



مقاله پژوهشی

ارزیابی انتقال فایتوپلاسم‌های همراه بیماری‌های سرارغوانی و استالبور سیب‌زمینی از طریق غده‌های بذری

سید مهدی لوح موسوی^{۱*} و مسعود بهار^{۱**}

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۴)

چکیده

فایتوپلاسم‌های *Ca. P. trifolii* و *Candidatus Phytoplasma solani* از عوامل اصلی بیماری‌های سرارغوانی و استالبور سیب‌زمینی در استان اصفهان هستند. گرچه زنجرها ناقل اصلی فایتوپلاسم‌ها محسوب می‌شوند، ولی نقش غده‌های بذری در انتقال این فایتوپلاسم‌ها و انتشار بیماری‌های مزبور در منطقه مشخص نیست. در بررسی حاضر، با کاشت ۱۱۱ غده بدست آمده از ۴۷ بوته سیب‌زمینی همراه با عوامل فایتوپلاسمایی در گلخانه و تحت شرایط بدون زنجرک، ۲۵ بوته سیب‌زمینی نسل دوم (۲۲٪)، طی آزمون‌های nested-PCR آلوده به *Ca. P. solani* تشخیص داده شدند که ۱۹ بوته علائم فایتوپلاسمایی داشتند و شش بوته بدون علائم بودند. در هیچکدام از این نمونه‌ها *Ca. P. trifolii* ردیابی نشد. برای ارزیابی میزان انتقال فایتوپلاسم‌ها به گیاهان نسل سوم، ۸۲ غده حاصل از گیاهان آلوده نسل دوم کشت شدند که فقط در پنج نمونه (۶٪) از این گیاهان *Ca. P. solani* ردیابی شد، ولی ردیابی *Ca. P. trifolii* در آنها منفی بود. احتمالاً به دلیل تیر بالاتر در میزبان، *Ca. P. solani* توانایی بیشتری در انتقال از طریق غده به گیاهان نسل بعدی داشت. روند نزولی انتقال *Ca. P. solani* از طریق غده‌های دختری در نسل‌های دوم و سوم نشان داد که احتمالاً به دلیل پراکندگی غیریکنواخت فایتوپلاسم‌ها در آوندهای آبکش، تمامی غده‌های یک گیاه بیمار به فایتوپلاسم آلوده نمی‌شوند. علیرغم کاهش نرخ انتقال فایتوپلاسم‌ها در غده‌های نسل‌های متوالی، همین میزان آلودگی کم نیز می‌تواند منبعی برای گسترش بیماری‌های ناشی از فایتوپلاسم‌ها توسط زنجرها در منطقه باشد.

واژه‌های کلیدی: پی‌سی آر آشیانه‌ای، انتقال فایتوپلاسم‌ها، بیماری‌های سیب‌زمینی، غده بذری

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mbahar@iut.ac.ir

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

^۲ استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان



DOI: 10.22034/ijpp.2025.2021822.467

Research Article

Evaluation of the transmission of phytoplasmas associated with potato purple top and stolbur diseases through seed tubers

Seyed Mehdi Lohmousavi^{1*} and M. Bahar^{1**}

(Received: 13.11.2024; Accepted: 13.01.2025)

Abstract

Candidaus *Phytoplasma solani* and *Ca. Phytoplasma trifolii* are the dominant causal agents of potato purple top and stolbur diseases in Isfahan province. While leafhoppers are known as the primary vectors of phytoplasmas, the exact impact of seed tubers on the transmission of phytoplasmas across different generations is still uncertain. In this study, 111 potato tubers from 47 phytoplasma-associated plants were grown in an insect-proof greenhouse. The nested-PCR assays revealed that 25 second-generation potato plants tested positive for *Ca. P. solani* (22%), 19 of which were symptomatic. *Ca. P. trifolii* was not detected in any of these plants. As the third generation, 82 progeny tubers were replanted from the 47 samples. Among these, only five plants were identified as infected with *Ca. P. solani* (6%), while they were negative for *Ca.P. trifolii*. The elevated titer of *Ca. P. solani* within the host may have played a significant role in enhancing the seed transmission of the pathogen to subsequent generations. The decrease in the transmission rate of *Ca. P. solani* in offspring suggests that the uneven distribution of phytoplasma within the phloem may result in circumstances where not all tuber derived from an infected maternal tuber becomes infected. Despite a relatively low-rate of phytoplasma transmission across successive generations of seed potatoes, this reduced transmission level remains significant as a source of phytoplasma inoculum, facilitating the spread of the disease through leafhopper vectors.

Keywords: Nested-PCR, Phytoplasma transmission, Potato diseases, Seed tuber

* A part of Msc. Thesis of of the first author submitted to College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

**Corresponding author's E-mail address: mbahar@iut.ac.ir

¹ Msc. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology Isfahan, Iran.

² Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology Isfahan, Iran.

مقدمه

Ca. Phytoplasma aurantifolia (16SrII)

بیماری *Phytoplasma americanum* (16SrXVIII) در بیماری سرارغوانی دخالت دارند (Santos-Cervantes *et al.* 2010). علاوه بر این، گزارش فایتوپلاسماهای جدیدتری مانند *Ca. P. fraxini* (Franco-Lara *et al.* 2023) همراه با سیب‌زمینی نشان می‌دهد که ممکن است در آینده فایتوپلاسماهای دیگری نیز به این فهرست اضافه شوند. تنوع فایتوپلاسماهای مختلف در بروز بیماری‌های سرارغوانی، جارویی‌شدن و استالبور در مناطق مختلف دنیا و شباهت علائم این بیماری‌ها نشان می‌دهد که ممکن است در موقعیت‌های مختلف جغرافیایی، مخلوطی از این بیمارگرها در بروز بیماری‌های فایتوپلاسمایی سیب‌زمینی نقش داشته باشند که معمولاً یک یا دو فایتوپلاسمای محوری و اصلی و دیگر فایتوپلاسمای نقش جزئی‌تری را در بیماری‌زایی ایفا می‌کنند (Leyva-Lopez *et al.* 2002; Santos-Cervantes *et al.* 2010).

فایتوپلاسماهای بیمارگر بطور عمده از طریق گونه‌های مختلف زنجبرک (Cicadellidae) منتقل می‌شوند (Weintraub, *et al.* 2006) که در بین آنها زنجبرک گل‌مینا (*Macrostelus facifron* Stål) و زنجبرک چغندرقد (*Circulifer tenellus* Baker) در انتقال فایتوپلاسماهای عامل سرارغوانی و جارویی‌شدن سیب‌زمینی نقش بیشتری دارند (Hiruki & Wang 2004; Munyaneza *et al.* 2014; Murphy *et al.* 2006). در اروپا و منطقه مدیترانه نیز، زنجبرک بومی اروپا (*Hyalesthes obsoletus* Signoret) کاندید اصلی انتقال فایتوپلاسمای *Ca. P. solani* می‌باشد (Linnaeus 1758; Mitrovic *et al.* 2016). اخیراً زنجبرک پلی‌فاژ (*Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae)) نیز به عنوان ناقل این فایتوپلاسمای معرفی شده است (Rinklef *et al.* 2024).

تصور اولیه این بود که به دلیل تولید جوانه‌های موین ضعیف در غده‌های بدست آمده از بوته‌های مبتلا به بیماری

بیماری‌های فایتوپلاسمایی سرارغوانی (Potato purple) (top, PPT)، جارویی‌شدن (Potato which's broom,) و استالبور (Potato stolbur) از شایع‌ترین بیماری‌های سیب‌زمینی محسوب می‌شوند که خسارت سالیانه آنها در سرتاسر دنیا قابل توجه است (Lee *et al.* 2006). اگر چه لوله‌ای شدن برگ‌های جوان، ارغوانی شدن برگ‌های بالایی بوته و تولید غده‌های هوایی به عنوان علائم عمومی این سه بیماری فایتوپلاسمایی در سیب‌زمینی ذکر شده‌اند (Girsova *et al.* 2016)، ولی بروز علائم زردی و پژمردگی بوته‌ها در آخر فصل و تولید غده‌های نرم و اسفنجی به همراه جوانه‌های نخی‌شکل در بیماری سرارغوانی (Lee *et al.* 2006; Santos-Cervantes *et al.* 1983; Wright *et al.* 2010)، کاهش فاصله میان گره‌ها و رشد انبوه شاخه‌ها در بیماری جارویی شدن (Khadhair *et al.* 1997) و تورم جوانه‌های جانبی بین شاخه‌ها به همراه تولید جوانه‌های خمیده از غده‌های کوچک در بیماری استالبور (Girsova *et al.* 2016; Mitrovic *et al.* 2016) تا حدودی به تفکیک این سه بیماری فایتوپلاسمایی در مزرعه کمک می‌نماید.

