



تعیین الگوی گسترش کاندید/توس فیتوپلازما استرالیزیا در گیاه گوجه فرنگی با استفاده از روش Real-time PCR

نازنین عبادی^۱، گیلدا نجفی پور^۲، محمد مهدی فقیهی^{۳*}، کاووس ایازپور^۲

^۱ دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی، ^۲ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه بیماری شناسی گیاهی، ^۳ استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زرقان

چکیده

سابقه و هدف: بیماری فیتوپلازمایی تورم جوانه گوجه فرنگی در سال های اخیر در مناطق مختلف کشور شیوع پیدا کرده است. این پژوهش با هدف تعیین غلظت و الگوی گسترش کاندید/توس فیتوپلازما استرالیزیا در گوجه فرنگی، به منظور ردیابی سریع تر بیمارگر به ویژه در دوره کمون بیماری و مدیریت بهتر آن انجام شد.

مواد و روش ها: در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، سه گیاه گوجه فرنگی به وسیله پیوند به کاندید/توس فیتوپلازما استرالیزیا آلوده شدند. در فواصل زمانی ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۷۰ روز پس از مایه زنی، نمونه برداری از برگ های انتهایی گیاهان تیمار، برگ ها از ساقه های بالا و پایین محل پیوند و نیز ریشه های فرعی انجام شد. سپس با روش واکنش زنجیره ای پلی مرز در زمان واقعی، غلظت و الگوی گسترش فیتوپلازما در گیاهان یاد شده تعیین شد. همچنین، روش های واکنش زنجیره ای پلی مرز مستقیم و آشیانه ای در ردیابی فیتوپلازما همراه با بیماری استفاده و مقایسه شدند.

یافته ها: نتایج نشان دادند که کاندید/توس فیتوپلازما استرالیزیا پس از ورود به گیاه، به سمت بالا و پایین حرکت کرده و به همین دلیل در برگ های بالایی و ریشه های گیاهان آلوده، غلظت آن بیشتر از برگ های میانی و پایینی بود. براساس یافته های این پژوهش، میانگین دوره کمون بیماری حدود ۴۰ روز تخمین زده شد. واکنش زنجیره ای پلی مرز آشیانه ای حساس تر از واکنش زنجیره ای پلی مرز مستقیم در ردیابی این فیتوپلازما به ویژه در دوره کمون بیماری بود.

نتیجه گیری: برای ردیابی و تشخیص بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی ناشی از کاندید/توس فیتوپلازما استرالیزیا، بهتر است از برگ های انتهایی و ریشه ها نمونه برداری و از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز آشیانه ای استفاده شود.

واژگان کلیدی: برگ های انتهایی، ریشه، غلظت، فیتوپلازما، گوجه فرنگی.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۸

مقدمه

دارای ژنوم کوچک و متعلق به رده مولیکوت ها هستند که در شرایط طبیعی اغلب توسط زنجیرک ها و تعداد کمی نیز توسط پسپیل از یک گیاه به گیاه دیگر منتقل می شوند. فیتوپلازماها در بسیاری از گیاهان بیماری ایجاد می کنند و به برخی از گیاهان باغی و زراعی در عرصه کشاورزی خسارت های

فیتوپلازماها که قبلاً به نام ارگانسیم های شبه مایکوپلازمایی نامیده می شدند، پروکاریوت های بدون دیواره سلولی و غیرمارپیچی، محدود به آوند آبکشی، غیرقابل کشت،

(* آدرس برای مکاتبه: استان فارس، زرقان، ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی زرقان

تلفن: ۰۹۱۷۸۶۱۷۰۸۴ پست الکترونیک: mm.faghihi@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (<http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/>) در

فصلنامه دنیای میکروباها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.



که فیتوپلازمای زردی پیاز در گیاه داوودی (*Chrysanthemum coronarium*) به طور مداوم از برگ های مایه زنی شده به ساقه اصلی، ریشه، برگ های بالایی و پایینی گسترش پیدا می کند و غلظت فیتوپلازما در ریشه ها بیشتر از برگ ها و ۲۸ روز بعد از مایه زنی علایم اولیه بیماری قابل مشاهده بود (۱۵). ساراکو (Saracco) و همکاران (۲۰۰۶) به روشنی نشان دادند که فیتوپلازمای زردی مینا در برگ های جوان انتهایی و ریشه های گیاه کریزانتموم کاریناتوم (*Chrysanthemum carinatum*) بیشتر از برگ های پایینی و پیر تجمع پیدا می کنند (۱۶). غلظت فیتوپلازما در گیاهان بیمار ممکن است با توجه به سویه فیتوپلازما و همچنین حساسیت گیاه میزبان بسیار متفاوت باشد (۱۷). قسمت های مختلف گیاه ممکن است غلظت های متفاوتی از سلول های فیتوپلازما را در برداشته باشند. علاوه بر این، غلظت فیتوپلازماها در میزبانان ممکن است به صورت فصلی تغییر کند (۱۶ و ۱۷). نحوه توزیع و غلظت فیتوپلازماها در گیاهان میزبان ممکن است بیماری زایی و ظهور علایم آن و همچنین ردیابی و مدیریت بیماری را تحت تاثیر قرار دهد (۱۶). پراکنش غیریکنواخت یا غلظت پایین سلول های فیتوپلازما در داخل گیاهان میزبان می تواند ردیابی آن را به خصوص در دوره کمون بیماری با مشکل مواجه کند. شناسایی گیاهان آلوده در دوره کمون بیماری حائز اهمیت است. چنانچه بتوان با اعمال یک راهکار مناسب آلودگی گیاه را در مرحله نهفتگی بیماری شناسایی کرد و قبل از ظهور علایم بیماری را مدیریت کرد، می توان از گسترش و بروز همه گیری آن جلوگیری نمود. در این راستا واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی فیتوپلازماها ابزاری مفید برای شناسایی این بیمارگرها می باشد. به طور کلی، فیتوپلازماها در همولنف و غدد بزاقی ناقلین خود و در عناصر آوندی گیاهان آلوده تکثیر و با شیره آوندی از صفحات غربالی آوندهای آبکشی عبور می کنند. به دلیل مشکلات در انتقال فیتوپلازماها با ناقلین، انتقال آزمایشگاهی فیتوپلازماها معمولاً با پیوند انجام می شود.

اقتصادی قابل توجهی وارد می کنند (۱). بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی (tomato big bud) یک بیماری فیتوپلازمایی است که برای اولین بار در سال ۱۹۴۳ توسط هیل (Hill) در استرالیا روی گیاه گوجه فرنگی گزارش و به علت متورم بودن جوانه گل، به آن big bud گفته شد. چندین فیتوپلازما از گروه های مختلف شامل *کاندیداتوس فیتوپلازما اورانتیفولیا* (*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*)، فیتوپلازما استرالیزیا (*Ca. Phytoplasma australasiae*)، *کاندیداتوس فیتوپلازما تریفولی* (*Ca. Phytoplasma trifolii*)، *کاندیداتوس فیتوپلازما آستریس* (*Ca. Phytoplasma asteris*)، *کاندیداتوس فیتوپلازما فونیسیم* (*Ca. Phytoplasma phoenicium*)، *کاندیداتوس فیتوپلازما سولانی* (*Ca. Phytoplasma solani*)، *کاندیداتوس فیتوپلازما پرونی* (*Ca. Phytoplasma pruni*) و *کاندیداتوس فیتوپلازما اولمی* (*Ca. Phytoplasma ulmi*) همراه با بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی گزارش شده اند (۲ و ۳). در ایران، اولین گزارش از وقوع بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی در سال ۱۹۹۲ بوده است (۴). پس از آن، علایم این بیماری شامل گل سبز، رشد بیش از اندازه و غیرطبیعی کاسبرگ ها، رگبرگ ارغوانی و تورم جوانه ها در تعداد زیادی از مزارع گوجه فرنگی و بادمجان در استان های مختلف ایران شامل فارس (۴ و ۵)، بوشهر (۶)، هرمزگان (۷)، یزد (۸)، قزوین (۹)، زنجان (۱۰)، خراسان رضوی و شمالی (۱۱)، اردبیل، اصفهان (۱۲)، کرمانشاه، کردستان، آذربایجان شرقی و غربی (۱۳) و لرستان (۱۴) مشاهده و گزارش شد. وقوع بیماری تورم جوانه در برخی از مزارع گوجه فرنگی در استان فارس تا ۷/۵ درصد گزارش شده است (۵). الگوی توزیع و گسترش *کاندیداتوس فیتوپلازما استرالیزیا*، در گیاهان گوجه فرنگی آلوده تاکنون مطالعه نشده است؛ اگرچه براساس مطالعات انجام شده روی فیتوپلازماهای دیگر به نظر می رسد که توزیع فیتوپلازماها در گیاهان میزبانان نامنظم و غیریکنواخت باشد. وی (Wei) و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند

برداری از گیاه آلوده با چهار سطح (برگ های انتهایی، برگ ها از شاخه های بالایی محل پیوند، برگ ها از شاخه های زیر محل پیوند و ریشه های فرعی) بودند. به عبارت دیگر، در مورد هر سه گیاه در فواصل زمانی مشخص (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۷۰ روز پس از مایه زنی با پیوند) نمونه برداری از قسمت های مختلف گیاهان مایه زنی شده شامل برگ های انتهایی از قسمت بالای گیاه، برگ ها از ساقه های بالایی محل پیوند (تقریباً وسط گیاه)، برگ ها از شاخه های زیر محل پیوند (پایین گیاه) و ریشه های فرعی انجام و از ۰/۲ گرم رگبرگ میانی برگ ها استخراج DNA کل انجام شد. سپس، در هر مقطع زمانی با آزمون های PCR معمولی (مستقیم) و آشیانه ای (nested-PCR) در ۱۰۰ نانوگرم از DNA کل استخراج شده از هر نمونه گیاهی، ردیابی فیتوپلازما همراه با بیماری انجام شد و علاوه بر این غلظت فیتوپلازما با روش PCR در زمان واقعی (Real-time PCR) در نمونه ها تعیین شد. همچنین، زمان ظهور علائم اولیه بیماری در گیاهان مایه زنی شده زیر نظر قرار گرفتند. داده های به دست آمده در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین غلظت های فیتوپلازما با آزمون PLSD در سطح احتمال یک درصد انجام شد (۱۸).

د) مایه زنی با پیوند: برای مایه زنی با پیوند، از یک گیاه گوجه فرنگی که قبلاً با فیتوپلازماهای تورم جوانه از طریق پیوندک آلوده مایه زنی شده بود، سه پیوندک مشابه (شاخه ای ظریف با طول حدود پنج سانتی متر و دارای دو برگ) از قسمت دارای علائم آن گیاه تهیه و هر کدام به روش جانبی و در یک زمان روی یک گیاه گوجه فرنگی سالم (وسط شاخه اصلی) و در مجموع روی سه گیاه پیوند شدند. برای حفظ رطوبت و جلوگیری از خشک شدن پیوندک ها، قسمت پیوند خورده به مدت یک هفته با کیسه پلاستیکی پوشانده شد. پس از اطمینان از گرفتن پیوندک ها، کیسه پلاستیکی حذف و گیاهان پیوند شده در یک گلخانه عاری از حشرات از نظر ظهور و گسترش علائم بیماری تحت نظر قرار گرفتند. سه گیاه عاری از فیتوپلازما نیز بدون مایه زنی با

در این تحقیق، با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز در زمان واقعی (Real-time PCR)، الگوی گسترش و غلظت *کاندیدایا/توس* فیتوپلازما استرالیزیا در قسمت های مختلف گیاهان گوجه فرنگی آلوده به بیماری تورم جوانه، در زمان های مختلف پس از مایه زنی با پیوند، بررسی شده است.

مواد و روش ها

الف) گیاه مورد استفاده در گلخانه: در آبان ماه سال ۱۳۹۷ بذرهای گوجه فرنگی رقم سانسید ۶۱۸۹ در یک گلخانه عاری از حشرات واقع در بخش گیاه پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی منابع طبیعی فارس کشت شدند و دو ماه پس از کشت از بین بوته های حاصل، سه گیاه که از نظر رشد یکنواخت بودند انتخاب و از طریق پیوند جانبی با فیتوپلازما همراه با تورم جوانه مایه زنی شدند. تمامی آزمایش ها در گلخانه ای با دمای حدوداً ۳۰ درجه سلسیوس در روز و ۲۵ درجه سلسیوس در شب و حدود ۱۵ ساعت نور طبیعی انجام شد.

ب) منبع آلودگی فیتوپلازما مورد مطالعه: در این پژوهش از گیاهان گوجه فرنگی آلوده به بیماری تورم جوانه به عنوان منبع فیتوپلازما در آزمایش ها استفاده شد. این گیاهان قبلاً در گلخانه به وسیله مایه زنی با پیوند به *کاندیدایا/توس* فیتوپلازما استرالیزیا آلوده شده بودند. آلودگی بوته ها به *کاندیدایا/توس* فیتوپلازما استرالیزیا با روش واکنش زنجیره ای پلی مرز با آغازگرهای عمومی فیتوپلازماها و تعیین ترادف قطعه تکثیر شده مورد تایید قرار گرفت.

ج) طرح آزمایش: در این پژوهش غلظت و الگوی پراکنش فیتوپلازما همراه با تورم جوانه گوجه فرنگی (*کاندیدایا/توس* فیتوپلازما استرالیزیا) در گیاه گوجه فرنگی بررسی شد. برای این منظور، در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی سه گیاه گوجه فرنگی (سه تکرار) تقریباً دو ماهه به وسیله پیوند به فیتوپلازماهای تورم جوانه گوجه فرنگی آلوده شدند. فاکتور اول زمان نمونه برداری با چهار سطح (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۷۰ روز بعد از مایه زنی با پیوند) و فاکتور دوم محل نمونه

دیگر منتقل گردید. پس از اضافه کردن حدود ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد (دمای ۲۰- درجه سلسیوس) به هر کدام و مخلوط کردن، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رانشین به آرامی دور ریخته و به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه و پنج دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. این عمل دو بار تکرار و پس از آن لوله‌ها از باقی مانده الکل خشک شدند. در انتها ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به هر لوله اضافه و به عنوان DNA قالب در PCR استفاده شد (۲۰).

(ز) ردیابی فیتوپلازما با آزمون‌های PCR معمولی و آشیانه‌ای: گیاهان گوجه فرنگی، قبل از مایه زنی با پیوند برای وجود یا عدم وجود آلودگی فیتوپلازمایی با PCR آشیانه‌ای با استفاده از آغازگرهای عمومی فیتوپلازماها مورد آزمایش قرار گرفتند. بعد از مایه زنی با پیوند، نمونه‌های هر چهار قسمت از گیاه که به طور جداگانه در فواصل زمانی مشخص (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۷۰ روز بعد از مایه زنی) از گیاه گرفته شده بودند، برای ردیابی فیتوپلازما در آن‌ها با آزمون‌های PCR معمولی و آشیانه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمون PCR معمولی از جفت آغازگر P1/P7 (۲۱ و ۲۲) و در PCR آشیانه‌ای از جفت آغازگرهای P1/P7 (دور اول) و R16F2n/R16R2 (دور دوم) (۲۳) استفاده شد. نام و ترادف نوکلئوتیدی آغازگرها، دمای اتصال و اندازه قطعه‌ای که تکثیر می‌کنند در جدول ۱ آمده است. PCR معمولی و آشیانه‌ای در حجم ۲۰ میکرولیتری

پیوند به عنوان شاهد استفاده شدند (۱۹). دوره کمون بیماری: گیاهان گوجه فرنگی مایه زنی شده با فیتوپلازما و همچنین گیاهان شاهد، به طور منظم و روزانه برای بررسی علائم در گلخانه تحت نظر قرار گرفتند. برای هر گیاه تعداد روزها پس از اعمال پیوند تا ظهور علائم بیماری یادداشت برداری شد و در واقع دوره کمون بیماری در هر تیمار مایه زنی برای هر گیاه ثبت شد. ارغوانی شدن رگبرگ‌ها به همراه ریزیرگی، رشد زیاد کاسبرگ و گل سبزی به عنوان علائم بیماری تلقی گردید (۲ و ۵). از این گیاهان، نمونه‌های لازم در زمان‌های مشخص به منظور آزمون‌های PCR معمولی، آشیانه‌ای و PCR در زمان واقعی تهیه شدند.

