



Scientific article

Investigation of the association between phloem-limited plant pathogenic prokaryotes and fruit malformation and abnormal coloration symptoms in Siyahoo mandarin (*Citrus reticulata* cv. Siyahoo) trees

M. M. FAGHIHI¹ , A. BAGHERI², M. ASKARI SEYAHOOEI³, S. SAMAVI⁴, M. AMIRI MAZRAIE⁵, NAZANIN SADAT EBADI⁶ 

1, 6[✉]: Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Zarghan, Iran.

2, 3: Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

4: Department of Plant Pathology, College of Agronomy Sciences, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran

5: Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Abstract

Over the past decade, symptoms of abnormal fruit coloration and deformation have been observed in mandarin (*Citrus reticulata*) trees in the Siyahoo region of Hormozgan Province, resulting in significant economic losses due to reduced marketability. To investigate the potential involvement of phloem-limited prokaryotes (*Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Phytoplasma* spp., and *Spiroplasma citri*), forty symptomatic and five asymptomatic trees were examined. Sampling was primarily conducted on the peduncles of symptomatic fruits, and DNA was extracted from both peduncles and midribs. Molecular detection of the target pathogens was performed using PCR assays with specific primer sets. Results revealed that *Ca. Liberibacter asiaticus*, the causal agent of the Asian form of citrus huanglongbing (HLB), was consistently identified in all trees exhibiting fruit discoloration and deformation. In contrast, phytoplasmas were not detected in any symptomatic trees, while *Spiroplasma citri*, the causal agent of citrus stubborn disease, was identified in only four trees with symptomatic fruits and leaves. None of these pathogens were detected in the five asymptomatic trees. Sequencing of selected PCR products, BLAST search and phylogenetic analyses confirmed the presence of *Ca. L. asiaticus* in symptomatic trees. Overall, PCR detection demonstrated a strong association between *Ca. L. asiaticus* and fruit malformation and uneven coloration, confirming the presence and spread of HLB in mandarin orchards of the Siyahoo region.

Key words: Citrus, Hormozgan, Huanglongbing, PCR

مقاله پژوهشی

بررسی همراهی پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی محدود به آوند آبکشی با علائم بدشکلی و رنگ‌گیری غیرطبیعی میوه در درختان نارنگی سیاهو (*Citrus reticulata* cv. Siyahoo)

محمد مهدی فقیهی¹، عبدالنبی باقری²، مجید عسکری سیاهویی³، سیاوش سماوی⁴، محسن امیری مزرائی⁵، نازنین سادات

عبادی⁶

1 و 6: بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و

ترویج کشاورزی، زرقان، ایران

2، 3: بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش

و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

4: بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

5: بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

چکیده

در دهه اخیر در درختان نارنگی منطقه سیاهو در استان هرمزگان علائم بدشکلی و رنگ‌گیری غیرطبیعی در میوه‌ها مشاهده شده که خسارت اقتصادی زیادی را به باغداران وارد کرده است. به‌منظور بررسی نقش پروکاریوت‌های محدود به آوند آبکشی شامل *Candidatus Liberibacter asiaticus*، *Candidatus Phytoplasma spp.* و *Spiroplasma citri* با این علائم، از 40 درخت دارای علائم و پنج درخت بدون علائم، نمونه‌برداری از میوه، دم‌میوه و برگ‌های اطراف میوه انجام شد. استخراج DNA کل از دم‌میوه و رگبرگ میانی انجام و ردیابی مولکولی این بیمارگرها با آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. در همه درختانی که در میوه آن‌ها علائم رنگ‌گیری غیرطبیعی و بدشکلی وجود داشت، باکتری *Ca. L. asiaticus*، عامل فرم آسیایی بیماری هوانگلونگ‌بینگ مرکبات (میوه‌سبز مرکبات)، ردیابی شد. در نمونه‌های دارای علائم، نتیجه ردیابی فیتوپلازما منفی بود و تنها در چهار درخت، *Spiroplasma citri* عامل استابورن مرکبات، به همراه *Ca. L. asiaticus* ردیابی شد. در هیچ یک از پنج درخت بدون علائم، بیمارگرهای نامبرده ردیابی نشدند. با تعیین توالی برخی از قطعات تکثیر شده در PCR، جستجو با برنامه بلاست و آنالیز تبارزایی، وجود گونه *Ca. L. asiaticus* در درختان دارای علائم تایید شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که باکتری *Ca. L. asiaticus* با علائم رنگ‌گیری غیرطبیعی و بدشکلی میوه در درختان نارنگی سیاهو همراه می‌باشد و این نشان‌دهنده گسترش بیماری میوه‌سبز مرکبات در این منطقه است.

واژه‌های کلیدی: مرکبات، هرمزگان، هوانگلونگ‌بینگ، PCR

مقدمه

نارنگی محلی سیاهو به‌عنوان یک محصول منحصر به فرد در منطقه سیاهو در استان هرمزگان، اهمیت ویژه‌ای در اقتصاد خانوارهای این منطقه دارد. در سال‌های اخیر در برخی از درختان نارنگی در این منطقه علائم بدشکلی، عدم تقارن، بدمزه شدن توام با تغییر رنگ غیر طبیعی در میوه‌ها مشاهده شده که منجر به کاهش شدید کیفیت میوه، عدم بازاریابندی و حتی غیرقابل برداشت شدن آن توسط باغداران شده است. روند گسترش این علائم احتمال نقش عوامل بیماری‌زای زنده را در بروز آن پررنگ‌تر می‌کند. علائم ایجاد شده در این درختان شبیه به علائم ناشی از بیماری‌هایی نظیر هوانگلونگ‌بینگ (Huanglongbing = HLB) یا همان میوه‌سبز مرکبات ناشی از *Candidatus Liberibacter spp.* استابورن مرکبات ناشی از *Spiroplasma citri* و همچنین بیماری‌های فیتوپلاسمایی می‌باشد.

بیماری میوه‌سبز مرکبات ناشی از سه گونه باکتری *Ca. L. americanus*، *Ca. L. africanus*، *Liberibacter asiaticus* بیماری مهم و خسارت‌زای مرکبات در بسیاری از نقاط دنیا می‌باشد که باعث کاهش محصول درختان و در نهایت نابودی آن‌ها می‌گردد. این باکتری‌ها در شرایط طبیعی با دو گونه پسیل به نام‌های *Diaphorina citri* (ناقل فرم‌های آسیایی و آمریکایی) و *Trioza erytrea* (ناقل فرم آفریقایی) منتقل می‌شوند. بیماری HLB با گسترش به برزیل و آمریکا که حدود یک سوم مرکبات دنیا را تولید می‌کنند اهمیت ویژه‌ای یافته است (Bové, 2006). پسیل ناقل فرم آسیایی بیماری، *D. citri*، اولین بار در سال 1997 از ایران گزارش شد (Bove et al., 2000). در ایران، در سال 1387 در بدن پسیل‌های جمع‌آوری شده و در نمونه‌های گیاهی شامل پرتقال‌های محلی و والنسیا در استان‌های هرمزگان و سیستان و بلوچستان، *Ca. L. asiaticus*، عامل فرم آسیایی بیماری HLB، با آزمون‌های PCR مستقیم و nested-PCR برای

اولین بار ردیابی شد (Faghihi et al., 2009). در سال‌های بعد، فرم آسیایی این بیماری از استان‌های کرمان و فارس نیز گزارش شد (Salehi et al., 2012; Salehi and Mohkami et al., 2011). (Rasoulpour, 2016).

