واکنش ارقام هسته‌دارها به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام*

REACTION OF STONE FRUIT CULTIVARS TO ALMOND WITCHES' BROOM PHYTOPLASMA

محمد عباسیان[1] و محمد صالحی[**2]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۴/۱۶)

چکیده

جاروک یکی از بیماری‌های مهم بادام در ایران و لبنان است. عامل این بیماری *Candidatus* Phytoplasma phoenicium و متعلق به گروه جاروک نخود کبوتر (16SrIX) می‌باشد. جهت مطالعه واکنش هسته‌دارها نسبت به این فیتوپلاسما، نهال‌های دو ساله ارقام درختان میوه هسته‌دار با روش پیوند جانبی با این فیتوپلاسما مایه‌زنی شدند. دو سال بعد از مایه‌زنی، در آلبالو (رقم شاتن مورل)، آلو (ارقام سانتاروزا و شایرو)، زردآلو (ارقام آصفی و تلخ)، شلیل رقم قرمز، گوجه سبز (ارقام سعدی و برغان) و هلو (ارقام زعفرانی، البرتا و شفتالو) در مقایسه با شاهد، علایمی شامل زردی، ریز برگی، لوله‌ای شدن برگ‌ها، کاهش فاصله میانگره‌ها، کوتولگی و جاروک ظاهر شد. دوره نهفتگی عامل بیماری در گیاهان مایه‌زنی شده از پنج تا نه ماه متغیر بود. میزان رشد پیوندک آلوده در گیاهان مایه‌زنی شده با شدت علائم ناشی از انتقال عامل جاروک بادام رابطه مستقیم ولی با مدت دوره نهفتگی بیماری در گیاه رابطه معکوس داشت. دی. ان. ای کل استخراج شده از رگبرگ میانی گیاهان مایه‌زنی شده و گیاهان سالم شاهد به وسیله آزمون PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 و PCR دومرحله‌ای با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2 از نظر آلودگی به فیتوپلاسما ارزیابی گردیدند و واکنش همه هسته‌دارهای مایه‌زنی شده علائم‌دار در این آزمون‌ها مثبت بود. در آزمونPCR دو مرحله‌ای علاوه بر ارقام علائم دار، واکنش نمونه‌های گیلاس مشکی مشهد و گوجه سبز هلندی که تا دو سال بعد از مایه‌زنی فاقد علائم بودند، نیز مثبت بود و در آنها قطعه ۱۲۰۰ جفت بازی تکثیر شد. تا دو سال بعد از مایه‌زنی در آلبالو رقم چمپای مشهد، زردآلو ارقام شکرپاره، تخم مرغی، نوری و گیلاس رقم صورتی لواسانات هیچ‌گونه علایمی ظاهر نشد و واکنش آنها در مقابل آزمون PCR منفی بود. پیشتر حساسیت هلو و شلیل به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام گزارش شده بود ولی آلودگی شفتالو، آلو، گوجه سبز، زردآلو، گیلاس و آلبالو به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام برای اولین بار گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فیتوپلاسما، جاروک بادام، هسته‌دارها، واکنش ارقام

---

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: salehi_abarkoohi@yahoo.com

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۲. استاد یار پژوهشی بیماری شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس(زرقان)

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

براساس علائم بیماری، انتقال با پیوند و درمان موقت با آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسیکلین، جاروک بادام (*Prunus amygdalus* Batsch) به عنوان یک بیماری فیتوپلاسمایی و مهم برای اولین بار در سال ۱۳۷۴ از مناطق خفر و میمند در استان فارس (Salehi & Izadpanah 1995) سپس طی سال‌های ۱۳۸۴-۱۳۸۰ از استان‌های چهارمحال و بختیاری (شهرکرد)، اصفهان (شهرضا) و کرمان (بافت) گزارش شد (Salehi *et al.* 2006). در سال ۲۰۰۱ بیماری مشابهی در درختان بادام از منطقه بکا در کشور لبنان گزارش گردید (Choueiri *et al.* 2001, Abou-Jawdah *et al.* 2002).

