تعیین ویژگی‌های انتقال فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو در استان فارس با زنجرک *Neoaliturus fenestratus*

TRANSMISSION CHARACTERISTICS OF LETTUCE PHYLLODY PHYTOPLASMA BY *Neoaliturus fenestratus* In Fars

شیوا دهقان[۱]، محمد صالحی[۲**]، امین خوانچه‌زر[۳]، نوذر رستگاری[۲] و محمد سالاری[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۲/۲۷؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۹/۲۳)

چکیده

بیماری فیلودی کاهو در فارس که ناشی از یک فیتوپلاسما از گروه جاروک نخود کبوتر (pigeon pea witches' broom) می‌باشد در طبیعت توسط زنجرک *Neoaliturus fenestratus* منتقل می‌شود. خصوصیات انتقال این فیتوپلاسما با زنجرک مزبور شامل زمان گیرش، دوره کمون و زمان دهش مورد بررسی قرار گرفت. حداقل مدت گیرش چهار ساعت بود و با اضافه شدن زمان دسترسی زنجرک سالم به کاهوی آلوده به فیتوپلاسمای عامل بیماری راندمان انتقال بالا رفت. حداقل دوره نهفتگی عامل بیماری در بدن زنجرک ناقل ۱۴ روز بود . راندمان انتقال ۳۲ روز پس از شروع تغذیه به حداکثر رسید و سپس سیر نزولی داشت. حداقل مدت دهش چهار ساعت بود و با اضافه شدن مدت زمان دهش راندمان انتقال بالا رفت. نتایج به دست آمده شبیه نتایجی است که در مورد ویژگی‌های انتقال فیتوپلاسماهای دیگر و *Spiroplasma citri* با ناقل‌های خود گزارش شده است. براساس نتایج این تحقیق فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو با زنجرک ناقل مانند سایر فیتوپلاسماها رابطه تکثیری دارد.

واژه‌های کلیدی: انتقال فیتوپلاسما، رابطه فیتوپلاسما، ناقل، فیلودی کاهو

Archive of SID

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

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

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲. به ترتیب استادیاران پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس(زرقان)

۳. کارشناس‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

www.SID.ir

مقدمه

فیتوپلاسماها بیمارگرهای محدود به آوندآبکشی میزبان‌های گیاهی می‌باشند و به همین دلیل حشرات تغذیه‌کننده از آوند آبکشی پتانسیل انتقال آنها را دارند. ناقلین شناخته شده فیتوپلاسماها زنجرک‌های برگی (Cicadellidae)، زنجرک‌های بوته‌ای(Fulgoromorpha) و پسیل(Psyllidae) می‌باشند(Weintraub and Bealand 2006). ویژگی‌های انتقال با ناقل در تعداد کمی از فیتوپلاسماها شامل فیتوپلاسماهای عامل زردی مینا (Chykowski & Sinha 1969)، بیماری ایکس درختان میوه هسته‌دار(Purcell 1979)، گل سبزی قابل انتقال با زنجرک برگی چغندرقند (Golino *et al*. 1987)، کوتولگی سر انبوه ذرت (Legrand & Power 1994) و زردی اروپایی درختان میوه هسته‌دار(Carraro *et al*. 2001) مطالعه شده است.

