بررسی مناطق مرکبات‌خیز جنوب ایران از نظر وجود بیماری میوه سبز و ناقل آن*

DISTRIBUTION OF CITRUS HUANGLONGBING DISEASE AND ITS VECTOR IN SOUTHERN IRAN

محمد صالحی[۱**]، محمد مهدی فقیهی[۲]، امین خوانچه‌زر[۳]، عبدالنبی باقری[۲] و کرامت‌اله ایزدپناه[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۲/۲۷؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۱۱/۱۲)

چکیده

بیماری میوه سبز مرکبات یا هوانگ لونگ بینگ (HLB) پیشتر از جنوب ایران گزارش شده است. بررسی‌هایی در زمینه پراکنش بیماری و ناقل آن در مناطق مرکبات کاری جنوب کشور انجام شد که نتایج حاصل از آنها در مقاله حاضر ارایه می‌شود. پسیل آسیایی مرکبات (*Diaphorina citri*) در تمامی مناطق مورد بازدید در استان‌های سیستان- بلوچستان، هرمزگان و کرمان و شهرستان‌های داراب و لار در استان فارس از روی درختان مرکبات جمع‌آوری شد. در آزمون‌های پی سی آر مستقیم و دو مرحله‌ای اختصاصی نوع آسیایی عامل بیماری میوه سبز، ازبین ۱۴۰ نمونه پسیل جمع‌آوری شده از استان‌های سیستان- بلوچستان و هرمزگان ۱۰۳ نمونه مثبت ارزیابی شدند. با استفاده از همین آزمون‌ها ۲۲ اصله درخت پرتقال والنسیا، دو نمونه پرتقال محلی، یک نمونه نارنگی از نیکشهر و سرباز (سیستان- بلوچستان) و ۱۶ اصله درخت پرتقال والنسیا از سندرک و رودان (استان هرمزگان) آلوده ارزیابی شدند. تعیین ترادف محصول پی سی آر دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای طراحی شده از روی ژن *opm* (۹۰۹ جفت باز) در دو نمونه پرتقال والنسیا از سیستان- بلوچستان و هرمزگان نشان داد که در صد همسانی قطعات تعیین ترادف شده (به‌ترتیب رس شمارهای **HQ267229 و **HQ267230** در بانک ژن) با یکدیگر ۹۹/۸٪ و با قطعه مشابه ژن *opm* باکتری ***Ca.* Liberibacter asiaticus**، ۱۰۰-۹۹/۵٪ است. آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از قطعه تعیین ترادف شده نیز وجود نوع آسیایی بیماری میوه سبز درایران را تأیید کرد. پیوند یک نمونه پرتقال والنسیای دارای علائم بیماری در نیکشهر روی نهال‌های سالم گریپ فروت و پرتقال والنسیا موجب ظهور علائم پیسک لکه‌ای(اختصاصی بیماری میوه سبز) شد. وجود پسیل آسیایی مرکبات برای اولین‌بار از استان فارس گزارش می‌شود. براساس علائم بیماری، انتقال با پیوند، ردیابی باکتری عامل بیماری در پسیل مرکبات و درختان پرتقال و نارنگی دارای علایم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و نیز شباهت قطعه تعیین ترادف شده با قطعه مشابه از باکتری نوع آسیایی، نوع آسیایی بیماری میوه سبز در استان‌های سیستان- بلوچستان و هرمزگان به‌طور گسترده وجود دارد.**

واژه‌های کلیدی: مرکبات، هوانگ لونگ بینگ، میوه سبز مرکبات، لکه سبز مرکبات، ***Ca.* L *.asiaticus***، پسیل مرکبات، جنوب ایران، بیماری‌های مرکبات

---

*: بخشی از طرح تحقیقاتی بررسی مناطق مرکبات‌خیز جنوب ایران از نظر وجود بیماری لکه سبز، سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی

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

۱. استادیار پژوهشی بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

۲. به‌ترتیب مربیان پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان

۳. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مقدمه

بیماری هوانگ لونگ بینگ (huanglongbing, HLB) یا greening با نام ایرانی میوه سبز یا لکه سبز که برای اولین بار در سال ۱۹۱۹ میلادی از مناطق مرکبات‌خیز جنوب چین گزارش گردید در حال حاضر یکی از عوامل محدودکننده تولید مرکبات در بسیاری از نقاط مرکبات‌خیز آسیا و افریقا می‌باشد(Bové 2006, DaGraca and Korsten 2004,). این بیماری اخیراً از برزیل (Coletta-Filho *et al*. 2004, 2005 a, b Teixeira)، کالیفرنیا در ایالات متحده آمریکا (Halbert 2005) و کوبا (Luis Panja *et al.* 2008) نیز گزارش شده است. در کشورهای یاد شده میوه سبز مهم‌ترین بیماری برای پرتقال، نارنگی و گریپ فروت محسوب می‌شود. درختان آلوده معمولاً ۳ تا ۵ سال پس از شروع آلودگی دچار زوال و غیراقتصادی می‌شوند. براساس گزارش‌های موجود تا به حال ده‌ها میلیون درخت مرکبات به این بیماری آلوده شده و ازبین رفته‌اند (Bové 2006, DaGraca and Korsten 2004).

براساس حساسیت به دما (Bové *et al.* 1974)، خصوصیات سرولوژیکی(Garnier *et al*. 1991) و مولکولی، شامل هیبریداسیون دی ان ا و آنالیز ژن آر ان ای ریبوزومی S ۱۶ (Villechanoux *et al.* 1992, 1993) پیشتر دو گونه باکتری از جنس پیشنهادی *Candidatus* Liberibacter به عنوان باکتری همراه بیماری میوه سبز گزارش شده بود که گونه *Ca*. L. asiaticus در آسیا، برزیل، کوبا و ایالات متحده آمریکا و گونه *Ca*. L. africanus در آفریقا وجود دارد. اخیراً براساس مقایسه ترادف ژن ار ان ای ریبوزومی S ۱۶ و ناحیه بین ژن‌های ار ان ای ریبوزومی S ۱۶ و S ۲۳، گونه جدید *Ca*. L. americanus از برزیل گزارش شده است (Teixeira *et al.* 2005 a, b, c, d). باکتری‌های همراه با بیماری میوه سبز محدود به اوند آبکشی میزبان (Lafleche & Bove 1970)، گرم منفی (Garnier *et al*. 1984) و متعلق به رده α- Proteobacteria (Jagoueix *et al.* 1994) می‌باشند. دو گونه پسیل *Diaphorina citri* Del Guercio و *Trioza erytreae* Yamakuya به‌ترتیب ناقل طبیعی نوع آسیایی و آفریقایی باکتری‌های عامل میوه سبز می‌باشند (McClean *et al*. 1965,Capoor *et al.* 1967,Halbert & Manjunath 2004). در شرایط آزمایشگاهی ناقل نوع آسیایی قادر به انتقال نوع آفریقایی و ناقل نوع آفریقایی قادر به انتقال نوع آسیایی می‌باشد (Bové 2006). خصوصیات انتقال مانند روش پایا و تکثیری در شته‌ها است. با *T. erytreae* انتقال عمودی نیز گزارش شده است (Halbert & Manjunath 2004). براساس مشاهدات در شرایط طبیعی و مطالعات آزمایشگاهی نوع آسیایی و ناقل آن به دماهای بالاتر از ۳۰° C متحمل ولی نوع آفریقایی و ناقل آن به دماهای بالا تر از ۳۰° C حساس می باشند(Bové *et al*. 1974).

