جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان حفظ نباتات کشور

راهنمای شناسائی و ردیابی

آفت قرنطینه خارجی

بیماری زردی انگور

Candidatus Phytoplasma vitis

Acholeplasmatales:Acholeplasmataceae

تهیه و تنظیم:

احمد چراغیان

دفتر پایش و تحلیل خطر

1404

بیماری فیتوپلاسمائی زردی انگور

Candidatus Phytoplasma vitis

Domain: Bacteria
Phylum: Firmicutes
Class: Mollicutes
Order: Acholeplasmatales Family:
Acholeplasmataceae

Common name:

FD, flavescence dorée phytoplasma, flavescence dorée de la Vigne, flavescencia dorada de la viña, flavescenza dorata de la vite, grapevine "flavescence dorée" phytoplasma, grapevine yellows.

اهمیت اقتصادی:

بیماری فیتوپلاسمایی زردی انگور «**Candidatus Phytoplasma vitis**» (که در اینجا به اختصار «**Ca. P. vitis**» نامیده می‌شود) باعث ایجاد **flavescence dorée (FD)**، یک بیماری بسیار جدی زردی انگور در تاکستان‌ها و یک آفت قرنطینه در اروپا می‌شود. شایع ترین آسیب مرتبط با **FD** از دست دادن قابل توجه تولید انگور به دلیل کاهش تدریجی گیاهان است. در بیشتر موارد، به ویژه در گونه های حساس تر، انگورهای آلوده در عرض چند سال می میرند. بیماری فیتوپلاسمایی زردی انگور(**FD**) ،توسط چندین سویه ایجاد می شود که به زیرگروه های فیلوژنتیکی فیتوپلاسما **SrV-C16** و **D-** تعلق دارند. سویه های طبقه بندی شده در زیر گروه **SrV-D16** بیشترین شیوع را دارند (**Arnaud et al. 2007; Filippin et al., 2009**).

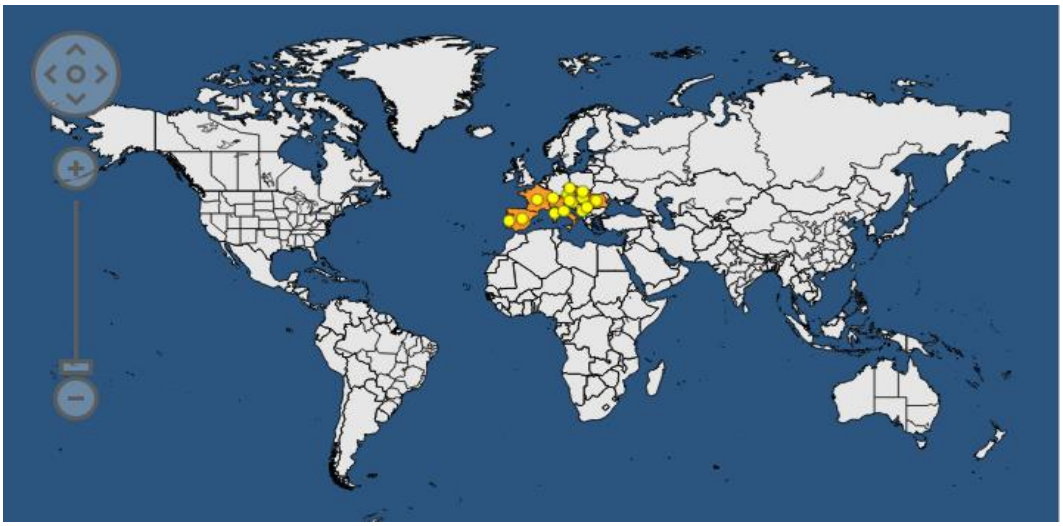
میزبانها:

درختان انگور مهمترین میزبان این بیماری می باشند، لیست کلی میزبانها به شرح ذیل می باشد

Major hosts:
All *Vitis vinifera* varieties are sensitive to FD but may not express symptoms of the disease to the same degree (Boudon-Padieu, 2002). *Vitis* rootstocks are also susceptible to infection.
Other possible hosts: *Alnus glutinosa, Alnus incana,* and *Clematis vitalba* (Arnaud et al. 2007, Filippin et al., 2009; Mehle et al., 2011).
Recent evidence points to these hosts as possible alternate hosts of FD phytoplasma strains (Filippin et al., 2009; Mehle et al., 2011).
Experimental hosts: *Chrysanthemum carinatum, Trifolium repens,* and *Vicia faba* (EPPO, 2012).

پراکنش جغرافیائی:

اروپا:اطریش، ،اطریش، کرواسی،چک،فرانسه، مجارستان ، ایتالیا،، مونته نگرو،پرتغال،رومانی،صربستان، ،اسلواکی ،اسلونی ،اسپانیا،



نقشه پراکنش بیماری فیتوپلاسمائی زردی انگور

زیست شناسی:

مانند سایر فیتوپلاسماها، 'Ca. P. vitis یک انگل داخل سلولی اجباری است که در آوندهای آبکش گیاهان آلوده رخ می دهد (CABI, 2007). به طور کلی فیتوپلاسماها به صورت گردشی-تکثیری توسط حشرات ناقل تغذیه کننده آبکش به گیاهان منتقل می شوند. مصرف شیره گیاهان بیمار توسط آنها یک مرحله نهفتگی/ نهفتگی به مدت یک تا چند هفته به طول می انجامد که در طی آن این باکتری ها گردش می کنند، تکثیر می شوند و بافت ها و اندام های مختلف ناقل مربوطه خود را انگلی می کنند. هنگامی که غدد بزاقی کلونیزه شدند، ناقلان قادر به انتقال فیتوپلاسما در طول هر فعالیت تغذیه بعدی برای طول عمر باقیمانده خود هستند (Weintraub and Beanland، 2006؛ Gitau et al.، 2009). فیتوپلاسماها از طریق پیوند مواد آلوده نیز منتقل می شوند.

ناقل تایید شده برای FD، قاچ برگ *Scaphoideus titanus* Ball (S. titanus) است که معمولاً به عنوان سرخرطومی آمریکایی انگور شناخته می شود (Schvester et al., 1961). برای FD، دوره نهفتگی / نهفتگی در 4 *S. titanus* هفته است. با تغذیه از فرد مبتلا. انگور و سپس تغذیه از سایر انگورها، ناقل بیماری را از طریق تاکستان پخش می کند. *S. titanus* مسئول گسترش سریع FD در فرانسه و اروپا است (Papura et al. 2009). با این حال، انتشار از راه دور عمدتاً نتیجه حمل و نقل مواد تکثیر آلوده توسط انسان است. *S. titanus* بومی ایالات متحده است و احتمالاً زمانی که پایه های آمریکایی به عنوان بخشی از مبارزه با سفیدک کرکی و فیلوکسرا در اوایل قرن بیستم وارد شد، در اروپا معرفی شد (Caudwell et al., 1983; Papura et al., 2012).

مطالعات ژنومی اخیر نشان داده است که سویه های فیتوپلاسما مسئول FD در اروپا منشا گرفته اند (Arnaud et al., 2007, Malembic-Maher et al., 2011).

تنها با معرفی اخیر ناقل *Scaphoideus titanus* از آمریکای شمالی بود که FD توانست به سرعت در بین درختان انگور *Vitis vinifera* گسترش یابد (INRA, 2013). مطالعات اخیر انجام شده بر روی برگ خوار *S. titanus* نشان می دهد که دمای سرد زمستانی برای پایان دادن به دیاپوز ضروری نیست، اگرچه آنها در طول زمان بر نسبت نر به ماده تأثیر می گذارند.

مطالعات همچنین نشان داد که دمای زمستان دینامیک جوجه ریزی را تنظیم می کند (چوچه و تیری، 2012). این یافته ها بسیار مهم هستند زیرا اکنون می توان اولین جوجه ریزی را پیش بینی کرد و می توان از آنها برای کنترل بهتر لاروها قبل از اینکه فرصتی برای بدست آوردن فیتوپلاسما داشته باشند استفاده کرد. این یافته‌ها همچنین امکان پیش‌بینی توانایی ناقل برای استعمار نواحی تولید شراب جدید را فراهم می‌کند (INRA، 2013).

مانند بسیاری دیگر از حشرات گیاهخوار، به ویژه حشرات مکنده، *S. titanus* جذابیت زیادی به رنگ زرد نشان می دهد. به نظر می رسد که این جاذبه با برگ های جوان و در حال رشدی مرتبط است که از نظر نیتروژن غنی تر هستند و بنابراین ارزش غذایی بالقوه بیشتری برای حشره دارند. *S. titanus* توسط رنگ سبز به میزان کمتر، اما هنوز قابل توجهی جذب می شود. زرد و تا حد زیادی سبز رنگ‌هایی هستند که بیشتر در تاک‌ها وجود دارند. جذب حشره به این رنگ ها برای انتشار FD بسیار مهم است. حشرات بیشتر جذب برگ های زرد گونه های سفید آلوده به FD می شوند و در نتیجه چرخه معیوب را تحریک می کنند (INRA، 2013).

آزمایش‌های انتخابی انجام‌شده با واریته سفید Baco 22A، واریته‌ای که به‌طور گسترده در آرمانیاک، فرانسه کاشته می‌شود و بسیار حساس به FD است، تأیید کرد که گیاهان آلوده به FD، *S. titanus* بیشتری را، هم در مراحل لاروی و هم در مرحله بالغ، جذب می‌کنند. جذابیت گیاهان آلوده ممکن است تا حدی در توضیح گسترش سریع بیماری باشد (INRA، 2013).

در مورد اینکه آیا *Clematis vitalba* و *Alnus spp* اختلاف نظر وجود دارد. (توسکا) "میزبان طبیعی" برای فیتوپلاسما FD هستند. همچنین در مورد اینکه آیا *Dictyophara europaea* و *Oncopsis alni* ناقل طبیعی فیتوپلاسمای FD هستند یا خیر، اختلاف نظر وجود دارد. فیتوپلاسماها از نظر ژنتیکی بسیار شبیه به فیتوپلاسماهای FD (گروه SrV-C16) در هر دو میزبان یافت شده اند و به ندرت می توانند به انگور منتقل شوند (فیلیپین و همکاران (2009) نشان داد که فیتوپلاسمای مرتبط با FD، که در مقاله به آن FD گفته می شود، می تواند گهگاه از گیاهان آلوده *Clematis vitalba* به انگور توسط گیاه خراش *Dictyophara europaea*، که معمولاً به عنوان مگس فانوس اروپایی شناخته می شود (غیرعادی در ایالات متحده) منتقل شود. ژنوتیپ های مرتبط با FD/FD نیز در توسکا شناسایی شد (Malembic-Maher و همکاران، 2007؛ Ember و همکاران، 2011؛ Mehle و همکاران، 2011)، و نشان داده شد که خرطومی *Oncopsis alni* می تواند گاهی اوقات زرد توسکا را منتقل کند.

