

## تنوع بیماری تورم جوانه بادنجان در استان فارس

سمیه کشاورز، ساسان قاسمی\*

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه گیاه پزشکی، شیراز، ایران

محمد صالحی

بخش تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، زرقان

### چکیده

در سالهای ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ طی بازدیدهای انجام شده از مزارع بادنجان استان فارس، علائم مشکوک به بیماریهای فیتوپلاسمایی از جمله سبز شدن و برگسانی اجزاء گل، رشد جوانه‌های داخل گل، جاروک، زردی و ریزبرگی دیده شد. جهت تعیین ماهیت این علائم، هفت بوته بادنجان آلوده با علائم متفاوت از شهرستانهای فسا، جهرم، فیروزآباد، داراب و سروستان در گلدانهای مناسب نشاء و بعنوان منبع بیماری جهت مطالعات بعدی به یک گلخانه عاری از حشرات انتقال داده شد. عامل بیماری از بوته‌های آلوده از طریق پیوند، به بادنجان و بوسپله سس، از بادنجان به پروانش انتقال داده شد. در بادنجان، علائم تورم جوانه، ریزبرگی، زردی و جاروک و در پروانش، گل سبزی، زردی و جاروک ظاهر شد. از رگبرگ میانی بوته‌های بادنجان با آلودگی طبیعی و پروانش علائم دار مایه‌زنی شده با سس و همچنین بادنجان و پروانش سالم دی ان ای کل استخراج و سپس ردیابی فیتوپلازما با واکنش زنجیره ای پلیمرز مستقیم، با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 انجام گردید. در تمام نمونه‌های دارای علائم، قطعه دی ان ای ریبوزومی با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز تکثیر شد که در نمونه‌های سالم چنین قطعه‌ای تکثیر نشد. واکنش پروانش در مقابل مایه‌زنی با جدایه‌های مورد مطالعه یکسان نبود، بطوریکه بر اساس تفاوت در شدت و نوع علائم ظاهر شده در پروانش، جدایه‌های مورد بررسی در شش گروه قرار گرفتند. براساس نقوش حاصله از هضم محصول PCR مستقیم با آنزیمهای *HaeIII*، *AluI* و *RsaI*، جدایه‌های مختلف در دو گروه قرار گرفتند: جدایه‌های فسا ۱، فسا ۲، فسا ۳، فیروزآباد، داراب و سروستان در یک گروه و جدایه جهرم در گروهی دیگر. در این تحقیق براساس علائم بیماری، انتقال با سس و پیوند و واکنش مثبت در آزمون PCR، مشخص شد بیماری تورم جوانه در استان فارس ماهیت فیتوپلاسمایی دارد. این نخستین گزارش از وجود این بیماری از

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : ssghasemi@yahoo.com

تاریخ دریافت : ۹۱/۱/۱ ، تاریخ پذیرش : ۹۲/۳/۲

شهرستانهای فسا، فیروزآباد، داراب و سروستان می باشد. همچنین با آزمایشات ملکولی همراهی حداقل ۲ فیتوپلازما با بیماری تورم جوانه بادنجان در استان فارس تایید شد که با استفاده از آنزیمهای برشی بیشتر احتمال مشاهده تنوع بیشتری در عامل بیماری تورم جوانه بادنجان در استان فارس وجود دارد.

**واژه های کلیدی:** تورم جوانه، بادنجان، فیتوپلازما، فارس

## مقدمه

بادنجان یکی از سبزیهای میوه‌ای و گیاهی است از خانواده سیب زمینی که از میوه آن در طبخ غذا و تهیه انواع ترشی استفاده می‌شود (Peyvast, 2009). استان فارس، در سال ۱۳۹۰، با سطح زیر کشت ۸۵۰۱ هکتار، بعد از استانهای مازندران، خوزستان، هرمزگان و تهران در مقام پنجم تولید گروه سایر سبزیجات از جمله بادنجان قرار دارد (Anonymous, 2011).

طی چند سال اخیر در مزارع بادنجان استان فارس بوته‌هایی عقیم مشاهده گردید که اندام زایشی آنها بشکل اندام رویشی درآمده و ساختارهای برگ مانند در محل گل آنها تشکیل شده بود. در این بوته‌ها زردی و ریزبرگی نیز دیده شد. از آنجا که چنین علائمی اکثراً مرتبط با آلودگی بوسیله فیتوپلازما می‌باشد، احتمال داده شد بیماری ناشی از بیماری‌گری از این گروه باشد. مشابه چنین علائمی، اولین بار در سال ۱۳۷۴ از مزارع بادنجان شهرستان جهرم، با عنوان بیماری تورم جوانه بادنجان گزارش شد که براساس نتایج آزمایشات بیولوژیکی و واکنش مثبت در مقابل رنگ آمیزی دینس، ماهیت فیتوپلازمایی این بیماری مشخص و زجره *Neoaleturus* (Mulsant & Rey) *haematoceps* نیز بعنوان ناقل بیماری تعیین شد (Salehi & Izadpanah, 1995). در سال ۱۳۷۷، بیماری فیتوپلازمایی دیگری به نام جاروک بادنجان از برازجان و فسا گزارش شد که احتمال داده شد با فیتوپلازمای عامل جاروک یونجه و تورم جوانه بادنجان متفاوت باشد (Salehi et al., 2000). در سال ۱۳۸۵، همراهی گروه فیتوپلازمایی 16SrII با بیماری تورم جوانه بادنجان در شهرستانهای ابرقوه، زرقان، بوشهر و همراهی گروه فیتوپلازمایی 16SrIX با بیماری تورم جوانه بادنجان در رودان مشخص شد (Salehi et al., 2006). در برزیل همراهی گروه فیتوپلازمایی 16SrIII (Amaral Mello et al., 2006) و در مصر همراهی زیرگروه 16SrII-D با این بیماری گزارش شد (Omar & Foissac, 2012). مقایسه نقوش حاصله از هضم محصول PCR دو مرحله‌ای با آنزیمهای *AluI*، *TaqI* و *HpaII*، *MseI*، *RsaI* مشخص کرد که در استان بوشهر حداقل ۳ فیتوپلازما با بیماری تورم بادنجان همراه است (Raofii et al., 2010).