(و) استخراج DNA کل: استخراج DNA کل از برگ‌های گیاهان مایه زنی شده و شاهد براساس روش دوپیل و دوپیل (۲۰) با تغییراتی در آن به شرح زیر انجام شد. حدود ۰/۲ گرم بافت رگبرگ میانی برگ‌ها در ازت مایع به صورت پودر در آمد و به لوله‌های اپندورف یک و نیم میلی لیتری منتقل شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر بافر ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) دو درصد با دمای ۶۵ درجه سلسیوس به اضافه ۵ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول به هر نمونه در لوله‌ها اضافه و در حمام آب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. در مرحله بعد، به هر لوله ۷۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم-ایزواکیل الکل (به نسبت حجمی ۲۴ به ۱) اضافه و در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. حدود ۵۰۰ میکرولیتر از رومانند هر لوله برداشته شد و به یک لوله

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمون‌های PCR معمولی، آشیانه‌ای و PCR در زمان واقعی

منبع	ناحیه هدف	اندازه قطعه تکثیر شونده (جفت باز)	دمای اتصال (سلسیوس)	ترادف	نام آغازگر
۲۱ و ۲۲	16S & 23S rRNA	۱۸۰۰	۵۵	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'	P1
				5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'	P7
۲۳	16S rRNA	۱۲۵۰	۵۵	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	R16F2n
		(PCR آشیانه‌ای)		5'-TGACGGGCGGTGTGTACAACCCCG-3'	R16R2
۲۵	16S rRNA	۹۶	۵۶	5'-GCCGCGGTAAGACATAAGGG-3'	TWB ^F
		(PCR در زمان واقعی)		5'-AGCGTTGCCATTACCCACTG-3'	TWB ^R

با ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه سلسیوس ۲۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه همراه با یک آنالیز منحنی ذوب آغازگرها که از ۶۰ تا ۹۴ درجه سلسیوس انجام شد. DNA استخراج شده از گیاهان گوجه فرنگی مایه زنی نشده و آب مقطر سترون به عنوان کنترل منفی در آزمون های PCR معمولی و Real-time PCR استفاده شدند.

ط (مراحل کمی سازی مطلق: ابتدا با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده (جدول ۱) برای آزمون Real-time PCR با یک نمونه DNA مثبت برای *کاندیدا/توس* فیتوپلازما استرالیازیا PCR معمولی انجام شد و قطعه قابل انتظار ۹۶ جفت باز تکثیر شد. برای تهیه منحنی استاندارد اقدام به همسانه سازی قطعه مورد نظر در پلاسمید pTZ57r/t شد. برای این کار محصول PCR، با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (Roche, Germany) خالص سازی شد. به وسیله کیت همسانه سازی محصول PCR شرکت سیناکلون (PCR TA Cloning kit, Sinaclon, Iran) قطعه مورد نظر وارد پلاسمید و سپس وارد سویه DH5 α باکتری *شریشیا کلی* شد. برای استخراج پلاسمید نیز از کیت استخراج پلاسمید (Mi-plasmid miniprep kit) شرکت متابیون (Metabion, Germany) استفاده شد. پلاسمید خالص سازی شده، با دستگاه نانودراپ (ND1000) مورد سنجش قرار گرفت و غلظت آن تعیین شد. سپس از غلظت ۳۱ نانوگرم در میکرولیتر پلاسمید نوترکیب (۲۹۸۲ جفت باز) که حاوی ۳۰ نانوگرم DNA پلاسمیدی (۲۸۸۶ جفت باز) و یک نانوگرم قطعه هدف (۹۶ جفت باز) بود، سری رقت های یک تا ۱۰^{-۸} نانوگرم در میکرولیتر تهیه شد. یک میکرولیتر از هر رقت به عنوان DNA الگو برای آزمون PCR در زمان واقعی به کار رفت و چرخه آستانه (cycle thresholds = Ct) برای هر کدام از رقت ها و سپس معادله منحنی استاندارد به دست آمد. همچنین، تعداد نسخه های ژن براساس وزن مولکولی DNA دورشته ای با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۶):

$$\text{تعداد نسخه ها} = (\text{میزان DNA برحسب نانوگرم} \times 6/0.22 \times 10^{13}) / (\text{اندازه قطعه تکثیر شده DNA برحسب جفت باز} \times 10^9 \times 1.650).$$

شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس (آمپلیکون)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (۱۰ میکرومول)، ۱ تا ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۶ میکرولیتر آب مقطر سترون انجام شد. برای انجام آزمون PCR آشیانه ای، یک میکرولیتر از محصول به دست آمده از دور اول PCR به عنوان DNA قالب در دور دوم PCR استفاده شد. چرخه دمایی PCR معمولی و آشیانه ای شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه دمایی شامل واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۵ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس ۹۰ ثانیه، همراه با یک مرحله گسترش نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. ده میکرولیتر از محصول های PCR معمولی و آشیانه ای روی ژل آگاروز یک درصد حاوی رنگ ایمن فلوروو (FluoroVue, NS1000) برده شد و در دستگاه UV ترانس ایلومیناتور مشاهده و با دستگاه عکس برداری از ژل از آن عکس گرفته شد. سپس، بر اساس وجود یا عدم وجود باند مورد نظر، تعداد واکنش های مثبت و منفی در هر آزمایش ثبت گردید. برای اطمینان از صحت آزمایش، تعدادی از قطعات تکثیرشده در PCR به صورت مستقیم تعیین توالی شدند (توسط شرکت ماکروژن، کره جنوبی). جستجو با برنامه بلاست در بانک جهانی ترادف ها با استفاده از قطعات تعیین توالی شده برای تشخیص و تایید قطعی فیتوپلاسمای همراه با بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی انجام شد (۲۴).

ح) آزمون PCR در زمان واقعی (Real-time PCR): آزمون PCR در زمان واقعی (با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی TWBF/TWBR (۲۵) در دستگاه Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (بیونیر، کره جنوبی) انجام شد. هر واکنش ۲۰ میکرولیتری شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس سایبرگرین (2X) (Ampliqon, Denmark)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۰/۵ میکرومولار غلظت نهایی)، ۷ میکرولیتر آب تیمار شده با دیپس (DEPC water) و ۱ میکرولیتر DNA الگو (۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) بود. برنامه چرخه دمایی عبارت بود از: ۹۵ درجه سلسیوس ۷ دقیقه همراه

بالایی گیاهان مشاهده شد (شکل ۱ الف). طول دوره کمون در سه گیاه مورد مطالعه ۳۸، ۴۰ و ۴۲ روز و در نتیجه میانگین دوره کمون بیماری در گیاهان مورد بررسی در شرایط گلخانه ۴۰ روز بود. در روز هفتم پس از مایه زنی، علائم مشخص و پیشرفته بیماری و توسعه علائم تورم جوانه گوجه فرنگی قابل مشاهده بود (شکل ۱ ب).

ب) ردیابی فیتوپلازما با PCR معمولی و آشیانه ای: نتایج ردیابی فیتوپلازما همراه با تورم جوانه در قسمت های مختلف گیاهان مایه زنی شده، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۷۰ روز پس از مایه زنی با پیوند، با آزمون های PCR معمولی و آشیانه ای در جدول ۲ آمده است. در نمونه های گرفته شده از گیاهان مایه زنی شده در روز دهم بعد از پیوند، در هیچ کدام از نمونه هایی که از چهار قسمت این گیاهان گرفته شده بود با روش های PCR مستقیم و آشیانه ای فیتوپلازما همراه با بیماری ردیابی نشد. در نمونه های روز بیستم بعد از مایه زنی، در تمام نمونه ها با روش PCR آشیانه ای فیتوپلازما همراه با بیماری ردیابی شد، در حالی که در آزمون PCR مستقیم تنها در نمونه های

میانگین وزن مولکولی یک جفت باز ۶۵۰ دالتون (گرم بر مول) فرض شد و عدد آووگادرو $10^{23} \times 6/022$ مولکول در مول می باشد.

