مقاله کوتاه

تعیین برخی ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسمای همراه با بیماری فیلودی پروانش در بهشهر، مازندران*

مریم فتاحی[۱]، محمد صالحی[۲**]، عباس شرزهی[۱] و سیدعلیرضا اسمعیل‌زاده حسینی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۲۰)

چکیده

در بازدیدهای سال ۱۳۹۲ از فضاهای سبز و پارک‌های شهرستان بهشهر (استان مازندران) بیماری فیلودی پروانش مشاهده گردید. عامل بیماری فیلودی از پروانش با پیوند به پروانش و به وسیله سس به بادنجان انتقال داده شد. پروانش‌های آلوده در طبیعت و گیاهان مایه زنی شده در آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) مستقیم با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 و واکنش زنجیره ای پلیمراز دو مرحله ای با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2 واکنش مثبت نشان دادند و در آن‌ها قطعات مورد انتظار تکثیر شد. مقایسه چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) مجازی نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با فیلودی پروانش بهشهر متعلق به زیر گروه A در گروه افژولش شبدر (16SrVI) بود. آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از ترادف کامل ژن آر ان ای ریبوزومی 16S نیز نتایج آنالیز RFLP مجازی را تایید کرد و نشان داد که فیتوپلاسمای عامل فیلودی پروانش بهشهر با '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'، فیتوپلاسمایی از زیر گروه 16SrVI-A طبقه بندی می‌شود. این اولین گزارش از بیماری فیلودی پروانش و تعیین ویژگی‌های فیتوپلاسمای همراه با آن در استان مازندران می‌باشد.

کلیدواژه: RFLP مجازی، آنالیز فیلوژنتیکی، گروه 16SrVI

---

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده ی اول، ارایه شده به گروه گیاه پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی مرودشت

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

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی مرودشت.

۲ و ۳. به ترتیب دانشیار و مربی پژوهشی بیماری شناسی گیاهی بخش‌های تحقیقات گیاهپزشکی مراکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استانهای فارس ویزد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ، ایران.

Partial biological and molecular characteristics of a phytoplasma associated with Behshahr (Mazandaran) periwinkle phyllody*

M. Fattahi[1], M. Salehi[2], A. Sharzehi[1], and S.A. Esmailzadeh Hosseini[3]**

(Received: 6.5.2015; Accepted: 9.3.2016)

Abstract

In 2013 surveys conducted in the green area and parks of Behshahr city (Mazandaran province of Iran), phyllody disease of periwinkle was observed. Agent of Behshahr periwinkle phyllody (BPP) was transmitted from naturally phyllody affected periwinkle to periwinkle by grafting and to eggplant via dodder inoculation. Naturally affected periwinkle plants and all inoculated plants reacted positively in direct PCR using P1/P7 primer pair and nested PCR using P1/P7 and R16F2n/R16R2 primer pairs and expected fragments were amplified. Virtual restriction fragment length polymorphism (RFLP) of nested PCR product sequence (1.2 kbp), percent homology and phylogenetic analysis of full length 16S rDNA sequence showed that BPP phytoplasma belongs to phytoplasma in the clover proliferation (16SrVI) phytoplasma group. The same analyses classified BPP phytoplasma with '*Candidatus* Phytoplasma trifolli', a member of A subgroup in the 16SrVI group. This is the first report of periwinkle phytoplasma disease and characterization of associated phytoplasma in Mazandran province.

Keywords: Virtual RFLP, Phylogenetic analysis, 16SrVI group

---

* A Part of MSc. Thesis of the First Author Submitted to Islamic Azad Univ., Marvdasht Branch, Marvdasht, Iran

** Corresponding author's E-mail: salehi_abarkoohi@yahoo.com

1. Former MSc. Student and Assist. Prof. of Plant Pathol., respectively, Islamic Azad Univ., Marvdasht Branch, Marvdasht, Iran.
2. Res. Assoc. Prof. of Plant Pathol., Plant Protection Research Dept., Fars Agricultural and Natural Resource Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran
3. Res. Instructor of Plant Pathol., Plant Protection Research Dept., Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yazd, Iran