فیتوپلاسما (SrV-C16) به انگور (Maixner et al., 2000). فیتوپلاسما FD طبق تعریف می تواند توسط *S. titanus* منتقل شود. فیتوپلاسماهای مشابه ژنتیکی به FD در توسکا و کلماتیس نشان داده نشده است که توسط *S. titanus* منتقل می شوند. بنابراین، این فیتوپلاسماها در این سند به عنوان مرتبط با FD معرفی خواهند شد.

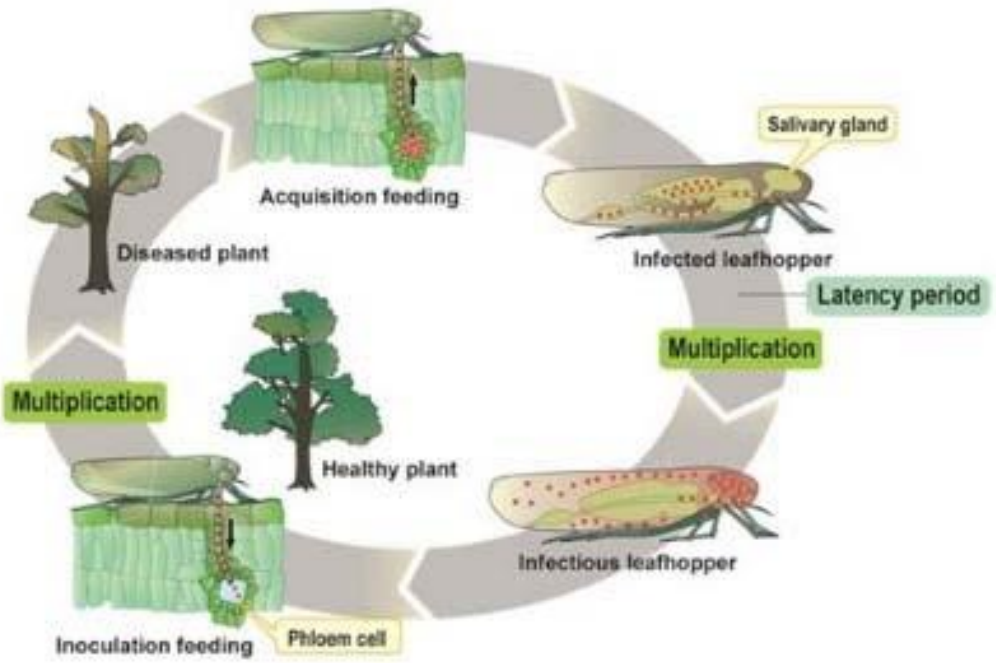


Fig. 1. *American grapevine leafhopper adult © Dr Ivo Tosevski, CABI Europe Switzerland*

Fig. 2. *Flavescence dorée disease symptoms on a red grape variety © Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia*

علائم خسارت:

ارتباط ثابتی بین علائم مختلف و عفونت زودرس یا دیررس گیاه وجود ندارد. برخی از گیاهان می توانند علائم را در اوایل فصل بروز دهند. در حالی که دیگران علائم را بعداً بروز می دهند. رقم، آب و هوا و سن گیاه عواملی هستند که می توانند تفاوت هایی را در بروز علائم ایجاد کنند. فیتوپلاسما FD در بافت انگور با توزیع نامنظم و با تیتر پایین رخ می دهد (Boudon-Padieu, 2002)، که می تواند تشخیص بیماری را دشوارتر کند. آلودگی گیاهان به استافیلوکوکوس تیتانوس معمولاً در اواسط تا اواخر تابستان اتفاق می‌افتد، اما علائم بیماری معمولاً تا سال بعد بیان نمی‌شوند (Boudon-Padieu، 2002).

به طور کلی، علائم مشابه سایر بیماری های زرد انگور است ("پیچش برگ ها، تغییر رنگ لایه ها و رگبرگ ها، فقدان انباشتگی جزئی یا کامل (lignification) با عصای خمیده، و کاهش بخشی یا کل درخت انگور") (Boudon-Padieu, 2002). شاخه های ارقام حساس به بلوغ نمی رسند و نازک، لاستیکی و آویزان هستند. شاخه های آلوده شکننده می شوند و بسیاری از جوش های کوچک سیاه در طول آنها ایجاد می شوند. جوانه ها ممکن است نکروز شوند. در ارقام مقاوم‌تر، گره‌های شاخه‌های آلوده می‌رسند اما برخی از میانگره‌ها نمی‌رسند .در طول زمستان، شاخه های آلوده سیاه می شوند. این شاخه ها بسته به رقم گیاه، سن گیاه و شرایط آب و هوایی ممکن است بمیرند یا زنده بمانند تا مقداری رشد بهاره ایجاد کنند (Defra, 2000).

ارقام با میوه قرمز رنگ برگ ها و رگبرگ های برگ را متمایل به قرمز ایجاد می کنند (شکل a-b1). ارقام با میوه سفید در مناطقی از برگ که در معرض آفتاب قرار دارند، تغییر رنگ زرد فلزی ایجاد می کنند (شکل c-d1). لکه های کوچک، مجزا و زرد رنگ در امتداد رگه های اصلی ظاهر می شوند. این لکه‌ها بزرگ می‌شوند و با هم ترکیب می‌شوند و نوارهای زردی را تشکیل می‌دهند که به تدریج روی برگ پخش می‌شوند و نواحی تغییر رنگ و زاویه‌ای ایجاد می‌کنند که توسط رگبرگ‌های برگ مشخص شده‌اند. مرکز نواحی تغییر رنگ داده خشک و شکننده می شود. برگ های آلوده اغلب به سمت پایین می غلتند، اما بیشتر از برگ های سالم روی گیاه باقی می مانند، زیرا کمتر تحت تأثیر یخبندان های پاییزی قرار می گیرند. با این حال، آنها می توانند به راحتی توسط باد جدا شوند. شکوفه ها خشک می شوند و ممکن است از تاک بیفتند. خوشه های انگور قهوه ای و چروکیده می شوند (شکل e1). ساقه ها خشک می شوند و انگورها به راحتی از جای خود خارج می شوند (Defra, 2000).

در *Clematis vitalba*، علائم فیتوپلاسماهای مرتبط با FD ممکن است شامل تغییر رنگ، پیچیدگی و پژمردگی برگها باشد (شکل 2)، اگرچه ارتباط بین وجود فیتوپلاسما و علائم برگ مشخص نیست. تشخیص PCR تنها در عصاره‌های DNA گیاهان کلماتیس که در ماه‌های پاییز نمونه‌برداری شده بودند و هرگز در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در جولای و آگوست، نتایج مثبت نشان داد. این می تواند نشان دهنده غلظت کم یا در واقع عدم وجود پاتوژن در اوایل فصل باشد (Angelini et al., 2004). مطالعه فیلیپین و همکاران. (2009) نشان داد که فیتوپلاسمای مرتبط با FD در *C. vitalba* گسترده است و تقریباً 36٪ از گیاهان مورد بررسی در سراسر اروپا مثبت بودند.

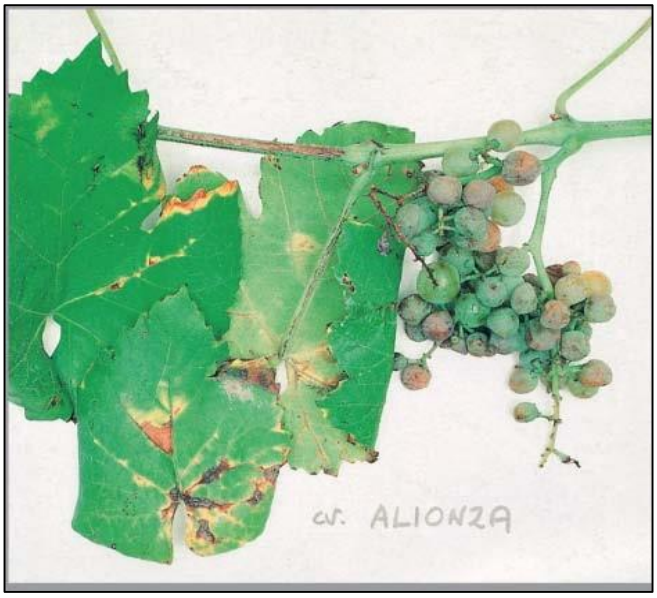
تقریباً 60 تا 80 درصد از گیاهان توسکا (*Alnus* sp) در اروپا به فیتوپلاسماهای مرتبط با FD آلوده هستند. با این حال، توسکا به ندرت علامت دار است (فوساک، ارتباط شخصی) (شکل 3).

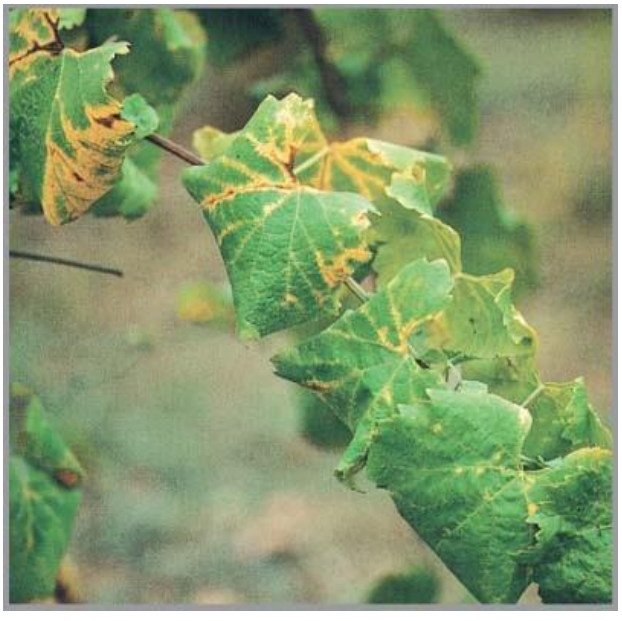
یکی از مشکلات در تشخیص بیماری این است که علائم همیشه هر سال ظاهر نمی شود و ممکن است فقط در یک شاخه یا تعداد کمی از شاخه ها وجود داشته باشد. بعلاوه، واریته های *Vitis vinifera* به یک اندازه به FD حساس نیستند و ممکن است علائم را با شدت یکسان نشان ندهند. پایه هایی که هیبریدهای مختلف *American Vitis sp* علائم بسیار محتاطانه یا بدون هیچ علامتی وجود دارد. با این وجود آنها ناقل این بیماری هستند (Caudwell et al., 1994; INRA, 2013).

