

## پایش ترکیبات بیوشیمیایی در برگ مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری جاروک لیموترش

طاهره رئیسی<sup>۱\*</sup>، ابوزر هاشمپور<sup>۱</sup> و مرتضی گل محمدی<sup>۱</sup>

۱. استادیار، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، رامسر، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۴)

### چکیده

بیماری جاروک لیموترش، که توسط *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* ایجاد می‌شود، مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید لیموترش در مناطق جنوبی ایران است. بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی تغییرات برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی در برگ نهال‌های ریشه‌دار مکزیکن لایم آلوده شده با فیتوپلازما و مکزیکن لایم سالم طی پیشرفت بیماری (۳۳۰-۹۰ روز) و امکان جداسازی نهال‌های سالم و آلوده تحت شرایط گلخانه‌ای پایه‌ریزی شد. بدین منظور، قلمه‌هایی از نهال سالم مکزیکن لایم تهیه شد. پس از سه ماه، نیمی از قلمه‌های مکزیکن لایم با استفاده از پیوندک پوست از نهال آلوده به بیماریگر فیتوپلازما آلوده شدند. در ادامه تعدادی برگ از هر یک از شش نهال سالم و شش نهال آلوده در بازه‌های زمانی ۹۰، ۱۵۰، ۲۱۰، ۲۷۰ و ۳۳۰ روز پس از آلودگی نمونه برداری شد و مقدار رنگدانه‌ها، فنل کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدان، کربوهیدرات محلول و نشاسته در این برگ‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که آلودگی با فیتوپلازما منجر به کاهش چشمگیر رشد و نیز کاهش وزن ماده خشک بخش هوایی و ریشه نهال‌های مکزیکن لایم شد. علاوه بر این، آلودگی غالباً منجر به کاهش مقدار رنگدانه‌ها و افزایش معنی‌دار مقدار کربوهیدرات محلول و نشاسته شد. همچنین، آلودگی با فیتوپلازما منجر به افزایش معنی‌دار فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان در برگ گیاه میزبان شد. به علاوه، نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که براساس شاخص‌های بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در برگ گیاهان سالم و آلوده طی پیشرفت بیماری، می‌توان این گیاهان را از یکدیگر تفکیک نمود. به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر بینشی جدید در مورد پاسخ مکزیکن لایم به بیمارگر فیتوپلازما طی پیشرفت بیماری فراهم نموده و در نهایت مشخص شد که می‌توان گیاهان سالم از آلوده را با بررسی روند تغییرات ترکیبات بیوشیمیایی جداسازی نمود.

واژه‌های کلیدی: بیماری جاروک، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، رنگدانه، فنل، نشاسته.

## Monitoring of the leaf biochemical compositions in Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during the progression of Witches' Broom Disease of Lime (WBDL)

Tahereh Raiesi<sup>1\*</sup>, Abouzar Hashempour<sup>1</sup> and Morteza Golmohammadi<sup>1</sup>

1. Assistant professor, Research Center of Citrus and Subtropical Fruit, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research and Education Organization (AREO), Ramsar, Iran  
(Received: Jul. 16, 2018 - Accepted: Sep. 29, 2018)

### ABSTRACT

Witches' broom disease of lime (WBDL), caused by '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*', is major limiting factor for Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) production in southern Iran. In this investigation, biochemical composition profiling of the healthy and infected rooted Mexican lime was monitored during WBDL progression (90-330 days) as well as to distinguish infected from healthy Mexican limes under greenhouse conditions. For this aim, stem cuttings is taken from healthy Mexican lime. After three months, half of Mexican lime cutting were inoculated by bark-grafting from WBDL-affected Mexican. Six healthy and infected plants were sampled 90, 150, 210, 270 and 330 days after inoculation with Phytoplasma. Pigments, total phenol, antioxidant capacity, soluble carbohydrate and starch content in leaves were measured. Results showed Phytoplasmal infection caused growth inhibition and reduced stem and root dry mater. Moreover, infection mostly caused to a marked decrease in pigments and significantly increased soluble carbohydrates and starch. In Mexican lime leaves, phenol contents and antioxidant capacity were increased after inoculation with Phytoplasma. In addition, the principal components analysis (PCA) revealed a clear distinction between the leaf biochemical profiles of healthy and infected plants during the progression of WBDL. In conclusion, this study provides new insights into the lime response to phytoplasma infection during the progression of WBDL. Finally, we showed that healthy plants can be isolated from infected plants using biochemical profiles.

**Keywords:** *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*, PCA, phenol, pigments, starch.

\* Corresponding author E-mail: taraiesi@gmail.com

### مقدمه

فیتوپلاسمها، پروکاریوت پاتوژن گیاهی از دسته مالیکیوتها هستند که دیواره سلولی ندارند و آلودگی‌شان از نوع سیستمیک و کنترل آن مشکل می‌باشد. فیتوپلاسم عامل ایجاد بیماری در بیش از ۱۰۰۰ گونه گیاهی در سرتاسر جهان هستند (Zimmermann *et al.*, 2015). یکی از گونه‌های گیاهی متأثر از آلودگی فیتوپلاسمایی، لایمها می‌باشند. اثر گسترده‌ی *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* عامل ایجاد بیماری جاروی جادوگر لیموترش (جاروک) (Witches' Broom Disease of Lime, WBDL)، منجر به کاهش سودآوری اقتصادی (بیش از ۷۰٪ تاکنون) در مکزیکن لایم تولیدشده در کشورهای امارات، عمان و ایران شده است (Salehi *et al.*, 1997). در این بیماری اندازه برگ‌ها کوچک شده و برگ‌ها دچار کلروز می‌شوند. همچنین، یکی دیگر از علائم ظاهری این بیماری، کاهش فاصله میانگره‌ها و ایجاد جست‌های نازک ثانویه می‌باشد (Zafari *et al.*, 2012). در نهایت فیتوپلاسم در مدت ۵-۳ سال منجر به مرگ درختان آلوده می‌شود. علائم بیماری ممکن است در مدت ۶ الی ۱۲ ماه در نهال‌های لایم آلوده‌شده به فیتوپلاسم با استفاده از پیوندک درختان لایم آلوده، مشاهده شود (Garnier *et al.*, 1991) و شرایط گرم برای توسعه و ایجاد این علائم مطلوب‌تر است (Chung *et al.*, 2006).

