

تنوع ژنتیکی جدایه‌های فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بادام در استان‌های فارس، کرمان و کردستان*

GENETIC DIVERSITY OF THE PHYTOPLASMA ISOLATES ASSOCIATED WITH ALMOND WITCHES' BROOM IN IRAN

حامد پورعلی^۱ و محمد صالحی^{۲*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۳۰)

چکیده

بیماری جاروک بادام که فیتوپلاسمای همراه با آن *Candidatus Phytoplasma phoenicium* نام دارد در حال حاضر یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های بادام در ایران و لبنان است. تنوع ژنتیکی در فیتوپلاسمای همراه با جاروک بادام در نمونه‌های تهیه شده در دو نقطه از باغ‌های اطراف نیریز (جدایه‌های نیریز اوئیریز ۲)، یک نقطه از مشکان نیریز (جدایه مشکان)، دو نقطه در اطراف کرمان (جدایه‌های کرمان اوکرمان ۲) و یک نقطه در شهرستان سنندج (جدایه سنندج) بررسی گردید. نهال‌های بادام تلخ مایه‌زنی شده با جدایه‌های عامل جاروک بادام در شرایط کنترل شده واکنش‌های متفاوتی را نشان دادند. RFLP محصول PCR مستقیم با جفت آغازگر P1/P7 (تقریباً ۱۸۰۰ جفت باز از اپرون ار.ان.ای ریپوزومی) با آنزیم‌های *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaII*, *RsaI*, *TaqI* با آنزیم‌های *CfoI* و جدایه کرمان ۲ از نظر نقوش حاصل از برش با آنزیم *HinfI* با بقیه متفاوت‌اند و بر اساس جدایه‌های مورد مطالعه در ۳ گروه قرار می‌گیرند. جدایه مشکان در گروه یک، جدایه کرمان ۲ در گروه دو و جدایه‌های کرمان، سنندج، نیریز ۱ و نیریز ۲ در گروه سه قرار گرفتند. مقایسه میزان تشابه نوکلئوتیدی در ناحیه SR نیز تفاوت جدایه‌های عامل جاروک بادام را تأیید کرد و نشان داد که جدایه مشکان با دیگر جدایه‌های مورد مطالعه تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد. بررسی تبارزایی براساس مترادف اپرون آر ان ای ریپوزومی، جدایه‌های عامل جاروک بادام را در گروه جاروک نخود کیوتر (Pigeon pea witches' broom 16S rIX) قرار داد و نشان داد که این جدایه‌ها یکسان نیستند. تمامی بررسی‌های مولکولی تفاوت جدایه خفر با جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق را تأیید کرد. بررسی‌های RFLP، مقایسه میزان تشابه نوکلئوتیدی و تبارزایی نشان داد که تفاوت ژنتیکی جدایه‌های جاروک بادام مربوط به ۶۰۰ جفت باز از اپرون آر ان ای ریپوزومی شامل انتهای ۵' ژن 16S، ناحیه SR و ابتدای ۳' ژن 23S است.

واژه‌های کلیدی: جاروک بادام، فیتوپلاسمای همراه با جاروک بادام، تنوع ژنتیکی

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

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

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

۲. استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

مقدمه

از آغاز کشف فیتوپلاسمها در سال ۱۹۶۷ میلادی ارتباط چند صد بیماری مهم گیاهی با این عوامل گزارش شده و لیست این گونه بیماری‌ها رو به افزایش است. بیماری‌های فیتوپلاسمایی موجب عقیمی و مرگ گیاه میزبان شده و اغلب خسارت آنها صد در صد است. به‌همین دلیل این گونه بیماری‌ها عامل عمده محدودیت کشت بسیاری از گیاهان از جمله گیاهان زراعی، سبزی و صیفی، زیتنی، درختان مثمر و غیرمثمر می‌باشند (Lee et al. 2000, Bove and Garnier 2002, Bertaccini 2007, Hogenhout 2008). در ایران تاکنون ده‌ها بیماری همراه با فیتوپلاسم شناسایی شده که از بین آنها جاروک یونجه، جاروک لیموترش، زوال گلابی، جاروک هلو و جاروک بادام در زمره بیماری‌های مهم و اقتصادی در جهان بوده و در ایران نیز تهدیدی جدی برای میزبان‌های گیاهی خود می‌باشند (Salehi et al. 2005). جاروک بادام به‌عنوان یک بیماری مهم و اقتصادی برای اولین بار در سال ۱۳۷۴ از مناطق خفر و میمند در استان فارس گزارش گردید (Salehi and Izadpanah 1995).

در بررسی‌های سال‌های ۱۳۸۴-۱۳۸۰ جاروک بادام در استان‌های چهارمحال و بختیاری (شهرکرد)، اصفهان (شهرضا) و کرمان (بافت) دیده شد (Salehi et al. 2000). بیماری مشابهی در درختان بادام کشور لبنان در سال ۲۰۰۱ گزارش گردید (Choueiri et al. 2000, Abou-Jawdah et al. 2002). آنالیز چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) و تعیین ترادف ژن آر ن ای ریوزومی 16S نشان داد که فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک بادام در لبنان و ایران متعلق به گروه جاروک نخود کبوتر (Pigeon pea witches' broom) یا گروه 16SrIX و زیر گروه 16SrIX-A می‌باشد و نام

Candidatus Phytoplasma phoenicium برای آن انتخاب گردید (Verdin et al. 2003). جاروک بادام وحشی (*Prunus scoparia*) 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) نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با جاروک بادام وحشی کوار متعلق به گروه جاروک نخود کبوتر می‌باشد و در بین اعضای این گروه رابطه بسیار نزدیکی با فیتوپلاسمای همراه با جاروک بادام لبنان (*Ca. P. phoenicium*) و جاروک بادام نیریز در ایران دارد (Salehi et al. 2006). مطالعه ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بادام در مناطق نیریز و خفر (استان فارس) یکسان نیستند و فیتوپلاسمای همراه با جاروک بادام در نیریز نسبت به جدایه خفر شباهت بیشتری به فیتوپلاسمای همراه با جاروک بادام در لبنان دارد (Salehi et al. 2006). با توجه به گزارش قبلی مبنی بر اختلاف ژنتیکی جدایه‌های خفر و نی ریز (Salehi et al. 2006) و همچنین وجود تفاوت علایم بیماری جاروک در بعضی از نقاط بادامخیز، احتمال وجود تفاوت ژنتیکی بین فیتوپلاسمای همراه با جاروک بادام در استان‌های فارس، کرمان و کردستان با استفاده از روش‌های بیولوژیکی و مولکولی بررسی شد.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه‌های جاروک بادام

در هر باغ آلوده مورد نظر یک جارو با علایم بارز بیماری جاروک بادام انتخاب شد. نمونه‌های بیماری جاروک بادام از باغ‌های آلوده در استانهای فارس (جدایه‌های نیریز و نیریز ۲ و مشکان)، کرمان (جدایه‌های

کرمان (اوکرمان ۲) و کردستان (جدایه سنندج) در کیسه پلاستیکی و روی یخ به آزمایشگاه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس در زرقان منتقل گردید تا از آنها برای تهیه پیوندک آلوده در آزمایش‌های انتقال عامل بیماری و استخراج دی ان ای کل جهت آزمایش‌های مولکولی استفاده شود.