با توجه به سطح زیر کشت کمابیش بالای بادنجان در استان فارس، مشاهده علائم تورم جوانه در شهرستان‌های مختلف بویژه مناطق گرمسیر استان و عدم اطلاع کشاورزان از بیماریزا بودن علائم مذکور، هدف از تحقیق حاضر، نخست اثبات بیماریزا بودن و تعیین ماهیت فیتوپلاسمایی این علائم در حال گسترش با آزمایشات بیولوژیکی و ملکولی، دوم بررسی وجود تنوع در عامل بیماری مذکور در مناطق مختلف استان فارس و سوم مقایسه دو روش بیولوژیکی و ملکولی جهت بررسی تنوع در عامل بیماری بوده است.

## مواد و روش‌ها

### منبع بیماری

در سالهای ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰، هفت بوته بادنجان آلوده با علائمی شبیه به تورم جوانه بعنوان ۷ جدایه مظنون به فیتوپلاسمای شهرستانهای فسا، جهرم، فیروزآباد، داراب و سروستان انتخاب، در گلدانهای مناسب نشاء و به یک گلخانه عاری از حشرات، برای انجام مطالعات بعدی انتقال داده شدند.

### انتقال با پیوند

جهت پیوند جانبی، از بوته‌های بادنجان هشت هفته‌ای بعنوان پایه و از شاخه‌های نازک و فرعی دارای علائم بارز بیماری و واجد دو یا سه برگ، بعنوان پیوندک استفاده شد. سپس قسمت زیر محل پیوند تا کمی بالاتر از آن با نوار پارافیلیم بسته شد. بمدت ۲ هفته جهت حفظ رطوبت، قسمت پیوند شده بوسیله یک کیسه فریزر پوشانده شد. از هر گیاه بادنجان با آلودگی طبیعی (هر جدایه) روی سه بوته سالم بادنجان پیوند شد. از این روش جهت انتقال عامل بیماری از پروانشهای آلوده مایه‌زنی شده با سس به پروانش‌های سالم همسن نیز در سه تکرار استفاده شد.

### انتقال با سس

ابتدا رشته‌های زردرنگ نازک و نخ‌ی شکل حاصله از بذر جوانه زده سس روی کاغذ صافی مرطوب، روی یک بوته سالم چغندر قند جهت تامین منبع سس سالم برای آزمایشات قرار داده شد. بعد از رشد و استقرار رشته‌های سالم سس بر روی بوته سالم پروانش، انتهای دیگر رشته‌های زردرنگ سس روی بوته آلوده بادنجان قرار داده شد. ارتباط بین بوته بادنجان آلوده و بوته پروانش سالم، پس از گذشت یکماه، قطع و هردو عاری از سس شدند و بوته‌های پروانش جهت مشاهده علائم در یک گلخانه عاری از حشرات نگهداری شدند.

### استخراج دی‌ان‌ای کل از بافت آلوده گیاهی

جهت بررسی آلودگی کلیه گیاهان با آلودگی طبیعی، گیاهان مورد استفاده جهت مایه زنی و گیاهان مایه زنی شده با آزمون PCR مستقیم، استخراج دی‌ان‌ای کل از هر نمونه گیاهی سالم یا آلوده به فیتوپلازما به روش Zhang *et al.* (1998) با اندکی تغییرات انجام شد، به این ترتیب که پس از جداسازی ۰/۲ گرم از بافت رگبرگ میانی یا دمبرگ هر نمونه گیاهی با تیغ استریل و افزودن مقداری ازت مایع به آن در هاونی استریل، هر نمونه کوبیده و به حالت پودر درآمد. به محتویات هر هاون، ۷۵۰ میکرولیتر بافر CTAB حاوی ۰/۱ درصد ۲-مرکاپتواتانول اضافه و عصاره بدست آمده از هر نمونه به یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل منتقل شد. هر تیوب سر بسته بمدت ۲۰ دقیقه در حرارت مرطوب بن ماری در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد که هر ۵ دقیقه یکبار، اختلاط محتویات تیوبها صورت گرفت. در مرحله بعد به هر تیوب ۷۵۰ میکرولیتر محلول کلروفورم-ایزواکیل الکل (۱:۲۴) اضافه و با حرکت دست، محتویات تیوبها تا زمان تشکیل دو فاز شفاف و کدر در آنها، بخوبی بهم زده شد. پس از سانتریفیوژ تیوبها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در درجه حرارت اتاق، به آرامی ۳۰۰ میکرولیتر از فاز شفاف رویی هر نمونه برداشته شده، به یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل و مابقی حذف شد. بلافاصله به محتویات هر تیوب ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد افزوده شد که پس از چندین بار بهم زدن محتویات و سانتریفیوژ تیوبها بمدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور، رانشین حذف و رسوب حاصل دو بار با اتانول سرد ۷۰ درصد شستشو داده شد. تیوبها یک شبانه روز، با سر باز و وارونه، روی یک دستمال کاغذی کاملاً خشک و تمیز در دمای اتاق چیده شدند که بعد از خشک شدن رسوب نهایی در دمای اتاق، دی‌ان‌ای حاصل در ۷۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر سترون حل و در دمای ۲۰- بعنوان دی‌ان‌ای الگو در آزمون PCR نگهداری شد.