در حال حاضر، *Ca. P. solani* به عنوان عامل بیماری استالبور، شایع‌ترین بیماری فایتوپلاسمایی سیب‌زمینی در اروپا، به حساب می‌آید (Ember, *et al.* 2011; Girsova *et al.* 2016) که البته انتشار آن در کشورهای آسیایی، آفریقایی، آمریکای لاتین و نیوزیلند نیز چشمگیر است (EPPO 2024). اگرچه *Ca. P. trifolii* (16SrVI) به عنوان عامل بیماری جارویی شدن سیب‌زمینی شناخته می‌شود (Hosseini *et al.* 2011a; Khadhair *et al.* 1997)، ولی فایتوپلاسماهای متعدد دیگری نیز از جمله *Candidatus Phytoplasma asteris* (16SrI)، *Ca. Phytoplasma trifolii* (16SrVI)،

باید زنجیرک‌ها عامل اصلی گسترش این عوامل بیمارگر در منطقه باشند (Weintraub, et al. 2006) که مشاهدات مربوط به انتشار جمعیت بالای زنجیرک‌ها طی ماه‌های تیر و مرداد در مزارع سیب‌زمینی اصفهان نیز این فرضیه را تقویت می‌کند. ولی در بررسی گونه‌های شایع زنجیرک‌ها در مزارع سیب‌زمینی استان اصفهان مشخص شد که از ۲۵ گونه شناسایی شده مربوط به ۲۲ جنس، فقط دو زنجیرک *Macrosteles laevis* و *Circulifer tenellus* با پتانسیل انتقال فایتوپلاسما در این مزارع حضور دارند (Khajeali et al. 2001)، درحالی‌که *Hyalesthes obsoletus* به عنوان کاندید اصلی انتقال *Ca. P. solani* (EPPO 2024; Mitrovic et al. 2016) در بین این ۲۵ گونه نبود. حتی با وجود توانایی زنجیرک *Empoasca decipiens* Paoli 1930 و یا زنجیرک‌های دیگر در انتقال *Ca. P. solani* (Galleto et al. 2011)، شواهدی مبنی بر حضور این زنجیرک در مزارع سیب‌زمینی اصفهان وجود ندارد. از طرف دیگر، تاکنون هیچ پژوهشی در اصفهان راجع به انتقال فایتوپلاسماهای رایج سیب‌زمینی از طریق غده بذری به گیاهان نسل‌های بعدی انجام نشده است تا نقش غده‌های دخترتری در انتقال بیماری‌های فایتوپلاسمایی روشن شود. به این لحاظ، تعیین نرخ انتقال فایتوپلاسماها از طریق غده‌های سیب‌زمینی، به عنوان هدف اصلی این پژوهش انتخاب شد تا بتوان اطلاعات مناسبی در مورد نحوه پراکنش و انتقال این بیمارگرها در مناطق کشت سیب‌زمینی استان اصفهان فراهم نمود.

مواد و روش

نمونه برداری از مزارع سیب زمینی، ردیابی و شناسایی فایتوپلاسماهای همراه

در اواخر شهریور و مهرماه ۱۳۹۸ طی بازدید از مزارع سیب‌زمینی استان‌های اصفهان (ناژوان، دامنه، فریدن،

سرارغوانی، امکان رشد کامل گیاه و در نتیجه انتقال فایتوپلاسما از طریق غده به نسل‌های بعدی فراهم نیست، هر چند در غده‌های مبتلا به جارویی شدن، امکان زنده‌مانی فایتوپلاسما وجود دارد (Wright 1983). با این حال، گزارشاتی مانند انتقال ۶٪ تا ۳۳٪ عامل بیماری PPT از طریق غده بذری در هندوستان (Giri & Nagaich 1973)، انتقال آلودگی مخلوط همراه با فایتوپلاسماهای زردی گل‌مینا *Aster yellows* (16SrI) و افزولش شبدر *Clover* proliferation group (16SrVI) با نرخ ۶٪ از غده‌های بذری حاصل از گیاهان آلوده به گیاهان نسل بعد در کانادا (Khadhair et al. 2003) و ردیابی فایتوپلاسما در غده‌های سیب‌زمینی بدست آمده از گیاهان فاقد علائم (Paltrinieri and Bertaccini 2007) نشان دادند که انتقال فایتوپلاسماها از طریق غده‌های بذری سیب‌زمینی قابل اغماض نیست. در تحقیقات بعدی نیز تایید انتقال فایتوپلاسماهای گروه استالبور از طریق غده در ارقام سیب‌زمینی با محتوای نشاسته بالا (Ember et al. 2011) و انتقال فایتوپلاسمای *Ca. P. trifolii* (16SrVI) از غده‌های هشت واریته سیب‌زمینی جمع‌آوری شده از مزارع مورد هجوم زنجیرک چغندر قند با نرخ انتقال صفر تا ۵۰٪ طی سه سال متوالی بسته به نوع رقم (Crosslin et al. 2011)، اهمیت غده‌های بذری را در انتقال فایتوپلاسماهای سیب‌زمینی به گیاهان نسل بعدی بیشتر روشن ساخت. این نتایج معلوم نمود که غده‌های سیب‌زمینی نیز می‌توانند به عنوان یک منبع ثانوی در انتقال و انتشار بیماری‌های سرارغوانی، جارویی جادوگر و استالبور در مزارع سیب‌زمینی ایفای نقش کنند.

در مناطق سیب‌زمینی کاری استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری، فایتوپلاسمای *Ca. P. solani* به صورت غالب و *Ca. P. trifolii* در حد کمتر انتشار دارند (Gholami et al. 2020; Hosseini, et al. 2011a; Hosseini, et al. 2011b). بر اساس یک فرض عمومی،

(Denmark) و ۸/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و با شرایط دمایی مندرج در جدول ۱ انجام شد. پس از رقیق‌سازی محصول PCR مرحله اول به نسبت ۱:۳۰ با آب مقطر استریل، واکنش مرحله دوم nested-PCR با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 (Gundersen and Lee 1996) با همان شرایط واکنش قبلی، ولی با دمای اتصال (annealing temperature) ۵۸°C انجام گرفت. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio Rad 100 Thermal cycler انجام شد. به منظور مشاهده قطعه‌های DNA تکثیر شده طی واکنش nested PCR، ۱۰ میکرولیتر از هر محصول واکنش بر روی ژل آگارز TBE ۱٪ به مدت یک ساعت با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردید. برای تخمین اندازه باندها، از نشانگر 100 bp plus DNA ladder (Fermentas Co., # SM0321) استفاده شد. پس از الکتروفورز، ژل آگارز به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (۵ μg/ml - ۰/۱) رنگ‌آمیزی شد و پس از شستشو با آب، تحت اشعه ماورای بنفش با طول موج ۲۵۴ nm در دستگاه Photodocument (Uvitec Cambridge) عکس برداری شد.

فریدون‌شهر و چادگان) و چهارمحال و بختیاری (فراذنبه، بروجن و سفید دشت)، از برگ بوته‌های سیب‌زمینی دارای علائم زردی بوته، لوله‌ای شدن برگ‌ها به همراه تغییر رنگ ارغوانی آنها و تشکیل غده‌های هوایی نمونه‌برداری شد. از هر کدام از گیاهان جمع‌آوری شده، سه غده بطور تصادفی انتخاب و همراه نمونه برگی مربوط به خود به آزمایشگاه منتقل شد.

از رگبرگ نمونه‌های جمع‌آوری شده، DNA کل به روش موری و تامسون با بافر CTAB ۳٪ استخراج شد (Murray & Thompson 1980) و غلظت نمونه‌های DNA در حد ۲۰ تا ۳۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق‌سازی گردید. از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای (nested-PCR) برای ردیابی فایتوپلاسماها در نمونه‌ها استفاده شد. مرحله اول آزمون با استفاده از جفت آغازگر P1 (Deng & Hiruki 1991) و P7 (Schneider *et al.* 1995) در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل دو میکرولیتر DNA (غلظت ۲۰ تا ۳۰ نانوگرم)، یک میکرولیتر از هر آغازگر (۱۲/۵ μM/μl)، ۲۵ میکرولیتر Taq DNA Polymerase 2.x Master Mix Red (Ampliqon) استفاده شد.

جدول ۱- نام، توالی، قطعه DNA مورد نظر جفت آغازگرها و شرایط PCR مورد استفاده در این تحقیق برای ردیابی گروه‌های مختلف فایتوپلاسمایی در پژوهش حاضر

Table 1. Primer names, sequences, PCR product sizes, and PCR conditions used for detecting of phytoplasmas studied in the current study

Primer	Primer sequences (5'-3')	Amplicon size (bp)	PCR cycling conditions	Reference
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	1784	94°C 5'; 35× [94°C 30", 55°C 30", 72°C 75"]]; 72°C 10'	Deng and Hiruki 1991
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT			Schneider <i>et al.</i> 1995
R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	1239	94°C 5'; 35× [94°C 30", 58°C 30", 72°C 75"]]; 72°C 10'	Gundersen and Lee 1996
R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCC			
rp(I)F1A	TTTTCCCCTACACGTACTTA	1240	94°C 11'; 35× [94°C 60", 50°C 90", 72°C 90"]]; 72°C 7'	Lee, et al. 2004
rp(I)R1A	GTTCTTTTGGCATTAAACAT			
TRF6F	GAAACTGTCTTGACTAGAGTGA	509	94°C 5'; 35× [94°C 30", 58°C 30", 72°C 75"]]; 72°C 10'	This study
TRF6R	CGTTAAAGTCCCCACCATTACG			
Solani1 2F	GGAAAAACATTATGACGGTACC	680	94°C 5'; 35× [94°C 30", 58°C 30", 72°C 75"]]; 72°C 10'	This study
Solani1 2R	GTCTTGCTAAAGTCCCCAACTTAA			

اختصاصی طراحی شده Solani12F/R برای *Ca. P. solani* و همچنین TRF6F/TRF6R برای *Ca. P. trifolii* (P1/P7) nested-PCR در مرحله اول و جفت پرایمر اختصاصی در مرحله دوم) با DNA نمونه‌های شاخص فایتوپلاسمهای *Ca. P. solani* 12CB (EU661607)، *Ca. P. trifolii* A6 (FJ427295) شناسایی شده در تحقیقات قبلی (Hosseinei et al. 2011a، Hosseinei et al. 2011b) و *Ca. P. asteris* (HAY1: Vali Sichani et al. 2014) (HQ433338) انجام گرفت (جدول ۱). در تمامی این آزمایشات، آزمون nested-PCR همان نمونه‌ها با P1/P7 (مرحله اول) و R16F2n/R16R2 (مرحله دوم) به عنوان شاهد مثبت و DNA نمونه‌های برگ‌گی سیب‌زمینی بدست آمده از کشت بافت به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