با توجه به اینکه فیتوپلازماها در ژنوم خود دارای دو نسخه از ژن 16S rRNA می باشند (۲۷-۲۹)، برای به دست آوردن تعداد سلول های فیتوپلازما تعداد نسخه های این ژن به عدد دو تقسیم شد.

یافته ها

الف) علائم شناسی و دوره کمون بیماری: در گیاهان گوجه فرنگی مایه زنی شده با فیتوپلازما تورم جوانه، ۳۸ روز پس از مایه زنی علائم رگبرگ ارغوانی در برگ های قسمت های بالایی یکی از گیاهان مشاهده شد و تا ۴۳ روز پس از مایه زنی، علائم گل سبز و تشکیل کاسبرگ های بزرگ و تورم جوانه روی هر سه گیاه مشاهده شد (شکل ۱). در گیاهان مایه زنی شده علاوه بر وقوع ناهنجاری های گل، اغلب میوه نیز تشکیل نشد و ظهور و پیشرفت علائم بیماری در قسمت انتهایی و



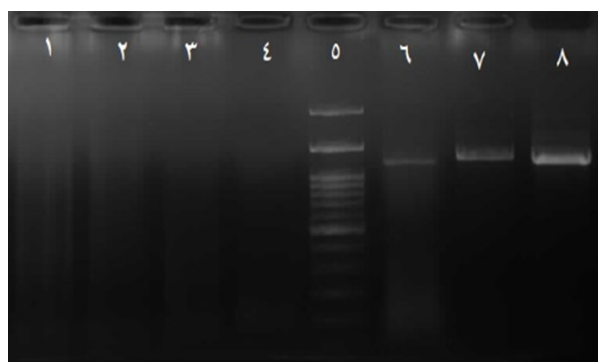
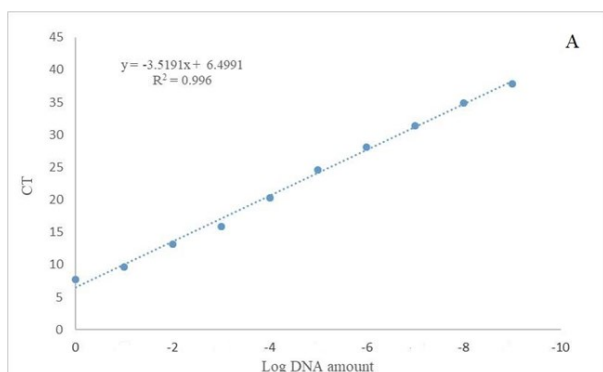
شکل ۱: الف) شروع علائم بیماری از قسمت بالایی گیاه که به صورت گل سبز، رشد زیاد کاسبرگ ها، ارغوانی شدن رگبرگ ها و تورم اندک جوانه ها مشخص هستند. ب) پیشرفت علائم بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی در یکی از گیاهان ۷۰ روز بعد از مایه زنی با پیوند.

جدول ۲: نتایج ردیابی فیتوپلاسمای تورم جوانه در قسمت های مختلف (برگ های بالایی گیاه، برگ از شاخه بالای محل پیوند، برگ از شاخه پایین محل پیوند و ریشه) سه گیاه مورد آزمون در روزهای مشخص (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۷۰) پس از مایه زنی با پیوند. در هر واکنش PCR معمولی و آشیانه ای ۱۰۰ نانوگرم DNA کل استخراج شده از گیاه به عنوان الگو استفاده شد.

ریشه فرعی		برگ از شاخه های زیر محل پیوند		برگ از شاخه های بالای محل پیوند		برگ های انتهایی و بالای گیاه		قسمت نمونه برداری شده و روش PCR	
PCR آشیانه ای	PCR مستقیم	PCR آشیانه ای	PCR مستقیم	PCR آشیانه ای	PCR مستقیم	PCR آشیانه ای	PCR مستقیم	زمان نمونه برداری و شماره گیاه	
-	-	-	-	-	-	-	-	گیاه ۱	روز ۱۰
-	-	-	-	-	-	-	-	گیاه ۲	بعد از مایه زنی
-	-	-	-	-	-	-	-	گیاه ۳	
+	-	+	-	+	-	+	+	گیاه ۱	روز ۲۰
+	-	+	-	+	-	+	+	گیاه ۲	بعد از مایه زنی
+	+	+	-	+	-	+	+	گیاه ۳	
+	+	+	+	+	+	+	+	گیاه ۱	روز ۴۰
+	+	+	+	+	+	+	+	گیاه ۲	بعد از مایه زنی
+	+	+	+	+	+	+	+	گیاه ۳	
+	+	+	+	+	+	+	+	گیاه ۱	روز ۷۰
+	+	+	+	+	+	+	+	گیاه ۲	بعد از مایه زنی
+	+	+	+	+	+	+	+	گیاه ۳	

فرنگی مایه زنی شده با فیتوپلاسمایی از گروه دو 16S rRNA و زیرگروه دی (16SrII-D)، *کاندیدا/توس فیتوپلازما* استرالیازیا، آلوده شده اند (Accession Nos. MN565885, MN565886) در اغلب نمونه هایی که در روز ۲۰ بعد از مایه زنی (در دوره کمون بیماری) از گیاهان گوجه فرنگی گرفته شد، نتایج PCR مستقیم منفی اما، PCR آشیانه ای مثبت بود. شکل ۲ الکتروفورز محصولات PCR مستقیم و آشیانه ای مربوط به ردیابی *کاندیدا/توس فیتوپلازما* استرالیازیا را در سه نمونه DNA که ۲۰ روز پس از مایه زنی با پیوند از گیاهان گوجه فرنگی استخراج شدند، نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود در سه نمونه ای که در PCR مستقیم نتیجه ردیابی فیتوپلازما منفی بود (قطعه قابل انتظار ۱۸۰۰ جفت باز روی ژل الکتروفورز مشاهده نشد)، در PCR آشیانه ای مثبت بودند و قطعه حدود ۱۲۵۰ جفت باز به خوبی

برگ های بالایی هر سه گیاه مایه زنی شده و در نمونه های ریشه یک گیاه نتیجه ردیابی فیتوپلاسمای بیماری مثبت و در نمونه های برگ از شاخه های بالا و پایین محل پیوند (شاخه های وسط و پایین گیاه) نتیجه ردیابی ها منفی بود. چهل و ۷۰ روز پس از مایه زنی، در همه نمونه های گرفته شده از هر سه گیاه مایه زنی شده، فیتوپلاسمای بیماری هم با PCR مستقیم و هم با PCR آشیانه ای ردیابی شد (جدول ۲). در واکنش های مثبت، در DNA گیاهان مایه زنی شده، قطعات قابل انتظار حدود ۱۸۰۰ و ۱۲۵۰ جفت باز به ترتیب در PCR مستقیم و آشیانه ای تکثیر شدند و در DNA گیاهان شاهد (مایه زنی نشده) و آب مقطر سترون این قطعات تکثیر نشد. دو محصول PCR به طور مستقیم تعیین ترادف شد. جست و جو با برنامه بلاست با استفاده از قطعات تعیین توالی شده تایید کرد که گیاهان گوجه



شکل ۳: منحنی استاندارد که برای کمی سازی DNA هدف (تعداد نسخه های ژن هدف) مربوط به *کاندید/توس فیتوپلازما استرالیازیا* به کار رفت. این منحنی براساس رابطه بین چرخه آستانه (Ct)، لگاریتم میزان های مشخص و استاندارد DNA به دست آمد.

داشتند. همچنین اثر متقابل زمان و محل نمونه برداری در گیاه معنی دار بود.

