

## ردیابی بیماری «پیرس» مو در برخی تاکستان‌های ایران

ناصر امانی فر<sup>۱\*</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۱۵)

## چکیده

بیماری "پیرس" مو (*Vitis vinifera* L) اخیراً از ایران گزارش شده است. پژوهش حاضر باهدف ردیابی این بیماری در مناطق عمده کشت مو در ایران انجام گرفت. برای این منظور طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۷ با بازدید از مناطق عمده کشت مو در ایران شامل استان‌های فارس، خراسان رضوی، خراسان شمالی، خراسان جنوبی، سمنان، البرز، تهران، قزوین، زنجان، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، کردستان، کرمانشاه، لرستان، کهگیلویه و بویراحمد، مرکزی، همدان و چهارمحال و بختیاری از برگ و ساقه تاک با علائم مشکوک به بیماری "پیرس" نمونه‌برداری شد. آلودگی نمونه‌ها به باکتری *Xylella fastidiosa* به سه روش کشت روی محیط‌های کشت، DAS-ELISA و PCR بررسی شد. بیماری‌زایی برخی جدایه‌ها روی مو (رقم بیدانه قزوین) انجام شد. علائم اولیه بیماری خشک شدن بخشی از حاشیه برگ و زردی و قرمز شدن بافت مجاور است. در تاک‌های آلوده پهنک‌برگ ریزش می‌کند اما دم برگ، شبیه چوب کبریت، همچنان متصل به ساقه باقی می‌ماند. از ۳۶۵ نمونه، با الیزا ۲۱۲ نمونه مثبت بودند، از ۹۶ نمونه با جذب نوری بالا در الیزا ۴۳ نمونه با PCR مثبت بودند و از ۳۶۵ نمونه کشت‌شده ۲۶ نمونه باکتری *X. fastidiosa* روی محیط کشت جدا شد. نمونه‌هایی که باکتری روی محیط کشت جدا شد در هر سه آزمون مثبت بودند. اگرچه نتایج DAS-ELISA حاکی از آلودگی تمام استان‌های مورد بازدید به *X. fastidiosa* بود، اما بر اساس جداسازی باکتری و نتایج PCR وجود آلودگی در برخی از تاکستان‌های استان‌های فارس، خراسان رضوی، البرز، قزوین، زنجان، لرستان، همدان و چهارمحال و بختیاری به *X. fastidiosa* قابل تأیید می‌باشد.

کلیدواژه: ایران، پیرس، تاکستان، مو

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sahragardn@yahoo.com

۱. دانشیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شهرکرد، ایران

## Detection of Pierce's Disease in some Vineyards of Iran

N. Amanifar<sup>1</sup>

(Received: 19.1.2019; Accepted: 4.5.2019)

### Abstract

Pierce's disease (PD) has been recently reported from Iran. The aim of this study was to detect this disease in major vineyards in Iran. To determine the distribution pattern of this disease, during 2013-2018 years, 365 samples of leaf and stem of grapes of 88 vineyards were collected with PD symptoms. Samples obtained of Iranian grape growing provinces of Fars, Khorasan Razavi, North Khorasan, South Khorasan, Semnan, Alborz, Tehran, Qazvin, Zanjan, West Azarbaijan, East Azarbaijan, Kurdistan, Kermanshah, Lorestan, Kohgiluyeh va BoyerAhmad, Markazi, Hamedan and Chahar Mahal va Bakhtiary. Samples were tested for the presence of *Xylella fastidiosa* by culturing, DAS-ELISA and PCR assay with *X. fastidiosa*-specific primers. Pathogenicity tests, for some isolates, were conducted on grapevine (cv. Bidaneh Qazvin) under greenhouse conditions. Early symptoms is leaf scorched, while adjacent tissues turned yellow or red. Some grapes showed "matchstick" symptoms in which the leaves dropped from the plant, while petioles remained attached. Approximately 56% (212 of 365), 44.8% (43 of 96) and 7.1% (26 of 365) of the samples, by DAS-ELISA, PCR and culturing, were infected to *X. fastidiosa*, respectively. Although based on DAS-ELISA all of the sampled provinces showed infected to *X. fastidiosa*, there were by the results of culturing and PCR infected to *X. fastidiosa* is definitive for some vineyards provinces of Fars, Khorasan Razavi, Alborz, Qazvin, Zanjan, Lorestan, Hamedan and Chahar Mahal-va-Bakhtiary.

**Keywords:** Iran, Pierce's Disease, Vineyard, *Vitis vinifera* L.

---

\*Corresponding author's E-mail: sahragardn@yahoo.com

1. Associate Professor of Department of Plant Protection Research, Charmahal va Bakhtiary Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shahrekord, Iran.

## مقدمه

زیرگونه فوق تعلق دارند (Amanifar et al. 2014, Amanifar et al. 2019).

بیماری "پیرس" در ایالات متحده آمریکا (از فلوریدا تا کالیفرنیا) به عنوان یک عامل تهدیدکننده صنعت ۳۰ میلیارد دلاری شراب سازی محسوب می‌شود (Kyrkou et al. 2018). همچنین به دلیل گزارش *Xf* از برخی کشورهای اروپا و به خاطر پتانسیل خطر و اهمیت این بیمارگر از طرف سازمان حفظ نباتات منطقه اروپا و مدیترانه به عنوان بیمارگر قرنطینه‌ای کلاس A1 تلقی شده است (EFSA 2018).

شاخص‌ترین علائم بیماری‌های ناشی از *Xf* در اغلب میزبان‌ها سوختگی حاشیه برگ است که به تکثیر باکتری‌ها در آوندهای چوبی مربوط است. علائم معمولاً چند هفته بعد از آلوده شدن گیاه به بیمارگر ظاهر می‌شود و در شرایط طبیعی هم‌زمان با حداکثر نیاز آبی گیاه در اواخر تابستان است (Chatterjee et al. 2010). از میزبان‌های مهم و اقتصادی *Xf* می‌توان مو، بادام، مرکبات، خرزهره، یونجه، گلابی، بلوط، قهوه و هلو را نام برد (Costa et al. 2004, Amanifar et al. 2016, EFSA 2018). وجود این بیمارگر به عنوان عامل برگ سوختگی پسته، برای اولین گزارش از دنیا، اخیراً از برخی مناطق ایران به اثبات رسید (Amanifar et al. 2019). میزبان‌های گزارش شده *Xf* در مناطق آلوده تا حدودی به دامنه میزبانی ناقلین وابسته است (Blua et al. 1999). اطلاع و دانش در مورد منبع مایه بیماری برای توسعه راهبردهای مؤثر مدیریت بیماری ضروری است، زیرا *Xf* دامنه میزبانی وسیعی دارد، همچنین در برخی حالات می‌تواند در گیاه بدون علائم با جمعیت فراوانی وجود داشته باشد (Purcell & Saunders 1999).