ردیابی و شناسایی فایتوپلاسمهای همراه با نمونه‌های سیب‌زمینی جمع‌آوری شده

برای شناسایی گروه‌های فایتوپلاسمایی همراه با نمونه‌های جمع‌آوری شده، DNA هر بوته سیب‌زمینی مبتلا به فایتوپلاسم با استفاده از جفت آغازگر عمومی P1/P7 (دور اول) تحت آزمون PCR قرار گرفت. محصول PCR هر نمونه به نسبت ۱:۲۰ رقیق شد و به عنوان الگو در آزمون nested-PCR مجزا با جفت آغازگرهای اختصاصی rp(I)F1A/rp(I)R1A (Lee et al. 2004)، Solani12F/Solani12R و TRF6F/TRF6R (طراحی شده در این پژوهش) به ترتیب برای ردیابی و تشخیص *Ca. P. asteris*، *Ca. P. solani* و *Ca. P. trifolii* استفاده گردید. (جدول ۱)

کاشت غده‌های بذری جمع‌آوری شده از مزارع (نسل دوم)

به منظور بررسی امکان انتقال عوامل فایتوپلاسمایی از طریق غده بذری، ۱۲۳ غده جمع‌آوری شده از بوته‌های

بعد از شناسایی نمونه‌های سیب‌زمینی آلوده به فایتوپلاسم با آزمایشات nested-PCR، بقیه نمونه‌های فاقد فایتوپلاسم با همراه غده‌های مربوط به آنها از ادامه آزمایشات حذف شدند. همچنین، برای شناسایی دقیق فایتوپلاسمای ردیابی شده، از نتایج nested-PCR محصول PCR مرحله دوم دو نمونه منتخب PTW30 و PTW58 تکثیر یافته با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 بطور مستقیم توالی‌یابی گردید (ماکروژن- کره جنوبی).

طراحی آغازگرهای اختصاصی برای *Ca. P. solani* و *Ca. p. trifolii*

به دلیل عدم معرفی جفت آغازگر اختصاصی برای ردیابی و شناسایی فایتوپلاسمهای *Ca. P. solani* و *Ca. P. trifolii*، در این تحقیق یک جفت آغازگر اختصاصی برای هر کدام و بر مبنای توالی ناحیه بین ژنی 16SrRNA-23SrRNA آنها طراحی شد که به دلیل طول مناسب و تنوع نوکلئوتیدی، برای پردازش آغازگر مناسب هست (Smart et al. 1996). به این منظور، ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی *Ca. P. solani* با کدهای دسترسی EU661607، JQ730750، EU344884 و HG531809 و توالی‌های نوکلئوتیدی *Ca. P. trifolii* با کدهای دسترسی FJ427296، AY390261، KP864665 از پایگاه اطلاعاتی بانک ژن NCBI دریافت و به کمک نرم افزار CLC Sequence Viewer v6.0 (https://clc-sequenceviewer.software.informer.com) هم‌ردیف‌سازی شدند. با توجه به تفاوت‌های موجود بین توالی‌های DNA گونه‌های مختلف *Ca. P. solani* و *Ca. P. trifolii*، برای طراحی جفت آغازگرها از برنامه Oligo 7 (https://www.oligo.net) استفاده شد. در این نرم افزار ویژگی‌های یک آغازگر مناسب از قبیل محتوای G+C، دمای ذوب (Tm)، عدم تشکیل ساختار سنجاق سری و عدم تشکیل دایمر پرایمر آغازگرها بررسی گردید. برای ارزیابی عملکرد اختصاصی جفت آغازگرهای

شرکت ماکروژن- کره جنوبی ارسال شد.

کاشت گیاهان نسل سوم

در مرحله پایانی رشد سه تا چهار ماهه بوته‌ها، غده‌های دخترتی گیاهانی که آلودگی آنها به عوامل فایتوپلاسمایی تایید شده بود، برداشت گردید و بقیه بوته‌ها از ادامه آزمایشات حذف شدند. غده‌های دخترتی گیاهان نسل دوم آلوده به فایتوپلاسمای منظور شکستن دوره خواب به مدت دو ماه در یخچال نگهداری شدند. پس از این مدت، غده‌ها به مدت دو تا سه هفته در دمای اتاق و در معرض رطوبت نسبی حدود ۷۰٪ قرار گرفتند تا عمل جوانه‌زنی صورت گیرد. سپس، غده‌ها به روش قبلی در گلدان‌های مجزا و با همان شرایط گلخانه‌ای کاشته شدند.

در بررسی امکان انتقال عوامل فایتوپلاسمایی سیب‌زمینی از طریق غده به گیاهان نسل سوم، سه گروه از غده‌های دخترتی گیاهان نسل دوم انتخاب شدند. گروه نخست غده‌هایی که گیاهان مادری نسل اول و نسل دوم آنها آلوده به *Ca. P. solani* بودند، گروه دوم شامل غده‌هایی بودند که گیاهان مادری نسل اول آنها در مزرعه آلودگی به *Ca. P. trifolii* داشتند ولی در نسل دوم فاقد آلودگی بودند و گروه سوم غده‌هایی از گیاهان مادری نسل دوم که در نسل اول به هر دو فایتوپلاسمای *Ca. P. solani* و *Ca. P. trifolii* داشتند. در کنار این غده‌ها، دو گلدان حاوی غده‌های عاری از عوامل بیمارگر (تهیه شده از کشت بافت) به عنوان شاهد منفی نیز کشت شدند.

یادداشت برداری از علائم قسمت‌های هوایی گیاهان، نمونه‌برداری و استخراج DNA از رگبرگ بوته‌ها در مرحله غده‌دهی و انجام آزمون‌های nested-PCR با جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 (دور اول) و R16F2n/R16R2 (دور دوم) و همچنین با P1/P7 (دور اول) و جفت آغازگرهای اختصاصی گروه (دور دوم) در مورد گیاهان نسل سوم نیز با همان شرایط گیاهان نسل دوم انجام شد.

سیب‌زمینی که طی آزمون‌های nested-PCR، آلوده به فایتوپلاسمای تشخیص داده شدند، پس از سرمادهی دو ماهه در داخل یخچال هر کدام بصورت منفرد در گلدان‌های با دهانه ۲۰ و ارتفاع ۱۸ سانتی‌متری با مخلوط خاک مناسب (خاک برگ، ماسه و خاک زراعی به نسبت ۱:۱:۲) کاشته شدند و در گلخانه با دمای کنترل شده ۲۴-۳۲°C نگهداری گردیدند. در تمام مراحل رشد گیاهان، از سمپاشی دو هفتگی با سوسپانسیون ۰/۵ درصد از ایمیداکلوپراید ۳۵٪ (گل سم -گرگان) برای کنترل زنجیرک‌ها در گلخانه استفاده شد.

طی مراحل مختلف رشد گیاهان در گلخانه، علائم فایتوپلاسمایی بوته‌ها یادداشت شد. در مرحله غده-دهی، ۱۰۰ میلی‌گرم از رگبرگ‌های چندین برگ انتهایی هر بوته انتخاب و پس از پودرکردن در نیتروژن مایع، از آنها به روش موری-تامسون استخراج DNA انجام گرفت (Murray & Thompson 1980). پس از رقیق‌سازی DNA نمونه‌ها به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر استریل، نمونه‌های DNA با جفت آغازگر P1/P7 و همان شرایط قبلی تحت واکنش PCR قرار گرفتند. محصول PCR بدست آمده مجدداً به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر استریل رقیق شد و در آزمون nested-PCR با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 استفاده گردید. نمونه‌های DNA با واکنش مثبت در آزمون قبلی (تکثیر قطعه مورد انتظار ۱۲۳۹ bp) در مرحله بعدی در آزمون‌های جداگانه nested-PCR با جفت آغازگر P1/P7 (دور اول) و بطور انفرادی با جفت آغازگرهای اختصاصی Solani12E/R ، TRF6F/TRF6R و همچنین rp(I)F1A/rp(I)R1A (دور دوم) بررسی شدند تا بطور مشخص آلودگی هر بوته به هر کدام از سه فایتوپلاسمای *Ca. P. solani*، *Ca. P. trifolii* و *Ca. P. asteris* تعیین شود. جهت اطمینان از نتایج بدست آمده، محصول PCR یک نماینده از هر کدام از نمونه‌های واکنش مثبت با جفت آغازگرهای nested-PCR انتخاب و برای توالی‌یابی به

نتایج

ردیابی عوامل فایتوپلاسمایی همراه نمونه‌های سیب‌زمینی

از ۷۳ بوته سیب‌زمینی جمع‌آوری شده از استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری که علائم زردی بوته، لوله‌ای و ارغوانی شدن برگ‌ها، ریزبرگی، کوتولگی و تشکیل غده‌های هوایی را نشان می‌دادند (شکل ۱)، ۴۷ نمونه به دلیل تکثیر قطعه ۱۲۳۹ bp درآزمون nested-PCR، با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 در مرحله اول و R16F2n/R16R2 در مرحله دوم، آلوده به فایتوپلاسم تشخیص داده شدند. درآزمون nested-PCR با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 در دور اول و جفت آغازگر rp(I)F1A/rp(I)R1A در دور دوم، هیچ تکثیری صورت نگرفت که نشان دهنده عدم همراهی فایتوپلاسمای *Ca. P. asteris* در نمونه‌های جمع‌آوری شده بود. در این آزمایشات، DNA شاهد *Ca. P. asteris* (HAY1 از شاهدانه) همیشه باندهای مترامی تولید نمود، ولی نتیجه واکنش در نمونه‌های سالم سیب‌زمینی منفی بود. با آزمون nested-PCR (مرحله اول P1/P7 و مرحله دوم Solani12F/R) یک باند ۶۸۰ bp در ۳۵ نمونه جمع‌آوری شده تکثیر یافت (شکل ۲). توالی‌یابی نوکلئوتیدی همزمان قطعات DNA حدود ۱۲۳۹ bp با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 و ۶۸۰ bp با Solani12F/R تکثیر یافته در دو نمونه منتخب PTW58-680 (accession no. PQ628502)، PTW58 (accession no. PTW80) و (accession no. PQ836122) PTW80 (accession no. PTW80-680، (PQ628503) PTW80-680) (PQ836123) مشخص نمود که این توالی‌ها با مترادف بخشی از ناحیه 16S rDNA نمونه‌های شناخته شده *Ca. P. solani* در بانک داده‌های NCBI شباهت حدود ۱۰۰٪ دارند. به این ترتیب، هر ۳۵ نمونه مزبور آلوده به *Ca. P. solani* تشخیص داده شدند. در سه نمونه دیگر از

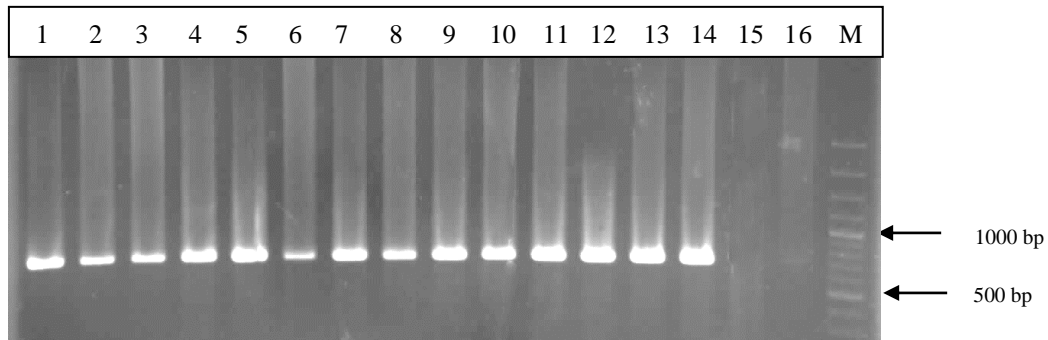
مجموع ۴۷ نمونه آلوده به عوامل فایتوپلاسمایی، طی واکنش nested-PCR (مرحله اول P1/P7 و مرحله دوم TRF6F/R) یک باند ۵۰۹ bp تکثیر شد (شکل ۳) که توالی باندهای DNA تکثیر شده با R16F2n/R16R2 و TRF6F/R در نمونه نماینده PTW30 (accession no. PQ628504)، PTW30-509 (accession no. PQ836124)، به میزان حدود ۱۰۰٪ با توالی بخشی از ناحیه 16SrDNA جدایه‌های *Ca. P. trifolii* در NCBI مشابه بود. در نه نمونه از گیاهان، طی واکنش‌های nested-PCR با جفت آغازگرهای Solani12F/R و TRF6F/R، به ترتیب هر دو باند ۶۸۰ bp و ۵۰۹ bp تکثیر شدند که نشان می‌داد در این نمونه‌ها، هر دو فایتوپلاسمای *Ca. P. trifolii* و *Ca. P. solani* حضور دارند.

برای تایید نتایج شناسایی فایتوپلاسمهای مورد مطالعه، روابط فیلوژنتیکی دو نماینده منتخب PTW58 و PTW80 از *Ca. P. solani* و PTW30 از *Ca. P. trifolii* با تعدادی از جدایه‌های فایتوپلاسمایی نزدیک به فایتوپلاسمهای همراه سیب‌زمینی بررسی شد. به این منظور، با استفاده از جفت آغازگر R16F2n/R16R2، بخشی از ناحیه 16SrDNA جدایه‌ها تکثیر و توالی‌یابی شد. پس از ویرایش ابتدا و انتهای توالی‌های دریافت شده، درخت فیلوژنتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی ذکر شده با توالی 16SrDNA فایتوپلاسمهای همراه با سیب زمینی ثبت شده در NCBI database، با نرم‌افزار Mega V 7.0 به روش maximum-likelihood با استفاده از مدل 3-parameter+6 Tamura (T92+6) و اعتبارسنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد (شکل ۴). نتایج این تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه‌های PTW58 و PTW80 با حداکثر شباهت به یکدیگر و جدایه‌های *Ca. P. solani* ثبت شده در NCBI، در یک خوشه (cluster) قرار می‌گیرند. همچنین، PTW30 نیز با یک جدایه *Ca. P. trifolii* در یک خوشه دیگر قرار گرفت (شکل ۴).



شکل ۱- علائم شاخص بیماری‌های فایتوپلاسمایی در گیاهان سیب‌زمینی: (a) زردی، (b) لوله‌ای و ارغوانی شدن برگ‌های راس بوته، (c) متورم شدن قاعده دمبرگ‌ها، (d) تشکیل غده‌های هوایی در زاویه ساقه

Fig 1. Characteristic symptoms of phytoplasma diseases on potato plants: (a) yellowing, (b) upward curling and purpling of top leaves, (c) swelling the base of the petiole, (d) the formation of an aerial tuber

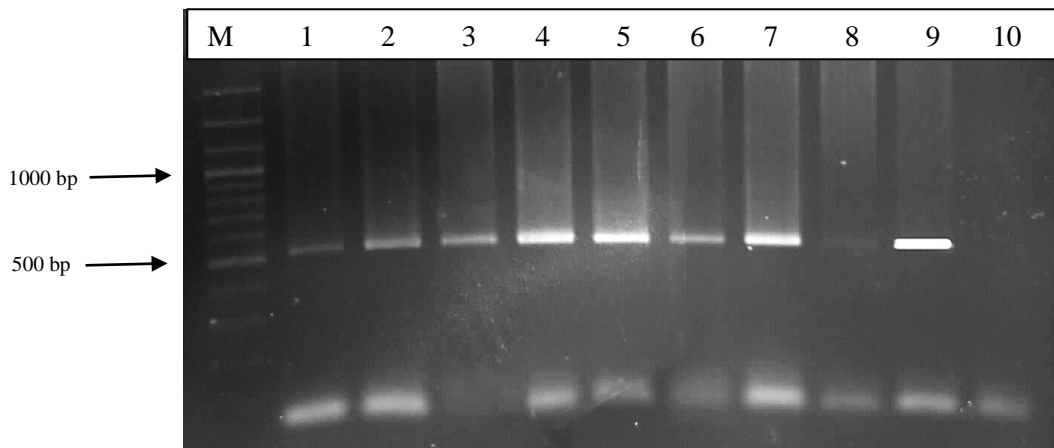


شکل ۲- تکثیر یک قطعه ۶۸۰ bp از DNA برخی نمونه‌های سیب‌زمینی آلوده به *Ca. P. solani*، طی واکنش nested-PCR با جفت آغازگرهای P1/P7 (مرحله اول) و Solani12F/Solani12R (مرحله دوم)

M. نشانگر DNA (Ladder plus) ۱- PTW21، ۲- PTW22، ۳- PTW25، ۴- PTW34، ۵- PTW49، ۶- PTW58، ۷- PTW60، ۸- PTW62، ۹- PTW64، ۱۰- PTW66، ۱۱- PTW70، ۱۲- PTW71، ۱۳- PTW80، ۱۴- شاهد مثبت (*Ca. P. solani* 12CB) -۱۵- شاهد منفی (*Ca. P. trifolii* A6) -۱۶- برگ سیب‌زمینی سالم

Fig 2. The nested-PCR amplification of a 680bp fragment from DNA of potato samples infected with *Ca. P. solani* using primer pairs P1/P7 (first round) and Solani12F/Solani12R (second round)

M. DNA marker, ladder 100plus, 1. PTW21, 2. PTW22, 3. PTW25, 4. PTW34, 5. PTW49 6. PTW58, 7. PTW60, 8. PTW62, 9. PTW64, 10. PTW66, 11. PTW70, 12. PTW71, 13. PTW80, 14. Positive control (BB17), 15. Negative Control (Healthy potato leaf), 16. Water

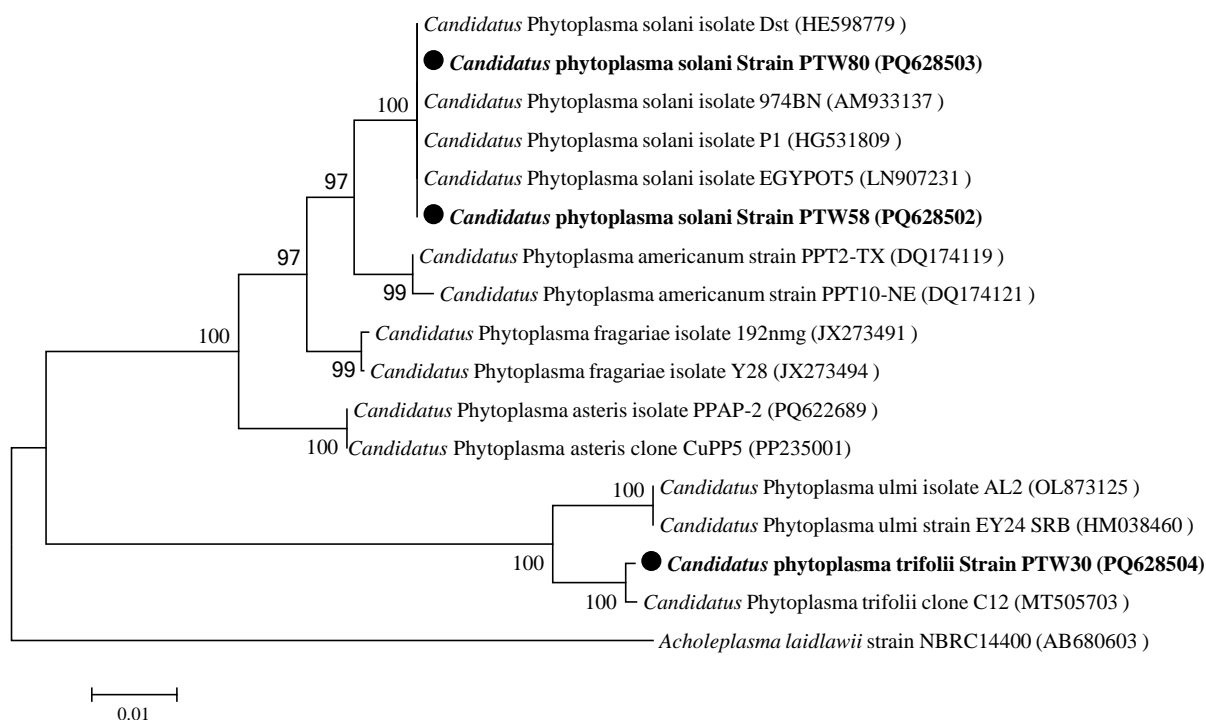


شکل ۳- تکثیر یک قطعه ۵۰۹ bp از DNA برخی نمونه‌های آلوده به *Ca. P. trifolii*، طی واکنش nested-PCR با جفت آغازگرهای P1/P7 (مرحله اول) و TRF6F/R (مرحله دوم)

