Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤٢، ١٣٨٥

بررسی وجود فیتوپلاسما در حشرات جمع‌آوری شده از باغ‌های لیموترش مبتلا به بیماری جاروک*

Detection of Phytoplasma in insects collected in witches´ broom affected lime groves

مجید صیام‌پور، کرامت‌اله ایزدپناه، علیرضا افشاریفر، محمد صالحی و محمد تقی‌زاده**

بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

دریافت ١٣٨٤/٣/٨ پذیرش ١٣٨٥/١/٣٠

چکیده

علیرغم خسارتهای شدید بیماری جاروک لیموترش و گسترش طبیعی آن در باغ‌های مناطق آلوده، هنوز ناقل آن شناسایی نشده است. هدف کلی این تحقیق، بررسی حشرات مکنده جمع‌آوری شده از باغهای لیموترش مبتلا به این بیماری به‌منظور شناسایی ناقلین احتمالی آن می‌باشد. به این منظور در فصول مختلف سال‌های ٨٢ و ٨٣، حشرات مکنده از باغ‌های آلوده استان‌های هرمزگان و کرمان به وسیله تور حشره‌گیری جمع‌آوری شدند. به منظور ردیابی و

** بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه شیراز. اعتبارات مربوط به این تحقیق از محل قطب علمی ویروس‌شناسی تامین شده است.

** مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی فیتوپلاسما در بدن حشرات جمع‌آوری شده از روش PCR دو مرحله‌ای و سپس آنالیز RFLP یا تعیین ترادف قطعه تکثیر شده استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که ژن آر. ان. ای ریبوزومی S ۱۶ فیتوپلاسمای همراه با جاروک لیموترش در بدن زنجرک‌های *Hishimonus phycitis*، *Recilia schmidtgeni* و *Idioscopus clypealis* و پسیل مرکبات (*Diaphorina citri*) قابل ردیابی است. زنجرک *H. phycitis* و پسیل *D.citri* تنها حشرات مکنده‌ای بودند که از درختان لیموترش مناطق آلوده جمع‌آوری شدند. بررسی‌های دقیق‌تر بعدی پایداری فیتوپلاسمای ردیابی شده را در بدن زنجرک *H. phycitis* و پسیل *D .citri* تأیید نمود. از قسمت سر، غدد بزاقی و بزاق آزاد شده زنجرک *H. phycitis* به یک محلول قندی قسمتی از ژن آر.ان.ای ریبوزومی S ۱۶ که با ژن مزبور در فیتوپلاسمای جاروک لیموترش شبیه بود ردیابی گردید.

واژه‌های کلیدی: فیتوپلاسما، ناقل، زنجرک، بزاق، لیموترش

مقدمه

بیماری جاروک لیموترش اولین بار در سال ۱۳۷۶ در مناطقی از استان سیستان و بلوچستان و سپس در لیموکاری‌های وسیع میناب و رودان در استان هرمزگان مشاهده شده است. آلودگی به این بیماری هم‌اکنون درختان لیموترش (*Citrus aurantifolia*) جیرفت و کهنوج در استان کرمان را نیز فرا گرفته و سایر مناطق لیموکاری را نیز به شدت تهدید می‌کند (Salehi *et al*. 1997, 2000, 2002). این بیماری قبل از ایران از دو کشور همسایه (عمان و امارات‌متحده‌عربی) گزارش شده بود (Garnier *et al*. 1991). تاکنون علاوه بر درختان لیموترش آلودگی طبیعی درختان لیموشیرین (*C. limetta, C. limettiodes*) در امارات و بکرایی (*C. reticulata*) در ایران با شدت کمتر گزارش شده است (Salehi *et al*. 2004, El Shereiqi & Gassouma 1997, Djavaheri & Rahimian, 2004).

گسترش سریع درخت به درخت بیماری جاروک لیموترش ظن قوی را در مورد وجود یک ناقل فعال حشره‌ای برای عامل این بیماری آن مطرح می‌سازد. کوشش‌های انجام گرفته تاکنون،

www.SID.ir

Archive of SID

مانند بسیاری از دیگر بیماری‌های فیتوپلاسمایی منجر به شناسایی ناقل عامل این بیماری نشده است. از مجموع بررسی‌های صورت گرفته، زنجرک *Hishimonus phycitis* به دلیل ردیابی عامل بیماری در بدن آن، به‌عنوان ناقل احتمالی بیماری گزارش شده است. وجود این زنجرک در مناطق آلوده ایران و نیز ردیابی فیتوپلاسما در بدن آن تأیید شده است (Bové *et al.* 1993, 2000). با این همه تلاش‌های انجام شده جهت انتقال فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک لیموترش، توسط این زنجرک تاکنون بی‌نتیجه بوده است (Bové *et al*. 1993, 2000, Salehi *et al*. 2000).

هدف این تحقیق نیز بررسی حشرات جمع‌آوری شده از باغهای لیموترش مناطق آلوده از نظر ارتباط آنها با فیتوپلاسمای جاروک لیموترش است.

روش بررسی

۱- جمع‌آوری و شناسایی حشرات

بدین منظور از باغ‌های آلودهٔ میناب و جیرفت بازدید به عمل آمد و به وسیله تور حشره‌گیری از روی درختان لیموترش و علف‌های کف باغ حشرات جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری در ۱۱ نوبت و درطی ماه‌های اسفند تا خرداد در سال‌های۸۲ و ۸۳. انجام شد. حشرات جمع‌آوری شده از درختان لیموترش آلوده پس از استقرار بر روی نهال‌های لیموترش سالم، به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ازبین حشرات جمع‌آوری شده زنجرک‌ها تفکیک و شناسایی شدند. از باغ‌های لیموترش سالم استان فارس نیز زنجرک *Hishimonus phycitis* عاری از فیتوپلاسما جمع‌آوری و پرورش داده شد.

۲- منبع بیماری در گلخانه

جهت بررسی‌های گلخانه‌ای، از یک نهال لیموترش پیوند شده با یک شاخه آلوده از یک درخت لیموترش مبتلا به بیماری جاروک در منطقه چابهار (سیستان و بلوچستان) به عنوان منبع آلودگی استفاده شد.

۳- استخراج دی.ان.ای کل از بدن حشرات و گیاه

www.SID.ir

Archive of SID

برای تعیین وجود یا فقدان دی.ان.ای فیتوپلاسمایی در حشرات جمع‌آوری شده، از آنها دی.ان.ای کل استخراج شد. جهت استخراج دی.ان.ای از حشرات و نیز از گیاهان از روش *تان* و همکاران (Tanne *et al*. 2001) استفاده شد. دی.ان.ای بدست آمده از بدن یک حشره و یا از ۰/۱ گرم رگبرگ در ۵۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی مولار تریس، ۱ میلی مولار EDTA با ۸ =pH) حل و از آن در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction) استفاده شد.