بر اساس آنالیز چند شکلی طول قطعات برشی (RFLP) و تعیین ترادف ژن 16S rRNA فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک بادام در لبنان و ایران متعلق به گروه جاروک نخود کبوتر (Pigeon pea witches' broom) یا گروه ار.ان.ای ریبوزومی 16SrIX زیر گروه 16SrIX-A می‌باشد (Abou-Jawdah *et al.* 2002, Verdin *et al.* 2003). همین آنالیزها نشان داد که فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام در لبنان با سایر اعضای گروه نخود کبوتر، سایر فیتوپلاسماهای عامل بیماری در هسته‌دارها و دیگر درختان میوه متفاوت می‌باشد و تنها با فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام در ایران شباهت بسیار زیادی دارد. به دلیل این خصوصیات ویژه نام *Candidatus* Phytoplasma phoenicium برای این فیتوپلاسما برگزیده شد (Verdin *et al.* 2003).

مطالعه ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی نشان داد که فیتوپلاسماهای عامل بیماری جاروک بادام در مناطق نیریز و خفر (استان فارس) یکسان نیستند و فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام در نیریز نسبت به جدایه خفر شباهت بیشتری به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام در لبنان دارد (Salehi *et al.* 2006). جاروک بادام وحشی (*P. scopari* K. Schneid .C (Spach) نیز در مناطق میمند، کوار، فیروزآباد (استان فارس) و سرچهان (استان یزد) مشاهده گردید. آنالیزهای مولکولی فاصله بین ژن‌های 16S rRNA و 23S rRNA (Spacer region, SR) نشا ن داد که فیتوپلاسمای جاروک بادام وحشی کوار متعلق به گروه جاروک نخود کبوتر است و در بین اعضای این گروه رابطه بسیار نزدیکی با فیتوپلاسماهای همراه با جاروک بادام لبنان (*Ca.* Phytoplasma phoenicium) و جاروک بادام نیریز در ایران دارد (Salehi *et al.* 2006). در ایران در مناطق بادام خیز و آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام گونه‌های مختلف درختان میوه هسته‌دار نیز کشت می‌شوند که ارزیابی آنها از نظر حساسیت و مقاومت به این فیتوپلاسما ضروری است و تحقیق حاضر در همین راستا انجام شد.

روش بررسی

جهت مطالعه واکنش هسته‌دارها به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام، نهال‌های دو ساله درختان میوه هسته‌دار شامل آلبالو (*Prunus cerasus* L.) ارقام چمپای مشهد و شاتن مورل، آلو (*P. salicina* L.) ارقام سانتاروزا و شایرو، زردآلو (*P. armeniaca* L.) ارقام آصفی، تخم مرغی، شکرپاره، تلخ و نوری، گوجه سبز (*P. domestica* L.) ارقام سعدی ارومیه، برغان و هلندی، گیلاس (*P. avium* L.) ارقام صورتی لواسانات و مشکی مشهد، شلیل (*P. persica* var. *nusipersica* L.) رقم قرمز و هلو (*P. persica*(L.) Batsch.) ارقام زعفرانی، البرتا و شفتالو

Archive of SID

www.SID.ir

از یک نهالستان در اصفهان خریداری و پس از نشا در گلدان‌های مناسب به یک گلخانه عاری از حشرات در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس انتقال داده شدند. نهال‌های بادام تلخ مورد نیاز از طریق بذر در گلخانه تکثیر شدند. دمای گلخانه در طول مدت این مطالعه از ۱۸°C تا ۳۰°C متغیر بود. شدت نورگیری با به کارگیری سایبان‌های حصیری و لامپ‌های فلورسنت (بسته به شرایط) تا حدودی تنظیم شد. کلیه نهال‌های خریداری شده با استفاده از آزمون PCR قبل و بعد از مایه‌زنی با عامل جاروک بادام از نظر آلودگی به فیتوپلاسما بررسی شدند. پس از اطمینان از عدم آلودگی به فیتوپلاسما که در آزمون PCR حاصل شد، در اردیبهشت ماه نهال‌های هسته‌دار با روش پیوند جانبی با عامل جاروک بادام مایه‌زنی گردیدند. از سرشاخه‌های ظریف و کوچک یک نهال بادام آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام (جدایه خفر) که دارای دو تا سه برگ بود به عنوان پیوندک و از نهال‌های سالم درختان میوه هسته‌دار موجود در گلخانه به عنوان پایه استفاده شد. برای هر رقم پنج نهال به عنوان پایه انتخاب و روی هرکدام سه پیوندک آلوده به بیماری جاروک پیوند و یک نهال از هر رقم نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پنج نهال بادام تلخ بذری با پیوندک آلوده مایه‌زنی و به عنوان کنترل مثبت در گلخانه نگهداری شدند. موضع پیوند به وسیله پارافیلم بسته و ناحیه پیوند شده به وسیله یک کیسه نایلونی شفاف پوشانده شد. جهت حصول اطمینان از گرفتن پیوندک‌ها کیسه‌های نایلونی در همین وضعیت به مدت سه هفته نگهداری شدند. آلودگی جاروک‌ها یا شاخه‌های حاصل از رشد پیوندک‌ها به فیتوپلاسما با آزمون PCR بررسی گردید. گیاهان مایه‌زنی شده تا دوسال از نظر ظهور علائم احتمالی بیماری در یک گلخانه عاری از حشرات تحت نظر قرار گرفتند.