نوع امریکایی نیز مانند نوع آفریقایی به دماهای بالاتر از ۳۰° C حساس می‌باشد (Lopes *et al*. 2009). باکتری‌های عامل میوه سبز با پیوند قابل انتقال می‌باشند (Bové *et al*. 1996). میزان انتقال با پیوند، به قسمتی از درخت مورد نظر که از آن پیوندک تهیه می‌شود، نوع پیوندک و اندازه آن، تعداد پیوندک مورد استفاده روی پایه، نحوه پیوندزنی و جدایه بیمارگر بستگی دارد (van Vurren 1993). انواع مختلف میوه سبز با سس (*Cuscuta* spp.) نیز قابل انتقال به پروانش می‌باشند (Garnier & Bové 1983). در یک بررسی، براساس ردیابی با آزمون PCR بذر برد بودن *Ca*. L. *asiaticus* گزارش شده است (Zhou *et al*. 2008) ولی با توجه به

عدم ظهور علایم بارز بیماری در دانهال‌های حاصل از کشت این بذور، تا به حال انتقال بذری عامل بیماری تأیید نشده است.

همه گونه‌های تیره Rutaceae و ارقام آنها میزبان‌های طبیعی گونه‌های جنس *Ca.* Liberibacter می‌باشند ولی حساسیت آنها یکسان نیست. انواع پرتقال (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) و نارنگی (*C. reticulata* Blanco) بسیارحساس، نارنج (*C. aurantium* L.)، گریپ فروت (*C. paradisi* Macf.) و لمون‌ها (*C. limon* (L.) Burm. F) از نظر حساسیت متوسط و لیمو ترش(*C. aurantifolia*(Christm.) Swing.)، نارنج سه برگچه‌ای (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) و بتابی (*C. maxima* (Burm.) Merr.) متحمل می‌باشند. کامکوات (Kumquat) نیز به بیماری میوه سبز حساس است (DaGraca 1991, Halbert & Manjunath 2004). درخارج از تیره Rutaceae، سس (*Cuscuta campestris* Yank.)، پروانش (*Catharanthus roseous* (L.) G. Don.) و توتون(*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) میزبان عامل میوه سبز می‌باشند (Garnier & Bové 1993). در حال حاضر تشخیص و ردیابی بیماری میوه سبز براساس مشاهده علایم بیماری و تأیید وجود باکتری عامل آن با آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز(PCR) می‌باشد. علایم بیماری اختصاصی نیستند و با علایم کمبود ریز مغذی‌هایی مانند روی و بعضی از بیماری‌های مرکبات مانند استابورن اشتباه می‌شوند. به‌طورکلی درختان دارای زردی شاخه با برگ‌های دارای علایم پیسک لکه‌ای (Blotchy mottle) و میوه‌های کوچک با علایم بدشکلی و عدم تقارن، رنگ‌گیری معکوس و دارای بذور چروکیده، پوک و عقیم مشکوک به آلودگی به بیماری میوه سبز می‌باشند.

برای اطمینان باید واکنش چنین درختانی در پی سی آر ارزیابی شود (Bové 2006). تا به حال از دو سیستم پی سی آر استفاده شده است. سیستم اول براساس تکثیر یک قطعه ۱۱۶۰ جفت بازی از ژن ار ان ای ریبوزومی S ۱۶ می‌باشد. برای تکثیر این قطعه درمورد نوع آسیایی از جفت آغازگر OI1/OI2c و درمورد نوع آفریقایی از جفت آغازگر OA1/OI2c استفاده می‌شود. در مناطقی که هر دونوع وجود دارند از OI1+OA1 به‌عنوان آغازگر پیش سو و از OL2c به عنوان آغازگر پس سو استفاده می‌شود(Jagouix *et al*. 1996). دی ان ای ریبوزومی S ۱۶ فرم آسیایی یک جایگاه برشی برای آنزیم *Xba*I دارد و نتیجه هضم با این آنزیم تشکیل قطعات ۵۲۰ و ۶۴۰ کیلو جفت بازی است.

در نوع آفریقایی در همین قسمت دو جایگاه برشی برای آنزیم *Xba*1 وجود دارد و نتیجه هضم آن تشکیل سه قطعه با اندازه‌های ۵۲۰، ۵۰۶ و ۱۳۰ جفت‌بازی می‌باشد. GB1/GB3 جفت آغازگر اختصاصی نوع آمریکایی بوده و با آن یک قطعه ۱۰۲۷ جفت‌بازی از ژن ار ان ای ریبوزومی S ۱۶ تکثیر می‌شود (Teixeira *et al*. 2005d). سیستم دوم براساس ترادف خوشه ژنی rpLKAJ - rpoBc است. ترادف بین ژن‌های rplA و rplJ در نوع آسیایی ۳۴ جفت باز بزرگ‌تر از همین فاصله درنوع آفریقایی است. با آغازگر پیش سوی A2 که به ژن rplA متصل می‌شود و اغازگر پس سوی J5 که به ژن rplJ اتصال می‌یابد در گونه آسیایی قطعه‌ای با اندازه ۷۰۱جفت باز و در گونه آفریقایی قطعه‌ای با اندازه ۶۶۷ جفت باز تکثیر می‌شود. با هر دونمونه و با استفاده از این جفت آغازگر در ژل آگاروز هر دو باند مشاهده می‌شوند. از خوشه ژنی rpoBc-rpLKAJ به عنوان کاوشگر و روش‌های هیبریداسیون دی ان ا نیز برای تشخیص اختصاصی دو نوع آسیایی و آفریقایی در

درختان و پسیل مرکبات استفاده گردیده است (Villechanoux *et al*. 1992., Planet *et al*. 1995). از نموده‌سازی بیولوژیکی نیز برای تشخیص بیماری میوه سبز استفاده می‌شود. در این مورد از ارقام پرتقال(ترجیحاً ارقام Pineapple، Madam Vinus و Hamlin) و تانجلو (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macf., tangelo) به عنوان گیاه آزمون استفاده شده است. با توجه به گزارش پسیل آسیایی مرکبات، ناقل نوع آسیایی بیماری میوه سبز در یک نقطه از شهرستان چابهار در سال ۱۹۹۷ (Bové *et al*. 2000) و شیوع بعدی این آفت در سایر نقاط این استان و استان هرمزگان و هم‌چنین وجود این بیماری در عربستان و پاکستان در همسایگی ایران، وجود این بیماری در ایران محتمل به نظر می‌رسید. اخیراً گزارش‌های مقدماتی در مورد وجود عامل بیماری میوه سبز منتشر شده است(Faghihi *et al*. 2009, Mohkami *et al*. 2011). به دلیل اهمیت بیماری و اینکه تأخیر در شناسایی بیماری ممکن است پیامدهای ناگواری داشته باشد طرحی تحت عنوان بررسی مناطق مرکبات‌خیز جنوب ایران از نظر وجود بیماری لکه سبز مرکبات به اجرا درآمد. گزارش حاضر نتایج به‌دست آمده از اجرای این طرح می‌باشد.

