جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان حفظ نباتات کشور

راهنمای شناسائی و ردیابی

آفت قرنطینه خارجی

بیماری فیتوپلاسمایی پیچیدگی کلروتیک برگ زردآلو

Candidatus Phytoplasma prunorum Seemüller & Schneider, 2004

Acholeplasmatales: Acholeplasmataceae

تهیه و تنظیم:

احمد چراغیان

دفتر پایش و تحلیل خطر

1404

بیماری فیتوپلاسمائی پیچیدگی کلروتیک برگ زرآلو

Candidatus Phytoplasma prunorum **Seemüller & Schneider, 2004**

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

Other scientific names:

European stone fruit yellows phytoplasma Apricot chlorotic leafroll phytoplasma
Phytoplasma prunorum [Candidatus] Seemüller & Schneider, 2004

Common name:

Apricot chlorotic leafroll, apricot dieback, Cherry Molières disease, decline of Japanese plum, nectarine chlorotic leafroll, peach decline, peach rosette, peach vein enlargement peach yellows (European), plum leptonecrosis, Peach vein clearing

اهمیت اقتصادی:

بیماری فیتوپلاسمایی پیچیدگی کلروتیک برگ زردآلو(ESFYP) بر روی زردآلو و آلوی ژاپنی از مهم ترین بیماریهای این میزبان ها و علل غالب زوال و مرگ درختان میزبان است. درختان زردآلو 24-12 ماه پس از اولین بروز علائم از بین می روند. اگر منبع پایه هلو باشد، این دوره ممکن است به هفته ها کاهش یابد.

بهبودی مجدد برای درختان ردآلو بندرت اتفاق میافتد، اما بیشتر اوقات ممکن است این عمل در *Prunus salicina* رخ می دهد. در فرانسه، بیماری فیتوپلاسمائی پیچیدگی کلروتیک برگ زردآلو احتمالاً مسئول 60-70٪ موارد کاهش زردآلو است. مشکلات جدی زمانی به وجود می آیند که درختان برای اولین بار پس از 5 سال میوه می دهند. ممکن است هر سال 5 درصد از درختان کشته شوند. در کشورهای دیگر که این بیماری رخ می دهد، *P. salicina* به عنوان میزبان مهم تر به نظر می رسد. در فرانسه، این بیماری در یک زمان باعث مرگ هزاران درخت آلو و گیلاس شد، اما به نظر می رسد در حال حاضر نادر است.

میزبانها:

درختان زردآلو مهمترین میزبان این بیماری می باشند، لیست کلی میزبانها به شرح ذیل می باشد

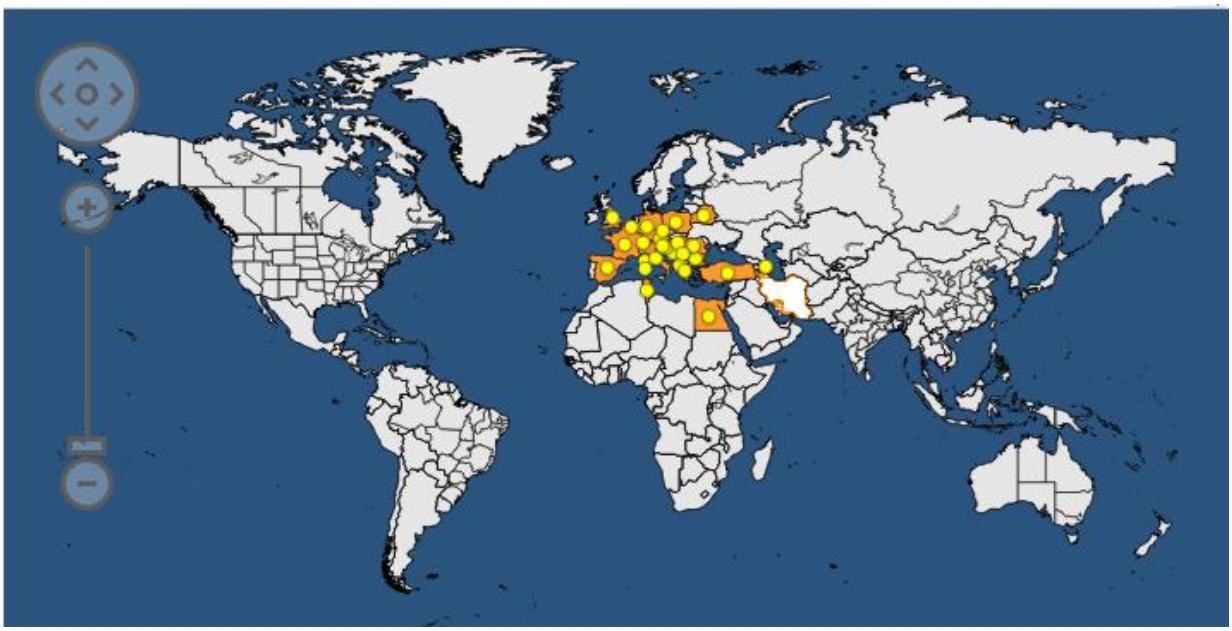
Major hosts:
Prunus armeniaca (apricot), *Prunus persica* (peach), *Prunus salicina* (Japanese plum) **Minor hosts:**
Prunus avium (sweet cherry), *Prunus domestica* (plum), *Prunus dulcis* (almond).