### آزمون PCR مستقیم

آزمون PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگر عمومی P1/P7 (Schneider *et al.*, 1995) جهت تکثیر یک قطعه با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز از آپرون آر ان ای ریبوزومی شامل ژن آر ان ای ریبوزومی ۱۶S، ناحیه بین ژنهای آر ان ای ریبوزومی ۱۶S و ۲۳S و ابتدای ۵' ژن آر ان ای ریبوزومی ۲۳S انجام شد. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۲۲ میکرولیتر و شامل یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت پایه ۱۰ میکرومولار، دو میکرولیتر دی‌ان‌ای الگو، ۰/۷۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  با غلظت پایه ۵۰ میلی مولار، ۰/۴ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP) با غلظت پایه ۱۰ میلی مولار، دو میکرولیتر بافر ۱۰x و ۰/۱ میکرولیتر آنزیم دی‌ان‌ای پلیمرز Taq (سیناژن، ایران) با غلظت پایه پنج واحد در یک میکرولیتر بود که با افزودن آب دیونیزه به ۲۲ میکرولیتر رسانده و در دستگاه ترموسایکلر Primus قرار داده شد. برنامه

دستگاه جهت واسرشتگی اولیه روی  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت چهار دقیقه، جهت انجام  $35$  چرخه برای تکرار سه مرحله Denaturation در دمای  $94^{\circ}\text{C}$  بمدت  $30$  ثانیه، Annealing در دمای  $58^{\circ}\text{C}$  بمدت دو دقیقه و ساخت رشته های DNA در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  بمدت سه دقیقه و برای برنامه انتهایی دستگاه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  بمدت  $10$  دقیقه تنظیم شد.

#### الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز مستقیم

$6$  میکرولیتر از هر محصول PCR با  $2$  میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط کرده و در چاهک ژل ریخته شد. از نمونه جاروک بادام خفر بعنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد. پس از گذشت حدوداً  $45$  دقیقه از اتصال جریان الکتریکی  $70$  ولت به تانک الکتروفورز، ژل از تانک خارج و به مدت  $10$  دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید قرار داده شد. سپس ژل در آب معمولی شسته و در داخل دستگاه ژل داکيومنت جهت عکسبرداری از باندهای بدست آمده قرار داده شد.

#### آنالیز چندشکلی طولی قطعات برشی (RFLP)

جهت بررسی میزان شباهت و تفاوت احتمالی جدایه های تورم جوانه بادنجان در استان فارس، هر محصول PCR مستقیم براساس روش Lee et al. (1998)، به طور جداگانه با آنزیمهای *HaeIII*، *RsaI* و *AluI* برش داده شد. بدین منظور در یک مخلوط واکنش  $20$  میکرولیتری،  $9/85$  میکرولیتر آب مقطر سترون، دو میکرولیتر بافر آنزیم بهمراه  $0/15$  میکرولیتر آنزیم برشی با غلظت پایه پنج واحد در یک میکرولیتر به هشت میکرولیتر از هر محصول PCR اضافه و لوله محتوی این مواد حداقل بمدت چهار ساعت در دستگاه ترموبلاک در دمای  $37$  درجه سانتی گراد قرار داده شد. در پایان  $7$  نمونه برش خورده با یک آنزیم در ژل آگاروز دو درصد الکتروفورز و از نوارهای دی ان ای عکسبرداری شد.

#### نتایج

##### علائم بیماری و میزان آلودگی

علائم بارز بیماری شامل گل سبزی، برگسانی اجزاء گل، رشد جوانه های داخل گل، کوتاه شدن فاصله میانگره ها، جاروک و زردی می شد که شدت و ضعف علائم در جدایه های جهرم و فیروزآباد، متفاوت از دیگر جدایه ها بود (جدول ۱). میزان آلودگی طبیعی در مناطق مختلف استان فارس بین  $15-0$  درصد متغیر بود.

## جدول ۱- اطلاعات مربوط به جدایه‌های مختلف عامل بیماری تورم جوانه بادنجان

Table 1. Information about the different isolates of Eggplant Big Bud disease agent

Isolates	Place of collection	Symptoms of disease
Fasa 1	Kheirabad Village in Fasa township	Slight little leaf, egression several flowers from one flower, egression several flowers from one place, virescence and big bud
Fasa 2	Dasteje Village in Fasa township	, egression Severely reduced internode distance several flowers from one place, virescence, big bud, little leaf and slight yellowing
Fasa 3	Kheirabad Village in Fasa township	Slightly reduced internode distance, moderate little leaf, yellowing of older leaves, egression several flowers from one place and big bud
Jahrom	Jahrom township	Severely reduced internode distances, severe little leaf, spoony shape of young leaves, Severe yellowing of older leaves, egression several flowers from one flower, egression terminal witches broom fom flower, egression several flowers from one place, phyllody, virescence, big bud, deformed fruits with longitudinal slit from blossom end of fruit, longitudinal slit in stem
Firouzaba	Firouzabad township	Severely reduced internode distances, severe yellowing and little leaf
Darab	Darab township	Moderate chlorosis of older leaves, Slight little leaf, egression several flowers from one flower and big bud
Sarvestan	Sarvestan township	Slight little leaf and big bud

