مقاله کوتاه

تعیین برخی از ویژگی‌های فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک یونجه در استان بوشهر*

PARTIAL CHARACTERIZATION OF A PHYTOPLASMA ASSOCIATED WITH ALFALFA WITCHES' BROOM IN BUSHEHR PROVINCE

داوود رئوفی[1] و محمد صالحی[2]**

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

چکیده

به منظور تعیین ویژگی‌های فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک یونجه در استان بوشهر در هر یک از مناطق بندارروز(۱جدایه)، سرکره(۲جدایه)، پشت پر(۱جدایه)و تنگ ارم(۱جدایه)یک بوته یونجه با علایم بارز بیماری جاروک انتخاب و به گلخانه انتقال داده شد تا به‌عنوان منبع عامل بیماری در مطالعات انتقال عامل بیماری و آزمون‌های مولکولی استفاده شود. در گلخانه عامل بیماری جاروک به‌وسیله سس از هر بوته یونجه به یک بوته سالم پروانش انتقال داده شدو در پروانش‌های مایه‌زنی شده علایم بیماری‌های فیتوپلاسمایی ظاهر شد. از نظر ایجاد علایم در پروانش، جدایه‌های فیتوپلاسمای جاروک یونجه در استان بوشهر قابل تفکیک نبودند. در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) با استفاده از جفت آغازگر P_1/P_7در همه جدایه‌ها قطعه مورد انتظار(۱۸۰۰ جفت باز از اپرون ار ان ای ریبوزومی) تکثیر شد.آزمون چند شکلی طول قطعات برشی (RFLP)باآنزیم‌های *Alu*I،*Cfo*I،*Hae*III،*Hpa*IIو *Rsa*I، نشان داد که براساس ۱۸۰۰ جفت باز از اپرون ار ان ای ریبوزومی جدایه‌های فیتوپلاسمای جاروک یونجه در استان بوشهر با یکدیگر و با فیتوپلاسماهای عامل جاروک یونجه در فارس (جدایه‌های جویم ۱ و مبارک آباد)و یزد (جدایه ابرکوه) که متعلق به گروه جاروک بادام زمینی(16SrII)هستند، تفاوتی ندارند و فقط از نظر جایگاه آنزیم*Cfo*I با یک جدایه از فارس (جویم۲)متفاوتند. جستجو با برنامه BLAST و آنالیز فیلوژنتیکی ترادف محصول PCR با جفت آغازگر P1/P7 نیز نشان داد که عامل جدایه بندارروز به‌عنوان نماینده جدایه‌های فیتوپلاسمای جاروک یونجه در استان بوشهر متعلق به گروه جاروک بادام زمینی است. بیماری جاروک یونجه برای اولین‌بار از نقاط مختلف استان بوشهر گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: یونجه، جاروک، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، چند شکلی طولی قطعات برشی، آنالیز تبارزایی، استان بوشهر

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

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

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

۲. استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

جاروک یکی از بیماری‌های مهم و اقتصادی در یونجه است که برای اولین‌بار از استرالیا (Edwards 1936) و سپس در بسیاری از مناطق دنیا ازجمله ایالات متحده امریکا (Menzies 1946) استرالیا (Bowyer *et al.* 1969)، ایتالیا(Marcone *et al.* 1997)، چکسلواکی (Smarz *et al.* 1981)، عربستان سعودی (Cook & Wilton 1985)، افریقای جنوبی (Thompson & Pieterson 1988)، کانادا(Khadhir *et al.* 1997)، چین (Chen *et al.* 1996)، لیتوانی(Valuinas*et al.* 2000)، عمان(Khan *et al.* 2002)، آرژانتین(Conci *et al.* 2005) و بولیوی (Jones *et al.* 2005)گزارش شده است.