توسعه بیماری‌هایی مانند "پیرس" مو و برگ سوختگی

از سال ۱۸۹۲، زمانی که "پیرس" (N.B.Pierce) اولین بار وجود پیکره‌های شبه باکتریایی را در تاک‌های با علائم برگ سوختگی گزارش کرد (Pierce 1892)، تشخیص عامل این بیماری مورد توجه محققین قرار گرفت. از اولین مشاهدات بیماری توسط "پیرس" تا اثبات اصول کخ برای *Xylella fastidiosa* (*Xf*) در سال ۱۹۷۸ توسط دیویس و همکاران، حدود هشتاد سال گذشت (Davis et al. 1978). تاکنون جدایه‌های *Xf* از چندین کشور از آمریکای شمالی، جنوبی و مرکزی، آسیا (تنها از ایران) و برخی کشورهای اروپایی گزارش شده است. گونه *Xylella taiwanensis* نیز فقط از تایوان گزارش شده است (EFSA 2018).

بر اساس ویژگی‌های ژنومی، بیولوژیکی و مورفولوژیکی سویه‌های *Xf* به زیرگونه‌های *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*، *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*، *X. fastidiosa* subsp. *pauca*، *X. fastidiosa* subsp. *sandyi*، *X. fastidiosa* subsp. *morus* و *X. fastidiosa* subsp. *tashke* تقسیم شده‌اند (EFSA 2018). سویه‌های عامل برگ سوختگی گلابی در تایوان به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی در گونه جدید *X. taiwanensis* قرار گرفتند (Su et al. 2016).

از برخی مناطق ایران *Xf* از بادام، مو و پسته بر اساس انتقال با پیوند، جداسازی روی محیط کشت، اثبات بیماری‌زایی و واکنش مثبت به الیزا و پی سی آر با استفاده از کیت و آغازگرهای اختصاصی این باکتری گزارش شده است. ویژگی‌های بیولوژیکی، مورفولوژیکی و مولکولی جدایه‌های *Xf* نشان داد که جدایه‌های مو به زیرگونه *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*، جدایه‌های پسته به *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* و جدایه‌های بادام به هر دو

## مواد و روش‌های بررسی

### نمونه‌برداری

طی تابستان و پاییز سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۷ از تاکستان‌های استان‌های فارس، خراسان رضوی، خراسان شمالی، خراسان جنوبی، سمنان، البرز، تهران، قزوین، زنجان، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، کردستان، کرمانشاه، لرستان، کهگیلویه و بویراحمد، مرکزی، همدان و چهارمحال و بختیاری بازدید به عمل آمد. از تاک‌های با علائم مشکوک به بیماری "پیرس" نمونه‌هایی از ساقه و برگ تهیه شد. نمونه‌ها داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. تعداد ۳۶۵ نمونه از ۸۸ تاکستان جمع‌آوری شد (جدول ۲).

### آزمون الیزا (DAS-ELISA)

آزمون الیزا، با استفاده از آنتی‌بادی چند همسانه‌ای فراهم‌شده از آنتی‌بادی‌های سویه‌های مختلف باکتری *Xf* (Agdia, Inc., Elkhart, IN, USA) و بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده روی ۳۶۵ نمونه گیاهی جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف ایران انجام شد. نتایج آزمون بر اساس تغییر رنگ (آبی) به صورت چشمی و با استفاده از دستگاه پلیت-ریدر (مدل Bio-Tek KC4, v.3.1) بر اساس میزان جذب نور در طیف نوری ۶۳۰ نانومتر ارزیابی شد.

### جداسازی عامل بیماری روی محیط کشت

یک روز پس از نمونه‌برداری، از هرکدام از ۳۶۵ نمونه جمع‌آوری‌شده، قطعاتی به طول ۲-۳ سانتی‌متر از دم برگ و رگبرگ اصلی، در برخی موارد از جوانه و شاخه باریک، تهیه شد و به مدت دو دقیقه در الکل اتانول ۷۰٪، سپس

بادام وابسته به وجود ارقام حساس، حشرات ناقل و گونه‌های گیاهی مناسب برای تغذیه ناقل است. بعد از آلوده شدن گیاه میزبان به *Xf* تکثیر باکتری، حرکت سیستمیک و بیان علائم بیماری بستگی به عواملی از جمله دما، زمان آلودگی و سویه باکتری دارد (Almeida & Purcell 2003, Feil et al. 2003). بالاترین میزان وقوع بیماری "پیرس" مو در کالیفرنیا در تاکستان‌هایی است که در حاشیه آن‌ها پوشش گیاهی با منابع کافی آب هست که برای تغذیه و تکثیر زنجبرک‌های ناقل *Xf* مناسب می‌باشد. با افزایش فاصله تاکستان‌ها از پوشش‌های گیاهی مناطق ساحلی میزان بیماری "پیرس" کاهش می‌یابد (Tubajika et al. 2004).

رتبه دوم میزان تولید محصولات باغی ایران مربوط به انگور با تولید حدود ۳/۲ میلیون تن و سهم ۱۵/۲ درصد از کل میزان تولید محصولات باغبانی بوده که استان‌های فارس با سهم ۱۸/۲ درصدی، همدان با سهم ۱۲/۱ درصدی، قزوین با سهم ۱۱ درصدی و خراسان رضوی با سهم ۱۰/۷ درصدی در رتبه‌های اول تا چهارم تولیدکنندگان انگور کشور قرار داشته‌اند. این چهار استان جمعاً در حدود ۵۲ درصد از کل تولید انگور کشور را تأمین نموده‌اند (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۶). با توجه به اینکه وجود بیماری "پیرس" قبلاً از برخی تاکستان‌های ایران به اثبات رسیده بود (Amanifar et al. 2014) و چون عامل بیماری دارای پتانسیل بالا از نظر خسارت در گیاهان به‌ویژه مو است، این پژوهش باهدف ردیابی بیماری "پیرس" در مناطق عمده کشت مو در ایران به‌منظور توسعه راهبردهای مؤثر مدیریت بیماری به‌ویژه اعمال قوانین قرنطینه داخلی انجام شد.

بینوکولر روزانه بررسی شد. اگر تا ۴۸ ساعت بعد از کشت روی محیط‌های کشت پرگنه باکتری ظاهر شد به‌عنوان آلوده به باکتری‌های ساپروفیت تلقی گردید و حذف شد. از محیط کشت‌های مایع PW و PD2 به نسبت یک به دو با گلیسرول برای نگهداری جدایه‌های *Xf* در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - استفاده شد (Schaad et al. 2001).