## انتقال با پیوند

پس از گذشت یک ماه از تاریخ مایه زنی، علائم بیماری بتدریج در تمامی بوته‌های بادنجان پیوند خورده ظاهر شد. علائم بارز و مشترک جدایه‌های مختلف بیماری تورم جوانه در بادنجانهای مایه زنی شده عبارت بودند از: تورم جوانه، کاهش فاصله میانگره‌ها در راس بوته، کاهش اندازه برگ و زردی پهنک برگهای مسن تر بجز رگبرگ و حواشی رگبرگ که در نهایت منجر به کوتولگی بوته، ریزبرگی و سبزرزدی کل بوته می‌شد. از نظر شکل تورم جوانه، تمایل به تولید پاجوش، قاشقی شدن برگهای جوانتر، شدت زردی و ریز برگی و خارج شدن یک گل از داخل گلی دیگر در بین جدایه‌های مورد آزمایش، تفاوتی وجود داشت (جدول ۲).

**جدول ۲-** علائم اختصاصی در بوته‌های سالم بادنجان مایه زنی شده با جدایه‌های مختلف عامل بیماری تورم جوانه در استان فارس

**Table 2.** Specific symptoms in healthy eggplants inoculated with different isolates of Big Bud disease agent in Fars province

Isolates	Symptoms type sucker	spoon shape of younger leaves	yellowing	severity of little leaf	shape of big bud	floral proliferation
Fasa 1	+	+	moderate	slight	bowel shaped	+
Fasa 2	+	-	slight	slight	Flat & bowl shaped	+
Fasa 3	+	+	moderate	moderate	bowel shaped	-
Jahrom	-	-	moderate	moderate	Flat & bowl shaped	+
Firouzabad	-	-	severe	severe	bowel shaped	-
Darab	-	+	slight	slight	Flat & bowl shaped	+
Sarvestan	-	+	slight	slight	bowel shaped	-

### انتقال با سس و پیوند در پروانش

حداقل دوره نهفتگی در پروانش‌های مایه زنی شده یکماه بود. علائم کلی بیماری در پروانش عبارت بودند از گل سبزی، برگ‌سانی، جاروک، ریزبرگی، زردی و کوتولگی. علاوه بر علائم مشترک، هر کدام از جدایه‌های بیماری، علائم اختصاصی در پروانش ایجاد کردند که در جدول ۳ علائم ناشی از جدایه‌های مختلف بیماری تورم جوانه در پروانش ذکر شده است (شکل ۱).

بر اساس تفاوت در واکنش پروانش‌های مایه زنی شده، جدایه‌های مورد آزمایش در شش گروه قرار گرفتند. در گروه اول، جدایه‌های فسا ۱ و سروستان با علائم اختصاصی گل سبزی، برگ‌سانی، خروج گل از گلی دیگر، زردی شدید حاشیه برگ‌های مسنتر و گاهی کل پهنک برگ، کاهش شدید فاصله میانگره‌ها و کوتولگی بوته، جارویی شدن شدید راس بوته، ریز برگی شدید و جارویی شدن جوانه‌های رشد کرده روی طوقه و ساقه و در گروه‌های دوم تا ششم، جدایه‌های فسا ۲، فسا ۳، فیروزآباد، جهرم و داراب قرار گرفتند.