۳- ارزیابی کمی فیتوپلازما در قسمت های مختلف گیاه. همان طور که در جدول ۳ مشخص است، با گذشت زمان غلظت فیتوپلازمای همراه با تورم جوانه تا آخرین روز نمونه برداری، یعنی ۷۰ روز پس از مایه زنی، به طور قابل ملاحظه ای در اندام های مختلف رو به افزایش است. با وجود این، در روزهای ۱۰ و ۲۰ بعد از مایه زنی، اختلاف معنی داری بین غلظت فیتوپلازما در قسمت های مختلف گیاهان مشاهده نشد. در هر نقطه زمانی که نمونه برداری انجام شد، بیشترین غلظت فیتوپلازما در برگ های انتهایی و بالایی گیاهان مایه زنی شده بود. در روزهای ۴۰ و ۷۰ پس از مایه زنی، اختلاف بین غلظت فیتوپلازما در برگ های بالایی گیاه و برگ های شاخه های اطراف محل پیوند (بالا و پایین پیوند) اختلاف معنی داری مشاهده شد ($P < 0.01$). غلظت فیتوپلازما در برگ های انتهایی در روز ۴۰ بعد از مایه زنی، بیشتر از غلظت آن در ریشه های فرعی گیاه بود ولی، اختلاف معنی داری را از نظر آماری با غلظت فیتوپلازما در ریشه نشان نداد. با وجود این، در روز ۷۰ بعد از مایه زنی، غلظت فیتوپلازما در برگ های انتهایی با غلظت آن در ریشه اختلاف معنی داری را نشان داد و بیشتر از آن بود. ارزیابی غلظت فیتوپلازما ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روز بعد از مایه زنی با

شکل ۲: مقایسه حساسیت روش PCR آشیانه ای با PCR مستقیم در ردیابی *کاندید/توس فیتوپلازما استرالیازیا* برای نمونه هایی که ۲۰ روز بعد از مایه زنی، از گیاهان گوجه فرنگی بدون علائم (در دوره کمون بیماری) گرفته شدند. چاهک ۱: کنترل منفی؛ چاهک های ۲ تا ۴: نمونه برگ های شاخه های بالایی محل پیوند ۲۰ روز پس از مایه زنی که در PCR مستقیم منفی بودند (عدم وجود باند مورد انتظار)؛ چاهک های ۶ تا ۸: نتیجه مثبت را در آزمون PCR آشیانه ای (وجود باند ۱۲۵۰ جفت باز) برای همین نمونه ها (که در PCR مستقیم منفی بودند) نشان می دهند. ۵: مارکر ۱۰۰ جفت باز (تا ۳ کیلو جفت باز).

تکثیر و روی ژل الکتروفورز مشاهده شد. (ج) *ارزیابی کمی فیتوپلازما در گیاهان گوجه فرنگی با روش PCR در زمان واقعی:*

۱- منحنی استاندارد: به منظور ایجاد منحنی استاندارد برای کمی سازی مطلق، در نرم افزار اکسل مقادیر Ct به دست آمده، در برابر لگاریتم مقادیر DNA قرار داده شد و یک رگرسیون خطی رسم شد که معادله آن به این صورت بود:

$$y = -3.5191x + 6.4991 \quad (R^2 = 0.9963) \quad (\text{شکل ۳})$$

مقادیر DNA هدف در محصول PCR با قرار دادن اعداد مربوط به چرخه آستانه (Ctها) (که از آزمون PCR در زمان واقعی به دست آمده بودند) در معادله یاد شده تعیین و سپس تعداد نسخه های ژن براساس وزن مولکولی DNA دورشته ای با استفاده از فرمول یاد شده در قسمت "ط" تعیین شد.

۲- آنالیز واریانس: نتایج تجزیه و تحلیل واریانس داده های PCR در زمان واقعی نشان داد که هر کدام از فاکتورهای زمان و محل نمونه برداری در گیاهان گوجه فرنگی، اثر معنی داری بر غلظت فیتوپلازمای همراه با تورم جوانه گوجه فرنگی

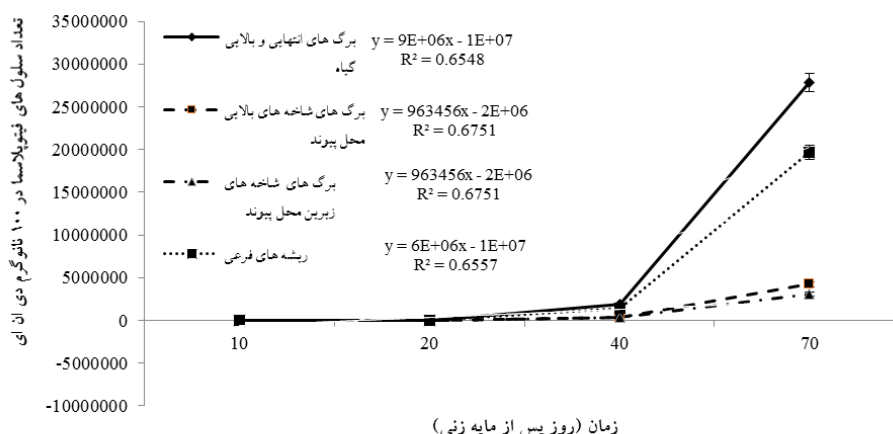
جدول ۳: مقایسه میانگین اثر انفرادی زمان و نوع بافت و اثر متقابل آن ها بر غلظت فیتوپلازما

میانگین محل نمونه برداری	۱۰ روز بعد از مایه زنی	۲۰ روز بعد از مایه زنی	۴۰ روز بعد از مایه زنی	۷۰ روز بعد از مایه زنی	میانگین محل نمونه برداری
برگ های انتهایی	††۳۸ ^g ± ۳/۲††††	۱۳۷۵ ^{fg} ± ۱۲۳	۱۹۱۸۳۳ ^{de} ± ۸۰۱۲۱	۲۷۸۵۰۰۰ ^a ± ۱۰۴۰۴۳۳	†۷۴۴۲۴۳۷ ^A ± ۳۵۶۷۲۷۸
برگ از شاخه های بالایی محل پیوند	۲۰ ^g ± ۰/۹	۴۷۱ ^g ± ۲۰	۳۳۶۱۶۶ ^{fg} ± ۱۰۳۷۰	۴۲۰۵۰۰۰ ^c ± ۳۲۸۰۷۵	۱۱۳۵۴۱۴ ^C ± ۵۴۰۴۹۳
برگ از شاخه های زیرین محل پیوند	۱۴ ^g ± ۲/۲	۳۹۶ ^g ± ۳۷	۲۹۵۰۰۰ ^{fg} ± ۱۵۱۳۶	۳۱۱۳۳۳ ^{cd} ± ۲۲۴۸۲۱	۸۵۲۱۸۶ ^C ± ۳۹۸۱۹۳
ریشه های فرعی	۲۱ ^g ± ۱/۲	۹۵۵ ^g ± ۸۸	۱۳۷۵۰۰۰ ^{ef} ± ۵۱۰۷۲	۱۹۶۵۰۰۰ ^b ± ۸۷۳۶۹۰	۵۲۵۶۴۹۴ ^B ± ۲۵۱۸۲۱۶
میانگین زمان نمونه برداری	†۲۳ ^C ± ۲/۸	۷۹۹ ^C ± ۱۲۴	۹۸۱۱۲۵ ^B ± ۲۰۹۹۲۲	۱۳۷۰۴۵۸۳ ^A ± ۳۱۶۸۹۷۴	

† میانگین های دارای حروف بزرگ در ستون سمت چپ و پایین جدول (مربوط به اثرات انفرادی فاکتورها) و †† میانگین های دارای حروف کوچک در خانه های میانی جدول، که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح ۱ درصد آزمون PLSD اختلاف معنی داری با هم ندارند. ††† خطای استاندارد میانگین (SEM). مقدار LSD برای مقایسه اثر انفرادی زمان و نوع بافت برابر ۶۸۶۹۰۶. مقدار LSD برای مقایسه اثر متقابل دو فاکتور برابر ۱۳۷۰۰۰۰ است.