در تحقیق حاضر ویژگی‌های انتقال با ناقل فیتوپلاسمای همراه با بیماری فیلودی کاهو مورد بررسی قرار گرفت. پیشتر این بیماری به عنوان یکی از بیماری‌های مهم و اقتصادی کاهو (*Lactuca sativa* L.) از ایران گزارش شده است (Salehi *et al*. 2007). فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو و کاهو وحشی(*Lactuca serriola* L.) در ایران متعلق به گروه جاروک نخود کبوتر (pigeon pea witches' broom) یا گروه ار.ان.ای. ریبوزومی 16SrIX می‌باشد. ناقل بیماری‌های فیلودی کاهو و کاهو وحشی در ایران زنجرک (Herrich-Schäffer) *Neoaliturus fenestratus* می‌باشد. در زمینه دامنه میزبانی فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهوکه از نظر اپیدمیولوژی و کنترل این بیماری اهمیت دارد اطلاعات کمی در دست می‌باشد. زنجرک *N. fenestratus* در شرایط گلخانه به خوبی روی کاهو و کاهوی وحشی تکثیر می‌شود و ناقلی بسیار کارا برای انتقال این فیتوپلاسما است (Salehi *et al*. 2007) . به همین دلیل این زنجرک وسیله مناسبی برای مایه‌زنی گیاهان مختلف با فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو و تعیین دامنه میزبانی این فیتوپلاسما می‌باشد. در همین راستا خصوصیات انتقال فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو با زنجرک *N. fenestratus* شامل زمان گیرش، دوره کمون عامل بیماری در بدن زنجرک و زمان دهش مطالعه گردید و گزارش حاضر نتیجه این مطالعه می‌باشد.

روش بررسی

از یک بوته کاهوی آلوده به فیتوپلاسمای عامل فیلودی با علائم بارز بیماری که قبلاً در گلخانه توسط زنجرک ناقل آلوده شده بود به عنوان منبع عامل بیماری استفاده گردید. برای تهیه کاهوی آلوده لازم برای آزمایش‌های مختلف، با استفاده از زنجرک ناقل، فیتوپلاسمای عامل بیماری از این بوته به بوته‌های سالم کاهو انتقال داده شد. برای تهیه کلنی سالم زنجرک *N. fenestratus*، در فصل پاییز با استفاده از دستگاه مکنده دی- وک از روی بوته‌های کاهو وحشی فاقد علائم بیماری فیلودی در زرقان این زنجرک جمع‌آوری شد. برای تهیه هر کلنی سالم یک جفت زنجرک (نر و ماده) روی پنج بوته چهار برگی سالم حاصل از بذر کاهو قرار داده شد تا تکثیر شوند. برای اطمینان از عدم آلودگی کلنی‌های سالم، از هر کلنی نمونه‌هایی در آزمون پی سی آر دو مرحله‌ای از نظر آلودگی به فیتوپلاسما آزمایش شدند. برای تهیه هر کلنی آلوده پنج جفت زنجرک (نر و ماده) تازه بالغ *N. fenestratus* از یک کلنی سالم انتخاب و روی یک بوته کاهوی آلوده به فیتوپلاسمای عامل فیلودی قرار داده شدند. برای اطمینان از آلودگی کلنی‌های آلوده، از هر

www.SID.ir

کلنی نمونه‌هایی از زنجرک‌های *N. fenestratus* در آزمون پی سی آر دو مرحله‌ای از نظر آلودگی به فیتوپلاسما آزمایش شدند. بوته‌های کاهوی مورد استفاده در آزمایش‌های تعیین خصوصیت انتقال، از طریق بذر در گلخانه تکثیر و در یک گلخانه عاری از حشرات نگهداری شدند. درآزمایش‌های مختلف، بوته‌های کاهو در سن چهار هفتگی با فیتوپلاسمای عامل فیلودی مایه‌زنی شدند. کلیه آزمایش‌ها در گلخانه‌ای با دمای ۳۰°C در روز و ۲۶ °C در شب و حدود ۱۵ ساعت نور طبیعی (گلخانه بدون سایبان) انجام شد. در کلیه آزمایش‌ها برای نگهداری زنجرک روی گیاه از سرپوش پلاستیکی استفاده گردید. گیاهان مایه‌زنی شده پس از سم‌پاشی با حشره‌کش متاسیستوکس و حذف سرپوش پلاستیکی برای مشاهده علائم بیماری و آزمایش‌های PCR- RFLP در یک گلخانه عاری از حشرات تحت نظر قرار گرفتند. در آزمایش‌های مختلف معیار انتقال فیتوپلاسما به بوته‌های کاهو، مشاهده علائم بیماری و واکنش مثبت در آزمون PCR بود.

