مقاله کوتاه

تعیین ویژگی های بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسمای همراه با بیماری فیلودی خیار گلخانه‌ای در استان فارس*

BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A PHYTOPLASMA ASSOCIATED WITH GREENHOUSE CUCUMBER PHYLLODY IN FARS PROVINCE

حسین دهقان[۱]، محمد صالحی[۲]**، امین خوانچه زر[۳]و حسین افشاری[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۱۲)

چکیده

فیلودی یکی از بیماری های اقتصادی کشت های گلخانه ای خیار در ایران می باشد. عامل فیلودی خیار گلخانه ای در لارستان فارس به وسیله سس از خیار گلخانه ای به پروانش و بادنجان انتقال داده شد. برای مقایسه فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانه ای با فیتوپلاسمای عامل فیلودی اطلسی که در لارستان جمع آوری شده بود و سه فیتوپلاسمای متعلق به گروه زردی مینا در ایران شامل عامل فیلودی کلزا و فیتوپلاسما های همراه با زنجرک های *Macrosteles levis* و*Psammotettix striatus* که در گلخانه در پروانش نگهداری می شدند این فیتوپلاسما ها همراه با فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانه ای به وسیله پیوند جانبی به بوته های پروانش جوان و هم سن انتقال داده شدند. بر اساس علائم بیماری در پروانش، فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانه ای با فیتوپلاسمای عامل فیلودی اطلسی شباهت داشت ولی از فیتوپلاسماهای گروه زردی مینا متفاوت بود. در آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 ، واکنش خیارگلخانه ای و اطلسی دارای علائم در طبیعت ، بادنجان و پروانش های مایه زنی شده و دارای علائم در شرایط گلخانه مثبت بود. آزمون چند شکلی طولی قطعات برشی(RFLP) محصول PCR با جفت اغازگرP1/P7 نشان داد که فیتوپلاسماهای عامل فیلودی خیار گلخانه ای و اطلسی از یکدیگر قابل تشخیص نیستند ولی از سایر فیتوپلاسماهای مورد مطالعه متفاوتند. جستجو با برنامه بلاست ، آنالیز فیلوژنتیکی و در صد تشابه نوکلئوتیدی نشان داد که فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانه ای متعلق به گروه ار ان ای ریبوزومی جاروک بادام زمینی(16SrII) می باشد . همین بررسی های مولکولی نشان داد که فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانه ای با وجود تعلق به گروه جاروک بادام زمینی از فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش وفیتوپلاسماهای عامل جاروک یونجه فارس و یزد، دیگر اعضای مهم و اقتصادی گروه جاروک بادام زمینی د ر ایران، متفاوت است. در گزارش حاضر برای اولین بار خیار گلخانه ای به عنوان میزبان گروه فیتوپلاسمایی جاروک بادام زمینی معرفی می شود.

کلیدواژه: خیار گلخانه ای، اطلسی، فیلودی ، فیتوپلاسما، انتقال با سس و پیوند، PCR ، گروه فیتوپلاسمایی جاروک بادام زمینی

---

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

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

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی و استادیار باغبانی ، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

۲- دانشیار پژوهشی بیماری شناسی گیاهی ، بخش گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

۳- کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی ، مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه شیراز

مقدمه

توسعه تکنولوژی و همچنین دوره رشد کوتاه خیار گلخانه ای(*Cucumis sativus*) امکان کشت آن را در اکثر مناطق آب و هوایی فراهم کرده است و هم‌اکنون در ایران مهمترین محصول گلخانه‌ای محسوب می‌شود به طوریکه ۹۵ درصد سطح زیر کشت گلخانه‌های کشور را به خود اختصاص داده است (Arbabi 2005 , Peyvast 2005) .