۴- تکثیر با واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز

از آغازگرهای عمومی P_1/P_7 (Schneider *et al*. 1995) در مرحله اول PCR واز آغازگرهای عمومی R16R2 R16F2n/ R16F2n/R16R2 (Lee *et al*. 1993) و fU5/rU3 (Lorenz *et al*. 1995) و آغازگر تقریبا" اختصاصی WB3 (Zreik *et al*. 1995) مبتنی بر ترادف ژن ار.ان.ای ریبوزومی ۱۶S فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و چند فیتوپلاسمای دیگر در مرحله دوم (NestedPCR) جهت تکثیر دی.ان.ای فیتوپلاسمایی مورد استفاده گردید. آزمون PCR در واکنشهای ۲۰ میکرولیتری شامل ۲/ ۰ میلی مولار dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2، ۰/۴ میکرومولار از هر آغازگر، ۲ میکرولیتر DNA template ، ۰/۶ واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (شرکت سیناژن) و ۲ میکرولیتر X PCR buffer 10 انجام شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز مرحله اول طی ۳۵ چرخه و با برنامه حرارتی یک دقیقه در دمای ºC ۹۴ (۲ دقیقه در چرخه اول)، ۲ دقیقه در دمای ۵۵ºC و ۳ دقیقه در دمای ۷۲ºC (۱۵ دقیقه در سیکل آخر) انجام شد. محصول این مرحله به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر استریل رقیق گردید و یک میکرولیتر از این رقت به عنوان دی.ان.ای قالب و با اجزاء واکنش و برنامه حرارتی یاد شده در مرحله دوم PCR به کار برده شد. مقدار ۵ تا ۱۰ میکرولیتر از محصول این واکنش‌ها در ژل آگارز یک درصد و در بافر TBX ×۱ الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم برماید (۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر آب) از آن عکس تهیه شد (Lee *et al*. 1994).

۵- شناسایی فیتوپلاسمای جاروک لیموترش

به منظور شناسایی فیتوپلاسمای جاروک لیموترش از آغازگر تقریباً اختصاصی WB3 ، آنالیزهای PCR-RFLP وتعیین ترادف قسمتی از ژن آر.ان.ای ریبوزومی ۱۶S استفاده شد. به منظور

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی دقیق فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در بدن زنجرک مظنون *H. phycitis* (Bove *et al*. 1993)، تعدادی زنجرک سالم از مناطق غیر آلوده در استان فارس جمع‌آوری گردید و پس از تکثیر بر روی نهال‌های سالم لیموترش، روی یک نهال لیموترش آلوده به بیماری جاروک رها شدند. سایر زنجرکهای جمع‌آوری شده از طبیعت نظیر زنجرک *H.phycitis* مورد بررسی قرار گرفتند.

در روش RFLP از آنزیم‌های *Hha*I,*Hinf*I ، *Hpa*II ، *Rsa*I و *Alu*I طبق دستورالعمل شرکت سازنده آنها (Rosch) استفاده شد (Lee *et al*., 1998). محصولات RFLP در ژل آگاروز ۲/۵ درصد و در مواردی در ژل پلی‌اکریل آمید ۵ درصد الکتروفورز شدند. با مقایسه الگوهای بدست آمده از این روش با الگوهای موجود در منابع یا با الگوهای بدست آمده از نمونه شاهد فیتوپلاسمای جاروک لیموترش، این فیتوپلاسما شناسایی شد.

از محصول مرحله دوم PCR (nested PCR) برای انجام همسانه‌سازی (cloning) و سپس تعیین ترادف استفاده شد. برای افزایش کارایی ،آخرین چرخهٔ PCR (نگهداری در ۷۲ درجه سانتیگراد) به مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافت. همسانه‌سازی با استفاده از InsT/AClone PCR Product Cloning Kit (Fermentas) صورت گرفت. قطعه مورد نظر وارد پلاسمید pTZ57R/T شد و به روش شوک حرارتی به باکتری *E.coli* انتقال داده شد. پس از کشت باکتری اقدام به استخراج پلاسمید نوترکیب شد. این پلاسمید جهت تعیین ترادف قطعه مورد نظر به شرکت ماکروژن (www.macrogen.com) ارسال شد.

۶- مطالعه بقاء فیتوپلاسما در بدن حشرات مظنون بعد از تغذیه از گیاه سالم

به این منظور زنجرکهای جمع‌آوری شده از باغهای کاملاً آلوده روی نهال‌های لیموترش و پروانش سالم انتقال داده شدند. سپس این زنجرکها در فواصل زمانی مختلف با آزمون nested PCR بررسی شدند.

در آزمون دیگری حشرات سالم *H.phycitis* در شرایط گلخانه روی نهال‌های لیموترش پرورش و تکثیر یافتند. زنجرک‌های بالغ تکثیر شده به مدت۳ روز روی نهال‌های آلودهٔ لیموترش واقع در

www.SID.ir

Archive of SID

زیر یک سرپوش قرار داده شدند. سپس همه این زنجرک‌ها به یک نهال سالم لیموترش منتقل شدند و طی روزهای مختلف به‌طور تصادفی از آن‌ها نمونه‌برداری گردید و جهت وجود فیتوپلاسما بررسی شدند.

۷- ردیابی فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش در قسمت سر و غدد بزاقی زنجرک *H. phycitis*

در این آزمون ابتدا اجازه داده شد تا زنجرک احتمالاً آلوده (زنجرک آلوده جمع‌آوری شده از درختان کاملا آلوده یا زنجرک تغذیه کرده از نهالهای آلوده شده در گلخانه) حدود ۱ ماه از نهال سالم لیموترش تغذیه کند. سپس از قسمت سر و غدد بزاقی (پس از جدا شدن از قسمت سر) تعدادی از این زنجرک‌ها دی. ان. ای کل استخراج گردید و در PCR دومرحله آی به کار برده شد.

۸- استفاده از روش تغذیهٔ مصنوعی برای ردیابی فیتوپلاسما در بزاق زنجرک‌ها

استفاده از تغذیه مصنوعی برای ردیابی فیتوپلاسما در بزاق در مورد بعضی از زنجرک‌های آلودهٔ باغ‌های لیموترش مطابق با روش *تان* و همکاران (Tanne *et al*. 2001) انجام شد. برای این کار ابتدا یک محلول ۵ درصد سوکروز در بافر TE تهیه شد. نیم تا یک سانتی‌متر از قسمت پایین میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری بریده شد. سپس حدود ۲۵۰ میکرولیتر از محلول قندی داخل گودی موجود در سرپوش لوله ریخته و روی آن یک لایه پارافیلم کشیده شد. پس از بستن سرپوش، حشرات آلودهٔ طبیعی یا آزمایشگاهی با حداقل دو روز تغذیه از گیاه سالم به طور انفرادی و به کمک آسپیراتور از قسمت انتهای باز لوله وارد آن شدند. سپس این قسمت انتهایی با مقداری پنبه مسدود شد. لوله‌ها بطور افقی به مدت ۳ تا ۷ روز در مقابل نور قرار داده شدند.

جهت استخراج دی.ان.ای، باقیمانده محلول تغذیه‌ای به یک لوله اپندورف ۰/۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. بعد از این مرحله رونشین بطور کامل حذف و به ته‌نشین مقدار ۱۰ میکرولیتر سود ۰/۵ نرمال و ۲۰ میکرولیتر بافر استخراج TSE (۱ مولار تریس ، ۲۰ میلی مولارEDTA، pH=۸ و یک درصد SDS) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. محتویات لوله به‌طور منظم بهم زده شد. سپس به این محلول حدود ۶۰ میکرولیتر (دو حجم) ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه

www.SID.ir

Archive of SID

سانتیگراد نگهداری شد. سپس دی.ان.ای موجود در محلول با سانتریفوژ کردن در ۱۲۰۰۰g رسوب داده شد. رسوب حاصل با اتانول ۷۰ درصد شسته و خشک شد. به این رسوب (که اغلب دیده نمی‌شد) ۳۰ میکرولیتر TE اضافه و از آن بعنوان دی.ان.ای قالب در آزمون nested PCR استفاده شد.

۹- بررسی انتقال طبیعی فیتوپلاسمای جاروک لیموترش:

حشرات جمع‌آوری شده از باغ‌های آلوده به بیماری جاروک در شرایط گلخانه مستقیماً روی نهال‌های سالم و بذری لیموترش رها شدند. همچنین تعداد زیادی زنجرک *H.Phycitis* جمع‌آوری شده از باغهای لیموترش با علایم جاروک بر روی دو نهال آلوده و سالم لیموترش واقع در زیر یک سرپوش مشترک رها شدند.تعدادی از زنجرکهای جمع‌آوری شده از این باغها نیز بر روی بوته‌های پروانش واقع در زیر یک سرپوش رها گردید.

نتیجه

۱- جمع‌آوری و شناسایی حشرات

اکثر زنجرک‌های جمع‌آوری شده از باغهای لیمو ترش از خانوادهٔ Cicadellidae بودند. از روی درختان لیموترش فقط زنجرک *H. phycitis* جمع‌آوری شد. در سال ۱۳۸۲ به جز این زنجرک هیچ گونه حشرهٔ مکنده دیگری از درختان لیموترش شهرستان میناب به دست نیامد. اما در اوایل سال ۱۳۸۳ هجوم شدید آفت پسیل مرکبات (*Diaphorina citri*) روی درختان لیموترش منطقه میناب مشاهده شد. زنجرک *H.phycitis* به‌جز از روی درختان لیموترش هیچ‌گاه از روی علف‌های کف باغ جمع‌آوری نشد. در صورتیکه پسیل مرکبات علاوه بر درختان لیمو از روی علف‌های کف باغ نیز جمع‌آوری شد. همچنین در باغ‌های جیرفت زنجرک *H. phycitis* فقط از روی درختان لیموترش جمع‌آوری گردید (جدول ۲).

به علاوه حشرات مکنده از روی علف‌های کف باغ‌های آلوده لیموترش (عمدتا از نوع گرامینه، به ویژه علف‌هرز مرغ) و نیز از روی درختان مجاور لیموترش‌های آلوده جمع‌آوری و شناسایی شدند. این حشرات غالباً از زنجرک‌های برگی (Cicadellidae) و معدودی از نوع بوته‌ای (Fulgoroidea) بودند. در مجموع حدود ۱۷ گونه از این زنجرک‌ها در زمان‌های مختلف سال و از

www.SID.ir

Archive of SID

باغ‌های مختلف به دست آمدند. فراوان‌ترین زنجرک‌های جمع‌آوری شده، گونه هایی از جنس *Stirellus* بودند. تعداد زیادی زنجرک از گونه *Idioscopus clypealis* نیز از درختان انبه مجاور لیموترش‌های آلوده جمع‌آوری شد. هیچ‌کدام از این زنجرک‌های مستقر روی علف‌های کف باغ از روی درخت‌های لیموترش به دست نیامدند. اسامی حشرات جمع‌آوری شده از باغ‌های لیموترش آلوده در جدول۱ آمده است.

۲- ردیابی فیتوپلاسما در بدن حشرات

جهت ردیابی فیتوپلاسما در بدن زنجرک‌ها از روش nested PCR و از آغازگرهای P1/P7 (در مرحله اول) و R16F2n/R2 یا fU5/rU3 (مرحله دوم) استفاده شد. در نتیجه از زنجرک‌های *Idioscopus clypealis* ، *Exitianus capicola* ،*Stirellus* sp. ،*Recilia schmidtgeni* ،*H. phycitis* وپسیل مرکبات (*D. citri*) دی.ان.ای فیتوپلاسمایی تکثیر گردید. (شکل۱و۳).

در مرحله دوم PCR با استفاده از آغازگرهای fU5/rU3 علاوه بر قطعه ۸۵۰ جفت بازی، باند دیگری به اندازه حدود ۳۵۰ جفت باز تکثیر شد(شکل ۷) که با استفاده از روش hot start PCR این باند اضافی حذف گردید. همچنین در مرحله دوم PCR با جفت آغازگر fU5/R16R2 باند اضافی تکثیر اما با جفت آغازگر R16F2n/rU3 چنین باندی مشاهده نشد.

۳- شناسایی فیتوپلاسماهای ردیابی شده در بدن حشرات

نتیجهٔ همسانه‌سازی قسمتی از ژن آر.ان.ای ریبوزومی ۱۶S (تکثیر شده با آغازگرهای R16F2n/R16R2) فیتوپلاسمای ردیابی شده در بدن دو زنجرک *H. phycitis* و *Stirellus* sp. ماهیت فیتوپلاسمایی آنها را مشخص کرد. پس از تعیین ترادف قسمتی از ژن مزبور و تطابق آن با ترادف‌های موجود در بانک ژن مشخص شد که فیتوپلاسمای ردیابی شده در بدن زنجرک *H. phycitis* بیشترین شباهت را با فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش (*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia) دارد در حالی که فیتوپلاسمای ردیابی شده در بدن زنجرک *Stirellus* sp. بیشترین شباهت را با فیتوپلاسماهای عامل برگ سفید مرغ داشت.

