

## تعیین ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسمای همراه با بیماری غنچه درشت گوجه فرنگی در استان زنجان

الهام صالحی<sup>۱</sup>، محمد صالحی<sup>۱\*</sup> و محمود معصومی<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۶)

### چکیده

غنچه درشت یکی از بیماری‌های مهم و اقتصادی گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) در نقاط مختلف جهان است. در بازدیدهای سال ۱۳۹۲ از مناطق گوجه فرنگی کاری زنجان، علائم بیماری غنچه درشت مشاهده گردید. عامل بیماری به وسیله پیوند از گوجه فرنگی دارای علائم به گوجه فرنگی و بادنجان و به وسیله سس از گوجه فرنگی به پروانش انتقال داده شد. در گیاهان مایه زنی شده با پیوند و سس علائم بیماری‌های فیتوپلاسمایی ظاهر شد. در آزمون‌های پی سی آر یک مرحله ای با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 و دومرحله ای با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2، در نمونه‌های دی ان ای استخراج شده از گوجه فرنگی دارای علائم در طبیعت و گیاهان مایه زنی شده با پیوند و سس قطعه‌های مورد انتظار، به ترتیب ۱۸۰۰ و ۱۲۵۰ جفت باز از اپرون ار ان ای ریبوزومی تکثیر شد. چند شکلی طولی قطعات برشی مجازی (Virtual-RFLP) ناحیه تکثیر شده با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با غنچه درشت گوجه فرنگی در زنجان متعلق به زیر گروه A در گروه ار ان ای ریبوزومی افزولش شبدر (16SrVI) می باشد. در آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از ترادف کامل ژن ار ان ای ریبوزومی 16S تعلق فیتوپلاسمای عامل غنچه درشت گوجه فرنگی در زنجان به 16SrVI-A تایید شد. این اولین گزارش از وجود بیماری غنچه درشت گوجه فرنگی و تعیین ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسمای همراه با آن در استان زنجان می باشد.

کلیدواژه: فیتوپلاسم، انتقال با سس و پیوند، آنالیز فیلوژنتیکی، گروه 16SrVI

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

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار پژوهشی بیماری شناسی گیاهی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس.

## Biological and molecular characterization of the phytoplasma associated with tomato big bud disease in Zanjan province, Iran

E. Salehi<sup>1\*</sup>, M. Salehi<sup>1\*</sup>, and M. Masoumi<sup>1</sup>

(Received: 11.3.2016; Accepted: 27.9.2016)

### Abstract

Tomato big bud (TBB) is an economically important disease of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in various regions of the world. In 2013 surveys of Zanjan province (Iran) tomato fields, symptoms of TBB disease were observed. The disease agent was successfully transmitted by grafting from a naturally symptomatic tomato in Zanjan to tomato and eggplant and from tomato to periwinkle via dodder (*Cuscuta campestris* Yank.) transmission. In inoculated plants phytoplasma-type symptoms were produced. Expected length DNA fragments of nearly 1,800 and 1,250 bp were respectively amplified from naturally infected tomato and experimentally inoculated plants in direct polymerase chain reaction (PCR) using phytoplasma primer pair P1/P7 or nested PCR using the same primer pair followed by R16F2n/R16R2 primers. Virtual restriction fragment length polymorphism (RFLP) of nested PCR products (1.2 kbp) showed that Zanjan TBB (ZTBB) phytoplasma is related to subgroup A in 16SrVI (clover proliferation) phytoplasma group. Phylogenetic analysis of full length 16S rDNA classified ZTBB with 16SrVI-A subgroup. This is the first report of biological and molecular characterization of a phytoplasma associated with TBB disease in Zanjan province.

**Keywords:** Phytoplasma, Dodder and graft transmission, Phylogenetic analysis, 16SrVI group

---

\* Corresponding author's E-mail: Salehi\_abarkoohi@yahoo.com

1. PhD. Student, Research Assoc. prof. and Assis Prof of Plant Pathol., Respectively, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zarghan, Iran.

## مقدمه

از آغاز کشف فیتوپلاسم‌ها در سال ۱۹۶۷ میلادی، صدها بیماری همراه با این موجودات گزارش شده است و لیست اینگونه بیماری‌ها در اکثر مناطق جهان رو به افزایش است. علائم بارز بیماری‌های فیتوپلاسمایی عبارتند از برگ‌ی شدن و سبز رنگ شدن اجزاء گل، جاروک در اثر رشد جوانه‌های داخل گل و ساقه، ریز برگ، کاهش اندازه میان گره‌ها، زردی، زوال و مرگ گیاه. بیماری‌های فیتوپلاسمایی اغلب موجب عقیمی و مرگ گیاه میزبان شده و خسارت آن‌ها تا ۱۰۰ درصد نیز گزارش شده است. بیماری‌های فیتوپلاسمایی عامل عمده محدودیت کشت بسیاری از گیاهان سبزی، صیفی، زراعی، زینتی و درختان مثمر و غیر مثمر می‌باشند (McCoy et al. 1989; Lee et al. 2000; Bertaccini et al. 2014). فیتوپلاسم‌ها محدود به دستجات آوندهای آبکش گیاهان میزبان بوده و در طبیعت توسط زنجیرک‌های برگ، بوته ای و پسپیل به صورت پایا و تکثیری منتقل میشوند. انتقال طبیعی در اثر پیوند ریشه گیاهان مجاور نیز امکان پذیر است (Weintraub & Beanland 2006). این بیمار گرها با سس، پیوند و اندام‌های تکثری شامل قلمه، پاجوش، پیاز، غده و ریزوم نیز قابل انتقال می‌باشند (Lee & Davis 1992).

غنچه درشت گوجه فرنگی به عنوان یک بیماری مهم و اقتصادی در اکثر کشورهای جهان شامل آذربایجان، تاجیکستان، قرقیزستان، ارمنستان، هندوستان، اردن، چین، لبنان، ترکیه، ایتالیا، روسیه، استرالیا، اسرائیل، ایالات متحده آمریکا، برزیل، شیلی، مکزیک، بولیوی، آفریقای جنوبی و مصر گزارش گردیده است (Amaral-Mello et al. 2006; Omar & Foissac 2012; Sentos-Cervantes 2007; Thompson & Mynhardt 1987; Salehi et al. 2014).

کشور ایران با تولید ۴۸۲۶۳۹۶ تن گوجه فرنگی در

سال به عنوان هفتمین کشور تولید کننده گوجه فرنگی در جهان محسوب می‌شود (FAOSTAT 2009). پیشتر در ایران بیماری غنچه درشت گوجه فرنگی در استان‌های فارس، یزد (Salehi et al. 2005)، اردبیل و اصفهان (Rashidi et al. 2006)، بوشهر (Salehi et al. 2014)، لرستان (Dehghani & Salehi 2011) و خراسان رضوی (Jamshidi et al. 2011) گزارش شده است. در بازدیدهای سال ۱۳۹۲ از مزارع گوجه فرنگی استان زنجان، علائم بیماری غنچه درشت در تمامی مزارع گوجه فرنگی مشاهده گردید. گزارش حاضر نتیجه پژوهش‌هایی است که به منظور شناسایی ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسمای همراه با بیماری غنچه درشت گوجه فرنگی در این استان انجام شده است.