روش بررسی

نمونه‌برداری

به منظور جمع‌آوری نمونه‌های مرکبات مظنون به آلودگی به بیماری میوه سبز و پسیل، طی سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ از مناطق مرکبات کاری استان هرمزگان[جاسک(سورگلم، سدیچ، کوئیک، جاسک کهنه)، سیریک(سرزه، مهمانی، بمانی، تلنگ)، سندرک (چاهنان، داوری، پوم، چراک، سرنی)، میناب (حاجی خادمی، راونگ، هشتبندی، چاه شریف، توکهور، چراغ‌آباد، جغین)، سیاهو (فورخورج، بنگلایان)، رودان (دهبارز، سرجوئیه، خراجی، برنطین، بندملا، شه نظری، بیکاه، خیرآباد، زیارتعلی، رهدار، رودخانه بر، نازدشت، حسین آباد، چیرم آباد)]، استان سیستان- بلوچستان(نیک شهر ، قصر قند و سرباز)، استان کرمان (شرکت کشت و صنعت جیرفت، بارگاه، کهنوج، کهور ،رئیس عباس، رضاآباد، کلاب صوفیان،کریم آباد، جهاد آباد و نور آباد) و استان فارس (لار، داراب، گراش، جهرم، کازرون، ممسنی و فیروزآباد) بازدید به‌عمل آمد. مناطق مورد بازدید در درجه اول از نظر آلودگی به پسیل بر رسی شدند. از دستگاه دی- وک (D-Vac) برای جمع‌آوری پسیل استفاده گردید. باغ‌هایی که آلودگی آنها به پسیل شدید بود برای ردیابی عامل بیماری در بدن پسیل و درختان مرکبات انتخاب شدند. در باغ‌های انتخابی از درختان پرتقال و نارنگی که دارای علائم مشکوک به‌ویژه پیسک لکه‌ای و میوه‌های ریز و بد شکل با لکه‌های سبز درقسمت گلگاه بودند نمونه‌برداری به‌عمل آمد. از هر درخت مشکوک سه شاخه کوچک حد اقل دارای ۱۰ برگ علایم‌دار جدا شد و به عنوان نمونه روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. دمبرگ و رگبرگ اصلی هر نمونه با یک تیغ استریل جدا گردید و پس از پودر کردن در ازت مایع تا زمان استخراج دی. ان. ا (DNA) برای انجام پی سی آر در لوله‌های اپندورف در C ° ۲۰- نگه‌داری شد. نمونه‌های پسیل نیز تا قبل از استخراج دی ان ای کل در در C ° ۲۰- نگهداری شدند.

پیوند نمونه‌های مشکوک روی درختان معرف(نموده‌سازی بیولوژیکی)

در چند مورد از نموده‌سازی بیولوژیکی برای اثبات قابلیت

انتقال و تشخیص بیماری استفاده گردید. از شاخه‌های کوتاه و ظریف درختان دارای علایم بیماری میوه سبز به عنوان پیوندک و از نهال‌های دو ساله والنسیا و گریپ فروت به عنوان پایه استفاده گردید. از ۵ درخت پرتقال والنسیای دارای علایم در منطقه سرباز(استان سیستان- بلوچستان) پیوندک تهیه و به روش جانبی روی ۲۰ نهال والنسیا و گریپ فروت (هرنهال ۳ پیوندک) پیوند شد. برای حفظ رطوبت و گیرایی بهتر قسمت‌های پیوند شده برای دوهفته در کیسه پلاستیکی قرار داده شد.

ردیابی *Ca.* Liberibacter spp. در گیاهان مشکوک و بدن پسیل مرکبات با استفاده از PCR

الف) استخراج دی ان ای کل از گیاه

استخراج دی ان ا با روش *یی و همکاران* (Yi *et al*. 1999) و *دینگ و همکاران*(Ding *et al*. 2004) با اندکی تغییر انجام گردید. به هر نمونه(۰/۳ گرم بافت رگبرگ میانی و یا دمبرگ پودر شده در ازت مایع) در لوله اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری، ۸۰۰ میکرولیتر بافر حاوی CTAB (100mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA, 2% CTAB)، با دمای ۶۵°C-۶۰ اضافه و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۰° C قرار داده شد. به هر لوله ۶۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت حجمی ۲۴ به ۱) اضافه و در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شد. رونشین هر لوله به یک لوله اپندورف جدید منتقل و پس از اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول با دمای ۲۰° C- به لوله‌ها، ۳۰ دقیقه در فریزر در ۲۰° C- نگهداری شد. سپس محتوای لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و پس از سه بار شستشوی رسوب حاصل با الکل ۷۰ درصد، خشک کردن و حل کردن آن در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل از آن به عنوان دی ان ای قالب درآزمون پی سی آر استفاده گردید.

ب) استخراج دی ان ای کل از بدن پسیل

استخراج دی ان ای کل از بدن پسیل مرکبات با بهره‌گیری از روش *دبارو و همکاران*(De Barro *et al*. 1995) و *هونگ و همکاران* (Hung *et al*. 2004) با تغییراتی انجام گردید. حشرات مورد آزمایش در دسته‌های ۵ تایی در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (بافرCTAB با ترکیب بالا) و ۲۰ واحد Proteinase K قرار داده و با یک سرسمپلر ریز با سایش به جدار لوله له شدند. پس از ۳ ساعت نگهداری لوله‌ها در ۵۰° C-، ابتدا با افزودن یک حجم مخلوط فنول- کلروفرم- ایزوامیل الکل (به نسبت۲۵: ۲۴: ۱)و سپس با استفاده از کلروفرم- ایزوامیل الکل به نسبت ۱:۲۴، دی ان ای کل پروتئین‌زدایی و استخراج گردید. در آخر پس از افزودن ۲/۵ حجم اتانول ۹۶٪ به فاز رویی، مخلوط نمودن و قرار دادن لوله‌ها در ۲۰° C-، اسیدهای نوکلئیک با سانتریفوژ رسوب داده شده و رسوب حاصل در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و از آن به عنوان دی ان ای قالب در PCR استفاده گردید.