گوجه فرنگی مایه زنی شده، غلظت فیتوپلازما افزایش قابل ملاحظه ای را در نمونه های گرفته شده در روزهای ۴۰ و ۷۰ بعد از مایه زنی نشان داد و با غلظت فیتوپلازما در روزهای ۱۰ و ۲۰ بعد از مایه زنی اختلاف معنی داری را نشان می داد ($P < 0.01$). غلظت فیتوپلازما در نمونه های گرفته شده در روزهای ۴۰ و ۷۰ بعد از مایه زنی، اختلاف معنی داری را با یکدیگر نشان می داد و در مورد هر قسمت از گیاه در مقایسه با خودش، غلظت فیتوپلازما در روز ۷۰ به طور قابل توجهی بیشتر از روز ۴۰ بعد از مایه زنی بود. به عنوان مثال، بین نمونه های برگ های انتهایی که در روزهای ۴۰ و ۷۰ بعد از مایه زنی از گیاه گرفته شده بودند، غلظت فیتوپلازما متفاوت بود و اختلاف معنی داری را نشان می داد و در روز ۷۰ به طور قابل توجهی بیشتر از روز ۴۰ بعد از مایه زنی بود (جدول ۳). در شکل ۴ نمودار تغییرات غلظت فیتوپلازما از ابتدای زمان مایه زنی تا آخرین نمونه برداری در روز ۷۰ بعد از مایه زنی، در قسمت های مختلف گیاه گوجه فرنگی نشان داده شده است. با مقایسه شیب خطوط برازش شده که در معادلات آن ها مشخص است، به روشنی مشاهده می شود که شیب خط مربوط به افزایش غلظت فیتوپلازما در برگ های انتهایی گیاه و سپس در ریشه های فرعی به طور قابل ملاحظه ای بیشتر از

پیوند نشان داد که غلظت فیتوپلازما در ریشه های فرعی بیشتر از برگ های شاخه های بالا و پایین محل پیوند بود، اما اختلاف معنی داری را حتی در روز ۴۰ بعد از مایه زنی نشان نداد. با وجود این، در روز ۷۰ بعد از مایه زنی اختلاف معنی داری بین غلظت فیتوپلازما در ریشه ها و برگ های پایینی گیاه گوجه فرنگی مشاهده شد. مقایسه میانگین غلظت های فیتوپلازما در زمان های مختلف نمونه برداری از گیاهان گوجه فرنگی نشان داد که به طور کلی در نمونه های برداشت شده در هفتادمین روز پس از مایه زنی، بالاترین غلظت فیتوپلازما مشاهده شد. به عبارت دیگر با گذشت زمان افزایش غلظت فیتوپلازما (به خصوص ۴۰ و ۷۰ روز پس از مایه زنی) در قسمت های مختلف گیاه مشاهده شد (جدول ۳). غلظت فیتوپلازما در برگ های وسطی و پایینی گیاه، یعنی برگ های شاخه های بالایی و پایینی محل پیوند، در روز ۷۰ پس از مایه زنی، اختلاف معنی داری را با غلظت فیتوپلازما در سایر زمان های نمونه برداری نشان داد. هرچند در روز ۴۰ بعد از مایه زنی غلظت فیتوپلازما در برگ های وسط و پایین گیاه نیز به طور محسوس بالاتر رفته بود اما، اختلاف معنی داری از نظر آماری با روزهای ۱۰ و ۲۰ بعد از مایه زنی نشان نداد. در برگ های انتهایی و ریشه گیاهان



شکل ۴: تغییرات غلظت *کاندیدا/توس* فیتوپلازما استرالیازیا از ابتدای زمان مایه زنی تا آخرین نمونه برداری در روز ۷۰ پس از مایه زنی، در قسمت های مختلف گیاه گوجه فرنگی.

سمت برگ های بالایی و به سمت ریشه گیاه و احتمالاً این حرکت به طور عمده در اثر جریان شیره آوند آبکشی از بافت های منبع به مخزن اتفاق می افتد. در مرحله رویشی گیاه، غالباً شیره آوندی به سمت ریشه ها و برگ های انتهایی و بالایی گیاه حرکت می کند (۳۰). به عبارتی دیگر، افزایش غلظت فیتوپلازما و آلودگی برگ های انتهایی گیاه لزوماً وابسته به حرکت فیتوپلازما به سمت ریشه و آلودگی ریشه نیست و این فیتوپلازما به طور هم زمان به سمت ریشه و برگ های جوان انتهایی گیاه حرکت می کند. آلودگی برگ ها در شاخه بالا و پایین محل پیوند که تقریباً در وسط و پایین گیاه قرار داشتند نشان داد که فیتوپلازما در تمام گیاه توزیع می شود، اما غلظت آن در قسمت های مختلف ممکن است تفاوت زیادی داشته باشد. امیری (Amiri) و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که حرکت *کاندیدا/توس* فیتوپلازما اورانتیفولیا در نهال های لیموترش پس از مایه زنی با پیوند، به هر دو سمت بالا و پایین گیاه رخ می دهد (۳۱). نتایج مشابهی نیز در مطالعات وی (Wei) و همکاران (۲۰۰۴) و ساراکو (Saracco) و همکاران (۲۰۰۶) به دست آمده است (۱۵ و ۱۶). با وجود این، لی (Lee) و همکاران (۲۰۱۲) مسیر حرکت متفاوتی را برای فیتوپلازماهای جاروک عناب (*Jujube witches' broom*) پس از مایه زنی به وسیله پیوند در گیاه پروانش گزارش کردند. آن ها نشان دادند که طی مراحل

برگ های بالغ در شاخه های وسط و پایین گیاه است. این نرخ افزایش غلظت سلول های فیتوپلازما به ویژه بین روزهای ۴۰ تا ۷۰ پس از مایه زنی به شدت بیشتر بود.

بحث

داشتن دانش از نحوه گسترش فیتوپلازما در داخل گیاه و توزیع نهایی آن در قسمت های مختلف میزبان گیاهی برای تشخیص و ردیابی سریع بیماری های ناشی از فیتوپلازماها و همچنین فهم از برهم کنش فیتوپلازما و گیاه می تواند حائز اهمیت باشد. در مطالعه حاضر با استفاده از روش PCR در زمان واقعی، الگوی کلی پنخس و غلظت *کاندیدا/توس* فیتوپلازما استرالیازیا در گیاهان گوجه فرنگی، پس از مایه زنی با پیوند، به صورت کمی تعیین شد. غلظت فیتوپلازما در گیاهان مایه زنی شده، در زمان های مختلف نمونه برداری متفاوت بود. به طور واضح، در تمام زمان های نمونه برداری غلظت فیتوپلازما در برگ های انتهایی و بالایی گیاه بیشتر از برگ های پایینی و ریشه بود. غلظت بالای فیتوپلازما در برگ های انتهایی گیاه می تواند مربوط به حرکت توده ای سلول های فیتوپلازما از پیوند آلوده به سمت بافت ها و اندام های مخزن (sink) در گیاه باشد. نتایج این پژوهش نشان می دهند که پس از ورود فیتوپلازما به داخل گیاه به وسیله پیوند، فیتوپلازما در هردو جهت در گیاه حرکت می کند، یعنی به

