گزارش علمی کوتاه
اولین گزارش از بیماری جاروک توتون در ایران

لیلا معارف[۱] و محمد صالحی[۲*]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲٤)

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) یکی از محصولات اقتصادی و مهم در منطقه برازجان از استان بوشهر است. در بازدید هایی که در سال ۱۳۹۵ به منظور شناسایی بیماری های فیتوپلاسمایی مزارع توتون این منطقه به عمل آمد در برخی از مزارع توتون بیماری جاروک مشاهده گردید. علائم بارز این بیماری عبارت بودند از، غنچه درشتی، گلسبزی، برگسانی (فیلودی)، کاهش فاصله میانگره ها، زردی بین رگبرگی، ریزبرگی، جاروک و کوتولگی (شکل ۱). از تعداد شش بوته توتون دارای علائم و سه بوته بدون علائم با روش *ژانگ و همکاران* (Zhang *et al*. 1998) دی.ان.ای کل استخراج گردید. جهت بررسی آلودگی فیتوپلاسمایی نمونه های دی.ان.ا استخراج شده، از آزمون PCR مستقیم با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 (Deng & Hiruki 1991, Schneider *et al.* 1995) و آزمون PCR دو مرحله ای با استفاده از جفت آغازگر های P1/P7 دور اول و R16F2n/R16R2(Gundersen & Lee 1996) دردور دوم استفاده شد. در آزمون های PCR مستقیم و دو مرحله ای به ترتیب قطعاتی با اندازه ی تقریبی ۱۸۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز از اپرون آر.ان.ای ریبوزومی تکثیر گردید. تحت همین شرایط چنین قطعاتی از گیاهان شاهد و بدون علایم تکثیر نشد. محصول PCR های مستقیم همسانه سازی و تعیین ترادف شد. تشابه نوکلئوتیدی ترادف های نمونه های به دست آمده ۱۰۰٪ بود و بخشی از ترادف ژن ار. ان . ای ریبوزومی16S یک نمونه از آن ها تحت رس شمار KX692288 در بانک جهانی ترادف ها (GenBank) ثبت شد. جستجو با برنامه Blast نشان داد که فیتوپلاسمای عامل جاروک توتون بیشترین نزدیکی را با فیتوپلاسماهای گروه جاروک بادام زمینی (Peanut witches'-broom, 16SrII) دارد. آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA7 نشان داد که فیتوپلاسمای عامل جاروک توتون با فیتوپلاسماهای گروه 16SrII طبقه بندی می شودو بیشترین نزدیکی را با زیرگروه C دارد. با استفاده از برنامه *i*PhyClassifier (Zhao *et al*. 2009) RFLP مجازی قطعه تکثیر شده (با جفت آغازگر R16F2n/R16R2) انجام شد و در نتیجه تعلق فیتوپلاسمای عامل جاروک توتون برازجان را به زیر گروه C گروه 16SrII تایید نمود. این اولین گزارش از وجود بیماری جاروک توتون در ایران می باشد.

کلیدواژه ها: **توتون، برازجان، فیتوپلاسما، واکنش های زنجیره ای پلیمراز،** 16SrII.

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

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲. دانشیار پژوهش بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

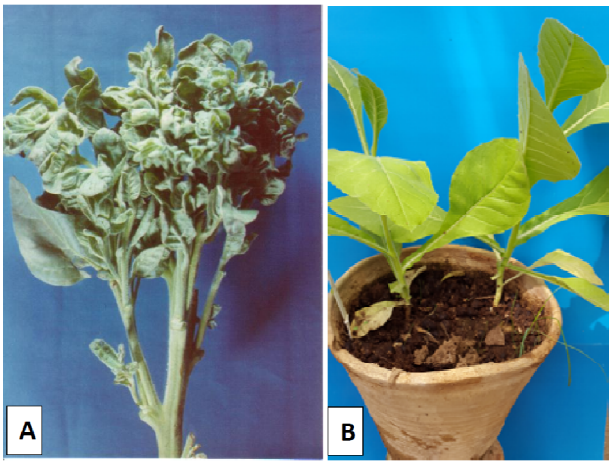
First report of witches'-broom disease of tobacco in Iran

L. Moaref[1] and M. Salehi[2*]

(Received: 4.9.2017; Accepted: 15.9.2017)

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is an economically important crop in Borazjan (Bushehr province, Iran). In 2016 surveys conducted in tobacco fields of Borazjan for phytoplasma diseases, tobacco witches'-broom (TWB) disease was observed. The main disease symptoms were big bud, flower virescence and phylllody, internode shortening, inter veinal yellowing, little leaf, leaf curl, witches'-broom and stunting. Total DNA was extracted from six symptomatic and three symptomless tobacco plants using Zhang *et al*. (1998) procedure. For phytoplasma detection DNA samples were tested in direct polymerase chain reaction (PCR) using phytoplasma primer pair P1/P7 (Deng& Hiruki 1991, Schneider *et al.* 1995) or nested PCR using the same primer pair followed by R16F2n/R16R2(Gundersen & Lee 1996) primers. Amplicons of 1.8 and 1.2 kb, respectively were amplified in samples of symptomatic plants but not in symptomless ones. All P1/P7 primed amplicons were cloned and sequenced. The obtained 16S rDNA sequences showed 100% sequence identity with each other and a representative of these sequences deposited in GenBank (KX692288). Blast search showed that TWB phytoplasma shared maximum homology (99%) with 16SrII phytoplasma strains. Phylogenetic analysis using MEGA7 showed that TWB phytoplasma clustered with16SrII group phytoplasmas closest to 16SrII-C subgroup. Virtual RFLP analysis using *i*PhyClassifier (Zhao *et al*. 2009) confirmed that the TWB phytoplasma belongs to 16Sr group II, subgroup C. To our knowledge this is the first report of association of a 16SrII phytoplasma with TWB disease in Iran.

Keywords: Tobacco, Borazjan, Phytoplasma, Polymerase chain reaction, 16SrII.



شکل ۱. A، علائم بیماری جاروک توتون شامل کاهش فاصله میانگره ها، زردی بین رگبرگی ، ریزبرگی و لوله ای شدن بر گ ها، جاروک و کوتولگی؛ B، توتون فاقد علائم بیماری

Fig 1. A, Tobacco witches'-broom symptoms including internode shortening, interveinal chlorosis , little leaf, leaf curl and witches'-broom; B, symptomless tobacco

* Corresponding author's E-mail: salehi_abarkoohi@yahoo.com
1. MSc. student , Department of Microbiology, College of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
2. Research Assoc. Prof. of Plant Pathol., Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.

منابع

Deng S. and Hiruki C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. Journal of Microbiology Methods 14:53-61.

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.

Schneider B., Seemuller 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 Mycoplasmology, Vol.1. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Zhang Y., Uyemoto J. K. and Kirpatrick 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.

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.