فصلنامه گیاه‌پزشکی
۱۳۹۰ -۳ (۲) : ۱۵۸-۱۷۳

تنوع بیماری تورم جوانه بادنجان در استان فارس

سمیه کشاورز، ساسان قاسمی*
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه گیاه‌پزشکی، شیراز، ایران
محمد صالحی
بخش تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، زرقان

چکیده

در سالهای ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ طی بازدیدهای انجام شده از مزارع بادنجان استان فارس، علائم مشکوک به بیماریهای فیتوپلاسمایی از جمله سبز شدن و برگسانی اجزاء گل، رشد جوانه‌های داخل گل، جاروک، زردی و ریزبرگی دیده شد. جهت تعیین ماهیت این علائم، هفت بوته بادنجان آلوده با علائم متفاوت از شهرستانهای فسا، جهرم، فیروزآباد، داراب و سروستان در گلدانهای مناسب نشاء و بعنوان منبع بیماری جهت مطالعات بعدی به یک گلخانه عاری از حشرات انتقال داده شد. عامل بیماری از بوته‌های آلوده از طریق پیوند، به بادنجان و بوسیله سس، از بادنجان به پروانش انتقال داده شد. در بادنجان، علائم تورم جوانه، ریزبرگی، زردی و جاروک و در پروانش، گل سبزی، زردی و جاروک ظاهر شد. از رگبرگ میانی بوته‌های بادنجان با آلودگی طبیعی و پروانش علائم دار مایه‌زنی شده با سس و همچنین بادنجان و پروانش سالم دی ان ای کل استخراج و سپس ردیابی فیتوپلاسما با واکنش زنجیره ای پلیمراز مستقیم، با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 انجام گردید. در تمام نمونه‌های دارای علائم، قطعه دی ان ای ریبوزومی با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز تکثیر شد که در نمونه‌های سالم چنین قطعه‌ای تکثیر نشد. واکنش پروانش در مقابل مایه‌زنی با جدایه‌های مورد مطالعه یکسان نبود، بطوریکه بر اساس تفاوت در شدت و نوع علائم ظاهر شده در پروانش، جدایه های مورد بررسی در شش گروه قرار گرفتند. براساس نقوش حاصله از هضم محصول PCR مستقیم با آنزیمهای *Alu*I، *Hae*III و*Rsa*I، جدایه های مختلف در دو گروه قرار گرفتند: جدایه‌های فسا ۱، فسا ۲، فسا ۳، فیروزآباد، داراب و سروستان در یک گروه و جدایه جهرم در گروهی دیگر. در این تحقیق براساس علائم بیماری، انتقال با سس و پیوند و واکنش مثبت در آزمون PCR، مشخص شد بیماری تورم جوانه در استان فارس ماهیت فیتوپلاسمایی دارد. این نخستین گزارش از وجود این بیماری از

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : ssghasemi@yahoo.com
تاریخ دریافت : ۹۱/۱۱/۱ ، تاریخ پذیرش : ۹۲/۳/۲

شهرستانهای فسا، فیروزآباد، داراب و سروستان می باشد. همچنین با آزمایشات ملکولی همراهی حداقل ۲ فیتوپلاسما با بیماری تورم جوانه بادنجان در استان فارس تایید شد که با استفاده از آنزیمهای برشی بیشتر احتمال مشاهده تنوع بیشتری در عامل بیماری تورم جوانه بادنجان در استان فارس وجود دارد.

واژه های کلیدی: تورم جوانه، بادنجان، فیتوپلاسما، فارس

مقدمه

بادنجان یکی از سبزیهای میوه‌ای و گیاهی است از خانواده سیب زمینی که از میوه آن در طبخ غذا و تهیه انواع ترشی استفاده می‌شود (Peyvast, 2009). استان فارس، در سال ۱۳۹۰، با سطح زیر کشت ۸۵۰۱ هکتار، بعد از استانهای مازندران، خوزستان، هرمزگان و تهران در مقام پنجم تولید گروه سایر سبزیجات از جمله بادنجان قرار دارد (Anonymous, 2011).

