

همراهی فیتوپلازما *Candidatus* در درختان میوه هسته‌دار استان گلستان: گزارش یک مطالعه تشخیصی

Association of *Candidatus* phytoplasma in stone fruit trees of Golestan province of Iran: a diagnostic study report

محمد رضا زرهون^۱، سعید نصرالله‌نژاد^{۲*}، الهام محمودی^۳ و آتنا زاهدی طبرستانی^۳

پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۹

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۱

چکیده

در بازدیدهای بهار، تابستان و پاییز سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ از باغات درختان میوه هسته‌دار استان گلستان، علائم مشکوک به بیماری فیتوپلازمایی مانند زردی، زوال، قرمز شدن و ریزبرگی مشاهده شد و ۲۸ نمونه از برگ میزبان‌های مختلف درختان میوه هسته‌دار جمع‌آوری گردید. از آغازگرهای عمومی P1/P7 برای آزمون PCR عمومی و آغازگرهای R16F2n/ R16R2 برای آزمون PCR آشیانه‌ای استفاده شد. نمونه‌های آلوده قطعات ۱۸۰۰ جفت‌باز را در PCR عمومی و قطعه ۱۲۵۰ جفت‌باز را در PCR آشیانه‌ای تکثیر کردند که از بین ۲۸ نمونه جمع‌آوری شده، ۳ نمونه از درختان هلو دارای باند در ناحیه مدنظر بودند؛ سپس محصول PCR آشیانه‌ای پس از توالی‌یابی در بانک جهانی ژن با شماره دسترسی‌های OQ945143 و OP055811 ثبت شدند. همزمان پیوند بر روی گیاه محک پروانش با هدف مخزن ذخیره ژن و مشاهده علائم فیتوپلازما صورت گرفت. مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های موجود در سایت NCBI توسط نرم‌افزار بر خط بلاست، بیشترین شباهت را به فیتوپلازماهای Aster yellows phytoplasma نشان داد و آنالیز فیلوژنتیک توالی مدنظر با الگوریتم تخمین درست‌نمایی بیشینه در مقایسه با زیرگروه‌های مختلف فیتوپلازمای گزارش شده در ایران نیز نتایج حاصل از بلاست را تأیید کرد. همچنین مقایسه نقوش حاصل از RFLP مجازی، مشابه‌ترین الگوی مرجع گروه 16SrI، زیرگروه AD (دسترسی GenBank: DQ286577)، با ضریب شباهت ۰/۷۷ را مشخص کرد که این موضوع نشان داد که این سویه ممکن است نشان‌دهنده یک گروه جدید باشد. نتایج این مطالعه حضور فیتوپلازما را در درختان هلو استان گلستان برای اولین بار تأیید نموده و نشان از حضور گونه فیتوپلازمایی نزدیک به *Candidatus* phytoplasma asteris در استان گلستان دارد.

واژگان کلیدی: فیتوپلازما، آنالیز فیلوژنتیکی، درختان میوه هسته‌دار، زردی و زوال هلو

مقدمه

فیتوپلازماها بیمارگرهای گیاهی بدون دیواره سلولی از رده Mollicutes با اندازه ژنوم کوچک هستند. این بیمارگرها در گیاهان آلوده، در آوند آبکش مستقر شده و به‌وسیله حشرات تغذیه کننده از آوند آبکش مانند زنجرفک‌ها یا پسیل‌ها بین گیاهان به‌صورت مداوم منتقل می‌شوند (Salehi *et al.*, 2020). ناتوانی در جداسازی و کشت فیتوپلازما، شناسایی و طبقه‌بندی آن‌ها را دشوار کرده است، بنابراین سنجش PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی که بر اساس توالی‌های حفاظت‌شده ژن 16S rDNA طراحی شده‌اند، امکان تشخیص طیف وسیعی از فیتوپلازماهای ناشناخته مرتبط با گیاهان و حشرات را فراهم می‌کند (Alkhozindar and AbdelSalam, 2014). ایران یکی از مهم‌ترین مناطق تولید میوه‌های هسته‌دار در سراسر جهان است. در سال ۱۳۹۶ در مجموع ۲۳۱۰۰۰ تن انواع میوه‌های هسته‌دار از حدود ۲۵۲۸۰۰۰