در نهال‌های مورد آزمایش از ۰/۲ گرم بافت رگبرگ میانی یا دمبرگ به روش ژانگ و همکاران(Zhang *et al.* 1998) با اندکی تغییرات (Abou-Jawdah *et al.* 2002) دی.ان.ای کل استخراج گردید. بعد از خشک شدن رسوب نهایی در دمای اتاق، ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر سترون به آن اضافه و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد تا از آن به عنوان دی. ان. ای الگو در آزمایش‌های PCR استفاده شود. آزمون PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگر عمومی P1/P7 (Schneider *et al.* 1995) و PCR دو مرحله‌ای با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 در دور اول و R16F2n / R16R2 (Gundersen & Lee 1996) در دور دوم انجام شد. جفت آغازگر P1/P7 یک قطعه با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز شامل ژن 16S rRNA و ناحیه بین ژن‌های 16S rRNA و23S rRNA و ابتدای ژن 23S rRNA و جفت آغازگر R16F2n/R16R2 یک قطعه از ژن 16S rRNA با اندازه تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز را تکثیر می‌کند. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۱۵ میکرولیتر و شامل دو میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) دی.ان.ای الگو، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت پایه ۰/۵ میکرومولار، ۰/۳۵ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP) با غلظت پایه ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر و ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم پلیمراز (ساخت شرکت سیناژن ایران) با غلظت پایه پنج واحد در یک میکرولیتر بود که با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر سترون حجم آن به ۱۵ میکرولیتر رسانده شد. برای جلوگیری از تبخیر، حدود ۱۳ میکرولیتر روغن معدنی (Sigma No. 232-455-8) به هر لوله محتوی مخلوط واکنش اضافه و سپس لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر BIORAD قرار داده شدند. چرخه دمایی PCR عبارت بود از یک برنامه یک چرخه‌ای شامل دمای ۹۴°C به مدت دو دقیقه و یک برنامه ۳۵

Archive of SID

www.SID.ir

چرخه‌ای شامل دمای ۹۴°C در یک دقیقه، دمای ۵۵ °C به مدت دو دقیقه و ۷۲ °C به مدت سه دقیقه. چرخه نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه بود. در آزمون PCR دو مرحله‌ای، ابتدا محصول PCR مستقیم با استفاده از آب دوبار تقطیر سترون به نسبت ۱:۳۰ رقیق گردید و از آن به عنوان دی. ان. ای الگو استفاده شد. شرایط PCR دو مرحله‌ای مانند شرایط PCR مستقیم بود. محصول PCR حاصل از هر دو آزمون در ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز و از نوارهای دی. ان. ای عکس تهیه شد. محصول PCR آشیانه‌ای (حدود ۱۲۰۰جفت باز) مربوط به هر نمونه به طور جداگانه با آنزیم‌های *AluI* ، *Hinf I* و *RsaI* هضم شد. محلول پایه برای هر واکنش ۲۰ میکرولیتر تنظیم گردید. برای برش با هر آنزیم، ۰/۱۵ میکرولیتر از آن آنزیم به همراه دو میکرولیتر بافر آنزیم و ۹/۸۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر سترون به هشت میکرولیتر محصول PCR اضافه و سپس به مدت چهار ساعت در دستگاه ترموبلاک با دمای ۳۷ °C قرار داده شد. محصول هضم آنزیمی با آنزیم‌های مختلف در ژل آگارز دو درصد الکتروفورز و از نوارهای دی. ان. ای عکس‌برداری گردید.