طی چند سال اخیر در مزارع بادنجان استان فارس بوته‌هایی عقیم مشاهده گردید که اندام زایشی آنها بشکل اندام رویشی درآمده و ساختارهای برگ مانند در محل گل آنها تشکیل شده بود. در این بوته‌ها زردی و ریزبرگی نیز دیده شد. از آنجا که چنین علائمی اکثراً مرتبط با آلودگی بوسیله فیتوپلاسما می‌باشد، احتمال داده شد بیماری ناشی از بیمارگری از این گروه باشد. مشابه چنین علائمی، اولین بار در سال ۱۳۷۴ از مزارع بادنجان شهرستان جهرم، با عنوان بیماری تورم جوانه بادنجان گزارش شد که براساس نتایج آزمایشات بیولوژیکی و واکنش مثبت در مقابل رنگ آمیزی دینس، ماهیت فیتوپلاسمایی این بیماری مشخص و زنجره *Neoaliturus haematoceps* (Mulsant & Rey) نیز بعنوان ناقل بیماری تعیین شد (Salehi & Izadpanah, 1995). در سال ۱۳۷۷، بیماری فیتوپلاسمایی دیگری به نام جاروک بادنجان از برازجان و فسا گزارش شد که احتمال داده شد با فیتوپلاسماهای عامل جاروک یونجه و تورم جوانه بادنجان متفاوت باشد (Salehi *et al*., 2000). در سال ۱۳۸۵، همراهی گروه فیتوپلاسمایی 16SrII با بیماری تورم جوانه بادنجان در شهرستانهای ابرقوه، زرقان، بوشهر و همراهی گروه فیتوپلاسمایی 16SrIX با بیماری تورم جوانه بادنجان در رودان مشخص شد (Salehi *et al*., 2006). در برزیل همراهی گروه فیتوپلاسمایی 16SrIII (Amaral Mello *et al*., 2006) و در مصر همراهی زیرگروه 16SrII-D با این بیماری گزارش شد (Omar & Foissac, 2012). مقایسه نقوش حاصله از هضم محصول PCR دو مرحله‌ای با آنزیمهای *Alu*I، *Rsa*I، *Mse*I، *Hpa*II و *Taq*I مشخص کرد که در استان بوشهر حداقل ۳ فیتوپلاسما با بیماری تورم بادنجان همراه است (Raoofi *et al*., 2010).

با توجه به سطح زیر کشت کمابیش بالای بادنجان در استان فارس، مشاهده علائم تورم جوانه در شهرستان‌های مختلف بویژه مناطق گرمسیر استان و عدم اطلاع کشاورزان از بیماریزا بودن علائم مذکور، هدف از تحقیق حاضر، نخست اثبات بیماریزا بودن و تعیین ماهیت فیتوپلاسمایی این علائم در حال گسترش با آزمایشات بیولوژیکی و ملکولی، دوم بررسی وجود تنوع در عامل بیماری مذکور در مناطق مختلف استان فارس و سوم مقایسه دو روش بیولوژیکی و ملکولی جهت بررسی تنوع در عامل بیماری بوده است.

مواد و روش‌ها

منبع بیماری

در سالهای ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰، هفت بوته بادنجان آلوده با علائمی شبیه به تورم جوانه بعنوان ۷ جدایه مظنون به فیتوپلاسما از شهرستانهای فسا، جهرم، فیروزآباد، داراب و سروستان انتخاب، در گلدانهای مناسب نشاء و به یک گلخانه عاری از حشرات، برای انجام مطالعات بعدی انتقال داده شدند.

انتقال با پیوند

جهت پیوند جانبی، از بوته های بادنجان هشت هفته ای بعنوان پایه و از شاخه‌های نازک و فرعی دارای علائم بارز بیماری و واجد دو یا سه برگ، بعنوان پیوندک استفاده شد. سپس قسمت زیر محل پیوند تا کمی بالاتر از آن با نوار پارافیلم بسته شد. بمدت ۲ هفته جهت حفظ رطوبت، قسمت پیوند شده بوسیله یک کیسه فریزر پوشانده شد. از هر گیاه بادنجان با آلودگی طبیعی (هر جدایه) روی سه بوته سالم بادنجان پیوند شد. از این روش جهت انتقال عامل بیماری از پروانشهای آلوده مایه‌زنی شده با سس به پروانش‌های سالم همسن نیز در سه تکرار استفاده شد.

انتقال با سس

ابتدا رشته‌های زردرنگ نازک و نخی شکل حاصله از بذر جوانه زده سس روی کاغذ صافی مرطوب، روی یک بوته سالم چغندرقند جهت تامین منبع سس سالم برای آزمایشات قرار داده شد. بعد از رشد و استقرار رشته‌های سالم سس بر روی بوته سالم پروانش، انتهای دیگر رشته‌های زردرنگ سس روی بوته آلوده بادنجان قرار داده شد. ارتباط بین بوته بادنجان آلوده و بوته پروانش سالم، پس از گذشت یکماه، قطع و هردو عاری از سس شدند و بوته‌های پروانش جهت مشاهده علائم در یک گلخانه عاری از حشرات نگهداری شدند.