مایه‌زنی نهال‌های سالم بادام تلخ

برای انتقال باروش پیوند جانبی از سرشاخه‌های ظریف و کوچک نمونه‌های جمع‌آوری شده که دارای دو تا سه برگ بود به‌عنوان پیوندک و از نهال‌های سالم و بذری بادام تلخ به‌عنوان پایه استفاده شد. پس از انتخاب و جدا کردن پیوندک از نمونه‌های جمع‌آوری شده، قسمت انتهایی آن (محل جدا کردن پیوندک از گیاه آلوده) به‌وسیله یک تیغ تیز و استریل به‌صورت مورب برش داده شد و سپس درون شکافی که در ساقه نهال سالم (پایه) ایجاد شده بود قرار گرفت. هر نمونه روی سه نهال سالم (۳ پیوندک روی هر نهال) بادام تلخ پیوند گردید. برای گرم ماندن و تأمین رطوبت لازم جهت پیوندک و گیرایش بهتر پیوندک‌ها، موضع پیوند به‌وسیله پارافیلیم بسته و ناحیه پیوند شده به‌وسیله یک کیسه نایلونی شفاف پوشانده شد. هر ۲۴ ساعت یکبار کیسه‌های نایلونی باز شد و گیاهان هوا دهی شدند. جهت حصول اطمینان از گیرایش قطعی پیوندک‌ها، کیسه‌های نایلونی در همین وضعیت و به‌مدت چهار هفته نگهداری شدند.

بررسی گیاهان مایه‌زنی شده از نظر ظهور علائم بیماری
حدود یک ماه پس از مایه‌زنی نهال‌های مورد آزمایش و اطمینان از گیرایش پیوندک‌ها، گیاهان مایه‌زنی شده هفته‌ای یکبار از نظر ظهور و گسترش علائم بیماری بررسی

گردیدند و از کلیه تغییرات احتمالی به‌وجود آمده در آنها عکس‌برداری شد. در طول این مدت عملیات باغبانی و به‌خصوص تغذیه نهال‌ها با استفاده از انواع کودهای شیمیایی و ریز مغذی‌ها صورت گرفت. تغذیه مناسب باعث شد تا ضمن این‌که درختان از رشد سبزی‌نگی و رویشی خوبی برخوردار باشند، از بروز علائم کمبود مواد غذایی که برخی از آنها شبیه به علائم به‌وجود آمده در اثر فیتوپلاسمها هستند جلوگیری شود. مبارزه با برخی آفات از قبیل کنه با استفاده از سموم مناسب و اختصاصی صورت گرفت.

استخراج دی ان ای کل، انتخاب آغازگر و انجام PCR

دی ان ای کل با روش ژانگ و همکاران (Zhang *et al.* 1998) با اندکی تغییرات (Abou-Jawdah *et al.* 2002) از ۰/۲ گرم بافت رگبرگ میانی یا دمبرگ نمونه‌های بیماری‌ز جازوک بادام از نقاط مختلف و نهال‌های بادام تلخ مایه‌زنی شده با فیتوپلاسمای عامل جازوک بادام 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 به‌عنوان 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 ۱۸۰۰ جفت بازی از اپرون آر ان ای ریبوزومی شامل ژن 16S، ناحیه میانی ژن‌های 16S و 23S و ابتدای ژن 23S و جفت آغازگر R16F2n/R16R2 یک قطعه از ژن آر ان ای ریبوزومی 16S 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 چهار داکسی نوکلئوتید تری فسفات با غلظت پایه ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر بافر یک برابر و ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم پلیمرز (ساخت شرکت سیناژن ایران) با غلظت پایه پنج واحد در یک میکرولیتر بود که با افزودن آب دیونیزه حجم آن به ۱۵ میکرولیتر رسانیده شد و لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر BIORAD قرار داده شدند. چرخه دمایی PCR عبارت بود از یک چرخه در دمای ۹۴ °C به مدت دو دقیقه برای واسرشتگی اولیه و ۳۵ چرخه که هر یک شامل یک دقیقه در دمای ۹۴ °C دو دقیقه در دمای ۵۵ °C و سه دقیقه در دمای ۷۲ °C بود. بسط قطعه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C انجام شد. 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 با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد در بافر TBE (IX) (۱۰/۸ گرم تریس، ۵/۵ گرم بوریک اسید، و ۰/۷۵ گرم EDTA در لیتر آب مقطر، pH ۸/۳) مورد بررسی قرار گرفت. پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم برومید ($\mu\text{g/ml}$)، به وسیله دستگاه gel documentation از ژل عکس برداری شد.

همسانه‌سازی و تعیین ترادف

از محصول PCR مستقیم (۱۸۰۰ جفت باز) مربوط به هر یک از ۶ جدایه جاروک بادام برای همسانه‌سازی و تعیین ترادف استفاده شد. محصول PCR مطابق روش کمپانی سازنده (Fermentas, Lithuania) درون ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T قرار داده شد. بدین منظور سه میکرولیتر ناقل پلاسمیدی، ۴ میکرولیتر محصول PCR، ۳ میکرولیتر بافر اتصال $\times 10$ ، ۳ میکرولیتر سوسپانسیون ۵٪ PEG4000، یک میکرولیتر آنزیم T4 DNA ligase (۵ واحد در میکرولیتر) و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر سترون مخلوط و در دمای ۲۲ °C به مدت یک شب نگهداری شد. سپس نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۲۰ °C - نگهداری گردید. انتقال پلاسمید نو ترکیب به سلول‌های باکتری *Echerichia coli* نژاد DH5 α (transformation) با استفاده از کیت Inst/Aclone PCR product Cloning Kit (Fermentas, Lithuania) و طبق دستورالعمل شرکت

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 چهار داکسی نوکلئوتید تری فسفات با غلظت پایه ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر بافر یک برابر و ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم پلیمرز (ساخت شرکت سیناژن ایران) با غلظت پایه پنج واحد در یک میکرولیتر بود که با افزودن آب دیونیزه حجم آن به ۱۵ میکرولیتر رسانیده شد و لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر BIORAD قرار داده شدند. چرخه دمایی PCR عبارت بود از یک چرخه در دمای ۹۴ °C به مدت دو دقیقه برای واسرشتگی اولیه و ۳۵ چرخه که هر یک شامل یک دقیقه در دمای ۹۴ °C دو دقیقه در دمای ۵۵ °C و سه دقیقه در دمای ۷۲ °C بود. بسط قطعه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C انجام شد. 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 با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد در بافر TBE (IX) (۱۰/۸ گرم تریس، ۵/۵ گرم بوریک اسید، و ۰/۷۵ گرم EDTA در لیتر آب مقطر، pH ۸/۳) مورد بررسی قرار گرفت. پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم برومید ($\mu\text{g/ml}$)، به وسیله دستگاه gel documentation از ژل عکس برداری شد.