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: snasrollanejad@yahoo.com

هکتر زمین در ایران تولید شد (Zirak *et al.*, 2020). باتوجه به نرخ سازگاری محیطی پایین هسته‌داران، متوسط طول عمر این درختان بین ۱۵ تا ۲۵ سال ذکر گردیده است، اما فقدان سازگاری محیطی و بروز حاد انواع مشکلات تغذیه‌ای و بیماری‌ها (دو عامل مرتبط با یکدیگر) موجب شده تا متوسط عمر هسته‌داران به ده تا دوازده سال کاهش یابد (Beckman and Long, 2003). درختان هسته‌دار میزبان بیش از ۳۰ عامل بیماری‌زای ویروسی و شبه‌ویروسی هستند. بین عوامل ویروسی و فیتوپلاسمایی نیز ویروس‌های لکه حلقوی گوجه‌فرنگی (*Prunus necrotic ringspot ilarvirus*, PNRSV)، لکه حلقوی نکتروتیک درختان میوه هسته‌دار (*Tomato ringspot nepovirus*, ToRSV)، آبله آلو (*Plum pox potyvirus*, PPV) و انواعی از فیتوپلازماها مانند عامل زردی اروپایی هسته‌داران (*Candidatus Phytoplasma prunorum*) و جاروک بادام (*Candidatus Phytoplasma phoenicium*) به‌عنوان عوامل بیماری‌زا با توانایی ایجاد سرخشکیدگی، زوال و دامنه‌ای از علائم برگ‌ی شامل زردی، ابلقی، لکه‌های نکتروتیک و سبزرزدی در سایر مناطق کشت درختان هسته‌دار گزارش شده است که به شدت بر تولیدات کشاورزی مرتبط با درختان میوه هسته‌دار تأثیر می‌گذارد (علوی و تیموری، ۱۳۹۹؛ Davis *et al.*, 2013). در بین درختان میوه هسته‌دار، درختان هلو نسبت به آلودگی ناشی از فیتوپلازما بسیار حساس هستند. چندین بیماری هلو در سراسر جهان در ارتباط با فیتوپلازماهایی که از نظر ژنتیکی و زیستی متمایز بوده و حداقل یازده گروه طبقه‌بندی 16Sr (16SrI, II, III, V, VI, VII, IX, X, XII, XV, XVII) گزارش شده‌اند. مطالعات قبلی وجود بیماری‌های فیتوپلاسمایی درختان میوه هسته‌دار را در ایران گزارش کردند که باعث لوله شدن برگ، ریزبرگی، زرد شدن و زوال می‌گردد (Salehi *et al.*, 2020). پس از بازدید در باغات درختان میوه هسته‌دار استان گلستان، نمونه‌هایی با علائم مشکوک به بیماری فیتوپلاسمایی مشاهده گردید. از آنجایی که روش آنالیز فیلوژنتیکی و توالی‌یابی معین و مشخصی در مورد فیتوپلازماهای درختان میوه هسته‌دار در استان گلستان در دست نیست، لذا هدف از این مطالعه ردیابی و شناسایی فیتوپلازماهای همراه درختان میوه هسته‌دار با تکیه بر تکنیک‌های PCR، آنالیز فیلوژنتیک و مقایسه نقش RFLP مجازی (Virtual Restriction fragment length polymorphism) با استفاده از ناحیه 16s rRNA بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از باغات درختان هسته‌دار

جهت مطالعه و بررسی درختان میوه هسته‌دار از جمله هلو، شلیل، آلو و گیلاس با علائم مشکوک به بیماری فیتوپلاسمایی، نمونه‌های دارای علائم زردی، قرمز شدن برگ، ریزبرگی و زوال، از ۲۸ نمونه با میزبان‌های مختلف درختان میوه هسته‌دار در باغات استان گلستان در فصول بهار، تابستان و پاییز سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ جمع‌آوری گردید (جدول ۱). نمونه‌ها بلافاصله درون یک فویل آلومینیومی پیچیده و درون یخدان به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج DNA و آزمون PCR

DNA ژنومیک گیاهی با کیت استخراج DNA (Genomic DNA isolation kit IV; DENA Zist Asia, Iran) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. غلظت DNA با اسپکتروفتومتر NanoDrop اندازه‌گیری شد و کیفیت با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تأیید شد. نمونه‌های DNA با استفاده از آب مقطر استریل شده با غلظت نهایی ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق شدند و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. از آزمون PCR به‌طور مستقیم با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 جهت تکثیر توالی اپرون ریبوزومی 16s-23s rRNA فیتوپلازما استفاده شد و جهت حصول اطمینان بیشتر از نمونه‌های دارای فیتوپلازما یک مرحله آزمون PCR آشیانه‌ای نیز انجام گرفت. با این‌وجود، نتایج حاصل از این دو مرحله آزمون PCR نیز برای تشخیص و ردیابی فیتوپلازما کفایت نکرده و نیاز بود که محصول PCR آشیانه‌ای نمونه‌های دارای باند در محدوده ۱۲۵۰ جفت باز برای توالی‌یابی ارسال گردید تا با دقت بالاتری حضور ارگانسیم مورد نظر ارزیابی شود. در این تحقیق آزمون PCR آشیانه‌ای با آغازگرهای R16F2n و R16R2 انجام شد (جدول ۲).