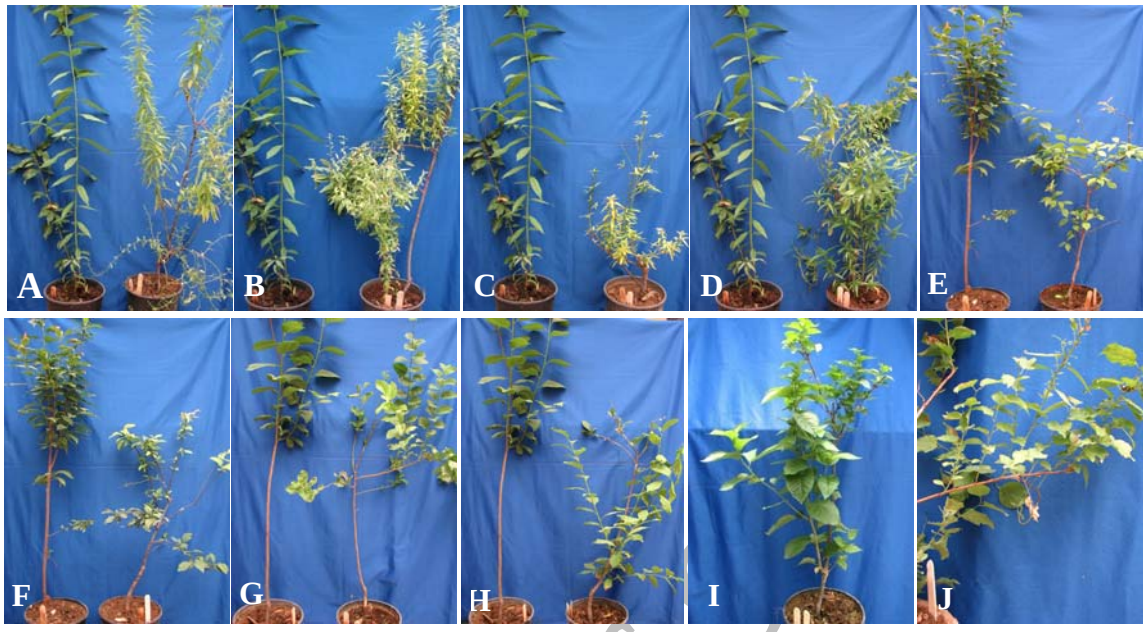
نتایج و بحث

در همه نهال‌هایی که به وسیله پیوند با عامل جاروک بادام مایه‌زنی شده بودند، حدود دو ماه بعد از مایه‌زنی پیوندک‌ها مستقر شده و شروع به رشد کردند. آزمون PCR دو مرحله‌ای نشان داد که همه جاروک‌ها یا شاخه‌های حاصل از رشد این پیوندک‌ها به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام آلوده هستند. در هلو ارقام زعفرانی، البرتا و شفتالو و شلیل رقم قرمز رشد زیاد پیوند ها منجر به تشکیل جاروک شد. در آلو رقم شایرو، ارقام آلبالو و گیلاس رشد پیوندک‌ها کم و در سایر ارقام هسته‌دارها رشد پیوندک‌ها متوسط بود. در برخی از ارقام مایه‌زنی شده مانند هلو و شلیل تبدیل پیوندک‌ها به جاروک‌های بزرگ مانعی برای رشد پایه و درنتیجه ظهور علائم بود و به همین دلیل با عمل هرس کوچک‌تر شدند. حدود پنج ماه پس از مایه‌زنی به تدریج در ارقام مختلف در مقایسه با شاهد تغییرات قابل توجهی ایجاد و مجموعه‌ای از علایم ظاهر گردید. در هلو رقم‌های زعفرانی و البرتا متورم شدن رگبرگ میانی، لوله شدن برگ‌ها به طرف پایین، زردی، کاهش فاصله میانگره‌ها، ریز برگی و جاروک (شکل ۱ ، به ترتیب A و B)، در شفتالو و شلیل رقم قرمز ریز برگی شدید، کاهش فاصله میانگره‌ها، زردی و جاروک (شکل ۱، به ترتیبC و D) دیده شد. در آلو ارقام سانتاروزا (شکل ۱،E) و شایرو (شکل ۱،F)، گوجه سبز ارقام سعدی (شکل ۱،G)و برغان (شکل ۱،H) آلبالو رقم شاتن مورل (شکل ۱،I) و زردآلو ارقام آصفی و تلخ علایم عمده بیماری ریز برگی، کوتاه شدن فاصله میانگره‌ها، زردی وکوتولگی بود. یکی از علائم بارز بیماری در زردآلو ایجاد دیوارکی متشکل از شاخه‌هایی ظریف با برگ‌های کوچک روی شاخه‌های اصلی بود (شکل ۱،J). در زرد آلو ارقام آصفی و تلخ علاوه بر این علایم، لوله‌ای شدن برگ به طرف داخل نیز مشاهده شد. دوره نهفتگی بیماری در ارقام مایه‌زنی شده از پنج ماه در هلو و شلیل تا نه ماه در زردآلو متغیر بود.