M. نشانگر DNA (Ladder plus) ۱- PTW64، ۲- PTW66، ۳- PTW68، ۴- PTW30، ۵- PTW37، ۶- PTW51، ۷- PTW54، ۸- PTW55، ۹- شاهد مثبت (*Ca. P. trifolii* A6) -۱۰- برگ سیب‌زمینی سالم

Fig 3. The nested-PCR amplification of a 509bp fragment from DNA of potato samples infected with *Ca. P. trifolii* using primer pairs P1/P7 (first round) and TRF6F/R (second round)

M. DNA marker, ladder 100plus 1. PTW64 2. PTW66 3. PTW68 4. PTW30 5. PTW37 6. PTW51 7. PTW54 8. PTW55 9. Positive control (*Ca. P. trifolii* A6) 10. Negative Control (Healthy potato leaf)



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس توالی های نوکلئوتیدی بخشی از ناحیه ۱۲۰۰ نوکلئوتیدی ژن 16SrDNA فایتوپلاسمای مورد مطالعه در این تحقیق (پر رنگ) و توالی فایتوپلاسمای بدست آمده از بانک اطلاعاتی NCBI. توالی *A. laidlawii* به عنوان خارج از گروه استفاده شد.

Fig 4. The phylogenetic tree was constructed based on partial ~1.2 kbp 16SrDNA gene sequences from the study's phytoplasmas (bold) and the representative phytoplasmas obtained from the NCBI database. Sequence of *A. laidlawii* as the outgroup to root the tree. The numbers on the branches are bootstrap (confidence) values.

جمع‌آوری شده از مزرعه، ۱۸ غده به دلیل ریز بودن و چروکیدگی زود هنگام کشت نشدند. با کاشت ۱۲۳ غده جوانه زده از ۴۷ نمونه آلوده به فایتوپلاسمای *Ca. P. trifolii* و/یا *Ca. P. solani* در گلخانه، ۱۲ غده نیز به دلیل پوسیدگی، جوانه نزدند و از بین رفتند. از ۱۱۱ بوته رشد کرده (گیاهان نسل دوم)، تعدادی از بوته ها در همان پنج هفته ابتدای رشد علایم ریزبرگی و کم رشدی از خود نشان دادند. بروز این نوع علایم به همراه زردی یا ارغوانی شدن برگ‌ها تا اواخر دوره رشد در تعداد بیشتری از بوته‌ها ادامه یافت. در ارزیابی نهایی گیاهان، ۴۶ بوته سیب زمینی علایم بیماری‌های فایتوپلاسمایی را نشان دادند، ولی

با در نظر گرفتن مجموع نتایج واکنش nested-PCR در بین ۷۳ نمونه مورد بررسی، ۲۶ نمونه فاقد آلودگی به فایتوپلاسمای ۳۵ نمونه (۴۸٪) فقط آلوده به *Ca. P. solani*، سه نمونه (۴٪) فقط آلوده به *Ca. P. trifolii* و نه نمونه (۱۲٪) بطور همزمان آلوده به این دو فایتوپلاسمای تشخیص داده شدند. از هر کدام از نمونه‌های آلوده به فایتوپلاسمای سه غده جمع‌آوری شد تا در آزمایشات مربوط به انتقال فایتوپلاسمای از طریق غده به نسل دوم استفاده شود.

ردیابی فایتوپلاسمای در گیاهان نسل دوم

از ۱۴۱ غده بدست آمده از گیاهان آلوده به فایتوپلاسمای

در این آزمایشات باشد. تکثیر باند مورد نظر در تمامی واکنش‌های نمونه شاهد مثبت A6، نشان دهنده شرایط درست آزمون nested-PCR بود.

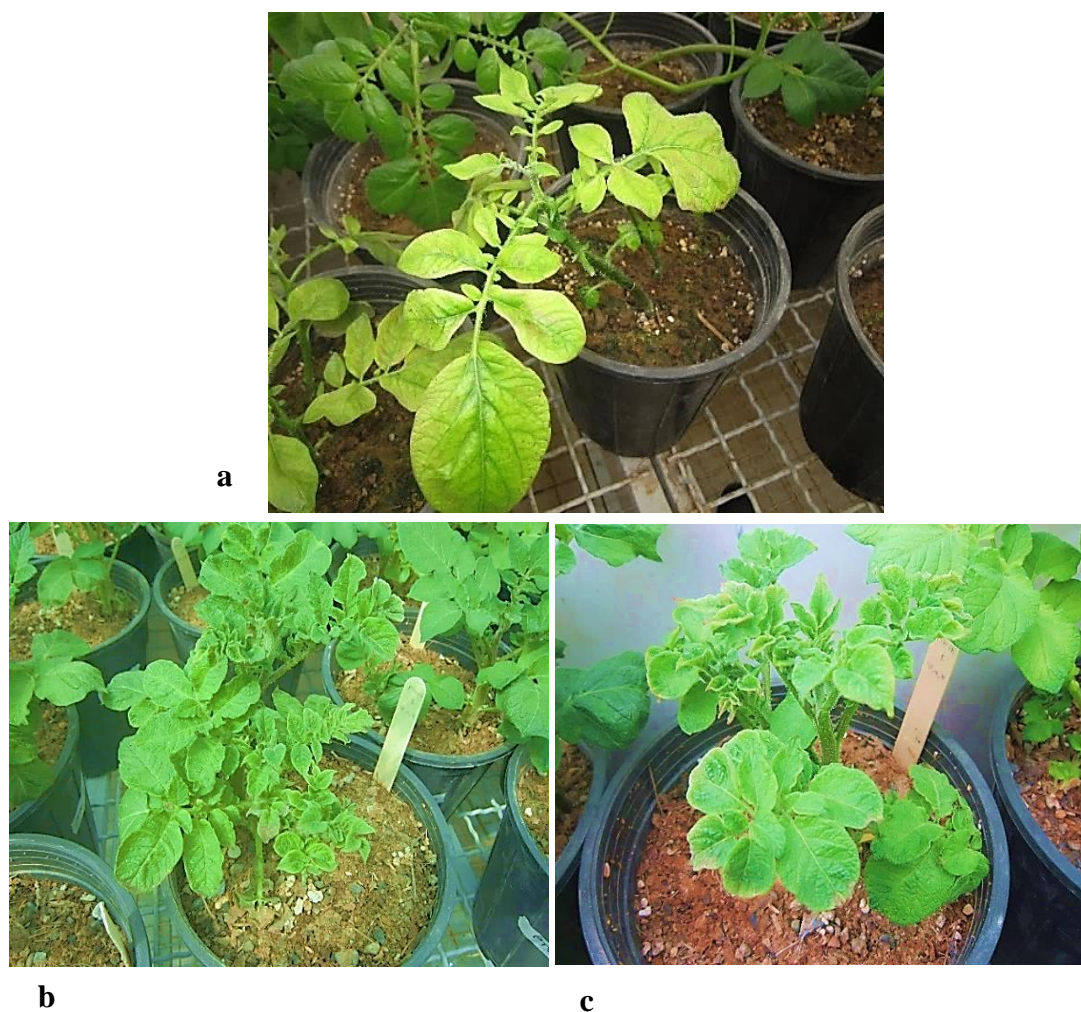
بررسی وجود آلودگی فایتوپلاسمی در گیاهچه‌های نسل سوم

در مشاهده هفتگی علایم ظاهری ۸۲ بوته از گیاهان نسل سوم، ۴۶ بوته‌ها فاقد علایم فایتوپلاسمی بودند، ولی در ۳۶ بوته دیگر با سابقه آلودگی به *Ca. P. solani*، در مراحل پس از گل‌دهی و یا تشکیل غده، علایمی نظیر زردی همراه با ارغوانی شدن ملایم حاشیه برگ‌ها، برگ‌گستگی لبه برگ‌ها، کم‌رشدی و ریزبرگی مشاهده شد (شکل ۵). گیاهان فاقد علایم فایتوپلاسمی از غده گیاهان نسل دومی بدست آمد که در نسل اول آلودگی به *Ca. P. trifolii* داشتند، ولی در گیاهان نسل دوم عاری از *Ca. P. trifolii* و *Ca. P. solani* تشخیص داده شدند (گروه دوم) و یا از بوته‌های آلوده به مخلوط دو فایتوپلاسمی *Ca. P. trifolii* و *Ca. P. solani* در نسل اول و بدون آلودگی در نسل دوم (گروه سوم) بودند. در هیچکدام از این گیاهان بدون علایم، در واکنش nested-PCR (مرحله اول P1/P7 و مرحله دوم R16F2n/R16R2) تکثیر بانندی صورت نگرفت و انتقال فایتوپلاسم در آنها منفی ارزیابی شد.

در بررسی بوته‌های بدست آمده از ۸۲ غده مورد آزمایش، در پنج بوته بدست آمده از غده‌های گروه اول (۶٪) که در هر دو نسل اول و دوم آلوده به *Ca. P. solani* بودند، باند مورد نظر ۱۲۳۹bp با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 تکثیر شد. طی آزمون nested-PCR با جفت آغازگر Solani12F/R نیز قطعه مورد انتظار ۶۸۰ bp در همه آنها تکثیر گردید ولی هیچ نوع بانندی با TRF6F/R تولید نشد. در بین این پنج نمونه، چهار نمونه PTW82-3b و PTW80-2a، PTW80-1a، PTW70-1a علایم ریزبرگی، کوتولگی، زردی و ارغوانی شدن حاشیه

۶۵ بوته دیگر فاقد علایم بیماری بودند. نکته قابل توجه اینکه، در بعضی از این گیاهان، علایم بیماری‌های فایتوپلاسمی فقط در یک یا چند شاخه مشاهده شد، در حالیکه برخی شاخه‌های همان بوته ظاهر سالمی داشتند. پس از استخراج DNA از رگبرگ‌های ۱۱۱ بوته بدست آمده از ۴۷ نمونه اولیه و انجام واکنش nested-PCR (مرحله اول P1/P7 و مرحله دوم R16F2n/R16R2)، قطعه مورد انتظار در ۲۵ نمونه تکثیر شد (۲۲٪) که از این تعداد، ۱۹ گیاه دارای علایم فایتوپلاسمی و شش گیاه فاقد علایم ظاهری در بوته بودند. با توجه به اینکه غده‌های دختری مورد بررسی از گیاهان مادری رشد کرده در مزرعه بدست آمده بود، احتمالاً تعدادی از آنها آلودگی ویروسی داشتند. چون تفکیک مشاهده‌ای علایم فایتوپلاسمی از علایم ویروسی آسان نیست، امکان خطا در شمارش گیاهان با علایم فایتوپلاسمی محتمل می‌باشد. همچنین، محدودیت‌های رشد گیاهان در گلخانه ممکن است باعث بروز عوارض فیزیولوژیکی در آنها شود که به دلیل دشواری تشخیص این علایم از علایم فایتوپلاسمی، احتمال اشتباه در شمارش بوته‌های مبتلا به فایتوپلاسم دور از ذهن نیست.

در مرحله شناسایی نوع فایتوپلاسمی همراه این ۲۵ نمونه، طی آزمون‌های nested-PCR (مرحله اول P1/P7 و مرحله دوم Solani12F/R)، قطعه ۶۸۰bp مربوط به *Ca. P. solani* در تمامی نمونه‌های مورد بررسی به همراه شاهد مثبت 12CB تکثیر شد. این بوته‌ها از غده‌هایی بدست آمده بودند که در والدین نسل اول خود به فایتوپلاسمی *Ca. P. solani* آلوده بودند و یا آلودگی مخلوط با *Ca. P. trifolii* داشتند. در مقابل، در هیچکدام از نمونه‌های DNA مربوط به بوته‌های نسل دوم طی آزمایشات nested-PCR با TRF6F/TRF6R، قطعه مورد نظر ۵۰۹ bp مربوط به *Ca. P. trifolii* تکثیر نشد که می‌تواند دلیلی بر عدم انتقال *Ca. P. trifolii* از طریق غده



شکل ۵- علایم گیاهان سیب‌زمینی نسل سوم آلوده به *Candidatus phytoplasma solani* در محیط گلخانه: (a) زردی همراه با ارغوانی شدن کم رنگ، (b) برگ‌گستگی ملایم حاشیه برگ‌ها، (c) کم‌رشدی گیاهان همراه با ریزبرگی

Fig 5. The symptoms of third-generation potato plants infected with *Candidatus phytoplasma solani* in a greenhouse environment: (a) yellowing accompanied by a pale purpling, (b) a mild upward curling of leaf margins, and (c) the growth stunting with little leaves

انتظار در بقیه نمونه‌های گیاهی در آزمون nested-PCR با P1/P7 در دور اول و جفت آغازگر های R16F2n/R16R2 و Solani12F/R و TRF6F/R در دور دوم معلوم نمود که دیگر غده‌های مورد آزمایش، عاری از آلودگی به فایتوپلازما هستند. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که امکان حضور فایتوپلازما در گیاهان نسل سوم که

برگ را نشان دادند، ولی نمونه PTW18-1a فاقد علایم فایتوپلاسمایی بود. مقایسه توالی نوکلئوتیدی قطعه تکثیر شده توسط جفت آغازگر Solani12F/R در PTW70-1a (دارای علایم) و PTW18-1a (بدون علایم) نشان داد که آنها در حد ۱۰۰٪ با هم و با توالی PTW80 (نمونه نسل مادری نسل دوم) شباهت دارند. عدم تکثیر باند مورد

فایتوپلاسمای همراه با گیاهان مورد بررسی مشاهده نشد و روی هم رفته نمونه‌های مورد بررسی علائم مشابهی داشتند. احتمالاً عملکرد فیزیولوژیکی یکسان این فایتوپلاسمها در محدود بودن به آوند آبکش، القای فرایندهای انتقال مواد قندی به ویژه سوکروز از برگها به آوندهای آبکش، بلوکه کردن تجزیه نشاسته، تخریب کلروپلاست، افزایش سیتوکینین در زوایای انشعاب برگگی و کاهش سنتز جیبرلین، در شباهت علائم آنها بصورت زردی، ریزبرگی، کاهش رشد و حالت جاروی جادوگر در میزبان (Wei 2022) نقش داشته است. همچنین، توانایی عمومی فایتوپلاسمها در محدود کردن انتقال نشاسته از برگها به غده و در نتیجه تجمع نشاسته در دمبرگها بصورت غده‌های هوایی (Namba 2019) و فعال نمودن مسیر سنتز آنتوسیانین باعث می‌شود که آنها از نظر تولید غده‌های هوایی و ارغوانی شدن حاشیه برگها در بوته‌های سیب‌زمینی علائم مشابهی ایجاد کنند (Bertaccini 2022).

در بررسی ۷۳ نمونه سیب‌زمینی به روش nested-PCR با جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 (مرحله اول) و R16F2n/R16R2 (مرحله دوم)، ۴۷ نمونه مبتلا به عوامل فایتوپلاسمایی تشخیص داده شدند. در تفکیک گروه‌های فایتوپلاسمایی همراه با این نمونه‌ها با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی، مطابق انتظار فایتوپلاسمای *Ca. P. asteris* در آنها ردیابی نشد. در مقابل، شناسایی ۳۵ نمونه آلوده به *Ca. P. solani*، سه نمونه آلوده به *Ca. P. trifolii* و نه نمونه دارای آلودگی مخلوط به *Ca. P. solani* و *Ca. P. trifolii* نشان دهنده غالبیت قابل توجه *Ca. P. solani* در بین نمونه‌های مورد بررسی بود. اگرچه تعیین غلظت عوامل فایتوپلاسمایی در گیاهان آلوده ممکن نیست و به ابزارهای پیشرفته‌ای مانند qPCR نیاز دارد، ولی به لحاظ وجود باندهای ضعیف ۵۰۹ bp تکثیر شده با جفت آغازگر اختصاصی TRF6F/TRF6R

گیاهان والد نسل دوم آنها عاری از آلودگی باشند، متفی است. همچنین، همه غده‌های حاصل از یک گیاه آلوده به *Ca. P. solani* الزاماً ناقل این بیمارگر نیستند.

با احتساب پنج نمونه آلوده از ۸۲ گیاه مورد بررسی، انتقال عوامل فایتوپلاسمایی از گیاهان نسل دوم به گیاهان نسل سوم در حدود ۶٪ برآورد شد که نشانگر کاهش میزان انتقال عوامل فایتوپلاسمایی در نسل سوم در مقایسه با نسل دوم است.

بحث

در استان اصفهان، زردی، کم‌رشدی، لوله‌ای و ارغوانی شدن برگ‌های راس بوته و تولید غده‌های هوایی از شایع‌ترین علائم بیماری‌های فایتوپلاسمایی سیب‌زمینی بشمار می‌روند که دو فایتوپلاسمای *Ca. P. solani* (گروه Stolbur) با غالبیت بیشتر و *Ca. P. trifolii* (گروه Clover proliferation) با فراوانی کمتر به عنوان عوامل اصلی این بیماری‌ها شناخته می‌شوند (Gholami et al. 2020; Hosseini, et al. 2011a, Hosseini, et al. 2011b). طی این پژوهش نیز در بین ۷۳ بوته سیب‌زمینی جمع‌آوری شده با علائم سرارغوانی، استالبور و جارویی شدن، *Ca. P. solani* (گروه Stolbur) با ۴۸٪، *Ca. P. trifolii* (گروه Clover proliferation) با ۱۲٪ و مخلوط این دو فایتوپلاسمای با ۴٪، به عنوان عوامل اصلی بیماری‌های فایتوپلاسمایی مزارع سیب‌زمینی اصفهان و چهار محال و بختیاری شناسایی شدند. اگرچه همراهی فایتوپلاسماهای *Ca. P. asteris*، *Ca. P. aurantifolia* و *Ca. P. americanum* با بیماری سرارغوانی (Lee et al. 2006; Santos-Cervantes et al. 2010) با جاروی جادوگر (Hosseini, et al. 2011a; Khadhair et al. 1997) و *Ca. P. solani* با استالبور (Ember, et al. 2016; Girsova et al. 2011) تایید شده است، ولی در این تحقیق یک همبستگی مشخصی بین علائم بیماری و گروه

2006). احتمالاً به دلیل جمعیت پایین زنجرک‌ها در منطقه و در نتیجه نرخ کم انتقال فایتوپلازما و همچنین غلظت پایین فایتوپلازما در اوایل شهریور، تیترا فایتوپلازما در برگ‌های این ۲۶ بوته در حدی نبود که بتوان آنها را از طریق nested-PCR ردیابی نمود. البته احتمال تشخیص اشتباه علایم فایتوپلازمایی از علایم بیماری‌های ویروسی و عوارض فیزیولوژیکی بوته‌ها را نیز نباید از نظر دور داشت.

