

## ردیابی و شناسایی فیتوپلاسمای همراه با بیماری زوال گلابی و پسیل گلابی (*Cacopsylla pyricola*) در استان‌های فارس و خراسان رضوی\*

سیدمصطفی شرافت<sup>۱</sup>، محمد صالحی<sup>۲\*</sup>، محمد سالاری<sup>۱</sup> و نوذر رستگاری<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۳)

### چکیده

در بازدهی‌های سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۹۱ در باغ‌های گلابی استان‌های خراسان رضوی و فارس علائم زوال گلابی مشاهده گردید. در آزمون‌های PCR دو مرحله‌ای با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 در دور اول و جفت آغازگرهای R16F2n/R16R2 و fO1/rO1 در دور دوم، در درختان دارای علائم زوال در باغ‌های مشهد و چناران در استان خراسان رضوی و سه منطقه از فارس شامل باجگاه، دشت ارژن و استهبان، پسیل (*Cacopsylla pyricola*) های جمع‌آوری شده از روی درختان دارای علائم در باغ‌های ناسیونال مشهد و باجگاه شیراز و گیاهان مایه‌زنی شده با عامل زوال گلابی به ترتیب قطعاتی به اندازه تقریبی ۱۲۰۰ و ۱۰۵۰ جفت باز از ژن آر. ان. ای. ریبوزومی 16S تکثیر شد. آزمون‌های RFLP واقعی و مجازی نشان داد که فیتوپلاسمای ردیابی شده در درختان گلابی، حشرات پسیل و گیاهان مایه‌زنی شده، با یکدیگر و با '*Candidatus Phytoplasma pyri*'، عامل زوال گلابی یکسان می‌باشند. آنالیز فیلوژنتیکی نیز تعلق فیتوپلاسمای ردیابی شده در درختان گلابی و نمونه‌های پسیل به '*Ca. Phytoplasma pyri*' را تأیید کرد. فیتوپلاسمای عامل بیماری زوال گلابی از باغ‌های ناسیونال مشهد و باجگاه به ترتیب به عنوان نماینده‌های عامل زوال گلابی در استان‌های فارس و خراسان رضوی از طریق پیوند به نهال‌های گلابی و "به" و از طریق سس به پروانش انتقال داده شد. این اولین گزارش از وجود فیتوپلاسمای عامل زوال گلابی در پسیل گلابی در ایران و اولین گزارش از بیماری زوال گلابی در استان خراسان رضوی و نقاط جدیدی از استان فارس می‌باشد.

کلیدواژه: آنالیز مولکولی، فیتوپلاسم، '*Candidatus. Phytoplasma pyri*'، 16SrX-C

\* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشگاه زابل.

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

۱. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و پژوهشیار بیماری شناسی گیاهی گروه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه زابل.

۲. به ترتیب استاد پژوهشی بیماری‌شناسی گیاهی و استادیار پژوهشی حشره‌شناسی کشاورزی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس.

## Detection and identification of the phytoplasma associated with pear decline disease and the pear psylla, *Cacopsylla pyricola* in Fars and Khorasan-e-Razavi provinces\*

S.M. Sherafat<sup>1</sup>, M. Salehi<sup>2\*\*</sup>, M. Salari<sup>1</sup>, and N. Rastegari<sup>2</sup>

(Received: 16.5.2016; Accepted: 22.2.2018)

### Abstract

During 2007-2012 surveys, pear decline (PD) symptoms was observed in different pear orchards in Mashhad and Chenaran (Khorasan-e-Razavi province), and 11 areas in Fars province. In nested PCR assays using P1/P7 primer pair in the first round and R16F2n/R16R2 and fO1/rO1 primer pairs in the second round, expected fragments of 1250 and 1050 bp, respectively, were amplified from symptomatic naturally infected pear trees, pear psyllid (*Cacopsylla pyricola*) insects collected on PD affected trees and experimentally inoculated plants. Real and virtual RFLP analyses showed that phytoplasmas detected in naturally decline affected pear trees, inoculated plants and psyllid insects were identical and belonged to '*Candidatus Phytoplasma pyri*'. Phylogenetic analysis also confirmed that the detected phytoplasmas are closely related to '*Ca. Phytoplasma pyri*'. As representatives of PD phytoplasmas detected in Fars and Khorasan-e-Razavi provinces, respectively, pear decline agents from Bajgah and National orchard were transmitted from PD affected trees to pear and quince young trees by grafting and to periwinkle via dodder inoculation. This is the first report of association of '*Ca. Phytoplasma pyri*' with PD disease and psylla insects in Khorasan-e-Razavi and some areas in Fars province, Iran.

**Keywords:** '*Candidatus Phytoplasma pyri*', Molecular analysis, Phytoplasma, 16SrX-C

---

\* A Part of M.Sc. Thesis of The First Author Submitted to School of Agric., Zabol University., Zabol, Iran.

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

1. Former M.Sc. Student and Associate Prof. of Plant Phathol., respectively, Zabol University, Zabol, Iran.

2. Research Prof of Plant Pathology and Research Assistant Prof. of Agricultural Entomology, Respectively, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zarghan, Iran.

## مقدمه

اغلب در تابستان یا پاییز و هنگام مواجه شدن درخت با تنش‌های گرما یا هوای خشک رخ می‌دهد. این نشانگان مخصوصاً در درختانی که روی پایه‌های شرقی *Pyrus pyrifolia* (Burm. F) Nak و *P. ussuriensis* Maxim. پیوند شده باشند بروز می‌کنند زیرا به بیماری حساس‌اند. زوال تدریجی نیز در بعضی از پایه‌های شرقی و کم‌تحمیل مانند *P. communis* L. دیده می‌شود (Seemüller 1989). وقتی زوال تدریجی روی می‌دهد رشد شاخه‌های انتهایی کم و یا به‌کلی متوقف می‌شود، برگ‌ها تعدادشان کاهش پیدا کرده، کوچک و چرمی و سبز کمرنگ شده و حاشیه آن‌ها به سمت بالابرمی‌گردد. رنگ برگ‌ها در اوایل پاییز قرمز می‌شود و برگ درختان آلوده زودتر از برگ درختان سالم می‌ریزد. درخت بعد از ابتلا به بیماری ممکن است به حیات خود ادامه داده یا در خلال چند سال از پای درآید (Seemüller 1989). علاوه بر نشانه‌های ذکر شده کلروز برگ‌ها همراه با لکه‌های نکروتیک، ریزش شدید برگ در تابستان و ضعف و مرگ گیاه نیز می‌تواند جزء علائم بیماری باشد (Avinent et al. 1997). بررسی‌ها نشان داده که عامل زوال گلابی در گلابی فرانسوی (*P. communis* L.)، گلابی ژاپنی، گلابی چینی (*Pyrus pyrifolia*) (Burm. F) Nak و درخت "به" (*Cydonia oblonga* M.) نیز ایجاد بیماری می‌کند. بیشتر گونه‌های گلابی وحشی، از جمله *P. betulaeifolia* Bunge نیز به این بیماری حساس می‌باشند (Seemüller 1989).

بیماری زوال گلابی در اکثر نقاط دنیا ناشی از یک فیتوپلازما با نام '*Candidatus Phytoplasma pyri*' است. عامل بیماری بر مبنای طبقه‌بندی فعلی در گروه 16SrX یا گروه افزولش سیب و در زیرگروه 16SrX-C قرار می‌گیرد (Wei et al. 2007).

زوال فیتوپلازمایی گلابی یکی از بیماری‌های مهم و خطرناک گلابی است که موجب کاهش کیفی و کمی میوه، توقف رشد و مرگ درختان گلابی پیوندشده روی پایه‌های حساس می‌شود. اولین بار این بیماری در سال ۱۹۴۸ از بریتیش کلمبیا گزارش گردید و امروزه در همه باغات گلابی واقع در نواحی ساحلی اقیانوس آرام در امریکای شمالی و شمال شرقی ایالات متحده امریکا شیوع دارد. شواهدی در دست است که این بیماری قبل از آنکه در امریکای شمالی پیدا شود، در ایتالیا شیوع داشته است (Seemüller 1989). بیماری مذکور در بسیاری از کشورهای اروپایی از جمله اتریش، بلژیک، چک و اسلواکی، یونان، رومانی، سوئیس، آلمان، انگلستان، فرانسه و اتحاد جماهیر شوروی سابق (Davis et al. 1992, Avinent et al. 1986, Nemeth 1986, Kristensen 1976)، اسپانیا (Avinent et al. 2003, Garsia-Chapa et al. 1997) و کشور اوراسیایی ترکیه (Gazel et al. 2007) گزارش شده است. در آسیا نیز این بیماری از تایوان (Hsiu-Lin et al. 2007) گزارش گردیده است.

علائم بارز بیماری عبارتند از زوال سریع، زوال تدریجی و قرمز شدن برگ‌ها که گاهی با پیچیدگی برگ همراه است. هیچ‌یک از علائم مذکور برای تشخیص بیماری اطمینان‌بخش نیست. از این رو برای تشخیص قطعی باید از آزمون‌های مولکولی، ایمونولوژیکی، الکترون میکروسکوپی، دو رگ گیری DNA و یا انتقال به گیاه معرف استفاده کرد (Seemüller et al. 2011). زوال سریع عبارت است از پژمردگی ناگهانی درخت و مرگ آن در خلال چند روز یا چند هفته که اغلب پیش از زوال تدریجی یا قرمزی برگ‌ها صورت می‌گیرد. زوال سریع

Errea et al. 2002, Salehi ) دو سال در گیاه ظاهر می‌شود (et al. 2008

گزارش حاضر نتیجه پژوهش‌هایی است که در زمینه ردیابی و تعیین ویژگی‌های فیتوپلاسمای همراه با زوال در درختان گلابی و پسپیل گلابی در استان خراسان رضوی و نقاط جدیدی از استان فارس به عمل آمده است.

### مواد و روش‌های بررسی

#### محل‌های مورد بازدید و تهیه نمونه

در بازدیدهای تابستان و پاییز سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۹۱ به‌منظور ردیابی بیماری زوال گلابی در مناطق گلابی کاری استان فارس (مناطق کوهستانی شهرستان استهبان، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز (باجگاه)، دشت ارژن، قصردشت شیراز، بوانات، اقلید، نی‌ریز، سپیدان، خرم بید و مرودشت) و استان خراسان رضوی (چناران و باغ‌های پزشکی، ناسیونال، استقلال، مزرعه نمونه و مرکز تحقیقات کشاورزی در شهرستان مشهد) بازدید به عمل آمد. در هر باغ به‌طور تصادفی از چهار درخت دارای علائم و یک درخت سالم، در مجموع ۱۵۰ نمونه برگگی از ۱۵۰ درخت تهیه گردید. با آسپیراتور ۳۰ نمونه پسپیل گلابی (هر نمونه متشکل از ۵ پسپیل) از روی درختان گلابی دارای علائم زوال در باغ‌های ناسیونال مشهد و باجگاه جمع‌آوری و با درج مشخصات به آزمایشگاه انتقال داده شد.

#### انتقال با پیوند

از نهال‌های گلابی نطنزی روی پایه "به" و نهال‌های "به" خریداری شده از یک نهالستان مورد تأیید در استان فارس به‌عنوان پایه برای انتقال عامل بیماری زوال گلابی از طریق پیوند استفاده گردید. بیشتر با استفاده از آزمون PCR

در ایران بیماری زوال گلابی برای اولین بار توسط صالحی و همکاران از استهبان فارس گزارش شد (Salehi et al. 2008). اخیراً این بیماری از استان اصفهان و گیلان نیز گزارش شده است (Hashemi-Tameh et al. 2014). در ایران فیتوپلاسمای همراه به زوال گلابی عمدتاً 'Ca. Phytoplasma pyri' بوده است (Salehi et al. 2007, Hashemi-Tameh et al. 2014). در یک گزارش (Hashemi-Tameh et al. 2014)، 'Ca. Phytoplasma pronorum' و یک فیتوپلاسمای از گروه زردی مینا (16SrI) در درختان دارای علائم زوال ردیابی شده‌اند.

بیماری زوال گلابی توسط گونه‌های مختلف پسپیل گلابی منتقل می‌شود. گونه‌های *Cacopsylla pyricola* و *C. pyri* در اکثر رویشگاه‌های گلابی در دنیا اعم از درختان گلابی اهلی و وحشی گزارش شده‌اند و ناقل بیماری زوال گلابی می‌باشند (Jenes et al. 1964, Leomine 1991, Davies et al. 1992, Carraro et al. 1998, Garcia-C. et al. 2003). در تایوان گونه‌های *C. qianli* و *C. chinensis* نیز به‌عنوان ناقل بیماری گزارش شده‌اند (Lin et al. 2007). عامل بیماری توسط سس گونه‌های *C. europea* L. و *Cuscuta campestris* Yank. به میزان زیاد و توسط گونه *C. odorata* Ruiz & Pav. میزان کم به پروانش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) منتقل شده است. علائم ایجاد بیماری بر روی این گیاه محک به‌صورت زردی و کاهش اندازه برگ و نیز کم شدن رشد و قدرت حیاتی گیاه است (Marcone et al. 1999). همچنین بیماری توسط پسپیل گلابی به پروانش انتقال می‌یابد. این حشرات می‌توانند ۱ تا ۲۵ روز بر روی پروانش زنده مانده و عامل بیماری را انتقال دهند (Avinent et al. 1997). عامل بیماری به‌وسیله پیوند نیز به درختان گلابی و "به" منتقل می‌شود و علائم بین یک تا

پروانش بعد از عاری شدن از سس برای مشاهده علائم و تهیه نمونه برای استخراج دی ان ای در یک گلخانه عاری از حشرات نگهداری شدند. با همین روش شش بوته سالم پروانش با عامل زوال گلابی باجگاه مایه‌زنی شدند. شش بوته سالم پروانش که روی آن‌ها سس سالم مستقر شده بود به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

### استخراج دی ان ای کل از گیاه و پسپیل

برای استخراج دی ان ای کل از گیاه از روش ژانگ و همکاران (1998) با تغییراتی جزئی (Abou-Jawdah et al. 2002) و برای استخراج دی ان ای کل از پسپیل از روش آویننت و همکاران (1997) (Avinent et al. 1997) استفاده شد. در هر دو مورد پس از حل کردن رسوب نهایی در ۵۰ میکرولیتر آب استریل دو بار تقطیر، از آن به‌عنوان دی ان ای قالب در آزمون PCR استفاده شد. با روش‌های فوق از پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و یک نهال گلابی که در پژوهش قبلی (Salehi et al. 2008) به 'Ca. Phytoplasma pyri' آلوده شده بود و همچنین نهال گلابی فاقد علائم در گلخانه و پسپیل‌های جمع‌آوری شده از روی درختان گلابی فاقد علائم زوال که در باغ‌های سالم انتخاب شده بودند دی ان ای کل استخراج شد و از آن‌ها به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده شد.

### آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

برای ردیابی عامل بیماری در گیاه و پسپیل از آزمون PCR دو مرحله‌ای (Nested-PCR) استفاده گردید. در مرحله اول از جفت آغازگر عمومی فیتوپلاسمایی P1/P7 (Deng & Hiruki 1991, Schneider et al. 1995) که قطعه‌ای با اندازه ۱۸۰۰ جفت باز شامل RNA ریبوزومی 16S، فاصله میان ژن‌های 16S و 23S و ابتدای ژن 23S را

عدم آلودگی این نهال‌ها به فیتوپلاسمای به اثبات رسیده بود. پیوندزنی به روش جانبی انجام گرفت. از سرشاخه‌های کوچک همراه با دو برگ از درختان دارای علائم به‌عنوان پیوندک استفاده شد. قسمت پایینی پیوندک برش داده شد و در شکافی مناسب روی ساقه نهال‌های خریداری شده قرار داده شد. پس از بستن محل پیوند، قسمت پیوندشده در یک کیسه پلاستیکی قرار داده شد. روی هر نهال دو پیوندک از یک درخت گلابی دارای علائم پیوند شد. با این روش ۱۵ نهال گلابی نظنزی با عامل زوال گلابی باجگاه مایه‌زنی شدند و ۱۵ نهال "به" با عامل زوال گلابی ناسیونال مشهد و ۱۵ نهال "به" با عامل زوال گلابی باجگاه مایه‌زنی شدند و به همراه نهال‌های سالم و پیوند نشده گلابی نظنزی و "به" (از هر کدام پنج نهال) به عنوان کنترل در یک گلخانه عاری از حشرات تحت نظر قرار گرفتند.

### انتقال با سس

به منظور انتقال عامل زوال گلابی باجگاه مایه‌زنی و باجگاه به گیاه پروانش، از روش مارکون و همکاران (1989) استفاده گردید. بذور سس گونه C. Yunk. *campestris* در گلدانی محتوی بوته‌های چغندر قند سالم کشت داده شد تا سس سالم روی آن‌ها مستقر شود. پس از جوانه زدن بذور سس و رشد آن‌ها روی بوته‌های چغندر قند شاخه‌هایی از سس جدا و به‌طور جداگانه روی شش بوته پروانش سالم حاصل از بذر قرار داده شد. یک نهال گلابی دارای علائم بیماری زوال که قبلاً در گلخانه از طریق پیوند با عامل زوال گلابی باجگاه مایه‌زنی مشهد مایه‌زنی شده بود و وجود فیتوپلاسمای در آن با آزمون PCR به اثبات رسیده بود در کنار پروانش‌ها قرار داده شد تا شاخه‌های سس بر روی آن هدایت گردد. یک ماه بعد ارتباط بوته‌های پروانش با نهال گلابی قطع شد و بوته‌های

جدول ۱- واکنش درختان گلایی دارای علائم زوال در آزمون‌های PCR دو مرحله ای

**Table 1. Reaction of pear trees with decline symptoms in nested PCR assays.**

Locality	Fars province			Khorasane-e-Razavi province		
	Dasht-e-Arjan	Estahban	Bajgah	National orchard (Mashhad)	Pezechki orchard (Mashhad)	Chenaran
No.of PCR positive trees/No.of tested trees	17/26	7/12	12/24	4/8	2/8	2/4

آزمون واکنش ۱۵۰ درخت گلایی دارای علائم از باغ‌های استان‌های فارس و خراسان رضوی (جدول ۱)، گیاهان مایه‌زنی شده با پیوند و سس و ۳۰ نمونه پسپیل جمع‌آوری شده از روی درختان آلوده در باغ‌های ناسیونال و باجگاه بررسی شد. محصول PCR حاصل از هر دو آزمون در ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز و با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل بررسی و عکس‌برداری شد.

#### آزمون چندشکلی طول قطعات برشی (RFLP)

در این آزمون محصول PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 (حدود ۱۲۵۰ جفت باز از ژن آر ان ای ریپوزومی 16S) مربوط به هر نمونه به‌طور جداگانه با آنزیم‌های *HinfI*، *RsaI*، *TaqI* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) هضم شدند. محلول پایه برای هر واکنش ۲۰ میکرو لیتر تنظیم گردید. برای برش با هر آنزیم ۰/۱۵ میکرو لیتر از آن آنزیم به همراه دو میکرو لیتر بافر آنزیم و ۹/۸۵ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر سترون به ۸ میکرو لیتر محصول PCR اضافه و سپس بر اساس توصیه شرکت سازنده (فرمتاز) به مدت چهار ساعت در دستگاه ترموبلاک با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۶۵ درجه برای آنزیم *TaqI*) قرار داده شد. محصول هضم آنزیمی با آنزیم‌های مختلف در ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل مورد بررسی قرار گرفته و عکس‌برداری گردید.

تکثیر می‌کند، استفاده شد. پس از رقیق کردن محصول PCR اول به نسبت ۱:۳۰ با آب استریل دو بار تقطیر، از آن به‌عنوان دی ان ای قالب برای تکثیر با جفت آغازگر عمومی R16F2n/R16R2 (Guendersen & Lee 1996) و جفت آغازگر fO1/rO1 (Lorenz et al. 1995) (اختصاصی گروه افزولش سیب) استفاده گردید. جفت آغازگرهای R16F2n/R16R2 و fO1/rO1 به ترتیب قطعاتی از دی ان ای ریپوزومی با اندازه‌های ۱۲۵۰ و ۱۰۵۰ جفت باز را تکثیر می‌کنند. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۱۵ میکرو لیتر و شامل ۲ میکرو لیتر (۵۰ نانوگرم) دی ان ای الگو، ۰/۵ میکرو لیتر از هر آغازگر با غلظت پایه ۰/۵ میکرو مولار، ۰/۳۵ میکرو لیتر از مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP) با غلظت پایه ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرو لیتر بافر ۱۰ برابر و ۰/۲ میکرو لیتر از آنزیم پلیمرز (ساخت شرکت سیناژن ایران) با غلظت پایه ۵ واحد در یک میکرو لیتر بود که با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر استریل حجم آن به ۱۵ میکرو لیتر رسانده شد. لوله‌ها برای ۳۵ چرخه PCR در دستگاه ترموسایکلر BIORAD مدل iCycler™ (ساخت آمریکا) قرار داده شدند. برنامه گرمایی PCR شامل ۲ دقیقه واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳ دقیقه بسط دی ان ای در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه نهایی (تکمیل بسط دی ان ای) ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. شرایط PCR دو مرحله‌ای مانند شرایط PCR مستقیم بود. در این

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

محصول PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 (حدود ۱۲۵۰ جفت باز از ژن آر آن ای ریپوزومی 16S) با استفاده از کیت InsT/A clone PCR product Cloning Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania) و دستورالعمل این شرکت در پلاسמיד pTZ57R/T DH5a همسانه سازی و به سویه باکتری *Escherichia coli* منتقل شد (Sambrook et al. 1989). پس از رشد باکتری حامل همسانه، پلاسמיד نو ترکیب جدا و خالص سازی شد (Sambrook et al. 1989) و برای تعیین ترادف به شرکت Bioneer در کشور کره جنوبی ارسال گردید. ترادف‌های به دست آمده با استفاده از برنامه ارسال ترادف‌های BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), با ترادف‌های موجود در بانک جهانی ترادف‌ها (GenBank) مقایسه و نزدیک‌ترین ترادف با آن‌ها جستجو شد. با استفاده از نرم افزار MEGA5 (Tamura et al. 2011) و روش Neighbour-Joining، ترادف ۱۲۵۰ جفت بازی (ترادف تکثیری توسط جفت آغازگر R16F2n/R16R2) جدایه‌های ردیابی شده در این مطالعه با ترادف‌های مشابه از فیتوپلاسمای انتخابی موجود در بانک جهانی ترادف‌ها (GenBank) مقایسه گردید. با انجام هم‌ردیف سازی چندگانه میزان تشابه نوکلئوتیدی مشخص و درخت فیلوژنتیکی رسم گردید. در این آنالیز ترادف مشابه در *Acholeplasma laidlawii* به عنوان Outgroup منظور گردید. اعتبار شاخه با انجام اعتبار سنجی (Bootstrap) در ۱۰۰۰ تکرار مورد سنجش قرار گرفت.

با استفاده از گزینه ماتریکس فاصله جفتی در نرم افزار DNAMAN ویرایش 4.02 (LynnonBiosoft, Quebec, Canada) درصد همولوژی جفتی بین فیتوپلاسمای همراه با زوال گلابی ردیابی شده در این پژوهش و چند

فیتوپلاسمای انتخابی همراه با زوال گلابی بر اساس ترادف دی آن ای ریپوزومی 16S ارزیابی شد.

## چندشکلی طولی قطعات برشی مجازی (Virtual RFLP)

برای تعیین جایگاه استرین‌های مورد مطالعه در بین زیر گروه‌های گروه 16SrX، با استفاده از برنامه *iPhyClassifier* (<http://www.Usda.gov>) (Zhao et al. 2009)، توالی حاصل از تکثیر بخشی از ژن آر آن ای ریپوزومی 16S با جفت آغازگر R16F2n/R16R2، با ۱۷ آنزیم برشی شامل: *DraI*, *BstUI*, *BfaI*, *BamHI*, *AluI*, *KpnI*, *HpaII*, *HpaI*, *HinfI*, *HhaI*, *HaeIII*, *EcoRI*, *SspI*, *RsaI*, *MseI*, *Sau3AI* که برای انجام آزمون RFLP مورد استفاده قرار می‌گیرند (Lee et al. 1998) برش داده شد و نقوش حاصل با یکدیگر و با نقوش حاصل از هضم آنزیمی دیگر فیتوپلاسمای با همین آنزیم‌ها مقایسه شدند.

## نتایج

## علائم بیماری

در کلیه مناطق مورد بازدید، علائم بیماری زوال گلابی شامل قرمزی برگ‌ها، لوله شدن برگ به طرف بالا، ریزش قبل از موقع برگ‌ها، سر خشکیدگی و زوال مشاهده گردید (شکل ۱). در بعضی از باغ‌های گلابی در استان خراسان رضوی تا بیست درصد درختان علائم زوال را نشان می‌دادند. بر روی هیچ‌یک از درختان "به"، حتی درختان مجاور نواحی آلوده علائم بیماری مشاهده نشد.

## انتقال با پیوند

از مجموع ۳۰ نهال گلابی و "به" که با پیوندک‌های

تهیه شده از گلابی دارای علائم، پیوندزده شده بودند در ۱۰ درخت گلابی و ۱۴ درخت "به" پیوندکها سالم ماندند. از بین نهالهایی که عمل پیوند در آنها موفقیت آمیز بود، در ۶ درخت گلابی پیوندشده با پیوندکهای درختان گلابی از ناسیونال مشهد و ۵ درخت "به" پیوندشده با پیوندکهای درختان دارای علائم از باجگاه علائم بیماری مشاهده گردید. علائم بیماری در نهالهای گلابی به صورت قرمزی، ریز برگگی، کاهش فاصله میانگره وزردی و در نهالهای "به" به صورت زردی و ندرتا قرمزی در سر شاخهها و پاجوشها و زوال بود (شکل ۲). حداقل فاصله زمانی بین مایه زنی با پیوند تا ظهور اولین علائم بیماری در نهالهای گلابی و "به" به ترتیب حدود ۸ و ۱۰ ماه بود. واکنش نهالهای مایه زنی شده و دارای علائم در آزمون پی سی آر دو مرحله ای مثبت بود.

### انتقال با سس

در پروانشهایی که از طریق سس با عامل زوال گلابی باغ ناسیونال مشهد و باجگاه مایه زنی شده بودند به ترتیب در دو و یک بوته عمل انتقال موفقیت آمیز بود و علائمی به صورت زردی، ریزبرگی و کاهش فاصله میانگره مشاهده شد (شکل ۳). حداقل دوره نهفتگی در پروانش حدود نه ماه بود. واکنش پروانشهای مایه زنی شده و دارای علائم در آزمون PCR دو مرحله ای مثبت بود. در پروانشهایی که سس سالم روی آنها مستقر شده بود علائم زردی، ریزبرگی و کاهش فاصله میانگره مشاهده نگردید و واکنش آنها در آزمون PCR دو مرحله ای از نظر وجود فیتوپلاسمای منفی بود.

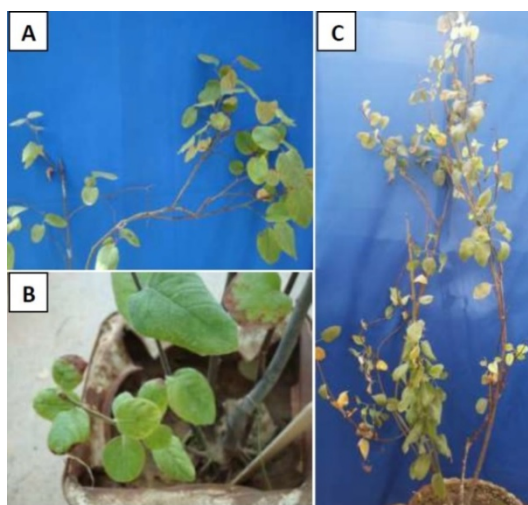
### ردیابی پسیل در باغهای گلابی

در تمامی مناطق مورد بازدید یک گونه حشره پسیل



شکل ۱- یک درخت گلابی دارای علائم زوال شامل قرمزی، خزان شدن برگها و سر خشکیدگی در یک باغ گلابی در باجگاه (استان فارس).

Fig.1. A pear tree showing decline symptoms, including leaf reddening, defoliation and dieback in a pear orchard in Bajgah (Fars province).



شکل ۲- علائم بیماری در نهالهای گلابی و "به" مایه زنی شده با عامل زوال گلابی از طریق پیوند: ریزبرگی، زردی و قرمزی در سرشاخه (A) و پاجوش (B) در نهالهای "به"؛ ریزبرگی زردی، قرمزی و کاهش فاصله میانگره در یک نهال گلابی (C).

Fig. 2. Disease symptoms on the graft-inoculated pear and quince trees with pear decline agent: little leaf, yellowing and reddening on branch (A) and sucker (B) of the quince trees; little leaf, yellowing, reddening and shortened internodes in the pear tree (C).



متخصص مربوطه با توجه به خصوصیات ظاهری و با استفاده از کلید شناسایی (Burchardt *et al.* 1986; Ahmadi *et al.*, 202) پسپل جمع‌آوری شده در این تحقیق گونه *Cacopsylla pyricola* Foerster تشخیص داده شد. مهمترین وجه تمایز *Cacopsylla pyricola* با سایر گونه‌های جنس *Cacopsylla* وجود پارامرهای هلالی یا داسی شکل در حشرات نر بود.

### ردیابی فیتوپلازما در درختان دارای علائم زوال و پسپل‌های جمع‌آوری شده از روی درختان گلابی

در واکنش زنجیره ای پلیمرز با جفت آغازگر P1/P7 در هیچ‌یک از نمونه‌های گلابی و پسپل بانندی مشاهده نگردید. ولی تحت همین شرایط با این جفت آغازگر قطعه مورد انتظار (۱۸۰۰ جفت باز) در نمونه پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش (کنترل مثبت) تکثیر شد.

در آزمون PCR دو مرحله‌ای واکنش شش درخت گلابی از باغ‌های ناسیونال و پزشکی در مشهد، دو درخت گلابی در چناران، ۱۲ درخت گلابی باجگاه، ۱۷ درخت گلابی دشت ارژن، ۷ درخت گلابی استهبان (جدول ۱)، ۶ نهال گلابی و ۵ نهال "به" آلوده شده به وسیله پیوند، سه پروانش آلوده شده توسط سس و کنترل‌های مثبت شامل نمونه‌های پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و یک نهال گلابی که در پژوهش قبلی به 'Ca. Phytoplasma pyri' آلوده شده بود مثبت بود و باندهای مورد انتظار ۱۲۵۰ جفت باز (جفت آغازگر R16F2n/R16R2) و ۱۰۵۰ جفت باز (جفت آغازگر fO1/rO1) تکثیر شد. تحت همین شرایط در نمونه‌های گلابی باغ‌های قصردشت، بوانات، اقلید، نی‌ریز، سپیدان، خرم بید و مرودشت (استان فارس)، باغ استقلال، مزرعه



شکل ۳- A، علائم ریزبرگی، زردی و کاهش میانگره‌ها در یک بوته پروانش که از طریق سس با عامل زوال گلابی باغ ناسیونال مشهد (استان خراسان رضوی) مایه‌زنی شده بود؛ (B)، پروانش سالم.

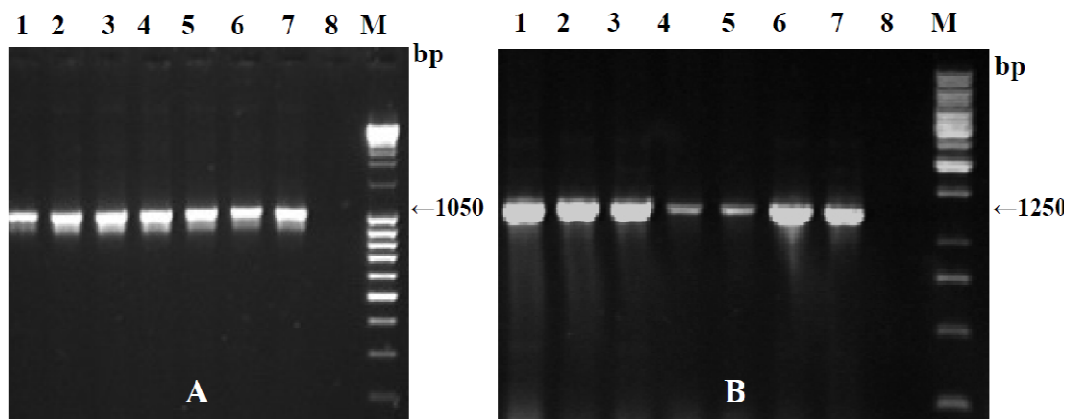
Fig. 3. A, little leaf, yellowing and shortened internodes in a dodder-inoculated periwinkle plant with pear decline agent from National orchard in Mashhad (Khorasan-e-Razavi province); B, a healthy periwinkle plant.



شکل ۴- آلودگی برگ درخت گلابی به پسپل *Cacopsylla pyricola* در باغ ناسیونال مشهد (استان خراسان رضوی)

Fig. 4. Infestation of a pear leaf with *Cacopsylla pyricola* in National pear orchard in Mashhad (Khorasan-e-Razavi province).

مشاهده گردید. در باغ‌های گلابی باجگاه، دشت ارژن (استان فارس) و استان خراسان رضوی جمعیت پسپل روی درختان گلابی چشمگیر بود (شکل ۴). در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس توسط



شکل ۵- الکتروفورز محصولات PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای (A) fO1/rO1 و (B) R16F2n/R16R2. راهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶، نمونه‌های دی ان ای به ترتیب در نهال "به" پیوندشده با پیوندک‌های تهیه‌شده از یک درخت گلابی دارای علائم زوال در باغ ناسیونال، یک نمونه پسیل جمع‌آوری‌شده از روی درخت‌های گلابی دارای علائم زوال در باغ ناسیونال، نهال گلابی پیوندشده با پیوندک‌های تهیه‌شده از یک درخت گلابی دارای علائم زوال در باجگاه، پروانش مایه‌زنی‌شده با عامل زوال گلابی ناسیونال با سس و دو درخت گلابی دارای علائم زوال از باغ‌های گلابی باجگاه و دشت ارژن. راهک‌های ۷ A و ۷B، نمونه‌های دی ان ای به ترتیب در نهال گلابی آلوده به 'Ca. Phytoplasma pyri' و پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش به عنوان کنترل‌های مثبت؛ راهک‌های ۸ A و ۸B، نمونه‌های دی ان ای به ترتیب در نهال گلابی فاقد علائم زوال در گلخانه و پسیل جمع‌آوری‌شده از روی درختان گلابی فاقد علائم زوال به عنوان کنترل‌های منفی؛ راهک M، نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

**Fig.5. Gel electrophoresis of nested PCR products with the primer pairs fO1/rO1 (A) and R16F2n/R16R2 (B).** Lanes 1, 2, 3, 4, 5 and 6 represent DNA templates from a quince tree graft-inoculated with a scion from a pear tree showing decline in the National pear orchard, psyllid insects collected from the pear trees showing decline symptoms in National orchard, a grafted pear tree with a scion from a pear tree showing decline in a pear orchard in Bajgah, a dodder-inoculated periwinkle plant with National pear decline agent, and two naturally decline affected pear trees in Bajgah and Dasht-e-Arjan, respectively. Lane 7 (A and B) represents amplified DNA from a pear tree and a periwinkle plant infected with 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Ca. Phytoplasma aurantifolia' respectively, as positive controls. Lane 8 (A and B) representing DNA templates from a healthy pear tree and healthy pear psylla, respectively, were used in PCR as negative controls. M, 100 bp molecular size marker (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

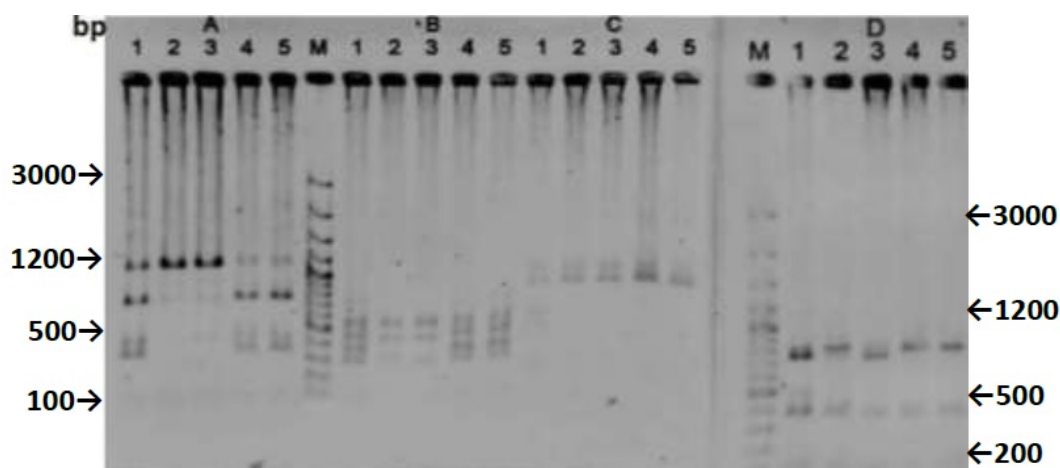
نمونه از استان فارس) از ۳۰ نمونه مورد بررسی باندهای مورد انتظار (به ترتیب ۱۲۵۰ و ۱۰۵۰ جفت باز) تکثیر شد. در نمونه‌های پسیل جمع‌آوری‌شده از روی درختان گلابی فاقد علائم زوال که در باغ‌های سالم انتخاب شده بودند چنین باندهایی مشاهده نگردید (شکل ۵).

#### آزمون RFLP

در آزمون RFLP محصول PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 مربوط به نمونه‌های گلابی

نمونه و مرکز تحقیقات کشاورزی (مشهد، خراسان رضوی) و نهال گلابی سالم چنین قطعاتی تکثیر نشد (شکل ۵).

نمونه‌های پسیل نیز از نظر وجود عامل بیماری در بدن آن‌ها با آزمون PCR دو مرحله‌ای با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 (در مرحله اول) و R16F2n/R16R2 و fO1/rO1 (جفت آغازگر اختصاصی فیتوپلاسمای گروه افزولش سیب) در مرحله دوم آزمایش شدند. در این آزمون در ۷ نمونه (۴ نمونه از استان خراسان رضوی و ۳



شکل ۶- نقوش حاصل از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی قطعات دی ان ای تکثیر شده با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 با استفاده از آنزیم‌های *Hinfl* (A)، *RsaI* (B)، *AluI* (C) و *TaqI* (D). راهک‌های ۵، ۴، ۳، ۲، ۱ قطعات تکثیر شده به ترتیب در یک نمونه نمونه پسیل جمع‌آوری شده از روی درخت‌های گلابی در باجگاه، نهال گلابی پیوند شده با پیوندک‌های تهیه شده از یک درخت گلابی دارای علائم زوال در باغ ناسیونال، پروانش مایه‌زنی شده با عامل زوال گلابی باغ ناسیونال از طریق سس، گلابی دارای علائم زوال از باغ‌های باجگاه و دشت ارژن. راهک M، مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

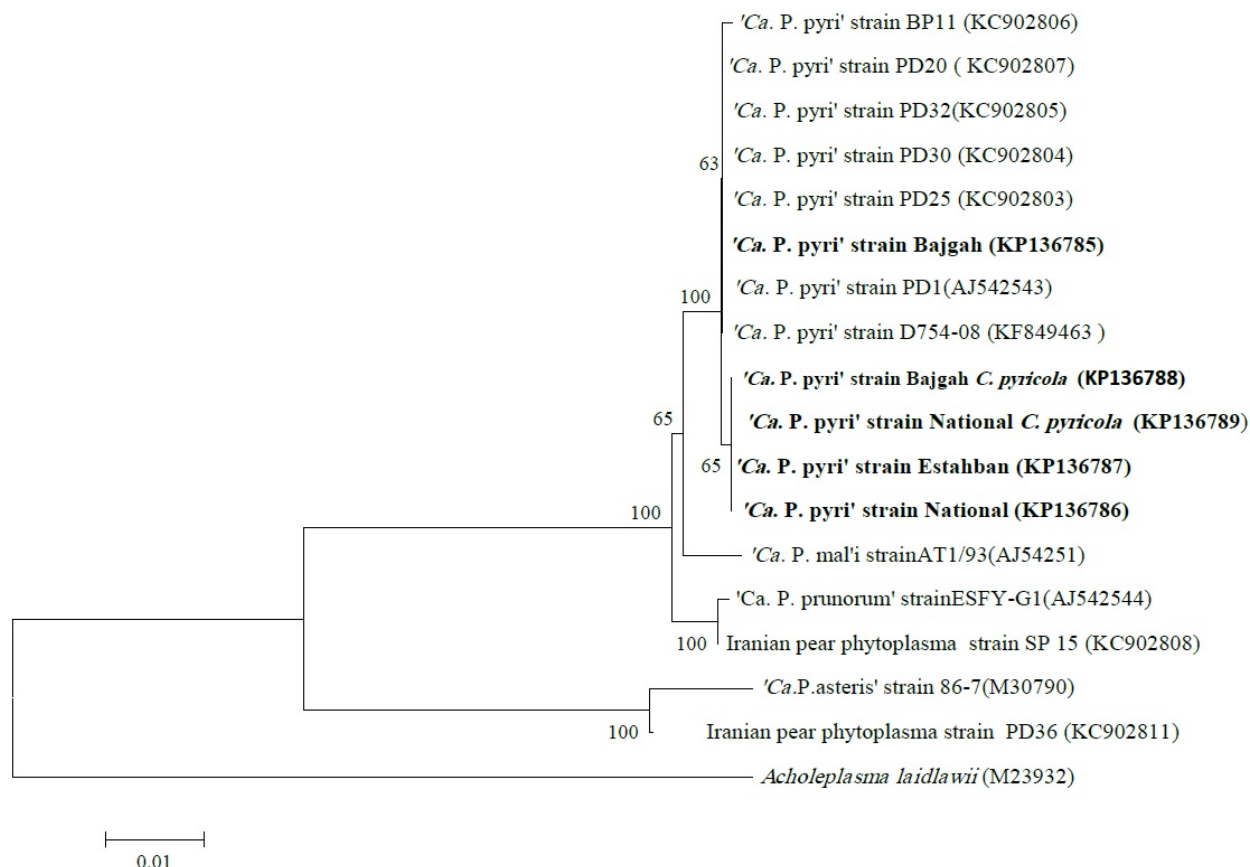
**Fig. 6.** Gel electrophoresis patterns from digestion of the R16F2n/R16R2 amplified fragments using *Hinfl* (A), *RsaI* (B), *AluI* (C) and *TaqI* (D) enzymes. Lanes 1,2,3,4 and 5 represent the amplified fragment from a psyllid sample collected on pear trees in Bajgah pear orchard, a grafted pear tree with a scion from a pear tree showing decline in the national orchard, a dodder-inoculated periwinkle plant with National pear decline agent, and two naturally decline affected pear trees in Bajgah and Dasht-e-Arjan, respectively. Lane M, 100 bp DNA molecular marker (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

گلابی باجگاه، استهبان و باغ ناسیونال مشهد و نمونه‌های پسیل جمع‌آوری شده از روی درختان گلابی باجگاه و ناسیونال مشهد پس از همسانه سازی و تعیین ترادف، به ترتیب تحت رس شماره‌های (Accession numbers) KP136785 - KP136789 در بانک جهانی ترادف‌ها ثبت شدند. جستجو با برنامه بلاست با استفاده از قطعه تعیین ترادف شده، نشان داد که ترادف‌های مورد مطالعه در این تحقیق در میان فیتوپلاسم‌های موجود در بانک ترادف‌ها، بیشترین شباهت را با 'Ca. Phytoplasma pyri' (AJ542543)، فیتوپلاسمایی از زیرگروه 16SrX-C دارند. با استفاده از ترادف‌های جدایه‌های مورد مطالعه و ترادف‌های مشابه از بانک جهانی ترادف‌ها، آنالیز تبارزایی انجام شد. در درخت تبارزایی حاصل (شکل ۷)،

دارای علائم زوال از باغ ناسیونال (استان خراسان رضوی)، باجگاه و دشت ارژن (استان فارس)، نمونه‌های پسیل جمع‌آوری شده در باغ گلابی باجگاه، نهال گلابی پیوند شده با پیوندک‌های تهیه شده از یک درخت گلابی دارای علائم زوال در باغ ناسیونال و پروانش مایه‌زنی شده با عامل زوال گلابی باجگاه با آنزیم‌های *Hinfl*، *RsaI*، *AluI* و *TaqI* برش داده شد. نقوش حاصل از هضم آنزیمی در تمامی نمونه‌ها با یکدیگر یکسان بود (شکل ۶)

#### تعیین ترادف و آنالیز فیلوژنتیکی

ترادف محصول PCR دومرحله‌ای با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 (حدود ۱۲۵۰ جفت باز از ژن آر ان ای ریوزومی 16S) در پنج استرین ردیابی شده در درختان

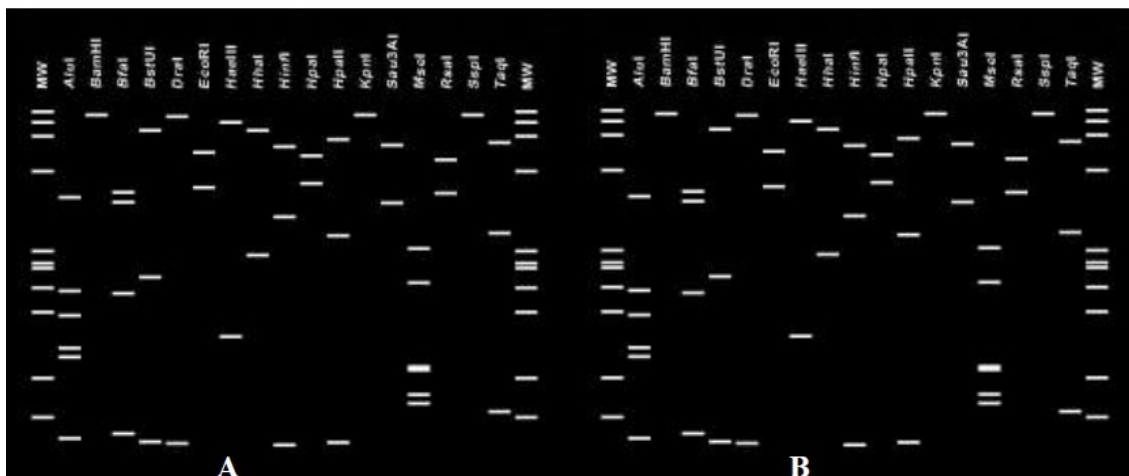


شکل ۷- درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-joining براساس ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژن آر آن ای ریپوزومی 16S فیتوپلاسمای ردیابی شده در این پژوهش (تیره) و ۱۲ فیتوپلاسمای دیگر از بانک جهانی ترادفها ترسیم شد؛ *Ca. Candidatus*; *Phytoplasma* P.; *Cacopsylla* C.; اعداد روی یا زیر شاخه‌ها اعتبارسنجی (bootstrap) برای ۱۰۰۰ تکرار می باشند؛ از *Acholeplasma laidlawii* استرین JA1 به عنوان outgroup استفاده شد.

Fig. 7. Phylogenetic tree constructed by the neighbour-joining method based on partial sequence of 16S rRNA gene of the phytoplasmas in the present study (bold) and 12 other phytoplasmas from Genbank; *Ca.*, *Candidatus*; *P.*, *Phytoplasma*; *C.*, *Cacopsylla*; Numbers above or below branches are bootstrap values obtained for 1,000 replicates. *Acholeplasma palmae* strain JA1 was used as an outgroup.

جدایه‌های مورد مطالعه با دو جدایه اروپایی (AJ542543) و پنج جدایه ایرانی (KC902803- KC902807) از زیرگروه 16SrX-C طبقه‌بندی شدند. ارزیابی درصد همولوژی نشان داد که استرین‌های فیتوپلاسمایی ردیابی شده در این پژوهش، بیشترین تشابه نوکلئوتیدی (۹۹/۹۹ تا ۱۰۰ درصد) را با یکدیگر، *Ca. Phytoplasma pyri* (AJ542543) و با استرینی متعلق به *Ca. Phytoplasma pyri* (KC902803) از اصفهان (Hashemi-Tameh *et al.* 2014) داشتند. همچنین کمترین تشابه (۹۲/۸ تا ۹۳ درصد) با فیتوپلاسمایی متعلق به *Ca. Phytoplasma asteris* (KC902811) (Hashemi-Tameh *et al.* 2014)، دیگر عامل زوال گلابی در استان اصفهان بود. میزان تشابه این استرین‌ها با فیتوپلاسمای عامل زوال گلابی در گیلان، استرینی از *Ca. Phytoplasma prunorum* (KC902808)، حد اکثر ۹۸/۸ بود.

جدایه‌های مورد مطالعه با دو جدایه اروپایی (AJ542543) و پنج جدایه ایرانی (KC902803- KC902807) از زیرگروه 16SrX-C طبقه‌بندی شدند. ارزیابی درصد همولوژی نشان داد که استرین‌های فیتوپلاسمایی ردیابی شده در این پژوهش، بیشترین تشابه نوکلئوتیدی (۹۹/۹۹ تا ۱۰۰ درصد) را با یکدیگر، *Ca. Phytoplasma pyri* (AJ542543) و با استرینی متعلق به *Ca. Phytoplasma pyri* (KC902803) از اصفهان (Hashemi-Tameh *et al.* 2014) داشتند. همچنین کمترین تشابه (۹۲/۸ تا ۹۳ درصد) با فیتوپلاسمایی متعلق به *Ca. Phytoplasma asteris* (KC902811) (Hashemi-Tameh *et al.* 2014)، دیگر عامل زوال گلابی در استان اصفهان بود. میزان تشابه این استرین‌ها با فیتوپلاسمای عامل زوال گلابی در گیلان، استرینی از *Ca. Phytoplasma prunorum* (KC902808)، حد اکثر ۹۸/۸ بود.



شکل ۸- نقوش حاصل از RFLP مجازی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ۱۲۵۰ جفت باز از ژن آر ان ای ریبوزومی 16S فیتوپلاسمای همراه با زوال گلابی در باغ ناسیونال مشهد (KP136786) به عنوان نماینده فیتوپلاسماهای ردیابی شده در درختان گلابی و پسیل گلابی در پژوهش حاضر (A) و 'Candidatus Phytoplasma pyri' (AJ542543) (B) با استفاده از آنزیم‌های *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI* و *TaqI*، virtual *Ox174*، *MW*، *HaeIII* digested size marker

**Fig. 8.** Virtual RFLP patterns from *in silico* digestions of 1250 bp nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene of a phytoplasma associated with pear decline disease in the National pear orchard (KP136786), representing phytoplasmas associated with decline disease in pear trees and pear psylla detected in the present study (A) and 'Candidatus Phytoplasma pyri' (AJ542543) (B). The following restriction enzymes were used in the simulated digestions: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI* and *TaqI*. MW, virtual *Ox174* *HaeIII* digested size marker.

## RFLP مجازی

شدن برگ به طرف بالا، سر خشکیدگی و زوال که از علائم بارز بیماری زوال گلابی می‌باشد، در تعدادی از درختان گلابی مشاهده گردید. در آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی فیتوپلاسمها، همراهی یک فیتوپلاسم با این گونه علائم در باغ‌های مشهد و چناران در استان خراسان رضوی و سه منطقه از فارس شامل باجگاه، دشت ارژن و استهبان به اثبات رسید. این امر نشان می‌دهد که این علائم در درختان گلابی نشانگر وجود بیماری فیتوپلاسمایی است. پیشتر در ایران بیماری زوال گلابی برای اولین بار توسط صالحی و همکاران از استهبان فارس گزارش شد (Salehi *et al.* 2008). اخیراً این بیماری از استان اصفهان و گیلان نیز گزارش شده است (Hashemi *et al.* 2014). در پژوهش حاضر در بعضی از

آنالیز RFLP مجازی بر اساس ۱۲۵۰ جفت باز از ژن آر ان ای ریبوزومی 16S (ناحیه تکثیری جفت آغازگر R16F2n/R16R2) نشان داد که الگوهای برشی فیتوپلاسمهای همراه با بیماری زوال در درختان گلابی باجگاه، استهبان و باغ ناسیونال مشهد و نمونه‌های پسیل جمع‌آوری شده از روی درختان گلابی باجگاه و ناسیونال مشهد با الگوهای برشی 'Ca. *Phytoplasma pyri*' (AJ542543) عامل زوال گلابی و نماینده زیرگروه 16SrX-C یکسان (ضریب تشابه ۱) می‌باشد (شکل ۸).

## بحث

تقریباً در تمامی مناطق مورد بازدید قرمزی و لوله‌ای

مناطق در درختان گلابی دارای علائم زوال فیتوپلاسمای ردیابی نشد. برای اطمینان از فیتوپلاسمایی بودن بیماری زوال در گلابی باید از آزمون‌های بیولوژیکی مانند انتقال با پیوند و آزمون‌های مولکولی به ویژه پی سی آر استفاده شود. علائم قرمزی و ریزش برگ‌ها و زوال درختان گلابی می‌تواند ناشی از تنش‌های محیطی و یا بیماری‌های دیگر باشد (Seemuller et al. 2011). یکی از دلایل دیگر عدم ردیابی فیتوپلاسمای در درختان دارای علائم زوال، رقت کم فیتوپلاسمای و عدم یکنواختی گسترش آن‌ها در قسمت‌های مختلف درخت می‌باشد (Bertaccini and Duduk, 2009). وجود بازدارنده‌های پی سی آر در درختان (Musetti et al. 2000, Lepka et al. 1999) نیز می‌تواند علت عدم ردیابی فیتوپلاسمای در یک درخت آلوده باشد. آلودگی بیش از ۶۵ درصد درختان مورد آزمایش در بضعی از مناطق مورد بررسی (جدول ۱) نشان می‌دهد که بیماری زوال گلابی تهدیدی برای کشت درختان گلابی در ایران می‌باشد. پیش‌تر این بیماری از استان‌های اصفهان و گیلان نیز گزارش شده است (Hashemi-Tameh et al. 2014). علائم زوال گلابی در اکثر نهالستان‌ها و باغ‌های گلابی در سایر نقاط ایران دیده می‌شود. ارزیابی میزان پراکنش و خسارت بیماری زوال گلابی در ایران نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

با توجه به ماهیت فیتوپلاسمایی بیماری زوال گلابی و انتقال عامل آن از طریق پیوند (Seemuller et al. 2011) که در این پژوهش نیز به اثبات رسید، عامل بیماری با پیوندک و سایر قسمت‌های گیاه آلوده قابل انتقال است و تولید نهال گلابی به روش سنتی یک تهدید برای کشت درختان گلابی در ایران می‌باشد. یکی از راه‌های پیشگیری از استقرار بیماری در باغ‌های گلابی تهیه نهال‌های عاری از فیتوپلاسمای با روش‌های علمی و مدرن می‌باشد.

عامل بیماری از طریق سس به گیاه پروانش که گیاهی محک برای فیتوپلاسمای است انتقال داده شد. در آزمون‌های PCR و RFLP وجود فیتوپلاسمای عامل زوال گلابی در پروانش‌های مایه‌زنی شده به اثبات رسید. پیش‌تر نیز عامل بیماری زوال گلابی توسط گونه *C. campestris* به پروانش انتقال داده شده بود (Seemuller, 1989). یکی از راه‌های تکثیر و نگهداری فیتوپلاسمای عامل زوال گلابی در گلخانه انتقال آن به وسیله سس از گلابی به پروانش و سپس تکثیر بیشتر و دائمی از طریق پیوند می‌باشد.

جفت آغازگر fO1/rO1 اختصاصی فیتوپلاسمای گروه افزولش سیب (16SrX) می‌باشد (Lorens et al. 1995). بر اساس تکثیر با جفت آغازگر fO1/rO1 فیتوپلاسمای عامل زوال گلابی در مناطق مورد مطالعه در درختان و پسیل گلابی متعلق به گروه افزولش سیب (16SrX) می‌باشد. بر اساس RFLP مجازی فیتوپلاسمای ردیابی شده در درختان و نمونه‌های پسیل با یکدیگر و با گونه پیشنهادی '*Ca. Phytoplasma pyri*' (AJ542543) نماینده زیرگروه 16SrX-C یکسان می‌باشند. آنالیز فیلوژنتیکی نیز نتایج RFLP را تایید کرد. در اکثر نقاط دنیا '*Ca. Phytoplasma pyri*' به‌عنوان عامل زوال گلابی گزارش شده است (Seemuller and Schneider 2004). هیچیک از استرین‌های مورد مطالعه با فیتوپلاسمای گروه زردی مینا (16SrI) و '*Ca. Phytoplasma prunorum*' که بیشتر از ایران گزارش شده‌اند (Hashemi-Tameh et al. 2014) طبقه بندی نشد (شکل ۷). ارزیابی درصد همولوژی نوکلئوتیدی نیز نشان داد که استرین‌های مورد مطالعه بیشترین همولوژی را با گونه پیشنهادی '*Ca. Phytoplasma pyri*' دارند.

در باغ‌های گلابی مورد بازدید روی درختان گلابی

Weintraub and ) می‌باشد *Phytoplasma pyri*'  
'Ca. *Phytoplasma* و ناقل (Beanland, 2006  
'pronurum' و فیتوپلاسمایی از گروه زردی مینا که در  
ایران به عنوان عامل زوال گلابی گزارش شده‌اند  
(Hashemi-Tameh et al. 2014) احتمالاً حشره دیگری  
است. *C. pyricola* در همه نقاط گلابی کاری ایران وجود  
دارد (Emami 2016) بنابراین با انتقال عامل بیماری زوال  
گلابی همراه با مواد گیاهی یا پسیل به یک منطقه، بیماری  
زوال در آن منطقه گسترش می‌یابد. این اولین گزارش از  
بیماری زوال گلابی در استان خراسان رضوی و نقاط  
جدیدی در استان فارس شامل باجگاه و دشت ارژن و  
اولین گزارش از وجود *'Ca. Phytoplasma pyri*' در بدن  
پسیل گلابی در ایران می‌باشد.

دارای علائم زوال و سالم پسیل گلابی گونه *Cacopsylla*  
*pyricola*، مشاهده گردید. در آزمون پی سی آر با جفت  
آغازگر عمومی فیتوپلاسمها و جفت آغازگر اختصاصی  
افزولش سبب در نمونه‌های پسیل جمع‌آوری شده روی  
درختان گلابی دارای علائم زوال یک فیتوپلاسم ردیابی  
شد که بر اساس آزمون RFLP و آنالیز فیلوژنتیکی با  
فیتوپلاسمهای ردیابی شده در درختان گلابی در همان  
باغ‌ها یکسان و متعلق به گونه پیشنهادی *'Ca.*  
*Phytoplasma pyri*' بود. بر این اساس می‌توان اظهارنظر  
کرد که پسیل گلابی پتانسیل انتقال طبیعی بیماری زوال  
گلابی در باغ‌های گلابی ایران را دارد. برای اطمینان از  
ناقل بودن باید تحت شرایط کنترل شده عامل زوال گلابی  
را توسط این حشره از درختان آلوده به درختان سالم انتقال  
داد. از ویژگی‌های این گونه، اختصاصیت در انتقال *'Ca.*

## منابع

- Abou-Jawdah Y., Karakashian A., Sobh H., Martini M. and Lee I.-M. 2002. An epidemic of almond witches'-broom in Lebanon: classification and phylogenetic relationship of the associated phytoplasma. *Plant Disease* 86:477-484.
- Ahmadi A., Mehrvar A., Lotfalizadeh H., Gharekhani G. and Burckhardt D. 2012. Determination of the species diversity of Psylloidea superfamily (Hemiptera) in East-Azarbaijan province. *Journal of Sustainable Agriculture and Production Science* 22:193-212. (In Farsi With English Summary).
- Avinent L., Llacer G., Almasellas J. and Tora R. 1997. Pear decline in Spain. *Plant Pathology* 46:694-698.
- Bertaccini A. and Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 2009 48:355-78.
- Burckhardt D. and Hodkinson I. D. 1986. A revision of the west Palaearctic pear psyllids (Hemiptera: Psyllidae). *Bulletin of Entomological Research* 76:119-132.
- Carraro L., Loi N., Ermacora P., Gregoris A. and Osler R. 1998. Transmission of pear decline by using naturally infected *Cacopsylla pyri*. *Acta Horticulture* 472:665-668.
- Davies D. L., Guise C. M., Clark M. F. and Adams N. A. 1992. Parry's disease of pears is similar to pear decline and associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. *Plant Pathology* 41: 194-203.
- Deng S. and Hiruki D. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14:53-61.
- Emami M. S. 2016. Field evaluation of two biorational compounds in the control of pear psylla, *Cacopsylla pyricola* (Förster), on pear trees. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 49:11-18.
- Errea P., Aguelo V. and Hormaza1 J. I. 2002. Seasonal variations in detection and transmission of pear decline phytoplasma. *Journal of Phytopathology* 150:439-443.
- Garcia-Chapa M., Lavina A., Sanchez I., Medina V. and Batlle A. 2003. Occurrence, symptom expression and characterization of phytoplasma associated with pear decline disease in Catalonia (Spain). *Journal of*

- Phytopathology 151: 584–590.
- Gazel M., Ulubasserce C., Caglayan K. and Ozturk H. 2007. Detection of *Candidatus Phytoplasma pyri* in Turkey. Bulletin of Insectology 60:125-126.
- 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.
- Hashemi-Tameh M., Bahar M. and Zirak L. 2014. Molecular characterization of phytoplasmas related to apple proliferation and aster yellows groups associated with pear decline disease in Iran. Journal of Phytopathology 162:660-669
- Hsiu-Lin L., Ching-Chung C. and Chan-Pin L. 2007. Detection and identification of the phytoplasma associated with pear decline in Taiwan. European Journal of Plant Pathology 117:281–291.
- Jensen D. D., Griggs W. H., Gonzales C. Q. and Schneider H. 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. Phytopathology 54:1346-1351.
- Lee I. M., Gundersen-Rindal 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.
- Lemoine J. 1991. Deperissement du poirier: rôle de *Psylla pyri* dans sa dissémination. arboriculture fruitière 442:28-32.
- Lepka P., Stitt M., Moll E. and Seemüller E. 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. Physiological and Molecular Plant Pathology 55:59-68.
- Lorenz K. H., Schneider B., Ahrens U. and Seemüller E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non ribosomal DNA. Phytopathology 85:771-776.
- Marcone C., Hergenbahn F., Ragozzino A. and Seemüller E. 1999. Dodder transmission of pear decline, European stone fruit yellows, rubus stunt, picris echinoids yellows and cotton phyllody phytoplasmas to periwinkle. Journal of Phytopathology 147:187-192.
- Musetti R., Favali M. and Pressacco L. 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. Cytobios 102:133-147.
- Németh M. 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Lancaster, Boston, USA/Dordrecht, Netherlands: M. Nijhoff Publishers. 841 pp.
- Salehi M., Izadpanah K., Taghavi S. M. and Rahimian H. 2008. Characterization of a phytoplasma associated with pear decline in Iran. Journal of Phytopathology 156:493–495.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 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 and J. G. Tully (Eds). Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma, Vol.1. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Seemüller E. 1989. Pear decline, pp: 188-201. In: P. R. Fridlund, (Ed). Virus and Virus like Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics, Washington State University, Pullman.
- Seemüller E. and Schneider B. 2004. '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54:1217–1226.
- Seemüller E., Schneider B. and Jarausch B. 2011. Pear Decline Phytoplasma, pp. 77-84. In: A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse and W. Jelkmann (Eds). Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stones Fruits. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- 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.
- Wei W., Davis R. E., Lee I. M., and Zhao Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. International Journal of Systematic and Evolutionary



Microbiology 57:1855-67.

Weintraub P. G. and Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. Annual. Review of Entomology 51:91-111.

Zhang Y., Uyemoto J. K. and 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.

Zhao Y., Wei 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.