بسم الله الرحمن الرحیم
الحمد لله رب العالمین الرحمن الرحیم مالک یوم الدین
اهدنا الصراط المستقیم صراط الذین انعمت علیهم غیر المغضوب علیهم ولا الضالین

دانشکده علوم کشاورزی

مطالعه الگوی بیان ژن در گیاه متحمل گریپ فروت آلوده به باکتری عامل میوه سبز مرکبات (*Candidatus* Liberobacter asiaticus) در مرحله بروز علائم

پایان‌نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی‌ارشد

در رشته مهندسی کشاورزی- گرایش بیوتکنولوژی

حسین غلامپور

اساتید راهنما:

دکتر جابر کریمی دکتر مریم غائب زمهریر

استاد مشاور:

دکتر ناصر فرخی

دکتر علاءالدین کردناییج

دی ۱۳۹۱

	اظهار نامه دانشجو	شماره: تاریخ:

اینجانب ..... دانشجوی کارشناسی ارشد رشته..... / دکتری رشته.....(Ph.D)/ دستیاری تخصصی ..... گرایش ..... دانشکده .....دانشگاه شاهد، گواهی می دهم که پایان نامه/ رساله تدوین شده حاضر با عنوان؛ " ..... " به راهنمایی استاد محترم سرکار خانم دکتر/ جناب آقای دکتر.....، توسط شخص اینجانب انجام و صحت و اصالت مطالب تدوین شده در آن، مورد تأیید است و چنان چه هر زمان، دانشگاه کسب اطلاع کند که گزارش پایان نامه/ رساله حاضر صحت و اصالت لازم را نداشته، دانشگاه حق دارد، مدرک تحصیلی اینجانب را مسترد و ابطال نماید هم چنین اعلام می دارد در صورت بهره گیری از منابع مختلف شامل؛ گزارش های تحقیقاتی، رساله، پایان نامه، کتاب، مقالات تخصصی و غیره، به منبع مورد استفاده و پدید آورنده آن به طور دقیق ارجاع داده شده و نیز مطالب مندرج در پایان نامه/ رساله حاضر تاکنون برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی توسط اینجانب و یا سایر افراد به هیچ کجا ارایه نشده است. در تدوین متن پایان نامه/ رساله حاضر، چارچوب (فرمت) مصوب تدوین گزارش های پژوهشی تحصیلات تکمیلی دانشگاه شاهد به طور کامل مراعات شده و نهایتاً این که، کلیه حقوق مادی ناشی از گزارش پایان نامه/ رساله حاضر، متعلق به دانشگاه شاهد می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو(دست نویس):.....

امضاء دانشجو:

تاریخ:

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

آقای حسین غلامپور به شماره دانشجوئی: ۸۹۷۶۱۸۵۰۰۲

تحت عنوان: مطالعه الگوی بیان ژن در گیاه متحمل کریپ فروت آلوده به باکتری عامل میوه سبز مرکبات candidatusliberobacterasiaticus در مرحله بروز علائم

در تاریخ ۱۳۹۷/۱۲/۰۳ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی وتصویب نهائی قرار گرفت که توسط هیئت داوران شایسته ی درجه ..... تشخیص داده شد.

اعضای هیات داوران	مرتبه دانشگاهی	تخصص	امضاء
استاد / اساتید راهنما :			
۱- دکتر [illegible] کرمی	استادیار		
۲- دکتر مریم غایب زمهریر	استادیار		
استاد / اساتید مشاور:			
۱- دکتر[illegible] کردبچ	استادیار		
۲- دکتر [illegible] قرخلو	استادیار		
استادان یا محققان مدعو:			
۱- دکتر امیر محمد ناجی	استادیار		
۲- دکتر علی علیزاده علی ابادی	استادیار		

نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده : حسین ترابی

لایق نبود قطره به عمان بردن خار و خس صحرا به گلستان بردن

هر چند که رسم ما ضعیفان این است پای ملخی پیش سلیمان بردن

تقدیم به

آستان مقدس بقیة ا... الاعظم **حضرت قائم (عج)**،

روح ملکوتی بنیانگذار جمهوری اسلامی ایران، **حضرت امام خمینی (ره)**،

رهبر فرزانه و حکیم انقلاب اسلامی ایران، **حضرت امام خامنه‌ای (دامه برکاته)**،

شهدا، جانبازان، آزادگان و ایثارگران

آنان که در ایثار جان و مال خود سرفرازی، استقلال و اعتماد به نفس و جرأت فکر و عمل را برای ملت مسلمان به ارمغان آوردند.

و تقدیم به

پدرم

به پاس قلب بزرگش که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهش به شجاعت می گراید

مادرم

که خود را مدیون بزرگواری ها و دعای خیر او می دانم

و همسر فداکارم

که فرصت های زیاد متعلق به ایشان صرف این کار شد.

تقدیر و تشکر

در ابتدای کلام، از الطاف خداوند تبارک و تعالی که توفیق کسب علم و دانش را تا این مرحله به این حقیر عنایت فرمود، بی‌نهایت سپاسگزارم و امیدوارم که ذات اقدس و علم مطلق، همچنان مرا در این راه توفیق روزافزون ارزانی بخشد، زیرا براساس فرموده پیامبر عظیم‌الشأن اسلام (ص):

«علم را بیاموزید که فراگیری آن کاری نیکوست و از حسنات به شمار می‌رود، یاد دادن آن در حکم تسبیح خدا می‌باشد، درپی علم رفتن عبادت و علم را به دیگران آموختن صدقه است».

فراگیری علم و دانش برای مسلمانان بسیار ارزشمند و مورد تأکید می‌باشد. در اینجا لازم می‌دانم به مصداق حدیث شریف نبوی (ص): ***«من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق»*** از همه‌ی معلمان، دبیران و اساتید گرامی خویش به ویژه جناب آقای دکتر جابر کریمی، استاد فرهیخته و کارآزموده، و همچنین از سرکارخانم دکتر مریم غایب زمهریر به جهت نکته سنجی‌ها و ارشادات سازنده‌شان، جناب آقای دکتر ناصر فرخی و همچنین آقای دکتر علاءالدین کردناییج از بابت مشاوره‌های مفید و گره‌گشایشان به جهت همکاری بی‌دریغ و صمیمانه، تشکر و قدردانی به عمل آورده و به پیروی از فرمایش حکیمانه و آموزنده حضرت امام زین‌العابدین (ع) که فرموده‌اند:

«حق کسی که عهده‌دار آموزش تو شده، بر تو لازم است که او را از صمیم قلب احترام‌گذاری، او را بزرگ شماری، سخنانش را با توجه گوش کنی و اندیشه‌ات را مهیای فهم مطالب او نمایی»، همواره قدردان زحمات گرانبهای ایشان بوده و بتوانم از راهنمایی و دانش آنان بهره‌گیری نمایم.

و من‌ا... التوفیق

حسین غلامپور

دی ـ ۱۳۹۱

فهرست مطالب

فصل اول ۲

۱-۱ تاریخچه و اهمیت مرکبات ۲

۱-۲ گیاه شناسی ۴

۱-۳ بیماری‌های گریپ فروت ۵

۱-۴ تاریخچه بیماری میوه سبز مرکبات ۵

۱-۵ وضعیت بیماری میوه سبز مرکبات در ایران ۶

۱-۶ عامل بیماری میوه سبز مرکبات ۷

۱-۷ انتقال ۹

۱-۸ علائم بیماری ۱۱

۱-۹ واکنش ارقام مرکبات به بیماری ۱۲

۱-۱۰ خسارت اقتصادی ۱۳

۱-۱۱ نحوه شناسایی پاتوژن ۱۴

۱-۱۱-۱تشخیص مزرعه‌ایی و ردیابی بیولوژیکی ۱۴

۱-۱۱-۲ استفاده از آنتی بادی تک همسانه ۱۴

۱-۱۱-۳ تشخیص با PCR ۱۵

۱-۱۲ ژنوم باکتری عامل میوه سبز مرکبات ۱۶

۱-۱۳ چرخه زندگی ۱۸

۱-۱۴ روش‌های مدیریت بیماری ۱۹

۱-۱۵ برهمکنش میزبان پاتوژن ۲۰

۱-۱۶ روش‌های مطالعه بیان ژن ۲۶

۱-۱۶-۱ cDNA-AFLP ۲۶

فصل دوم ۳۰

۲-۱ تهیه نهال گریپ فروت ۳۰

۲-۲ تهیه پیوندک آلوده به بیماری ۳۰
۲-۳ اثبات تکثیر باکتری در نهال‌های گریپ‌فروت با استفاده از روش PCR ۳۱
۲-۴ نمونه برداری از گیاهان سالم و آلوده جهت انجام cDNA-AFLP ۳۱
۲-۵ جداسازی RNA کل از گیاه ۳۱
۲-۶ سنتز cDNA ۳۲
۲-۷ هضم آنزیمی ds cDNA ۳۳
۲-۸ AFLP ۳۴
۲-۹ جداسازی و تکثیر باندها از ژل پلی‌آکریل آمید ۳۵
۲-۱۰ آنالیز تعیین توالی ۳۶
فصل سوم ۳۷
۳-۱- نتایج ۳۷
۳-۱-۱ پیوند نمونه‌های سالم با پیوندک آلوده و ردیابی پاتوژن در گریپ‌فروت پس از بروز علائم در گیاه حساس پرتقال ۳۷
۳-۱-۲ جداسازی RNA کل از گیاه ۳۸
۳-۱-۳ cDNA-AFLP ۴۰
۳-۲ بحث ۴۵
۳-۲-۱ رونوشت شبیه به Aconitate Hydratase ۴۶
۳-۲-۲ رونوشت شبیه به Zeaxanthin epoxidase ۴۷
۳-۲-۳ رونوشت شبیه به Cellulose synthase ۴۹
۳-۲-۴ رونوشت شبیه به Cytochrome P450 monooxygenase ۵۰
۳-۲-۵ رونوشت شبیه ATP synthase ۵۲
۳-۲-۶ رونوشت شبیه به ژن rRNA ۵۳
۳-۲-۷ رونوشت شبیه به ژن مقاومت به بیماری تریستیزا ۵۳
۳-۲-۸ رونوشت شبیه به DNA Repair protein ۵۵
۳-۲-۹ رونوشتها با عمل ناشناخته ۵۸

نتیجه گیری ۵۹
پیشنهادات ۶۰
منابع ۶۱

فهرست جدول

جدول ۱-۱، آمار میزان تولید مرکبات (MT) در سال ۲۰۱۰ (http://faostat.fao.org) ۳

جدول۱-۲، واکنش گونه‌های مرکبات به بیماری میوه سبز مرکبات..... ۱۳

جدول۲-۱، توالی‌های آداپتورهای استفاده شده در آزمایش..... ۳۶

جدول۲-۲ ، توالی‌های پرایمرهای استفاده شده در آزمایش ۳۶

جدول ۲-۳، ترکیب جفت آغازگرهای واکنش انتخابی..... ۳۶

جدول۳-۱، ارزیابی کمّی نمونه‌های RNA توسط دستگاه نانودراپ مدل ND 1000..... ۳۹

جدول۳-۲، ارزیابی کمّی نمونه‌های cDNA توسط دستگاه نانودراپ مدل ND 1000 ..... ۴۰

جدول۳-۳، همولوژی پلی مورف‌ها با توالی‌های شناسایی شده در پایگاه داده NCBI..... ۴۳

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱، میزان تولید بر اساس تناژ و ارزش سالیانه مرکبات (http://faostat.fao.org) ۳

شکل ۱-۲، اندامهای شبهباکتریایی در آوندهای آبکش درخت پرتقال در عربستان ۹

شکل ۱-۳، پسیل آسیایی (Diaphorina citri) ناقل بیماری میوه سبز مرکبات ۱۱

شکل ۱-٤، علائم بیماری میوه سبز مرکبات روی برگ (بالا) و میوه (پایین) ۱۲

شکل ۳-۱، الگوی الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲ ٪ نمونه‌های RNA استخراج شده از گریپ فروت ۳۹

شکل ۳-۲ ، الگوی الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ ٪ cDNA گریپ فروت ۴۰

شکل ۳-۵، نمودار درصد پلی مورف‌های متعلق به گروه‌های عمل مختلف ۴۵

شکل ۳-٦، چرخه بیوسنتز زانتوفیل ۴۹

چکیده

بیماری میوه سبز مرکبات توسط باکتری سخت کشت *Candidatus* Liberobacter asiaticus ایجاد می‌شود که اولین بار در چین توصیف شده است و در سال ۱۹۱۹ با نام رسمی Huanglongbing معرفی گردید. این بیماری یکی از پرخسارت‌ترین بیماری‌های مرکبات درجنوب شرقی آسیا، شبه قاره هند، آفریقای جنوبی و شبه جزیره عربستان است. این بیماری در سال ۱۳۸۶ از جنوب ایران گزارش گردید. برای درک مکانیسم مولکولی برهمکنش میزبان-پاتوژن از تجزیه و تحلیل بیان ژن در سطح انبوه استفاده می‌شود. در این بررسی برهمکنش میزبان- پاتوژن با استفاده از روش cDNA-AFLP مورد مطالعه قرار گرفت. ترکیب آنزیمی در مرحله برش آنزیمی *Mse*I/*Eco*RI و ۱۰ ترکیب پرایمری برای تکثیر cDNA های هضم شده با آنزیم‌های مذکور، استفاده شد. در مجموع ۲۴ قطعه از نسخه‌های ژنی موجود در برگ گیاه گریپ‌فروت مایه‌زنی شده با عامل بیماری میوه سبز مرکبات در مقایسه با گیاه سالم به دست آمد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که به طور کلی بسیاری از ژن-ها در طی آلودگی بیانشان افزایش می‌یابد. در طی آلودگی بیان ژن‌های *ATP Synthase*، *cytochrome P450*، *cellulose synthase*، *DNA repair protein*، *citrus tristeza virus gene resistance*، *ribosomal RNA gene* افزایش یافت. این مطالعه اولین بررسی بر روی تغییرات بیان ژن‌ها در برهمکنش گریپ‌فروت و *Candidatus* Liberobacter asiaticus است که در طی بیماری میوه سبز مرکبات اتفاق می‌افتد. این نتایج می-تواند به پیشرفت اطلاعات مولکولی مربوط به روند بیماری و شناسایی ژن‌های دخیل در آن کمک نماید.

واژگان کلیدی: گریپ‌فروت، بیماری میوه سبز مرکبات، cDNA-AFLP

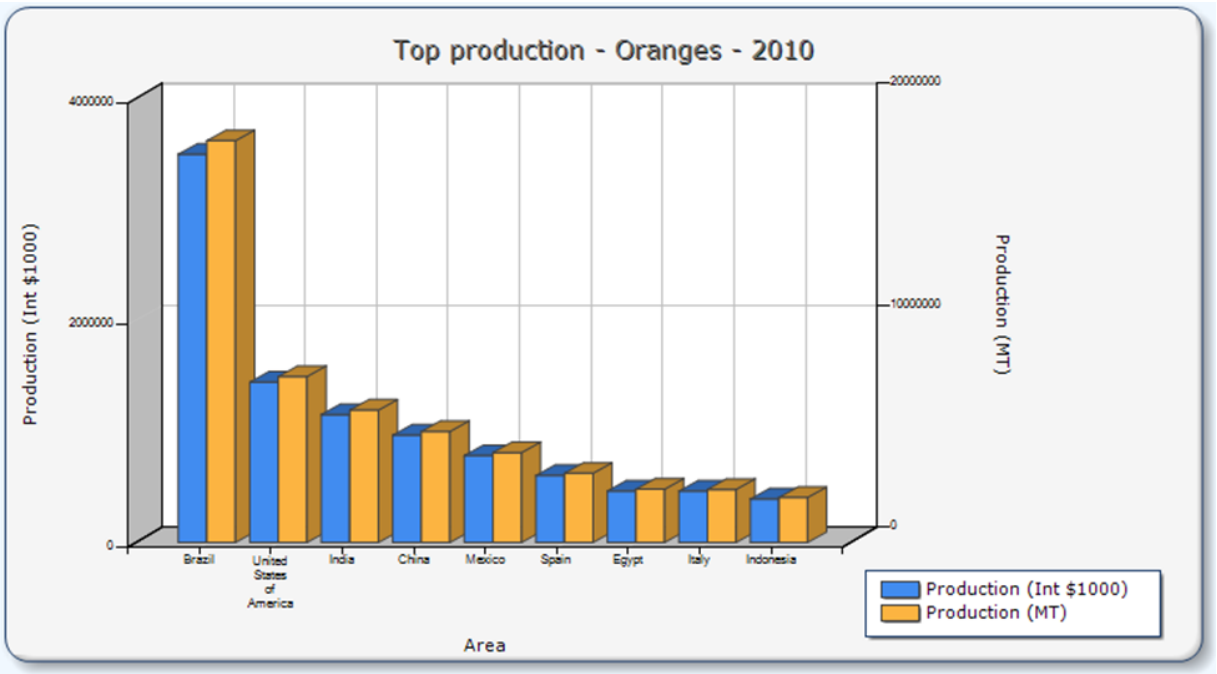
فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

فصل اول

۱-۱ تاریخچه و اهمیت مرکبات

اگر چه قدمت استفاده از میوه مرکبات در جهان به طور دقیق مشخص نیست، ولی بر اساس مستندات موجود، پرورش مرکبات احتمالا از ۲۴۰۰ سال قبل از میلاد در جنوب چین و هندوچین، خصوصا ویتنام جنوبی مرسوم بوده است. از سواحل دریای مازندران، که در آن انواع غیر اقتصادی مرکبات دیده می‌شود، نیز به عنوان مرکز انتشار انواع مرکبات در ایران نام برده شده است. گسترش کشت درختان مرکبات از کشورهای جنوب دریای مدیترانه به کشورهای اروپایی در خلال جنگ‌های صلیبی و به آمریکا توسط کریستف‌کلمب در سال ۱۴۹۲ میلادی، باعث شد امروزه درختان مرکبات در هر نقطه‌ای از جهان که شرایط آب و هوایی برای آن مناسب باشد، کاشت شود (علیزاده، ۱۳۸۸). امروزه مرکبات به عنوان یکی از منابع تولید ثروت، مبادلات تجاری و ایجاد اشتغال در کشورهای مرکبات خیز دنیا از جمله آرژانتین، استرالیا، برزیل، چین، کره وغیره از اهمیت اقتصادی به سزایی برخوردار است (شکل ۱-۱). در سال ۲۰۱۰ برزیل با تولید ۱۸,۱۰۱,۷۰۰ تن درمقام اول و ایران با تولید ۱,۵۰۲,۸۲۰ تن رتبه دوازدهم را در جهان داشت (FAO, 2010) .



شکل ۱-۱، میزان تولید بر اساس تناژ و ارزش سالیانه مرکبات (http://faostat.fao.org)

جدول ۱-۱، آمار میزان تولید مرکبات (MT) در سال ۲۰۱۰ (http://faostat.fao.org)

ردیف	منطقه	تولید (تن)
۱	برزیل	۱۸,۱۰۱,۷۰۰
۲	ایالت متحده آمریکا	۷,۴۷۷,۹۲۰
۳	هند	۵,۹۶۶,۴۰۰
۴	چین	۵,۰۰۳,۲۸۹
۵	مکزیک	۴,۰۵۱,۶۳۰
۶	اسپانیا	۳,۱۲۰,۰۰۰
۷	مصر	۲,۴۰۱,۰۲۰
۸	ایتالیا	۲,۳۹۳,۶۶۰
۹	اندونزی	۲,۰۲۸,۹۰۰
۱۰	ترکیه	۱,۷۱۰,۵۰۰
۱۱	پاکستان	۱,۵۰۵,۰۰۰
۱۲	ایران	۱,۵۰۲,۸۲۰
۱۳	آفریقای جنوبی	۱,۴۱۴,۵۹۰

سطح زیرکشت مرکبات کشور در سال ۱۳۸۷ حدود ۲۹۱ هزار هکتار برآورد شده بود که از این میزان ۸۲/۸ درصدآن درختان بارور مرکبات و ۱۷/۲درصد نهال می‌باشد. از حدود ۲۴۱ هزار هکتار سطح بارور درختان مرکبات کشور ۸۵/۳ درصد آن آبی و ۱۴/۷درصد آن به صورت دیم در استان گیلان است. استان مازندران با ۳۴/۶ درصد از اراضی بارور مرکبات کشور، بیشترین سطح را دارا است و استان‌های فارس، هرمزگان، منطقه جیرفت و کهنوج، گیلان و کرمان به ترتیب با دارا بودن ۲۳/۸، ۱۲/۴، ۶/۱،۱۱/۳ و ۵/۵ درصد از اراضی بارور مرکبات، مقام‌های دوم تا ششم کشت این محصول را به خود اختصاص داده‌اند و شش استان مزبور در مجموع ۹۳/۷ درصد سطح بارور مرکبات کشور را دارا بوده‌اند (جهاد کشاورزی، ۱۳۸۷).

در بین استان‌ها، بیشترین تولید مرکبات با ۴۵/۱ درصد از کل تولید این محصول، در استان مازندران بوده است. استان‌های فارس، منطقه جیرفت و کهنوج، هرمزگان، گیلان و کرمان به ترتیب با۲۷/۵، ۹/۷، ۹/۴، ۲/۵ و ۲/۱ درصد سهم در تولید مرکبات کشور در رتبه‌های بعدی قرار دارند. شش استان مذکور در مجموع ۹۶/۴ درصد مرکبات کشور را تولید کرده‌اند (جهاد کشاورزی، ۱۳۸۷).

۱-۲- گیاه شناسی

مرکبات(*Citrus*) از تیره سداب (Rutaceae) و زیر تیره اورانتوئیده (Aurantioidae) است. گیاهان این تیره چوبی با برگ‌هایی ساده یا مرکب و گل‌هایی منظم و هرمافرودیت هستند (قهرمان، ۱۳۷۳). در تیره سداب ۳۳ جنس مختلف وجود دارد. سه جنس آن یعنی پونسیروس[1]، فورچونلا[2] و سیتروس[3] در کشورهای تولید کننده مرکبات دارای اهمیت اقتصادی و کشاورزی هستند. جنس سیتروس شامل کلیه مرکبات متداول است. در واقع این جنس دارای گونه‌های زیادی از جمله گریپ‌فروت با نام علمی *Citrus paradise* است (علیزاده ۱۳۸۸).

1-*Poncirus*
2-*Fortunella*
3-*Citrus*

۱-۳- بیماری‌های گریپ فروت

عمده بیماری‌هایی که در جنس گریپ‌فروت مرکبات رخ می‌دهد شامل، بیماری‌های قارچی مثل ملانوز با عامل *Diaporthe citri* (Nelson, 2008) ، پوسیدگی‌های فیتوفترایی با انواع گونه‌های جنس .spp *Phytophthora* (Ezeibekwe, 2011)، اسکاپ در مرکبات با عامل *Elsinoe* (Rawal *et. al.*, 1984) *fawcettii*، لکه سیاه با عامل *Phoma citricarpa* (Millan, 1986)، بیماری‌های باکتریایی مثل بلایت با عامل *Xylella fastidiosa* (Young *et al.*, 1980)، شانکر مرکبات با عامل *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Powell *et. al.*, 1999) بیماری ویروسی تریستیزا با عامل Citrus tristeza virus (Maria *et al.*, 2006) است. همچنین عامل باکتریایی میوه سبز مرکبات در گریپ‌فروت بیماری ایجاد می‌کند (Bové, 2006).

۱-٤- تاریخچه بیماری میوه سبز مرکبات

بیماری میوه‌سبز مرکبات[1] برای اولین بار در اواخر قرن نوزدهم (۱۸۹۰) در جنوب چین، به عنوان یک بیماری با عاملی ناشناخته معروف به بیماری شاخه زرد[2] مشاهده شد (Zhao, 1981). نامی که کشاورزان چائوژو (نام منطقه‌ایی در چین) به این بیماری داده بودند بیماری اژدهای زرد یا بیماری شاخه زرد "huang long bing" (HLB) بود. (huang به معنی زرد و long به معنی اژدها یا شاخه و bing به معنی بیماری است). در قرن هجدهم، در هند علایم این بیماری، که به زوال مرکبات (citrus dieback) معروف است، اولین بار در استان‌های مرکزی هند مشاهده شد (Capoor, 1963)، سپس در سال ۱۸۸۸ توسط بوناویا علائم بیماری میوه سبز مرکبات از آسام هند توصیف گردید (Bonavia, 1888). عامل این بیماری سال‌ها نامعلوم بود. در سال۱۹۶۷ انتقال HLB توسط *Diaphorina citri* در هند نیز به اثبات رسید. به‌نظر می‌رسد این بیماری ابتدا از هند یا چین به همراه اندام‌های گیاهی وحشرات ناقل به‌سایر نقاط آسیا منتقل شده است (Da Graça,

[1] Citrus greening
[2] Yellow shoot disease

(2008. بیماری مشابهی در اوایل قرن بیستم (۱۹۲۸) به‌نام بیماری شاخه زرد در منطقه‌ی در آفریقای جنوبی، که مرکبات برای اولین بار در قرن هفدهم وارد آن کشور شده بود نیز مشاهده گردید (Burke, 1967) که واژه‌ی "greening" یا میوه سبز به عنوان نام غالب این بیماری در این منطقه به‌کار رفت.

این بیماری به‌مرور از سایر کشورهای آسیایی و آفریقایی گزارش گردید. تا اینکه اخیرا گزارشاتی مبنی بر مشاهده و شناسائی این بیماری از قاره‌ی آمریکا، که قبل از آن مانند قاره‌های اروپا و استرالیا عاری از این بیماری بود، منتشر شده است. برای اولین بار، علائم HLB در ایالت سائوپولو (São Paulo) برزیل بر روی درخت پرتقال دیده شد و عامل آن مورد شناسائی دقیق قرارگرفت (Anonymous, 2004; Teixeira *et al.*, 2005 b) در فلوریدا نیز عامل HLB از روی درخت پوملو [Citrus grandis (L.) Osb.] مشاهده و گزارش گردید (Halbert, 2005)

۱-۵- وضعیت بیماری میوه سبز مرکبات در ایران

بیماری میوه سبز مرکبات از جنوب ایران گزارش شده است. بر اساس مطالعات انجام شده عامل بیماری میوه سبز مرکبات در ایران از فرم آسیایی است. بر اساس وجود پسیل آسیایی مرکبات، و با استفاده از روش‌های تشخیص علائم بیماری در مرکبات، انتقال بیماری با پیوند، ردیابی عامل بیماری در بدن پسیل مرکبات و همچنین درختان پرتقال و نارنگی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی فرم آسیایی، در سال ۱۳۸۸ این بیماری در استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان گزارش شد (صالحی و همکاران، ۱۳۸۹). پسیل آسیایی مرکبات در تمامی مناطق مورد بازدید در استان‌های سیستان بلوچستان، هرمزگان و کرمان و شهرستان‌های داراب و لار استان فارس از روی درختان مرکبات جمع آوری شده است. پسیل هم‌اکنون در بسیاری از مناطق مرکبات خیز ایران (سیستان، هرمزگان، کرمان و فارس) وجود دارد و در برخی از نقاط به تنهایی عامل خسارت درختان است. ردیابی عامل میوه سبز مرکبات به کمک پی سی ار، وجود این بیماری را در

مناطقی از سیستان‌بلوچستان و هرمزگان قطعی می‌سازد. در سندرک و رودان در استان هرمزگان بیش از ۵۰ درصد درختان پرتقال دارای علائم بیماری هستند. بررسی‌های جدید نشان داده که فرم آسیایی این بیماری در مناطقی از استان کرمان شامل جیرفت، ارزوئیه وجود دارد(صالحی و همکاران، ۱۳۹۱).

۱-٦- عامل بیماری میوه سبز مرکبات

باتوجه به غیرقابل‌کشت بودن عامل این بیماری، امکان جداسازی و مطالعه‌ی آن برای سال‌ها، وجود نداشت. در سال ۱۹۶۸، پیشنهاد شد که چون این بیماری همانند ویروس‌های بیماری‌زای گیاهان، از طریق پیوند و نیز حشره‌ی پسیل از درخت آلوده به درختان سالم منتقل می‌شود، عامل بیماری را "ویروسی" باشد (Fraser and Singh, 1968 Salibe and Cortez, 1968). پس از سال ۱۹۶۷ که موجودات شبه مایکوپلاسمایی[1] (MLOs)، درگیاهان شناسایی شدند و عامل بیماری‌هایی هم‌چون ریزبرگی مرکبات[2] به این گروه منتسب گردید(Doi *et al.*, 1967)، عامل HLB را نیز شبه مایکوپلاسمایی پنداشتند (and Bové, 1970 Laflèche). عامل HLB اولین بار در سال ۱۹۷۰ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد (Laflèche and Bové, 1970). در درون بدن پسیل آلوده‌ی آسیایی (Chen *et al.*, 1973) و آفریقایی (Moll and Martin, 1973) نیز سلول‌های این بیمارگر با میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد و نشان داده شد که سلول‌های عامل این بیماری با دیواره‌ای ۲۵ نانومتری متفاوت از غشای سلول‌های شبه مایکوپلاسمائی، (۷ تا ۱۰ نانومتر) است (شکل۱-۲) (Saglio *et al.*, 1971; Garnier *et al.*, 1976). در سلول‌های این میکروارگانیسم، غشاء سیتوپلاسمی دو لایه با لایه‌ی پپتیدوگلایکانی، به صورت پوشش سه لایه‌ای، دیده می‌شود. به‌همین دلیل عامل بیماری، باکتری دارای دیواره‌ی سلولی (که مشتمل بر یک لایه پپتیدوگلایکانی و یک غشاء سیتوپلاسمی است) قلمداد شد (Saglio *et al.*, 1971; Garnier *et al.*, 1976). در سال ۱۹۸۴

[1] Mycoplasma-Like Organisms
[2] Stubborn

ماهیت باکتریایی بودن آن به اثبات رسید(Garnier and Bové, 1984) . ابعاد این باکتری میله‌ای شکل حدود ۳۵۰-۵۵۰ ×۶۰۰ - ۱۵۰۰ نانومتر می‌باشد (Su, 1998). عامل بیماری یک باکتری گِرم منفی سخت کِشت و محدود به آوند آبکش است (Ute and Kim, 2008). این باکتری قابل کشت نیست و بیرون از سلول‌های میزبان زنده نمی‌ماند به همین دلیل مطالعه آن سخت می‌باشد (Marilou *et al.*, 2002). برای تعیین جایگاه فیلوژنی باکتری از ناحیه 16S ribosomal DNA (16S rDNA) استفاده می‌شود. مقایسه توالی ناحیه 16S با توالی‌های موجود در پایگاه داده نشان می‌دهد که باکتری آسیایی و آفریقایی متعلق به زیر شاخه آلفا از شاخه Proteobacteria هستند. اعضای این کلاس باکتری‌های گرم منفی هستند. ارگانیسم‌ها در این گروه با سلول‌های یوکاریوت ارتباط دارند و در بسیاری از موارد توانایی زنده ماندن و رشد در بدن ناقل‌های از گروه بندپایان را دارند (Bové, 2006).

از نظر تاکسونومی این باکتری در رده Bacteria، شاخه Proteobacteria، دامنه Alphaproteobacteria، راسته Rhizobiales، خانواده Phyllobacteriaceae قرار دارد. نام علمی آن *Candidatus* Liberobacter است که برای آن سه گونه شناسایی شده است، که گونه آسیایی (*Ca* L. asiaticus) بیشترین پراکنش را در آسیا، گونه آفریقایی (*Ca* L. africanus) بیشترین پراکنش را در آفریقا و گونه آمریکایی (*Ca* L. americanus) بیشترین پراکنش را درآمریکا دارد (Bové, 2006).