

سبب‌شناسی بیماری زوال درختان مرکبات با پایه بکرای در جنوب استان کرمان

مهدی آزادوار^۱، حمیدرضا علیزاده^{۲*}، محمدرضا صفرنژاد^۳، موسی نجفی‌نیا^۱ و پیرو آتلیو برانکو^۴

۱. استادیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان، سازمان تحقیقات

آموزش و ترویج کشاورزی، جیرفت، ایران

۲. استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران

۳. دانشیار، بخش تحقیقات ویروس‌شناسی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

۴. استاد، بخش علوم کشاورزی و محیطی، دانشگاه میلان، میلان، ایتالیا

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۲)

چکیده

عارضه نوظهور زوال سریع در سال‌های اخیر سبب مرگ تعداد زیادی از درختان مرکبات با پایه بکرای در جنوب استان کرمان شده است. علائم این بیماری به صورت پژمردگی برگ‌ها، پوسیدگی ریشه‌ها و مرگ سریع درختان مشاهده می‌شود. این پژوهش با هدف شناسایی عوامل بیماری مذکور انجام شد. حضور پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی و هم‌چنین با استفاده از سامانه MISEQ بررسی شد. ردیابی ویروس‌ها و ویروئیدها با استفاده از آزمون‌های ELISA، RT-PCR و مایه‌زنی به گیاهان محک و هم‌چنین جداسازی dsRNA از نمونه‌های گیاهی انجام شد. همراهی نماتد *Tylenchulus semipenetrans* و شبه قارچ *Phytophthora nicotiana* با جداسازی و ارزیابی جمعیت این بیمارگرها در ریشه و ریزوسفر درختان بیمار و مقایسه آن با درختان بدون علائم بررسی شد. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان‌دهنده همراهی *Candidatus Liberibacter asiaticus* با بیماری زوال سریع درختان مرکبات با پایه بکرای در جنوب استان کرمان است. به علاوه وجود تنش‌های خشکی و دمایی و آلودگی هم‌زمان درختان بیمار به *Ca. Phytoplasma aurantifolia*، شبه قارچ *Phytophthora nicotiana* و نماتد *Tylenchulus semipenetrans* می‌تواند منجر به تشدید بیماری و تسریع در زوال درختان شود.

واژه‌های کلیدی: بکرای، پوسیدگی ریشه، فیتوپلاسما، لیبری باکتر.

Etiology of quick decline disease of citrus on Bakraee (*Citrus* sp.) rootstock in southern Kerman

Mehdi Azadvar¹, Hamidreza Alizadeh^{2*}, Mohamad Reza Safarnejad³, Mousa Najafiny¹ and Pero Atellio Bianco⁴

1. Assistant Professor, Plant Protection Department, South Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Jiroft, Iran

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Kerman, Iran

3. Associate Professor, Department of Plant Viruses, Iranian Research Institute of Plant Protection, AREEO, Tehran, Iran

4. Professor, University of Milan, Department of Agricultural and Environmental Sciences, Milan, Italy

(Received: Aug. 25, 2018 - Accepted: Mar. 13, 2019)

ABSTRACT

The emerged citrus quick decline disease has destroyed many of citrus plants grafted onto Bakraee rootstock in southern Kerman during recent years. Disease symptoms are included leaf wilting, root rot, and quick decline. In this project, the etiology of quick decline disease was studied. Symptomatic and asymptomatic plants were tested for the presence of plant pathogenic prokaryotes using PCR with universal and specific primers, and MISEQ Illumina method. Furthermore, ELISA, RT-PCR, inoculation on index plants, and dsRNA extraction were used for detection of viruses and viroids in symptomatic and asymptomatic plants. The correlation between the presence of *Tylenchulus semipenetrans*, *Phytophthora nicotiana*, and quick decline disease was investigated by isolation and quantification of pathogens from root and rhizosphere of asymptomatic and infected plants. Overall, results indicated the association of *Candidatus Liberibacter asiaticus* with citrus (on Bakraee rootstock) quick decline disease in southern Kerman. In addition, drought and heat stresses and co-infection of the diseased plants by *Ca. Phytoplasma aurantifolia*, *Phytophthora nicotiana*, and *Tylenchulus semipenetrans* lead to severe symptoms of the disease and accelerated the decline of the infected plants.

Keywords: Bakraee, greening, liberibacter, phytoplasma, root rot.

* Corresponding author E-mail: hamid6948@gmail.com

مقدمه

جنوب استان کرمان با بیش از ۳۲۰۰۰ هکتار سطح زیر کشت مرکبات و دارا بودن جایگاه سوم تولید این محصول در ایران، سهم مهمی در تأمین مرکبات کشور به خود اختصاص داده است (Ebadzadeh *et al.*, 2017). تولید مرکبات در سال‌های اخیر با مشکلات بسیاری از جمله بیماری‌های گیاهی مواجه بوده است. بیماری‌های شانکر باکتریایی، جاروک، میوه‌سبز (huanglongbing) و در سال‌های اخیر عارضه زوال مرکبات، تولید مرکبات را در نواحی جنوبی ایران و به‌طور خاص جنوب استان کرمان به چالش کشیده‌اند (Najafinia & Azadvar, 2016). بیماری‌های متعددی با علائم ظاهری زوال و ناشی از عوامل زنده و غیرزنده، مرتبط با درختان مرکبات از کشورهای مختلف دنیا گزارش شده‌اند (Seriwastava & Singh, 2009). از جمله عواملی که سبب زوال ناگهانی درختان مرکبات در دنیا شده‌اند می‌توان به بیمارگرهای سویه زوال سریع ویروس تریستزای مرکبات (Tristeza quick decline) متعلق به جنس *Clostruvirus* (Maccheroni *et al.*, 2005)، ویروس عامل بیماری مرگ ناگهانی مرکبات (Citrus sudden death) از جنس *Marafivirus* (Maccheroni *et al.*, 2005)، گونه‌های *Phytophthora* (Ippolito *et al.*, 1990; Safdar *et al.*, 2010) و قارچ‌های *Fusarium semitectum* و *F. solani* (Safdar *et al.*, 2010)، سویه جدیدی از فیتوپلاسمی گروه 16SrII (Alhudaib *et al.*, 2009)، نماد ریشه مرکبات (Safdar *et al.*, 2010) و همچنین عوامل غیرزنده از جمله تنش دمایی و آبیاری بیش‌ازحد اشاره نمود (Meena *et al.*, 2018). پراکنش جغرافیایی و میزان خسارت بیماری‌های ناشی از این عوامل در کشورهای مختلف متفاوت بوده و به میزان زیادی متأثر از رقم و به‌ویژه پایه مورد استفاده است.