به طورکلی در هسته‌دارهای مورد مطالعه میزان رشد پیوندک‌ها با دوره نهفتگی بیماری رابطه معکوس و با شدت علایم بیماری رابطه مستقیم داشت. در هلو ارقام زعفرانی، البرتا، شفتالو و شلیل رقم قرمز که پیوندک‌ها به جاروک تبدیل شدند. علایم بیماری پنج ماه بعد از مایه‌زنی ظاهر شد. در این ارقام شدیدترین حالت بیماری یعنی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. علائم بیماری در هسته‌دارهای مایه زنی شده با عامل جاروک بادام A، B، C و D : علائم زردی، ریزبرگی، کاهش فاصله میانگره‌ها، کوتولگی و جاروک به ترتیب در هلو زعفرانی، هلو البرتا، شفتالو و شلیل. H،G، F، E و I : زردی، ریز برگی، کاهش شدید فاصله میانگره‌ها و کوتولگی به ترتیب در آلو سانتاروزا، آلو شایرو، گوجه سبز سعدی، گوجه سبز برغان و آلبالو شاتن مورل. J: رشد شاخه‌های فرعی به شکل دیوارک روی شاخه‌های اصلی در زردآلو تلخ.

Fig.1. Disease symptoms in various stone fruits graft - inoculated with almond witches' broom phytoplasma. A, B, C and D: Yellowing, little leaf, internode shortening, witches' broom and stunting symptoms in peach cultivar Elberta, peach cultivar Zaferani, peach cultivar Shaftalou and nectarine, respectivly. E, F, G, H and I: Yellowing, little leaf, internode shortening, and stunting syptoms in plum cultivar Santa Roza, plum cultivar Shiro , prune cultivar Sadi, prune cultivar Barghan and sour cherry cultivar Schattenmorelle, respectivly. J: Growth of a row of short branches on the main branch in apricot cultivar Talkh.

ایجاد جاروک و ریز برگی شدید مشاهده گردید. در سایر هسته‌دارها که پیوندک‌ها به جاروک تبدیل نشدند، دوره کمون طولانی‌تر، علائم ملایم‌تر و جاروک تشکیل نگردید. سایر ارقام مایه‌زنی شده با فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام که شامل زردآلو (ارقام شکرپاره، تخم مرغی و نوری)، گیلاس (ارقام مشکی مشهد و صورتی لواسانات)، آلبالو (رقم چمپای مشهد) و گوجه سبز رقم هلندی بودند از نظر علایم بیماری تا دو سال بعد از مایه‌زنی در مقایسه با شاهد سالم تفاوتی نشان ندادند.

نتیجه آزمون PCR آشیانه‌ای نشان داد که همه نهال‌های هسته‌دار خریداری شده عاری از فیتوپلاسما بودند. با همین آزمون آلودگی جاروک‌ها یا شاخه‌های حاصل از رشد پیوندک‌های آلوده مستقر شده روی ارقام هسته‌دارها به فیتوپلاسما به اثبات رسید. واکنش نمونه‌های دی.ان.ای نهال‌های بادام تلخ (کنترل مثبت)، شلیل، هلو ارقام زعفرانی، البرتا و شفتالو، زردآلو آرقام آصفی و تلخ، آلو ارقام سانتاروزا و شایرو، گوجه سبز رقم برغان و آلبالو رقم شاتن مورل در آزمون PCR مستقیم که با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 انجام شد، مثبت بود و قطعه مورد انتظار (حدود ۱۸۰۰جفت باز) تکثیر گردید. تحت همین شرایط

Archive of SID
www.SID.ir

در محصولات PCR مربوط به نهال‌های سالم و سایر ارقام مایه‌زنی شده شامل ارقام گیلاس مشکی، گوجه سبز هلندی، گوجه سبز سعدی، زردآلو ارقام شکرپاره، تخم مرغی و نوری، گیلاس صورتی لواسانات، آلبالو چمپای مشهد هیچ باندی دیده نشد.