استخراج دی ان ای کل از بافت آلوده گیاهی

جهت بررسی آلودگی کلیه گیاهان با آلودگی طبیعی، گیاهان مورد استفاده جهت مایه زنی و گیاهان مایه زنی شده با آزمون PCR مستقیم، استخراج دی ان ای کل از هر نمونه گیاهی سالم یا آلوده به فیتوپلاسما به روش Zhang *et al*. (1998) با اندکی تغییرات انجام شد، به این ترتیب که پس از جداسازی ۰/۲ گرم از بافت رگبرگ میانی یا دمبرگ هر نمونه گیاهی با تیغ استریل و افزودن مقداری ازت مایع به آن در هاونی استریل، هر نمونه کوبیده و به حالت پودر درآمد. به محتویات هر هاون، ۷۵۰ میکرولیتر بافر CTAB حاوی ۰/۱ درصد ۲- مرکاپتواتانول اضافه و عصاره بدست آمده از هر نمونه به یک تیوب ۱/۵میلی لیتری استریل منتقل شد. هر تیوب سربسته بمدت ۲۰ دقیقه در حرارت مرطوب بن ماری در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد که هر ۵ دقیقه یکبار، اختلاط محتویات تیوبها صورت گرفت. در مرحله بعد به هر تیوب ۷۵۰ میکرولیتر محلول کلروفورم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه و با حرکت دست، محتویات تیوبها تا زمان تشکیل دو فاز شفاف و کدر در آنها، بخوبی بهم زده شد. پس از سانتریفیوژ تیوبها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در درجه حرارت اتاق، به آرامی ۳۰۰ میکرولیتر از فاز شفاف رویی هر نمونه برداشته شده، به یک تیوب ۱/۵میلی لیتری جدید منتقل و مابقی حذف شد. بلافاصله به محتویات هر تیوب ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد افزوده شد که پس از چندین بار بهم زدن محتویات و سانتریفیوژ تیوبها بمدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور، رونشین حذف و رسوب حاصل دو بار با اتانول سرد ۷۰ درصد شستشو داده شد. تیوبها یک شبانه روز، با سر باز و وارونه، روی یک دستمال کاغذی کاملاً خشک و تمیز در دمای اتاق چیده شدند که بعد از خشک شدن رسوب نهایی در دمای اتاق، دی ان ای حاصل در ۷۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر سترون حل و در دمای ۲۰- بعنوان دی ان ای الگو در آزمون PCR نگهداری شد.

آزمون PCR مستقیم

آزمون PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگر عمومی P1/P7 (Schneider *et al*., 1995) جهت تکثیر یک قطعه با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز از اُپرون آر ان ای ریبوزومی شامل ژن آر ان ای ریبوزومی ۱۶S، ناحیه بین ژنهای آر ان ای ریبوزومی ۱۶S و ۲۳S و ابتدای ′۵ ژن آر ان ای ریبوزومی ۲۳S انجام شد. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۲۲ میکرولیتر و شامل یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت پایه ۱۰ میکرومولار، دو میکرولیتر دی ان ای الگو، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت پایه ۵۰ میلی مولار، ۰/۴ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP) با غلظت پایه ۱۰ میلی مولار، دو میکرولیتر بافر ۱۰x و ۰/۱ میکرولیتر آنزیم دی ان ای پلیمراز Taq (سیناژن، ایران) با غلظت پایه پنج واحد در یک میکرولیتر بود که با افزودن آب دیونیزه به ۲۲ میکرولیتر رسانده و در دستگاه ترموسایکلر Primus قرار داده شد. برنامه

دستگاه جهت واسرشتگی اولیه روی ۹۴°C به مدت چهار دقیقه، جهت انجام ۳۵ چرخه برای تکرار سه مرحله Denaturation در دمای ۹۴°C بمدت ۳۰ ثانیه، Annealing در دمای ۵۸°C به مدت دو دقیقه و ساخت رشته های DNA در دمای ۷۲°C به مدت سه دقیقه و برای برنامه انتهایی دستگاه در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد.

الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مستقیم

۶ میکرولیتر از هر محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط کرده و در چاهک ژل ریخته شد. از نمونه جاروک بادام خفر بعنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد. پس از گذشت حدوداً ۴۵ دقیقه از اتصال جریان الکتریکی ۷۰ ولت به تانک الکتروفورز، ژل از تانک خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید قرار داده شد. سپس ژل در آب معمولی شسته و در داخل دستگاه ژل داکیومنت جهت عکسبرداری از باندهای بدست آمده قرار داده شد.

آنالیز چندشکلی طولی قطعات برشی (RFLP)

جهت بررسی میزان شباهت و تفاوت احتمالی جدایه های تورم جوانه بادنجان در استان فارس، هر محصول PCR مستقیم براساس روش Lee *et al*. (1998)، به طور جداگانه با آنزیمهای *Hae*III، *Rsa*I و *Alu*I برش داده شد. بدین منظور در یک مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتری، ۹/۸۵ میکرولیتر آب مقطر سترون، دو میکرولیتر بافر آنزیم بهمراه ۰/۱۵ میکرولیتر آنزیم برشی با غلظت پایه پنج واحد در یک میکرولیتر به هشت میکرولیتر از هر محصول PCR اضافه و لوله محتوی این مواد حداقل بمدت چهار ساعت در دستگاه ترموبلاک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در پایان ۷ نمونه برش خورده با یک آنزیم در ژل آگاروز دو درصد الکتروفورز و از نوارهای دی ان ای عکسبرداری شد.