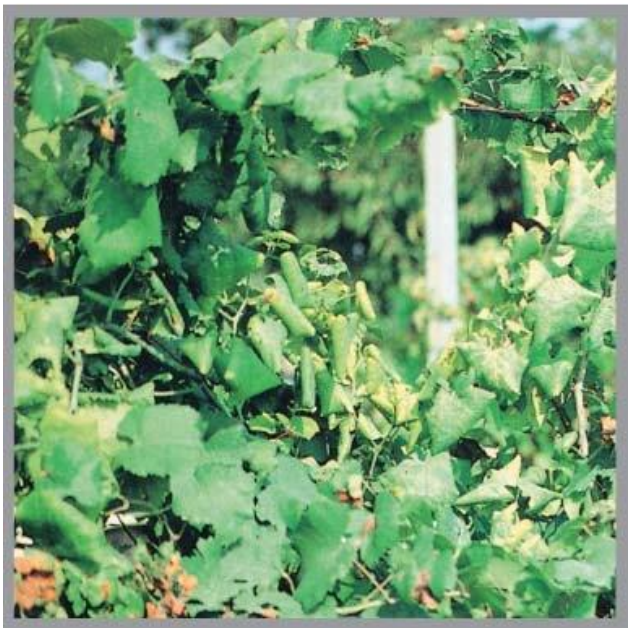
Figure 1: **a)** a "Cabernet Sauvignon" red grape plant infected with '*Ca*. P. vitis' shows reddening of leaves. **b)** a symptomatic leaf of another infected red grape cultivar **c)** an infected "Sémillon" white grape cultivar shows yellowing of leaves. **d,e)** Drying of the grapes and shriveling of the fruits in infected "Sémillon" and "Cabernet Sauvignon" cultivars. Photo c courtesy of Michael Maixner, Julius Kühn-Institut (JKI). Photos a, b, d, and e courtesy of of S. Malembic-Maher, INRA

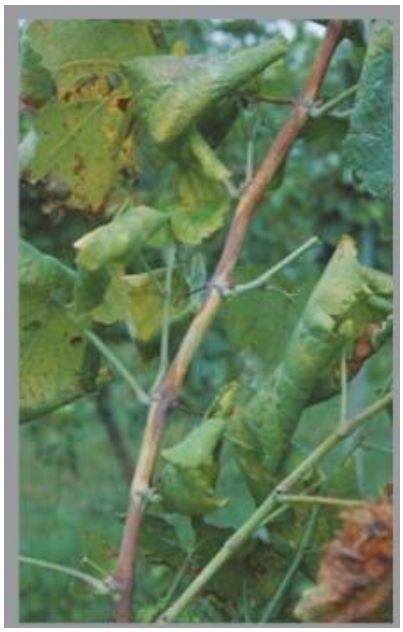
Figure 3: Infected (FD-related phytoplasma) but non-symptomatic alders next to a vineyard in Germany. Photo courtesy of S. Malembic-Maher, INRA Bordeaux.

Figure 2: Infected symptomatic *Clematis vitalba* by FD-related phytoplasma in Hungary. Photo courtesy of S. Malembic-Maher, INRA Bordeaux.


cv. ALIONZA







راههای انتقال و انتشار:

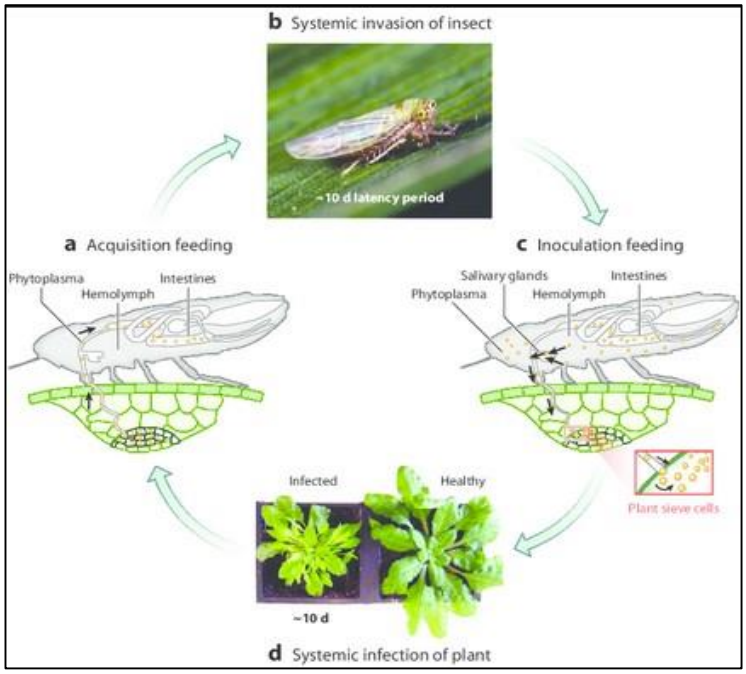
فیتوپلاسماها از گیاهی به گیاه دیگر با پیوند ریشه به ریشه و مهمتر از همه از طریق حشراتی که از قسمت های دهانی مکنده سوراخ کننده خود برای تغذیه از آبکش استفاده می کنند، پخش می شود.

ناقلین شناخته شده (یا حشرات مرتبط)

ناقلین:

Primary vector: *Scaphoideus titanus* (CABI, 2013a,b).
Other Potential Vectors: *Dictyophara europaea, Orientus ishidae,* and *Oncopis alni* (Filippin et al., 2009; Mehle et al., 2011). *Dictyophara europaea* is indicated by some authors to be a natural vector (Filippin et al., 2009). Others consider that all three of these potential vectors can harbor FD-related phytoplasmas but that they are not confirmed vectors of FD (Malembic-Maher/Foissac personal communication; Maixner personal communication).
Experimental vectors: *Anoplotettix fuscovenosus, Euscelidius variegatus, Euscelis incisus* (all leafhoppers from the family Cicadellidae) (Bressan et al., 2006).

.



Oncopsis alni - A Leafhopper (Bugs - Homoptera)

Scroll down and rollover titles to change screen image or click on title to view image.

Leafhopper Oncopsis alni - top view 1

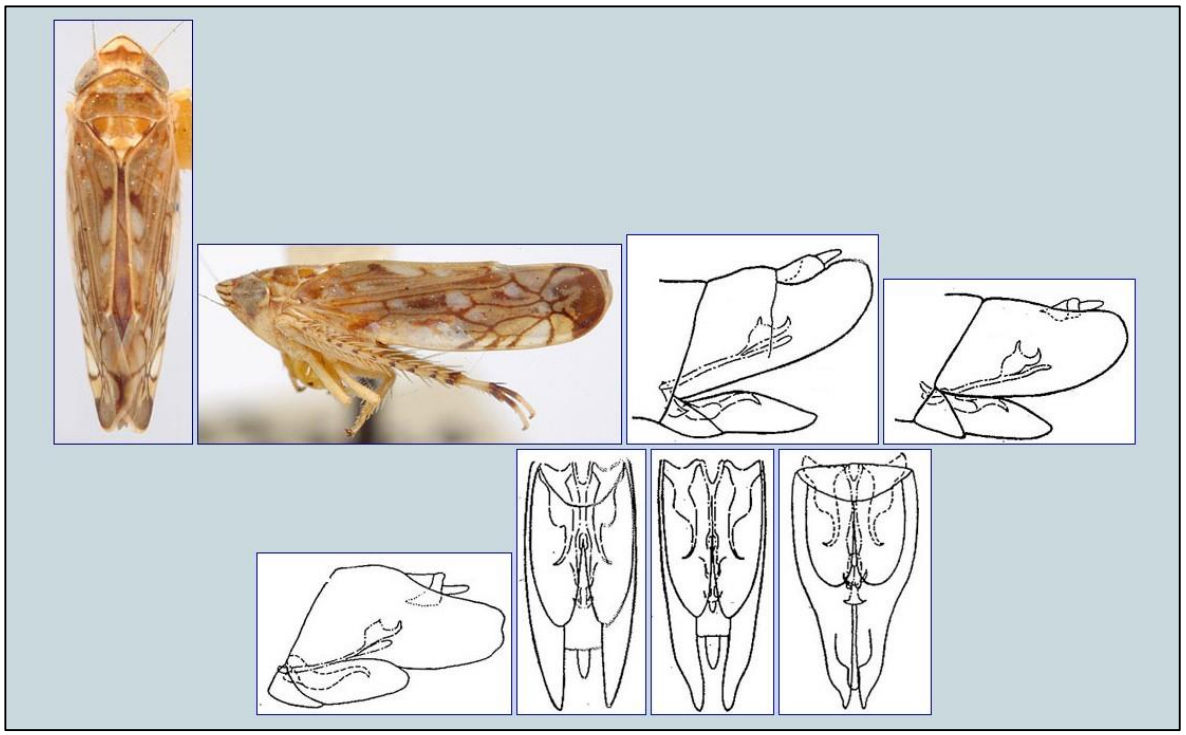
Leafhopper Oncopsis alni - side view 1

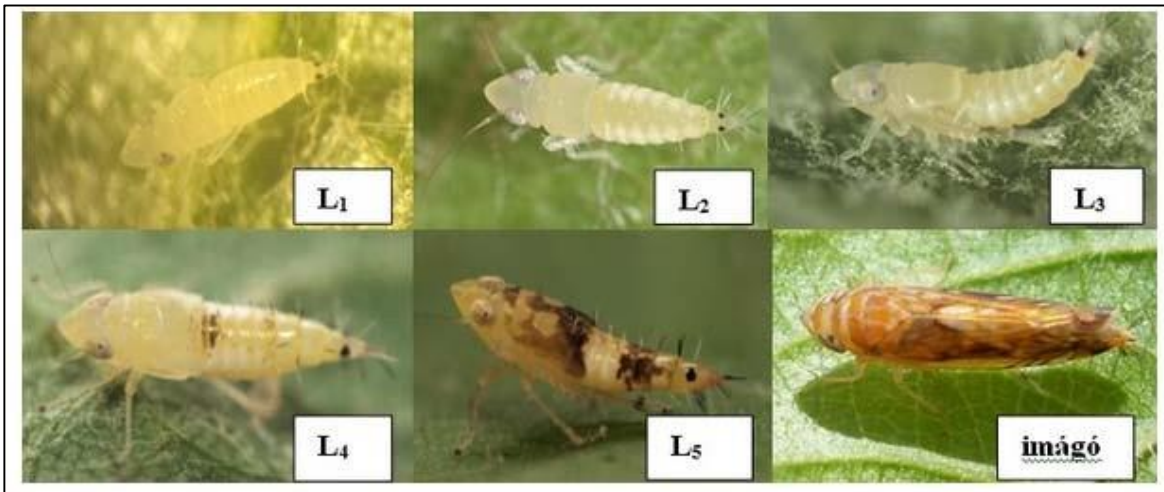
Leafhopper Oncopsis alni - side view 2

Images of species taken at Tehidy Country Park, South Tehidy, near Camborne, Cornwall. 11.07.13. Species feeds on Alder.

The main objective of this website is in furthering environmental awareness and education through the medium of photography. To increase awareness and access to the wildlife of the region and help people find and identify it. Sometimes the difference between species is obvious but many species can only be determined by observing microscopic characteristics that are specific to any one species.

View other APHOTO websites *Photography by David Fenwick* *E-mail for Advice or Feedback*





A S. titanus fejlődési alakjai
(Fotó: Zsolnai Balázs /L1/, Varga András /L2-L5/, Keresztes Balázs /imágó/)

Dictyophara europaea (Linnaeus, 1767)

Orientus ishidae

Family: Cicadellidae

A very attractively marked leafhopper which should be unmistakable, *O. ishidae* has a distinctive mosaic-like pattern across the forewings.