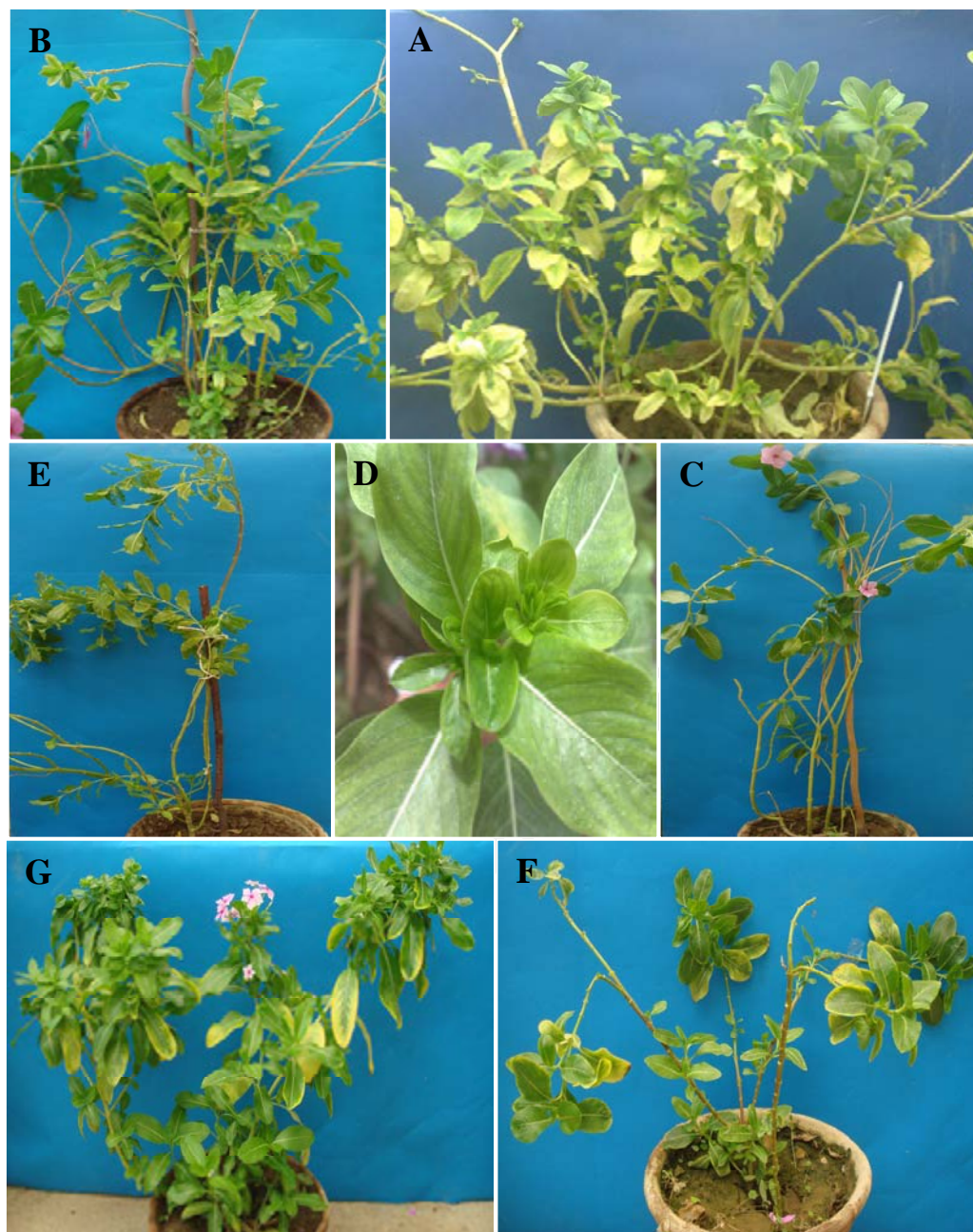
جدول ۳- علائم ناشی از مایه زنی پوتیمنی سالم برونش با عامل جراثیمی مختلف بیماری بومری ترم جوله از طریق سس و پیوند در استان فارس

Symptoms type	Isolates					
	Fars 1	Fars 2	Fars 3	Jahrom	Firouzabad	Darb
drying of branches free of leaf	-	+	+	+	-	+
shrinkage and twist in leaf	severe	moderate	slight	severe	severe	-
main vein yellowing in leaf margins	severe	severe	Relativey Severe	severe	moderate	severe
little leaf	severe	severe	slight	moderate	moderate	severe
Growth of secondary buds on the stem & crown	+	+	+	-	+	+
whiches broom of secondary buds	+	+	+	-	+	+
whiches broom in plant tip	severe	Relativey Severe	slight	moderate	severe	Relativey Severe
Reduction of internode distance	severe	Relativey Severe	moderate	moderate	Relativey Severe	Relativey Severe
floral proliferation	+	-	-	+	-	-
phyllody	+	-	-	+	-	-
whesence	+	+	-	+	-	-

Archi

SID



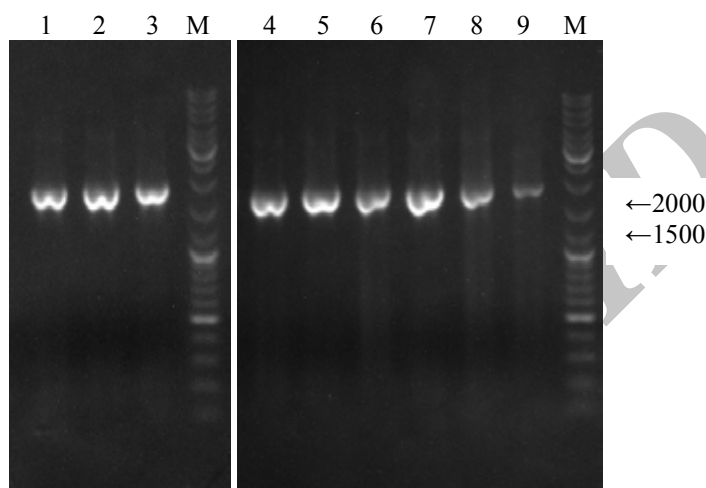


شکل ۱- علائم بیماری در پروانش های مایه زنی شده با جدایه های مختلف عامل تورم جوانه بادنجان در استان فارس: (A و G) کاهش شدید فاصله میانگره ها، گل سبزی، ریزبرگی و زردی شدید حاشیه برگ به ترتیب در جدایه های فسا ۱ و سروستان. (B) جارویی شدن جوانه های رشد کرده روی طوقه و ساقه در جدایه فسا ۲. (C) خشک شدن شاخه های عاری از برگ در جدایه فسا ۳. (D) خروج گل از گلی دیگر در جدایه جهرم. (E) چروکیدگی و پیچ و تاب شدید برگ در اثر بدشکلی در رگبرگ اصلی در جدایه فیروزآباد. (F) جارویی شدن نسبتاً شدید راس بوته در جدایه داراب.

**Figure 1.** Disease symptoms in periwinkle inoculated with different isolates of eggplant big bud factor in Fars province: (A & G) Severely reduced internode distance, virescence, severe little leaf and yellowing in leaf margins in Fasa 1 & Sarvestan isolates respectively. (B) witches broom in growthed buds on the crown and stem in Fasa 2 isolate. (C) drying of branches free of leaf in Fasa 3 isolate. (D) floral proliferation in Jahrom isolate. (E) shrinkage and severe twist in leaf because of deformation in main vein in Firouzabad isolate. (F) relatively strong witches broom in plant tip in Darab isolate.

### آزمون PCR مستقیم

با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 در نمونه‌های دی ان ای کل مستخرج از کلیه بوته‌های دارای آلودگی مزرعه ای و کلیه بوته‌های بادنجان و پروانش مایه زنی شده و علائم دار، قطعه ای با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز تکثیر شد. تحت همین شرایط در کلیه نمونه های سالم بادنجان و پروانش چنین قطعه ای تکثیر نشد (شکل ۲).

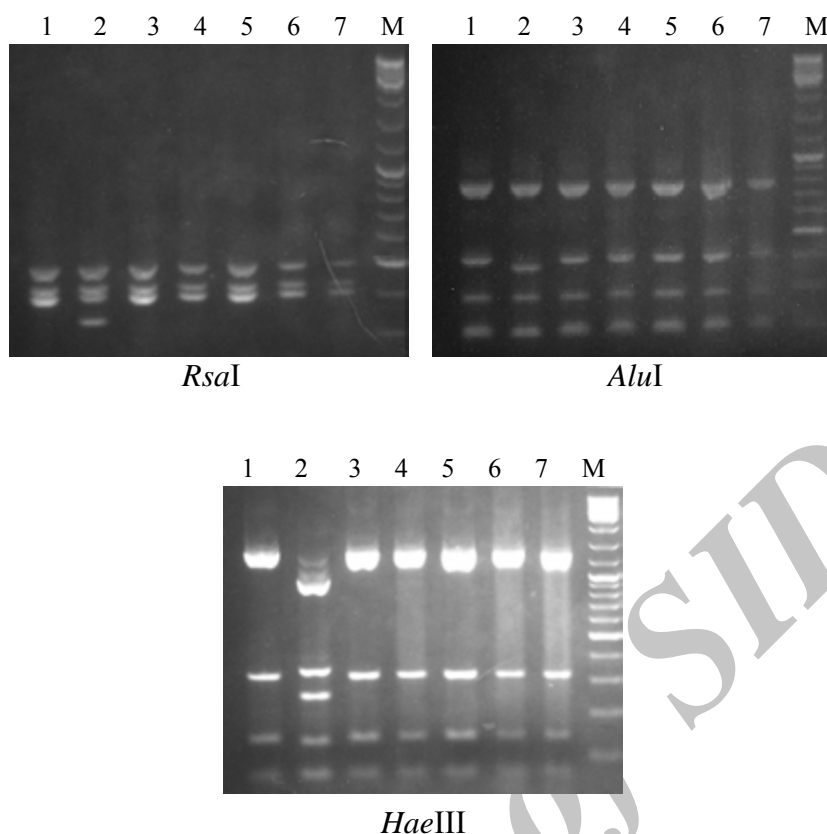


شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 در ژل آگاروز ۱٪. چاهکها: (1)، جدایه داراب؛ (2)، جدایه سروستان؛ (4)، جدایه فسا ۱؛ (5)، جدایه فسا ۲؛ (6)، جدایه فسا ۳؛ (7)، جدایه جهرم؛ (8)، جدایه فیروزآباد؛ (3) و (9)، نمونه کنترل مثبت مربوط به جاروک بادام خفر و (M)، مارکر.

**Figure 2.** Electrophoresis of direct PCR products by using primer pairs P1/P7 in 1% agarose gel. Lanes: (1), Darab; (2), Sarvestan; (4), Fasa 1; (5), Fasa 2; (6), Fasa 3; (7), Jahrom; (8), Firouzabad; (3) & (9), Khafra almond witches broom as positive controls and (M), marker.

### آزمون چندشکلی طولی قطعات برشی

در هضم آنزیمی با آنزیم *HaeIII* در چاهک ۲ که مربوط به جدایه جهرم بود، پنج باند و در شش جدایه مابقی، چهار باند با موقعیت یکسان مشاهده شد. در هضم آنزیمی با آنزیم *RsaI* در جدایه جهرم، چهار باند و در مابقی جدایه‌ها، سه باند با موقعیت یکسان مشاهده شد. بر اثر هضم آنزیمی با آنزیم *AluI* در هریک از هفت جدایه مورد مطالعه ۴ باند حاصل شد ولی جدایه جهرم در موقعیت باند دوم از بالای ژل کمی با بقیه جدایه‌ها تفاوت داشت. (شکل ۳) براساس تفاوت در نقوش حاصله از هضم آنزیمی محصول PCR مستقیم، جدایه های مختلف در دو گروه قرار گرفتند: جدایه‌های فسا ۱، فسا ۲، فسا ۳، فیروزآباد، داراب و سروستان در یک گروه و جدایه جهرم، در گروهی دیگر.



شکل ۳- نقوش حاصل از الکتروفورز هضم آنزیمی قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی با آنزیمهای *RsaI*، *HaeIII* و *AluI* در ژل آگاروز ۲٪. چاهکها: (۱)، جدایه فسا ۱؛ (۲)، جدایه جهرم؛ (۳)، جدایه فسا ۲؛ (۴)، جدایه فیروزآباد؛ (۵)، جدایه فسا ۳؛ (۶)، جدایه داراب؛ (۷)، جدایه سرvestan و (M)، مارکر

**Figure 3.** Electrophoretic patterns of 1800 bps fragment Enzymatic digestion with *HaeIII*, *RsaI* and *AluI* enzymes in 2% agarose gel. lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7, Fasa 1, Jahrom, Fasa 2, Firouzabad, Fasa 3, Darab and Sarvestan, respectively; M, marker

### بحث

در سالهای ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰، در مزارع بادنجان شهرستانهای مختلف استان فارس، علائم تیپیک فیتوپلاسمها از جمله تورم جوانه، ریزبرگی، زردی و جاروک دیده شد و با توجه به میزان آلودگی ۱۵-۰ درصدی بیماری در مزارع مختلف استان فارس و روند رو به گسترش آن، این تحقیق در راستای بررسی برخی از خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی این علائم انجام شد.

در این تحقیق براساس علائم بیماری، انتقال با پیوند، سس و واکنش مثبت در آزمون PCR مستقیم، ماهیت فیتوپلاسمایی این علائم تعیین شد. این اولین گزارش از بیماری تورم جوانه بادنجان از شهرستانهای فسا، فیروزآباد، داراب و سرvestan بود.

بیماری تورم جوانه پیشتر از تبریز (Torabi, 1994)، جهرم (Salehi & Izadpanah, 1995)، استانهای اصفهان، اردبیل و آذربایجان غربی (Rashidi, 2006)، استانهای خراسان

رضوی، خراسان شمالی، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، کردستان، کرمانشاه و فارس (Jamshidi, 2011) و درود لرستان (Dehghani & Salehi, 2011) گزارش شده است.

از آنجاییکه تنوع در علائم بیماری تورم جوانه بادنجان در نقاط مختلف استان فارس، احتمال همراهی بیش از یک فیتوپلازما با این بیماری را مطرح می‌کرد، در این راستا هفت جدایه مورد مطالعه براساس نتایج آزمایشات بیولوژیکی (تفاوت در واکنش پروانشهای مایه زنی شده) در شش گروه و براساس آزمایشات ملکولی (نتایج RFLP فیزیکی) در دو گروه قرار گرفتند. آزمایشات ملکولی با سه آنزیم *HaeIII*، *RsaI* و *AluI* تنها توانست تفاوت جدایه چهارم با سایر جدایه‌ها را نشان داده و این بخش از آزمایشات بیولوژیکی را تایید کند، بنابراین در این تحقیق گروه بندی ملکولی با گروه بندی بیولوژیکی بجز در مورد جدایه چهارم مطابقت نداشت و دقت گروه بندی بیولوژیکی با در نظر گرفتن تکرار مناسب در آزمایشات انتقال و استفاده از گلخانه عاری از حشرات به جهت تشخیص تفاوت بین مابقی جدایه‌ها بجز چهارم، بیشتر از گروه بندی ملکولی بود.

در تحقیق مشابهی که در سال ۱۳۸۹ در استان بوشهر انجام شد، مقایسه نقوش حاصله از هضم محصول PCR دومرحله‌ای با آنزیمهای *TaqI*، *HpaII*، *MseI*، *RsaI*، *AluI* و *HpaII* هشت جدایه مورد بررسی، گروه بندی براساس علائم بیماری در پروانش را تایید کرد و نشان داد که فیتوپلازماهای جدایه‌های مختلف در سه گروه قرار گرفتند.

کارگروه اسپیروپلازما/فیتوپلازما در سال ۲۰۰۴ اعلام کرد چنانچه دو فیتوپلازما با میزان همولوژی بالای ۹۷/۵ درصد در توالی ژن ۱۶S آر آن ای ریپوزومی شان، دارای ناقل متفاوت یا دامنه میزبانی طبیعی متفاوت باشند یا حداقل در یک گونه گیاهی میزبان علائم متفاوتی ایجاد کنند - (The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - *Phytoplasma taxonomy group*, 2004)، این دو فیتوپلازما، معرف دو گونه متفاوت هستند. بر همین اساس در این تحقیق، علیرغم یکسان بودن نقوش حاصله از RFLP جدایه‌های فسا ۱، فسا ۲، فسا ۳، فیروزآباد، داراب و سروستان، با در نظر گرفتن تفاوتها در ویژگیهای بیولوژیکی این جدایه‌ها، همراهی شش فیتوپلازما با بیماری تورم جوانه بادنجان در استان فارس نشان داده شد. در دنیا گروه بندی براساس علائم در یک گیاه میزبان مهمتر است، چرا که آزمایشات مولکولی به شناسایی بخشی از ژنوم فیتوپلازما و نه همه آن می‌پردازد.

احتمال می‌رود در مطالعات آتی بتوان با استفاده از آنزیمهای برشی بیشتر و انجام مطالعات تکمیلی نظیر همسانه سازی، تعیین ترادف و آنالیزهای تبارزایی، تفاوت موجود بین نتایج آزمایشات بیولوژیکی و ملکولی در این پژوهش را توجیه کرد.

## منابع

- Amaral Mello, AP. Bedendo, IP. Kitajima, EW. Ribeiro, LFC. & Kobori, R. 2006. Tomato big bud associated with a phytoplasma belonging to group 16SrIII in Brazil. *International Journal of Pest Management*, 52: 233-237.
- Anonymous, 2011. Agriculture Statistics First Vol., Crops 2009-10. Persian Geratic Press, Tehran, Iran.
- Dehghani, A. & Salehi, M. 2011. Short report of tomato big bud disease in Lorestan province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 483: 47.
- Jamshidi, E. 2011. *Detection and Characterization of Phytoplasmas Associated with Big Bud Disease of Tomato Using Molecular Methods in Khorasan Razavi and Other Provinces*. M.Sc. Thesis, Department of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Khorasan Razavi, Iran.
- Lee, IM. Gundersen-Rindal, DE. Davis, RE. & Bartoszyki, IM. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48:1153-1169.
- Omar, AF. & Foissac, X. 2012. Occurrence and incidence of phytoplasmas of the 16SrII-D subgroup on solanaceous and cucurbit crops in Egypt. *Biomedical and Life Sciences European Journal of Plant Pathology*, 133: 353-360.
- Peyvast, G. 2009. *Olericulture*. Daneshpazir Press, Gilan, Iran.
- Raofi, D. 2010. *Biological and Molecular Characterization of Tomato and Eggplant Phytoplasma Disease Agent (Agents) in Bushehr Province*. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Semnan Branch, Semnan, Iran.
- Raofi, D. Salehi, M. & Firouz, R. 2010. Multiple phytoplasma associated with eggplant witches broom in Bushehr province. *Proceedings of the 19<sup>th</sup> Iranian Congress of Plant Protection, 12-9 Aug. 2010, Tehran, Iranian Plant production Research Institute*, p. 427.
- Rashidi, M. 2006. Occurrence tomato big bud disease in Isfahan, Ardabil and West Azarbaijan provinces. *Proceedings of the 17th International Congress of Plant Protection, 11-14 Sept. 2006, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University*, p. 188.
- Salehi, M. & Izadpanah, K. 1995. Big Bud disease in tomato and eggplant in Fars. *Proceedings of 12<sup>th</sup> Iranian Congress of Plant Protection, 16-11 Sept. 1995, Karaj, College of Agriculture*, p. 169.
- Salehi, M. Babani, G. & Izadpanah k. 2000. Eggplant Witches Broom in Bushehr and Fars provinces. *Proceedings of the 14<sup>th</sup> Iranian Congress of Plant Protection, 14-17 Sept. 2000, Isfahan University of Technology*, p. 318.
- Salehi, M. Izadpanah, k. & Heydarnezhad, J. 2006. Identification and grouping of 35 phytoplasmas Based on molecular properties from central and southern areas of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 423: 51-52.
- Schneider, B. Cousins, MT. Klinkong, S. & Seemüller, E. 1995. Taxonomic Relatedness and Phylogenetic Positions of Phytoplasmas Associated With Diseases of Faba Bean, Sunnhemp, Sesame, Soybean, and Eggplant. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 102: 225-232.

- The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group. 2004. Candidatus Phytoplasma, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243-1255.
- Torabi, E. 1994. *Etiological Review of Big Bud Disease in Azerbaijan*. M.Sc. Thesis, Department of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.
- Zhang, Y.P. Uyemoto, J.K. & Kirkpatrick, B.C. 1998. A small scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45-50.

Archive of SID

## Diversity of Eggplant Big Bud Disease in Fars Province

**Somayeh KESHAVARZ, Sasan GHASEMI\***

*Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz Branch, Islamic Azad University,  
Shiraz, Iran*

*\*(Corresponding author, E-mail: ssghasemi@yahoo.com)*

**Mohammad SALEHI**

*Fars Agricultural and Natural Resources Research Center, Zarghan*

### Abstract

In 2010 and 2011 surveys of Fars province were observed symptoms doubtful to phytoplasma diseases such as virescence and phyllody, floral proliferation, witches'-broom, yellowing and little leaf in eggplant fields. To determination of etiology this symptoms, seven infected eggplant plants from Fasa, Jahrom, Firouzabad, Darab and Sarvestan were planted in suitable pots, transferred to a greenhouse without any insects and used as sources of disease for further studies. The causal agents were transmitted from diseased to healthy eggplants by grafting and from eggplant to periwinkle by dodder. In inoculated eggplants, were appeared big bud, little leaf, yellowing and witches'-broom and in inoculated periwinkles, were appeared virescence, yellowing and witches'-broom. Total DNA were extracted from fresh midrib tissues of naturally infected eggplant, experimentally inoculated periwinkle plants and a healthy eggplant and periwinkle plant. In direct PCR using primer pairs P1/P7, DNA fragments of approximately 1800 bp were amplified from total nucleic acid samples extracted from symptomatic eggplant and periwinkle plants. Periwinkle reaction to inoculation with Eggplant Big Bud (EBB) different isolates was variable as based on difference in severity and type of symptoms in periwinkle, EBB different isolates, were placed in six groups. Direct PCR products of EBB different isolates were digested with *AluI*, *HaeIII* and *RsaI* enzymes. Comparison of RFLP patterns indicated that EBB different isolates place in two groups: Fasa 1, Fasa 2, Fasa 3, Firouzabad, Darab and Sarvestan isolates in one group and Jahrom isolate in other group. Based on disease symptoms, dodder and graft transmission and positive reaction in PCR, eggplant big bud in Fars province has phytoplasmal etiology. This is the first report of the presence of EBB in Fasa, Firouzabad, Darab and Sarvestan. With molecular testings in this study, were confirmed there are at least two phytoplasmas associated with EBB in Fars province. By using more restriction enzymes, it is likely to see more diversity in EBB agent in Fars province.

**Keywords:** Big Bud, Eggplant, phytoplasma, Fars