ارزیابی واکنش تعدادی از هیبریدهای مرکبات نسبت به *'Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'

نگار رضازاده[۱]، اسد اسدی آبکنار[۲*] و احمد روحی‌بخش[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱)

چکیده

مناطق جنوبی ایران شامل استان‌های هرمزگان، سیستان و بلوچستان، بوشهر، فارس و کرمان سابقه‌ای طولانی در تولید لیموترش (مکزیکن لایم) [*Citrus aurantifolia* (Chrism.) Swing.] دارند. در دو دهه اخیر بیماری جاروک لیموترش که عامل آن *'Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' می‌باشد هزاران اصله از درختان لیموترش را در جنوب ایران نابود کرده است. یکی از راه‌های مدیریت بیماری جاروک لیموترش به کار گیری ارقام مقاوم و متحمل می‌باشد. هدف از این پژوهش تولید هیبریدهای مرکبات اسیدی مقاوم به بیماری جاروک لیموترش بود. برای این منظور در چهار نوع تلاقی، لیمو ترش 'یورکا' (*C. limon* (L.) Burm. F.) به عنوان والد مادر و گونه‌های یوزو (*C. junos* Sieb. ex Tan.)، کلئوپاترا ماندارین (*C. reshni* Hort. ex Tan.)، لیمو ترش 'کوسای' (*C. limonia* Osb.) و پرتقال 'هاملین' (*C. sinensis* (L.) Osb.) به عنوان والدین پدر به کار رفتند. تعداد ۷۹ گیاه هیبرید از والدین بالا به روش پیوند T واژگون با عامل بیماری جاروک لیموترش مایه‌زنی شدند. هیبریدهای مایه‌زنی‌شده از نظر ظهور علائم بیماری جاروک و واکنش در آزمون پی سی آر (PCR) آشیانه‌ای ارزیابی شدند. دو سال بعد از مایه‌زنی در ۶۳ هیبرید علائم بیماری جاروک ظاهر نشد که از بین آن‌ها از نظر وجود فیتوپلاسمای جاروک لیموترش ۳۵ هیبرید منفی و ۲۸ هیبرید مثبت بودند. هیبریدهای فاقد علائم که در آن‌ها فیتوپلاسما ردیابی نشد تحت ارزیابی فنوتیپی بیشتری قرار دارند و می‌توانند در آینده به عنوان مرکبات اسیدی جدید مقاوم به بیماری جاروک لیموترش معرفی شوند.

کلیدواژه: بەنژادی، جنوب ایران، فیتوپلاسما، مرکبات اسیدی (ترش)

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: asadiabkenarasad@gmail.com و a.asadi@abrii.ac.ir

۱. گروه گیاه‌پزشکی، پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت، ایران.

۳. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان.

Reaction assessment of a number of citrus hybrids to *'Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'

N. Rezazadeh[1], A. Asadi Abkenar[2*], and A. Rouhibakhsh[3]

(Received: 6.1.2018; Accepted: 1.1.2019)

Abstract

South citrus growing belt of Iran including Hormozgan, Sistan-Baluchestan, Bushehr, Fars and Kerman provinces, has a long history of cultivation of acid lime (Mexican lime) [*Citrus aurantifolia* (Chritm.) Swing.]. In two recent decades due to witches' broom disease of lime (WBDL), caused by '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia', thousands of acid lime trees have been killed in the south of Iran. Using resistant or tolerant varieties is one of the important strategies for controlling WBDL . The aim of this study was producing new acid citrus hybrids resistant to the WBDL disease. Four types of crosses were carried out. The female parent was 'Eureka' lemon [*C. limon* (L.) Burm. F.] and the male parents were 'Yuzu' [*C. junos* Sieb. ex Tan.], 'Cleopatra' mandarin [*C. reshni* Hort. ex Tan.], 'Kusaie' lime (*C. limonia* Osb.) and 'Hamlin' orange [*C. sinensis* (L.) Osb.]. From the above parents, 79 hybrid plants were successfully inoculated with the *'Ca*. P. aurantifolia' by inverted T-budding. Appearance of disease symptoms and nested-PCR assay were used to assess inoculated hybrids for resistance. Two years post-inoculation 63 hybrids remained symptomless. Among symptomless hybrids, 35 and 28 hybrids were negative and positive for presence of WBDL phytoplasma, respectively. Symptomless hybrids negative for WBDL phytoplasma are under more phenotypic evaluation and may be promising as new acid citrus resistant to WBDL.

Keywords: Breeding, South of Iran, Phytoplasma, Acid Citrus

*Corresponding author's E-mail: a.asadi@abrii.ac.ir and asadiabkenarasad@gmail.com

1. Department of plant pathology, Pardis Campus, University of Guilan, Rasht, Iran.
2. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Branch of North Region, Rasht, IRAN, P. Code 418895-8883.
3. Department of plant pathology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

مقدمه

مرکبات شامل پرتقال، نارنگی، گریپ فروت، لیموشیرین و لیموترش در ایران از مهم‌ترین محصولات میوه‌ای هستند. تولید مرکبات در ایران در سال ۲۰۱۴-۲۰۱۳ حدود ۴/۵۷ میلیون تن برآورد شده است (FAO 2016). در ایران گونه‌های مرکبات اسیدی مانند نارنج (*Citrus aurantium* L.) و لیموترش [*Citrus aurantifolia* (Chrism) Swing.] عمدتاً به صورت میوه‌های ترش تازه و یا آب نارنج و آب لیمو به همراه غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند. تولید کل انواع لیمو ترش (لایم‌ها و لمون‌ها) در ایران در سال ۲۰۱۴-۲۰۱۳ حدود ۱/۰۲ میلیون تن برآورد شده است (FAO 2016). در بین مرکبات اسیدی، لیموترش یا مکزیکن لایم که با نام‌های تجاری لیموآب، لیمو شیراز و لیمو عمانی شناخته می‌شود، در نواحی مرکبات خیز جنوب ایران مانند استان‌های هرمزگان، سیستان و بلوچستان، فارس، بوشهر و کرمان دارای تاریخچه طولانی کاشت و پرورش بوده و اهمیت اقتصادی و اکولوژیکی قابل توجهی دارد.

پرورش مرکبات اسیدی (ترش) در ایران با بسیاری از محدودیت‌های مربوط به عوامل زنده و غیر زنده رو به رو می‌باشد. در این میان می‌توان به حساسیت نارنج به ویروس تریستیزای مرکبات، حساسیت لیموترش به سرمازدگی در شمال ایران، بیماری‌های مرگ گیاهچه و خشکیدگی سرشاخه پرشین لایم در جنوب ایران و برخی دیگر از بیماری‌های ناشی از عوامل بیمارزای گیاهی اشاره نمود (Najafiniya 2016). اما مهم‌تر از همه در دو دهه اخیر بیماری ویرانگر جاروک لیموترش است که عامل آن نوعی فیتوپلاسما با نام علمی *'Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' (Zreik *et al.* 1995) می‌باشد. این بیماری صدها هزار اصله از درختان لیموترش را در جنوب ایران نابود کرده است (Faghihi *et al.* 2011). ظهور این بیماری در ایران در سال ۱۹۹۷ از یک ناحیه کوچک در استان سیستان و بلوچستان تایید شد (Salehi *et al.* 1997, Bove *et al.* 2000). از آن تاریخ تاکنون، به دلیل گسترش این بیماری وسعت کاشت و تولید لیموترش به ترتیب به ۱۲۰۰۰ هکتار و ۱۴۰۰۰۰ تن کاهش یافته است (Ahmadi *et al.* 2017). اطلاعات در مورد تاریخ پیدایش، گسترش و وضعیت کنونی این بیماری در کشورهایی نظیر عمان، امارات متحده عربی و ایران در گزارش‌های متعدد موجود است (Garnier *et al.* 1991, Bove *et al.* 2000, Faghihi *et al.* 2011, Al-Yahyai *et al.* 2012, Salehi *et al.* 2017). بیماری جاروک لیموترش تاثیرات مخرب زیادی بر صنعت لیموترش و محیط زیست کشورهای خاورمیانه گذاشته زیرا در بین محصولات میوه‌ای بعد از خرما عمدتاً لیموترش در مناطق گرم و خشک این کشورها کاشت و پرورش وسیع دارد (Khan 2000, Al-Yahyai *et al.* 2015). علائم ظاهری بیماری جاروک لیموترش در درختان آلوده، میزبان‌های علفی و روش‌های انتقال این بیماری به طور کامل تعیین شده‌اند (Garnier & Bove 2000, Salehi *et al.* 2002, Chung *et al.* 2006, Bagheri *et al.* 2009, Salehi *et al.* 2017). عامل بیماری جاروک لیموترش مانند سایر فیتوپلاسماها می‌تواند توسط سمپاشی‌های منظم علیه زنجرک ناقل (*Hishimonus phycitis*) (Bagheri *et al.* 2009)، اعمال قوانین قرنطینه ای در مناطق آلوده، حذف درختان و سایر گیاهان آلوده و به‌کارگیری ارقام مقاوم و متحمل کنترل شود. ارقام مرکبات مقاوم و متحمل به بیماری جاروک لیموترش را می‌توان با روش‌های مختلفی بدست آورد مانند انتخاب درختان غیرآلوده‌ای که در مناطق آلوده وجود دارند، به‌نژادی، القای جهش و دست ورزی ژن‌ها (Roose 2000). تنوع ژنتیکی

گونه‌های لیموترش در استان هرمزگان در جنوب ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR و ISSR مورد مطالعه قرار گرفت و بسیاری از ژنوتیپ‌هایی که دارای منشاء جنسی بودند شناسایی شدند (Sharafi *et al.* 2016). برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های لیموترش در کشور عمان از نشانگر مولکولی AFLP استفاده شد، اما میزان تنوع ژنتیکی در این گونه بسیار پایین بوده است (Al-Sadi *et al.* 2012).

تاکنون مطالعات متعددی در مورد ارزیابی واکنش ارقام مختلف مرکبات و یا جنس‌های نزدیک به مرکبات نسبت به بیماری جاروک لیموترش انجام گرفته است Moghal *et al.* 1998, Garnier & Bove 2000, Salehi *et al.* (2005). این مطالعات نشان داده‌اند که از بین مرکبات در جنس *Citrus* و جنس‌های نزدیک به آن‌ها نارنگی 'کلمانتین' (*C. clementina* Hort. ex Tan.)، یوزو (*C. junos* Sieb. ex Tan.)، کلئوپاترا ماندارین (*C. reshni* Hort. ex Tan.)، پرتقال (*C. sinensis* (L.) Osb.) و کامکوات (*Fortunella margarita* (Lour,) Swng.) با مایه‌زنی به وسیله‌ی پیوند، آلوده نشدند. اگر چه از نتایج مطالعات اخیر می‌توان به طور مستقیم در انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به جاروک و یا انتخاب والدین برای انجام تلاقی‌ها در برنامه‌های به نژادی استفاده نمود، اما تاکنون گزارشی در مورد استفاده از به‌نژادی در تولید مرکبات اسیدی جدید و متحمل به بیماری جاروک لیموترش وجود ندارد. امروزه تقاضای زیادی برای ژنوتیپ‌های شبه لیموترش متحمل یا مقاوم به بیماری جاروک وجود دارد به طوری که کشورهایی که با خسارت این بیماری روبرو شده‌اند، در سطح تجاری به دنبال جایگزینی برای لیموترش از بین ژنوتیپ‌های مقاوم مرکبات و حتی سایر میوه‌های گرمسیری هستند. در دهه گذشته، در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران با همکاری پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، تعدادی از پروژه‌های به‌نژادی با هدف دست یابی به شبه لیموترش‌های جدید و متحمل به جاروک لیموترش به اتمام رسیده است. در این پژوهش، نتایج یکی از این پروژه‌ها ارائه می‌شود. هدف از این پژوهش تولید دورگ‌های مرکبات اسیدی جدید و ارزیابی واکنش آنها به جاروک لیموترش و انتخاب دورگ‌های متحمل با ویژگی‌های فنوتیپی شبه لیموترش بوده است.

مواد و روش‌های بررسی

تلاقی‌ها

برای انجام تلاقی‌ها، از لیمو ترش 'Eureka' به عنوان والد مادر استفاده شد. گل‌های والد مادر در مرحله‌ی غنچه کامل و ۱ تا ۲ روز قبل از باز شدن بساک‌ها با حذف گلبرگ‌ها و پرچم‌ها با استفاده از پنس نوک تیز عقیم شدند. برای جلوگیری از بازدید حشرات گرده‌افشان، گل‌های عقیم‌شده با کیسه‌های کاغذی مومی پوشانده شدند. ژنوتیپ‌های کلئوپاترا ماندارین، یوزو، پرتقال 'هاملین' و لیمو ترش 'کوسای' به عنوان والدین پدر به کار گرفته شدند. بساک‌های والدین پدری جمع‌آوری و تا باز شدن کامل بطور جداگانه در دمای اتاق (۲۶ درجه سانتی گراد) به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. گل‌های حفاظت‌شده والد مادر با گرده‌های جمع‌آوری‌شده والدین نر به وسیله برس نرم گرده افشانی شدند.

جمع‌آوری بذرها و کاشت آنها

میوه‌های حاصل از دورگ گیری‌ها (تلاقی‌ها) پس از گذشت هفت ماه جمع‌آوری و بذرهای آن‌ها استخراج گردید. از آنجا که بذرهای لیموترش 'Eureka' ویژگی

چند جنینی و تک جنینی هر دو را دارند، پس از حذف دو لایه‌ی پوسته هر بذر و مشاهده در زیر بینوکولار، تنها بذرهای تک جنین انتخاب و کاشته شدند. نهال‌ها به شیوه استاندارد مورد مراقبت قرار گرفته و جهت کنترل آفات به طور منظم سمپاشی شدند.

مایه‌زنی نهال‌ها

نهال‌های بذری دورگ پس از دو سال رشد در یک گلخانه ایزوله، با روش پیوند T معکوس آلوده شدند. هر نهال با یک جوانه لیموترش آلوده به بیماری جاروک (فراهم آمده از یک باغ آلوده در میناب) مایه‌زنی شد. بعضی از قسمت‌های بالایی نهال‌های مایه زده شده برای القاء رشد جدید دو بار هرس شدند.

ارزیابی علائم بیماری جاروک لیموترش

طی دوره رشد دو ساله بعد از مایه‌زنی موفقیت آمیز، نهال‌ها از نظر علائم ظاهری بیماری جاروک مانند ظهور برگ‌های کوچک و زرد روشن، کوتاه شدن فاصله میان گره‌ها در شاخه‌های جدید وجاروک ارزیابی شدند. تعداد نهال‌های آلوده (دارای علائم) و سالم (فاقد علائم) ثبت و نهال‌های دارای علائم بعد از تهیه نمونه از آنها سوزانده شدند (جدول ۱).

ردیابی عامل بیماری جاروک لیموترش با آزمون PCR آشیانه‌ای

از دور تا دور و وسط تاج نهال‌ها نمونه‌های برگی جمع‌آوری و از ۰/۲ تا ۰/۵ گرم بافت رگبرگ و دمبرگ با استفاده از روش Murray & Thompson (1980) دی ان ای کل استخراج شد. از یک جاروک در یک نهال لیموترش دارای علائم، که قبلاً آلودگی آن به عامل بیماری جاروک به اثبات رسیده بود به عنوان شاهد مثبت و از یک نهال نارنج سالم به عنوان کنترل منفی نیز با همین روش دی ان ای کل استخراج شد. غلظت دی ان ای استخراج‌شده در حدود ۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر تنظیم شد. برای ردیابی عامل جاروک لیموترش از روش پی سی آر آشیانه‌ای، با جفت آغازگر عمومی P_1/P_7 (Schneider 1995) و جفت آغازگر اختصاصی fe_1/re_1 (Askari *et al.* 2011)، به ترتیب برای اولین و دومین واکنش پی سی آر استفاده شد (جدول ۲). جفت آغازگرهای P_1/P_7 و fe_1/re_1 به ترتیب قطعاتی از دی ان ای ریبوزومی با اندازه‌های ۱۸۰۰ و ۱۳۶ جفت باز را تکثیر می‌کنند. محصول پی سی آر اول با رقیق سازی به نسبت یک به ده به عنوان دی ان ای قالب برای پی سی آر مرحله دوم استفاده شد. هر ۱۲/۵ میکرو لیتر از مخلوط واکنش پی سی آر آشیانه‌ای شامل مواد زیر بود: آب دو بار تقطیر (۷/۵ میکرولیتر)، بافر پی سی آر با غلظت ده برابر (۱/۲۵ میکرولیتر)، کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار (۰/۵ میکرو لیتر)، مخلوط dNTP ۲/۵ میلی‌مولار (۱ میکرولیتر)، هر یک از آغازگرهای fe_1/re_1 با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر (۰/۵ میکرولیتر)، آنزیم Taq DNA Polymerase (Fermentas) با غلظت ۳ واحد بر میکرولیتر (۰/۲۵ میکرولیتر)، و محصول پی سی آر با جفت آغازگر P_1/P_7 (۱ میکرولیتر). برنامه پی سی آر آشیانه‌ای عبارت بود از : ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه برای واسرشت نمودن اولیه دی ان ا، یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای با دمای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه برای واسرشته سازی، دمای ۵۴ درجه به مدت یک دقیقه به منظور اتصال آغازگرها، دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه برای تکثیر و یک چرخه به منظور تکثیر نهایی با دمای ۷۲ درجه به مدت هفت دقیقه. برای انجام پی سی آر از دستگاه ترموسایکر Gene Amp Applied

جدول۱. تلاقی‌های ایجاد شده بین لیموترش «یورکا» و چهار گونه دیگر از مرکبات برای تولید هیبریدهای جدید و ارزیابی واکنش آنها به *'Candidatus* Phytoplasama aurantifolia'

Table 1. Crosses made between 'Eureka' lemon and four other citrus species to produce hybrids for reaction assessment to '*Candidatus* Phytoplasama aurantifolia'.

Cross	Pollinated flowers	No. of fruits	No. of seeds	No. of hybrids	No. of plants inoculated with 'Ca. P. aurantifolia'*	No. of plants with WBDL symptoms and PCR+	No. of plants without WBDL symptoms and PCR-	No. of plants without WBDL symptoms but PCR+
Eureka × Cleopatra	10	7	162	31	15	2	4	9
Eureka × Yuzu	58	31	722	227	26	4	3	9
Eureka × Hamlin	53	25	446	125	21	5	12	4
Eureka × Kusaie lime	47	25	431	90	17	5	6	6
Total	168	88	1761	473	79	16	35	28

*'*Ca*. P.', '*Candidatus* Phytoplasama'

Biosystems، مدل ۹۷۰۰ (ساخت آمریکا) استفاده شد. محصول واکنش پی سی آر آشیانه‌ای در ژل آگارز یک درصد با استفاده از بافر TAE الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) زیر دستگاه مستند ساز ژل بررسی و عکس برداری شد.

نتایج و بحث

در پژوهش حاضر از چهار تلاقی مختلف شامل کلئوپاترا ماندارین × 'یورکا'، یوزو × 'یورکا'، پرتقال 'هاملین' × 'یورکا' و لیمو ترش 'کوسای'× 'یورکا' به منظور تولید نهال‌های هیبرید (دورگ) و ارزیابی به بیماری جاروک لیموترش استفاده شد. از این چهار تلاقی در مجموع ۴۷۳ گیاه دورگ بدست آمد که بین آنها تفاوت زیادی از نظر ارتفاع و قطر تنه نهال (قدرت رشد) مشاهده شد و به همین دلیل تنها ۷۹ نهال هیبرید (۱۶/۷٪) منتخب و یکنواخت نسبت به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش با مایه‌زنی با استفاده از پیوند تی واژگون مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). بیست و چهار ماه پس از مایه‌زنی، از ۷۹ گیاه مایه‌زنی‌شده، تعداد ۶۳ نهال فاقد علائم بودند و ۱۶ نهال علایم کوتولگی همراه با برگ‌های کوچک به رنگ‌های سبز روشن تا زرد و فاصله میانگره کوتاه را نشان دادند (شکل ۱). در تمام گیاهان مایه‌زنی‌شده، علایم بیماری در شاخه‌های حاصل از رشد پیوندک آلوده نیز مشاهده شد که نشان دهنده موفقیت مایه‌زنی بود. درحالی‌که نهال‌های شاهد (نهال نارنج سالم بدون اینوکلوم)، هیچ علائمی از بیماری نشان ندادند. قطعه ۱۳۶جفت بازی مورد انتظار بعد از پی سی آر دوم با آغازگرهای اختصاصی fe_1/re_1 در ۱۶ نهال دارای علائم و ۲۸ نهال فاقد علائم تکثیر شد. در کنترل منفی و ۳۵ نهال فاقد علائم این قطعه تکثیر نشد. (شکل ۲، جدول ۲). به منظور اطمینان از ردیابی فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دو بار تکرار شد.

با توجه به علائم بیماری جاروک لیموترش در نهال‌های آلوده، و تکثیر یا عدم تکثیر قطعه پی سی آر مورد انتظار، نهال‌ها در سه گروه قرار گرفتند: ۱- نهال‌های دارای علائم با واکنش پی سی آر مثبت (۱۶ نهال)، ۲- نهال‌های فاقد علائم با واکنش پی سی آر مثبت (۲۸ نهال) و ۳- نهال‌های فاقد علائم با واکنش پی سی آر منفی (۳۵ نهال) (جدول ۱). در جدول ۱، برای هر یک از تلاقی‌ها تعداد نهال‌های هر یک از این سه گروه نشان داده شده است. بالاترین

شکل ۱. مایه زنی دو هیبرید مرکبات با فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش با روش پیوند: a، علائم بیماری جاروک شامل زردی و کاهش فاصله میانگره‌ها در یک گیاه هیبرید حاصل تلاقی لیمو ترش 'کوسای'× 'یورکا'؛ b، یک گیاه هیبرید حاصل تلاقی پرتقال 'هاملین' × 'یورکا' که علی‌رغم ظهور علائم جاروک در پیوندک آلوده، فاقد علائم بیماری جاروک لیموترش بود.

Fig. 1. Inoculation of two citrus hybrids with agent of witches' broom disease of lime using graft inoculation: a, a 'Eureka' × 'Kusaie' lime hybrid plant showing symptoms of witches' broom disease of lime (WBDL) including yellowing and shortened internodes; b, a 'Eureka' × 'Hamlin' orange hybrid plant showing no symptoms of WBDL phytoplasma in spite of appearance of WBDL phytoplasma symptoms in infected bud.

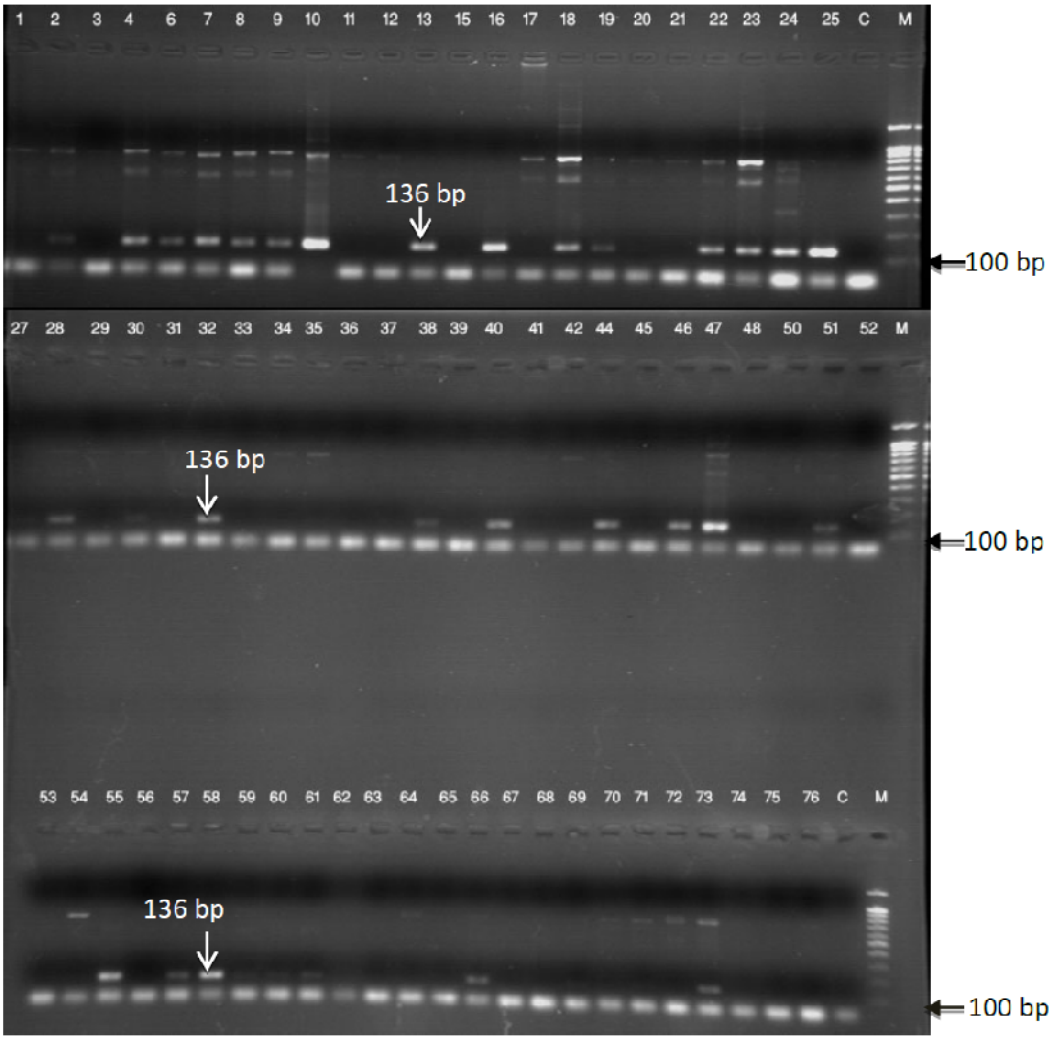
جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده در پی سی آر آشیانه‌ای برای ردیابی فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در دورگ‌های مایه زده شده.

Table 2. Primers used in nested PCR to detect witches' broom disease of lime phytoplasma in inoculated hybrids.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Amplified product (bp)	Target gene	Reference
P_1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGTT	1788	rRNA operon	Schneider *et al.* 1995
P_7	AAGAGCCGATGAAGGACG			
fe_1	GAGTTAGATAGAGGCGAGTG	136	16S rRNA	Askari *et al.* 2011
re_1	TAATCCTGTTTGCTCCCCAC			

درصد نهال‌های فاقد علائم با پی سی آر منفی (۵۷٪) متعلق به تلاقی پرتقال 'هاملین' × 'یورکا' است.

در برنامه‌های به‌نژادی مرکبات به منظور تولید ارقام جدید انتخاب والدین مناسب برای دورگ‌گیری اولین گام موفقیت به شمار می‌رود. از آن‌جا که چند جنینی مانع بزرگی در به‌نژادی مرکبات می‌باشد، والد مادر باید کاملاً تک جنین بوده ویا درصد زیادی از تک جنینی را داشته باشد و از انتخاب مادر کاملاً چند جنین باید اجتناب کرد. از سوی دیگر برای نیل به هدف مورد نظر هر تلاقی، حداقل یکی از والدین باید دارای ژن‌هایی با ویژگی‌های مطلوب و مد نظر باشد. در این پژوهش دست‌یابی تحمل به بیماری جاروک لیموترش و ویژگی‌های میوه مرکبات اسیدی در هیبریدها از اهداف اصلی بوده است. برای این منظور لیمو ترش 'یورکا' که یکی از مرکبات اسیدی است



شکل۲. الکتروفورز محصول پی سی آر آشیانه‌ای(۱۳٦جفت باز) با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 در دور اول و fe_1/re_1 در دور دوم جهت ردیابی فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در هیبریدهای مورد مطالعه در این پژوهش. راهک‌های ۱ تا ۱۳، ٥٦ و ٥٧، دورگ‌های حاصل از کلئوپاترا ماندارین × 'یورکا' ؛ راهک‌های ۱۵ تا ۳۳، و ۵۸ تا ٦۳، دورگ‌های حاصل از یوزو × 'یورکا'؛ راهک‌های ۳٤ تا ٤۲، و ٦٤ تا ۷٤ ، دورگ‌های حاصل از پرتقال 'هاملین' × 'یورکا'؛ راهک‌های ٤٤ تا ٥٥، و ۷٥ و ۷٦، دورگ‌های حاصل از لیمو ترش 'کوسای' × 'یورکا'؛ c، کنترل منفی (نارنج سالم)؛ M، نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas).

Fig. 2. Electrophoresis of nested PCR products (136 bp) using P1/P7 (first round) and $fe_1/re_{1\ (second\ round)}$ primer pairs fordetection of WBDL-phytoplasma in hybrids plants analyzed in this study. lanes 1 to 13, 56 and 57, hybrids resulted from 'Eureka' × 'Cleopatra' mandarin; lanes 15 to 33, and 58 to 63, hybrids resulted from 'Eureka' × 'Yuzu'; lanes 34 to 42 and 64 to 74, hybrids resulted from 'Eureka' × 'Hamlin' orange; lanes 44 to 55 and 75 and 76, hybrids resulted from 'Eureka' × 'Kusaie' lime; C, negative control (sour Orange); M , 100 bp molecular size marker (Fermentas).

و درجه قابل توجهی از تک جنینی را دارد (Janick & Moore 1996, Perez-Tornero & Porras 2008) به عنوان والد مادر مورد استفاده قرار گرفت و والدین پدر در هر چهار تلاقی از ارقامی که به بیماری جاروک لیموترش متحمل بودند انتخاب شدند (Moghal *et al.*, 1998, Garnier & Bove 2000).

از بین والدین پدر استفاده شده در این پژوهش، یوزو یکی از انواع مرکبات اسیدی ویژه محسوب می‌شود که در ژاپن پرورش می‌یابد و به علت طعم خوب و ترکیبات معطر در آشپزی استفاده می‌شود. همچنین یوزو، به علت مقاومت به سرما به عنوان یک والد در برنامه‌های به نژادی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Janick & Moore 1996). تولید دورگ بین یوزو و لیموی 'یورکا' با بالاترین تعداد نهال‌ها در مقایسه با سه نوع تلاقی‌های دیگر، برای اولین بار در این مطالعه گزارش می‌شود.

برخلاف بسیاری از بیماری‌های ویروسی مرکبات که می‌توانند با روش‌های مختلف منتقل شوند (Timmer *et al.* 2000)، برای انتقال آزمایشگاهی بیماری فیتوپلاسمایی جاروک لیموترش، به طور معمول از روش مایه‌زنی با پیوند استفاده می‌شود. پیوندک آلوده باید به خوبی رشد کند و علائم بیماری در آن دیده شود (Salehi *et al.* 2005). چند جنینی بذر مرکبات به عنوان مهمترین مانع در به نژادی و همچنین محدودیت روش‌های انتقال بیماری جاروک، تولید و ارزیابی تعداد زیادی از نهال‌های دورگ را برای انجام مطالعات ژنتیکی و تعیین نحوه توارث مقاومت و حساسیت به این بیماری با دشواری رو به رو می‌سازند. استفاده از گونه‌های کاملاً تک جنین از قبیل نارنگی کلمانتین ، کامکوآت ناگامی [*F. margarita* [Lour.) Swing.] ، و پوملو [(L) Osb. *C.* grandis] به عنوان والد مادر در تلاقی‌ها می‌تواند این محدودیت را برطرف نماید.

در پژوهش حاضر برای ردیابی فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش از پی سی آر آشیانه‌ای استفاده شد. جفت آغازگر اختصاصی بیماری جاروک لیموترش (fe_1/re_1) که پیش تر از روی قطعه تکثیری توسط جفت آغازگر P_1/P_7 (۱/۸ kb) طراحی شده است (Askari *et al.* 2011)، قطعه‌ای ۱۳۶ جفت بازی را در نهال‌های آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیمو ترش تکثیر کرد. با استفاده از این روش ردیابی هیچگونه اطلاعاتی در مورد میزان غلظت فیتولاسما در گیاهان آلوده به دست نمی‌آید و باید از روش پی سی آر در زمان واقعی (Real-time PCR) برای تعیین کمّی عامل بیماری به ویژه در دو گروه از گیاهان مطالعه‌شده شامل نهال‌های دارای علائم جاروک و پی سی آر مثبت و نهال‌های فاقد علائم و پی سی آر مثبت استفاده شود. گروه بندی دورگ‌های ارزیابی‌شده در این پژوهش بر اساس ظهور علائم بیماری جاروک و ردیابی عامل بیماری با پی سی آر آشیانه‌ای با آن چه که پیش تر گزارش گردیده است Garnier & Bove 2000, Salehi *et al.* 2005) همخوانی دارد. این پژوهشگران نیز در ارزیابی واکنش گونه‌ها و ارقام مرکبات به بیماری جاروک لیموترش گیاهان مایه‌زنی‌شده را در سه گروه حساس (دارای علائم با پی سی آر مثبت)، متحمل (فاقد علائم با پی سی آر مثبت) و مقاوم (فاقد علائم با پی سی آر منفی) قرار دادند.

اطلاعاتی که توسط روش‌های پی سی آر در زمان واقعی به دست می‌آیند به‌نژادگران مرکبات را قادر خواهد ساخت تا مناسب‌ترین ارقام والد را برای تلاقی‌های بین دو گروه از ژنوتیپ‌های فاقد علائم با پی سی آر مثبت و فاقد علائم با پی سی آر منفی انتخاب کنند. در میان سه گروه از گیاهان دورگ که در این پژوهش به‌دست آمد، گروه سوم با ۳۵ گیاه فاقد علائم بیماری و واکنش منفی در پی سی آر، به عنوان ژنوتیپ مقاوم در برابر بیماری جاروک لیموترش بسیار امید بخش هستند چون نه علائم بیماری را نشان دادند و نه عامل بیماری در آن‌ها تکثیر شد. اگر چه احتمال ظهور علائم بیماری جاروک در اثر تغییر شرایط محیطی، دمای بالا به مدت طولانی برای گروه دوم، فاقد

علائم با پی سی آر مثبت (۲۸ نهال)؛ می‌تواند وجود داشته باشد، برای گروه سوم از دورگ‌ها، فاقد علائم با پی سی آر منفی، مطرح نیست (Galetto *et al.* 2011).

مشاهدات متعدد در جنوب ایران، وجود درختان لیموترش فاقد علائم بیماری جاروک در باغ‌های کاملاً آلوده به این بیماری را تایید می‌نماید. برای کنترل بیماری جاروک لیموترش یکی از راه‌حل‌های مناسب می‌تواند استفاده از چنین ارقام احتمالاً مقاوم یا متحمل موجود باشد. از آن‌جا که لیموترش (مکزیکن لایم) چندین دهه در مناطق جنوب کشور توسط کاشت مستقیم بذر تکثیر و گسترش یافته، منشا این درختان فاقد علائم به احتمال زیاد جنین‌های جنسی لیموترش (تقریبا ۲۰-۲۵ ٪) می‌باشد (Sharafi *et al.* 2016) که در آنها تفرق صفات به وجود آمده است. به همین دلیل بررسی دقیقی از وضعیت ظاهری درختان لیموترش در مناطق آلوده و انجام آزمون‌های مولکولی دقیق به منظور شناسایی، انتخاب و جدا سازی ژنوتیپ‌های متحمل و مقاوم ضروری می‌باشد. این راهبرد پیش‌تر نیز در کشور عمان برای دست‌یابی به لیموترش‌های مقاوم و متحمل به عامل بیماری جاروک پیشنهاد شده بود (Khan 2000).

در بین بیماری‌های مرکبات، بیماری میوه سبز (Huanglongbing) برای صنعت مرکبات بسیار مخرب است و توجه جهانی را به خود جلب کرده است (Mattos *et al.* 2016). بیماری جاروک لیموترش نیز برای صنعت مرکبات در کشورهای خاورمیانه بسیار مخرب می‌باشد. حل این مشکل قطعاً نیازمند توجه جهانی همانند بیماری گرینینگ است. دورگ‌های متعددی باید از تلاقی‌های مختلف در مرکبات به منظور شناسایی نحوه توارث و تفرق ژنتیکی صفت مقاومت به این بیماری به‌دست آیند.

منابع

Ahmadi K., Gholizadeh H. A., Ebadzadeh H., Hatami F., Hoseinpour R., Abdshah H., Rezaie M. M. and Fazli Estabragh M. 2017. Agricultural Statistics of the year 2015-2016. Ministry of Agriculture-Jahad. 3: 210-211.

Al-Sadi A. M., Al-Moqbali H. S., Al-Yahyai R .A and Al-Said F. A. 2012. AFLP data suggest a potential role for the low genetic diversity of acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) in Oman in the outbreak of witches' broom disease of lime. Euphytica 188: 285–297.

Al-Yahyai R., Khan I., Al-Said F., Al-Sadi A., Al-Wahaibi A. and Deadman M. 2012. Status of *Citrus aurantifolia* infected with Witches' Broom Disease of Lime in Oman. Acta Horticulture 928: 375-381.

Al-Yahyai R. A., Al-Sadi A. M., Al-Said F. A., Al-Kalbani Z. H., Carvalho C. M., Elliot S. L. and Bertaccini A. 2015. Development and morphological changes in leaves and branches of acid lime (*Citrus aurantifolia*) affected by witches' broom. Phytopathologia Mediterranea 54: 133-139.

Askari N., Salehi Jouzani Gh., Mousivand M., Foroutan A., Hagh Nazari A., Abbasalizadeh S., Soheilivand S. and Mardi M. 2011. Evaluation of anti-phytoplasma properties of surfactin and tetracycline towards lime witches' broom disease using real-time PCR. Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 81-88.

Bagheri A. N., Salehi M., Faghihi M. M., Samavi S. and Sadeghi A. 2009. Transmission of *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia to 'Mexican' lime by the leafhopper *Hishimonus phycitis* in Iran. Journal of Plant Pathology 91: S_4 105.

Bove J. M., Danet. J. L., Bananej K., Hassanzadeh N., Taghizadeh M., Salehi M. and Garnier M. 2000. Witches' broom disease of lime (WBDL) in Iran. Pp. 207-212. In: Proc. of 14th IOCV Conference Riverside, California.

Chung K. R., Khan I. A. and Brlansky R. H. 2006. Citrus diseases exotic to Florida: witches' broom disease of lime (WBDL). EDIS publications, University of Florida, Gainesville, PP-228, 1-3.

Faghihi M. M., Bagheri A. N., Bahrami H. R., Hasanzadeh H., Rezazadeh R., Siampour M., Samavi S., Salehi M. and Izadpanah K. 2011. Witches'-broom disease of lime affects seed germination and seedling growth but is not seed transmissible. Plant Disease 95: 419-422.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2016. Citrus fruit statistics 2015. http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus/en/.

Galetto L., Marzachi C., Marques R., Graziano C. and Bosco D. 2011. Effects of temperature and CO2 on phytoplasma multiplication pattern in vector and plant. Bulletin of Insectology 64 (Supplement): S151-S152.

Garnier M. and Bove J. M. 2000. Etiology of witches' broom disease of lime (WBDL). Proceedings International Society of Citriculture. IX Congress. 939-941.

Garnier M., Zreik L. and Bove J. M. 1991. Witches' broom, a lethal mycoplasmal disease of lime trees in the Sultanate of Oman and the United Arab Emirates. Plant Disease 75: 546-551.

Janick J. and Moore J. (eds). 1996. Fruit Breeding: Tree and Tropical Fruits, Volum 1. John Wiley & Sons, New York.

Khan I. A. 2000. Present status of lime and investigations on the witches' broom disease of lime in Oman. Proceedings of the International Society of Citriculture. IX Congress. 935-938.

Mattos Jr. D., Carlos E. F., Novelli V. M., de Azevedo F. A., Filho H. D. C. and Zaccheo P. V. C. (Eds.). 2016. Abstract book of international citrus congress, p 238.

Moghal S. S., Zidgali A. D. and Moustafa S. S. 1998. Natural host range and reaction of citrus species to witches' broom disease of lime (WBDL) in Oman. Pp 143-152. In: Proceedings of the IPM Conference, Sultan Qaboos University, Muscat.

Murray M. G. and Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.

Najafiniya M. 2016. Management of citrus die-back disease. Plant Pathology Science 5: 26-36 (in Persian with English summary).

Perez-Tornero O. and Porras I. 2008. Assessment of polyembryony in lemons: rescue and in vitro culture of immature embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture 93: 173-180.

Roose M. L. 2000. Identification and use of genetic resistance and tolerance to new disease. Proceedings of the International Society of Citriculture. IX Congress. 952-954.

Salehi M., Izadpanah K. and Rahimian H. 1997. Witches broom disease of lime in Sistan-Baluchestan, Iran. Journal of Plant Pathology 33: 76.

Salehi M., Izadpanah K. and Taghizadeh M. 2002. Witches' broom disease of lime in Iran: New distribution areas, experimental herbaceous hosts and transmission trials.Pp293-296. In: Proceedings of 15th International Organization of Citrus Virologists Conference, Riverside, CA.

Salehi M., Nejat N., Tavakoli A. R. and Izadpanah K. 2005. Reaction of citrus cultivars to *Candidatus* phytoplasma aurantifolia in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 363-376.

Salehi M., Bagheri A., Faghihi M. M. and Izadpanah K. 2017. Study of partial biological and behavioral traits of *Hishimonus phycitis*, vector of lime witches' broom, for management of the disease. Iran Journal of Plant Pathology 53: 96-75.

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: R. Razin and J.G. Tully (Eds), Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology, Volum 1, Academic Press, San Diego, California.

Sharafi A. A., Asadi Abkenar A., Sharafi A. and Masaeli M. 2016. Genetic variation assessment of acid lime accessions collected from south of Iran using SSR and ISSR molecular markers. Physiology and Molecular Biology of Plants 22: 87–95.

Timmer L. W., Garnsey S. M. and Graham J. H. (Eds). 2000. Compendium of Citrus Diseases, 2nd edn. St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press.

Zreik L., Carle P., Bove J. M. and Garnier M. 1995. Characterization of the mycoplasmalike organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, *'Candidatus Phytoplasma* aurantifolia'. International Journal of Systematic Bacteriology 45: 449-453.