نتایج

علائم بیماری و میزان آلودگی

علائم بارز بیماری شامل گل سبزی، برگسانی اجزاء گل، رشد جوانه‌های داخل گل، کوتاه شدن فاصله میانگره‌ها، جاروک و زردی می شد که شدت و ضعف علائم در جدایه های جهرم و فیروزآباد، متفاوت از دیگر جدایه ها بود (جدول ۱). میزان آلودگی طبیعی در مناطق مختلف استان فارس بین ۱۵-۰درصد متغیر بود.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به جدایه‌های مختلف عامل بیماری تورم جوانه بادنجان

Table 1. Information about the different isolates of Eggplant Big Bud disease agent

Isolates	Place of collection	Symptoms of disease
Fasa 1	Kheirabad Village in Fasa township	Slight little leaf, egression several flowers from one flower, egression several flowers from one place, virescense and big bud
Fasa 2	Dasteje Village in Fasa township	Severely reduced internode distance, egression several flowers from one place, virescense, big bud, little leaf and slight yellowing
Fasa 3	Kheirabad Village in Fasa township	Slightly reduced internode distance, moderate little leaf, yellowing of older leaves, egression several flowers from one place and big bud
Jahrom	Jahrom township	Severely reduced internode distances, severe little leaf, spoony shape of young leaves, Severe yellowing of older leaves, egression several flowers from one flower, egression terminal witches broom fom flower, egression several flowers from one place, phyllody, virescense, big bud, deformed fruits with longitudinal slit from blossom end of fruit, longitudinal slit in stem
Firouzaba	Firouzabad township	Severely reduced internode distances, severe yellowing and little leaf
Darab	Darab township	Moderate chlorosis of older leaves, Slight little leaf, egression several flowers from one flower and big bud
Sarvestan	Sarvestan township	Slight little leaf and big bud

انتقال با پیوند

پس از گذشت یک ماه از تاریخ مایه زنی، علائم بیماری بتدریج در تمامی بوته‌های بادنجان پیوند خورده ظاهر شد. علائم بارز و مشترک جدایه‌های مختلف بیماری تورم جوانه در بادنجانهای مایه زنی شده عبارت بودند از: تورم جوانه، کاهش فاصله میانگره‌ها در راس بوته، کاهش اندازه برگ و زردی پهنک برگهای مسن تر بجز رگبرگ و حواشی رگبرگ که در نهایت منجر به کوتولگی بوته، ریزبرگی و سبززردی کل بوته می‌شد. از نظر شکل تورم جوانه، تمایل به تولید پاجوش، قاشقی شدن برگهای جوانتر، شدت زردی و ریز برگی و خارج شدن یک گل از داخل گلی دیگر در بین جدایه‌های مورد آزمایش، تفاوتهایی وجود داشت (جدول ۲).

جدول ۲- علائم اختصاصی در بوته‌های سالم بادنجان مایه زنی شده با جدایه‌های مختلف عامل بیماری تورم جوانه در استان فارس

Table 2. Specific symptoms in healthy eggplants inoculated with different isolates of Big Bud disease agent in Fars province

Symptoms type / Isolates	sucker	spoony shape of younger leaves	yellowing	severity of little leaf	shape of big bud	floral proliferation
Fasa 1	+	+	moderate	slight	bowel shaped	+
Fasa 2	+	-	slight	slight	Flat & bowl shaped	+
Fasa 3	+	+	moderate	moderate	bowel shaped	-
Jahrom	-	-	moderate	moderate	Flat & bowl shaped	+
Firouzabad	-	-	severe	severe	bowel shaped	-
Darab	-	+	slight	slight	Flat & bowl shaped	+
Sarvestan	-	+	slight	slight	bowel shaped	-