بیماری HLB علاوه بر علائمی که روی برگ‌ها و شاخه‌ها ایجاد می‌کند، روی میوه نیز علائمی را نشان می‌دهد. میوه‌های آلوده کوچک، نامتقارن و ترش‌مزه‌تر بوده که دلیل آن اسیدیته‌ی بالاتر و قند پایین‌تر می‌باشد (Dala-Paula et al., 2019). تشکیل میوه‌های ریز و بدشکلی که پوست آن‌ها در مقایسه با میوه‌های سالم سبز کم رنگ باقی می‌ماند، ریزش میوه قبل از بلوغ و سبز ماندن قسمت‌هایی از میوه از علائم دیگر بیماری است. در آلودگی شدید، بذور داخل میوه اغلب ریز، چروکیده، تیره و عقیم می‌شوند. علائم عمومی بیماری در مرکبات عبارتند از: زردی شاخساره، زردی رگبرگ و بافت‌های مجاور و در نهایت زردی یا حالت ماتلینگ و موزاییک در برگ، چرمی شدن، قاشقی شدن و علائم کمبود روی در برگ‌ها، ریزش قبل از موقع برگ‌ها، سرخسبکی، به گل رفتن خارج از فصل و ریزش شدید میوه، مرگ ریشه‌های فرعی، کاهش رشد و سرانجام مرگ درخت (Bové, 2006; da Graca, 1991).

بیماری استابورن یا ریزبرگی مرکبات ناشی از بیمارگر *Spiroplasma citri* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در دنیا و ایران می‌باشد. این بیماری اولین بار در ایران توسط کاکران و صمدی (1976) گزارش شده است و پس از آن محققین دیگری این بیماری را از استان‌های خوزستان، کرمان، هرمزگان، فارس، مازندران، بوشهر و سیستان و بلوچستان گزارش کرده‌اند (Rahimian and Habashi, 1992; Salehi et al., 1993). رحیمیان (1361) از تعدادی نمونه‌های پرتقال و گریپ‌فروت جمع‌آوری شده از باغ‌های استان کرمان، *S. citri* را جداسازی کرد. درختانی که عامل ریزبرگی مرکبات از آن‌ها جدا شده بود همه دارای میوه‌های کوچک و نامتقارن بودند. وجود این نوع میوه شاید بهترین نوع علائم برای تشخیص آلودگی احتمالی به استابورن در جنوب ایران باشد، ولی مطمئن‌ترین راه، جداسازی

بدشکلی و تغییر رنگ غیرطبیعی میوه در درختان نارنگی سیاهو انجام شد.

مواد و روش‌ها

شماره‌گذاری درختان و نمونه‌برداری

در پاییز سال 1395 از مناطق مختلف سیاهو شامل خرسین، زاکین، درگز، سغ، بنگالیان و فورفوج در استان هرمزگان بازدید به عمل آمد و در مجموع 40 درخت دارای علایم تغییر رنگ غیرطبیعی در میوه‌ها و پنج درخت بدون علایم شماره‌گذاری و مشخص شدند. از چهار طرف هر درخت، نمونه‌های دم‌میوه (از میوه‌های دارای علایم) و در تعدادی از درختان علاوه بر نمونه‌های دم‌میوه نمونه‌های برگ اطراف میوه‌ها جمع‌آوری و برای هر درخت به‌عنوان یک نمونه مرکب برای ردیابی پروکاریوت‌های محدود به آوند آبکشی شامل *Spiroplasma citri*, *Ca. Liberibacter spp.* و فیتوپلاسم‌ها به آزمایشگاه منتقل شد. بدین منظور از نمونه‌های مورد نظر در هر درخت به‌طور جداگانه استخراج DNA انجام شد.

ردیابی پروکاریوت‌های محدود به آوند آبکشی

استخراج DNA، آزمون‌های PCR معمولی و nested-PCR

استخراج DNA کل از دم‌میوه (شکل 3) و رگبرگ میانی با استفاده از روش CTAB تغییریافته (Doyle and Doyle, 1990) انجام شد.

ردیابی پروکاریوت‌های محدود به آوند آبکشی شامل *S. citri*، *Ca. L. asiaticus* و فیتوپلاسم‌ها در DNA به‌دست آمده از نمونه‌های گیاهی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن‌ها (جدول 1) با روش‌های PCR معمولی و nested-PCR انجام شد.

جهت ردیابی باکتری *Ca. L. asiaticus* در نمونه‌های گیاهی، از آزمون PCR معمولی با آغازگرهای اختصاصی OI1/OI2c و A2/J5 استفاده شد (جدول 1). در آزمون nested-PCR از جفت

و کشت و یا ردیابی مولکولی *S. citri* می‌باشد (Rahimian, 1982).

درختان آلوده به بیماری، کوتولگی خفیف تا شدید، رشد متراکم شاخه‌ها، گل‌دهی بی‌موقع، ریزبرگی و فنجان‌ی شدن برگ‌ها را نشان می‌دهند. میوه‌ها کوچک و نامتقارن بوده و ریزش پیدا می‌کنند و بذور آن‌ها نیز چروکیده، تیره و عقیم می‌شوند (Bove, 2006).

تاکنون چندین فیتوپلاسم‌ها از گروه‌های جاروک نخود کبوتر (16SrIX)، زردی مینا (16SrI) و گروه جاروک بادام زمینی (16SrII) در کشورهایی مانند برزیل (Teixiera et al., 2008)، چین (Chen et al., 2009) و تایوان (Feng et al., 2015)، همراه با علایم شبیه به بیماری HLB در مرکبات گزارش شده‌اند.

با توجه به اینکه این بیماری‌ها به‌طور بالقوه می‌توانند تهدیدی جدی برای تولید نارنگی در منطقه سیاهو باشند در اولین گام ردیابی مولکولی این عوامل در درختان نارنگی دارای علایم، ضروری به‌نظر می‌رسید. در حال حاضر این علایم در باغ‌های منطقه سیاهو رو به گسترش هستند و یکی از دغدغه‌های اصلی باغداران منطقه شده‌اند. با بررسی نقش این عوامل در بروز بدشکلی، تغییر رنگ و کاهش کیفیت میوه و میزان وقوع آن‌ها، امکان اعمال برنامه‌های مدیریتی صحیح جهت مدیریت و کاهش این علایم فراهم می‌شود.

به‌طورکلی، این تغییرات در شکل، رنگ و عدم تقارن میوه در اثر تغییر در فیزیولوژی و هورمون‌ها به‌خصوص توزیع نابرابر ایندول-استیک اسید (IAA) و آبسزیک اسید (ABA) در گیاه و در بافت میوه اتفاق می‌افتد (Gaikwad et al., 2025) که ممکن است در بیماری‌های مهمی نظیر HLB، استابورن و برخی از بیماری‌های فیتوپلاسمایی، که اخیراً از روی مرکبات گزارش شده‌اند، نیز مشاهده شود.

با توجه به اینکه سبب‌شناسی دقیقی در مورد وقوع این علایم در میوه‌های نارنگی انجام نشده بود، این تحقیق با هدف تعیین ارتباط بیماری‌های فیتوپلاسمایی، میوه‌سبز و استابورن با علایم

همچنین، برای مشخص کردن جایگاه تاکسونومیکی جدایه‌های باکتری *Ca. L. asiaticus* مربوط به نارنگی سیاهو و تایید گونه باکتری، درخت تبارزایی براساس ترادف‌های به‌دست آمده از ژن *16S rRNA* ترسیم شد. بدین منظور، هم‌ردیفی توالی‌های به‌دست آمده از جدایه‌های مختلف و تعدادی از جدایه‌های موجود در بانک جهانی ترادف‌ها (ژن‌بانک) با استفاده از گزینه ClustalW در نرم افزار MEGA11 انجام و در نهایت درخت تبارزایی به روش آنالیز حداکثر درست‌نمایی (maximum likelihood) با استفاده از این نرم افزار (Tamura et al., 2021) ترسیم شد.

