

نشریه پژوهشی:

بررسی تغییرات غلظت عناصر غذایی در برگ مکزیکن لایم (*Citrus aurantifolia* Swingle) طی پیشرفت بیماری جاروکطاهره رئیسی^۱، مرتضی گل محمدی^{۲*} و علی اسدی کنگرشاهی^۳

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

کشاورزی، رامسر، ایران

۲. دانشیار، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، رامسر، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۱۲)

چکیده

بیماری جاروک مکزیکن لایم، که توسط *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* ایجاد می‌شود، مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید این محصول در مناطق جنوبی ایران است. این پژوهش با هدف بررسی تغییرات غلظت عناصر غذایی در برگ نهال‌های ریشه‌دار مکزیکن‌لایم آلوده‌شده با فیتوپلازما و مکزیکن‌لایم سالم طی پیشرفت بیماری (۹۰-۳۳۰ روز) و امکان جداسازی نهال‌های سالم و آلوده تحت شرایط گلخانه‌ای انجام گرفت. بدین‌منظور، تعدادی برگ از نهال‌های آلوده و سالم در بازه‌های زمانی ۹۰، ۱۵۰، ۲۱۰، ۲۷۰ و ۳۳۰ روز پس از آلوده‌سازی نمونه‌برداری شد و غلظت عناصر غذایی شامل نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، بور، آهن، منگنز، روی و مس طی پیشرفت بیماری در برگ گیاهان اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد آلودگی به فیتوپلازما منجر به کاهش معنی‌دار غلظت نیتروژن، کلسیم، بور و منگنز و افزایش معنی‌دار غلظت فسفر، پتاسیم، منیزیم، آهن و روی در برگ گیاهان آلوده شد. غلظت مس در برگ گیاهان آلوده در مقایسه با گیاهان سالم تغییر معنی‌داری نداشت. به علاوه، نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد بر اساس غلظت عناصر غذایی نمی‌توان گیاهان آلوده و سالم را در مراحل اولیه نمونه‌برداری (قبل از ظهور علائم ظاهری بیماری) جداسازی نمود، اما با ظهور علائم ظاهری بیماری و پیشرفت بیماری، آنالیز مولفه اصلی قادر به جداسازی گیاهان آلوده از گیاهان سالم بود. به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر بینشی جدید در مورد پاسخ مکزیکن‌لایم به بیماری‌گر فیتوپلازما فراهم نمود و می‌تواند در اتخاذ راهکارهایی در جهت بازتوانی و افزایش عمر اقتصادی درختان آلوده به جاروک مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه به مولفه‌های اصلی، عناصر غذایی پرمصرف، عناصر غذایی کم‌مصرف.

Evaluation of leaf nutrient changes in Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during the progression of witches' broom disease of lime (WBDL)Tahereh Raiesi¹, Morteza Golmohammadi^{2*} and Ali Asadi Kangarshahi³

1. Assistant Professor, Citrus and Subtropical Fruit Research Centre, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran

2. Associate Professor, Citrus and Subtropical Fruit Research Centre, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran

3. Assistant Professor, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran

(Received: Feb. 14, 2020 - Accepted: Nov. 02, 2020)

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, leaf nutrient profiling of the healthy and infected rooted Mexican lime during WBDL progression (90-330 days) as well as to distinguish the infected from the healthy Mexican limes under greenhouse condition. For this aim, the healthy and infected plants were sampled 90, 150, 210, 270 and 330 days after inoculation with phytoplasma and leaf nutrient concentrations including nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, boron, iron, manganese, zinc and copper were measured during WBDL progression. The results showed phytoplasmal infection mostly caused to a marked decrease in the concentration of nitrogen, calcium, boron, manganese, and significant increase in phosphorus, magnesium, potassium, iron, and zinc in the infected leaves. In Mexican lime leaves, copper concentration did not significantly change after inoculation with phytoplasma with respect to the healthy plants. In addition, the principal components analysis (PCA) based on the concentration of nutrients could not distinguish infected and healthy plants in the early stages of sampling (before the appearance of symptoms), but PCA revealed a clear distinction between the leaf nutritional profiles of healthy and infected plants after the appearance of symptoms during the progression of WBDL. In conclusion, this study provides new insights into the lime response to phytoplasma infection during the progression of WBDL and it can be useful in adopting strategies to improve and increase the economic efficiency of trees infected with WBDL.

Keywords: Macro nutrient, micro nutrient, PCA.

* Corresponding author E-mail: citrus_icri@areeo.ac.ir

مقدمه

فیتوپلاسمها، پروکاریوت‌های عامل بیماری گیاهی از دسته مالیکیوتها (Mollicutes) هستند که دیواره سلولی ندارند و آلودگی‌شان از نوع سیستمیک بوده و کنترل آن‌ها مشکل است. این عامل بیماری عمدتاً در آوند آبکش مستقر بوده و غالباً از طریق حشراتی که از شیره آوند آبکش تغذیه می‌کنند، به گیاه میزبان منتقل می‌شوند. تاکنون در هیچ پژوهش آزمایشگاهی امکان کشت فیتوپلاسم در محیط عاری از سلول محقق نشده و همین امر پیشرفت در زمینه مطالعه کنش‌های احتمالی فیتوپلاسم با گیاه میزبان و مطالعه صدمات وارده به گیاه میزبان را مشکل ساخته است (Christensen *et al.*, 2005).

فیتوپلاسمها 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 هستند. در میان رقم‌های لیموترش، مکزیکن لایم که از جایگاه خاصی در جنوب کشور برخوردار است (Raheb *et al.*, 2019)، بیشترین حساسیت به فیتوپلاسم را دارد. این در حالی است که پرشین لایم (Chung *et al.*, 2006) و لیموی لیسبون (Salehi *et al.*, 2005) به فیتوپلاسم متحمل هستند.

اثر گسترده *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* عامل ایجاد بیماری جاروک مکزیکن لایم (جاروک، Witches' Broom Disease of Lime، WBDL) منجر به کاهش سودآوری اقتصادی (بیش از ۷۰ درصد تاکنون) مکزیکن لایم 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 است (Raiesi *et al.*, 2019). در نهایت فیتوپلاسم در مدت ۳-۵ سال منجر به مرگ درختان آلوده می‌شود. علائم بیماری ممکن است در مدت ۱۲-۶ ماه در نهال‌های لایم آلوده شده 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).

گزارش‌هایی مبنی بر این وجود دارد که فیتوپلاسم در آوند آبکش تکثیر می‌شود و همراه جریان توده‌ای در آوند آبکش حرکت می‌کند (Lepka *et al.*, 1999). هم‌چنین، ضمن ایجاد محدودیت در انتقال از طریق آوند آبکش (به دلیل رسوب کالوز در آوند)، احتمالاً در بارگیری ساکارز در آوند آبکش نیز اختلال ایجاد می‌کند (Himeno *et al.*, 2014). بنابراین طبق فرضیه ذکر شده، این بیماری می‌تواند دارای یک اثر ثانویه نیز باشد. احتمالاً آلودگی به فیتوپلاسم بر توزیع متابولیت‌ها و عناصر غذایی 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 غذا ساز (Source) نهال سیب، به دنبال آلودگی به فیتوپلاسم تأیید شده است (Lepka *et al.*, 1999; Giorno *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2015).

عناصر غذایی نقشی انکارناپذیر در انجام بسیاری از واکنش‌های مهم در گیاه دارند. هم‌چنین، عناصر غذایی در بهبود کمیت و کیفیت محصول و نیز مقاومت گیاه در مقابل آفات و بیماری‌ها مؤثر هستند (Poschenrieder *et al.*, 2006). برای مثال یکی از پاسخ‌های کلیدی گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، تجمع اسید آمینه پرولین در گیاه است. همان‌طور که ذکر شده است، پرولین یک اسید آمینه بوده و برای سنتز آن به نیتروژن نیاز است. هم‌چنین، عناصر غذایی نقشی مهم در بسیاری از واکنش‌های گیاه ایفا می‌کنند و در ساختار بسیاری از آنزیم‌ها و یا برای فعال شدن برخی از آنزیم‌ها، ضروری هستند (Del Rio, 1983). حال سوالی که پیش می‌آید این است که آیا نحوه توزیع عناصر غذایی در گیاه نیز از فیتوپلاسم تأثیر می‌پذیرد؟ اطلاعات جامعی در مورد تغییرات عناصر غذایی طی پیشرفت بیماری در مکزیکن لایم آلوده شده به این فیتوپلاسم وجود ندارد. طبق بررسی منابع فقط یک پژوهش در این زمینه در کشور عمان و بر روی درختان باغی انجام شده است. طبق نتایج گزارش شده در این پژوهش غلظت سدیم، پتاسیم و

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 نهال‌ها 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 علاوه بر تیپیک بیماری را نشان می‌داد. لازم به ذکر است قبل از انجام پیوند، وجود بیماری در این نهال توسط آزمون پی‌سی‌آر نیز تأیید شد (شکل ۱، چاهک ۲ و ۳). برای این کار ابتدا DNA از رگبرگ میانی به وسیله محلول CTAB استخراج (Murray & Thomson, 1980) و سپس با کمک پی‌سی‌آر و به وسیله جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) و اختصاصی R16F2n/R16R2 (Gundersen & Lee, 1996) وجود عامل بیماری در نهال‌های آلوده و فقدان آن در نهال‌های سالم بررسی شد. در این مرحله، نیمی از قلمه‌ها با پیوندک آلوده به عامل بیماری و نیمی دیگر با پیوندک سالم پیوند و مایه‌زنی شدند. لازم به ذکر است که پیوندک‌ها فاقد جوانه فعال بودند. به منظور حفظ رطوبت، محل پیوند نهال‌های پیوندشده به با پوشش‌های پلاستیکی پوشیده شد.

یک ماه پس از آلوده‌سازی، آزمون پی‌سی‌آر به وسیله جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 و اختصاصی R16F2n/R16R2 برای مشخص شدن قلمه‌های آلوده شده به بیماری جاروک انجام و این عمل به صورت ماهیانه تکرار شد. در اول شهریور ۱۳۹۵، نتیجه آزمون پی‌سی‌آر در نهال مثبت بود (شکل ۱). از شش نهال آلوده مزبور جهت پایش عناصر غذایی 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

فسفر به طور معنی‌داری در برگ درختان آلوده به فیتوپلاسمای جاروک را نشان می‌دادند بیشتر از غلظت این عناصر در برگ درختان سالم و یا درختان آلوده فاقد علائم ظاهری بیماری جاروک بود. طبق پژوهش انجام شده غلظت کلسیم و بور در برگ درختان آلوده که علائم ظاهری جاروک را نشان می‌دادند کمتر از غلظت این دو عنصر در برگ درختان سالم بود (Al Ghaithi *et al.*, 2016). البته چون این پروژه با درختان رشد یافته تحت شرایط باغی انجام شد و شرایط باغ، شرایطی کاملاً کنترل شده نمی‌باشد و غلظت عناصر غذایی در درختان باغ، تابعی از فاکتورهایی از قبیل سن و به‌ویژه شرایط مدیریت آبیاری و تغذیه‌ای است می‌توان گفت تا کنون در محیط کنترل شده گلخانه‌ای و به ویژه طی پیشرفت بیماری جاروک مطالعه‌ای صورت نگرفته است. بنابراین در مطالعه حاضر تغییرات عناصر غذایی در برگ مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری به منظور درک بهتر واکنش متقابل بین فیتوپلاسمای جاروک و گیاه بررسی و امکان استفاده از این روش به همراه دیگر روش‌های شناسایی بیماری در تشخیص گیاهان آلوده در مراحل اولیه پیشرفت بیماری، بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

به منظور پایش تغییرات غلظت عناصر غذایی در برگ مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری جاروک، آزمایشی گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی طی یک دوره زمانی ۱۸ ماهه انجام شد. به این منظور در آذر سال ۱۳۹۴، ۸۰ قلمه یکنواخت از یک نهال سالم و عاری از بیماری مکزیکن لایم (*Citrus aurantifolia* Swingle) تهیه و در ۱۰ گلدان کشت شدند.

در اسفند سال ۱۳۹۴ پس از اطمینان از ریشه‌دهی قلمه‌ها و توزین هر یک از قلمه‌های ریشه‌دار شده، هر یک از آن‌ها به گلدان‌های پنج کیلوگرمی جداگانه پلاستیکی حاوی کوکوپیت و پرلایت اتوکلاو شده با نسبت ۲ به ۱ منتقل شدند. یک‌ماه پس 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

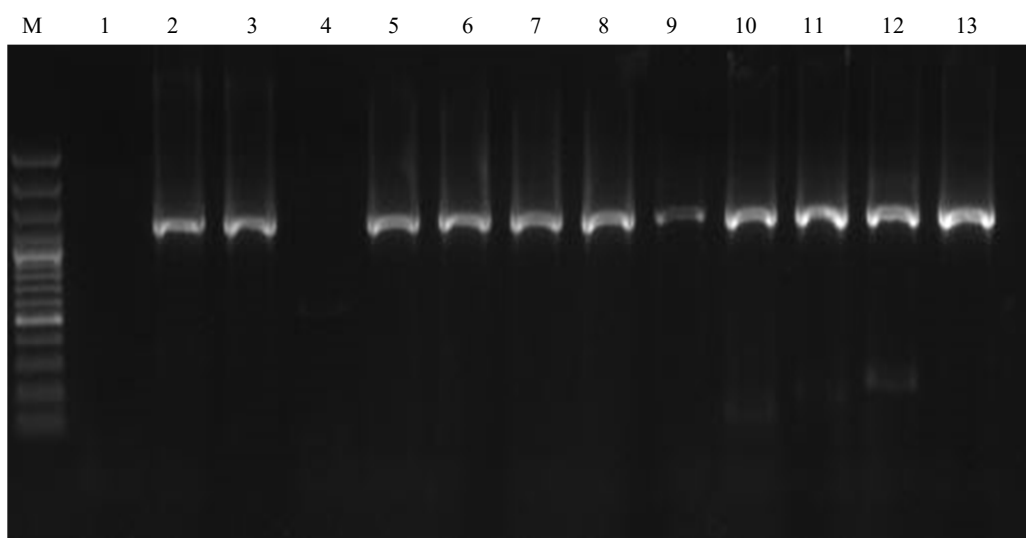
مکزیکن لایم (۹۰، ۱۵۰، ۲۱۰، ۲۷۰ و ۳۳۰ روز پس از مایه‌زنی) وجود تفاوت بین هر یک از عناصر غذایی مورد بررسی در برگ‌های نمونه‌برداری شده از شش گیاه آلوده و شش گیاه سالم توسط آزمون T-Test بررسی شد. در نهایت امکان تمایز نهال‌های آلوده از سالم بر اساس غلظت عناصر غذایی در برگ گیاهان با استفاده از مدل تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بررسی شد. کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار استاتیسیتیکا نسخه ۱۰ (STATISTICA 10) و مینی‌تب نسخه ۱۸ (MINITAB 18) 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 (شکل ۱، چاهک‌های ۱۳-۵) و در نمونه‌های کنترل مثبت که مربوط به نهالی است که پیوندک از آن گرفته شده بود، باند مورد نظر در ژل مشاهده شد (شکل ۱، چاهک‌های ۲ و ۳). در ادامه کار از نهال‌های مزبور جهت پایش تغییرات عناصر غذایی استفاده گردید.

(برگ سوم و چهارم شاخه‌های مختلف) در شاخساره شش گیاه آلوده و شش گیاه سالم برداشته شد. عناصر غذایی در نمونه‌های برگ خشک‌شده در آون، اندازه‌گیری شدند.

به منظور اندازه‌گیری عناصر غذایی، برگ‌های آون خشک‌شده از نهال‌های مکزیکن لایم با استفاده از آسیاب برقی پودر شدند. سپس، نمونه‌های پودر شده به روش خاکستر خشک هضم و مقدار فسفر، پتاسیم، کلسیم، آهن، منگنز، روی و مس موجود در نمونه‌های هضم شده تعیین شد (Kalra, 1998). کلسیم به روش کمپلکسومتری، پتاسیم به روش شعله‌سنجی با دستگاه فلیم‌فتومتر (مدل JENWAY PFP7)، فسفر به روش رنگ‌سنجی با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل JENWAY 6300) و عناصر کم‌مصرف با استفاده از دستگاه جذب اتمی (PERKINE LIMER 2380) اندازه‌گیری شدند (Kalra, 1998). غلظت عنصرهای غذایی پرمصرف در انساج‌های گیاهی بر حسب درصد (گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) و غلظت عناصر غذایی کم‌مصرف بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم برگ خشک محاسبه شد. در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری از برگ



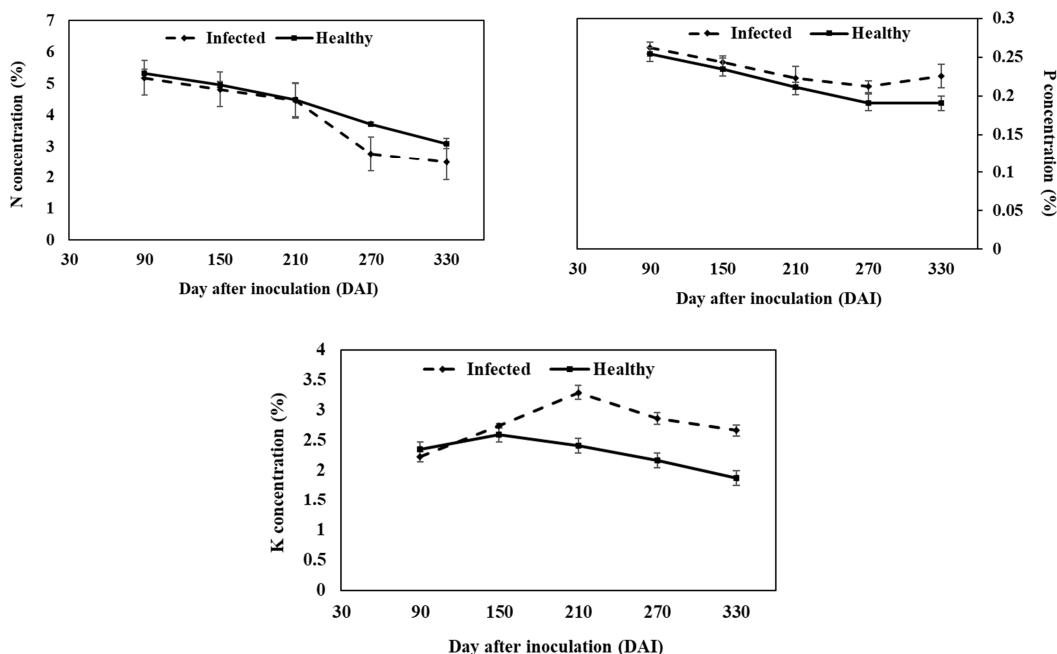
شکل ۱. محصول پی‌سی‌آر برگ‌های لیمو سه ماه پس از مایه‌زنی (چاهک‌های ۱۳-۵: نمونه‌ها پس از مایه‌زنی؛ چاهک ۱: کنترل منفی؛ چاهک ۴: کنترل مثبت و M: مارکر (۱۰۰ جفت باز)). باند مورد نظر (۱۲۰۰ جفت باز) در چاهک‌های ۱۳-۵ و ۲-۳ مشاهده شد.