علایم بیماری شامل رشد تعداد زیادی ساقه کوتاه و باریک از محل طوقه، انشعاب بیش از حد جوانه‌های جانبی ساقه، ریز برگی، گرد شدن و چروکیدگی برگ‌ها، تغییرات در گل، کوتولگی شدید، زردی و بالاخره خشکیدگی و مرگ گیاه می‌باشد. عامل بیماری در طبیعت توسط زنجرک منتقل می‌شود (Klostermeyer & Menzies 1951, Helms 1957). گسترش جاروک در مزارع کوچک و تنک نسبت به کشت‌های بزرگ و انبوه سریع‌تر است و جایگزینی مزارع آلوده و مسن به‌وسیله کشت مجدد، تقویت گیاه به‌وسیله عملیات مناسب زراعی و کشت متراکم به‌عنوان روش‌های مؤثر در پیشگیری از وقوع آلودگی و گسترش بیماری گزارش شده است (Menzies 1951). تا به‌حال فیتوپلاسماهایی از گروه 16SrI درلیتوانی، بولیوی و استرالیا (Valuinas *et al.* 2000, Jones *et al.* 2005,Getachew et al., 2007)، 16SrII در ایتالیا و عمان (Marcone *et al.* 1997, Khan *et al.* 2002)، 16SrVI در کانادا(Wang and Hiruki 2001) 16SrVIIدرآرژانتین(Conci *et al.* 2005)، گزارش شده‌اند. در ایران این بیماری برای اولین‌بار از استان فارس گزارش گردید (Salehi *et al.* 1995) و در حال حاضر در استان‌های سیستان- بلوچستان، کرمان، اصفهان، و یزد گسترش دارد(Salehi *et al.* 1995, Salehi *et al.* 2000). ماهیت فیتوپلاسمایی جاروک یونجه در ایران براساس علایم بیماری، انتقال با زنجرک، پیوند و سس، واکنش مثبت در مقابل رنگ‌آمیزی دینس و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)به اثبات رسیده است (Salehi *et al.* 1995, Salehi *et al.* 2005). ناقل فیتوپلاسمای عامل جاروک یونجه در ایران زنجرک *Orosius albicinctus* Distant می‌باشد (Salehi *et al.* 1995). براساس نتایج حاصل از آنالیزهای ترادف ار ان ای ریبوزومی فیتوپلاسمای عامل جاروک یونجه در استان های فارس و یزد متعلق به گروه فیتوپلاسمایی 16SrII می‌باشد(Salehi *et al.* 2005).

براساس آزمایش بلات نقطه‌ای، الیزای غیرمستقیم و تأثیر متفاوت روی گیاه پروانش، فیتوپلاسماهای جاروک یونجه در یزد با فارس قابل تفکیک می‌باشند (Esmailzadeh-Hosseini 2000, Salehi & Izadpanah 2000, Salehi *et al.* 2000). از ماهیت فیتوپلاسماهای همراه با جاروک یونجه در دیگر استان‌های ایران اطلاع دقیقی در دست نیست. گزارش حاضر نتایج بررسی مناطق یونجه کاری استان بوشهر از نظر وجود بیماری جاروک، تعیین برخی از ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسمای جاروک یونجه در این استان و مقایسه عامل جاروک یونجه در استان بوشهر با فیتوپلاسما های عامل جاروک یونجه در استان‌های فارس و یزد می‌باشد.

www.SID.ir

روش بررسی

به منظور تعیین خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی عامل بیماری جاروک یونجه در استان بوشهر، در سال ۸۸ از مناطق عمده یونجه کاری این استان شامل بنداروز، سرکره، پشت پر و تنگ ارم بازدید به عمل آمد و در هر منطقه یک بوته یونجه دارای علایم بارز بیماری جاروک انتخاب و پس از نشا در یک گلدان به گلخانه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس در زرقان منتقل شد تا از آنها به‌عنوان منبع عامل بیماری در آزمایش انتقال با سس و آزمون‌های مولکولی استفاده شود. گیاهان مورد آزمایش شامل پروانش، چغندر قند و یونجه از طریق بذر در گلخانه تکثیر و تا زمان انجام آزمایشات در یک گلخانه عاری از حشرات نگهداری شدند. زمان مایه‌زنی گیاهان مورد آزمایش با عامل بیماری حدود پنج ماه بعد از کشت بود.