مقدمه

مولیکوت‌ها یا میکوپلاسماها پروکاریوت‌های ریز، فاقد دیواره‌ی سلولی، چندریختی، دارای ژنوم کوچک (۶۰۰ - ۱۲۰۰ کیلوجفت باز)، مقاوم به آنتی بیوتیک پنی سیلین و حساس به آنتی بیوتیک‌های گروه تتراسیکیلین و دارای درصد G+C پایین می‌باشند. فیتوپلاسماها در داخل مولیکوت‌ها یک شاخه تک تبار (جنس پیشنهادی 'Candidatus Phytoplasma') را تشکیل می‌دهند. این بیمارگرها غیر قابل کشت و محدود به آوند آبکشی گیاهان میزبان می‌باشند و در طبیعت توسط حشرات ناقل با رابطه پایا و تکثیری منتقل می‌شوند (Bertaccini *et al.* 2014). پروانش [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.] گیاهی متعلق به تیره ی Apocynaceae و بومی جزایر ماداگاسکار در اقیانوس هند می‌باشد. این گیاه علاوه بر جنبه‌های زینتی و رشد سریع، حاوی ترکیبات دارویی نیز می‌باشد. علاوه بر آن، پروانش به عنوان میزبان طبیعی بسیاری از فیتوپلاسماها از جمله فیتوپلاسماهایی از گروه‌های 16SrI (Torres *et al.* 2004)، 16SrIII-A، 16SrIII-E، 16SrVI-A (Lee *et al.* 1998) و 16SrXIII (Gundersen *et al.* 1994) گزارش شده است. در بازدیدهای سال ۱۳۹۲ که به منظور شناسایی بیماری‌های فیتوپلاسمایی از فضاهای سبز و پارک‌های شهرستان بهشهر (استان مازندران) به عمل آمد بیماری برگسانی (فیلودی) پروانش مشاهده گردید. گزارش حاضر نتایج تعیین پاره‌ای از ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسمای همراه با بیماری فیلودی پروانش در بهشهر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

یک بوته پروانش دارای علایم فیلودی از شهرستان بهشهر انتخاب و پس از نشاء در یک گلدان به گلخانه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس انتقال داده شد تا از آن به عنوان منبع عامل بیماری در مطالعات بیولوژیکی (انتقال با پیوند و سس) و آزمون‌های مولکولی استفاده‌شود. گیاهان مورد استفاده در مطالعات بیولوژیکی از طریق بذر در یک گلخانه عاری از حشرات تکثیر شدند.

از سس (*Cuscuta campestris* Yank.) برای انتقال عامل بیماری از پروانش به گیاهان سالم بادنجان استفاده شد. یک بوته پروانش دارای علایم بیماری‌های فیتوپلاسمایی که از طریق پیوند با عامل فیلودی پروانش بهشهر مایه‌زنی شده بود در کنار چغندر قند آلوده به سس سالم قرار داده شد تا سس از روی چغندر قند به پروانش منتقل شود. بعد از رشد سس روی پروانش آلوده ارتباط بین گلدان چغندر قند و پروانش آلوده قطع شد. سپس گلدان حاوی پروانش آلوده به فیتوپلاسما و کلونیزه شده با سس در کنار پنج بوته‌ی بادنجان سالم قرار داده شد تا سس روی بوته‌های بادنجان مستقر شود. یک ماه بعد ارتباط بین بوته پروانش و بوته‌های بادنجان قطع و بوته-های بادنجان پس از عاری شدن از سس در یک گلخانه عاری از حشرات برای مشاهده علایم احتمالی بیماری تحت نظر قرار گرفتند.

از پروانش مبتلا به بیماری فیلودی، پیوندک (شاخه کوتاه با دو تا سه برگ) تهیه و به روش جانبی روی پروانش‌های سالم پیوند شد. با این روش پنج بوته پروانش سالم با عامل بیماری فیلودی پروانش مایه‌زنی شدند. روی هر بوته پروانش دو پیوندک آلوده پیوند زده شد.

با روش *ژانگ و همکاران* (Zhang *et al.* 1998) از ۰/۳ گرم بافت رگبرگ میانی نمونه‌های پروانش دارای علایم در بهشهر، پروانش‌ها و بادنجان‌های مایه‌زنی شده و گیاهان سالم پروانش و بادنجان دی ان ای کل استخراج شد. برای

ردیابی فیتوپلاسما در نمونه‌های دی ان ای، آزمون پی سی آر مستقیم با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 (Schneider *et al.* 1995) و پی سی آر دو مرحله‌ای با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 (دور اول) و R16F2n/R16R2 (Gundersen & Lee 1996) (دور دوم) با شرایطی که پیشتر گزارش شده است (Abbasian *et al.* 2010) انجام شد. در کلیه آزمون‌های پی سی آر از گیاه سالم به عنوان شاهد منفی و از دی ان ای استخراج شده از پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

محصول پی سی آر مستقیم (۱۸۰۰ جفت باز از اپرون آر ان آ ی ریبوزومی) و پی سی آر دو مرحله‌ای (۱۲۰۰ جفت باز از ژن آر ان آ ی ریبوزومی16S) برای تعیین ترادف مستقیماً به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد.