جدول ۱- اطلاعات مربوط به نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان گلستان

تعداد نمونه Total No.	علائم Symptoms	میزبان Host	اندام گیاهی Plant Organ	GPS	منطقه نمونه‌برداری Sampling site		
1	Decline and Yellows	زردی و زوال	Peach	هلو	Leaf برگ	36.786217, 54.141910	کردکوی Kordkoy
1	Yellows	زردی	Nectarine	شلیل	Leaf برگ	36.786286, 54.160407	
2	Decline	زوال	Nectarine	شلیل	Leaf برگ	36.835556, 54.335501	
2	Decline and Yellows	زردی و زوال	Peach	هلو	Leaf برگ	36.823940, 54.283780	گرگان Gorgan
2	Reddening	قرمز شدن	Plum	آلو	Leaf برگ	36.847405, 54.489525	
1	Small leaves	ریز برگی	Plum	آلو	Leaf برگ	36.852282, 54.518364	
2	Yellows	زردی	Nectarine	شلیل	Leaf برگ	36.864918, 54.486950	
1	Yellows	زردی	Nectarine	شلیل	Leaf برگ	36.828171, 54.512871	
1	Yellows and small leaves	زردی و ریزبرگی	Peach	هلو	Leaf برگ	36.920490, 54.760098	علی‌آباد کتول Aliabad Katul
1	Small leaves	ریزبرگی	Plum	آلو	Leaf برگ	36.898392, 54.796147	
1	Yellows	زردی	Nectarine	شلیل	Leaf برگ	36.948482, 54.932618	
2	Decline	زوال	Cherry	گیلاس	Leaf برگ	36.948482, 54.932618	
2	Reddening	قرمز شدن	Peach	هلو	Leaf برگ	37.034997, 55.056801	دلند Daland
1	Reddening and yellows	قرمز شدن و زردی	Nectarine	شلیل	Leaf برگ	37.029995, 55.030494	
2	Yellows and small leaves	زردی و ریزبرگی	Plum	آلو	Leaf برگ	37.034997, 55.056801	
3	Yellows	زردی	Cherry	گیلاس	Leaf برگ	37.034997, 55.056801	
1	Small Leaves	ریزبرگی	Peach	هلو	Leaf برگ	36.760474, 53.976279	
1	Reddening	قرمز شدن	Plum	آلو	Leaf برگ	36.768106, 54.004002	بندگز Bandare Gaz
1	Yellows	زردی	Plum	آلو	Leaf برگ	36.773813, 54.018422	
28	Total Number of Samples				تعداد کل نمونه‌ها		

برای هر دو آزمون PCR عمومی و PCR آشیانه‌ای از مسترمیکس پی‌سی آر 2X Taq premix استفاده شد. بدین صورت که ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت ۰/۵ میکرومولار، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت ۰/۵ میکرومولار، ۳ میکرولیتر نمونه DNA استخراج شده و ۵ میکرولیتر آب استریل شده با هم ترکیب شده و به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. در آزمون PCR با آغازگرهای عمومی، چرخه‌های دمایی PCR عبارت بود از یک برنامه تک چرخه‌ای شامل دمای ۹۵°C به مدت ۲ دقیقه برای دناتوراسیون اولیه، یک چرخه با ۳۵ تکرار شامل دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۴°C به مدت ۷۵ ثانیه، دمای ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه نهایی با یک تکرار در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد.

جدول ۲- اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده در آزمون‌های PCR و PCR آشیانه‌ای

منبع Reference	موقعیت Position	اندازه قطعه تقویت شده Amplified fragment size	توالی Sequence	نام آغازگر Primer name
Deng and Hiruki, 1991	16sr DNA	1800 bp	AAGAATTGATCCTGGCTCAGGATT	P1: Forward
Schneider <i>et al.</i> , 1995	23sr DNA		CGTCCTTCATCGGCTCTT	P7: Reverse
Gundersen and Lee, 1996	16sr DNA	1250 bp	GAAACGACTGCTAAGACTGG	R16F2n: Forward
Lee <i>et al.</i> , 1993	16sr DNA		TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	R16R2: Reverse

سپس محصول PCR همراه با DNA Fluorescent Loading Dye در ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز گردید و سپس PCR آشیانه‌ای همراه با آغازگرهای R16F2n و R16R2 انجام شد؛ چرخه دمایی PCR آشیانه‌ای نیز در این مرحله کمی با مرحله قبلی متفاوت بود و عبارت بود از یک برنامه تک چرخه‌ای شامل دمای ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه برای دناتوراسیون اولیه، یک چرخه با ۳۵ تکرار شامل دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰°C به مدت ۷۵ ثانیه، ۷۲°C درجه به مدت

۹۰ ثانیه و یک چرخه نهایی با یک تکرار ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲°C. محصول PCR آشیانه‌ای که شامل قطعه تکثیر شده ۱۲۵۰ bp ژن RNA ریپوزومی 16S هست، همانند مرحله قبل در ژل آگارز ۱/۲ الکتروفورز شدند. محصولات PCR آشیانه‌ای تکثیر شده در محدوده ۱۲۵۰ bp، وجود فیتوپلازما را می‌توانند از نمونه‌های استخراج شده تأیید کنند.

پیوند به گیاه محک پروانش

نهال‌های ۳ ماهه گل پروانش (*Catharanthus roseus*) از نهالستان محلی گرگان در استان گلستان به‌عنوان گیاهان محک تهیه شدند. همه نهال‌ها با استفاده از واکنش‌های PCR آشیانه‌ای با استفاده از پروتکل شرح داده شده، به‌عنوان عاری از فیتوپلازما تأیید شدند. شاخه‌هایی از درختان دارای علائم و تشکیل‌دهنده باند در PCR عمومی و PCR آشیانه‌ای به‌عنوان پیوندک تهیه شد. چهار پیوندک از آنها به گیاهان محک به روش پوستی پیوند داده شد و یک نهال نیز بدون پیوند به‌عنوان شاهد باقی ماند. نهال‌های پیوند شده و پیوند نشده به مدت ۴ ماه در گلخانه ضدحشره به‌عنوان مخزن ذخیره ژن فیتوپلازما و مشاهده علائم نگهداری شدند.

تعیین توالی و تعیین ترادف

محصول PCR آشیانه‌ای با جفت آغازگرهای R16F2n/R16R2 جهت تعیین توالی به شرکت Microsynth سوئیس ارسال گردید. توالی‌یابی با روش سانگر انجام شد و نتایج به‌دست‌آمده در نرم‌افزار Mega-X از وجود فاصله‌های اضافی اصلاح گردید. توالی حاصل با استفاده از نرم‌افزار برخط بلاست موجود در سایت NCBI با تمام توالی‌های مرتبط با فیتوپلازما موجود در بانک ژن مقایسه و نزدیک‌ترین توالی به آن‌ها در نظر گرفته شد. از ترادف‌های دارای شباهت زیاد، دو توالی به نمایندگی در بانک ژن ثبت شدند. آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌ها و نزدیکی آن‌ها با گروه‌ها و زیرگروه‌های مختلف فیتوپلازما با استفاده از نرم‌افزار Mega-X و به‌روش تخمین درست‌نمایی بیشینه (Maximum likelihood) با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی بوتاسترپ انجام شد. از *Acheloplasma axanthum* به‌عنوان گروه خارجی برای آنالیز فیلوژنتیکی استفاده گردید. جهت تکمیل تعیین ترادف فیتوپلازما از روش مقایسه نقوش RFLP مجازی با استفاده از برنامه iPhyClassifier موجود در تارنمای <https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi> استفاده گردید.

نتایج و بحث

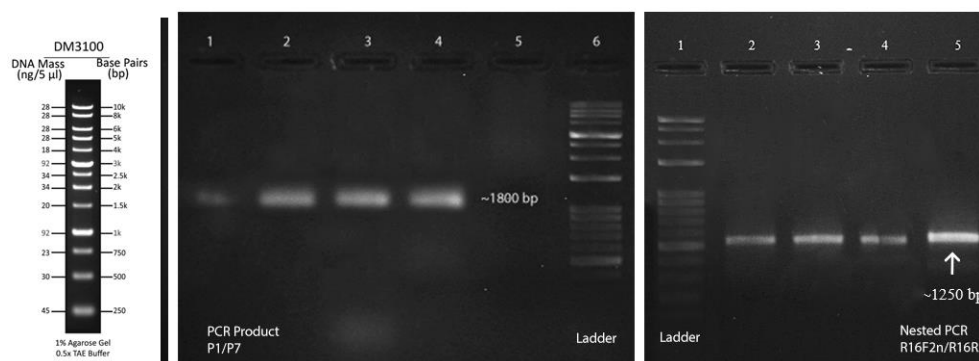
علائم مشکوک به بیماری فیتوپلازمایی در درختان میوه هسته‌دار در باغات استان گلستان مشاهده گردید. علائم بیماری شامل زردی، ریزبرگی، قرمز شدن، لوله‌ای شدن و زوال درخت بود (شکل ۱). نمونه‌های جمع‌آوری شده دارای علائم با آزمون PCR عمومی همراه با آغازگرهای P1/P7 و PCR آشیانه‌ای با آغازگرهای R16F2/R16R2 از نظر آلودگی به فیتوپلازما بررسی شدند. در هر دو آزمون پس از انجام مرحله الکتروفورز، محصول PCR حاوی DNA نمونه‌های آلوده، قطعات مورد انتظار ۱۸۰۰ جفت‌باز را در PCR عمومی و قطعه ۱۲۵۰ جفت‌باز را در PCR آشیانه‌ای تکثیر کردند (شکل ۲). در همین راستا هیچ باندهایی از درختان سالم و بدون علائم مشاهده نشد. در مجموع از ۲۸ نمونه جمع‌آوری شده، ۳ نمونه آلوده به فیتوپلازما شناسایی شدند که همگی آن‌ها از نمونه‌های جمع‌آوری شده از درختان هلو بوده‌اند. همچنین پس از گذشت ۳ ماه از پیوند به گیاه محک پروانش، همه نهال‌های مورد آزمایش علائم ریزبرگی و زردی در برگ‌ها مشاهده گردید و نهال شاهد بدون علامت باقی ماند.

تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیکی

دو مورد از محصول PCR آشیانه‌ای سه نمونه درخت هلو دارای باند، پس از توالی‌یابی به علت شباهت زیاد با یکدیگر، به نمایندگی پس از هم‌ترازی با شماره دسترسی‌های OQ945143 و OP055811 در بانک ژن NCBI به ثبت رسیدند. جستجو با برنامه برخط بلاست با استفاده از توالی هم‌تراز شده نشان داد که توالی مورد مطالعه در این تحقیق در میان فیتوپلازماهای موجود در بانک ژن بیشترین نزدیکی را با گونه فیتوپلازمای *Aster yellows phytoplasma* دارا بود.



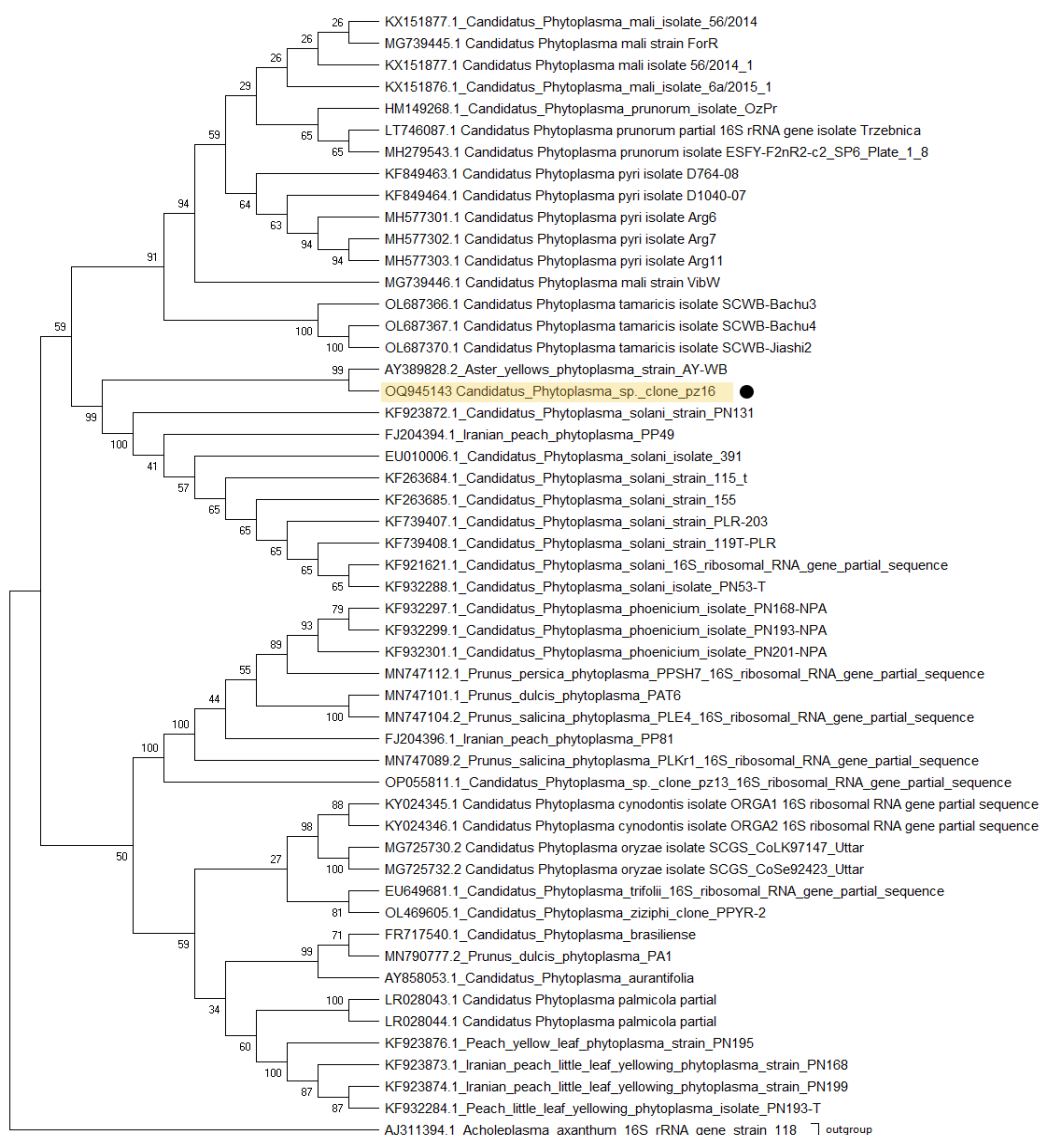
شکل ۱- علائم درختان هلو آلوده به بیماری فیتوپلازما در باغات استان گلستان، مقایسه آوند درختان هلو سالم و مشکوک به آلودگی فیتوپلازما (۱)، علائم زوال و قرمز شدن برگ (۲)، لوله‌ای شدن و ریزبرگی (۳)
 Fig. 1. Symptoms of peach trees infected with phytoplasma in the orchards of Golestan province, comparing the vascular tube of healthy and suspected phytoplasma infected peach trees (1), signs of decline and reddening of leaves (2), rolling and small leaves (3)



شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR با آغازگرهای P1/P7 و تشکیل باند در محدوده ۱۸۰۰ جفت‌باز و R16F2/R16R2 با تشکیل باند در محدوده ۱۲۵۰ جفت‌باز از درختان هلو در ژل آگارز ۱/۲ درصد در مقایسه با تصویر راهنمای نشانگر نشان داده شده است. در تصویر مربوط به آغازگر P1/P7 (سمت چپ)، شماره ۲ مربوط به نمونه جمع‌آوری شده از شهرستان کردکوی و نمونه ۳ و ۴ مربوط به شهرستان گرگان می‌باشند و آن دسته از نمونه‌هایی که تشکیل باند نداده‌اند مربوط به نمونه‌های سالم و یا فاقد فیتوپلازما می‌باشند.
 Fig. 2. The results of electrophoresis of PCR products with universal primers P1/P7 and band formation in the range of 1800 base pairs and R16F2/R16R2 with band formation in the range of 1250 base pairs from peach trees in 1.2% agarose gel compared to the DNA Ladder guide image show given. In the picture related to primer P1/P7 (left side), number 2 is related to the sample collected from Kordkoy city and samples 3 and 4 are related to the Gorgan city and those samples that did not form a band are related to healthy samples or phytoplasma-free samples.

جهت آنالیز تبارزایی و رسم درخت فیلوژنتیک از توالی‌های مربوط به گروه‌های مختلف فیتوپلازمایی و همچنین توالی‌های مربوط به زیرگروه‌های گزارش شده فیتوپلازمایی همراه درختان هلو در ایران و جهان با استفاده از نرم‌افزار Mega-x و با الگوریتم تخمین درست‌نمایی بیشینه (Maximum likelihood) و مدل Tamura 3 parameter و با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ آنالیز شد که در آن‌گونه مورد مطالعه در درخت فیلوژنتیک با Aster yellows phytoplasma در یک گره یا شاخه قرار گرفت (شکل ۳). الگوی RFLP مجازی مشتق شده از قطعه 16S rDNA F2nR2 با الگوهای مرجع همه گروه‌ها (زیرگروه‌های 16Sr که قبلاً ایجاد شده بودند)، متفاوت بود. مشابه‌ترین الگوی مرجع گروه 16Sr، زیرگروه AD (دسترسی GenBank: DQ286577)، با ضریب شباهت ۰/۷۷ مشاهده شد (شکل ۴) همین امر نشان می‌دهد این سویه ممکن است نشان‌دهنده یک گروه جدید باشد. با این حال این مطالعه حضور فیتوپلازمایی را

مرتبط با زردی و زوال درختان هلو در استان گلستان برای اولین بار بررسی و شناسایی نموده است که البته نیاز به مطالعه بیشتر جهت تشخیص کامل گونه را در این منطقه می‌طلبد.

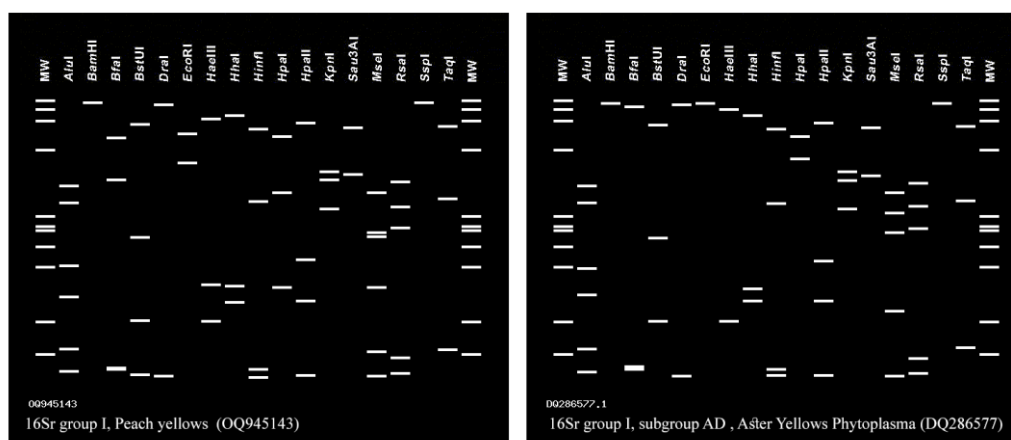


شکل ۳- درخت فیلوژنتیک رسم شده با برنامه Mega-X با استفاده از الگوریتم تخمین درست‌نمایی بیشینه و بوت‌استرپ ۱۰۰۰ بر اساس ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژن 16s rRNA، برای تعیین نزدیکی جدایه توالی‌یابی شده در مطالعه حاضر که با علامت مشخص شده ● با گروه‌های مختلف فیتوپلازمایی و *Acheloplasma axanthum* به‌عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

Fig. 3. Phylogenetic tree drawn with Mega-X program using Maximum likelihood algorithm and bootstrap 1000 based on nucleotide synonymy of a part of 16s rRNA gene, to determine the proximity of the isolate sequenced in the present study, which is marked with the sign ● with different groups. *Phytoplasma* and *Acheloplasma axanthum* have been selected as external groups.