برای انتقال با سس،گلدان‌های حاوی سس سالم روی بوته چغندرقند در نزدیکی گلدان‌های حاوی پروانش‌های سالم قرار داده شد. بیست روز بعد و پس از استقرار و تکثیر سس سالم روی بوته‌های پروانش، اتصال بین گلدان‌های چغندرقند و پروانش قطع و ۵ گلدان پروانش حاوی سس سالم هر یک جداگانه در مجاورت یک گلدان محتوی یونجه دارای علایم جاروک و واکنش مثبت در آزمون PCR (به‌عنوان یک جدایه از فیتوپلاسمای جاروک یونجه)قرار داده شد. با این روش از طریق سس به‌طور جداگانه بین جدایه‌های مختلف فیتوپلاسمای جاروک یونجه استان بوشهر و بوته‌های پروانش سالم ارتباط برقرار شد. بعد از ۳۰روز ارتباط بین بوته‌های یونجه و پروانش قطع و بوته‌های پروانش عاری از سس شدند. پروانش‌های مایه‌زنی شده برای مشاهده علایم در یک گلخانه عاری از حشرات نگهداری شدند. آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده با آزمون PCR بررسی گردید.

با روش *ژانگ و همکاران*(Zhang *et al*. 1998) از ۰/۲ گرم بافت رگبرگ میانی نمونه‌های یونجه علایم‌دار در طبیعت، پروانش‌های مایه‌زنی شده در شرایط گلخانه و گیاهان سالم یونجه و پروانش دی ان ای کل استخراج گردید. آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 که قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز از اپرون ار ان ای ریبوزومی را تکثیر می‌کند (Schneider *et al.*1995) انجام شد. مقدار مواد مورد استفاده در هر واکنش ۵۰ میکرولیتری، چرخه دمایی و سایر شرایط PCR به روش قبلی بود(Salehi *et al*. 2005b). محصول PCR در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید از باندهای حاصل عکسبرداری شد.

درآزمون چند شکلی طول قطعات برشی(RFLP)، محصول PCR مستقیم با جفت آغازگر P1/P7 (۱۸۰۰ جفت باز) مربوط به هر نمونه به‌طور جداگانه با آنزیم‌های *Alu*I، *Hae*III، *Hpa*II، *Cfo*I و *Rsa*I، برش داده شد. 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 شد و سپس به‌مدت چهار ساعت در دستگاه ترموبلاک با دمای C ۳۷ (در مورد آنزیم *Taq*I C ۶۵) قرار داده شد. محصول هضم آنزیمی با آنزیم‌های مختلف در ژل آگاروز دو درصد الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت مورد بررسی قرار گرفت.

به‌دلیل یکسان بودن جدایه‌های یونجه در آزمون RFLP، جدایه بنداروز برای همسانه‌سازی، تعیین ترادف و تجزیه و تحلیل ترادف‌ها انتخاب شد. محصول PCR با آغازگر P1/P7 با استفاده از InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit درپلاسمید pTZ57R/T و در

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. نام، گروه و رس شمار فیتو پلاسماهای مورد استفاده در آنالیز فیلوژنتیکی

Table 1 .A list of phytoplasmas with group designation and GenBank accession number of phytoplasmas used in phylogenetic analysis.

Acronym	Phytoplasma strain designation	RFLP Group	Accession number
A. laidlawii	*Acholeplasma laidlawii*		D13260
BAlfWB	Bushehr Alfalfa witches'-broom	16SrII	JN860711
Ca. P. asteris	*Candidatus* Phytoplasma asteris	16SrI	M30790
Ca. P. aurantifolia	*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia	16SrII	U15442
CaP	Cactus phytoplasma	16SrII	AF200718
FBP	Faba bean phyllody	16SrII	X83432
FAlfWB	Fars Alfalfa witches'-broom	16SrII	DQ233655
IAlfWB	Italian alfalfa witches'-broom	16SrII	Y16390
OAlfWB	Oman Alfalfa witches'-broom	16SrII	AF438413
PYC	Papaya yellow crinkle	16SrII	Y10097
SP	Sunhemp witches' broom	16SrII	AF037595
YAlfWB	Yazd Alfalfa witches'-broom	16SrII	DQ233656