با استفاده از برنامه بلاست (BLAST) نزدیک‌ترین ترادف‌های فیتوپلاسمایی به فیتوپلاسمای فیلودی پروانش بهشهر تعیین گردید. با استفاده از نرم افزار DNAMAN، ترادف کامل ژن آران ا ی ریبوزومی 16S فیتوپلاسمای فیلودی پروانش بهشهر با ترادف مشابه در فیتوپلاسماهایی از گروه‌های آر ان ای ریبوزومی مختلف و *Acholoplasma laidlawii* به عنوان out group مقایسه شد و درخت فیلوژنتیکی ترسیم گردید. با استفاده از همین نرم افزار میزان تشابه نوکلئوتیدی بین جدایه بهشهر و فیتوپلاسماهای انتخابی تعیین گردید.

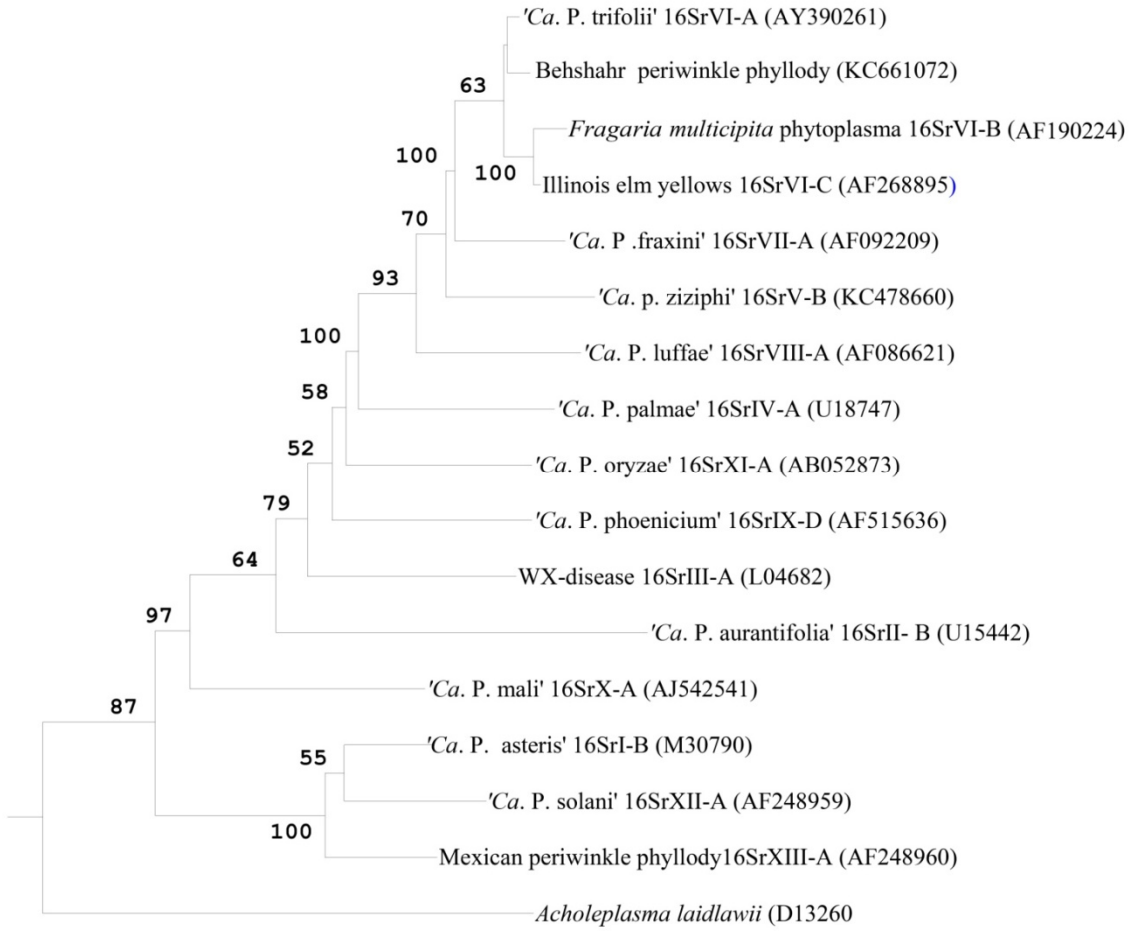
چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) مجازی ترادف محصول پی سی آر دو مرحله ای با استفاده از برنامه *i*phyClassifier (Zhao *et al.* 2009) انجام شد. ترادف‌های ناحیه تکثیر شده با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 در فیتوپلاسمای عامل فیلودی پروانش بهشهر و فیتوپلاسماهای نماینده زیر گروه‌های (A, B, C, D, E, F, G, H, I) گروه افژولش شبدر با ۱۷ آنزیم برشی شامل *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*uI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hin*fI, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI, *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, *Taq*I. (Lee *et al.* 1998) برش داده شد و الگوهای برشی جدایه‌ی فیلودی پروانش با الگوهای حاصل از برش با این آنزیم‌ها در فیتوپلاسماهای دیگر (Lee *et al.* 1998) مقایسه شد.