زمان گیرش (Acquisition access period) با تغذیهٔ زنجرک‌های تازه بالغ از گیاهان آلوده و دارای علایم بارز بیماری بررسی گردید. ابتدا به حدود ۱۵۰۰ زنجرک تازه بالغ از کلنی سالم در دسته‌های ۱۲۰ تایی به مدت یک ساعت گرسنگی داده شد و سپس این زنجرک‌ها به ترتیب برای زمان‌های پنج ، ۱۰، ۱۵ و ۳۰ دقیقه، یک ، دو، چهار و شش ساعت و یک و دو روز تغذیه روی بوته‌های آلوده کاهو قرار داده شدند. یکصد و هشت زنجرک مربوط به هر زمان، بعد از تغذیه برای مدت پنج هفته روی ۲۷ بوته کاهوی سالم در سه گلدان (در هر گلدان در زیر یک سرپوش پلاستیکی ۳۶ زنجرک روی نه بوته) قرار داده شدند. برای جلوگیری از خطاهای ناشی از تغییرات circadian که در رفتار تغذیه‌ای ناقل و در نتیجه گیرش مؤثر است کلیه آزمون‌های کمتر از ۱۲ ساعت در صبح انجام شد. پس از پنج هفته تغذیه گلدان‌ها سمپاشی شده و برای مشاهده علائم بیماری در یک گلخانه عاری از حشرات نگهداری شدند. برای تعیین دوره نهفتگی **(Latent Period)** حدود ۱۰۰۰ زنجرک (پوره‌های سنین چها و پنج) ناقل از کلنی سالم برای مدت ۴۸ ساعت تغذیه گیرش در زیر سرپوش پلاستیکی روی بوته‌های آلوده به فیتوپلاسمای عامل فیلودی (در یک گلدان) قرار داده شدند. سپس ۱۶۸ زنجرک انتخاب و برای یک تغذیه دو روزه روی ۴۲ بوته کاهوی سالم در سه گلدان (در هر گلدان در زیر یک سرپوش پلاستیکی ۳۶ زنجرک روی ۱۴ بوته کاهو) قرار داده شدند. سپس هر دو روز یکبار و تا ۳۶ روز بعد از تغذیه گیرش زنجرک‌های هر گلدان برداشته شده و روی ۱۴ بوته کاهوی سالم در یک گلدان جدید انتقال داده شدند. زنجرک‌های تلف شده با استفاده از زنجرک‌هایی که از نظر مدت زمان بعد از تغذیه اولیه همان وضعیت را داشتند جایگزین شدند.بعد از هر انتقال گلدان‌ها با حشره‌کش متاسیستوکس سمپاشی شده و در یک گلخانه عاری از حشرات نگهداری شدند.

در آزمایش زمان‌های لازم برای دهش(Inoculation Access Period) ابتدا زنجرک‌های ناقل از کلنی‌های آلوده برای مدت یک ساعت گرسنه نگه داشته شدند و سپس در گروه‌های ۱۲۰ تایی به‌ترتیب برای مدت‌های پنج ، ۱۰، ۱۵ و ۳۰ دقیقه، یک ، دو، چهار و شش ساعت و یک و دو روز تغذیه روی ۳۰ بوته کاهو در سه گلدان(در هر گلدان در زیر یک سرپوش پلاستیکی ۴۰ زنجرک روی ۱۰ بوته) قرار داده شدند. برای جلوگیری از خطاهای ناشی از تغییرات circadian که در رفتار تغذیه‌ای ناقل و در نتیجه دهش مؤثر است آزمون‌های کمتر از ۱۲ ساعت در

Archive of SID

www.SID.ir

صبح انجام شد. پس از پایان هردوره زنجرک‌ها با حشره‌کش کشته شدند و گیاهان مایه‌زنی شده برای ظهور علائم بیماری در گلخانه عاری از حشرات تحت نظر قرار گرفتند. از بافت رگبرگ میانی یا دمبرگ کاهو به روش *ژانگ و همکاران* (Zhang *et al.* 1998) و از نمونه‌های زنجرک *N. fenestratus* (هر سه زنجرک یک نمونه) به روش *مایکسنر و همکاران* (Maixner *et al.* 1995) دی.ان.ای کل استخراج گردید. تا از آن به عنوان دی.ان.ای قالب در آزمایش‌های PCR استفاده شود. محصول پی سی آر مستقیم (۱۸۰۰ جفت باز)، نمونه‌های دی. ان. ای کل استخراج شده از کاهوی مورد استفاده به عنوان منبع عامل بیماری، یک نمونه از زنجرک‌های کلنی آلوده و یک نمونه از کاهوی مایه‌زنی شده و علائم دار به طور جداگانه با آنزیم‌های *Alu*I ، *Hin*fI، *Mse*I و *Rsa*I هضم شد.