سویه *Echerichia coli* DH5α همسانه‌سازی شد. پلاسمیدها پس از خالص‌سازی به منظور تعیین ترادف به شرکت ماکروژن(سئول، کره جنوبی) ارسال گردید. با استفاده از ترادف به‌دست آمده و با استفاده از برنامه بلاست(BLAST) نزدیک‌ترین ترادف با فیتوپلاسمای جاروک یونجه بنداروز جستجو گردید. مقایسه هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلوتیدی و محاسبه میزان اختلاف ژنتیکی بین فیتوپلاسماهای مورد نظر (جدول ۱) با برنامه Clustal W با استفاده از نرم‌افزار LaserGene(DNASTAR,Madinson, W1) انجام شد. آنالیز فیلوژنتیکی نیز با استفاده از همین نرم‌افزار انجام شد. از *Acholeplasma laidlawii* به‌عنوان outgroup استفاده گردید.

نتیجه و بحث

در تمام مناطق یونجه کاری استان بوشهر شامل بنداروز، سرکره، پشت پر و تنگ ارم علایم بیماری جارک دیده شد. میزان آلودگی از صفر در محمود آباد تا ۱۰۰ درصد در بنداروز متغیر بود. علایم بارز بیماری جاروک یونجه در این مناطق عبارت بودند از ریز برگی، گرد شدن و چروکیدگی برگ‌ها، زردی، کاهش فاصله میانگره‌ها، جاروک در محل طوقه، کوتولگی وتغییرات گل شامل گل سبزی، برگسانی و عقیمی(شکل ۱). پنج بوته یونجه علایم‌دار به‌عنوان پنج جدایه فیتوپلاسمای بیماری جاروک یونجه از مناطق بنداروز، سرکره، پشت پر و تنگ ارم انتخاب و پس از انتقال به گلخانه از آنها به‌عنوان منبع عامل بیماری در آزمایش‌های انتقال و مولکولی استفاده گردید. در جدول ۲ جدایه‌های مختلف، محل جمع‌آوری و علایم بارز بیماری در آنها مشخص شده است.

عامل بیماری از پنج بوته یونجه آلوده مربوط به پنج جدایه به بوته‌های سالم پروانش انتقال داده شد و در آنها علایم بیماری فیتوپلاسمائی شامل زردی، گل سبزی، برگسانی، کاهش فاصله میانگره‌ها، ریزبرگی، زردی، جاروک و کوتولگی ظاهر شد (شکل ۲). علایم بیماری ناشی از مایه‌زنی بوته‌های پروانش با جدایه‌های

www.SID.ir

شکل ۱. علایم بیماری جاروک شامل تنک شدن، ریزبرگی، زردی، جاروک و کوتولگی بوته‌های یونجه در یک مزرعه در بندارروز(A) و جاروک طوقه در یک بوته یونجه در مزرعه (B).

Fig. 1. Thin stand,little leaf, yellowing, witches' broom and stunting in an alfalfa field inBondaroozdue to witches' broom disease (A) and an alfalfa plant showing crown witches' broom(B).

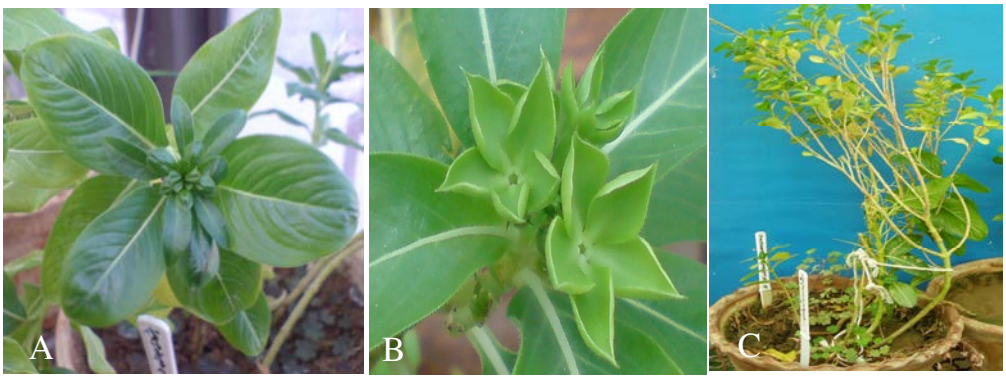
جدول ۲. جدایه‌های مختلف فیتوپلاسمای جاروک یونجه در استان بوشهر، محل جمع‌آوری و علایم بارز بیماری ناشی از آنها