نتایج

علایم بیماری

اولین علایم مشخص در درختان نارنگی که در فصل میوه توجه را به خود جلب می‌کرد، بدشکلی و تغییر رنگ غیرطبیعی میوه بود. در این میوه‌ها، برخلاف اغلب میوه‌های طبیعی که تغییر رنگ به‌طور طبیعی انجام می‌گیرد، قسمت گل‌گاه به مدت زیادی سبز باقی مانده بود و در نتیجه تغییر رنگ (از سبز به نارنجی) فقط در قسمت بالای میوه و دم‌میوه مشاهده می‌شد و بسیاری از این میوه‌ها حالت دورنگ داشتند (شکل 1). چنین میوه‌هایی اغلب بدشکل و فاقد طعم و مزه طبیعی بودند. از علایم دیگر در میوه وجود بذره‌های قهوه‌ای، چروکیده و کوچک بود (شکل 1، E). درختانی که دارای علایم روی میوه بودند اغلب علایم زردی شاخه‌ها، حالت ماتلینگ در برگ، سرخسکیدگی و زوال را نشان می‌دادند (شکل 2).

ردیابی مولکولی پروکاریوت‌های محدود به آوند آبکشی

در PCR مستقیم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن *16S rRNA* (OI1/OI2c) و ژن اوپرون بتا که پروتئین‌های ریبوزومی را رمزگذاری می‌کند (A2/I5)، در تمام نمونه‌های DNA مربوط به 40 درخت با میوه‌های دارای علایم، قطعات

آغازگر OI1/OI2c در دور اول و جفت آغازگر CGO5R/CGO3F در دور دوم استفاده شد (جدول 1).

ردیابی *S. citri* در درختان نارنگی با استفاده از جفت آغازگر P58-6f/P58-4r با PCR معمولی و ردیابی فیتوپلاسماها با روش PCR معمولی با جفت‌آغازگر P1/P7 و روش nested-PCR با جفت‌آغازگرهای P1/P7 (دور اول) و R16F2n/R16R2 (دور دوم) انجام شد. در همه موارد برای انجام آزمون nested-PCR محصول به‌دست آمده از دور اول PCR به نسبت 1 به 10 رقیق و یک تا دو میکرولیتر از آن به عنوان DNA الگو در آزمون nested-PCR استفاده شد.

چرخه‌های گرمایی مورد استفاده در آزمون‌های PCR معمولی و nested-PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه 4 دقیقه در 94°C ، چرخه شامل 40 ثانیه در 94°C ، 50 ثانیه در 53°C تا 60°C (جدول 1) و 80 ثانیه در 72°C و سپس 10 دقیقه در 72°C بود. مقدار مواد لازم برای هر واکنش 20 میکرولیتری PCR معمولی و nested-PCR شامل 10 میکرولیتر ماستر میکس PCR (آپلیکون، دانمارک)، 6 میکرولیتر آب مقطرسترون، 1 میکرولیتر از هر آغازگر و 2 میکرولیتر DNA الگو بود.

تعیین توالی قطعات تکثیر شده در PCR و ترسیم درخت

تبارزایی

در مواردی که نتایج آزمون PCR مثبت بود، جهت تایید و صحت آزمایش، تعدادی از محصولات PCR به‌دست آمده تعیین توالی شدند. بنابراین، قطعات تکثیر یافته در واکنش‌های PCR با آغازگرهای OI1/OI2c (ژن *16S rRNA*) و A2/I5 (ژن اوپرون بتا) و P58-6f/P58-4r (ژن اسپیرالین) به‌طور مستقیم برای تعیین توالی به شرکت‌های مربوطه ارسال شدند. در نهایت قطعات DNA تعیین توالی شده با استفاده از نرم‌افزارهای Bio-Edit و DNA STAR (SeqMan) ویرایش و در مجموعه داده NCBI بلاست و مقایسه شد و صحت آزمایش مورد بررسی قرار گرفت.

قرار گرفتند و از سایر گونه‌های لیبریباکتر مانند جدایه‌های *Ca. L. asiaticus*، *Ca. L. solanacearum*، *Ca. L. africanus* و *Liberibacter crescens* جدا شدند (شکل 5).

بحث

در بازدیدهای انجام شده از باغ‌های نارنگی سیاهو در بسیاری از مناطق در فصل میوه‌دهی علائم عدم رنگ‌گیری کامل و وارونگی و بدشکلی میوه مشاهده شد. این علائم در برخی از درختان، همراه با زردی و حالت Blotchy mottle (حالت ماتلینگ و موزاییکی) و زردی رگبرگ‌ها (شکل 2) همراه بود و تعدادی از درختان شماره‌گذاری شده در سال‌های بعد دچار زوال و مرگ شده بودند. ردیابی پروکاریوت‌های محدود به آوند آبکشی در این گیاهان نشان داد که همراه با این علائم در درختان نارنگی، باکتری *Ca. L. asiaticus* ردیابی می‌شود و این باکتری در تمام درختانی که علائم تغییر رنگ در میوه را نشان می‌دهند وجود دارد. در مجموع در هر 40 درخت دارای علائم در میوه، باکتری *Ca. L. asiaticus* ردیابی شد، ولی در نمونه‌های درختان فاقد علائم، نتیجه ردیابی‌ها برای *Ca. L. asiaticus* منفی بود. با توجه به اینکه نتیجه ردیابی فیتوپلاسماها در درختان دارای علائم روی میوه، منفی بود و عامل استابورن هم تنها در چهار درخت ردیابی شد، می‌توان نتیجه گرفت که درختان نارنگی دارای میوه‌های با رنگ غیرطبیعی به فرم آسیایی بیماری HLB مبتلا هستند. معمولاً شناسایی بیماری HLB حتی از روی علائم تقریباً اختصاصی‌تر این بیماری، نظیر وجود علائم ماتلینگ و موزاییک در برگ‌ها و یا تک شاخه‌ی زرد در درخت نیز روش مطمئنی نیست و برای تایید آلودگی درخت، به ردیابی عامل بیماری براساس روش‌های مولکولی حساس نیاز است. بررسی تعداد نسبتاً زیاد نمونه و همبستگی علائم بیماری با نتایج آزمون‌های مولکولی در این پژوهش نشان داد که در منطقه سیاهو علائمی مانند عدم رنگ‌گیری و ایجاد حالت

قابل انتظار به ترتیب حدود 1160 جفت‌باز (شکل 4) و 700 جفت‌باز تکثیر شد که نشان‌دهنده وجود *Ca. L. asiaticus* همراه با این علائم در درختان بود. در آزمون nested-PCR با استفاده از جفت آغازگر OI1/OI2c در دور اول و جفت آغازگر CGO3F/CGO5R در دور دوم نیز قطعه مورد انتظار حدود 800 جفت‌بازی در تمامی نمونه‌ها تکثیر شد.

همچنین، در چهار درخت نارنگی دارای علائم، بیمارگر *S. citri* با روش PCR به‌طور مثبت ردیابی شد و در نتیجه حضور هر دو بیمارگر، با هم، در این چهار درخت اثبات شد. با وجود این، در نمونه‌های بررسی شده، نتیجه ردیابی فیتوپلاسماها در آزمون‌های PCR مستقیم و دومرحله‌ای منفی بود و همراهی فیتوپلاسماها با علائم بدشکلی و تغییر رنگ میوه‌های نارنگی اثبات نشد (جدول 2).

شناسایی مولکولی و تایید گونه کاندید عامل بیماری

تعدادی از محصولات PCR به‌دست آمده با آغازگرهای OI1/OI2c و A2/J5 تعیین توالی شدند و پس از ویرایش، تحت رس‌شمارهای مختلف (جدول 3) در ژن‌بانک ثبت شدند. جستجو با برنامه بلاست با هر یک از ترادف‌های به‌دست آمده نشان داد که این قطعه‌های تعیین ترادف شده با ترادف‌های متناظر آن در باکتری *Ca. L. asiaticus* بین 99 تا 100 درصد شباهت داشتند. برای تعیین جایگاه جدایه‌های *Ca. L. asiaticus* مربوط به نارنگی سیاهو، درخت تبارزایی براساس ترادف‌های ژن *16S rRNA* با نرم‌افزار MEGA11 رسم شد. درخت تبارزایی حاصل با استفاده از روش آنالیز آماری حداکثر درست‌نمایی بر اساس ترادف‌های به‌دست آمده از ژن *16S rRNA* از جدایه‌های نارنگی سیاهو، جدایه‌های ایرانی *Ca. L. asiaticus* و برخی از جدایه‌های موجود در ژن‌بانک نشان داد که جدایه‌های نارنگی سیاهو به همراه سایر جدایه‌های ایرانی *Ca. L. asiaticus* و جدایه‌های این باکتری از سایر نقاط دنیا مانند ژاپن، آمریکا، تایوان، اندونزی، مالزی، برزیل و مکزیک در یک گروه مجزا

مرکبات خیز ایران اثبات نشده است، ولی احتمال ردیابی فرم آمریکایی بیماری HLB (*Ca. L. americanus*) در آینده وجود دارد، زیرا فرم آمریکایی عامل بیماری با وقوع بسیار پایین در مناطقی از آسیا مانند چین و تایوان گزارش شده و ناقل آن همانند *Ca. L. asiaticus*، پسپیل آسیایی مرکبات (*Diaphorina citri*) است که در مناطق مرکبات خیز جنوب ایران شیوع دارد. به‌طورکلی، فرم آمریکایی بیماری اغلب در کشورهای نظیر آمریکا و برزیل و فرم آفریقایی بیماری در قاره آفریقا و برخی کشورهای آسیایی مانند عربستان و یمن گزارش شده‌اند (Bové, 2006). اگرچه علائم بیماری HLB در فرم‌های مختلف بیماری شبیه به هم هستند، ولی شدت بیماری‌زایی و میزان علائم ایجاد شده در دو گونه *Ca. L. asiaticus* و *Ca. L. africanus* تاحدی متفاوت است و زوال و مرگ درختان بر اثر *Ca. L. asiaticus* بیشتر گزارش شده است (Bové, 2006).

در درختان نارنگی سیاهو و برخی از مناطق استان کرمان نقش بیماری HLB به‌عنوان عامل مهم زوال، پررنگ است، ولی به‌طورکلی، مجموعه‌ای از عوامل غیرزنده و زنده در بروز زوال مرکبات نقش دارند و برای تمام مناطق، نمی‌توان این بیماری را عامل زوال دانست. بیمارگرهای گیاهی نظیر ویروس‌ها و پروکاریوت‌های محدود به آوند آبکشی می‌توانند موجب زوال مرکبات شوند. باوجوداین، در بسیاری از باغ‌های جنوب کشور، به‌خصوص در استان فارس، علت اصلی زوال و به‌طور خاص زوال سریع، مستقیماً ناشی از بیماری HLB نیست و در نتیجه نمی‌توان مدیریت واحدی برای همه باغ‌ها اتخاذ کرد.

مشاهدات سال‌های اخیر نشان داده‌اند که خسارت پسپیل آسیایی مرکبات روی نارنگی در منطقه سیاهو و توابع آن زیاد نیست و جمعیت آن در باغ‌های نارنگی پایین است. استفاده از روش nested-PCR برای ردیابی دقیق‌تر *Ca. L. asiaticus* در بدن پسپیل و در درختان دارای علائم و مشکوک به داشتن بیماری مناسب‌تر از PCR معمولی است و منفی‌های کاذب را کاهش می‌دهد. هرچند باید در انجام این روش نهایت دقت را اعمال کرد و کنترل منفی را لحاظ کرد تا خطر نتایج مثبت کاذب به

وارونگی رنگ و اغلب به همراه بدشکلی در میوه را می‌توان با بیشترین احتمال ناشی از بیماری HLB دانست. در پژوهش‌هایی که اخیراً انجام شده، علت ایجاد علائم روی میوه در بیماری HLB بررسی شده است. در این میان، توزیع غیریکنواخت IAA (ایندول-3-استیک اسید) و ABA (آبسزیک اسید) در میوه‌های دارای علائم، رشد و بزرگ‌شدن غیرطبیعی سلولی در لایه‌های زیر اپیدرم (هیپودرم)، بیان افتراقی ژن‌های مرتبط با فیتوهورمون‌ها و همچنین رونویسی پروتئین‌های شبه GH3 در سنتر اکسین، دلایل احتمالی پدیدار شدن میوه‌های بدشکل با رنگ‌گیری غیرطبیعی در درختان آلوده ذکر شده‌اند. توزیع نامتقارن IAA و ABA در بافت فلاودو (پوست بیرونی) و غدد روغنی میوه‌های دارای علائم درختان آلوده به HLB مشاهده شده است. علاوه بر این، میوه‌های بدشکل دارای علائم HLB در بخش بزرگی از همان میوه، سطوح بالاتری از IAA نسبت به طرف مقابل میوه در بافت فلاودو داشتند (Gaikwad et al., 2025).

با توجه به اینکه علائم بیماری HLB اختصاصی نیست و باکتری پراکنش غیریکنواختی در درخت دارد و غلظت آن ممکن است پایین باشد، استفاده از روش nested-PCR یا real-time PCR که حساسیت بیشتری نسبت به PCR معمولی دارد (با رعایت دقت در کار برای حداقل کردن جواب‌های مثبت کاذب) برای ردیابی *Ca. L. asiaticus* در درختانی که در دوره کمون بیماری هستند اهمیت زیادی دارد (Faghihi et al., 2014). همچنین، بر اساس پژوهش‌های انجام شده، نمونه‌برداری از ریشه درختان برای ردیابی سریع‌تر و زود هنگام عامل بیماری می‌تواند اهمیت زیادی داشته باشد (Braswell et al., 2020).

ردیابی مولکولی عامل بیماری با آغازگرهای A2/J5 مربوط به دو گونه *Ca. L. asiaticus* و *Ca. L. africanus* و تعیین توالی قطعه حدود 700 جفت‌بازی حاصل از PCR و سپس جستجو با برنامه بلاست نشان داد که در نمونه‌های نارنگی مورد بررسی در منطقه سیاهو تنها گونه *Ca. L. asiaticus* وجود دارد. تا به حال وجود فرم آفریقایی بیماری در منطقه سیاهو و سایر نقاط

مشکلات ردیابی *S. citri* با PCR ممکن است نتیجه منفی کاذب را در مورد بسیاری از درختان نشان دهد و در کنار ردیابی مولکولی استفاده از روش‌های سرولوژیک و کشت باکتری *S. citri* از درختان مشکوک نیز برای تشخیص قطعی درختان آلوده به استابورن ضرورت دارد. همچنین، استفاده از روش nested-PCR می‌تواند منفی‌های کاذب را به حداقل برساند.

همراهی دو بیمارگر در آوند آبکشی و برهمکنش این دو می‌تواند روی روند علائم و یا گسترش زوال درختان نارنگی تاثیرگذار باشد و این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر دارد. علاوه بر این، در بسیاری از این درختان پوسیدگی ریشه‌ها و علائم ساقه آبله‌ای نیز مشاهده شد. علائم ساقه آبله‌ای در تعدادی از بیماری‌های ویروسی و ویرویدی در مرکبات مشاهده می‌شود و در نتیجه احتمال وجود سایر بیمارگرها به همراه *Ca. L. asiaticus* حداقل در تعدادی از درختان نارنگی وجود دارد. سماوی و همکاران ویروید کوتولگی رازک (*Hop stunt viroid*) را در درختان نارنگی سیاهو ردیابی و گزارش کردند (Samavi *et al.*, 2018). مطالعه برهمکنش *Ca. L. asiaticus* با سایر بیمارگرها از جمله *S. citri*، بیمارگرهای قارچی ریشه، ویرویدی و ویروسی می‌تواند زمینه‌ای برای مطالعات آتی فراهم کند.

حداقل برسد (Faghihi *et al.*, 2014). به‌طورکلی، وقوع و پراکندگی بیماری HLB در درختان نارنگی سیاهو نشان می‌دهد که طی سالیان گذشته، بیماری HLB، علاوه بر انتقال طبیعی با پسپل آسیایی مرکبات، بیشتر به‌وسیله پیوندک یا جابه‌جایی نهال آلوده در منطقه گسترش یافته باشد. بنابراین، از احداث نهالستان در مناطق آلوده باید دوری شود و اقدامات قرنطینه‌ای به‌منظور جلوگیری از انتقال نهال و پیوندک‌های آلوده به مناطق سالم انجام و از نهال‌های سالم و گواهی شده استفاده شود.

تاکنون چندین فیتوپلازما از گروه‌های مختلف همراه با علائم شبیه به بیماری HLB از برزیل (Teixiera *et al.*, 2008)، چین (Chen *et al.*, 2009) و تایوان (Feng *et al.*, 2014) روی مرکبات گزارش شده‌اند. عدم ردیابی فیتوپلازما در درختان نارنگی دارای علائم بیماری HLB روی میوه با روش nested-PCR نشان داد که فیتوپلازماها در علائم ایجاد شده روی ایجاد تغییر رنگ غیرطبیعی میوه نارنگی سیاهو نقشی ندارند.

اخیراً در جنوب استان کرمان بیماری زوال مرکبات در درختان پرتقال، گریپ‌فروت و نارنگی روی پایه بکرایی مشاهده شده است. نتایج تحقیقات انجام شده نشان داد که پروکاریوت‌های *Ca. L. asiaticus* و *Ca. Phytoplasma aurantifolia* به صورت با هم یا به تنهایی با این بیماری همراه هستند (Alizadeh *et al.*, 2017).

در چهار درخت نارنگی با میوه‌های دارای علائم، آلودگی به *S. citri* به همراه *Ca. L. asiaticus* وجود داشت. وقوع و گسترش بیماری استابورن در مرکبات جنوب کشور در استان‌های فارس و کرمان قبلاً گزارش شده است. در مناطق مختلف مرکبات کاری استان هرمزگان نیز علائم بیماری استابورن شامل کاهش رشد، ریزبرگی و حالت جمع شدن و راست ایستادن و نوک تیز شدن برگ‌ها به همراه ریزش میوه مشاهده شده است.

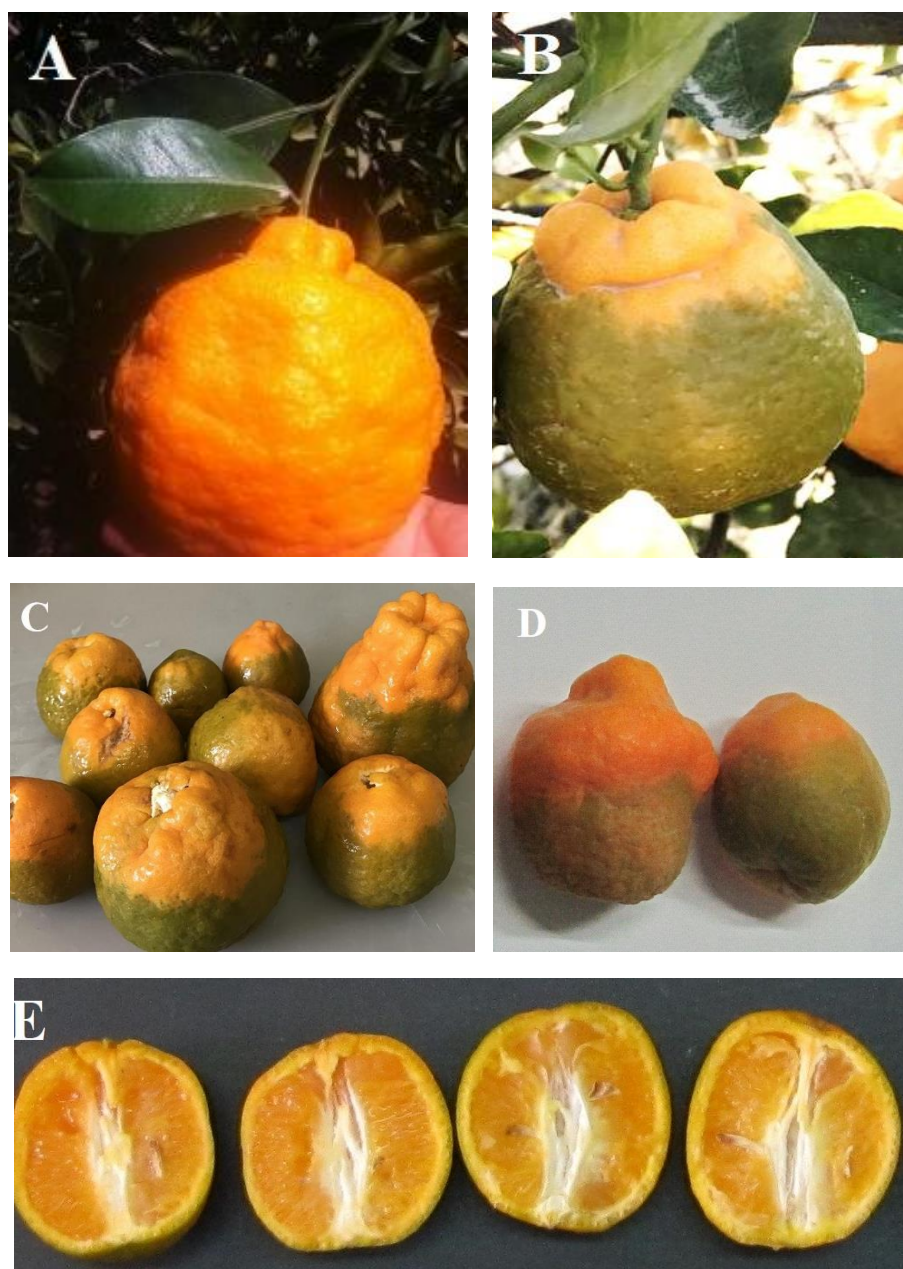
جدول 1: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمون‌های PCR معمولی و nested-PCR برای ردیابی *Spiroplasma .Ca. Liberibacter asiaticus* و *citri* و فیتوپلاسما

Table 1: Specifications of primers employed in conventional PCR and nested-PCR assays for detecting *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Spiroplasma citri*, and phytoplasmas.

نام آغازگر Primer name	ترادف Sequence	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) Annealing (°C)	اندازه قطعه تکثیر شونده (جفت‌باز) Amplicon size (bp)	ناحیه هدف Target	میکروارگانسیم Microorganism	منبع Reference
O1I	5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3'	56	1160	16S rDNA	Las*	Jagoueix <i>et al.</i> 1996
O12c	5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'					
CGO3F	5'- RGGGAAAGATTTTATTGGAG-3'	56	800 (nested-PCR)		Las	Zhou <i>et al.</i> 2007
CGO5R	5'-GAAAATAYCATCTCTGATATCGT-3'					
A2	5'- TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3'	60	669 (Laf)	β-operon	Las, Laf	Hocquellet <i>et al.</i> 1999
J5	5'- ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3'		703 (Las)			
P1	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT- 3'	53	1800	23S & 16S rRNA	Phyt	Deng & Hiruki, 1991; Schneider <i>et al.</i> , 1995
P7	5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT- 3'					Lee <i>et al.</i> .1995
R16F2n	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	55	1250 (nested-PCR)	16S rRNA	Phyt	
R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'					
P58-6f	GCGGACAAATTAAGTAATAAAAAGAGC -3 5'-	56	450	Putative P58 adhesin-like gene	Spir	Yokomi <i>et al.</i> , 2008
P58-4r	'5- GCACAGCATTGCCAACTACA -3'					

Las* :*Ca. L. asiaticus*; Laf: *Ca. L. africanus*; Phyt: Phytoplasma; Spir: *Spiroplasma citri*

بررسی همراهی پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی محدود به آوند آبکشی با علائم بدشکلی و رنگ‌گیری غیرطبیعی میوه در درختان نارنگی سیاهو



شکل 1: A، میوه سالم نارنگی سیاهو؛ B، C و D، علائم بدشکلی همراه با رنگ غیرطبیعی در میوه نارنگی سیاهو E: میوه‌های نامتقارن با بذرهای کوچک، تیره و چروکیده.

Figure 1: A, Healthy-PCR negative Siyahoo mandarin fruit; B, C, and D: Symptoms of malformation accompanied by abnormal coloration on Siyahoo mandarin fruits; E, Asymmetrical fruits with small, dark, and shriveled seeds.



شکل 2: سمت راست: درخت نارنگی سیاهو دارای علائم زوال، سرخشکیدگی و زردی برگ‌ها. سمت چپ: برگ‌های نارنگی سیاهو دارای علائم رگبرگ زردی و Blotchy mottle در اثر بیماری HLB.

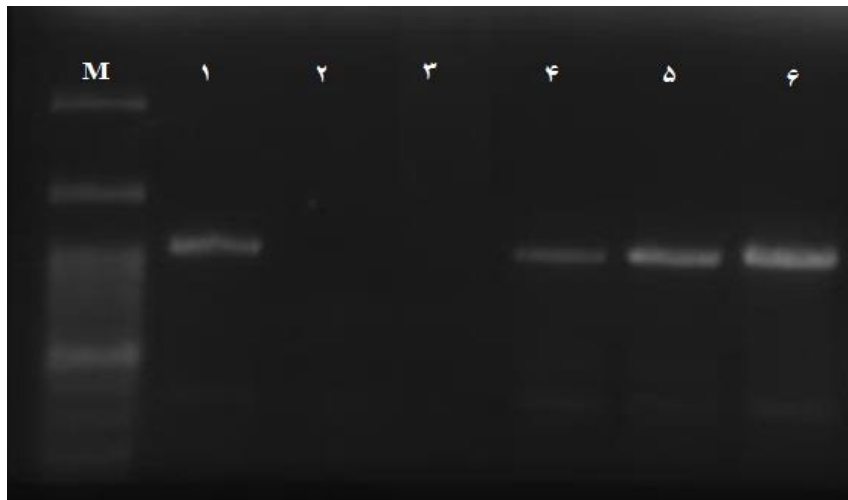
Figure 2: Right: Siyahoo mandarin tree showing symptoms of decline, dieback, and leaf chlorosis. Left: Siyahoo mandarin leaves exhibiting vein chlorosis and blotchy mottle caused by HLB disease.



شکل 3: راست، میوه نارنگی دارای رنگ غیرطبیعی؛ چپ: دم میوه از یک میوه دارای علائم برای استخراج DNA و ردیابی پروکاریوت‌های محدود به آوند آبکشی در آزمون PCR.

Figure 3: Right: Mandarin fruit with abnormal coloration; Left: Peduncle of symptomatic fruit used for DNA extraction and detection of phloem-limited prokaryotes via PCR assay.

بررسی همراهی پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی محدود به آوند آبکشی با علائم بدشکلی و رنگ‌گیری غیرطبیعی میوه در درختان نارنگی سیاهو



شکل 4: الکتروفورز محصول PCR (1160 جفت‌باز) تکثیر شده با جفت آغازگر اختصاصی OI1/OI2c باکتری *Ca. Liberibacter asiaticus* در ژل آگارز 1 درصد: راهک 1: کنترل مثبت؛ راهک‌های 2 و 3: درختان سالم؛ راهک‌های 4، 5 و 6: درختان دارای علائم در میوه؛ M: مارکر 3 کیلو جفت‌باز (SL7041، سیناکلون).

Figure 4: Electrophoresis of PCR products (1160 bp) amplified using the specific primer pair OI1/OI2c for *Ca. Liberibacter asiaticus* on a 1% agarose gel. Line 1: Positive control; line 2, 3: healthy mandarin; lines 4, 5, 6: trees with symptomatic fruits. M: 3 kb ladder (SL7041, Sinaclon).

جدول 2: نتایج آزمون‌های PCR معمولی (مستقیم) و nested-PCR در ردیابی پروکاریوت‌های محدود به آوند آبکشی در درختان نارنگی سیاهو با میوه‌های دارای علائم و میوه‌های بدون علائم.

Table 2: Results of direct-PCR and nested-PCR assays for the detection of phloem-limited prokaryotes in Siyahoo mandarin trees bearing symptomatic and asymptomatic fruits.

PCR Result						Plant organ	Symptom	Region	Tree number
<i>Ca. Phytoplasma</i>		<i>Spiroplasma citri</i>		<i>Ca. Liberibacter asiaticus</i>					
Nested-PCR	Direct-PCR	Nested-PCR	Direct-PCR	Nested-PCR	Direct-PCR				
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFC*	Siyahoo, Zakin	1
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFC	Siyahoo, Zakin	2
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFC	Siyahoo, Zakin	3
-	-	N	-	+	+	Peduncle/Midrib	AFC	Siyahoo, Zakin	4
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFC	Siyahoo, Zakin	5
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM*	Siyahoo, Zakin	6
-	-	N	+	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	7
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	8
-	-	N	+	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	9
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	10
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	11
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	12
-	-	N	-	+	+	Peduncle/Midrib	AFCM	Siyahoo, Zakin	13
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	14
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	15
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	16
-	-	N	-	+	+	Peduncle/Midrib	AFCM	Siyahoo, Zakin	17
-	-	N	+	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	18
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	19
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	20
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	21
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Zakin	22
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFC	Siyahoo, Dargaz	23
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFC	Siyahoo, Dargaz	24
-	-	N	+	+	+	Peduncle	AFC	Siyahoo, Dargaz	25
-	-	N	-	+	+	Peduncle/Midrib	AFC	Siyahoo, Dargaz	26
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Dargaz	27
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Dargaz	28
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Dargaz	29
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Dargaz	30

PCR Result						Plant organ	Symptom	Region	Tree number
<i>Ca. Phytoplasma</i>		<i>Spiroplasma citri</i>		<i>Ca. Liberibacter asiaticus</i>					
Direct-PCR	PCR مستقیم	nested-PCR	PCR مستقیم	nested-PCR	Direct-PCR				
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Dargaz	31
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Dargaz	32
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Dargaz	33
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Dargaz	34
-	-	N	-	+	+	Peduncle/Midrib	AFCM	Siyahoo, Dargaz	35
-	-	N	-	+	+	Peduncle/Midrib	AFCM	Siyahoo, Dargaz	36
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Dargaz	37
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Khersin	38
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Khersin	39
-	-	N	-	+	+	Peduncle	AFCM	Siyahoo, Khersin	40
-	-	N	-	-	-	Peduncle/Midrib	AS***	Siyahoo, Khersin	41
-	-	N	-	-	-	Peduncle/Midrib	AS	Siyahoo, Zaki	42
-	-	N	-	-	-	Peduncle/Midrib	AS	Siyahoo, Banglayan	43
-	-	N	-	-	-	Peduncle/Midrib	AS	Siyahoo, Forfoj	44
-	-	N	-	-	-	Peduncle/Midrib	AS	Siyaho (Segh)	45

N: آزمایش انجام نشد.

* علائم رنگ غیرطبیعی میوه (رنگ‌گیری غیرطبیعی میوه)، ** رنگ‌گیری غیرطبیعی و بدشکلی در میوه

*** میوه بدون علائم از درخت سالم

N: The test was not performed.

*AFC: Abnormal fruit coloration

**AFCM: Abnormal fruit coloration and malformation

***AS: Asymptomatic fruit from a healthy tree

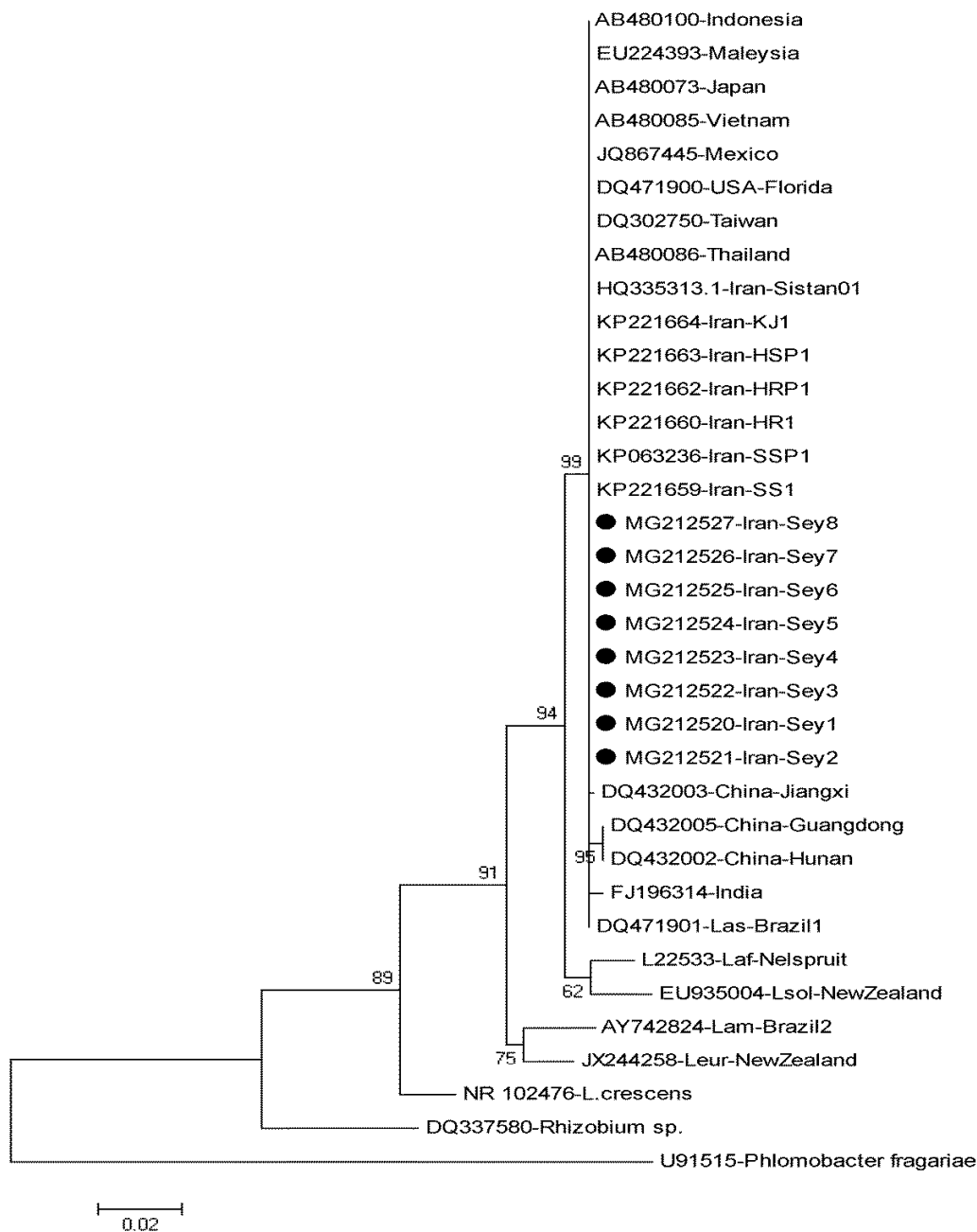
جدول 3: نام جدایه، محل جمع‌آوری، میزبان و رس‌شمارهای مربوط به ژن‌های تعیین توالی شده آن‌ها

Table 3: Isolate name, collection site, host, and accession numbers corresponding to their sequenced genes.

Isolate code	Organism Name	Collection site/ Host	Accession numbers	
			16S rRNA	Operon beta
Sey1	*Las	Siyahoo (Zakin)-Mandarine	MG212520	MG493276
Sey2	Las	Siyahoo (Zakin)-Mandarine	MG212521	MG493277
Sey3	Las	Siyahoo (Zakin)-Mandarine	MG212522	MG493278
Sey4	Las	Siyahoo (Zakin)-Mandarine	MG212523	MG493279
Sey5	Las	Siyahoo (Zakin)-Mandarine	MG212524	MG384706
Sey6	Las	Siyahoo (Zakin)-Mandarine	MG212525	MG384707
Sey7	Las	Siyahoo (Zakin)-Mandarine	MG212526	MG384708
Sey8	Las	Siyahoo (Zakin)-Mandarine	MG212527	MG384709
SC1_Siyahoo	**Sc	Siyahoo (Zakin)-Mandarine	-	-

*Las: *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Sc: *Spiroplasma citri*. -: تعیین توالی انجام نشده یا نتایج تعیین توالی خوب نبوده است.

-. Sequencing was not performed



شکل 5: درخت تبارزایی به دست آمده بر اساس توالی‌های ژن *16S rRNA* از جدایه‌های *Candidatus Liberibacter asiaticus* مربوط به نارنگی سیاهو و سایر جدایه‌های ایران و برخی از جدایه‌های موجود در ژن‌بانک که با نرم‌افزار MEGA11 به روش حداکثر درست‌نمایی با بوت‌استرپ 1000 مرتبه رسم شده است. ●: جدایه‌های باکتری *Ca. L. asiaticus* از نارنگی سیاهو در کنار سایر جدایه‌های *Ca. L. asiaticus* از ایران و سایر کشورها در یک گروه مجزا از سایر گونه‌های کاندید لیبریباکتر قرار گرفته‌اند. Las: *Ca. L. asiaticus*; Laf: *Ca. L. africanus*; Lam: *Ca. L. americanus*; Lsol: *Ca. L. solanacearum*; Leu: *Ca. L. europaeus*.

Figure 5: Phylogenetic tree constructed from *16S rRNA* sequences of *Candidatus Liberibacter asiaticus* isolates associated with Siyahoo mandarin, other Iranian samples, and reference sequences from GenBank. The tree was generated using MEGA11 software with the Maximum Likelihood method and 1,000 bootstrap replicates. ●: Isolates of *Ca. L. asiaticus* from Siyahoo mandarin, together with other Iranian and international *Ca. L. asiaticus* isolates, form a distinct cluster separate from other *Ca. Liberibacter* species. Las: *Ca. L. asiaticus*; Laf: *Ca. L. africanus*; Lam: *Ca. L. americanus*; Lsol: *Ca. L. solanacearum*; Leu: *Ca. L. europaeus*.