نتایج و بحث

در هیچ یک از بوته‌های کاهوی مایه‌زنی شده با زنجرک‌هایی که مدت زمان گیرش آنها کمتر از چهار ساعت بود علائم بیماری فیلودی مشاهده نگردید و واکنش آنها در آزمون PCR دو مرحله‌ای منفی بود. حداقل مدت زمان گیرش چهار ساعت بود و با بالا رفتن زمان گیرش راندمان انتقال افزایش یافت به طوری که با ۴۸ ساعت گیرش میزان آلودگی به ۸۸/۸۸٪ رسید(جدول ۱). رابطه بین زمان بعد از تغذیه گیرش توسط زنجرک تا انتقال عامل بیماری به کاهو (دوره کمون) در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. با مدت زمان‌های کمتر از ۱۴ روز در هیچ یک از بوته‌های کاهوی مایه‌زنی شده علائم بیماری فیلودی مشاهده نگردید و واکنش آنها در آزمون پی سی آر دو مرحله‌ای نیز منفی بود. حداقل دوره نهفتگی ۱۴ روز بود و با گذشت زمان، راندمان انتقال افزایش یافت به طوری که با ۳۲ روز پس از تغذیه زنجرک، میزان آلودگی به ۹۲/۸۵٪ رسید. بعد از ۳۲ روز راندمان انتقال سیر نزولی داشت و با دوره‌های ۳۴ و ۳۶ روز میزان آلودگی به ترتیب ۸۸/۱۰٪ و ۷۱/۴۲٪ بود. بعد از ۳۶ روز تلفات زنجرک‌ها بالا رفت و تعداد زنجرک کافی برای ادامه این مطالعه باقی نماند. با مدت دهش‌های کمتر از چهار ساعت درهیچ یک از بوته‌های سالم مایه‌زنی شده با عامل فیلودی کاهو علائم بیماری مشاهده نشد و واکنش آنها در پی سی آر نیز منفی بود. با چهار ساعت تغذیه در دو بوته از مجموع ۳۰ بوته مایه‌زنی شده(۶/۱۰٪ درصد) علائم بیماری مشاهده گردید. با مدت دهش‌های ۶؛ ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان آلودگی براساس ظهور علائم فیلودی و آزمون PCR به ترتیب ۶/۶۶٪، ۵۶/۶۶٪ و ۹۶/۶۶٪ بود (جدول۳).

واکنش نمونه‌های زنجرک از کلنی‌های آلوده، بوته کاهوی انتخابی به عنوان منبع عامل بیماری وکلیه بوته‌های مایه‌زنی شده و علائم‌دار در آزمایش‌های تعیین زمان‌های گیرش، دهش و نهفتگی، در آزمون‌های مستقیم و دو مرحله‌ای پی سی آر مثبت بود و در آنها باند مورد انتظار (به ترتیب ۱۸۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز) تکثیر شد. تحت همین شرایط واکنش نمونه‌های زنجرک‌های کلنی‌های سالم، بوته‌های کاهوی مایه‌زنی شده و فاقد علائم و نمونه‌های کاهوی سالم به عنوان کنترل منفی در آزمون‌های PCR مستقیم و دو مرحله‌ای منفی بود و در آنها هیچ باندی مشاهده نگردید. نقوش حاصل از هضم آنزیمی محصول پی سی آر مستقیم با آنزیم‌های *Alu*I ، *Hin*fI، *Mse*I و *Rsa*I در نمونه‌ای از کاهوی علائم‌دار به عنوان منبع عامل بیماری، یک نمونه از کلنی زنجرک آلوده و یک بوته از بوته‌های مایه‌زنی شده و علائم‌دار یکسان بود. با آنزیم‌های *Alu*I ، *Hin*fI، *Mse*I و *Rsa*I در کلیه نمونه‌ها به

www.SID.ir

جدول ۱. واکنش بوته‌های مایه‌زنی شده با فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو در آزمایش مطالعه زمان‌های مختلف گیرش با زنجرک *Neoaliturus fenestratus*