Figure 1. PCR product of lime leaves obtained 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.

تغییرات غلظت پتاسیم در برگ گیاه آلوده در مقایسه با گیاه سالم در زمان‌های ذکر شده به ترتیب ۵/۱-، ۵/۶+، ۳۶/۷+، ۳۲/۲+ و ۴۲/۱+ درصد بود (شکل ۲).
 صرف‌نظر از تیمار اعمالی، غلظت کلسیم، منیزیم و بور در برگ لیموترش با گذشت زمان افزایش یافت (شکل ۳).
 بررسی نتایج نشان داد غلظت منیزیم در برگ لیموترش آلوده در مقایسه با برگ لیموترش سالم در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری به ترتیب ۲۸/۷، ۴۶/۰، ۹۲/۱، ۳۳۰ و ۴۸۲ درصد افزایش یافته است. همان طور که مشاهده می‌شود با گذشت زمان و با پیشرفت بیماری افزایش غلظت منیزیم در برگ بیشتر شده است (شکل ۳).
 بررسی نتایج نشان داد در تمام زمان‌های نمونه‌برداری، غلظت کلسیم و بور در برگ لیموترش آلوده در مقایسه با برگ لیمو سالم کمتر بود. مقدار کاهش غلظت کلسیم در برگ مکزیکن‌لایم بیمار در مقایسه با نهال‌های سالم این گیاه در زمان‌های اول تا پنجم نمونه‌برداری به ترتیب ۲/۶، ۱/۹، ۸/۵، ۲۰/۰ و ۸/۱ درصد و مقدار کاهش غلظت برای بور در زمان‌های ذکر شده به ترتیب ۱۷/۶، ۳۱/۲، ۳۱/۵، ۳۳/۴ و ۲۷/۸ درصد بود (شکل ۳).

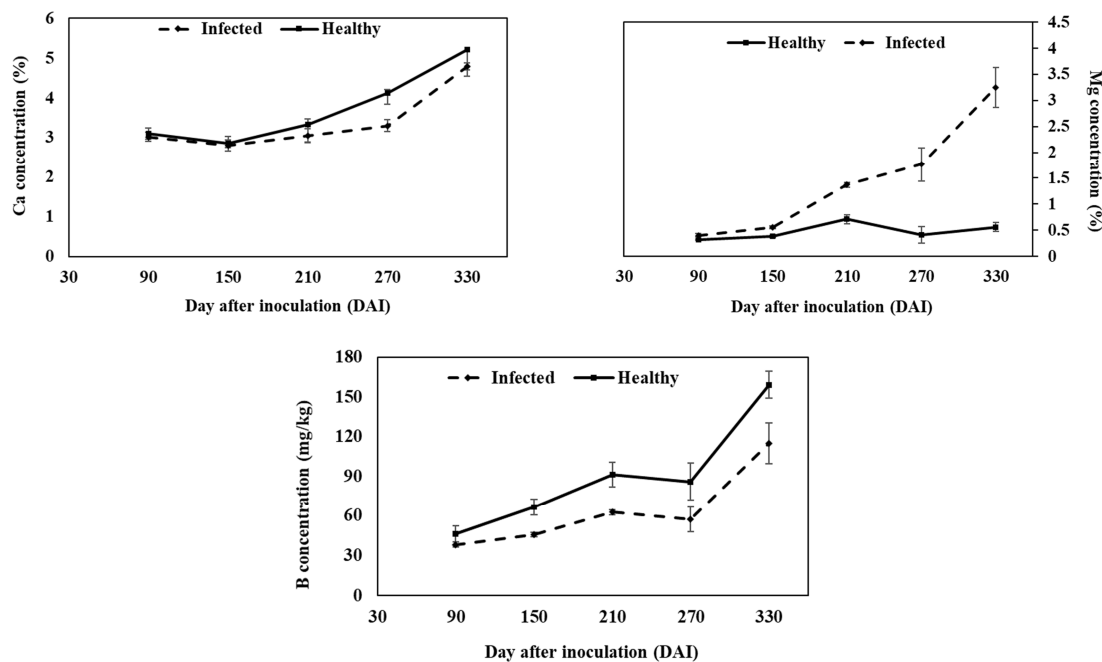
تغییرات غلظت عناصر غذایی در برگ مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری

همان‌طور که در شکل ۲ آورده شده، صرف‌نظر از تیمار، غلظت نیتروژن و فسفر در برگ لیموترش با گذشت زمان کاهش یافته است. نتایج نشان داد که غلظت فسفر در برگ لیموترش آلوده به جاروک چه قبل از ظهور علائم ظاهری و چه بعد از ظهور علائم ظاهری بیشتر از گیاه سالم بود. این در حالی بود که غلظت پتاسیم در مرحله قبل از ظهور علائم ظاهری در برگ لیموترش آلوده کمتر از برگ لیمو سالم و در مراحل پس از ظهور علائم ظاهری بیماری جاروک بیشتر از لیموترش سالم بود. به‌طور کلی، غلظت نیتروژن در برگ مکزیکن لایم آلوده در مقایسه با گیاه سالم در زمان‌های اول تا پنجم نمونه‌برداری به ترتیب ۲/۷، ۳/۰، ۰/۷۴، ۲۶/۰ و ۲۰/۰ درصد کاهش یافت (شکل ۲).
 افزایش غلظت فسفر در برگ مکزیکن‌لایم آلوده در مقایسه با برگ نهال سالم مکزیکن‌لایم در زمان‌های نمونه‌برداری اول تا پنجم به ترتیب ۳/۱، ۳/۷، ۵/۷، ۱۱/۴ و ۱۸/۳ درصد و



شکل ۲. تغییرات غلظت نیتروژن، فسفر و پتاسیم در برگ مکزیکن‌لایم طی پیشرفت بیماری جاروک. میانگین \pm انحراف استاندارد شش تکرار.

Figure 2. Changes of nitrogen (N), phosphorous (P) and potassium (K) concentration in the leaves of healthy and infected Mexican lime during progression of WBDL. Means \pm SE of six replicates.



شکل ۳. تغییرات غلظت کلسیم، منیزیم و بور در برگ مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری جاروک. میانگین \pm انحراف استاندارد شش تکرار.

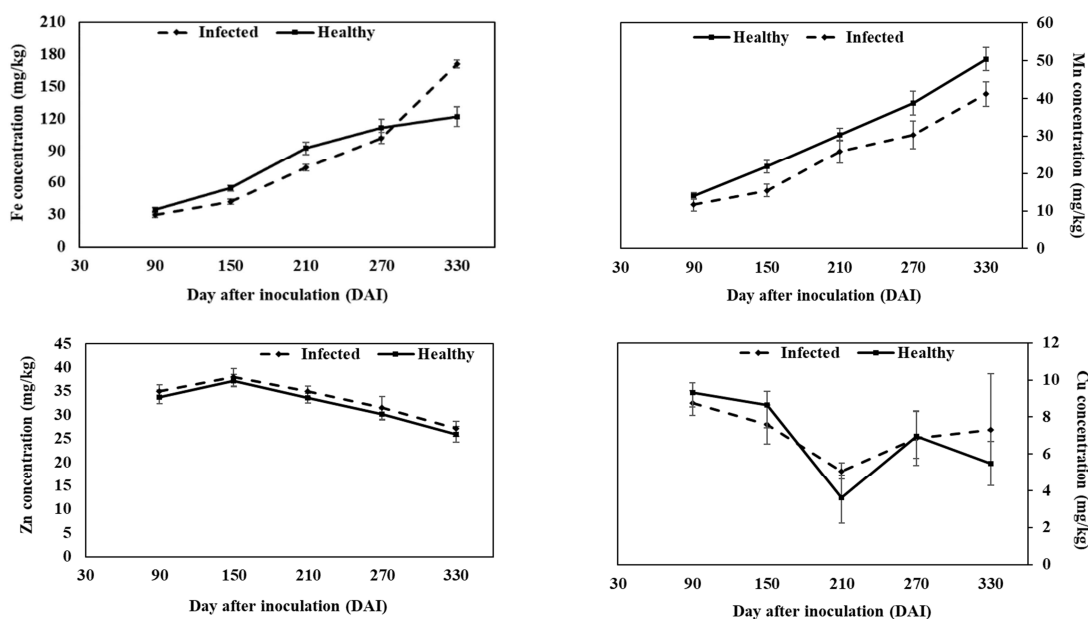
Figure 3. Changes of calcium (Ca), magnesium (Mg) and boron (B) concentration in the leaves of healthy and infected Mexican lime during progression of WBDL. Means \pm SE of six replicates

به ترتیب ۳/۶، ۲/۱، ۴/۱، ۴/۵ و ۴/۶ درصد بود. بررسی نتایج نشان داد در اکثر زمان‌های نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری بین غلظت مس در برگ لیموترش آلوده با لیموترش سالم مشاهده نشد (شکل ۵).

تحقیقات نشان داده است که فیتوپلازما، عامل بیماری جاروک، وزن خشک ریشه مکزیکن لایم را نسبت به وزن خشک بخش هوایی این گیاه بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد (Raieis *et al.*, 2019). بنابراین، سیستم به شدت آسیب‌دیده ریشه در این نهال‌ها به دنبال آلودگی به فیتوپلازما می‌تواند موجب کاهش جذب آب و عناصر غذایی و به دنبال آن تضعیف درخت شده و منجر به زوال این درختان شود. طبق منابع موجود، فیتوپلازما در مدت کمتر از ۵ سال منجر به مرگ درختان آلوده به جاروک می‌شود (Chung *et al.*, 2006).

گزارش شده است که از ماه چهارم آلوده‌سازی نهال‌ها، علائم تبییک بیماری جاروک شامل کوچک شدن اندازه برگ‌ها و دچار کلروز شدن این بافت‌ها، کاهش فاصله میانگره‌ها، از بین رفتن تیغ و ایجاد جست‌های نازک ثانویه در نهال‌های آلوده است (Raiesi *et al.*, 2019).

صرف‌نظر از تیمار اعمالی، با گذشت زمان غلظت آهن و منگنز در برگ لیموترش افزایش و غلظت روی کاهش یافته است (شکل ۵). نتایج نشان داد تا زمان چهارم نمونه‌برداری (۲۷۰ روز پس از آلوده‌سازی گیاه) غلظت آهن در برگ نهال‌های آلوده کمتر از برگ نهال‌های سالم و پس از آن غلظت آهن در برگ نهال‌های آلوده بیشتر از سالم بود. تغییرات غلظت آهن در برگ نهال‌های آلوده در مقایسه با سالم طی زمان‌های مختلف نمونه‌برداری به ترتیب ۱۵/۲-، ۲۳/۲-، ۱۹/۸-، ۸/۴- و ۴۰/۶ درصد بود. بررسی نتایج نشان داد غلظت منگنز در برگ نهال‌های آلوده در همه‌ی زمان‌های نمونه‌برداری بررسی شده کمتر از غلظت این عنصر در برگ نمونه‌های سالم بود. کاهش غلظت منگنز در برگ نهال‌های آلوده طی زمان‌های اول تا پنجم نمونه‌برداری به ترتیب ۱۷/۱، ۲۹/۴، ۱۴/۷، ۲۲/۱ و ۱۸/۴ درصد بود (شکل ۵). همچنین، بررسی نتایج نشان داد که غلظت روی در برگ لیموترش آلوده در همه‌ی زمان‌های نمونه‌برداری بیشتر از گیاه سالم بود. در زمان‌های اول تا پنجم نمونه‌برداری درصد تجمع غلظت روی در برگ گیاه آلوده در مقایسه با گیاه سالم



شکل ۴. تغییرات غلظت آهن، منگنز، روی و مس در برگ مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری جاروک. میانگین \pm انحراف استاندارد شش تکرار.

Figure 4. Changes of iron, manganese, zinc and copper concentration in the leaves of healthy and infected Mexican lime during progression of WBDL. Means \pm SE of six replicates

علایم ظاهری مکزیکن لایم‌های آلوده می‌تواند نشان‌دهنده برهم‌خوردن بالانس تغذیه‌ای در این گیاهان باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد غلظت عناصر فسفر، پتاسیم و منیزیم در برگ گیاهان آلوده بیشتر از مقادیر این عناصر در برگ گیاهان سالم بود. به‌علاوه، علایم ظاهری درختان مبتلا به جاروک شبیه علایم کمبود و یا بیش‌بود عناصر ریزمغذی شامل آهن، منگنز، روی و مس است. آنچه در پژوهش حاضر مشاهده شد حاکی از افزایش غلظت آهن، روی و مس در برگ گیاهان آلوده در مقایسه با گیاهان سالم بود. به دنبال آلودگی با فیتوپلازما، رشد مکزیکن لایم و مقدار وزن خشک آن‌ها کاهش یافت. به نظر می‌رسد در گیاهان آلوده سرعت کاهش رشد این گیاهان بسیار بیشتر از سرعت کاهش جذب فسفر، پتاسیم، منیزیم، آهن، روی و مس توسط این گیاهان باشد. بنابراین، غلظت این عناصر در برگ‌های آلوده افزایش یافته است. همچنین به‌تازگی پیشنهاد شده که تجمع مقادیر زیادی از فلزات در گیاهان را می‌توان به عنوان یک سازوکار دفاعی این گیاهان در برابر عامل بیماری‌ها قلمداد کرد (Poschenrieder *et al.*, 2006). بنابراین در این پژوهش، افزایش غلظت آهن، روی و مس و به ویژه افزایش غلظت آهن در زمان‌های نمونه‌برداری پایانی را می‌توان به نقش این عناصر در سازوکار دفاعی گیاهان ربط داد. در بسیاری از منابع ذکر شده که کمبود پتاسیم حساسیت به بیماری‌ها را در گیاهان افزایش می‌دهد (Huber *et al.*, 2012)، اما در مطالعه حاضر مشاهده شد که در گیاهان آلوده غلظت پتاسیم افزایش یافته است. لازم به ذکر است که نسبت پتاسیم به کلسیم از غلظت خود پتاسیم به تنهایی در مقاومت گیاه نسبت به عوامل بیماری‌زا مهم‌تر می‌باشد (Huber *et al.*, 2012). بررسی منابع نشان داد افزایش میزان پتاسیم در گیاه تا زمانی که میزان کلسیم در سطح بالایی نگه داشته شود، الزاماً به افزایش در میزان آلودگی گیاهان منجر نمی‌شود. اما در مطالعه حاضر مشاهده شد که به دنبال آلودگی به فیتوپلازما غلظت کلسیم در گیاه کاهش یافت و بنابراین نسبت پتاسیم به کلسیم در گیاهان آلوده (۰/۴۷) بیشتر از گیاهان سالم (۰/۲۹) بود و همین امر می‌تواند منجر به کاهش مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا گردد. از

علایم ظاهری مکزیکن لایم‌های آلوده می‌تواند نشان‌دهنده برهم‌خوردن بالانس تغذیه‌ای در این گیاهان باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد غلظت عناصر فسفر، پتاسیم و منیزیم در برگ گیاهان آلوده بیشتر از مقادیر این عناصر در برگ گیاهان سالم بود. به‌علاوه، علایم ظاهری درختان مبتلا به جاروک شبیه علایم کمبود و یا بیش‌بود عناصر ریزمغذی شامل آهن، منگنز، روی و مس است.

آنچه در پژوهش حاضر مشاهده شد حاکی از افزایش غلظت آهن، روی و مس در برگ گیاهان آلوده در مقایسه با گیاهان سالم بود. به دنبال آلودگی با فیتوپلازما، رشد مکزیکن لایم و مقدار وزن خشک آن‌ها کاهش یافت. به نظر می‌رسد در گیاهان آلوده سرعت کاهش رشد این گیاهان بسیار بیشتر از سرعت کاهش جذب فسفر، پتاسیم، منیزیم، آهن، روی و مس توسط این گیاهان باشد. بنابراین، غلظت این عناصر در برگ‌های آلوده افزایش یافته است. همچنین به‌تازگی پیشنهاد شده که تجمع مقادیر زیادی از فلزات در گیاهان را می‌توان به عنوان یک سازوکار دفاعی این گیاهان در برابر عامل بیماری‌ها قلمداد کرد

از سوی دیگر نتایج مطالعه قبلی نشان داد آلودگی به فیتوپلازما منجر به تجمع معنی‌دار کربوهیدرات و نشاسته در برگ مکزیکن لایم چه قبل و چه بعد از ظهور علائم ظاهری بیماری و نیز کاهش معنی‌دار این دو شاخص در ریشه نهال‌های مکزیکن لایم آلوده شد (Raiesi *et al.*, 2019). یون پتاسیم برای فعال‌سازی سنتز نشاسته مورد نیاز است و در مطالعه حاضر مشاهده شد که به دنبال آلودگی به فیتوپلازما غلظت پتاسیم در برگ مکزیکن لایم‌های آلوده در زمان آخر نمونه‌برداری ۲۵ درصد افزایش یافته که احتمالاً منجر به افزایش سنتز نشاسته در این برگ‌ها و سپس تجمع نشاسته در این بافت‌ها شده است. همچنین، طبق منابع موجود کاهش رشد و فتوسنتز و تجمع نشاسته و کربوهیدرات‌ها در برگ‌ها می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت مخازن این ترکیبات در شرایط کمبود عنصر بور باشد.

گیاهان در مواجهه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی، سیستم‌های دفاعی مختلفی را برای تنظیم گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS) و کاهش واکنش‌های اکسیداتیو تخریبی آن‌ها به کار می‌گیرند (Foyer *et al.*, 1994). یکی از ترکیبات کلیدی در افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش‌ها، آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو هستند. در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ نهال‌های آلوده در مقایسه با برگ گیاهان سالم افزایش یافته است (Raiesi & Golmohammadi, 2020). همچنین، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در برگ گیاهان آلوده نسبت به گیاهان سالم کاهش نشان داده است (Raiesi & Golmohammadi, 2020). سوپراکسید دیسموتاز دارای ایزومرهای مختلفی است که عنصر فلزی فعال‌کننده یا ساختمانی این ایزومرها متفاوت است. ایزومرهای مختلف آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شامل Fe-SOD؛ Mn-SOD؛ Cu,Zn-SOD هستند (Broadley, 2012). در واقع سنتز و یا فعال‌سازی ایزومرهای مختلف این آنزیم به قابلیت دسترسی فلزات ذکر شده بستگی دارد (Lastra *et al.*, 1982; Del Rio, 1983). مطابق با نتایج Zafari *et al.* (2012) در مکزیکن لایم آلوده به فیتوپلازما مقدار افزایش بیان ایزومرهای Mn-SOD و Fe-SOD

طرفی، غلظت نیتروژن، کلسیم، بور و منگنز در اکثر زمان‌های نمونه‌برداری در برگ‌های نهال‌های آلوده در مقایسه با برگ نهال‌های سالم کمتر بود.

کلسیم برای استحکام دیواره سلولی و بافت‌های گیاهی ضروری است. همچنین، کلسیم نقش ساختاری در پایداری غشا و سلول ایفا می‌کند. این نقش اولیه کلسیم بر پایداری غشا و دیواره سلولی، حاکی از نقش مهم یون کلسیم در افزایش مقاومت گیاهان در برابر عامل بیماری‌های گیاهی است. بررسی منابع نشان می‌دهد انتشار باکتری در درون بافت میزبان به وسیله آنزیم‌های هضم‌کننده پکتین آسان می‌گردد (Huber *et al.*, 2012). فعالیت آنزیم‌های هضم‌کننده پکتین عمده‌تاً با مقدار کلسیم در بافت گیاه رابطه معکوس دارد.

برهم‌خوردگی‌های سوخت و سازی ناشی از کمبود بور را می‌توان به نقش بور در سنتز دیواره سلولی مرتبط دانست. کمبود بور منجر به تغییرات ریخت‌شناسی و تغییرات در تمایز بافت‌ها در بسیاری گیاهان می‌شود. کاهش رشد شاخساره از علائم ظاهری اولیه کمبود بور در گیاهان است. در اکثر گیاهان دارای کمبود بور فاصله میانگره‌ها کم شده و گیاه حالت جارویی پیدا می‌کند (Srivastava, 2013).

نتایج قبلی نشان داد رنگ برگ مکزیکن لایم‌های آلوده به فیتوپلازما در مقایسه با رنگ برگ نهال‌های سالم روشن‌تر بود و مقدار رنگدانه‌های بررسی‌شده در تمام زمان‌های نمونه‌برداری چه قبل از ظهور علائم بیماری و چه بعد از ظهور این علائم در نهال‌های آلوده نسبت به نهال‌های سالم کمتر بود (Raiesi *et al.*, 2019). احتمالاً کاهش کلروفیل مشاهده شده می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز در برگ‌های آلوده به فیتوپلازما (Bertamini *et al.*, 2002) و یا اختلال در جذب و انتقال عناصر معدنی موجود در ساختار کلروفیل‌ها باشد. یکی از مهمترین عناصر غذایی دخیل در ساختار کلروفیل نیتروژن است بنابراین می‌توان احتمال داد که یکی از دلایل کاهش مقدار کلروفیل در برگ گیاهان آلوده می‌تواند ناشی از اختلال در جذب نیتروژن در برگ مکزیکن لایم آلوده، باشد.

نیز استفاده شد (شکل ۵). نتایج نشان داد که مولفه اول (متغیرهای اصلی در این مولفه شامل منگنز، آهن، کلسیم، روی، بور، نیتروژن و فسفر بودند) و دوم (متغیر اصلی در این مولفه پتاسیم و منیزیم بودند) به ترتیب ۶۶ و ۱۹ درصد تغییرات نمونه‌های گیاهان سالم و آلوده به جاروک را توجیه کردند.

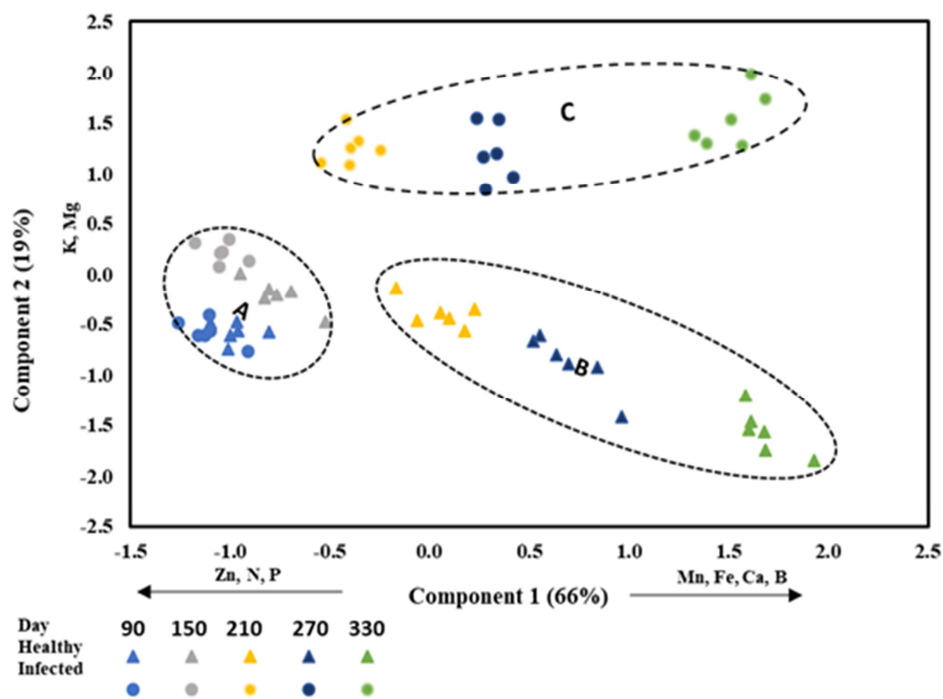
با بررسی شکل ۵ مشاهده شد که بر خلاف ترکیبات بیوشیمیایی (Raiesi et al., 2019)، با استفاده از غلظت عناصر غذایی نمی‌توان نهال‌های آلوده و سالم را در مراحل اولیه بیماری از یکدیگر تفکیک نمود اما با پیشرفت بیماری نهال‌های سالم و آلوده بر مبنای غلظت عناصر غذایی در دو گروه مجزا قرار می‌گیرند.

در مطالعه 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 مولفه‌های اصلی می‌توان گیاهان آلوده و سالم را بر اساس نوع اسید آمینه تجمع‌یافته در برگ این گیاهان جداسازی نمود (Mollayi et al., 2015).

نسبت به ایزومر Cu,Zn-SOD بیشتر بود. همچنین گزارش شده است که در شرایط کمبود منگنز، مقدار فعالیت SOD در برگ لیمون کاهش یافته است (Sevilla et al., 1984). این محققین، کاهش فعالیت SOD در شرایط محدودیت منگنز را به سهم بیشتر ایزومر Mn-SOD در مقایسه با ایزومر Fe-SOD در برگ لیمون مرتبط دانسته‌اند. مطابق با آنالیز عناصر معدنی در مطالعه حاضر، غلظت منگنز در برگ مکزیکن لایم‌های آلوده کمتر از مکزیکن لایم‌های سالم بود. بنابراین، کاهش فعالیت آنزیم SOD در برگ مکزیکن لایم آلوده می‌تواند ناشی از کمبود منگنز در برگ نهال‌های مکزیکن لایم بیمار باشد.

پایش عناصر غذایی با استفاده تجزیه به مولفه‌های اصلی

در پژوهش حاضر از تجزیه به مولفه‌های اصلی به منظور بررسی امکان تفکیک گیاهان سالم و آلوده به بیماری جاروک طی پیشرفت بیماری با استفاده از وضعیت عناصر غذایی در برگ گیاهان آلوده و سالم



شکل ۵. تجزیه به مولفه‌های اصلی غلظت عناصر غذایی در برگ گیاه سالم و آلوده مکزیکن لایم طی پیشرفت بیماری جاروک.
Figure 5. Principal component analysis (PCA) scores plot of nutrient concentrations in healthy and infected Mexican lime during progression of WBDL.

نتیجه‌گیری کلی

بسیار حائز اهمیت است. به طور کلی، این پژوهش بینشی جدید در مورد پاسخ مکزیکن لایم به عامل بیماری فیتوپلازما فراهم نموده و در اتخاذ راه‌کارهای تغذیه‌ای در جهت بازتوانی و افزایش عمر اقتصادی درختان آلوده به جاروک، می‌تواند مفید باشد. در واقع با بهبود سیستم ریشه درختان از طریق تغذیه مناسب و کاربرد عناصر غذایی موثر در رشد ریشه و نیز انجام تغذیه اصولی با در نظر گرفتن تعادل عناصر غذایی و در جهت رفع کمبودهای مشاهده شده (نیتروژن، کلسیم، بور و منگنز) می‌توان تولید و عمر اقتصادی درختان مبتلا به جاروک را بهبود بخشید.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد آلودگی نهال‌های مکزیکن لایم به فیتوپلازما منجر به کاهش معنی‌دار نیتروژن، کلسیم، بور و منگنز در برگ گیاهان آلوده و منجر به افزایش معنی‌دار غلظت فسفر، پتاسیم، منیزیم، آهن، روی و مس در برگ گیاهان آلوده شد. بنابراین می‌توان اینگونه استنباط کرد که علائم ظاهری مکزیکن لایم‌های آلوده می‌تواند ناشی از برهم‌خوردن بالانس تغذیه‌ای در این گیاهان باشد. علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر نشان داد نقش تغذیه در پاسخ دفاعی گیاهان مکزیکن لایم به فیتوپلازما

REFERENCES

1. Al-Ghaithi, A.G., Hanif, M.A., Al-Busaidi, W.M. & Al-Sadi, A.M. (2016). Increased sodium and fluctuations in minerals in acid limes expressing witches' broom symptoms. *SpringerPlus*, 5, 1-8.
2. 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.
3. Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z. & Zhao, F. (2012). Function of nutrients: micronutrients. In: P. Marschner (Ed), *Mineral Nutrition of Higher Plants*. (pp.191-248). Academic Press, London.
4. Christensen, M.N., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M. & Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10, 526-535.
5. Chung, K. R., Khan, I. A. & Brlansky, R. H. (2006). Citrus diseases exotic to Florida: Witches' Broom Disease of Lime (WBDL): PP-228/PP150, 4/2006.
6. Del Rio, L.A. (1983). Metalloenzymes as biological markers for the appraisal of micronutrient imbalances in higher plants. *Life Chemistry Reports*, 2, 1-34
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. Foyer, C.H., Lelandais, M. & Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Plant Physiology*, 92, 696-717.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Himeno, M., Kitazawa, Y., Yoshida, T., Maejima, K., Yamaji, Y., Oshima, K. & Namba, S. (2014). Purple top symptoms are associated with reduction of leaf cell death in phytoplasma-infected plants. *Scientific Reports*, 4, 1-7.
13. Huber, D., Römheld, V. & Weinmann, M. (2012). Relationship between Nutrition, plant diseases and pests. In: P. Marschner (Ed), *Mineral Nutrition of Higher Plants*. (pp. 283-298). Academic Press, London.
14. Kalra, Y.P. (1998). *Handbook of reference methods for plant analysis*, CRC, London.
15. Lastra, O., Gomez, M., Lopez-Gorge, J. & Del Rio, L.A. (1982). Catalase activity and isozyme pattern of the metalloenzyme system superoxide dismutase, as a function of leaf development during growth of *Pisum sativum* L. plants. *Physiologia Plantarum*, 55, 209-213.

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. 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.
18. Murray, M.G. & Thomson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
19. Poschenrieder, Ch., Tolra, R. & Barcelo, J. (2006). Can metals defend plants against biotic stress? *Trends in Plant Science*, 11, 288-295.
20. Raiesi, T. & Golmohammadi, M. (2020). Changes in nutrient concentrations and biochemical characteristics of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) infected by phytoplasma. *Journal of General Plant Pathology*, 86(6), 486-493.
21. Raiesi, T., Hashempour, A. & Golmohammadi, M. (2019). Monitoring of the leaf biochemical compositions in Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during the progression of Witches' Broom Disease of Lime (WBDL). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 50, 733-743. (In Farsi).
22. Raheb, S., Ghasemnezhad, M., Golain, B., Golmohammadi, M., Sabori, A. (2019). Investigation of polymorphism in different acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) genotypes with free witch's broom disease by molecular markers of SSR and ISSR. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 50(1), 1-11. (In Farsi)
23. Salehi, M., Izadpanah, K. & Rahimian, H. (1997). Witches' broom disease of lime in Sistan, Baluchistan. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 33, 76. (In Farsi)
24. 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.
25. Sevilla, F., Del Rio, L. A., & Hellin, E. (1984). Superoxide dismutases from a citrus plant: presence of two iron-containing isoenzymes in leaves of lemon trees (*Citrus limonum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 116(5), 381-387.
26. Srivastava, A.K. (2013). Nutrient deficiency symptomology in citrus: An effective diagnostic tool or just an aid for post-mortem analysis. *Agricultural Advances*, 2, 177-194
27. 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.
28. 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.
29. 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.