برگ های انتهایی و یا ریشه گیاه می توان حدود ۲۰ روز قبل از وقوع علائم بیماری، آلودگی گیاه گوجه فرنگی را به *کاندید/توس* فیتوپلازما استرالیازیا تشخیص داد. به عبارتی دیگر، هنگامی که بتوان با آزمون PCR فیتوپلازما را در گیاهان گوجه فرنگی ردیابی کرد، به طور تقریبی حداکثر تا بیست روز بعد باید انتظار ظهور علائم را در گیاه داشته باشیم. هرچند شرایط محیطی، سویه بیمارگر و سن گیاه در لحظه آلودگی نیز می تواند روی بیان علائم تاثیرگذار باشد. در ردیابی فیتوپلازما همراه با بیماری، روش PCR آشیانه ای حساسیت بیشتری را نشان داد. به عنوان مثال، با روش PCR آشیانه ای در تمام ۱۲ نمونه جمع آوری شده در روز بیستم پس از مایه زنی از قسمت های مختلف گیاه، فیتوپلازما همراه با بیماری ردیابی شد، اما با PCR مستقیم تنها در چهار نمونه از این ۱۲ نمونه نتایج ردیابی فیتوپلازما مثبت بود. بنابراین، با توجه به اینکه غلظت فیتوپلازما در دوره کمون بیماری و به ویژه در اوایل آلودگی پایین است، استفاده از روش حساس تر PCR آشیانه ای بهتر از روش PCR مستقیم است و احتمال گرفتن پاسخ منفی کاذب را در نمونه ها کاهش می دهد. صادقی (Sadeqi) و همکاران (۲۰۱۰) با این فرض که *کاندید/توس* فیتوپلازما اورانتیفولیا در درختان لیموترش پس از ورود به گیاه در کنار انتشار غیرمنظم آن در درخت به سمت ریشه ها نیز حرکت می کند، با نمونه برداری از پوست طوقه درختان لیموترش توانستند به طور موثرتر و دقیق تر در مقایسه با نمونه های برگ های بدون علائم، فیتوپلازما را در دوره کمون بیماری ردیابی کنند. در مطالعه ایشان استفاده از روش PCR آشیانه ای کارایی بالاتری را نسبت به روش PCR مستقیم در ردیابی فیتوپلازما نشان داد (۳۶). براساس نتایج به دست آمده توزیع فیتوپلازما به صورت غیریکنواخت در قسمت های مختلف گیاه صورت می گیرد و غلظت آن نیز اغلب در برگ های فاقد علائم پایین تر است که می تواند در دوره کمون بیماری منجر به نتیجه منفی کاذب در PCR شود. در این پژوهش، در تمام ردیابی های انجام گرفته در برگ های انتهایی و ریشه گیاهان آلوده ولی فاقد علائم (گیاهان

اولیه آلودگی، فیتوپلازما از محل پیوند به سمت پایین و به سوی ریشه و از ریشه ها به سمت بالای گیاه گسترش می یابد (۳۲). همچنین، سوگیو (Sugio) و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که فیتوپلازما پس از ورود به گیاه عمدتاً به سمت ریشه ها حرکت می کند و سپس به قسمت های هوایی در حال رشد گیاه انتقال می یابد (۳۳). همبستگی معنی داری بین ظهور علائم بیماری و غلظت فیتوپلازما در گیاهان گوجه فرنگی مشاهده شد. غلظت بالای فیتوپلازما در قسمت های انتهایی گیاهان و همچنین ظهور علائم اولیه بیماری در قسمت های بالایی آن ها نشان داد که در قسمت های هوایی گیاه، هرکجا که غلظت فیتوپلازما بیشتر باشد، علائم بیماری زودتر خود را نشان می دهد. به عبارت دیگر، در قسمت های هوایی دارای علائم بیماری غلظت فیتوپلازما بیشتر است. بووه (Bove) و همکاران (۱۹۹۸) با میکروسکوپ الکترونی و امیری و همکاران (۲۰۱۹) با آزمون PCR در زمان واقعی نشان دادند که در گیاهان لیموترش آلوده به جاروک، غلظت *کاندید/توس* فیتوپلازما اورانتیفولیا در آوند آبکشی شاخه های جارویی و علائم دار گیاه بسیار زیاد و بیشتر از قسمت های بدون علائم است (۳۱ و ۳۴). کوسکه و کیرک پاتریک (Kuske & Kirkpatrick) در سال ۱۹۹۲ نشان دادند که فیتوپلازما زردی مینا (*کاندید/توس* فیتوپلازما آستریش) در گیاه پروانش، در هفته های اول پس از مایه زنی با پیوند، از محل مایه زنی به سمت شاخه هایی که از پایین ساقه اصلی منشا می گیرند حرکت می کند و سپس در تمام گیاه سیستمیک می شود. در مطالعه یاد شده، پس از هفت هفته بیشترین غلظت فیتوپلازما در بافت های جوان انتهایی گیاه و شاخه های دارای علائم و کمترین غلظت آن در ریشه بود. بدین ترتیب انتشار فیتوپلازما و غلظت آن به طور واضح با بیان علائم در قسمت های هوایی گیاه همبستگی داشت (۳۵).

نتایج ردیابی فیتوپلازما با آزمون های PCR مستقیم و آشیانه ای در قسمت های مختلف گیاه در زمان های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۷۰ روز بعد از مایه زنی نشان داد که با نمونه برداری از

نتیجه گیری

در این مطالعه با استفاده از روش PCR در زمان واقعی الگوی پخش و نحوه گسترش *کاندیدا/توس* فیتوپلازما استرالیزیا در گیاهان گوجه فرنگی بررسی و مشخص شد که این فیتوپلازما از محل مایه زنی در دو جهت به سمت بالا و پایین در گیاه حرکت می کند و پس از مدتی با غلظت های متفاوت در تمام گیاه پخش می شود. بیشترین غلظت فیتوپلازما در قسمت بالایی گیاه و در درجه دوم در ریشه بود؛ به همین دلیل برای ردیابی این فیتوپلازما در گیاهان گوجه فرنگی نمونه برداری از این قسمت ها و انجام آزمون PCR آشیانه ای پیشنهاد می شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از جناب آقای دکتر حامد حسن زاده خانکهدانی و مهندس محسن امیری به جهت کمک در تجزیه و تحلیل های آماری و راهنمایی های ارزنده شان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

در دوره کمون بیماری)، نتیجه ردیابی فیتوپلازما در برگ های انتهایی و ریشه ها نسبت به نمونه های قسمت وسط و پایین گیاه موفق تر بود. ردیابی بهتر فیتوپلازما در برگ های جوان بالای گیاه و ریشه ها به دلیل غلظت بیشتر فیتوپلازما در این قسمت ها نسبت به سایر قسمت های گیاه بود. بنابراین، برای ردیابی و تشخیص زودهنگام بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی ناشی از *کاندیدا/توس* فیتوپلازما استرالیزیا، بهتر است از برگ های انتهایی و بالایی گیاه و یا از ریشه ها نمونه برداری برای استخراج DNA انجام شود و از آزمون PCR آشیانه ای استفاده نمود. نحوه گسترش، انتشار و غلظت فیتوپلازماهای مختلف در میزبان های گیاهی ممکن است براساس نوع فیتوپلازما و سویه های آن، شرایط میزبان از نظر سن، واکنش های اختصاصی آن علیه بیمارگر و شرایط محیطی، تفاوت هایی را نشان دهند. در پژوهش های آینده نحوه گسترش و پخش فیتوپلازماهایی از گروه های دیگر اران ای ریوزومی ۱۶ اس که با بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی همراه هستند می تواند انجام شود. علاوه بر این، می توان نحوه گسترش *کاندیدا/توس* فیتوپلازما استرالیزیا را در گیاهان گوجه فرنگی که در زمان های مختلف با زنجبرک ناقل آن آلوده می شوند مطالعه کرد. همچنین، بررسی توزیع و غلظت فیتوپلازماهای همراه با بیماری در بخش های مختلف گیاه مانند ریشه اصلی، دمگل، دم میوه، دم برگ و قسمت های مختلف ساقه گیاه آلوده در شدت های مختلف بیماری در بوته های آلوده در شرایط طبیعی مزرعه و در گلخانه می تواند حائز اهمیت باشد.