در آزمون PCR دو مرحله‌ای با استفاده از آغازگرهای P1/P7 (دور اول) و R16F2n/R16R2 (دور دوم) علاوه بر ارقامی که در PCR مستقیم واکنش مثبت داشتند واکنش ارقام گیلاس مشکی مشهد، گوجه سبز هلندی و گوجه سبز سعدی نیز مثبت بود و در نمونه‌های دی.ان.ای آنها قطعه مورد انتظار (حدود ۱۲۰۰ جفت باز) تکثیر شد. تحت همین شرایط در محصولات تکثیری نمونه‌های زردآلو ارقام شکرپاره، تخم مرغی و نوری، گیلاس صورتی لواسانات، آلبالو چمپای مشهد و نهال‌های سالم هیچ باندی دیده نشد. نقوش حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR دو مرحله‌ای با آنزیم‌های *AluI*، *HinfI* و *RsaI* در تمامی نمونه‌های مورد آزمایش، کنترل مثبت و منبع عامل بیماری با نقوش حاصل از آزمون‌های مشابه با نمونه‌های مربوط به فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک بادام لبنان (Abou- Jawdah *et al.* 2002 & 2003) یکسان بود.

قبل از مایه‌زنی با فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام، واکنش کلیه نهال‌های خریداری شده در آزمون PCR که از آغازگرهای عمومی فیتوپلاسمایی استفاده گردید منفی بود. بنابراین تا قبل از مایه‌زنی، نهال‌های هسته‌دار مورد مطالعه از نظر آلودگی به فیتوپلاسما سالم بوده‌اند و در مقایسه با نهال‌های سالم شاهد، علائم حاصل از مایه‌زنی در این نهال‌ها ناشی از فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام بوده است. آزمون PCR نشان داد که جاروک‌ها یا شاخه‌های حاصل از رشد پیوندک‌های مستقر شده روی ارقام هسته دار به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام آلوده‌اند و بنابراین عدم آلودگی بعضی ارقام هسته‌دارها ناشی از عدم حساسیت آنها به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام می‌باشد و به علت عدم آلودگی پیوندک‌های استفاده شده در مایه‌زنی نبوده است .

بر اساس علایم بیماری و واکنش مثبت در آزمون‌های PCR مستقیم و دو مرحله‌ای، هلو ارقام زعفرانی، البرتا و شفتالو، زردآلو ارقام آصفی و تلخ، آلو ارقام سانتاروزا و شایرو، گوجه سبز ارقام برغان و سعدی، شلیل رقم قرمز، آلبالو رقم شاتن مورل میزبان‌های علائم دار فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام هستند. این‌گونه ارقام مانند بادام به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام حساس هستند و در اثر آلودگی خسارت زیادی را متحمل می‌شوند و به همین دلیل باید از کاشت این ارقام در نقاطی که احتمال آلودگی وجود دارد خودداری گردد. دربین ارقام علائم‌دار، هلو، شلیل و شفتالو حساسیت بیشتری داشتند زیرا دوره نهفتگی بیماری در آنها کمتر و شدت علائم در آنها بیشتر بود. ارقام گوجه سبز هلندی و گیلاس مشکی مشهد میزبان‌های فاقد علائم فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام می‌باشند زیرا تا دو سال پس از مایه‌زنی از نظر ظهور علائم در مقایسه با ارقام شاهد سالم هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ولی در آزمون PCR دو مرحله‌ای واکنش آنها در برابر عامل جاروک بادام مثبت بود. وجود ارقام آلوده فاقد علائم به عنوان منبع بیماری برای آلودگی ارقام حساس اهمیت دارد. در مورد ارقام فاقد علایم ولی آلوده به فیتوپلاسما باید دقت بیشتری به عمل آید. ممکن است وجود فیتوپلاسما در آنها به دلیل تکثیر فیتوپلاسما در پیوندک آلوده و ورود به داخل آوند آبکش نهال باشد و در واقع فیتوپلاسما در این ارقام تکثیر نشده باشد. در صورتی‌که عدم تکثیر فیتوپلاسما در این ارقام به اثبات برسد، این

Archive of SID

www.SID.ir

ارقام به عنوان میزبان عامل بیماری جاروک بادام قلمداد نمی‌شوند.