در گیاهان مختلف در زمان مواجهه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی، پاسخ‌های مختلفی مشاهده می‌شود. در برخی گیاهان به دنبال آلودگی گیاه با فیتوپلاسم مسیره‌های سوخت و سازی دستخوش تغییر شده و این امر منجر به تجمع و یا کاهش غلظت برخی از متابولیت‌ها در گیاه می‌شود. علاوه بر این، در بسیاری از گیاهان در برخورد با تنش، پاسخ‌های آنتی‌اکسیدان فعال می‌شود. در بررسی نتایج تحقیق انجام شده روی مکزیکن لایم مشاهده شد که پس از ۳۰ روز آلودگی این نهال‌ها با فیتوپلاسم، برخی ترکیبات متابولیتی شامل آرژنین، گلوتامات، سترات، فروکتاز و غیره در واکنش به فیتوپلاسم در گیاه افزایش نشان دادند. اما هیچ یک از این واکنش‌ها در جلوگیری از پیشرفت بیماری مؤثر نبودند (Mollayi *et al.*

2015). در تحقیقی دیگر، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کاهش اکسین، قند محلول، کلروفیل و احتمالاً دخالت فیتوپلاسم در فتوسنتز پس از ۲۰ هفته آلودگی مکزیکن لایم با فیتوپلاسم گزارش شده است (Zafari *et al.*, 2012). از سوی دیگر، گزارش‌هایی مبنی بر استقرار و تکثیر فیتوپلاسم در آوند آبکش و حرکت آن همراه جریان توده‌ای در آوند آبکش و انتقال به قسمت‌های مصرف‌کننده گیاه (Sink) و دور شدن از قسمت‌های تولیدکننده گیاه (Source) در گیاهان انگور و تنباکو وجود دارد (Lepka *et al.*, 1999; Bertamini *et al.*, 2002). بررسی نتایج تحقیق انجام شده در زمینه تغییرات بیوشیمیایی رخ داده در برگ انگور و سیب آلوده به فیتوپلاسم نشان داد که مقدار کلروفیل، کاروتنوئیدها و پروتئین محلول و نیز فعالیت آنزیم‌های روبیسکو، نیترات و نیتريت ردوکتاز در برگ گیاه آلوده به فیتوپلاسم در مقایسه با گیاهان سالم کاهش، اما مقدار قندهای محلول افزایش نشان دادند (Bertamini & Nedunchezian, 2001; Bertamini *et al.*, 2003).

همچنین، گزارش‌هایی مبنی بر تغییر نقش برگ‌ها متأثر از فیتوپلاسم در برخی از گیاهان میزبان این عامل بیماری از منبع به مخزن وجود دارد. در تحقیقی مشاهده شد که به دنبال آلودگی گیلاس با فیتوپلاسم، برگ‌ها زرد، کوچک و لوله‌ای شده و حالت جارویی پیدا می‌کنند. همچنین، فتوسنتز در برگ‌های آلوده احتمالاً به دلیل کاهش رنگدانه‌ها کاهش یافته و این برگ‌ها قادر به تولید کربوهیدرات کافی برای برطرف کردن نیاز خود نیستند. این در حالی بود که مقدار نشاسته برگ‌های آلوده به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. نتایج فوق نشان داد که به دنبال آلودگی با فیتوپلاسم، نقش برگ‌های آلوده از منبع به مخزن تغییر یافته است (Tan *et al.*, 2015). همچنین، در تحقیقی مشاهده شد که بعد از آلودگی رقم‌های سیب حساس به بیماری فیتوپلاسمایی، مقدار نشاسته در برگ و ریشه گیاهان آلوده در مقایسه با گیاهان سالم به ترتیب افزایش و کاهش نشان داد، درحالی‌که در رقم‌های سیب متحمل‌تر به این بیماری، تفاوت معنی‌داری بین مقدار نشاسته در برگ‌ها و ریشه گیاهان

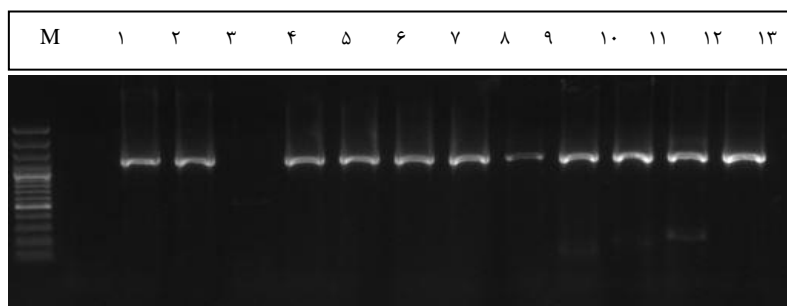
پلاستیکی حاوی کوکوپیت و پرلایت اتوکلاو شده با نسبت ۲ به ۱ منتقل شدند. پس از یک ماه از انتقال قلمه‌ها و حصول اطمینان از استقرار هر نهال، گلدان‌ها به مدت یک ماه، دو مرتبه در هر هفته با ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول غذایی یک چهارم هوگلند اصلاح شده آبیاری شدند. در ادامه غلظت محلول غذایی برای آبیاری به یک دوم و سپس به محلول غذایی کامل افزایش یافت. مازاد بر این، هر یک از گلدان‌ها دو مرتبه در هر هفته نیز با ۲۵۰ میلی‌لیتر آب شهری آبیاری شدند. لازم به ذکر است که تمامی مراقبت‌های لازم مانند آبیاری، تغذیه، تنظیم نور و رطوبت برای تمامی تیمارها به طور یکسان اعمال شد. در اول خرداد سال ۱۳۹۵ از یک نهال لیموترش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش موجود در گلخانه پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری به عنوان منبع پیوندک آلوده برای مایه‌زنی نهال‌های مورد آزمایش استفاده شد. نهال مزبور قبلاً از طریق پیوندک از لیموترش آلوده به جاروک آلوده شده و علائم تیپیک بیماری را نشان می‌داد. لازم به ذکر است قبل از انجام پیوند، وجود بیماری در این نهال توسط آزمون پی‌سی‌آر و با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی و اختصاصی تأیید شد (شکل ۱، چاهک ۲ و ۳). در این مرحله، نیمی از قلمه‌ها با پیوندک آلوده به عامل بیماری و نیمی دیگر با پیوندک سالم پیوند پوست زده و مایه‌زنی شدند. به منظور حفظ رطوبت، نهال‌های پیوندشده به مدت یک ماه در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند. هر ماه پس از آلوده‌سازی، آزمون پی‌سی‌آر برای مشخص شدن قلمه‌های آلوده شده به بیماری جاروک انجام شد. برای این کار ابتدا DNA از رگبرگ به وسیله محلول CTAB استخراج (Deng & Murray Thomson, 1980) و سپس با کمک پی‌سی‌آر و به وسیله جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) و R16F2n/R16R2 (Gundersen & Lee, 1996) وجود بیمارگر در قلمه‌های آلوده شده و فقدان آن در قلمه‌های سالم بررسی شد. در اول شهریور ۹۵ نتیجه آزمون پی‌سی‌آر در تعدادی از نهال‌ها مثبت بود (شکل ۱). از نهال‌های آلوده مزبور جهت پایش ترکیبات بیوشیمیایی استفاده شد.

آلوده و سالم مشاهده نشد (Kartte *et al.*, 1991). بنابراین طبق مطالب ذکر شده، این بیماری می‌تواند دارای یک اثر ثانویه نیز باشد. بنابراین می‌توان عنوان کرد احتمالاً آلودگی با فیتوپلاسمای بر توزیع مواد و متابولیت‌هایی که توزیع آن‌ها از نحوه جریان در آوند آبکش تبعیت می‌کند، اثرگذار است. این فرضیه تا حدودی با گزارش چندین محقق مبنی بر افزایش سطح نشاسته و ساکارز در اندام‌های تولیدکننده نهال سیب به دنبال آلودگی با فیتوپلاسمای تأیید می‌شود (Giorno *et al.*, 2013).

به طور کلی، برای حفظ تولید لیموترش در جهان، توسعه ارقام لایم متحمل به بیمارگر فیتوپلاسمای ضروری است. به هر حال، امر فوق نیازمند بررسی جامع سازوکارهای سازگاری و پاسخ به بیمارگر فیتوپلاسمای می‌باشد که اجازه می‌دهد درختان لایم زنده بمانند. اطلاعات در مورد فیتوپلاسمای به دلیل عدم امکان کشت آن در محیط بیرون از سلول محدود می‌باشد. علاوه بر این، اطلاعات بسیار کمی در مورد تغییرات برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی طی پیشرفت بیماری جاروک وجود دارد. بنابراین در مطالعه حاضر روند تغییرات برخی شاخص‌های بیوشیمیایی در برگ مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری به منظور درک بهتر واکنش متقابل بین فیتوپلاسمای و گیاه میزبان ارزیابی شده و امکان این‌که این پارامترها به همراه دیگر روش‌های شناسایی بیماری بتوانند در تشخیص گیاهان آلوده در مراحل مختلف پیشرفت بیماری کمک کنند، مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

به منظور پایش ترکیبات بیوشیمیایی در برگ مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری جاروک، یک آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی روی مکزیکن لایم طی یک دوره زمانی ۱۸ ماهه انجام شد. بدین منظور در آذر سال ۱۳۹۴، ۸۰ قلمه یکدست از نهال سالم و عاری از بیماری مکزیکن لایم (*Citrus aurantifolia* Swingle) تهیه و در ده گلدان کشت شد. در اسفند ۹۴ پس از اطمینان از ریشه‌دهی قلمه‌ها و توزین هر یک از قلمه‌های ریشه‌دار شده، هر یک از آن‌ها به گلدان‌های جداگانه



شکل ۱. محصول پی سی آر نمونه‌ها سه ماه پس از مایه‌زنی (چاهک‌های ۱۳-۵: نمونه‌ها پس از مایه‌زنی؛ چاهک ۱: کنترل منفی؛ چاهک ۴: کنترل سالم؛ چاهک ۲ و ۳: کنترل مثبت و M: مارکر (۱۰۰ جفت باز)). باند مورد نظر (۱۲۰۰ جفت باز) در چاهک‌های ۱۳-۵ و ۳-۲ مشاهده شد.

Figure 1. PCR products obtained from samples in the third month after infection. (lanes 5-13: lime leaves after infection; lane 1: negative control; lane 4: healthy control; lanes 2-3: positive control; M: DNA size markers (bp)). The band of the expected size (1200 bp) is observed in lanes 5-13 and 2-3.

۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک و سپس توزین شدند.

در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری از برگ مکزیکن لایم (۹۰، ۱۵۰، ۲۱۰، ۲۷۰ و ۳۳۰ روز پس از آلودگی) وجود اختلاف بین هر یک از پارامترهای مورد بررسی شامل مقدار رنگدانه‌ها، فنل کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدان، کربوهیدرات محلول و نشاسته در برگ‌های نمونه‌برداری شده از شش گیاه آلوده و شش گیاه سالم و نیز در پایان دوره رشد مورد مطالعه معنی‌دار بودن تفاوت بین وزن خشک ریشه و بخش هوایی نمونه‌های آلوده و سالم با استفاده از آزمون t بررسی شد. در نهایت امکان تمایز نمونه‌های آلوده از سالم با استفاده از مدل تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بررسی شد. کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار استاتیسیتیکا نسخه ۱۰ انجام شد.

### نتایج و بحث

**بررسی وجود فیتوپلازما در نهال‌های مکزیکن لایم**  
بررسی نتایج آزمون پی‌سی‌آر روی ژل آگارز یک درصد، سه ماه پس از انجام مایه‌زنی، نشان داد که در نمونه‌های مربوط به برخی از نهال‌ها پس از انجام مایه‌زنی (شکل ۱، چاهک‌های ۹-۱ و ۱۷-۱۲) و در نمونه کنترل مثبت که مربوط به نهالی است که پیوندک از آن گرفته شده بود، باند مورد نظر در ژل مشاهده شد (شکل ۱، چاهک‌های ۱ و ۱۸). در ادامه کار از نهال‌های مزبور جهت پایش ترکیبات بیوشیمیایی استفاده شد.

پس از اطمینان از آلوده شدن گیاهان به عامل جاروک از طریق انجام آزمون پی‌سی‌آر، هر ۶۰ روز یک بار (تا ۳۳۰ روز پس از مایه‌زنی)، برگ‌هایی از یک موقعیت در شاخسار شش گیاه آلوده و شش گیاه سالم برداشت شد. نمونه‌های برگ بلافاصله در ازت مایع منجمد و در دمای ۸۰- سلسیوس در فریزر به‌منظور اندازه‌گیری رنگدانه‌ها، کل فنل محلول و ظرفیت آنتی‌اکسیدان نگهداری شدند. علاوه بر شاخص‌های ذکر شده قندهای محلول و نشاسته نیز در نمونه‌های برگ خشک‌شده در آن، اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری رنگدانه‌ها (کلروفیل a، b و کاروتنوئید) به روش استخراج با استون ۸۰ درصد و قرائت غلظت با اسپکتروفتومتر انجام شد. فنل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان نمونه‌های برگ با استفاده از محلول اتانول اسیدی شده استخراج (Boeing *et al.*, 2014) و فنل به روش فولین (Singleton & Rossi, 1965) و ظرفیت آنتی‌اکسیدان نیز در محلول استخراجی ذکر شده به روش DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995) اندازه‌گیری شدند. قندهای محلول با استفاده از محلول اتانول ۸۰ درصد استخراج و به روش فنل (Dubois *et al.*, 1956) اندازه‌گیری شدند. برای استخراج نشاسته از اسید پرکلریک ۵۲ درصد استفاده و نشاسته در محلول استخراجی به روش آنترون (McCready *et al.*, 1950) اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، در پایان دوره رشد، جهت تعیین مقدار وزن خشک بخش هوایی و ریشه، نهال‌های مکزیکن لایم سالم و آلوده برداشت و بخش هوایی و ریشه هر یک از نهال‌ها به مدت

هوایی نهال‌های مکزیکن‌لایم‌های آلوده و سالم به‌ترتیب ۳۱/۳ و ۴۹/۴ گرم بود. همچنین، میانگین مقدار ماده خشک ریشه مکزیکن‌لایم‌های آلوده و سالم به‌ترتیب ۲۰/۱ و ۵/۳ گرم بود. علاوه بر این، نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی مکزیکن‌لایم آلوده (۰/۱۷) کمتر از مکزیکن‌لایم سالم (۰/۴۱) بود. بررسی نتایج نشان داد درصد کاهش وزن خشک ریشه و بخش هوایی مکزیکن‌لایم به دنبال آلودگی به بیمارگر فیتوپلازما به‌ترتیب ۷۳ و ۳۷ درصد بود. بنابراین، بیمارگر فیتوپلازما، وزن خشک ریشه مکزیکن‌لایم را نسبت به وزن خشک بخش هوایی این گیاه بیشتر تحت تأثیر قرار داده است. بنابراین، سیستم به شدت آسیب دیده ریشه در این نهال‌ها به دنبال آلودگی با فیتوپلازما می‌تواند منجر به کاهش جذب آب و عناصر غذایی و به دنبال آن تضعیف درخت گشته و می‌تواند منجر به زوال این درختان شود. طبق منابع موجود فیتوپلازما در مدت کمتر از ۵ سال منجر به مرگ این درختان می‌شود (Chung et al., 2006).

### تغییرات ریخت‌شناسی در گیاهان آلوده

در ماه چهارم از زمان آلوده‌سازی، علایم تیپیک بیماری جاروک در تعدادی از شاخه‌های برخی از نهال‌های آلوده مشاهده شد. در ماه‌های بعد گستره و شدت علایم افزایش یافت. این علایم شامل کوچک شدن اندازه برگ‌ها و دچار کلروز شدن این انساج‌ها بود. همچنین، یکی دیگر از علایم ظاهری مشاهده شده در گیاهان آلوده شده به این بیمارگر کاهش فاصله میانگره‌ها، از بین رفتن تیغ و ایجاد جست‌های نازک ثانویه بود (شکل ۲). علاوه بر این، در گیاه آلوده، برگ‌های جوان نسبت به برگ‌ها با سن بالاتر سبزتر بودند و برگ‌های با سن بالاتر حالت سفیدشدگی (بلیچینگ) داشتند.

### ماده خشک بخش هوایی و ریشه

مقدار ماده خشک بخش هوایی و ریشه نهال‌های مکزیکن‌لایم سالم و آلوده به بیمارگر فیتوپلازما در جدول ۱ آورده شده است. میانگین وزن خشک بخش



Infection time



Bark Grafting

Third month after infection  
(before symptoms appear; the first sampling)



Fourth month after infection  
(After symptoms appear)



The last sampling

شکل ۲. اثر مایه‌زنی با فیتوپلازما بر ریخت‌شناسی گیاه

(گلدان‌های سمت راست: نهال سالم؛ گلدان‌های سمت چپ: نهال آلوده به بیمارگر)

Figure 2. Effect of infection by phytoplasma on plant morphology  
(pots on the right: healthy plant; pots on the left: infected plants)

جدول ۱. مقدار ماده خشک بخش هوایی و ریشه نهال‌های مکزیکن لایم سالم و آلوده به بیمارگر فیتوپلازما

Table 1. Aboveground and root dry matter of healthy and infected Mexican lime

Lime plant	aboveground (stem+leaves)	root	Root to aboveground matter
Control	49.4a	20.1a	0.41a
Infected	31.3 (-37%)b	5.3 (-73%)b	0.17 (-58%)b

در هر ستون میانگین‌ها با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ( $t$ -Test;  $p \leq 0.05$ ).

اعداد داخل پرانتز در سطر سوم نشان‌دهنده درصد کاهش هریک از بخش‌های گیاه آلوده در مقایسه با گیاه سالم می‌باشد ( $100 \times (\text{سالم} - \text{آلوده}) / \text{سالم}$ ).

Within columns, means followed by different letters are significantly different by  $t$ -Test ( $t$ -Test;  $p \leq 0.05$ ).

Values in parentheses are percent reduction with reference to healthy controls ( $100 \times (\text{healthy} - \text{infected}) / \text{healthy}$ ).

## رنگدانه‌ها

نسبتاً سریع‌تر کلروفیل نسبت به کاروتنوئید در برگ مکزیکن لایم آلوده به جاروک باشد.

نتایج مشابه با کار حاضر در برگ گیاهان آلوده به فیتوپلازما در گونه‌های گیاهی مکزیکن لایم (Zafari *et al.*, 2013)؛ انگور (Bertamini & Nedunchezian, 2001)؛ سیب (Bertamini *et al.*, 2003) و گیلان (Tan *et al.*, 2015) نیز مشاهده شده است. احتمالاً کاهش کلروفیل مشاهده‌شده در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌از در برگ آلوده به فیتوپلازما (Bertamini *et al.*, 2002) و یا اختلال در جذب و انتقال عناصر معدنی موجود در ساختار کلروفیل باشد. هرچند در مطالعه حاضر تغییرات در سرعت فتوسنتز بررسی نشده است، اما می‌توان احتمال داد که کاهش مقدار کلروفیل در برگ گیاهان آلوده می‌تواند منجر به کاهش ظرفیت انجام فتوسنتز در برگ لیموترش شود. در دیگر مطالعه انجام شده در زمینه اثرات فیتوپلازما بر گیاه به کاهش فعالیت فتوسنتزی برگ گیاه انگور اشاره شده است (Bertamini *et al.*, 2003).

## کربوهیدرات

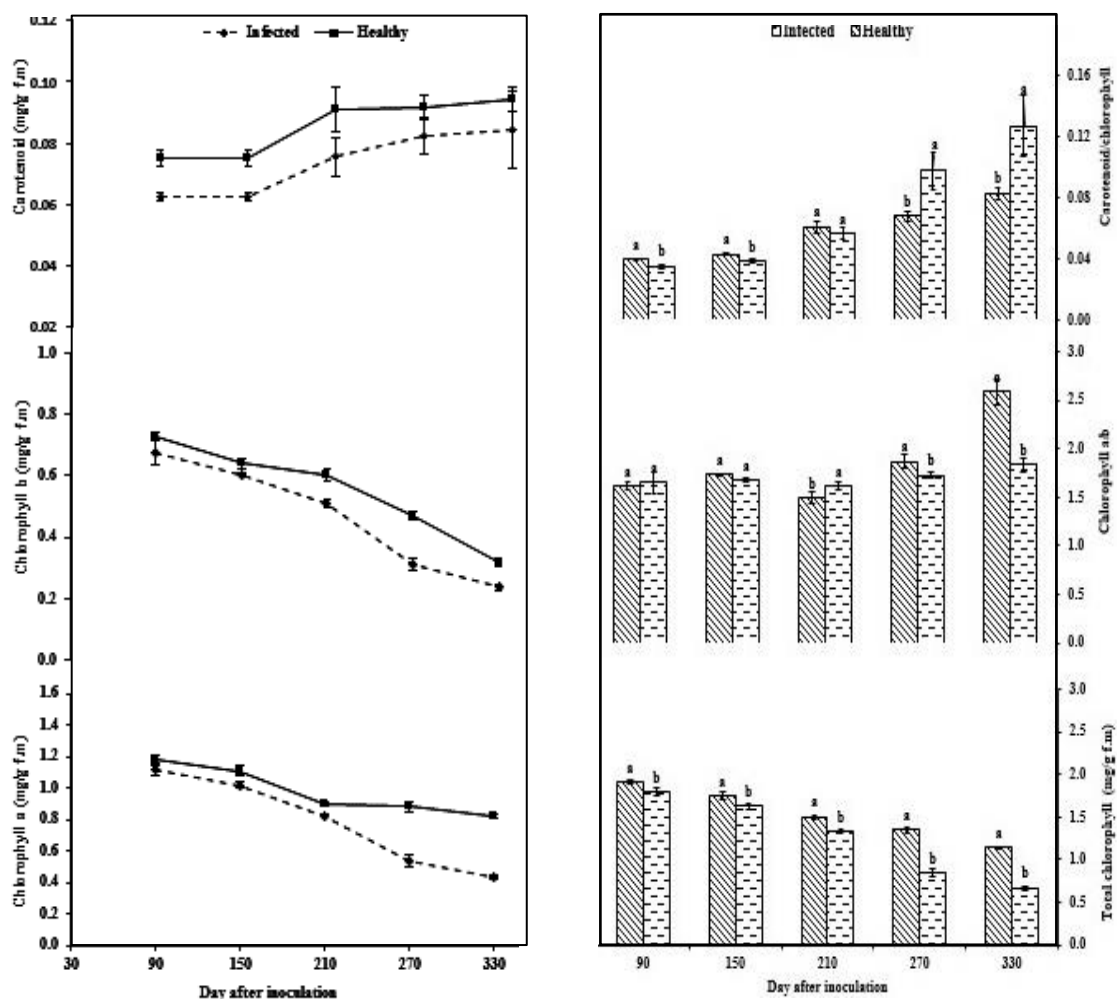
عدم تعادل کربوهیدرات‌ها در برخی گونه‌های گیاهی آلوده‌شده به بیمارگر فیتوپلازما گزارش شده است. بنابراین در مطالعه حاضر، روند تغییرات قندهای محلول و نشاسته در برگ‌های بالغ نهال‌های آلوده و سالم مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری جاروک بررسی شد (شکل ۴). همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود نشاسته در برگ مکزیکن لایم آلوده چه قبل و چه بعد از ظهور علائم ظاهری بیماری به‌طور معنی‌داری تجمع یافته است. مقدار افزایش تجمع نشاسته در برگ مکزیکن لایم بیمار در مقایسه با نهال‌های سالم این گیاه در زمان‌های اول تا پنجم نمونه‌برداری به ترتیب ۳۶، ۳۶،

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود رنگ برگ نهال‌های آلوده در مقایسه با برگ نهال‌های سالم روشن‌تر بود. به منظور تأیید این مطلب که تغییر رنگ برگ‌های آلوده می‌تواند ناشی از تغییر رنگدانه‌های برگ به‌دنبال آلوده‌سازی باشد، مقادیر کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها در برگ‌ها ارزیابی شدند. مقدار رنگدانه‌های بررسی‌شده در تمام زمان‌های نمونه‌برداری چه قبل از ظاهر شدن علائم بیماری و چه بعد از ظهور این علائم در نهال‌های آلوده نسبت به نهال‌های سالم کمتر بود، اما مقادیر کلروفیل a با پیشرفت بیماری جاروک کاهش یافت. به‌طور کلی مقدار کاهش رنگدانه a در برگ نهال مکزیکن لایم آلوده در مقایسه با مقادیر این پارامترها در برگ نهال سالم مکزیکن لایم در زمان‌های نمونه‌برداری اول تا پنجم به ترتیب ۵/۵، ۸/۳، ۸/۲، ۳۹ و ۴۷ درصد؛ مقدار کاهش کلروفیل b در برگ گیاه آلوده در مقایسه با گیاه سالم در زمان‌های ذکرشده به ترتیب ۷/۴، ۵/۳، ۱۵، ۳۴ و ۲۶ درصد و مقدار کاهش کاروتنوئید در برگ گیاه آلوده در مقایسه با گیاه سالم در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری به ترتیب ۱۶، ۱۶، ۱۷، ۱۰ و ۱۱ درصد بود. علاوه بر این همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود با پیشرفت بیماری، نسبت کلروفیل a به b کاهش بیشتری نشان می‌دهد. امر فوق حاکی از بیشتر شدن مقدار تخریب و یا کمتر شدن مقدار سنتز کلروفیل a که شاخص دقیق‌تری از فعالیت فتوسنتزی برگ است (Sestak, 1966)، در مقایسه با کلروفیل b با پیشرفت بیماری جاروک می‌باشد. در مورد نسبت کاروتنوئید به کلروفیل مشاهده شد که این نسبت در زمان‌های آخر نمونه‌برداری در گیاهان آلوده بیشتر از گیاهان سالم بود. نتیجه فوق می‌تواند ناشی از کاهش

نشاسته در برگ مکزیکن لایم آلوده به فیتوپلازما در توافقی با نتایج گزارش شده در مورد گیلاس آلوده به فیتوپلازما (Tan *et al.*, 2015)؛ مکزیکن لایم آلوده به فیتوپلازما (Zafari *et al.*, 2013) و تنباکو (Lepka *et al.*, 1999) می‌باشد.

تجمع کربوهیدرات‌های محلول در برگ گیاهان آلوده می‌تواند ناشی از اثرات ثانویه آلودگی با فیتوپلازما نیز باشد. طبق منابع موجود احتمالاً فیتوپلازما باعث ممانعت انتقال متابولیت‌ها از طریق آوند آبکش شده و به این ترتیب منجر به تجمع کربوهیدرات‌ها در برگ‌ها به‌عنوان اندام‌های تولیدکننده گیاه آلوده شده و نیز تامین قند از برگ‌ها برای ریشه‌ها و دیگر اندام‌های مصرف‌کننده گیاه را کاهش داده و به این ترتیب باعث تخریب بافت ریشه شده است (جدول ۱).

