Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 15:48 IRST on Monday February 24th 2020

ردیابی عامل بیماری ریزبرگی مرکبات در زنجرک‌های جمع آوری شده از جنوب استان کرمان

زهره لری[۱]، اکبر حسینی پور[۱*]، حسین معصومی[۱] و حشمت اله رحیمیان[۲]

(تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۴)

چکیده

ریزبرگی یا استابورن یکی از بیماری‌های مهم مرکبات در ایران است و بیمارگر آن یک میکوپلاسمای فنری شکل به نام *Spiroplasma citri* است. این بیمارگر در طبیعت توسط زنجرک‌های ناقل تغذیه کننده از شیره پرورده منتقل می‌شود. در این بررسی جهت ردیابی *S. citri* در ناقلین احتمالی، پس از تهیه آنتی سرم چند سانه‌ای علیه یک استرین *S. citri* ، زنجرک‌ها از روی علف‌های هرز وحشی و نیز از روی برخی از گیاهان زراعی مجاور باغ‌های مرکبات منطقه جیرفت جمع آوری شدند. تعداد ۱۲ گونه از زنجرک‌های جمع آوری شده با روش الایزای غیر مستقیم و نیز جداسازی و کشت در محیط کشت اسپیروپلاسمایی LD10 بررسی شدند. واکنش زنجرک‌های *Circulifer haematoceps*، *Orosius albicinctus*، *Psamotettix striatus* ، *Austroagallia sinuata* و *Psammotettix alienus* با آنتی سرم تهیه شده مثبت بود و از ۳ گونه اول *S. citri* جداسازی وکشت شد. زنجرک‌های یاد شده عمدتا از مزارع کنجد مجاور باغ‌های مرکبات جمع آوری شدند. بنابراین به نظر می‌رسد این زنجرک‌ها ی ناقل احتمالی و هم چنین کنجد به عنوان میزبان آنها نقش کلیدی در همه جاگیری *S. citri* در منطقه جیرفت دارند.

واژه‌های کلیدی: استابورن، زنجرک،جیرفت، *Spiroplasma citri*، *Circulifer haematoceps*

مقدمه

بیماری استابورن یا ریزبرگی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در کشور محسوب می‌شود که باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌گردد. بیماری استابورن در اوایل دهه ۱۹۰۰در کالیفرنیای آمریکا مشاهده شد و ابتدا توسط فاست در ۱۹۴۴ توصیف شد (۱۴). در سال ۱۹۷۲ مشخص گردید که عامل بیماری یک Mollicute متحرک و فنری شکل است که به این سبب به نام *Spiroplama citri* معرفی شد (۲۵). از نظر تاریخی *S. citri* اولین Mollicute بیماری‌زای گیاهی قابل کشت است که اصول بیماری شناسی کخ در مورد آن به اثبات رسید(۲۲). سپس از اکثر مناطق مرکبات خیز دنیا به ویژه مناطق گرم و خشک ازجمله شمال آفریقا، شرق حوزه دریای مدیترانه و خاور میانه از روی ارقام مختلف پرتقال، گریپ فروت و نارنگی‌ها گزارش شد(۱۷). کاکران و صمدی (۱۳) اولین محققینی هستند که با انتقال پیوندی (Graft transmission)، بیماری ریزبرگی را از یک درخت پرتقال رقم ناول Gillette

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیاران بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲. استاد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه مازندران
* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hosseini@mail.uk ac.ir

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 15:48 IRST on Monday February 24th 2020

آلوده با منشا جیرفت به نهال‌های بذری پرتقال رقم Pineapple منتقل نمودند. در ایران اولین جدایه *S. citri* در سال ۱۹۷۴ از یک نمونه مرکبات جمع آوری شده از ایران و در آزمایشگاه مرکز تحقیقات کشاورزی بردو درکشور فرانسه کشت شد(۱۰). سپس این بیمارگراز مرکبات شمال و جنوب کشور جداسازی و کشت شد(۱، ۲ و ۳).

عامل بیماری استابورن به آوندهای آبکش گیاهان آلوده محدود بوده و توسط زنجرک‌های خانواده Cicadellidae به شیوه پایای تکثیری منتقل می‌شود. در سال ۱۹۷۶ زنجرک *Circulifer tenellus* به عنوان ناقلی اصلی *S. citri* در کالیفرنیا گزارش شد (۲۳). در تحقیقات بعدی جهت شناسایی ناقلین *S. citri*، چند گونه زنجرک جمع آوری شده از مناطق مرکبات خیز کالیفرنیا بررسی گردیدند که از بین گونه‌های بررسی شده، فقط دو گونه *C. tenellus* و *Scaphytopius nitridus*، آن را به بوته‌های پروانش انتقال دادند و در این بررسی اگر چه زنجرک *Ollarianus strictus*حامل طبیعی بیمارگر تشخیص داده شد ولی انتقال *S. citri* به بوته‌های پروانش با این زنجرک میسر نبود(۲۴).

گسترش طبیعی بیماری استابورن در چند کشور از دنیای قدیم از جمله سوریه، مراکش، عراق و ترکیه بررسی شده است. در ترکیه در یک بررسی با وجود جداسازی و کشت *S. citri* از پنج گونه زنجرک، اما در بررسی‌های گلخانه‌ای، فقط گونه *C. haematoceps* قادر به انتقال این بیمارگر به بوته‌های پروانش بود (۱۸). لذا در این کشور و سایر کشورهای یاد شده، زنجرک *C. haematoceps* به عنوان ناقل مهم این بیمارگر معرفی گردیده است (۱۱). در ایران آلودگی ارقام محلی مرکبات (غیر وارداتی از کالیفرنیا یا کشورهای حوزه دریای مدیترانه) و هم‌چنین آلودگی نهال‌های بذری را گواه بر انتقال طبیعی *S. citri* در ایران دانسته‌اند (۱۰). هم چنین در ایران وجود و گسترش بیماری استابورن، به وجود دو زنجرک *C. haematoceps* و *C. tenellus* در مناطق مرکبات خیز کشور نسبت داده شده است (۱۰). صالحی و همکاران (۶) با استفاده از زنجرک *C. haematoceps* در شرایط آزمایشگاهی عامل بیماری استابورن را از یک نهال پرتقال آلوده به بیماری استابورن، به بوته‌های پروانش منتقل نمودند و در سایر مناطق مرکبات خیز کشور که وقوع بیماری استابورن در آنها گزارش شده است، بررسی‌هایی دراین زمینه انجام نشده است.

استان کرمان یکی از مناطق مهم مرکبات خیز کشور است وبر اساس آمار سال ۱۳۸۲، سطح زیر کشت باغ‌های مرکبات در این استان ۴۳۶۵۸/۵۵ هکتار و میزان تولید آن ۵۱۱۴۶۲ تن است که ۷۷/۸ درصد این سطح و نیز۸۳/۴ درصد تولید، به منطقه جیرفت اختصاص دارد(۴ و ۵). هم چنین یکی از بیماری‌های مهم مرکبات این منطقه به ویژه پرتقال و گریپ فروت، استابورن یا ریز برگی است (۱، ۲ و ۳). بنابراین لازم است عوامل موثر در همه جاگیری این بیماری ازجمله ناقلین عامل این بیماری مشخص گردند تا بتوان از گسترش بیماری به ویژه در باغ‌های جوان مرکبات جلوگیری نمود. در این خصوص هیچ گونه گزارش مبنی بر آلودگی طبیعی زنجرک‌ها به *S. citri* و نقش آنها در گسترش بیماری استابورن در کشور به ویژه در منطقه جیرفت در دست نیست. لذا این تحقیق با هدف شناسایی، ردیابی آلودگی طبیعی زنجرک‌ها به *S. citri* و شناسایی ناقلین بالقوه این بیمارگر انجام گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت *S. citri* از درختان پرتقال و پروانش آلوده

به منظور جداسازی و کشت *S. citri*، از باغ‌های مرکبات منطقه جیرفت بازدید و از میوه در ختان پرتقال رقم واشنگتن ناول با علائم مشکوک به آلودگی به بیماری استابورن نمونه برداری شد. میوه‌های آلوده پس از شستشوی سطحی با آب و صابون، با اتانول و شعله ضد عفونی سطحی شدند. سپس در شرایط سترون با تیغ جراحی سترون دستجات آوندی ناحیه متصل به دم میوه (Columella) به لوله‌های حاوی محیط کشت اسپیروپلاسمایی LD10 (۲۰) حاوی ۵۰۰ واحد پنیسیلین در میلی‌لیتر منتقل گردید. این لوله‌ها در دمای ۳۲°C نگه‌داری

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 15:48 IRST on Monday February 24th 2020

شدند. جهت جداسازی *S. citri* از بوته پروانش آلوده تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی زرقان فارس، ابتدا برگ‌های جوان پروانش با علائم کلروز حاشیه برگ با آب معمولی و نیز با آب مقطر سترون شسته شدند. سپس با تیغ سترون، رگبرگ‌های اصلی جداو ۰/۲ گرم از آنها در دو میلی‌لیتر محیط کشت اسپیروپلاسمایی LD10 له شدند و پس از گذشت ۳۰ دقیقه، عصاره به دست آمده از فیلترهای میلی پور با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. بعد از آن، صاف شده(Filtrate) به طور متوالی درلوله‌های حاوی محیط کشت یاد شده تا میزان $۱۰^{-۶}$×۱رقیق گردید. سپس این لوله‌ها در دمای ۳۲°C قرار داده شدند.

تهیه آنتی سرم

جهت تهیه آنتی سرم، *S. citri* جداسازی شده از مرکبات در یک لیتر محیط غذایی LD10 کشت داده شد. سوسپانسیون رشد یافته اسپیروپلاسمایی در مرحله رشد لگاریتمی به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور دقیقه و در دمای ۴°C سانتریفوژ گردید. جهت حذف پروتئین‌های سرم موجود در محیط کشت، سلول‌های ته نشین شده سه بار با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافرHEPES-sucrose (۱۵) شستشو داده شدند. رسوب نهایی در هشت میلی‌لیتر بافر یاد شده سوسپانسیون گردید. جهت تهیه آنتی سرم از خرگوش سفید نیوزلندی استفاده شد. در اولین تزریق نیم میلی‌لیتر از رسوب سلولی با نیم میلی‌لیتر همیار کامل (Complete adjuvant) مخلوط گردید و به ماهیچه‌های شانه‌های خرگوش تزریق شد. یک هفته بعد از تزریق اول، یک میلی‌لیتر از رسوب سلولی با یک میلی‌لیتر از این همیار مخلوط و به طور داخل پوستی در پنج نقطه ناحیه پشتی خرگوش تزریق گردید. دو تزریق دیگر به فواصل هفتگی مشابه شرایط هفته اول تکرار شد. سه هفته پس از آخرین تزریق از قلب حیوان خون گیری به عمل آمد. آنتی سرم خون حاصل، مطابق روش Ball و همکاران(۸) جداسازی گردید ودر دمای ۲۰°C- نگه‌داری شد.

منبع وجمع آوری حشرات

طی بهار، تابستان و اوایل پاییز سال‌های ۱۳۸۱ و۱۳۸۲ با تور حشره گیری، حشرات از روی علف‌های هرز داخل و خارج باغ‌های مرکبات منطقه جیرفت و هم چنین از مزارع ذرت، کنجد، ویونجه اطراف این باغ‌ها نیز جمع آوری شدند و در شرایط سرما (با صندوق یخدان) به آزمایشگاه منتقل گردیدند. سپس با اسپیراتور زنجرک‌ها از سایر حشرات تفکیک و تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شدند. هم‌چنین نمونه‌هایی از این زنجرک‌ها جهت شناسایی به مرکز تحقیقات کشاورزی استان فارس (زرقان) ارسال شد.

ردیابی *S. citri* در زنجرک‌ها

جهت ردیابی این بیمارگر در زنجرک‌ها، از الایزای غیر مسقیم استفاده شد. تعداد ۲ تا ۱۰ و در مواردی یک زنجرک از هرگونه در ۴/. میلی لیتر بافر نمونه (PBS حاوی ۵/. در هزار توئین-۲۰ و دو درصد پلی وینیل پیرولیدون) له و از آنها رقت ۱:۵تهیه گردید(۱۸). میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت یاد شده به چاهک‌های سینی الایزا افزوده و سینی به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C نگه‌داری شد.سپس چاهک‌ها سه بار با بافر شستشو (PBS حاوی ۰/۵ در هزار توئین-۲۰)، شسته شدند. بعد از آن به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر بافر پوششی (Coating buffer) اضافه شد و پس از دو ساعت نگه‌داری در دمای۳۷°C، چاهک‌ها سه بار با بافر شستشو، شسته شدند. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۵۰۰ آنتی سرم چند سانه‌ای تهیه شده علیه *S. citri* به چاهک‌ها اضافه گردید و بعد از دو ساعت نگه‌داری در دمای۳۷°C،چاهک‌ها با بافر یاد شده شستشو داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۲۰۰۰ گاما گلوبولین متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (Goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate "Sigma") به هر چاهک اضافه گردید و پس از دو ساعت نگه‌داری در دمای۳۷° C، چاهک‌ها شسته شدند.بعد از آن ۱۰۰ میکرولیتر ازمحلول حاوی ماده زمینه آنزیم (۴- نیترو فنیل فسفات) به

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 15:48 IRST on Monday February 24th 2020

چاهک‌ها اضافه گردید و پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه، میزان تغییر رنگ این محلول در طول موج ۴۰۵ نانومترو در دستگاه BIO-TEK Microplate Reader اندازه‌گیری شد. نمونه‌های با جذب بیش از میانگین جذب تکرارها (X) + سه برابر انحراف استاندارد شاهد ($\overline{X}$ + ۳SD) مثبت ارزیابی شدند.

جداسازی و کشت *S. citri* از زنجرک‌ها

تعداد ۵ زنجرک از هر گونه پس از ضد عفونی سطحی در محلول ده درصد وایتکس(معادل ۰/۵٪ هیپوکلریت سدیم) و شستشو با آب مقطر سترون، در دو میلی‌لیتر محیط کشت LD10 له شدند. سپس در شرایط سترون، عصاره به دست آمده از صافی‌های میلی پور سترون (با قطر منفذ ۴۵/. میکرومتر) عبور داده شد. صاف شده‌ها به طور متوالی تا رقت ۱×۱۰^{-۶} در لوله‌های حاوی محیط کشت یاد شده رقیق و در دمای ۳۲ °C نگه‌داری شدند.

آزمون ممانعت از رشد(Growth inhibition test)

این آزمون مطابق روشWithcomb و همکاران (۲۹) انجام شد. ابتدا با افزودن یک درصد آگارنوبل (Noble agar) به محیط کشت مایع LD10، محیط جامد آن تهیه وبه ظروف پتری اضافه شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر ازکشت فعال اسپیروپلا سماهای جداسازی شده از پرتقال‌های آلوده، بوته پروانش آلوده و نیز حشرات در سطح محیط کشت یاد شده پخش شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، دیسک‌های کاغذی آغشته به آنتی سرم تهیه شده علیه*S. citri* جداسازی شده ازیک درخت پرتقال آلوده به بیماری استابورن، در مرکز ظروف پتری مستقر و دردمای۳۲°C نگه‌داری شدند.

نتایج و بحث

جداسازی و کشت *S. citri* و تهیه آنتی سرم

حدود یک هفته پس از انتقال بخشی از دستجات آوندی ناحیه دم میوه پرتقال‌های مشکوک به آلودگی به محیط کشت LD10 و نگه‌داری در دما ۳۲° C ضمن تغییر رنگ قرمز محیط کشت به زرد، کدورت ملایمی درمحیط کشت دیده شد. هم چنین پس از گذشت حدود۱۰ روز، چنین تغییر رنگ و کدورتی در لوله‌های حاوی صاف شده حاصل از بوته پروانش آلوده(به جزء رقت‌های۱×۱۰^{-۲}و۱×۱۰^{-۱}) ظاهر گردید. جهت اطمینان از رشد *S. citri* درکشت‌های حاصل از پرتقال، در شرایط استریل مقدار کمی از این کشت‌ها با میکروسکپ زمینه سیاه بررسی شد و حضور سلول‌های فنری شکل *S. citri* در آنها تأیید گردید. در کشت‌های حاصل از بوته پروانش نیز سلول‌های اسپیروپلاسمایی مشاهده شد. پس از تزریق سلول‌های حاصل از کشت *S. citri* (جداسازی شده از پرتقال) به خرگوش سفید نیوزلندی، آنتی سرم به دست آمده توانست با رقت ۱:۵۰۰با روش الایزای غیر مستقیم اسپروپلاسماها را در بوته‌های پروانش آلوده و نیز در زنجرک‌ها تشخیص دهد. لذا این موضوع نشان از کیفیت خوب آنتی سرم تهیه شده است که با رقت یاد شده، اسپیروپلاسماها را دربوته‌های پروانش آلوده و نیز زنجرک‌ها ردیابی نمود.

ردیابی سرولوژیک (الایزا) *S. citri* در زنجرک‌ها

نام و فراوانی زنجرک‌های جمع آوری شده از روی پوشش گیاهی اطراف باغ‌های مرکبات منطقه جیرفت (علف‌های هرز، گیاهان زراعی شامل ذرت، یونجه و کنجد) در جدول ۱ منعکس شده است.

از بین ۱۵ گونه زنجرک جمع آوری شده، گونه‌های *A. sinuata*، *C. haematoceps*، *O. albicinctus* و *P. striatus* عمدتاً طی ماه‌های مرداد، شهریور و مهر از مزارع کنجد اطراف باغ‌های مرکبات جمع آوری شدند.

جهت ردیابی *S. citri* در زنجرک‌های جمع آوری شده،از روش الایزا و با استفاده از آنتی سرم تهیه شده علیه یک استرین *S. citri* استفاده شد. نتایج این ردیابی در جدول ۱ ارائه شده است. یکی از راه‌های ردیابی *S. citri* در گیاهان و نیز حشرات ناقل، استفاده از آنتی سرم‌های اختصاصی آن در روش

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 15:48 IRST on Monday February 24th 2020

جدول ۱. ردیابی *Spiroplasma citri* در زنجرک‌های جمع آوری شده از روی پوشش گیاهی داخل و اطراف باغ‌های مرکبات منطقه جیرفت با استفاده از روش الایزای مستقیم

نام خانواده	گونه زنجرک	فراوانی نسبی*	میانگین تعداد زنجرک استفاده شده جهت الایزا	نتیجه الایزا
Cicadellidae	*Anaceratagallia laevis*	+	۲-۴	-
	Austroagallia sinuata	+++	۲-۴	+
	Circulifer haematoceps	++	۲-۴	+
	Empoasca decipiens	+	۵-۷	-
	Eupelix cupidate	+	۲-۴	-
	Exitianus sp.	+	۲-۴	-
	Orosius albicinctus	+++	۳-۵	+
	Psammotettix alienus	++	۳-۵	+
	Psammotettix striatus	++	۳-۴	+
	Resilia schmidtgeni	+	۱	-
	Stirellus bicolor	+	۱-۲	-
	Toya propinqua	+	۲-۴	-
Cixiidae	*Reptalus lindbergi*	+	- **	- **
Delphacidae	*Sogatella vibix*	+	-	-
Tettigometridae	*Tettigometra* sp.	+	-	-

* : یک تادو زنجرک (+), ۱۰ زنجرک (++) و ۱۵ زنجرک (+++) در هر بار تور زدن

** : انجام نشد

سرولوژیک الایزا است(۷، ۱۲ و ۲۶). هر چند الایزا روش مفید و مقدماتی جهت غربال گیری حشرات حامل این بیمارگر در طبیعت است. اما لازم است واکنش‌های مثبت الایزا با جداسازی و کشت این بیمارگر در محیط‌های غذایی مناسب رشد آن، تأیید شوند (۲۷).

جداسازی و کشت *S. citri* از زنجرک‌ها و آزمون ممانعت از رشد

از کشت رقت‌های ۱×۱۰^{-۲} و ۱×۱۰^{-۳} صاف شده برخی از زنجرک‌هایی که واکنش الایزای آنهادر برابر آنتی سرم تهیه شده علیه یک استرین *S. citri* جداسازی شده از مرکبات مثبت بود، در محیط غذایی LD10 کشت‌های اسپیروپلاسمایی به دست آمد. از ۱۲ گونه زنجرک بررسی شده، فقط از سه گونه آنها (*C. haematoceps* ، *O. albicinctus* و *P. striatus*) اسپیروپلاسما قابل کشت و جداسازی بود و بیشترین تعداد کشت از زنجرک گونه *C. haematoceps* و سپس به ترتیب از دو گونه *O. albicinctus* و *P. striatus* به دست آمد (جدول ۲). از سایر گونه‌های با واکنش مثبت در برابر آنتی سرم یاد شده، هیچ‌گونه کشت اسپیروپلاسما یی حاصل نشد. عدم موفقیت در جداسازی و کشت اسپیروپلاسما از دو گونه زنجرک *P. alienus* و *A. sinuata* با واکنش مثبت در الایزا را می‌توان چنین تفسیر نمود، زنجرک‌هایی که به طور تصادفی انتخاب و جهت جداسازی و کشت مورد استفاده قرار گرفتند، عاری ازاسپیروپلاسما بودند یا عصاره آنها حاوی مواد بازدارنده‌ای است

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 15:48 IRST on Monday February 24th 2020

جدول ۲. جداسازی و کشت *Spiroplasma citri* از زنجرک‌های جمع آوری شده از مزارع کنجد و با واکنش مثبت به آنتی سرم *S. citri* مورد استفاده در الایزا

گونه زنجرک	واکنش الایزا	تعداد کشت‌های انجام شده	نتیجه کشت	
			منفی	مثبت
Austroagallia sinuata	+	۵	۵	۰
Circulifer haematoceps	+	۸	۳	۵
Orosius albicinctus	+	۶	۴	۲
Psammotettix alienus	+	۵	۵	۰
Psammotettix striatus	+	۵	۵	۱

که در رقت‌هایی که سلول‌های اسپیروپلاسما وجود دارند، از رشد آنها جلوگیری می‌نماید. به همین جهت معمولا در رقت‌های اولیه صاف شده‌ها، علی‌رغم وجود سلول‌های اسپیروپلاسمایی، این سلول‌ها رشد ننموده ولذا رنگ قرمز محیط غذایی تغییر نمی کند. این موضوع در مورد عصاره گیاهان آلوده به اسپیروپلاسما نیز صادق است. برای مثال عصاره ساقه بوته‌های ذرت و پروانش به ترتیب با رقت ۱به ۱۶۰ و ۱ به ۱۴۰ از رشد *S. citri* جلوگیری کردند (۲۱). در این تحقیق برخی از زنجرک‌های جمع‌آوری شده به دلیل فراوانی پایین جمعییت آنها، در آزمایش‌های الایزا و جداسازی وکشت بررسی نشدند (جدول۱).

آزمون بازداری شد مفید ترین روش برای توصیف سرولوژیک گونه‌های متعلق به رده Mollicutes است و از جمله حداقل روش‌های استاندارد برای توصیف گونه‌ای جدید از رده یاد شده است(۲۸). لذا برای تعیین ارتباط سرولوژیک اسپیروپلاسماهای جداسازی شده از زنجرک‌ها و نیز بوته پروانش باجدایه *S. citri* پرتقال، این آزمون انجام شد. پس از گذشت ۵ روز از نگه‌داری ظروف پتری حاوی قرص‌های کاغذی آغشته به آنتی سرم*S. citri*، میزان ناحیه ممانعت از رشد ناشی از اثر آنتی سرم در برابرآنتی ژن *S. citri* (جداسازی شده از درخت آلوده به بیماری استابورن)، هم چنین آنتی ژن اسپیرو پلاسماهای کشت شده از بوته پروانش و نیز از زنجرک‌ها به ترتیب به طور متوسط ۸، ۶ و ۶ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که استرین‌های جداسازی شده از بوته پروانش و نیز از زنجرک‌ها، رابطه سرولوژیک نزدیکی با *S. citri* جداسازی شده از درخت پرتقال آلوده به بیماری استابورن دارند.

در ترکیه بررسی‌هایی در خصوص نقش زنجرک‌ها در همه جاگیری*S. citri* انجام شده است. یکی از محصولات مهم منطقه Cukurova این کشور کنجد است که در یک محل از ناحیه یاد شده میزان آلودگی بوته‌های کنجد به *S. citri* تا ۲۰ درصد برآورد شده است(۱۹). در یک بررسی در ترکیه زنجرک‌های *C. haematoceps*، *O. orientalis*، *E. decipiens* و *Asymmetrasca decedens* از روی این بوته‌ها جمع آوری و با الایزا وآنتی سرم چند سانه‌ای علیه *S. citri* بررسی شدند و واکنش آنها مثبت بود. اما فقط ازدو گونه اول، کشت‌های اسپیروپلاسمایی با رابطه سرولوژیکی نزدیک با *S. citri* به دست آمد و هیچ توضیحی در خصوص عدم موفقیت کشت از سایر گونه‌ها ارائه نشده است. نتایج حاصل از بررسی در منطقه یاد شده نشان داده است که اگرمیزبان مناسبی برای هر دو ناقل و عامل بیماری استابورن وجود داشته باشد تعداد زنجرک‌های آلوده بیشتر خواهند شد به طوری که میزان آلودگی *C. haematoceps* در ناحیه اینجرلیک منطقهCukurova ترکیه تا ۸۰ درصد گزارش شده است (۱۹). در بررسی دیگر در ترکیه، ۱۷ گونه زنجرک جمع آوری شده از مناطق مرکبات خیز جنوب این کشور، با استفاده از روش الایزا واکنش آنها نسبت

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 15:48 IRST on Monday February 24th 2020

به آنتی سرم چند سانه‌ای *S. citri* مثبت بوده است و این بیمارگر فقط از پنج گونه زنجرک *Balclutha hebe*، *Cicadulina bipunctella*، *O. orientalis*، *Exitianus capicola* و *C. haematoceps* جداسازی و کشت شد.هم‌چنین از بین زنجرک‌های یاد شده فقط زنجرک *C. haematoceps* جمع‌آوری شده از روی کنجد و ذرت این اسپیروپلاسما را به بوته‌های کنجد انتقال داد (۱۸). در تحقیق حاضر نیز از برخی از زنجرک‌های جمع آوری شده از منطقه جیرفت با وجود واکنش مثبت در برابر آنتی سرم *S. citri*، در محیط غذایی این بیمارگر از آنها جداسازی و کشت نشد.

در بررسی‌های انجام شده در سوریه، مراکش، عراق و فرانسه (Corsica)، فقط زنجرک *C. haematoceps* به عنوان میزبان طبیعی *S. citri* معرفی شده است (۹ و ۱۱). در خصوص ایران گشترش بیماری استابورن مرکبات به فعالیت زنجرک *C. haematoceps* نسبت داده شده است. اما هیچ‌گونه تحقیقی در تأیید این ادعا به ویژه در مناطق مرکبات خیز استان کرمان صورت نگرفته است(۱۱). در ایران فقط در شرایط آزمایشگاهی زنجرک‌های سالم گونه *C. haematoceps* پس از تغذیه از یک نهال پرتقال آلوده به بیماری استابورن،*S. citri* را به بوته‌های پروانش منتقل نمود(۶). اما در آزمایش‌های انجام شده از این زنجرک، *S. citri* جداسازی و کشت انجام نشده است. در کالیفرنیا زنجرک *C. tenellus* به عنوان ناقل عامل بیماری استابورن معرفی شده است، به علاوه زنجرک‌های *S. nitridus* جمع آوری شده از طبیعت، کمتر از یک در صد *S. citri* را به بوته‌های پروانش منتقل نمودند (۲۴). در بررسی حاضر با وجود نمونه برداری در زمان‌های متفاوت، هیچ کدام ازاین دو زنجرک در حشرات نمونه برداری شده وجود نداشتند، هرچند زنجرک *C. tenellus* نسبت به گونه *C. haematoceps*، با پراکنش و جمعییت کمتر از ایران گزارش شده است (۱۱).

ردیابی *S. citri* در یک زنجرک لزوما نشانگر ناقل بودن آن زنجرک نخواهد بود. احتمالاً برخی از زنجرک‌های تغذیه کننده از شیره آوندهای آبکش، قادر به اخذ سلول‌های این بیمارگر هستند و برای مدتی در بدن حشره باقی می‌مانند. اما در گونه‌های ناقل واقعی، *S. citri* در بدن حشره تکثیر گردیده و پس از عبور از سدهای فیزیکی ناقل (۱۶) قادر به انتقال آن به گیاهان میزبان در طول دوره زندگی خواهند بود. حتی در مواردی برخی از استرین‌های *S. citri* در بدن زنجرک تکثیر می‌شوند اما قادر به انتقال به بوته‌های پروانش نیستند (۱).در تحقیق حاضر اگر چه *S. citri* همراه با برخی از زنجرک‌های جمع‌آوری شده از منطقه جیرفت ردیابی شد، اما لازم است در تحقیقات بعدی قابلیت انتقال طبیعی (Natural inoculativity) این زنجرک‌ها نیز بررسی گردد. تا کنون گزارشی مبنی بر انتقال بذری *S. citri* وجود ندارد و آلودگی اسپیروپلاسمایی ارقام محلی پرتقال (غیر وارداتی از کالیفرنیا و کشورهای حوزه دریای مدیترانه) در منطقه خفر استان فارس و جیرفت، گواه بر انتقال طبیعی *S. citri* توسط حشرات در ایران است (۱۰).از آنجایی که در تحقیق حاضر زنجرک‌هایی که از آنها *S. citri* جداسازی وکشت شد، از مزارع کنجد منطقه جیرفت جمع‌آوری شدند، چنین به نظر می‌رسد این زنجرک‌ها پس از برداشت محصول کنجد، به سایر گیاهان مجاور از جمله مرکبات مهاجرت نموده و پس از تغذیه از آنها، *S. citri* را نیز به آنها منتقل می‌نمایند. این اولین گزارش از جداسازی و کشت *S. citri* از سه گونه زنجرک *C. haematoceps*،*O. albicinctus* و*P. striatus* در ایران است وبا توجه به این که بیشترین تعداد کشت اسپیروپلاسمایی از زنجرک*C. haematoceps* به دست آمد (جدول۲)، به نظر می‌رسد این زنجرک نقش مهم‌تری در همه جاگیری *S. citri* در منطقه بررسی شده دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به لحاظ تامین هزینه‌های این تحقیق،از جناب آقای مهندس محمد تقی زاده به خاطر تشخیص زنجرک‌ها و نیز از راهنمایی‌ها ی سرکار خانم دکتر کولت سیار استاد دانشگاه بردو فرانسه صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 15:48 IRST on Monday February 24th 2020

منابع مورد استفاده

۱. حسینی پور، الف. ۱۳۷۹. بررسی پاره‌ای از ویژگی‌های سلولی و مولکولی اسپیروپلاسمای عامل ریزبرگی (استابرن) مرکبات کرمان، فارس و مازندران. پایان نامه دکتری. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشگاه تهران.

۲. حسینی پور، الف.،ح. رحیمیان ک. سیار و م. گارنیه.۱۳۸۰. بررسی پلی مورفیزم در DNA ژنومی استرین‌های *Spiroplasma citri* جداشده از مرکبات برخی مناطق شمالی و جنوبی ایران. مجله بیماری‌های گیاهی، ۳۷: ۱-۱۴.

۳. رحیمیان، ح.۱۳۶۲. پراکندگی و علائم بیماری ریزبرگی یا استابورن مرکبات در جنوب شرق ایران. خلاصه مقالات هفتمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، کرج.

۴. سازمان جهاد کشاوزی استان کرمان، اطلاعات و آمار محصولات باغی سال ۱۳۸۲. URL: http://www.kermanagrijahad.ir

۵. سازمان جهاد کشاورزی منطقه جیرفت وکهنوج، آمار نامه سال۱۳۸۲.

۶. صالحی، م.، ح. رحیمیان و ک. ایزدپناه. ۱۳۷۲. بیماری ریزبرگی مرکبات و ناقل آن در استان فارس. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، رشت.

7. Archer, D. B., R. Townsend and P. G. Markham. 1982. Detection of *Spiroplasma citri* in plants and insect hosts by ELISA. Plant Pathol. 31:299-306.
8. Ball, E. M., R. O. Hampton, S. H. De Boer and N. W. Schadd. 1990. Polyclonal antibodies. PP. 33-54. *In*: R. Hampton, E. Ball, and S. De Boer (Eds.), Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. APS Press, St. Paul, MN., U.S.A.
9. Bove, J. M. 1986. Stubborn and its natural transmission in the Mediterranean area and the Near East. FAO Plant Prot. Bull. 34:15-23.
10. Bove, J. M. 1995. Virus and Virus - Like Diseases of Citrus in the Near East Region. FAO, Rome.
11. Bove, J. M., A. Fos, J. Lallemand, A. Raie, Y. Ali, N. Ahmed, C. Saillard and J. C. Vignault. 1988. Epidemiology of *Spiroplasma citri* in the old world. PP. 300-303. *In*: Proc. 10th Conf. IOCV, Riverside, Univ. Calif.
12. Bove, J. M., J. C. Vignault and C. Saillard. 1987. *Spiroplasm citri* detection by enzymed- linked immunosorbent assay (ELISA), culture and dot hybridization. Israel J. Medical Sci. 23:729-731.
13. Cochran, L.C. and M. Samadi. 1976. Distribution of stubborn disease in Iran. PP. 10-12. *In*: Proc. 7th Conf. IOCV, Riverside, Univ. Calif.
14. Fawcett, H. S., J. C. Perry and J. C. Johnston.1944. The stubborn disease of citrus.Citrograph. 29:146-174.
15. Fletcher, J . 1987. Filter paper dot-immunobinding assay for detection of *Spiroplasma citri*. Appl. Environ. Microbiol. 53:183-184.
16. Fletcher, J., A. Wayadande, U. Melcher and F. Ye. 1998. The phytopathogenic mollicute- insect vector interface: A closer look. Phytopathol. 88:1351-1358.
17. Garnsey, S. M. and D. J. Gumpf. 1988. Stubborn. PP. 46-47. *In*: J. O. Whiteside, S. M. Garnsey and L.W. Timmer, (Eds.), Compendium of Citrus Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
18. Kertsing, U. and C. Sengonca. 1992. Detection of insect vectors of the citrus stubborn disease pathogen, *Spiroplasma citri* Saglio et al., in the citrus growing area of south Turk. J. Appl Ent.113:356-364.
19. Kersting, U., C. Sengonca and A. Cinar. 1992. Detection of non-citrus host plants and their associated leafhopper vectors in southern Turkey.FAO Plant Prot. Bull. 40:89-95.
20. Lee, I. M. and R. E. Davis. 1984. New media for rapid growth of *Spiroplasma citri* and corn stunt spiroplasma. Phytopathol. 78:84-89.
21. Liao, C. H., C. J. Chang and T. A. Chen. 1979. Spiroplasmostatic action of plant tissue extracts. PP. 99-103. *In*: Hong- Ji Su and R. E. McCoy (Eds.), Proc. R.O.C.-U.S. Coop. Sci. Semin. Mycoplasma Dis. Plants. National Science Council, Taipei, Taiwan.
22. Markham, P. G., R. Townsend, M. Bar-Joseph, M. J. Daniels, A. Plaskitt and B. M. Meddins. 1974. Spiroplasmas are the causal agents of citrus little leaf disease. Ann. Appl Biol. 78:49-57.
23. Oldfield, G. N., G. H. Kaloostian, H. D. Pierce, A. L. Granett and R. L. Blue.1976. Beet leafhopper transmits citrus stubborn disease. Calif. Agric 30:15.
24. Oldfield, G. N., D. A. Sullivan and E. C. Calavan. 1984. Inoculativity of leafhopper vectors of stubborn disease in California. PP. 125-130. *In*: Proc. 9th Conf. IOCV, Riverside, Univ. Calif.

25. Saglio, P., M. Lhospital, D. Lafle`che, G. Dupont, J. M. Bove´, J. G. Tully and E. A. Freundt. 1973. *Spiroplasma citri* gen. and sp. n.: A mycoplasma-like organism associated with "stubborn" disease of citrus. Int. J. Syst. Bacteriol. 23:191–204.
26. Saillard, C. and J. M. Bove. 1983. Application of ELISA to spiroplasma detection and classification. PP. 471-476. *In*: S. Razin and I. G. Tully (Eds.). Methods in Mycoplasmaology. Vol. I. Academic Press., USA.
27. Saillard, C., O. Garcia-Jurado, J. M. Bove, J. C. Vignault, G. Moutous, A. Fos, J. Bonfils, A. Nhami, R.Vogel and G. Viennot-Bourgin. 1980. Application of ELISA to the detection of *Spiroplasma citri* in plants and insects. PP. 145- 152. *In*: Proc. 8th Conf. IOCV, Riverside, Univ. Calif.
28. Tully, J. G. and R. F. Whitcomb. 1995. Minimal standards for description of new species of the class mollicutes. PP. 339-347. *In*: S. Razin and J. G. Tully (Eds.), Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology. Vol. I, Academic Press Inc., San Diego, Calif.
29. Whitcomb, R. F., J. G. Tully, P. McCawley and D. L. Rose. 1982. Application of the growth inhibition test to *Spiroplasma citri* taxonomy. Int. J. Sys. Bacteriol. 32:387-394.

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 15:48 IRST on Monday February 24th 2020