A recent arrival in Britain, first recorded during 2011 in the London area. On the continent this species is associated with a range of woody plants and deciduous trees, including *Salix* and hornbeam *Carpinus betulus*.

Adult: June to October
Length: 4.5-6.5 mm

Adult: south London (August 2011) ©Penny Frith

Adult female: south London (September 2011) ©Tristan Bantock

Adult female: south London (September 2011) ©Tristan Bantock

Cacopsylla pruni – vector of Candidatus Phytoplasma prunorum (For permission to reproduce images email wolfgang.jarausch@agroscience.rlp.de).

Source *Dr Wolfgang Jarausch Agroscience*

اقدامات قرنطینه ای:

Candidatus Phytoplasma vitis آفت قرنطینه ای برای ایران است، FD اثرات اقتصادی منفی زیادی در زردهای انگور ایجاد کننده فیتوپلاسم دارد .FD (Hren et al., 2007) توسط سازمان حفاظت از گیاهان اروپا و مدیترانه (EPPO) به عنوان یک آفت قرنطینه شناخته شده است (EPPO، FD2012 .(باعث ایجاد علائمی می شود که برای انگورهای آلوده مضر است. بسته به شدت آلودگی، بازده ممکن است به طور چشمگیری کاهش یابد. سرزندگی آنها تحت تأثیر قرار می گیرد، عملکرد کاهش می یابد و کیفیت شراب با اسید بالا و محتوای قند کم در خوشه های میوه آلوده کاهش می یابد. هنگامی که هیچ کنترلی بر ناقل انجام نشده باشد، تعداد تاک های آلوده ممکن است به طور پیوسته حدود 10 بار در هر سال افزایش یابد و ممکن است در عرض چند سال به 80 تا 100 درصد برسد. زمانی که گیاهان مولد کمتر از 25 درصد کل گیاهان یک تاکستان باشند، صرفه اقتصادی نگهداری یک تاکستان متوقف می شود (CABI, 2013a).

تولید انگور در سال 2006 5 درصد از ارزش کل تولیدات کشاورزی اتحادیه اروپا (EU) را تشکیل می داد. فرانسه، اسپانیا، ایتالیا و پرتغال، همه کشورهایی که FD دارند، تقریباً 92٪ از کل هکتارهای تاکستان در اتحادیه اروپا را تشکیل می دهند (Pappalardo et al., 2012).

FD به عنوان یک تهدید برای صنعت انگور در ایالات متحده در صورت تبدیل شدن به آن در نظر گرفته می شود تاسیس شد. یک مطالعه ارزش کل انگور و محصولات انگور را در سال 2004 برای اقتصاد ایالات متحده 90 میلیارد دلار برآورد می کند (MKF، 2006).