در سال‌های اخیر، عارضه ناشناخته و نوظهور زوال سریع به تهدیدی برای مرکبات جنوب استان کرمان تبدیل شده است. این بیماری که زوال جیرفتی مرکبات نامیده می‌شود، اولین بار در سال ۱۳۸۹ در جنوب استان کرمان مشاهده شد و هر ساله موجب مرگ تعداد زیادی از درختان مرکبات در این منطقه می‌شود و خسارت اقتصادی چشمگیری را به باغداران وارد می‌نماید

(Najafinia & Azadvar, 2016). مرگ سریع (طی یک تا دو هفته) درختان مرکبات متمرکز با پایه بکرایی در فصل تابستان، از ویژگی‌های متمایزکننده این بیماری از سایر بیماری‌های دارای علائم زوال است. پژوهش حاضر با هدف سبب‌شناسی این بیماری انجام شد.

مواد و روش‌ها

تعیین پراکنش بیماری و جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی
طی ماه‌های مختلف و در فاصله سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۶ بازدیدهای دوره‌ای از باغ‌های مرکبات نواحی دشت و کوهپایه‌ای جنوب استان کرمان انجام و اطلاعات مربوط به رقم و مکان دقیق یادداشت‌برداری شد. در هر آزمایش، از برگ و ریشه درختان پرتقال دارای علائم زوال و همچنین درختان فاقد علائم با الگوی تصادفی در جنوب استان کرمان نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در کلمن روی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در ردیابی پروکاریوت‌ها، شستشو و ضدعفونی نمونه‌ها مطابق روش Mori *et al.* (2014) انجام شد.

استخراج اسیدنوکلیئیک (dsRNA, RNA, DNA) از نمونه‌های گیاهی

استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی به روش Zhang *et al.* (1998) انجام شد. استخراج RNA با استفاده از Lithium Chloride و یا SDS/Potassium acetate انجام شد (Pallas *et al.*, 1998). جداسازی dsRNA از پوست ساقه و برگ هر گیاه بر مبنای روش پیشنهادی توسط Valverde (1990) و با استفاده از ستون کروماتوگرافی متشکل از پودر سلولز CF-11 اشباع‌شده با بافر STE (۱۰۰ میلی‌مولار تریس، ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۲ میلی‌مولار EDTA) حاوی ۱۶ درصد اتانول انجام شد. از برگ گیاه آلوده به ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus*) به‌عنوان کنترل مثبت جهت استخراج dsRNA استفاده شد.

ردیابی پروکاریوت‌های آوندی بیماری‌زای گیاهی
ردیابی فیتوپلاسم در بیش از ۲۵ نمونه گیاهی، با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دومرحله‌ای و استفاده از جفت

RNA با کیت RNeasy Plant Mini Kit (شرکت کپازن) انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از Random hexamer و آنزیم ترانویسی معکوس M-MuLV Reverse Transcriptase (شرکت سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل مربوطه انجام شد. سپس cDNA سنتز شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) تکثیر گردید. جهت مشاهده قطعه‌های تکثیر شده از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. همچنین از روش مایه‌زنی روی گیاهان محک شامل سلمه قرمز (*Chenopodium amaranticolor*)، داتوره متل (*Datura metel*)، داتوره استرامونیوم (*D. stramonium*)، توتون وایت‌بارلی (*Nicotiana tabacum* cv. white burley)، توتون رقم سامسون (*Nicotiana tabacum* cv. Sumsun)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) و گل‌تکمه‌ای (*Gompherena globosa*) استفاده شد.

برای بررسی آلودگی نمونه‌ها به ویروس تریستزا از آزمون ELISA با استفاده از کیت تجاری شرکت بیورا سوئیس طبق روش پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده استفاده گردید. نمونه‌هایی که میزان جذب آن‌ها بیش از ۳ برابر نمونه کنترل منفی بود به‌عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته شدند.

ردیابی و تعیین جمعیت شبه قارچ *Phytophthora* و نماتد ریشه‌ مرکبات

توده خاک اطراف ریشه با احتیاط جدا و جمعیت *Phytophthora* در باقی‌مانده خاک چسبیده به ریشه با استفاده از روش سری رقت (Graham, 1995) تعیین شد. تعداد کلنی *Phytophthora* در یک گرم خاک با استفاده از محیط انتخابی PARPH تعیین شد (Graham et al., 2011). جداسازی نماتد از نمونه ۲۰۰ گرمی خاک با روش سینی (Whitehead & Hemming, 1965) با ۴۸ تا ۷۲ ساعت نگهداری در دمای اتاق انجام شد. شمارش جمعیت نماتد لارو سن دوم با استفاده از استریومیکروسکوپ با بزرگنمایی ۵۰X انجام و متوسط جمعیت نماتد در یک کیلوگرم خاک خشک محاسبه شد. جمعیت نماتد بالغ در ریشه به‌روش Tanha Maafi & Damadzdeh (2008) تعیین شد.

آغازگرهای عمومی فیتوپلازما P1/P7 در مرحله اول و R16F2n/R16R2 در مرحله دوم (جدول ۱) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با کاربرد آغازگرهای اختصاصی OI1/OI2c و A2/J5 (جدول ۱) برای ردیابی باکتری‌های *Candidatus Liberibacter* spp. در نمونه‌های گیاهی استفاده شد. ردیابی اسپروپلاسمای عامل بیماری استابورن با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از جفت آغازگر p89-f/p89-r انجام گرفت. برای ردیابی باکتری *Xylella fastidiosa* عامل بیماری سبزدی ابلقی، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آغازگرهای اختصاصی X1for/X1rev استفاده شد (جدول ۱).

ردیابی و تعیین توالی *Ca. Liberibacter* و *Ca. Phytoplasma* با استفاده از MiSeq

به‌منظور تأیید همراهی *Ca. Liberibacter* و *Ca. Phytoplasma* در ریشه و برگ درختان دارای و فاقد علائم زوال، ۲۰ میکرولیتر DNA استخراجی از اندام‌های گیاهی با غلظت ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر برای توالی‌یابی ناحیه V1-V3 از ژن *16S rRNA* با استفاده از دستگاه توالی‌یاب MiSeq 1000 شرکت ایلومینا (Illumina) به کشور ایتالیا (Personal Genomics, Italy) ارسال شد. این ناحیه ژنی با آغازگرهای پیشرو 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' و معکوس 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' تکثیر گردید (Muyzer et al., 1993). در این بررسی ۱۸ نمونه از ریشه و برگ درختان مرکبات (۹ نمونه ریشه و ۹ نمونه برگ) در دو گروه درختان فاقد علائم و درختان دارای علائم زوال انتخاب شدند. آنالیز توالی‌های به‌دست‌آمده برای ردیابی *Ca. Liberibacter* و *Ca. Phytoplasma* به روش Akinsanya et al. (2015) انجام شد.

بررسی همراهی ویروس‌ها و ویروئیدها در نمونه‌های گیاهی

همراهی ویروس‌های تریستزا، پسروروز، *Citrus sudden death* و ویروئیدهای کاجکسیا و اگزوکورتیس با روش‌های مولکولی (RT-PCR) و سرولوژیکی (ELISA) بررسی شد. برای این منظور ابتدا استخراج

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی پروکاریوت‌ها، ویروس‌ها و ویروئیدهای بیماری‌زای مرکبات

Table 2. Primers used for detection of citrus pathogenic prokaryotes, viruses, and viroids

Primer set	Target	Sequence (5' to 3')	Reference
P1/P7	<i>Ca. Phytoplasma</i>	AAGAATTTGATCCTGGCTCAGGATT/ CGTCCTTCATCGGCTCTT	Schneider <i>et al.</i> , 1995
R16F2n/R16R2	<i>Ca. Phytoplasma</i>	GAAACGACTGCTAAGACTGG/ TGACGGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	Gundersen & Lee, 1996
O11/OI2C	<i>Ca. Liberibacteri asiaticus</i>	GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA/ GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT	Jagoueix <i>et al.</i> , 1996
A2/J5	<i>Ca. Liberibacteri asiaticus</i>	TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTT/ ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA	Hocquellet <i>et al.</i> , 1999
P89-f/ P89-r	<i>Spiroplasma citri</i>	ATTGACTCAACAAACGGGATAA/ CGGCGTTTGTAAATTTTGGTA	Yokomi <i>et al.</i> , 2008
X1for/X1rev	<i>Xylella fastidiosa</i>	GGTGCACGCCAAATCGAATG/ GTATCGTTGTGGCGTACACTG	Yuan <i>et al.</i> , 2010
CTV-F/ CTV-R	Cirus tristeza virus	AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA/ TCAACGTGTGTGAATTTCCCAAGC	Izadpanah <i>et al.</i> , 2002
TYMOF2/ TYMORR	Citrus sudden death-associated virus	GTCAGCTGTCCAACCAAGTTCC/ GTGAAGATCAATGAGAGCCTG	Maccheroni <i>et al.</i> , 2005
C ^h -CCaVd/ H ^h -CCaVd	Cachexia	TTGCCCGGGGCTCCTTTCTC/ CTCTTCTCAGAATCCAGCGA	Francis <i>et al.</i> , 1995, Levy & Hadidi, 1993
CEV-f/ CEV-r	Exocortis	GGTGGAAACAACCTGAAGCTT/ GGGTAGTCTCCAGAGAGAAG	Palacio & Duran-Vila 1999
CPV1/ CPV2	Psorosis	GCTTCTGGAAAAGCTGATG/ TCTGTTTTTGTCAACACACTCC	Barthe <i>et al.</i> , 1998
HSVd-RT HSVd-F1/ HSVd-R1 CEVd-RT CEVd-F1/ CEVd-R1 CVd-III-RT CVd-III-F1/ CVd-III-R1 CBLVd-RT CBLVd-F1/ CBLVd-R1	Viroides	GTGTTGCCCGGGGCTCCTTTCTCTGG GGGGCAACTCTTCTCAGAATCC/ GGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGTC CTTCTCCAGGTTTCCCCGGGGATCCC GGAAACCTGGAGGAAGTCG/ CCGGGGATCCCTGAAGGA CCAACCTAGCTGCCTTCGTCGACGACG GGCAGCTAAGTTGGTGACGC/ TTCGTCGACGACGACAGGTA GCTGACGAGCCTTCGTCGACGACGACC GGCTCGTCAGCTGCGGAGGT/ TTCGTCGACGACGACGACGTC	Banihashemian <i>et al.</i> , 2009

مشاهده نمی‌شود. در درختان مبتلا به این بیماری، علائم بارز پوسیدگی ریشه دیده می‌شود و میزان ریشه در درختان بیمار در مقایسه با درختان فاقد علائم، کمتر است.



شکل ۱. علائم ظاهری بیماری زوال سریع مرکبات در جنوب استان کرمان. (a) درخت پرتقال بدون علائم؛ (b) علائم اولیه زوال؛ (c) علائم اولیه زوال در کنار درخت فاقد علائم؛ (d)

علائم شدید و مرگ ناشی از بیماری زوال

Figure 1. Symptoms of citrus quick decline disease in southern Kerman. (a) asymptomatic sweet orange; (b) early decline symptoms; (c) early decline symptoms vs. an asymptomatic tree on the left; (d) severe decline symptoms

نتایج و بحث

علائم و پراکنش بیماری

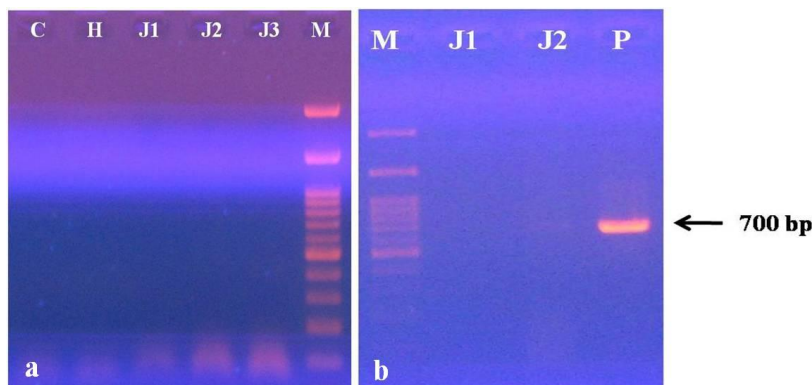
علائم بیماری زوال در ابتدا به صورت رنگ‌پریدگی برگ‌ها، عدم تولید جوانه جدید و توقف محسوس رشد در فصل جوانه‌زنی، لوله‌ای شدن برگ‌ها (مشابه علائم کمبود آب) و در نهایت مرگ کامل درخت به صورت سبز خشک (بدون ریزش برگ و میوه) مشاهده می‌شود (شکل ۱). بروز علائم این بیماری از اواسط اردیبهشت‌ماه شروع و در فصل تابستان شدت یافته و در پاییز و زمستان تقریباً متوقف و یا بسیار کند می‌شود.

این بیماری در شهرستان‌های جیرفت (نراب، رمون، دلفارد، زارین، جبالبارز شمالی، خضراآباد) و عنبرآباد (جبالبارز جنوبی) در جنوب استان کرمان گسترش دارد. بیماری زوال مرکبات در مناطق کوهپایه‌ای پراکنش بیشتری داشته و در باغ‌ها به صورت لکه‌ای گسترش پیدا می‌کند. علائم بیماری در ارقام پرتقال، نارنگی و گریپ‌فروت که روی پایه بکرایی پیوند شده بودند مشاهده می‌شود. بکرایی از ارقام بومی مرکبات است که دارای ریشه‌های سطحی بوده و در مناطق کوهپایه‌ای که از خاک عمقی کمتری برخوردار هستند استفاده می‌شود (Golein *et al.*, 2012). این بیماری در نهالستان‌ها

ردیابی پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی

در بررسی‌های انجام‌شده با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مشخص شد که هیچ‌یک از نمونه‌ها به باکتری عامل بیماری سبزدی ابلقی (*Xylella fastidiosa*) و اسپروپلاسمای عامل بیماری استابورن (*Spiroplasma citri*) آلوده نیستند (شکل ۲). باکتری عامل بیماری میوه سبز (*Ca. Liberibacter spp.*) در ریشه پنچ درخت از شش درخت دارای علائم زوال ردیابی شد، درحالی‌که در ریشه درختان بدون علائم و همچنین برگ هیچ‌کدام از درختان (دارای یا فاقد علائم زوال) وجود نداشت. بیمارگر *Ca. Phytoplasma* در برخی نمونه‌های برگ و ریشه مربوط به درختان دارای علائم زوال ردیابی شد (جدول ۲).

علائم پوسیدگی ریشه و پژمردگی درختان، زردی برگ‌ها، بدشکلی و ریزش میوه‌ها، سرخشکیدگی شاخه‌ها و ظاهر کثیف ریشه‌ها در بیماری ویروسی *Citrus sudden death* نیز گزارش شده است (Spina *et al.*, 2008; Bassanezi *et al.*, 2003; Safdar *et al.*, 2010). زوال ناشی از ویروس تریستزا که در برخی از کشورها مشاهده می‌شود با علائم دیگری از جمله *Stem pitting* همراه است درحالی‌که در درختان مرکبات مبتلا به زوال در جنوب کرمان این علائم مشاهده نمی‌شود. بر اساس اطلاعات موجود، گزارش رسمی از بیماری تریستزا در این منطقه وجود ندارد.



شکل ۲. ژل آگارز حاصل از الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نمونه‌های مرکبات: (a) با استفاده از جفت آغازگر X1 for/X1rev (b) با استفاده از جفت آغازگر P89-f/P89-r. C: شاهد منفی بدون DNA، H: مرکبات سالم، P: شاهد مثبت، J1-J3: نمونه‌های درختان دارای علائم زوال، M: DNA سایز مارکر (100 bp)

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained from citrus trees: a) using P89-f/P89-r primer pair, b) using X1 for/X1rev primer pair. C: Negative control, H: healthy citrus tree, P: positive control, J1-J3: citrus decline symptomatic trees, M: 100 bp DNA size marker

جدول ۲. ردیابی *Ca. Phytoplasma* و *Ca. Liberibacter* در برگ و ریشه درختان مرکبات فاقد و دارای علائم زوال سریع با روش‌های

PCR و توالی‌یابی Illumina

Table 2. Detection of *Ca. Phytoplasma* and *Ca. Liberibacter* using PCR and Illumina MiSeq sequencing techniques in leaf and root samples collected from citrus plants with and without symptoms

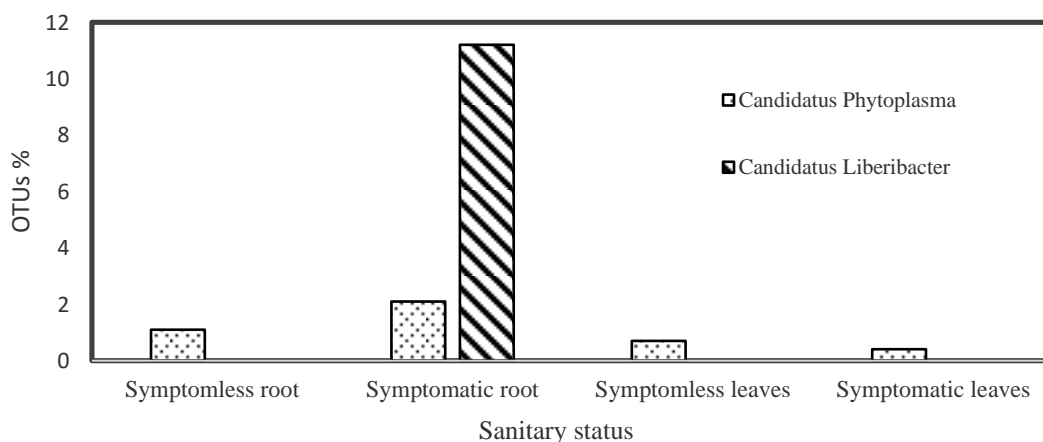
No. tree	Sanitary status	Plant sample			
		Root		Leaf	
		MiSeq	PCR	MiSeq	PCR
1	Asymptomatic	-	-	P	-
2	Asymptomatic	P	-	N	-
3	Asymptomatic	N	-	P	-
4	Symptomatic	LP	LP	P	-
5	Symptomatic	LP	LP	N	-
6	Symptomatic	N	P	P	P
7	Symptomatic	LP	LP	-	-
8	Symptomatic	LP	L	P	P
9	Symptomatic	LP	L	P	-

N: عدم تجزیه و تحلیل نمونه و یا حذف داده‌های پرت، P: فیتوپلاسما ردیابی شد، L: لیبری‌باکتر ردیابی شد، -: هیچ‌کدام از بیمارگرها ردیابی نشدند.
N: not analysed or deleted sample, P: *Candidatus phytoplasma* was detected, L: *Candidatus Liberibacter* was detected, -: none of the pathogens were detected.