انتقال با سس و پیوند در پروانش

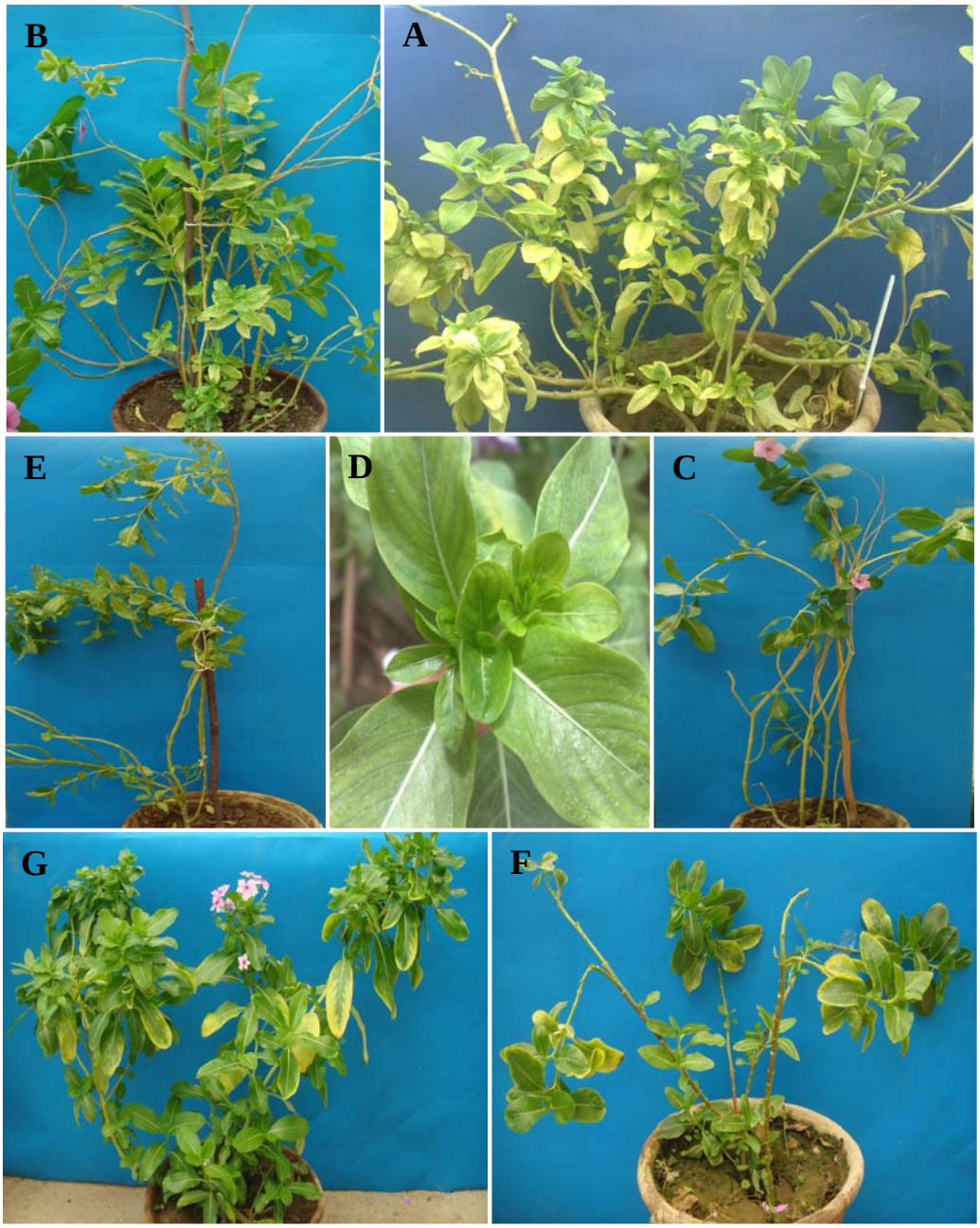
حداقل دوره نهفتگی در پروانشهای مایه زنی شده یکماه بود. علائم کلی بیماری در پروانش عبارت بودند از گل سبزی، برگسانی، جاروک، ریزبرگی، زردی و کوتولگی. علاوه بر علائم مشترک، هرکدام از جدایه‌های بیماری، علائم اختصاصی در پروانش ایجاد کردند که در جدول ۳ علائم ناشی از جدایه‌های مختلف بیماری تورم جوانه در پروانش ذکر شده است (شکل ۱).

براساس تفاوت در واکنش پروانش‌های مایه زنی شده، جدایه‌های مورد آزمایش در شش گروه قرار گرفتند. در گروه اول، جدایه‌های فسا ۱ و سروستان با علائم اختصاصی گل سبزی، برگسانی، خروج گل از گلی دیگر، زردی شدید حاشیه برگهای مسنتر و گاهی کل پهنک برگ، کاهش شدید فاصله میانگره‌ها و کوتولگی بوته، جارویی شدن شدید راس بوته، ریز برگی شدید و جارویی شدن جوانه‌های رشد کرده روی طوقه و ساقه و در گروههای دوم تا ششم، جدایه‌های فسا ۲، فسا ۳، فیروزآباد، جهرم و داراب قرار گرفتند.

جدول ۳- علائم ناشی از مایه زنی بوته‌های سالم پروانش با عامل جدایه‌های مختلف عامل بیماری تورم جوانه از طریق سس و پیوند در استان فارس

Table 3. Symptoms in healthy periwinkle plants inoculated with different isolates of Big Bud disease agent through dodder & grafting in Fars province

Symptoms type / Isolates	Fasa 1	Fasa 2	Fasa 3	Jahrom	Firouzabad	Darab	Sarvestan
drying of branches free of leaf	-	+	+	+	-	+	-
shrinkage and twist in leaf because of deformation in main vein	severe	moderate	slight	severe	severe	-	-
yellowing in leaf margins	severe	severe	Relatively Severe	severe	moderate	severe	severe
little leaf	severe	severe	slight	moderate	moderate	moderate	severe
Growth of secondary buds on the stem & crown	+	+	+	-	+	+	+
witches broom of secondary buds	+	+	+	-	+	+	+
witches broom in plant tip	severe	Relatively Severe	slight	moderate	severe	Relatively Severe	severe
Reduction of internode distance	severe	Relatively Severe	moderate	moderate	Relatively Severe	moderate	severe
floral proliferation	+	-	-	+	-	-	+
phyllody	+	-	-	+	-	-	+
virescence	+	+	-	+	-	-	+