## روش بررسی

## منبع عامل بیماری و تهیه بوته‌های سالم

طی بازدید از مزارع گوجه فرنگی در استان زنجان، پنج بوته گوجه فرنگی دارای علائم بارز غنچه درشت از پنج مزرعه انتخاب گردیدند و پس از نشاء در گلدان به مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس انتقال داده شدند. از این بوته‌ها در مطالعات مربوط به انتقال بیماری و آزمون‌های PCR استفاده گردید.

گیاهان مورد استفاده شامل گوجه فرنگی، بادنجان و پروانش در یک گلخانه عاری از حشرات واقع در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، از طریق بذر تکثیر شدند تا از آنها در آزمایش‌های مایه‌زنی با پیوند و سس استفاده شود.

## انتقال عامل بیماری به بوته‌های پروانش با سس

برای انتقال با سس، بذر سس (*Cuscuta campestris*)

Yank.) روی کاغذ فیلتر مرطوب کشت داده شد و گیاهچه‌ها بر روی بوته‌های سالم چغندر قند قرار داده شدند تا منبع سس سالم تهیه شود. بعد از ۴ هفته بین سس موجود روی هر بوته چغندر قند سالم و یک بوته گوجه فرنگی دارای علائم از مزرعه ارتباط برقرار شد. یک ماه بعد ارتباط بین چغندر قند سالم و گوجه فرنگی‌های دارای علائم قطع و شاخه‌های جدیدی از سس که روی گوجه فرنگی‌های دارای علائم رشد کرده بود به ۴ بوته پروانش سالم متصل شدند. پس از گذشت ۳۰ روز ارتباط بین گوجه فرنگی‌های دارای علائم بیماری و پروانش سالم قطع گردید و بوته‌های پروانش عاری از سس شدند. جهت مشاهده علائم احتمالی، بوته‌های پروانش در یک گلخانه‌ی عاری از حشرات نگهداری شدند.

#### انتقال با پیوند

برای تکثیر و نگهداری عامل بیماری غنچه درشت گوجه فرنگی، از هر بوته گوجه فرنگی دارای علائم از مزرعه پیوندک (شاخه‌ای کوچک با دو تا سه برگ) تهیه و به روش جانبی روی ۵ بوته سالم گوجه فرنگی و ۵ بوته سالم بادنجان (دو پیوندک روی هر بوته) پیوند شد. برای حفظ رطوبت و جلوگیری از خشک شدن پیوندک‌ها، قسمت پیوند خورده به مدت یک هفته با کیسه پلاستیکی پوشانده شد. پس از اطمینان از گرفتن پیوندک‌ها، کیسه پلاستیکی حذف و گیاهان پیوند شده در یک گلخانه‌ی عاری از حشرات از نظر ظهور و گسترش علائم بیماری تحت نظر قرار گرفتند.

#### استخراج دی‌ان‌ای کل و انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

از ۰/۲ گرم رگبرگ میانی برگ‌های گوجه فرنگی با

علائم غنچه درشت و گیاهان مایه‌زنی شده با پیوند و سس، به روش ژانگ و همکاران (Zhang et al. 1998) دی‌ان‌ای کل استخراج گردید و به عنوان قالب در آزمون PCR استفاده گردید. از رگبرگ میانی گیاهان سالم گوجه فرنگی، بادنجان و پروانش به عنوان شاهد منفی و از پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش به عنوان شاهد مثبت نیز دی‌ان‌ای کل استخراج شد. برای بررسی نمونه‌های دی‌ان‌ای از نظر وجود فیتوپلاسمای آزمون PCR استفاده شد. در آزمون PCR مستقیم از جفت آغازگر P1/P7 (Deng & Hiruki et al. 1991; Schneider et al. 1995) و در آزمون PCR دو مرحله‌ای از جفت آغازگرهای P1/P7 در مرحله اول و R16RF2n/R16R2 (Guendersen & lee 1996) در مرحله دوم استفاده گردید. PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل ۵۰ نانوگرم دی‌ان‌ای الگو، مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت نهایی ۰/۲ میکرومولار، آغازگرها با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌مولار، یک و نیم میکرولیتر بافر PCR، کلرید منیزیم با غلظت نهایی یک و نیم میلی‌مولار، آنزیم پلیمرز تک (ساخت شرکت سیناژن، ایران) به مقدار دو و نیم واحد و آب دو بار تقطیر شده استریل تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. لوله‌های محتوی مخلوط واکنش برای ۳۵ چرخه PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) 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. تکمیل ساخت دی‌ان‌ای و بسط قطعه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. در آزمون PCR دوجمله‌ای، ابتدا محصول PCR مستقیم با استفاده از آب دو بار تقطیر سترون به نسبت یک به ۳۰ رقیق شد و از آن به عنوان دی

نرم افزار MEGA5 مقایسه گردید. در آنالیزهای فیلوژنتیکی ترادف مشابه در *Acholeplasma laidlawii* به عنوان Out-group منظور گردید.

### چند شکلی طولی قطعات برشی مجازی (Virtual-RFLP)

با استفاده از برنامه iPhyClassifier (Zhao et al. 2009)، ناحیه تکثیر شده با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 در جدایه‌های زنجان و فیتوپلاسمهای مربوط به زیرگروه‌های گروه 16SrVI (جدول ۱)، با ۱۷ آنزیم شامل: *HaeIII*, *EcoRI*, *DraI*, *BstUI*, *BfaI*, *BamHI*, *AluI*, *MseI*, *Sau3AI*, *KpnI*, *HpaII*, *HpaI*, *HinfI*, *HhaI*, *TaqI*, *SspI*, *RsaI* برش داده شد و جایگاه فیتوپلاسمی همراه با غنچه درشت گوجه فرنگی زنجان در بین زیر گروه‌های گروه 16SrVI تعیین گردید.