تغییرات فیزیولوژیکی میزبان در رابطه متقابل با فایتوپلازما عمدتاً سازگارانه بوده و ضمن اینکه گیاه آسیب جدی نمی‌بیند، فایتوپلازما نیز با جریان شیره نباتی، از طریق عناصر غربالی در آوندهای آبکش به عنوان یک کنج (nich) اکولوژیکی وارد می‌شود (Bertaccini 2022). در عناصر غربالی، ضمن اینکه فایتوپلازما قادر است فشار اسمزی خود را با فشار اسمزی محیط تطبیق دهد، می‌تواند از منابع غنی اسیدهای آمینه، قندهای فسفریله شده و نوکتوتیدهای این ناحیه برای فعالیت‌های فیزیولوژیکی و تکثیر خود استفاده نماید، چون خود آنها فاقد ژن‌های سنتز اسیدهای آمینه، نوکلئوتید و فسفریله کردن قندها هستند (van Bel and Musetti 2019). به این لحاظ، می‌توان فرض نمود که در تکمیل این تعامل سازگارانه فایتوپلازما-سیب زمینی، فایتوپلازما از طریق آوندهای آبکش به غده‌های دختره منتقل شود و با فعالیت در بوته‌های نسل بعدی بقای اکولوژیکی خود را ادامه دهد. با این حال، انتقال فایتوپلازما از طریق غده‌های دختره و نقش آن در اپیدمیولوژی بیماری‌های سرارغوانی، جاروی جادوگر و استالبور، در گذشته چندان جدی در نظر گرفته نمی‌شد (Wright et al. 1983). در مطالعات بعدی، با تایید انتقال بیماری‌های فایتوپلازمایی سرارغوانی، جارویی شدن و استالبور سیب‌زمینی از طریق غده‌های بذری (Crossline, et al. 2011; Ember et al. 2011; Khadhair et al. 2003; Paltrinieri & Bertaccini 2007)، انتشار

در مقایسه با باندهای مترکم ۶۸۰bp فایتوپلازمایی *Ca. P. solani* تکثیر یافته با جفت آغازگر Solani12E/R در اکثر نمونه‌های دارای آلودگی مخلوط، چنین استنباط شد که احتمالاً در این بوته‌ها *Ca. P. trifolii* تیترا و عملکرد پایین‌تری نسبت به *Ca. P. solani* دارد. آلودگی مخلوط فایتوپلازمایی یک اتفاق متداول در میزبان‌های گیاهی است که به دلیل همپوشانی ناقل و میزبان، دو یا چند فایتوپلازما می‌توانند بصورت مخلوط در یک میزبان فعالیت نمایند (Lee et al. 2004). این وضعیت آلودگی مخلوط فایتوپلازمایی در سیب‌زمینی هم رایج است که از آن جمله می‌توان به گزارش‌های آلودگی مخلوط گروه‌های فایتوپلازمایی 16SrI و 16SrII در مکزیک (Leyva-Lopez et al. 2002)، گروه 16SrXII-A با گروه‌های 16SrI یا 16SrIII در روسیه (Girsova et al. 2016)، *Ca. P. asteris* و *Ca. P. fraxini* در کلمبیا (Franco-Lara et al. 2023) و *Ca. P. solani* (16SrXII) با *Ca. P. trifolii* (16SrVI) در ایران (Golami et al. 2011b, Hosseini, et al. 2020) اشاره کرد.

طی فرایند انتخاب بوته‌های سیب‌زمینی دارای علایم فایتوپلازمایی برای تامین غده‌های ناقل فایتوپلازمایی، ۲۶ نمونه واجد علایم فایتوپلازمایی در آزمون‌های nested-PCR بانندی تکثیر نکردند و فاقد فایتوپلازما تشخیص داده شدند. نمونه‌های مزبور یا در مرحله گلدهی و قبل از بزرگ شدن غده‌ها نمونه‌برداری شده بودند و یا متعلق به مناطقی بودند که اصولاً زنجرک‌ها جمعیت زیادی نداشتند. معمولاً تیترا فایتوپلازما در مراحل اولیه و میانی فصل رشد (بهار و اوایل تابستان) میزبان کم و در اواخر مرحله رشد (اواخر تابستان و اوایل پاییز) زیاد است (Wright et al. 2022). از طرف دیگر، گیرش فایتوپلازما از گیاه آلوده توسط زنجرک ناقل، دوره انکوباسیون و انتقال به میزبان، بسته به تیترا پاتوژن و شرایط محیطی، به زمانی طولانی نیازمند است (Weintraub & Beanland

تعداد محدودی از شاخه‌های یک بوته و یا فقدان علایم در بعضی بوته‌های آلوده نشانگر آن است که به دلیل توزیع نامتوازن جمعیت فایتوپلازما در آوندهای آبکش، فایتوپلازما جمعیت کافی برای انتشار در کل سیستم آوندی گیاه را ندارد. بنابراین، انتقال از طریق غده‌های دخترتی، از الگوی پراکنش یکنواختی پیروی نمی‌کند. در این رابطه، ممکن است تیترا کم فایتوپلازما در ریشه و قسمت‌های زیرزمینی در مقایسه با برگ‌های بالایی (Christensen *et al.* 2005) و تکثیر کند فایتوپلازما در شرایط گلخانه‌ای به دلیل کمبود نور، یکنواختی دما در مقایسه با شرایط طبیعی، محدودیت توسعه اندام‌های زیرزمینی و عدم رشد کافی غده‌ها در گلدان، را مانع تکثیر بهینه فایتوپلازما و بروز علایم دانست. از طرف دیگر، محدودیت‌های فیزیولوژیکی حرکت فایتوپلازما در آوندهای آبکشی نیز می‌تواند از دلایل عدم یکنواختی پراکنش فایتوپلازما در قسمت‌های مختلف میزبان باشد.

فایتوپلازماها با جریان شیره گیاهی (mass flow) و از طریق صفحات آبکشی (sieve elements) وارد سلول‌های آبکشی می‌شوند و در طول آوند حرکت می‌کنند. کلنیزه شدن فایتوپلازما در آوندهای آبکش موجب کاهش اندازه منافذ صفحات آبکشی به خاطر تشکیل کالوس (Wei *et al.* 2022) یا ایجاد کمپلکس پروتئینی SERO در آنها می‌شود که در واکنش‌های دفاعی نقش دارد (Pagliari *et al.* 2018). این تغییرات فیزیولوژیکی موجب انسداد آوندهای آبکشی و تضعیف حرکت شیره نباتی می‌شود که محدودیت‌هایی را در انتقال سیستمیک فایتوپلازما در آوندهای آبکش به وجود می‌آورد (Mussetti *et al.* 2013). از طرف دیگر فایتوپلازماها به دلیل اتصال ناپایدار به صفحات آبکشی، ممکن است بطور موقت در مسیر جریان شیره گیاهی قرار نگیرند (van Bel & Musetti 2019). تمام این اتفاقات باعث می‌شود حرکت فایتوپلازما در داخل شیره گیاهی کند

فایتوپلازما به وسیله غده توجه بیشتری را جلب کرد، هر چند در ارزیابی نرخ انتقال فایتوپلازماها به این روش تفاوت‌هایی وجود داشت.

در بررسی حاضر، توانایی انتقال فایتوپلازما از طریق غده‌های دخترتی بوته‌های آلوده سیب‌زمینی به بوته‌های نسل‌های بعدی تایید شد. از ۱۱۱ غده بدست آمده از گیاهان آلوده به فایتوپلازما در مزرعه، ۲۵ غده (۲۲٪) قادر به انتقال *Ca. P. solani* به نسل دوم بودند. احتمالاً تیترا فایتوپلازما در این غده‌ها متفاوت بود، بطوریکه در ۱۹ نمونه علایم کم رشدی، ریزبرگی، زردی یا ارغوانی شدن برگ‌ها در تمام بوته ظاهر گردید که از میان آنها در سه بوته علایم فایتوپلاسمایی در یک یا چند شاخه از گیاه وجود داشت و شاخه‌های دیگر همان بوته ظاهر سالمی داشتند. در شش بوته دیگر علایم فایتوپلاسمایی مشاهده نشد. در بررسی روند انتقال فایتوپلازما به گیاهان نسل سوم نیز از مجموع ۸۲ بوته مورد بررسی، پنج نمونه (۶٪) آلوده به فایتوپلازما تشخیص داده شدند که همه علایم فایتوپلاسمایی داشتند. از نتایج این پژوهش می‌توان استنباط نمود که میزان انتقال فایتوپلازما از بوته‌های نسل اول به نسل‌های بعدی روند نزولی دارد. در تحقیقات سایرین نیز علیرغم تایید انتقال فایتوپلازما از طریق غده‌های دخترتی سیب‌زمینی، نرخ انتقال از طریق غده بین ۶٪ تا ۵۰٪ متغیر بود (Crosslin *et al.* 2011; Ember *et al.* 2011; Khadhair *et al.* 2003). این نتایج نشان می‌دهد که انتقال فایتوپلازما از طریق غده‌های دخترتی بصورت سیستمیک انجام نمی‌گیرد و ممکن است همه غده‌های یک بوته سیب‌زمینی، آلوده به فایتوپلازما نباشند و حتی در صورت آلوده بودن، بوته‌های رشد کرده از این غده‌ها علایم ظاهری نشان ندهند. اگر یک همبستگی منطقی بین تیترا فایتوپلازما و شدت علایم وجود داشته باشد، می‌توان توجیه کرد که حالت‌های مختلف بروز کامل علایم در بعضی بوته‌ها، ظهور علایم در

فایتوپلازما که در گیاهان نسل اول غالبیت داشت، احتمالاً عامل اصلی بیماری‌های فایتوپلازمایی سیب‌زمینی در مزارع استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری می‌باشد، در گیاهان نسل دوم و سوم نیز، *Ca. P. solani* هرچند با یک روند نزولی، تنها عامل فایتوپلازمایی قابل انتقال به غده بود. بنظر می‌رسد، غلظت بالاتر این فایتوپلازما در گیاهان از عوامل اصلی انتقال آن به نسل‌های بعدی باشد. از نتایج بدست‌آمده در این تحقیق، می‌توان چنین استنباط کرد که *Ca. P. solani* عامل اصلی بیماری‌های فایتوپلازمایی سیب‌زمینی در مزارع استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری است که می‌تواند با نرخ کم یا متوسط از طریق غده‌های بذری به نسل‌های بعدی منتقل شود. همین میزان انتقال محدود نیز می‌تواند منبع بسیار مناسبی برای زنجیرک‌ها جهت انتقال این فایتوپلازما و سبب پراکنش و شیوع بیماری استالبور در مزارع سیب‌زمینی باشد.