نتایج بررسی توالی نوکلئوتیدی ناحیه *16S rDNA* در فیتوپلاسم‌های ردیابی‌شده نشان دادند که توالی تمامی نمونه‌ها یکسان بوده و بیش از ۹۹ درصد به توالی نوکلئوتیدی سویه‌های مختلف گونه تحت شماره‌های دسترسی KY990815 تا KY990820 در بانک ژن ذخیره شده‌اند. همچنین آنالیز توالی نوکلئوتیدی نواحی ژنی *rplJ* و *16S rRNA* لیبری‌باکترهای ردیابی‌شده نشان داد که تمامی نمونه‌ها دارای توالی نوکلئوتیدی یکسان بوده و به ترتیب بیش از ۹۹/۹ و ۹۹ درصد با توالی نوکلئوتیدی سویه‌های مختلف *Ca. Liberibacter asiaticus* شباهت دارند. این توالی‌ها به ترتیب تحت شماره‌های دسترسی KY990821 تا KY990822 و KY990823 تا KY990824 در بانک ژن ذخیره شده‌اند. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از ردیابی پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی نشان داد که بدون در نظر گرفتن اندام مورد مطالعه، در تمامی درختان دارای علائم زوال، دو بیمارگر فیتوپلازما و لیبری‌باکتر وجود دارند. عدم حضور *Ca. Liberibacter* در برگ‌ها ممکن است ناشی از شرایط اقلیمی گرم و خشک منطقه و در نتیجه کاهش بسیار شدید جمعیت *Ca. Liberibacter* در اندام‌های هوایی و مهاجرت باکتری‌ها در شیرۀ آوندی به سمت ریشه‌ها باشد.

در بررسی‌های انجام‌شده با استفاده از روش MiSeq، پس از حذف خوانش‌های متعلق به اندامک‌های گیاهی (کلروپلاست و میتوکندری) در نهایت تعداد ۳۰۶۵۵۸ خوانش بررسی شدند. نمونه‌ها بر اساس اندام گیاهی مورد بررسی (برگ یا ریشه) و وضعیت سلامت درختان (داری علائم و بدون علائم زوال) به چهار گروه تقسیم شدند. نتایج آنالیز مقایسه‌ای جامعه میکروبی درختان مرکبات بدون علائم و یا دارای علائم زوال بر مبنای دو بیمارگر احتمالی *Ca. Phytoplasma spp.* و *Ca. Liberibacter spp.* در دو روش PCR و MiSeq بیانگر حساسیت بیشتر روش MiSeq نسبت به PCR است به گونه‌ای که روش MiSeq توانست در برخی از نمونه‌هایی که PCR قادر به ردیابی بیمارگرها نبود، آن‌ها را ردیابی کند (جدول ۲).

جستجوی اختصاصی OTU (operational taxonomic unit) مربوط به *Ca. Phytoplasma* و *Ca. Liberibacter* نشان‌دهنده عدم حضور *Ca. Liberibacter* در نمونه‌های برگ‌گی مورد بررسی است؛ در حالی که *Ca. Phytoplasma* به میزان کمتر از ۲ درصد در برگ‌های درختان مرکبات (داری و فاقد علائم زوال) ردیابی شد. در ریشه درختان مرکبات دارای علائم زوال، فراوانی *Ca. Liberibacter* حداقل پنج برابر بیشتر از *Ca. Phytoplasma* است در صورتی که در ریشه درختان فاقد علائم ردیابی نشد (شکل ۳).



شکل ۳. مقایسه فراوانی جمعیت *Ca. Phytoplasma* و *Ca. Liberibacter* در ریشه و برگ درختان مرکبات فاقد علائم زوال و درختان دارای علائم زوال روی پایه بکرایی

Figure 3. Comparison between population densities of *Ca. phytoplasma* and *Ca. Liberibacter* in root and leaves of asymptomatic and symptomatic citrus plants on Bakraee root stock

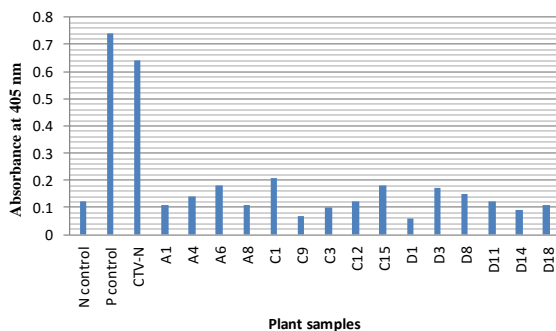
ویروسی در نمونه‌های دارای عارضه زوال مرکبات استفاده شد (Jordan & Dodds, 1984). نتایج به‌دست‌آمده که بر اساس تفسیر باندهای حاصله بر روی ژل آگاروز انجام شد حاکی از عدم وجود این قطعات در نمونه‌های موردبررسی بود. در مواردی باندهایی در ژل الکتروفورز مشاهده شد (ردیف‌های ۲ و ۳ در شکل a-۵) که با انجام هضم آنزیمی با RNase مشخص گردید این باندها مربوط به قطعات RNA هستند (شکل b-۵).

آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تریستزا، پسروروز و Citrus sudden death-associated virus و همچنین عوامل ویروئیدی ایجادکننده بیماری‌های کچکسیا و اگزوکورتیس حاکی از عدم وجود عوامل مذکور در نمونه‌های آلوده بودند. تأیید مراحل آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نواحی 18srDNA به‌عنوان کنترل داخلی صورت پذیرفت (شکل ۶).

در چنین شرایطی ریشه‌ها زیستگاه اکولوژیکی مناسب‌تری برای این بیمارگرها هستند. پژوهش‌های قبلی نیز نشان داده‌اند که جمعیت لیبری‌باکتر در بافت‌ها و اندام‌های مختلف مرکبات مبتلا به بیماری میوه سبز از توزیع یکنواختی برخوردار نیست (Louzada *et al.*, 2016) و می‌تواند متأثر از دمای محیط باشد (Hoffman *et al.*, 2013).