در ایران پیشتر آلودگی طبیعی هلو و شلیل به عامل جاروک بادام گزارش شده است (Bahrami Kamangar *et al.* 2004, Salehi *et al.* 2005). در لبنان نیز هلو و شلیل به عنوان ارقام حساس به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام معرفی شده‌اند (Abou-Jawdah *et al.* 2002 & 2003). در تحقیق حاضر علاوه بر هلو و شلیل، آلودگی شفتالو، آلو ارقام سانتاروزا و شایرو، زردآلو ارقام آصفی و تلخ، گوجه سبز ارقام برغان، سعدی و هلندی، گیلاس مشکی مشهد و آلبالو شاتن مورل به اثبات رسید. این تفاوت ممکن است به علت اختلاف ایزوله‌های فیتوپلاسمای استفاده شده در مایه‌زنی باشد زیرا تحقیقات قبلی در ایران نشان داده که فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام خفر که در این تحقیق از آن به عنوان عامل بیماری استفاده گردید با فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام در لبنان کاملاً یکسان نیست (Salehi *et al.* 2006). علت دیگر می‌تواند ناشی از این باشد که در تحقیق حاضر ارقام بیشتر و متنوع‌تری از درختان میوه هسته‌دار استفاده می‌شوند.

در این مطالعه از روش مایه‌زنی با پیوند برای بررسی واکنش هسته‌دارها به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام استفاده گردید. در شرایط طبیعی بیماری‌های فیتوپلاسمایی توسط حشرات (زنجرک و پسیل) منتقل می‌شوند (Tsai 1997) و این احتمال وجود دارد که از نظر واکنش هسته‌دارها به فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک بادام، نتایج حاصل از مایه‌زنی با پیوند با نتایج حاصل از مایه‌زنی با حشره ناقل یکسان نباشد. صرف نظر از این احتمال نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بسیاری از ارقام درختان میوه هسته‌دار پتانسیل آلودگی به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام را دارند. این تحقیق نشان می‌دهد که در همه هسته‌دارها نتیجه آلودگی به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام، ظهور جاروک نیست و علایم دیگری مانند ریز برگی، زردی، کاهش فاصله میانگره‌ها و کوتولگی نیز از نشانه‌های آلودگی به این فیتوپلاسما هستند و در ردیابی فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام در باغ های درختان میوه هسته دار باید مد نظر قرار گیرند.

در آزمون PCR دو مرحله‌ای در مقایسه با PCR مستقیم عامل بیماری جاروک در ارقام گوجه سبز هلندی و گیلاس مشکی مشهد نیز ردیابی گردید. در مطالعات قبلی نیز مشخص شده که به دلیل پایین بودن غلظت فیتوپلاسما و وجود بازدارنده‌ها در هسته‌دارها ردیابی با PCR دو مرحله ای دقیق‌تر است (Heinrich *et al.* 2001).

یکی از راه‌های تشخیص فیتوپلاسماها استفاده از آزمون چند شکلی طول قطعات برشی (RFLP) است (Lee *et al.* 1998). با استفاده از این آزمون و آنزیم‌های برشی *AluI* ، *HinfI* و *RsaI* مشخص شد که نقوش حاصل از برش محصول PCR دو مرحله‌ای، نمونه‌های ارقام هسته‌دار مایه‌زنی شده و نمونه بادام تلخ مورد استفاده به عنوان منبع عامل بیماری، یکسان و شبیه به نقوش حاصل از برش محصول PCR دو مرحله‌ای نمونه‌های فیتوپلاسمای عامل جاروک لبنان با همین آنزیم‌هاست (Abou-Jawdah *et al.* 2002). با توجه به این نتایج مشخص می‌شوند که فیتوپلاسمای انتقال داده شده به هسته‌دارها همان فیتوپلاسمای موجود در نهال بادام تلخ مورد استفاده به عنوان منبع عامل بیماری بوده است که شباهت بسیار زیادی با عامل جاروک بادام در لبنان دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

نگارندگان از بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس (زرقان) که امکانات گلخانه‌ای- آزمایشگاهی جهت این تحقیق فراهم نموده‌اند و گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران تشکر می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (48-47) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir