مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۶، شماره ۳، پائیز ۱۴۰۲
ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

بررسی شرایط انتقال بهینه عامل بیماری فیتوپلاسمایی با استفاده از پیوندک آلوده به نهال‌های لیمو ترش به منظور مطالعات بیماری‌شناسی

نوع مقاله: پژوهشی

سعید سهیلی‌وند[1*]، محمدرضا صفرنژاد[2]

۱- استادیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- استاد موسسه گیاهپزشکی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

soheilivand@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۲

صفحه ۱۸-۱

چکیده

بیماری جاروی جادوگر لیمو ترش، یک بیماری مهلک و قرنطینه‌ای است که به‌طور وسیعی باغات لیمو ترش جنوب کشور را تهدید می‌کند. عامل این بیماری فیتوپلاسمایی از طریق روش‌های مختلفی مانند حشرات ناقل، پیوند پیوندک آلوده و استفاده از ابزار آلوده می‌تواند به درختان سالم لیمو ترش منتقل شود. متاسفانه بدلیل قرنطینه‌ای بودن آن، امکان بسیاری از پژوهش‌ها و راستی‌آزمایی‌ها در سطح باغ و محیط آزاد وجود ندارد. بنابراین پژوهش‌های علمی اولیه در مورد برهمکنش عامل بیمارگر و گیاه، عوامل پیشرفت بیماری، تست روش‌های مختلف کنترل و مدیریت بیماری، بررسی گیاهان تراریخته متحمل به بیماری، آزمون کیت‌های تشخیصی باید در محیط‌های کنترل شده انجام شود. هدف از اجرای این پژوهش یافتن بهترین شرایط برای تولید گیاهان آلوده به بیماری فیتوپلاسما است تا بتوان در قدم‌های بعدی در مطالعات تکمیلی از آنها استفاده کرد. در این پژوهش با استفاده از پیوندک‌های آلوده و سالم (به‌عنوان کنترل) و با استفاده از دو نوع پیوند جوانه از نوع شکمی (T معکوس) و پیوند انتهایی و با بررسی شرایط پیوند و مشخصات پایه و پیوندک مشخص شد که پیوند جوانه نسبت به پیوند انتهایی از موفقیت بیشتری در انتقال بیماری برخوردار بوده است.

واژه‌های کلیدی: پیوندک، پایه، بیماری جاروک، انتقال بیماری.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

مقدمه

لیمو ترش با تولید ۴۱۱ میلیارد ریال درآمد ناخالص از جمله مهمترین محصولات باغی در نواحی جنوبی کشور است. اهمیت لیمو ترش علاوه‌بر آمار ذکر شده، در اقتصاد بومی منطقه نیز قابل تامل است. این محصول نقش مهمی در اقتصاد محلی منطقه داشته و بخش زیادی از درآمد ناخالص خانوارهای روستایی را تشکیل می‌دهد. آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی، میزان عملکرد باغات لیمو ترش در سال ۱۴۰۰ را ۶۶۵۱ کیلوگرم میوه در هکتار و تولید کل آن را در کشور حدود ۶۸۷۴۳۳ تن نشان می‌دهد (Agricultural Statistics. 2022).

متاسفانه در دهه‌های اخیر بیماری مهلک جاروی جادوگر لیمو ترش یا WBDL (witches' broom disease of lime)، تهدید بزرگی از نظر کاهش تولیدات لیمو ترش بوده و ضررهای اقتصادی معنی‌داری را در این بخش از کشاورزی تحمیل کرده است. علاوه‌بر این، ترس از گسترش آن به دیگر مناطق مرکبات‌خیز کشور، موجی از نگرانی و تهدید را ایجاد کرده است. اولین مورد بیماری جاروک لیمو ترش، در سال ۱۹۷۵ از باغات لیمو ترش کشور عمان گزارش شد (Bove. 1986) و به فاصله چند سال بعد، علائم بیماری در کشور امارات متحده عربی (Garnier et al. 1991) و پس از آن در هند (Ghosh et al. 1999) و ایران گزارش شد (Bove et al. 2000). گزارش‌های بعدی از کشور عمان نشان داد که در حدود سه دهه، بیش از ۹۸٪ درختان لیمو ترش، آلوده به این بیماری شده و بسیاری از آنها از بین رفته‌اند (Chung et al. 2006). در ایران این بیماری، اولین بار در سال ۱۳۷۶ در منطقه قصر قند استان سیستان و بلوچستان گزارش و بعد از آن در بقیه مناطق استان‌های همجوار گسترش یافته است. به طوری‌که همه ساله تعداد کثیری از باغات مناطق آلوده را تحت تاثیر قرار داده و باعث کاهش شدید محصول و در نهایت انهدام باغات آلوده می‌شده است (Mardi. 2012b). براساس گزارش‌های رسمی همه‌گیر بودن این بیماری تایید شده است. به‌طوری که تا پایان سال ۱۳۸۵ بالغ بر ۱۶۰۰۰۰ درخت آلوده در مناطق جنوبی کشور در استان‌های مختلف رصد شده بود. بر همین مبنا، میزان خسارت در آن زمان بیش از ۲۷ میلیارد تومان برآورد شده که شامل پارامترهای مختلفی همانند: میزان افت تولید و درآمد (۴۶ میلیارد ریال)، خشک شدن درخت (۲۳ میلیارد ریال) و خرید و جایگزینی درختان بیمار (۳/۹ میلیارد ریال) و سایر عوامل هزینه‌ساز است (Mardi. 2012a).

عامل بیماری جاروک و روش‌های انتقال بیماری

عامل بیماری جاروک لیمو ترش، یک نوع فیتوپلاسما با نام علمی *Candidatus*

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

Phytoplasma aurantifolia است و از لحاظ فیلوژنتیکی، ارتباط نزدیکی با عامل فیلودی کنجد و شاهدانه دارد (Albanese and Garnier, 2006; Chung et al. 2006).

فیتوپلاسماها شبه‌باکتری‌هایی بدون دیواره سلولی، دارای یک غشای منفرد و به قطر ۲۰۰–۸۰۰ nm بوده که ژنومشان در طی تکامل کوچک شده و به حدود ۷۵۰ kb رسیده است. این نوع باکتری‌ها، بدلیل داشتن ژنوم کوچک و نداشتن دیواره سلولی جزو رده *Mollicuta* طبقه بندی و به همین دلیل با باکتری‌های گرم مثبت، از قبیل *Closteridium*، متفاوت در نظر گرفته می شوند. کوچکی ژنوم و از دست دادن بسیاری از ژن‌های دخیل در فرآیندهای متابولیسمی همانند سنتز ATP، نوکلئوتیدها و آمینواسیدهای ضروری باعث گردیده تا این باکتری‌ها، پارازیت اجباری درون سلولی شوند و در بسیاری از فرآیندهای زیستی به ژنوم میزبان وابسته باشند. در طی تکامل، تکثیر فیتوپلاسماها در غلظت‌های بالا، در اجزاء آوندی ریشه‌ها و شاخه‌های جوان، سازگار شده است (Kube et al. 2012; Bai et al. 2006).

بروز علائم این بیماری به عوامل مختلفی همچون دما و نوع ژنوتیپ بستگی دارد (Noorizadeh et al. 2023). فیتوپلاسماها به دلیل پارازیت اجباری بودن، مجبورند در سلول گیاه و یا بدن حشرات ناقل‌شان باشند. انتقال فیتوپلاسمای جاروک لیمو ترش در طبیعت، به وسیله زنجره *Hishimonus phycitis* که نقش حشره ناقل را دارد، انجام می‌شود. این امر با جداسازی عامل WBDL در زنجرک‌هایی که از درختان آلوده جدا شده‌اند، به اثبات رسیده است. انتقالشان به این صورت است که در زمان تغذیه حشره از شیره گیاهی، وارد دستگاه گوارش آن شده، از دیواره سلول عبور کرده و در بافت‌های داخلی حشره تکثیر می‌یابند و دوباره با ورود به غدد بزاقی و ترشح در بزاق در موقع تغذیه از گیاه سالم، به آن منتقل می‌شوند (Hogenhout et al. 2008).

راه دیگر انتقال، توسط انسان و با عمل پیوند است به‌طوری که پیوندک آلوده به فیتوپلاسما قادر است پس از پیوند موفق، عامل بیماری را به پایه سالم انتقال دهد. در فعالیت‌های پژوهشی، برای انتقال بیماری‌های فیتوپلاسمایی به گونه‌ها و حتی گیاهانی که از لحاظ تکاملی از هم دور هستند، معمولا از گیاه انگلی سس استفاده می‌شود. توسط سس، فیتوپلاسمای جاروک لیمو ترش به پروانش (*Catharanthus roseus*) منتقل شده و علائم بیماری همانند علائم بیماری بر روی لیمو ترش، با کوچک شدن برگ‌ها، جاروئی شدن سرشاخه‌ها و بدشکلی میوه‌ها گزارش شده است (Garnier and Bove, 2000) (شکل ۱–a).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

روش‌های سنتی از قبیل کنترل ناقلین، و اقدامات قرنطینه‌ای قابلیت محدودی در کنترل بیماری دارند. به همین دلیل راه‌های موثر دیگری با پتانسیل بالا در مدیریت و کنترل خسارات بیماری مانند تولید ارقام مقاوم یا متحمل به بیماری از طریق اصلاح کلاسیک و یا تکنیک‌های زیست فناوری مانند تولید گیاهان تراریخته وجود دارد. موفقیت در معرفی ارقام مقاوم علاوه‌بر لزوم داشتن یک راهبرد صحیح در تولید آنها، نیازمند آزمون‌های مختلف ارقام در مقابل عامل بیمارگر است. به دلیل حساسیت بالا در احتمال انتقال ناخواسته بیماری توسط حشرات در آزمایش‌هایی که در سطح باغ و یا فضای باز وجود دارد، اینگونه آزمایش‌ها در وهله اول، نیازمند یک فضای ایزوله مانند گلخانه‌ها یا اتاقک‌های رشد هستند که بتوان عامل بیماری را بر روی آنها آزمایش کرد (Mardi et al. 2015).

بنابراین بهینه‌سازی روش انتقال بیماری به نهال‌های (تراریخته یا ارقام تازه) معرفی شده برای مطالعات تکمیلی بر روی آنها، ضرورت دارد و بهترین و ایمن‌ترین روش استفاده از پیوندک‌های آلوده است. به دلیل همین نیاز، لازم است تا فرآیند پیوند و دستیابی به گیاهان آلوده در شرایط کنترل شده بهینه‌سازی شود تا بتوان با اطمینان بالا تمام نهال‌های مورد آزمون را برای مطالعات تکمیلی، به‌طور همزمان و یکنواخت آلوده به عامل بیماری کرد. هدف از این پژوهش نیز رسیدن و هموار کردن این مسیر و بررسی عوامل دخیل در پیوند موفق است.

از تکنیک پیوند، علاوه‌بر تکثیر گیاهان، در بسیاری از زمینه‌های دیگر نیز استفاده می‌شود که می‌توان به مواردی همچون تشخیص آلودگی‌های ویروسی، ویروئیدی و فیتوپلاسمایی، تولید گیاهان پیوندی عاری از بیماری‌های ویروس و شبه‌ویروسی، حذف و غلبه بر محدودیت‌های اکولوژیکی و محیطی، جوان‌سازی بافت‌های بالغ و کوتاه کردن مرحله جوانی در درختان میوه، احیاء دوباره نوک-شاخساره‌های منجمد از طریق cryopreservation، حمل و نقل و امکان تبادل سریع ژرم‌پلاسم سالم، تسهیل در شناسایی زودهنگام ناسازگاری پیوند، نجات شاخساره‌های بدون ریشه و جنین‌های ناقص، مطالعه ارتباطات سیگنالی در بخش‌های مختلف گیاه و تولید گیاهان پلوئیدی اشاره کرد (Soheilivand. 2022). همانطوری‌که قبلا عنوان شد یکی از راه‌های انتقال بیماری و یا حتی ایجاد مقاومت به بیماری، استفاده از تکنیک پیوند است. از این روش در بسیاری از مطالعات برای بررسی رفتار و روند بیماری در گیاهانی همچون خیار (Sabry et al. 2015)، گوجه‌فرنگی (Spanò et al. 2020) و هندوانه (Devi et al. 2021) استفاده شده است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

مواد و روش‌ها

این پژوهش شامل مراحل مختلفی همچون تهیه پایه‌های لیمو ترش سالم، تهیه شاخساره‌های آلوده و سالم و تهیه پیوندک‌ها از آنها، انجام پیوند و بررسی علائم و آنالیز نتایج آنها و تایید نهایی به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)است.

تهیه پایه‌های لیمو ترش و PCR آنها جهت اطمینان از سالم بودن آنها

نهال‌های ۳-۲ ساله لیمو ترش تهیه شده قبل از ورود به گلخانه برچسب‌گذاری شده و از هر یک از آنها نمونه‌های برگی تهیه و از آنها دی.ان.اِ استخراج شد. پس از انجام PCR با جفت آغازگرهای P1 و P7 (جدول ۱) و اطمینان از عدم آلودگی به بیماری فیتوپلاسما در یک گلخانه ایزوله شده از حشرات قرار داده شدند.