Table 2. Alfalfa witches' broom phytoplasma isolates in Bushehr province, location of collection and disease symptoms

Alfalfa witches' broom phytoplasma isolate	Location of isolate	Disease symptoms
1	Bondarooz	Severe and compact crown witches' broom and severe stunting
2	Sarkoreh	Pale yellow and spindly shoots from the crown , short spindly shoots from axillary buds along the stem, flower virescence, phyllody and proliferation
3	Sarkoreh	short spindly shoots from axillary buds along the stem, flower virescence, phyllody and proliferation
4	Poshtpar	Short spindly shoots from axillary buds along the stem, flower virescence, phyllody and proliferation
5	Tange-eram	crown witches broom and severe stunting

مختلف فیتوپلاسمای جاروک یونجه تقریباً یکسان بود. حداقل دوره نهفتگی یک ماه با جدایه پشت پر و حد اکثر ۴۵ روز با جدایه تنگ ارم بود. در آزمون PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگر P_1/P_7 قطعه مورد انتظار(۱۸۰۰ جفت باز) در نمونه‌های دی ان ای کل استخراج شده از بوته‌های یونجه علایم‌دار در طبیعت که به‌عنوان جدایه‌های جاروک یونجه از نقاط مختلف استان بوشهر جمع‌آوری شده بود و هم‌چنین از بوته‌های پروانش مایه‌زنی شده با فیتوپلاسماهای عامل جاروک در جدایه مختلف تکثیر شد

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲. علایم بیماری در پروانش‌های مایه‌زنی شده با عامل بیماری جاروک یونجه در استان بوشهر:(A) برگسانی اجزای گل، (B) گل سبزی، (C) ریزبرگی، زردی و کاهش فاصله میانگره‌ها

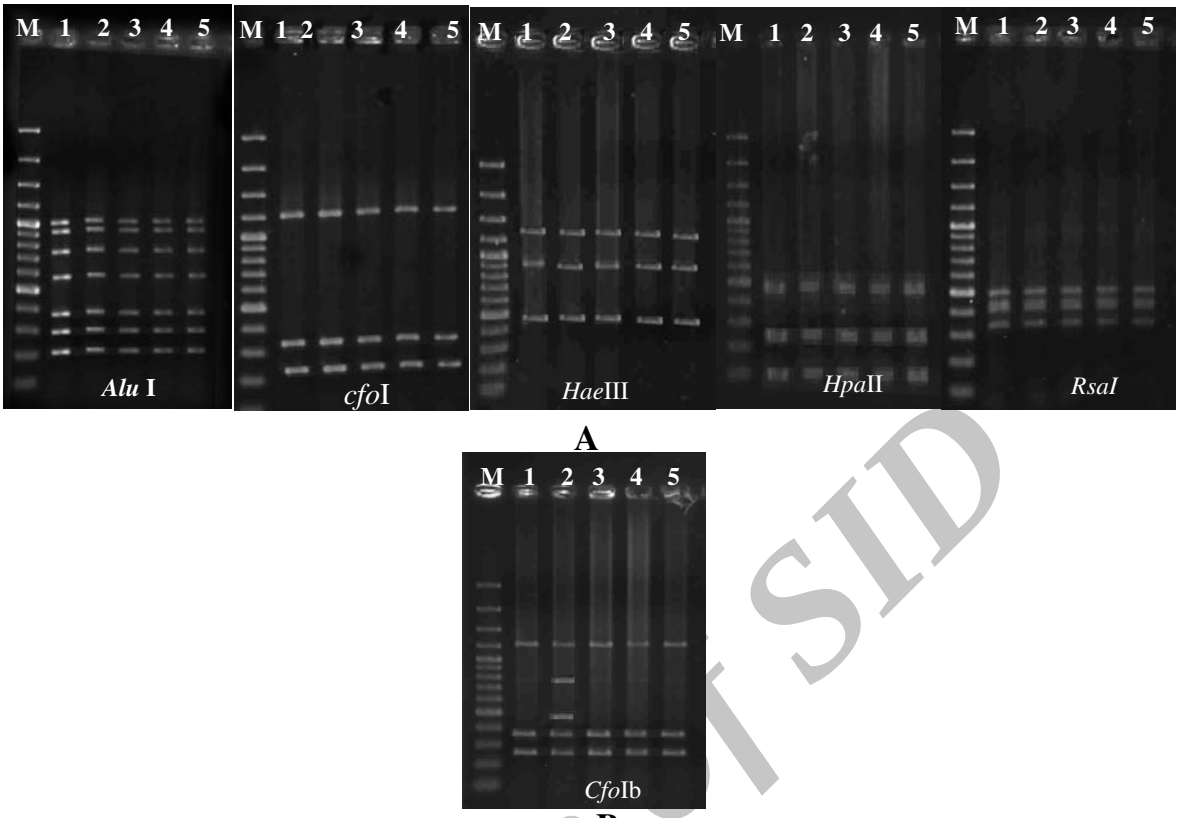
Fig. 2. Disease symptoms in periwinkle plants inoculated with Bushehr alfalfa witches' broom agent. A, flower phyllody; B, flower virescence; C, little leaf, internode shortening and yellowing.