### استخراج دی ان ای از گیاه و باکتری

برای استخراج دی ان ای کل، از ۹۶ نمونه گیاهی که در الیزا جذب نوری بالا داشتند، از روش‌های فنول، CTAB (Sambrook & Russell 2001; Minsavage et al. 1994) و کیت استخراج دی ان ای از گیاه (Qiagen, Inc) استفاده شد. مراحل استخراج دی ان ای بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد. برای استخراج دی ان ای باکتری، جدا شده روی محیط کشت، از روش گای و همکاران استفاده شد (Gai et al. 2011). به دلیل محدودیت هزینه استخراج دی ان ای از نمونه‌هایی گیاهی که در آزمون الیزا میزان جذب نوری برابر یا بیشتر از میانگین جذب نوری نمونه‌های کنترل منفی بعلاوه سه برابر انحراف معیار آن‌ها داشتند (۹۶ نمونه) انجام شد.

### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی سی آر)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در یک بستر با حجم‌های ۲۰ یا ۵۰ میکرو لیتری با استفاده از آنزیم TaKaRa Taq DNA polymerase از شرکت تاکارا ژاپن Hot Start (TaKaRa Taq DNA polymerase) انجام شد (جدول ۱). واکنش پی سی آر در یک ترمال سایکلر (Thermal cycler) ساخت شرکت Biotech انگلستان با برنامه‌های متفاوت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بسته به ژن و آغازگرهای طراحی شده برای ردیابی *Xf* (جدول ۲) برای

دو دقیقه در مایع سفیدکننده ۲۰٪ تجاری ضدعفونی شد. نمونه‌ها چهار بار در آب مقطر سترون شستشو شدند. از روش آلمیدا و پرسل (Almeida & Purcell 2003)، روش شاد و همکاران (Schaad et al. 2001) و روش امانی فر (Amanifar 2014) برای کشت نمونه‌ها استفاده گردید. در روش آخر، پس از ضدعفونی، تعداد ۵-۸ دم برگ از هر نمونه انتخاب شد و با ایجاد شکاف طولی با اسکالپل در آن‌ها داخل محیط کشت مایع PW و PD3 درون لوله آزمایش قرار داده شدند. درب لوله‌ها با پارافیلیم بسته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. سپس مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از مایع درون ظروف پتری حاوی محیط کشت جامد پخش گردید و ظروف مزبور به مدت شش هفته در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  نگه‌داشته شدند (Amanifar 2014). از محیط کشت‌های آگار مغذی (NA) (Schaad et al. 2001) PW، (Schaad et al. 2001) *Xf* PD1، (Almeida et al. 2004) PD3، (Davis et al. 1980) و PD2 (Schaad et al. 2001) با اندکی تغییرات استفاده شد. در محیط کشت PD3 علاوه بر مواد توصیه‌شده در منابع مقدار نیم گرم از اسید آمینه‌های آسپاراژین و سیستین اضافه شد. در محیط کشت‌های حاوی آلبومین سرم گاوی، از غلظت ۷۰٪ مقدار توصیه‌شده آن استفاده شد (Amanifar 2014). وجود پرگنه‌های باکتری با استفاده از

جدول ۱. مقادیر اجزاء واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در واکنش‌های ۲۰ و ۵۰ میکرو لیتری

**Table 1. Quantities of Polymerase Chain Reaction components in 20 and 50  $\mu\text{L}$  reactions**

	20 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
HotStarTaq Master Mix	10 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
Primers (each of) (10mM)	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Template DNA	2 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	7 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعاتی از ژنوم *Xylella fastidiosa*

Table 2. Primer sets used for amplification of fragments of *Xylella fastidiosa* genome

GeneTarget	Primer	Primer Sequences (5' to 3')	Annealing Temperature (°C)	Amplicon Length (bp)	Reference
RNA polymerase sigma-70 factor gene	RST31* RST33	GCGTAAATTTTCGAAGTGATTTCGATTGC CACCATTTCGTATCCCGGTG	55	733	Minsavage et al. 1994
Hypothetical protein gene	272-1-int** 272-2-int	5'-CTGCACTTACCCAATGCATCG-3' 5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT-3'	56	600	Pooler & Hartung 1995
16S r DNA	Dixon454fa* Dixon1261rg	5'-AACAACTAGGTATTAACCAATTGCC-3' 5'-CCTTTTGTGGGGAAGAAAA-3'	57	847	Chen et al. 2007
16S r DNA	R1378** PO27F	5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3' 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	58	1100	Gai et al. 2011

\* Prepared from IDT

\* تهیه شده از شرکت IDT

\*\* Prepared from Macrogen

\*\* تهیه شده از شرکت Macrogen

### اثبات بیماری زایی

اثبات بیماری زایی، به روش آلمدیا و همکاران (Almedia et al. 2003) با اندکی تغییر روی نهال مو (رقم بیدانه قزوین) انجام شد. شش جدایه از قزوین (دو جدایه)، خراسان رضوی (دو جدایه)، البرز (یک جدایه) و همدان (یک جدایه) برای اثبات بیماری زایی استفاده شد. سوسپانسیونی با غلظت  $10^6$  CFU/ml (OD<sub>600</sub> = 0.4) در بافر سوکسینات-سیترات-فسفات (SCP) (۰/۱٪ دی سدیم سوکسینات، ۰/۲٪ تری سدیم سیترات، ۰/۰۷۵٪ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> و ۰/۰۰۵٪ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7) تهیه شد. قطره‌ای (حدود ۰/۲ میلی‌لیتر) از سوسپانسیون روی ساقه کنار جوانه (بین دو گره) قرار داده شد و با سوزن نمره صفر حشره‌شناسی از داخل قطره بافت سوراخ گردید. حداقل در پنج محل بین میان گره اول تا میان گره پنجم مایه‌زنی انجام شد و نهال‌ها در گلخانه عاری از حشرات در شرایط دمایی  $25 \pm 8$  °C نگهداری شدند. گیاهان شاهد با بافر SCP مایه‌زنی گردید. زمان ظهور اولین علائم و روند پیشرفت بیماری تا یک سال بعد از

تکثیر در ۴۰-۳۰ چرخه انجام شد (Minsavage et al. 1994, Pooler & Hartung 1995, Chen et al. 2007, Extension و Denaturation (Gai et al. 2011)). برای همه یکسان بود. محصول پی سی آر در ژل آگاروز ۱٪ در شدت جریان پنج ولت بر سانتی‌متر به مدت یک ساعت الکتروفورز شد. برای رنگ‌آمیزی ژل از محلول اتیدیوم بروماید (حاوی ۱۰ میکرولیتر از محلول پایه 10 mg/ml در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. پس از شستشو ژل در آب مقطر در دستگاه مستندساز ژل برای مشاهده قطعات تکثیر شده و تهیه عکس قرار گرفت (Costa et al. 2004). برای تکثیر قطعات ژن‌های مورد نظر از آغازگرهایی ساخت شرکت‌های Macrogen کشور کره جنوبی و شرکت IDT (Integrated DNA Technologies) از کشور آمریکا استفاده شد. محصول پی سی آر تعدادی نمونه‌ها با استفاده از استات سدیم خالص‌سازی (Sambrook & Russell 2001) و برای تعیین ترادف به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال گردید.