### نتایج

#### علائم بیماری غنچه درشت

در تمامی مزارع گوجه فرنگی مورد بازدید در استان زنجان علائم بیماری غنچه درشت مشاهده گردید. بر اساس علائم بیماری میزان آلودگی به ویژه در شهرستان‌های زنجان و زنجان رود چشمگیر بود. در یک مزرعه در اطراف زنجان روی یک خط تا ۵۵ درصد بوته‌های گوجه فرنگی دارای علائم غنچه درشت بودند. علائم بارز بیماری تورم جوانه گوجه فرنگی در مناطق گوجه کاری زنجان عبارت بودند از ضخیم شدن ساقه، راست ایستادن شاخه‌ها، جوانه‌های متورم و سبز رنگ، تغییرات گل شامل بزرگ شدن و به هم چسبیدن کاسبرگ‌ها، سبزرنگی گلبرگ‌ها، فیلودی، رشد جوانه‌های داخل گل و عقیمی، عدم تشکیل

ان ای الگو استفاده گردید. سی و پنج چرخه دمایی مرحله دوم آزمون دو مرحله‌ای PCR شامل  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت یک دقیقه (دو دقیقه در  $94^{\circ}\text{C}$  برای واسرشته کردن اولیه)،  $55^{\circ}\text{C}$  به مدت ۹۰ ثانیه،  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵۰ ثانیه و بسط نهایی ۱۰ دقیقه در  $72^{\circ}\text{C}$  بود. محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید عکس تهیه شد.

#### همسانه سازی، تعیین ترادف و تجزیه و تحلیل ترادف‌ها

محصول PCR مستقیم با جفت آغازگر P1/P7 ( $1800$  جفت باز) با استفاده از کیت PCR InsT/A clone product Cloning Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania) و دستورالعمل این شرکت در پلاسמיד pTZ57R/T همسانه سازی و به جدایه DH5a باکتری *Escherichia coli* منتقل شد. پس از رشد باکتری حامل همسانه، پلاسמיד نو ترکیب جدا و خالص سازی شد و برای تعیین ترادف به شرکت Bioneer در کشور کره ارسال گردید. ترادف‌های بدست آمده با استفاده از برنامه BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)، ترادف‌های موجود در بانک جهانی ترادف‌ها (GenBank) مقایسه و نزدیکترین ترادف‌ها با عامل غنچه درشت گوجه فرنگی در زنجان جستجو شد. با استفاده از نرم افزار MEGA5 (Tamura et al. 2011) ترادف کامل ژن ار ای ریبوزومی 16S جدایه ی زنجان با ۱۷ فیتوپلاسمی انتخابی در بانک جهانی ترادف‌ها (جدول ۱) مقایسه و با انجام همردیف سازی چندگانه درخت فیلوژنتیکی مربوط رسم گردید. در یک آنالیز دیگر برای تعیین موقعیت فیتوپلاسمی جدایه غنچه درشت زنجان، ترادف قطعه تکثیری با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 با ترادف‌های مشابه زیر گروه‌های گروه 16SrVI (جدول ۱) با استفاده از

جدول ۱. رس شمارهای فیتوپلاسمای مورد استفاده در ترسیم درخت فیلوژنتیکی

Table 1. Accession numbers of phytoplasmas used in phylogenetic tree construction .

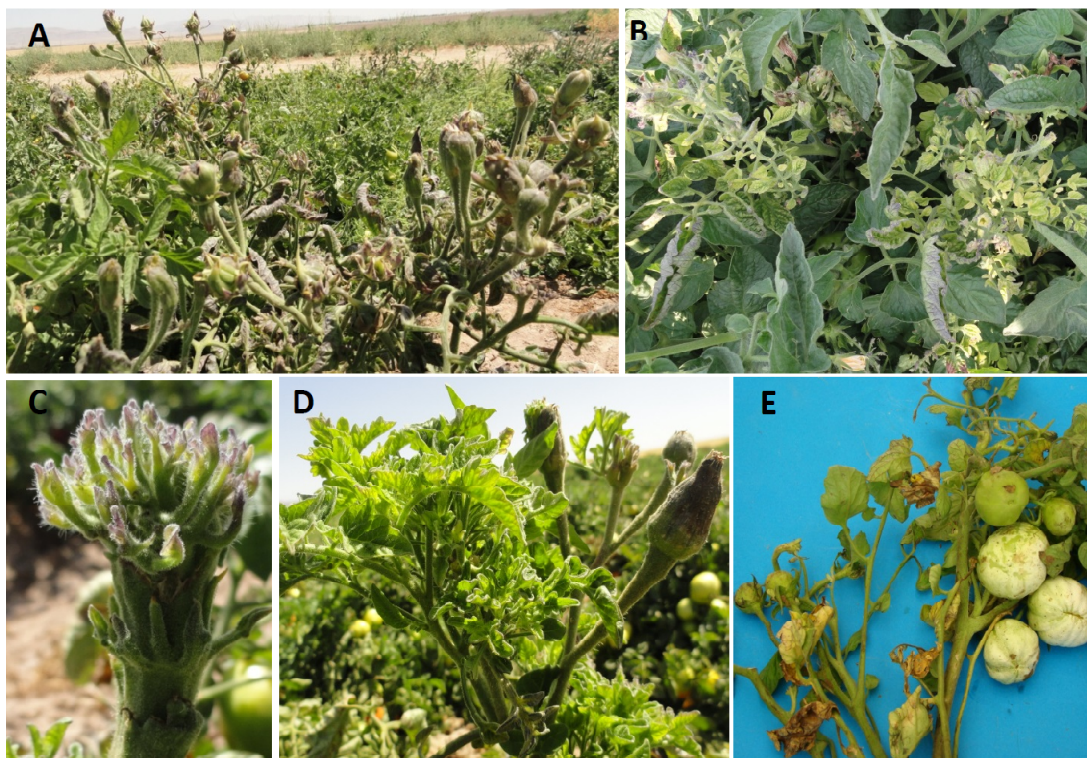
| Acronym               | Phytoplasma strain designation         | RFLP Group | Accession number |
|-----------------------|----------------------------------------|------------|------------------|
| 'Ca. P. asteris'      | 'Candidatus Phytoplasma asteris'       | 16SrI-I    | M30790           |
| 'Ca. P. aurantifolia' | 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'  | 16SrII     | U15442           |
| 'Ca. P. trifolii'     | 'Candidatus Phytoplasma trifolii'      | 16SrVI     | AY390261         |
| 'Ca. P. phoenicium'   | 'Candidatus Phytoplasma phoenicium'    | 16SrIX     | AF515637         |
| 'Ca. P. mali'         | 'Candidatus Phytoplasma mali'          | 16SrX      | AJ542541         |
| 'Ca. P. oryzae'       | 'Candidatus Phytoplasma oryzae'        | 16SrXI     | AJ542541         |
| 'Ca. P. solani'       | 'Candidatus Phytoplasma solani'        | 16SrXII    | AF248959         |
| 'Ca. P. australiense' | 'Candidatus Phytoplasma australiense'  | 16SrXII    | L76865           |
| 'Ca. P. cynodontis'   | 'Candidatus Phytoplasma cynodontis'    | 16SrXIV    | AJ550984         |
| 'Ca. P. brasiliense'  | 'Candidatus Phytoplasma brasiliense'   | 16SrXV     | AF147708         |
| 'Ca. P. luffae'       | 'Candidatus Phytoplasma luffae'        | 16SrVIII   | AF086621         |
| 'Ca. P. palmae'       | 'Candidatus Phytoplasma palmae'        | 16SrIV     | U18753           |
| 'Ca. P. ulmi'         | 'Candidatus Phytoplasma ulmi'          | 16SrV-A    | AY197655         |
| 'Ca. P. fraxini'      | 'Candidatus Phytoplasma fraxini'       | 16SrVII    | AF092209         |
| MPV                   | Mexican periwinkle virescence          | 16SrXIII   | AF248960         |
| WXD                   | Western X-disease                      | 16SrIII    | L04682           |
| VI-A                  | Vinca virescence                       | 16SrVI-A   | AY500817         |
| VI-B                  | Strawberry multiplier disease          | 16SrVI-B   | AF190224         |
| VI-C                  | Illinoise elm yellows                  | 16SrVI-C   | AF409070         |
| VI-D                  | Periwinkle little leaf                 | 16SrVI-D   | AF228053         |
| VI-E                  | Centarurea solstitialis virescence     | 16SrVI-E   | AY270156         |
| VI-F                  | Catharanthus phyllody phytoplasma      | 16SrVI-F   | EF186819         |
| VI-H                  | Portulaca little leaf phytoplasma      | 16SrVI-H   | EF651786         |
| VI-I                  | 'Candidatus Phytoplasma sudamericanum' | 16SrVI-I   | GU292081         |
| ZTBB                  | Zanjan tomato big bud                  | 16SrVI-A   | KR150879         |
| A.laidlawii           | Acholeplasma laidlawii                 | -----      | M23932           |