هدف از تحقیق حاضر، شناسایی عوامل فیتوپلازمایی همراه درختان میوه هسته‌دار در استان گلستان بود. در اغلب مناطق مورد بازدید، علائم بیماری شامل زردی، ریزبرگی، قرمز شدن و زوال در درختان میوه هسته‌دار مشاهده شد. در مطالعه حاضر، نتایج به‌دست‌آمده از آزمون PCR، میزان تشابه نوکلئوتیدی، آنالیز درخت فیلوژنتیک و مقایسه نقوش حاصل از RFLP مجازی، همراهی یک فیتوپلازما با شباهت بسیار بالایی به زیرگروه 16SrI-AD را فقط در نمونه‌های

درخت هلو به اثبات رساند. به نظر می‌رسد فیتوپلاسمای شناسایی شده، تفاوت‌هایی با گونه‌های شناسایی شده در ایران داشته باشد که مستلزم انجام مطالعات فیلوژنی بیشتر است.



شکل ۴- نقوش حاصل از RFLP مجازی با استفاده از نرم‌افزار iPhyClassifier بر اساس ترادف نوکلئوتیدی محصول PCR آشیانه‌ای فیتوپلاسمای همراه با زردی و زوال درختان هلو توالی‌یابی شده در تحقیق حاضر (سمت چپ) و فیتوپلاسمای زیرگروه 16SrI-AD.

Fig. 4. Patterns obtained from virtual RFLP using iPhyClassifier software based on nucleotide synonymy of the nested PCR product of phytoplasma with yellowing and decline of peach trees sequenced in the present research (left) and phytoplasma of subtype 16SrI-AD.

در مطالعات گذشته از ایران و سایر کشورها، فیتوپلاسماهای مختلفی روی درختان مختلفی گزارش شده است. در مطالعه‌ای که در استان خراسان رضوی و شمالی روی درختان هلو انجام شد، علائمی مانند زردی و ریزبرگی در درختان هلو مشاهده گردید که با نتایج این مطالعه مطابق بود؛ اما مقایسه توالی‌ها، عامل فیتوپلاسمایی را *Candidatus Phytoplasma phoenicium* نشان داد (طریقی و همکاران، ۱۳۹۷). در استان گلستان نیز مطالعه مشابهی بر روی هلو و شلیل صورت گرفت که علائم مشاهده شده شامل لوله‌ای شدن برگ‌ها، ضعف و کم‌رشدی، ضخیم شدن برگ و ارغوانی شدن حاشیه برگ‌ها را گزارش داد که مطابق با نتایج این مطالعه می‌باشد؛ اما تعیین توالی و هم‌ریدیفاسی توالی بیشترین شباهت بیمارگر را به *Candidatus phytoplasma solani* (الهوردی، پور و همکاران، ۱۳۹۲). پیش از این مطالعاتی روی آنالیز مولکولی درختان هلو در مناطق مرکزی و شمال غرب ایران با استفاده از توالی‌های بخشی از 16sRNA صورت گرفت که نشان داد *Ca. Phytoplasma aurantifolia*، *Ca. Phytoplasma solani* و *Ca. Phytoplasma trifolii* در این مناطق شایع بودند (Zirak *et al.*, 2010). در کانادا علائمی چون زوال، زردی و قرمز شدن برگ درختان هلو مشاهده شد که پس از آنالیزهای مولکولی حضور دو سویه *Ca. P. fraxini* و *Ca. P. asteris* اعلام شدند؛ سپس تجزیه و تحلیل RFLP شبیه‌سازی شده با کامپیوتر، نتایج را به یک زیرگروه جدید (16SrI-W) در گروه AY اختصاص داد که شباهت زیادی به مطالعه حاضر دارد (Marcone *et al.*, 2014).

مشاهده علائم در باغ‌های مورد بررسی در استان گلستان و انجام آزمون‌های آزمایشگاهی و مقایسه توالی‌های به‌دست آمده در بانک ژن، نشان‌دهنده حضور بیمارگر فیتوپلاسمایی بر روی درختان هلو در این منطقه می‌باشد که این موضوع می‌تواند تهدید جدی برای درختان هلو و سایر درختان میوه هسته‌دار در این منطقه و حتی استان‌های مجاور از جمله استان مازندران باشد. با توجه به گستردگی گروه‌های مختلف فیتوپلاسمایی در ایران و امکان انتقال آن‌ها با نهال‌های آلوده و ناقل‌های حشره‌ای، دور از انتظار نیست که گروه‌های جدید گزارش نشده‌ای بر روی درختان هسته‌دار در این استان شناسایی شوند که نیازمند تحقیقات بیشتر برای دستیابی به این مهم می‌باشد تا با تخمین پراکنش

فیتوپلازما بر روی این میزبان‌ها اقدامات لازم جهت کاهش خسارت ناشی از بیمارگرهای فیتوپلازمایی برنامه‌ریزی و انجام پذیرد.