رضوی بیش‌تر بود. بر این اساس از تمامی استان‌های مورد بازدید برخی نمونه‌ها از یک تاکستان به *Xf* آلوده بودند (شکل ۲).

**جداسازی:** از حدود ۱٪/۷ از ۳۶۵ نمونه (جدول ۳) ۲۶ جدایه *Xf* روی محیط‌های کشت PW و PD2 جداسازی شد. پرگنه‌ها جدایه‌های محدب، صاف و شیری‌رنگ با حاشیه مشخص بودند. پرگنه‌ها حدود ۱۰ روز بعد از کشت روی محیط‌های PD2 و PW در دمای ۲۸ °C ظاهر شدند. جدایه‌ها هیچ‌کدام قادر به رشد روی محیط آگار مغذی نبودند. بر اساس نتایج جداسازی باکتری و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با دو جفت آغازگر RST31/RST33 و 272-1-int/272-2-int، با استفاده از پرگنه‌های جدایه‌های باکتری، به‌طور قطع می‌توان گفت برخی تاکستان‌های استان‌های فارس، خراسان رضوی، البرز، قزوین، زنجان، لرستان، همدان و چهارمحال و بختیاری به *Xf* آلوده هستند (شکل ۲). از برخی نمونه‌ها جدایه‌های کندرشدی از باکتری‌ها جدا گردید که بسیار شبیه به *Xf* بودند اما در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای مورد اشاره هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمرز:** نمونه‌هایی برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد که در آزمون الیزا خوانش جذب نوری آن‌ها با دستگاه پلیت ریدر بیشتر از ۰/۸ بود. از ۹۶ نمونه با جذب نوری بالا در الیزا پس از استخراج دی ان ای دم برگ ۴۳ نمونه (جدول ۳) در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دو جفت آغازگر RST31/RST33 و 272-1-int/272-2-int قطعه مورد انتظار تکثیر شد؛ اما در استفاده از جفت آغازگر Dixon454fa/ Dixon1261rg هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۳). بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و نتایج تعیین ترادف قطعات تکثیری می‌توان گفت برخی

مایه‌زنی یادداشت شد. دوازده نهال مو برای مایه‌زنی استفاده شد. پس از ظهور علائم در گیاهان مایه‌زنی شده، از گیاهان بدون علائم و دارای علائم نسبت به بازیابی عامل بیماری روی محیط کشت اقدام گردید. علاوه بر این از الیزا و پی سی آر برای ردیابی *Xf* در این گیاهان استفاده شد.

## نتایج

**علائم بیماری:** در مو علائم ابتدایی آلودگی به *Xf* خشک شدن حاشیه برگ است. قسمت‌های خشک‌شده معمولاً بافت مرده و با یک هاله زرد تا قرمز احاطه‌شده است. گاهی قسمت پهنک‌برگ ریزش کرده و دم برگ متصل به شاخه، به‌صورت چوب‌کبریتی، باقی می‌ماند که شاخص‌ترین علائم "پیرس" است و هم‌زمان در پاییز با ریزش برگ‌های سالم ریزش می‌کند. در بیماری "پیرس" به تدریج در سال‌های بعد زردی برگ‌ها توسعه‌یافته، خوشه‌ها چروکیده شده و لکه‌های نامنظم قهوه‌ای و سبز (به‌صورت جزیره‌ای) در روی ساقه پدیدار می‌شود (شکل ۱). کم‌رشدی، کوتولگی و کاهش رشد درختان در نهایت ممکن است منجر به مرگ تاک شود.

## ردیابی و پراکندگی بیمارگر

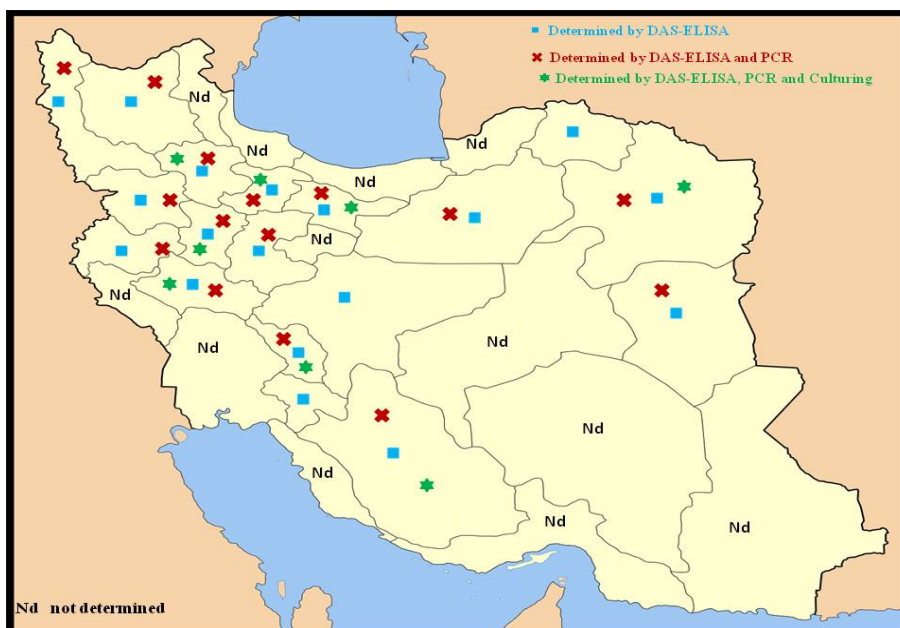
**الیزا (DAS-ELISA):** در این بررسی میانگین جذب نوری نمونه‌های کنترل مثبت  $0/4 \pm 2/2$  و میانگین جذب نوری نمونه‌های کنترل منفی بعلاوه سه برابر انحراف معیار آن‌ها  $0/04 \pm 0/07$  بود. نمونه‌هایی (۲۱۲ نمونه از ۳۶۵ نمونه) بر اساس الیزا به‌عنوان آلوده محسوب شد که حداقل جذب نوری آن‌ها ۰/۸ بود. در برخی از نمونه‌ها میزان خوانش جذب نوری، با دستگاه پلیت ریدر، بیش از ۳/۵ بود، فراوانی این وضعیت در نمونه‌های استان خراسان



شکل ۱. علائم مختلف "پیرس" روی مو. الف- برگ سوختگی مو، ب- تک تاک آلوده در باغ (تاکستان- قزوین)، پ- ریزش پهنک‌برگ‌ها و باقی ماندن دم برگ روی تنه مو (چوب‌کبریتی شدن دم برگ) (ملایر-همدان)، ت- چوب‌کبریتی شدن دم برگ‌ها و نکروز انتهای آن‌ها در رقم پیکامی (خلیل‌آباد-خراسان رضوی)، ث- چوب‌کبریتی شدن دم برگ‌ها در رقم بی‌دانه (تاکستان-قزوین)، ج- جزایر سبز روی ساقه رقم بی‌دانه (تاکستان-قزوین)، چ- برگ سوختگی شدید مو و ریزش پهنک‌برگ (فاروق-فارس)، ح- برگ سوختگی و پلاسیدگی حبه‌های انگور بیدانه سفید (بناب- آذربایجان شرقی)، خ- ریزش پهنک‌برگ مو (رباط‌کریم- البرز)، د- مو پیکامی در حال زوال با علائم شدید برگ سوختگی (کاشمر- خراسان رضوی)، ذ- خشکیدگی خوشه‌های انگور (خرم‌آباد- لرستان) و ر- برگ سوختگی مو رقم عسکری (گهرود- چهارمحال و بختیاری).

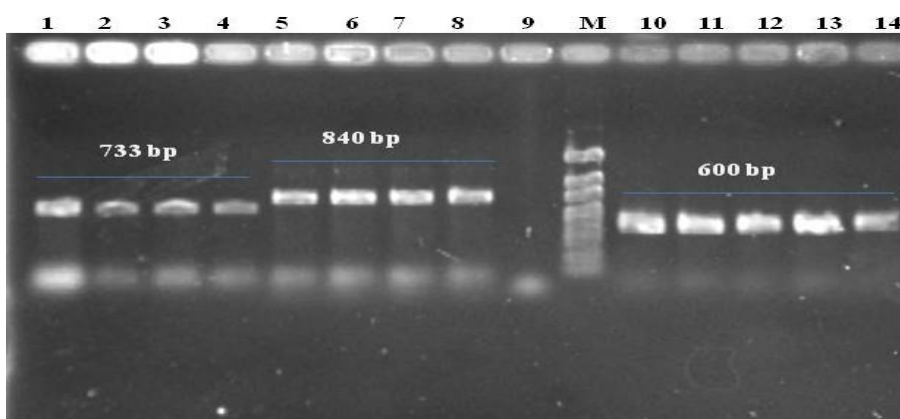
**Fig. 1. Various symptoms of Pierce disease on grapes. a. leaf scorched, b. single tree with symptoms of Pierce disease in vineyard (Takestan-Qazvin), c. symptoms leaves dropped, while petioles remained attached ("matchstick") (Malayer-Hamadan), d- "matchstick" symptoms in Pikami cultivar (Khalilabad-Khorasan Razavi), e- "matchstick" in Bidaneh cultivar (Takestan-Qazvin), f- green islands on twig of Bidaneh cultivar (Takestan-Qazvin), g- leaves dropped and severe leaf scorched (Farooq-Fars), h- grape dehydration and leaf scorched (Bonab-East Azerbaijan), i- leaves dropped (Rabat Karim-Alborz), j- decline and leaf scorched in Pikami cultivar (Kashmar- Khorasan Razavi), k- drying of grape clusters (Khorram Abad, Lorestan) and l- leaf scorched in Askari cultivar (Goharrood- Chaharmahal va Bakhtiary).**





شکل ۲. نقشه گزارش وجود بیماری "پیرس" مو در مناطق عمده کشت مو در ایران بر اساس سه روش الیزا، پی سی آر و جداسازی

Fig. 2. Map of the report "Pierce" disease in the major regions of grape cultivation in Iran based on DAS-ELISA, PCR and culturing methods



شکل ۳. نقوش الکتروفورزی محصول پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *Xylella fastidiosa*. محصول PCR با جفت آغازگر RST31/RST33 از پرگنه‌های باکتری جدا شده از مو (راهک های ۱ و ۲)، از نمونه دی ان ای دم برگ مو (راهک ۳)، از پرگنه‌های جدا شده بادام (راهک ۴). محصول PCR با جفت آغازگر Dixon454fa/ Dixon1261rg از پرگنه باکتری جدا شده از پسته (راهک ۵)، از نمونه دی ان ای دم برگ بادام (راهک ۶ و ۷)، از پرگنه‌های جدا شده بادام (راهک ۸) و از پرگنه‌های جدا شده مو (راهک ۹، تکثیر نشده). محصول PCR با جفت آغازگر 272-1-int/272-2-int از پرگنه‌های جدا شده بادام (راهک ۱۰)، از نمونه دی ان ای دم برگ پسته (راهک ۱۱)، و از پرگنه‌های جدا شده مو (راهک ۱۲ و ۱۳) و از نمونه دی ان ای دم برگ مو (راهک ۱۴). مارکر دی ان ای 100 bp (راهک M).

Fig. 3. Gel electrophoresis pattern of PCR amplification products using *Xylella fastidiosa* specific primers. PCR products with primers RST31/RST33 from bacterial colonies isolated from grape (lane 1 and 2), from DNA of grape petioles (lane 3), from bacterial colonies isolated from almond (lane 4). PCR products with primers Dixon454fa/Dixon1261rg from bacterial colonies isolated from pistachio (lane 5), from DNA of almond petioles (lanes 6 and 7), from bacterial colonies isolated from almond (lane 8), from bacterial colonies isolated from grape (lane 9). PCR products with primers 272-1-int/272-2-int from bacterial colonies isolated from almond (lane 10), from DNA of pistachio petioles (lanes 11), from bacterial colonies isolated from grape (lane 12 and 13) and from DNA of grape petioles (lane 14). 100 bp DNA ladder (lane M).

جدول ۳. وضعیت آلودگی مناطق عمده کشت مو به بیماری «پیرس» در ایران و مقایسه روش‌های ردیابی *Xylella fastidiosa*

**Table 3. State of infection to *Pierce's disease* in major regions of grapevine cultivation in Iran and comparison of *Xylella fastidiosa* detection methods**

Sampling region (Province)	Sampling time	Assay results (positive/tested)			Results
		DAS-ELISA	PCR	Culturing	
Qazvin	August 2013	9/16	2/4	2/16	Detected
	September 2014	14/23	3/6	1/23	Detected
	August 2015	11/17	2/5	2/17	Detected
	August 2016	11/20	1/3	1/20	Detected
	September 2017	12/18	2/4	1/18	Detected
	October 2018	8/15	1/2	3/15	Detected
Khorasan Razavi	Sep. 2014	6/10	1/3	0/10	Undetected
	Sep. 2016	15/21	3/7	2/21	Detected
	October 2017	12/16	3/5	2/16	Detected
Chaharmahal va Bakhtiary	October 2013	2/3	1/1	0/3	Undetected
	September 2014	3/4	0/1	0/4	Undetected
	August 2015	2/3	0/0	0/3	Undetected
	October 2016	2/4	1/1	1/4	Detected
	August 2018	2/5	1/2	1/5	Detected
Fars	August 2013	5/7	1/3	0/7	Undetected
	October 2014	4/10	0/3	1/10	Detected
	September 2015	5/9	1/2	1/9	Detected
Hamedan	August 2013	7/11	1/3	0/11	Undetected
	October 2015	6/11	2/5	1/11	Detected
	September 2016	4/6	0/2	1/6	Detected
Lorestan	August 2015	8/11	1/3	1/11	Detected
Southern Khorasan	August 2014	3/4	1/3	0/4	Undetected
	October 2016	0/3	0/0	0/3	Undetected
Semnan	October 2015	3/3	1/1	0/3	Detected
	August 2017	1/3	0/1	0/3	Undetected
Esfahan	September 2013	1/3	0/1	0/3	Undetected
	August 2016	3/8	0/1	0/8	Undetected
Zanjan	October 2014	3/4	1/1	1/4	Detected
	August 2015	3/5	1/2	0/5	Detected
	August 2016	4/6	1/1	1/6	Detected
Western Azerbaijan	August 2014	2/3	1/1	0/3	Undetected
	August 2015	0/2	0/0	0/2	Detected
	September 2016	2/5	1/1	0/5	Undetected
East Azarbaijan	August 2014	3/5	1/3	0/5	Detected
	August 2015	0/3	0/0	0/3	Undetected
	September 2016	4/10	1/2	0/10	Undetected
Alborz	August 2013	11/14	3/3	2/14	Detected
	August 2015	2/4	0/1	0/4	Undetected
	September 2018	7/10	1/3	1/10	Detected
Kurdistan	September 2014	2/3	1/1	0/3	Undetected
	September 2016	1/2	0/1	0/0	Detected
Kermanshah	September 2016	3/6	1/1	0/6	Detected
Northern Khorasan	September 2018	2/5	0/1	0/5	Undetected
Markazi	September 2017	1/4	0/0	0/4	Undetected
Tehran	September 2018	2/5	1/1	0/5	Detected
Kohgiluyeh va Boyerahmad	September 2018	1/5	0/1	0/5	Undetected
Total		212/356	43/96	26/365	
Infectivity percent		56%	44.8%	7.1%	

Detected: Positive reaction based on ELISA, PCR and isolation on media culture

Undetected: No isolation on media culture



شکل ۴. اثبات بیماری‌زایی جدایه *Xylella fastidiosa* از مو روی قلمه مو رقم بیدانه قزوین در گلخانه. ظهور علائم اولیه برگ سوختگی مو حدود دو ماه بعد از مایه‌زنی (چپ) و ریزش پهنک‌برگ، درحالی‌که دم برگ به ساقه چسبیده (چوب‌کبریتی) و علائم جزایر سبز روی شاخه مو حدود هشت ماه بعد از مایه‌زنی (راست).

**Fig. 4. Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* isolates on Bidaneh cultivar of grape in greenhouse conditions. Left- Appearance of the early symptoms of leaf scorch on grape leaves about two months after inoculation. Right- Leaves dropped, while petioles remained attached ("matchstick") and Green islands symptoms on grape twigs about eight months after inoculation.**

نهال‌های مو مورد آزمایش مرگ گیاه حتی سه سال بعد از آلوده سازی در شرایط گلخانه مشاهده نشد. هر شش جدایه از گیاهان دارای علائم روی محیط کشت PD2 و PW بازیافت شدند. جدایه‌های باکتری با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگر RST31/RST33 مورد آزمایش قرار گرفتند که وجود *Xf* به اثبات رسید. در گلدان‌های شاهد هیچ‌گونه علائمی مشاهده نگردید.

### بحث

بر اساس سه روش الیزا، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و جداسازی باکتری روی محیط کشت می‌توان گفت "پیرس" مو در مناطق مختلف ایران گزارش می‌شود. شدت و فراوانی بیماری در استان‌های خراسان رضوی، قزوین و چهارمحال و بختیاری بیشتر از سایر استان‌هاست.

تاکستان‌های استان‌های فارس، خراسان رضوی، خراسان جنوبی، سمنان، البرز، تهران، قزوین، زنجان، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، کردستان، کرمانشاه، لرستان، همدان و چهارمحال و بختیاری به *Xf* آلوده هستند (شکل ۳).

**بیماری‌زایی:** هر شش جدایه مو که از آن‌ها برای مایه‌زنی استفاده شد، در شرایط گلخانه روی مو رقم بی‌دانه قزوین بیماری‌زا بودند (شکل ۴). حدود پنجاه روز بعد از مایه‌زنی علائم اولیه بیماری به صورت سوختگی خفیف حاشیه برگ ظاهر شد. در همه گلدان‌ها به تدریج سوختگی حاشیه برگ پیشرفت کرد و گاهی تمام پهنک‌برگ را فراگرفت و باعث جدا شدن پهنک‌برگ از دم برگ گردید. حدود هشت ماه بعد از آلوده سازی علائم جزایر سبز در برخی نهال‌ها مو مشاهده گردید (شکل ۴). در هیچ‌کدام از

کردند که از نظر مرفولوژیکی بسیار شبیه *Xf* بودند. بر اساس نتایج پژوهش حاضر می‌توان گفت الیزا بهترین روش برای بررسی جنبه‌های بیولوژیکی *Xf* مانند تغییرات فصلی جمعیت باکتری، غلظت باکتری در اندام‌های مختلف، مطالعات اپیدمیولوژیک و مقاومت ارقام و پراکنش بیماری است. الیزا مناسب‌ترین روش برای غربال کردن تعداد زیادی نمونه است و برای اطمینان از نتایج الیزا بهتر است آستانه حداقل بیشتر از حد استاندارد (میانگین جذب نوری نمونه‌های کنترل منفی بعلاوه سه برابر انحراف معیار) باشد. الیزا مناسب‌ترین روش برای کمک در پاسخ به سؤالاتی همانند وجود *Xf* و تراکم جمعیت، به‌ویژه شرایط آلودگی پنهان است ( Purcell & Hopkins 1996, Sherald & Lei 1991). در این پژوهش میانگین جذب نوری نمونه‌های کنترل منفی بعلاوه سه برابر انحراف معیار آن‌ها  $0.04 \pm 0.057$  بود، اما نمونه‌های با جذب نوری بیش از  $0.8$  به‌عنوان نمونه آلوده با روش الیزا تلقی شد. می‌توان گفت منفی بودن نتایج پی سی آر دال بر عدم آلودگی به بیمارگر نیست ( Pooler & Hartung 1995, Bextine & Miller 2004).

گسترش تنش کمبود آب (مانند خشک‌سالی) باعث تشدید علائم "پیرس" می‌شود و عقیده بر این است که تاک‌هایی که دچار کمبود آب می‌شوند نسبت به تاک‌هایی که سیراب هستند به بیماری "پیرس" حساس‌ترند (Hopkins 1989). بررسی‌های میدانی طی سال‌های ۹۷-۸۸ در تاکستان‌های مناطق مختلف ایران حاکی از این است که شدت بیماری "پیرس" مو و میزان آلودگی روند افزایشی داشته است. این وضعیت در تاکستان‌های کاشمر و خلیل‌آباد (خراسان رضوی)، تاکستان (قزوین)، شهریار و رباط‌کریم (تهران)، ملایر (همدان) و فاروق (فارس) کاملاً مشهود است. با توجه به دوره خشک‌سالی در سال‌های

نتایج الیزا، جداسازی و پی سی آر در این پژوهش نشان داد که بهترین روند برای ردیابی و تشخیص *Xf* غربال کردن نمونه‌های با جذب نوری بالا در الیزا و استفاده از این نمونه‌ها برای جداسازی باکتری روی محیط کشت اختصاصی و به‌کارگیری پرگنه‌های باکتری در پی سی آر با آغازگرهای اختصاصی (Minsavage et al. 1994, Pooler & Hartung 1995) است. حدود ۵۶٪ از نمونه‌های با علائم مشکوک به "پیرس" مورد استفاده در الیزا به *Xf* آلودگی نشان دادند به عبارتی بیماری پیرس در این نمونه‌ها با الیزا محرز شد. از حدود ۷۱٪ از ۳۶۵ نمونه باکتری فوق روی محیط کشت جدا شد و از ۴۴/۸٪، که برای استخراج دی ان ای کل با به‌کارگیری کیت‌های تجارتي دی ان ای استفاده شد در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی *Xf*، و نتایج تعیین ترادف قطعات تکثیری، واکنش مثبت نشان دادند. این نتایج تا حدودی با نتایج سایر محققین در روش‌های ردیابی این بیمارگر مطابقت دارد ( Pooler & Hartung 1995, Bextine & Miller 2004). زمانی که جمعیت باکتری در گیاه و ناقل خیلی پایین است ردیابی *Xf* با پی سی آر ناکارآمد است. دلیلی که به مشکل بودن استخراج دی ان ای باکتریایی از بافت گیاه و قطعات دهانی و پیش‌معدده حشرات ناقل نسبت داده‌اند وجود بازدارنده‌هایی برای پی سی آر است ( Bextine & Miller 2004). در هر دو روش الیزا و پی سی آر احتمال واکنش مثبت کاذب و منفی کاذب وجود دارد که همیشه دلایل آن مشخص نیست، اما یکی از دلایل عمده آلودگی‌های باکتریایی همراه با *Xf* است (Sherald & Lei 1991, Minsavage et al. 1993, Pooler & Hartung 1995, Chen et al. 1995). در این بررسی نیز جدایه‌های کند رشدی از باکتری‌ها در محیط کشت PW و PD2 رشد

مرگ میزبان می‌شوند. به‌عنوان مثال بیماری "پیرس" مو در ارقام حساس در عرض چند سال بعد از آلودگی سبب مرگ برخی از تاک‌ها می‌شود (Goodwin et al. 1988). روند پیشرفت بیماری "پیرس" مو در تاکستان‌های خلیل‌آباد استان خراسان رضوی در سال‌های اخیر کاملاً مشهود است، به‌طوری‌که در بازدیدهای تابستان ۱۳۹۶ به‌عنوان مهم‌ترین معضل گیاه‌پزشکی مو در این منطقه مطرح است و در برخی موارد باعث مرگ و نابودی کامل تاک‌های مو در برخی تاکستان‌ها شده است. به نظر می‌رسد مو رقم پیکامی، که بیشترین سطح زیر کشت شهرستان خلیل‌آباد به آن اختصاص داده شده است، به  $Xf$  حساس باشد.

چون مو به روش غیرجنسی (قلمه) تکثیر می‌شود احتمال انتقال انواع بیمارگرها به‌ویژه بیمارگرهای آوندی مانند  $Xf$  در آن زیاد است، از طرفی دامنه میزبانی سویه‌های این بیمارگر در مو وسیع‌تر از سایر سویه‌هاست (Amanifar 2014)، لذا این احتمال وجود دارد که پراکنش این بیمارگر در ایران وسیع‌تر از نقشه تهیه‌شده در این پژوهش باشد و آهنگ خطر برای سایر میزبان‌های مهم این بیمارگر از جمله مرکبات و زیتون است.

با توجه به اینکه در برخی تاکستان‌ها در مناطق مختلف کشور علائم به‌صورت لکه‌ای (تعداد اندک تاک مو) دیده شد، از طرفی قدمت برخی از این تاکستان‌ها بیش از ۲۰ سال است همچنین بررسی‌های میدانی حاکی از افزایش فراوانی و شدت بیماری در سال‌های اخیر است، بنابراین وضعیت فوق وجود ناقل (ناقلین) طبیعی را تقویت می‌کند لذا شناسایی و بررسی کارآیی ناقل (ناقلین)  $Xf$  در ایران ضروری است.

چون تفاوت‌های بیولوژیکی، مرفولوژیکی و مولکولی در جدایه‌های ایرانی  $Xf$  از بادام (Amanifar et al.

اخیر شاید بتوان یکی از دلایل چشمگیر شدن این بیماری در برخی مناطق کشور را به اثر هم‌افزایی تنش کم‌آبی در ایجاد بیماری توسط سویه‌های  $Xf$  نسبت داد، به عبارتی کم‌آبی به‌عنوان عامل پیش‌آمودگی (predisposing) برای "پیرس" مو است.

تورن و همکاران (Thorne et al. 2006) نشان دادند وقتی تاک‌های آلوده به  $Xf$  در معرض تنش کم‌آبی قرار می‌گیرند، شدت علائم "پیرس" در مقایسه با تاک‌هایی که آب کافی دریافت می‌کنند بیشتر است. با این حال، موهای آلوده به  $Xf$  در هر دو گروه تنش کم‌آبی و سیر آبی علائم منحصربه‌فرد "پیرس" یعنی جزایر سبز، جدا شدن پهنک از دم برگ (چوب‌کبریتی شدن) و سوختگی نامنظم حاشیه برگ را نشان می‌دهند؛ اما در موهای تحت تنش کم‌آبی بدون آلودگی به  $Xf$  زردی یکنواخت پهنک‌برگ و ریزش برگ به همراه دم برگ دیده می‌شود. کمبود آب باعث توسعه ناحیه جداکننده دم برگ از ساقه می‌شود اما در "پیرس" چنین حالتی دیده نمی‌شود. علائم "پیرس" با هیچ‌کدام از تیمارهای کمبود آب ایجاد نمی‌شود، اما کم‌آبی علائم بیماری "پیرس" را تشدید می‌کند؛ بنابراین، عواملی غیر از کمبود آب در ایجاد علائم "پیرس" دخیل هستند. این فرضیه به‌طور گسترده پذیرفته‌شده است که در تاک‌های آلوده به  $Xf$  کمبود آب همراه با باکتری است که باعث ایجاد جزایر سبز، جدا شدن پهنک‌برگ و برگ سوختگی موضعی و مرگ احتمالی گیاه می‌شود (Thorne et al. 2006). در این پژوهش نیز از نمونه‌هایی که دارای علائم جزایر سبز و اتصال دم برگ به ساقه (چوب‌کبریتی شدن) بودند (شکل ۲) فراوانی جداسازی  $Xf$  روی محیط کشت بیشتر از نمونه‌هایی بود که فقط علائم برگ سوختگی داشتند.

بسیاری از بیماری‌های شناخته‌شده ناشی از  $Xf$  باعث

همکاری در تهیه نمونه و یا ارسال نمونه‌های مو مشکوک به بیماری "پیرس" سپاسگزارم. این پژوهش قسمتی از نتایج دو پروژه تحقیقاتی به شماره ۸۷۰۱۹-۱۶-۴۲-۰ و ۹۲۱۲۸-۱۶-۴۲-۴، مصوب سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، است که بخشی از اعتبارات مربوطه توسط سازمان جهاد کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری تأمین شد، بدین‌وسیله از سازمان فوق‌الذکر قدردانی می‌شود.

پسته (Amanifar et al. 2019) و موجود دارد، لذا مطالعه ویژگی‌های بیولوژیکی، مورفولوژیکی و ژنومی جدایه‌های مختلف *Xf*، از میزبان‌های مختلف، از ایران و مقایسه آن‌ها با سویه‌های سایر کشورها را می‌طلبد.

## سپاسگزاری

از کارشناسان حفظ نباتات و باغبانی سازمان جهاد کشاورزی و کلینیک‌های گیاه‌پزشکی استان‌های خراسان رضوی، لرستان، فارس، سمنان، آذربایجان شرقی، قزوین، زنجان، کهگیلویه و بویراحمد، همدان و مرکزی به خاطر

## منابع

- Almeida R. P. P. and Purcell A. H. 2003. Biological traits of *Xylella fastidiosa* strains from grapes and almonds. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7447-7452.
- Almeida R. P. P., Purcell A. H. and Alexander H. 2003. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology* 96: 264-271.
- Almeida R. P.P., Mann R. and Purcell A. H. 2004. *Xylella fastidiosa* cultivation on a minimal solid defined medium. *Current Microbiology* 48: 368-372.
- Amanifar N. 2014. Molecular and biological characterization of *Xylella fastidiosa* in Iran. PhD. Thesis, submitted to Shiraz University, Iran, 212 pp.
- Amanifar N., Taghavi T. Izadpanah K and Babaei Gh. 2014. Isolation and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from Grapevine and Almond in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 53: 318-327.
- Amanifar N., Taghavi M. and Salehi M. 2016. *Xylella fastidiosa* from almond in Iran: overwinter recovery and effects of antibiotics. *Phytopathologia Mediterranea* 55: 337-345.
- Amanifar N., Babaei Gh. and Mohammadi A.M. 2019. *Xylella fastidiosa* causes a leaf scorch pistachio (*Pistacia vera*) in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 58: 57-66.
- Bextine B. R. and Miller T. A. 2004. Comparison of whole-tissue and xylem fluid collection techniques to detect *Xylella fastidiosa* in grapevine and oleander. *Plant Dis.* 88:600-604.
- Blua M. J., Hillips P. A. P and Redak R. A. 1999. A new sharpshooter threatens both crops and ornamentals. *California Agriculture* 53: 22-25.
- Chatterjee S., Killiny N., Almeida R. P. P. and Lindow S. E. 2010. Role of cyclic di-GMP in *Xylella fastidiosa* biofilm formation, plant virulence, and insect transmission. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 1356-1363.
- Chen J., Lamikanra O., Chang C. J. and Hopkins D. L. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease and oak leaf scorch pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1688-1690.
- Chen J., Groves R., Zheng Y., Civerolo E.L., Viveros M. and Freeman M. 2007. Colony morphology of *Xylella fastidiosa* almond leaf scorch strains. *Canadian Journal of Plant Pathology* 29: 225-231.
- Costa H. S., Raetz E., Pinckard T. R., Gispert C., Hernandez-Martinez R., Dumenyo C. K. and Cooksey D. A. 2004. Plant hosts of *Xylella fastidiosa* in and near southern California vineyards. *Plant Disease* 88:1255-1261.
- Davis M. J., Purcell A. H. and Thomson S. V. 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* 199: 75-77.
- Davis M. J., Thomson S. V. and Purcell A. H. 1980. Etiological role of a xylem-limited bacterium causing

- Pierce's disease in almond leaf scorch. *Phytopathology* 70: 472-475.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2018. Scientific report on the update of the *Xylella* spp. host plant database. *EFSA Journal* 16: 5408, 87 pp.
- Feil H., Feil W. S. and Purcell A. H. 2003. Effects of date of inoculation on the within plant movement of *Xylella fastidiosa* and persistence of Pierce's disease within field grapevines. *Phytopathology* 93:244-251.
- Gai C. S., Dini-Andreote F., Andreote F. D., Lopes J. R. S., Araújo W. L., Miller T. A., Azevedo J. L. and Lacava P. T. 2011. Endophytic Bacteria Associated to Sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae), Insect Vectors of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 2:2-8.
- Goodwin P. H., DeVay J. E. and Meredith C. P. 1988. Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce's disease of the grapevine. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 1-15.
- Hopkins D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology* 27: 271-290.
- Minsavage G. V., Thompson C. M., Hopkins D. L., Leite R. M. and Stall R. E. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84: 456-461.
- Pierce N. B. 1892. The California vine disease. United States Department of Agriculture, Division of Vegetable Pathology Bull. 2. Washington, DC.
- Pooler M. R. and Hartung J. S.. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31: 377-381.
- Purcell A. H. 2013. Paradigms: Examples from the Bacterium *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology* 51:339-56.
- Purcell A. H. and Hopkins D. L. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 34: 131-151.
- Purcell A. H. and Saunders S. R. 1999. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. *Plant Disease* 83: 825-830.
- Kyrkou I., Pusa T., Ellegaard-Jensen L., Sagot M.F. and Hansen L.H. 2018. Pierce's Disease of Grapevines: A Review of Control Strategies and an Outline of an Epidemiological Model. *Frontiers in Microbiology* 9:2141.
- Sambrook J. and Russell D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2100 pp.
- Schaad N.W., Jones J.B. and Chun W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, St. Paul, MN, USA. 373 pp.
- Sherald J. L. and Lei J. D. 1991. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscaping trees. *Plant Disease* 75: 200-203.
- Su C.C., Deng W.L., Jan F.J., Chang C.J., Huang H., Shih H.T. and Chen J. 2016. *Xylella taiwanensis* sp. nov., causing pear leaf scorch disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 4766-4771.
- Thorne E. T., Stevenson J. F., Rost T. L., Labavitch J. M. and Matthews M. A. 2006. Pierce's disease symptoms: comparison with symptoms of water deficit and the impact of water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 1-11.
- Tubajika K. M., Civerolo E. L., Ciomperlik M. A., Luvisi D. A. and Hashim J. M. 2004. Analysis of the spatial patterns of Pierce's disease incidence in the lower San Joaquin Valley in California. *Phytopathology* 94:1136-1144.