تحت همین شرایط درنمونه دی ان ای مربوط به یونجه و پروانش سالم چنین قطعه‌ای تکثیر نشد.

محصول PCR مستقیم با جفت اغازگر P1/P7 (۱۸۰۰ جفت باز) جدایه‌های مختلف فیتوپلاسمای جاروک یونجه در استان بوشهر با آنزیم‌های *Alu*I، *Hae*III، *Hpa*II، *Cfo*I، *Rsa* I، هضم و نقوش حاصل با یکدیگر و با نتایج هضم آنزیمی محصول PCR مستقیم با جفت اغازگر P1/P7 در فیتوپلاسماهای دیگر (Khan *et al.* 2002) مقایسه شدند. نقوش حاصل از برش آنزیمی جدایه‌های بوشهر با یکدیگر یکسان بودند و به‌طورکلی به نقوش حاصل از فیتوپلاسماهای گروه ار ان ای ریبوزومی جاروک بادام زمینی (16srII)شباهت داشتند(شکل A ۳). در یک آزمون جداگانه محصول PCR مستقیم با جفت آغازگر P1/P7 مربوط به جدایه بنداروز به‌عنوان نماینده جدایه های فیتوپلاسمای جاروک یونجه در استان بوشهر وجدایه‌های فیتوپلاسمای جاروک یونجه در استان‌های فارس (جدایه‌های مبارک آباد، جویم ۱، جویم ۲) و یزد(جدایه ابرکوه) با همین آنزیم‌ها برش داده شده و نقوش حاصل با یکدیگر مقایسه شدند. این مقایسه نشان داد که نقوش حاصل از هضم آنزیمی جدایه بوشهر با نقوش حاصل از هضم آنزیمی جدایه‌های مبارک آباد، جویم ۱ و یزد تفاوتی ندارند و فقط از نظر جایگاه آنزیم *Cfo*I با جویم ۲ متفاوت است (شکل B ۳).

قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی از اپرون ار ان ای ریبوزومی جدایه بنداروز همسانه‌سازی و تعیین ترادف گردید و تحت رس شمار JN860711 در بانک جهانی ترادف‌ها قرار داده شد. جستجو با برنامه بلاست نشان داد که در بین فیتوپلاسماهای موجود در بانک جهانی ترادف‌ها جدایه بنداروز بیشترین نزدیکی را با فیتوپلاسمای گروه ار ان ای ریبوزومی جاروک بادام زمینی (16S rII) دارد. در بین فیتوپلاسماهای همراه با جاروک یونجه در گروه 16S rII بیشترین شباهت را با فیتوپلاسمای عامل جاروک یونجه فارس(ACC. No. DQ233655) و کمترین شباهت را با فیتوپلاسمای عامل جاروک یونجه عمان (AF438413)داشت. شباهت آن با فیتوپلاسماهای عامل جاروک یونجه یزد(ACC. No. DQ233655)، دیگر جدایه ایرانی، ۹۹٪ بود. با استفاده از نرم‌افزار LaserGene ترادف ۱۸۰۰جفت بازی از اپرون ار