نتایج و بحث

بارزترین علایم بیماری فیلودی پروانش بهشهر عبارت بودند از گل سبزی، برگسانی، کاهش فاصله میان گره‌ها، زردی و کوتولگی. عامل بیماری فیلودی با استفاده از پیوند از پروانش به پنج بوته سالم پروانش و با استفاده از سس از یک بوته پروانش آلوده شده با روش پیوند به سه بوته از پنج بوته بادنجان مایه‌زنی شده منتقل گردید. علایم بارز بیماری در پروانش‌های مایه‌زنی شده شامل گل سبزی، برگسانی، ریزبرگی، کاهش فاصله میان گره‌ها و جاروک و در بادنجان‌های مایه‌زنی شده شامل رگبرگ روشنی، ریزبرگی و گل سبزی بود.

در پی سی آر مستقیم و پی سی آر دو مرحله‌ای در تمام نمونه‌ها قطعات مورد انتظار (به ترتیب ۱۸۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز) تکثیر شد. تحت همین شرایط در گیاهان سالم پروانش و بادنجان چنین قطعاتی تکثیر نشد.

محصول پی سی آر مستقیم یک نمونه از پروانش دارای علایم در بهشهر تعیین ترادف شد و ترادف کامل ژن آر ان ا ی ریبوزومی 16S تحت رس شمار KC661072 در بانک جهانی ترادف‌ها ثبت شد. جستجو با برنامه بلاست با ترادف به دست آمده نشان داد که بین ترادف‌های فیتوپلاسمایی موجود در بانک جهانی ترادف‌ها، فیتوپلاسمای عامل بیماری فیلودی پروانش بهشهر



شکل ۱. دندروگرام حاصل از تطابق نوکلئوتیدی ۱۶ فیتوپلاسما و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup با استفاده از گزینه درخت فیلوژنتیکی و روش Neighbor joining در نرم‌افزار DNAMAN بر اساس ترادف نوکلئوتیدی کامل ژن آر ان ای ریبوزومی 16S، *Ca.* P.، 'Candidatus Phytoplasma'، اعداد داخل پرانتز، رس شمار در بانک جهانی ترادف‌ها و اعداد بالای شاخه‌ها، اعتبار سنجی (bootstrap) با ۱۰۰ تکرارمی‌باشند.

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed from the alignment of full length 16S rRNA gene nucleotide sequences of 16 phytoplasmas and *Acholeplasma laidlawii* as outgroup by Neighbor joining using DNAMAN software; *Ca.* P., '*Candidatus* Phytoplasma'; Numbers in parentheses, GenBank accession numbers; Numbers above the branches, bootstrap support (100 replicates).

بیش‌ترین نزدیکی را با اعضای گروه افژولش شبدر(16SrVI) داشت.

نقوش حاصل از آنالیز RFLP مجازی در فیتوپلاسمای فیلودی پروانش بهشهر و *'Candidatus* Phytoplasma trifolii' (رس شمار،AY390261)، نماینده زیر گروه A در گروه 16SrVI یکسان بود.

در درخت حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی (شکل۱) عامل فیلودی پروانش بهشهر با گروه 16SrVI طبقه‌بندی شد. در بین اعضای این گروه بیشترین نزدیکی را با *'Candidatus* Phytoplasma trifolii' (AY390261) نماینده زیر گروه 16SVI-A داشت. در بین فیتوپلاسماهای نماینده زیر گروه‌های گروه 16SrVI، فیتوپلاسمای عامل فیلودی پروانش بهشهر بیشترین تشابه نوکلئوتیدی(۹۹/۵٪) را با *'Candidatus* Phytoplasma trifolii'(16SrVI-A)

داشت.

بر اساس علایم بیماری، انتقال با پیوند و سس و واکنش مثبت در آزمون‌های پی‌سی‌آر مستقیم و دو مرحله ای بیماری فیلودی پروانش در بهشهر ماهیت فیتوپلاسمایی دارد. این اولین گزارش از بیماری فیلودی پروانش در شرایط طبیعی و بررسی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسمای همراه با آن در استان مازندران می‌باشد. پیش‌تر بیماری‌های فیتوپلاسمایی پروانش از باجگاه شیراز(استان فارس)، چابهار (استان سیستان و بلوچستان) و جیرفت (استان کرمان) گزارش شده است (Salehi *et al.* 2005). بررسی‌های مولکولی نشان داد که فیتوپلاسمای همراه در باجگاه متعلق به گروه 16SrI و فیتوپلاسماهای همراه در چابهار و جیرفت متعلق به گروه 16SrII می‌باشند (Salehi *et al.* 2005). براساس جستجو با برنامه بلاست، آر.اف .اِل پی مجازی، میزان تشابه نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیکی، فیتوپلاسمای عامل فیلودی پروانش بهشهر متعلق به زیر گروه A در گروه افژولش شبدر (16SrVI) می‌باشد. این اولین گزارش از همراهی یک فیتوپلاسما از گروه 16SrVI با یک بیماری پروانش در ایران می‌باشد. در ایران پیش تر فیتوپلاسماهایی از زیر گروه 16SrVI-A به عنوان عامل بیماری فیتوپلاسمایی تورم جوانه گوجه فرنگی در استان‌های آذربایجان شرقی، خراسان رضوی، کرمانشاه و کردستان (Jamshidi *et al.* 2014) گزارش شده اند. گروه 16SrVI از نظر تعداد اعضاء، اهمیت اقتصادی و گسترش، یکی از گروه‌های مهم فیتوپلاسمایی است. تا کنون فیتوپلاسماهایی از این گروه به عنوان عامل بیماری در درختان، سبزیجات، گیاهان زینتی و زراعی و علف‌های هرز (Wei *et al.* 2007, Bertaccini *et al.* 2014)، گزارش شده است. همراهی فیتوپلاسمایی از زیر گروه 16SrVI-A در گیاه پروانش در بهشهر نشان می‌دهد که احتمالا" سایر بیماری‌های فیتوپلاسمایی مثل تورم جوانه گوجه فرنگی در استان مازندران قابل ردیابی است.

منابع

Abbasian M., Salehi M. and Hassanzadeh N. 2010. Reaction of stone fruit cultivars to almond witches' broom phytoplasma. Iranian Journal of Plant Pathology 46:153-160 (in Persian with English summary).

Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri A. and Contaldo N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: A severe threat to agriculture. American Journal of Plant Science 5: 1763-1788.

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.

Gundersen D. E., Lee I.-M., Rehner S. A., Davis R. E. and Kingsbury D. T. 1994. Phylogeny of mycoplasmalike organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. Journal of Bacteriology 176: 5244-5254.

Jamshidi E., Jafarpour B., Rouhani H. and Salehi M. 2014. Association of members of clover proliferation (16SrVI) and pigeon pea witches'broom (16SrIX) phytoplasma groups with tomato big bud disease in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 50:79-89.

Lee I.-M., Gundersen D. E., Davis R. E. and Bartoszyk I. M. 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.

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., Seemüller 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, J. G. Tully (Eds.), Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology, Vol.1. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Torres L., Galdeano E., Docampo D. and Conci L. 2004. Characterization of aster yellows phytoplasma

associated with Catharanthus little leaf in Argentina. Journal of Plant Pathology 86: 209-214.
Wei W. Lee I.-M., Davis R.E., Suo, X. and Zhao, Y. 2007. Virtual RFLP analysis of 16S rDNA sequences identifies new sroups in the clover proliferation phytoplasma group. Bulletin of Insectology 60**:** 349-350. ubg
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., Wei W., Lee I.-M., Shao J., Suo X. and Davis R.E. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *i*PhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59: 2582-2593