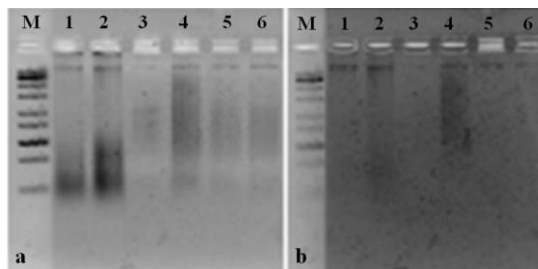
ردیابی ویروس‌ها و ویروئیدها

مایه‌زنی عصاره درختان مبتلا به زوال روی گیاهان محک موجب تشکیل هیچ‌گونه علائم مرتبط با بیماری‌های ویروسی از قبیل موزاییک، کلروز، نکروز، لکه‌های سوخته و یا زردی نشد. نتایج آزمون ELISA حاکی از عدم وجود ویروس تریستزای مرکبات در نمونه‌های دارای علائم بیماری زوال بود (شکل ۴). در این پژوهش از روش استخراج dsRNA به‌عنوان یک روش تشخیصی برای بررسی همراهی عوامل



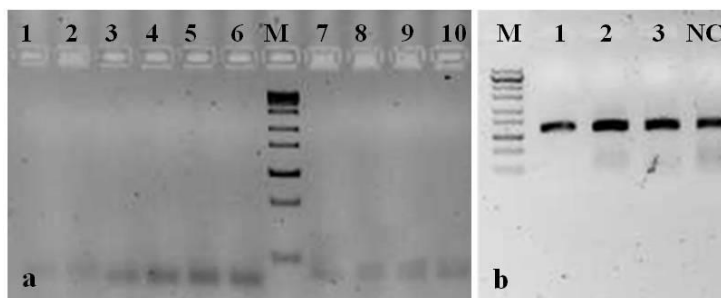
شکل ۴. نتایج آزمون ELISA با پادتن اختصاصی جهت شناسایی ویروس تریستزا. N control: کنترل منفی، P control: کنترل مثبت، CTV-N: گیاه پرتقال آلوده به تریستزا جمع‌آوری شده از حومه ساری، A1, A4, A6, C1, C3, C9, C12, D1, D3, D8, D11, D14, D18: نمونه‌های مختلف پرتقال مبتلا به بیماری زوال جمع‌آوری شده از جنوب کرمان

Figure 4. Results of ELISA test with specific antibody of Tristeza. N control: negative control, P control: positive control, CTV-N: a citrus plant infected by tristeza virus from Sari area, A1, A4, C1, C3, C9, C12, D1, D3, D11, D14, and D18: samples from citrus with decline symptoms from southern Kerman



شکل ۵. پروفایل استخراج dsRNA بر روی ژل آگاروز ۱ درصد: (a) قبل از هضم آنزیمی، (b) پس از هضم آنزیمی توسط RNase (ب)، (۱) مرکبات بدون علائم زوال، (۲-۶) مرکبات دارای علائم زوال

Figure 5. dsRNA extraction profile on 1% agarose gel: a) before digestion, b) after digestion by RNase, 1) asymptomatic citrus tree, 2-6) citrus decline symptomatic trees



شکل ۶. ا) ژل الکتروفورس محصولات RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس‌های تریستزا، کاکچکسیا، اگزوکورتیس، پسرورس و Citrus sudden death-associated virus (ب) ژن داخلی 18S rDNA (۹-۱۸) نمونه‌های مرکبات، NC) کنترل منفی، M) DNA سایز مارکر Figure 6. a) Gel electrophoresis of RT-PCR products using tristeza, cachexia, exocortis, psorosis, and citrus sudden death-associated viruses' specific primers. b) 18S rDNA internal gene. 1-9) citrus samples, NC) negative control, M) DNA size marker

لارو سن دو نماتد ریشه مرکبات در یک گرم ریشه درختان فاقد علائم زوال از ۷۲ تا ۱۵۰ و در درختان دارای علائم زوال از ۷۲ تا ۵۶۵ عدد متغیر بود. سطح بحرانی آلودگی نماتد ریشه مرکبات در کشورهای مختلف متفاوت گزارش شده است (Le Roux *et al.*, 2000; Philis, 1989). این نتایج نشان می‌دهند که نماتد به تنهایی نمی‌تواند عامل زوال باشد بلکه آلودگی به سایر عوامل بیماری‌زا سبب افزایش جمعیت نماتد شده و منجر به تشدید علائم بیماری و زوال درختان می‌شود. ردیابی پروپاگول‌های شبه قارچ *Phytophthora nicotianae* در درختان فاقد علائم دارای علائم زوال نشان داد که با گسترش علائم بیماری، تعداد پروپاگول‌ها افزایش می‌یابد. به طوری که تعداد پروپاگول‌ها در ماه‌های تیر، مرداد و شهریور در نمونه‌های خاک درختان مرکبات بدون علائم زوال به ترتیب ۸/۵، ۷/۳ و ۹/۱ و در درختان دارای علائم زوال به ترتیب ۱۴/۲، ۱۳/۳ و ۱۶/۱ عدد در یک گرم خاک شمارش شد. بر اساس منابع موجود، وجود تعداد ۱۰ تا ۲۰ پروپاگول شبه‌قارچ *Phytophthora* در یک گرم خاک منجر به بروز بیماری ناشی از این شبه قارچ می‌شود (Graham, 2011). بررسی‌های قبلی نشان داده‌اند در درختان مرکبات عاری از هرگونه آلودگی به *Phytophthora* که در مراحل اولیه ابتلا به بیماری میوه سبز بوده ولی هنوز علائم ظاهری برگ‌ها را نشان نمی‌دهند حدود ۳۰ درصد ریشه‌ها از بین می‌روند (Graham *et al.*, 2013). این یافته بیانگر نقش اصلی باکتری *Ca. Liberibacter* در پوسیدگی ریشه

بررسی منابع نشان می‌دهد که علاوه بر تریستزا، بیماری ویروسی مرگ ناگهانی مرکبات (Citrus sudden death) نیز می‌تواند باعث زوال سریع درختان مرکبات شود. این بیماری در سال‌های اخیر باعث از بین رفتن تعداد زیادی از درختان مرکبات با پایه رافلمون در برزیل شده است (در هر دو بیماری، درختان آلوده سریع خشک می‌شوند درحالی‌که برگ‌ها و میوه‌ها به درخت متصل می‌مانند) (Maccheroni *et al.*, 2005, Roman *et al.*, 2004). علی‌رغم شباهت ظاهری عارضه زوال مرکبات در جنوب استان کرمان با بیماری‌های مذکور، انجام آزمون‌های مختلف سرولوژیکی و مولکولی با پادتن‌ها و آغازگرهای اختصاصی منجر به ردیابی این ویروس‌ها در نمونه‌های موردبررسی نشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، شواهدی مبنی بر نقش عامل ویروسی در بروز زوال مرکبات جیرفت وجود ندارد.

ردیابی نماتد ریشه مرکبات و شبه قارچ *Phytophthora*
نتایج این پژوهش نشان داد آلودگی به نماتد ریشه (*T. semipenetrans*) در تمامی درختان مرکبات بدون علائم و دارای علائم زوال وجود دارد اما جمعیت نماتد در درختان با علائم زوال بیشتر است. میانگین تعداد نماتد ماده بالغ در یک گرم ریشه درختان سالم ۶۲/۵ عدد است درحالی‌که در درختان مبتلا به زوال به ۱۱۵ عدد افزایش می‌یابد که بر اساس منابع می‌تواند در حد بحرانی برای بروز زوال باشد (Tanha Maafi & Damadzadeh, 2008, Graham *et al.*, 2013).

ریشه‌های بکرایی در مقایسه با سایر پایه‌های رایج مرکبات، بسیار سطحی است که سبب آسیب‌پذیرتر بودن آن‌ها به‌ویژه در فصل تابستان و در پی تنش‌های محیطی می‌شود. پوسیدگی ریشه در برخی دیگر از بیماری‌های گیاهی ناشی از باکتری‌های بیماری‌زای آوندی از جمله بیماری‌های ناشی از فیتوپلاسماها نیز گزارش شده است (Graham *et al.*, 2013)؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود برهمکنش عوامل بیماری‌های میوه‌سبز و جاروک و نقش نوع پایه در پوسیدگی ریشه درختان مرکبات و بروز بیماری زوال سریع بررسی شود.

بر اساس یافته‌های حاصل از سبب‌شناسی بیماری زوال سریع مرکبات در جنوب استان کرمان، استفاده از پایه نارنج به‌جای بکرایی در توسعه باغ‌های جدید (به دلیل دارا بودن ریشه‌های عمقی و عدم بروز زوال در درختان با پایه نارنج)، استفاده از نهال سالم دارای گواهی سلامت، تغذیه و آبیاری بهینه، انجام عملیات مناسب جهت پیشگیری و کنترل بیماری‌های نماتد ریشه و پوسیدگی ریشه، خودداری از ایجاد هرگونه تنش در گیاه و هرس مناسب از جمله اقداماتی هستند که برای مدیریت عارضه زوال درختان مرکبات در جنوب استان کرمان توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از حمایت مالی سازمان جهاد کشاورزی جنوب کرمان و مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی و بین‌المللی از پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی می‌گردد

درختان مرکبات بوده و نشان می‌دهد که آلودگی درختان مرکبات به این باکتری می‌تواند سبب تسهیل آلودگی‌های بعدی درختان مذکور به شبه قارچ *Phytophthora* و نماتد ریشه و در نتیجه افزایش جمعیت آن‌ها شود. اگرچه برهمکنش این دو بیمارگر تأثیری بر کاهش بیشتر میزان ریشه‌ها نداشته است (Wu *et al.*, 2017; Graham *et al.*, 2013; Ann *et al.*, 2004).

نتیجه‌گیری نهایی

یافته‌های حاصل از این پژوهش، شامل ردیابی باکتری *Ca. liberibacter asiaticus* در درختان دارای علائم زوال و عدم حضور آن در درختان بدون علائم، عدم حضور ویروس‌ها و ویروئیدهای بیماری‌زای مرکبات در درختان مورد بررسی، تفاوت اندک جمعیت *Phytophthora* و نماتد ریشه در درختان بدون علائم با درختان دارای علائم زوال و مقایسه این نتایج با یافته‌های سایر پژوهش‌گران، بیانگر اثبات همراهی باکتری *Ca. liberibacter asiaticus* با بیماری زوال سریع درختان مرکبات با پایه بکرایی در جنوب استان کرمان است. از بین رفتن حجم عمده‌ای از ریشه‌های تغذیه‌کننده گیاه و کاهش چشمگیر میزان جذب آب و مواد غذایی برای جبران فعالیت‌های طبیعی گیاه در فصل گرم تابستان، سبب اختلال در فیزیولوژی گیاه و انتقال آب و در نتیجه بروز علائم برگشت‌ناپذیر زوال ناگهانی در این درختان می‌شود. لازم به ذکر است

REFERENCES

1. Akinsanya, M. A., Goh, J. K., Lim, S. P. & Ting, A. S. (2015). Metagenomics study of endophytic bacteria in *Aloe vera* using next-generation technology. *Genom Data*, 6, 159-163.
2. Alhudaib, K., Arocha, Y., Wilson, M. and Jones, P. (2009). Molecular identification, potential vectors and alternative hosts of the phytoplasma associated with a lime decline disease in Saudi Arabia. *Crop Protection*, 28, 13-18.
3. Ann, P. J., Ko, W. H. & Hong J. S. (2004). Interaction between Likubin bacterium and *Phytophthora parasitica* in citrus hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 1-6.
4. BaniHashemian, S. M., Serra, P., Barbosa, C., Juárez, J., Aleza, P., Corvera, J., Lluch, A., Pina, J. & Duran-Vila, N. (2009). Effect of a field-source mixture of citrus viroids on the performance of 'Nules' clementine and 'Navelina' sweet orange trees grafted on Carrizo citrange. *Plant Disease*, 93, 699-707.
5. Barthe, G. A., Ceccardi, T. L., Manjunath, K. L. & Derrick, K. S. (1998). Citrus psorosis virus: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *Journal of General Virology*, 79, 1531-1537.
6. Bassanezi, R. B., Bergamin Filho, A., Amorim, L., Gimenes-Fernandes, N., Gottwald, T. R. & Bové, J. M. (2003). Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. *Phytopathology*, 93, 502-512.