پ) انتخاب آغازگر و انجام پی سی آر

جفت آغازگرهای OI1/OI2c (Jagoueix *et al*. 1996)، F1/R1 (Ding *et al*. 2005)، (Jagoueix *et al*. 1996) A2/J5 و libEF/ libER (این تحقیق) برای ردیابی *Ca.* Liberibacter spp در نمونه‌های گیاهی و پسیل مرکبات با آزمون پی سی آر مستقیم و سه آزمون PCR دو مرحله‌ای به کار برده شدند. در آزمون اول PCR دو مرحله‌ای جفت آغازگرهای F1/R1 ((دور اول) و

F2/R2 (Ding *et al.*, 2005) (دور دوم)، در آزمون دوم جفت آغازگرهای OI1/OI2c (دور اول) و CGO3F/CGO5R Zhou *et al.*, 2007) (دور دوم) و در آزمون سوم جفت آغازگرهایlibEF/ libER و libIF/ libIR(تحقیق حاضر) مورد استفاده قرار گرفتند. در آزمون‌های پی سی آر دو مرحله‌ای محصول پی سی آر در دور اول با آب مقطر سترون ۳۰ بار رقیق گردید و از آن به عنوان دی ان ای قالب در دور دوم استفاده شد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمون‌هایPCR در جدول ۱ ذکر شده است.

ت) آزمون‌های مستقیم و دو مرحله‌ای پی سی آر

پی سی آر در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۰۰ نانوگرم دی ان ا ، مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت نهائی ۰/۲ میلی‌مولار، آغازگرها با غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار برای هر آغازگر، ۵ میکرولیتر بافر PCR، MgCl2 با غلظت نهائی ۱/۵ میلی‌مولار، آنزیم پلی مراز تک (سیناژن، ایران) به مقدار ۲/۵ واحد و آب دوبار تقطیر شده استریل تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید. پس از اضافه کردن ۳۰ میکرولیتر روغن معدنی به لوله‌های واکنش، لوله‌ها در دستگاه PCR قرار داده شدند. چرخه دمایی واکنش شامل ۳ دقیقه در°C ۹۴ برای واسرشته کردن ابتدایی و۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در°C ۹۴ برای واسرشته کردن، ۳۰ ثانیه در°C ۵۵ برای اتصال آغازگر و ۱ دقیقه در°C۷۲ برای ساختن دی ان ا انجام گرفت. در آخر برای افزایش طول قطعه‌های دی ان ا ، لوله‌ها ۱۰ دقیقه در °C۷۲ نگهداری شدند. سی و پنج چرخه دمایی مرحله دوم آزمون دو مرحله‌ای پی سی آر شامل ۳۰ ثانیه در°C ۹۴ برای واسرشته کردن (۳ دقیقه در °C ۹۵ برای واسرشته کردن ابتدایی)، ۳۰ ثانیه در°C۳ ۵ برای اتصال آغازگر (°C ۵۶ برای جفت آغازگرF2/R2)، ۱ دقیقه در °C۷۲ برای ساختن دی ان ا و در آخر ۱۰ دقیقه در°C ۷۲ بود. محصول PCR در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید از باندهای حاصل عکسبرداری شد. در کلیه آزمون‌های PCR از آب و گیاه سالم به‌عنوان شاهدهای منفی استفاده شد.

همسانه‌سازی، تعیین ترادف و تجزیه و تحلیل ترادف‌ها

محصول پی سی آر دو مرحله‌ای (۹۰۹ جفت باز با دو جفت آغازگر libEF/ libER و libIF/ libIR) از دو جدایه پرتقال والنسیای هرمزگان و سیستان- بلوچستان با استفاده از کیت InsT/Aclone PCR product Cloning Kit (Fermentas, Lithuania) و دستورالعمل شرکت مزبور در پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی و به جدایه DH5α باکتری *Echerichia coli* وارد شد. متعاقب رشد باکتری حامل همسانه، پلاسمید نوترکیب جدا و خالص‌سازی شد (Sambrook *et al.* 1989 Holmes & Guigley 1981,) و برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (سئول، کره جنوبی) ارسال گردید. ترادف‌های به‌دست آمده با استفاده از برنامه بلاست(BLAST) با ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه و نزدیک‌ترین ترادف با عامل بیماری میوه سبز مرکبات در ایران جستجو شد. از ترادف‌های باکتری‌های عامل بیماری میوه سبز در بانک ژن ۹ ترادف مورد استفاده قرار گرفتند و سپس به کمک نرم‌افزار DNAMAN دندروگرام مربوطه رسم گردید. ترادف باکتری *Burcella melitensis* به عنوان outgroup به‌کار برده شد.

جدول۱. ترادف، موقعیت درژنوم و اختصاصیت آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

Table 1. Nucleotide sequences, targeted genomic loci and strain specificity of primers used in polymerase chain reaction(PCR)

Primers	Nucleotide sequence (5′3′)(forward reverse)	Target	Amplicon size (bp)	Specificity
OI1	GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA	16S rRNA	1160	*Ca*. L. asiaticus *Ca*. L. africanus *Ca*. L. americanus
OI2c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT			
F1	TGAATTCTTCGAGGTTGGTGAGC	rpLKAJ-rpoBc	535	*Ca*. L. asiaticus
R1	AGAATTCGACTTAATCCCCACCT			
F2	GCGTTCATGTAGAAGTTGTG	rpLKAJ-rpoBc	400	*Ca*. L. asiaticus
R2	CCTACAGGTGGCTGACTCAT			
A2	TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT	rpLKAJ - rpoBc	700 650	*Ca*. L. asiaticus *Ca*. L. africanus
J5	ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA			
CGO3F	RGG GAA AGA TTT TAT TGG AG	16S rRNA	800	*Ca*. L. asiaticus
CGO5R	GAA AAT AYC ATC TCT GAT ATC GT			
libER	ACG CCG AAT TAC AGA ATC ATA C	omp	1132	*Ca*. L. asiaticus
libEF	TTC GCA GAA TTA AAA GGT TGT TA			
libIR	TTC TCG TCT TTA CCC GAA C	omp	909	*Ca*. L. asiaticus
libIF	TAT GGG TCA AAT ACA TCT A			

نتایج

وجود پسیل و علایم بیماری میوه سبز

در کلیه نقاط مورد بازدید یک گونه پسیل به اضافه تعدادی حشرات دیگر با استفاده از مکنده دی- وک از روی درختان مرکبات جمع‌آوری گردید. پسیل به‌دست آمده پسیل آسیایی مرکبات (*Diaphorina citri*)، ناقل نوع آسیایی عامل میوه سبز مرکبات، تشخیص داده شد. در هیچ نقطه گونه *Trioza erytreae* که ناقل نوع آفریقایی عامل میوه سبز مرکبات است مشاهده نگردید. پسیل آسیایی مرکبات روی لیموترش در بسیاری از مناطق مذکور خسارت قابل توجهی وارد کرده بود(شکل ۱) و در ظاهر لیموترش در مقایسه با پرتقال، نارنگی و سایر ارقام و گونه‌های مرکبات میزبان ترجیحی این پسیل بود. با این حال پسیل مذکور در برخی مناطق به وفور از روی پرتقال و نارنگی که نشانه‌های خسارت شدید روی آنها وجود داشت جمع‌آوری شد.

