جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان حفظ نباتات کشور

راهنمای شناسائی و ردیابی

آفت قرنطینه خارجی

بیماری فیتوپلاسمای زردی کشنده گیلاس

Cherry lethal yellows phytoplasma

Acholeplasmatales:Acholeplasmataceae

تهیه و تنظیم:

احمد چراغیان

دفتر پایش و تحلیل خطر

1404

بیماری فیتوپلاسمائی زردی کشنده گیلاس

Cherry lethal yellows phytoplasma

Domain: Bacteria
Phylum: Firmicutes
Class: Mollicutes
Order: Acholeplasmatales Family:
Acholeplasmataceae

Common name:
Cherry phytoplasma

اهمیت اقتصادی:

شیوع بیماری زردی کشنده گیلاس (Prunus pseudocerasus) در سال 1989 در استان سیچوان چین گزارش شد. درختان بیمار در اواخر بهار دچار تغییر رنگ پراکنده و زرد در شاخ و برگ می شوند، برگها زودرس می ریزند و تولید میوه کم یا صفر است. درختان آلوده در 3–4 سال می میرند. مطالعات نشان داده اند که فیتوپلاسماهای مرتبط با این بیماری وجود دارد.

.

میزبانها:

درختان گیلاس *Prunus pseudocerasus*) **مهمترین میزبان این بیماری می باشند، لیست کلی میزبانها به شرح ذیل می باشد**

Major hosts: Cherry (*Prunus pseudocerasus* lindl.) possibly sweet and sour cherry

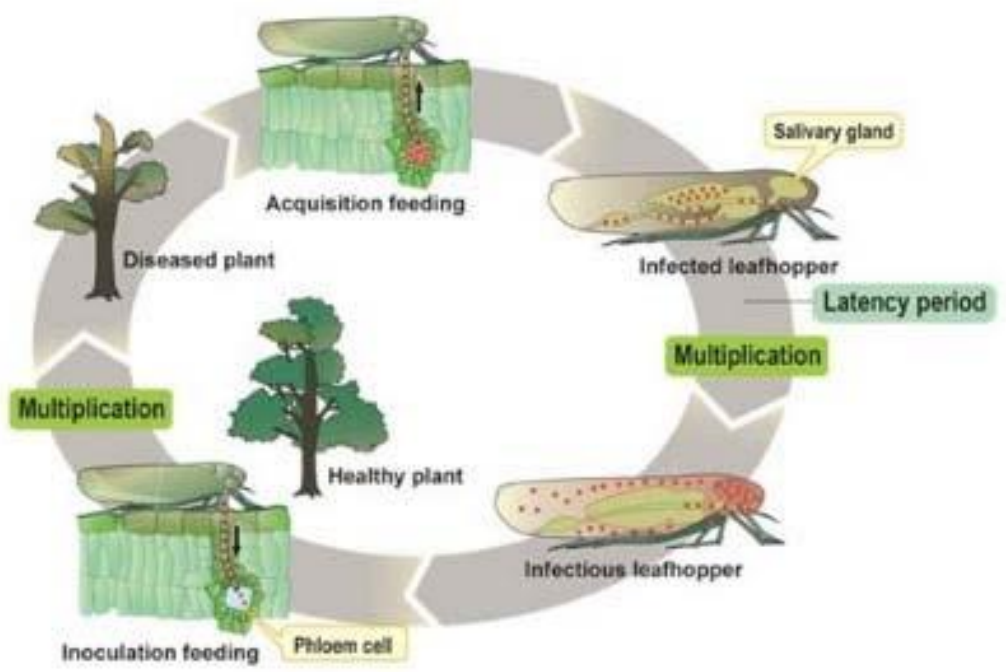
پراکنش جغرافیائی:

آسیا:چین

نقشه پراکنش بیماری فیتوپلاسمائی زردی کشنده گیلاس

زیست شناسی:

واردات بسیار زیاد گیلاس چینی (*Prunus pseudocerasus lindl*) در چین (Zhu and Shu 1992). درختان جوان در عرض 1 تا 3 سال پس از بروز علائم می میرند. 20 ساله ها در عرض 3 تا 5 سال می میرند. فیتوپلاسمایی که با فیتوپلاسمای نزدیک مرتبط است که باعث جارو زدن عناب می شود (لی و همکاران 1995). دو پاتوژن از یک زیر گروه جدید در گروه زرد نارون(S.Zhu et al.unpublished) .



Phytoplasma Life Cycle

علائم خسارت:

درختان آلوده در اواخر بهار دچار تغییر رنگ پراکنده شاخ و برگ می‌شوند، برگ‌زدایی زودرس می‌کنند، میوه‌هایی با اندازه کوچک تولید می‌کنند که بالغ نمی‌شوند یا اصلاً میوه ندارند. پس از 3 تا 5 سال علائم کم‌حالی (شکل 35) با مرگ همراه می‌شوند. Wichesbroom در بهار روی تنه درخت در حال مرگ رشد می کند و به عنوان منبعی برای گسترش بیشتر پاتوژن عمل می کند.

از طریق پیوند و احتمالاً توسط یک حشره ناقل منتقل می شود. انتشار پاتوژن در مزرعه، تجاوز به عنف در چانه است.

Fig. 35. Dieback symptoms in a cherry tree in China, caused by cherry lethal yellows phytoplasma. (Dr A. Hadidi, USDA-ARS, Beltsville)

راههای انتقال و انتشار:

از طریق پیوند و احتمالاً توسط یک حشره ناقل منتقل می شود. انتشار پاتوژن در مزرعه راپی در چانه است.

قطعات گیاهی که می توانند آفت را در تجارت/حمل و نقل حمل کنند

– پوست درخت: در داخل حمل می شود. زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است

– میوه ها (شامل غلاف): به صورت داخلی. زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است

– گل / گل آذین / مخروط / کاسه گل: در داخل حمل می شود. زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است

– برگ: در داخل بدن حمل می شود. زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است

– نهال/گیاهان ریز ازدیاد: تولید داخل. زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است

– ریشه ها: در داخل متحمل می شوند. زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است

– ساقه (بالای زمین) / ساقه / تنه / شاخه: حمل داخلی. زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است

اجزای گیاهی که برای حمل آفت در تجارت/حمل و نقل شناخته نشده اند

– رشد گیاهان کشت بافتی

- چوب

اقدامات قرنطینه ای:

فیتوپلاسمای زردهای کشنده گیلاس آفت قرنطینه ای برای ایران و برخی کشورهای دیگر Candidatus Phytoplasma است

روشهای ردیابی و بازرسی:

فیتوپلاسماهای شناسایی شده در درختان گیلاس با علائم زردهای کشنده (CLY) و در درختان عناب با علائم جارو جادوگر (JWB) در چین قبلاً به عنوان یک زیرگروه جدید در گروه V 16S rRNA (زردهای نارون [EY] و فیتوپلاسم‌های مرتبط) طبقه‌بندی شده بودند (تجزیه و تحلیل پلی‌مورفیسم طولی PCR1P6aD) دنباله ها بر اساس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی های ژن S rRNA16 این دو فیتوپلاسما و نمایندگان گروه های فیتوپلاسمایی شناخته شده، فیتوپلاسماهای CLY و JWB یک زیرگروه فیلوژنتیکی متمایز را در زیرشاخه فیتوپلاسمای زرد نارون تشکیل می دهند که با تجزیه و تحلیل تمایز ژن RFLP بر اساس همان RFLP همخوانی دارد. شناسایی بیشتر با تجزیه و تحلیل RFLP توالی ژن پروتئین ریبوزومی و کل DNA ژنومی با استفاده از پروب های DNA منتخب مشتق شده از فیتوپلاسمای EY نشان می دهد که فیتوپلاسم های CLY و JWB با هم مرتبط هستند، اما سویه های متمایز هستند. پیشنهاد می‌شود که فیتوپلاسم‌های CLY و JWB یک تاکسون جدید متمایز، در رتبه زیرگونه‌ها، از دیگر اعضای گروه S rRNA16 را نشان می‌دهند.

سنجش سرولوژی:

فیتوپلاسماها آبکش محدود هستند و بافت آوندی باید برای تشخیص موفقیت آمیز PCR استفاده شود. دمبرگ های برگ، رگبرگ میانی از برگ های علامت دار و خراشیدن پوست شاخه ها و شاخه ها را می توان از میزبان های گیاهی در حال رشد استفاده کرد. می توان از دمگل های میوه گیلاس استفاده کرد و در بادام از قسمت نوک تیز پایین پوسته در حالی که هنوز نرم است می توان استفاده کرد (Lauri Guerra Pers. Comm.). اگر گیاه خواب باشد، می توان از جوانه ها و خراشیدن پوست شاخه ها، تنه و ریشه ها استفاده کرد، اگرچه اینها احتمالاً کمتر قابل اعتماد هستند. در صورت استفاده از تراشیدن پوست از مواد چوبی، لایه مرده پوست بیرونی را جدا کنید تا بافت عروق داخلی سبز رنگ نمایان شود.

بیماری بدون علامت ممکن است رخ دهند و در صورت مشکوک بودن به این امر، نمونه برداری کامل از بافت آبکش مختلف از شاخه ها و شاخه های مختلف یک گیاه برای جداسازی فیتوپلاسما مهم است.

روش تشخیص فیتوپلاسما توصیه شده

• استخراج DNA کل با استفاده از روش توصیف شده توسط گرین و همکاران. (1999) که از a بافر استخراج CTAB و DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Cat. No. 69104).

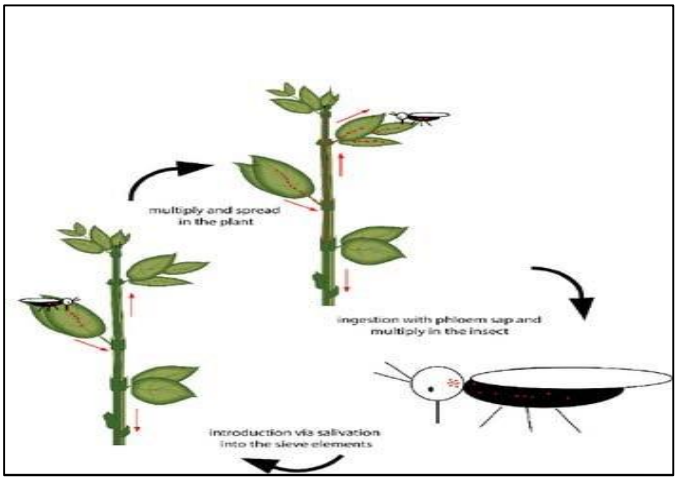
• PCR کنترل داخلی را با پرایمرهای rP1/fD2 انجام دهید. پرایمرهای rP1/fD2 ژن S rRNA16 را از بیشتر پروکاریوت‌ها و همچنین کلروپلاست‌ها تقویت می‌کنند. اگر این آزمایش منفی باشد، DNA وجود ندارد یا مهارکننده‌های DNA پلیمراز استخراج شده با اسید نوکلئیک وجود دارد. در این شرایط، سعی کنید اسید نوکلئیک را تمیز کنید (پیوست 1) یا استخراج را با روش دیگری تکرار کنید (پیوست 2).

PCR را با استفاده از روش زیر انجام دهید:

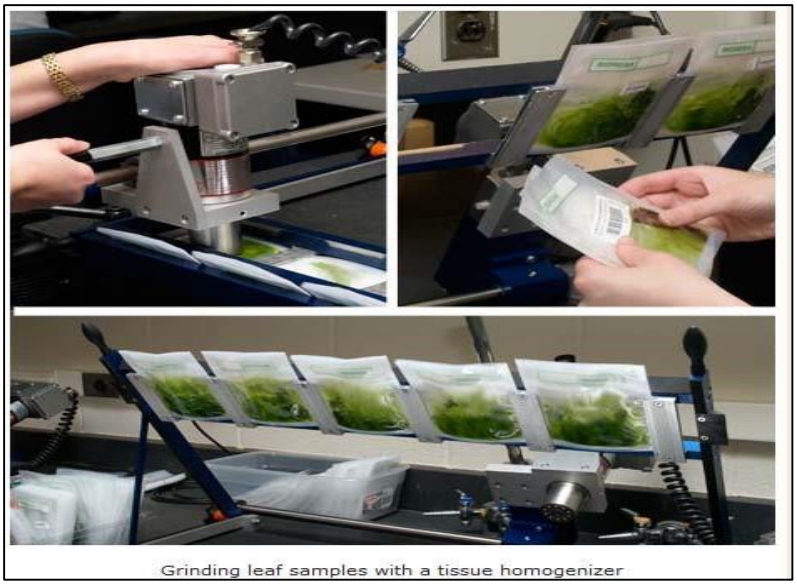
• از یک PCR تو در تو روی DNA خالص شده با استفاده از جفت پرایمر جهانی فیتوپلاسما، P1/P7 برای PCR مرحله اول و سپس جفت پرایمر R16F2n/R16R2 برای مرحله دوم PCR استفاده کنید (جدول 4).

• محصولات PCR را با الکتروفورز ژل آگارز آنالیز کنید.

برای تعیین هویت فیتوپلاسما، محصول PCR تودرتو را توالی مستقیم کنید. اگر توالی یابی مستقیم مشکل ساز باشد، محصول PCR را می توان کلون کرد و سپس با استفاده از روش های شبیه سازی و توالی یابی استاندارد، توالی یابی کرد. داده‌های توالی را می‌توان با استفاده از ابزار اصلی جستجوی هم‌ترازی محلی (BLAST) که در آدرس: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi موجود است، تجزیه و تحلیل کرد. اگر امکانات توالی یابی در دسترس نباشد، می توان از یک PCR تودرتو با استفاده از محصول PCR برای محصول PCR مرحله اول (P1/P7) و پرایمرهای اختصاصی گروه SrIII16 (جدول 4) برای شناسایی فیتوپلاسما در سطح گروه استفاده کرد، اما این مشخص نمی کند که کدام گونه فیتوپلاسمای SrIII16 وجود دارد.

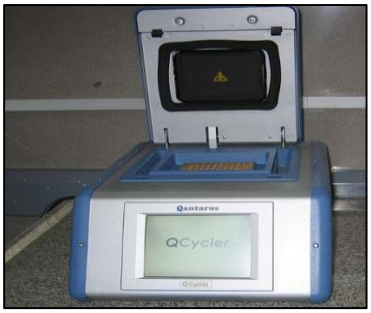


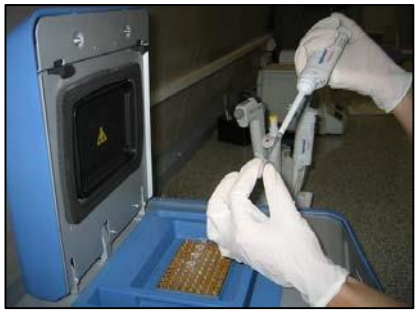
Excision of leaf tissue from orchard or homeowner samples to be processed



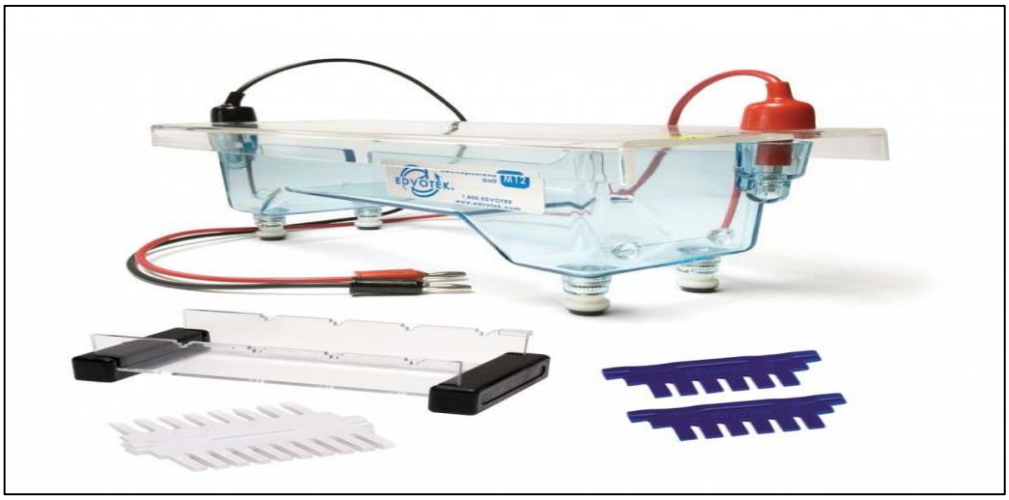
Grinding leaf samples with a tissue homogenizer

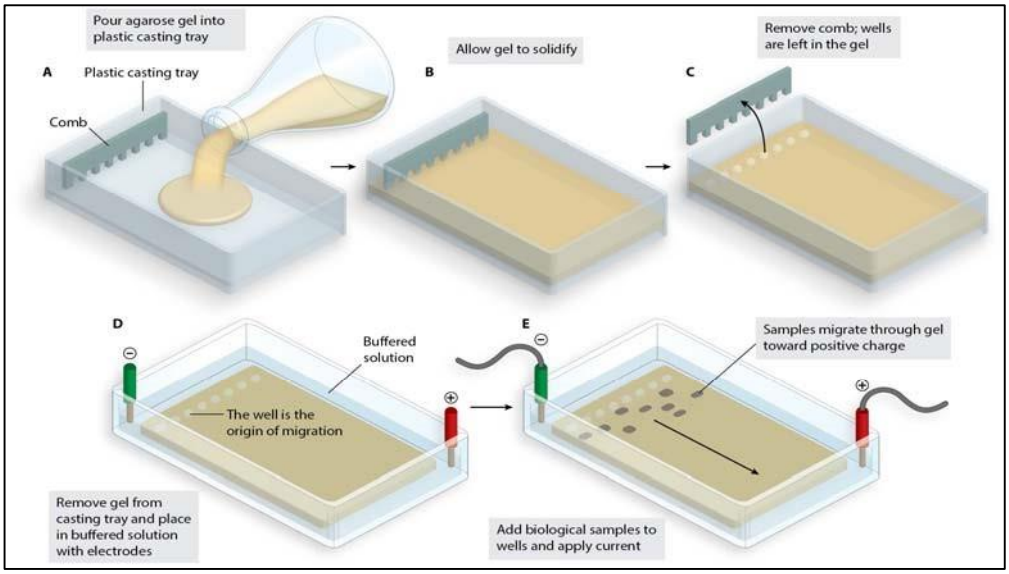
Grinding buffer is added to samples.

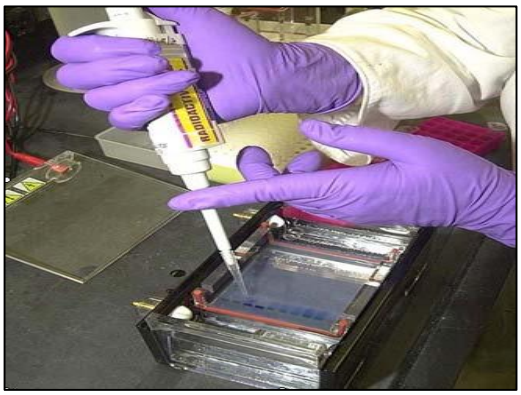


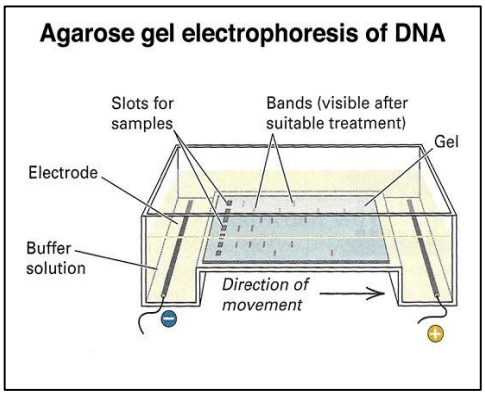


Detection and inspection Phytoplasma by PCR









Detection and inspection Phytoplasma by PCR

منابع:

CAB International. 2025. Crop Protection Compendium. 2025 Edition. CAB International. Wallingford, Oxon, UK.

Hasanzadeh ,Nader, 1995, principles and methods of plant bacteriology, scientific publication center of Islamic azad university,P 641.

Diekmann,M.AND C.A.J.Putter,Stone fruits,FAO/PGRI Technical guidelines for the safe Movement of germplasm.

http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/wordpress/wp-content/uploads/2015/03/NDP-17-Xdisease-phytoplasma-V1.2.pdf

http://www.actahort.org/books/472/472_94.htm

www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/download/1203/983

https://gd.eppo.int/reporting/article-4036