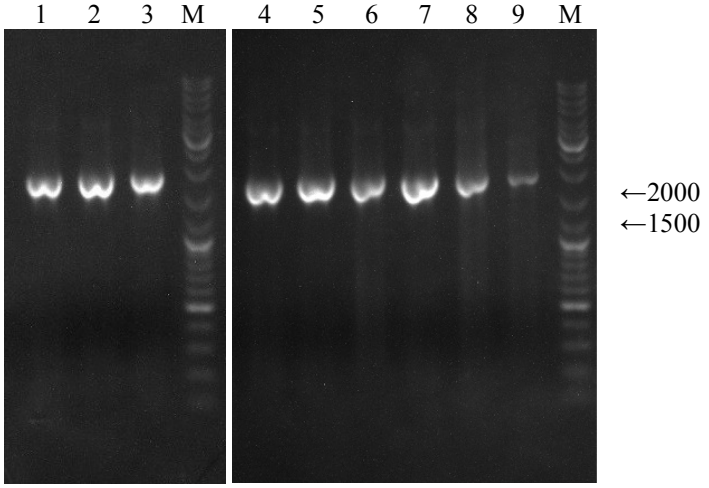


شکل ۱- علائم بیماری در پروانش های مایه زنی شده با جدایه های مختلف عامل تورم جوانه بادنجان در استان فارس: (A و G) کاهش شدید فاصله میانگره ها، گل سبزی، ریزبرگی و زردی شدید حاشیه برگ به ترتیب در جدایه های فسا ۱ و سروستان. (B) جارویی شدن جوانه‌های رشد کرده روی طوقه و ساقه در جدایه فسا ۲. (C) خشک شدن شاخه‌های عاری از برگ در جدایه فسا ۳. (D) خروج گل از گلی دیگر در جدایه جهرم. (E) چروکیدگی و پیچ و تاب شدید برگ در اثر بدشکلی در رگبرگ اصلی در جدایه فیروزآباد. (F) جارویی شدن نسبتاً شدید راس بوته در جدایه داراب.

Figure 1. Disease symptoms in periwinkle inoculated with different isolates of eggplant big bud factor in Fars province: (A & G) Severely reduced internode distance, virescence, severe little leaf and yellowing in leaf margins in Fasa 1 & Sarvestan isolates respectively. (B) witches broom in growthed buds on the crown and stem in Fasa 2 isolate. (C) drying of branches free of leaf in Fasa 3 isolate. (D) floral proliferation in Jahrom isolate. (E) shrinkage and severe twist in leaf because of deformation in main vein in Firouzabad isolate. (F) relatively strong witches broom in plant tip in Darab isolate.

آزمون PCR مستقیم

با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 در نمونه‌های دی ان ای کل مستخرج از کلیه بوته‌های دارای آلودگی مزرعه ای و کلیه بوته‌های بادنجان و پروانش مایه زنی شده و علائم دار، قطعه ای با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز تکثیر شد. تحت همین شرایط در کلیه نمونه های سالم بادنجان و پروانش چنین قطعه ای تکثیر نشد (شکل ۲).



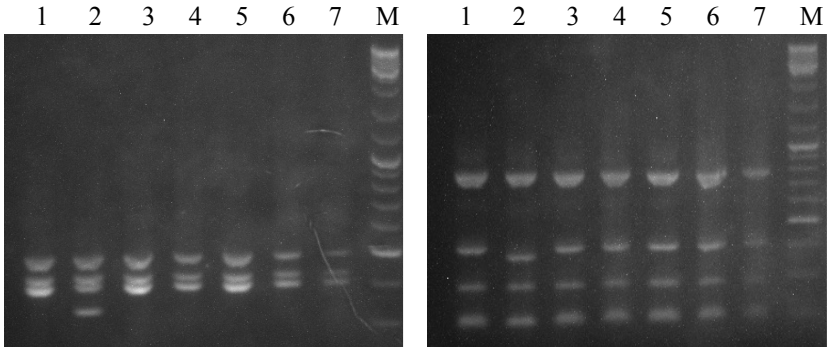
شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 در ژل آگاروز ۱٪. چاهکها: (1)، جدایه داراب؛ (2)، جدایه سروستان؛ (4)، جدایه فسا ۱؛ (5)، جدایه فسا ۲؛ (6)، جدایه فسا ۳؛ (7)، جدایه جهرم؛ (8)، جدایه فیروزآباد؛ (3) و (9)، نمونه کنترل مثبت مربوط به جاروک بادام خفر و (M)، مارکر.

Figure 2. Electrophoresis of direct PCR products by using primer pairs P1/P7 in 1% agarose gel. Lanes: (1), Darab; (2), Sarvestan; (4), Fasa 1; (5), Fasa 2; (6), Fasa 3; (7), Jahrom; (8), Firouzabad; (3) & (9), Khafr almond witches broom as positive controls and (M), marker.