7. Ebadzadeh, H. R., Ahmadi, K., Mohammadnia Afroozi, S., Abbas Taghani, R., Abbasi, M. & Yari, S. 2017. *Agricultural statistics 1395*. (Vol. 3) Ministry of Jihad -e- Agriculture. Tehran, Iran.
8. Francis, M. I., Szychowski, J. A. & Semancik, J. S. (1995). Structural sites specific to citrus viroid groups. *Journal of General Virology*, 76, 1081-1089.
9. Golein, B., Bigonah, M., Azadvar, M. & Golmohammadi, M. (2012). Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus* sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. *Scientia Horticulturae*, 148, 147-153.
10. Graham, J. H. (1995). Root regeneration and tolerance of citrus rootstocks to root rot caused by *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathology*, 85, 111-117.
11. Graham, J. H., Johnson, E. G., Gottwald, T. R. & Irey, M. S. (2013). Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. *Plant Disease*, 97, 1195-1199.
12. Graham, J. H., Timmer, L. W. & Dewdney, M. M. (2011). *Florida citrus pest management guide: Phytophthora foot rot and root rot*. University of Florida, IFAS Extension.
13. Gundersen, D. E. & Lee, I. M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology Mediterranean*, 35, 144-151.
14. Hocquellet, A., Bove, J. M. & Garnier, M. (1999). Isolation of DNA from the uncultured *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by RAPD. *Current Microbiology*, 38, 176-182.
15. Hoffman, M. T., Doud, M. S., Williams, L., Zhang, M.-Q., Ding, F., Stover, E., Hall, D., Zhang, S., Jones, L., Gooch, M., Fleites, L., Dixon, W., Gabriel, D. & Duan, Y. P. (2013). Heat treatment eliminates 'Candidatus Liberobacter asiaticus' from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology*, 13, 15-22.
16. Ippolito, A., Decicco, V., Cicco, E. & Salerno, M. (1990). Role of *Phytophthora* spp. in citrus decline in Apulia and Basilicata, Italy. *Bulletin EPPO*, 20 (1), 91-94.
17. Izadpanah, K., Shafiee, V. & Pakniat, A. (2002). The status of Citrus tristeza virus in the Fars and Bushehr provinces of Iran. *Fifteenth International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings*. 332-334.
18. Jagoueix, S., Bove, J. M. & Garnier, M. (1996). PCR detection of two *Candidatus Liberobacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecular Cell Probes*, 10, 1915-1917.
19. Jordan, R. L. & Dodds, J. A. (1984). Double-stranded RNA in detection of diseases of known and unproven viral etiology. *Acta Horticulturae*, 164, 101-108.
20. Le Roux, H. F., Pretorius, M. C. & Huisman, L. (2000). Citrus nematode IPM in southern Africa. *Proceeding of the International Society of Citriculture*, 2, 823-827.
21. Levy, L. & Hadidi, A. (1993). Direct nucleotide sequencing of PCR amplified DNAs of the closely related viroids IIA and IIB (Cachexia). In: *Proceeding of 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, 180-186.
22. Louzada, E. S., Vazquez, O. E., Braswell, W. E., Yanev, G., Devanaboina, M. & Kunta, M. (2016). Distribution of 'Candidatus Liberobacter asiaticus' above and below ground in Texas citrus. *Phytopathology*, 106 (7), 702.
23. Maccheroni, W. I., Alegria, M.C., Greggio, C. C., Piazza, J.P., Kamla, R. F., Zacharias, P. R., Bar-Joseph, M., Kitajima, E. W., Assumpção, L. C., Camarotte, G., Cardozo, J., Casagrande, E. C., Ferrari, F., Franco, S. F., Giachetto, P. F., Girasol, A., Jordão, H. J., Silva, V. H., Souza, L. C., Aguilar-Vildoso, C. I., Zanca, A. S., Arruda, P., Kitajima, J. P., Reinach, F. C., Ferro, J. A. & da Silva A. C. (2005). Identification and genomic characterization of a new virus (Tymoviridae family) associated with citrus sudden death disease. *Journal of Virology*, 79, 3028-3037.
24. Meena, A. K., Dutta, F., Marak, M. Ch. & Meena, R. K. (2018). Citrus decline. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(4), 2807-2815.
25. Mori, H., Maruyama, F., kato, H., Toyoda, A., Dozono, A., Ohtsubo, y., Nagata, Y., Fjiyama, A., Tsuda, M. & Kurokawa, K. (2014). Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes. *DNA Research*, 21, 217-227.
26. Muyzer, G., Waal, E. C. D. & Uitertlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 695.
27. Najafinia, M. & Azadvar, M. (2016). Citrus sudden decline disease in Iran. *Indian Phytopathology*, 69(4s), 41-43.
28. Palacio, A. & Duran-Vila, N. (1999). Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for viroid characterization. *Journal of Virological Methods*, 77, 27-36.
29. Pallas, V., Sanchez-Navarro, J. A., Mas, P., Cañizares, M. C., Aparicio, F. & Marcos, J. F. (1998). Molecular diagnostic techniques and their potential role in stone fruit certification schemes. *Options Méditerranéennes*, 19, 191-208.

30. Philis, J. (1989). Yield loss assessment caused by the citrus nematode on Valencia orange in Cyprus. *Nematologia Mediterranea*, 17, 5-6.
31. Roman, M. P. M., Cambra, J., Juárez, P., Moreno, N., Duran-Vila, F. A. O., Tanaka, E., Alves, E. W., Kitajima, P. T., Yamamoto, B., Bassanezi, D. C. J. Jr. Teixeira, A. J., Ayres, N., Gimenes-Fernandes, F., Rabenstein, L. F. & Bove, J. M. (2004). Sudden death of citrus: a graft-transmissible bud union disease. *Plant Disease*, 88, 453-467.
32. Safdar, A., Javed, N., Khan S. A., Khan, H. U., Rehman, A. & Haq, I. U. (2010). Survey and investigation of different citrus growing areas for citrus sudden death syndrome. *Pakistanian Journal of Phytopathology*, 22, 71-78.
33. Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D. & Kirkpatrick, B. C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin, R. & Tully, J. G., (Eds.). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol. I., (pp. 369-380.) Academic Press, San Diego, CA, USA.
34. Seriwastava, A. K. & Singh, S. (2009). Citrus decline: soil fertility and plant nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 32, 197-245.
35. Spina, S., Coco, V., Gentile, A., Catara, A. & Cirvilleri, G. (2008). Association of *Fusarium solani* with rolabc and wild type Troyer citrange. *Journal of Plant Pathology*, 90 (3), 479-486.
36. Tanha Maafi, Z. & Damadzadeh, M. (2008). Incidence and control of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, in the north of Iran. *Nematology*, 10, 113-122.
37. Valverde, R. A. (1990). Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74, 255-258.
38. Whitehead, A. G. & Hemming, J. R. (1965). A comparison of some quantitative methods of extracting some small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology*, 55, 22-38.
39. Wu J., Johnson, E. G., Bright, D. B., Gerberich, K. M. & Graham J. H. (2017). Interaction between *Phytophthora nicotianae* and *Candidatus Liberibacter asiaticus* damage to citrus fibrous roots. *Journal of Citrus Pathology*, 4(1), 1-7.
40. Yokomi, R. K., Mello, A. F. S., Saponari, M. & Fletcher, J. (2008). Polymerase chain reaction based detection of *Spiroplasma citri* associated with citrus stubborn disease. *Plant Disease*, 92, 253-260.
41. Yuan, X., Morano, L., Bromley, R., Spring-Pearson, S., Stouthamer, R. & Nunney, L. (2010). Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Phytopathology*, 100, 601-611.
42. Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K. & Kirkpatrick, B. C. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71, 45-50.