References

منابع

- الهوردی پور، ت.، رحیمیان، ح. و بابائیزاد، و. ۱۳۹۲. ردیابی مولکولی فیتوپلازمای همراه درختان هلو و شلیل در استان گلستان. هشتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران و چهارمین همایش ملی امنیت زیستی.
- طریقی، س.، دهقان نیری، م. و عبادی، ع. ۱۳۹۷. شناسایی و تعیین ویژگی‌های مولکولی فیتوپلازمای همراه زردی و ریزبرگی هلو در استان‌های خراسان رضوی و شمالی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳): ۱۳۱-۱۲۴.
- علوی، س. و تیموری، پ. ۱۳۹۹. شناسایی عامل خشکیدگی شاخه و زوال درختان میوه هسته‌دار (برگ نقره‌ای) در شرق مازندران. گیاه‌پزشکی کاربردی ۶(۲): ۹۳-۸۵.
- Al-khazindar, M. and Abdel Salam, A. 2014. Phytoplasma in stone fruits and date palm in Egypt. European cooperation in science and technology. International Phytoplasma Working Group, 2pp.
- Beckman, T. G. and Long, G. A. 2003. Rootstock breeding for stone fruits. Acta Horticulture 622: 531-551.
- Davis, R. E., Zhao, Y., Dally, E. L., Lee, I., Jomantien, R. and Douglas, S. M. 2013. 'Candidatus Phytoplasma pruni', a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multi locus characterization based on 16S rRNA, secY, and ribosomal protein genes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63(2): 766-776.
- Deng, S. J. and Hiruki C. 1991. Amplification of 16S ribosomal-RNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. Journal of Microbiological Methods 14: 53-61.
- Gundersen, D. E. and Lee, I-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathologia Mediterranea 35: 144-151.
- Lee, I-M., Hammond, R. W., Davis, R. E. and Gundersen, D. E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. Phytopathology 83: 834-842.
- Marcone, C., Guerra, L. J. and Uyemoto, J. K. 2014. Phytoplasmal diseases of peach and associated phytoplasma taxa. Journal of Plant Pathology 96(1): 15-28.
- Salehi, M., Hosseini, A. E., Salehi, E., Qualio, F. and Bianco, P. A. 2020. Peach witches'-broom, an emerging disease associated with 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' and 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' in Iran. Crop protection, 127(4): 104946.
- Schneider, B., Seemuller, E., Smart, C. D., et al. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. Pp. 369-380. In: Razin, S. and Tully, J.G. (eds.). Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma. Academic press, San Diego, CA.
- Zirak, L., Khakvar, R., Zarrini, Gh. and Hasanpour, K. 2020. Detection and molecular characterization of phytoplasmas associated with stone fruit trees in northwest of Iran. Crop protection 142(2): 105526.
- Zirak, L., Bahar, M. and Ahoonmanesh, A. 2010. Molecular Characterization of Phytoplasmas Associated with Peach Diseases in Iran. Journal of Phytopathology 158: 105-110.

Association of *Candidatus* phytoplasma in stone fruit trees of Golestan province of Iran: a diagnostic study report

M. R. Zarhoon¹, S. Nasrollahnejad^{2*}, E. Mahmoudi³ and A. Zahedi Tabarestani³

Received: 22 Dec., 2022

Accepted: 28 Feb., 2023

ABSTRACT

In the visits of the spring, summer, and autumn of 2021 and 2022 to the orchards of stone fruit trees in Golestan province, suspected symptoms of phytoplasma disease such as yellowness, deterioration, reddening, and small leaves were observed, and 28 samples of leaves from different hosts of stone fruit trees were collected. P1/P7 general primers were used for general PCR, and R16F2n/R16R2 primers were used for nested PCR. Infected samples amplified 1800 bp fragments in general PCR and 1250 bp fragment in nested PCR. Out of the 28 samples collected, 3 samples of peach trees had a band in the target area. The nested PCR product after sequencing was registered in the World Gene Bank with accession numbers OQ945143 and OP055811. At the same time, transplanting was done on the benchmark plant, Periwinkle, with the aim of gene storage and observation of phytoplasma symptoms. The comparison of the obtained sequences with the sequences available on the NCBI by the BLAST showed the most similarity to Aster yellows phytoplasmas, and the phylogenetic analysis of the target sequence with the maximum likelihood estimation algorithm in comparison with the different phytoplasma subgroups reported in Iran also showed the results confirmed the blast. Also, the comparison of patterns obtained from virtual RFLP identified the most similar reference pattern of the 16SrI group, subtype AD (GenBank accession: DQ286577), with a similarity coefficient of 0.77, which indicates that this strain may represent a new group. The results of this study confirm the presence of phytoplasma in peach trees in Golestan province for the first time and indicate the presence of a phytoplasma species close to *Candidatus* phytoplasma asteris in Golestan province.

Key words: Phytoplasma, phylogenetic analysis, Stone fruit trees, peach yellows and decline

-
1. Former MSc. Student, Department of Plant Pathology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 3. PhD student in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Corresponding author: snasrollanejad@yahoo.com

doi: 10.30495/plant.2023.704984