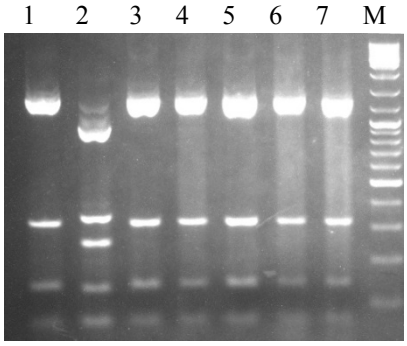
آزمون چندشکلی طولی قطعات برشی

در هضم آنزیمی با آنزیم *Hae*III، در چاهک ۲ که مربوط به جدایه جهرم بود، پنج باند و در شش جدایه مابقی، چهار باند با موقعیت یکسان مشاهده شد. در هضم آنزیمی با آنزیم *Rsa*I، در جدایه جهرم، چهار باند و در مابقی جدایه‌ها، سه باند با موقعیت یکسان مشاهده شد. بر اثر هضم آنزیمی با آنزیم *Alu*I، در هریک از هفت جدایه مورد مطالعه ۴ باند حاصل شد ولی جدایه جهرم در موقعیت باند دوم از بالای ژل کمی با بقیه جدایه‌ها تفاوت داشت. (شکل ۳)

براساس تفاوت در نقوش حاصله از هضم آنزیمی محصول PCR مستقیم، جدایه های مختلف در دو گروه قرار گرفتند: جدایه‌های فسا ۱، فسا ۲، فسا ۳، فیروزآباد، داراب و سروستان در یک گروه و جدایه جهرم، در گروهی دیگر.



*Rsa*I *Alu*I



*Hae*III

شکل ۳- نقوش حاصل از الکتروفورز هضم آنزیمی قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی با آنزیمهای *Hae*III ، *Rsa*I و *Alu*I در ژل آگاروز ۲٪. چاهکها: (1)، جدایه فسا ۱؛ (2)، جدایه جهرم؛ (3)، جدایه فسا ۲؛ (4)، جدایه فیروزآباد؛ (5)، جدایه فسا ۳؛ (6)، جدایه داراب؛ (7)، جدایه سروستان و (M)، مارکر

Figure 3. Electrophoretic patterns of 1800 bps fragment Enzymatic digestion with *Hae*III, *Rsa*I and *Alu*I enzymes in 2% agarose gel. lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7, Fasa 1, Jahrom, Fasa 2, Firouzabad, Fasa 3, Darab and Sarvestan, respectively; M, marker

بحث

در سالهای ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰، در مزارع بادنجان شهرستانهای مختلف استان فارس، علائم تیپیک فیتوپلاسماها از جمله تورم جوانه، ریزبرگی، زردی و جاروک دیده شد و با توجه به میزان آلودگی ۱۵-۰ درصدی بیماری در مزارع مختلف استان فارس و روند رو به گسترش آن، این تحقیق در راستای بررسی برخی از خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی این علائم انجام شد.

در این تحقیق براساس علائم بیماری، انتقال با پیوند، سس و واکنش مثبت در آزمون PCR مستقیم، ماهیت فیتوپلاسمایی این علائم تعیین شد. این اولین گزارش از بیماری تورم جوانه بادنجان از شهرستانهای فسا، فیروزآباد، داراب و سروستان بود.

بیماری تورم جوانه پیشتر از تبریز (Torabi,1994)، جهرم (Salehi & Izadpanah, 1995)، استانهای اصفهان، اردبیل و آذربایجان غربی (Rashidi, 2006)، استان‌های خراسان

رضوی، خراسان شمالی، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، کردستان، کرمانشاه و فارس (Jamshidi, 2011) و درود لرستان (Dehghani & Salehi, 2011) گزارش شده است.

از آنجاییکه تنوع در علائم بیماری تورم جوانه بادنجان در نقاط مختلف استان فارس، احتمال همراهی بیش از یک فیتوپلاسما با این بیماری را مطرح می کرد، در این راستا هفت جدایه مورد مطالعه براساس نتایج آزمایشات بیولوژیکی (تفاوت در واکنش پروانشهای مایه زنی شده) در شش گروه و براساس آزمایشات ملکولی (نتایج RFLP فیزیکی) در دو گروه قرار گرفتند. آزمایشات ملکولی با سه آنزیم *Hae*III ، *Rsa*I و *Alu*I تنها توانست تفاوت جدایه جهرم با سایر جدایه ها را نشان داده و این بخش از آزمایشات بیولوژیکی را تایید کند، بنابراین در این تحقیق گروه بندی ملکولی با گروه بندی بیولوژیکی بجز در مورد جدایه جهرم مطابقت نداشت و دقت گروه بندی بیولوژیکی با در نظر گرفتن تکرار مناسب در آزمایشات انتقال و استفاده از گلخانه عاری از حشرات به جهت تشخیص تفاوت بین مابقی جدایه ها بجز جهرم، بیشتر از گروه بندی ملکولی بود.

در تحقیق مشابهی که در سال ۱۳۸۹ در استان بوشهر انجام شد، مقایسه نقوش حاصله از هضم محصول PCR دومرحله‌ای با آنزیمهای *Alu*I، *Rsa*I، *Mse*I، *Hpa*II و *Taq*I هشت جدایه مورد بررسی، گروه بندی براساس علائم بیماری در پروانش را تائید کرد و نشان داد که فیتوپلاسماهای جدایه‌های مختلف در سه گروه قرار گرفتند.