شکل۱. آلودگی شدید یک درخت لیمو ترش در رودان به پسیل آسیایی مرکبات

Fig. 1. Heavy infestation of a lime tree with *Diaphorina citri in* Roodan (Hormozgan).

در مناطق نیکشهر، سرباز، سندرک و رودان علایمی شبیه به علایم بیماری میوه سبز شامل شاخه زردی، راست ایستادن، پیسک لکه‌ای و بد شکلی برگ‌ها، سبز باقی ماندن قسمت گلگاه و تیرگی و عقیمی بذر در میوه، ریزش برگ و میوه و سرخشکیدگی دیده شد(شکل‌های ۲ و ۳A). در مناطق جیرفت و کهنوج نیز علاوه بر پسیل مرکبات در درختان پرتقال والنسیا و محلی، لیمو ترش و نارنگی علایمی شامل زردی، حالت موزائیک، چرمی شدن، قاشقی شدن و علایم کمبود روی و ریزش قبل از موقع برگ‌ها، به گل رفتن خارج از فصل و تشکیل میوه‌های ریز و بدشکل با پوست سبز کمرنگ و بذور پوک و تیره مشاهده گردید. از ۵ پرتقال والنسیای دارای علایم میوه سبز در سرباز پیوندک تهیه و روی نهال‌های پرتقال و گریپ فروت به عنوان گیاهان محک پیوند شد. حدود یک سال بعد ازپیوند، علائم پیسک لکه‌ای و زردی شاخه در یک نمونه گریپ فروت و یک نمونه والنسیا ظاهر شد(شکل۳B).

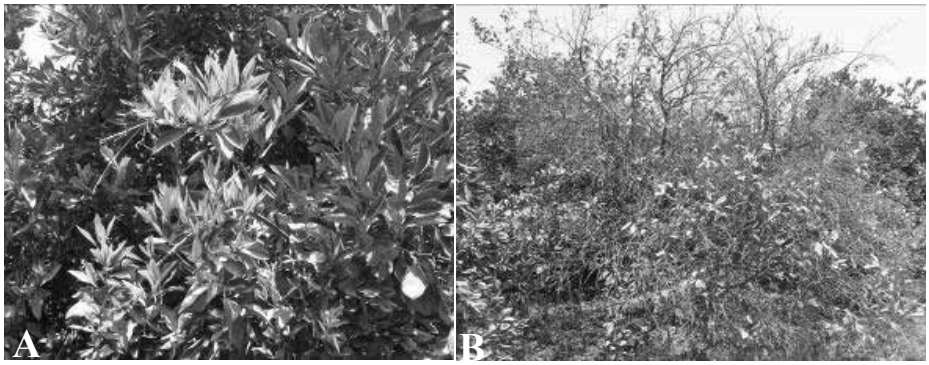
ردیابی عامل بیماری میوه سبز با آزمون PCR

الف) در بدن پسیل

در سال ۱۳۸۶ نمونه‌های پسیل جمع‌آوری شده از مناطق مورد بازدید در آزمون پی سی آر مستقیم با جفت آغازگر F1/R1 وآزمون پی سی آر دو مرحله‌ای با جفت اغازگرهای F1/R1 (دور اول) و F2/R2 (دور دوم) از نظر آلودگی به نوع آسیایی عامل بیماری میوه سبز ارزیابی شدند. در آزمون پی سی آر دو مرحله‌ای ازبین ۱۴۰ نمونه پسیل جمع‌آوری شده در سندرک، رودان و قصر قند در ۱۰۳ نمونه که شامل حدود ۷۵ درصد نمونه‌های مورد بر رسی می‌باشد قطعه‌ای با اندازه ۴۰۰ جفت باز تکثیر شد (شکل۴B و جدول ۲). در صد آلودگی در چند ماه از سال ۱۳۶۸ که درآنها نمونه‌برداری به‌عمل آمد متفاوت و از ۸۲/۵ درصد در اسفند ماه تا ۴۰ درصد در شهریور ماه متغیر بود.

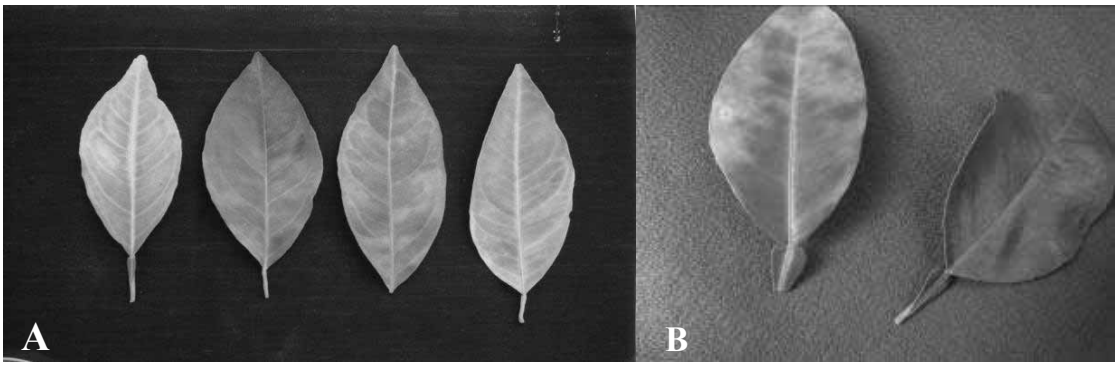
ب) در مرکبات

در آزمون‌های پس سی آر که با جفت آغازگرهای OI1/OI2c، A2/J5، F1/R1 ، F2/R2، و CGO3F/ CGO5R، libEF/ libER و libIF/ libIR و با نمونه‌های دی ان ای کل مرکبات مظنون به آلودگی انجام شد. به‌وسیله پی سی آر مستقیم با استفاده از جفت آغازگر A2/J5 در ۶ درخت از ۱۰ درخت پرتقال مظنون در منطقه سرباز قطعه‌ای با اندازه



شکل ۲. علائم شبیه هوانگ لونگ بینگ در پرتقال والنسیا در رودان. A: زردی شاخه و راست ایستادن برگ‌ها. B: ریـزش بـرگ و میـوه و سرخشکیدگی.

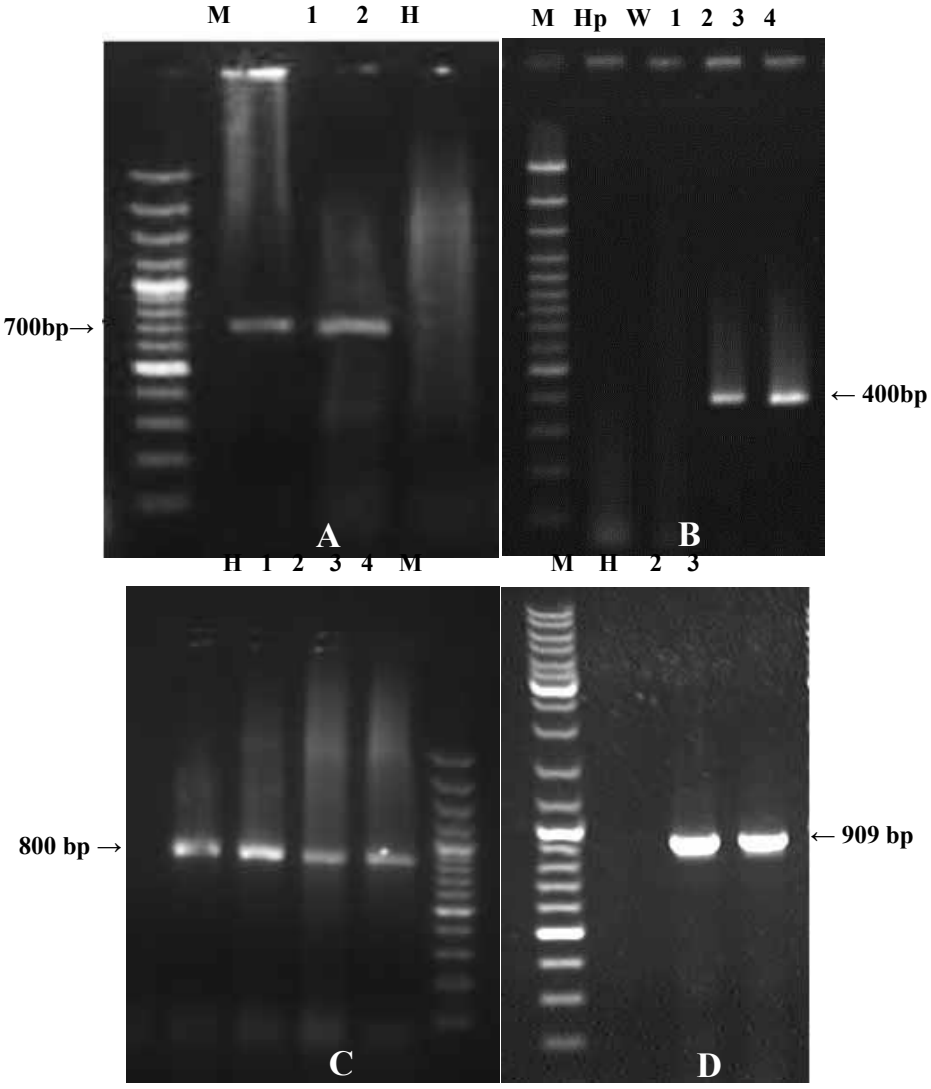
Fig. 2. Huanglongbing - like symptoms in sweet orange in Roodan. A: Yellow shoot and upright growth of leaves. B: Defoliation of shoots and twig dieback.



شکل۳. علائم بیماری میوه سبز در برگ‌های مرکبات. A: علائم زردی و پیسک لکه‌ای در برگ‌های یک درخت پرتقال والنـسیا در نیکـشهر B: پیسک لکه‌ای ناشی از پیوند نمونه‌ای از درخت والنسیای دارای علایم بیماری هوانگ لونگ بینگ روی یک نهال گریـپ فـروت (سمت چپ) در مقایسه با برگ سالم (سمت راست).

Fig. 3. Huanglongbing symptoms in citrus leaves. A: Yellowing and blotchy mottling in leaves of Valencia sweet orange from Nikshahr. B: Blotchy mottling in a leaf of a young grapefruit plant, graft inoculated with scions from huanglongbing–affected Valencia sweet orange (left) compared with a healthy leaf(right)

تقریبی ۷۰۰ جفـت بـاز از خوشـه ژنـی *rplKAJL-rpoBC* تکثیر شد (شکل ۴A). نمونه‌های مناطق دیگر با ایـن جفـت آغازگر بررسی نـشدند. هـم‌چنـین در ۸ نمونـه از ۱۰ نمونـه مذکور و دو نمونه پرتقال محلی در قـصر قنـد بـا روش پـی سی آر دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای OI1/OI2c در دور اول و CGO3F / CGO5R در دور دوم قطعه‌ای حدود ۸۰۰ جفت باز تکثیر شد(۴C). در آزمون پی سـی آر دومرحلـه‌ای که با جفـت آغازگرهـای F1/R1 (دور اول) و F2/R2 (دور دوم) و با نمونه‌های مناطق قصر قند و سرباز انجام شد ازبین ۲۶ درخت پرتقال والنسیای مظنون واکنش ۱۲ نمونه و ازبین ۶ نمونه نارنگی کلمانتین واکـنش یـک نمونـه مثبـت بـود و قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۴۰۰ جفت باز تکثیر شد. بـا همـین آزمون واکنش ۱۶ نمونه از ۳۱ نمونه پرتقال والنـسیای دارای علایـم از منـاطق سـندرک و رودان مثبـت بـود(جـدول ۳).



شکل۴. تکثیر دی ان ای *Candidatus* Liberibacter asiaticus در نمونه‌های پسیل و مرکبات در استان‌های سیستان- بلوچستان و هرمزگان به‌وسیله آزمون پی سی آر با استفاده از جفت آغازگرهای مختلف. M، H ، Hp و W: به‌ترتیب مارکر، پرتقال سالم، پسیل سالم و آب .A: پی سی آر مستقیم نمونه‌های پرتقال والنسیای دارای علایم از سرباز (۱ و ۲)با جفت آغازگر A2/J5 .B: پی سی آر دومرحله‌ای نمونه‌های پسیل (۱و۲) از رودان با استفاده از جفت آغازگرهای F1/R1 وF2/R2. C: پی سی آر دومرحله‌ای نمونه‌های پرتقال والنسیای علایم‌دار (۱،۲،۳و۴) با استفاده از جفت آغازگرهای OI1/OI2c و CGO5R /CGO3F. D: پی سی آر دو مرحله‌ای نمونه‌های پرتقال والنسیای علایم‌دار از استان‌های سیستان-بلوچستان (۲) و هرمزگان (۳) با استفاده از جفت آغازگرهای libEF/ libER و libIF/ libIR.

