

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

زهره لری<sup>۱</sup>، اکبر حسینی پور<sup>۱\*</sup>، حسین معصومی<sup>۱</sup> و حشمت اله رحیمیان<sup>۲</sup>

(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 فتری شکل به نام *Spiroplasma citri* است. این بیمارگر در طبیعت توسط زنجبرک‌های 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*، زنجبرک‌ها 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 زنجبرک‌های جمع آوری شده با روش الایزای غیر مستقیم و نیز جداسازی و کشت در محیط کشت اسپروپلاسمایی LD10 بررسی شدند. واکنش زنجبرک‌های *Circulifer haematoceps*، *Psamotettix striatus*، *Orosius albicinctus* و *Austroagallia sinuata* با آنتی سرم تهیه شده مثبت بود و از ۳ گونه اول *S. citri* جداسازی و کشت شد. زنجبرک‌های یاد شده عمدتاً از مزارع کنجد مجاور باغ‌های مرکبات جمع آوری شدند. بنابراین به نظر می‌رسد این زنجبرک‌های ناقل احتمالی و هم چنین کنجد به عنوان میزبان آنها نقش کلیدی در همه جاگیری *S. citri* در منطقه جیرفت دارند.

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

### مقدمه

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 از جمله 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

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 ۱۹۰۰ در کالیفرنیا آمریکا مشاهده شد و ابتدا توسط فاست در ۱۹۴۴ توصیف شد (۱۴). در سال ۱۹۷۲ مشخص گردید که عامل بیماری یک Mollicute متحرک و فتری شکل است که به این سبب به نام *Spiroplasma citri* معرفی شد (۲۵). از نظر

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

از زنجبرک *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 در این زمینه انجام نشده است.

استان کرمان یکی از مناطق مهم مرکبات خیز کشور است و بر 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 نیز ۸۳/۴ درصد تولید، به منطقه جیرفت اختصاص دارد (۴ و ۵). هم‌چنین یکی از بیماری‌های مهم مرکبات این منطقه به ویژه پرتقال و گریپ فروت، استابورن یا ریز برگگی است (۱، ۲ و ۳). بنابراین لازم است عوامل موثر در همه جاگیری این بیماری از جمله 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 زنجبرک‌ها 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 زنجبرک‌ها 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 درختان 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 پنسیلین در میلی‌لیتر منتقل گردید. این لوله‌ها در دمای ۳۲°C نگهداری

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 در کشور 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 زنجبرک‌های خانواده Cicadellidae به شیوه پایای تکثیری منتقل می‌شود. در سال ۱۹۷۶ زنجبرک *Circulifer tenellus* به عنوان ناقلی اصلی *S. citri* در کالیفرنیا گزارش شد (۲۳). در تحقیقات بعدی جهت شناسایی ناقلین *S. citri*، چند گونه زنجبرک 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 زنجبرک *Ollarianus strictus* حامل طبیعی بیمارگر تشخیص داده شد ولی انتقال *S. citri* به بوته‌های پروانش با این زنجبرک 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 زنجبرک، 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، زنجبرک *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). هم‌چنین در ایران وجود و گسترش بیماری استابورن، به وجود دو زنجبرک *C. haematoceps* و *C. tenellus* در مناطق مرکبات خیز کشور نسبت داده شده است (۱۰). صالحی و همکاران (۶) با استفاده

### منبع و جمع آوری حشرات

طی بهار، تابستان و اوایل پاییز سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ 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 زنجبرک‌ها از سایر حشرات تفکیک و تا زمان استفاده در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگه‌داری شدند. هم‌چنین نمونه‌هایی از این زنجبرک‌ها جهت شناسایی به مرکز تحقیقات کشاورزی استان فارس (زرقان) ارسال شد.

### ردیابی *S. citri* در زنجبرک‌ها

جهت ردیابی این بیمارگر در زنجبرک‌ها، از الایزای غیر مسقیم استفاده شد. تعداد ۲ تا ۱۰ و در مواردی یک زنجبرک 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 ۱:۵ تهیه گردید (۱۸). میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت یاد شده به چاهک‌های سینی الایزا افزوده و سینی به مدت ۲ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  نگه‌داری شد. سپس چاهک‌ها سه بار با بافر شستشو (PBS حاوی 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 دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ، 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 دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ، 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 دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ، چاهک‌ها شسته شدند. بعد از آن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی ماده زمینه آنزیم (۴- نیترو فنیل فسفات) به

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 جدا و ۰/۲ گرم از آنها در دو میلی لیتر 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 در لوله‌های حاوی محیط کشت یاد شده تا میزان  $10 \times 10^6$  رقیق گردید. سپس این لوله‌ها در دمای  $32^{\circ}\text{C}$  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  $13000$  دور دقیقه و در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفوژ گردید. جهت حذف پروتئین‌های سرم موجود در محیط کشت، سلول‌های ته نشین شده سه بار با ۱۰۰ میلی لیتر بافر HEPES-sucrose (۱۵) شستشو داده شدند. رسوب نهایی در هشت میلی لیتر بافر یاد شده سوسپانسیون گردید. جهت تهیه آنتی سرم از خرگوش سفید نیوزلندی استفاده شد. در اولین تزریق نیم میلی لیتر از رسوب سلولی با نیم میلی لیتر همیار کامل (Complete adjuvant) مخلوط گردید و به ماهیچه‌های شانته‌های خرگوش تزریق شد. یک هفته بعد از تزریق اول، یک میلی لیتر از رسوب سلولی با یک میلی لیتر 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 و در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگه‌داری شد.

و نگهداری در دما  $32^{\circ}\text{C}$  ضمن تغییر رنگ قرمز محیط کشت به زرد، کدورت ملایمی در محیط کشت دیده شد. هم چنین پس از گذشت حدود ۱۰ روز، چنین تغییر رنگ و کدورتی در لوله‌های حاوی صاف شده حاصل از بوته پروانش آلوده (به جزء رقت‌های  $10^{-2}$  و  $10^{-1}$ ) ظاهر گردید. جهت اطمینان از رشد *S. citri* در کشت‌های حاصل از پرتقال، در شرایط استریل مقدار کمی از این کشت‌ها با میکروسکپ زمینه سیاه بررسی شد و حضور سلول‌های فنی شکل *S. citri* در آنها تأیید گردید. در کشت‌های حاصل از بوته پروانش نیز سلول‌های اسپروپلاسمایی 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  $1:500$  با روش الایزای غیر مستقیم اسپروپلاسمها را در بوته‌های پروانش آلوده و نیز در زنجبرک‌ها تشخیص دهد. لذا این موضوع نشان از کیفیت خوب آنتی سرم تهیه شده است که با رقت یاد شده، اسپروپلاسمها را در بوته‌های پروانش آلوده و نیز زنجبرک‌ها ردیابی نمود.

#### ردیابی سرولوژیک (الایزا) *S. citri* در زنجبرک‌ها

نام و فراوانی زنجبرک‌های 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 زنجبرک جمع آوری شده، گونه‌های *P. striatus* و *O. albicinctus*، *C. haematoceps*، *A. sinuata* عمدتاً طی ماه‌های مرداد، شهریور و مهر از مزارع کنجد اطراف باغ‌های مرکبات جمع آوری شدند.

جهت ردیابی *S. citri* در زنجبرک‌های 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

چاهک‌ها اضافه گردید و پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه، میزان تغییر رنگ این محلول در طول موج ۴۰۵ نانومتر در دستگاه BIO-TEK Microplate Reader اندازه‌گیری شد. نمونه‌های با جذب بیش از میانگین جذب تکرارها (X) + سه برابر انحراف استاندارد شاهد ( $\bar{X} + 3SD$ ) مثبت ارزیابی شدند.

#### جداسازی و کشت *S. citri* از زنجبرک‌ها

تعداد ۵ زنجبرک 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 ۰/۴۵ میکرومتر) عبور داده شد. صاف شده‌ها به طور متوالی تا رقت  $10^{-6}$  در لوله‌های حاوی محیط کشت یاد شده رقیق و در دمای  $32^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند.

#### آزمون ممانعت از رشد (Growth inhibition test)

این آزمون مطابق روش Withcomb و همکاران (۲۹) انجام شد. ابتدا با افزودن یک درصد آگارنوبل (Noble agar) به محیط کشت مایع LD10، محیط جامد آن تهیه و به ظروف پتری اضافه شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کشت فعال اسپروپلاسمهای 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 از یک درخت پرتقال آلوده به بیماری استابورن، در مرکز ظروف پتری مستقر و در دمای  $32^{\circ}\text{C}$  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

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

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

\*: یک تادو زنجبرک (+)، ۱۰ زنجبرک (++) و ۱۵ زنجبرک (+++) در هر بار تور زدن

\*\* : انجام نشد

آمد. از ۱۲ گونه زنجبرک بررسی شده، فقط از سه گونه آنها (*P. striatus* و *O. albicinctus*، *C. haematoceps*) اسپیروپلازما قابل کشت و جداسازی بود و بیشترین تعداد کشت از زنجبرک 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 اسپیروپلازما بی حاصل نشد. عدم موفقیت در جداسازی و کشت اسپیروپلازما از دو گونه زنجبرک *P. alienus* و *A. sinuata* با واکنش مثبت در الایزا را می‌توان چنین تفسیر نمود، زنجبرک‌هایی که به طور تصادفی انتخاب و جهت جداسازی و کشت مورد استفاده قرار گرفتند، عاری از اسپیروپلازما بودند یا عصاره آنها حاوی مواد بازدارنده‌ای است

سرولوژیک الایزا است (۷، ۱۲ و ۲۶). هر چند الایزا روش مفید و مقدماتی جهت غربال‌گیری 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 زنجبرک‌ها و آزمون ممانعت از رشد

از کشت رقت‌های  $1 \times 10^{-2}$  و  $1 \times 10^{-3}$  صاف شده برخی از زنجبرک‌هایی که واکنش الایزای آنها در برابر آنتی سرم تهیه شده علیه یک استرین *S. citri* جداسازی شده از مرکبات مثبت بود، در محیط غذایی LD10 کشت‌های اسپیروپلازمایی به دست

جدول ۲. جداسازی و کشت *Spiroplasma citri* از زنجرک‌های جمع‌آوری 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 |
| <i>Austroagallia sinuata</i>  | +            | ۵                       | ۵         | ۰    |
| <i>Circulifer haematoceps</i> | +            | ۸                       | ۳         | ۵    |
| <i>Orosius albicinctus</i>    | +            | ۶                       | ۴         | ۲    |
| <i>Psammotettix alienus</i>   | +            | ۵                       | ۵         | ۰    |
| <i>Psammotettix striatus</i>  | +            | ۵                       | ۵         | ۱    |

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 *E. decipiens*, *O. orientalis*, *C. haematoceps* و *Asymmetrasca decedens* از روی این بوته‌ها جمع‌آوری و با الایزا و آنتی سرم چند سانه‌ای علیه *S. citri* بررسی شدند و واکنش آنها مثبت بود. اما فقط از دو گونه اول، کشت‌های اسپروپلاسمایی با رابطه سرولوژیک 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 اگر میزبان 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 اینجریلیک منطقه *Cukurova* ترکیه تا ۸۰ درصد گزارش شده است (۱۹). در بررسی دیگر در ترکیه، ۱۷ گونه زنجرک جمع‌آوری شده از مناطق مرکبات خیز جنوب این کشور، با استفاده از روش الایزا واکنش آنها نسبت

که در رقت‌هایی که سلول‌های اسپروپلازما وجود دارند، از رشد آنها جلوگیری می‌نماید. به همین جهت معمولاً در رقت‌های اولیه صاف شده‌ها، علی‌رغم وجود سلول‌های اسپروپلاسمایی، این سلول‌ها رشد نموده و لذا رنگ قرمز محیط غذایی تغییر نمی‌کند. این موضوع در مورد عصاره گیاهان آلوده به اسپروپلازما نیز صادق است. برای مثال عصاره ساقه بوته‌های ذرت و پروانش به ترتیب با رقت ۱ به ۱۶۰ و ۱ به ۱۴۰ از رشد *S. citri* جلوگیری کردند (۲۱). در این تحقیق برخی از زنجرک‌های جمع‌آوری شده به دلیل فراوانی پایین جمعیت آنها، در آزمایش‌های الایزا و جداسازی و کشت بررسی نشدند (جدول ۱).

آزمون بازدارنده شد مفیدترین 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 اسپروپلاسمای جداسازی شده از زنجرک‌ها و نیز بوته پروانش با جدایه *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 برابر آنتی ژن *S. citri* (جداسازی شده از درخت آلوده به بیماری استابورن)، هم چنین آنتی ژن اسپروپلاسمای کشت شده از بوته پروانش و نیز از زنجرک‌ها به ترتیب به طور متوسط ۶ و ۶ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این آزمون

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 زنجبرک تکثیر می‌شوند اما قادر به انتقال به بوته‌های پروانش نیستند (۱). در تحقیق حاضر اگر چه *S. citri* همراه با برخی از زنجبرک‌های جمع‌آوری شده از منطقه جیرفت ردیابی شد، اما لازم است در تحقیقات بعدی قابلیت انتقال طبیعی (Natural inoculativity) این زنجبرک‌ها نیز بررسی گردد. تا کنون گزارشی مبنی بر انتقال بذری *S. citri* وجود ندارد و آلودگی اسپروپلاسمایی 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 زنجبرک‌هایی که از آنها *S. citri* جداسازی و کشت شد، از مزارع کنجد منطقه جیرفت جمع‌آوری شدند، چنین به نظر می‌رسد این زنجبرک‌ها 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 زنجبرک *C. haematoceps*، *O. albicinctus* و *P. striatus* در ایران است و با توجه به این که بیشترین تعداد کشت اسپروپلاسمایی از زنجبرک *C. haematoceps* به دست آمد (جدول ۲)، به نظر می‌رسد این زنجبرک نقش مهم‌تری در همه‌جاگیری *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 زنجبرک‌ها و نیز از راهنمایی‌های سرکار خانم دکتر کولت سیار استاد دانشگاه بردو فرانسه صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

به آنتی‌سرم چند سانه‌ای *S. citri* مثبت بوده است و این بیمارگر فقط از پنج گونه زنجبرک *Balclutha hebe*، *Exitianus capicola*، *O. orientalis*، *Cicadulina bipunctella* و *C. haematoceps* جداسازی و کشت شد. هم‌چنین از بین زنجبرک‌های یاد شده فقط زنجبرک *C. haematoceps* جمع‌آوری شده از روی کنجد و ذرت این اسپروپلاسم را به بوته‌های کنجد انتقال داد (۱۸). در تحقیق حاضر نیز از برخی از زنجبرک‌های جمع‌آوری شده از منطقه جیرفت با وجود واکنش مثبت در برابر آنتی‌سرم *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 زنجبرک *C. haematoceps* به عنوان میزبان طبیعی *S. citri* معرفی شده است (۹ و ۱۱). در خصوص ایران گسترش بیماری استابورن مرکبات به فعالیت زنجبرک *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 زنجبرک‌های 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 زنجبرک، *S. citri* جداسازی و کشت انجام نشده است. در کالیفرنیا زنجبرک *C. tenellus* به عنوان ناقل عامل بیماری استابورن معرفی شده است، به علاوه زنجبرک‌های *S. nitridus* جمع‌آوری 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 از این دو زنجبرک در حشرات نمونه برداری شده وجود نداشتند، هرچند زنجبرک *C. tenellus* نسبت به گونه *C. haematoceps* با پراکنش و جمعیت کمتر از ایران گزارش شده است (۱۱).

ردیابی *S. citri* در یک زنجبرک لزوماً نشانگر ناقل بودن آن زنجبرک نخواهد بود. احتمالاً برخی از زنجبرک‌های تغذیه‌کننده از شیره آوندهای آبکش، قادر به اخذ سلول‌های این بیمارگر

## منابع مورد استفاده

۱. حسینی پور، الف. ۱۳۷۹. بررسی پاره‌ای از ویژگی‌های سلولی و مولکولی اسپروپلاسمای 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 مورفیسم در DNA ژنومی استرین‌های *Spiroplasma citri* جدا شده 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 کشاورزی استان کرمان، اطلاعات و آمار محصولات باغی سال ۱۳۸۲. URL: <http://www.kermanagrijahad.ir>.
۵. سازمان جهاد کشاورزی منطقه جیرفت و کهنوج، آمار نامه سال ۱۳۸۲.
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. 10<sup>th</sup> 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. 7<sup>th</sup> 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. Kersting, 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. Spiroplasm static 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. 9<sup>th</sup> 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. 8<sup>th</sup> 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 mycoplasmaology. 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.