حصر وتوصيف جزيئي للإصابة بالفايتوبلازما على محصول الفليفلة المزروعة في حقول محافظة حلب، سورية

محمد صعب وفاتح خطيب*

قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة حلب، سورية.

*البريد الالكتروني للباحث المراسل: f.khatib@alepuniv.edu.sy

الملخص

صعب، محمد وفاتح خطيب. 2026. حصر وتوصيف جزيئي للإصابة بالفايتوبلازما على محصول الفليفلة المزروعة في حقول محافظة حلب، سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 44(2):147–154. https://doi.org/10.22268/AJPP-001401

يعدّ محصول الفليفلة من الخضار الغذائية المهمة التي تزرع في محافظة حلب. تم إجراء عملية حصر للإصابة بالفايتوبلازما خلال الموسم الزراعي لعام 2022 في 9 حقول موزعة على مناطق دير حافر والسفيرة وكويرس. جمعت 22 عينة نباتية مصابة ظاهرياً، واستخلص الـ DNA الجينومي منها، وقدّر تركيزه ونقاوته ونوعيته. أجري التفاعل التسلسلي للبوليميراز المتداخل (Nested PCR) على مرحلتين باستخدام البادئات P1/P7 و R16F2n/R16R2 للكشف عن الإصابة بالفايتوبلازما. استخدمت 6 أنزيمات قطع *Rsa*I، *Hha*I، *Eco*RI، *Bam*HI، *Hin*fI و *Alu*I في تقنية PCR-RFLP لهضم نواتج تفاعل الـ PCR في المرحلة الثانية. تم فصل نواتج الهضم على هلامة أجاروز 2%، وقورنت النتائج مع الدراسات المرجعية لتحديد المجموعات الجزيئية المعتمدة على المورثة 16S للفايتوبلازما. بلغ متوسط نسبة الإصابة بالفايتوبلازما 2% في ديرحافر، 3% في السفيرة و 1% في كويرس. أظهرت نتائج التفاعل التسلسلي للبوليميراز المتداخل أن جميع عينات الفليفلة التي تم جمعها كانت مصابة بالفايتوبلازما بنسبة 100%. أظهرت نتائج القطع الأنزيمي لأربعة من أنزيمات القطع *Rsa*I، *Hha*I، *Hin*fI و *Alu*I عدم وجود تطابق تام في نماذج القطع بينها وبين المخطط المنفَّح لتصنيف الفايتوبلازما؛ الأمر الذي يتطلب تحليل التتالي النكليوتيدي للمورثة 16S RNA، وتحليل جميع مواقع القطع فيها لتحديد المجموعات الجزيئية التي تنتمي إليها العزلات المدروسة.

كلمات مفتاحية: الفايتوبلازما، الفليفلة، توصيف جزيئي، تقنية PCR-RFLP.

المقدمة

تعدّ الفليفلة (*Capsicum annuum* L.)، التابعة للفصيلة الباذنجانية (Solanaceae)، من محاصيل الخضار المهمة المزروعة محلياً، حيث تدخل ثمارها في السلطات والمخللات، كما تجفف ثمارها الحمراء وتطحن لتصبح مسحوقاً ناعماً يمكن إضافته للوجبات الغذائية، وتستعمل كتوابل وفي إنتاج الصبغات الملونة، وكمادة طبيعية لعلاج أمراض المفاصل والجهاز العصبي (Govindarajan & Salzer, 1985). تنتشر زراعة الفليفلة في معظم أنحاء العالم، وتشير إحصائية منظمة الأغذية والزراعة الدولية FAO لعام 2022 إلى أن المساحة المزروعة لإنتاج الفليفلة الجافة في سورية بلغت 754 هكتاراً أنتجت 928 طناً بمعدل 1.233 طن/هـ، كما زرعت مساحة 5220 هكتاراً للحصول على الفليفلة الخضراء بإنتاجية 78704 طن وغلة 15.074 طن/هـ (FAO, 2024). هناك العديد من المسببات المرضية التي تصيب محصول الفليفلة، ومنها الأمراض المتسببة عن الفايتوبلازما التي تعدّ آفة رئيسية مهمة في مناطق عديدة من العالم وتسبب خسائر كبيرة في كمية الإنتاج ونوعيته. وهي بكتيريا بدائية النواة، إجبارية التطفل، عديمة الجدار الخلوي، محاطة فقط بغشاء مفرد، تتكاثر في النسيج اللحائي للنباتات وأيضاً في هيموليمف الحشرات الناقلة، كما أنها متعددة الأشكال مع تباين أحجامها حيث تتراوح ما بين 200–800 نانومتر، ولديها مجين صغير الحجم في حدود 530–1350 كيلو قاعدة (Kb).

إنّ الفايتوبلازما هي بكتيريا موجبة الغرام، حساسة للمضاد الحيوي تتراسكلين (Doi *et al*., 1967). ترتبط الفايتوبلازما بأكثر من 600 مرض نباتي متنوع في جميع أنحاء العالم، وتنتقل بشكل رئيسي عن طريق الحشرات التي تتغذى على اللحاء وبخاصة نطاطات الأوراق، وطرائق الإكثار الخضري بالتطعيم وبالعقل والدرنات أو الجذور والإكثار الدقيق والحامول (*Cuscuta* sp.) (Bertaccini *et al*., 2014). تم حتى الآن تصنيف 41 نوعاً مرشحاً (*Candidatus*) تندرج تحت 14 مجموعة رئيسية و 46 مجموعة فرعية بناءً على تحليل الـ RFLP وتسلسل المورثة 16Sr DNA (Bertaccini & Lee, 2018). تسبب الفايتوبلازما أعراضاً

https://doi.org/10.22268/AJPP-001401
© 2026 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

عديدة على النباتات المصابة مثل التقزم والبرعم الكبير ومكنسة الساحرة وتورق الأزهار والكأس العملاق وتشوه الأزهار والأوراق الصغيرة وتغير لون الأوعية الناقلة. يمكن أن تترافق الفايتوبلازما مع أعراض مختلفة على أنواع نباتية متنوعة، وقد تحفز ظهور أعراض مماثلة على أنواع مختلفة؛ فقد ذكر مثلاً أن المجموعة 16SrIII تظهر أعراض التقزم ومكنسة الساحرة على محاصيل متنوعة كالبطاطا والفليفلة الحارة والبندورة/الطماطم والكوسا والقرع المرّ، وتظهر الأعراض على الفليفلة على شكل اصفرار وصغر حجم الأوراق والبرعم الكبير وتبرقش الأوراق (Faghihi *et al*., 2016). يعتمد تشخيص الفايتوبلازما بشكل أساسي على التقنيات الجزيئية مثل التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR) نظراً لصعوبة عزلها على مستنبتات غذائية في المختبر. لذلك تعدّ الاختبارات القائمة على الحمض النووي مثل التفاعل التسلسلي للبوليميراز العادي (PCR) وتقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز المتداخل (Nested PCR) أداة مناسبة وموثوقة للكشف عن الإصابة، وتتصف بالبساطة والسرعة ودقة الكشف (Bertaccini *et al*., 2014)، والتي يتبعها تحليل قطع التحديد المتباينة (PCR-RFLP) للتوصيف الجزيئي وتحديد المجموعة ونوع الفايتوبلازما "*Candidatus* (Ca.) Phytoplasma" بالاعتماد على الهضم الأنزيمي لناتج مكاثرة المورثة 16S rDNA (Hodgetts *et al*., 2008).

بقيت الفايتوبلازما بعيدة عن عملية التعريف الدقيق لعقود عديدة لأنها غير قابلة للعزل، والزرع على الأوساط المغذية البسيطة المستخدمة في عزل البكتيريا الممرضة للنبات. في حين قادت التطورات التي حدثت في مجال التقانات الحيوية التي شهدها القرن الحادي والعشرون إلى استخدامها كأدوات جزيئية في تعريف هذه البكتيريا وتحديد أنماطها وتقسيمها ضمن مجموعات جزيئية، وهي من الطرائق الموثوقة والمعتمدة حالياً على مستوى العالم، مع الإشارة إلى ندرة هذا النوع من الدراسات على مستوى القطر. وبذلك يمكن من خلال استخدام تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز المتداخل تحديد الإصابة بهذه البكتيريا وتمييزها عن مسببات أخرى مثل الأمراض الفيروسية أو نقص عنصر الزنك الذي قد يتسبب بأعراض مشابهة على نباتات هذه العائلة، أو تكون هناك إصابة مختلطة معها، مما يتيح اقتراح طريقة فاعلة لإدارة هذه المسببات أو تحديد مصادر الإصابة بها.

هدف هذا البحث إلى حصر انتشار الإصابة بالفايتوبلازما على محصول الفليفلة في أهم مناطق زراعتها في محافظة حلب والكشف عنها جزيئياً باستخدام تقنية Nested PCR وتوصيف المجموعة وتحت المجموعة الجزيئية التي تتبع لها باستخدام تقنية تباين أطوال قطع التحديد لناتج التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR-RFLP).

مواد البحث وطرائقه

مسح نسبة الإصابة وجمع العينات النباتية

تمت عملية مسح انتشار الفايتوبلازما خلال عام 2022 في مناطق زراعة الفليفلة الرئيسة في محافظة حلب. نفذت جولات حقلية على مناطق الدراسة خلال موسم النمو، حيث لوحظ ظهور أعراض الإصابة من بداية الإنتاج وحتى نهايتها وتحديداً خلال شهر آب/أغسطس. تم تنظيم استمارة استبيان خاصة بكل حقل دوّنت عليها المعلومات الخاصة بمكان وتاريخ الجمع، والمحصول المزروع، ومصدر البذار، والصنف المزروع، كما سجلت الأعراض الظاهرية والاختلافات الشكلية للنباتات المصابة مقارنةً مع النباتات السليمة.

بلغ عدد الحقول التي تمت زيارتها وجمع العينات منها وتحديد نسبة الإصابة فيها 9 حقول، موزعة على مناطق دير حافر، السفيرة وكويرس بمعدل ثلاثة حقول لكل منطقة. حددت نسبة الإصابة في كل حقل بالكشف عن الأعراض الظاهرية للإصابة بالفايتوبلازما على 100 نبات تم تحديدها عشوائياً من خلال السير في الحقل على شكل الحرف W، والتوقف لالتقاط عينة بعد كل عدد محدد من الخطوات. تم جمع 3 عينات نباتية مصابة من كل حقل، وبلغ عدد العينات الإجمالي 27 عينة، تم اختيار 22 عينة لإجراء الاختبارات عليها، كما جُمع عدد من العينات غير المصابة لاستخدامها كشاهد سليم للمقارنة. تمّ أخذ الأجزاء التالية لكل عينة: ورقة، برعم، حامل البرعم. وضعت العينات في أنابيب ابندورف سعة 2 مل تحوي على محلول السوربيتول Sorbitol الذي استخدم لاحقاً في الخطوة الأولى لسحق العينات واستخلاص الـ DNA منها. وضِعتْ العينات في الحافظة، ونقلت إلى المختبر وحفظتْ في البراد لحين استخلاص الـ DNA وتعريف النمط الجزيئي.

استخلاص الـ DNA واختبار تركيزه ونقاوته ونوعيته

تم استخلاص الـ DNA من العينات التي تم جمعها من الحقول، وذلك من خلال سحق كمية 0.3 غ من كل عينة نباتية (ورقة، برعم، حامل البرعم) بشكل منفصل في هاون بورسلان معقم باتباع طريقة الغسيل بالسوربيتول (Inglis *et al.,* 2018). حفظ الـ DNA عند درجة حرارة −20°س لحين استخدامها. تم قياس الامتصاصية (Absorbance) باستخدام المطياف الضوئي، عند طول موجة 360 نانومتر لـ DNA و 280 نانومتر للبروتين، وحسب التركيز وفق العلاقة:

تركيز الـ DNA ميكروغرام/ميكرولتر = الامتصاصية عند طول موجة 260 نانومتر × عامل التخفيف × 1000/50

قدرت النقاوة من النسبة OD260/OD280، والتي يجب أن تتراوح في العينات النقية ما بين 1.8–2.0 (Sambrook *et al.,* 1989). اختبرت نوعية الـ DNA بالرحلان الكهربائي على هلامة أجاروز تركيز 1%، ومن ثم لوّنت ببروميد الايثيديوم وظهرت تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) في جهاز توثيق الهلام (Gel documentation)، وأخذت صورة رقمية للهلامة لتحليل النتائج. خفف الـ DNA إلى تركيز 50 نانوغرام/الميكروليتر بناءً على قراءة قيم التراكيز في المطياف الضوئي.

الكشف عن الفايتوبلازما بتقنية تفاعل الـ PCR المتداخل (Nested PCR)

اختبرت العينات بواسطة تفاعل الـ PCR المتداخل (Nested-PCR) للكشف عن الفايتوبلازما، وقد أجري هذا الاختبار على مرحلتين، حيث تمّ في المرحلة الأولى استخدام زوج البادئات (Deng & Hiruki, 1991):

P1: 5'- AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'
P7: 5'- CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'

وبلغ حجم ناتج التفاعل في هذه المرحلة حوالي 1.8 كيلو قاعدة (Kb)؛ أما المرحلة الثانية، فاعتمدت على ناتج اختبار المرحلة الأولى ولكن باستخدام البادئتين (Gundersen & Lee, 1996):

R16F2n: 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'
R16R2: 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'

لتضخيم قطعة من المورثة 16Sr RNA يبلغ طولها 1.2 كيلو قاعدة (Kb). حضر مزيج التفاعل في حجم نهائي 20 ميكروليتر بحيث يحتوي 2 ميكروليتر محلو منظم لتفاعل الـ PCR + 10x PCR buffer 15 mM $MgCl_2$، 2 ميكروليتر من الـ DNA تركيز 50 نانوغرام/ميكرولتر في التفاعل الأول و 1 ميكروليتر من ناتج المكاثرة في التفاعل الأول مخفف بنسبة 1:40 للتفاعل الثاني، 0.2 مليمولر من النكليوتيدات 2 mM dNtp's، 1 ميكروليتر من كل من البادئتين الأمامية والعكسية (تركيز 10 ميكرومولر)، 0.2 ميكروليتر من أنزيم البلمرة 5U/µl *Taq* polymerase، وأكمل الحجم بالماء المقطر والمعقم منزوع الشوارد. تمت عملية المكاثرة في جهاز من نوع Applied Biosystems 2720 Thermal cycler بواسطة برنامج التدوير الحراري الخاص ببادئات المرحلة الأولى والثانية، حيث تمت عملية فصل أولي لسلسلة الـ DNA لمدة 5 دقيقة عند حرارة 94°س لدورة واحدة، من ثم تبعها 35 دورة تتضمن الفصل الثانوي لمدة 1 دقيقة عند حرارة 94°س، وارتباط البادئات لمدة 1.5 دقيقة عند حرارة 57°س، ومن ثم امتداد البادئات لمدة 1.5 دقيقة عند حرارة 72°س. انتهى البرنامج بعملية امتداد نهائي عند حرارة 72°س لمدة 10 دقيقة ولدورة واحدة فقط، ثم حفظ التفاعل عند درجة حرارة 4°س. فصلت نواتج التفاعل في كلا المرحلتين بالرحلان الكهربائي على هلامة أجاروز تركيز 1%، واستخدم سلم الوزن الجزيئي 100 زوج نكليوتيدي Molecular Ladder 100 bp من نوع Gene ruler لتحديد أطوال القطع الناتجة، واستخدمت عينتان من نباتات الفليفلة غير المصابة كشاهد سلبي.

تباين أطوال قطع التحديد لناتج التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR-RFLP

تم اجراء هذا الاختبار لتحديد المجموعات الرئيسية وتحت المجموعات للفايتوبلازما. عوملت كمية محددة من نواتج تفاعل المرحلة الثانية لـ PCR المتداخل ذات الأحجام التي شوهدت بوضوح على هلامة الآغاروز (1.2 كيلو قاعدة من المورثة 16S rDNA)، وذلك بشكل إفرادي مع أنزيمات القطع *Rsa*I، *Hha*I، *Eco*RI، *Bam*HI، *Hin*fI و *Alu*I، ولستِّ عينات تم اختيارها بحيث تكون موزعة على المناطق المدروسة. حضر مزيج الهضم في حجم نهائي 10 ميكروليتر بحيث يحتوي 7 ميكروليتر ناتج تفاعل PCR المرحلة الثانية، 1 ميكروليتر محلول منظم تركيز 10× restriction enzyme buffer، 0.5 ميكروليتر أنزيم (10 وحدة أنزيمية في 1 ميكروليتر، أو 0.25 ميكروليتر من الأنزيم *Hin*fI الذي يحوي الميكروليتر منه على 20 وحدة أنزيمية) وأكمل الحجم بالماء المعقم منزوع الشوارد. حضنت العينات في حمام مائي عند درجة حرارة 37°س لمدة 3 ساعات، ثم أضيف إليها 2 ميكروليتر من محلول تحميل العينات 6x loading dye buffer. فصلت نواتج الهضم في هلامة أجاروز تركيز 2%، ثم لونت في محلول بروميد الإيثيديوم تركيز 20.2 ميكروغرام/مل، وظُهِّرت في جهاز توثيق الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية. أخذت صورة رقمية للهلامة لتحليل النتائج بمقارنة نواتج الهضم مع مؤشر قياسي للوزن الجزيئي 100 زوج نكليوتيدي، ومقارنة أطوال القطع الناتجة مع الدراسات المرجعية التي استخدمت فيها ذات البادئات وأنزيمات القطع لتعريف النمط الجزيئي للفايتوبلازما.

النتائج

أعراض الإصابة الحقلية

تم خلال عملية المسح الحقلي توصيف الأعراض الظاهرية التي سببتها الفايتوبلازما على نباتات الفليفلة، حيث كانت النباتات صغيرة الحجم، متقزمة، متوردة على شكل باقة، الأوراق مصفرة لحمية مجعدة ملعقية الشكل، البراعم إما كأسية الشكل مفرغة أو ممتلئة قاسية، حامل البرعم إما طويل جداً أو أن البراعم ملتصقة بالأفرع، الثمار غالباً غير موجودة، وفي حال وجودها كانت مشوهة، صغيرة الحجم، قليلة العدد إذ تراوحت أعدادها بين 1–3 ثمرة (شكل 1).

شكل 1. أعراض الإصابة بالفايتوبلازما على الفليفلة. A= النباتات صغيرة الحجم متوردة على شكل باقة، B= الأوراق مصفرة لحمية مجعدة ملعقية الشكل، C= حامل البرعم طويل والبراعم كأسية الشكل، D= البراعم كأسية مُفرغة وملتصقة بالأفرع ، E= البرعم الكبير، F= الثمار صغيرة مشوهة.

Figure 1. Symptoms of phytoplasma infection in pepper. A= Small plants, clustered in flowers, B= Leaves are yellowish, fleshy, wrinkled, spoon-shaped, C= Bud holder is long and buds are goblet-shaped, D= Buds are goblet-shaped, hollow and attached to branches, E= Large bud, F= Fruits are small and deformed.

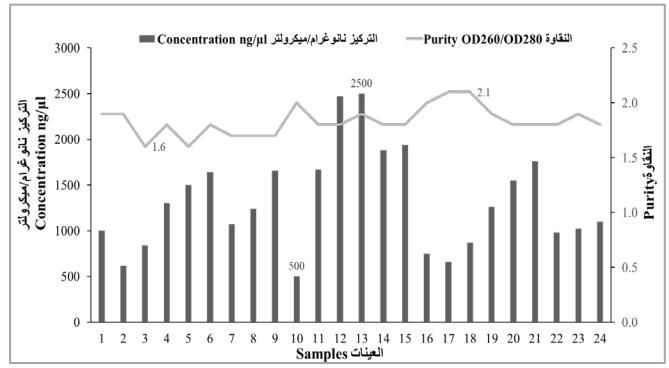
نسبة الإصابة بالفايتوبلازما في الحقل

تم تقدير نسبة الإصابة بالفايتوبلازما على الفليفلة في ثلاثة حقول في المناطق الرئيسية في محافظة حلب، إذ تراوحت نسبة الإصابة في منطقة السفيرة بين 1–7%؛ والتي كانت أعلى نسبة إصابة في المحافظة، وكان متوسط نسبة الإصابة في المنطقة نفسها 3%. في حين كانت نسب الإصابة 2% في الحقول المدروسة في منطقة دير حافر و 1% في منطقة كويرس؛ وهو أقل متوسط لنسبة الإصابة في المناطق المدروسة.

تركيز ونقاوة ونوعية الـ DNA

تم قياس تركيز الـ DNA وتقدير نقاوته من البروتين بواسطة المطياف الضوئي، حيث تراوح تركيز الـ DNA بين 500–2500 نانوغرام/ميكروليتر (وسطياً 1324 نانوغرام/ميكروليتر)، بينما تراوحت قيم النقاوة بين 1.6–2.1 (وسطياً 1.8) (شكل 2).

أوضح مؤشر النقاوة وجود تلوث بالبروتين في العينات التي كان المؤشر فيها أدنى من 1.8، بينما أشار ارتفاع قيم النسبة عن 2.0 إلى وجود كميات زائدة من الـ RNA في العينات، ويرتبط هذا بشكل أساسي بعدم كفاءة الأنزيم RNase المستخدم في التخلص من الـ RNA بشكل كامل، إذ تراوحت قيمة مؤشر النقاوة OD260/OD280 ما بين 1.8–2.0 في العينات النقية (Sambrook *et al.*, 1989). تم تطوير البروتوكول المستخدم في عملية الاستخلاص والغسيل بمحلول السوربيتول للتخلص من المركبات الفينولية في العينات مما يحسن من نقاوة الـ DNA وخلوه من عديد السكريات، إلا أن جمع العينات في أنابيب تحوي هذا المحلول وبقائها لمدّة من الزمن معرضة للظروف العادية قبل حفظها في الثلاجة أدى إلى تأكسد المركبات الفينولية في العينات وتحولها للون البني قبل طحنها والقيام بعملية الاستخلاص. وكان من المفضل في مثل هذه الحالة جمع العينات ووضعها مباشرة في حافظة تحوي النيتروجين السائل ثم نقلها مباشرة للمختبر وطحنها ثم حفظها في المجمدة لحين استخلاص الـ DNA منها. وقد أجري هذا التعديل على الطريقة لعدم توفر النيتروجين السائل. وعلى الرغم من ذلك كله، تم استخدام الـ DNA الناتج في التفاعل التسلسلي للبوليمراز PCR كاختبار تأكيدي على إمكانية استخدام هذا الـ DNA في الاختبارات الجزيئية.



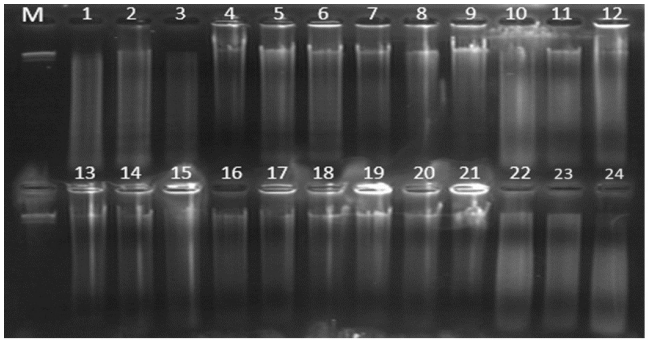
شكل 2. تركيز ونقاوة الـ DNA المستخلص من الفليفلة.

Figure 2. Concentration and purity of extracted DNA from pepper.

تم اختبار نوعية الـ DNA المستخلص على هلامة أغاروز تركيز 1%، وقد أظهرت النتائج أن جزءاً من الـ DNA المستخلص كان ذو نوعية جيدة، ووزن جزيئي مرتفع، وهو يعادل حجم جينوم الباكتريوفاج لامبدا (حوالي 50 كيلو قاعدة)، حيث ظهر الـ DNA على شكل حزمة (Band) متماسكة أعلى المسارات في الهلامة، كما أظهرت صورة الهلامة وجود تراكيز من RNA ذات وزن جزيئي منخفض أسفل المسارات، وهذا ما تم الكشف عنه سابقاً من خلال قراءة المطياف الضوئي عندما تجاوزت قيمة نسبة النقاوة 2.0. كما لوحظ ظهور الـDNA على شكل لطخ (Smear) على طول المسار وبشكل واضح (شكل 3)، وقد يعود ذلك إلى طريقة حفظ العينة كما أشرنا سابقاً. إلا أن الطريقة المتبعة في هذا البحث كانت كافية للحصول على حزمة من الـ DNA بوزن جزيئي كبير يعادل الوزن الجزيئي لجينوم البكتريوفاج لامبدا، وكانت الكمية المستخلصة كافية لإجراء التفاعل التسلسلي للبوليميراز للكشف عن الفايتوبلازما. إن نجاح التفاعل التسلسلي للبوليمراز باستخدام الـ DNA المستخلص يدلّ على صلاحية هذا الـ DNA للعمل وخلوه من الملوثات التي قد تثبط هذا التفاعل. لذلك خففت العينات إلى التركيز 50 نانوغرام/ميكرولتر بناءً على قراءة المطياف الضوئي واستخدمت كمية 2 ميكروليتر منه (100 نانوغرام) في المرحلة الأولى لتفاعل الـ PCR.

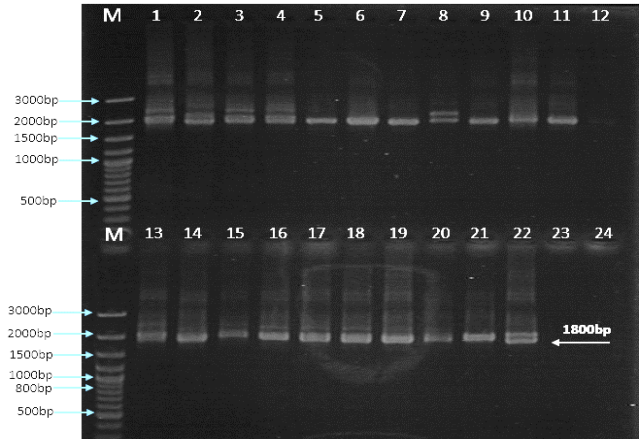
الكشف عن الفايتوبلازما بواسطة التفاعل التسلسلي للبوليميراز المتداخل (Nested PCR)

تم في المرحلة الأولى من التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR الحصول على القطعة المتوقعة، وهي بطول حوالي 1.8 كيلو قاعدة، في كل عينات الفليفلة وبشكل واضح (شكل 4)، مما يشير إلى وجود عدد كبير من خلايا الفايتوبلازما في العينات المدروسة أدت إلى ظهور ناتج التفاعل في المرحلة الأولى، والتي يتعذر ظهورها في حال كان عدد الخلايا أقل من حدود الكشف اللازمة للتفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR مما يستدعي إجراء المرحلة الثانية من التفاعل التسلسلي للبوليميراز المتداخل. وفي المرحلة الثانية تم الحصول على القطعة المتوقعة بطول حوالي 1.2 كيلو قاعدة في جميع عينات الفليفلة المختبرة، وهذا يؤكد نتيجة الاختبار الأول نظراً لأنه في هذه المرحلة تتم عملية المكاثرة لقطعة DNA داخل القطعة الأولى، مما يزيد من التخصص ودقة النتيجة. يمكن من خلال هذه المرحلة تأكيد وجود الإصابة بالفايتوبلازما عندما يكون تعداد البكتيريا قليلاً في الأنسجة وأدنى من حدود الكشف (شكل 5).



شكل 3. الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز تركيز 1% لاختبار نوعية الـDNA المستخلص من عينات الفليفلة. M = مؤشر لامبدا 50 نانوغرام، المسارات 1 – 22= عينات الفليفلة المصابة، المسارين 23-24= عينات فليفلة سليمة.

Figure 3. DNA quality test extracted from pepper samples by electrophoresis in agarose gel 1%. M= lambda marker 50 ng/µl, lanes 1-22= infected samples, lanes 23-24= healthy samples.



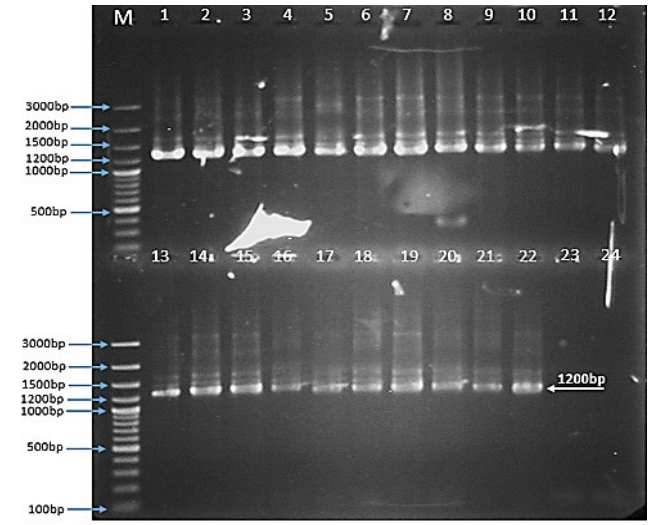
شكل 4. الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز 1% لنواتج المرحلة الأولى من التفاعل التسلسلي للبوليميراز المتداخل Nested PCR باستخدام البادئات P1/P7 على عينات الفليفلة. M= المؤشر السلمي 100 زوج نكليوتيدي. المسارات 1-22= عينات الفليفلة المصابة بالفايتوبلازما، المساران 23-24= عينات الفليفلة السليمة.

Figure 4. Electrophoresis of the PCR products on 1% agarose gel from the first stage of Nested PCR using P1/P7 primers on pepper samples. M= Gene ruler 100 bp, lanes 1-22= pepper samples infected with phytoplasma, lanes 23-24= healthy pepper plants.

تحديد مجموعات وتحت مجموعات الفايتوبلازما 16Sr group

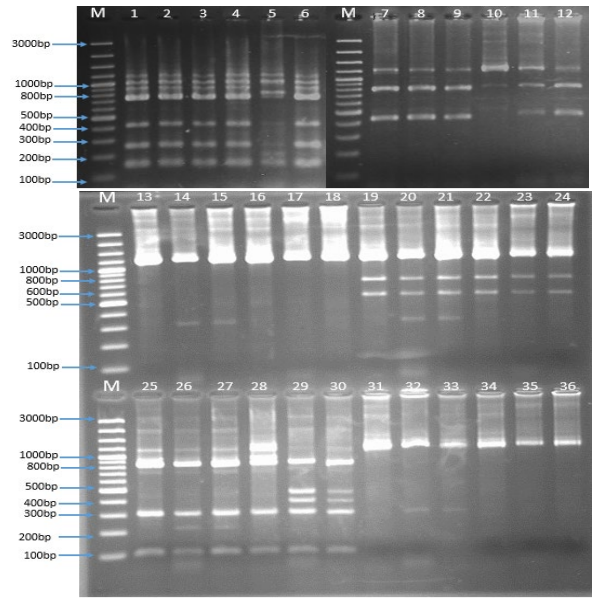
تم اختيار ناتج المكاثرة من المرحلة الثانية لتفاعل Nested PCR في 6 عينات فليفلة مصابة بالفايتوبلازما، مثّلت كل اثنتين منها إحدى مناطق الحصر المدروسة (دير حافر، السفيرة، كويرس)، وذلك لتحديد المجموعة وتحت المجموعة للمورثة 16SrDNA. هضمت العينات باستخدام ستة أنزيمات قطع مختلفة وهي *Rsa*I، *Hha*I، *Eco*RI، *Bam*HI، *Hin*fI و *Alu*I. لم تظهر نتائج هضم بالنسبة للأنزيمين *Bam*HI و *Rsa*I وتم الاعتماد على باقي الأنزيمات في تعريف المجموعة وتحت المجموعة الجزيئية للفايتوبلازما.

حيث أظهرت نتائج القطع بالأنزيم *Alu*I تشكل أربع قطع بطول 150، 250، 400 و 800 زوج نكليوتيدي (bp)، وقطعتين بطول 400 و 800 زوج نكليوتيدي (bp) عند الهضم بالأنزيم *Hin*fI، وقطعتين بطول 600 و 800 زوج نكليوتيدي (bp) عند الهضم بالأنزيم *Eco*RI ما عدا العينتين 20 و 21 فكانت أطوال القطع الناتجة 300، 600 و 800 زوج نكليوتيدي (bp). وثلاث قطع بطول 100، 400 و 800 زوج نكليوتيدي (bp) عند الهضم بالأنزيم *Hha*I باستثناء العينتين 29 و 30 التي كان نموذج القطع فيها مختلفاً وغير متطابق مع الدراسات المرجعية لنماذج القطع بنفس الأنزيم؛ فقد تم الحصول على خمس قطع بطول 100، 300، 400، 500 و 800 زوج نكليوتيدي (شكل 6).



شكل 5. الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز 1% لنواتج المرحلة الثانية من التفاعل التسلسلي للبوليميراز المتداخل Nested PCR باستخدام البادئات R16F2n / R16R2 على عينات الفليفلة. M= مؤشر سلمي 100 زوج نكليوتيدي، المسارات 1-22= ناتج الـPCR لعينات الفليفلة التي ظهرت عليها إصابة بالفايتوبلازما، المساران 23-24= ناتج تفاعل الـ PCR للشاهد السلبي من عينات الفليفلة السليمة.

Figure 5. Electrophoresis of the PCR products on 1% agarose gel from the second stage of Nested PCR using R16F2n / R16R2 primers on pepper samples. M= Gene ruler 100 bp, lanes 1-22= pepper samples infected with phytoplasma, lanes 23-24= healthy pepper plants.



شكل 6. الرحلان الكهربائي في هلامة أغاروز تركيز 2% للهضم الأنزيمي لنواتج المرحلة الثانية من التفاعل التسلسلي للبوليميراز المتداخل (Nested PCR) على عينات الفليفلة المصابة بالفايتوبلازما. M= مؤشر سلمي 100 زوج نكليوتيدي، المسارات 1-6= الهضم بالأنزيم *Alu*I، المسارات 7-12= الهضم بالأنزيم *Hin*fI، المسارات 13-18= الهضم بالأنزيم *Bam*HI، المسارات 19-24= الهضم بالأنزيم *Eco*RI، المسارات 25-30= الهضم بأنزيم *Hha*I، المسارات 31-36= الهضم بالأنزيم *Rsa*I.

Figure 6. Electrophoresis in 2% agarose gel of enzymatic digestion for the second stage products of Nested PCR on phytoplasma infected pepper samples. M= Gene ruler 100 bp, lanes 1-6= *Alu*I digestion, lanes 7-12= *Hin*fI digestion, lanes 13-18= *Bam*HI digestion, lanes 19-24= *Eco*RI digestion, lanes 25-30= *Hha*I digestion, lanes: 31-36= *Rsa*I digestion.

المناقشة

أظهرت نتائج هذه الدراسة انتشار الإصابة بالفايتوبلازما على الفليفلة في أهم مناطق زراعتها في محافظة حلب، وتمثلت الأعراض بمظاهر مختلفة على النباتات المصابة على مستوى الأوراق والبراعم وحامل البرعم. إلا أن الأعراض الأكثر تمييزاً، حتى من قبل المزارعين، كانت عقم النباتات وانخفاض عدد الثمار عليها بشكل كبير. أشارت نتائج الدراسة الجزيئية إلى أن جميع الأعراض التي تمت مشاهدتها في الحقل كانت ناتجة عن الإصابة بالفايتوبلازما. تباينت نسبة الإصابة في الحقول المدروسة ووصلت في حدها الأقصى إلى 7%، الأمر الذي يستدعي متابعة تطور انتشار هذا المرض في المناطق المدروسة لاعتمادها على زراعة هذه المحاصيل سنوياً. ويعد هذا التسجيل الأول للمرض على الفليفلة في سورية. أشارت دراسة سابقة إلى أن نسبة الإصابة بالفايتوبلازما على محصول الفليفلة في لبنان تراوحت بين 1–4%، وعلى البندورة/الطماطم بين 2–8% (Choueiri *et al*., 2007)، وفي دراسة أخرى في تركياً وجد

أن أعراض الفايتوبلازما على الفليفلة كانت مرتبطة مع المجموعة الفرعية 16SrVI-A (Sertkaya *et al*., 2007)، كما سجلت المجموعة 16SrVI في الهند وأمريكا (Randall *et al*., 2009؛ Rao & Kumar, 2017).

بينما في إيران، وجد أنها مرتبطة بالمجموعة الفرعية 16SrXII-A (Davoodi *et al.,* 2021)، والمجموعة 16SrIII في بوليفيا (Arocha *et al.,* 2010). وفي دراسة مشابهة، تم إجراء مسح حقلي لأربع محافظات في جمهورية مصر العربية تم فيها زيارة 40 حقل بندورة/طماطم و20 حقل باذنجان، وكانت نسبة الإصابة فيها متساوية بين المحصولين وتراوحت بين 4–15%، وكانت الفايتوبلازما تتبع تحت المجموعة 16SrII-D (Omar *et al*., 2012).

وبيّنت دراسة أخرى أجريت في محافظة حماة خلال الموسم 2010 على محصول السمسم أن نسبة الإصابة تراوحت في حدود 7–66% (Khabbaz *et al*., 2013). أما في اليونان فقد أجريت دراسة لتحديد نسبة الإصابة بالفايتوبلازما على محصول البندورة خلال الموسمين 2004 و 2005، وبلغت نسبة الإصابة في معظم الحقول 1–2%، وفي بعض الحقول 15%، وفي حالات قليلة جداً وصلت إلى 70–80% (Vellios & Lioliopoulou, 2007). كما سُجلت المجموعة نفسها 16SrVI-A على الذرة الرفيعة في إيران (Zibadoost & Rastgou, 2016) وعلى السمسم في تركيا وإيران (Salehi *et al.,* 2017).

عند مقارنة نتائج الهضم الأنزيمي لستة أنزيمات مع المراجع المتخصصة في تمييز المجموعات الجزيئية للفايتوبلازما (Lee *et al.,* 1998)، تبين عدم وجود تطابق تام بين نماذج القطع لأربعة أنزيمات *Rsa*I، *Hha*I، *Hin*fI و *Alu*I ومثيلاتها في الدراسة المرجعية، بينما تطابقت مع نماذج القطع للأنزيمين *Eco*RI و *Bam*HI اللذين لهما نموذج القطع نفسه في جميع المجموعات الجزيئية المعرفة مما يقلل من أهميتهما في تمييز المجموعات الجزيئية للعزلات المدروسة. وبناء عليه يمكن الاعتماد على تحليل التتابع النكليوتيدي (DNA sequencing) للمورثة 16S RNA، وتحديد كامل مواقع القطع الأنزيمي الموجودة فيها، ورسم الشكل الافتراضي لها، ومن ثم تحديد المجموعات الجزيئية التي تتبع لها العزلات المدروسة باستخدام برنامج *i*PhyClassifier.

يعدّ هذا البحث من الدراسات القليلة التي أجريت على الفايتوبلازما في سورية، والأول على الفليفلة، وكذلك استخدام الطرق الجزيئية في الكشف عنها، وبذلك يمكن الاعتماد على نتائجه في معرفة مدى تطور انتشار المرض في السنوات القادمة في أهم مناطق زراعة الفليفلة في محافظة حلب، وتحديد النواقل المسؤولة عن انتشاره، ومن ثم وضع استراتيجية مناسبة للحد من انتشاره.

Abstract

Saab, M. and F. Khatib. 2026. Survey and Molecular Characterization of Phytoplasma Incidence in The Pepper Crop Grown in The Fields of Aleppo Governorate, Syria. Arab Journal of Plant Protection, 44(2):147-154.
https://doi.org/10.22268/AJPP-001401

The pepper crop is an important dietary vegetable grown in Aleppo Governorate. A field survey for phytoplasma infection was conducted during the 2022 growing season in 9 fields distributed in Deir Hafer, Al-Safira, and Kuweres, and the observed symptoms caused by phytoplasma were described, and 22 samples with disease symptoms were collected. The genomic DNA was extracted and characterized for its concentration, purity, and integrity. Nested PCR was performed in two stages using two primers pairs P1/P7 and R16F2n/R16R2 to detect the phytoplasma infection. For PCR-RFLP technique, the PCR products of stage II were digested with six restriction enzymes: *Alu*I, *Hin*fI, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hha*I and *Rsa*I. The digestion products were separated on 2% agarose gel, and the results were compared with reference studies to identify the molecular groups based on the 16S rRNA gene in phytoplasma. The average phytoplasma incidence was around 2, 3 and 1% in Deir Hafer Al -Safira, and Kuweres, respectively. Based on PCR results, all pepper samples tested were 100% infected with phytoplasma. The results of enzymatic digestion with four restriction enzymes *Alu*I, *Hin*fI, *Hha*I, and *Rsa*I showed incomplete profile match between the isolates and the revised classification scheme of phytoplasma. Therefore, DNA sequencing for 16S RNA gene is required for the classification of molecular groups of phytoplasma based on the available restriction sites.

Keywords: Pepper, phytoplasma, molecular characterization, PCR-RFLP.

Affiliation of authors: *M. Saab and F. Khatib*[*]*, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Engineering, University of Aleppo, Syria. *Email address of the corresponding author: f.khatib@alepuniv.edu.sy*

المراجع

References

Arocha, Y., G. Plata, J. Franco, G. Maín, S. Veramendi, F. Lazcano, J.L. Crespo, V. Lino, C. Calderón, R. Llerena and R.F. Andrews. 2010. First report of a 16SrIII phytoplasma (X-disease group) affecting bell pepper, strawberry (frutilla), *Schinus molle* and *Arracacia xanthorrhiza* in Cochabamba, Bolivia. Plant Pathology, 59(2):395. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02235.x

Bertaccini, A. and I.-M. Lee. 2018. Phytoplasmas: an update. Pp. 1-29. *In*: Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - I. Characterization and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases. G.P. Rao, A. Bertaccini, N. Fiore and L.W. Liefting (eds.). Springer, Singapore.

Bertaccini, A., B. Duduk, S. Paltrinieri and N. Contaldo. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a

severe threat to agriculture. American Journal of Plant Sciences, 5:1763-1788. https://doi.org/10.4236/ajps.2014.512191

Choueiri, E., P. Salar, F. Jreijiri, S. El Zammar, R. Massaad, H. Abdul-Nour, J.M. Bové, J.L. Danet and X. Foissac. 2007. Occurrence and distribution of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' associated with diseases of solanaceous crops in Lebanon. European Journal of Plant Pathology, 118:411-416. https://doi.org/10.1007/s10658-007-9142-8

Davoodi, A., N. Panjeke, C. Moslemkhani and A. Taheri. 2021. Detection of 16SrXII-A phytoplasma strain associated with *Capsicum annuum* stolbur disease in Iran. Journal of Crop Protection, 10(3):547-555. https://doi.org/10.48311/jcp.2021.1555

Deng, S. and C. Hiruki. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. Journal of Microbiological Methods, 14(1):53-61. https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D

Doi, Y., M. Teranaka, K. Yora and H. Asuyama. 1967. Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. Japanese Journal of Phytopathology, 33(4):259-266. https://doi.org/10.3186/jjphytopath.33.259

Faghihi, M.M., S.M. Taghavi, A. Safaei, M. Siampour and S.S. Modarres-Najafabadi. 2016. First report of a phytoplasma associated with bell pepper big bud disease in Iran. New Disease Reports, 33(1):15. https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.033.015

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2024. FAOSTAT. FAO Statistics Division. Available at: https://www.fao.org/faostat/

Govindarajan, V.S. and U.J. Salzer. 1985. Capsicum-production, technology, chemistry, and quality. Part 1. History, botany, cultivation, and primary processing. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 22(2):109-176. https://doi.org/10.1080/10408398509527412

Gundersen, D.E. and I.-M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathologia Mediterranea, 35(3):144-151.

Hodgetts, J., N. Harrison, M. Dickinson, C. Denman and I.-M. Lee. 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(8):1826-1837. https://doi.org/10.1099/ijs.0.65668-0

Inglis, P.W., M.V. Pappas, L.V. Resende and D. Grattapaglia. 2018. Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high-quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. PLOS ONE, 13(10):e0206085. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206085

Khabbaz, S.E., M. Alnabhan and M. Arafeh. 2013. First report of the natural occurrence of phyllody disease of sesame in Syria. International Journal of Scientific Research, 2(10):1-3.

Lee, I.-M., D.E. Gundersen-Rindal, R.E. Davis and I.-M. Bartoszyk. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology, 48:1153-1169.

Omar, A.F. and X. Foissac. 2012. Occurrence and incidence of phytoplasmas of the 16SrII-D subgroup on solanaceous and cucurbit crops in Egypt. European Journal of Plant Pathology, 133(2):353-360. https://doi.org/10.1007/s10658-011-9908-x

Randall, J.J., P.W. Bosland and S.F. Hanson. 2009. Brote grande, a new phytoplasma-associated disease of Chile peppers. Plant Disease, 93(9):968. https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0968C

Rao, G.P. and M. Kumar. 2017. World status of phytoplasma diseases associated with eggplant. Crop Protection, 96:22-29. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.005

Salehi, M., S.A. Esmailzadeh Hosseini, E. Salehi and A. Bertaccini. 2017. Genetic diversity and vector transmission of phytoplasmas associated with sesame phyllody in Iran. Folia Microbiologica, 62:99-109. https://doi.org/10.1007/s12223-016-0476-5

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. 1890 pp.

Sertkaya, G., M. Martini, R. Musetti and R. Osler. 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. Bulletin of Insectology, 60(2):141-142.

Vellios, E. and F. Lioliopoulou. 2007. Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece. Bulletin of Insectology, 60:157-158.

Zibadoost, S. and M. Rastgou. 2016. Molecular identification of phytoplasmas associated with some weeds in West Azerbaijan province, Iran. Acta Agriculturae Slovenica, 107(1):129-136. https://doi.org/10.14720/aas.2016.107.1.13

Received: April 25, 2024; Accepted: December 30, 2024

تاريخ الاستلام: 2024/4/25؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2024/12/30