

## ارزیابی واکنش چند ژنوتیپ پرشین لایم به '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' در شرایط گلخانه

سینا نوری‌زاده<sup>۱</sup>، رضا خاک‌ور<sup>۱\*</sup>، مرتضی گل‌محمدی<sup>۲\*</sup>، سیدمهدی بنی‌هاشمیان<sup>۲</sup> و محمد مهدی  
فقیهی<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۱۱)

### چکیده

در این پژوهش واکنش سه ژنوتیپ متحمل شامل *TLCR10*، *TLCRO*، *TLC876* و یک ژنوتیپ حساس (ژنوتیپ *RA*) پرشین لایم به فیتوپلاسمای جারوک لیموترش با روش مایه‌زنی با پیوند در شرایط گرم (دمای روز ۳۷-۳۵ و دمای شب ۲۷-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) ارزیابی شد. هم‌چنین، در شرایط دمایی خنک (دمای روز ۲۶-۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و دمای شب ۲۰-۱۸ درجه‌ی سانتی‌گراد) واکنش ژنوتیپ *RA* به این بیمارگر بررسی شد. غلظت فیتوپلازما در گیاهان مایه‌زنی‌شده در فواصل زمانی مشخص با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی تعیین شد. چهل و هشت هفته بعد از مایه‌زنی، میانگین غلظت فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در ژنوتیپ‌های *TLCRO*، *TLC876* و *TLC10* بسیار اندک و به ترتیب ۱۷، ۱۰ و ۱۲ نسخه از ژنوم در ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای گیاه بود و علائمی از بیماری در آن‌ها مشاهده نشد. در ژنوتیپ *RA*، میانگین تعداد نسخه‌های فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای گیاه در شرایط گرم بیشتر از شرایط خنک بود و اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) را نشان داد. علائم بیماری جاروک در پرشین لایم *RA*، فقط در شرایط گرم پدیدار شد و در شرایط خنک علائمی از بیماری مشاهده نشد. نتایج این پژوهش نشان داد که ژنوتیپ‌های *TLC10*، *TLC876* و *TLCRO* تحمل بالایی به '*Ca. P. aurantifolia*' دارند که می‌توانند به عنوان یک رقم متحمل یا مقاوم به بیماری معرفی شوند و در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی به منظور تولید ارقام مقاوم و متحمل مورد استفاده قرار گیرند. هم‌چنین افزایش دما ممکن است میزان حساسیت برخی ژنوتیپ‌های پرشین لایم به فیتوپلاسمای بیماری جاروک لیموترش را افزایش دهد.

کلیدواژه: جاروک لیموترش، مقاومت، پی‌سی‌آر در زمان واقعی، شرایط دمایی گرم و خنک

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: [khakvar@gmail.com](mailto:khakvar@gmail.com); [mgolm2009@gmail.com](mailto:mgolm2009@gmail.com)

۱. دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران.

۲. دانشیار، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران.

۳. استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زرقان، ایران.

## Reaction of some Persian lime genotypes to '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' under greenhouse condition

S. Noorizadeh<sup>1</sup>, R. Khakvar<sup>1</sup>, M. Golmaohamadi<sup>2</sup>, S.M. Bani Hashemian<sup>2</sup>, and M.M. Faghihi<sup>3</sup>

(Received: 14.11.2019; Accepted: 31.7.2020)

### Abstract

Lime witches' broom disease associated with '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' is one of the most serious threats to lime production in Oman, United Arab Emirates and Iranian southern provinces. In this study, under warm condition (35-37°C and 25-27°C day/night) the reaction of four genotypes of Persian lime including TLCR10, TLCRO, TLC876 (tolerant genotypes) and RA (sensitive genotype) to '*Ca. P. aurantifolia*' was investigated via graft inoculation. Also, under cool condition (24-26°C and 18- 20°C day/night) using the same inoculation method, the reaction of RA genotype to this pathogen was evaluated. Quantitative PCR was used for detection and quantification of '*Ca. P. aurantifolia*' in the inoculated plants. At 48 weeks post-inoculation, the copy numbers of '*Ca. P. aurantifolia*' per 100 ng of total plant DNA in TLCRO, TLC876 and TLCR genotypes was very low (17, 10 and 12, respectively) and no disease symptoms were observed. In RA genotype under warm condition, the mean copy numbers of '*Ca. P. aurantifolia*' per 100 ng of plant total DNA was higher than that of cool condition and showed significant differences ( $P<0.01$ ). Furthermore, the disease symptoms were only appeared under the warm condition. The results of the present study showed that TLC10, TLC876 and TLCRO genotypes had high tolerance to '*Ca. P. aurantifolia*' and can be introduced as tolerant or resistant cultivars to '*Ca. P. aurantifolia*'. These tolerant genotypes can be used in genetic breeding programs to produce resistant and tolerant cultivars. The results also indicated that higher temperature may change susceptibility of Persian lime genotypes to '*Ca. P. aurantifolia*'.

**Keywords:** Lime witches' broom, Resistance, Real time PCR, Warm and cool conditions

\* Corresponding author's E-mail: khakvar@gmail.com; mgolm2009@gmail.com

1. Ph.D. Candidate and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran, respectively.
2. Associate Professor, Horticultural Sciences Research Institute, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ramsar, Iran.
3. Research Assistant Professor, Department of Plant Protection Research, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Fars, Agricultural Research Education and Extension Organization, Zarghan, Iran.

## مقدمه

جاروک لیموترش برای اولین بار در دهه ۱۹۸۰ میلادی از کشور عمان گزارش (Bové 1986) و در سال ۱۹۹۵ میلادی نام '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' برای فیتوپلاسمای عامل آن پیشنهاد شد (Zreik et al. 1995). بیماری در کشورهایی مانند عمان، امارات متحده عربی و ایران که در آنها لیموترش (لایم) کشت می‌شود گسترش یافته است (Garnier et al. 1991, Bové et al. 2000). در ایران، در دو دهه‌ی اخیر بیماری جاروک در باغ‌های لیموترش جنوب کشور شیوع زیادی داشته و باعث کاهش شدید عملکرد درختان آلوده و مرگ آن‌ها شده است. فیتوپلاسمای همراه با این بیماری در شرایط طبیعی توسط زنجبرک *Hishimonus phycitis* از یک درخت به درخت دیگر منتقل می‌شود (Salehi et al. 2009, Bagheri et al. 2007). علائم بیماری در لیموترش به صورت ظهور شاخه‌های جارویی در یک قسمت از درخت و سپس گسترش بیماری و افزایش تدریجی تعداد شاخه‌های جارویی در سایر قسمت‌ها از جمله تنه و طوقه می‌باشد. شاخه‌های جارویی معمولاً تولید گل و میوه نمی‌کنند و اکثراً بدون خار هستند. به ندرت در شاخه‌های آلوده میوه‌های بسیار ریز، بدشکل و غیر قابل استفاده تشکیل می‌شوند. خشک شدن برگ‌ها منجر به خشک شدن جاروک‌ها و نهایتاً مرگ درختان مبتلا معمولاً پس از ۴ تا ۵ سال از ظهور اولین علائم بیماری می‌شود (Salehi et al. 2005). هر چند که گزارش‌هایی مبنی بر زنده ماندن درختان آلوده تا ۸ سال پس از ظهور علائم نیز وجود دارد (Al-Yahyai et al. 2010).

