican lime (WBDL), caused by a phytoplasma (Candidatus *Phytoplasma aurantifolia*) is a lethal disease of Mexican lime and other sensitive citrus species. Use of resistant cultivars is the most economical and safest way for control of this disease. In order to introduce citrus cultivars resistant or tolerant to WBDL for using in breeding programs or in alternative cultures, in the present study 20 citrus genotypes were evaluated for WBDL using graft inoculation method. The inoculated trees were evaluated for the symptoms after 14 and 26 months. Direct PCR using re1/rf1 primer pairs and nested PCR using P1/P7 and R16F2n/R16R2 primer pairs were performed to test the existence of the phytoplasma. The results of this study showed that the genotypes were placed in one of the following group; tolerant (PCR was positive but symptoms were negative); resistant (both PCR and symptoms were negative) and sensitive (both PCR and symptoms were positive). Some of the resistant

genotypes evaluated in this study are suggested to be used for crossing with Mexican lime in producing new resistant cultivars or may be used for substitution of sensitive cultivars.