فیلودی یکی از بیماری های خیارگلخانه ای در ایران است و در اکثر موارد خسارت آن چشمگیر است. اولین گزارش از وقوع بیماری فیلودی خیار گلخانه‌ای در ایران مربوطه به منطقه جیرفت و کهنوج در جنوب استان کرمان می‌باشد. علائم بارز بیماری فیلودی خیار گلخانه ای عبارتند از کوتاه شدن فاصله میانگره ها، سبزشدن گلبرگ‌ها، فیلودی اجزاء گل، کپه‌ای و جارویی شدن انتهای ساقه ها , عقیم شدن گیاه و بد شکلی و ترک خوردگی میوه هایی که قبل از آلودگی تشکیل شده اند. درصد ابتلا بوته‌ها در برخی از واحدهای گلخانه‌ای خیار به بیش از ۸۰٪ می‌رسد(Azadvar *et al*. 2004). در بازدیدهایی که طی سال‌های ۸۳ لغایت ۸۵ از گلخانه‌های استان‌های یزد، تهران و فارس به عمل آمد در منطقه حومه یزد و پیشوا در ورامین ولارستان فارس علائم فیلودی خیار گلخانه‌ای مشاهده گردید. میزان آلودگی در پیشوای ورامین و اکرمیه یزد به ترتیب ۸۰ و ۳۵ درصد بود(Esmailzadeh- Hosseini 2006). در مورد ماهیت فیتوپلاسمای فیلودی خیار گلخانه ای در ایران هیچ اطلاعی در دست نیست و گزارش حاضر نتایج تعیین برخی از خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسمای همراه با فیلودی خیار گلخانه ای در استان فارس می باشد.

روش بررسی

گیاهان مورد استفاده در آزمایشهای انتقال عامل بیماری شامل پروانش (*Catharanthus roseus*) و بادنجان (*Solanum melongena*) بودند که از طریق بذر در یک گلخانه عاری از حشرات تکثیر شدند. گیاهان مورد مطالعه تقریبا در هشت هفتگی با عامل بیماری مایه زنی شدند. معیار آلودگی گیا هان مایه زنی شده به فیتوپلاسما ظهور علائم و واکنش مثبت در آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بود.

یک بوته خیار گلخانه‌ای با علائم بارز بیماری فیلودی (شکل ۱) در یکی از گلخانه های پرورش خیار سبز در شهرستان لار از استان فارس ویک بوته اطلسی(*Petunia hybrida*) دارای علائم فیلودی در اطراف همان گلخانه انتخاب و پس از نشاء در گلدان سفالی به گلخانه بیماری شناسی گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس منتقل شدند تا از آنها به عنوان منبع عامل بیماریهای فیلودی خیار گلخانه ای و فیلودی اطلسی در آزمایش ها استفاده شود. از پروانش آلوده به فیتوپلاسمای بیماری فیلودی کلزا و پروانش های آلوده به فیتوپلاسماهای همراه با زنجرک های *Macrosteles levis* و *Psammottetix striatus* موجود در گلخانه مرکز تحقیقات کشاورزی و منبع طبیعی فارس نیز به عنوان منبع سه فیتوپلاسمای متعلق به گروه زردی مینا در ایران (Salehi *et al*. 2005) در مطالعات مربوط به مقایسه فیتو پلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانه ای با آنها استفاده گردید.

برای انتقال عوامل فیلودی های خیار گلخانه ای و اطلسی از خیار گلخانه ای و اطلسی به پروانش و از پروانش به بادنجان از سس (*Cuscuta campestris*

شکل۱. علائم ریز برگی ، کاهش فاصله میانگره و جاروک در یک بوته خیار گلخانه ای از لارستان فارس، مورد استفاده به عنوان منبع بیماری فیلودی خیار گلخانه ای

Fig 1. Little leaf, internode shortening and witches' broom in a greenhouse cucumber plant from Larestan (Fars province) used as the source of greenhouse cucumber phyllody disease.

سالم موجود روی یک بوته چغندر قند استفاده گردید و به روش قبل (Salehi *et al*. 1995) پنج بوته سالم از هر گیاه مورد نظر با عوامل فیلودی های خیار گلخانه ای و اطلسی مایه زنی شدند. برای مقایسه علائم در پروانش های هم سن ، به طور همزمان از بوته های پروانش آلوده به هریک از عوامل بیماری های فیلودی خیار گلخانه ای، فیلودی اطلسی، فیلودی کلزا و فیتوپلاسماهای همراه با زنجرک های *M. levis* و *P. striatus* پنج پیوندک مشابه تهیه و به روش پیوند جانبی (Salehi *et al.* 1995) در فاصله ۱۰ سانتیمتری از طوقه روی پنج بوته پروانش سالم (هر بوته یک پیوندک) پیوند شد. گیاهان مایه زنی شده با سس پس از عاری شدن از سس و گیاهان مایه زنی شده با پیوند.پس از برداشتن کیسه پلاستیکی برای مشاهده علائم بیماری و تهیه نمونه برای انجام آزمونPCR در یک گلخانه عاری از حشرات تحت نظر قرار گرفتند.