کارگروه اسپیروپلاسما/فیتوپلاسما در سال ۲۰۰۴ اعلام کرد چنانچه دو فیتوپلاسما با میزان همولوژی بالای ۹۷/۵ درصد در توالی ژن ۱۶S آر ان ای ریبوزومی شان، دارای ناقل متفاوت یا دامنه میزبانی طبیعی متفاوت باشند یا حداقل در یک گونه گیاهی میزبان علائم متفاوتی ایجاد کنند (The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group, 2004)، این دو فیتوپلاسما، معرف دو گونه متفاوت هستند. بر همین اساس در این تحقیق، علیرغم یکسان بودن نقوش حاصله از RFLP جدایه‌های فسا ۱، فسا ۲، فسا ۳، فیروزآباد، داراب و سروستان، با در نظر گرفتن تفاوتها در ویژگیهای بیولوژیکی این جدایه ها، همراهی شش فیتوپلاسما با بیماری تورم جوانه بادنجان در استان فارس نشان داده شد. در دنیا گروهبندی براساس علائم در یک گیاه میزبان مهمتر است، چرا که آزمایشات مولکولی به شناسایی بخشی از ژنوم فیتوپلاسما و نه همه آن می‌پردازد.

احتمال می‌رود در مطالعات آتی بتوان با استفاده از آنزیمهای برشی بیشتر و انجام مطالعات تکمیلی نظیر همسانه سازی، تعیین ترادف و آنالیزهای تبارزایی، تفاوت موجود بین نتایج آزمایشات بیولوژیکی و ملکولی در این پژوهش را توجیه کرد.

منابع

Amaral Mello, AP. Bedendo, IP. Kitajima, EW. Ribeiro, LFC. & Kobori, R. 2006. Tomato big bud associated with a phytoplasma belonging to group 16SrIII in Brazil. *International Journal of Pest Management*, 52: 233-237.

Anonymous, 2011. Agriculture Statistics First Vol., Crops 2009-10. Persian Gerafic Press, Tehran, Iran.

Dehghani, A. & Salehi, M. 2011. Short report of tomato big bud disease in Lorestan province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 483: 47.

Jamshidi, E. 2011. *Detection and Characterization of Phytoplasmas Associated with Big Bud Disease of Tomato Using Molecular Methods in Khorasan Razavi and Other Provinces*. M.Sc. Thesis, Department of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Khorasan Razavi, Iran.

Lee, IM. Gundersen-Rindal, DE. Davis, RE. & Bartoszyki, IM.1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48:1153-1169.

Omar, AF. & Foissac, X. 2012. Occurrence and incidence of phytoplasmas of the 16SrII-D subgroup on solanaceous and cucurbit crops in Egypt. *Biomedical and Life Sciences European Journal of Plant Pathology*, 133: 353-360.

Peyvast, G. 2009. *Olericulture*. Daneshpazir Press, Gilan, Iran.

Raoofi, D. 2010. *Biological and Molecular Characterization of Tomato and Eggplant Phytoplasma Disease Agent (Agents) in Bushehr Province*. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Semnan Branch, Semnan, Iran.

Raoofi, D. Salehi, M. & Firouz, R. 2010. Multiple phytoplasma associated with eggplant witches broom in Bushehr province. *Proceedings of the 19th Iranian Congress of Plant Protection, 12-9 Aug. 2010, Tehran, Iranian Plant production Research Institute*, p. 427.

Rashidi, M. 2006. Occurrence tomato big bud disease in Isfahan, Ardabil and West Azarbaijan provinces . *Proceedings of the 17th International Congress of Plant Protection, 11-14 Sept. 2006, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University*, p. 188.

Salehi, M. & Izadpanah, K. 1995. Big Bud disease in tomato and eggplant in Fars. *Proceedings of 12th Iranian Congress of Plant Protection, 16-11 Sept. 1995, Karaj, College of Agriculture*, p. 169.

Salehi, M. Babani, G. & Izadpanah k. 2000. Eggplant Witches Broom in Bushehr and Fars provinces. *Proceedings of the 14th Iranian Congress of Plant Protection, 14-17 Sept. 2000, Isfahan University of Technology*, p. 318.

Salehi, M. Izadpanah, k. & Heydarnezhad, J. 2006. Identification and grouping of 35 phytoplasmas Based on molecular properties from central and southern areas of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 423: 51-52.

Schneider, B. Cousins, MT. Klinkong, S. & Seemüller, E. 1995. Taxonomic Relatedness and Phylogenetic Positions of Phytoplasmas Associated With Diseases of Faba Bean, Sunnhemp, Sesame, Soybean, and Eggplant. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 102: 225-232.

The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group. 2004. Candidatus Phytoplasma, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243-1255.

Torabi, E. 1994. *Etiological Review of Big Bud Disease in Azerbaijan*. M.Sc. Thesis, Department of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

Zhang, Y.P. Uyemoto, J.K. & Kirkpatrick, B.C. 1998. A small scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45-50.