Fig. 4. Amplification of *Candidatus* Liberibacter asiaticus DNA from psyllid and citrus samples by PCR using different primer pairs. M, H, Hp and W, marker, healthy sweet orange, healthy psyllid and water control, respectively. A: Direct PCR with Valencia sweet orange from Sarbaz (1 and 2) using A2/J5 primer pair. B: Nested nested PCR with psyllid samples from Roodan (1 and 2) using F1/R1 and F2/R2 primer pairs. C: Nested PCR with sweet orange from Sarbaz (1, 2, 3, and 4) using OI1/OI2c and CGO3F/ CGO5R primer pairs.D: Nested nested PCR with symptomatic Valencia sweet orange from Sarbaz (1) and Senderk (2) using libEF/ libER and libIF/ libIR primer pairs.

جدول ۲. نتایج ردیابی ***Ca.* Liberibacter asiaticus** در نمونه‌های ***Diaphorina citri*** در استان‌های سیستان- بلوچستان و هرمزگـان بـا آزمون پی سی آر دو مرحله‌ای با استفاده از جفت آغازگرهای **F1/R1** و **F2/R2**

Table 2. Detection of *Ca.* Liberibacter asiaticus in *Diaphorina citri* samples from Sistan-Baluchistan and Hormozgan provinces by nested PCR using F1/R1 and F2/R2 primer pairs

Location of psyllid collection	Date of collecion in 2007	No. of psyllids tested	No. of psyllids testing positive	Percent infection
Ghasreghand	February	10	8	80
Sarbaz	March	40	33	82.5
Roodan	April	20	15	75
Senderk	May	20	16	80
Roodan	June	20	13	65
Roodan	July	20	13	65
Senderk	August	5	3	60
Sarbaz	September	5	2	40
Total		140	103	70.3

جدول۳. نتایج ردیابی ***Ca.* Liberibacter asiaticus** در نمونه‌های درختان مرکبات با علایم مشکوک به بیماری میوه سـبز در اسـتان‌هـای سیستان- بلوچستان و هرمزگان به‌وسیله **PCR**

Table 3. Detection of *Ca.* Liberibacter asiaticus in leaf samples of symptomatic citrus trees by PCR in Sistan-Baluchistan and Hormozgan provinces

Host	Location of collection	Primer pair used	*Ca*.L. asiaticus positive trees/ total trees tested
Citrus sinensis Valencia	Sarbaz (S)	A2/J5 (D)	6/10
Citrus sinensis Valencia	Sarbaz (S)	OI1/OI2c and CGO3F/ CGO5R (N)	8/10
Citrus sinensis	Ghasreghand (S)	OI1/OI2c and CGO3F/ CGO5R (N)	2/7
Citrus sinensis	Ghasreghand (S)	F1/R1and F2/R2 (N)	12/26
Citrus reticulata Ponkan	Sarbaz (S)	F1/R1and F2/R2 (N)	1/6
Citrus sinensis Valencia	Senderk and Roodan (H)	F1/R1and F2/R2 (N)	16/31
A local *Citrus reticulata*	Roodan(H)	F1/R1and F2/R2 (N)	0/20
Total			45/110

S= Sistan-Baluchistan, H= Hormozgan, D= Direct PCR, N= nested PCR

براساس ترادف ژن *opm* در باکتری نوع آسیایی (رس شمار AB576198) جفت آغازگرهای libEF/ libER و libIF/ libIR طراحی گردید. در آزمون پی سی آر دو مرحله‌ای با استفاده از این آغازگرها قطعه‌ای با اندازه ۹۰۹ جفت باز در نمونه‌هایی از درختان والنسیا با علایم بیماری میوه سبز از استان‌های سیستان- بلوچستان و هرمزگان تکثیر گردید(۴D). در هیچ مورد از نمونه‌های شاهد، که در آنها آب یا اسید نوکلئیک گیاهان سالم به جای دی ان ای گیاهان مظنون به آلودگی به‌کار برده شده بود قطعه‌ای تکثیر نگردید.

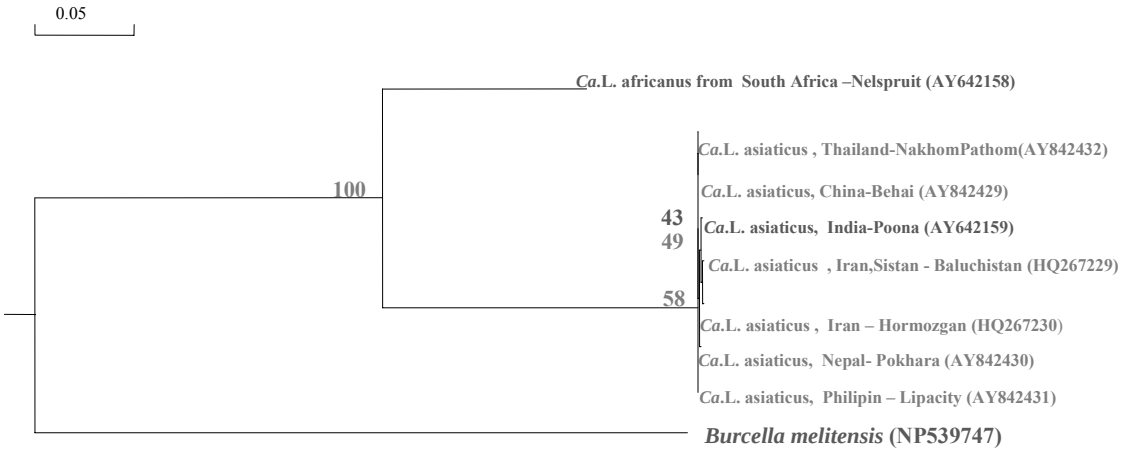
تعیین ترادف وبررسی میزان تشابه با ترادف‌های مشابه در بانک ژن

قطعه ۹۰۹ جفت بازی محصول پی سی آر دو مرحله‌ای با جفت آغازگر libIF/ libIR در دو جدایه پرتقال والنسیا از استان‌های سیستان- بلوچستان (S1) و هرمزگان (S2) تعیین ترادف شد و به‌ترتیب با رس شمارهای (accession number) HQ267229 و HQ267230 در GenBank قرار داده شد. جستجو با برنامه بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) نشان داد که ترادف‌های مورد نظر با قطعه‌ای از دی ان ای از ژن *opm* مربوط به باکتری *Ca.* L. asiaticus بیشترین نزدیکی را دارد. با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN ترادف ۹۰۹ جفت بازی از ژن opm در جدایه‌های S1 و S2 با ترادف‌های مشابه در ۹ جدایه باکتری عامل میوه سبز مرکبات مقایسه و دندروگرام تبارزایی ترسیم گردید (شکل۵). این بررسی مشخص ساخت که جدایه‌های ایرانی رابطه نزدیکی با *Ca.* L. asiaticus دارند و با *Ca.* L. africanus رابطه دوری دارند.

بحث

وجود نوع آسیایی بیماری میوه سبز و ناقل آن در استان‌های سیستان- بلوچستان و هرمزگان بر مبنای پی سی آر نمونه‌های *D. citri* و پرتقال پیش از این به اختصار گزارش شده است (Faghihi *et al.* 2009). براساس نتایج تحقیق کنونی شواهد تازه‌ای مبنی بر گسترش بیماری و ناقل آن *D. citri* در نواحی جنوبی ایران ارایه می‌شود. در سال ۱۹۹۷ میلادی وجود تعداد اندکی پسیل آسیایی مرکبات در چابهار (استان سیستان- بلوچستان) گزارش گردید(Bové *et al.* 2000). معلوم نبود که حشره مزبور به تازگی وارد ایران شده یا این‌که در کشور سابقه طولانی داشته و به دلایلی قادر به انتشار گسترده نبوده است. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که پسیل مزبور هم اکنون در بسیاری از مناطق مرکبات خیز ایران (سیستان- بلوچستان، هرمزگان، کرمان و فارس) وجود دارد و در برخی از نقاط خود به تنهایی عامل خسارت به درختان مرکبات است. ردیابی *Ca.* L. asiaticus در در صد بالایی از درختان مرکبات دارای علایم میوه سبز به کمک پی سی آر با چند جفت آغازگر مختلف، وجود این بیماری را در مناطقی از استان‌های سیستان- بلوچستان و هرمزگان قطعی می‌سازد. انتقال بیماری با پیوند و ایجاد علایم بیماری در برخی گیاهان پیوند شده در شرایط گلخانه تأیید دیگری بر وجود بیماری در منطقه است.

به نظر می‌رسد که پرتقال والنسیا از حساسیت بالایی نسبت به بیماری برخوردار است به‌طوری که در مواردی ۸۰ درصد درختان دارای علایم حامل باکتری عامل بیماری بودند. در سندرک و رودان در استان هرمزگان بیش از ۵۰ درصد از درختان پرتقال دارای علایم (۱۶ نمونه از ۳۱ نمونه) به بیماری مبتلا بودند درحالی‌که در هیچیک از نارنگی‌های ارزیابی شده در منطقه مزبور عامل بیماری



شکل۵. درخت فیلوژنتیکی مربوط به مقایسه جدایه‌های ایرانی با شش جدایه غیر ایرانی بیماری میوه سبز مرکبات براساس ۹۰۹ جفت باز از ژن*opm*. درخت فیلوژنتیکی، حاصل آنالیز با نرم‌افزار DNAMAN می‌باشد. از باکتری *Burcella melitensis* به‌عنوان outgroup استفاده شد. در سمت راست هر جدایه در داخل یک پرانتز رس شمار مربوطه نشان داده شده است.

Fig. 5. Phylogenetic tree showing the genetic relationship of Iranian isolates of huanglongbing with six "*Ca.* Liberibacter" isolates on the basis of 909 bp of the *opm* gene. The tree was constructed using phylogenetic tree option of DNAMAN software. *Burcella melitensis* bacterium was used as outgroup. GenBank accession numbers are in parentheses to the right of isolate name.

ردیابی نشد. در تحقیق حاضر به رغم وجود *D. citri*، عامل هوانگ لونگ بینگ در استان کرمان ردیابی نشد ولی بررسی‌های جدید نشان داده که فرم آسیایی این بیماری در مناطقی از این استان شامل جیرفت(علیزاده، اطلاعات منتشر نشده) و ارزوئیه (Mohkami *et al*. 2011) وجود دارد. وجود پسیل آسیایی مرکبات در استان فارس آلودگی به بیماری میوه سبز را در آینده‌ای نه چندان دور محتمل می‌سازد. تعاقب ناقل و بیمارگر در برخی نقاط دیگر جهان نیز دیده شده است. به‌طور مثال در فلوریدا عامل میوه سبز هفت سال بعد از گزارش پسیل آسیایی مرکبات تشخیص داده شد(Bové 2006). درکوبا نیز *D. citri* برای اولین‌بار در سال ۱۹۹۹و *Ca*. L. asiaticus در سال ۲۰۰۶ گزارش گردید (Luis Pantoja *et al*. 2008). به دلیل غلظت پایین و عدم گسترش یکنواخت عامل بیماری، تشخیص بیماری میوه سبز در درختان به ویژه درختان بدون علایم به سختی امکان‌پذیر است. در مناطق آلوده به پسیل قبل از ظهور علایم بیماری در مرکبات می‌توان با آزمون پی سی آر نمونه‌های پسیل را از نظر وجود عامل بیماری میوه سبز بررسی کرد و در صورت وجود عامل بیماری در پسیل نسبت به وجود بیماری در مرکبات منطقه مورد نظر هشدار داد.

یک مطالعه در فلوریدای آمریکا نشان داد که با ردیابی عامل بیماری در بدن پسیل آسیایی می‌توان یک تا چند سال قبل از ظهور علایم در درختان مرکبات به وجود بیماری در منطقه اطمینان حاصل کرد(Manjunath *et al*. 2008). در ایران نیز در مناطقی مانند رودان ابتدا عامل بیماری در پسیل ردیابی شد. علایم بیماری میوه سبز از سال‌ها پیش در مناطق مرکبات‌خیز ایران وجود داشته است (ایزدپناه، اطلاعات منتشر نشده) لکن می‌تواند بر اثر عوامل دیگر از

جمله کمبودهای غذایی، آلودگی به *Spiroplasma citri* و برخی فیتوپلاسماها باشد. وجود بیماری stubborn در مناطق جنوبی ایران پیش از این گزارش شده (Cochran & Samadi 1976, Rahimian 1983, Salehi *et al.* 1993) و ممکن است با بیماری میوه سبز مخلوط و بخشی از علایم مربوط به آن باشد(داده‌های ارایه نشده). در برزیل(Teixeira *et al.* 2008b) و چین(Chen et *al*. 2009) دو فیتوپلاسما از گروه جاروک نخود کبوتر و گروه زردی مینا همراه با بیماری میوه سبز مرکبات بوده‌اند. در ایران تا به‌حال چندین فیتوپلاسما از گروه‌های مختلف و گیاهان مختلف گزارش شده‌اند(Salehi *et al*., 2005) ولی دخالت آنها در ایجاد علائم بیماری میوه سبز در مرکبات تاکنون معلوم نشده است. به دلیل تکثیر *Ca*. L. asiaticus در بدن پسیل مرکبات (*D. citri*) و وابستگی انتشار بیماری به گسترش ناقل آن، برای پیشگیری از آلودگی‌های جدید، مبارزه جدی با ناقل به همراه حذف درختان آلوده و مظنون به آلودگی توصیه می‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (64- 61) متن انگلیسی مراجعه شود.