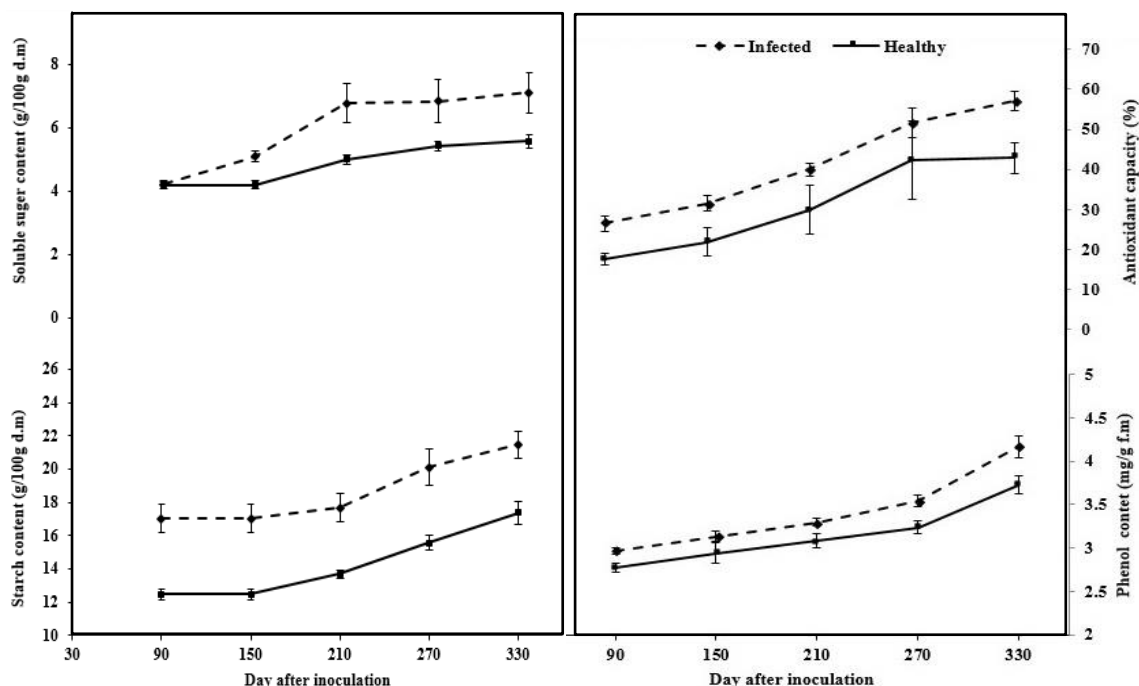
۲۹، ۲۳ و ۲۳ درصد بود. معمولاً برگ‌ها به دلیل جایگاه انجام فتوسنتز به عنوان اندام‌های تولیدکننده (منبع) عمل می‌کنند. به‌رحال در مطالعه حاضر مقدار رنگدانه کلروفیل و کاروتنوئیدها) برگ‌ها در شاخه‌های گیاهان آلوده به جاروک کاهش یافته (شکل ۳) و بنابراین می‌توان احتمال داد که کاهش مقدار کلروفیل در برگ گیاهان آلوده می‌تواند منجر به کاهش ظرفیت انجام فتوسنتز در برگ لیموترش آلوده شده باشد. از سوی دیگر تجمع نشاسته در برگ گیاهان آلوده (۱۹ گرم بر صد گرم ماده خشک) بیشتر از برگ گیاهان سالم (۱۴ گرم بر صد گرم ماده خشک) بود، که حاکی از انتقال کربوهیدرات‌ها از سایر برگ‌ها می‌باشد. این امر نشان می‌دهد که فیتوپلازما باعث تغییر نقش برگ‌های بالغ از اندام تولیدکننده به اندام ذخیره‌کننده شده است. تجمع



شکل ۳. تغییر مقدار رنگدانه‌های موجود در برگ مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری جاروک. میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد شش تکرار

Figure 3. Pigments Changes in the leaves of healthy and infected Mexican lime during progression of WBDL.

Means  $\pm$ SE of six replicates.



شکل ۴. تغییر مقادیر نشاسته، کربوهیدرات، فنل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان در برگ مکزیکن لایم سالم و آلوده طی پیشرفت بیماری جاروک. میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد شش تکرار.

Figure 4. Starch, soluble carbohydrate, phenol and antioxidant capacity changes in the leaves of healthy and infected Mexican lime during progression of WBDL. Means  $\pm$ SE of six replicates.

بیشترین افزایش (۱۲/۰) در زمان آخر نمونه‌برداری مشاهده شد. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های ترکیبات فنلی فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات می‌باشد. در واقع ساخت ترکیبات فنلی در بسیاری از واکنش‌های متقابل گیاه-بیمارگر مشاهده شده و در اغلب موارد با مقاومت گیاه میزبان نسبت به بیمارگرهای گیاهی از قبیل قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها ارتباط دارد (Friend, 1979). در مطالعه حاضر نیز همان‌طور که گزارش شد مقدار فنل محلول کل در همه زمان‌های نمونه‌برداری در برگ نهال‌های مکزیکن لایم آلوده افزایش یافته است.

#### ظرفیت آنتی‌اکسیدان

یکی از سازوکارهایی که بر میزان تحمل گیاهان در مواجهه با تنش‌های زیستی تأثیرگذار می‌باشد، ظرفیت آنتی‌اکسیدان این گیاهان است. گیاهان در مواجهه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی سیستم‌های دفاعی مختلفی را برای تنظیم گونه‌های آزاد اکسیژن و کاهش واکنش‌های اکسیداتیو تخریبی آن‌ها به کار

تجمع مقادیر زیاد کربوهیدرات محلول در برگ می‌تواند اثر ممانعت‌کننده بر ظرفیت فتوسنتز برگ داشته و مقدار فتوسنتز در برگ گیاهان بیمار را کاهش دهد. همچنین، تجمع کربوهیدرات‌ها می‌تواند برخی علائم ظاهری ایجاد شده در گیاهان بیمار را توجیه نماید. همان‌طور که در بخش ریخت‌شناسی گزارش شد حالت سفیدشدگی برگ بالغ گیاهان بیمار می‌تواند نتیجه‌ای از افزایش غلظت و تجمع کربوهیدرات‌ها در برگ‌ها باشد. تجمع کربوهیدرات‌های محلول در برگ بالغ گیاهان بیمار به فیتوپلازما در دیگر مطالعات گزارش شده است (Lepka et al., 1999).

#### فنل

مقدار ترکیبات فنلی محلول کل در برگ نهال مکزیکن لایم به دنبال آلودگی این گیاه با بیمارگر فیتوپلازما در همه زمان‌های نمونه‌برداری افزایش یافت. درصد افزایش ترکیبات فنلی در برگ گیاه آلوده در مقایسه با گیاه سالم در زمان‌های اول تا پنجم نمونه‌برداری به ترتیب ۶/۹، ۶/۵، ۶/۹، ۹/۰، ۱۲/۰ بود و

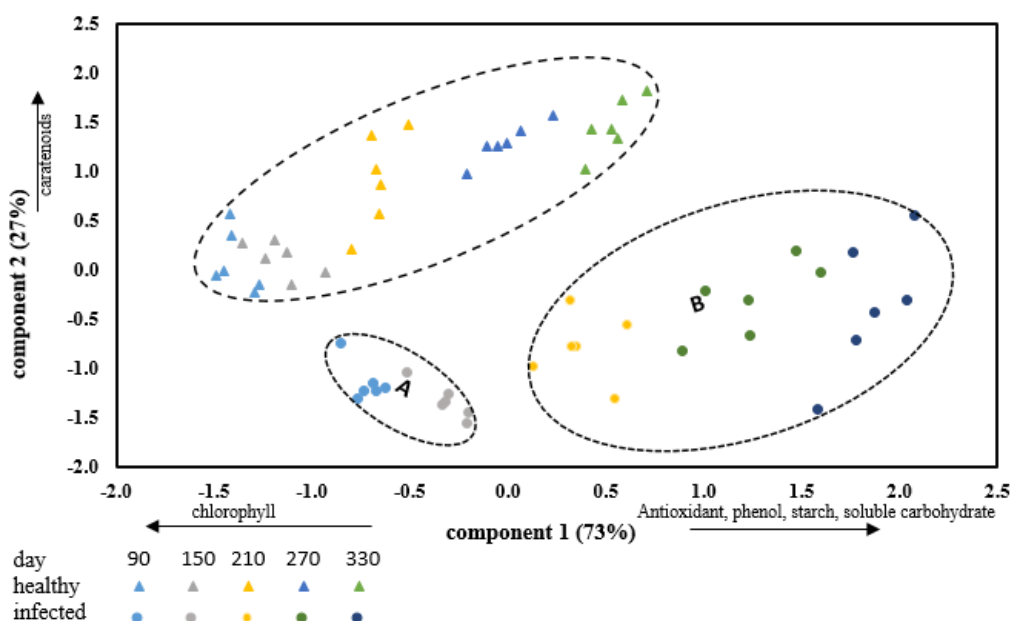


ترکیبات بیوشیمیایی، استفاده شد. نتایج نشان داد که مؤلفه اول (متغیرهای اصلی در این مؤلفه شامل آنتی-اکسیدان، فنل کل، نشاسته، کربوهیدرات محلول و کلروفیل کل می‌باشند) و دوم (متغیر اصلی در این مؤلفه کاروتنوئیدها می‌باشد) به ترتیب ۷۳ و ۲۷ درصد تغییرات نمونه‌های گیاه سالم و آلوده به جاروک را توجیه کردند.

بررسی شکل ۵ نشان داد که نهال‌های سالم در یک گروه مجزا از نهال‌های آلوده قرار گرفتند. علاوه بر این با بررسی شکل ۵ مشاهده شد که وضعیت ترکیبات بیوشیمیایی نهال‌های آلوده طی پیشرفت بیماری جاروک تغییر کرده و نهال‌ها در دو گروه اصلی قرار گرفتند (گروه A: از ۹۰ تا ۱۵۰ روز و گروه B: از ۲۱۰ تا ۳۳۰ روز). بنابراین می‌توان براساس ترکیبات بیوشیمیایی گیاهان آلوده از سالم را جداسازی نمود. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود گیاهان سالم در مقایسه با گیاهان آلوده دارای مقدار کاروتنوئید و کلروفیل بیشتری می‌باشند. بنابراین یکی از مهمترین تغییرات رخ داده در برگ مکزیکن‌لایم به دنبال آلودگی به بیماریگر فیتوپلازما، کاهش مقدار رنگدانه‌ها (کلروفیل و کاروتنوئید) در برگ این گیاه و متعاقباً تغییر رنگ برگ این گیاهان می‌باشد.

می‌گیرند (Foyer *et al.*, 1994). غالباً هرچه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه بیشتر باشد، آن گیاه در مواجهه با آسیب‌های اکسیداتیو مقاوم‌تر بوده و بنابراین در برابر تنش‌ها متحمل‌تر می‌باشد. به طور مشابه افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدان و به ویژه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (Zafari *et al.*, 2013) در مواجهه با تنش‌های زیستی گزارش شده است. بزرگی افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان کاملاً به گونه گیاه و مقدار تحمل آن گیاه در برابر تنش بستگی دارد. به هر حال در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدان در برگ گیاه آلوده در مقایسه با گیاه سالم بیشتر نشان‌دهنده پاسخ عمومی گیاه میزبان در برابر تنش است تا به‌عنوان یک سازوکار دفاعی ویژه. موضوع فوق در مورد برخی گیاهان میزبان برخی بیمارگرهای گیاهی دیگر نیز گزارش شده است (Junqueira *et al.*, 2011).

پایش ترکیبات بیوشیمیایی با استفاده تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در تحقیق حاضر از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌منظور بررسی امکان تفکیک گیاهان سالم و آلوده به بیماری جاروک طی پیرفت بیماری با استفاده از وضعیت



شکل ۵. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ترکیبات بیوشیمیایی در گیاه سالم و آلوده مکزیکن‌لایم طی پیشرفت بیماری جاروک  
Figure 5. Principal component analysis (PCA) scores plot of biochemical composition in healthy and infected Mexican lime during progression of WBDL.

همچنین، فاصله میانگره‌ها کاهش یافته و جست‌های نازک ثانویه فاقد تیغ ایجاد شده است. مقدار رنگدانه‌های (کلروفیل و کاروتنوئیدها) برگ‌ها در شاخه‌های گیاهان مکزیکن لایم آلوده به جاروک کاهش یافته و بنابراین می‌توان احتمال داد که کاهش مقدار کلروفیل در برگ گیاهان آلوده می‌تواند منجر به کاهش ظرفیت انجام فتوسنتز در برگ گیاهان آلوده شده باشد. از سوی دیگر نشاسته و کربوهیدرات‌های محلول در برگ گیاهان آلوده تجمع یافته بود. تجمع نشاسته در برگ‌های بالغ می‌تواند یکی از دلایل حالت سفیدشدگی (بلیچینگ) مشاهده‌شده در برگ‌های گیاهان آلوده باشد. علاوه بر این، تجمع کربوهیدرات‌های محلول در برگ گیاهان آلوده می‌تواند ناشی از اثرات ثانویه آلودگی با فیتوپلازما باشد. احتمالاً به دنبال آلودگی با فیتوپلازما، انتقال متابولیت‌ها از طریق آوند آبکش مختل شده و کربوهیدرات‌ها در برگ‌ها به‌عنوان اندام‌های تولیدکننده گیاه تجمع یافته و قند کمتری از برگ‌ها به سمت ریشه‌ها و دیگر اندام‌های مصرف‌کننده گیاه انتقال خواهد یافت. رخداد امر فوق، باعث تخریب بافت ریشه و اختلال در جذب آب و عناصر غذایی و به دنبال آن تضعیف درخت شده و موجب زوال این درختان می‌شود. مازاد بر این در مطالعه با بررسی روند تغییرات بیوشیمیایی این امکان میسر شد که نهال‌های سالم و آلوده از یکدیگر تفکیک شوند.