شود. همچنین، تشخیص مخلوط فایتوپلازماهای فعال و غیر فعال یا مرده در صفحات آبکشی با میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری یا کانفوکال (confocal laser scanning microscopy) نشان داده است که علی‌رغم جمعیت زیاد فایتوپلازما در آوندهای آبکشی ممکن است توانایی عملکرد غشای سیتوپلازمی آنها بر اثر تغییر فشار زیاد شیره گیاهی از بین برود و علی‌رغم حضور در آوند، فعالیتی نداشته باشند (Christensen *et al.* 2004). با در نظر گرفتن تمام این موارد می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ممکن است تیترا فایتوپلازما در گیاه میزبان همیشه در حدی نباشد که بتواند با جمعیت کافی در همه بافت‌های گیاهی و از جمله تمام غده‌های یک بوته سیب‌زمینی حضور فعال پیدا کند تا در نسل‌های بعدی بیماری ظاهر شود. تکثیر فایتوپلازمای *Ca. P. solani* در تعدادی از غده‌های نسل‌های دوم و سوم نشان داد که این

References

- Bertaccini, A. 2022. Plants and phytoplasmas: When bacteria modify plants. *Plants* 11: 1425. doi.org/10.3390/plants11111425
- Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M. and Schulz, A. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Sci.* 10:526-535.
- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M. and Schulz, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 1175-1184.
- Crosslin, J. M., Hamlin, L., Buchman, J. L. and Munyaneza, J. E. 2011. Transmission of potato purple top phytoplasma to potato tubers and daughter plants. *Am. J. Potato Res.* 88: 339-345.
- Deng, S. and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16SrRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J. Microbiol. Methods* 14: 53-61.
- Ember, I., Acs, Z., Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M. and Kolber, M. 2011. Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. *Eur. J. Plant Pathol.* 130: 367-377.
- EPPO. 2024. '*Candidatus* Phytoplasma solani'. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. Available online. <https://gd.eppo.int>.
- Franco-Lara, L., Varela-Correa, C.A., Guerrero-Carranza, G. P. and Quintero-Vargas, J.C. 2023. Association of phytoplasmas with a new disease of potato crops in cundinamarca. *Colombia Crop Prot* 163: 106 123. doi.org/10.1016/j.cropro.2022.106123
- Galetto, L., Marzachi, C., Demichelis, S. and Bosco, D. 2011. Host plant determines the phytoplasma transmission competence of *Empoasca decipiens* (Hemiptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomol.* 104:360-366.
- Gholami, J., Bahar, M. and Talebi, M. 2020. Simultaneous detection and direct identification of

- phytoplasmas in the aster yellows (16SrI), clover proliferation (16SrVI) and stolbur (16SrXII) groups using a multiplex nested PCR assay in potato plants. *Potato Res.* 63:403–415.
- Girsova, N. V., Bottner-Parker, K. D., Bogoutdinov, D. Z., Meshkov, Y. I., Mozhaeva, K. A., Kastalyeva, T. B. and Lee, M. 2016. Diverse phytoplasmas associated with potato stolbur and other related potato diseases in Russia. *Eur. J. Plant Pathol.* 145: 139-153.
- Gundersen, D. E. and Lee, I-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterr.* 35: 144-151.
- Hiruki, C. and Wang, K. 2004. Clover proliferation phytoplasma: *Candidatus Phytoplasma trifolii*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1349-1353.
- Hosseini, P., Bahar, M., G., Madani, M. and Zirak, L. 2011a. Molecular characterization of a phytoplasma associated with potato witches'-broom disease in Iran. *J. Phytopathol.* 159: 120-123.
- Hosseini, P., Bahar, M., Madani, G. and Zirak, L. 2011b. Molecular characterization of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Iran. *J. Phytopathol.* 159: 241-246.
- Khadhair, A. H., Hiruki, C., Hwang, S. F. and Wang, K. 1997. Molecular identification and relatedness of potato witches'-broom phytoplasma isolates from four potato cultivars. *Microbiol Res.* 152:281–286.
- Khadhair, A. H., Duplessis Mcalister, P., Among-Nyarko, K and Bains, P. 2003. Transmission and characterization of phytoplasma diseases associated with infected potato cultivars in Alberta. *Acta Hort.* 619: 167-176. doi:10.17660/actahortic.2003.619.18.
- Khajehali, J., Seyedoleslami, H. and Kamali, K. 2001. A contribution to study of hoppers (Hom. Auchenorrhyncha) of potato fields in Isfahan and Daran. *Appl. Entomol. Phytopath.* 68:43-71. (Abstract in English)
- Lee, I-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bottner, K. D., Marcone, C. and Seemüller, E. 2004. '*Candidatus Phytoplasma asteris*', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int. J. Syst. Evo. Microbiol.* 54: 1037-1048.
- Lee, I-M., Bottner, K. D., Secor, G. and Rivera-Varas, V. 2006. '*Candidatus Phytoplasma americanum*', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1593-1597.
- Leyva-Lopez, N. E., Ochoa-Sanchez, J. C., Leal-Klevezas, D. S. and Martinez-Soriano, J. P. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Can. J. Microbiol.* 48: 1062-1068.
- Mitrovic, M., Jakovljevic, M., Jovic, J., Krstic, O., Kosovac, A., Trivellone, V., Jermini, M., Toševski, I and Cvrkovic, T., 2016. '*Candidatus Phytoplasma solani*' genotypes associated with potato stolbur in Serbia and the role of *Hyalesthes obsoletus* and *Reptalus panzeri* (Hemiptera, Cixiidae) as natural vectors. *Eur. J. Plant Pathol.* 144: 619-630.
- Munyaneza, J. E., Crosslin J. M. and Upton, J. E. 2006. Beet leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) transmits the Columbia Basin potato purple top phytoplasma to potatoes, beets and weeds. *J. Econ. Entomol.* 99: 268–272.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4326.
- Murphy, A. F., Rondon, S. I., Marchosky, R., Buchman, J., and Munyaneza, J. 2014. Evaluation of beet leafhopper transmitted virescence agent damage in the Columbia Basin. *Amer. J. Potato Res.* 91: 101-108.
- Musetti, R., Buxa, S.V., De Marco, F., Loschi, A., Polizzotto, R., Kogel, K. H., van Bel, A. J. 2013. Phytoplasma-triggered Ca²⁺ influx is involved in sieve-tube blockage. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26: 379-386.
- Nagaich, B. B. and Giri, B. K. 1973. Purple top roll disease of potato. *Amer. Potato J.* 50: 79 –85.
- Namba, S. 2019. Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 95: 401–418.
- Paltrinieri, S. and Bertaccini, A. 2007. Detection of phytoplasmas in plantlets grown from different batches of seed-potatoes. *Bull. Insectol.* 60: 379–380.
- Pagliari, L., Buoso, S., Santi, S., van Bel, A. J. E. and Musetti, R. 2018. What slows down phytoplasma proliferation? Speculations on the involvement of AtSEOR2 protein in plant defence signalling. *Plant*

- Signaling & Behavior 13, e1473666.
- Rinklef, A., Behrmann, S. C., Löffler, D., Erner, J., Meyer, M.V., Lang, C., Vilcinskas, A. and Lee, K.-Z. 2024. Prevalence in potato of ‘*Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ and their transmission via adult pentastiridius leporinus. *Insects*.15: 275. doi: 10.3390/insects15040275
- Santos-Cervantes, M. E., Chávez-Medina, J. A., Acosta-Pardini, J., Flores-Zamora, G. L., Méndez-Lozano, J. and Leyva-López, N. E. 2010. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. *Plant Dis.* 94:388-395.
- 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: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Vol. 2. S. Razin and J. G. Tully (Eds.). Academic Press, New York.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E. and Kirkpatrick, B. C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2988-2993.
- Vali Sichani, F., Bahar, M. and Zirak, L. 2014. Characterization of phytoplasmas related to aster yellows group infecting annual plants in Iran based on 16SrRNA and *rp* genes studies. *J. Plant Prot. Res.* 54: 1-8
- van Bel, A. J. E. and Musetti, R. 2019. Sieve element biology provides leads for research on phytoplasma lifestyle in plant hosts. *J Exp Bot.* 70:3737-3755.
- Wei, W., Inaba, J., Zhao, Y., Mowery, J. D. and Hammond, R. 2022. Phytoplasma infection blocks starch breakdown and triggers chloroplast degradation, leading to premature leaf senescence, sucrose reallocation, and spatiotemporal redistribution of phytohormones. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1810. doi.org/10.3390/ijms23031810 18
- Weintraub, P.G. and Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 91–111.
- Wright, A.A., Shires, M., Molnar, C., Bishop, G., Johnson, A., Frias, C. and Harper, S. J. 2022. Titer and distribution of *Candidatus phytoplasma pruni* in *Prunus avium*. *Phytopathology* 112: 1406-1412.
- Wright, N.S., Raine, J. and Valenta, V. 1983 *Mycoplasmas*. pp. 91-93 in: *Compendium of Potato Diseases*. Hooker, W.J (Ed). American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.