آزمون چند شکلی طول قطعات برشی (RFLP)

در این آزمون محصول PCR دو مرحله‌ای (۱۲۰۰ جفت باز) و محصول PCR مستقیم (۱۸۰۰ جفت باز) هر نمونه به‌طور جداگانه با آنزیم‌های *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*,

نتایج

علایم ناشی از جدایه‌های جاروک بادام در نهال‌های

بادام تلخ

از حدود یکسال بعد از مایه‌زنی نهال‌های بادام تلخ با جدایه‌های جاروک بادام به تدریج علایم بیماری جاروک در نهال‌های پیوند خورده ظاهر شد. علایم بارز و مشترک جدایه‌های جاروک بادام در نهال‌های بادام تلخ عبارت بودند از رشد تعداد زیادی شاخه‌های باریک همراه با برگ‌های ریز و در نتیجه ایجاد جاروک در بعضی نقاط، تغییر رنگ برگ‌ها، کم‌رشدی، کاهش فاصله میانگره‌ها و کوتولگی (Stunting). از نظر ریز برگی، شدت جارویی و تغییر رنگ برگ‌ها در بین جدایه‌های مورد آزمایش تفاوت‌هایی وجود داشت و در جدایه‌های مورد مطالعه علاوه بر علایم مشترک، علایم اختصاصی (شکل ۱ و جدول ۲) نیز در بادام تلخ ایجاد شد. علایم اختصاصی جدایه‌های کرمان قرمز شدن برگ‌ها و علایم اختصاصی جدایه‌های نیریز زردی برگ‌های آلوده بود. شدت ریز برگی و کاهش فاصله میانگره‌ها و قرمز شدن برگ‌ها در جدایه سنندج ملایم بود. علایم اختصاصی جدایه مشکان، عدم تغییر رنگ در برگ‌های آلوده و خفیف بودن جاروک‌ها و کاهش فاصله میانگره بود.

آزمون PCR

تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های فارس، کرمان و کردستان و همچنین نهال‌های بادام تلخ مایه‌زنی شده با جدایه‌های مختلف عامل احتمالی با آزمون‌های PCR مستقیم و دو مرحله‌ای از نظر آلودگی به فیتوپلاسمای بررسی گردیدند. در هر دو آزمون پس از الکتروفورز محصول PCR در نمونه دی ان ای به ترتیب قطعه‌های ۱۸۰۰ و ۱۲۰۰ جفت بازی مشاهده گردید. تحت همین

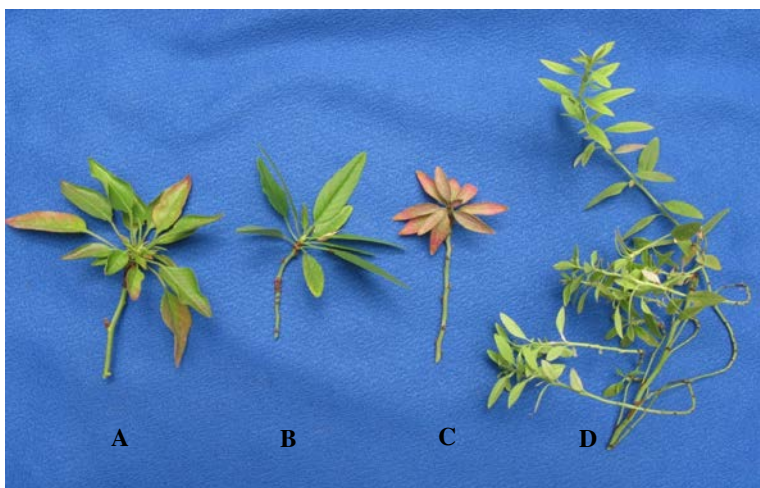
سازنده ترانسفورم و سوسپانسیون سلول‌ها در شرایط استریل روی محیط کشت جامد LB حاوی (40mg/ml) X-Gall و IPTG (25mg/ml) و آمپی سی سیلین (20 mg/ml) کشت شد. بعد از گذشت یک شب از کشت باکتری، پرگنه‌های سفید برداشته و هرکدام در ۲ میکرولیتر محیط کشت مایع LB حاوی ۱۰۰ میکرولیتر میلی‌لیتر آمپی سیلین کشت و به مدت یک شب در ۳۷ °C روی انکوباتور گردان (shaker incubator) نگهداری شدند. برای استخراج دی ان ای پلاسمیدهای نوترکیب از سلول‌های باکتری از روش جوشاندن (Holmes and Quigley 1981) استفاده شد. به منظور اطمینان از وجود قطعه مورد نظر در پلاسمید، عمل هضم انزیمی با استفاده از آنزیم‌های *PstI* و *EcoRI* انجام گرفت. پنج میکرولیتر از پلاسمید همراه پنج واحد از هرکدام از این دو آنزیم و دو میکرولیتر بافر با یکدیگر مخلوط و بعد از رسانیدن حجم مخلوط با آب دیونیزه به ۲۰ میکرولیتر ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C نگهداری شد. پس از اطمینان از وجود قطعه مورد نظر در پلاسمید، نمونه‌ها جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (سنول، کره جنوبی) ارسال گردید.

با استفاده از ترادف‌های به دست آمده و به کاربردن برنامه بلاست (BLAST) نزدیک‌ترین ترادف با عامل بیماری جدایه‌های جاروک بادام مشخص گردید. با به‌کارگیری نرم‌افزارهای DNAMAN و DNASTAR ترادف ۱۲۰۰ جفت باز از ژن *anA* ریپوزومی S_{۱۶}، ترادف کامل این ژن و ناحیه SR جدایه‌های بادام با ترادف‌های مشابه در بانک جهانی ترادف‌ها (GenBank) (جدول ۱) مقایسه گردید. با هم‌ردیف‌سازی چندگانه میزان تشابه نوکلئوتیدی مشخص و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد. در این بررسی ترادف مشابه در *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup به کار رفت.