استخراج دی.ان.ای کل از ۲۰۰ میلی گرم رگبرگ میانی گیاهان آلوده وسالم به روش *ژانگ و همکاران* (Zhang *et al*.1998) انجام گرفت. در آزمون PCR با استفاده از دی.ان.ای کل و جفت آغازگر عمومی Pl/P7 آلودگی نمونه ها به فیتوپلاسما ارزیابی شد. جفت آغازگرPl/P7 یک قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی شامل ژن ار.ان.ای ریبوزومی ۱۶S و ناحیه بین ژنهای ار.ان.ای ریبوزومی S ۱۶و ۲۳S و ابتدای ژن آر.ان.ای ریبوزومی S ۲۳ را تکثیر می کند (Schneider *et al.* 1995). حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، اجزائ تشکیل دهنده و مقدار آن ها و چرخه دمایی مانند روش *عباسیان وصالحی* (Abbasian & Salehi 2010) انتخاب گردید. محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت بررسی و از باندهای حاصل عکسبرداری شد. آزمون چندشکلی طولی قطعات برشی (RFLP) به روش *لی و همکاران* (1998) انجام شد. محصول PCR مستقیم (۱۸۰۰ جفت باز) مربوط به هر نمونه به طور جداگانه با آنزیم های *Hpa*II، *Hae*III، *Hinf*I، *Cfo*I، *Alu*I، *Rsa*I هضم شد. محلول پایه برای هر واکنش ۲۰ میکرولیتر تنظیم گردید. 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 ۸ میکرولیتر محصول PCR اضافه و

سپس بمدت چهار ساعت در دستگاه ترموبلاک با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. محصول هضم آنزیمی با آنزیمهای مختلف در ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت مورد بررسی قرار گرفته و از آن ها عکسبرداری گردید.

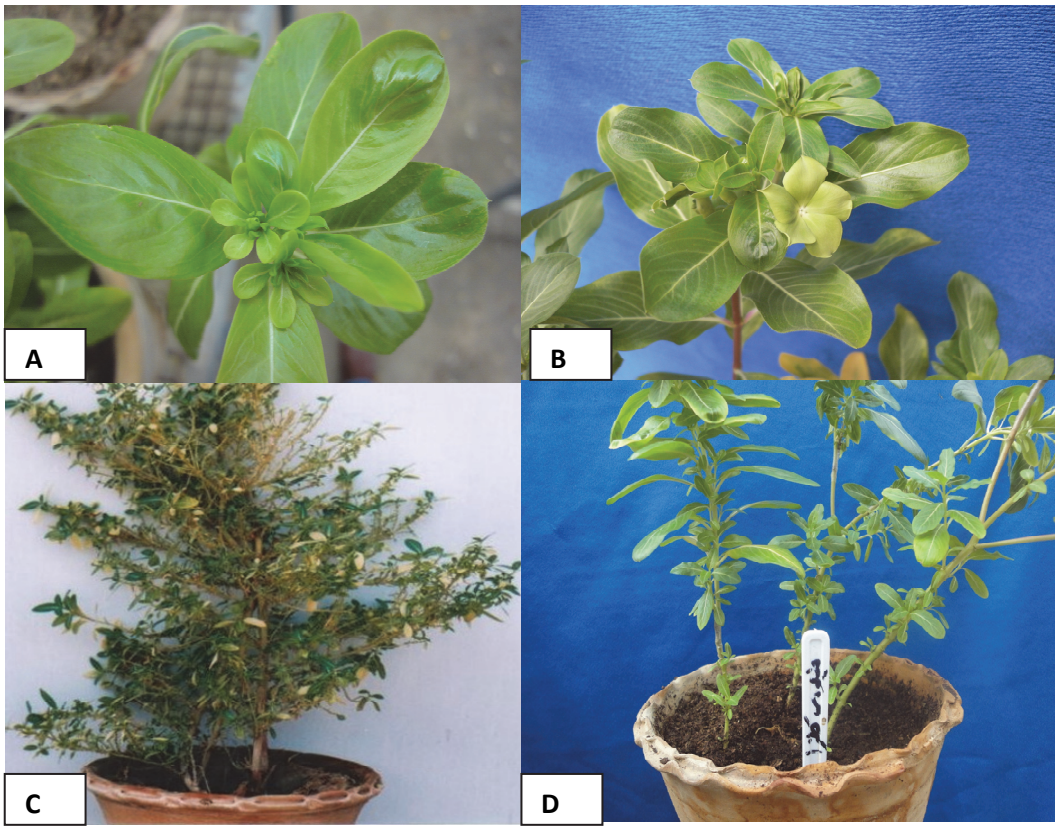
با استفاده از کیت InsT/Aclone PCR product Cloning Kit (Fermentas, Lithuania) محصول پی سی آر فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانه ای با جفت آغازگر P1/P7 (۱۸۰۰ جفت باز) همسانه سازی و دی ان ای همانند سازی شده بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده در پلاسمید pTZ57R/T قرار داده شد (Sambrook *et al.* 1989). پلاسمید نوترکیب حاصل جهت تکثیر به باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α منتقل گردید. پلاسمید ها پس از خالص سازی (Holmes and Guigley 1981) به منظور تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (سئول، کره جنوبی) ارسال گردید . با استفاده از ترادف های بدست آمده و با استفاده از برنامه بلاست (BLAST) نزدیکترین ترادف با عامل بیماری برگسانی خیار گلخانه ای جستجو شد. از ترادف های فیتوپلاسمایی موجود در بانک ژن ۱۷ ترادف مورد استفاده قرار گرفتند و به کمک نرم افزار DNAMAN دندروگرام مربوطه رسم گردید. در این آنالیز ترادف مشابه در *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup بکار رفت.