در سال‌های اخیر برای ردیابی فیتوپلاسم‌ها از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (پی‌سی‌آر) استفاده شده است. در این

روش از آغازگرهای متفاوتی برای تکثیر بخش‌های از ژنوم فیتوپلاسم‌ها به ویژه ناحیه‌ی 16S rRNA استفاده شده است. برای افزایش حساسیت کار، از پی‌سی‌آر آشیانه‌ای (nested-PCR) و پی‌سی‌آر در زمان واقعی (real-time PCR) کمک گرفته می‌شود. به کمک این روش‌ها فیتوپلاسم‌ها در غلظت‌های بسیار اندک نیز قابل ردیابی می‌باشد. از روش پی‌سی‌آر در زمان واقعی برای بررسی کمی غلظت بیمارگرها و میزان تکثیر آن‌ها در میزبان‌های مختلف می‌توان استفاده نمود و حساسیت و مقاومت نسبی میزبان‌ها نسبت به بیمارگر را مورد سنجش قرار داد. بنابراین، کاربرد روش فوق در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی برای معرفی ژنوتیپ‌ها و ارقام متحمل یا مقاوم می‌تواند اهمیت به‌سزایی داشته باشد.

با توجه به نقش مهم ارقام تجاری و محلی مقاوم و متحمل در مدیریت بیماری جاروک لیموترش، در پژوهش‌های پیشین واکنش بسیاری از ارقام و ژنوتیپ‌های مرکبات به فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک لیموترش مطالعه و گزارش شده است (Salehi et al. 2005, Hassanzadeh Khankahdani et al. 2019, Rezazadeh et al. 2019). در این گزارش‌ها پرشین‌لایم (*Citrus latifolia* Tan.) و تعدادی از بیوتیپ‌های لایم مکزیکی در شرایط گلخانه به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل گزارش شده‌اند (Salehi et al. 2005, Hassanzadeh Khankahdani et al. 2019). در مطالعه‌ای که اخیراً صورت گرفته، مشخص شده است که برخی از دورگه‌های لیموترش اورکا به جاروک لیموترش متحمل هستند و از بین دورگه‌های مختلف دورگه‌های هاملین × اورکا در شرایط گلخانه تحمل بیشتری را از خود نشان داده‌اند (Rezazadeh et al. 2019). در تمامی مطالعات صورت گرفته برای گزارش میزان تحمل ارقام و ژنوتیپ‌ها از روش‌های ارزیابی علائم

بیماری و پی سی آر معمولی و آشیانه ای استفاده شده است. برای کنترل بیماری جاروک لیموترش استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل، استفاده از نهال های پیوندی لیموترش سالم روی پایه های عاری از بیماری، حذف علف های هرز میزبان، کنترل شیمیایی حشره ی ناقل و امحای گیاهان آلوده توصیه شده است (Salehi et al. 2005) که استفاده از ارقام مقاوم و متحمل یکی از اقتصادی ترین و ایمن ترین راه های پیشگیری از بیماری های فیتوپلاسمایی می باشد. برای دست یافتن به چنین هدفی، آگاهی از میزان تحمل ژنوتیپ های مرکبات و به خصوص ژنوتیپ های پرشین لایم - که به عنوان یکی از گونه های مقاوم به بیماری جاروک لیموترش مطرح بوده است - برای معرفی ارقام مناسب و جدید لازم و ضروری می باشد. در این مطالعه، واکنش چهار ژنوتیپ پرشین لایم شامل TLC876، TLCRO، TLCR10 و RA نسبت به 'Ca. P. aurantifolia' ارزیابی و با آزمون پی سی آر در زمان واقعی غلظت فیتوپلاسم و بروز علائم بیماری در آن ها بررسی شد. همچنین، واکنش ژنوتیپ RA از نظر تکثیر فیتوپلاسم در آن و بروز علائم بیماری در شرایط دمایی گرم و خنک در گلخانه ارزیابی و مقایسه شد.

## مواد و روش ها

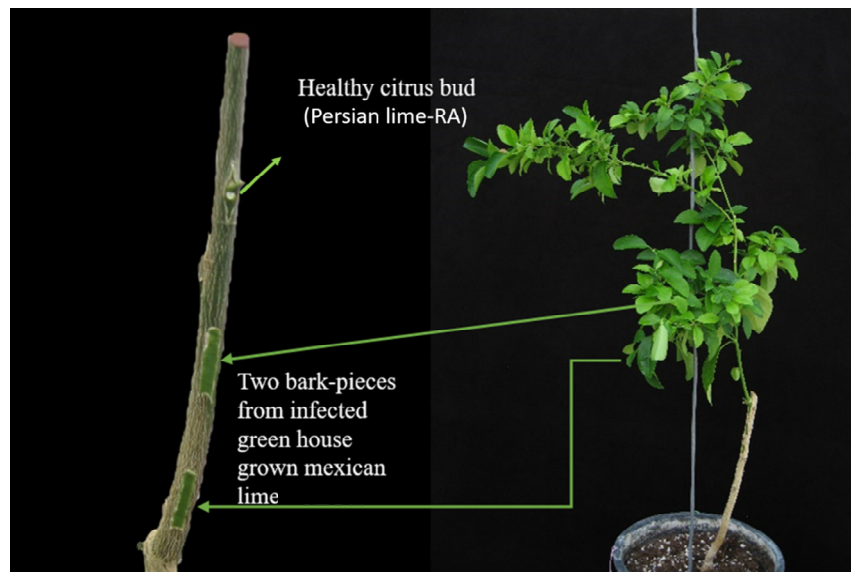
### آماده سازی مواد گیاهی و مایه زنی با پیوند

نهال های دو ساله ی لیمومکزیک (Citrus aurantifolia Swingle) (Christm.)، از پژوهشکده مرکبات و میوه های نیمه گرمسیری به عنوان پایه تهیه و عدم آلودگی آن ها به فیتوپلاسم با آزمون پی سی آر آشیانه ای با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 (دور اول) و R16F2n/R16R2 (دور دوم) تایید شد. برای ارزیابی واکنش چهار ژنوتیپ پرشین

لایم شامل TLC876، TLCRO، TLCR10 (ژنوتیپ های متحمل) و RA (ژنوتیپ حساس) به عامل بیماری جاروک لیموترش، به طور همزمان یک جوانه سالم از هر ژنوتیپ و دو پوستک آلوده به جدایه ی LWB- (MK907878) 'Ca. P. aurantifolia' DL1 روی یک پایه سالم لیمومکزیک پیوند زده شدند. برای هر ژنوتیپ پنج تکرار در نظر گرفته شد. در هر تکرار ابتدا پوستک های آلوده به عامل جاروک لیموترش و سپس جوانه سالم پرشین لایم پیوند شدند. جوانه های سالم ژنوتیپ های مذکور به عنوان شاهد (سه تکرار) روی پایه های سالم لیمومکزیک پیوند زده شدند. گیاهان مایه زنی شده در شرایط گرم (دمای روز ۳۷-۳۵ و دمای شب ۲۷-۲۵ درجه ی سانتی گراد) نگهداری شدند. به منظور ارزیابی تاثیر دما در روند تکثیر فیتوپلاسم و بروز علائم بیماری، با همین روش پنج پایه لیموترش مکزیک هر یک همزمان با جوانه سالم ژنوتیپ RA و دو پوستک آلوده به جدایه ی LWB-DL1 (MK907878) 'Ca. P. aurantifolia' از طریق پیوند مایه زنی و به واحد خنک (دمای روز ۲۶-۲۴ درجه ی سانتی گراد و دمای شب ۲۰-۱۸ درجه ی سانتی گراد) گلخانه منتقل شدند. در شکل ۱ نحوه پیوند جوانه های ژنوتیپ های پرشین لایم و پوستک های آلوده به عامل جاروک لیموترش نشان داده شده است. پایه ها بیست روز بعد از پیوند زنی سربرداری شدند نهال های مایه زنی شده به صورت مرتب (هفتگی) به منظور بروز علائم بیماری و نمونه برداری جهت تعیین غلظت فیتوپلاسمی جاروک لیموترش به مدت دوازده ماه، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### نمونه برداری و استخراج دی ان ای

نمونه برداری در نهال های مایه زنی شده ژنوتیپ های TLC876، TLCRO و TLCR10 که در شرایط گرم



شکل ۱. پیوند همزمان جوانه‌ی سالم پرشین لایم (ژنوتیپ RA) و پوستک آلوده به '*Ca. P. aurantifolia*' روی پایه‌ی سالم لیمومکزیکایی.

**Fig.1. Simultaneous grafting of bud-pieces from healthy Persian lime (genotype RA) and a '*Ca. P. aurantifolia*' infected lime tree on healthy Mexican lime rootstock.**

نسبت حجمی ۲۴ به ۱) اضافه و در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رونشین هر لوله (حدود ۴۰۰ میکرولیتر) به یک لوله دیگر منتقل و پس از اضافه کردن دو سوم حجم ایزوپروپانول سرد به هر کدام و مخلوط کردن آن‌ها، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رونشین به آرامی دور ریخته و به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه و ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از آن لوله‌ها از باقیمانده‌ی الکل خشک و ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به رسوب موجود در هر لوله اضافه و از آن به عنوان دی‌ان‌ای الگو در پی‌سی-آر استفاده شدند.

#### ردیابی فیتوپلازما با آزمون پی‌سی‌آر معمولی و آشیانه‌ای

دی‌ان‌ای نهال‌های پرشین‌لایم، قبل و بعد از مایه‌زنی با

نگهداری می‌شدند در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ هفته بعد از مایه‌زنی و برای نهال‌های مایه‌زنی‌شده پرشین‌لایم RA در دو شرایط گرم و خنک، ۱۲ و ۴۸ هفته بعد از مایه‌زنی انجام شد. برای نمونه‌برداری بسته به اندازه برگ سه تا هشت برگ از هر نهال برداشته شد. استخراج دی‌ان‌ای کل از گیاهان مایه‌زنی‌شده و شاهد بر اساس روش موری و تامپسون (Murray & Thompson, 1980) با تغییراتی در آن به شرح زیر انجام شد. مقدار ۰/۵ گرم از بافت رگبرگ میانی برگ‌ها در ازت مایع به صورت پودر در آمد. سپس ۳ میلی‌لیتر بافر CTAB دو درصد (CTAB 2%, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, Tris-HCl 100mM, pH 8.0) به نمونه‌های پودر شده اضافه شد. مقدار یک میلی‌لیتر از این عصاره به لوله‌های اپندورف یک و نیم میلی‌لیتری اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵° C درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد، رونشین حاصل به یک لوله اپندورف ۲ میلی‌لیتری انتقال و به هر لوله ۷۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم-ایزوامیل الکل (به

پیوند برای وجود یا عدم وجود آلودگی فیتوپلاسمایی با پی سی آر آشیانه ای با استفاده از جفت آغازگر P1A/P7A (Lee et al. 2004) در دور اول و جفت آغازگر R16F2n/R16R2 (Gundersen and Lee 1996) در دور دوم مورد آزمایش قرار گرفتند. از نمونه های دی ان ای یک نهال لیمو ترش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک و نهال های سالم ژنوتیپ های پرشین لایم مورد آزمایش به ترتیب به عنوان شاهد مثبت و منفی استفاده گردید. از هر نمونه مثبت در پی سی آر یک محصول پی سی آر (برای هر آغازگر) توسط شرکت ماکروژن، کره ی جنوبی به صورت مستقیم تعیین توالی و جستجو با بلاست در بانک ژن با استفاده از قطعات تعیین توالی شده انجام شد.

#### آزمون پی سی آر در زمان واقعی (Real-time PCR)

ردیابی و تعیین غلظت فیتوپلاسمای در گیاهان مایه زنی شده با آزمون پی سی آر در زمان واقعی در دستگاه Step One Plus (ساخت کشور آمریکا) انجام شد. در این روش از جفت آغازگر (5'-GTACACACCGCCCGTC و 5'-GATCCATCCCCACCT) و WBDLF (AAAC-3' WBDLR (TCCGG-3' Salehi Abarghouei et al. (2018) که قطعه ی ۱۴۶ جفت بازی از ژن 16S rRNA فیتوپلاسمای جاروک لیموترش را تکثیر می کند، استفاده شد. حجم نهایی واکنش پی سی آر در زمان واقعی حدود ۲۵ میکرولیتر و شامل: ۱۲ میکرولیتر مستر میکس حاوی سایبرگرین با غلظت بالای ROX (Amplicon, Denmark)، یک میکرولیتر از جفت آغازگرهای WBDLF/WBDLR در غلظت پایه ی ۱۰ میکرومولار، ۷ میکرولیتر آب مقطر سترون، و ۳ تا ۴ میکرولیتر از دی ان ای رقیق شده (۱۰۰ نانوگرم) بود. برنامه ی دمایی واکنش شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد به

مدت ۱۳ دقیقه و ۴۰ چرخه شامل ۹۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۳ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. جهت تایید اختصاصیت آغازگرها در تکثیر قطعه ی هدف، یک منحنی ذوب در انتهای واکنش، با افزایش نیم درجه ای از ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد رسم شد. تمامی ارزیابی ها در سه تکرار انجام شد. دی ان ای استخراج شده از گیاهان سالم پرشین لایم (ژنوتیپ های TLC876، TLCRO، TLCR10 و RA) و همچنین آب مقطر سترون به عنوان کنترل منفی استفاده شدند.

#### مراحل کمی سازی مطلق

ابتدا با آغازگرهای اختصاصی WBDLF/WBDLR طراحی شده برای آزمون پی سی آر در زمان واقعی (Salehi Abarghouei et al. 2018) با یک نمونه ی دی ان ای مثبت برای 'Ca. P. aurantifolia' پی سی آر معمولی انجام شد و قطعه ی قابل انتظار ۱۴۶ جفت باز تکثیر شد. سپس، این قطعه ی تکثیر یافته با استفاده از کیت خالص سازی محصول پی سی آر از ژل (دنازیست، ایران) استخراج و خالص سازی شد. قطعه ی خالص سازی شده با اسپکتروفوتومتر (BMG LABTECH, Germany) مورد سنجش قرار گرفت و غلظت آن تعیین شد. برای شمارش تعداد نسخه های قطعه ی هدف تکثیر شده از فرمول زیر استفاده شد (URI Genomics & Sequencing Center, <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>):

$$\frac{6/0.22 \times \text{میزان دی ان ای برحسب نانوگرم}}{\text{تعداد نسخه ها}} = \frac{\text{اندازه ی قطعه ی تکثیر شده ی دی ان ای برحسب (} 10^{23} \times \text{)}}{650 \times 10^9 \times 1 \times \text{جفت باز}}$$

میانگین وزن مولکولی یک جفت باز ۶۵۰ دالتون (گرم

ریزبرگی، کاهش فاصله‌ی میان‌گره‌ها و جاروک در تمامی تکرارهای این ژنوتیپ قابل مشاهده بود (شکل ۲). در نهال‌های مایه‌زنی شده ژنوتیپ RA که در شرایط خنک نگهداری شده بودند تا ۴۸ هفته بعد مایه‌زنی هیچگونه علائمی مشاهده نگردید.

### پی‌سی‌آر و تعیین توالی

چهل و هشت هفته بعد از مایه‌زنی، در شرایط گرم و خنک، در نمونه‌های ژنوتیپ RA و شاهد مثبت قطعات قابل انتظار حدود ۱۸۰۰ و ۱۲۵۰ جفت‌باز به‌ترتیب در پی‌سی‌آر مستقیم و آشیانه‌ای تکثیر شدند و در دی‌ان‌ای گیاهان شاهد (مایه‌زنی نشده) و آب مقطر سترون این قطعات تکثیر نشد. نتیجه‌ی ردیابی فیتوپلازما در سه ژنوتیپ دیگر تنها با پی‌سی‌آر آشیانه‌ای در ژنوتیپ TLC876، ۱۲ و ۲۴ هفته پس از مایه‌زنی مثبت بود ولی پس از ۳۶ و ۴۸ هفته نتایج ردیابی‌ها با پی‌سی‌آر آشیانه‌ای در این ژنوتیپ مشابه دو ژنوتیپ دیگر منفی بودند. محصول پی‌سی‌آر مستقیم و آشیانه‌ای به‌طور مستقیم تعیین ترادف شدند. از آنجا که تمامی توالی‌ها بدست آمده ۹۹/۹ درصد با همدیگر شباهت داشتند فقط یک توالی (محصول پی‌سی‌آر آشیانه‌ای با طول توالی ۱۱۳۵ جفت‌باز) منتخب با رس‌شمار MG893889 در بانک ژن ثبت شد. جستجوی بلاست با استفاده از توالی‌های به دست آمده نشان داد که این ترادف‌ها با 'Ca. P. aurantifolia' ۹۹/۹۸ درصد شباهت داشتند.

ارزیابی کمی فیتوپلازما در نهال‌های پرشین لایم با روش پی‌سی‌آر در زمان واقعی  
منحنی استاندارد

برای کمی‌سازی غلظت فیتوپلازما بیماری جاروک

بر مول) فرض شد و عدد آووگادرو  $6.022 \times 10^{23}$  مولکول در مول می‌باشد. سپس، از هفت رقت متوالی از محصول پی‌سی‌آر به‌دست آمده از جفت آغازگر WBDLF/WBDLR، به صورت  $10^8 \times 1/7$  تا  $10^2 \times 1/7$  نسخه دی‌ان‌ای، در واکنش پی‌سی‌آر در زمان واقعی استفاده و چرخه‌ی آستانه (cycle thresholds = Ct) برای هر کدام از رقت‌ها و سپس منحنی استاندارد و معادله‌ی آن به‌دست آمد. از آنجایی که ژن 16S rRNA در ژنوم اکثر فیتوپلازماها دارای دو نسخه است (Schneider & Seemüller 1994)، برای به دست آوردن تعداد ژنوم و غلظت سلول‌های فیتوپلازما جاروک لیموترش، تعداد نسخه‌های این ژن به عدد دو تقسیم شد.

در مورد ژنوتیپ RA در دو شرایط گرم و خنک مقایسه‌ی میانگین غلظت فیتوپلازما در دو زمان مختلف در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد ( $P < 0.01$ ) انجام شد.

### نتایج

#### علائم و دوره‌ی نهفتگی بیماری در گیاهان مایه‌زنی شده

در این تحقیق روند بروز علائم جاروک و تغییرات غلظت فیتوپلازما جاروک لیموترش در یک ژنوتیپ حساس (RA) و سه ژنوتیپ متحمل (TLCRO، TLC876، TLCR10 و پرشین لایم پس از مایه‌زنی با روش پیوند مطالعه شد. در شرایط گرم تا ۴۸ هفته بعد از مایه‌زنی، در هیچ یک از ژنوتیپ‌های TLCRO، TLC876 و TLCR10 علائم بیماری جاروک مشاهده نشد. نخستین علائم بیماری جاروک شامل ریزبرگی و رنگ‌پریدگی در ژنوتیپ RA در شرایط گرم حدود ۱۰ هفته بعد از مایه‌زنی ظاهر شد. بیست و پنج هفته بعد از مایه‌زنی علائم بارز بیماری شامل



شکل ۲. علائم ریزبرگی، کاهش فاصله میانگره‌ها و جاروک در پرشین لایم (ژنوتیپ RA) در شرایط دمایی گرم، ۸۰ (A)، ۱۲۰ (B) و ۲۰۰ (C) روز بعد از مایه زنی با فیتوپلاسمای جاروک لیموترش از طریق پیوند.

**Fig 2. Symptoms of little leaf, shortened internodes and witches' broom in Persian lime (genotype RA) under warm condition: 80 (A), 120 (B) and 200 (C) days after graft inoculation with lime witches' broom phytoplasma.**

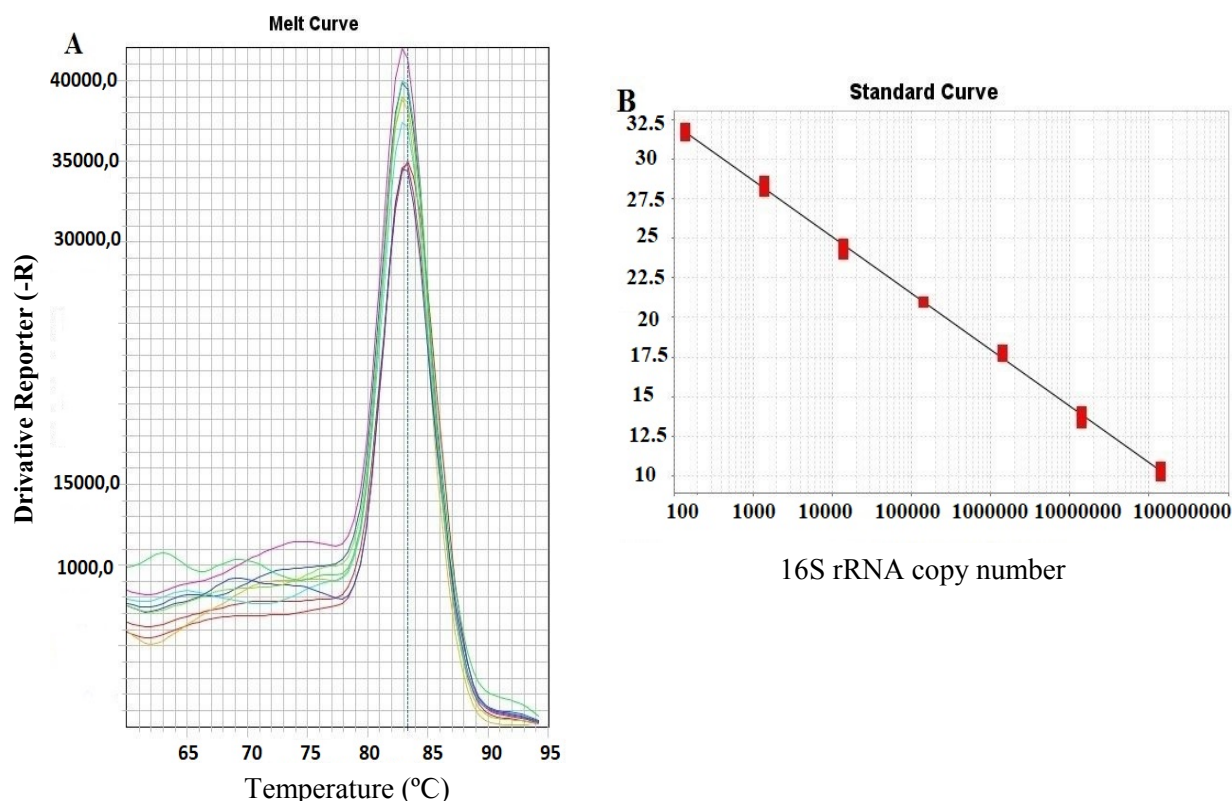
۴۸ هفته بعد از مایه‌زنی، غلظت فیتوپلاسمای افزایش زیادی را نشان نداد. حتی با وجود اینکه میانگین تعداد نسخه‌های ژنوم فیتوپلاسمای در ژنوتیپ TLC876، ۱۲ هفته (۳۳۰) نسخه در ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای) و ۲۴ هفته (۴۱۶) نسخه در ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای) نسبت به ژنوتیپ‌های TLCRO و TLC10 بیشتر بود ولی، ۴۸ هفته پس از مایه‌زنی به کمتر از ۲۰ نسخه (مانند TLCRO و TLC10) رسید و در واقع بعد از ۴۸ هفته غلظت فیتوپلاسمای دوباره کاهش یافت (جدول ۱).

در مورد ژنوتیپ RA، تغییرات غلظت فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در دو شرایط گرم و خنک بررسی شد و

در مرکبات مورد آزمایش، منحنی استاندارد براساس لگاریتم تعداد نسخه‌های ژن هدف و چرخه‌ی آستانه (Ct) به وسیله‌ی دستگاه ترسیم شد و یک نمودار خطی با ضریب همبستگی بالاتر از ۰/۹۸ به‌دست آمد (شکل ۳B). با توجه به دمای ذوب به‌دست آمده (۸۳ درجه‌ی سانتی-گراد) و هم‌پوشانی منحنی‌های ذوب، اختصاصیت واکنش تایید شد (شکل ۳A).

ارزیابی کمی فیتوپلاسمای در زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی

در ژنوتیپ‌های (TLCRO، TLC876 و TLCR10)،



شکل ۳. A، منحنی‌های ذوب به دست آمده برای هر واکنش پی‌سی‌آر در زمان واقعی؛ B، منحنی استاندارد به دست آمده از هفت رقت متوالی از محصول آغازگرهای WBDLR/F ( $10^2$  تا  $10^8$  نسخه از ژن هدف).

Fig. 3. A, Melt curves analysis obtained for each qPCR reaction; B, Standard curve generated from seven dilution series ( $1.7 \times 10^2$  to  $1.7 \times 10^8$ ) of PCR products of WBDLR/F primers.

نمونه‌برداری، اثر معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) بر غلظت فیتوپلازما در این ژنوتیپ داشتند. همچنین، اثر متقابل دما و زمان بر غلظت فیتوپلازما در این ژنوتیپ معنی‌دار بود (جدول ۲).

در ژنوتیپ RA در هر دو شرایط گرم و خنک غلظت فیتوپلازما با گذشت زمان افزایش یافت و در آخرین نمونه‌برداری (۴۸ هفته پس از مایه‌زنی) بیشترین غلظت فیتوپلازما مشاهده شد (جدول ۳). در این ژنوتیپ، ۱۲ و ۴۸ هفته پس از مایه‌زنی، میانگین غلظت فیتوپلازما در شرایط گرم در مقایسه با شرایط خنک به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) افزایش نشان داد؛ به‌طوری‌که پس از ۴۸ هفته، میانگین غلظت فیتوپلازما در شرایط گرم ( $10^6 \times 1/44$ )

جدول ۱. میانگین تعداد نسخه‌های ژنوم فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای گیاه ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ هفته بعد از مایه‌زنی در سه ژنوتیپ متحمل پرشین لایم.

Table 1. Mean number of lime witches' broom disease phytoplasma genomes per 100 ng DNA in three tolerant Persian lime genotypes, 12, 24, 36 and 48 weeks post- inoculation.

| Persian lime genotypes<br>ژنوتیپ‌های پرشین لایم | Weeks after inoculation<br>هفته بعد از مایه‌زنی |     |    |    |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----|----|----|
|                                                 | 12                                              | 24  | 36 | 48 |
| TLC10                                           | 30*                                             | 65  | 15 | 12 |
| TLC876                                          | 330                                             | 416 | 13 | 10 |
| TLCRO                                           | 4                                               | 4   | 27 | 17 |

\* تعداد نسخه‌های ژنوم در هر ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های پی‌سی‌آر در زمان واقعی نشان داد که هر کدام از فاکتورهای دما و زمان

جدول ۲. تجزیه واریانس داده‌های پی‌سی‌آر در زمان واقعی در رابطه با اثر دما و زمان نمونه‌برداری بر تعداد نسخه‌های ژنوم فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای گیاه

**Table 2. Analysis of variance of quantitative PCR data regarding the effect of temperature and sampling time on lime witches' broom disease phytoplasma copy numbers of the genome per 100 ng plant DNA.**

| منبع تغییر                    | درجه‌ی آزادی            | میانگین مربعات   |
|-------------------------------|-------------------------|------------------|
| Source of variation (S.V)     | Degree of freedom (D.F) | Mean square (MS) |
| دما Temperature               | 1                       | 29617.2**        |
| زمان Time                     | 1                       | 22347.2**        |
| دما × زمان Temperature × Time | 1                       | 21540.5**        |
| خطا Error                     | 16                      | 33.1             |
| Coefficient variation (C.V%)  |                         | 14.6             |

\*\* معنی دار در سطح احتمال (۰.۰۱٪)

جدول ۳. مقایسه‌ی میانگین ( $\pm$  خطای استاندارد) اثر انفرادی دما و زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل آن‌ها بر غلظت فیتوپلاسمای جاروک لیموترش (تعداد نسخه‌های فیتوپلاسمای عامل جاروک در ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای گیاه) ۱۲ و ۴۸ هفته بعد از مایه‌زنی پرشین لایم ژنوتیپ RA با عامل جاروک لیموترش

**Table 3. Mean comparison ( $\pm$  SEs) of the single effect of temperature and sampling time and their interaction on lime witches' broom phytoplasma (LWBP) concentration (copy numbers of genome per 100 ng of plant DNA) in Persian lime, genotype RA, 12 and 48 weeks- post inoculation with LWBP.**

| زمان                   | شرایط دمایی                  |                           |                              | F value | P value |
|------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------|---------|
| Time                   | Temperature conditions       |                           |                              |         |         |
| هفته بعد از مایه‌زنی   | گرم                          | خنک                       | میانگین زمان                 |         |         |
| Weeks post inoculation | Warm                         | Cool                      | Time Mean                    |         |         |
| 12                     | 115100 <sup>b</sup> ± 6896   | 1822 <sup>c</sup> ± 244   | 58460 <sup>B</sup> ± 19158   | 9.69    | 0.0067  |
| 48                     | 1440000 <sup>a</sup> ± 50990 | 14000 <sup>bc</sup> ± 661 | 727000 <sup>A</sup> ± 238879 | 1535.8  | <0.0001 |
| میانگین دما            | 777550 <sup>A</sup> ± 222145 | 7910 <sup>B</sup> ± 2057  |                              |         |         |
| Temperature mean       |                              |                           |                              |         |         |
| F value                | 1325.8                       | 0.11                      |                              |         |         |
| P value                | <0.0001                      | 0.7422                    |                              |         |         |

\* میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح ۱ درصد آزمون LSD اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

\* The means with at least one common letter are not significantly different at the 1% level of the LSD test.

مشاهده نشد.

## بحث

در این مطالعه، علائم بیماری و روند تکثیر و غلظت فیتوپلاسمای در چهار ژنوتیپ پرشین لایم شامل سه ژنوتیپ متحمل TLCR10، TLCRO، TLC876 (در شرایط گرم)

نسخه از ژنوم در ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای) در مقایسه با شرایط خنک ( $10^4 \times 1/4$  نسخه از ژنوم در ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای) در حدود ۱۰۰ برابر و به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) بیشتر بود. در شرایط خنک اگرچه غلظت فیتوپلاسمای ۴۸ هفته پس از مایه‌زنی نسبت به هفته‌ی دوازدهم افزایش یافت ولی اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها

و یک ژنوتیپ حساس RA (در دو شرایط گرم و خنک) نسبت به 'Ca. P. aurantifolia' با آزمون پی‌سی‌آر در زمان واقعی ارزیابی شد.

چهل و هشت هفته بعد از مایه‌زنی، میانگین غلظت فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در سه ژنوتیپ TLCRO، TLC876 و TLC10 بسیار اندک بود و علائمی از بیماری نیز در آن‌ها مشاهده نشد. به‌طور کلی، ۳۶ و ۴۸ ماه پس از مایه‌زنی با پیوند، غلظت فیتوپلاسمای در ژنوتیپ‌های متحمل پرشین‌لایم، از آستانه‌ی ردیابی با پی‌سی‌آر معمولی و آشیانه‌ای پایین‌تر بود ولی در آزمون پی‌سی‌آر در زمان واقعی نتیجه‌ی ردیابی‌ها در هر سه ژنوتیپ مثبت بود. اگرچه نتیجه‌ی ردیابی‌های فیتوپلاسمای با پی‌سی‌آر آشیانه‌ای تنها در ژنوتیپ TLC876، ۱۲ و ۲۴ هفته پس از مایه‌زنی مثبت بودند ولی پس از ۳۶ و ۴۸ هفته نتایج ردیابی‌ها با پی‌سی‌آر آشیانه‌ای در این ژنوتیپ مشابه دو ژنوتیپ دیگر منفی بودند. غلظت پایین و تکثیر اندک فیتوپلاسمای در ژنوتیپ‌های مذکور و عدم ظهور علائم بیماری نشان‌دهنده‌ی مقاومت این ژنوتیپ‌ها در برابر فیتوپلاسمای جاروک لیموترش است.

گزارش‌هایی مبنی بر رابطه‌ی بین غلظت فیتوپلاسمای و بروز علائم و شدت بیماری در گیاه وجود دارد (Bertaccini & Duduk 2009; Salar et al. 2013) که به نظر می‌رسد عدم بروز علائم در این سه ژنوتیپ از پرشین‌لایم در شرایط کنترل‌شده، محدود شدن تکثیر فیتوپلاسمای در طول زمان باشد. این محدود شدن ممکن است به دلیل وجود مواد ضد میکروبی موجود در پرشین‌لایم یا دیگر عواملی باشد که باعث فعال شدن سازوکارهای دفاعی گیاه می‌شوند. گیاهان در تماس دائمی با گونه‌های مختلفی از بیمارگرها قرار دارند که برای محدودسازی این عوامل بیماری‌زا باید به سرعت سازوکارهای دفاعی خود

را فعال نمایند. این سازوکارها شامل دفاع‌های ساختمانی یا بیوشیمیایی از پیش موجود است که از حمله و گسترش آنها جلوگیری می‌کند یا دفاع‌های ساختمانی و بیوشیمیایی القایی پس از حمله و نفوذ آنهاست (Dickinson 2004). پژوهش‌های جدید نشان داده‌اند که ژن‌های HSP70، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی مانند PR10 و TLP، پروتئین‌های مرتبط با کیناز و همچنین تولید پروتئین‌های نو ترکیب مانند سرکوپین (DU et al. 2005) در مقاومت گیاهان به فیتوپلاسمای نقش دارند (Liu et al. 2014).

میانگین غلظت فیتوپلاسمای در ژنوتیپ RA در شرایط دمایی گرم بیشتر از غلظت آن در شرایط خنک بود، به‌طوری‌که فیتوپلاسمای عامل بیماری ۱۲ هفته پس از مایه‌زنی در شرایط گرم حتی با پی‌سی‌آر مستقیم قابل ردیابی بود؛ در حالیکه در شرایط خنک، ۱۲ هفته پس از مایه‌زنی، فیتوپلاسمای جاروک تنها با روش پی‌سی‌آر آشیانه‌ای قابل ردیابی بوده و فقط ۴۸ هفته بعد از مایه‌زنی، فیتوپلاسمای بیماری با پی‌سی‌آر معمولی در همه‌ی نهال‌های ژنوتیپ RA قابل ردیابی شدند. با وجود این، علائم بیماری جاروک در این ژنوتیپ فقط در شرایط گرم مشاهده شد.

عوامل محیطی در برهمکنش بین گیاه و بیمارگر موثر هستند و می‌توانند بر بیماری‌زایی و همچنین مقاومت گیاهی تاثیرگذار باشند (Colhoun 1973, Ghini et al. 2008). در این بین، دما یکی از عواملی است که در توزیع بیمارگرها در گیاهان و توسعه علائم بیماری نقش مهمی را ایفا می‌کند (Wang et al. 2009). برای مثال، براساس مطالعات انجام شده دما یکی از عوامل تاثیرگذار در بروز علائم بیمارگرهای ویروسی در میزبان‌های گیاهی آلوده می‌باشد (Obrepalska-Stepłowska et al. 2015, Singh et al. 2018). در ارتباط با تاثیر دما بر روند بروز علائم باکتری‌های محدود به آوند آبکشی در گیاهان نیز مطالعاتی

انجام شده است؛ برای مثال، گزارش شده است که ظهور علائم ایجادشده توسط باکتری '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' در دمای پایین تر از ۱۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با کندی صورت می‌گیرد، در حالی که در دمای بالاتر از ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ظهور علائم متوقف می‌شود (Munyaneza et al. 2012). همچنین، گزارش‌های متفاوتی در ارتباط با تاثیر دما در روند بروز علائم بیماری در گیاهان آلوده به فیتوپلاسم‌ها وجود دارد. در پژوهشی که در ارتباط با بیماری فیتوپلاسمایی زردی انگور انجام شده (Salar et al. 2013)، مشخص شده است که علائم بیماری در تاک‌های مایه‌زنی‌شده در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در مقایسه با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با یک هفته تاخیر ظاهر شده است. از طرف دیگر، گزارش شده است که دمای خنک می‌تواند تکثیر '*Candidatus Phytoplasma mali*' را در میزبان کاهش دهد (Baric et al. 2011).

نتایج مطالعه‌ی حاضر در مورد تاثیر دما بر غلظت فیتوپلاسم در ژنوتیپ RA نشان داد که در شرایط گرم، غلظت فیتوپلاسم، ۱۲ و ۴۸ هفته پس از مایه‌زنی به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از غلظت آن در شرایط خنک بود و اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) در شرایط گرم نسبت به شرایط خنک مشاهده شد. یکی از دلایلی که می‌تواند در ایجاد علائم بیماری در ژنوتیپ‌های مایه‌زنی‌شده در شرایط گرم موثر باشد غلظت بیشتر فیتوپلاسم نسبت به شرایط خنک است. براساس مطالعات صورت گرفته، غلظت فیتوپلاسمی همراه با جاروک لیموترش در درختان لیموترش آلوده در تابستان بیشتر از غلظت آن در پاییز است (Amiri et al. 2019). با وجود این، واکنش گیاه که وابسته به فعالیت‌های فیزیولوژیکی و رویدادهای بیوشیمیایی در آن است نیز در دو شرایط دمایی مختلف

می‌تواند متفاوت باشد و در مجموع برآیند تاثیر دما روی بیمارگر و روی میزبان و در نهایت برهمکنش آن‌ها منجر به ظهور یا عدم ظهور علائم در گیاه می‌شود. نتایج این تحقیق نشان دادند که بالا رفتن دما ممکن است میزان حساسیت برخی ژنوتیپ‌های پرشین لایم را به فیتوپلاسمای بیماری جاروک لیموترش افزایش دهد و به ظهور و پیشرفت علائم بیماری در آن‌ها منجر شود.

در مطالعات پیشین، پرشین لایم به عنوان یک گیاه متحمل به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در شرایط گلخانه گزارش شده است (Salehi et al. 2005)، در حالی که در این مطالعه، در ژنوتیپ‌های RA که در شرایط نسبتاً گرم مایه‌زنی‌شده بودند، علائم ریزبرگی و کاهش فاصله‌ی میانگره‌ها، ۱۰ هفته بعد از مایه‌زنی، ظاهر شد (شکل ۲). از آنجایی که الگوهای متفاوت ژنتیکی در میان گیاهان یکی از عوامل موثر در بروز علائم بیماری است (Bita & Gerats 2013) نمی‌توان تمامی ژنوتیپ‌های پرشین لایم را نسبت به '*Ca. P. aurantifolia*' متحمل یا مقاوم دانست. براساس مطالعات انجام‌شده در جنوب ایران، چندین ژنوتیپ از پرشین لایم شناسایی شده که از نظر خصوصیات مورفولوژیکی و همچنین مولکولی با هم متفاوت می‌باشند که این تنوع ژنتیکی می‌تواند در واکنش هر ژنوتیپ به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش نیز تاثیرگذار باشد (Hassanzadeh Khankahdani et al. 2017). در بین بیماری‌های مرکبات، جاروک لیموترش یکی از مهمترین خسارت‌زا ترین بیماری‌ها می‌باشد و یک تهدید جدی برای صنعت مرکبات کشور است. با توجه به تمرکز تولید لیموترش در مناطق جنوبی کشور و نیز گسترش بیماری جاروک لیموترش در سال‌های اخیر، بررسی سازگاری پرشین لایم که تحمل بالایی به این بیماری دارد از اهمیت زیادی برخوردار است.

فیتوپلازما در سال دوم و سوم بعد از مایه‌زنی در ژنوتیپ‌های پرشین لایم و به‌خصوص ژنوتیپ RA در شرایط خنک (که برخلاف افزایش غلظت فیتوپلازما علائم بیماری مشاهده نشد) می‌تواند اهمیت زیادی داشته باشد و ارزیابی غلظت فیتوپلازما علاوه بر اندام‌های هوایی در ریشه‌ها نیز باید انجام شود. همچنین، برای پی‌بردن به سازوکارهای دفاعی ژنوتیپ‌های مقاوم یا متحمل مرکبات به فیتوپلازمای جاروک لیموترش نیاز به انجام پژوهش‌های جدیدی در ارتباط با ترکیبات از پیش موجود یا ژن‌های دخیل در مقاومت این گیاهان می‌باشد.

در مجموع، ژنوتیپ‌های پرشین لایم مورد مطالعه شامل TLC10، TLC876 و TLCRO، که از باغ‌های آلوده به جاروک لیموترش در جنوب ایران جمع‌آوری شده بودند، با توجه به عدم بروز علائم بیماری و غلظت بسیار پایین فیتوپلازما در آزمایش‌های انجام گرفته، به‌عنوان ارقام با درجه‌ی تحمل بالا نسبت به بیماری جاروک لیموترش در نظر گرفته می‌شوند که می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی و یا پس از تعیین خصوصیات باغبانی به‌عنوان یک رقم تجاری و متحمل به بیماری به‌خصوص در مناطق آلوده به این بیماری استفاده کرد.

در پژوهش‌های آتی در مورد روند تغییرات غلظت

## منابع

- Al-Yahyai R., Khan I., Al-Said F., Al-Sadi A., Al-Wahaibi A. and Deadman M. 2010. Status of *Citrus aurantifolia* infected with witches'broom disease of lime in Oman. *Acta Horticulture* 928: 375-81.
- Amiri Mazraie M., Izadpanah K., Hamzehzarghani H., Salehi M. and Faghihi M. M. 2019. Spread and colonization pattern of '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' in lime plants [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] as revealed by real-time PCR assay. *Journal of Plant Pathology* 101:629-637.
- Bagheri A., Salehi M., Faghihi M.M., Samavi S. and Sadeghi A. 2009. Transmission of *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* to Mexican lime by the leafhopper *Hishimonus phycitis* in Iran. *Journal of Plant Pathology* 91: S4 105.
- Baric S., Berger J., Cainelli C., Kerschbamer C., Letschka T. and Dalla Via J. 2011. Seasonal colonisation of apple trees by '*Candidatus Phytoplasma mali*' revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. *European journal of Plant Pathology* 129: 455-67.
- Bertaccini A. and Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 355-78.
- Bitá C. and Gerats T. 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science* 4, 273.
- Bové J. 1986. Outbreaks and new records. Oman. Witches' broom disease of lime. *FAO Plant Protection Bulletin* 34: 217-8
- Bové J. M., Danet J. L., Bananej K., Hassanzadeh N., Salehi M. and Garnier M. 2000. Witches' broom disease of lime (WBDL) in Iran. Fourteenth IOCV Conference, Insect-Transmitted Procaryotes, pp 207-212
- Colhoun J. 1973. Effects of environmental factors on plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 11:343-64.
- Dickinson M. 2004. *Molecular plant pathology*. Garland Science.
- Du T., Wang Y., Hu Q. X., Chen J., Liu S., Huang W. J. and Lin M. L. 2005. Transgenic *Paulownia* expressing shiva-1 gene has increased resistance to paulownia witches' broom disease. *Journal of Integrative Plant Biology* 47: 1500-6.
- Garnier M., Zreik L. and Bové J. M. 1991. Witches' broom, a lethal mycoplasmal disease of lime trees in the Sultanate of Oman and the United Arab Emirates. *Plant Disease* 75:546-551.
- Ghini R., Hamada E. and Bettiol W. 2008. Climate change and plant diseases. *Scientia Agricola* 65. 98-107.
- Gundersen D. E. and Lee I. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assay using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterranea* 35:144-151

- Hassanzadeh Khankahdani H., Rastegar S., Golein B., Golmohammadi M. and Aboutalebi Jahromi A. 2017. Genetic diversity in Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) accessions using morphological and molecular markers. *Agriculture and Forestry* 63: 221-231.
- Hassanzadeh Khankahdani H., Bahrami H. R., Faghihi M. M. and Bagheri A. 2019. Reaction of some commercial citrus species and Iranian lime biotypes to witches' broom disease of lime. *Crop Protection* 122: 23-9.
- Lee M., Martini M., Marcone C. and Zhu S. F. 2004. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:337-347.
- Liu Z., Wang Y., Xiao J., Zhao J. and Liu M. 2014. Identification of genes associated with phytoplasma resistance through suppressive subtraction hybridization in Chinese jujube. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 86: 43-8.
- Munyaneza J. E., Sengoda, V. G., Buchman, J. L. and Fisher, T. W. 2012. Effects of temperature on '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Disease* 96, 18-23.
- Murray M. G. and Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research* 8: 4321-6.
- Obrepalska-Stepłowska A., Renaut J., Planchon S., Przybylska A., Wiczorek P., Barylski J. and Palukaitis P. 2015. Effect of temperature on the pathogenesis, accumulation of viral and satellite RNAs and on plant proteome in peanut stunt virus and satellite RNA-infected plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 903.
- Rezazadeh N., Asadi Abkenar A. and Rouhibakhsh A. 2019. Reaction assessment of a number of citrus hybrids to '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*'. *Iranian Journal of Plant Pathology* 54: 173-83.
- Salar P., Charenton C., Foissac X. and Malembic-Maher S. 2013. Multiplication kinetics of Flavescence dorée phytoplasma in broad bean. Effect of phytoplasma strain and temperature. *European journal of Plant Pathology* 135: 371-81.
- Salehi Abarghouei E., Izadpanah K., Taghavi S. M., Hamzezarghani H. and Afsharifar A. 2018. Interaction of witches' broom disease of lime phytoplasma and lettuce phyllody phytoplasma in mixed infection of periwinkle plants. *Iranian Journal of Plant Pathology* 2: 131-46.
- Salehi M., Izadpanah K., Siampour M., Bagheri A. and Faghihi S. M. 2007. Transmission of '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' to Bakraee (*Citrus reticulata* hybrid) by feral *Hishimonus phycitis* leafhoppers in Iran. *Plant Disease* 91: 466.
- Salehi M., Nejat N., Tavakkoli A. R. and Izadpanah K. 2005. Reaction of citrus cultivars to *Candidatus phytoplasma aurantifolia* in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41: 363-73.
- Schneider B. and Seemüller E. 1994. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Applied Environmental Microbiology* 60: 3409-12.
- Singh A., Permar V., Basavaraj B. S. T. and Praveen S. 2018. Effect of temperature on symptoms expression and viral rna accumulation in groundnut bud necrosis virus infected vigna unguiculata. *Iranian Journal of Biotechnology* 16: 227-234.
- Wang Y., Bao Z., Zhu Y. and Hua J. 2009. Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:498-506.
- Zreik L., Carle P., Bov J. M. and Garnier M. 1995. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches' broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* Taxon for the Organism, '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45: 449-453.