www.SID.ir



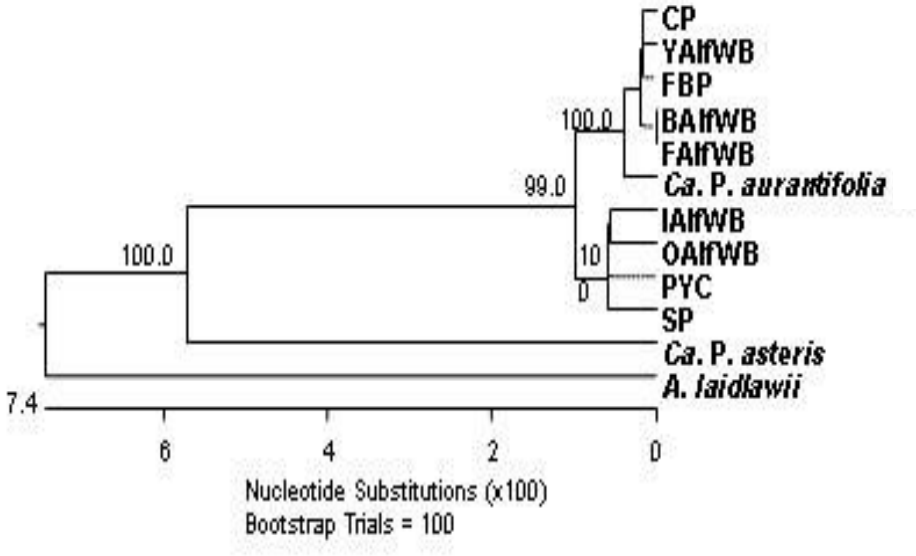
شکل۳. الکتروفورز هضم آنزیمی محصول PCR با جفت آغازگر P1/P7 با آنزیم‌های *Alu*1، *Cfo*1، *Hae*III، *Hpa*II و *Rsa*1 در ژل آگاروز ۲ درصد .A: نمونه‌های پروانش مایه‌زنی شده با جدایه‌های بندارروز، سرکره۱، سرکره۲، پشت پر و تنگ ارم(به‌ترتیب ۱ تا ۵) ؛B: نمونه‌های پروانش مایه‌زنی شده با جدایه‌های یونجه بندارروز (استان بوشهر)، جویم۲، جویم۱ و مبارک آباد(استان فارس) و ابرکوه(استان یزد) (به‌ترتیب ۱ تا ۵) ؛ M، مارکر

Fig. 3. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles of P1/P7 primed PCR products with*AluI, CfoI, Hae*III, *Hpa*II and *Rsa*I enzymes separated through a 2% agarose gel.A, periwinkle plants inoculated with Bondarooz, Sarkoreh1, Sarkoreh2, Poshtpar and Tange- eram isolates (Lanes 1-5, respectively) ; B,periwinkle plants inoculated with Bondarooz(Bushehr Province), Juyom 2, Juyom 1, Mobarakabad(Fars province) and Abarkooh (Yazd Province) isolates (Lanes 1-5, respectively); M, DNA ladder

ان. ای ریبوزومی با ترادف‌های مشابه در ۱۱ فیتوپلاسما و *Acholeplasma laidlawii* به‌عنوان Outgroup مقایسه و دندروگرام تبارزایی(شکل۴) ترسیم گردید. این آنالیز نشان داد که جدایه بندارروز همراه با فیتوپلاسماهای عامل جاروک یونجه یزد و فارس با فیتوپلاسماهای گروه 16SrII طبقه‌بندی می‌شود و در بین اعضای انتخابی این گروه بیشترین نزدیکی را با جدایه فارس دارد و به‌ترتیب با فیتوپلاسماهای عامل جاروک یونجه در یزد و عمان رابطه دورتری دارد.