جدول ۱. رس شمار فیتوپلاسم‌های مورد استفاده در ترسیم درخت فیلوژنتیکی و میزان شباهت نوکلئوتیدی فیتوپلاسم‌های همراه با بیماری جاروک بادام

Table 1. Accession number of phytoplasmas used in phylogenetic tree construction and nucleotide similarity comparison of the phytoplasmas associated with almond witches' broom

Acronym	Phytoplasma strain designation	RFLP Group	Accession number
<i>A. laidlawii</i>	<i>Acoleplasma laidlawii</i>		D13260
<i>Ca. P. asteris</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris	16SrI	M30790
<i>Ca. P. aurantifolia</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma aurantifolia	16SrII	U15442
<i>Ca. P. braziliens</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma braziliens	16SrXV	AF147708
<i>Ca. P. cynodontis</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma cynodontis	16SrXIV	AJ550984
<i>Ca. P. fraxini</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma fraxini	16SrVII	AF092209
<i>Ca. P. mali</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma mali	16SrX	AJ542541
<i>Ca. P. oryzae</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma oryzae	16SrXI	D12581
<i>Ca. P. palmae</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma palmae	16SrIV	U18753
<i>Ca. P. phoenicium</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma phoenicium	16SrIX	AF515636
<i>Ca. P. trifoli</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifoli	16SrVI	AY392610
<i>Ca. P. ziziphi</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma ziziphi	16SrV	AY072722
GLL	Gliricidia little leaf	16SrIX	AF361019
PEY	<i>Picris echioides</i> yellows	16SrIX	Y16389
KAP	<i>Knautia arvensis</i> phyllody	16SrIX	Y18052
LWB	Loofah witches' broom	16SrV111	L33764
MPV	Mexican periwinkle phyllody	16SrXIII	AF248960
PPWB	Pigeon pea witches' broom	16SrIX	U18763
Stol	Stolbur	16SrXII	X76427
WXD	Western X- disease	16SrIII	L04682
KhAWB	Khafr almond witches' broom	16SrIX	DQ195209
KAWB 1	Kerman almond witches' broom 1	16SrIX	JN565012
KAWB 2	Kerman almond witches' broom 2	16SrIX	JN565013
MAWB	Moshkan almond witches' broom	16SrIX	JN565017
NAWB 1	Neyreez almond witches' broom 1	16SrIX	JN565014
NAWB 2	Neyreez almond witches' broom 2	16SrIX	JN565016
SAWB	Sanandaj almond witches' broom	16SrIX	JN565015



شکل ۱. واکنش نهال‌های بادام تلخ به مایه‌زنی با جدایه‌های فیتوپلاسمای همراه با جاروک بادام. A، کاهش فاصله میانگره، ریز برگ‌گی خفیف، قرمزی خفیف برگ‌ها در جدایه سنندج. B، کاهش فاصله میانگره، ریز برگ‌گی خفیف و عدم تغییر رنگ برگ‌ها در جدایه مشکان. C، کاهش فاصله میانگره، ریز برگ‌گی و قرمزی شدید برگ‌ها در جدایه‌های کرمان ۱ و کرمان ۲. D، کاهش فاصله میانگره، ریز برگ‌گی نسبتاً شدید و زردی برگ‌ها در جدایه‌های نیریز ۱ و نیریز ۲.

Fig. 1. Reaction of bitter almond seedlings to inoculation with almond witches' broom isolates. A, mild little leaf and witches' broom, mild internode shortening and mild reddening of leaves induced by Sanandaj isolate; B, mild little leaf and witches' broom, mild internode shortening and no obvious change of leaf color induced by the Moshkan isolate; C, severe little leaf, mild witches' broom, internode shortening and severe leaf reddening induced by the Kerman 1 and Kerman 2 isolates; D, severe little leaf and witches' broom, internode shortening and leaf yellowing induced by the Neyreez 1 and Neyreez 2 isolates.

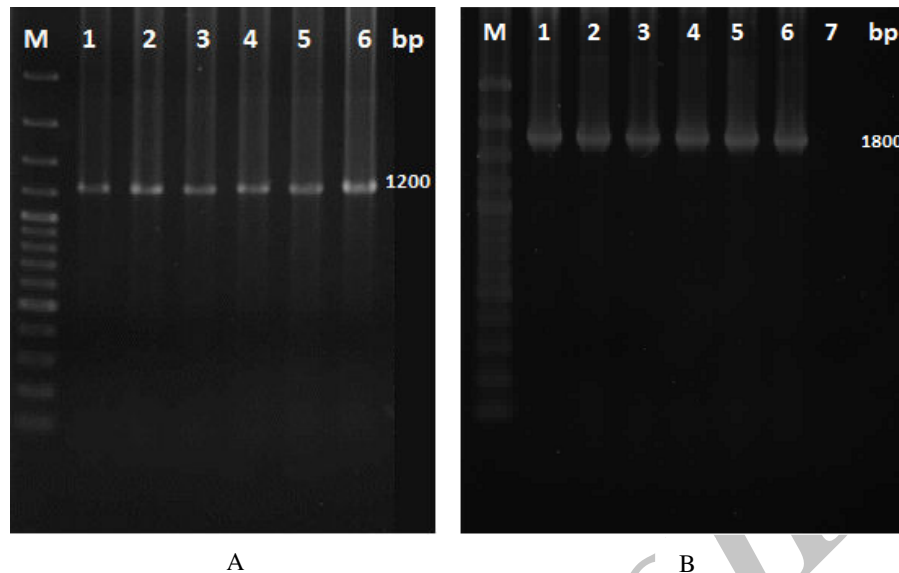
نقوش حاصل از برش با آنزیم *CfoI* و جدایه کرمان ۲ از نظر نقوش حاصل از برش با آنزیم *HinfI* با بقیه متمایز بود.

شرایط در نمونه‌های بادام تلخ سالم چنین باندهایی دیده نشد(شکل ۲).

آزمون چند شکلی طولی قطعات برشی

همسانه‌سازی و آنالیزهای فیلوژنتیکی
قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی از اپرون آر ان ای ریبوزومی جدایه‌های نی ریز ۱، نی ریز ۲، کرمان ۱، کرمان ۲، مشکان و سنندج همسانه‌سازی و تعیین ترادف گردید و به ترتیب تحت رس شماره‌های JN565016، JN565014، JN565013، JN565017 و JN565015 در بانک جهانی ترادف‌ها قرار داده شد. جستجو با برنامه بلاست این سنجش از اپرون آر ان ای ریبوزومی نشان داد که در بین فیتوپلاسماهای موجود در بانک جهانی ترادف‌ها

نقوش قطعات حاصل از برش محصول PCR دو مرحله‌ای (۱۲۰۰ جفت از ژن آر ان ای ریبوزومی ۱۶S) با آنزیم‌های *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaII*, *RsaI*, *TaqI* در ژل آگاروز دو درصد (شکل ۳) نشان داد که نقوش حاصل از برش با آنزیم‌ها در جدایه‌های جاروک بادام یکسان می‌باشند. در نقوش الکتروفورز محصول برش PCR مستقیم جدایه‌ها با جفت آغازگر P1/P7 (۱۸۰۰ جفت باز از اپرون آر ان ای ریبوزومی) با آنزیم‌های مذکور (شکل ۴) فقط جدایه مشکان از نظر

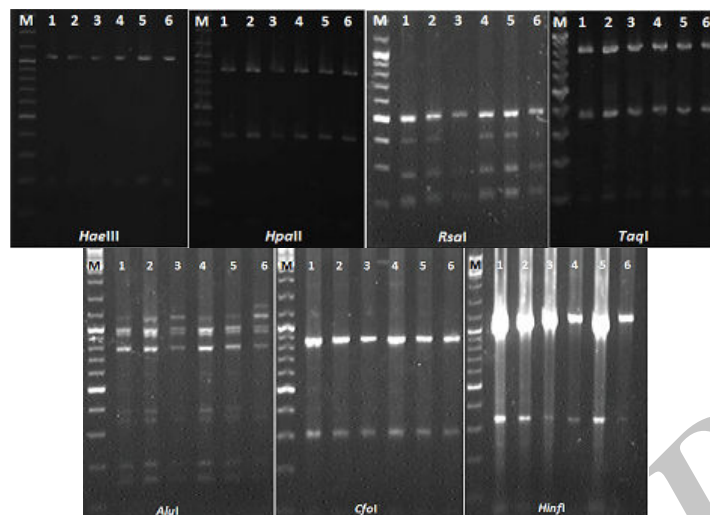


شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR مستقیم (۱۸۰۰ جفت باز از اپرون آر ان ی ریبوزومی) با جفت آغازگر P1/P7 (A) و PCR دو مرحله‌ای (۱۲۰۰ جفت باز از ژن آر ان ای ریبوزومی ۱۶S) با جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2 (B) در ژل آگاروز ۱/۲ درصد. راهک M، نشانگر جرم مولکولی. راهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب نهال‌های بادام تلخ مایه‌زنی شده با جدایه‌های نیریز ۱، نیریز ۲، مشکان، کرمان ۱، کرمان ۲ و سنندج. راهک ۷ بادام تلخ سالم.

Fig. 2. Electrophoresis of direct PCR product using primer pair P1/P7(A) and nested PCR using primer pairs P1/P7 and R16F2n/R16R2 (B) in 1.2% agarose gel. Lane M, DNA ladder. Lanes 1-6, bitter almond graft inoculated with phytoplasmal agent of Neyreez1, Neyreez2, Moshkan, Kerman1, Kerman2, and Sanandaj almond witches' broom isolates, respectively. Lane 7 healthy bitter almond.

جدایه‌های مورد بررسی از ۹۹/۳٪ تا ۹۹/۷٪ متغیر بود. بیشترین تفاوت ترادف نوکلئوتیدی در ناحیه SR مشاهده گردید (جدول ۳) که از ۹۸/۱٪ تا ۹۹/۶٪ متغیر بود. در بین ۶ جدایه مورد بررسی جدایه مشکان تشابه کمتری با بقیه داشت و به جز با جدایه نیریز ۱ میزان تشابه نوکلئوتیدی آن با سایر جدایه‌ها از ۹۸/۱٪ تا ۹۸/۷٪ متغیر بود. در هر سه نوع مقایسه تفاوت میزان تشابه نوکلئوتیدی جدایه خفر که پیشتر مطالعه شده بود (Salehi *et al.* 2006) با سایر جدایه‌ها بیشتر بود بعد از جدایه خفر جدایه‌های مورد بررسی به ترتیب بیشترین تفاوت را با *Ca. P. mali* (فیتو پلاسمای همراه جاروک سیب) و *Acholeplasma laidlawii* یک مولیکوت

جدایه‌های جاروک بادام مورد بررسی، بیشترین نزدیکی با فیتوپلاسم‌های گروه آر ان ای ریبوزومی 16S rIX را دارند. در بین فیتوپلاسم‌های گروه 16S rIX بیشترین شباهت نوکلئوتیدی با فیتوپلاسمای همراه جاروک بادام (*Ca. P. phoenicium*) دیده شد. مقایسه چند ردیفی محصول PCR دو مرحله‌ای (قطعه ۱۲۰۰ جفت بازی ژن آر ان ای ریبوزومی 16S)، SR، و ترادف کامل ژن 16S برای جدایه‌های جاروک بادام در ایران و فیتوپلاسم‌های انتخابی انجام شد. با قطعه ۱۲۰۰ جفت بازی میزان تشابه نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد مطالعه حدود ۱۰۰ درصد بود و جدایه‌ها قابل تشخیص نبودند. با ترادف کامل ژن آر ان ای ریبوزومی 16S میزان تشابه نوکلئوتیدی بین



شکل ۳. چند شکلی طول قطعات برشی (RFLP) محصول PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R2 با آنزیم‌های برشی HaeIII, HpaII, RsaI, TaqI, AluI, CfoI, HinfI در ژل آگاروز دو در صد. راهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ به ترتیب نمونه‌های نیریز ۱، نیریز ۲، مشکان، کرمان ۱، کرمان ۲ و سنندج. راهک M، نشانگر جرم مولکولی.

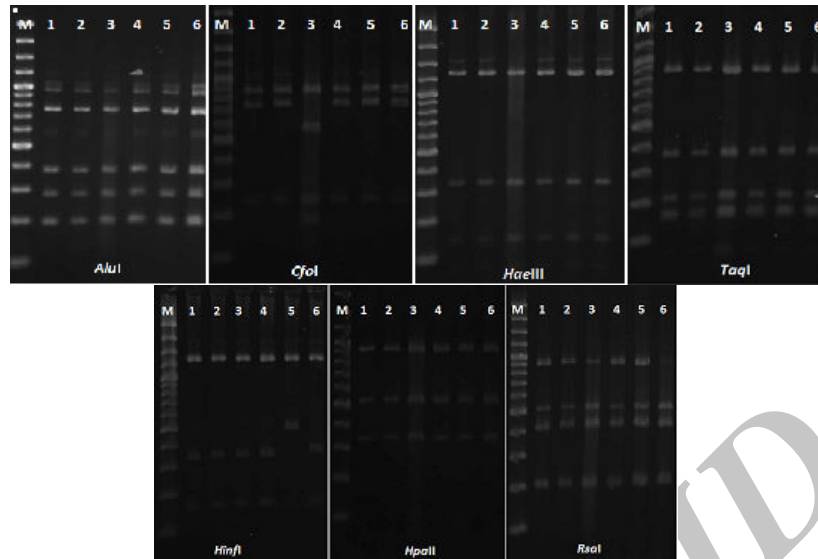
Fig. 3. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles of nested polymerase chain reaction products using P1/P7 followed by R16F2n/R2 primer pairs from bitter almond inoculated with Neyreez1, Neyreez2, Moshkan, Kerman1, Kerman2, and Sanandaj almond witches' broom isolates (Lanes 1-6, respectively). Lane M, DNA ladder. DNA products were digested with *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaII*, *RsaI* and *TaqI* and separated through a 2% agarose gel.

۱۴۷۰ جفت باز) و حدود ۱۸۰۰ جفت باز از اپرون آر آن ای ریپوزومی (شکل‌های ۶ و ۷) نشان داد که این جدایه‌ها با وجود نزدیک‌تر بودن به *Ca. Phytoplasma phoenicium* از یکدیگر قابل تفکیک می‌باشند. این تفاوت‌ها در درخت تبارزایی براساس ۱۸۰۰ جفت باز از اپرون آر آن ای ریپوزومی محسوس‌تر بود. در تمام ارزیابی‌های فیلوژنتیکی جدایه خفر در مقایسه با جدایه‌های دیگر جاروک بادام رابطه دورتری را با *Ca. Phytoplasma phoenicium* داشت.

بحث

بیماری جاروک در حال حاضر یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های بادام در کشور ایران و لبنان است (Salehi and Izadpanah 1995, Choueiri et al. 2001, Abou-

outgroup ساپروفیت نزدیک به فیتوپلاسمای به‌عنوان داشتند. درخت‌های تبارزایی با استفاده از قطعه ۱۲۰۰ جفت بازی از ابتدای ژن آر آن ای ریپوزومی 16S، ناحیه SR و ترادف کامل ژن آر آن ای ریپوزومی 16S برای جدایه‌های جاروک بادام در ایران و فیتوپلاسمای انتخابی ترسیم گردید (شکل‌های ۵ تا ۷). براساس هر سه درخت تبارزایی جدایه‌های جاروک بادام با فیتوپلاسمای گروه جاروک نخود کبوتر (16SrIX) گروه‌بندی می‌شوند و رابطه نزدیکی با *Ca. P. phoenicium*، فیتوپلاسمای همراه جاروک بادام دارند. درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ۱۲۰۰ جفت باز از ژن آر آن ای ریپوزومی (شکل ۵) نشان داد که جدایه‌های جاروک بادام مورد مطالعه با یکدیگر تفاوت ندارند ولی درخت‌های فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ترادف کامل ژن آر آن ای ریپوزومی 16S (حدود



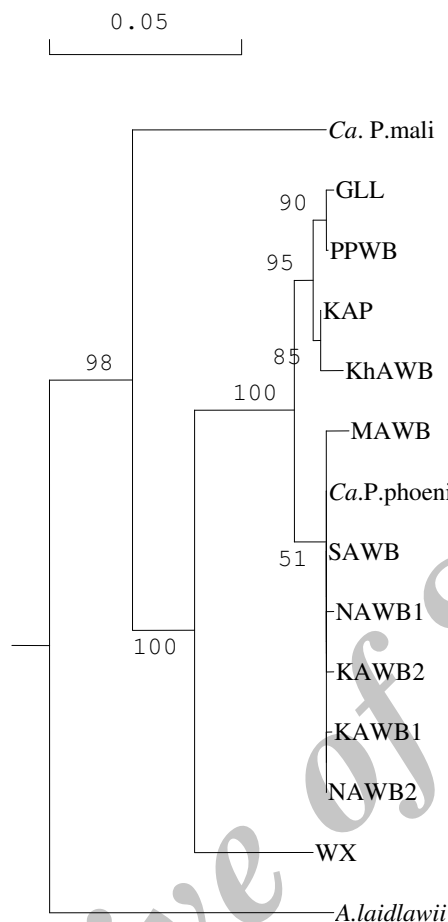
شکل ۴. چند شکلی طول قطعات برشی (RFLP) محصول PCR با جفت آغازگر P1/P7 به وسیله آنزیم‌های برشی *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *AluI*, *HpaII*, *RsaI*, *TaqI* در ژل آگاروز دو در صد. راهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ به ترتیب نمونه‌های نیریز ۱، نیریز ۲، موشکان، کرمان ۱، کرمان ۲ و سنندج. راهک M، نشانگر جرم مولکولی

Fig. 4. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles of direct polymerase chain reaction products using P1/P7 primer pair from bitter almond inoculated with Neyreez1, Neyreez2, Moshkan, Kerman1, Kerman2, and Sanandaj almond witches' broom isolates (Lanes 1-6, respectively). Lane M, DNA ladder. DNA products were digested with *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaII*, *RsaI* and *TaqI* and separated through a 2% agarose gel.

جدول ۲. علائم جدایه‌های مختلف جاروک بادام در نهال‌های بادام تلخ

Table 2. Disease symptoms induced by different isolates of almond witches' broom in bitter almond seedlings

Isolates	Disease symptoms
Neyreez1	Severe little leaf and witches' broom , internode shortening and leaf yellowing
Neyreez 2	Severe little leaf and witches' broom , internode shortening and leaf yellowing
Sanandaj	Mild little leaf and witches' broom, mild internode shortening and mild reddening of leaves
Moshkan	Mild little leaf and witche's broom, mild internode shortening and no obvious change of leaf color
Kerman1	Severe little leaf, mild witches' broom, internode shortening and leaf reddening
Kerman2	Severe little leaf, mild witches' broom, internode shortening and severe leaf reddening