References

1. Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54: 221-255.
2. Del Serrone P, Marzachi C, Bragaloni M, Galeffi P. Phytoplasma infection of tomato in central Italy. *Phytopathol Mediterr.* 2011; 40(2): 137-142.
3. Santos-Cervantes ME, Chávez-Medina JA, Méndez-Lozano J, Leyva-López NE. Detection and molecular characterization of two little leaf phytoplasma strains associated with pepper and

- tomato diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. *Plant Dis J.* 2008; 92(7): 1007-1011.
4. Salehi M, Heydarnejad J, Izadpanah K. Molecular characterization and grouping of 35 phytoplasmas from central and southern provinces of Iran. *Iran J Plant Pathol.* 2005; 41(1): 62-64.
 5. Salehi M, Esmailzadeh Hosseini SA. The first report of a 16SrXII-A phytoplasma associated with tomato big bud disease in Iran. *J Plant Pathol.* 2016; 98(3): 692.
 6. Salehi E, Salehi M, Taghavi SM, Izadpanah K. A 16SrII-D Phytoplasma strain associated with tomato witches' broom in Bushehr province, Iran. *J Crop Prot.* 2014; 3(3): 377-388.
 7. Akbarpour K, Salehi E, Salehi M. 2012. First report of tomato big bud disease in Hormozgan province. *Proceeding of the 20th Iran Plant Protection Congress.* 4-7 September, Shiraz, Iran. 569.
 8. Vali Sichani F, Bahar M, Zirak L. Characterization of stolbur (16SrXII) group phytoplasmas associated with Cannabis sativa witches' broom disease in Iran. *Plant Pathol J.* 2011; 10(4): 161-167.
 9. Davoodi A, Panjekeh N, Moslemkhani K, Taheri AH. Detection and molecular characterization of tomato big bud disease in Qazvin province. *J Crop Prot.* 2019; 8(4): 379-388.
 10. Salehi E, Salehi M, Masoumi M. Biological and molecular characterization of the phytoplasma associated with tomato big bud disease in Zanzan province, Iran. *Iran J Plant Pathol.* 2016; 52 (3): 415-427.
 11. Jamshidi E, Jafarpour B, Roohani H, Salehi, M. 2011. Tomato big bud disease in Khorasan-e Razavi and Khorasan-e Shomali provinces. *Proceeding of the 19th Iranian Plant Protection Congress.* 31 July-3 August, Tehran, Iran.
 12. Rashidi M, Ghosta Y, Bahar M. 2006. Russain olive (*Elaeagnus angustifolia* L.), a new host for phytoplasma from Iran. *Proceeding of the 19th Iranian Plant Protection Congress.* 2-5 September, Karaj, Iran. 349.
 13. Jamshidi E, Jafarpour B, Roohani H, Salehi M. Association of members of clover proliferation (16S rVI) and pigeon pea witches' broom (16SrIX) phytoplasma groups with tomato big bud disease in Iran. *Iran J Plant Pathol.* 2014; 50 (2): 77-89.
 14. Dehghani A, Salehi M. Tomato big bud disease in Lorestan province. *Iran J Plant Pathol.* 2011; 47(4): 483.
 15. Wei W, Kakizawa S, Suzuki S, Jung HY, Nishigawa H, Miyata SI, Oshima K, Ugaki M, Hibi T, Namba S. In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized

- inoculation by insect transmission. *Phytopathol.* 2004; 94(3): 244-250.
16. Saracco P, Bosco D, Veratti F, Marzachi C. Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant *Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insect vector. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2006; 67 (3-5): 212-219.
 17. Marcone C. Movement of phytoplasmas and the development of disease in the plant. In: Weintraub PG, Jones P, editors. *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts and vectors.* CAB International, Wallingford; 2009: 114-131.
 18. Soltani A, Torabi B. Design and analysis of agricultural experiments with the SAS program. Mashhad University Press; 2014. [In Persian].
 19. Salehi E, Izadpanah K, Taghavi, SM, Hamzearghani H, Afsharifar A. Interaction of witches' broom disease of lime phytoplasma and lettuce phyllody phytoplasma in mixed infection of periwinkle plants. *Iran J Plant Pathol.* 2018; 54(2): 131-146.
 20. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990; 12(1): 13-15.
 21. Deng S, Hiruki C. Amplification of *16S rRNA* genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *J Microbiol Methods.* 1991; 14(1): 53-61.
 22. Schneider B, Seemüller E, Smart CD, Kirkpatrick BC. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG, editors. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology.* Academic Press, San Diego; 1995: 369-380.
 23. Gunderson DE, Lee IM. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer sets. *Phytopathol Mediterr.* 1996; 35(3): 144-151.
 24. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn & PAGE_TYPE= BlastSearch & LINK_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
 25. Salehi E, Izadpanah K, Taghavi, SM, Hamzearghani H, Afsharifar A. Interaction of witches' broom disease of lime phytoplasma and lettuce phyllody phytoplasma in mixed infection of periwinkle plants. *Iran J Plant Pathol.* 2018; 54(2): 131-146.
 26. Tatineni S, Sagaram US, Gowda S, Robertson CJ, Dawson WO, Iwanami T, Wang N. In planta distribution of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and Real-time PCR. *Phytopathology.* 2008; 98(5): 592-599.
 27. Liefting LW, Andersen MT, Beever RE, Gardner RC, Forster RL. Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of Phormium yellow leaf phytoplasma. *Appl Environ Microbiol.*

1996; 62(9): 3133-3139.

28. Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata SI, Ugaki M, Namba S. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat Genet.* 2004; 36(1): 27–29.
29. Schneider B, Seemüller E. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(6): 3409-3412.
30. De Schepper V, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K. Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *J Exp Bot.* 2013; 64 (16): 4839-4850.
31. Amiri Mazraie M, Izadpanah K, Hamzehzarghani H, Salehi M, Faghihi MM. Spread and colonization pattern of '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' in lime plants [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] as revealed by Real-time PCR assay. *J Plant Pathol.* 2019; 101 (3): 629-637.
32. Lee SH, Kim CE, Cha BJ. Migration and distribution of graft inoculated Jujube witches' broom phytoplasma within a *Cantharanthus roseus* plant. *Plant Pathology J.* 2012; 28(2): 191-196.
33. Sugio A, MacLean AM, Kingdom HN, Grieve VM, Manimekalai R, Hogenhout SA. Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annu Rev Phytopathol.* 2011; 49: 175-195.
34. Bové JM, Garnier M, Mjeni AM, Khayrallah A. 1988. Witches' broom disease of small-fruited acid lime trees in Oman: First MLO disease of citrus. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings.* 10(10): 307-309.
35. Kuske CR, Kirkpatrick BC. Distribution and multiplication of western aster yellows mycoplasma like organisms in *Catharanthus roseus* as determined by DNA hybridization analysis. *Phytopathology.* 1992; 82(4): 457-462.
36. Sadeghi A, Salehi M, Faghihi MM, Bagheri AN, Samavi S. 2010. Detection of witches' broom disease of lime phytoplasma in crown region by PCR during latent period of the disease. *Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress.* 31 July-3 August, Tehran, Iran. 526.



Determination of distribution pattern of *Candidatus Phytoplasma australasiae* in tomato plants as revealed by Real-time PCR

Nazanin Ebadi¹, Gilda Najafipour², **Mohammad Mehdi Faghihi³**, Kavous Ayazpour²

¹ Ph.D. student, Department of Plant Pathology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

² Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

³ Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Zarghan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Tomato big bud is a phytoplasma disease which has been recently distributed in different areas of Iran. This study aimed to determine the concentration and distribution pattern of '*Candidatus Phytoplasma australasiae*' within tomato plants for its rapid detection, especially during the incubation period of the disease.

Materials & Methods: Three tomato plants were graft-inoculated with '*Candidatus Phytoplasma australasiae*' in a factorial experiment in a completely randomized design. At the time intervals of 10, 20, 40, and 70 days post-inoculation, samples of apical leaves, leaves above and below the grafting site and lateral roots were taken from the inoculated plants. The concentration of the phytoplasma and its distribution pattern were evaluated using Real-time PCR. Also, the direct and nested-PCR assays were used and compared for the detection of '*Candidatus Phytoplasma australasiae*'.

Results: The current study found that after entering into the tomato plants, '*Candidatus Phytoplasma australasiae*' moved upward into the apical leaves as well as downward into the roots. The phytoplasma concentration in the apical leaves and roots was higher than the leaves of the middle and lower branches of the inoculated plants. The mean disease incubation period was estimated to be about 40 days. The nested-PCR was more sensitive than direct-PCR in detecting the phytoplasma.

Conclusion: For the detection of tomato big bud disease associated with '*Candidatus Phytoplasma australasiae*', especially during the incubation period of the disease, it is recommended to sample from apical leaves and roots as well as using nested-PCR.

Keywords: Apical leaves, Concentration, Phytoplasma, Root, Tomato.

Correspondence to: Mohammad Mehdi Faghihi

Tel: +98 5431232125

E-mail: mm.faghihi@yahoo.com

Journal of Microbial World 2020, 12(4): 377-392.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.