همچنین با بررسی شکل ۵ می‌توان گفت که سازوکارهای دفاعی شامل پاسخ‌های آنتی‌اکسیدان و تجمع فنل در برگ گیاهان به‌دنبال آلودگی گیاه با بیماریگر فیتوپلازما تشدید شده، به این ترتیب که ظرفیت آنتی‌اکسیدان و مقدار فنل بیشتری در برگ گیاهان آلوده در مقایسه با گیاهان سالم تجمع یافته است. همچنین، در برگ گیاهان آلوده در مقایسه با برگ گیاهان سالم مقدار کربوهیدرات‌های محلول و نشاسته بیشتری تجمع یافته است. بنابراین، احتمالاً به‌دنبال آلودگی با بیماریگر فیتوپلازما مسیرهای سوخت و ساز در برگ مکزیکن لایم دستخوش تغییر شده و منجر به تغییر وضعیت ترکیبات بیوشیمیایی نهال‌های آلوده در مقایسه با نهال‌های سالم شده است. در مطالعه‌ی دیگری که در زمینه روند تغییرات مقدار و تجمع انواع اسیدهای آمینه در برگ مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری جاروک انجام شده است، مشاهده شد که با استفاده از تکنیک آماری تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌توان گیاهان آلوده و سالم را بر اساس نوع اسید آمینه تجمع‌یافته در برگ این گیاهان جداسازی نمود (Mollayi et al., 2015).

#### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در گیاهان آلوده به فیتوپلازما برگ‌ها دچار کلروز شده و کوچک شده‌اند.

#### REFERENCES

- Bertamini, M., Grando, M. S. & Nedunchezian, N. (2003). Effects of phytoplasma infection on pigments, chlorophyll-protein complex and photosynthetic activities in field grown apple leaves. *Biologia Plantarum*, 47, 237-242.
- Bertamini, M., Nedunchezian, N., Tomasi, F. & Grando, S. (2002). Phytoplasma [Stolbur subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61, 357-366.
- Bertamini, M. & Nedunchezian, N. (2001). Effects of phytoplasma [Stolbur-Subgroup (Bois Noir-BN)] on photosynthetic pigments, saccharides, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases, and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Photosynthetica*, 39, 119-122.
- Boeing, J., Barizao, E. O., Silva, B. C., Montanher, P. F., Almeida, V. & Visentainer J. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8, 1-9.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Chung, K. R., Khan, I. A. & Brlansky, R. H. (2006). Citrus diseases exotic to Florida: witches' broom disease of lime (WBDL), University of Florida (Electronic Data Information Systems) Database, Fact Sheet.

7. Deng, S. J. & Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S ribosomal-RNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14, 53-61.
8. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
9. Friend, J. (1979). Phenolic substances and plant disease. In: T. Swain, J.B. Harborne, and C.F. Van Sumere (Eds), *Biochemistry of plant phenolics*. (pp. 557-558). Plenum Press, New York.
10. Foyer, C. H., Lelandais, M. & Kunert, K. J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Plant Physiology*, 92, 696-717.
11. Garnier, M., Zreik, L. & Bov, J. M. (1991). Witches' 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. In: Proceedings of 11th conference of the International Organization of Citrus Virologists, 6-10 Nov., c/o Department of Plant Pathology, Riverside, California, pp. 448-453.
12. Giorno, F., Guerriero, G., Biagetti, M., Ciccotti, A. M. & Baric, S. (2013). Gene expression and biochemical changes of carbohydrate metabolism *in vitro* micro-propagated apple plantlets infected by 'Candidatus Phytoplasma mali'. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 311-317.
13. Gundersen, D. E. & Lee, I. M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35, 144-151.
14. Junqueira, A. C., Bedendo, I. P. & Pascholati, S. F. (2011). Effect of phytoplasma infection on the activity of peroxidase,  $\beta$ -1,3 glucanase and chitinase in corn plants. *Summa Phytopathologica*, 37, 194-198.
15. Kartte, S. & Seemuller, E. (1991). Histopathology of apple proliferation in *Malus* taxa and hybrids of different susceptibility. *Journal of Phytopathology*, 131, 149-160.
16. Lepka, P., Stitt, M., Moll, E. & Seemüller, E. (1999). Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 59-68.
17. McCready, R. M., Guggolz, J., Silveira, V. & Owens, H. S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry*, 22(9), 1156-1158
18. Mollayi, S., Zadali, R., Farzaneh, M. & Ghassempour, A. (2015). Metabolite profiling of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) leaves during the progression of witches' broom disease. *Phytochemistry Letters*, 13, 290-296.
19. Murray, M. G. & Thomson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
20. Salehi, M., Izadpanah, K. & Rahimian, H. (1997). Witches' broom disease of lime in Sistan, Baluchistan. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 33, 76.
21. Sestak, Z. (1966). Limitation for finding linear relationship between chlorophyll content and photosynthetic activity. *Biologia Plantarum*, 8, 336-346.
22. Schneider, B., Seemuller, E., Smart, C. D. & Kirkpatrick, B. C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In S. Razin (Ed.) *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. (pp. 369-380). Academic Press, San Diego.
23. Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
24. Tan, Y., Wei, H. R., Wang, J. W., Zong, X. J., Zhu, D. Z. & Liu, Q. Z. (2015). Phytoplasmas change the source-sink relationship of field-grown sweet cherry by disturbing leaf function. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 92, 22-27.
25. Zafari, S., Niknam, V., Musetti, R. & Noorbakhsh, S. N. (2012). Effect of phytoplasma infection on metabolite content and antioxidant enzyme activity in lime (*Citrus aurantifolia*). *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 561-568.
26. Zimmermann, M. R., Schneider, B., Mithofer, A., Reichelt, M., Seemuller, E. & Furch, A. (2015). Implications of "Candidatus Phytoplasma mali" infection on phloem function of apple trees. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, 26, 67-75.