نتایج

به سه بوته از پنج بوته پروانش مایه زنی شده با عامل فیلودی خیار گلخانه ای، عامل فیلودی انتقال داده شد و درآنها به تدریج از ۳۵ روز بعد از مایه زنی علائم بیماری ظاهر شد. علائم ناشی از انتقال عامل فیلودی خیار گلخانه ای در پروانش عبارت بودند از سبز شدن گلبرگ ها، فیلودی اجزای گل و جاروک (شکل ۲). به هر پنج بوته پروانش مایه زنی شده با عامل فیلودی اطلسی عامل بیماری انتقال یافت و در آنها علائم سبز شدن گلبرگ ها، فیلودی اجزای گل و جاروک ظاهر شد که تقریبا شبیه علائم ناشی فیتوپلاسمای عامل فیلودی گلخانه ای در پروانش بود (شکل ۲). واکنش پروانش های دارای علائم مایه زنی شده با عامل فیلودی خیار گلخانه ای و فیلودی اطلسی در آزمون PCR مثبت بود.

ازپنج بوته بادنجان مایه زنی شده با عامل فیلودی خیار گلخانه ای، عامل بیماری به دو بوته انتقال یافت و در آن ها علائم گل سبزی، فیلودی، ریز برگی و کوتولگی ظاهر شد (شکل ۳). واکنش بوته های علائم دار در مقابل آزمون PCR مثبت بود. از پنج بوته بانجان مایه زنی شده با عامل فیلودی اطلسی هیچ کدام علائم مشخصی را نشان ندادند و واکنش آنها در آزمون PCR منفی بود.

در پروانش های هم سنی که باروش پیوند به طور همزمان با عوامل بیماری های فیلودی خیار گلخانه ای، فیلودی اطلسی، فیلودی کلزا و فیتوپلاسماهای همراه با زنجرک های *M. levis* و *P. striatus* .مایه زنی شده بودند ، حدود یک ماه بعداز مایه زنی ابتدا علائم بیماری در پروانش های مایه زنی شده با عامل فیلودی خیار گلخانه ای و اطلسی و سپس به تدریج در پروانش های مایه زنی شده با فیتوپلاسماهای عامل فیلودی کلزا و فیتوپلاسماهای همراه با زنجرک های *M. levis* و *P. striatus* ظاهر شد. به جز در پروانش های مایه زنی شده با فیتوپلاسماهای همراه با زنجرک *P. striatus* در پروانش های مایه زنی شده با سایر فیتوپلاسماها، علائم گل سبزی و فیلودی مشاهده گردید. علائم بارز ناشی از فیتوپلاسمای همراه با *P. striatus* در پروانش، زردی و ریزبرگی بود (شکل ۲).