در این بررسی‌ها با استفاده از PCR دو مرحله ای و آغازگرهای عمومی ، از بدن زنجرک‌های

www.SID.ir

Archive of SID

R. schmidtgeni ، *I. clypealis* و *H. phycitis* و نیز پسیل مرکبات یک نوار DNA ۸۰۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۱). اما از زنجرک‌های *H. phycitis* جمع‌آوری شده از روی درختان سالم لیموترش و یا پرورش یافته در گلخانه چنین قطعه DNAای تکثیر نشد.

الگوهای RFLP حاصل از ترادف تکثیر شده با جفت آغازگرfU5/rU3 نشان داد فیتوپلاسمای ردیابی شده در بدن زنجرک‌های *R. schmidtgeni* و *I.clypealis* و پسیل مرکبات با الگوهای متناظر در نمونه شاهد مثبت (فیتوپلاسمای جاروک لیموترش) مشابه است.

۴- آزمون انتقال توسط حشرات

گونه‌هایی که فیتوپلاسما در بدن آن‌ها ردیابی شده بود جهت انتقال بررسی شدند. پس از دو سال هیچ‌کدام از آنها فیتوپلاسمایی را به نهال‌های سالم لیموترش، یا به بوته‌های پروانش یا بادنجان منتقل نکردند. از بین حشرات بررسی شده زنجرک *H. phycitis* و پسیل مرکبات (*D.citri*) به خوبی و به وفور روی نهال‌های لیموترش تکثیر شدند. سایر زنجرک‌ها حداکثر ۱۰ تا ۱۴ روز روی این نهال‌ها بدون ایجاد نسل پایدار بودند. زنجرک‌های *H. phycitis* پس از ۱۰ روز فعالیت بر روی بوته‌های پروانش به نهال‌های لیموترش منتقل شدند، اما پس از انتقال تلفات آنها زیاد شد.

۵- پایداری فیتوپلاسما در بدن زنجرک *H. phycitis* و پسیل مرکبات

در این مطالعه زنجرک‌های *H. phycitis* و پسیل مرکبات جمع‌آوری شده از درخت‌های آلوده بر روی گیاهان سالم منتقل و در فواصل مختلف با PCR دو مرحله‌ای بررسی شدند. در نتیجه DNA فیتوپلاسمایی شبیه فیتوپلاسمای جاروک لیموترش پس از گذشت ۴۰ و ۳۰ روز (آخرین بررسی) به ترتیب از بدن زنجرک *H. phycitis* و پسیل مرکبات تکثیر شد (شکل‌های ۲ و ۴ و جدول ۳). در بررسی‌های دیگر زنجرک های سالم *H. phycitis* پس از سه روز تغذیه از یک نهال آلوده لیموترش و انتقال بر روی نهال‌های سالم این گیاه DNA فیتوپلاسمای جاروک لیموترش تا ۶ هفته (آخرین بررسی) در بدن این زنجرک‌ها ردیابی شد.

۶- ردیابی فیتوپلاسما در سر و غدد بزاقی زنجرک *H. phycitis*

این آزمون برای تعیین قدرت تکثیر و گردش عمومی فیتوپلاسما در بدن زنجرک*H. phycitis* انجام

www.SID.ir

Archive of SID

گرفت. نتایج این بررسی با آزمون nested PCR و با آغازگرهای P1/P7 در مرحله اول PCR و

جدول ۱- تعداد حشرات جمع‌آوری شده از باغ‌های مرکبات استان‌های هرمزگان و کرمان و ردیابی فیتوپلاسما در بدن آنها با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 1. Insects collected in witches′ broom affected lime groves in Hormozgan and Kerman provinces and detection of phytoplasma in the insect bodies by nested PCR

نام گونه حشره Insect species	تیره یا بالا تیره Family or Superfamily	نتایج Nested PCR با آغازگرهای عمومی(تعداد آزمایش شده/تعداد مثبت) Nested PCR using general primers (positive/total tested)	نتایج Nested PCR با آغازگرتقریبا اختصاصی WB3/rU3 Results of nested PCR using specific primer WB3/Ru3
Hishimonus phycitis	Cicadellidae	32/35	[a]+
Stirellus bicolor	Cicadellidae	5/12	–
Stirellus sp.	Cicadellidae	0/7	*
Recilia schmidtgeni	Cicadellidae	12/30	+
Aconurella prolixa	Cicadellidae	0/17	*
Psammotettix sp.	Cicadellidae	0/5	*
Exitianus capicola	Cicadellidae	4/12	-
Empoasca sp.	Cicadellidae	0/10	*
Kybosca bipunctata	Cicadellidae	0/10	*
Austroasca lybeca	Cicadellidae	0/5	*
Balclutha incisa	Cicadellidae	0/4	*
Cicadulina bipunctata	Cicadellidae	0/20	*
Paralimenellus cingulatus	Cicadellidae	0/30	*
Paramesodes lineaticollis	Cicadellidae	0/4	*
Tropiducephala prasina	Cicadellidae	0/2	*
Idioscopus clypealis	Cicadellidae	12/32	+
Toya sp.	Fulgoroidea	0/12	*
Diaphorina citri	Psylloidea	25/40	+

[a]+: نتیجه ردیابی مثبت (positive results)

– : نتیجه ردیابی منفی (negative results)

*: آزمایش انجام نشد (not determined)

www.SID.ir

Archive of SID

WB3/rU3 در مرحله دوم PCR وجود نوار حدود ۸۰۰ جفت بازی مورد نظر را در سرو غدد بزاقی زنجرک‌های *H. phycitis* آلوده که بیش از یک ماه روی گیاه سالم مستقر شده بودند تأیید کرد (شکل ٦ و جدول ۲). آنالیزهای RFLP نشان داد کـه الگوهـای حاصـل از فیتوپلاسـمای ردیـابی شـده بـا الگوهای شاهد مثبت (جاروک لیموترش) مشابه است.

۷- ردیابی عامل بیماری جاروک لیموترش در بزاق زنجرک *H. phycitis*

در آخرین بررسی انجام شده روی این زنجرک سعی در ردیابی فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در بزاق جمع‌آوری شده از این حشره از محیط تغذیه مصنوعی شد. در نتیجه با جفت آغازگر P1/P7 (درمرحله اول PCR) و fU5/rU3 یا WB3/rU3 (در مرحله دوم PCR) در یازده نمونه قطعه DNAای در حدود ۸۵۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۷ و جدول ۲). در این آزمون‌ها نمونه‌هایی که در آنها به جای دی.ان.ای قالب از آب استفاده شده بود هیچ باندی تشکیل ندادند. شباهت قطعه تکثیر شده با قطعه مشابه در فیتوپلاسمای جاروک لیموترش با آنالیز RFLP تایید شد (شکل ۸).