Table 1. Reaction of lettuce plants inoculated with lettuce phyllody phytoplasma using *Neoaliturus fenestratus* after various lengths of acquisition access period

Acquisition access period	No. symptomatic plants/No. exposed plants			%infected
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
4 hr	2/9	4/9	3/9	33/33%
6 hr	3/9	3/9	4/9	37/03%
24 hr	6/9	4/9	5/9	55/55%
48 hr	9/9	8/9	7/9	88/88%

جدول ۲. نتایج آزمایش تعیین دوره نهفتگی فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو در بدن زنجرک *Neoaliturus fenestratus*

Table 2. Results of experiment on latent period of lettuce phyllody phytoplasma in *Neoaliturus fenestratus*

Days after acquisition	No. symptomatic plants/No. exposed plants			% Infected plants
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
14	0/14	2/14	0/14	4.76%
16	7/14	5/14	4/14	38.10%
18	7/14	6/14	8/14	50%
20	9/14	5/14	10/14	57.14%
21	8/14	7/14	12/14	64.28%
22	9/14	11/14	10/14	71.42%
24	10/14	11/14	10/14	73.80%
26	11/14	10/14	12/14	78.57%
28	12/14	12/14	11/14	83.33. %
30	13/14	13/14	12/14	90.47%
32	14/14	13/14	12/14	92.85 %
34	12/14	13/14	12/14	88.10%
36	10/14	9/14	11/14	71.42%

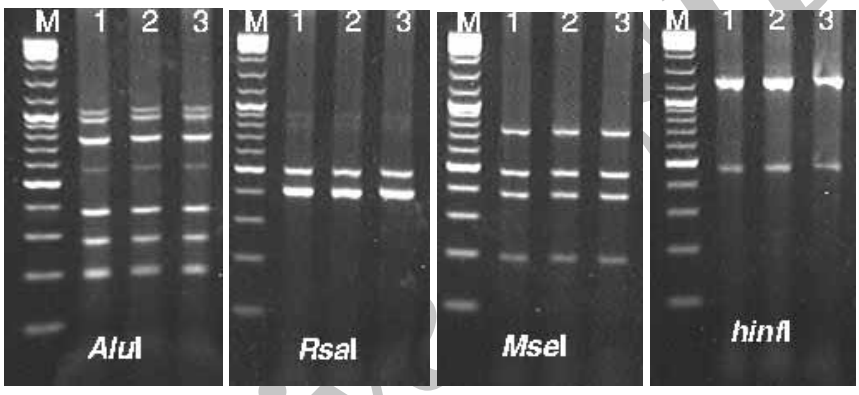
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳. اثر مدت تغذیه دهش روی انتقال فیتوپلاسمای فیلودی کاهو به وسیله زنجرک *Neoaliturus fenestratus*

Table 3. Effect of inoculation access period on the transmission rate of lettuce phyllody phytoplasma by *Neoaliturus fenestratus*

Acqisition access period	No. symptomatic plants/No. exposed plants			% infected
	Exp. 1	Exp. 1	Exp. 1	
4 hr	1/10	1/10	0/10	6.10%
6 hr	1/10	3/10	2/10	20.00%
24 hr	7/10	4/10	6/10	56.66%
48 hr	9/10	10/10	10/10	96.66%



شکل ۱. الکتروفورز هضم آنزیمی محصول PCR مستقیم P1/P7 (۱۸۰۰ جفت باز) با آنزیم‌های *Alu* I، *Rsa* I، *Mse*I و *Hinf* I. راهک M، نشانگر، راهک‌های ۳،۲،۱ به ترتیب نقوش حاصل از هضم آنزیمی نمونه‌های منبع عامل بیماری(1)، زنجرک‌های کلنی آلوده(2) و کاهوی مایه‌زنی شده و علائم‌دار (3)

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis pattern of restriction fragment length polymorphism (RFLP) of direct PCR products using P1/P7 primer pair (1800bp) using *Alu*I, *Rsa*I, *Mse*I and *Hin*fI enzymes. Lane M, marker, lanes 1, 2, 3, RFLP profiles from a sample of phyllody affected lettuce plant used as a source of disease (1), a sample of infected leafhopper colony(2) and a sample of symptomatic lettuce plant inoculated with lettuce phyllody phytoplasma (3), respectively.

ترتیب هفت، دو، چهار و دو قطعه حاصل شد(شکل ۱). در مطالعه تعیین ویژگی‌های انتقال فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو با زنجرک *N. fenestratus* حداقل مدت گیرش چهار ساعت بود و با اضافه شدن زمان دسترسی راندمان انتقال بالا رفت به طوری که با ۴۸ ساعت دسترسی ۸۸/۸۸ درصد گیاهان مورد آزمایش آلوده شدند. حداقل دوره نهفتگی ۱۴ روز بود ودر ۳۲ روز پس از شروع تغذیه راندمان انتقال به حداکثر (۹۲/۸۵ درصد) رسید و سپس سیر نزولی داشت. حداقل مدت دهش چهار ساعت بود و با اضافه شدن مدت زمان دهش راندمان انتقال بالا رفت به‌طوری‌که با ۴۸ ساعت تغذیه زنجرک‌های آلوده از گیاهان سالم درصد آلودگی ۹۶/۶۶٪ بود. نتایج به دست آمده شبیه نتایجی است که در مورد ویژگی‌های

www.SID.ir

انتقال فیتوپلاسماهای دیگر و *Spiroplasma citri* با ناقل‌های خود گزارش شده است(Chiykouski 1981, Purcell 1982, Rosenberger 1982, Liu *et al.* 1983, Oldfield *et al*. 1984 , Bealand *et al*. 1999, Golino *et al*. 1987). در این تحقیق حد اقل زمان گیرش و دهش مشابه بود. در بررسی‌های مشابه قبلی نیز چنین شباهتی مشاهده می‌شود. علت شباهت مدت گیرش و دهش احتمالاً به دلیل این است که هر دو به تغذیه ناقل مربوط می‌شوند(Purcell 1982). زمان گیرش به رقت فیتوپلاسما در گیاه (Wei *et al*. 2004) و دوره نهفتگی علاوه بر رقت فیتوپلاسما در گیاه به درجه حرارت زمان آزمایش نیز بستگی دارد (Jensen 1972). بر همین اساس انتظار نمی‌رود که در مورد فیتوپلاسماهای مختلف زمان گیرش و دوره نهفتگی کاملاً یکسان باشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که زنجرک *N. fenestratus* فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو را به روش تکثیری انتقال می‌دهد و زنجرک ناقل بعد از گیرش فیتوپلاسمای عامل بیماری تا آخر عمر آلوده می‌ماند. بر این اساس مبارزه با نسل زمستانی ناقل در کنترل بیماری اهمیت پیدا می‌کند. براساس نتایج این تحقیق برای مطالعه دامنه میزبانی فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو در بین گیاهان مختلف، برای اطمینان از آلوده بودن زنجرک ناقل، باید زنجرک‌های تازه بالغ از کلنی آلوده را که حداکثر دهش دارند و معمولاً دوره کمون عامل بیماری در آنها به اتمام رسیده برداشته و برای مدت طولانی تری (۴۸ ساعت) روی گیاهان سالم مورد آزمایش قرار داد. بررسی‌های اخیر نشان داده است که بعضی از فیتوپلاسماها انتقال عمودی دارند و از طریق تخم منتقل می‌شوند (Weintraub and Bealand 2006) در مورد انتقال فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو با ناقل مطالعه این ویژگی ضرورت دارد

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (36-35) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir