دانشگاه مازندران

مجتمع آموزش عالی علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

دانشکده علوم زراعی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی

موضوع:

بررسی اثر متقابل ویروس تریستزای مرکبات و فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش

اساتید راهنما:

دکتر سید کمال کاظمی تبار

دکتر حشمت اله رحیمیان

استاد مشاور:

دکتر محسن مردی

اساتید داور:

دکتر نادعلی بابائیان

دکتر محمد علی تاجیک

نام دانشجو:

آیدین فروتن ندافی

آذر ماه ۱۳۸۸

سپاسگزاری:

خداوند متعال را با تمامی وجود سپاسگزارم که به من توفیق فراگیری علم و دانش را داد. وظیفه خود می دانم که از اساتید گرامی، دوستان و خانواده ام که در طول این تحقیق مرا یاری کرده اند تشکر و قدردانی نمایم.

بر خود لازم می دانم که از رهنمود های ارزشمند اساتید راهنما، جناب آقای دکتر حشمت اله رحیمیان استاد علم و اخلاق که از بدو تحصیل همواره استاد و راهبر من بوده و شاگردی ایشان از بزرگترین افتخارات زندگی من است و همچنین جناب آقای دکتر سید کمال کاظمی تبار استاد فرزانه ام که در تمامی مراحل از راهنمایی های سودمندشان بهره بردم، سپاسگزاری نمایم.

سپاس فراوان از استاد مشاور ارجمند جناب آقای دکتر محسن مردی که با هدایت های علمی و مدبرانه خویش طی مراحل تحقیق مرا یاری نمودند.

از اساتید محترم آقایان دکتر نادعلی بابائیان و دکتر محمد علی تاجیک که زحمت داوری پایان نامه را متقبل و نظرات اصلاحی ارزنده ای را ارائه فرمودند، قدردانی می نمایم.

از زحمات فراوان اساتید محترم گروه، جناب آقای دکتر قربانعلی نعمت زاده، جناب آقای دکتر غلامعلی رنجبر و جناب آقای دکتر همت اله پیردشتی کمال تشکر را دارم.

از همکاری و لطف کلیه عزیزان در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران و مجتمع آموزش عالی علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به خصوص جناب آقای مهندس سید مصطفی پیرسیدی، جناب آقای مهندس رضا غفاری، جناب آقای مهندس سید محمد علوی، جناب آقای دکتر علی برزگر، جناب آقای مهندس محسن شیخ حسن و جناب آقای مهندس عباس شالی کمال تشکر را دارم.

در نهایت از زحمات بی دریغ خانواده محترمم که نامشان گل واژه های عشق و امید در گستره یاد و خاطرم برای زندگی دیروز، امروز و فرداست، از صمیم قلب تشکر و از درگاه ایزد منان سلامت و سعادتشان را خواستارم.

تقدیم به:

پدر، مادر و برادر عزیزم که همچون تکیه گاهی استوار همواره حامی و مشوق من در تمام دوران تحصیل بودند و

همسرم امید دهنده آینده روشن فردا

بررسی اثر متقابل ویروس تریستزای مرکبات و فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش

آیدین فروتن ندافی[۱و۲]، سید کمال کاظمی تبار[۱]، حشمت اله رحیمیان[۱] و محسن مردی[۲]

۱- مجتمع آموزش عالی علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشگاه مازندران
۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

چکیده

بیماری جاروک لیمو ترش "*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia" که به عنوان میکروارگانیسم همراه آن تلقی می شود، از عوامل خسارتزای جدی و خطرناک لیمو ترش و دیگر مرکبات حساس در مناطق جنوبی ایران و کشور های حاشیه خلیج فارس می باشد. در این بررسی به منظور کنترل بیماری جاروک لیمو ترش، اثر متقابل ویروس تریستزای مرکبات و فایتوپلاسمای همراه جاروک در لیمو ترش مورد ارزیابی قرار گرفته تا اثرات سینرژیستی یا احیانا آنتاگونیستی آن ها مشخص شود. در این بررسی ۵۰ نهال یک ساله بذری لیمو ترش با استفاده از ۳ پیوندک به هر یک از دو استرین M1S و F ویروس تریستزا آلوده شدند. سه ماه پس از آلوده سازی، با مشاهده علائم ظاهری رگ روشنی (Vein clearing) و انجام آزمون های سرولوژیکی و مولکولی جهت تایید حضور ویروس در این گیاهان، آلوده سازی آن ها به جاروک لیمو ترش انجام گرفت. برای آلوده سازی دوم، ۱۵ نهال آلوده به هر استرین ویروس تریستزا و همچنین ۱۵ نهال سالم بذری به عنوان شاهد، توسط سه پیوندک به فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش آلوده شدند. حدود ۲ ماه پس از آلوده سازی، به منظور تعیین میزان عامل همراه جاروک لیمو ترش در نهال های آلوده به تریستزا- جارویی و نسبت به میزان موجود در نهال های فقط آلوده به جارویی، از Real-time PCR با استفاده از آغازگر های ژن پروتئین غشائی آنتی ژنیک فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش، استفاده شد. آنالیز داده ها توسط مقدار عددی چرخه آستانه (Ct) و بر اساس طرح کاملا تصادفی صورت گرفت و مشخص شد که تفاوت معنی داری در سطح ۱٪، بین تیمارهای مختلف آلوده به فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش در Real-time PCR وجود دارد. مقایسه میانگین ها با آزمون LSD (Least significant difference test) نشان داد که تفاوت معنی داری در سطح ۱٪، بین مقدار فایتوپلاسما، در نهال های فقط آلوده به جاروک لیمو ترش با مقدار آن روی نهال های آلوده به تریستزا-جاروک لیمو ترش وجود دارد و این امر نشان دهنده این است که دو استرین ویروس تریستزای به کار گرفته شده تاکنون به طور نسبی قادر به جلوگیری از افزایش جمعیت فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش بوده اند.

کلمات کلیدی: لیمو ترش، تریستزا، فایتوپلاسما، Real-time PCR.

فهرست مطالب

عنوان | **صفحه**

فهرست مطالب ..... ح
فهرست اشکال ..... ر
فهرست جداول ..... س
فصل اول: مقدمه ۱
مقدمه ۲
فصل دوم: کلیات ۵
کلیات ۶
۲-۱- لیمو ترش ۶
۲-۲- بیماری جاروک لیمو ترش ۷
۲-۲-۱- تاریخچه ۷
۲-۲-۲- علائم بیماری جاروک لیمو ترش ۷
۲-۲-۳- عامل بیماری ۹
۲-۲-۴- خصوصیات کلی فایتوپلاسماها ۹
۲-۲-۵- خصوصیات ژنومی فایتوپلاسماها ۱۰
۲-۲-۶- اهمیت بیماری جاروک لیمو ترش ۱۰
۲-۲-۷- انتقال و انتشار بیماری جاروک لیمو ترش ۱۱
۲-۲-۸- دامنه میزبانی بیماری جاروک لیمو ترش ۱۴
۲-۲-۹- تشخیص بیماری های فایتوپلاسمائی ۱۴
۲-۲-۹-۱- Real-time PCR ۱۵
۲-۲-۹-۱-۱- روش‌های سنجش با Real-time PCR ۱۶
۲-۲-۹-۱-۲- روش‌های تعیین کمیت با Real-time PCR ۲۳
۲-۲-۹-۱-۳- مزایای استفاده از Real-time PCR ۲۷
۲-۳- ویروس تریستزای مرکبات ۲۸
۲-۳-۱- تاریخچه و مناطق انتشار ۲۸
۲-۳-۲- اهمیت بیماری ویروسی تریستزای مرکبات ۲۹
۲-۳-۳- علائم بیماری تریستزا ۲۹
۲-۳-۴- دامنه میزبانی ویروس تریستزای مرکبات ۳۰
۲-۳-۵- عامل بیماری تریستزا ۳۰
۲-۳-۶- رده بندی و خصوصیات مرفولوژیکی CTV ۳۱

عنوان	صفحه

۲-۳-۷- ساختار ژنی ویروس تریستزای مرکبات ۳۱
۲-۳-۸- همانندسازی و تکثیر ویروس تریستزای مرکبات ۳۲
۲-۳-۹- انتقال ویروس تریستزای مرکبات ۳۳
فصل سوم: بررسی منابع ۳۶
بررسی منابع ۳۷
۳-۱- علل ایجاد علائم بیماری جاروک لیمو ترش ۳۷
۳-۲- کشف فایتوپلاسماها به عنوان عوامل همراه بیماری های گیاهی ۳۷
۳-۳- بررسی ژنوم فایتوپلاسماها ۳۸
۳-۴- طبقه بندی فایتوپلاسماها ۴۱
۳-۵- چگونگی ایجاد بیماری و اثر فایتوپلاسما در فیزیولوژی گیاهان آلوده و ناقلین ۴۷
۳-۶- تشخیص بیماری های فایتوپلاسمایی ۴۹
۳-۶-۱- شناسایی بر اساس علائم ظاهری ۴۹
۳-۶-۲- شناسایی به کمک تیمار با آنتی بیوتیک ها ۴۹
۳-۶-۳- شناسایی با روش های میکروسکوپی ۴۹
۳-۶-۴- آزمون های سرولوژیکی ۵۰
۳-۶-۵- شناسایی به وسیله روش های مولکولی ۵۲
۳-۷- کنترل بیماری فایتوپلاسمایی جاروک لیمو ترش ۵۵
فصل چهارم: مواد و روش ها ۵۸
مواد و روش ها ۵۹
۴-۱- مواد و لوازم آزمایش ۵۹
۴-۲- تهیه نهال ها و آلوده سازی ۵۹
۴-۲-۱- کاشت بذر ۵۹
۴-۲-۲- آلوده سازی ۵۹
۴-۳- ردیابی ویروس تریستزای مرکبات ۶۰
۴-۳-۱- آزمون الیزا ۶۰
۴-۳-۱-۱- مراحل انجام آزمون Tissue-print ELISA ۶۲
۴-۳-۲- تکثیر ژن CP25 ..... ۶۴
۴-۳-۲-۱- استخراج RNA کل ۶۴
۴-۳-۲-۲- بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده ۶۵
۴-۳-۲-۳- سنتز آغازگر های ویروس تریستزای مرکبات ۶۷
۴-۳-۲-۴- ساخت cDNA ژن CP25 ..... ۶۷

عنوان	صفحه

۴-۳-۲-۵- تکثیر cDNA با روش PCR ۶۸
۴-۳-۲-۶- تعیین خلوص و غلظت محصول PCR ۷۰
۴-۴- ردیابی فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش ۷۰
۴-۴-۱- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۷۱
۴-۴-۱-۱- استخراج DNA کل ۷۱
۴-۴-۱-۲- تعیین خلوص و غلظت اسید نوکلئیک استخراج شده ۷۳
۴-۴-۱-۳- آغازگر های جارویی لیمو ترش ۷۳
۴-۴-۱-۴- تکثیر DNA با روش PCR ۷۴
۴-۵- همسانه سازی محصولات PCR ویروس تریستزای مرکبات و فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش در ناقل pGEM-Teasy vector ۷۵
۴-۵-۱- جداسازی قطعات تکثیر شده با PCR ۷۵
۴-۵-۲- همسانه سازی ۷۶
۴-۵-۳- انتقال پلاسمید تراریخته به باکتری ۷۸
۴-۵-۳-۱- سلول های مستعد ۷۸
۴-۵-۳-۲- انتقال به درون باکتری ۷۹
۴-۵-۴- انتخاب یا غربال کلنی ها ۸۰
۴-۵-۵- استخراج پلاسمید ۸۰
۴-۵-۶- کلنی PCR ۸۲
۴-۵-۷- هضم آنزیمی ۸۲
۴-۵-۸- نگهداری باکتری ها در گلیسرول ۸۳
۴-۵-۹- استخراج پلاسمید با کیت ۸۳
۴-۵-۱۰- تعیین توالی ۸۳
۴-۵-۱۱- آنالیز کامپیوتری توالی ها ۸۳
۴-۶- تعیین میزان کمی فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش ۸۳
۴-۶-۱- استخراج DNA کل ۸۴
۴-۶-۲- سنتز آغازگر های جارویی لیمو ترش ۸۴
۴-۶-۳- ترسیم منحنی استاندارد برای Real-time PCR ۸۶
۴-۶-۴- واکنش Real-time PCR ۸۷
۴-۶-۵- آنالیز داده‌ها ۸۸
فصل پنجم: نتایج ۸۹
نتایج ۹۰

عنوان	صفحه

۵-۱- علائم ظاهری بیماری ۹۰
۵-۲- ردیابی ویروس تریستزای مرکبات ۹۱
۵-۲-۱- استفاده از آزمون Direct immunoprinting-ELISA ۹۱
۵-۲-۲- تکثیر ژن CP25 ویروس تریستزای مرکبات ۹۲
۵-۲-۲-۱- استخراج RNA کل و بررسی کمی و کیفی آن ۹۲
۵-۲-۲-۲- تکثیر ژن CP25 نهال های آلوده به CTV با روش RT-PCR ۹۳
۵-۳- ردیابی فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش ۹۳
۵-۳-۱- استخراج DNA کل و بررسی کمی و کیفی آن ۹۳
۵-۴- همسانه سازی محصولات PCR در پلاسمید pGEM ۹۵
۵-۵- تعیین توالی قطعات و آنالیز کامپیوتری آن ها ۹۸
۵-۶- تعیین میزان کمی فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش به روش Real-time PCR ۱۰۰
۵-۶-۱- استخراج DNA کل ۱۰۰
۵-۶-۲- تکثیر ژن کد کننده پروتئین غشائی جاروک لیمو ترش به روش PCR ۱۰۰
۵-۶-۳- تعیین توالی قطعات حاصل از آغازگر های مورد استفاده در Real-time PCR و آنالیز کامپیوتری آن ها ... ۱۰۱
۵-۶-۴- انجام Real-time PCR جهت تعیین میزان کمی فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش ۱۰۲
۵-۶-۴-۱- رسم منحنی استاندارد ۱۰۳
۵-۶-۴-۲- ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده ۱۰۷
۵-۶-۴-۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۱۰۹
فصل ششم: بحث ۱۱۲
بحث ۱۱۳
فصل هفتم: منابع ۱۱۸
منابع ۱۱۹
فصل هشتم: پیوست ۱۲۷
پیوست ۱۲۸
چکیده انگلیسی ۱۳۰

فهرست اشکال

عنوان | **صفحه**

شکل ۲-۱- علائم ظاهری بیماری جاروک لیمو ترش ۸
شکل ۲-۲- چرخه آلودگی یک بیماری همراه با یک فایتوپلاسمای قابل انتقال بوسیله زنجرک ۱۲
شکل ۲-۳- زنجرک *Hishimonus phycitis* ۱۳
شکل ۲-۴- منحنی تکثیر Real-time PCR ۱۶
شکل ۲-۵- تشعشع فلورسنت پس از قرار گرفتن سایبر سبز در شیار کوچک DNA دو رشته ای ۱۷
شکل ۲-۶- مکانیسم عمل سایبر سبز به عنوان عامل متصل شونده به DNA ۱۷
شکل ۲-۷- منحنی ذوب در Real-time PCR ۱۸
شکل۲-۸- چگونگی عملکرد کاوشگر تک من..... ۲۰
شکل ۲-۹- روش های مختلف سنجش میزان کمی بیان ژن ها توسط Real-time PCR ۲۲
شکل ۲-۱۰- منحنی تکثیر سری رقت ۲۵
شکل ۲-۱۱- منحنی استاندارد بدست آمده از سری رقت ۲۵
شکل ۲-۱۲- ساختار ژنی ویروس تریستزای مرکبات ۳۲
شکل ۳-۱- ترتیب اپران های موجود روی rRNA فایتوپلاسماها ۴۰
شکل ۳-۲- درخت فیلوژنتیکی مالیکیوت ها بر پایه توالی 16s rRNA ۴۲
شکل ۳-۳- درخت فیلوژنتیکی گونه های مختلف *Candidatus* Phytoplasma ۴۶
شکل ۴-۱- نقشه فیزیکی پلاسمید pGEM (برگرفته از سایت www.promega.com) ۷۷
شکل ۴-۲- نقشه فیزیکی پلاسمید pTZ57R/T (برگرفته از سایت www.fermentas.com) ۸۶
شکل ۵-۱- علائم رگ روشنی برگ لیمو ترش حاصل از پیوند توسط CTV ۹۰
شکل ۵-۲- علائم جاروک لیمو ترش حاصل از پیوند روی نهال سالم (الف) و گیاه آلوده به فقط CTV (ب)..... ۹۱
شکل ۵-۳- آزمون Direct immunoprinting-ELISA به منظور ردیابی ویروس تریستزای مرکبات ۹۲
شکل ۵-۴- الکتروفورز RNA استخراج شده حاصل از روش کومزینسکی و ساکچی (۱۹۸۷) در ژل آگاروز ۱٪..... ۹۲
شکل ۵-۵- الکتروفورز محصول های پروتئین پوششی (CP) ویروس تریستزای مرکبات تکثیر شده با آغازگر ها ۹۳
شکل ۵-۶- الکتروفورز DNA استخراج شده حاصل از روش CTAB (هانگ و همکاران، ۲۰۰۰) در ژل آگاروز ۱٪..... ۹۴
شکل ۵-۷- الکتروفورز محصول های RNA ریبوزومی 16s فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش تکثیر شده ۹۵
شکل ۵-۸- نتیجه کشت کلنی های *E. coli* ترانسفورم شده روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین.. ۹۶
شکل ۵-۹- نتیجه استخراج پلاسمید باکتری های *E. coli* ترانسفورم شده در ژل آگاروز ۱٪..... ۹۶
شکل ۵-۱۰- نتایج کلنی PCR کلنی های *E. coli* ترانسفورم شده در ژل آگاروز ۲٪..... ۹۷
شکل ۵-۱۱- الکتروفورز پلاسمید های pGEM حامل قطعات ۱۷۸۸ جفت بازی جاروک لیمو ترش و ۶۷۲ و ۱۵۷ ..... ۹۸
شکل ۵-۱۲- نتیجه همردیفی فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش که تشابه ۱۰۰٪ را با تنها توالی فایتوپلاسمای همراه .. ۹۹

عنوان	صفحه

شکل ۵-۱۳- الکتروفورز DNA استخراج شده حاصل از روش CTAB (هانگ و همکاران، ۲۰۰۰) در ژل آگاروز ۱٪ ۱۰۰

شکل ۵-۱۴- الکتروفورز محصولات PCR آغازگر های فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش در ژل آگاروز ۲٪..... ۱۰۱

شکل ۵-۱۵- نتیجه همردیفی ژن پروتئین غشائی آنتی ژنیک فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش که تشابه ۱۰۰٪ ۱۰۲

شکل ۵-۱۶- نمودار تکثیر سری رقت $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۷}$ پلاسمید واجد پروتئین غشائی آنتی ژنیک فایتوپلاسمای همراه جاروک.. ۱۰۴

شکل ۵-۱۷- نمودار لگاریتمی تکثیر سری رقت $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۷}$ پلاسمید واجد پروتئین غشائی آنتی ژنیک فایتوپلاسمای ۱۰۴

شکل ۵-۱۸- نمودار تکثیر نمونه های آلوده به جاروک لیمو ترش در مقایسه با سری رقت $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۷}$ پلاسمید واجد ۱۰۵

شکل ۵-۱۹- نمودار لگاریتمی تکثیر نمونه های آلوده به جاروک لیمو ترش در مقایسه با سری رقت $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۷}$ پلاسمید ... ۱۰۵

شکل ۵-۲۰- منحنی استاندارد حاصل از سری رقت $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۷}$ پلاسمید واجد پروتئین غشائی آنتی ژنیک فایتوپلاسمای ... ۱۰۶

شکل ۵-۲۱- منحنی استاندارد حاصل از سری رقت $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۷}$ پلاسمید واجد پروتئین غشائی آنتی ژنیک فایتوپلاسمای ... ۱۰۶

شکل ۵-۲۲- الکتروفورز محصولات PCR ژن پروتئین غشائی آنتی ژنیک فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش در ژل.. ۱۰۶

شکل ۵-۲۳- منحنی ذوب سری رقت محصول های واکنش زنجیره ای پلیمراز DNA پلاسمید واجد پروتئین غشائی ۱۰۸

شکل ۵-۲۴- منحنی ذوب سری رقت محصول های واکنش زنجیره ای پلیمراز DNA پلاسمید واجد پروتئین غشائی ۱۰۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۴-۱- ترکیب و میزان مواد به کار رفته برای تهیه بافر فسفات نمکی ۶۱
جدول ۴-۲- ترکیب و میزان مواد به کار رفته برای تهیه بافر زمینه ۶۱
جدول ۴-۳- ترکیب و میزان مواد به کار رفته برای استخراج RNA ۶۴
جدول ۴-۴- ترکیب و میزان مواد به کار رفته برای تهیه ژل آگاروز ۱٪ ۶۶
جدول ۴-۵- ترکیب و میزان مواد به کار رفته برای تهیه بافر ۱۰X MOPS (pH=۷)..... ۶۶
جدول ۴-۶- ترکیب و میزان مواد به کار رفته برای تهیه بافر بارگذاری RNA ۶۷
جدول ۴-۷- آغازگر های مورد استفاده جهت ردیابی ویروس تریستزای مرکبات ۶۷
جدول ۴-۸- غلظت مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR برای تکثیر قطعه cDNA ژن CP25 ویروس تریستزا ۶۹
جدول۴-۹- شرایط دمایی و زمانی مراحل مختلف واکنش PCR با استفاده از آغازگر های 91F و 92R ۶۹
جدول ۴-۱۰- شرایط دمایی و زمانی مراحل مختلف واکنش PCR با استفاده از آغازگر های ۶۹
جدول ۴-۱۱- ترکیب و میزان مواد مورد نیاز برای تهیه بافر ۵۰X TAE ۷۰
جدول ۴-۱۲- ترکیب و میزان مواد به کار رفته برای استخراج DNA ۷۱
جدول ۴-۱۳- آغازگر های مورد استفاده جهت ردیابی فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش ۷۳
جدول ۴-۱۴- غلظت مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR برای جفت آغازگر عمومی فایتوپلاسمایی P1/P7 ... ۷۴
جدول ۴-۱۵- شرایط دمایی و زمانی مراحل مختلف واکنش PCR با استفاده از آغازگر های P1 و P7 ..... ۷۴
جدول ۴-۱۶- شرایط دمایی و زمانی مراحل مختلف واکنش PCR با استفاده از آغازگر های R16F2n و R16R2 ..... ۷۵
جدول ۴-۱۷- مواد مورد نیاز جهت واکنش الحاق ۷۷
جدول ۴-۱۸- ترکیب واکنش هضم برای جدا کردن قطعات الحاقی از پلاسمید ۸۲
جدول ۴-۱۹- آغازگر های مورد استفاده جهت ردیابی فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش ۸۴
جدول ۴-۲۰- غلظت مواد مورد استفاده جهت تکثیر پروتئین غشائی جاروک لیمو ترش در واکنش PCR ۸۵
جدول ۴-۲۱- شرایط دمایی و زمانی مراحل مختلف واکنش PCR با استفاده از آغازگر های ۸۵
جدول ۴-۲۲- غلظت مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش Real-time PCR ۸۸
جدول ۴-۲۳- شرایط دمایی و زمانی مراحل مختلف واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر های ۸۸
جدول ۵-۱- شرایط ایده آل و آزمون منحنی استاندارد سری رقت 10^{1} تا 10^{7} ۱۰۳
جدول ۵-۲- داده های آنالیز شده Real-time PCR توسط نرم افزار Bio-Rad iCycler software, version 3.06070 .. ۱۱۰
جدول ۵-۳- چرخه آستانه (Ct) و میانگین چرخه آستانه فایتوپلاسما در تیمار های مختلف ۱۱۱
جدول ۵-۴- جدول تجزیه واریانس طرح کاملا تصادفی تیمار های مختلف آلوده به جاروک لیمو ترش ۱۱۱
جدول ۵-۵- مقایسه میانگین کمی فایتوپلاسما در تیمار های مختلف ۱۱۱
جدول ۸-۱- طبقه بندی فایتوپلاسما ها بر اساس مقایسه الگوی RFLP ناحیه 16s rRNA و توالی ژن پروتئین ریبوزومی ... ۱۲۸

فصل اول

مقدمه

مقدمه:

لیمو ترش یا لیمو عمانی (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) از مهمترین و اقتصادی ترین محصولات باغی استان های جنوبی کشور ما، به خصوص استان هرمزگان می باشد. سهم جهانی ایران از تولید لیمو ترش حدود ۴۰ درصد است که در سطح وسیعی معادل ۴۱۸۰۰ هکتار در کشور کشت می شود. استان هرمزگان با سطح زیر کشت ۱۹۱۰۰ هکتار و درآمد ناخالص ۴۱۱ میلیارد ریال، حدود ۵۰ درصد از تولید کشور را به خود اختصاص داده است. سطح زیر کشت لیمو ترش در جیرفت و کهنوج حدود ۷۰۰۰ هکتار با تولید سالانه ۸۴۰۰۰ تن و ارزش اقتصادی ۱۷ میلیارد تومان است (شبکه بیماری جاروک لیمو ترش ایران، ۱۳۸۸).

عامل احتمالی بیماری فایتوپلاسمایی جاروک لیمو ترش که در ابتدا The Mycoplasma-Like-Organism associated with witches' broom disease of lime نامیده می شد و بعدا تحت نام "*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia" نامگذاری گردید، تهدیدی جدی برای باغات لیمو ترش مناطق جنوبی ایران به حساب می آید . فایتوپلاسما ها که قبلا به عنوان موجودات شبه مایکوپلاسمائی (MLO[1]) شناخته می شدند، میکروارگانیسم های بدون دیواره سلولی بوده که در آوند های آبکشی گیاهان میزبان به سر می برند (کریستنسن[2] و همکاران، ۲۰۰۴).

علاوه بر لیمو ترش گیاهان دیگری از خانواده مرکبات مثل بکرائی (*C. reticulata* Hybrid)، بالنگ (*C. medica* L.)، لیمو شیرین (*C. limettioides* Tanaka)، لیمو لامپی (*C. limon* (L.) Hybrid)، راف لمون (*C. jambhiri* Lush.)، آلمو (*C.macrophylla* Wester)، رنگپور لایم (*C. limonia* Osbeck)، سیترنج ترویر (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *C. sinensis* (L.) Osbeck) و لمون (*C. limon* (L.) Burm. f.) و نیز چندین گیاه زراعی و غیر زراعی نیز از میزبان های فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش می باشند (لی[3] و همکاران، ۲۰۰۲؛ موقال[4] و همکاران، ۱۹۹۸).

[1] Mycoplasma Like Organism
[2] Christensen
[3] Lee
[4] Moghal

لیست بیماری های فایتوپلاسمائی در حال افزایش بوده و بسیاری از آن ها در سال های اخیر شناخته شده اند (لی و همکاران، ۲۰۰۰).

تا سال ۱۹۶۷ عوامل این گونه بیماری ها را ویروسی می دانستند، تا این که در سال ۱۹۶۷ دوئی[۱] و همکاران در آوند های آبکشی گیاهان مبتلا به زردی مینا به میکروارگانیسم هایی برخورد کردند که از نظر ساختار و شکل ظاهری مشابه مایکوپلاسما های بیماریزا در انسان و حیوانات بودند و پیشنهاد کردند که اصطلاح بیماری های شبه مایکوپلاسمایی برای این گونه بیماری ها به کار برده شود.

فایتوپلاسما ها به تتراسایکلین حساس، اما به دلیل فقدان دیواره سلولی به پنی سیلین مقاوم هستند (گارنیه[۲]، ۱۹۹۹). همچنین دارای ژنوم کوچکی با دامنه Kb ۱۶۰۰-۶۸۰ (اندازه ژنوم جارویی ۷۲۰Kbp می باشد) بوده و محتوی سیتوزین و گوانین (G + C) آن ها نیز کم می باشد (گاندرسن[۳] و همکاران، ۱۹۹۴؛ رزین[۴] و همکاران، ۱۹۹۸). این گروه از موجودات به شاخه مالیکیوت ها (Mollicutes) تعلق داشته و بعد ها مشخص گردید که رابطه خویشاوندی دوری با مایکوپلاسما ها دارند. به همین دلیل به پیشنهاد کمیته بین المللی رده بندی باکتری ها (ICSB[۵]) اصطلاح فایتوپلاسما جایگزین موجودات شبه مایکوپلاسمائی گردید (لی و همکاران، ۲۰۰۰). در رده بندی فایتوپلاسما ها، فایتوپلاسمای همراه جاروک لیمو ترش را در گروه 16SrII (Peanut WB group) قرار داده شده است (زریک و همکاران[۶]، ۱۹۹۵).

تشخیص این گونه بیماری ها معمولا مشکل است. استفاده از علائم (عقیم شدن گل ها، جاروی جادوگر، تشکیل گل های سبز رنگ (گل سبزی[۷])، تبدیل قسمت های گل به ساختمان های رویشی یا برگ مانند (برگسانی[۸]) یا اندام های رویشی، کاهش میانگره و کوتولگی گیاه، تغییر رنگ غیر فصل برگ یا ساقه، فنجانی شدن برگ ها، خوشه ای شدن انتهای شاخه ها، قهوه ای شدن آوند

[1] Doi
[2] Garnier
[3] Gundersen
[4] Razin
[5] International committee of systematic bacteriology
[6] Zreik
[7] Virescence
[8] Phyllody

های آبکشی، زوال عمومی، سرخشکیدگی و مرگ گیاه)، به کارگیری آزمون الیزا و روش های مولکولی برای شناسائی این بیماری ها به کار می روند (شیومی و سوگیورا [1]، ۱۹۸۴؛ چیکوسکی و سینها[2]، ۱۹۸۹).

تا قبل از پیشرفت کار های مولکولی، شناسائی فایتوپلاسما ها با استفاده از علائم ایجاد شده روی میزبان ها، استفاده از میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ نوری (مشاهده بافت آبکش رنگ آمیزی شده با DAPI [3] و دینس (Dienes)) انجام می گرفت (او ای پی پی/ای پی پی او [4]، ۲۰۰۶). با توسعه ابزار های مولکولی در سال های اخیر، پیشرفت قابل توجهی در شناسائی این بیماری ها در گیاهان و حشرات ناقل آن ها و نیز در طبقه بندی آن ها صورت گرفته است (زریک و همکاران، ۱۹۹۵؛ لی، ۲۰۰۰).

جهت کنترل بیماری های فایتوپلاسمائی، استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل، پایه های عاری از آلودگی، حذف علف های هرز میزبان، کنترل حشرات ناقل، امحاء گیاهان آلوده، انتقال ژن های مختل کننده رشد فایتوپلاسما ها و استفاده از آنتی بیوتیک هایی همچون تتراسایکلین توصیه گردیده است (گارنیه و بوه[5]، ۲۰۰۰؛ صالحی و تقی زاده، ۱۳۸۷؛ رحیمیان و جعفری، ۱۳۷۴).

در این بررسی اثر متقابل دو بیماری ویروس تریستزای مرکبات و فایتوپلاسمای همراه جاروک در لیمو ترش مورد ارزیابی قرار گرفته، تا با بررسی اثرات سینرژیستی یا احیانا آنتاگونیستی آن ها گام جدیدی در زمینه مدیریت این بیماری برداشته شود. این پدیده را می توان محتمل دانست که استرین هایی از تریستزا ضمن ایجاد آلودگی و وارد کردن خسارت معین یا محدودی، از خسارت شدید و مرگ نهایی درختان مبتلا به جاروک جلوگیری کنند.

[1] Shiomi and Sugiura
[2] Chiykowski and Sinha
[3] 4,6 diamindino-2-phenyl indole 2HCl
[4] OEPP/EPPO
[5] Bove

فصل دوم

کلیات

کلیات:

۲-۱- لیمو ترش

لیمو ترش (لایم یا لیمو عمانی یا لیمو شیشه یا لیمو شیراز یا لیمو آب یا آب شیراز) که در دنیا به نام های Mexican Lime، Key Lime، West Indian Lime و Egyptian Sour Lime خوانده می شود، از خانواده مرکبات (Rutaceae) و زیر خانواده Aurantioideae بوده و به گروه اسیدی لیمو ترش ها تعلق دارد. منشاء آن از جزایر شرق هند بوده و به همراه نارنج (*C. aurantium* L.) و لمون (*C. limon* (L.) Burm. f.) توسط اعراب در سال ۱۰۰۰ میلادی به خاور نزدیک و ایران و توسط سربازان جنگ های صلیبی به ایتالیا و آمریکا وارد شد (برکت و رودز[1]، ۱۹۷۶). لیمو ترش در ایران بیشتر در استان های فارس، هرمزگان، کرمان و سیستان و بلوچستان کاشته می شود. لایم بومی مناطق گرمسیری است. لذا کشت آن نیز به مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مرطوب یا نسبتا مرطوب محدود شده و به سرما حساس است. درختان لایم بسیار قوی، پر رشد، عادت به رشد عمودی و نیز ایجاد شاخه های پراکنده با برگ های کوچک دارند. داشتن تیغ های زیاد از مهمترین مشخصه های آن است. اندازه درخت متوسط و تاج آن پخش و بوته ای است. میوه ها خیلی کوچک، گرد تا تخم مرغی بوده و معمولا در بخش قاعده مدور هستند، ولی گاهی ممکن است گردن بسیار کوتاهی نیز داشته باشد. پوست میوه خیلی نازک با سطحی چرمی و صاف است که کاملا به گوشت چسبیده است. گوشت میوه سبز مایل به زرد، ترد، آبدار، بسیار اسیدی و معطر بوده و ترش ترین میوه مرکبات است. جوانه های گل و گل ها، ریز و گل دهی در تمام طول سال انجام می شود. البته فصل اصلی گل دهی بهار و اواخر تابستان است. جوانه های گل و گل های جوان تا حدودی ته رنگ ارغوانی دارند که پس از مدتی این رنگ خصوصا با گرم شدن هوا زایل خواهد شد (هاگسون[2]، ۱۹۷۹).

[1] Barrect and Rhods
[2] Hodgson

۲-۲- بیماری جاروک لیمو ترش

۲-۲-۱- تاریخچه

بیماری جارویی (جاروک) لیمو ترش (WBDL[1]) اولین بار در سال ۱۹۸۶ از کشور عمان و در سال ۱۹۸۹ از امارات متحده عربی (گارنیه و همکاران، ۱۹۹۱ a) و در سال ۱۹۹۸ از هندوستان (قوست[2] و همکاران، ۱۹۹۹) گزارش گردید. اما بر پایه وجود درختان بسیار آلوده می توان گفت که این بیماری در عمان از مدت ها پیشتر و احتمالا در دهه ۱۹۷۰ نیز وجود داشته است (بوه و همکاران، ۱۹۸۸). زریک و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارشات قبلی مبنی بر حضور شبه مایکوپلاسمای مرتبط با بیماری جارویی لیمو ترش در عمان را تایید کردند.

در ایران این بیماری اولین بار در سال ۱۹۹۷ در سیستان و بلوچستان (صالحی[3] و همکاران، ۱۹۹۷) و متعاقب آن در استان های هرمزگان، کرمان و فارس و برخی دیگر از مناطق جنوبی ایران گزارش شد (صالحی و همکاران، ۱۳۸۷). در سال ۲۰۰۰ بوه و همکاران وجود این بیماری را ایران مورد تائید قرار دادند.

۲-۲-۲- علائم بیماری جاروک لیمو ترش

علائم بارز بیماری به شکل جارو ظاهر می گردد. در یک شاخه رشد طولی ایجاد شده، برگ ها کوچکتر می شوند. با ایجاد انشعابات بیش از حد، فاصله میانگره ها کم شده، گیاه آلوده حالت رزت[4] و جارویی گرفته و به تدریج خشک می شود. رنگ برگ از سبز کمرنگ تا زرد و اندازه آن ها از کوچک تا بسیار کوچک متغیر است. شاخه آلوده هیچ گل و میوه ای تولید نکرده و فاقد تیغ می باشد. آلودگی به تدریج به شاخه های دیگر هم سرایت کرده، برگ ها خشک شده و ریزش کرده و محصول کاهش می یابد (او ای پی پی/ای پی پی او[5]، ۲۰۰۶) (شکل ۲-۱).

[1] Witches' broom disease of lime
[2] Ghost
[3] Salehi
[4] Rosette
[5] OEPP/EPPO

شکل ۲-۱- علائم ظاهری بیماری جاروک لیمو ترش. شماره های الف و ب به ترتیب بخشی از شاخه های نهال سالم و آلوده به جاروک لیمو ترش.

گسترش بیماری بسیار سریع بوده و ظرف مدت کمی با آلوده شدن چند درخت، تمام باغ آلوده می شود. درختان آلوده طی مدت ۴ تا ۱۰ سال از پای در می آیند (گارنیه و بوه، ۲۰۰۰). دوره کمون بیماری ۲ تا ۱۴ ماه است. انبوهی سر شاخه های کناری و تولید برگ هایی به رنگ سبز کمرنگ و تبدیل قسمت های هوایی سالم گیاه به ساختار های رویشی یا برگ مانند سبز رنگ (برگسانی) نیز جزء علائمی هستند که به وسیله آن ها می توان گروه های مختلفی از فایتوپلاسما ها را ردیابی کرد (چنگ و لی[1]، ۱۹۹۵؛ دیوی[2] و همکاران، ۱۹۸۱).

[1] Chang and Lee
[2] Davey