بحث

۱- گسترش بیماری جاروک لیموترش و ناقل آن

گسترش درخت به درخت و ناحیه‌ای بیماری جاروک لیموترش که به سرعت منجر به توسعه آن در درختان لیموترش یک باغ می‌شود احتمال وجود یک ناقل فعال با عادت تغذیه از درختان لیموترش را تقویت می‌کند. البته در این رابطه نباید احتمال انتقال از طریق پیوند طبیعی ریشه‌های درختان مجاور را علاوه بر وجود ناقل از نظر دور داشت (He *et al*. 2000). شواهد حاکی از آن است که بیماری در سراسر مناطق آلوده به صورت ناحیه‌ای گسترش یافته است. Bové و همکاران (۱۹۹۳) زنجرک‌های گونه *H. phycitis* را از درختان لیموترش آلوده جمع‌آوری کرده و در بدن آنها فیتوپلاسما ردیابی نموده‌اند. با این وجود آنها با این زنجرک عملاً قادر به انتقال فیتوپلاسما نبودند. در بررسی‌های انجام شده در این تحقیق گونه *H. phycitis* تنها زنجرکی بود که با تور حشره‌گیری از درختان آلوده لیموترش جمع‌آوری شد. جمع‌آوری این زنجرک از جاروک‌های درخت لیموترش

www.SID.ir

Archive of SID

با تور با مشکلاتی همراه بود که نشانگر کندی نسبی جهش این حشره است. حرکت کند و درخت به درخت بیماری با رفتار حرکتی این زنجرک تطبیق می‌کند. عدم موفقیت در یافتن میزبان دوم در بین گیاهان علفی که در این تحقیق و بررسی‌های دیگر صورت پذیرفت (اطلاعات منتشر نشده) نیز در این رابطه نکته حایز اهمیتی است. این در حالی است که بسیاری از گیاهان تیره بادمجانیان موجود در باغهای لیموترش آلوده، به عنوان میزبان گلخانه‌ای عامل بیماری شناسایی شده‌اند (Salehi *et al.* 2000). با توجه به اینکه زنجرک *H.phycitis* از روی علف‌های کف باغ جمع‌آوری نشد امکان ناقل بودن آن را افزایش می‌دهد.

جدول ۲- ردیابی فیتوپلاسما در بدن زنجرک‌های *Hishimonus phycitis* جمع‌آوری شده از باغهای آلوده لیموترش و زنجرک‌های سالم این گونه تغذیه کرده از نهال لیموترش آلوده در گلخانه و انتقال یافته به نهال‌های سالم لیموترش با استفاده از روش nested PCR و جفت آغازگرهای P1/P7 و WB3/rU3

Table 2. Nested PCR detection of phytoplasma in parts of *Hishimonus phycitis* body collected on infected lime trees and also healthy *H.phycitis* feeding on greenhouse infected lime followed by their transmision on healthy lime seedlings using primer pairs P1/P7 in the first stage and WB3/fU5 in nested PCR

محل جمع‌اوری location	حشره کامل Intact insect	قسمت سر head	غدد بزاقی salivary glands	بزاق Saliva
گلخانه (نهال لیموترش آلوده) Greenhouse (Infected lime)	5/5*	5/5	5/5	4/5
جیرفت(Jiroft)	4/4	4/4	4/4	4/4
میناب(Minab)	4/4	4/4	3/4	3/4

* تعداد نمونه مثبت از تعداد کل نمونه آزمایش شده با nested PCR (positive samples/ total tested)

جدول ۳- ردیابی فیتوپلاسما در بدن زنجرک *Hishimonus phycitis* وپسیل *Diaphorina citri*

www.SID.ir

Archive of SID

جمع‌آوری شده از باغ‌های لیموترش آلوده و تغذیه نموده از نهـال سـالم لیمـوتـرش در روزهای مختلف به روش nested PCR با جفت آغازگرهای P1/P7 و WB3/rU3

Table 3. Nested PCR detection of phytoplasma by primer pairs P1/P7 and WB3/rU3 in *Hishimonus phycitis* and *Diaphorina citri* collected in witches′ broom affected lime groves after feeding on healthy lime seedligns

D. citri	*H. Phycitis*	تعداد روزهای تغذیه از گیاه سالم days of feeding on healthy plants
12/18	*32/35	0
**–	3/3	5
4/6	4/5	10
–	5/5	15
4/7	4/4	20
–	4/4	25
6/12	5/5	35
–	2/2	40

* تعدادنمونه دارای فیتوپلاسما از تعداد کل نمونه آزمایش شده (positive/total tested)

** آزمایش نشده (not determined)

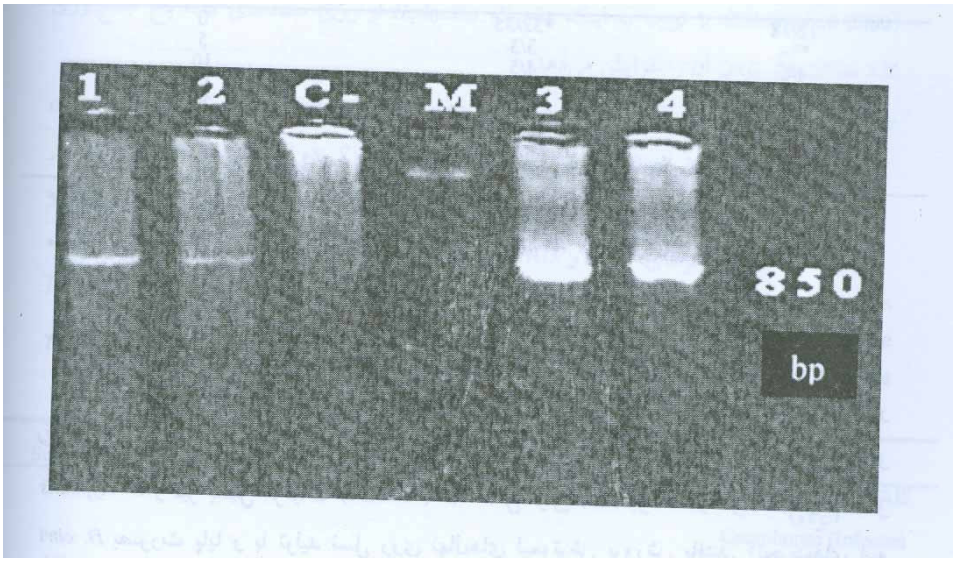
۲- ردیابی فیتوپلاسما در بدن حشرات

قسمتی از ژن آر.ان.ای ریبوزومی ۱۶s مشابه با همین ژن در فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در سه گونه زنجرک و یک گونه پسیل ردیابی شد. از بین زنجرک‌های *H. phycitis*، *R. schmidtgeni* و *I. clypealis* و نیز پسیل مرکبات (*D. citri*) که حامل فیتوپلاسما بودند دو گونهٔ *H. phycitis* و *D. citri* بصورت پایا و با تولید نسل روی نهال‌های لیموترش پرورش یافتند. زنجرک‌های انبه (*I. clypealis*) جمع‌آوری شده از درختی نزدیک به درخت لیموترش آلوده بودند و به احتمال زیاد به علت تغذیه‌های موقتی از درخت آلوده مجاور، فیتوپلاسما را کسب کرده‌اند. زنجرک *R. shmidtgeni* نیز که از علف‌های کف باغ جمع‌آوری شده به فیتوپلاسما آلوده بود و مشخص نیست که آلودگی را از درخت آلوده و یا میزبانی دیگر دریافت کرده باشد. اما با توجه به ضعیف بودن نوار DNA حاصل از این زنجرک، فیتوپلاسمای عامل بیماری احتمالا با یک تغذیهٔ غیراختصاصی و موقتی از درختان آلودهٔ باغ وارد بدن این حشره شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Bové و همکاران (۱۹۹۳) با بررسی حدود ۲۳ گونهٔ مختلف زنجرک دریافتند که *H. phycitis* تنها زنجرک حامل عامل بیماری است. در این بررسی بعلاوه، فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در بدن چند حشره دیگر ردیابی شد. با این وجود، هرچند ردیابی فیتوپلاسما در بدن یک زنجرک گامی در جهت شناسایی ناقل است ولی جهت اثبات ناقل بودن آن به بررسی‌های بیشتری نیاز است (Hanboonsong *et al*. 2002).

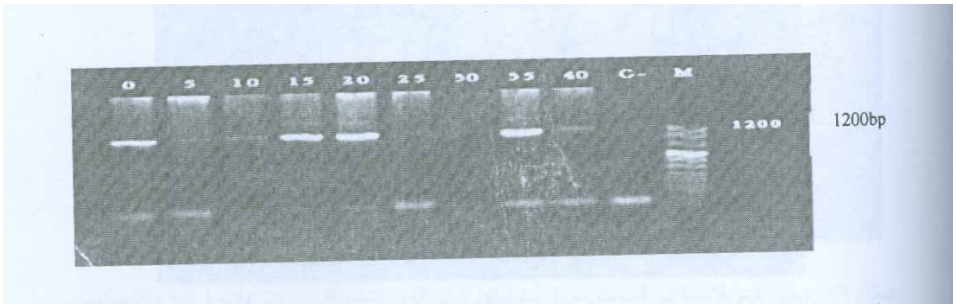


شکل ۱- ردیابی فیتوپلاسما در زنجرکهای *Recilia schmidtgeni*(ستون ۱)، *Idioscopus clypealis*(ستون ۲)، *Hishimonus phycitis* (ستون ۳) و پسیل *Diaphorina citri* (ستون ٤). M: مارکر و C^-:زنجرک سالم *H.phycitis* با استفاده از PCR دو مرحله‌ای و جفت آغازگرهای P1/P7 و WB3/rU3.

Fig. 1. Nested PCR detection of phytoplasma in bodies of the leafhoppers, *Recilia schmidtgeni*(1), *Idioscopus clypealis*(2), *Hishimonus phycitis*(3) and the citrus psylla, *Diaphorina citri* (4) by primer pairs P1/P7 and WB3/rU3. C^-= healthy *H. phycitis*, M= Marker.

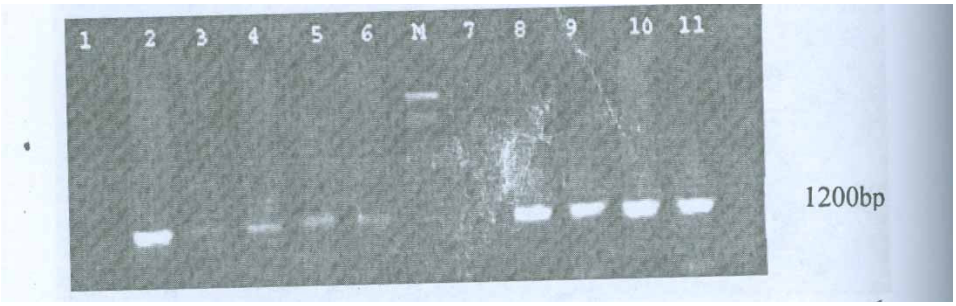
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- ردیابی فیتوپلاسما در بدن زنجرکهای *Hishimonus phycitis* جمع‌آوری شده از لیموترش باغهای آلوده بعد از انتقال به نهال‌های سالم لیموترش با استفاده از PCR دو مرحله‌ای و جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/ R16R2 . اعداد، تعداد روزهای تغذیه زنجرکها از گیاهان سالم را نشان می‌دهد. هر واکنش مربوط به یک زنجرک است. M= مارکر. C⁻: زنجرک سالم *H.phycitis*.

Fig 2. Nested PCR detection of phytoplasma in the *Hishimonus phycitis* body collected in witches′ broom affected lime groves after feeding on healthy lime seedlings. Numbers refer to days of feedings on healthy seedlings. C⁻= healthy *H. phycitis*, M= Marker.

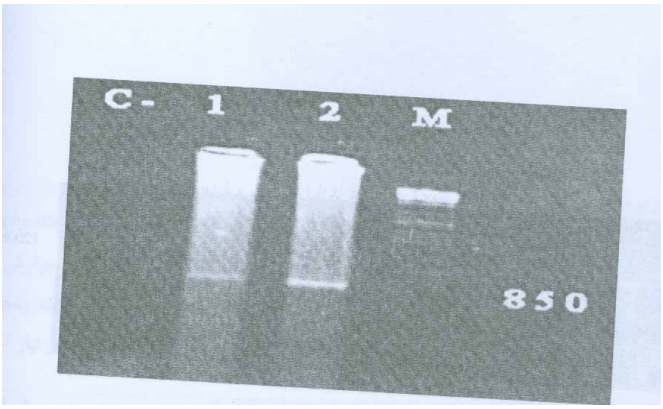


شکل۳- ردیابی فیتوپلاسما در بدن زنجرکهای *Hishimonus Phycitis* (۸ تا ۱۱)، *Stirellus* sp. (۲ تا ۴) و *Exitianus capicola* (۴ و ۵) جمع‌آوری شده از باغهای لیموترش مبتلا به بیماری جاروک با استفاده از PCR دو مرحله‌ای و جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/ R16R2. ۱و ۷: زنجرک سالم *H. phycitis* M: مارکر.