تهیه شاخساره‌های سالم و آلوده به فیتوپلاسما

نمونه‌های آلوده توسط همکاران محترم در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس از درختان آلوده تهیه شده بودند. این نمونه‌ها در داخل روزنامه نم‌دار جهت حفظ رطوبت قرار داده و ارائه شده بودند (شکل ۱- b).

به محض دریافت شاخساره‌ها، آنها به قطعات کوچکتر تقسیم شده و در ظروف درب بسته در یخچال نگه‌داری شدند (شکل ۱-c).

شکل ۱- نمونه شاخساره‌ها و پیوندک‌ها. a) شاخه بارده آلوده به بیماری جاروک لیمو ترش با میوه‌های غیرطبیعی b) شاخساره‌های تهیه شده از درختان آلوده c) ظروف نگه‌داری شاخساره‌ها در یخچال تا قبل از عمل پیوند d) پیوندک با برگ بریده جهت استفاده در پیوند انتهایی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

نمونه‌های سالم نیز از درختان سالم لیمو ترش و آزمون شده با PCR تامین شدند. لازم به ذکر است در تمامی مراحل انجام آزمایش و در هر یک از مراحل انجام پیوندها، تمامی لوازم و ابزارهای مورد استفاده به دقت با الکل و مواد شوینده ضدعفونی و تمیز می‌شدند. همچنین تمامی مواد گیاهی باقیمانده، توسط اتوکلاو ضدعفونی و سپس معدوم شدند.

انواع پیوندها و آماده‌سازی پایه‌ها و پیوندک‌های لیمو ترش

در این پژوهش دو نوع روش پیوند جوانه (T معکوس) و انتهایی با دو نوع پیوندک سالم و آلوده بصورت فاکتوریل ۲*۲ با طرح پایه کاملا تصادفی با ۳ تکرار آزمایش شدند. در هر تکرار ۷ پیوند انجام شد. نتایج با نرم‌افزار آماری SAS آنالیز شد.

مقایسه میانگین تیمارها با روش دانکن و در دو سطح معنی‌دار پنج و یک درصد صورت گرفت. مشخصات پیوندها پس از ۱۰ روز سپری شدن از تاریخ پیوند زدن بررسی شد تا زمانی‌که پیوندک به‌طور کامل رشد کرده و علائم بیماری در آن ظاهر شود. پایه‌های لیمو ترش از درختچه‌های ۲-۳ ساله‌ای که در شرایط کاملاً ایزوله در گلخانه بودند، انتخاب شدند. این درختچه‌ها بصورت جداگانه در گلدان‌ها کاشته شده بودند (شکل ۲-a) و به‌طور مرتب هر چند روز یکبار آبیاری و هر ماه یکبار توسط محلول‌های غذایی محلول در آب، تغذیه می‌شدند. ملاک گیاهان منتخب، رشد مناسب و سالم بودن آنها بود.

برای تهیه پیوندک در وهله اول برگ‌ها و قسمت‌های اضافی آنها، از روی شاخساره حذف و جوانه‌های سالم برای استفاده انتخاب شدند (شکل ۱-c). برای هر پیوند شکمی (T معکوس)، یک جوانه خواب سالم انتخاب شد و درست قبل از ایجاد خراش بر روی پایه، از شاخساره به همراه پوست جدا و در پتری دیش پر از آب قرار داده شد تا رطوبت خود را تا زمان قرار دادن در محل پیوند از دست ندهد. برای پیوند انتهایی نیز یک پیوندک سالم انتخاب شده و برگ آن بریده می‌شد به‌طوری که یک سوم آن به همراه جوانه باقی بماند تا در جریان شیره خام به سمت پیوندک کمک کند (شکل ۱-d).

برای انجام پیوند T معکوس برگ‌ها و شاخه‌های اضافی در محل پیوند حذف شده و پس از آن دو برش عمود برهم به‌صورت T معکوس بر روی پوست پایه ایجاد می‌شد (شکل ۲-b). پس از بلند کردن لبه‌های پوست در محل شکاف، پیوندک جوانه با احتیاط وارد محل شکاف شده و زیر پوست بدون هیچ فاصله‌ای قرار می‌گرفت (وجود فاصله بین پیوندک و پوست علاوه‌بر ایجاد اختلال در ایجاد کالوس و مداخله در جوش خوردن، باعث نفوذ هوا شده و موجب خشک شدن

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

پیوندک و پوست پایه می‌شود). پس از انجام پیوند محل پیوند به‌طور کامل با نوار تفلون یا پارافیلم بسته می‌شد. در مورد پیوند انتهایی نیز شاخه‌هایی که قطر آنها تقریبا برابر با قطر پیوندک بودند در روی پایه انتخاب و بوسیله تیغ از وسط به‌طور عمود شکافی (به اندازه محل برش خورده انتهای پیوندک) ایجاد می‌شد (شکل ۲-c). سپس محل برش خورده پیوندک به‌طور کامل داخل شکاف قرار گرفته و محل شکاف کاملا با نوار پارافیلم یا تفلون پیچیده شده و با کیسه پلاستیک برای جلوگیری از تبخیر شدید پوشیده می‌شد (شکل ۲-d). (Rezazadeh et al. 2018).

شکل ۲- انواع پیوندها: a. پایه‌های همسن آماده برای پیوند T معکوس b. پیوند جوانه به روش T معکوس c. پیوند انتهایی d. پوشش پیوندهای انتهایی با کیسه پلاستیکی.

استخراج دی.ان.ای کل از برگ‌های گیاهان پیوندی

برای استخراج دی.ان.ای کل، از روش Zhang و همکاران (۱۹۹۸) با کمی تغییر استفاده شد. به این

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

صورت که حدود ۸۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (شامل دو درصد CTAB، 100 میلی‌مولار Tris، pH 8، ¼ مولار NaCl، 2 درصد PVP و ۲ درصد مرکاپتواتانل) در هر تیوپ ۲ میلی‌لیتری به همراه حدود ۲۰۰ میلی‌گرم پودر رگبرگ خرد شده در ازت مایع اضافه و در بن‌ماری در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت حدود نیم ساعت قرار داده شد. پس از آن بر روی آن حدود ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوآمیل الکل (به نسبت حجمی ۲۴ به ۱) اضافه و چندین بار وارونه شد. نمونه‌ها با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی به دقت به یک ویال تمیز منتقل و بر روی آن حدود ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل سرد (۲۰-) ریخته و چندین بار وارونه شد. سپس ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد و پلت دی.ان.ای باقیمانده با الکل ۷۰ درصد شسته، خشک و در ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل حل و در فریزر نگه‌داری شد.

مشخصات آغازگرها و PCR

غلظت‌های دی.ان.ای تمامی نمونه‌ها با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری و به یک میزان و غلظت یکسان‌سازی شد. جهت انجام PCR و تکثیر قطعات مختلف و اطمینان کامل از صحت نتایج، برای هر نمونه چهار نوع واکنش PCR انجام شد. اولین واکنش یک نمونه دی.ان.ای استخراج شده از یک لیمو ترش سالم به‌عنوان کنترل بود. دومین واکنش مربوط به نهال پیوند شده با پیوندک آلوده بود که با استفاده از جفت آغازگرهای پوشش پروتئینی IMP (جدول ۱) فیتوپلاسما انجام شد. واکنش سوم عیناً شرایط واکنش دوم را داشته با این تفاوت که آغازگرهای آن جفت آغازگرهای متداول P1 و P7 بود. نمونه چهارم برای اثبات درستی واکنش PCR و اجزای آن طراحی شده بود که شامل جفت آغازگرهای *18s rRNA* (جدول ۱) بود و در هر صورت بایستی باند تکثیر شده در این واکنش مشاهده می‌شد.

برای اینکه تمامی واکنش‌های متعلق به یک نمونه (به همراه کنترل‌ها) به‌طور همزمان و در یک ست PCR و در یک دستگاه انجام شود و تاییدی بر صحت همدیگر باشند، یک محلول Master برای کلیه واکنش‌ها تهیه شد که فقط در نوع آغازگرها و نمونه‌های دی.ان.اِ باهم فرق داشتند تا از این طریق خطا و اشتباه تکنیکی به حداقل ممکن برسد. مشخصات آغازگرهای مختلف برای PCR و طول محصول PCR پیش‌بینی شده در جدول ۱، آورده شده است. تمامی واکنش‌ها با جفت آغازگرهای مختلف در یک برنامه PCR واحد، انجام شد. شرایط و مراحل و تعداد چرخه‌های PCR به صورت یک چرخه به مدت ۴ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

شامل مرحله اول به مدت ۴۰ ثانیه با دمای ۹۵ درجه سلسیوس، مرحله دوم ۴۰ ثانیه با دمای ۵۵، مرحله سوم ۴۰ ثانیه با دمای ۷۲ درجه سلسیوس، یک چرخه: ۵ دقیقه ۷۲ درجه سلسیوس، با آغازگرهای مختلف PCR انجام شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرها و طول محصول PCR آنها

طول محصول	طول آغازگر	توالی آغازگر (5'-3')	نام آغازگر
۳۶۶	۲۱	agttggtgtgttagcatcttt	IPM-F- 48
	۲۲	tctttaggagcagcactttctt	IPM-R-392
۱۷۸۸	۲۵	aagagtttgatcctggctcaggatt	P1
	۱۸	cgtccttcatggctctt	P7
۶۱۹	۲۴	cttcgggatcggagtaatgattaa	*18s rRNA* FW
	۲۷	gcccagaacatctaagggcatcacaga	*18s rRNA* RW

نتایج

نتایج این پژوهش در سه قسمت بررسی علائم ظاهری و گزارش‌های مربوط به آن، آنالیز و تجزیه تحلیل و مقایسه آماری و نتایج ملکولی ارائه خواهد شد.

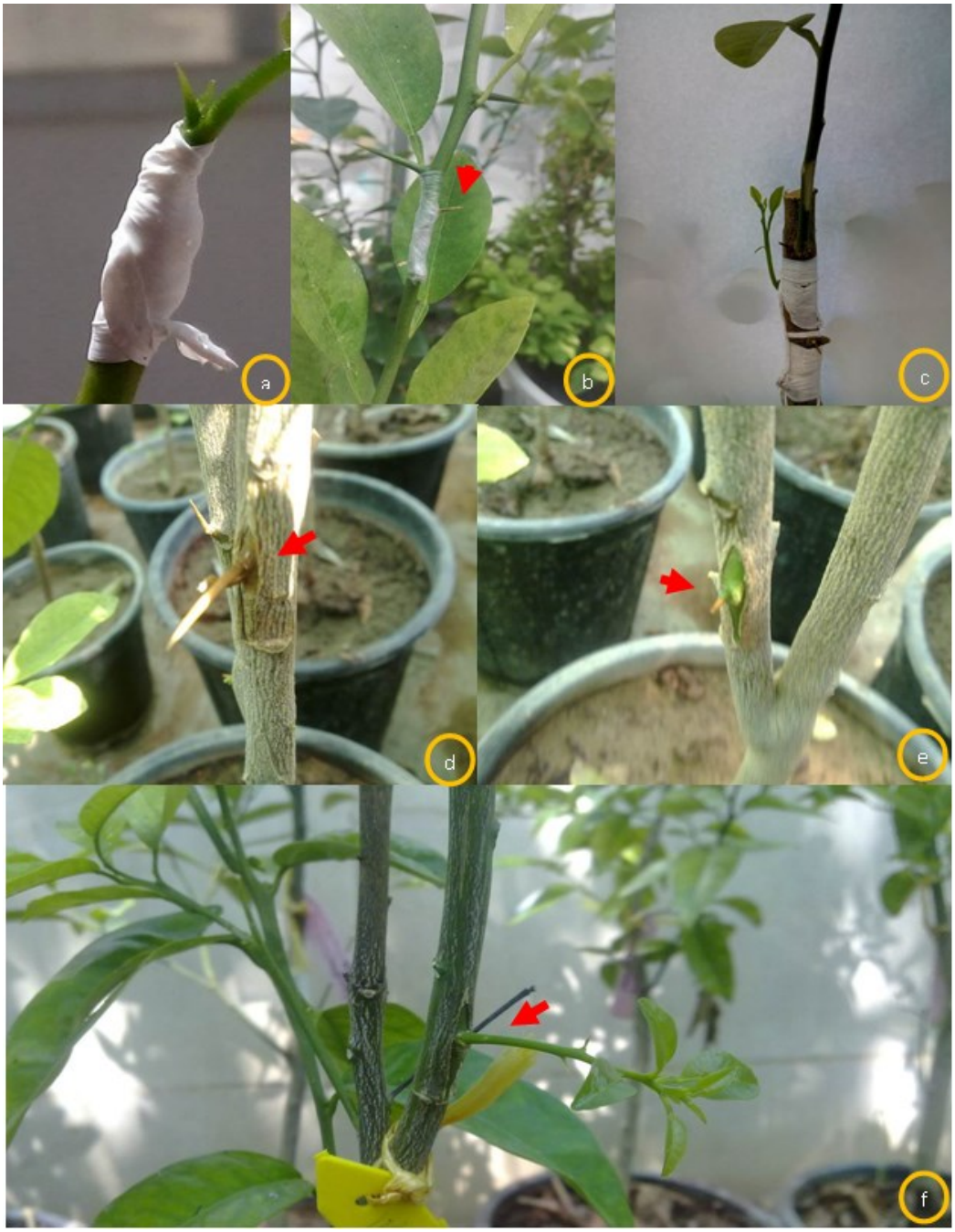
علائم ظاهری بیماری

سرنوشت پیوندک‌ها و موفقیت یا عدم موفقیت آنها بعد از گذشت ۱۰ روز تا چهار هفته بعد از زمان پیوند، تقریبا قابل تشخیص بود (شکل‌های ۳: a، b، d و e). بررسی اولیه ۱۰ روز پس از پیوند انجام شد. معمولا پیوندهایی که ناموفق بودند با مشاهده خشک شدن نوک تیغ جوانه که این خشک شدن بسمت جوانه توسعه می‌یافت، در مدت ۱۵-۱۰ روز مشخص می‌شد (شکل ۳-b). این نوع پیوندهای ناموفق به‌طور معمول پس از گذشت سه هفته کاملا خشک شده و از بین می‌رفتند (شکل ۳-d) در حالی‌که پیوندهای سالم هم در پیوند شکمی و هم در پیوند انتهایی به رنگ سبز باقی می‌ماندند و ناحیه پیوند بدلیل تشکیل کالوس و اتصال پیوندک به پایه متورم می‌شد (شکل ۳-a و e) و پس از گذشت چند هفته جوانه تبدیل به یک شاخساره سبز می‌شد (شکل ۳-c و f).

علائم تیپیک بیماری جاروک در کمتر از پنج ماه به‌طور مشهود به صورت برگ‌های کوچک، مجتمع و با رنگ سبز روشن نسبت به گیاهان سالم قابل مشاهده بود. با پیشرفت بیماری تیپ گیاه آلوده به صورت توده کروی‌تر نسبت به گیاه سالم با تیپ کشیده دیده می‌شد و این به دلیل شاخساره‌های کوتاه‌تر با حالت جاروماننند بود (شکل ۳-g).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

با پیشرفت بیماری شاخه‌های قدیمی‌تر، برگ‌های خود را از دست داده و از انتها شروع به خشک شدن می‌کردند (شکل ۳-h). در مراحل پیشرفته‌تر و به‌خصوص زمانی‌که پایه از قدرت لازم برخوردار نبود و دارای بنیه ضعیفی بود، گیاه به‌طور کامل خشک شده و از بین می‌رفت (شکل ۳-i).



[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

شکل ۳- مشاهدات مربوط به نتایج پیوند a. پیوندک متورم در پیوند انتهایی موفق b. خشک شدن تیغ جوانه پیوندک از علائم پیوند ناموفق c. رشد شاخساره از جوانه پیوندک پس از حذف تنه اصلی (شاخه اصلی بالای محل پیوندک) d. خشک شدن کامل پیوندک در یک پیوند ناموفق e. سبز باقی ماندن پیوندک و متورم شدن آن در پیوند موفق (با تشکیل کالوس در محل پیوندک و ارتباط پیوندک با پایه) f. رشد جوانه پیوندک و تبدیل شدن به شاخساره g. علائم جاورئی شدن در اطراف محل پیوند (مقایسه برگ‌های کوچک و کم رنگ نهال آلوده در وسط تصویر با برگ‌های بزرگ، سبز و طبیعی نهال سالم همسن در سمت راست تصویر) h. ظهور علائم بیماری در کل گیاه و شروع خشک شدن شاخساره‌ها در مراحل پیشرفته (مقایسه نهال بیمار در سمت راست به همراه نهال سالم کنترل در سمت چپ عکس) i. خشک شدن کامل نهال پیوندی آلوده شده به فیتوپلاسما در اثر پیشرفت حاد بیماری در سراسر گیاه

نتایج تجزیه و تحلیل آماری تیمارهای پیوند

همانطوری‌که ذکر شد تیمارها شامل دو روش پیوند جوانه T معکوس و پیوند انتهایی در ترکیب با دو نوع پیوندک سالم و بیمار بود که بصورت فاکتوریل ترکیب شده بودند. پس از اینکه پیوندهای موفق با رشد کامل جوانه و تبدیل آن به شاخساره تایید شدند. داده‌برداری انجام و آنالیز آماری انجام شد. نتایج نشان داد که نوع پیوندک (سالم یا بیمار) در سطح ۵ درصد و روش پیوند (شکمی یا انتهایی) در سطح ۱ درصد معنی‌دار شدند. آنالیزهای مربوط به هیچ یک از اثرات متقابل معنی‌دار نبودند (جدول ۲).

بنابراین مشخص شد که پیوند جوانه (T معکوس) از لحاظ موفقیت نسبت به پیوند انتهایی با اختلاف بسیار معنی‌دار روش مناسب هم برای پیوند پیوندک‌های سالم و هم بیمار، است (در سطح ۱ درصد). در مقایسه بین پیوندک سالم و بیمار مشخص شد گیرایی پیوندک سالم نسبت به پیوندک آلوده به فیتوپلاسما بیشتر بوده است (در سطح ۵ درصد).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

جدول ۲- اثر نوع پیوندک (سالم یا بیمار) و روش پیوند (جوانه‌ای یا انتهایی) در موفقیت آن

تیمارها	درصد پیوندهای موفق
پیوندک از شاخه آلوده (بیمار به فیتوپلاسما)	۳۱/۰ b*
پیوندک از شاخه سالم (عاری از بیماری)	۴۲/۹ a
پیوند جوانه (پیوند شکمی)	۵۷/۱ a**
پیوند انتهایی	۱۶/۷ b
پیوندک سالم/پیوند جوانه	۶۶/۷ ns
پیوندک سالم/پیوند انتهایی	۱۹/۰ ns
پیوندک آلوده/پیوند جوانه	۴۷/۶ ns
پیوندک آلوده/پیوند انتهایی	۱۴/۳ ns

*: اختلاف در سطح (α=0.05)، **: اختلاف در سطح (α=0.01)، ns: بدون اختلاف معنی‌دار

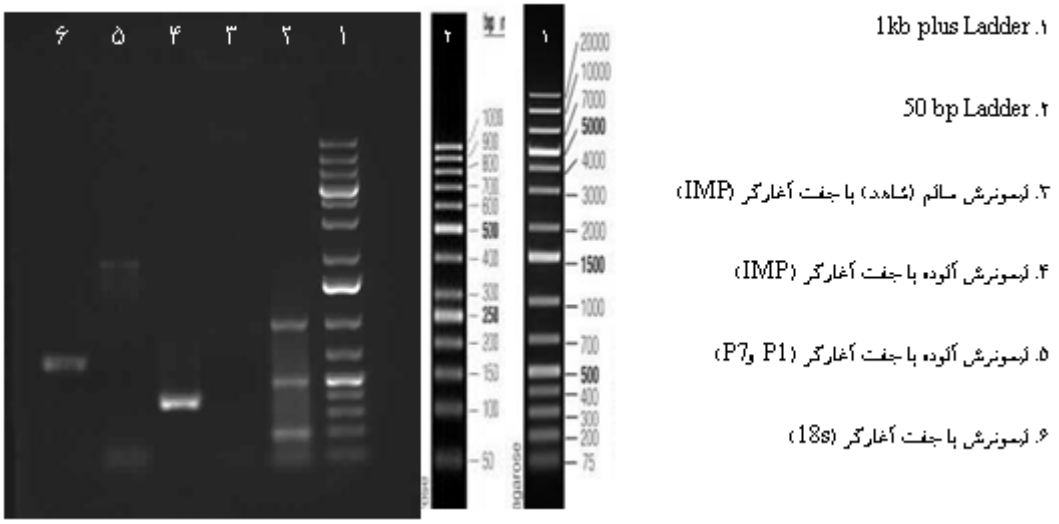
با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان به یک استنباط کلی رسید که احتمالا یکی از عوامل موثر در پایین بودن درصد پیوند در پیوندک‌های آلوده نسبت به سالم، وضعیت فیزیولوژیکی ضعیف پیوندک‌های آلوده است.

تایید ملکولی نمونه‌های آلوده توسط PCR

تمامی نهال‌هایی که پیوندشان موفق بود و پیوندک توانسته بود به‌طور کامل در آنها رشد کند و علائم بیماری نشان دهد، انتخاب و از رگبرگ‌های برگ‌های آنها دی.ان.اِ استخراج و طبق برنامه PCR و آغازگرهای ذکر شده برای تایید حضور فیتوپلاسما در گیاه، PCR انجام شد. نتایج نشان داد که در تمامی مواردی که پیوندک آلوده توانسته بود به پایه پیوند شود حضور عامل بیماری فیتوپلاسما می‌توانست توسط PCR تایید شود.

همانطوری‌که در شکل ۴ مشخص است آغازگرهای (IPM-F- 48 و IPM-R- 392) و (P1 و P7) که به ترتیب قطعاتی از ژن‌های *IMP* و *16s rRNA* فیتوپلاسما را تکثیر می‌کنند، توانسته‌اند نمونه‌های آلوده را تایید کنند. وجود جفت آغازگر *18s rRNA* برای تایید صحت PCR بوده که قطعه‌ای از ژن *18s rRNA* لیمو ترش را تکثیر می‌کرد که می‌تواند در مواردی که هیچ باندی در نمونه‌ها (به‌عنوان مثال نمونه‌های سالم) دیده نشود به‌عنوان تاییدکننده صحت PCR عمل کند (بایستی در تمامی نمونه‌ها چه سالم و چه آلوده باند *18s rRNA* مشاهده شود).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]



شکل ۴- تایید ملکولی نمونه گیاهی با پیوند موفق توسط PCR به همراه کنترل‌های آن (کنترل منفی گیاه سالم و کنترل مثبت ژن داخلی *18s rRNA*)

بحث

کشاورزی پایدار نیازمند استفاده از روش‌های مختلف مدیریت‌های موافق با محیط زیست مانند استفاده از آفت‌کش‌های زیستی (Bt)، کم کردن اثرات سموم و کودهای شیمیایی و شناخت کامل سیکل بیماری‌ها برای کنترل آنهاست (Sadeghi et al. 2016; Zhanget al. 2023). نیاز برای تولید گیاهان سالم و عاری از بیماری یکی از اصول در توسعه کشاورزی و به‌خصوص صنعت باغداری است. برای مقابله با برخی از بیماری‌های مخرب، همانند بیماری‌های فیتوپلاسمایی، در درختان مثمر هسته‌دار، شاید تنها راه ممکن، استفاده از پایه‌ها و پیوندک‌های سالم و مقاوم باشد (Jarausch et al. 1999).

علاوه‌براین با استفاده از پیوندک آلوده، پژوهشگران قادر هستند مکانیسم‌های عفونت فیتوپلاسما، توسعه علائم و پاسخ میزبان در گیاهان مرکبات را به دقت تحت شرایط کاملاً کنترل شده، بررسی کنند. بنابراین بهینه‌سازی تکنیک پیوند پیوندک آلوده، ابزار ارزشمندی را برای پیشبرد درک ما از این بیماری مهم اقتصادی مرکبات فراهم خواهد کرد.

در حالت طبیعی، عوامل مختلفی در انتقال فیتوپلاسماها به گیاهان نقش دارند. یکی از دلایل انتقال بیماری که به صورت ناخواسته اتفاق می‌افتد، استفاده از ابزاری است که با شیره گیاه آلوده، تماس داشته است. به طور قطع، استفاده از پیوندک آلوده نیز می‌تواند باعث انتقال عامل بیماری به پایه سالم حساس باشد. علاوه‌بر پیوند، می‌توان از گیاه سسی که بر روی گیاهان آلوده مستقر می‌شود، بیماری را به گونه‌های دیگر منتقل کرد (Gogoi et al. 2022). با وجود این، از گیاه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

سس معمولا برای انتقال بیماری‌های فیتوپلاسما به گیاهان علفی مانند تاج‌ریزی (*Solanum nigrum*) و پروانش (*C. roseou*) استفاده می‌شود (صالحی، ۱۳۹۴). در واقع ناقل طبیعی بیماری جاروی جادوگر، زنجرک (*H. phycitis*) است که با تکثیر و تخم‌گذاری بر روی درختان آلوده، فیتوپلاسما را به درختان سالم منتقل می‌کند. با اینحال، استفاده از حشره زنجره برای آلوده‌سازی نهال‌های لیمو ترش در فعالیت‌های پژوهشی به خاطر خطرات انتشار بیماری به خارج از گلخانه، دارای ریسک بسیار بالایی است. همچنین، کاربرد گیاه انگلی سس می‌تواند در برخی موارد غیر قابل کنترل بوده و به خارج از گلخانه، گسترش یابد. بنابراین بهترین و قابل کنترل‌ترین روش برای انتقال بیماری در مطالعات علمی، استفاده از پیوندک‌های آلوده در شرایط کاملا ایزوله و کنترل شده گلخانه یا اتاقک رشد محبوس است.

در پژوهش حاضر برای رسیدن به یک پیوند موفق، از هر دو نوع پیوندک سالم و بیمار استفاده شد و موفقیت دو نوع روش پیوند شکمی یا T معکوس و پیوند انتهایی با هم مقایسه شد. به‌طور خلاصه همانطوری‌که نتایج آماری نشان دادند، روش پیوند T معکوس با استفاده از جوانه، در هر دو نوع پیوندک سالم و آلوده، از موفقیت معنی‌داری نسبت به روش پیوند انتهایی برخوردار بود. به نظر می‌رسد دلیل اصلی آن در عدم جریان صحیح شیره نباتی در انتهای شاخساره گیاه باشد. در حالی که در پیوند جوانه قسمت بالا و سبز نهال باعث حرکت شیره گیاهی و تداوم تبادل مواد غذایی و مهمتر از آن رطوبت مناسب زیر پوستی در اطراف جوانه داخل پوست، در حالت پیوند شکمی نسبت به پیوند انتهایی است. در مقایسه بین نوع پیوندک‌ها نیز پیوندک حاصل از شاخساره‌های سالم از موفقیت بیشتری نسبت به پیوندهای حاصل از شاخه‌های بیمار به عامل فیتوپلاسما برخوردار بودند. شاید بتوان گفت دلیل اصلی آن در اثرات منفی عامل بیمارگر موجود در آوندهای آبکشی گیاه بیمار باشد. همچنین اثرات منفی حضور عامل بیماری در گیاه باعث برهم زدن تعادل هورمونی گیاه بیمار شده که خود موجب تولید انشعابات زیاد جارو مانند شاخساره‌ها بر روی تنه و شاخه‌ها می‌شود (Dermastia 2019). همین عامل سبب رشد و نمو شاخساره‌های نازک، ضعیف با قطر کم و با برگ‌های رنگ پریده می‌شود. بنابراین جوانه‌های حاصل از این شاخساره‌ها در مقابل جوانه‌های شاخه‌های سالم از بنیه ضعیفی برخوردارند و دور از انتظار نخواهد بود اگر دلیل اصلی این اختلاف را در پتانسیل پایین پیوندک‌های متعلق به شاخساره‌های بیمار دانست.

یکی از فاکتورهای مهم در موفقیت پیوند، قرار گرفتن صحیح پیوندک در محل پیوند و داشتن

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

ارتباط درست با پایه، است. این بدلیل، تشکیل کالوس و اتصال بافت‌های آوندی پیوندک و پایه در محل پیوند است. زمان تشکیل بافت کالوس و تشکیل یک پیوند محکم بین پایه و پیوندک در گیاهان مختلف متفاوت است. ایجاد اتصالات آوندی در گیاه مو پس از گذشت ۸ روز، گزارش شده است (Cantos et al. 1993). در مورد گیاه خرنوب (*Ceratonia siliqua* L.)، مطالعات هیستولوژی نشان داده است که انتهای هفته دوم، کالوس در منطقه پیوند تشکیل شده و در هفته چهارم تمایز آوندهای آبکش انجام می‌شود (Hsina and Mtili, 2009). در مطالعه‌ای موقعیت محل پیوند از طوقه برای پیوند لیمو ترش (*Citrus aurantifolia* Swingle) بر روی پایه نارنج سه برگ بررسی شده است، نتایج آن نشان داده است که بهترین ارتفاع، ۱۶ سانتی‌متر است (Chalise et al. 2013). عوامل دیگری نیز در بالا بردن موفقیت دخیل هستند. به‌طور مثال برای تشکیل یک پینه محکم بایستی رطوبت در محل پیوند تا زمان ترمیم کامل حفظ شود (Hussain et al. 2014). توصیه می‌شود برای بالا بردن انعطاف پوست گیاهان و گیرایی پیوند، یک روز قبل از پیوند نهال‌ها به صورت کامل آبیاری شوند.

نتیجه‌گیری

پیوند یکی از راه‌های بسیار مهم در تکثیر ژنوتیپ‌ها و مواد گیاهی منتخب است. این روش می‌تواند جهت مطالعاتی از قبیل بررسی بیماری‌ها و روند آن کاربرد داشته باشد. روند پژوهش‌ها برای دستیابی به نمونه‌های بیمار در درختچه‌های گلدانی موجود در گلخانه با استفاده از تکنیک پیوند پیوندک آلوده، علاوه‌بر ایجاد شرایط استاندارد برای پژوهش بر روی مشخصات و روند بیماری (نسبت به شرایط آزاد و کنترل نشده در باغ)، خطرات و ریسک‌های انتقال بیماری توسط حشرات و ابزارآلات آلوده را به شدت پایین می‌آورد. بنابراین نتایج این پژوهش می‌تواند زمینه‌ساز پژوهش‌های وسیع‌تر به‌عنوان مثال تولید گیاهان تراریخته پلنتی‌بادی و بررسی میزان کارآیی آنها با پیوند پیوندک آلوده و یا ارزیابی ارقام جدید مقاوم یا متحمل به بیماری‌های مرکبات باشد و یا شرایط را برای بررسی کارآیی و دقت عمل کیت‌های تشخیصی ملکولی و یا مبتنی‌بر ایمونواسی‌ها، فراهم سازد.

در کل بر حسب تجربه در حین انجام پژوهش، مشخص شد که استفاده از پایه‌های قوی که به‌طور منظم و اصولی تغذیه شده‌اند در زنده‌مانی نهال بعد از پیوند موفق نقش مهمی دارد. همچنین با دقت بستن محل پیوند به‌طوری‌که هیچ فضای خالی برای حضور هوا بین پیوندک و پایه در محل پیوند وجود نداشته باشد و رطوبت پیوندک و پوست پایه حفظ شود، نقش بسیار موثری در موفقیت پیوند و انتقال بیماری دارد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

تشکر و قدردانی

لازم است از لطف و مساعدت همکاران محترم جناب آقای دکتر محمد صالحی ابرقوئی و جناب آقای دکتر محمد مهدی فقیهی در ارائه نظرات تخصصی و نیز جناب آقای مهندس امیر توسلی از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، در ارائه شاخساره‌های آلوده، کمال تشکر و امتنان را داشته باشم.

فهرست منابع

References

Agricultural Statistics. 2022. Ministry of Agricultural Jihad, Planning and Economic Deputy, Information and Communication Technology Center, third volume: horticultural products. 328 p.

Albanese M and Garnier M. 2006. *Candidatus* Phytoplasma aurantifoliae. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 36: 117–119.

Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Jancso Radek A, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW, Hogenhout SA. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. J. Bacteriol. 188: 3682–3696.

Bove JM. 1986. Witches' broom disease of lime. FAO Plant Protection Bulletin. 34: 217–218.

Bove JM, Danet JL, Bananej K, Haasanzadeh N, Taghizadeh M, Salehi M, Garnier M. 2000. Witches' broom disease of lime (WBDL) in Iran. In: Proceeding 14th Conference International Organization of Citrus Virology, Riverside, CA. 207-212.

Cantos M, Ales G, Troncoso A. 1993. Morphological and anatomical aspects of a cleft micrografting of grape explants in vitro. In International Symposium on Viticulture and Enology. 388: 135-140.

Chalise B, Paudyal KP, Srivastava SP. 2013. Effect of grafting height on success and subsequent growth of acid Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) saplings. Nepal Journal of Science and Technology. 14(2): 25-32.

Chung KR, Khan IA, Brlansky RH. 2006. Citrus diseases exotic to Florida: Witches' broom disease of lime (WBDL). Fact Sheet. 228.

Dermastia M. 2019. Plant hormones in phytoplasma infected plants. Frontiers in plant science, 10: 1-15.

Devi P, Tymon L, Keinath A, Miles C. 2021. Progress in grafting watermelon to manage Verticillium wilt. Plant Pathology. 70(4): 767-777.

Garnier M and Bove JM. 2000. Etiology of witches' broom disease of lime (WBDL). Proceedings of the 9th International Citrus Conferece .Orlando, Florida, USA.

Garnier M, Zreik L, Bové JM. 1991. Witcheś 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: Proc.11th Conf. IOCV., Riverside. 448-453.

Ghosh DK, Das AK, Singh S, Singh SJ, Ahlawat YA. 1999. Occurrence of witches' broom, a new phytoplasma disease of acid lime (*Citrus aurantifolia*) in India. Plant Disease. 83(3): 302.

Gogoi A, Baruah N, Poudel M, Gupta R, Baruah G, Borah BK. 2021. Parasitic plants as vectors for pathogens. In Parasitic Plants. Intech, 108 p.

Golmohammadi M, Khankahdani HH, Rastegar S. 2023. Reaction of some Persian lime accessions on different rootstocks to witches' broom disease of lime. Phytopathogenic Mollicutes. 13(1): 65-66.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

Hogenhout SA, Oshima K, Ammar E, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Molecular Plant Pathology, 9:403–423.

Hsina T, Mtili NE. 2009. In vitro micrografting of mature carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). The Open Horticulture Journal. 2: 44-48.

Hussain G, Wani M, Mir M, Rather Z, Bhat K. 2014. Micrografting for fruit crop improvement. African J. Biotec. 13: 2474-2483.

Jarausch W, Lansac M, Bliot C, Dosba F. 1999. Phytoplasma transmission by in vitro graft inoculation as a basis for a preliminary screening method for resistance in fruit trees. Plant Pathology. 48: 283-287.

Kube M, Mitrovic J, Duduk B, Rabus R, Seemüller E. 2012. Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. The Scientific World Journal. 2012: 1-25.

Mardi M. 2012a. "Establishment of Iran's witches' broom disease of lime network" (Final Report), Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). 57.

Mardi M. 2012b. Report of the comprehensive management plan for witches' broom disease of lime, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). 822.

Mardi M, Karimi Farsad L, Gharechahi J, Salekdeh GH. 2015. In-Depth Transcriptome Sequencing of Mexican Lime Trees Infected with *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia. PLoS One. 10(7): 1-23.

Noorizadeh S, Golmohammadi M, Faghihi MM. 2023. Effect of temperature on symptom expression of witches' broom disease in a susceptible genotype of Persian lime. Phytopathogenic Mollicutes. 13(1): 67-68.

Rezazadeh N, Asadi Abkenar A, Rouhibakhsh A. 2018. Reaction assessment of a number of citrus hybrids to *'Candidatus* Phytoplasma aurantifolia", Iranian Journal of Plant Pathology. 54(3): 173-183.

Sabry S, Ali AZ, Abdel-Kader DA, Abou-Zaid MI. 2022. Histopathological and biochemical aspects of grafted and non-grafted cucumber infected with stem rot caused by *Fusarium* spp. Saudi Journal of Biological Sciences. 29(3): 1770-1780.

Sadeghi M, Sadeghi A, Karimi E. 2016. A review on Bacillus thuringiensis Berliner (Bt) as bioinsecticide. Journal of Biosafety. 9(2): 99-114.

Salehi M. 2014. Management of witches' broom disease of lime, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Instruction 12.

Soheilivand S. 2022. Micrografting and its Applications in Agriculture and Natural Resources. Journal of Biosafety, 15 (1): 1-16 (In Farsi with English abstract)

Spanò R, Ferrara M, Gallitelli D, Mascia T. 2020. The role of grafting in the resistance of tomato to viruses. Plants. 9(8): 1042.

Zhang N, Wang Z, Shao J, Xu Z, Liu Y, Xun W, Miao Y, Shen Q, Zhang R. 2023. Biocontrol mechanisms of *Bacillus*: Improving the efficiency of green agriculture. Microbial Biotechnology, 16(12): 2250-2263.

Zhang YP, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. Journal of Virological Methods. 71(1): 45-50.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]

Investigating of Optimal Conditions for the Transmission of Phytoplasma Disease Agent Using Infected Scions on Mexician Lime Seedling for Phytopathological Studies

Saeed Soheilivand*[1] and Mohammadreza Safarnegad[2]

1- Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

2- Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

soheilivand@gmail.com

Abstract

The lime tree witches' broom disease is a lethal and quarantine-regulated disease that poses a significant threat to lime orchards in southern Iran. The disease can be transmitted to healthy lime trees through various methods, including insect vectors, infected scions, and the use of contaminated tools. Unfortunately, due to its quarantine status, extensive research and testing opportunities in open field conditions are limited. Therefore, many scientific studies must be conducted in isolated and controlled locations such as growth chambers and greenhouses to perform initial scientific research on the interaction between the pathogen and the plant, factors contributing to disease progression, testing various control and management methods, examining disease-tolerant plant varieties, and testing diagnostic kits in controlled environments. The objective of this research is to find the best conditions for producing plants infected with the phytoplasma disease, which can be used in subsequent studies. In this study, both infected and healthy scions (as controls) were utilized with two types of T-budding (inverted T) and terminal grafting. By analyzing grafting conditions and the characteristics of rootstocks and scions, it was determined that budding grafts were more successful than terminal grafts in transferring the disease.

Keywords: Scions, Rootstock, Witches' Broom Disease, Disease Transmission.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-16]