سپاس‌گزاری

شرایط انجام این پژوهش را مهیا کردند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

این پژوهش حاصل از انجام پروژه تحقیقاتی مصوب موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور به شماره 16-014-940097-62-24 می‌باشد. نویسندگان از رئیس و معاون بهبود تولیدات گیاهی سازمان جهاد کشاورزی استان هرمزگان به دلیل فراهم کردن هزینه‌های پروژه و حمایت‌های مالی و از رئیس مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان که

References

- ALIZADEH, H., F. QUAGLINO, M. AZADVAR, S. KUMAR, A. ALIZADEH, F. BOLBOLI, F., P. CASATI, and P. A. BIANCO, 2017. First report of a new citrus decline disease (CDD) in association with double and single infection by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' related strains in Iran. *Plant Disease* 101(12): 2145. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0670-PDN>
- BOVÉ, J. M., 2006. Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37. DOI: <https://doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828E>.
- BOVÉ, J. M., J. L. DANET, K. BANANEJ, N. HASSANZADEH, M. TAGHIZADEH, M. SALEHI, and M. GARNIER, 2000. Witches broom disease of lime (WBDL) in Iran. *Proceedings of the 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, Riverside, California. pp. 52.
- BRASWELL, W. E., J. W. PARK, P. A. STANSLY, ET AL, 2020. Root samples provide early and improved detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Citrus. *Scientific Reports* 10, 16982. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74093-x>
- CHEN, J. X. PU., X. DENG, S. LIU, H. LI, and F. CIVEROLO, 2009. A phytoplasma related to *Candidatus Phytoplasma asteri* detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99:236-242. DOI: 10.1094/PHYTO-99-3-0236.
- DA GRAÇA, J. V., 1991. Citrus greening disease. *Annual Review of Phytopathology* 29:109-136. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000545>
- DA GRAÇA J. V., 2008. Biology, history and world status of Huanglongbing. Texas A & M University-Kingsville, Citrus Center, Weslaco TX 78596, USA.
- DALA-PAULA, B. M., A. PLOTTO, J. BAI, J. A. MANTHE, E. A. BALDWIN, R. S. FERRAREZI, and M. B. A. GLORIA, 2019. Effect of huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. *Frontiers in Plant Science* 9:1976. DOI: 10.3389/fpls.2018.01976
- DENG, S. and C. HIRUKI, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiology Methods* 14:53-61. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D).
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15. DOI: <https://doi.org/10.2307/2419362>
- FAGHIHI, M. M., M. SALEHI, A. BAGHERI, and K. IZADPANAH, 2009. First report of citrus huanglongbing disease on orange in Iran. *Plant Pathology* 58:793. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02051.x>
- FAGHIHI, M. M., S. M. TAGHAVI, H. HAMZEHZARGHANI, and A. NIAZI, 2014. Comparison of the efficiency of conventional pcr, nested-PCR, real-time PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) methods for detection of the causal agent of citrus huanglongbing in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 50:237-255.
- FENG, Y. C, T. H. HUANG, and H. J SU, 2015. Detection and inoculation of peanut witches' broom phytoplasma (16SrII-A) and periwinkle leaf yellowing Phytoplasma (16SrI-B) in citrus cultivars in Taiwan. *Journal of Phytopathology* 163:364-376. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12331>
- GAIKWAD, P. N., G. S. SIDHU, N. S. BRAR, S. JAGVEER Y. T. · VIJAY, S. ANKUSH, AND M. POOJA, 2025. Roles of metabolites in fruit maturation, HLB-

- defense regulation and crosstalk between phytohormone signalling pathways in citrus. *Plant Growth Regulation* 105:619-653. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-025-01308-4>
- HOCQUELLET, A., J. M. BOVÉ, and M. GARNIER, 1999. Isolation of DNA from the uncultured “*Candidatus Liberibacter*” species associated with citrus Huanglongbing by RAPD. *Current Microbiology* 38: 176-182. DOI: <https://doi.org/10.1007/PL00006783>
- JAGOUEIX, S., J. M. BOVÉ, and M. GARNIER, 1996. PCR detection of the two ‘*Candidatus*’ *Liberibacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes* 10:43-50. DOI: <https://doi.org/10.1006/mcpr.1996.0006>
- LEE, I. M., A. BERTACCINI, M. VIBIO, and D. E. GUNDERSEN, 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85: 728-735. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-85-728>
- MOHKAMI, A., R. SATTARI, Z. LORI, A. EHSANI, A. NAZEMI, 2011. First report of citrus huanglongbing in the Orzooiyeh region in Kerman province (Orzooiyeh). *Iranian Journal of Plant Pathology* 47:105.
- RAHIMIAN, H. Citrus stubborn in Kerman province. 1982. *Iranian Journal of Plant Pathology* 18:12-19.
- RAHIMIAN, H. and M. HABASHI, 1992. Investigation on citrus stubborn in Mazandaran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 28:97-101.
- ROISTACHER, C. N, 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. *Handbook for detection and diagnosis*. FAO, Rome. 286 pp.
- RUANGWONG, O. and A. AKARAPISAN, 2006. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Citrus Huanglongbing disease. *Journal of Agricultural Technology* 2:111-120.
- SALEHI, M., H. RAHIMIAN, and K. IZADPANA, 1993. Citrus stubborn and its vector in the Fars province. In: *Proceeding of 11th Iranian Plant Protection Congress*. Rasht, Iran, pp 230.
- SALEHI, M., M. M. FAGHIHI, A. KHANCHEZAR, A. BAGHERI, and K. IZADPANA, 2012. Distribution of citrus huanglongbing disease and its vector in southern Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 48:195-208.
- SALEHI, M. and R. RASOULPOUR, 2016. First report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with Huanglongbing in Fars province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51: 563-566.
- SAMAVI, S., H. RAHIMIAN, M. AMIRI MAZRAIE, M. M. FAGHIHI, M. ASKARI SEYAHOOEI, and A. BAGHERI, 2018. Occurrence of Hop stunt viroid infecting mandarin (*Citrus reticulata* cv. Siyahoo) in Hormozgan province. In: *Proceedings of 23rd Iranian Plant Protection Congress*, 27-30 August, Gorgan, Iran.
- TAMURA, K., G. STECHER, and S. KUMAR, 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022-3027. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- TEIXEIRA, D. C., N. A. WULFF, E. C. MARTINS, E. W. KITAJIMA, R. BASSANEZI, A. J. AYRES, S. EVEILLARD, C. SAILLARD, and J. M. BOVÉ, 2008. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches' broom phytoplasma (16SrIX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98:977-984. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-9-0977>
- VILLECHANOUX, S., M. GARNIER, J. RENAUDIN, and J. M. BOVÉ, 1993. The genome of the non-cultured bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the *nusGrp1KAJL-rpoBC* gene cluster and the gene for a bacteriophage DNA polymerase. *Current Microbiology* 26:161-166. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01577372>
- YOKOMI, R. K., A. F. S. MELLO, M. SAPONARI, and J. FLETCHER, 2008. Polymerase chain reaction-based detection of *Spiroplasma citri* associated with citrus stubborn disease. *Plant Disease* 92:253-260. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-2-0253>
- ZHOU, L. J., D. W. GABRIEL, Y. P. DUAN, S. E. HALBERT, and W. N. DIXON, 2007. First report of dodder transmission of huanglongbing from naturally infected *Murraya paniculata* to citrus. *Plant Disease* 91:227. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-2-0227B>