Fig. 3. Nested PCR detection of phytoplasma by primer pairs P1/P7 and R16F2/R2 in *Hishimonus phycitis* (8-11) , *Stirellus* sp. (2-4) and *Exitianus capicola* (4 and 5) collected in witches′ broom affected lime groves. 1anes 1 and 7= healthy *H. phycitis*, M= Marker.

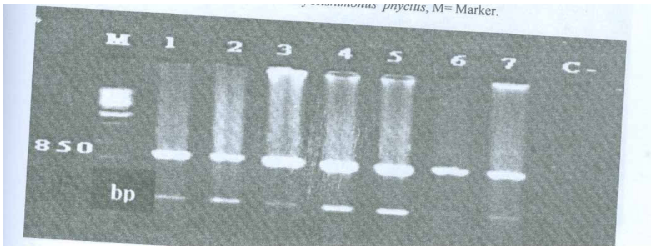
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- ردیابی فیتوپلاسما در بدن پسیل مرکبات جمع‌آوری شده از درختان لیموترش آلوده بعد از یک ماه تغذیه از گیاه سالم با استفاده از PCR دو مرحله‌ای وجفت آغازگرهای P1/P7 و WB3/rU3. -C= زنجرک سالم *Hishimonus phycitis*، ١ و ٢= پسیل، M= مارکر.

Fig. 4. Nested PCR detection of phytoplasma by primer pairs P1/P7 and WB3/rU3 in citrus psylla (*Diaphorina citri*) collected on witches′ broom affected lime trees after one month feeding on healthy lime seedlings (Lanes 1 and 2). C⁻= healthy *Hishimonus phycitis*, M= Marker.

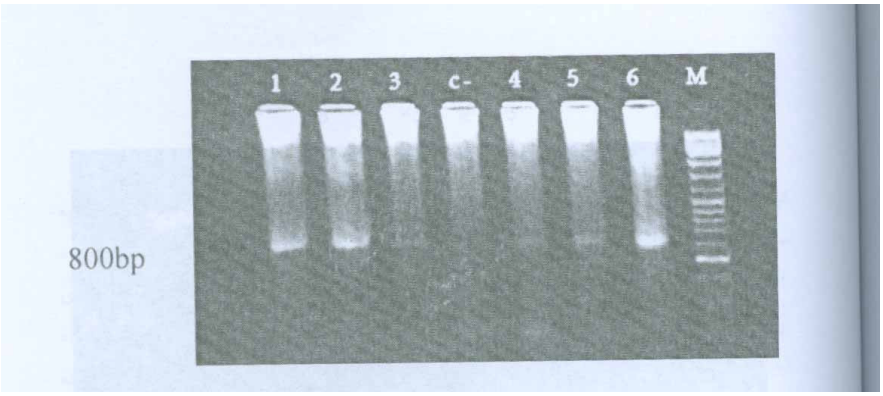


شکل ٥- ردیابی فیتوپلاسما در بدن زنجرکهای سالم *Hishimonus phycitis* بعد از ٣ روز تغذیه از گیاه آلوده و متعاقبا انتقال به گیاه سالم تا ٤٠ روز بعد با استفاده از PCR دو مرحله‌ای وجفت آغازگرهای P1/P7 و fU5/rU3 . حشرات در فواصل منظم ٦ روزه بررسی شده اند: M: مارکر، C⁻: زنجرک سالم *Hishimonus phycitis*.

Fig. 5. Nested PCR detection of lime witches′ broom phytoplasma in healthy *Hishimonus phycitis* after 3 days of feeding on witches′ broom affected lime followed by their transfer to healthy lime seedligns. Leafhoppers were tested by primer pairs P1/P7 and fU5/rU3 at 6 day intervals from day 0 (Lane1) to day 40 (Lane 7), C⁻= healthy *H. phycitis*, M=Marker.

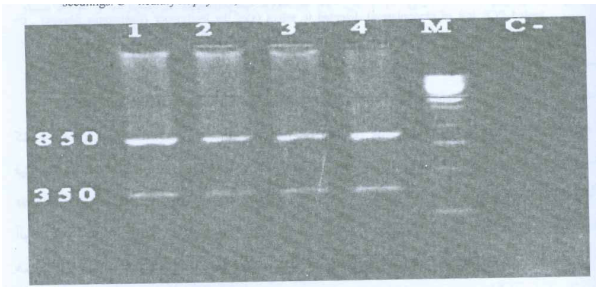
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦- ردیابی فیتوپلاسما در قسمت سر (ستونهای ١ تا ٣) و غدد بزاقی (ستونهای ٤ تـا ٦) زنجرکهـای آلوده *Hishimonus phycitis* بعد از تغذیه طولانی از نهـال سـالم لیمـوترش بـا اسـتفاده از PCR دو مرحله‌ای و جفت آغازگرهای P1/P7 و WB3/rU3. M= مارکر، C^-= زنجرک سالم *H. phycitis*.

Fig. 6. Nested PCR detection of phytoplasma by primer pairs P1/P7 and WB3/rU3 in the head (Lanes 1-3) and salivary glands (Lanes 4-6) of infected *Hishimonus phycitis* after prolonged feeding on healthy lime seedlings. C^-= healthy *H. phycitis*, M= Marker.

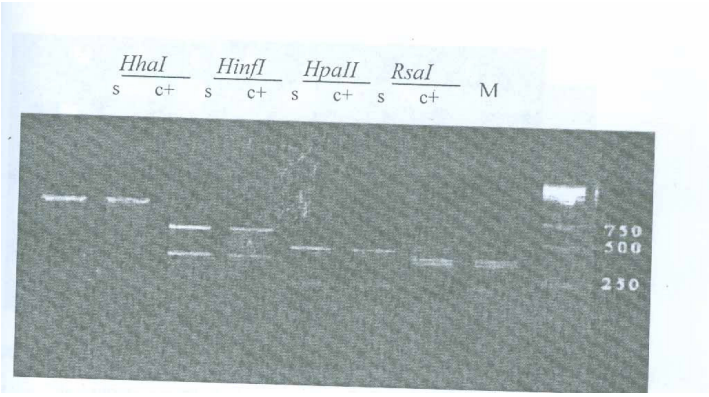


شکل٧- ردیابی فیتوپلاسما از بزاق زنجرک *Hishimonus phycitis* با اسـتفاده از PCR دو مرحلـه‌ای و جفـت آغازگرهای P1/P7 و fU5/rU3 و تکثیر باندهای مورد نظر اصلی (٨٥٠ جفت بازی) و اضافی (٣٥٠ جفت بازی) (ستونهای ٤-١)، M= مارکر، C^-= زنجرک سالم *Hishimonus phycitis*.

Fig. 7. Nested PCR detection of phytoplasma by primer pairs P1/P7 and fU5/rU3 in the saliva of the leafhopper *H.phycitis* collected on witches′ broom affected lime after feeding on healthy lime seedlings (Lanes1-4). A 350 bp band is formed in addition to the expected 850 bp band. M= Marker, C^- = healthy *H. phycitis*.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۸- نمونه‌ای از الگوهای RFLPبدست آمده از یک ترادف ۸۵۰ جفت بازی از فیتوپلاسمای ردیابی شده در بزاق زنجرک *Hishimonus phycitis* (s) ومقایسه آن با نمونه مثبت جاروک لیموترش (c+). M: مارکر .

Fig. 8. Example of RFLP analysis of 850 bp PCR product (produced by primer pairs P1/P7 and fU5/rU3 in nested PCR test of phytoplasma) detected in saliva (s)of the leafhopper *Hishimonus phycitis* , c+ positive control, M= Marker.

زنجرک‌های *Aconurella prolixa*، *Cicadulina bipunctata*، *Empoasca* sp. و *H. phycitis* در کشور عمان بررسی شده‌اند (Bové *et al*. 1993). اما زنجرک *H. phycitis* تنها حشره مشترک حامل فیتوپلاسما در بررسی حاضر و مطالعات عمان است. نتایج بررسی پایداری عامل بیماری در بدن *H. phycitis* نشان داد که زنجرک‌های سالم این گونه پس از فعالیت ۲ تا ۳ روزه بر روی برگ‌های آلوده لیموترش و گیرش فیتوپلاسما قادرند تا ۸ هفته فیتوپلاسما را در بدن خود حفظ نمایند. همچنین زنجرک‌های آلودهٔ طبیعی این گونه نیز تا مدت‌های زیادی پس ازاستقرار بر روی نهال‌های سالم لیموترش به وسیلهٔ آزمون‌های nested PCR، حامل عامل بیماری تشخیص داده شدند. لذا این پایداری طولانی مدت موضوع ناقل بودن این زنجرک را تقویت می‌نماید.

نظر به اینکه فیتوپلاسمایی در ناحیه سر این زنجرک ردیابی شد می‌توان گفت زنجرک *H. phycitis* توانسته عامل بیماری را از میزبان گیاهی کسب نماید و احتمالاً پس از تکثیر سلول‌های

www.SID.ir

Archive of SID

فیتوپلاسمایی در بدن آنها را به غدد بزاقی برساند. تنها بعد از ورود سلول‌های فیتوپلاسمایی به سلول‌های ویژه در غدد بزاقی و تکثیر نهایی در این قسمت است که این عوامل می‌توانند وارد کانال بزاقی شده و به همراه بزاق وارد آوند آبکشی میزبان گیاهی شوند (Webb *et al*. 1999). برای بررسی این موضوع از روش تغذیه زنجرک از یک محلول قندی از طریق غشاء پارافیلم استفاده شد. انجام چنین آزمایشی در مورد زنجرک *H. phycitis* با آلودگی طبیعی نشان داد که این زنجرک قادر است عامل بیماری را همراه بزاق خود به محلول قندی وارد کند. این نتایج نشان داد که سلول‌های فیتوپلاسمایی توانسته‌اند وارد سلول‌های اختصاصی غدد بزاقی شوند و پس از ورود به کانال بزاقی به بیرون از بدن راه یابند.

با این وجود تأیید نهایی توانایی انتقال فیتوپلاسما توسط یک حشره منوط به استفاده از روش‌های بیولوژیک است. ولی انجام این مهم در مورد فیتوپلاسماها در بسیاری از موارد بسیار سخت و طاقت‌فرسا است (Tanne *et al*. 2001) . در بررسی‌های انجام شده با وجود تلاش یک ساله، به انتقال بیولوژیک فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک لیموترش با زنجرک *H. phycitis* و سایر زنجرک‌ها (*R. schmidtgeni*، *I. clypealis*) میسر نشد. البته عدم موفقیت در انجام این بخش از تحقیق به منزلهٔ عدم توانایی زنجرک در انتقال عامل بیماری نیست. در موارد متعددی گزارش شده است که با وجود بررسی‌های بیولوژیک طولانی مدت بر روی یک زنجرک ناقل، علایمی روی گیاهان گلخانه‌ای مورد آزمایش مشاهده نشده است (Tsai & Thomas 1981). در مورد زنجرک *H. phycitis* و نهال‌های گلخانه‌ای نیز ممکن است چنین حالتی وجود داشته باشد.

عدم بروز علایم بر روی گیاهان مورد مطالعه شاید بدلیل تکثیر کند فیتوپلاسما در آنها است وممکن است با گذشت زمان طولانی‌تر، گیاهان علایم را نشان دهند. از دلایل دیگر نیز می‌توان به فیزیولوژی متفاوت نهال‌ها با درختان مسن در ارتباط با تغذیه زنجرک اشاره کرد. البته ذکر این نکته لازم است که نهال‌های لیموترش در گلخانه حدود یک سال پس از پیوند با پیوندک آلوده، علایم بیماری را نشان داده‌اند (Salehi *et al*. 1997). البته ممکن است شرایط انتقال طبیعی حشره‌ای با این گونه انتقال گلخانه‌ای کاملاً متفاوت باشد. در بررسی‌ها نشان داده شده است که کارآیی انتقال یک

www.SID.ir

Archive of SID

فیتوپلاسما توسط یک حشره به دو گیاه حساس کاملاً متفاوت بوده است (Purcell 1982).

پسیل مرکبات نیز قادر به گیرش فیتوپلاسمای جاروک بوده و تا یک ماه آن را در بدن خود نگه داشته است. اما این حشره در نمونه‌برداری‌های قبلی از مناطق آلوده جمع آوری نشده است و در زمینه توانایی‌های این حشره در انتقال فیتوپلاسمای جاروک لیموترش بررسی‌های بیشتر مورد نیاز است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (39-35) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: مجید صیام‌پور، دکتر کرامت‌اله ایزدپناه و دکتر علیرضا افشاریفر، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز و دکتر محمد صالحی و مهندس محمد تقی‌زاده، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس-زرقان

www.SID.ir