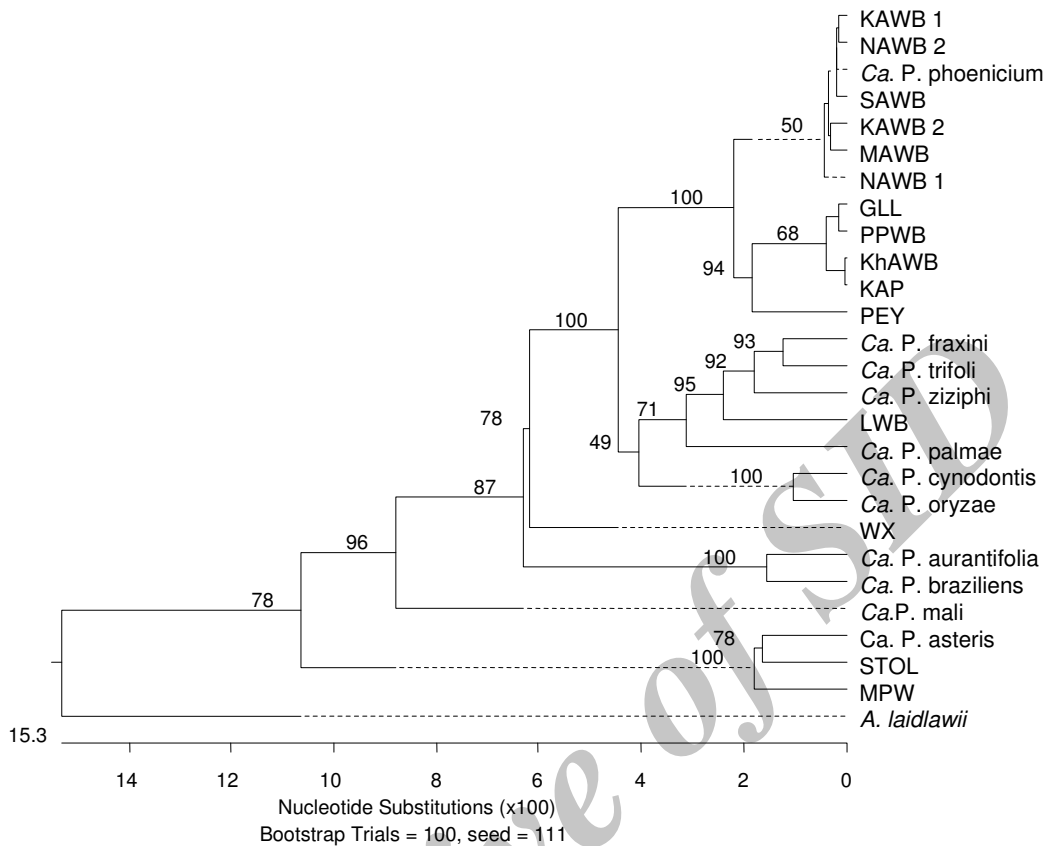


شکل ۵. دندروگرام حاصل از شباهت ترادف نوکلئوتیدی ۱۲۰۰ جفت باز از ژن آر ان ای ریپوزومی 16S سیزده فیتوپلاسمای و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup با استفاده از گزینه درخت فیلوژنتیکی در نرم افزار DNAMAN. برای اسامی فیتوپلاسمای و رس شمارهها به جدول شماره ۱ رجوع شود.

Fig. 5. Phylogenetic tree constructed from the alignment of 1200 bp of 16S rRNA gene of 13 phytoplasmas and *A. laidlawii*, as outgroup using phylogenetic option of DNAMAN software. See Table 1 for abbreviations and accession numbers.

(استان کرمان) مشکان (استان فارس) و سنندج (استان کردستان) گزارش می‌شود. براساس مایه‌زنی نهال‌های سالم بادام تلخ با جدایه‌های فیتوپلاسمای همراه جاروک بادام در شرایط کنترل شده و ایجاد علائمی متفاوت توسط این فیتوپلاسمای در نهال‌های بادام تلخ (شکل ۱ و جدول ۲)، آزمون چند شکلی طولی قطعات برشی (شکل ۴)، مقایسه میزان تشابه نوکلئوتیدی (جدول ۳) و آنالیز

(Jawdah *et al.*, 2002). در ایران این بیماری پیش‌تر به‌عنوان یک بیماری فیتوپلاسمایی و مهم از مناطق خفر، میمند و نی‌ریز در استان فارس (Salehi and Izadpanah 1998; Salehi and Izadpanah 1995)، استان‌های چهارمحال و بختیاری (شهرکرد)، اصفهان (شهرضا) و کرمان (بافت) (Salehi *et al.* 2000) گزارش شده بود. در این تحقیق برای اولین بار بیماری جاروک از کرمان

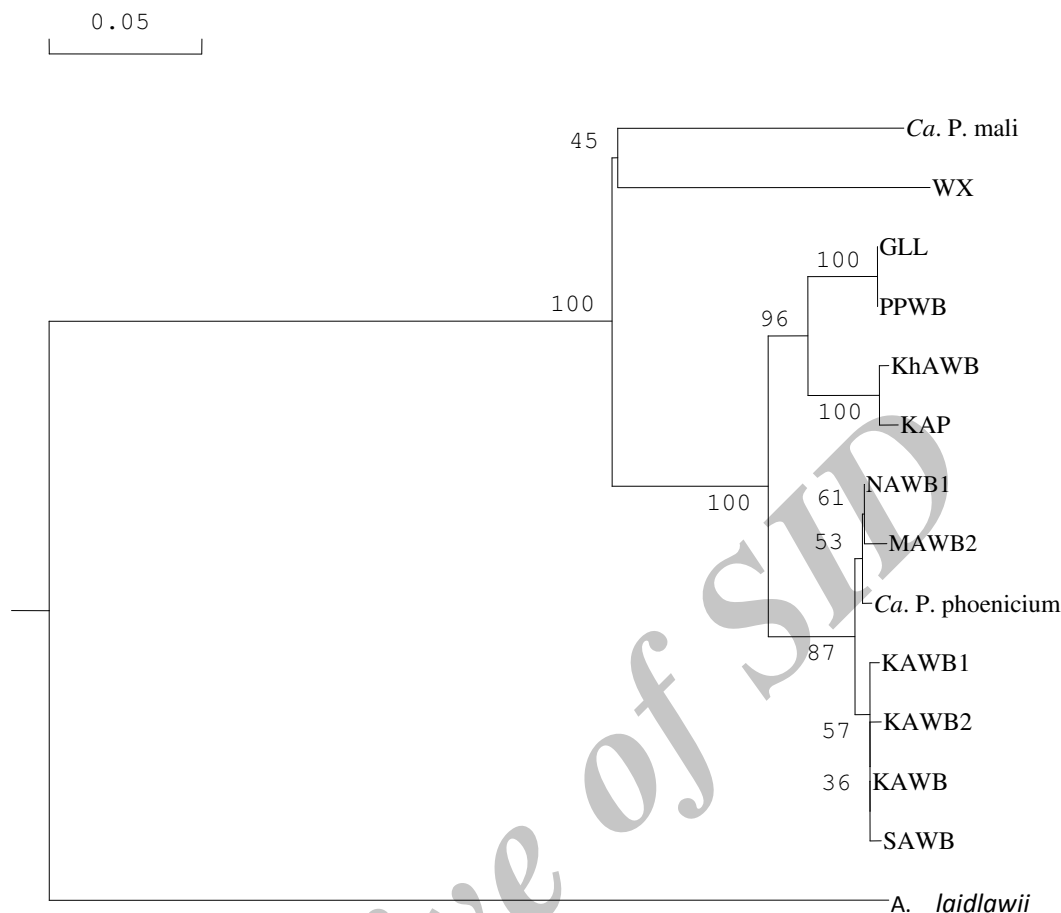


شکل ۶. دندروگرام حاصل از شباهت ترادف نوکلئوتیدی ژن آر آن ای ریپوزومی 16S بیست و شش فیتوپلازما و *Acholeplasma laidlawii* با استفاده از گزینه درخت فیلوژنتیکی در نرم‌افزار DNASTAR. برای اسامی فیتوپلازماها و رس شماره‌ها به جدول شماره ۱ رجوع شود.

Fig. 6. Phylogenetic tree constructed from the alignment of full length sequences of 16S rRNA gene of 26 phytoplasmas and *Acholeplasma laidlawii* as outgroup, using phylogenetic tree option of DNASTAR software. See Table 1 for abbreviations and accession numbers.

(شکل ۳) ولی هضم آنزیمی محصول PCR مستقیم با جفت آغازگر P1/P7 شامل ژن آر آن ای ریپوزومی ۱۶S، فاصله میانی ژن ریپوزومی ۱۶S و ۲۳S و ابتدای ژن ۲۳S (۱۸۰۰ جفت باز) با آنزیم‌های مذکور نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه یکسان نیستند و براساس مقایسه نقوش حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *CfoI* جدایه مشکان و براساس هضم آنزیمی با آنزیم برشی *HinfI*

تبارزایی (شکل‌های ۶ و ۷) تنوع زنتیکی در بین جدایه‌های جاروک بادام مورد بررسی وجود دارد. براساس RFLP محصول PCR دو مرحله‌ای (تقریباً ۱۲۰۰ جفت باز از ابتدای ژن آر آن ای ریپوزومی) با آنزیم‌های *AluI* *CfoI*، *HaeIII*، *HinfI*، *HpaII*، *RsaI*، *TaqI* در بین جدایه‌های استان کرمان (کرمان ۱ و کرمان ۲)، استان فارس (مشکان، نیریز و نیریز ۲) و یک جدایه از سندج تفاوتی دیده نشد



شکل ۷. دندروگرام حاصل از شباهت ترادف نوکلئوتیدی ۱۸۰۰ جفت باز از خوشه ژنی آر ان ای ریبوزومی سیزده فیتوپلاسمای و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان **outgroup** با استفاده از گزینه درخت فیلوژنتیکی در نرم افزار DNAMAN. برای اسامی فیتوپلاسمای و رس شمارهها به جدول شماره ۱ رجوع شود.

Fig. 7. Phylogenetic tree constructed from the alignment of 1800 bp of rRNA operon of 13 phytoplasmas and *Acholeplasma laidlawii* as outgroup, using phylogenetic tree option of DNAMAN software. See Table 1 for abbreviations and accession numbers.

تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد (شکل ۷). در آزمون RFLP، مقایسه میزان تشابه نوکلئوتیدی و آنالیز تبارزایی، جدایه‌های جاروک بادام حداقل تا ۱۲۰۰ جفت باز از ابتدای ژن آر ان ای ریبوزومی 16S تفاوت ژنتیکی ندارند و تفاوت ژنتیکی مشاهده شده مربوط به ۶۰۰ جفت باز از پرون آر ان ای ریبوزومی شامل انتهای ژن 16S، ناحیه SR و ابتدای ژن 23S می‌باشد. به نظر می‌رسد برای بررسی

جدایه کرمان ۲ با سایر جدایه‌ها تفاوت دارند (شکل ۴). در مجموع جدایه‌ها به سه گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول شامل جدایه مشکان، گروه دوم شامل جدایه کرمان ۲ و گروه سوم شامل جدایه‌های کرمان ۱، نیریز ۱، نیریز ۲ و سنندج می‌باشند. مقایسه میزان تشابه نوکلئوتیدی در ناحیه SR نیز نشان داد که جدایه‌های جاروک بادام یکسان نیستند و به‌ویژه جدایه مشکان با دیگر جدایه‌های مورد مطالعه

جدول ۳. درصد تشابه نوکلئوتیدی بین جدایه‌های جاروک بادام مورد استفاده در این مطالعه

Table 3. Percent sequence identity between almond witches' broom isolates used in this study

KhAWB*	KAWB1	KAWB2	MAWB	NAWB1	NAWB2	SAWB	AP	A. <i>laidlawii</i>
KhAWB	98.7	98.7	98.5	98.9	98.8	98.7	82.4	42.3
KAWB1		99.6	98.5	99.2	99.6	99.6	82.9	42.8
KAWB2			98.1	98.9	99.2	99.2	82.4	42.8
MAWB				99.2	98.1	98.1	81.4	42.8
NAWB1					98.9	98.9	82.4	42.4
NAWB2						99.2	82.9	42.8
SAWB							82.4	42.8
AP								42.3

*: برای اسامی فیتوپلاسمها و رس شماره‌های مربوطه به جدول شماره ۱ مراجعه شود.

*: see Table 1 for abbreviations and accession numbers.

میزبانی نیز می‌تواند در تنوع ژنتیکی عامل جاروک بادام تأثیرگذار می‌باشد. پیشتر نیز گزارش شده بود که فیتوپلاسمهای عامل بیماری جاروک بادام در مناطق نیریز و خفر (استان فارس) یکسان نیستند و در مقایسه با فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام در خفر، فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام در نیریز شباهت بیشتری به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام در لبنان دارد (Salehi *et al.* 2006). در تحقیق حاضر نیز وجود این تفاوت تأیید شد. بررسی‌های بیشتر ممکن است وجود میزان بالاتری از تنوع را آشکار سازد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (122- 121) متن انگلیسی مراجعه شود.

تنوع ژنتیکی جدایه‌های جاروک بادام ترادف محصول PCR با جفت آغازگر R16f2n/R16R2 (۱۲۰۰ جفت باز از ژن ار ان ای ریوزومی) مناسب نیست و ترادف محصول PCR با جفت آغازگر P1/P7 که شامل ناحیه SR می‌شود ترجیح داده می‌شود. پیشتر اهمیت ناحیه SR برای تشخیص فیتوپلاسمهای نزدیک گزارش شده است (Kirkpatrick *et al.* 1994). کشت بادام در ایران سابقه بسیار طولانی دارد و منشأ بادام را به ایران و کشورهای آسیای مرکزی نسبت می‌دهند (Kester & Gradziel 1996). به دلیل سابقه طولانی کشت بادام و به‌ویژه وجود ارقام وحشی بادام در ایران که در آنها نیز بیماری جاروک گزارش شده (Salehi *et al.* 2000) و تنوع علایم بیماری جاروک بادام در برخی نقاط ایران، تنوع ژنتیکی در فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام دور از انتظار نبود. پیشتر آلودگی طبیعی هلو و شلیل در ایران (Salehi *et al.* 2006) و لبنان (Abou-Jawdah *et al.* 2002) گزارش شده است و در آزمایشگاه نیز عامل بیماری جاروک بادام از طریق پیوند به اکثر هسته‌دارها قابل انتقال بوده است (Abbasian & Salehi 2010). تنوع