بادنجان ضخیم شدن ساقه ، برگ و جوانه ، لوله شدن برگ‌ها به طرف داخل ، رشد جوانه‌های جانبی ساقه و تبدیل آن‌ها به شاخه‌هایی کوتاه با برگ‌های کوچک و زرد رنگ، کوتولگی و مرگ گیاه (شکل 2A) و در گوجه فرنگی علائمی شبیه به علائم بیماری غنچه درشت گوجه فرنگی در مزرعه از جمله تورم جوانه و ارغوانی شدن جوانه‌ها و برگ‌های جوان (شکل 2B) مشاهده گردید. علائم بارز بیماری در پروانش‌های مایه زنی شده ریزبرگی، زردی و گل سبزی بودند. دوره نهفتگی بیماری در گیاهان مایه زنی شده از ۴۵ روز در گوجه فرنگی مایه زنی شده با پیوند تا ۸۸ روزدر پروانش مایه زنی شده با سس متغیر بود.

میوه، سنگی شدن و بد شکلی میوه‌هایی که قبل از آلودگی تشکیل شده بودند، ریزبرگی، باریک برگ، برگ قاشقی، ضخیم شدگی و رنگ پریدگی برگ‌ها، ارغوان رنگی برگ‌ها در قسمت‌های انتهایی بوته‌ها و نیز کوتولگی (شکل ۱).

#### انتقال فیتوپلاسمای همراه با غنچه درشت گوجه فرنگی

گیاهان سالم بادنجان و گوجه فرنگی با روش پیوند جانبی با فیتوپلاسمای عامل غنچه درشت گوجه فرنگی مایه‌زنی شدند. عامل بیماری از هر کدام از ۵ بوته گوجه فرنگی دارای علائم در مزارع زنجان، با پیوند به پنج گیاه سالم گوجه فرنگی و پنج گیاه سالم بادنجان منتقل و از طریق سس به چهار بوته پروانش منتقل گردید. در



شکل ۱- علائم بیماری غنچه درشت گوجه فرنگی در مزارع زنجان: A، تورم جوانه و بنفش شدن قسمت های مختلف گیاه؛ B، ریز برگ، قاشقی شدن و زردی برگ ها؛ C، رشد جوانه های داخل گل؛ D، تورم و جاروک؛ E، کوچک ماندن، بدشکلی و سنگی شدن میوه.

Fig. 1. Symptoms of big bud disease in tomato fields in Zanjan: A, Big bud and purplish of different parts of the plant; B, small, yellowed and cupped leaves; C, floral proliferation; D, witches' broom and big bud; E, Small miss-shaped and stony fruits.

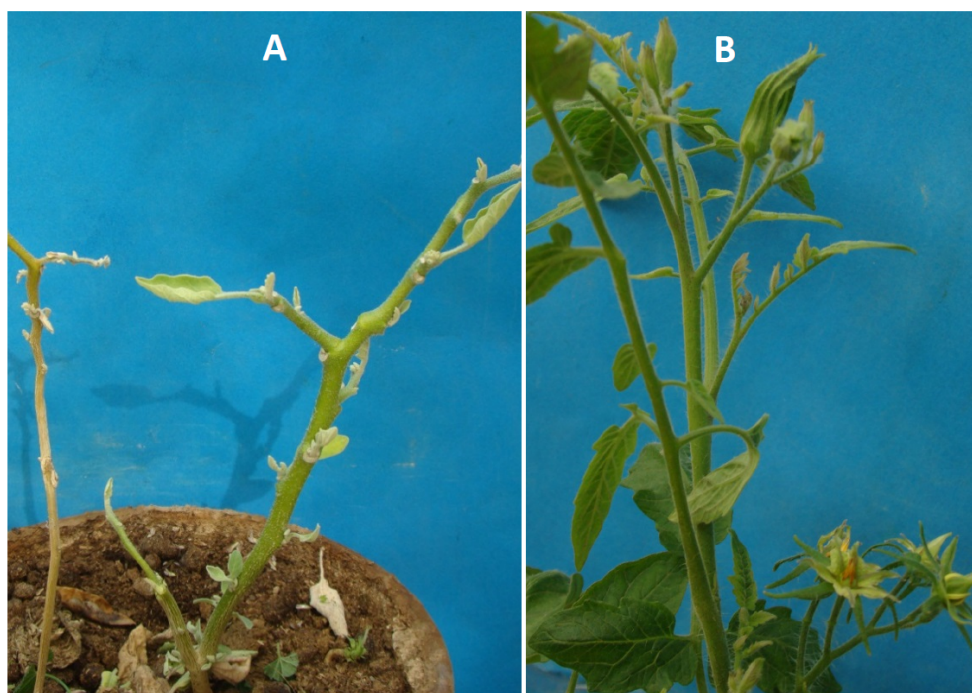
سالم (کنترل منفی) باندی مشاهده نگردید (شکل ۳).

#### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

پس از ۳۵ چرخه در آزمون PCR مستقیم با استفاده از جفت آغاز گر P1/P7 و دومرحله ای با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 قطعات مورد انتظار (به ترتیب حدود ۱۸۰۰ و حدود ۱۲۵۰ جفت باز) در پنج نمونه گوجه فرنگی دارای علائم غنچه درشت در طبیعت و پنج نمونه از هریک از گیاهان مایه زنی شده شامل بادنجان، گوجه فرنگی و یک نمونه از پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش (کنترل مثبت) تکثیر شد. تحت همین شرایط در گیاهان سالم گوجه فرنگی، بادنجان و پروانش

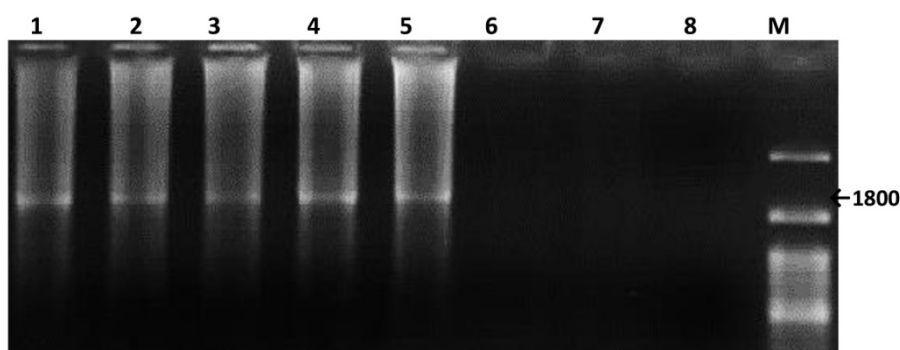
#### آزمون چند شکلی طولی قطعات برشی مجازی (Virtual-RFLP)

آنالیز RFLP مجازی بر اساس ۱۲۵۰ جفت باز از ژن آر ان ای ریپوزومی 16S (ناحیه تکثیری جفت آغازگر R16F2n/R16R2) نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با غنچه درشت گوجه فرنگی در زنجان با 'Ca. *Phytoplasma trifolii* (Ay390261)، نماینده زیرگروه A در گروه 16SrVI یکسان (ضریب تشابه ۱) می باشد (شکل ۴).



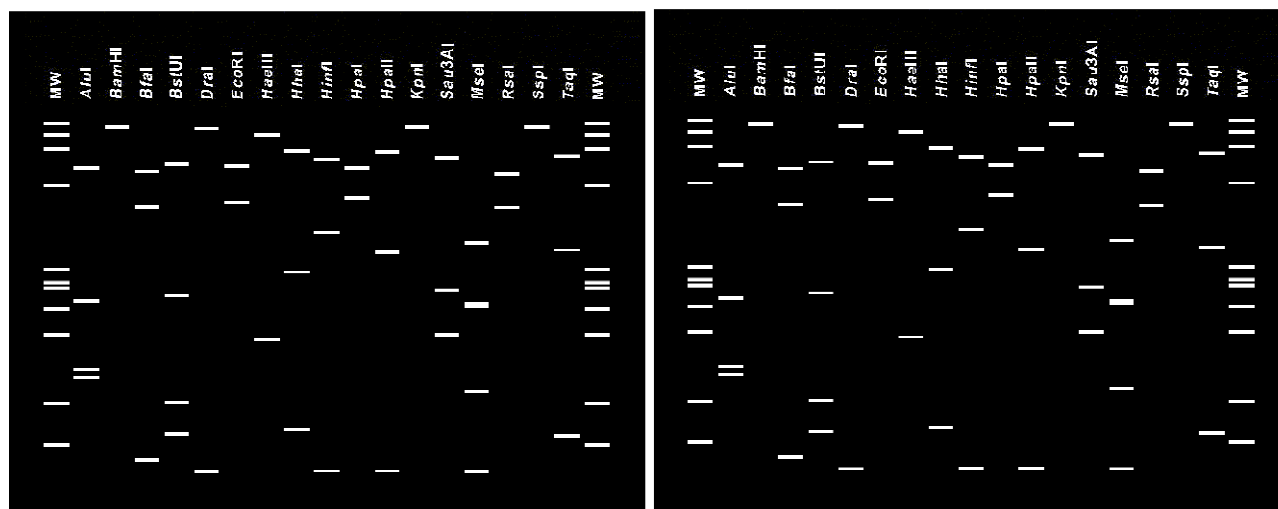
شکل ۲. علائم بیماری در بادنجان و گوجه فرنگی مایه زنی شده با عامل بیماری غنچه درشت گوجه فرنگی زنجان با استفاده از پیوند: A، ضخیم شدن ساقه، قاشقی شدن برگ، رشد جوانه‌های جانبی و تبدیل آن‌ها به شاخه‌های کوتاه با برگ‌های زرد و ضخیم و مرگ گیاه در بادنجان: B، تورم جوانه و بنفش شدن جوانه‌ها در گوجه فرنگی.

Fig. 2. Disease symptoms in eggplant and tomato plants graft inoculated with Zanzan tomato big bud agent: A, Thickened stem, growth of lateral buds to small branches bearing yellowed and cupped leaves in eggplant; B, Big bud and purple buds in tomato.



شکل ۳. نقوش الکتروفورزی محصول PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگر P<sub>1</sub>/P<sub>7</sub> (۱۸۰۰ جفت باز) در ژل آگاروز ۱٪: راهک ۱، نمونه ی پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش (کنترل مثبت): راهک ۲ و ۳، نمونه‌های گوجه فرنگی آلوده به فیتوپلاسمای عامل غنچه درشت درمزارع گوجه فرنگی زنجان، راهک‌های ۴ و ۵، نمونه‌های بادنجان و گوجه مایه زنی شده با عامل غنچه درشت گوجه زنجان، راهک ۶، ۷ و ۸: نمونه ی گوجه فرنگی، بادنجان و پروانش سالم (کنترل منفی): راهک M، مارکر دی ان ا. (سیناژن، ایران)

Fig.3- Agarose gel electrophoresis pattern of PCR products using P<sub>1</sub>/P<sub>7</sub> primer pair. Lane 1, periwinkle plant infected with lime witches' broom phytoplasma ( positive control); lanes 2 and 3, symptomatic tomato plants from tomato fields in Zanzan; lanes 4 and 5, eggplant and tomato plants graft inoculated with Zangan tomato big bud agent; lanes 6, 7 and 8, healthy tomato, eggplant and periwinkle plants. M, DNA marker (CinaGen, Iran).

16SrVI-A, *Ca. Phytoplasma trifolii* (AY500817)

16SrVI-A, Zanzan tomato big bud (KR150879)

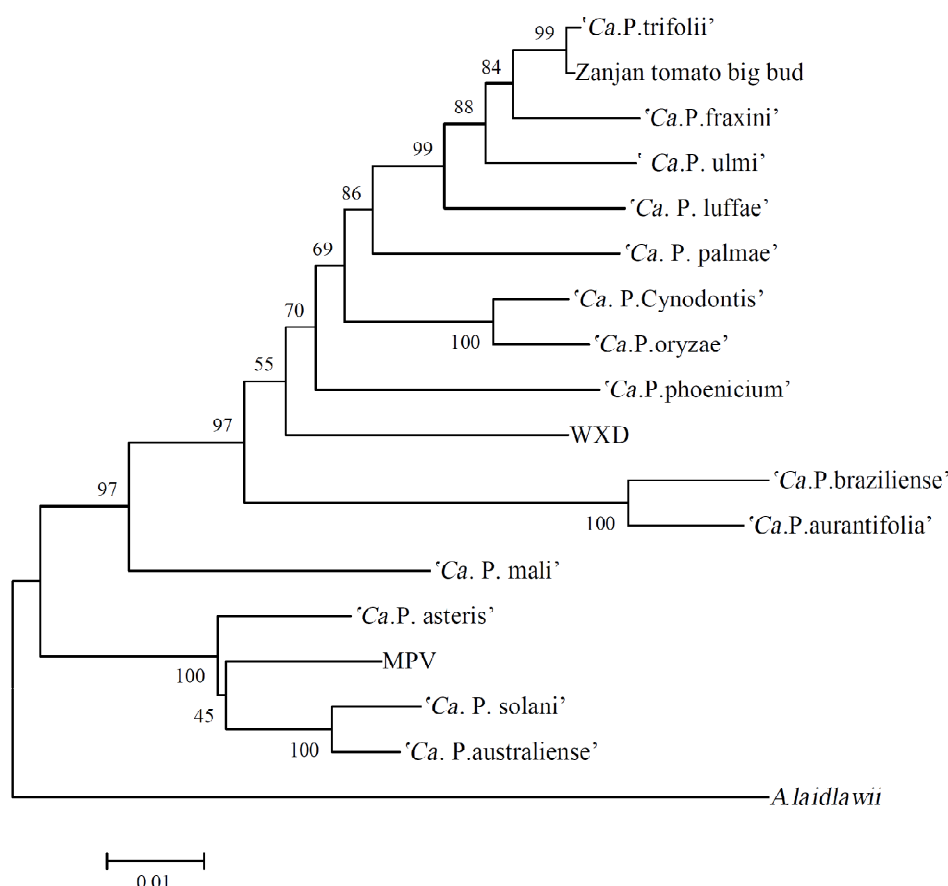
شکل ۴: نقوش حاصل از RFLP رایانه ای بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ۱۲۵۰ جفت باز از ژن ار ان ای ریپوزومی 16S فیتوپلاسمی همراه با غنچه درشت گوجه فرنگی در زنجان و یک فیتوپلاسم از زیرگروه 16SrVI-A با استفاده از آنزیم‌های: *BfaI*, *BamHI*, *AluI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI* و *TaqI*. مارکر دی ان ای، virtual  $\phi$ X174 *HaeIII* digested size marker

**Fig. 4.** Virtual RFLP patterns obtained by digestion of 1250 bp nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene of Zanzan tomato big bud phytoplasma and a phytoplasma related to 16SrVI-A subgroup using the enzymes *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI* and *TaqI*. MW, virtual  $\phi$ X174 *HaeIII* digested size marker.

### تعیین ترادف و آنالیز فیلوژنتیکی

بیشترین نزدیکی را با فیتوپلاسم‌های گروه ار ان ای ریپوزومی افزولش شبدر (*Clover proliferatin*, 16SrVI) دارد. بر اساس درخت تبارزایی حاصل از مقایسه ترادف ژن ار ان ای ریپوزومی 16S، جدایه زنجان با 'Ca. P. trifolii' فیتوپلاسمی از گروه 16SrVI طبقه‌بندی شد (شکل ۵). درخت تبارزایی حاصل از مقایسه ترادف ژن ار ان ای ریپوزومی 16S فیتوپلاسمی همراه با تورم جوانه گوجه فرنگی در زنجان با فیتوپلاسم‌های نماینده زیر گروه‌های 16SrVI نشان داد که جدایه زنجان در مقایسه با سایر زیر گروه‌ها به نماینده زیر گروه A (*Vinca virescence* phytoplasma, 16SrVI-A) نزدیکتر است و با آن در یک شاخه قرار می‌گیرد (شکل ۶).

محصول پی سی آر مستقیم (۱۸۰۰ جفت بازی از اپرون ار ان ای ریپوزومی) پنج بوته گوجه فرنگی دارای علائم غنچه درشت در مزارع زنجان و ۵ بوته پروانش مایه زنی شده با فیتوپلاسم‌های همراه با آن‌ها تعیین ترادف شدند. میزان تشابه نوکلئوتیدی ترادف‌های به دست آمده ۱۰۰ درصد بود و ترادف یک نمونه از آن‌ها تحت رس شمار KR150879 در بانک جهانی ترادف‌ها ثبت شد. جستجو با برنامه بلاست با استفاده از قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی، ضمن تایید فیتوپلاسمی بودن غنچه درشت گوجه فرنگی در زنجان نشان داد که ترادف‌های مورد مطالعه در این تحقیق در میان فیتوپلاسم‌های انتخابی از بانک ترادف‌ها،



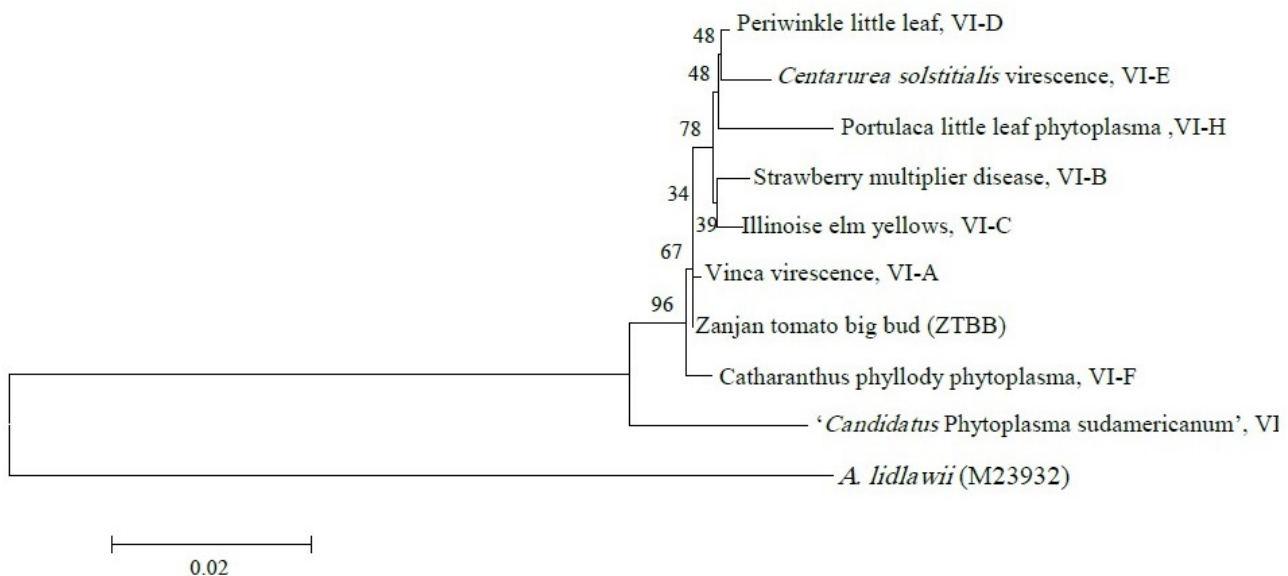
شکل ۵. دندروگرام حاصل از تطابق نوکلئوتیدی ۱۷ فیتوپلاسمای *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup با استفاده از گزینه درخت فیلوژنتیکی و روش Neighbor joining در نرم‌افزار MEGA5 بر اساس ترادف نوکلئوتیدی کامل ژن آر آن ای ریبوزومی 16S. اعداد بالای شاخه‌ها، اعتبار سنجی (bootstrap) برای ۱۰۰۰ تکرار می‌باشند. برای اسامی فیتوپلاسمای و شماره دسترسی آن‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.

**Fig. 5. Phylogenetic tree constructed from the alignment of full length 16S rRNA gene nucleotide sequences of 17 phytoplasmas and *Acholeplasma laidlawii* as the outgroup by Neighbor joining method using MEGA5 Software; Numbers above the branches, bootstrap support (1000 replicates). See table 1 for phytoplasma names and related accession numbers.**

## بحث

باشد. با توجه به اینکه این بیماری در تمامی مزارع گوجه فرنگی زنجان دیده می‌شود و در بسیاری از مزارع گوجه فرنگی استان زنجان میزان آلودگی به بیماری غنچه درشت به بیش از ۵۰ درصد می‌رسد این بیماری تهدیدی جدی برای کشت گوجه فرنگی در استان زنجان و احتمالاً استان‌های مجاور می‌باشد. در همین چارچوب تعیین ناقل و منابع پایداری عامل بیماری از اولویت‌های

بر اساس علائم بیماری، انتقال عامل بیماری با سس و پیوند به گوجه فرنگی، بادنجان و پروانش و ظهور علائم فیتوپلاسمایی و واکنش مثبت در PCR با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی فیتوپلاسمای، غنچه درشت گوجه فرنگی در زنجان ماهیت فیتوپلاسمایی دارد. این اولین گزارش از بیماری غنچه درشت در استان زنجان می‌باشد.



شکل ۶- دندروگرام حاصل از تطابق نوکلئوتیدی ۸ فیتوپلازما به عنوان نمایندگان زیر گروه های گروه 16SrVI، فیتوپلازمای همراه با عنجه درشت گوجه فرنگی زنجان و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup بر اساس ۱۲۰۰ جفت باز از ژن ار ان ای ریبوزومی 16S. دندوگرام با روش Neighbor joining در نرم افزار MEGA5 ترسیم شده است. اعداد بالای شاخه ها، اعتبار سنجی (bootstrap) برای ۱۰۰۰ تکرار می باشند. برای اسامی فیتوپلازماها و شماره دسترسی آن ها به جدول ۱ مراجعه شود.

**Fig. 6.** Phylogenetic tree constructed from the alignment of 1200 bp of 16S rRNA gene nucleotide sequences of 8 phytoplasmas as representatives of 16SrVI phytoplasma subgroups, Zanzan tomato big bud phytoplasma and *Acholeplasma laidlawii* as the outgroup. The tree was constructed by Neighbor joining method using MEGA5 Software; Numbers above the branches, bootstrap support (1000 replicates). See table 1 for phytoplasma names and related accession numbers.

فیتوپلازمایی از زیر گروه 16SrVI-A همراه با بیماری عنجه درشت گوجه فرنگی از استان های رضوی شمالی و جنوبی (Jamshidi *et al.* 2015) و البرز (Moslemkhani *et al.* 2014) گزارش شده اند. فیتوپلازمایی از گروه های 16SrII در استان های فارس، یزد (Salehi *et al.* 2005) و بوشهر (Salehi *et al.* 2014) و 16SrIX از استان های فارس (Salehi *et al.* 2005) و خراسان رضوی (Jamshidi *et al.* 2011) گزارش شده اند. به نظر می رسد در ایران فیتوپلازمای 16SrVI-A در مقایسه با فیتوپلازمای متعلق به دیگر گروه های فیتوپلازمایی از نظر همراهی با بیماری عنجه درشت اهمیت بیشتری

پژوهشی می باشد. براساس آزمون های RFLP مجازی، جستجو با برنامه ی BLAST، آنالیزهای فیلورنیتیکی و میزان تشابه نوکلئوتیدی فیتوپلازمای عامل عنجه درشت در استان زنجان متعلق به زیر گروه A در گروه افزولش شبدر (16SrVI) یا گونه ی پیشنهادی 'Can. Phytoplasma trifolii' می باشد. تاکنون چندین فیتوپلازما به عنوان اعضای زیرگروه 16SrVI-A شناخته شده اند مانند Potato witch's Broom (PWB) (رس شماره های AY500130, AY500818) و *Vinca virescence* (رس شماره AY500817) (Lee & Bettner 2004). پیشتر در ایران

- دارند. تا بحال در نقاط مختلف جهان فیتوپلاسماهایی از هفت گروه از آن ای ریپوزومی همراه با بیماری غنچه درشت گزارش شده اند. این گروه‌ها عبارتند از 16SrI زیر گروه‌های A (Lee et al. 1998) و B (Okuda et al. 1997; Marcone et al. 1997; Archoa et al. 2007) 16SrII زیر گروه‌های A (Xu et al. 2013) و D (Omar & Foissac 2012; Singh et al. 2012; Salehi et al. 2014)، 16SrIII (Serrone et al. 2001; Tapia-Tussell et al. 2006)، 16SrVI (Serrone et al. 2001)، 16SrV (Anfoka Moslemkhani et al. 2014; Du et al. 2013) 16SrIX (et al. 2003; Lee et al. 1998، 16SrXII و 16SrXIII (Jamshidi et al. 2015) Sertkaya et al. 2007; Vellios & Lioliopoulon 2007) (در مناطق گوجه کاری استان زنجان نیز احتمال وجود فیتوپلاسماهایی غیر از 16SrVI-A وجود دارد که ردیابی آنها از نظر همه گیری بیماری غنچه درشت در این استان ضرورت دارد.

## منابع

- Amaral mello A. P. O., Flores D. and Bedendo I. P. 2006. Identificacao do phytoplasma associado ao enfezamento dorepolho, atraves de analise de RFLP. Fitopatologia Brasileira 31:239.
- Anfoka G. H. A., Khalil A. B. and Fattash I. 2003. Detection and molecular characterization of a phytoplasma associated with big bud disease of tomatoes in Jordan. Journal of Phytopathology 151:223–227.
- Arocha Y., Antesana O., Montellano E., Franco P., Plata G. and Jones P. 2007. 'Candidatus Phytoplasma lycopersici', a phytoplasma associated with 'hoja de perejil' disease in Bolivia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57:1704- 1710.
- Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S. and Contaldo N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. America Journal of Plant Science 5:1763-1788.
- Dehghani A. and Salehi M. 2011. Tomato big bud disease in Lorestan province. Iranian Journal of Plant Pathology 47:165.
- Deng S. and Hiruki C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. Journal of Microbiology Methods 14:53-61.
- Du Y., Mou H., Shi B., Xu X. and Xiang B. 2013. Mollecular Detection and Identification of a 16SrVI group phytoplasma associated with a big bud disease in Xinjiang China. Journal of Phytopathology 161:870- 873.
- FAOSTAT. 2009. Preliminary 2009 production data. <http://faostat.fao.org>.
- Gundersen D. E. and Lee I. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathologia Mediterranea 35:144-151.
- Jamshidi E., Jafarpoor B., Roohani H. and Salehi M. 2011. Tomato big bud disease in Khorasan-e Razavi and Khorasan-e Shomali provinces. Proceedings of the 19<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran:482.
- Lee I. M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E. and Bartoszyk I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International journal ofsystematic bacteriology 48:1153-1169.
- Lee I.-M. and Davis R. E. 1992. Mycoplasmas which infect plants and insects. pp. 379–390. In: J. Maniloff, R.N. McElhaney, L.R. Finch and J.B. Baseman (Eds.), Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. American Society of Microbiology: Washington, D.C.
- Lee I-M., Davis R. E. and Gundersen-Rindal D. E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. Annual Review of Microbiology 54:221-255.
- Lee L. M. and Bettner K. D. 2004. Clover Proliferation Group (16SrVI) Subgroup A (16SrVI- A) Phytoplasma is a Probable Causal Agent of Dry Bean Phyllody Disease in Washington. Plant Disease 88:429.
- Marcone C., Ragozzino A. and Seemuller E. 1997. Detection and identification of phytoplasmas infecting vegetable, ornamental and foliage crops in southern Italy. Journal of Plant Pathology 79:211- 217.

- McCoy R. E., Caudwell A., Chang C. J., Chen T. A., Chiykowski L. N., Cousin M. T., Dale J. L., de Leeuw G. T. N., Golino D. A., Hackett K. J., Kirkpatrick B. C., Marwitz R., Petzold H., Sinha R. C., Sugiura M., Withcomb R. F., Yang I. L., Zhu B. M. and Seemuller E. 1989. The Mycoplasmas, pp: 545-640. In: R. F. Whitcomb and J. G. Tully (Eds). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. Academic Press.
- Moslemkhani C., Razavi V., Sadeghi L., Mobasser S., Khelgati bana F. and Shahbazi R. 2014. Characterization of phytoplasmas associated with tomato big bud disease, using single-tube nested PCR. Journal of Crop Protection 3:573- 580.
- Okuda S., Prince J. P., Davis R. E., Dally E. L., Lee I. M., Margone B. and Kato S. 1997. Two groups of phytoplasmas from Japan distinguished on the basis of amplification and restriction analysis of 16S rDNA. Plant Disease 81:301- 305.
- Omar A. F. and Foissac X. 2012. Occurrence and incidence of phytoplasmas of the 16SrII-D subgroup on solanaceous and cucurbit crops in Egypt. European Journal of Plant Pathology 133:353- 360.
- Rashidi M., Ghosta Y. and Bahar M. 2006. Russain olive (*Elaeagnus angustifolia* L.), a new host for phytoplasma from Iran. Proceeding of 17<sup>th</sup> Iranian Plant Protection congress, Iran:349.
- Salehi E., Salehi M., Taghavi S. M. and Izadpanah K. 2014. A 16SrII-D Phytoplasma strain associated with Tomato Witches Broom in Bushehr province, Iran. Journal of Crop Protection 3:377-388.
- Salehi M. and Izadpanah K. 1992. Etiology and Transmission of sesame phyllody in Iran. Journal of Phytopathology 135:37-47.
- Salehi M., Heydarnejad J. and Izadpanah K. 2005. Molecular characterization and grouping of 35 phytoplasmas from central and southern provinces of Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 41:62-64.
- Schneider B., Seemeider E., Smart C. D. and Kirkpatrick B. C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas, pp. 369-380. In: S. Razin and J. G. Tully (Eds.), Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma, Vol.1. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Sentos-Cervantes M. E., Chavez-Medina J. A., Mendez-Lozano J. and Leyva-Lopez N. E. 2008. Detection and molecular characterization of two little leaf phytoplasma strains associated with pepper and tomato disease in Guanajuato and Sinaloa. Mexico. Plant Disease 92:1007-1011.
- Serrone P., Marzachi C., Bragalon M. and Galeffi P. 2001. Phytoplasma infection of tomato in central Italy. Phytopathologia Mediterranea 40:137-142.
- Sertkaya G., Martini M., Musetti R. and Osler R. 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. Bulletin of Insectology 60:141-142.
- Singh J., Rani A., Kumar P., Baranwal V. K., Saroj P. L. and Sirohi A. 2012. First report of a 16SrII-D phytoplasma '*Candidatus* Phytoplasma Australasia' associated with a tomato in India. New Disease Reports pp: 14.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739.
- Tapia-Tussell R., Susate-Dzul A., Cortes-Velazquez A., Torres-Calzada C., Quijano-Ramayo A., Martin-Mex R., Nexticapan-Garcez A. and Perez-Brito D. 2012. Molecular characterization of Yucatan tomato phytoplasma (Group 16SrIII). African Journal of Biotechnology 11:2169-2177.
- Thompson G. J. and Myanhardt L. 1987. Tomato big bud disease in south Africa . Phytophylactica 19:109-111.
- Vellios E. and Lioliopoulou F. 2007. Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece. Bulletin of Insectology 60:157-158.
- Weintraub P. and Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. Annual Review of Entomology 51: 91-111.
- Xu X., Mou H-Q., Zhu S. F., Liao X. L. and Zhao W. J. 2013. Detection and characterization of phytoplasma associated with big bud disease of tomato in china. Journal of Plant Pathology 161:430-433.
- Zhang Y.P., Uyemoto J. K. and Kirkpatrick B. C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytoplasmas for PCR assay. Journal of Virological Methods 71:45-50.
- Zhao Y., Wel W., Lee I-M., Shao J., Suo X. and Davis R. E. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:2582-2593.