

برهمکنش فیتوپلاسم‌های عامل بیماری‌های جاروک لیموترش و فیلودی کاهو در آلودگی مخلوط بوته‌های پروانش*

الهام صالحی ابرقوئی^۱، کرامت‌اله ایزدپناه^{۱*}، سیدمحسن تقوی^۱، حبیب‌اله حمزه زرقانی^۱ و علیرضا افشاریفر^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۹)

چکیده

در این پژوهش اثر آلودگی مخلوط فیتوپلاسم‌های جاروک لیموترش (16SrII-B) و فیلودی کاهو (16SrIX-D) بر روی علائم بیماری و تراکم سلول‌های فیتوپلاسم در بوته‌های پروانش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) مطالعه شد. تعداد چهار بوته پروانش سالم و هم‌سن از طریق قطعات سس آلوده ابتدا با فیتوپلاسم‌های عامل فیلودی کاهو و پس از سه هفته با فیتوپلاسم‌های جاروک لیموترش مایه‌زنی شدند. علائم بیماری و جمعیت فیتوپلاسم در این بوته‌ها با علائم بیماری و جمعیت فیتوپلاسم در بوته‌هایی که تنها با یکی از این فیتوپلاسم‌ها مایه‌زنی شده بودند مقایسه گردید. در بوته‌هایی که به صورت مخلوط مایه‌زنی شده بودند تنها کاهش خفیفی در اندازه برگ و فاصله میانگره‌ها ایجاد شد که با علائم شدید ناشی از هر یک از دو فیتوپلاسم، کاملاً متفاوت بود. بوته‌هایی که به صورت مخلوط مایه‌زنی شده بودند در مقایسه با بوته‌هایی که تنها با یک فیتوپلاسم مایه‌زنی شده بودند طول عمر بیشتری داشتند. با استفاده از پی‌سی‌آر معمولی و آغازگرهای اختصاصی وجود هر دو فیتوپلاسم در بوته‌هایی که به صورت مخلوط مایه‌زنی شده بودند و همچنین در بوته‌های شاهد مثبت به اثبات رسید. آنالیز داده‌های حاصل از آزمون پی‌سی‌آر در زمان واقعی (Real-time PCR) نشان داد که جمعیت هر دو فیتوپلاسم در بوته‌هایی که به صورت مخلوط مایه‌زنی شده بودند در مقایسه با بوته‌های شاهد مثبت به طور معنی‌داری کاهش داشت. به نظر می‌رسد برهمکنش این دو فیتوپلاسم در آلودگی مخلوط از نوع آنتاگونیسم متقابل باشد.

کلیدواژه: آلودگی مخلوط، بازداری متقابل، جمعیت فیتوپلاسم، پی‌سی‌آر در زمان واقعی

* بخشی از پایان‌نامه دکتری نویسنده اول، دانشجوی دکتری پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی، بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: izadpana@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، استاد، دانشیار و استاد بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران.

Interaction of witches'- broom disease of lime phytoplasma and lettuce phyllody phytoplasma in mixed infection of periwinkle plants*

E. Salehi Abarghouei¹, K. Izadpanah^{1**}, S. M. Taghavi¹, H. Hamzezarghani¹, and A. Afsharifar¹

(Received: 27.6.2018; Accepted: 1.10.2018)

Abstract

In this research the effect of mixed infection of witches' broom disease of lime (WBDL) (16SrII-B) and lettuce phyllody (LP) (16SrIX-D) phytoplasmas on symptom expression and phytoplasma density in periwinkle plants (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) were investigated. Four healthy periwinkle plants of the same age were first inoculated with LP phytoplasma and after three weeks with WBDL phytoplasma using detached fragments of inoculative dodder (*Cuscuta campestris* Yank.). Disease symptoms and phytoplasma population in plants inoculated with both phytoplasmas were compared with those in plants inoculated with either WBDL or LP phytoplasma. In doubly inoculated periwinkle plants the disease symptoms mitigated to mild reduction of leaf size and internodes which strongly differed from those in periwinkle plants singly inoculated with either WBDL or LP phytoplasma. Plants with mixed infection lived longer than those inoculated singly with either phytoplasma. Both WBDL and LP phytoplasmas could be detected in singly and doubly infected plants by conventional and real time PCR assays using specific primer pairs. Analysis of the data obtained by real-time PCR showed that the population of both WBDL and LP phytoplasmas in the mixed infection was significantly lower than that in plants singly inoculated with WBDL or LP phytoplasma. It seems that interaction of WBDL and LP phytoplasmas in mixed infection of periwinkle is of the mutual suppression type.

Keywords: Mixed infection, Mutual antagonism, Phytoplasma population, Real-time PCR

* A part of PhD. thesis by the first author, Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

**Corresponding author's E-mail: izadpana@shirazu.ac.ir

1. PhD student, Prof., Prof., Associate Prof. and Prof. of Plant Pathology, Respectively, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

مقدمه

پدیده دگرپادی (Cross protection) در ویروس‌های گیاهی از دهه ی ۱۹۳۰ شناخته شده است (McKinney 1929). این مطالعات فیتوپلاسمها را نیز که در آن زمان به عنوان ویروس شناخته می‌شدند در بر می‌گرفت (Kunkel 1936). در سال ۱۹۵۵ کانکل مطالب مربوط به دگرپادی میان سویه‌های عامل زردی مینا (aster yellows) را مرور کرد (Kunkel 1955). در بیشتر این مطالعات نشان داده می‌شد که یک سویه ملایم مانع از فعالیت و توسعه سویه شدید از همان بیمارگر می‌گردد. در اروپا طی ۱۲ سال حدود ۲۴ جدایه از فیتوپلاسمای همراه با بیماری افزولش سیب جمع‌آوری شدند که از نظر شدت بیماری زایی در سه گروه کم آزار (mildly virulent)، بسیار آزار (strongly virulent) و ناپر آزار (avirulent) قرار می‌گرفتند (Seemüller & Schneider 2007). سویه‌های بسیار پر آزار موجب کوتولگی شدید و زوال در درختان می‌شوند. علائم استرین‌های خفیف مشخص و بارز نیست و در درختان آلوده به این سویه‌ها در مقایسه با درختان سالم تفاوت محسوسی مشاهده نمی‌شود (Seemüller et al. 1984, Seemüller et al. 2011). جهت بررسی برهمکنش آنتاگونیستی میان استرین‌های 'Candidatus Phytoplasma mali' در شرایط گلخانه، بوته‌های پروانش و توتون به طور همزمان و غیرهمزمان با استرین‌های شدید و خفیف فیتوپلاسمای افزولش سیب مایه‌زنی شدند (Schneider et al. 2014). نتایج بررسی علائم بیماری در این گیاهان و انجام آزمون‌های مولکولی از جمله پی‌سی‌آر در زمان واقعی نشان داد که در مایه‌زنی‌های غیرهمزمان استرین خفیف 1/93Vin خاصیت سرکوب‌کنندگی داشت و در کلیه آزمایش‌ها این استرین

تا روزهای آخر در ریشه و ساقه گیاهان مایه‌زنی‌شده قابل ردیابی بود، درحالی‌که استرین شدید AT در ساقه وجود نداشت و به ندرت در ریشه ردیابی شد. در مایه‌زنی همزمان نیز استرین خفیف در ساقه و ریشه جمعیت بالایی داشت ولی جمعیت استرین شدید اگر چه در ریشه و ساقه قابل ردیابی بود ولی در مقایسه با گیاهانی که به تنهایی با این استرین مایه‌زنی شده بودند کاهش شدید داشت. در مایه زنی غیرهمزمان چه استرین مهاجم ابتدا و چه پس از استرین ملایم مایه‌زنی شده بود تغییر چندانی در نتیجه سرکوب‌گری نداشت. در بوته‌هایی که به طور همزمان و غیرهمزمان مایه‌زنی شده بودند ابتدا علائم استرین خفیف ظاهر شد و در پایان یاد داشت برداری این گیاهان هیچگونه تفاوتی با گیاهان سالم نداشتند. اخیراً علاوه بر برهمکنش استرین‌های 'Ca. Phytoplasma mali' مطالعات جدیدی در رابطه با برهمکنش استرین‌های فیتوپلاسمای دیگر در درختان میوه از جمله زردی اروپایی هسته‌دارها ناشی از 'Ca. Phytoplasma prunorum' و زوال گلابی ناشی از 'Ca. Phytoplasma pyri' انجام شده است (Seemüller & Schneider 2004, Seemüller et al. 2010, Seemüller et al. 2011, Seemüller et al. 2013, Schneider et al. 2014). نتایج این مطالعات نشان داده است که استرین ملایم 1/93Vin فیتوپلاسمای همراه با بیماری افزولش سیب مانع از گسترده‌گی علائم ناشی از بیماری زوال گلابی و زردی اروپایی هسته‌دارها می‌شود. با وجود این مطالعه بر همکنش فیتوپلاسمای مختلف مخصوصاً آن‌ها که به گروه‌های مختلف تعلق دارند محدود باقی مانده است.

هدف از پژوهش حاضر بررسی برهمکنش فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش (16SrII-B) (Salehi et al. 2002) با فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهودر ایران

(Salehi et al. 2007) (16SrIX-D) در پروانش از طریق مایه‌زنی غیرهمزمان بود.

مواد و روش‌ها

گیاهان مورد استفاده در گلخانه

بذور پروانش (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) گل قرمز در یک گلخانه عاری از حشرات کشت شد و از بین بوته‌های حاصل بوته‌هایی که از نظر رشد یکنواخت بودند برای مایه‌زنی با فیتوپلاسمهای عامل جاروک لیموترش و فیلودی کاهو از طریق سس مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهان پروانش در سن شش ماهگی با فیتوپلاسمهای مورد نظر از طریق سس مایه‌زنی شدند. کلیه آزمایش‌ها در گلخانه‌ای با دماهای حدود 30°C در روز و 26°C در شب و حدود ۱۵ ساعت نور طبیعی (گلخانه بدون سایبان) انجام شد.

منابع فیتوپلاسمهای مورد مطالعه

در این پژوهش از یک بوته پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش (16SrII-B) و یک بوته پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل بیماری فیلودی کاهو (16SrIX-D) به عنوان منبع فیتوپلاسم استفاده شد. پیشتر فیتوپلاسمای جاروک لیموترش با استفاده از سس (*Cuscuta campestris* Yank.) از یک نهال لیموترش آلوده جمع‌آوری شده از نیک شهر (استان سیستان-بلوچستان) (Salehi et al. 2002) و فیتوپلاسمای فیلودی کاهو از یک بوته پروانش آلوده به این فیتوپلاسم از زرقان (استان فارس) (Salehi et al. 2007) به بوته‌های پروانش انتقال داده شده و بوسیله پیوند در این گیاه تکثیر و نگهداری شده بودند.

مایه‌زنی بوته‌های پروانش با فیتوپلاسم به کمک سس

برای این منظور بذور سس (*C. campestris* Yank.) روی کاغذ صافی مرطوب کشت داده شد و گیاهچه‌های حاصل روی دو بوته سالم چغندر قند حاصل از کشت بذر در گلخانه قرار داده شدند تا منبع سس سالم تهیه شود. بعد از ۴ هفته بین سس موجود روی یکی از بوته‌های چغندر و یک بوته پروانش آلوده به بیماری جاروک لیموترش و بین سس موجود روی بوته دیگر چغندر قند با یک بوته پروانش آلوده به فیتوپلاسمای فیلودی کاهو ارتباط برقرار شد تا منبع سس آلوده به این دو فیتوپلاسم تهیه گردد. برای مایه‌زنی، ابتدا یگ گرم از قطعات سس موجود روی پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو و سه هفته بعد یک گرم از قطعات سس موجود روی پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش روی هر یک از چهار بوته پروانش قرار داده شدند. به عنوان شاهد مثبت با استفاده از قطعات سس چهار بوته پروانش سالم به تنهایی با فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش و چهار بوته دیگر با فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو مایه‌زنی شدند. روی چهار بوته پروانش سالم نیز قطعات سس سالم مستقر شد و از آن‌ها به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. بوته‌های مایه‌زنی شده و کنترل منفی سه هفته بعد از قرار دادن سس روی آن‌ها عاری از سس شدند و برای یادداشت برداری از علائم و تهیه نمونه برای پی‌سی‌آر در گلخانه تحت نظر قرار گرفتند. گیاهان مایه‌زنی شده بعد از اولین مایه‌زنی هر ماه یک بار از نظر علائم بررسی شده و یادداشت برداری به عمل آمد.

استخراج دی‌ان‌ای کل و واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز

برای آزمون‌های پی‌سی‌آر معمولی و پی‌سی‌آر در زمان واقعی از یک ماه بعد از شروع مایه‌زنی تا هشت ماه و هر

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش و ویژگی های آن ها

Table 1. Primers used in the present study and their features

Primer	Size (nt)	Sequence (5'-3')	Annealing temperature	Product length(bp)
LP ^F	20	AGGAACACCAGAGGCGTA GG	63	143
LP ^R	20	TCAGTACCGAGCCGAAAC CC		
WBDL ^F	20	GTACACACCGCCCGTCAAAC	63	146
WBDL ^R	20	GATCCATCCCCACCTTCCGG		
ef-1a ^F	22	CTCTGCTTGCTTTCACCCTTGG	55	115
ef-1a ^R	23	GAGACCTCCTTCACAATTCATC		

سیناژن ایران استفاده گردید. در آزمون‌های پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای محصول دور اول پی‌سی‌آر ۲۰ بار رقیق و از آن به عنوان دی ان ای قالب برای مرحله دوم استفاده شد. حجم نهائی مخلوط واکنش پی‌سی‌آر ۲۵ میکرولیتر و شامل ۵۰ نانوگرم دی ان ای الگو، مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت نهایی ۰/۲ میکرومولار، آغازگرها با غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار، بافر پی‌سی‌آر یک و نیم میکرولیتر، کلرید منیزیم با غلظت نهایی یک و نیم میلی مولار و آنزیم پلیمرز تک (خریداری شده از شرکت سیناژن، ایران) به مقدار دو و نیم واحد بود که با افزودن آب دو بار تقطیر شده استریل حجم آن به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

در آزمون پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای لوله‌ها برای ۳۵ چرخه پی‌سی‌آر در دستگاه ترموسایکلر Biorad مدل iCyclerTM (ساخت آمریکا) قرار داده شدند. چرخه دمایی دور اول پی‌سی‌آر شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد برای واسرشتگی دی ان ای (اولین چرخه ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد)، دو دقیقه در ۵۵ درجه سانتیگراد برای اتصال آغازگر (annealing) و ۳ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ساختن دی ان ای بود. چرخه دمایی دور دوم پی‌سی‌آر شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد برای واسرشتگی دی ان ای (اولین چرخه ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد)، یک دقیقه در ۶۳ درجه سانتیگراد برای اتصال

ماه یک بار از پروانش‌هایی که به طور مخلوط مایه‌زنی شده بودند و همچنین کنترل مثبت و منفی جهت استخراج دی ان ای نمونه تهیه شد. هر نمونه شامل ۰/۲ گرم بافت رگبرگ میانی از برگ‌های موجود روی شاخه‌های موجود در وسط ساقه اصلی بود. برای استخراج دی ان ای از روش ژانگ و همکاران (Zhang et al. 1998) استفاده گردید. آزمون پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای با استفاده از جفت آغازگر P₁/P₇ (Schneider et al. 1995) در دور اول و جفت آغازگرهای WBDL^F / WBDL^R (اختصاصی فیتوپلاسمای جوارک لیموترش) و یا LP^F/LP^R (اختصاصی فیتوپلاسمای فیلودی کاهو) که در این پژوهش از روی ژن آران‌ای ریپوزومی 16S با استفاده از نرم افزار آنالین 3 Primer (Untergasser et al. 2012) طراحی شدند (جدول ۱) در دور دوم انجام شد. جفت آغازگر P₁/P₇ قطعه‌ای به اندازه ی تقریباً 1800 جفت باز از اپرون آران‌ای ریپوزومی شامل ژن آران‌ای ریپوزومی 16S، ناحیه بین ژن‌های آران‌ای ریپوزومی 16S و 23S، ابتدای ژن آران‌ای ریپوزومی 23S و جفت آغازگرهای WBDL^F/WBDL^R و LP^F/LP^R به ترتیب قطعاتی به اندازه‌های تقریبی ۱۴۶ و ۱۴۳ جفت باز از ژن آران‌ای ریپوزومی 16S را تکثیر می‌کنند (جدول ۱). در آزمون پی‌سی‌آر از مواد خریداری شده از شرکت

پی‌سی‌آر ۲۰ میکرولیتر و شامل ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای الگو، ۱۰ میکرولیتر qPCR Green-Master with lowROX با غلظت نهایی 1x، ۳۰۰ نانومولار از هر آغازگر با غلظت پایه ۱۰ میکرومولار بود که با افزودن آب دو بار تقطیر شده استریل حجم آن به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده و آنالیز داده‌ها

محصول پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای LP^F/LP^R و $WBDL^F/WBDL^R$ (۱۴۶ جفت باز) برای تعیین ترادف (۱۴۳ جفت باز) پس از خالص‌سازی برای تعیین ترادف مستقیم به شرکت Bioneer در کشور کره ارسال گردید. ترادف‌های بدست آمده با استفاده از برنامه BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) موجود در بانک جهانی ترادف‌ها (GenBank) مقایسه و نزدیکترین ترادف‌ها با آن‌ها جستجو شد.

نرمال‌سازی میزان ژن ریبوزومی 16S پس از آزمون پی‌سی‌آر در زمان واقعی (Real-time PCR)

به منظور نرمال‌سازی میزان ژن ریبوزومی 16S در این پژوهش، آزمون پی‌سی‌آر در زمان واقعی به روش Carrillo-Tripp و همکاران (۲۰۰۷) در دستگاه BIOEER Line Gene K و به روش SYBR® Green و با کیت Jena Bioscience انجام گردید. داده‌های حاصل از آزمون پی‌سی‌آر در زمان واقعی به کمک نرم افزار Line Gene K از دستگاه بدست آمدند و با رابطه Livak یا $2^{-\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2004)، آنالیز گردیدند: رابطه Livak ($2^{-\Delta Ct}$)، ΔCt : Ct (target - Ct ref)، Ct: Ct ref و ΔCt : Ct ref (Ct) Cycle threshold (Ct) هر نمونه

آغازگر و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای تکمیل ترادف بود. در آزمون‌های پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای در آخر به منظور توسعه طول رشته دی‌ان‌ای، لوله‌ها ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. محصول پی‌سی‌آر در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید از نوارهای دی‌ان‌ای حاصل عکسبرداری شد.

برای انجام آزمون پی‌سی‌آر در زمان واقعی علاوه بر جفت آغازگرهای $WBDL^F/WBDL^R$ و LP^F/LP^R به ترتیب اختصاصی فیتوپلاسمهای جاروک لیموترش و فیلودی کاهو، جفت آغازگر کنترل داخلی ($ef-1a^F/ef-1a^R$) با استفاده از نرم افزار آنالیز Primer 3 (Untergasser *et al.* 2012) از روی ژن عامل امتداد (elongation factor) گیاه مرکبات طراحی شد (جدول ۱). از جفت آغازگرهای کنترل داخلی $ef-1a^F/ef-1a^R$ و $WBDL^F/WBDL^R$ به ترتیب جهت استانداردسازی واکنش پی‌سی‌آر در زمان واقعی و تکثیر ژن‌های اصلی در نمونه‌های پروانش مایه‌زنی شده استفاده شد. برای انجام این آزمون از Master mix Kit کمپانی Jena Bioscience استفاده شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس با جفت آغازگرهای اختصاصی $WBDL^F/WBDL^R$ و LP^F/LP^R در یک چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و با جفت آغازگرهای کنترل داخلی $ef-1a^F/ef-1a^R$ در یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه با استفاده از دستگاه Bioneer مدل Exicycler™ 96 ساخت کشور کره جنوبی انجام شد. آزمون پی‌سی‌آر در زمان واقعی حجم نهایی مخلوط واکنش

(مایه‌زنی‌های مخلوط و تکی) و SE_1^2 و SE_2^2 خطاهای معیار دو شیب می‌باشند. t_{cal} برای آزمون فرض برابری دو شیب و محاسبه سطح احتمال معنی‌دار ($Pr > t_{cal}$) مورد استفاده قرار گرفت (Garret et al. 2004). رسم شکل‌ها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

علائم بیماری در پروانش‌های مایه‌زنی‌شده

حدود ۱۰ هفته بعد از مایه‌زنی ظهور نشانه‌های بیماری در پروانش‌هایی که به تنهایی با فیتوپلاسم‌های عامل جاروک لیموترش و فیلودی کاهو مایه‌زنی شده بودند (شاهد مثبت‌ها) شروع و تا دو ماه بعد از آن (حدود چهار ماه بعد از مایه‌زنی)، به تدریج نشانه‌های این فیتوپلاسم‌ها کامل شدند. در بوته‌های پروانسی که به تنهایی با عامل جاروک لیموترش مایه‌زنی شده بودند در همه تکرارها علائم شدید ریزبرگی، کاهش فاصله میانگره‌ها، ایجاد گل‌های کوچک و گل سبزی ناقص، جاروک و کوتولگی (شکل 1A) و در بوته‌های پروانسی که به تنهایی با عامل فیلودی کاهو مایه‌زنی شده بودند در همه تکرارها علائم ریزبرگی، کاهش فاصله میانگره، گل سبزی و برگسانی اندام‌های گل ظاهر شد (شکل 1C). در پروانش‌هایی که به صورت مخلوط با فیتوپلاسم‌های عامل جاروک لیموترش و فیلودی کاهو مایه‌زنی شده بودند در همه تکرارها از ابتدا تا انتهای آزمایش تنها کاهش جزئی در اندازه برگ، فاصله میانگره و زردی مشاهده گردید ولی علائم سبز شدن و برگسانی اندام‌های گل، ریزبرگی و جاروک شدید، علائم بارز ناشی از فیتوپلاسم‌های عامل فیلودی کاهو و جاروک لیموترش ظاهر نشد (شکل 1B). در پایان یادداشت برداری (۳۵ هفته بعد از مایه‌زنی اول

برای ژن اصلی و کنترل داخلی با تعیین Base Line با استفاده از نرم افزار LineGeneK در حالت دستی (manual) و اتوماتیک محاسبه شد. بدین صورت که محل تقاطع Base Line با ابتدای فاز نمایی شکل تکثیر واکنش پی‌سی‌آر در زمان واقعی به عنوان Ct در نظر گرفته شد. سپس ΔCt (دلتا سی تی) محاسبه شد، یعنی Ct نمونه کنترل داخلی از Ct نمونه اصلی یا ژن هدف خودش تفریق شد (Pfaffl 2004).

محاسبات آماری

آزمایش مطالعه بر همکنش فیتوپلاسم‌های جاروک لیموترش و فیلودی کاهو در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. جمعیت فیتوپلاسم‌ها با اندازه‌گیری‌های تکراری (repeated measures) در هشت فاصله زمانی ۳، ۷، ۱۱، ۱۵، ۱۹، ۲۳، ۲۷ و ۳۱ هفته پس از مایه‌زنی ارزیابی شد. تجزیه آماری با استفاده از نرم افزار SAS 9.3 (SAS 1999) با برآزش مدل خطی به داده‌های جمعیت فیتوپلاسم‌های جاروک لیموترش و فیلودی کاهو در برابر زمان انجام شد. شیب خطوط نمودارهای افزایش جمعیت هر فیتوپلاسم و خطای معیار آنها در مایه‌زنی‌های مخلوط یا تکی محاسبه شد. برآورد شیب خط معیاری است که سرعت افزایش جمعیت هر کدام از فیتوپلاسم‌ها را در گیاه اندازه‌گیری می‌کند. مقدار آماره آزمون t (t_{cal}) با استفاده از فرمول زیر جهت انجام آزمون فرض صفر برابری شیب‌های خطوط (عدم تفاوت در سرعت افزایش جمعیت فیتوپلاسم در گیاه) ($H_0 = S_1 = S_2$) با آزمون تی (t-test) مورد استفاده قرار گرفت.

$$t_{cal} = \frac{S_1 - S_2}{\sqrt{SE_1^2 + SE_2^2}}$$

در فرمول فوق S_1 و S_2 بترتیب شیب خطوط ۱ و ۲



شکل ۱. علائم بیماری در بوته های پروانش مایه زنی شده با فیتوپلاسمهای جاروک لیموترش و فیلودی کاهو به صورت مخلوط و تنها، سی و پنج هفته پس از اولین مایه زنی: **A**، ریزبرگی، زردی، کاهش فاصله میانگره و جاروک شدید در پروانش مایه زنی شده با فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش به تنهایی؛ **B**، کاهش فاصله میانگره و زردی خفیف در پروانش مایه زنی شده به طور غیر همزمان با فیتوپلاسمهای جاروک لیموترش و فیلودی کاهو؛ **C**، ریزبرگی، کاهش میانگره و زردی در پروانش مایه زنی شده با فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو؛ **D**، پروانش سالم.

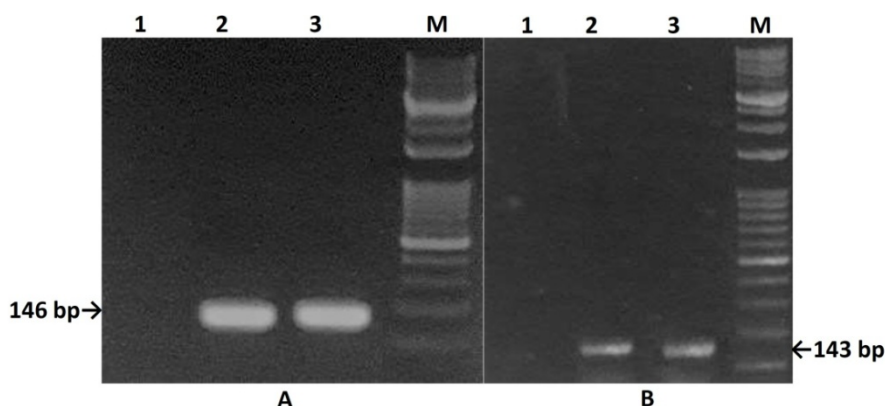
Fig. 1. Disease symptoms in periwinkle plants following inoculation of WBDL and LP phytoplasmas, 35 weeks post-inoculation: A, yellowing and severe little leaf, short internodes and witches' broom in a periwinkle plant inoculated with WBDL phytoplasma alone; B, mild yellowing and short internodes in a periwinkle plant inoculated with both WBDL and LP phytoplasmas; C, yellowing, little leaf and internode shortening in a periwinkle plant inoculated with LP phytoplasma alone; D, healthy periwinkle plant.

اختصاصی اقدام به ردیابی فیتوپلاسمهای جاروک لیموترش و فیلودی کاهو در گیاهان شد. در هر دو دفعه در آلودگی‌های مخلوط فیتوپلاسمهای جاروک لیموترش و فیلودی کاهو، هر فیتوپلاسم با جفت آغازگر اختصاصی خود تکثیر یافت ولی با جفت آغازگر اختصاصی فیتوپلاسمای دیگر تکثیر نشد. در همین آزمون قطعه ۱۴۶ جفت بازی در بوته‌هایی که به تنهایی با فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش مایه‌زنی شده بودند و قطعه ۱۴۳ جفت بازی در بوته‌هایی که به تنهایی با فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو مایه‌زنی شده بودند نیز تکثیر شد. تحت همین شرایط در بوته‌های سالم پروانش چنین قطعاتی تکثیر نشد (شکل ۲). قطعات ۱۴۶ و ۱۴۳ جفت بازی به

با عامل فیلودی کاهو) در ۲ بوته از ۴ بوته مایه‌زنی شده با فیتوپلاسمهای جاروک لیموترش و فیلودی کاهو گل‌های نرمال ایجاد شد. بوته‌هایی که به صورت مخلوط با فیتوپلاسمهای فیلودی کاهو و لیموترش مایه‌زنی شده بودند تا ۲۰ ماه بعد از مایه‌زنی زنده بودند ولی در این مدت همه بوته‌هایی که به تنهایی با فیتوپلاسمهای جاروک لیموترش و فیلودی کاهو مایه‌زنی شده بودند پژمرده شدند.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مرز

بعد از انجام مایه‌زنی، دوبار (۲ و ۸ ماه بعد از مایه‌زنی) در آزمون پی‌سی‌آر معمولی با استفاده از جفت آغازگرهای



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول های PCR دو مرحله ای باجفت آغازگر P1/P7 (دور اول) و جفت آغازگر های WBDL^F/WBDL^R (A) و LP^F/LP^R (B) در دور دوم. چاهک های 1 و M، به ترتیب پروانش سالم و مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, Vilnius, Lithuania). چاهک های 2 و 3 در A به ترتیب نمونه های پروانش مایه زنی شده با فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش به تنهایی و پروانش مایه زنی شده با فیتوپلاسمای فیلودی کاهو و جاروک لیموترش به صورت مخلوط؛ چاهک های 2 و 3 در B به ترتیب نمونه های پروانش مایه زنی شده با فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو به تنهایی و پروانش مایه زنی شده با فیتوپلاسمای فیلودی کاهو و جاروک لیموترش به صورت مخلوط.

Fig. 2. Gel electrophoresis patterns of nested PCR products using P1/P7 in the first round and WBDL^F/WBDL^R (A) or LP^F/LP^R (B) primer pairs in the second round. lanes 1 and M, healthy periwinkle and 100bp DNA marker (Fermentas, Vilnius, Lithuania), respectively; lanes 2 and 3 in A, a periwinkle plants inoculated only with WBDL phytoplasma and with both WBDL and LP phytoplasmas, respectively; lanes 2 and 3 in B, periwinkle plants inoculated with LP phytoplasma and with both WBDL and LP phytoplasmas, respectively.

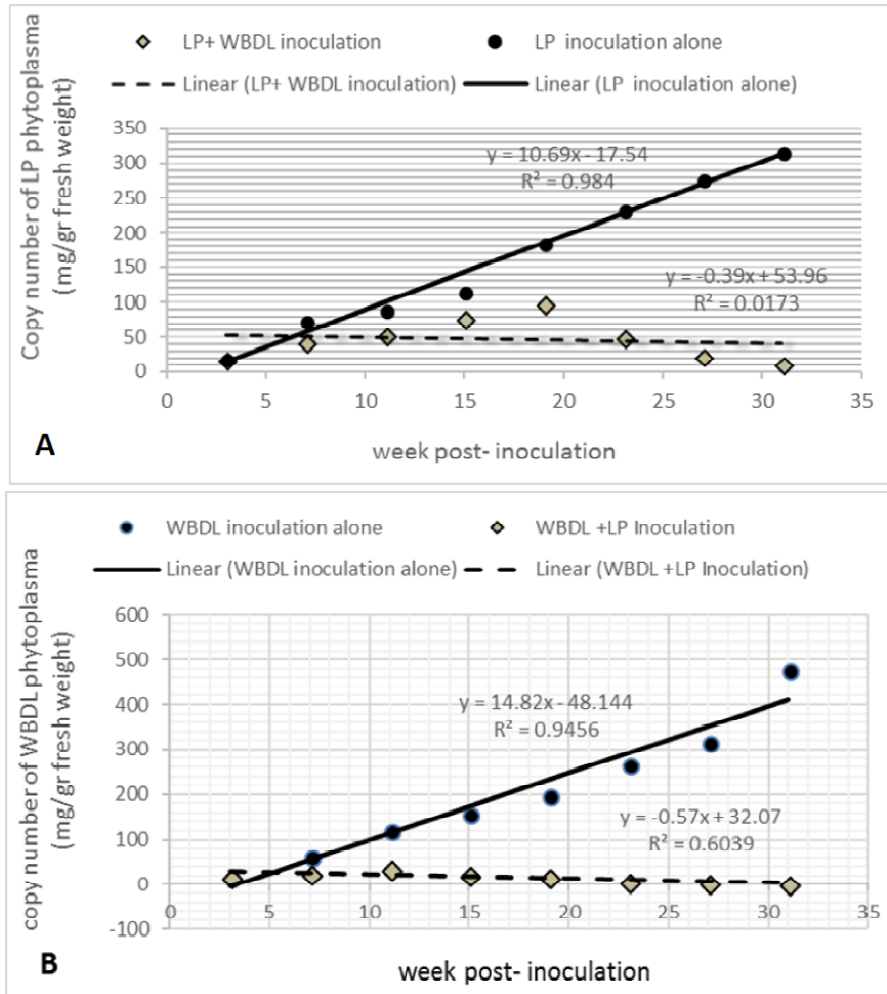
از سه هفته بعد از اولین مایه‌زنی تا هشت ماه بعد نمونه برداری به طور ماهانه انجام گرفت، از هر نمونه دی ان ا استخراج و مورد آزمایش پی‌سی‌آر در زمان واقعی قرار گرفت.

در بوته‌های پروانسی که به تنهایی با فیتوپلاسمای جاروک لیموترش یا فیلودی کاهو مایه‌زنی شده بودند از ابتدا تا پایان نمونه برداری جمعیت فیتوپلاسمای به طور معنی‌داری سیر صعودی داشت ولی در مایه‌زنی‌های مخلوط، خط نمودار تغییرات جمعیت این دو فیتوپلاسمای به طور کلی دارای شیب منفی بود هرچند به ترتیب تا نمونه برداری‌های هفته یازدهم و هفته نوزدهم پس از اولین مایه‌زنی مختصر افزایشی در جمعیت هر دو فیتوپلاسمای مشاهده شد (شکل های ۳A و ۳B).

مقایسه شیب رگرسیون تغییرات جمعیت فیتو

طور مستقیم تعیین ترادف و به ترتیب تحت رس شماره‌های MH411203 و MH411204 در بانک جهانی ترادف‌ها ثبت شدند. جستجو با بلاست نشان داد که ترادف ۱۴۶ جفت بازی بیشترین شباهت (۱۰۰ درصد) را با اعضای گروه 16SrII از جمله فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش در ایران (KF607102) و قطعه ی ۱۴۳ جفت بازی بیشترین شباهت را با اعضای گروه 16SrIX از جمله فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو در ایران (DQ889749) دارند.

برای مقایسه کمی جمعیت فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش و فیلودی کاهو در بوته‌های پروانش که به طور مخلوط باهم مایه‌زنی شده بودند و همچنین بوته‌هایی که هریک به تنهایی با این فیتوپلاسمای مایه‌زنی شده بودند از آزمون پی‌سی‌آر در زمان واقعی استفاده شد.



شکل ۳. تغییرات جمعیت فیتوپلاسمهای عامل بیماری فیلودی کاهو و جاروک لیموترش در حالت مایه زنی مخلوط و به تنهایی در زمان‌های مختلف پس از مایه زنی. A، تغییرات جمعیت فیتوپلاسمای فیلودی کاهو در حالت مایه زنی مخلوط با فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و به تنهایی؛ B، تغییرات جمعیت فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در حالت مایه زنی مخلوط با فیتوپلاسمای فیلودی کاهو و به تنهایی.

Fig. 3. Population dynamics of LP and WBDL phytoplasmas at different post-inoculation time in mixed and alone inoculation. A, population dynamics of LP phytoplasma alone and in mixed inoculation with WBDL phytoplasma; B, population dynamics of WBDL phytoplasma alone and in mixed inoculation with LP phytoplasma. WBDL, witches' broom disease of lime; LP, Lettuce phyllody.

عامل جاروک لیموترش با گذشت زمان کاهش یافت. شیب خط رگرسیون در این مورد $0.57-$ بود و با صفر تفاوت معنی‌دار داشت (جدول ۲ و شکل ۳B). در مقایسه جمعیت فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو با شیب خط رگرسیون $0.39-$ (که با شیب صفر تفاوت معنی‌داری نداشت) با گذشت زمان ثابت ماند (جدول ۲ و شکل A). شیب خط‌های رگرسیون فیتوپلاسمهای جاروک

پلاسمهای جاروک لیموترش و فیلودی کاهو (به ترتیب ۱۴/۸۲ و ۱۰/۶۹) (جدول ۲) نشان می‌دهد که در مدت ۸ بار بررسی در پروانش‌هایی که به تنهایی مایه‌زنی شده بودند جمعیت فیتوپلاسمای جاروک لیموترش با شیب تندتری نسبت به جمعیت فیتوپلاسمای فیلودی کاهو افزایش یافته است. در همین مدت در پروانش‌هایی که به صورت مخلوط مایه‌زنی شده بودند جمعیت فیتوپلاسمای

جدول ۲. ضریب رگرسیون تغییرات جمعیت فیتوپلاسم‌های فیلودی کاهو و جاروک لیموترش در آلودگی مخلوط و به تنهایی با استفاده از نرم افزار SAS 9.3.

Table 2. Regression coefficient of the best fit line for population growth curve of LP and WBDL phytoplasmas in mixed infection and alone in periwinkle using SAS 9.3 software.

Inoculation trial	Regression coefficient of LP phytoplasma in mixed infection and alone		Regression coefficient of WBDL phytoplasma in mixed infection and alone	
	LP+WBDL	LP alone	WBDL+LP	WBDL alone
Slope (S*)	-0.3900 ^{ns}	10.69 ^{**}	-0.5700 ^{**}	14.82 ^{**}
SE	0.5870	0.3500	0.2300	0.0720

*S، شیب خط رگرسیون برای سنجش سرعت تکثیر فیتوپلازما درون گیاه، SE، خطای معیار شیب، ns و ** به ترتیب عدم تفاوت معنی دار و تفاوت معنی دار شیب خط با صفر شیب.

*S, Slope of the regression line and a measure of population growth rate of phytoplasma in the plant; SE, standard error of slope; slope = 0 null hypothesis test statistic: non significant=ns or and Highly significant=**. WBDL, witches'- broom disease of lime; LP, Lettuce phylloidy.

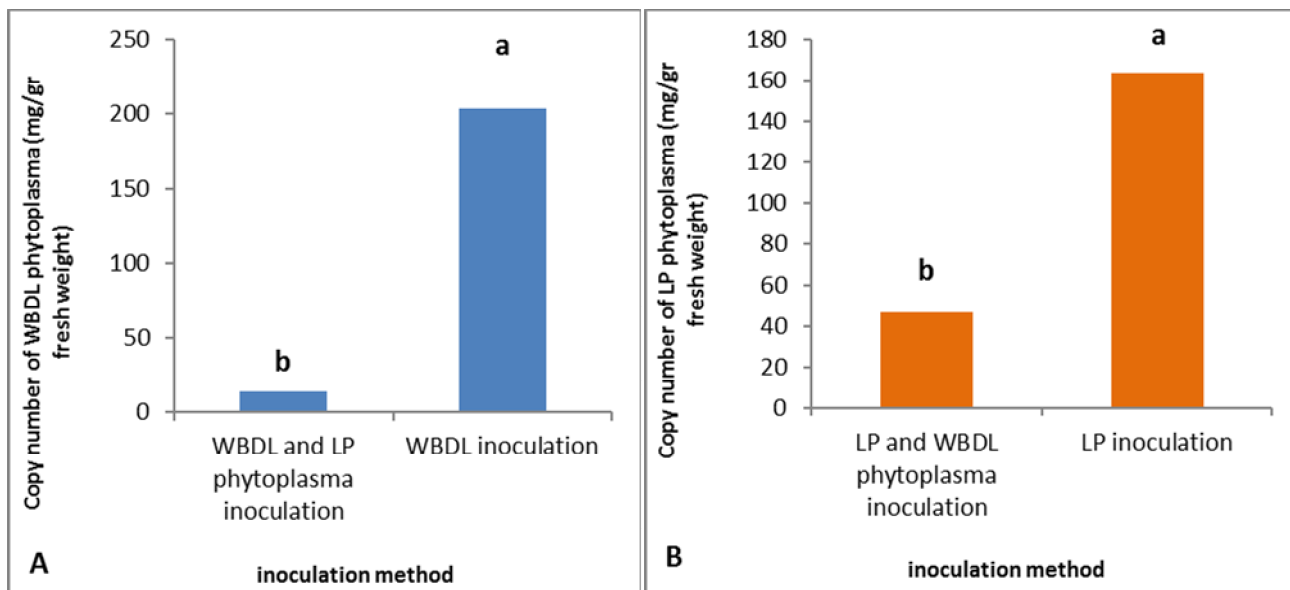
سایر فیتوپلاسم‌های مطالعه شده در ایران خیلی سریعتر از بین می‌روند. فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش (Ca. 'Phytoplasma aurantifolia') متعلق به زیرگروه B در گروه A ۱6SrII (Zreik et al. 1995) می‌باشد. در پژوهش حاضر برهمکنش فیتوپلاسمای عامل فیلودی کاهو که متعلق به زیر گروه D در گروه 16SrIX است با فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش در گیاه پروانش بررسی شد. آلودگی مخلوط دو فیتوپلازما مانع از ظهور علائم شدید اختصاصی آن‌ها شد. نتایج پی‌سی‌آر در زمان واقعی نیز نشان داد که مایه‌زنی مخلوط این دو فیتوپلازما موجب کاهش بسیار معنی‌دار سرعت افزایش جمعیت هر دو فیتوپلازما می‌شود (جدول ۲ و شکل‌های ۳A، ۳B، ۴A و ۴B). بر اساس عدم ظهور علائم بارز فیتوپلاسم‌های جاروک لیموترش و فیلودی کاهو و کاهش جمعیت این دو فیتوپلازما در بوته‌های پروانش که به صورت مخلوط مایه‌زنی شده بودند، به نظر می‌رسد این دو فیتوپلازما اثر آنتاگونیستی متقابل روی یکدیگر دارند. بیشتر وجود رابطه آنتاگونیستی متقابل بین استرین‌های فیتوپلاسمای زردی مینا در زنجبرک ناقل و گیاهان بارهنگ

لیموترش و فیلودی کاهو در آلودگی مخلوط نسبت به شاهد مثبت تفاوت معنی‌داری داشتند که نشان از کاهش معنی‌دار سرعت رشد هر دو فیتوپلازما در آلودگی مخلوط نسبت به شاهد مثبت دارد (Pr<0.0001) (شکل‌های A ۳ و B ۳).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین جمعیت‌ها در مجموع نمونه برداری‌ها نیز نشان داد که جمعیت فیتوپلاسم‌های جاروک لیموترش و فیلودی کاهو در بوته‌هایی که به صورت مخلوط آلوده شده‌اند با جمعیت این فیتوپلاسم‌ها در حالتی که به تنهایی مایه‌زنی شده بودند تفاوت معنی‌داری دارد (شکل‌های A ۴ و B ۴).

بحث

فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش در بین فیتوپلاسم‌هایی که تا بحال در ایران شناسایی شده‌اند شدیدترین علائم و خسارت را روی لیموترش ایجاد می‌کند. در گیاه پروانش نیز علائم این فیتوپلازما منحصر بفرد و بسیار شدید است (شکل 1A). بوته‌های پروانش آلوده به این فیتوپلازما در مقایسه با بوته‌های آلوده به



شکل ۴- مقایسه میانگین جمعیت فیتوپلاسمهای عامل بیماری جاروک لیموترش و فیلودی کاهو در بوته پروانش در حالات مایه زنی مخلوط و تنها در مجموع نمونه برداری ها. A، مقایسه میانگین جمعیت فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در پروانش در حالت مایه زنی مخلوط با فیتوپلاسمای فیلودی کاهو و تنها ؛ B، مقایسه میانگین جمعیت فیتوپلاسمای فیلودی کاهو در حالت مخلوط با فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و تنها. تیمارهایی که با حروف مختلف (a و b) نشان داده شده اند با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند.

Fig. 4. Mean comparison of WBDL and LP phytoplasmas population in mixed and alone inoculated periwinkle plant in total sampling. A, mean comparison of WBDL phytoplasma population in periwinkle plants with WBDL + LP phytoplasmas or with WBDL phytoplasma alone; B, mean comparison of LP phytoplasma population in periwinkle plants with LP + WBDL phytoplasmas or with LP phytoplasma alone. Treatments followed by different letters (a and b) are significantly different; WBDL, witches'-broom disease of lime; LP, lettuce phyllody.

موفقیت زمانی بدست آمده است که استرین های ملایم و شدید به طور غیرهمزمان (ابتدا استرین ملایم و سپس استرین شدید) مایه زنی شده بودند (Kiss *et al.* 2013, Schneider *et al.* 2013). در پژوهش هایی که با دو استرین ملایم و شدید یک فیتوپلاسم انجام شده است و استرین ملایم اثر بازدارندگی روی استرین شدید داشته است معمولاً با استفاده از پی سی آر استرین شدید در گیاه مایه زنی شده قابل ردیابی نبوده است (Kiss *et al.* 2013, Schneider *et al.* 2014). در ایران تا بحال استرین ملایمی برای عامل بیماری جاروک لیموترش گزارش نشده است و در این پژوهش اثر متقابل دو فیتوپلاسمای غیرنزدیک روی یکدیگر بررسی شد. یکی از نتایج این تحقیق تایید

و نوعی توتون گزارش شده است (Kunkle 1955, Freitag 1964). در سال های اخیر در تعدادی از فیتوپلاسمها از جمله فیتوپلاسمهای عامل جاروک سیب زمینی (16SrII) (Valenta 1959)، زردی زبان گنجشک (16SrVI) (Sinclair & Griffiths 2000)، زردی اروپایی هسته دارها (16SrX) (Castelain 2007, Kiss *et al.* 2013) و افژولش سیب (16SrX) (Schneider *et al.* 2013) اثر آنتاگونیستی استرین های ملایم روی استرین های شدید بررسی و گزارش شده است. براساس این مطالعات اثرات آنتاگونیستی زمانی حاصل شده است که گیاهان مبتلا به یک استرین ملایم از نظر بیماری زایی با یک استرین شدید همان فیتوپلاسم مایه زنی شده بودند. بیشترین

& Fakheri 2014, Eamens *et al.* 2008, Axtell *et al.* 2007). احتمال خاموشی ژن در برهمکنش آنتاگونیستی میان فیتوپلاسمها نیز وجود دارد. اخیراً مطالعات نشان داده است که گیاه توتون (*Nicotiana benthamiana*) آلوده به استرین ملایم ویروس جفجنگ توتون (Tobacco rattle virus) از طریق خاموشی ژن مانع از تکثیر و انتشار عملگر (effector) SAP11 فیتوپلاسمای عامل زردی گل مینا (*'Ca. Phytoplasma asteris'*) در گیاه توتون می‌شود. عملگر SAP11 در بین سایر ۵۶ عملگر فیتوپلاسمای عامل زردی گل مینا نقش بسزایی در تغییر فیزیولوژی و ایجاد علائم زردی و جاروک شدید در گیاه میزبان دارد (Bai *et al.* 2009). تفاوت عمده‌ای که این برهمکنش با دگر پادی دارد، سرکوب متقابل دو فیتوپلاسم است. در صورتیکه پدیده خاموشی ژن در سرکوب متقابل دخالت داشته باشد باید ژن‌های اساسی و مشترک فیتوپلاسمهای جاروک لیموترش و فیلودی کاهو خاموش شوند. ممکن است وجود دو فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و فیلودی کاهو در یک گیاه پروانش به نوعی باعث فعال شدن سیستم دفاعی این گیاه شده باشند. پژوهش‌های جدید نشان داده است که ژن‌های گلیکولیتیک، فاکتورهای پرآزاری مانند TENGU، ژن‌های اثر گذار در سیستم ترشحی مانند SecA، SecY و عملگرهای پروتئینی SAP11 و SAP54 در بیماری زایی و علائم بیماری‌های فیتوپلاسمایی نقش موثر دارند (Bertaccini *et al.* 2014). برای روشن شدن مکانیسم آنتاگونیسم متقابل باید پژوهش‌هایی در زمینه خاموشی و غیرفعال شدن این ژن‌ها و همچنین امکان ایجاد عوامل موثر در فعال شدن سیستم دفاعی گیاه پروانش توسط این دو فیتوپلاسم انجام شود.

بیماری جاروک لیموترش در سال ۱۳۷۶ از ایران

گزارش‌های پیشین (Bertaccini & Duduk 2009, Roggia *et al.* 2014) مبنی بر رابطه بین جمعیت فیتوپلاسم و شدت علائم بیماری در گیاه میزبان می‌باشد. این پژوهش نشان می‌دهد که یکی از دلایل شدت علائم و خسارات ناشی از *'Ca. P. aurantifolia'* در میزبان‌های گیاهی غلظت بالای آن در گیاه است. البته در این مورد نیاز به تحقیقات بیشتر از جمله مقایسه جمعیت این فیتوپلاسم با جمعیت تعدادی از فیتوپلاسمهای دیگر که از نظر شدت علائم در یک میزبان مشترک یکسان نیستند می‌باشد. یکی از نتایج دیگر این مطالعه این است که هر ماده یا عاملی که جمعیت فیتوپلاسم در آوند آبکشی را کنترل کند احتمالاً می‌تواند در کاهش علائم بیماری و خسارت آن موثر باشد. نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داده است که برای فراهم شدن شرایط رقابت آمیز انتخاب روش مایه‌زنی غیرهمزمان و مایه‌زنی اول با فیتوپلاسمای ملایم مناسب تر است. به همین دلیل در پژوهش حاضر از روش مایه‌زنی غیرهمزمان استفاده شد و مایه‌زنی اول با فیتوپلاسمای عامل بیماری فیلودی کاهو که در مقایسه با فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش در پروانش علائم ملایم تری دارد انجام شد. در حال حاضر طرز کار دگرپادی در فیتوپلاسمها ناشناخته است. البته در رابطه با طرز کار برهمکنش آنتاگونیستی و ایجاد دگرپادی پیشنهادهایی ارائه شده است از جمله اشغال محل تکثیر سویه شدید توسط استرین ملایم، رقابت استرین ملایم با استرین شدید بر سر مواد ضروری و جلوگیری از استقرار استرین شدید از طریق تولید مواد سمی یا پیش‌گیری‌کننده توسط استرین ملایم (Musetti *et al.* 2004, Musetti *et al.* 2013, Patui *et al.* 2010, Musetti *et al.* 2013). اخیراً در بسیاری از ویروس‌های گیاهی نقش خاموشی ژن در پدیده دگرپادی به اثبات رسیده است (Koochakpour

حساس با سرکوب استرین شدید فیتوپلاسمای جاروک لیموترش که در حال حاضر در مناطق مرکبات کاری جنوب شایع است عامل جدیدی را وارد مدیریت این بیماری کرد. در دنیا تا بحال فیتوپلاسمهایی از گروه‌های 16SrI (Alhudaib et al. 2009, Chen et al. 2009) 16SrII (Lou et al. 2013, Saberi et al. 2017) 16SrVI (Das et al. 2016) و 16SrIX (Teixeira et al. 2008) در مرکبات ردیابی شده‌اند. به همین دلیل یافتن فیتوپلاسمهایی دیگر در مرکبات دور از انتظار نیست.

گزارش شد. عمر این بیماری در ایران به بیش از ۲۰ سال می‌رسد و احتمال ظهور استرین‌های جدید عامل این بیماری از جمله استرین‌های ملایم وجود دارد. بر اساس این پژوهش احتمال کاهش جمعیت فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش توسط فیتوپلاسمایی از گروه‌های دیگر نیز وجود دارد. در این رابطه نیاز به جستجوی استرین‌های جدید فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش و فیتوپلاسمهای دیگر در مرکبات است تا در صورت اثبات کارایی آن‌ها و بررسی همه جوانب از جمله بی‌خطری آن‌ها روی مرکبات در آینده بتوان با انتقال آن‌ها به مرکبات

منابع

- Alhudaib K., Arocha Y., Wilson M. and Jones P. 2009. Molecular identification, potential vectors and alternative hosts of the phytoplasma associated with a lime decline disease in Saudi Arabia. *Crop Protection* 28: 13-18.
- Axtell M.J., Synder J.A. and Bartel D.P. 2007. Common functions for diverse small RNAs of land plants. *Plant Cell* 19: 1750-1769
- Bai X., Correa V. R., Tourno T. Y., Ammar E. D., Kamoun S. and Hogenhout S. A. 2009. AY-WB Phytoplasma Secretes a Protein That Targets Plant Cell Nuclei. *Molecular Plant- Microbe Interactions* 22: 18-30.
- Bertaccini A. and Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 355-378.
- Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S. and Contaldo N. 2014. Phytoplasmas and Phytoplasmas Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 1763-1788.
- Carrillo-Tripp J., Lozoya-Gloriae E. and Rivera-Bustamante R.F. 2007. Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology* 97: 51-59.
- Castelain C., Jullian J. P., Lemaire J. M. and Morvan G. 2007. Lutte biologique contre l'ECA: la prémunition. *Arboriculture* 611:33-38.
- Chen J., Pu X., Deng X., Liu S., Li H. and Civerolo E. 2009. A phytoplasma related to 'Candidatus phytoplasma asteris' detected in citrus showing Huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99:236-242.
- Das A. K., Nerkar S., Thakre N. and Kumar A. 2016. First report of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' (16SrVI group) in Nagpur mandarin (*Citrus reticulata*) showing huanglongbing symptoms in central India. *New Disease Reports* 34: 15.
- Eamens A., Wang M. B., Smith N. A. and Waterhouse P. M. 2008. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiology* 456-468.
- Freitag J. H. 1964. Interaction and mutual suppression among three strains of aster yellows virus. *Virology* 24: 401-413.
- Garrett K. A., Madden L. V., Hughes G. and Pfender W. F. 2004. New applications of statistical tools in plant pathology. *Phytopathology* 94(9): 999-1003
- Kiss E., Seemüller E. and Sule S. 2013. Cross-protection Test with 'Candidatus Phytoplasma mali' 1/93 Strain against Closely and Distantly Related Phytoplasma Strains. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 207-218.
- Koochakpour Z. and Fakheri B. 2014. RNA silencing and plant viral diseases. *Iranian Journal of Fuzzy Systems* 3: 946-951.

- Kunkel L. O. 1936. Immunological studies on the three peach diseases, yellows, rosette, and little peach. *Phytopathology* 26: 201-219.
- Kunkel L. O. 1955. Cross protection between strains of aster yellows. *Advances in Virus Research* 3: 251-273.
- Lou B., Bai X., Bai Y., Deng C., RoyChowdhury M., Chen C. and Song Y. 2014. Detection and molecular characterization of a 16SrIIA* phytoplasma in grape-fruit (*Citrus paradise*) with huanglongbing like symptoms in China. *Journal of Phytopathology* <https://doi.org/10.1111/jph.12200>.
- MacIntyre D. L., Miyata S. T., Kitaoka M. and Pukatzki S. 2010. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 19520-19524.
- McKinney H. H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Journal of Agricultural Research* 39: 557-578.
- Musetti R., Di Toppi L. S., Ermacora P. and Favali, M. A. 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology* 94: 203- 208.
- Musetti R., Farhan K., De Marco F., Polizzotto R., Paolacci A., Ciaffi M., Ermacora P., Grisan S., Santi S. and Osler, R. 2013. Differentially regulated defence genes in *Malus domestica* during phytoplasma infection and recovery. *European Journal of Plant Pathology* 136: 13-19.
- Musetti R., Paolacci A., Ciaffi M., Tanzarella O. A., Polizzotto R., Tubaro F., Mizzau M., Ermacora P., Badiani M. and Osler, R. 2010. Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. *Phytopathology* 100: 390-399.
- Patui S., Bertolini A., Clincon, L., Ermacora P., Braidot E., Vianello A. and Zancani M. 2013. Involvement of plasma membrane peroxidases and oxylipin pathway in the recovery from phytoplasma disease in apple (*Malus domestica*). *Physiologia Plantarum* 148: 200-213.
- Pfaffl M. W. 2004. Quantification strategies In: real-time PCR. Bustin S. A. (Ed). IUL. California. USA 87-112.
- Roggia M. F., Imai H., Shiraya T., Noda Y. and Ueta T. 2014. Protective Role of Glutathione Peroxidase 4 in Laser-Induced Choroidal Neovascularization in Mice. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098864>.
- Saberi E., Alavi A. M., Safaie N., Moslemkhany C. and Azadvar M. 2017. Bacterial pathogens associated with citrus huanglongbing-like symptoms in southern Iran. *Journal of Crop Protection* 6: 99-113.
- Salaman R. N. 1933. Protective inoculation against a plant virus. *Nature* 131: 468.
- Salehi M., Izadpanah K., Siampour M., Nejat N. and Siampour M. 2007. Partial characterization of phytoplasmas associated with lettuce and wild lettuce phyllodies in Iran. *Plant Pathology* 56: 669-676.
- Salehi M. Izadpanah K. and Taghizadeh M. 2002. Witches broom disease of lime in Iran: New distribution areas, experimental herbaceous hosts and transmission trails: Proceeding of 15th Conference IOCV, IOCV, Riverside 293-296.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. II ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- SAS. 1999. *Statistical Analysis System User' Guide Statistics*. SAS Institute Inc. Cary NC 27513 USA.
- Schneider B., Seemüller E., Smart C. D. and Kirkpatrick B. C. 1995. Phylogenetic Classification of Plant Pathogenic Mycoplasma like Organisms or Phytoplasmas Molecular and Diagnostic Procedures in *Mycoplasmology* 369-380. In: Razin S. and Tully J.G. (Eds), Academic Press, San Diego.
- Schneider B., Sule S., Jelkmann W. and Seemüller E. 2014. Suppression of aggressive strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*' by Mild Strains in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana occidentalis* and identification of similar action in apple trees. *Phytopathology* 104: 453- 461.
- Seemüller E. and Schneider B. 2004. '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1217–1226.
- Seemüller E. and Schneider B. 2007. Differences in virulence and genomic features of strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*', the apple proliferation agent. *Phytopathology* 97: 964–970.
- Seemüller E., Kampmann M., Kiss E. and Schneider B. 2011. HflB gene-based phytopathogenic classification of '*Candidatus Phytoplasma mali*' strains and evidence that strain composition determines virulence in multiply infected apple trees. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 1258-1266.
- Seemüller E., Kiss E., Sule S. and Schneider B. 2010. Multiple infection of apple trees by distinct strains of

- '*Candidatus Phytoplasma mali*' and its pathological relevance. *Phytopathology* 100: 863-870.
- Seemüller E., Kunze L. and Schaper U. 1984. Colonization behavior of MLO, and symptom expression of proliferation-diseased apple trees and decline-diseased pear trees over a period of several years. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* 91: 525-532.
- Seemüller E., Sule S., Kube M., Jelkmann W. and Schneider B. 2013. The AAA+ ATPases and HflB/FtsH proteases of '*Candidatus Phytoplasma mali*': Phylogenetic diversity, membrane topology, and relationship to strain virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 26: 367- 376.
- Sinclair W. A. and Griffiths H. M. 2000. Variation in aggressiveness of ash yellows phytoplasmas. *Plant Disease* 84:282-288.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Teixeira D.C., Wulff N.A., Martins E.C., Kitajima E.W., Bassanezi R., Ayres A.J., Eveillard S., Saillard C. and Bove J.M. 2008. A phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches-Broom Phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98:977-984.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M. and Rozen S.G. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*
- Valenta V. 1959. Interference studies with yellows-type plant viruses. II. Cross protection tests with European and American viruses. *Acta Virologica* 3: 145-152.
- Zhang Y., Uyemoto J. K. and Kirkpatrick B. C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71: 45-50.
- Zreik L., Carle P., Bove J. M. and Garnier M. 1995. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a candidate's taxon for the organism, '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*'. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 449-453