شکل ۲. برخی از علائم ناشی از مایه زنی پروانش با فیتوپلاسماهای مورد مطالعه از طریق پیوند A. ، علائم گل سبزی و برگسانی ناشی از فیتوپلاسماهای عامل فیلودی خیارگلخانه ای. B، علائم گل سبزی و برگسانی ناشی از فیتوپلاسمای همراه با زنجرک *Macrosteles levis* . C، ریزبرگی، کاهش فاصله میانگره، عدم گل سبزی و برگسانی ناشی از فیتوپلاسمای همراه با زنجرک *Psammottetix striatus*. D ، ریزبرگی، رشد جوانه های جانبی در محل طوقه و کاهش فاصله میانگره ناشی از فیتوپلاسمای عامل فیلودی کلزا

Fig. 2. Disease symptoms in periwinkle plants graft inoculated with selected phytoplasmas. A, virescence and phyllody induced by greenhouse cucumber phyllody phytoplasma; B, virescence and phyllody induced by phytoplasma associated with *Macrosteles levis*; C, little leaf and internode shortening induced by phytoplasma associated with *Psammottetix striatus* ; D, small leaf, shoot proliferation and internode shortening induced by rapeseed phyllody phytoplasma.

در پروانش مایه زنی شده با عامل فیلودی کلزا، علاوه بر گل سبزی، فیلودی و جاروک، ریز برگی شدید، رشد جوانه های طوقه و ساقه و کوتولگی نیز مشاهده شد (شکل ۲) که از این نظر با سایر فیتوپلاسماهای مورد مطالعه قابل تشخیص بود. در پروانش های مایه زنی شده با فیتوپلاسمای همراه با زنجرک سوماتتیکس علائم کاهش میانگره ، رشد جوانه های داخل گل ، ریزبرگی و جاروک محسوس نبود. واکنش کلیه پروانش های مایه زنی شده و دارای علائم در آزمون PCR مثبت بود.

پس از ۳۵ چرخه PCR مستقیم با استفاده ازجفت آغازگر P1/P7 در نمونه های دی. ان. ای خیار گلخانه ای و اطلسی دارای علائم فیلودی و تمامی بوته های پروانش و بادمجان مایه زنی شده با سس یا پیوند و دارای علائم بیماری، باند مورد انتظار (۱۸۰۰ جفت باز) مشاهده گردید.

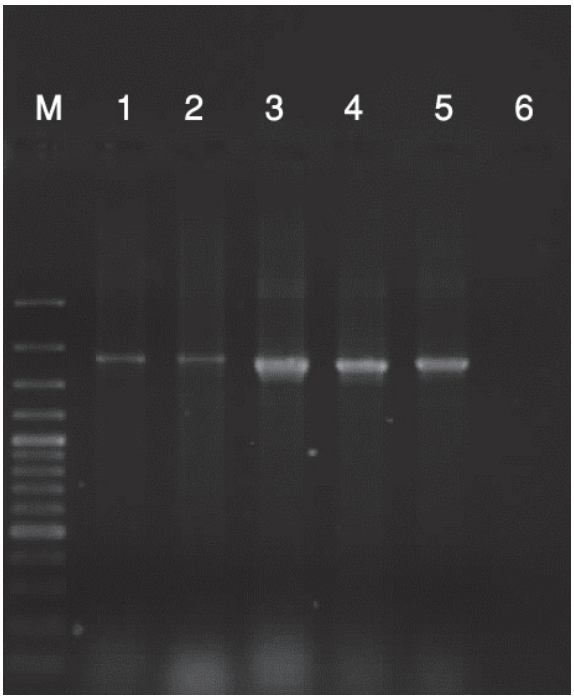
شکل ۳.علائم گل سبزی و فیلودی در بادنجان مایه زنی شده با فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانه ای بوسیله سس

Fig. 3. Flower virescence and phyllody in eggplant graft inoculated with greenhouse cucumber phyllody phytoplasma.

تحت همین شرایط در گیاهان سالم خیار گلخانه ای، اطلسی، ، بادنجان ، پروانش و زنجرک های سالم *M. levis* و *P. striatus* چنین باندی مشاهده نگردید (شکل ۴).

در آزمونRFLP با آنزیم های برشی *Alu*I، *Rsa*I ، *Cfo*I، *Hinf*I ، *Hae*III ، *Hpa*، به طور کلی تعداد باندها و موقعیت باندها در فیتوپلاسماهای اطلسی و خیار گلخانه ای یکسان بود. فیتوپلاسماهای همراه با *P. striatus* و فیلودی کلزا نیز از نظر تعداد باندهای حاصل و همچنین موقعیت قرار گرفتن باندها با یکدیگر مشابه بودند. نقوش حاصل از فیتوپلاسمای همراه با *M. levis* از سایر نمونه های مورد آزمایش قابل تفکیک بود.

قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی محصول پی سی آر مستقیم با جفت آغازگر P1/P7 در فیتوپلاسمای عامل فیلودی گلخانه ای تعیین ترادف شد و با رس شمار (Accession number) JN574839 در بانک ژن قرار داده شد. جستجو با برنامه بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) نشان داد که قطعه تعیین ترادف شده با قطعه مشابه از دی ان ای ریبوزومی در فیتوپلاسماهای گروه جاروک بادام زمینی



شکل۴. الکتروفورز نمونه ای از محصول PCR مستقیم با جفت آغازگر عمومی P1 /P7 (۱۸۰۰جفت باز از اپرون ارانای ریبوزومی). راهک های ۱ تا ۵ به ترتیب نمونه های پروانش های مایه زنی شده با فیتوپلاسما های همراه با زنجرک *Macrosteles levis* ، فیلودی خیار گلخانه ای، فیلودی اطلسی، فیلودی کلزا و فیتوپلاسما ی همراه با رنجرک*Psammmotettix striatus* . راهک ۶ نمونه پروانش سالم. را هک M، مارکر.

Fig. 4. Electrophoresis of 1800 bp of phytoplasma rDNA operon amplified by direct PCR with P1/P7 primer pair. Lanes 1 -5 inoculated periwinkles with phytoplasmas associated with *Macrosteles levis* leafhopper, greenhouse cucumber phyllody, rapeseed phyllody, petunia phyllody and a phytoplasma associated with *Psammmotettix striatus* leafhoppers, respectively. Lane 6, healthy periwinkle and lane M, marker.

(Peanut witches' broom)، 16SrII از جمله فیتوپلاسماهای عامل جاروک یونجه فارس و یزد در ایران بیشترین نزدیکی را دارد.

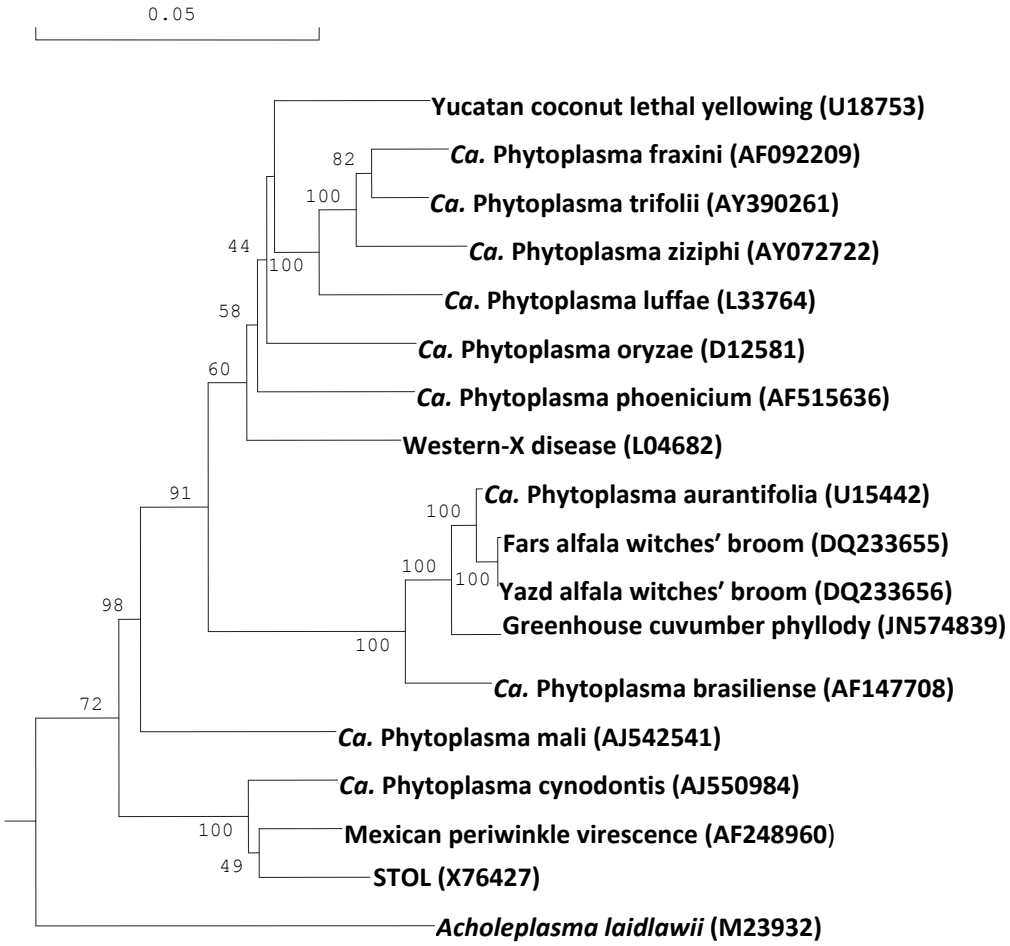
با استفاده از نرم افزار DNAMAN ترادف ۱۸۰۰جفت بازی از اپرون ار ان ای ریبوزومی با ترادف های مشابه در ۱۷ فیتوپلاسما از گروه های مختلف فیتوپلاسمایی مقایسه

و دندروگرام تبارزایی (شکل ۵) ترسیم گردید. ایـن آنـالیز نیز نشان داد که فیتوپلاسـمای عامـل فیلـودی خیـار سـبز گلخانه ای با وجود تعلق به گروه فیتوپلاسمایی 16SrII بـا سه فیتوپلاسمای مهم واقتصادی ایرانی متعلق به این گـروه شامل فیتوپلاسماهای عامل بیماری های جاروک لیموترش (Accession no. U15442)، جـاروک یونجـه فـارس (Accession no.DO233655) و جـاروک یونجـه یـزد (Accession no. DO233656) تفاوت دارد.

آنـالیز همولـوژی نیـز نشـان داد کـه میـزان همولـوژی فیتوپلاسمای عامل بیمـاری فیلـودی خیـار گلخانـه ای بـا فیتوپلاسماهای عامل جاروک لیموترش ، جـاروک یونجـه فارس و جاروک یونجه یزد به ترتیب۹۸/۵، ۹۸/۲ و ۹۸ /۳ درصد می باشد. میـزان همولـوژی فیتوپلاسـمای فیلـودی خیار گلخانه ای با فیتوپلاسمای گروه زردی مینـا کمتـر از ۹۷/۵ درصد بود

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر برای اولین بار برخـی از خصوصـیات بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسمای فیلودی خیـار گلخانـه ای تعیین گردید. در بررسی های گلخانه ای عامل بیمـاری فیلودی با استفاده از سس از خیار گلخانه ای به پـروانش و از پروانش به بادنجان انتقال داده شد. علائم بیماری ناشـی از انتقال عامل فیلودی خیار گلخانه ای به پروانش با علائم ناشی از فیتوپلاسماهای شناخته شـده از گـروه زردی مینـا (Aster yellows, 16S rI) در ایـران شـامل فیتوپلاسـمای عامل فیلودی کلزا و فیتوپلاسماهای همراه با زنجرک هـای هـای *M. levis* و *P. striatus* (Salehi *et al*. 2005) کـه همراه با فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار به پروانش انتقال داده شـده بودنـد، متفـاوت بـود . در اکثـر نقـاط دنیـا فیتوپلاسماهای همراه با بیماری در کدوییان متعلق به گروه 16S rI (زردی مینـــا) مـــی باشـــند Provvidenti (1996,Montana *et a.l* 2000) . آآنالیز تبارزایی (شکل ۵) نیـز نشـان دادکـه دربـین فیتوپلاسـماهای مـورد بررسـی فیتوپلاسمای عامل فیلودی گلخانـه ای رابطـه نزدیکـی بـا فیتوپلاسـمای عامـل زردی مینـا نـدارد. میـزان همولـوژی فیتوپلاسمای فیلودی خیار گلخانه ای با فیتوپلاسمای گروه زردی مینـا کمتـر از ۹۷/۵ درصـد بودکـه عـدم تعلـق فیتوپلاسمای عامل فیلودی گلخانه ای به گـروه زردی مینـا را نشـان مـی دهـد. تعلـق دو فیتوپلاسـما بـه یـک گـروه فیتوپلاسمایی مسـتلزم وجـود ۹۷/۵ درصـد همولـوژی یـا بیشـتر از آن مـی باشـد (RPCM 2004, Firrao *et al*. 2005). جستجو با بلاست وآنالیز تبارزایی (شکل ۵) نشان دادکه عامـل فیلـودی خیـار گلخانـه ای متعلـق بـه گـروه فیتوپلاسمایی جاروک بادام زمینـی مـی باشـد. بـر اسـاس همین آنالیز قیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانه ای بـا فیتوپلاسما های عامل جاروک لیموترش، جـاروک یونجـه یزد و جاروک یونجه فارس (دیگر اعضای گـروه جـاروک بادام زمینی در ایران) (Salehi *et al*. 2005) یکسان نیسـت . میزان همولوژی فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانـه ای با فیتوپلاسما های عامل جـاروک لیمـوترش، جـاروک یونجه یزد و و جاروک یونجه فارس صد در صد نبود . بـر اساس علائم بیماری در پـروانش نیـز فیتوپلاسـمای عامـل فیلودی خیار گلخانـه ای از فیتوپلاسـمای عامـل جـاروک لیمـوترش کـاملا متفـاوت اسـت زیـرا بـا عامـل جـاروک لیموترش ریز برگی، جاروک و کوتولگی بسیار شدید است و گل سـبزی نـاقص مـی باشـد (Salehi *et a*l. 2000) در حالیکه با عامل فیلودی خیار گلخانه ای میزان ریزبرگـی و کوتولگی ملایم است و گل سبزی کامل می باشد (تحقیـق حاضر). بر اساس آنـالیز تـرادف میـانی ژن هـای ار ان ای



شکل ۵- دندروگرام حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی ژن ار ان ای ریبوزومی 16S در۱۷ فیتوپلاسما و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup به روش Neighbor joining و با استفاده از نرم افزار DNAMAN. اعداد داخل پرانتز رس شمارهای بانک ژن می باشند .

Fig. 5. Phylogenetic tree constructed from the alignment of full length 16S rRNA gene nucleotide sequences of 17 phytoplasmas and *Acholeplasma laidlawii* as outgroup by Neighbor joining using program and DNAMAN software. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers.

ریبوزومی 23S و16S (SR) فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار سبز مزرعه ای در ایران نیز متعلق به گروه جاروک بادام زمینی است (Salehi *et al.* 2005) و احتمالا فیتوپلاسما های عامل فیلودی خیار گلخانه ای و خیار مزرعه ای یکسان می باشند. در این زمینه باید مطالعات بیشتری انجام شود. بر اساس علائم بیماری در پروانش، فیتوپلاسمای عامل برگسانی فیلودی خیار گلخانه ای از فیتوپلاسماهای عامل جاروک یونجه یزد و فارس قابل

تشخیص نیست . فیتوپلاسمای عامل فیلودی اطلسی از نظر علائم در پروانش و آنالیزRFLP با فیتوپلاسمای عامل فیلودی خیار گلخانه ای یکسان بود و به همین دلیل فیتوپلاسمای عامل فیلودی اطلسی در ایران متعلق به گروه 16S rII می باشد. احتمالا اطلسی یکی از میزبان های عامل فیلودی خیار گلخانه ای می باشد. در این مطالعه بر خلاف عامل فیلودی خیار سبز گلخانه ای عامل فیلودی اطلسی به بادنجان منتقل نشد.آزمایش مایه زنی بادنجان با عامل بیماری فیلودی اطلسی باید مجددا تکرار شود و در صورت اطمینان از عدم انتقال قیتوپلاسمای عامل فیلودی اطلسی به بادنجان ، فیتوپلاسما های عامل فیلودی خیار گلخانه ای و اطلسی یکسان نیستند. در این تحقیق بیماری فیلودی اطلسی برای اولین بار از فارس گزارش می گردد.

بر اساس نتایج RFLP فیتوپلاسمای همراه با زنجرک *P. striatus* و فیتوپلاسمای عامل فیلودی کلزا یکسان هستند (شکل ۵) ولی براساس نوع علائم در گیاه پروانش متفاوتند. در ایران باید زنجرک *P. striatus* از نظر انتقال این دو فیتوپلاسما به کلزا بررسی شود. پیشتر در ایران زنجرک *Circulifer haematoceps* به عنوان ناقل بیماری فیتوپلاسمایی فیلودی کلزا گزارش شده است (Salehi *et al*. 2011).

منابع

جهت ملاحظه به صفحهٔ ۱۸۶ متن انگلیسی مراجعه شود.