بیماری جاورک یونجه در استان بوشهر یکی از بیماری‌های بسیار مهم و اقتصادی یونجه است زیرا میزان آلودگی در برخی نقاط استان مانند بندارروز به ۱۰۰ درصد می‌رسد. در این پژوهش برای اولین‌بار این بیماری از نقاط مختلف استان بوشهر گزارش می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴. دندروگرام حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی ژن ار ان ای ریبوزومی 16S در ۱۱فیتوپلاسما و *Acholeplasma laidlawii* به‌عنوان outgroup با استفاده از نرم‌افزار LaserGene. برای اسامی فیتوپلاسماها ورس شمارها به جدول شماره ۱ رجوع شود.

Fig. 8. Phylogenetic tree constructed from the alignment of full length 16S rRNA gene nucleotide sequences of 11phytoplasmas and *Acholeplasma laidlawii* as outgroup using LaserGenesoftware. See table 1 for abbreviations and accession numbers.

پیشتر بیماری جاروک یونجه از مزارع استان‌های فارس، یزد، سیستان و بلوچستان، کرمان و اصفهان گزارش شده است(Salehi *et al*. 1995, Salehi *et al*. 2000). براساس علایم بیماری، انتقال باسس و واکنش مثبت در آزمون PCR، جاورک یونجه در استان بوشهرماهیت فیتوپلاسمایی دارد. براساس ایجاد علایم مشابه در پروانش و نقوش یکسان در RFLP ۱۸۰۰ جفت باز اپرون ار ان ای ریبوزومی، در مناطق یونجه کاری استان بوشهر تنوعی در فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک یونجه وجود ندارد. تفاوت علایم بیماری جاروک در مناطق مختلف استان بوشهر (جدول ۲) ناشی از تنوع ژنتیکی قیتوپلاسمای عامل بیماری نیست و بیشتر مربوط به مراحل مختلف آلودگی بوته‌های یونجه، تنوع ارقام و شرایط مزاریونجه به‌ویژه تراکم بوته می‌باشد. (Esmailzadeh-Hosseini 2008).

نقوش حاصل از هضم انزیمی ۱۸۰۰ جفت باز از اپرون ار ان ای ریبوزومی(شکل B ۴) نشان داد که فیتوپلاسمای عامل جاروک یونجه در استان بوشهر با جدایه های جاروک یونچه در فارس و یزد یکسان می‌باشد. فیتوپلاسماهای عامل جاروک یونجه در فارس و یزد متعلق به گروه فیتوپلاسمایی جاروک بادام زمینی می‌باشند (salehi *et al.* 2000a) و بر این اساس نتیجه‌گیری می‌شود که فیتوپلاسمای جاروک یونجه در بوشهر متعلق به گروه فیتوپلاسمایی جاروک بادام زمینی (16SrII)می‌باشد. جستجو با برنامه BLAST و آنالیز تبارزایی(شکل ۴) نیز تعلق فیتوپلاسمای عامل جاروک یونجه بوشهر به گروه جاروک بادام زمینی را تأیید کرد. براساس میزان تشابه نوکلئوتیدی و دندروگرام فیلوژنتیکی، جاروک یونجه

www.SID.ir

بوشهر با فیتوپلاسمای عامل جاروک یونجه فارس شباهت بسیار زیادی دارد ولی از فیتوپلاسماهای عامل جاروک یونجه در یزد، عمان و ایتالیا متفاوت است. استان‌های فارس و بوشهر مرزهای مشترک دارند و احتمالاً فیتوپلاسمای جاروک یونجه از طریق ناقل بین آنها رد و بدل می‌شود.

با توجه به این‌که فیتوپلاسماها در طبیعت توسط ناقل (زنجرک‌ها پاپسیل) منتقل می‌شوند(Purcell 1982) بنابراین در استان بوشهر ناقل فعالی برای انتقال بیماری وجود دارد. در استان بوشهر باید زنجرک‌های مختلف در مزارع یونجه استان از نظر انتقال عامل جاروک یونجه مورد بررسی قرار گیرند. در ایران پیشتر زنجرک *Orosius albicinctus* به‌عنوان ناقل بیماری جاروک در فارس گزارش شده است (Salehi *et al.* 1995). در استان بوشهر زمستان ملایم است و معمولاً بوته های یونجه آلوده برخلاف مناطق سردتر که در زمستان از بین می‌روند دوام آورده و منبع عامل بیماری برای آلودگی کشت‌های جدید می‌باشند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (145-143) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir