تعیین برخی ویژگی‌های زیستی و رفتاری زنجرک *Hishimonus phycitis*، ناقل بیماری جاروک لیموترش با هدف مدیریت بیماری

محمد صالحی[1*]، عبدالنبی باقری[2]، محمدمهدی فقیهی[2] و کرامت‌الله ایزدپناه[3]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۳۱)

چکیده

تعیین ناقل و ویژگی‌های انتقال یکی از فاکتورهای کلیدی در مطالعه اپیدمیولوژی و کنترل بیماری‌های فیتوپلاسمایی از جمله بیماری فیتوپلاسمایی جاروک لیموترش می‌باشد. تحقیق حاضر با هدف شناسایی ناقل/ناقلین بیماری جاروک لیموترش و بررسی برخی ویژگی‌های ناقل این بیماری طی سال‌های ۹۰-۱۳۸۵ در استان‌های هرمزگان و فارس انجام شد. بررسی‌های به عمل آمده در مورد حشرات مکنده جمع آوری شده در باغ‌های آلوده هشتبندی، میناب و رودان (استان هرمزگان) با استفاده از آزمون پی‌سی‌آر و RFLP نشان داد که فیتوپلاسمای مزبور تنها در بدن زنجرک *Hishimonus phycitis* و پسیل آسیایی مرکبات (*Diaphorina citri*) وجود دارد ولی تنها زنجرک *H. Phycitis* که پیشتر به عنوان ناقل معرفی شده قادر به انتقال فیتوپلاسما می‌باشد. زنجرک *H. Phycitis* در شرایط طبیعی فقط از روی لیموترش و بکرایی جمع آوری شد در صورتی‌که در شرایط گلخانه، این زنجرک زیر سرپوش پلاستیکی روی کنار و گونه‌های مختلف مرکبات تکثیرشد. زنجرک ناقل روی گیاهان علفی شامل بادنجان، هندوانه، هویج ویونجه که در هند به عنوان میزبان این زنجرک گزارش شده‌اند، تکثیر نشد. جمعیت زنجرک ناقل در ماه‌های بسیار گرم (خرداد تا آبان) روی درختان لیموترش بسیار پایین بود ولی با خنک شدن هوا، جمعیت آن به تدریج افزایش یافت به طوری‌که در اواخر زمستان و بهار به بیشترین تعداد رسید. جمعیت حشره ناقل روی درختان آلوده لیموترش با اختلاف بسیار معنی‌داری بیشتر از جمعیت آن روی درختان سالم بود که می‌تواند نشان دهنده اثرگذاری جاروک‌ها در جلب و تکثیر حشره ناقل و امکان کنترل حشره ناقل و متعاقب آن بیماری جاروک از طریق حذف جاروک‌ها باشد.

کلیدواژه: آنالیز مولکولی، *'Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'، *Hishimonus phycitis*، زنجرک ناقل، لیموترش

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: salehi_abarkoohi@yahoo.com

۱. دانشیار پژوهش بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۲. استادیار پژوهش بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۳. استاد بیماری شناسی بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

Study of partial biological and behavioral traits of *Hishimonus phycitis*, vector of lime witches' broom, for management of the disease

M. Salehi[1*], A. Bagheri[2], M. M. Faghihi[2], and K. Izadpanah[3]

(Received: 13.1.2017; Accepted: 21.5.2017)

Abstract

Witches' broom disease of lime (WBDL) is a serious threat to lime industry in Iranian southern provinces. Vector identification and transmission characteristics are main factors in epidemiology and management of phytoplasma diseases including WBDL. Investigation of the collected sucking insect fauna on witches' broom infected lime trees in Hashtbandee, Minab and Roodan (Hormozgan province) using PCR and RFLP assays showed that *Hishimonus phycitis* leafhopper and *Diaphorina citri* were positive for '*Ca*. Phytoplasma aurantifolia' presence. However, only *H. phycitis*, previously identified as vector of WBDL, successfully transmitted the phytoplasma to Bakraee (*Citrus reticulate* hybrid) seedlings and bearing lime trees. Host range studies showed that *H. phycitis* can reproduce only on citrus and ziziphus species and was unable to reproduce on eggplant, watermelon, alfalfa and carrot, reported hosts of *H. phycitis* in india. Results of population fluctuation revealed a main peak for the *H. phycitis* from February to March. However, the lowest population density was observed in warm months (May to October). The population density of vector on healthy and witches' broom affected trees was compared and the results revealed that the population density of vector was significantly higher on witches' broom affected trees than healthy ones. It can demonstrate that in affected lime trees, witches' broom branches can prepare appropriate niche for *H. phycitis* reproduction. On the basis of the above data, it is possible to predict that cutting of witches' broom can be an effective approach for reduction of vector population and WBDL management.

Keywords: *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia, *Hishimonus phycitis*, leafhopper vector, lime, molecular analyses

*Corresponding author's E-mail: salehi_abarkoohi@yahoo.com

1. Research Assoc. prof. of Plant Pathol., Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.
2. Assis. Prof. of Plant Pathol., Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.
3. Prof. of Plant Pathol., College of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

مقدمه

مولیکوت‌ها، پروکاریوت‌های ریز فاقد دیواره سلولی و چند ریختی با ژنوم کوچک (۶۰۰ تا ۲۲۰۰ کیلوباز) و درصد سیتوزین و گوانین ($G+C$) پایین می‌باشند. براساس مطالعات تبارزایی این موجودات با انشعاب از یک گروه از باکتری‌های گرم مثبت و دارای سیتوزین و گوانین پایین به نام لاکتو باسیلوس‌ها با تکامل انحطاطی که همراه با از دست دادن دیواره سلولی و کاهش پیچیدگی فیزیولوژیکی بوده است، به وجود آمده‌اند (Weisburg *et al.* 1989). اسپیروپلاسماها و فیتوپلاسماها مولیکوت‌های بیماریزا در گیاهان می‌باشند.

فیتوپلاسماها مولیکوت‌های سخت کشت با کروموزوم کوچک (۵۳۰ تا ۱۳۵۰ کیلوباز) می‌باشند. این بیمارگرها عامل ایجاد بیماری‌های مختلف درقریب به یک هزار گونه گیاهی شامل سبزی‌ها، درختان میوه و جنگلی و گیاهان زراعی می‌باشند (McCoy *et al.* 1989; Seemuller *et al.* 2002). گیاهان آلوده به فیتوپلاسما عمدتا علائمی را از خود نشان می‌دهند که ناشی از عدم توازن در هورمون‌های گیاهی است.

فیتوپلاسماها محدود به آوند آبکشی میزبان‌های گیاهی بوده و به همین دلیل تنها حشرات تغذیه کننده از آوند آبکشی، پتانسیل انتقال آن‌ها را دارند. ناقل‌های شناخته شده فیتوپلاسماها شامل زنجرک‌های برگی، زنجرک‌های بوته‌ای و پسیل‌ها می‌باشند (Weintraub and Beanland 2006; Dumonceaux *et al.* 2014). اغلب فیتوپلاسماها به وسیلهٔ زنجرک‌های برگی منتقل می‌شوند. تعداد کمی فیتوپلاسما شامل فیتوپلاسماهای همراه با بیماری‌های Coconut lethal yellowing، Stolbur و Phormium yellow leaf (Liefting *et al.* 1997) با زنجرک‌های بوته‌ای منتقل می‌شوند. فیتوپلاسماهای درختان میوه ازگروه افژولش سیب (Apple proliferation) شامل Apple proliferation، Pear decline، European stone fruit yellows و Peach yellow leaf roll به وسیلهٔ یک یا دو گونه پسیل منتقل می‌شوند و تا به حال هیچ زنجرکی به عنوان ناقل برای این گروه شناسایی نشده است (Jensen *et al.* 1964, Carraro *et al.* 1998a and b, Frisinghelli *et al.* 2000).

انتقال فیتوپلاسماها توسط ناقلین فرآیندی پیچیده با چندین رخداد اصلی است. در طی این فرایندها سلول‌های فیتوپلاسمایی توسط ناقل از آوند آبکشی گیاه آلوده جذب و پس از تکثیر و عبور از قسمت‌های مختلف، به سلول-های مخصوصی در غدد بزاقی رسیده و از آن‌جا به گیاه میزبان انتقال می‌یابند (Rashed *et al.* 2012). مدت زمان لازم برای گیرش فیتوپلاسماها از گیاه توسط حشره از چند ساعت تا چند روز گزارش شده است (Bertaccini *et al.* 2014).

فیتوپلاسماهای مختلف ازنظر اختصاصی بودن ناقل با یکدیگرمتفاوت هستند. به طورمعمول یک مولیکوت توسط یک یا تعداد اندکی زنجرک منتقل می‌شود و یک گونه معین زنجرک نیز یک یا تعداد اندکی مولیکوت را انتقال می‌دهد. حتی جمعیت‌های مختلف یک گونه ناقل بعلت وجود گونه های مختلف باکتری‌های درون همزیست در بدن آن ها ممکن است یک پاتوژن را با کارایی‌های متفاوتی انتقال دهند (Gottlieb *et al.* 2010).

ناقلین بیماری‌های فیتوپلاسمایی نقش بسزا و اصلی در توسعه و پراکنش این بیماری‌ها بر عهده دارند (Lee *et al.* 2000). شناسایی این ناقلین اهمیت بسزایی در مطالعات اپیدمیولوژی، طبقه بندی و کنترل بیماری‌های فیتوپلاسمایی دارد. اما یافتن ناقلین فیتوپلاسماها با استفاده از روش‌های بیولوژیکی کار مشکلی است. طبق بعضی گزارش‌ها،

شناسایی این ناقلین به سال‌ها وقت و همکاری بین گروه-های مختلف متخصصین نیاز دارد. به دلیل مشکلات یاد شده، ناقلین بسیاری از این بیماری‌ها حتی آن دسته که سال‌های مدیدی ازکشف آن‌ها گذشته است، ناشناخته باقی مانده است (Lee *et al.* 2000, Tanne *et al.* 2001). به همین دلیل محققین از روش‌های آزمایشگاهی دیگری در کنار روش‌های بیولوژیک استفاده می‌کنند. این روش‌های مکمل با پیشرفت و توسعه روش‌های مولکولی و مخصوصًا روش‌های مبتنی بر پی‌سی‌آر رواج بیشتری یافته اند. در حال حاضر برای یافتن ناقلین فیتوپلاسماها، کل حشرات مکنده را از گیاهان با وسایلی مانند *D-Vac* جمع آوری می‌کنند، سپس این حشرات را با آزمون‌های مختلف سرولوژی، مولکولی و به ویژه روش پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای برای یافتن فیتوپلاسمای مورد نظر آزمایش می‌کنند. با این کار از طیف وسیع حشرات جمع آوری شده، تنها گونه-هایی را که عامل بیماری‌زا در آن‌ها ردیابی شده به عنوان ناقلین مظنون مورد توجه قرار می‌دهند (Blomquist & Kirkpatrick 2002). در روش‌های به کار رفته محققین بیشتر از روش‌های مبتنی بر پی‌سی‌آر و هیبریداسیون دی‌ان ا بهره برداری می‌کنند (Blomquist & Kirkpatrick 2002). یافته‌های بعضی محققین نشان داده که بعضی از حشرات قادر به گیرش غیر اختصاصی فیتوپلاسماها بوده اما بعد از تغذیه از گیاه سالم و طی چند هفته این عوامل را از دست می‌دهند (Hanboonsong *et al.* 2002). در موارد بسیار معدود، تکثیر فیتوپلاسما در قسمت روده میانی زنجرک غیر ناقل نیز گزارش شده است (Vega *et al.* 1993).

با وجود این که بدون شک انتقال فیتوپلاسماها به وسیلهٔ ناقل‌های حشره‌ای اصلی‌ترین راه گسترش طبیعی این موجودات است، ایجاد پیوند طبیعی بین ریشه گیاهان مجاور نیز یکی از راه‌های گسترش بیماری‌های فیتوپلاسمایی است. انتقال مصنوعی به وسیلهٔ پیوند نیز از سال‌های دور برای تأیید عفونی بودن یک بیماری مورد استفاده قرار گرفته است. تقریبا تمام فیتوپلاسماها با پیوند انتقال پیدا می‌کنند. در روش انتقال با پیوند دوره نهفتگی بیماری از ۲۰ روز تا بیش از یک سال می‌تواند متغیر باشد (Seliskar & Wilson, 1981).

بیماری جاروک لیموترش که عامل آن یک فیتوپلاسما با نام *'Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' است (Zreik *et al.* 1995) به دلیل سیستمیک شدن عامل بیماری در گیاه میزبان، قابل درمان نبودن و کشندگی، انتقال با زنجرک با رابطه پایا و تکثیری و پتانسیل همه گیری سریع، یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین بیماری‌های گیاهی در ایران است. این بیماری ابتدا در اواخر دههٔ ۱۹۷۰ از کشور عمان و سپس در سال ۱۹۸۹ از کشور امارات متحده عربی (Garnier *et al.* 1991) گزارش گردید. جاروک لیموترش تقریبا باعث نابودی کامل درختان لیموترش در این دو کشور شده است (Garnier *et al.* 1991). بیماری جاروک در سال ۱۳۷۶ برای اولین بار در ایران از استان سیستان –بلوچستان گزارش گردید (Salehi *et al.* 1997) و پس از مدت کوتاهی در استان‌های هرمزگان، کرمان و فارس مشاهده شد (Salehi *et al.* 2002). بیماری جاروک در این مناطق موجب از بین رفتن یا امحاء هزاران اصله درخت لیموترش شده و تهدیدی جدی برای درختان لیموترش و سایر مرکبات حساس در جنوب کشور می‌باشد.

یکی از فاکتورهای مهم در زمینهٔ اپیدمیولوژی و کنترل فیتوپلاسماها از جمله فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش، تعیین ناقلین و دامنه میزبانی این بیمارگرها است. پیشتر بر اساس آزمون سرولوژیکی الایزا (ELISA)،

کاوشگر دی‌انا و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، وجود عامل بیماری جاروک در بدن زنجرک *Hishimonous phycitis* به اثبات رسیده بود و این زنجرک به عنوان کاندیدای ناقل بیماری معرفی شده بود (Bove *et al.* 1993) ولی با وجود تمام تلاش‌های به عمل آمده قابلیت انتقال عامل بیماری جاروک از این زنجرک به مرکبات سالم امکان پذیر نشده بود (Bove *et al.* 1993, Salehi *et al.* 2002) همچنین در زمینه تغییرات جمعیت ناقل و ویژگی‌های رفتاری آن نیز اطلاعاتی وجود نداشت. در همین راستا پروژه جستجوی ناقل و دامنه میزبانی طبیعی فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش در ایران در سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی به تصویب رسید و گزارش حاضر نتایج حاصل از اجرای این پروژه در زمینه جستجوی ناقل و مطالعه ویژگی‌های انتقال فیتوپلاسمای جاروک لیموترش با حشره ناقل می‌باشد. پیشتر گزارش مختصری در مورد انتقال فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش با ناقل منتشر شده است (Salehi *et al.* 2007).

مواد و روش‌های بررسی

شرایط گلخانه

تمام مطالعات گلخانه‌ای این پژوهش در یک گلخانه عاری از حشرات در دمای ۲±۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و طول دوره روشنایی-تاریکی ۱۴:۱۰ انجام شد.

گیاهان مورد آزمایش

الف- مرکبات: شامل لیموترش (Christm.) Swingle (*Mexican lime, Citrus aurantifolia*)، بکرایی (*C. reticulata hybrid*)، نارنج (*C. aurantium* L.)، لیموی یورکا (*C. limon* (L.) Burm. f.)، لیموشیرین (*C. limetta* Risso Tan.)، نارنگی محلی فارس (*C. reticulata* Blanco)، پرتقال رقم هاملین (*C. sinensis* (L.) Osb)، گریپ فروت رقم ردبلاش (*C. paradisi* Macf.)، بالنگ (*C. medica* L.)، لایم کوات (*C. aurantifolia* × *Fortunella*) و نارنج سه برگچه‌ای (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) بود. از بین این مرکبات لیموترش، بکرایی، نارنج، لیموی یورکا، لیموشیرین، لایم کوات و نارنج سه برگچه‌ای از طریق بذر و بقیه از طریق پیوند روی لیموترش تکثیر شدند و دانهال‌ها یا نهال‌های کوچک آن‌ها در مطالعات مربوط به تعیین دامنه میزبانی ناقل مورد استفاده قرار گرفتند.

ب- کنار: *Ziziphus spina- christi* (L.) Desf.: از میوه‌های یک درخت کنار در آب موشوی میناب که از نظر ظاهری نماینده درختان کنار در مناطق مختلف استان‌های جنوبی بود بذر تهیه شد تا از آن در تهیه دانهال‌های کنار استفاده شود.

پ - پروانش *Catharanthus roseus* (L.) G.Don و سایر گیاهان علفی شامل بادمجان (*Solanum melongena* L.)، هویج (*Daucus carrota* L.)، هندوانه (*Citullus vulgaris* L.)، یونجه (*Medicago sativa* L.) و اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) در یک گلخانه عاری از حشرات از طریق بذر تکثیر شدند. از گیاهچه‌های این گیاهان در مطالعه دامنه میزبانی ناقل بیماری جاروک استفاده شد.

در تمامی موارد گیاهانی که بوسیله ناقل با عامل بیماری جاروک لیموترش مایه زنی شده بودند، برای مشاهده علائم بیماری در یک گلخانه عاری از حشرات نگهداری شدند و هر دو هفته یک‌بار از نظر ظهور علائم بررسی شدند. پروانش‌های مایه زنی شده در دو نوبت شامل سه و شش ماه بعد از مایه زنی و دانهال‌های لیموترش و بکرایی

در دو نوبت شامل یک و دو سال بعد از مایه زنی از نظر آلودگی به عامل جاروک در آزمون پی‌سی‌آر ارزیابی شدند.

تعیین ناقل فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش

مناطق مورد بررسی

برای مطالعه ناقل و دامنه میزبانی فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش، باغ‌های لیموترش سالم در جهرم (استان فارس) و باغ‌های لیموترش آلوده به بیماری جاروک و مزارع مجاور در میناب، رودان، هشتبندی (استان هرمزگان) و گود شانه داراب (استان فارس) مورد بررسی قرار گرفتند.

جمع آوری حشرات

در ماه‌های مختلف سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ با استفاده از دی-وک اقدام به جمع آوری حشرات از باغ‌های سالم و آلوده مرکبات و مزارع مجاور گردید. در باغ مورد نظر در هر نوبت به مدت نیم ساعت از روی درختان سالم یا آلوده، حشرات جمع آوری شدند. محتویات کیسه دی-وک به نایلون‌های پلاستیکی منتقل و با استفاده از آسپیراتور از بین حشرات جمع آوری شده، زنجرک‌ها و پسیل‌ها (حشرات دارای قابلیت انتقال فیتوپلاسما) انتخاب شدند. زنجرک‌ها و پسیل‌های مختلف براساس خصوصیات ظاهری و ساختمان مورفولوژیک اندام جنسی توسط حشره شناس متخصص رده بندی جوربالان تفکیک و سپس از نظر آلودگی به فیتوپلاسما و انتقال عامل بیماری جاروک مورد آزمایش قرار گرفتند.

بررسی انتقال عامل بیماری جاروک لیموترش توسط حشرات دارای واکنش مثبت در آزمایش PCR

پس از جمع آوری حشرات از روی درخت‌های لیمو ترش آلوده و بررسی آن‌ها از نظر آلودگی به عامل جاروک لیموترش، از هر گونه حشره دارای پتانسیل انتقال فیتوپلاسما ۲۰۰ حشره انتخاب و به منظور بررسی قابلیت انتقال عامل بیماری جاروک لیموترش به طور جداگانه روی ۱۰ دانهال لیموترش و ۱۰ دانهال بکرایی (۱۰ زنجرک به ازای هر دانهال) رهاسازی شدند. پس از یک ماه تغذیه، نهال‌های مایه زنی شده سم پاشی و برای مشاهده علائم احتمالی در یک گلخانه عاری از حشرات نگهداری شدند. بررسی آلودگی گیاهان مایه زنی شده با ناقل با استفاده از علائم بیماری و PCR دو مرحله‌ای انجام شد.

بررسی انتقال عامل جاروک توسط حشرات دارای واکنش مثبت در آزمون پی‌سی‌آر پس از تغذیه از نهال آلوده

از حشراتی که نمونه‌های مورد آزمایش آن‌ها در آزمون پی‌سی‌آر از نظر آلودگی به عامل جاروک واکنش مثبت داشتند، کلنی عاری از فیتوپلاسما تهیه گردید. برای این کار یک جفت حشره (نر و ماده) از هر گونه زیر سرپوش پلاستیکی روی نهال‌های لیموترش قرار داده شدند تا زاد و ولد نموده و تکثیر شوند. برای اطمینان از عدم وجود فیتوپلاسما در زنجرک‌های کلنی عاری از فیتوپلاسما نمونه هایی از آن ها در آزمون پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای با استفاده از جفت آغازگر های P1/P7 در دور اول و R16F2n/R16R2 در دور دوم از نظر وجود فیتوپلاسما بررسی شدند. از حشرات تازه بالغ شده کلنی‌های سالم هر گونه حشره، ۴۰۰ عدد برای یک ماه تغذیه و گذراندن دوره نهفتگی، روی دو دانهال لیموترش آلوده به عامل بیماری جاروک (۲۰۰ حشره روی هر دانهال) قرار داده شدند. سپس زنجرک‌های زنده مانده از هر گونه برای یک ماه تغذیه روی دانهال‌های لیموترش (۱۰ زنجرک به ازای

هر دانهال) رهاسازی شدند. بررسی آلودگی گیاهان مایه زنی شده به عامل بیماری جاروک با استفاده از علائم بیماری و *PCR* دو مرحله‌ای انجام شد.

آزمایش زنجرک *H. phycitis* از نظر انتقال فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش به درختان بالغ لیموترش

به منظور بررسی انتقال بیماری توسط زنجرک *H. phycitis* به درختان بالغ لیموترش، تعداد پنج عدد درخت لیموترش ۲۰-۱۵ ساله در مرکز شهر بندرعباس که در آنجا تا زمان انجام آزمایش، بیماری جاروک لیموترش گزارش نشده بود، انتخاب شدند. با آزمون PCR دو مرحله ای عاری از فیتوپلاسما بودن این درختان به اثبات رسید و برای رهاسازی *H. Phycitis*، این درختان به‌وسیله دو لایه توری ضد حشره محصور شدند. در اسفند ماه ۱۳۸۶ و فرودرین‌ماه ۱۳۸۷، دسته‌های ۱۰۰۰ تایی زنجرک *H. phycitis* از روی درختان لیموترش آلوده و دارای علائم بیماری جاروک در شهرستان رودان جمع‌آوری و روی چهار درخت (۱۰۰۰ زنجرک روی هر درخت در زیر توری) رهاسازی شدند. آلودگی نمونه هایی از زنجرک‌های جمع آوری شده (به ازای هر ۱۰۰۰ زنجرک، ۵ نمونه) به فیتوپلاسما در آزمون پی‌سی‌آر دو مرحله ای تایید شد. همچنین به عنوان شاهد، ۱۰۰۰ عدد زنجرک *H. Phycitis* از روی درختان غیرآلوده لیموترش در باغ‌های فاقد علایم آلودگی به بیماری جاروک لیموترش واقع در شهرستان بندرعباس جمع‌آوری و در زیر توری روی یک درخت سالم لیموترش رهاسازی شد. بررسی نمونه‌هایی از این زنجرک‌ها در آزمون PCR نشان داد که زنجرک‌های جمع آوری شده از روی درختان فاقد آلودگی، عاری از فیتوپلاسما می‌باشند. حشرات رهاسازی شده (زنجرک‌های آلوده و سالم) به مدت هشت هفته از درختان مورد آزمایش تغذیه کرده و سپس با استفاده از حشره‌کش متاسیستوکس نسبت به حذف آن‌ها اقدام شد. درختانی که زنجرک‌های جمع آوری شده از روی درختان آلوده و سالم روی آن‌ها رها سازی شده بودند از نظر ظهور علایم بیماری جاروک لیموترش تحت نظر قرار گرفتند و آلودگی آن‌ها به فیتوپلاسما با استفاده از آزمون پی‌سی‌آر دو مرحله-ای بررسی شد.

مقایسه جمعیت حشره ناقل روی درختان سالم و آلوده لیموترش

به منظور بررسی نقش درختان آلوده و جاروک‌ها در میزان جلب و تراکم جمعیت حشره ناقل، در اردیبهشت ۱۳۸۶ آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک-های کامل تصادفی با فاکتورهای A (مناطق هشتبندی و رودان) و B (درخت‌های آلوده و سالم) با سه تکرار (هر تکرار یک باغ آلوده یا ظاهرا سالم) انجام شد. در هر یک از مناطق هشتبندی و رودان (استان هرمزگان) سه باغ لیموترش با میزان آلودگی حدود ۵۰ درصد انتخاب و در هر باغ با استفاده از دی-وک به مدت ۳۰ دقیقه حشره ناقل از روی ۲۰ درخت لیموترش آلوده و دارای علائم جمع آوری شد. برای مقایسه در همین تاریخ در هر یک از مناطق فوق در سه باغ لیموترش ظاهرا سالم و دور از باغ-های آلوده به مدت ۳۰ دقیقه از روی ۲۰ درخت سالم نیز اقدام به جمع آوری حشره ناقل گردید. تعداد زنجرک‌های جمع آوری شده از روی ۲۰ درخت در هر باغ به عنوان یک داده در تجزیه و تحلیل‌های آماری مورد استفاده قرار گرفت. باغ‌های مورد استفاده در این آزمایش حتی الامکان از نظر سن درخت و وضعیت رویشی مشابه بودند.

ردیابی فیتوپلاسما در بدن حشرات و درختان مرکبات

استخراج دی‌ان‌ای کل از بدن حشرات

به منظور استخراج دی‌ان‌ای کل از بدن حشرات مختلف

از روش مایکسنر و همکاران (۱۹۹۵)با اندکی تغییرات استفاده شد. در این روش که براساس روش CTAB است زنجرک‌ها به صورت انفرادی و در مورد پسیل مرکبات که حشره ریزتر بود در دسته‌های سه‌تایی در داخل یک لولهٔ اپندروف قرارداده و دی‌ان‌ای کل از بدن آن‌ها استخراج شد.

استخراج دی‌ان‌ای کل از گیاه

از هر نمونه (مرکبات و گیاهان علفی) ۰/۲ گرم از بافت رگبرگ میانی برای استخراج دی‌ان‌ای کل جدا گردید. از رگبرگ میانی یک گیاه پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش و علائم‌دار که قبلا در آزمون پی‌سی‌آر واکنش مثبت آن به فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک به اثبات رسیده بود نیز دی‌ان ای کل استخراج شد تا از آن به عنوان شاهد مثبت در آزمون‌های PCR استفاده شود. از گیاهان سالم و آب دوبار تقطیر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. برای استخراج دی‌ان‌ای کل در گیاه از روش ژانگ و همکاران (۱۹۹۸) استفاده شد.

انتخاب آغازگر و انجام PCR

در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مستقیم از جفت آغازگر P1/P7 (Schneider *et al. 1995)* و در PCR دو مرحله‌ای از جفت آغازگرهای P1/P7 در دور اول و R16F2n/R16R2 (Gundersen & Lee 1996) در دور دوم استفاده شد. جفت آغازگر P1/P7 قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز شامل ژن ارانای ریبوزومی ۱۶S، حد فاصل ژن‌های آرانای ریبوزومی ۱۶S و ۲۳S و ابتدای *5′* ژن آرانای ریبوزومی ۲۳S و جفت آغازگر R16F2n/R16R2 قطعه ۱۲۰۰ جفت بازی از ژن آرانای ریبوزومی *۱۶S* را تکثیر می‌کند. پی‌سی‌آر مستقیم و دو مرحله‌ای به صورت واکنش ۲۰ میکرو لیتری شامل ۱۰۰ نانو گرم دی‌انا، مخلوط نوکلئوتیدهای سه فسفاته با غلظت نهائی ۰/۲ میلی مولار، آغازگرها با غلظت نهائی ۰/۵ میکرو مولار برای هر آغازگر، ۵ میکرو لیتر بافر پی-سی‌آر، MgCl2 با غلظت نهائی ۱/۵ میلی مولار، آنزیم پلی‌مراز (سیناژن، ایران) به مقدار ۲/۵ واحد و آب دوبار تقطیر شده استریل انجام گردید. محصول پی‌سی‌آر مرحله اول ۳۰ بار رقیق شد و از آن به عنوان دی‌ان‌ای قالب در آزمون PCR دو مرحله‌ای استفاده شد. پس از اضافه کردن ۳۰ میکرولیتر روغن معدنی به لوله‌های محتوی اجزاء واکنش، لوله‌ها در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شدند و ۳۵ چرخه دمایی شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشتگی دی انای (اولین چرخه ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس)، دو دقیقه در ۵۵ درجه سلسیوس برای اتصال آغازگر و سه دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس برای ساختن دی‌ان‌ای انجام گرفت. در آخر به منظور توسعه طول رشته دی‌ان‌ای، لوله‌ها ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. محصول PCR در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید از باندهای حاصل عکسبرداری شد.

آزمون چند شکلی طولی قطعات برشی

برای تشخیص فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش از آزمون PCR-RFLP استفاده شد. آزمون طبق دستور شرکت سازنده آنزیم‌های برشی انجام شد. یک واکنش ۲۰ میکرولیتری شامل ۹ میکرولیتر آب مقطر سترون، دو میکرولیتر بافر به همراه یک واحد از هر کدام از آنزیم‌های برشی ***Alu*I**، ***Hae* III** و ***Rsa*I** ***Mse*I** و ***Taq*I** و هشت میکرولیتر محصول PCR بود. لوله‌های محتوی این مخلوط به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای هضم

شدن نگه‌داری شدند. سپس محصول حاصل در ژل آگاروز دو درصد مورد بررسی قرار گرفت.

همسانه سازی، تعیین ترادف و تجزیه و تحلیل ترادف‌ها

با استفاده از کیت InsT/Aclone PCR product Cloning Kit (Fermentas, Lithuania) محصول پی‌سی-آر دو مرحله‌ای فیتوپلاسمای همراه با زنجرک *H. phycitis* (۱۲۵۰ جفت باز) براساس دستورالعمل شرکت سازنده در پلاسمید pTZ57R/T قرار داده شد (Sambrook *et al.* 1989). پلاسمید نوترکیب حاصل برای تکثیر به باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α منتقل شد. پلاسمیدها پس از خالص سازی (Holmes & Guigley 1981) به منظور تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (سئول، کره جنوبی) ارسال گردید. با استفاده از ترادف‌های به دست آمده و با استفاده از برنامه بلاست نزدیک‌ترین ترادف با فیتوپلاسمای همراه با *H. phycitis* جستجو شد. با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی فیتوپلاسمای همراه با زنجرک *H. phycitis*، ۲۲ ترادف مشابه فیتوپلاسمایی موجود در بانک جهانی ترادف‌ها (GenBank) و ترادف مشابه در Acholeplasma laidlawii به عنوان out-group و به کمک نرم افزار MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) دندروگرام تبارزایی رسم گردید. با استفاده از گزینه میزان همولوژی در نرم افزار DNAMAN میزان همولوژی فیتوپلاسمای همراه با *H. phycitis* و زیر گروه‌های گروه 16SrII تعیین شد.

نتایج

جمع آوری و شناسایی حشرات

با استفاده از دی-وک در فصول مختلف سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ اقدام به جمع آوری حشرات مکنده (زنجرک و پسیل) از باغ‌های مرکبات آلوده در شهرستان‌های هشتبندی، میناب و رودان شد. در مجموع از باغ‌های مرکبات و علف‌های هرز موجود در آن‌ها ۲۷ گونه زنجرک و یک گونه پسیل جمع آوری شد. در جدول ۱ نام علمی گونه‌های مختلف زنجرک و یک گونه پسیل، محل جمع آوری و فراوانی نسبی آن‌ها نشان داده شده است. زنجرک *H. phycitis* تنها زنجرکی بود که به وفور روی درختان لیموترش و بکرایی جمع آوری شد. این زنجرک به ندرت و به تعداد بسیار کم روی گونه‌های دیگر مرکبات جمع آوری شد. تعداد حشرات جمع آوری شده برای این گونه در فصول مختلف و در دو سال نمونه برداری کاملا متفاوت بود. بیشترین تعداد زنجرک شکار شده مربوط به اواسط اردیبهشت ماه بود. در استان هرمزگان این زنجرک از اواخر خرداد تا اواسط آبان ماه قابل جمع آوری نبود. از بین زنجرک‌های جمع آوری شده از روی درختان لیموترش، *H. phycitis* تنها زنجرکی بود که سنین مختلف پورگی آن قابل جمع آوری بود. براساس مطالعات گلخانه-ای و مشاهده‌ای در باغ‌های لیموترش مشخص شد که این زنجرک در کنار رگبرگ لیموترش تخم گذاری می‌کند. در اطراف سد میناب زنجرک *H. phycitis* از روی درختان کنار نیز جمع آوری شد. این زنجرک از روی علف‌های کف باغ جمع آوری نشد. علاوه بر این زنجرک، در چند مورد به طور اتفاقی تعداد اندکی زنجرک متعلق به گونه-های *Circulifer haematoceps*، *Balclutha incisa* و *Psammotettix sp.* (فقط به صورت حشره بالغ) از روی درختان لیموترش جمع آوری شدند. یکی از حشرات دیگر که سنین مختلف پورگی آن به وفور از روی درختان لیموترش و سایر مرکبات جمع آوری گردید، پسیل آسیایی مرکبات بود. سایر زنجرک‌های جمع آوری شده در این

جدول ۱. حشرات مکنده جمع آوری شده از باغ‌های لیموترش: نام علمی، محل جمع آوری، فراوانی نسبی و واکنش در آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR).

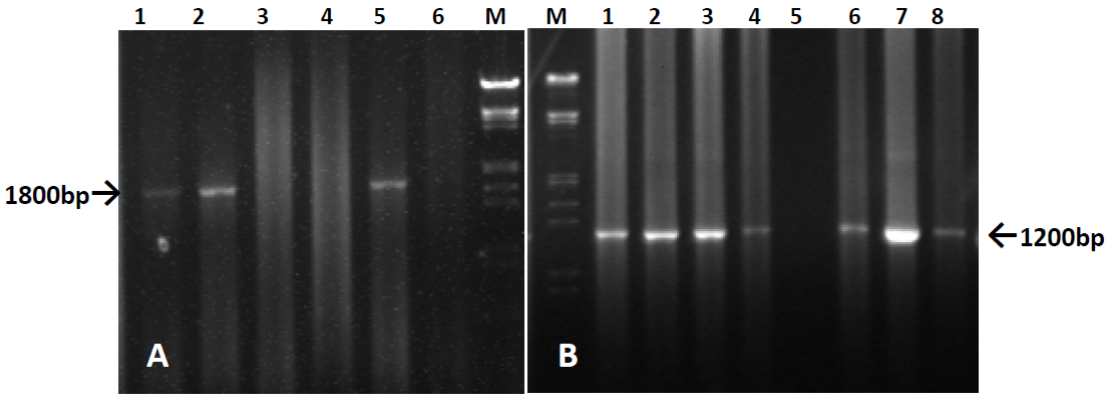
Table 1. Characteristics of collected sucking insects from lime orchards including their scientific name, sampling site, relative abundance and reaction to polymerase chain reaction (PCR) assay.

Leafhopper/planthopper species	Collection site	Frequency	Nested PCR results(positive/studied samples)
Aconurella prolixa	Citrus orchards (on weeds)	+++	0/50
Agallia sp.	Eggplant plants cultivated between citrus trees	+	0/12
Anaceratagallia laevis	Citrus orchards (on weeds)	++	0/17
Austroasca lybeca	Citrus orchards (on weeds)	+	0/11
Austragallia sinuata	Citrus orchards (on weeds)	+	0/19
Balclutha incisa	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds)	+++	0/11
Cicadulina bipunctata	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds)	++	0/11
Circulifer haematoceps	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds)	+	4/21
Diaphorina citri	Citrus orchards (on various citrus species)	+++	8/37
Empoasca desepiens	Citrus orchards (on weeds)	+++	0/17
Exitianus capicola	Citrus orchards (on weeds)	++	8/23
Hishimonus phycitis	Mexican lime, Bakraei, Ziziphus	+++	35/50
Idioscopus clypealis	Citrus orchards (on weeds)	++	4/18
Laodelphax striatellus	Citrus orchards (on weeds)	++	0/12
Macrosteles laevis	Citrus orchards (on weeds)	++	0/12
Neoaliturus fenestratus	Citrus orchards (on weeds)	+	13/27
Orosius albicinctus	Alfalfa farms	+	9/23
Orosius cellulosus	Citrus orchards (on weeds)	+	0/16
Paralimenellus cingulatus	Citrus orchards (on weeds)	+	0/5
Paramesodes lineaticollis	Citrus orchards (on weeds)	+	0/13
Psammotettix sp.	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds)	+++	2/12
Recilia schmidtgeni	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds))	++	0/12
Ribautodelphax notabilis	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds)	++	0/12
Stirellus sp	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds)	+	0/3
Stirellus bicolor	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds)	++	0/12
Toya propinqua	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds)	++	0/12
Tropiducephala prasina	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds)	+	0/12
Kybosca bipunctata	Citrus orchards (on Mexican lime & weeds)	++	0/12

+++، جمعیت بالا (بیشتر از ۳۰ حشره با نیم ساعت جمع آوری با مکنده دی-وک)؛ ++، جمعیت متوسط (بین ۱۵ تا ۳۰ حشره با نیم ساعت جمع آوری با مکنده دی-وک) +،جمعیت پایین (کمتراز ۱۵ حشره با نیم ساعت جمع آوری با مکنده دی-وک)

+++, high population frequency (higher than 30 insects collected by D-Vac aspirator in 30 minutes); + +, moderate population frequency (between 15 to 30 insects collected by D-Vac aspirator in 30 minutes); + , low population frequency (lower than 15 insects collected by D-Vac aspirator in 30 minutes)

پژوهش از روی علف‌های هرز داخل باغ‌های مرکبات یا از روی گیاهان زراعی و سبزی و صیفی در داخل باغ‌های مرکبات یا در حاشیه آن‌ها جمع آوری گردیدند.



شکل ۱. نقوش الکتروفورزی محصول‌های پی‌سی‌آر در ژل آگاروز یک درصد. A: پی‌سی‌آر مستقیم با جفت آغازگر P1/P7، راهک‌های ۱، ۳، ٤، ٥ به ترتیب نمونه‌های دی‌ان ای زنجرک های جمع آوری شده از باغ‌های لیموترش آلوده شامل *Hishimonus phycitis*، *Idioscopus clypealis*، *Circulifer haematoceps* و *Exitianus capicola* و راهک‌های ۲ و ٦ به ترتیب پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش کنترل مثبت) و زنجرک *H. phycitis* از یک کلنی سالم در گلخانه (کنترل منفی). B: محصول پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای با جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2؛ راهک‌های ۱، ۲، ۳، ٤، ٦، ۷ و ۸ به ترتیب نمونه‌های دی‌انای کل از پروانش آلوده (کنترل مثبت) و زنجرک‌های *C .haematoceps*، *E. capicola*، *H. phycitis*، *I. clypealis*، *Orosius albicinctus* و *Psammotettix* sp. جمع آوری شده از باغ‌های لیموترش آلوده و راهک ٥، زنجرک *H. phycitis* از یک کلنی سالم در گلخانه (کنترل منفی). M، مارکر ۱۰۰ جفت بازی

Figure 1. Electrophoresis patterns of PCR products on 1% agarose gel. A: direct PCR using P1/P7 primer pair; Lanes 1, 3, 4, 5 leafhopper samples collected from lime witches' broom infected orchards including *Hishimonus phycitis*, *Idioscopus clypealis*, *Circulifer haematoceps* and *Exitianus capicola*, respectively; lanes 2 and 6, lime witches broom infected periwinkle (positive control) and a sample of *H. phycitis* leafhopper from healthy colony (negative control) B: nested PCR using P1/P7 primer pair followed by R16f2n/R16R2 primers, Lanes 1, 2, 3, 4, 6, 7 and 8, *C.haematoceps*, *E. capicola*, *H. phycitis*, *I. clypealis*, *Neoaliturus. fenestratus*, *Orosius albicinctus* and *Psammotettix* sp leafhoppers, respectively collected from infected lime orchards. Lanes 1 and 5 a periwinkle plant infected with lime witches broom phytoplasma (positive control) and a *Hishimonus phycitis* sample from healthy colony (negative control), respectively. M, 100bp marker.

ردیابی فیتوپلاسما در بدن حشرات

با استفاده از جفت آغازگر P1/P7، واکنش زنجرک‌های *H. Phycitis*، *Exitianus capicol* و نمونه‌های پروانش آلوده به بیماری جاروک لیموترش (شاهد مثبت) در آزمون پی‌سی‌آر مثبت بود و قطعه مورد انتظار (۱۸۰۰ جفت باز) مشاهده گردید. در آزمون پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 در مرحله دوم از زنجرک‌های *Circulifer haematoceps*، *E. capicola*، *H. phycitis*، *Idioscopus clypealis*، *N. fenestratus*، *Orosius albicinctus*، *Psammotettix sp.*، پسیل آسیایی مرکبات (*Diaphorina citri*) و شاهد مثبت، قطعه مورد انتظار (حدود ۱۲۵۰ جفت باز) به دست آمد. در آزمون‌های پی‌سی‌آر مستقیم و دو مرحله‌ای در شاهدهای منفی (زنجرک سالم و آب مقطر) و سایر زنجرک‌ها هیچ قطعه ای تکثیر نگردید (شکل ۱).

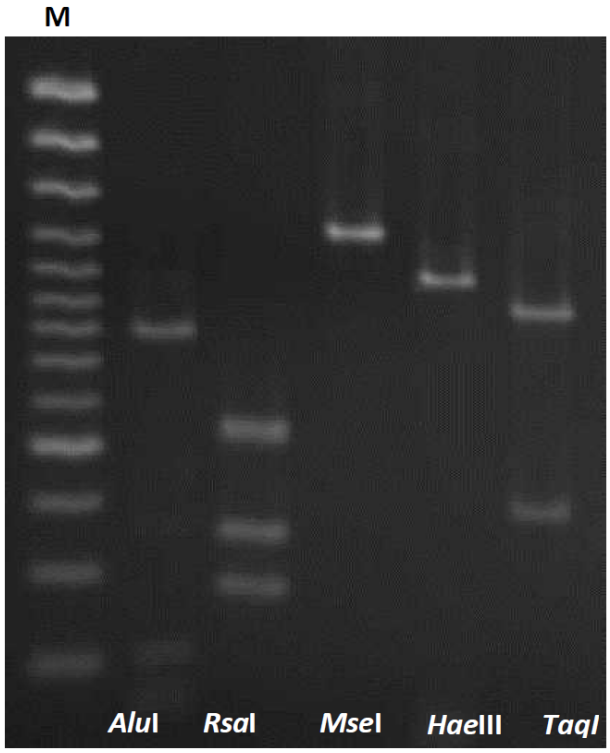
چند شکلی طول قطعات برشی(RFLP)

مقایسه نقوش حاصل از هضم آنزیمی محصول پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای با آنزیم‌های برشی *Alu*I، *Hae*III، *Mse*I،

*Rsa*I و *Taq*I (شکل۲) با نقوش حاصل از هضم همین آنزیم‌ها در فیتوپلاسماهای گروه 16S rII و فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش (Lee *et al.* 1998) نشان داد که از نظر ۱۲۵۰ جفت باز از ژن آرانای ریبوزومی 16S، از بین حشراتی که در آزمون پی‌سی‌**آر** مثبت بودند، تنها زنجرک *H. phycitis* و پسیل آسیایی مرکبات حامل فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش می‌باشند. به دلیل عدم تشابه نقوش حاصل از هضم آنزیمی فیتوپلاسماهای همراه با سایر زنجرک‌ها با فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش، این زنجرک‌ها در مطالعات بعدی حذف شدند.

شناسایی فیتوپلاسماهای ردیابی شده با استفاده از آنالیزهای مولکولی محصول PCR دو مرحله‌ای

محصول پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای (۱۲۵۰ جفت باز) نمونه‌های زنجرک *H. phycitis* و پسیل آسیایی مرکبات (از هر گونه ۵ نمونه) همسانه سازی و تعیین ترادف شد. تشابه نوکلئوتیدی ترادف‌های به دست آمده صد درصد بود و یک نمونه از آن‌ها تحت رش شمار KX828609 در بانک جهانی ژن قرار داده شد. جستجو با برنامه BLAST نشان داد که این ترادف بیشترین شباهت را با اعضای گروه جاروک بادام زمینی (Peanut witches' broom,16SrII) دارد. میزان تشابه نوکلئوتیدی فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش با فیتوپلاسماهای همراه با جاروک لیموترش در عمان (LN873017 و AB295057) و جاروک گریپ فروت در ایران (JF518980) (اعضای زیر گروه 16SrII-B) صد در صد بود. با استفاده از گزینه همولوژی در نرم افزار DNAMAN میزان تشابه نوکلئوتیدی فیتوپلاسمای همراه با زنجرک *H. phycitis* و فیتوپلاسماهای نماینده زیر گروه‌های گروه 16SrII و

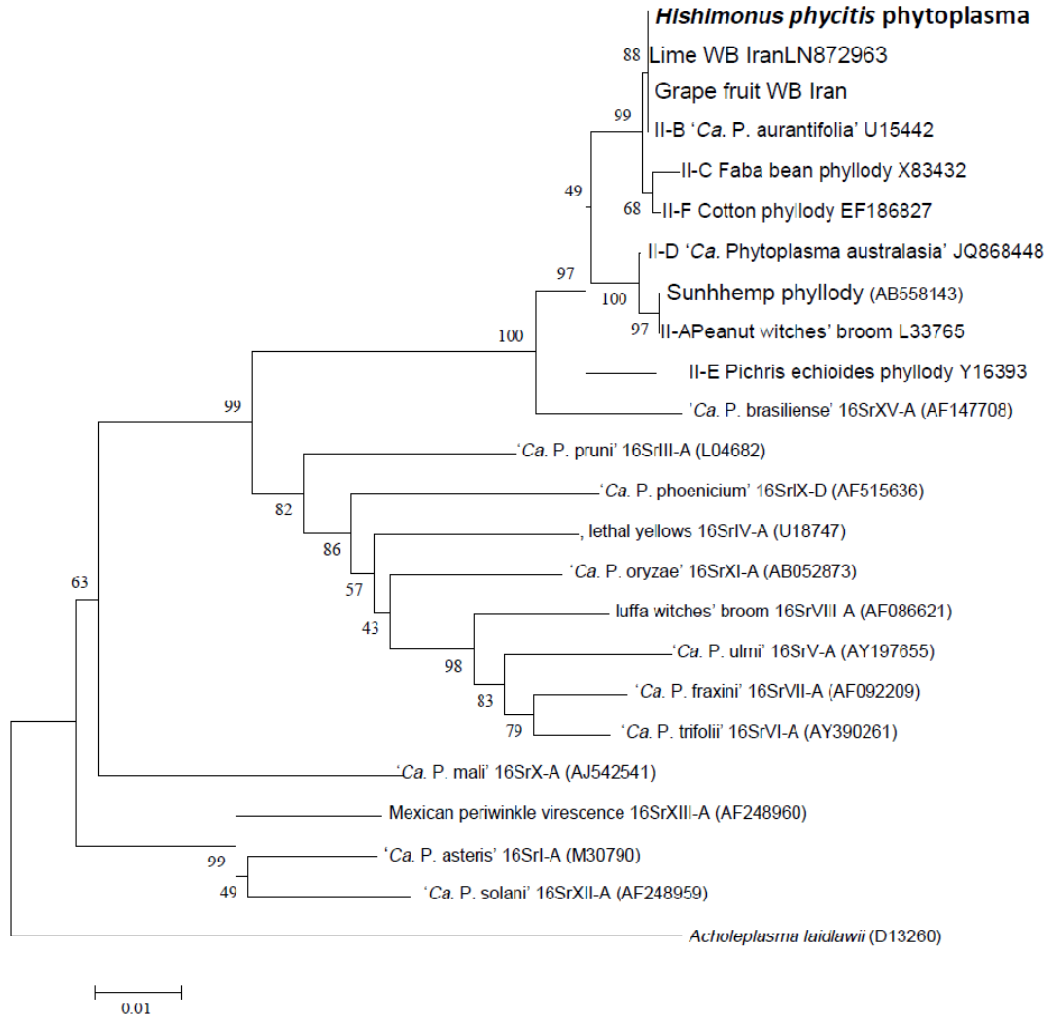


شکل ۲. نقوش حاصل از هضم آنزیمی محصول پی‌سی‌آر دومرحله‌ای یک نمونه از فیتوپلاسمای همراه با زنجرک *Hishimonus phycitis* با آنزیم‌های برشی *Alu*I، *Hae*III و *Mse*I *Rsa*I و *Taq*I. M، مارکر ۱۰۰جفت بازی.

Figure 2. Electrophoretic patterns of digested nested PCR product from a *Hishimonus phycitis* sample using *Alu*I, *Hae*III, *Mse*I, *Rsa*I and *Taq*I restriction enzymes. M: 100bp marker

فیتوپلاسمای عامل افژولش شبدر به عنوان out-group تعیین شد. این آنالیز نشان داد که میزان تشابه نوکلئوتیدی فیتوپلاسمای همراه با زنجرک *H. phycitis* با *'Ca. Phytoplasma aurantifolia'* نماینده زیر گروه 16SrII-B صد در صد بود. میزان تشابه نوکلئوتیدی این فیتوپلاسما با فیتوپلاسماهای زیر گروه‌های *A, C, D, E, F* و فیتوپلاسمای عامل افژولش شبدر به ترتیب ۹۸/۶، ۹۹/۴، ۹۸/۶، ۹۸/۴، ۹۹/۷ و ۹۷/۱ درصد بود.

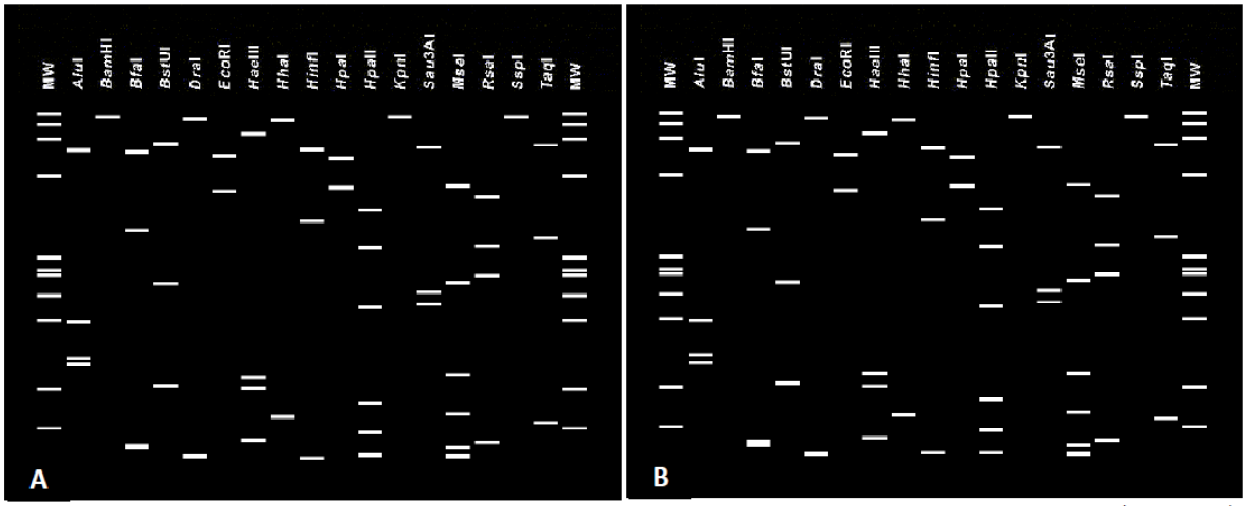
با استفاده از نرم افزار MEGA5 ترادف 1250 جفت



شکل ۳. دندروگرام حاصل از هم ردیف سازی ۲۲ فیتوپلاسما و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان out-group با استفاده از گزینه درخت فیلوژنتیکی و روش Neighbor-joining در نرم افزار MEGA5 براساس ترادف نوکلئوتیدی ۱۲۵۰جفت باز از ژن آرانای ریبوزومی16S. *'Ca.* P.' ، *'Candidatus* Phytoplasma'؛Witches broom،WB؛ اعداد داخل پرانتز، رس شمار در بانک جهانی ترادف‌ها و اعداد بالای شاخه‌ها، اعتبار سنجی (bootstrap) برای ۱۰۰۰ تکرارمی‌باشند.

Figure3. Phylogenetic tree inferred from alignment of 16S rRNA gene sequences (1250 bp) in 22 phytoplasmas and *Acholeplasma laidlawii* as outgroup by Neighbor-joining method using MEGA5 software; *'Ca.* P.', '*Candidatus* Phytoplasma';WB, witches' broom; Numbers in parentheses, GenBank accession numbers; Numbers above the branches, bootstrap support (1000 replicates).

بازی از اپرون آرانای ریبوزومی فیتوپلاسمای همراه با زنجرک *H. phycitis* با ترادف‌های مشابه در ۲۲ فیتوپلاسما و *A. laidlawii* به عنوان out-group مقایسه و دندروگرام تباری (شکل ۳) ترسیم گردید. این آنالیز نشان داد که فیتوپلاسمای همراه بازنجرک *H. phycitis* با فیتوپلاسماهای گروه *16SrII* طبقه بندی می‌شود و در بین اعضای انتخابی این گروه بیشترین نزدیکی را با فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش در ایران و عمان (رس شمارهای *N872963* و *U15442*) و جاروک گریپ فروت در ایران (رس شمار *JF518980*) دارد.



شکل ٤. نقوش حاصل از چند شکلی طول قطعات برشی مجازی ناحیه تکثیری جفت آغازگر R16F2n/R16R2 در فیتوپلاسمای همراه با جاروک لیموترش ('*Ca* P. aurantifolia') (A) و زنجرک *Hishimonus phycitis* (B) با استفاده از برنامه *i*PhyClassifier و آنزیم‌های برشی: *Alu*I، *Bam*HI، *Bfa*I، *Bst*UI، *Dra*I، *Eco*RI، *Hae*III، *Hha*I، *Hin*fI، *Hpa*I، *Hpa*II، *Kpn*I، *Sau*3AI، *Mse*I، *Rsa*I، *Ssp*I، *Taq*I.

Figure 4. Virtual RFLP analyses generated with *i*PhyClassifier from *in silico* digestion of the 16S rDNA R16F2n/R16R2 fragments of the'*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' (A) and *Hishimonus phycitis* associated phytoplasma (B) using restriction enzymes *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hin*fI, *Hpa*I, *Hpa*II و *Kpn*I, *Sau*3AI, *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I,*Taq*I.

چند شکلی طول قطعات برشی(RFLP) مجازی

آنالیز چند شکلی طول قطعات برشی مجازی براساس ۱۲۵۰ جفت باز از ژن ارانای ریبوزومی *16S* (ناحیه تکثیری جفت آغازگر *R16F2n/R16R2*) نشان دادکه فیتوپلاسمای همراه با *H. phycitis* با *'Ca. Phytoplasma aurantifolia' (U15442)*، نماینده زیر گروه *B* در گروه *16SrII* یکسان (ضریب تشابه ۱) می‌باشد (شکل ۴).

انتقال فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش در شرایط گلخانه

۱- مستقیما بعد از جمع آوری از باغ‌های آلوده

زنجرک *H. phycitis* و پسیل آسیایی مرکبات که از نظر وجود *Ca. P. aurantifolia* در آزمایش پی‌سی‌آر مثبت بودند از نظر انتقال فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش به دانهال‌های لیموترش و بکرایی آزمایش شدند. از بین این دو حشره زنجرک *H. phycitis* عامل بیماری را به سه دانهال از ۱۰ دانهال بکرایی مورد آزمایش انتقال داد و در آن‌ها علائم بارز بیماری جاروک ظاهر شد (شکل ۵). دوره نهفتگی بیماری در بکرایی حدود ۶ ماه بود. واکنش نهال‌های بکرایی مایه زنی شده و دارای علائم بیماری در آزمون پی‌سی‌آر مستقیم، مثبت بود. براساس هضم آنزیمی محصول *PCR* با آنزیم‌های برشی *Alu*I، *Hha*III، *Mse*II، *Rsa*I و *Taq*I فیتوپلاسمای ردیابی شده در بدن زنجرک *H. phycitis* و بکرایی مایه زنی شده دارای علایم با عامل بیماری جاروک در یک دانهال لیموترش موجود در گلخانه که قبلا با پیوندک یک درخت لیموترش آلوده در هشتبندی

شکل ۵. ریز برگی، زردی، جاروک و کوتولگی در نهال‌های بکرایی حدود ۱۲ ماه بعد از رهاسازی زنجرک‌های *Hishimonus phycitis* جمع آوری شده از روی درختان لیموترش دارای علائم.

Figure 5. Little leaf, yellowing, witches' broom and stunting in Bakraee seedlings 12 months after introducing *Hishimonus phycitis* leafhoppers collected from WBDL-symptoms bearing lime trees.

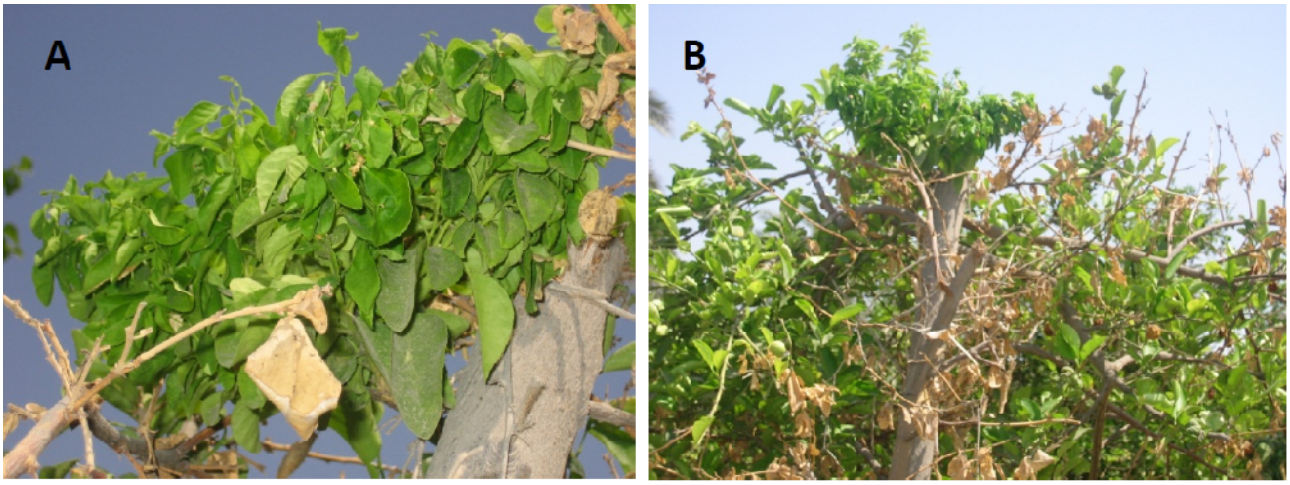
میناب مایه زنی شده بود، یکسان بود. در هیچ‌یک از نهال-های لیموترش مایه زنی شده با زنجرک *H. phycitis* علائم بیماری ظاهر نشد. پسیل آسیایی مرکبات قادر به انتقال عامل بیماری جاروک لیموترش به نهال‌های لیموترش و بکرایی نبود. در آزمون‌های پی سی آر مستقیم و دو مرحله‌ای، از بین نهال‌های بکرایی و لیموترش مایه زنی شده توسط زنجرک *H. phycitis* و پسیل آسیایی مرکبات به جز دانهال‌های بکرایی دارای علائم بیماری، واکنش بقیه دانهال‌ها منفی بود.

۲- بعد از تغذیه از لیموترش آلوده

زنجرک *H. phycitis* و پسیل آسیایی مرکبات که واکنش آن‌ها از نظر وجود *'Ca. P. aurantifolia'* مثبت بود بعد از دو هفته تغذیه ازنهال لیموترش آلوده به عامل جاروک لیموترش از نظر قدرت انتقال بیماری به نهال‌های لیموترش و بکرایی آزمایش شدند. نتایج آزمایش نشان داد که تنها زنجرک‌های *H. phycitis* توانستند فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک را از نهال آلوده به نهال‌های بکرایی انتقال دهند. پس از تغذیه زنجرک *H. phycitis*، در دو نهال از ۱۵ نهال بکرایی مایه زنی شده علائم بیماری جاروک ظاهر شد و واکنش آن‌ها در آزمون PCR مثبت بود. زمان بین رهاسازی زنجرک‌های *H. phycitis* روی نهال‌های بکرایی تا ظهور اولین علائم بیماری حدود ۷ ماه بود.

انتقال فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش به درختان لیموترش بارور در شرایط باغ

پس از حدود هشت ماه، علایم جارویی روی سه اصله از چهار اصله درختی که زنجرک‌های جمع‌آوری شده از درختان آلوده روی آن‌ها رهاسازی شده بود مشاهده گردید (شکل ۶). در درختی که زنجرک‌های سالم روی آن رهاسازی شده بود علائم بیماری ظاهر نشد. وجود فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش در درختانی که در معرض زنجرک‌های آلوده قرار گرفته بودند و دارای علائم بودند به‌وسیله آزمون پی‌سی‌آر مستقیم با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 مورد تأیید قرار گرفت. قطعه تکثیر شده به اندازه تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز بود. از درختان آلوده شده در شرایط آزمایشگاهی، زنجرک‌های جمع آوری شده از درختان دارای علایم و نیز درختان دارای آلودگی طبیعی به طور مجزا با آنزیم‌های اندو نوکلئاز *Alu*I، *Hha*I، *Rsa*I، *Hpa*II و *Taq*I هضم شد و نقوش به دست آمده با نقوش حاصل از *'Ca. P. aurantifolia'* یکسان بود.



شکل ٦. A و B علائم ریز برگی، کاهش فاصله میانگره‌ها، جاروک و سرخشکیدگی در درختان لیموترش بارور مایه زنی شده با زنجرک *Hishimonus phycitis* جمع آوری شده از روی درختان آلوده لیموترش

Figure 6. Little leaf, internode shortening, witches' broom and dieback symptoms on bearing trees inoculated with *Hishimonus phycitis* collecting from WBDL-infected lime trees.

بررسی دامنه میزبانی زنجرک ناقل فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش

امکان تکثیر و زاد و ولد زنجرک *H. Phycitis*، روی انواع مرکبات، کنار و چند گیاه علفی در شرایط گلخانه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس و در زیر سرپوش پلاستیکی بررسی شد. این زنجرک روی کنار، انواع مرکبات مورد آزمایش شامل لیموترش، یک تیپ دیرگیر لیموترش، لایم کوات، بکرایی، نارنج، اورکا لمون، لیموشیرین، لایم کوات، نارنج سه برگی، نارنگی محلی فارس، پرتقال رقم‌های والنسیا و هاملین و گریپ فروت رقم ردبلاش تکثیر شد. روی مرکبات مذکور و کنار مراحل مختلف شامل تخم، سنین مختلف پورگی و حشره بالغ مشاهده گردید. زنجرک مزبور روی هندوانه، هویج، یونجه، اسفناج و بانجان تکثیر نشد.

مقایسه جمعیت حشره ناقل در درختان سالم و آلوده لیموترش

در مناطق هشتبندی و رودان در استان هرمزگان در سال ۱۳۸۸ با استفاده از دی – وک به مدت ۲۰ دقیقه از روی درخت‌های لیموترش آلوده (۲۰ درخت آلوده در هر باغ) و سالم (۲۰ درخت سالم در هر باغ) اقدام به جمع آوری زنجرک ناقل شد. تفاوت تعداد زنجرک ناقل جمع آوری شده (پوره‌های سنین مختلف و حشرات بالغ) در درختان-های آلوده در مقایسه با درختان سالم در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود ($FS=60.2^{**}$) (جدول ۲). در سه باغ آلوده در هشتبندی به ترتیب ۴۵۷، ۷۲۳ و ۵۵۲ (با میانگین ۵۷۷) و در سه باغ آلوده در رودان به ترتیب ۳۴۴، ۵۳۳ و ۲۱۱ زنجرک ناقل (با میانگین ۳۶۳) جمع آوری شد. در هشتبندی تعداد زنجرک *H. phycitis* جمع آوری شده در سه باغ سالم به ترتیب ۳۸، ۴۴ و ۳۲ (با میانگین ۳۸) و در سه باغ سالم در رودان به ترتیب ۴۳، ۲۴ و ۶۳ (با میانگین ۴۳) بود (جدول ۳). در یک بررسی دیگر در سال ۱۳۸۸ در گودشانه داراب (فارس) تعداد زنجرک‌های جمع آوری شده از روی ۸ درخت آلوده ۱۰۲ و تعداد زنجرک‌های جمع آوری شده از روی ۴۰ درخت سالم ۱۷ عدد بود. از نظر آماری نیز بین باغ‌های آلوده و سالم اختلاف معنی

جدول ۲. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تعداد زنجزک *Hishimonus phycitis* جمع آوری شده در باغ‌های سالم و آلوده بـه بیمـاری جاروک لیموترش

Table 2. Analysis of variance in relation to the number of *Hishimonus phycitis* leafhoppers collected in healthy and witches broom affected lime orchards

SV	DF	SS	MS	FS	CV (%)
Replication	2	34424.7	17212.3	1.87^{ns}	37.5
Region (A)	1	32865.3	32865.3	3.58^{ns}	
orchard type (healthy vs infected orchards (B)	1	552981.3	552981.3	60.2^{**}	
Interaction AB	1	363000.0	363000.0	3.95^{ns}	
Error	6	55113.3	9185.6	-	
Total	11	711684.6	-	-	

^{ns}، غیر معنی دار؛ **، معنی دار در سطح احتمال ۱٪

^{ns}:non significant; ** significant at 1%

جدول ۳. مقایسه اثر منطقه، نوع درخت (آلوده و سالم) و اثر متقابل آن‌ها بر تعداد زنجرک ناقل بیماری جاروک

Table 3. The effect of sampling regions, orchard condition (WBDL-affected or not) and their interaction on WBDL vector density

Region Healthy vs WBDL infected orchards	Hashtbandi	Rudan	Orchard type (healthy vs WBDL infected) mean
Healthy	$^{\dagger}38^{c} \pm {}^{\dagger\dagger}3.5$	$43^{c} \pm 11.3$	$41^{B} \pm 5.4$
Infected to WBDL	$577^{a} \pm 77.8$	$363^{b} \pm 93.4$	$470^{A} \pm 72.5$
Region mean	$308^{A} \pm 125.5$	$203^{A} \pm 82.9$	

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، در سطح ۵٪ آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. میانگین‌هـای دارای حـروف بزرگ، مربوط به اثرات انفرادی فاکتورها و میانگین‌های دارای حروف کوچک، مربوط به اثرمتقابل دو فاکتور هستند. ††خطای استاندارد (SE)

†, Means with at least one similar letter have no significant difference ($p<0.05$). Effect of each factor and their interaction has been denoted by capital and small letters, respectively. ††, Standard error.

داری در سطح یک درصد مشـاهده شـد. اثرمتقابـل معنـی داری بین دو فاکتور وجود نداشـت. بـین منـاطق مختلـف مورد بررسی اختلاف معنـی داری از نظـر تعـداد زنجـرک جمع آوری شده مشاهده نشد(جدول ۲).

در مقایسه دو منطقه از نظر مجموع تعداد زنجرک‌هـای جمع آوری شده در باغ‌های سالم و آلوده، تعـداد زنجـرک در منطقه هشت بنـدی (۳۰۸) بیشـتر از رودان (۲۰۳) بـود ولی تفـاوت معنـی داری بـا هـم نداشـتند (جـدول ۳). در مقایسه باغ‌های سالم و آلوده، تعـداد زنجـرک در بـاغ‌هـای آلوده (۴۷۰ زنجرک) بیشتر از باغـات سـالم (۴۱ زنجـرک) بود و تفاوت معنی داری با هم داشتند (جدول ۳).

مقایسه تیمارهای حاصل از اثر متقابل دو فاکتور (منطقه و تعـداد زنجـرک) حـاکی از آن بـود کـه بیشـترین تعـداد زنجـرک در بـاغ‌هـای آلـوده منطقـه هشـت بنـدی (۵۷۷ زنجرک) و کمترین آن در باغ‌های سالم همـین منطقـه (۳۸ زنجرک) بود. در این رابطه اختلاف معنی داری بین تعـداد زنجرک در باغ‌های سالم دو منطقه مشاهده نشد اما درختان آلوده دو منطقه اختلاف معنی داری با هم داشتند به طوری که تعداد زنجرک در بـاغ‌هـای آلـوده هشـت بنـدی (۵۷۷) بیشتر از باغات آلوده رودان (۳۶۳) بـود. در هـر دو منطقـه معنی دار بودن اختلاف بین درختـان سـالم و آلـوده کـاملاً مشهود بود (جدول ۳).

بحث

از بین ۲۸ گونه حشره مکنده جمع آوری شده از باغ-های لیموترش (جدول ۱)، واکنش هفت گونه از نظر آلودگی به فیتوپلاسما در آزمون پی‌سی‌آر مثبت بود. لکن آزمون چند شکلی طولی قطعات برشی (Physical RFLP) محصول پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای (۱۲۵۰ جفت باز از ژن آر-ان‌ای ریبوزومی 16S نشان داد که در بین فیتوپلاسماهای همراه با این هشت گونه، تنها فیتوپلاسماهای همراه با زنجرک *H. phycitis* و پسیل آسیایی مرکبات با فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش یکسان هستند. با تعیین توالی محصول پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای، جستجو با برنامه Blast، میزان شباهت نوکلئوتیدی، آنالیز تبارزایی و آزمون مجازی چند شکلی طولی قطعات برشی (Virtual RFLP) نیز شباهت فیتوپلاسماهای همراه با زنجرک *H. phycitis* و پسیل آسیایی مرکبات با فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش تایید شد. از بین دو حشره مزبور تنها زنجرک *H. phycitis* جمع آوری شده از باغ‌های آلوده یا تغذیه شده از نهال‌های آلوده به عامل بیماری جاروک قادر به انتقال عامل بیماری جاروک لیموترش به دانهال‌های بکرایی بود. تمامی تلاش‌های به عمل آمده برای انتقال عامل جاروک لیموترش از طریق پسیل آسیایی مرکبات به لیموترش و بکرایی بی نتیجه بود. تقریباً در تمامی نقاط آلوده به بیماری جاروک لیموترش قبل از گزارش پسیل آسیایی مرکبات(Bove 2006) به عنوان یک آفت وارداتی، بیماری جاروک وجود داشته است(Salehi *et al.* 1997 and 2002) و این امر می تواند یکی از شواهد غیر مستقیم دیگر مبنی بر عدم دخالت پسیل آسیایی مرکبات در انتقال فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش باشد. در شرایط آزمایشگاه زنجرک *H. phycitis* قادر به انتقال عامل بیماری جاروک به دانهال‌های جوان لیموترش نبود ولی در شرایط باغ زنجرک *H. phycitis* جمع آوری شده از روی درخت‌های آلوده، عامل جاروک لیموترش را به درختان بالغ و بارور لیموترش انتقال داد. این بررسی نشان داد که درختان جوان لیموترش (دانهال‌ها) ممکن است در مقابل مایه زنی با عامل جاروک لیموترش توسط زنجرک *H. phycitis* حساس نبوده و آلودگی نشان ندهند. عدم موفقیت در انتقال بیماری به دانهال‌های لیموترش از طریق مایه زنی با زنجرک پیش‌تر نیز گزارش شده است (Bove *et al.* 1993, Salehi *et al.* 2002).

عدم توانایی زنجرک *H. phycitis* در انتقال عامل جاروک لیموترش به دانهال‌های جوان لیموترش و توانایی آن در انتقال عامل بیماری به درختان مسن لیموترش قابل تامل است و باید در مورد آن بررسی‌های بیشتری انجام شود. احتمالاً در دانهال‌های جوان لیموترش ممانعت کننده‌هایی وجود دارد که مانع از انتقال عامل بیماری توسط زنجرک ناقل می‌شود. در صورتی‌که وجود این‌گونه ممانعت کننده‌ها به اثبات برسد از آن‌ها می‌توان در مقاوم کردن درختان بارور لیموترش استفاده کرد. وجود پپتیدهای مختلف در گیاهان با نقش ضد میکروبی و قارچی به فراوانی گزارش شده است (Oard & Enright, 2006; Tam *et al.* 2015) که باعث مقاومت آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شود (Prabahar *et al.* 2015). با شناسایی این پپتیدها، از آن‌ها برای تولید گیاهان مقاوم به بیماری‌های گیاهی استفاده شده است (Jung & kang, 2014). مطالعات نشان داده است که مقدار این پپتیدها در مراحل مختلف فنولوژیکی گیاه متفاوت می‌باشد (Bundo *et al.* 2014; Tam *et al.* 2015).

در پژوهش حاضر نشان داده شد که در شرایط

آزمایشگاه زنجرک ناقل بیماری جاروک روی تمامی مرکبات مورد آزمایش که تقریباً نماینده ژرم پلاسم‌های مرکبات موجود در ایران هستند تکثیر می‌شود. در شرایط طبیعی (نتایج پژوهش حاضر) زنجرک ناقل روی بکرایی و لیموترش با جمعیت بالا جمع آوری شد. روی سایر گونه-های مرکبات قابل جمع آوری نبود یا جمعیت آن بسیار ناچیز بود. این زنجرک از روی سایر درختان، درختچه‌ها و گیاهان علفی قابل جمع آوری نبود. با توجه به نتایج حاضر، این زنجرک در حالت عادی مرکباتی مانند لیموترش و بکرایی را ترجیح می‌دهد ولی تحت شرایطی می‌تواند از سایر مرکبات نیز تغذیه کند. در باغ‌های مرکبات استان هرمزگان اخیراً پرتقال، نارنگی و گریپ فروت که در شرایط عادی زنجرک ناقل از روی آن‌ها جمع آوری نمی-شود به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش آلوده شده‌اند (Salehi *et al.* 1391) .این پدیده نشان می‌دهد که احتمالا تحت فشار بالای جمعیت، این زنجرک از سایر انواع مرکبات نیز تغذیه می‌کند.

در شرایط آزمایشگاه زنجرک ناقل روی دانهال‌های کنار نیز تکثیر شد .در مناطق غیر مرکبات خیز به استثنای یک منطقه (منطقه پشت سد میناب در استان هرمزگان) این زنجرک از روی درختان کنار جمع آوری نشد (نتایج پژوهش حاضر). در منطقه یاد شده نیز این زنجرک از روی درختان کناری که در بین درختان لیموترش آلوده وجود داشتند، جمع آوری شد. این نتایج نشان می‌دهد که کنار نیز مانند اکثر مرکبات، مورد علاقه زنجرک ناقل نیست ولی تحت شرایطی زنجرک ناقل می‌تواند از کنار تغذیه کرده و تکثیر شود.

در پژوهش حاضر مشخص شد که زنجرک *H. phycitis* روی گیاهان علفی مانند بادمجان، هویج، هندوانه، یونجه و اسفناج تکثیر نشد در حالی‌که در کشور هند این گیاهان به عنوان میزبان‌های این زنجرک گزارش شده‌اند و حتی این زنجرک به عنوان ناقل بیماری فیتوپلاسمایی ریز برگی بادمجان معرفی شده است (Bindra & Singh 1969). این امر می‌تواند بیانگر این واقعیت باشد که آن چه در کشور هند و ایران به عنوان زنجرک *H. phycitis* گزارش شده، دو بیوتیپ یا حتی دو گونه متفاوت بوده که از نظر مورفولوژیکی کاملا به یکدیگر شبیه می‌باشند. وجود گونه‌های مخفی در مورد بسیاری از آفات و حشرات ناقل بیماری‌های گیاهی و انسانی ثابت شده است و این مورد حتی به عنوان یکی از مهم‌ترین موانع بر سر راه برنامه‌های مدیریتی همواره مشکل ساز بوده است (Lajus *et al.* 2015). این موضوع نیازمند انجام پژوهش-های بیشتر می‌باشد.

در این پژوهش نشان داده شد که تحت شرایط یکسان اختلاف بسیار معنی‌داری بین جمعیت زنجرک ناقل روی درختان آلوده و سالم لیموترش وجود دارد. این موضوع می‌تواند به دلیل جذابیت شاخه‌های جارویی (به دلیل ترد شدن این شاخه‌ها و لطیف‌تر شدن برگ‌ها) برای تغذیه و تکثیر زنجرک ناقل باشد. در مورد پسیل آسیایی مرکبات وجود جوانه‌های نورسته برای تخم‌گذاری و تکثیر ثابت شده است (Grafton-Cardwell *et al.* 2013). همچنین درختان آلوده می‌توانند در نتیجه تغذیه زنجرک *H. phycitis*، با ترشح کایرمون باعث جلب حشرات ناقل بیشتری به سمت خود شوند. نقش کایرمون‌ها در جلب حشرات به خوبی در مطالعات مختلف بررسی شده است و هم اکنون حتی از این تکنیک علیه خود حشرات استفاده می‌نمایند (Meng *et al.* 2015). به علاوه، عامل بیماری می‌تواند درختان بیمار را وادار به ترشح مواد فراری نماید که باعث جلب بیشتر حشرات ناقل می‌شود. در مورد پسیل آسیایی مرکبات مشخص شده است که درختان آلوده با

آزاد کردن یک ماده فرار به نام متیل سالیسیلیت باعث جلب پسیل به درختان آلوده می‌شوند (Grafton-Cardwell *et al.* 2013; Martini *et al.* 2016).

در پژوهش حاضر مشخص شد که تحت شرایط یکسان (جمع آوری از روی تعداد معینی درخت لیموترش آلوده تقریباً هم سن و با درجه آلودگی مشابه) تعداد زنجرک ناقل جمع آوری شده در هشتبندی بیشتر از رودان بود. این امر می‌تواند ناشی ازتفاوت جمعیت‌های زنجرک *H. phycitis* از نظر پارامترهای زیستی باشد. تفاوت در پارامترهای زیستی و نرخ ذاتی افزایش جمعیت در جمعیت‌های متفاوت یک حشره توسط محققین مختلف گزارش شده است (Bagheri *et al.* 2016). در خصوص زنجرک *H. phycitis* نیز مشخص شده است که جمعیت-های مختلف آن از نظر مقدار تبادل ژنی با هم متفاوت هستند (Shabani *et al.* 2012). به علاوه سابقه بیماری جاروک لیموترش در هشتبندی بیشتر از رودان می‌باشد و این امر نشان می‌دهد که در زمان انجام بررسی، اثر درختان آلوده (وجود آلودگی بیشتر در هشتبندی) بر تراکم جمعیت زنجرک ناقل بی تاثیر نبوده است. براساس نتایج این پژوهش، آلودگی درخت لیموترش به فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک و ظهور جاروک در جلب و تکثیر حشره ناقل و گسترش بیماری بسیار موثر است. این موضوع می-تواند به امکان کنترل حشره ناقل و در نتیجه کنترل بیماری جاروک از طریق حذف جاروک‌ها کمک نماید. اثر گیاهان آلوده به فیتوپلاسما به ویژه وجود جاروک‌ها در جلب و تکثیر ناقل آن‌ها پیش تر نیز گزارش شده است(Gross *et al.* 1998, Bealand *et al.* 2000, Mayer *et al.* 2008, Sugio *et al.* 2011)

منابع

Bagheri A., Fathipour Y., Askari-Seyahooei M. and Zeinalabedini M. 2016. How different populations and host plant cultivars affect two-sex life table parameters of the date palm hopper, *Ommatissus lybicus* (Hemiptera: Tropiduchidae). Journal of Agricultural Science and Technology 18:1606-1619.

Bealand L., Hoy C. W., Miller S. A. and Nault L. R. 2000. Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). Annals of the Entomological Society of America 93:271-276.

Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S. and Contaldo N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. American Journal of Plant Sciences 5:1763-1788.

Bindra O. S. and Singh B. 1969. Biology and bionomics of Hishimonus phycitis (Distant), a Jassid vector of little-leaf disease of brinjal (Solanum melongena L.). The Indian Journal of Agricultural Sciences 39:912-919.

Blomquist C. L. and Kirkpatrick B. C. 2002. Identification of phytoplasma taxa and insect vectors of peach yellow leaf roll disease in California. Plant Disease 86:759-763.

Bove J. M., 2006. Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century old disease of citrus. Journal of Plant Pathology 88:7- 37.

Bové J. M., Zreik L., Danet J-L., Bonfils J., Mjein A. M. M. and Garnier M. 1993. Witcheś broom disease of lime trees: Monoclonal antibody and DNA probes for the detection of the associated MLO and the identification of a possible vector. pp. 342-348. In: Proc. 12th Conf. IOCV, Riverside.

Bundo M., Montesinos L., Izquierdo E., Campo S., Mieulet D., Guiderdoni E., Rossignol M., Badosa E., Montesinos E., San Segundo B. and Coca M. 2014. Production of cercopin an antimicrobial peptide in rice seed endosperm. BMC Plant Biology 14:102.

Carraro L., Loi N., Emarcora P., Gregoris A. and Osler R. 1998a. Transmission of pear decline by using naturally infected *Cacopsylla pyri*. Acta Horticulture 472:665-668.

Carraro L., Osler R., Loi N., Ermacora P., Reffati E. 1998b. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. Journal of Plant Pathology 80:233-239.

Dumonceaux T. J., Green M., Hammond C., Perez E. and Olivier C. 2014. Molecular diagnostic tools for

detection and differentiation of phytoplasmas based on chaperonin-60 reveal differences in host plant infection patterns. Plos One 9:e116039.

Frisinghelli C., Delatti L., Grando M. S., Forti D. and Vindimian M. E. 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. Journal of Phytopathology 148:425- 431.

Garnier M., Zreik L. and Bové J. M. 1991. Witcheś broom disease of lime trees in Oman: Transmission of a mycoplasma-like organism (MLO) to periwinkle and citrus and the production of monoclonal antibodies against the MLO. pp. 448-453. In: Proc.11th Conf. IOCV. , Riverside.

Gottlieb Y., Zchori-Fein E., Mozes-Daube N., Kontsedalov S., Skaljac M., Brumin M., Sobol I., Czosnek H., Vavre F. and Fleury F. 2010. The transmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* by the whitefly Bemisia tabaci is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. Journal of Virology 84:9310-9317.

Grafton-Cardwell E.E., Stelinski L.L. and Stansly P.A. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. Annual Review of Entomology 58:413-432.

Gross J., Mayer C. J. and Vilcinskas A. 1998. Multitrophic interactions between insects, phytopathogens and plants: Phytoplasma manipulates vector behaviour by means of plant odour. IOBC WPRS Bulletin 2009, 14:137.

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

Hanboonsong Y., Choosai C., Panyim C. and Damak S. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumoratettix hiroglyphicus* (Matsumura). Insect Molecular Biology 11:97-103.

Holmes D. S. and Guigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Annual Biotechnology 114:193-197.

Jensen D. D., Griggs W. H., Gonzales C. Q. and Schneider H. 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. Phytopathology 54:1346-1351.

Jung Y. J. and Kang K. K. 2014. Application of antimicrobial peptides for disease control in plants. Plant Breeding and Biotechnology 2:1-13.

Lajus D., Sukhikh N. and Alekseev V. 2015. Cryptic or pseudocryptic: can morphological methods inform copepod taxonomy? An analysis of publications and a case study of the Eurytemora affinis species complex. Ecology and Evolution 5:2374-2385.

Lee I.-M., Davis R. E. and Gundersen-Rindal D. E. 2000. Phytoplasmas: Phytopathogenic Mollicutes. Annual Review of Microbiology 54:221-255.

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

Liefting L. W., Beever R. E., Winks C. J., Pearson M. N. and Forster R. L. S. 1997. Planthopper transmission of Phormium yellow leaf phytoplasma. Australian Plant Pathology 26:148-154.

Liu H. Y., Gumpf D. J., Oldfield G. N. and Calavan E. C. 1983. The relationship of *Spiroplasma citri* and *Circulifer tenellus*. Phytopathology 73:585-590.

Maixner M., Rudel M., Dair X. and Boudon-Padieu E. 1995. Diversity of grapevine yellows in Germany. Vitis 34:235-236.

Martini X., Willett D.S., Kuhns E. H., Stelinski L.L. 2016**.** Disruption of vector host preference with plant volatiles may reduce spread of insect-transmitted plant pathogens.Journal of Chemical Ecology 42:357-67.

Mayer C. J., Vilcinskas A. and Gross, J. 2008. Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. Journal of Chemical Ecology 34:1045–49.

MCcoyr E., Caudwell A., Chang C. J., Chen T. A., Chiykowski L. N., Cousin M. T., Dale J. L., DE Leeuw G. T. N., Golino D. A., Hackett K. J., Kirkpatrick B. C., Marwitz R., Petzold H., Sinha R. C., Sugiura M., Whitcomb R. F., Yang I. L., Zhu B. M. and Seemuller E., 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms, pp. 546-640. In:. R. F. Whitcomband J. G. Tully, (Eds). The Mycoplasmas, Vol. 5. Academic Press, New York, USA.

Meng P. S., Hoover K. and Keena M.A. 2015. Asian longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae), an

introduced pest of maple and other hardwood trees in North America and Europe. Journal of Integrated Pest Management 6:1.

Oard S. V. and Enright F.M. 2006. Expression of the antimicrobial peptides in pants to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant Cell Reports 25:561-572.

Prabahar A., Swaminathan S., Loganathan A. and Jegadeesan R., 2015. Identification of Novel inhibitors for Tobacco Mosaic Virus Infection in Solanaceae Plants. Advances in Bioinformatics, 2015.

Rashed A., Nash T. D., Paetzold L., Workneh F. and Rush C.M. 2012. Transmission Efficiency of Candidatus Liberibacter solanacearum and potato zebra chip disease progress in relation to pathogen titer, vector numbers, and feeding sites. Phytopathology 102:1079-1085.

Salehi M., Izadpanah K. and Rahimian H. 1997. Witches broom disease of lime in Sistan-Balochestan, Iran. Journal of Plant Pathology 33:76

Salehi M., Izadpanah K. and Taghizadeh M. 2002. Witches broom disease of lime in Iran: New distribution areas, experimental herbaceous hosts and transmission trials. Pp. 293-296. In: Fifteenth IOCV Conference.

Salehi M., Izadpanah K., Siampour M., Bagheri A. and Faghihi M. M. 2007.Transmission of candidatus *'Candidatus* Phytoplasma auranmtifolia' to Bakraee (*Citrus reticulata* Hybrid) by feral *Hishimonus phycitis* leafhopper in Iran.The American Phytopathological society. APSnet.

Sambrook J., Fritsh E. F. and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Schneider B., Seemüller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. pp. 369 – 380 In: S. Razinand and J. C. Tully (Eds.), Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology**,** Vol. 1., San Academic Press, CA. USA

Seemüller E., Garnier M. and Schneider B. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. pp. 91-116 In*:* S. Razin and R. Herrmann (Ed.). Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Seliskar C. E. and Wilson C. L. 1981. Yellows diseases of trees. Pp. 35-96 In: K. Maramorosch, and S. P., Raychaudhuri (Eds.). Mycoplasma diseases of trees and shrubs. Academic Press.

Shabani M., Bertheau C., Zeinalabedini M., Sarafrazi A., Mardi M., Naraghi S. M., Rahimian H. and Shojaee M. 2012. Population genetic structure and ecological niche modelling of the leafhopper *Hishimonus phycitis*. Journal of Pest Science 86:173-183.

Sugio A., Maclean A. M., Kingdom H. N., Grieve V. M., Manimekalai R. and Hogenhout S. A. 2011. Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. Annual Review of Phytopathology 49:175–195.

Tam J. P., Wang S., Wong K. H. and Tan W.L. 2015. Antimicrobial peptides from plants. Pharmaceuticales 8:711-757.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739.

Tanne E., Boudon-Padieu E., Clair D., Davidovich M., Melamed S. and Klein M. 2001. Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. Phytopathology 91:741-746.

Vega F. E., Daivis R. E., Barbosa P., Dally E. L., Purcell A. H. and Lee I-M. 1993. Detection of a plant pathogen in a nonvector insect species by the polymerase chain reaction. Phytopathology 83:621-624.

Weisburg W. G., Tully J. G., Rose D. L., Petzel J. P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T. G., Van Etten J., Maniloff J. and Woese C. R. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. Journal of Bacteriology 171:6455-6467.

Zhang Y. P., Uyemoto Z. K. and Kirkpatrick B. C. 1998. A small scale procedure for woody plants extracting nucleic acids from infected with various phytopathogens for PCR assay. Journal of Virological Methods 71:45-50

Zreik L., Carle P., Bove J. and Garnier M. 1995. Characterization of the mycoplasmalike organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'. International Journal of Systematic Bacteriology 45:449-453.