پراکنش جغرافیائی:

اروپا: آلبانی ،اطریش،آذربایجان، بلاروس بلژیک،بوسنی،بلغارستان، کرواسی،چک،فرانسه،آلمان،یونان،مجارستان ،

ایتالیا،،نروژ،لهستان،رومانی،صربستان، ،اسلواکی،اسلونی،اسپانیا،سوئیس،ترکیه،اکراین،انگلستان

آسیا:گزارش تائید نشده ای از ایران آفریقا:مصر،تونس



نقشه پراکنش بیماری فیتوپلاسمائی پیچیدگی کلروتیک برگ زردآلو

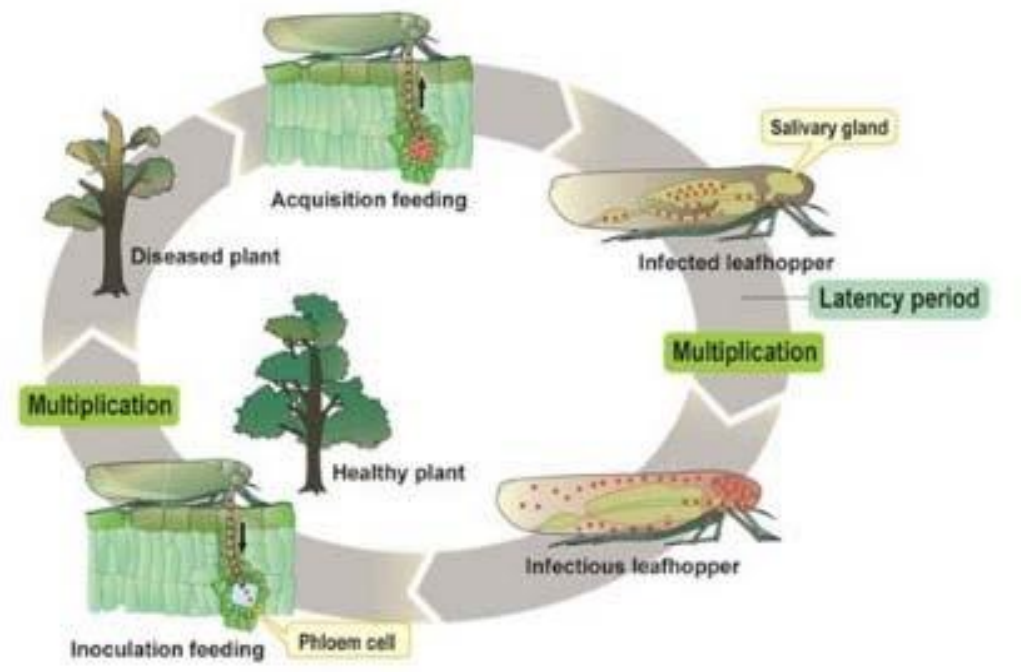
شکل شناسی:

Németh (1986) ویژگی های مورفولوژیکی **بیماری فیتوپلاسمایی پیچیدگی کلروتیک برگ زردآلو(ESFYP)** را به عنوان اجسام پلئومورفیک توصیف کرد. با این حال، ذرات باسیل شکل نیز یافت شد. اجسام داخل واکوئولی میله ای یا کروی شکل را می توان در سلول های آبکش جوان و با آلودگی کم یافت.اجسام در سلول های قدیمی و به شدت آلوده فشرده شده و تحلیل می روند (Németh, 1986).

زیست شناسی:

این بیماری که از طریق پیوند قابل انتقال است، در اصل به یک ویروس نسبت داده شده است. با این حال، علائم نوع زرد، تشخیص اجسام شبیه مایکوپلاسما در آوندها، و بهبود نسبی علائم توسط تیمارهای تتراسایکلین در دهه 1970 نشان داد که عامل علت شناسی احتمالی یک فیتوپلاسما است (Morvan et al., 1973). پاتوژن هنوز در محیط های عاری از سلول کشت نشده است. انتقال از طریق یک ناقل حشره مطمئناً اتفاق می افتد و وسیله اصلی گسترش بیماری است. حشره ، *Fieberiella florii*، ناقل احتمالی **بیماری فیتوپلاسمایی پیچیدگی کلروتیک برگ زردآلو(ESFYP)** نظر گرفته شد. در اسپانیا، زنجرک ها (cicadellids)در باغ‌های زردآلو که در آن رول برگ کلروتیک رایج بود، فراوان‌تر بود (Llacer et al., 1986). برخی از مطالعات اولیه نشان داده اند که در باغ های آلوده زردآلو و آلو در ایتالیا، بیماری فیتوپلاسمائی پیچیدگی برگ

کلروتیک زردآلودر *Anaceratagallia* و *Euscelis* شناسایی شده است، اما مطالعات انتقال بیشتری مورد نیاز است (Poggi Pollini و همکاران، 1997). در فرانسه، با وجود بررسی‌های گسترده، تشخیص PCR خاص در شناسایی حشرات آلوده شکست خورده است (Jarausch و همکاران، 1999). با این حال، دووال و همکاران. (1999) گزارش می دهد که گلابی پسیل *Cacopsylla pruni* ناقل بیماری فیتوپلاسمائی پیچیدگی برگ کلروتیک زردآلودر در باغ های آلو ژاپنی است. *C. pruni* توسط Carraro و همکاران استفاده شد. (1998) به طور تجربی زردهای میوه هسته دار اروپایی را به 89 درصد از کل cv آلو ژاپنی تلقیح شده انتقال داد. "Ozark Premier".

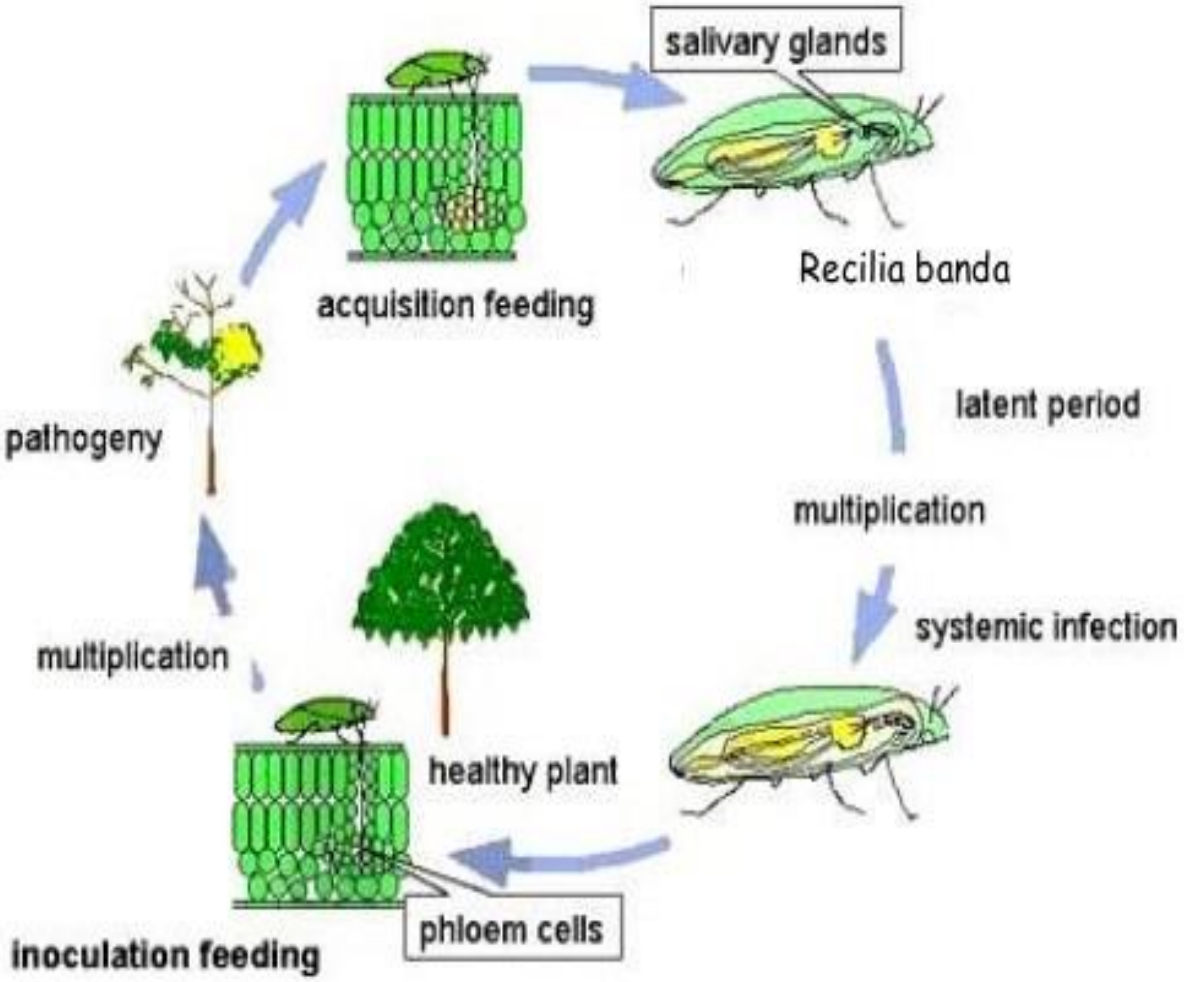


Oshima et al. 2011

Phytoplasma Life Cycle

.

Life cycle of NSD in the region



علائم خسارت:

علائم ناشی از بیماری فیتوپلاسمایی پیچیدگی کلروتیک برگ زردآلو(ESFYP) تحت تاثیر گونه، رقم و عوامل محیطی نامشخص است. به طور کلی، آنها شامل جوانه زدن زودرس، بزرگ شدن رگبرگ، رنگ شدن برگ، نکروز آبکش و رشد رویشی خارج از فصل هستند.

در مورد آلو ژاپنی:

علائم روی **Prunus salicina** مشابه است اما کمتر معمولی است. برگها کوچکتر و مایل به قرمز هستند و به جای پیچش مخروطی شکل استوانه ای را نشان می دهند. بخزان برگ زودتر از حد معمول است و اغلب رشد جدید بین اکتبر و دسامبر آغاز می‌شود. درختان بیمار در هنگام شکوفه دادن در برگ هستند و به راحتی از درختان سالمی که فقط گل های سفید را نشان می دهند متمایز می شوند. گل ها و میوه های کمتری روی درختان بیمار رشد می کنند، میوه ها کوچکتر و دیرتر از درختان سالم می رسند. نکروز آبکش بعد از یخبندان زمستانی قابل مشاهده است. زوال درختان تا حدودی کندتر از زردآلو است. شاخه های بیمار در عرض چند سال می میرند و در نهایت کل درخت می میرد (**Seemüller and Foster, 1995**).

در مورد زردآلو:

علائم بیماری را می توان در طول سال تشخیص داد، زیرا یکی از اثرات آن تحریک رشد جدید در طول خواب زمستانی است. با این حال، یخ زدگی آن را مسدود می کند. بهترین زمان برای مشاهده علائم قبل از گلدهی و اواخر تابستان است. در بهار، درختان آلوده قبل از باز شدن جوانه های گل، برگ می دهند. اگر دمای زمستان کمتر از **-5** درجه سانتیگراد باشد، درختان آلوده قهوه ای شدن لایه میانی پوست، تیره تر و ضخیم تر با توجه به شدت زمستان نشان می دهند. کامبیوم ممکن است تحت تأثیر قرار گیرد، اما در بهار پوست بیرونی طبیعی به نظر می رسد و اگر لایه زیرین به اندازه کافی نازک باشد سبز باقی می ماند. یک تا دو ماه بعد، پوست بیرونی خشک می شود. علائم برگ برگ در طول تابستان ایجاد می شود و در پایان سپتامبر به وضوح قابل مشاهده است (به جز در موارد حمله زنگ شدید). لامینا در امتداد خطوطی که از دمبرگ تا نوک آن می‌پیچد، احتمالاً حاشیه برگ را در یک یا دو نقطه از راه لمس می‌کند و یک مخروط یا یک طرح کلی چند ضلعی ایجاد می‌کند. کلروز نامنظم بین وریدی نیز دیده می شود. در نهایت، تکثیر جوانه های ابتدایی در انتهای شاخه های کوتاه و تمایل به باز شدن جوانه ها روی چوب های قدیمی وجود دارد.

روی هلو:

علائم بسته به رقم متفاوت است. در برخی ارقام گوشت سفید، شاخ و برگ قرمز در تابستان یا اوایل پاییز و غلتیدن یا پیچ خوردگی جزئی برگها مشاهده می شود. در برخی ارقام دارای بافت زرد، علائم مشابه بیماری ایکس هلو و فیتوپلاسمای برگ زرد هلو است. در مطالعات اخیر (کیسون و همکاران، **1997**)، به نظر می رسد که فیتوپلاسم های مختلف ممکن است در بیماری پیچیدگی برگ زرد هلو دخیل باشند. در کالیفرنیا، یکی از اشکال این بیماری توسط سویه ای از فیتوپلاسما بیماری **X** ایجاد می شود.اما همچنین مشخص شده است که سویه های دیگر جدا شده از درختان علامت دار هلو در کالیفرنیا با تکثیر سیب، زوال گلابی وفیتوپلاسماهای زرد میوه هسته دارواروپایی مرتبط هستند.فیتوپلاسمای رول برگ زرد هلو را می توان به وضوح ازفیتوپلاسمای تکثیر سیب و بیماری فیتوپلاسمایی پیچیدگی کلروتیک برگ زردآلو(**ESFYP**) (با **RFLP DNA** ریبوزومی و تجزیه و تحلیل ساترن بلات) متمایز کرد، اما نه از فیتوپلاسمای کاهش گلابی (توسط **RFLP DNA** ریبوزومی). برگها تا اواسط تابستان نرمال به نظر می رسند، سپس کمی کلروتیک یا سبز کم رنگ می شوند و ضایعات نکروزه در لایه برگ ایجاد می شوند. بعداً، این ضایعات بریده می شوند تا ظاهری "شات سوراخ" ایجاد

کنند و زردی برگی آشکارتر می شود. به طور همزمان، حاشیه برگ ها به صورت طولی به سمت بالا می پیچند، نوک برگ ها به سمت پایین خم می شوند و برگ ها سخت و شکننده می شوند و زود می ریزند. علائم خاص تر عبارتند از تورم میانی ناشی از رسوب چوب پنبه ای و رنگ زرد یا قرمز وریدهای جانبی بزرگ شده. جوانه زدن زودرس برگی و تغییر رنگ آبکش مشاهده شده است. بنیه و باردهی درخت آلوده کاهش می یابد، شاخه های داربست خشک می شوند و درختان در عرض چند سال کاهش می یابند (Seemüller and Foster, 1995).

در سایر میزبان های Prunus:

علائم در سایر میزبان های Prunus کمتر توضیح داده شده است. اولین علائم بیماری مولیر در آلو و گیلاس اروپایی، برگهای خفیف کلروتیک در تابستان است که معمولاً تا زمانی که درختان به سن 3-7 سالگی نرسند مشاهده نمی شود. سال بعد، درختان به وفور شکوفا می‌شوند، اما گل‌ها اغلب بدشکل هستند و میوه‌دهی ضعیف است. میوه هایی که رشد می کنند دارای دمگل کوتاه هستند، کوچک می مانند و زودرس می افتند. در این مرحله از بیماری، تغییر شکل کوچک برگ‌ها، گل‌زدگی، لیگن شدن ضعیف شاخه‌های جوان، نکروز آبکش و پوست مشهود است. درختان آسیب دیده کاهش یافته و می میرند. علائم روی بادام به سختی توضیح داده شده است

علائم بیماری بیماری فیتوپلاسمائی پیچیدگی برگ کلروتیک زردآلو **روی قسمت آسیب دیده گیاه**

رنگ های غیر طبیعی؛ اشکال غیر طبیعی

ساقه ها: تغییر رنگ خارجی. رشد غیر طبیعی

Chlorosis and rolling of apricot leaves on a shoot affected by ESFY (right) compared to unaffected apricot (left) (For permission to reproduce images email b.schneider@bba.de) Source: Dr B. Schneider BBA

Chlorosis and rolling of peach leaves on a shoot affected by ESFY (right) compared to unaffected peach (left) (For permission to reproduce images email b.schneider@bba.de) Source **Dr B. Schneider BBA**

Chlorosis and rolling of plum leaves affected by ESFY (right) compared to an unaffected leaf (left) (For permission to reproduce images email b.schneider@bba.de) Source **Dr B. Schneider BBA**

Chlorosis and rolling of apricot leaves affected by ESFY (left) compared to an unaffected leaf (right) (For permission to reproduce images email b.schneider@bba.de)

Source *Dr B. Schneider BBA*

The lamina rolls up along lines running from the petiole to the tip

Phloem necrosis caused by *Candidatus* Phytoplasma prunorum

Necrosis of the vascular tissue of an ESFY affected Prunus tree (For permission to reproduce images email b.schneider@bba.de). Source *Dr B. Schneider BBA*

راههای انتقال و انتشار:

پراکندگی طبیعی (غیر زیستی)

در مناطق آلوده، راه اصلی انتقال احتمالاً توسط ناقلان سیکادلید است. اهمیت میزبان‌های علفی به‌عنوان یک مخزن برای ESFYP هنوز باید ارزیابی شود.

انتقال در تجارت

مواد کاشت آلوده (گیاهان جوان، غنچه‌ها و به‌ویژه پایه‌های تکثیر شده رویشی) وسیله بالقوه اصلی معرفی در فواصل طولانی به مناطق غیر آلوده است.

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

– نهال/گیاهان ریز ازدیاد: تولید داخل. نامرئی

– ساقه (بالای زمین) / ساقه / تنه / شاخه: حمل داخلی. نامرئی

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

– پوست

– پیاز / غده / بنه / ریزوم

– میوه ها (شامل غلاف)

– رشد گیاهان همراه متوسط

– گل / گل آذین / مخروط / کاسه گل

– برگ

– ریشه ها

انتقال از طریق دانه یا گرده وجود ندارد

ناقلین:

Vector	Source	Reference	Group	Distribution
Cacopsylla pruni			Insect	

Cacopsylla pruni – vector of Candidatus Phytoplasma prunorum (For permission to reproduce images email wolfgang.jarausch@agroscience.rlp.de). Source *Dr Wolfgang Jarausch Agroscience*

cicadellid vectors

اقدامات قرنطینه ای:

اگرچه بیماری فیتوپلاسمایی پیچیدگی کلروتیک برگ زردآلو(ESFYP)دیگر به عنوان مقررات قرنطینه ای بیماری در اروپا در نظر گرفته نمی شود، اما خطر قابل توجهی برای سایر قاره هایی است که در آن فیتوپلاسم های گروه تکثیر سیب که به میوه هسته دار حمله می کنند، وجود ندارد. اهمیت آن بستگی به وجود ناقلین مناسب دارد.

1. kép: Candidatus Phytoplasma prunorum (Fotó: Süle Sándor)

روشهای ردیابی و بازرسی:

شنا سایی مثبت نیاز به آزمایش انتقال پیوند بر روی یک نشانگر چوبی دارد. یک آزمایش سریع که ممکن ا ست امتحان شود، ا ستفاده از معرف DAPI (4 ،6-diamidino-2-phenylindole) برای ت شخیص فلور سانس فیتوپلا سما در لوله های غربالی رگبرگ های برگ ا ست. تکنیک‌های مولکولی با ا ستفاده از دات بلات، آنالیز هیبریدا سیون جنوبی، PCR (Avinent و Llacer، 1995؛ Carraro و همکاران، 1998)، PCR تودرتو (Waterworth and Mock، 1999) و RFLP (Bertaccini وهمکاران، 1997) اکنون برای شناسایی و بیماری فیتوپلاسمایی پیچیدگی کلروتیک برگ زردآلو(ESFYP) در دسترس هستند. توزیع پاتوژن در درختان آلوده ناهموار است و تحت تأثیر میزبان و زمان سال است. بنابراین، نمونه برداری کامل و تکرار آزمایش ها مهم است. یک استاندارد EPPO در مورد تشخیص فیتوپلاسم درختان میوه منتشر شده است (OEPP/EPPO، 1994).

Tree decline caused by *Candidatus* Phytoplasma prunorum (left healthy)

Detection and inspection of *Candidatus* Phytoplasma prunorum

سنجش سرولوژی:

انتخاب نمونه:

فیتوپلاسماها به 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.

عفونت های 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

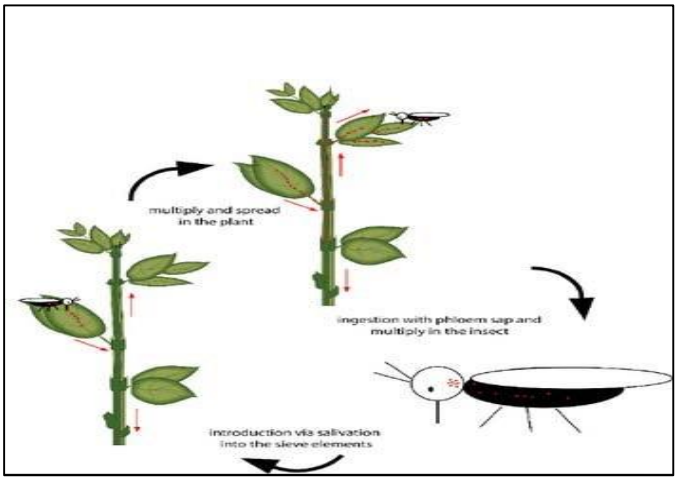
• استخراج DNA کل با استفاده از روش توصیف شده توسط گرین و همکاران. (1999) که از a
®
بافر استخراج CTAB و DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Cat. No. 69104).

• 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).

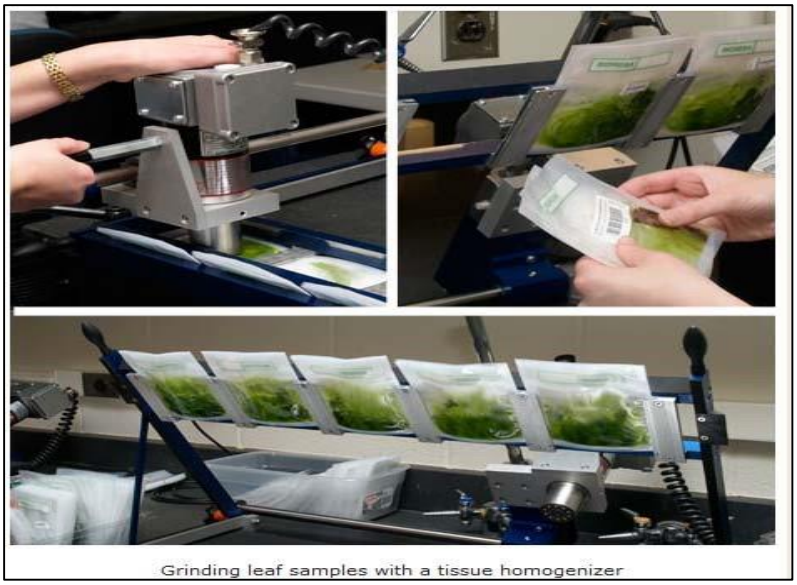
PCR را با استفاده از روش زیر انجام دهید:

• 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.

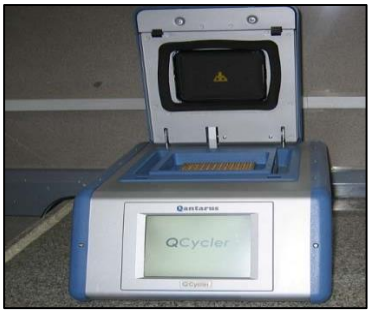


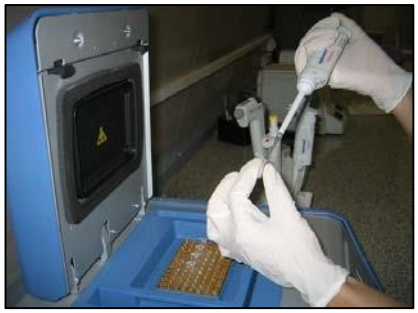
Excision of leaf tissue from orchard or homeowner samples to be processed



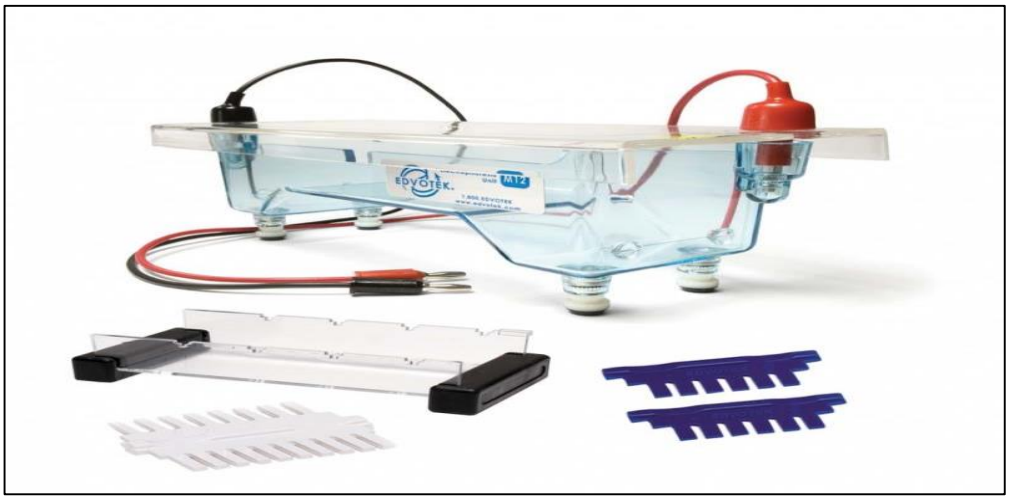
Grinding leaf samples with a tissue homogenizer

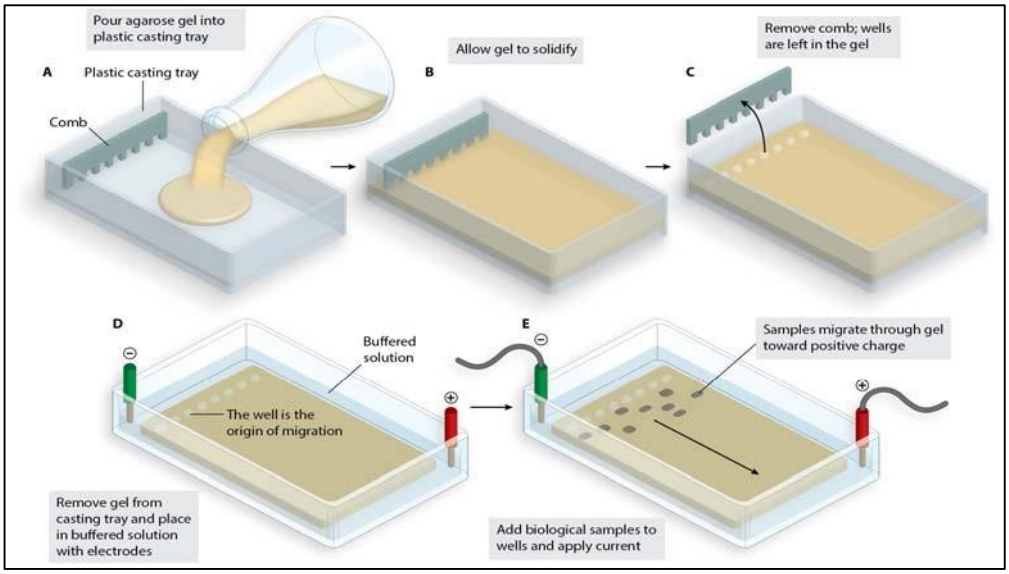
Grinding buffer is added to samples.

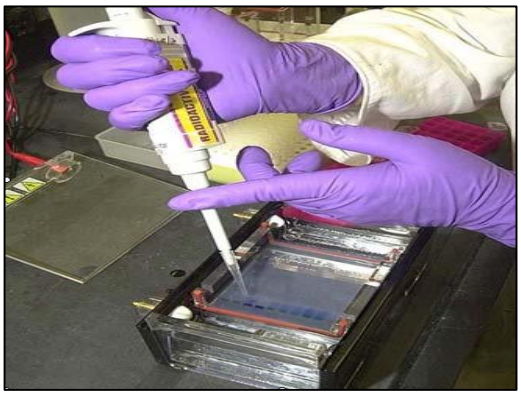


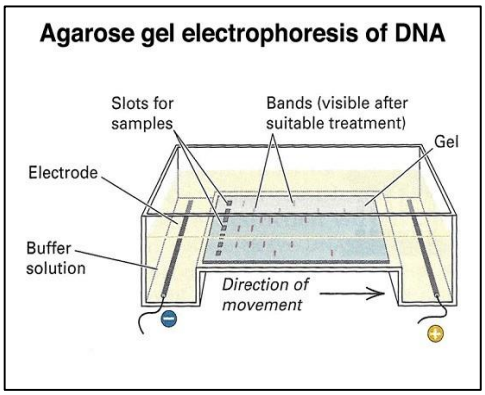


Detection and inspection Phytoplasma by PCR









Detection and inspection Phytoplasma by PCR

منابع:

CAB International. 2007. Crop Protection Compendium. 2007 Edition. CAB International. Wallingford, Oxon, UK.
https://gd.eppo.int/taxon/PHYPPR/distribution
Hasanzadeh ,Nader, 1995, principles and methods of plant bacteriology, scientific publication center of Islamic azad university,P 641.
http://images.search.yahoo.com/search/images;_ylt=A0oG7jLFXLlSkk4AQwVXNyoA?p=Candidatus+Phytoplasma+prunorum+&fr=yfp-t-742&fr2=piv-web#index=srp
http://images.search.yahoo.com/search/images;_ylt=A0PDoQ4odLpSvgYAu66JzbkF?p=Apricot+chlorotic+leafroll+phytoplasma&fr=yfp-t-742&ei=utf-8&n=60&x=wrt#index=srp
http://images.search.yahoo.com/search/images;_ylt=A0PDoKtfc7pS1x4AqEyJzbkF?p=European+stone+fruit+yellows+phytoplasma&fr=yfp-t-742&ei=utf-8&n=60&x=wrt#index=srp
http://images.search.yahoo.com/search/images;_ylt=A0PDoS6sp79SbjMAflOJzbkF?p=prunus+survey&fr=yfp-t-742&ei=utf-8&n=60&x=wrt#index=srp
http://images.search.yahoo.com/search/images;_ylt=A0PDoTCSqL9SF2cAujOJzbkF?p=Fieberiella+florii+&fr=yfp-t-742&ei=utf-8&n=60&x=wrt&y=Search#index=srp
http://www.cabi.org/isc/datasheet/34065 http://www.ogrodinfo.pl/ochrona-roslin/rzadziej-wystepujace-wirusy-oraz-fitoplazmy-iwiroidy-drzew-pestkowych
http://portal.nebih.gov.hu/fumagteszt/-
http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136664/4810
https://www.researchgate.net/publication/282604076_Implications_of_Candidatus_Phytoplasma_mali_infection_on_phloem_function_of_apple_trees
http://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/03/Peach-X-disease-FS.pdf
http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/wordpress/wp-content/uploads/2015/03/NDP-17-Xdisease-phytoplasma-V1.2.pdf