FD توسط 16 کشور زیر به عنوان یک ارگانیسم مضر فهرست شده است: برزیل، شیلی، چین، کاستاریکا، اسرائیل، ژاپن، مکزیک، مراکش، کالدونیای جدید، ژاپن، روسیه، تایلند، تیمور شرقی، ترکیه، اوکراین و اروگوئه (PCIT، پرس و جو در 18 ژوئیه 2013). اگر آفت در ایالات متحده پیدا شود، اثرات تجاری احتمالی با این کشورها می تواند ایجاد شود.

پتانسیل انتشار 'Ca. P. vitis در صورت تاسیس در ایالات متحده قابل توجه است. طیف گسترده ای از میزبان های شناخته شده وجود دارد (شکل 4). علاوه بر این، ناقل تایید شده *S. titanus* بومی آمریکای شمالی است و در حداقل 35 ایالت و پنج استان کانادا وجود دارد (CABI, 2013a). در حالی که ناقل بالقوه *Dictyophara europaea* در آمریکای شمالی وجود ندارد، در محموله‌های کاشی‌های سرامیکی و مرمری از ایتالیا، کشوری که به داشتن کلسیم شناخته می‌شود، رهگیری شده است.

روشهای ردیابی و بازرسی:

سرولوژیکی: طبق EPPO (2007): الایزا با آنتی بادی های پلی کلونال و مونوکلونال برای تشخیص (FD) در ناقل و انگور استفاده شده است (Boudon-Padieu et al., 1989; Caudwell and Kuszala, 1992; Osler et al., 1202; I202; Osler et al., 1202**). با توجه به EPPO (2007)، این روش متکی بر "در دسترس بودن آنتی بادی هایی است که به صورت تجاری فروخته نمی شوند و در عمل با PCR جایگزین شده اند، که همه کاره، اختصاصی و حساس است." ایریمیا و همکاران (2010)، با این حال، بیان می کند که آنتی بادی ها به صورت تجاری در دسترس هستند. Neogen Europe و Sediag نشان می دهند که مواد ELISA به صورت تجاری در دسترس هستند.**

این روش الایزا برای حساسیت، ویژگی یا برای استفاده نظارتی آزمایش نشده است. مولکولی: نمونه‌های بالقوه آلوده را می‌توان برای حضور FD با روش Realtime PCR همانطور که در Hren و همکارانش توضیح داده شده است، تجزیه و تحلیل کرد. (2007)، آنجلینی و همکاران. (2007)، یا Pelletier و همکاران. (2009). پلتیر و همکاران روش تشخیص (2009) روش رسمی فرانسوی است که توسط خدمات حفاظت گیاه آنها تأیید شده است. همچنین اکنون در کرواسی، مجارستان و اسپانیا استفاده می شود.

سپس ممکن است خصوصیات مولکولی بیشتر بر روی نمونه های مثبت توسط PCR و به دنبال آن RFLP یا تعیین توالی ژن secY یا سایر نشانگرهای غیر ریبوزومی همانطور که در Angelini و همکارانش توضیح داده شده است، انجام شود. (2001، 2003) و آرنو و همکاران. (2007). اخیراً کوگوشک و همکاران. (2014) استفاده از فناوری تقویت همدما با واسطه حلقه همدما (LAMP) را برای تشخیص FD توصیف می کند.

گونه هایی که به راحتی گیج می شوند (FD) شبیه زردی های انگور استرالیایی (AGY، "Candidatus Phytoplasma australiense")، بوآ نوآر، پیچ خوردگی برگ، چروک شدن توت و سایر بیماری های انگور (زرد انگور آمریکای شمالی، جوانه بزرگ گوجه فرنگی و یک بیماری نامشخص که اعتقاد بر این است که توسط یک بیماری ناشناخته ایجاد می شود) است. دیویس و همکاران، 1997؛ لی و همکاران، 1998. هیچ راهی برای تشخیص بصری FD از bois noir ("Candidatus Phytoplasma solani") و سایر بیماری های زرد انگور (Foissac، ارتباطات شخصی) وجود ندارد. روش های مولکولی برای تشخیص بیماری های مختلف زردی انگور استفاده می شود.

سنجش سرولوژی:

انتخاب نمونه:

فیتوپلاسماها آبکش محدود هستند و بافت عروقی باید برای تشخیص موفقیت آمیز PCR استفاده شود. دمبرگ های برگ، رگبرگ میانی از برگ های علامت دار و خراشیدن پوست شاخه ها و شاخه ها را می توان از میزبان های گیاهی در حال رشد استفاده کرد. می توان از دمگل های میوه گیلاس استفاده کرد و در بادام از قسمت نوک تیز پایین پوسته در حالی که هنوز نرم است می توان استفاده کرد (Lauri Guerra Pers. Comm.). اگر گیاه خواب باشد، می توان از جوانه ها و خراشیدن پوست شاخه ها، تنه و ریشه ها استفاده کرد، اگرچه اینها احتمالاً کمتر قابل اعتماد هستند. در صورت استفاده از تراشیدن پوست از مواد چوبی، لایه مرده پوست بیرونی را جدا کنید تا بافت عروق داخلی سبز رنگ نمایان شود.

عفونت های بدون علامت ممکن است رخ دهند و در صورت مشکوک بودن به این امر، نمونه برداری کامل از بافت آبکش مختلف از شاخه ها و شاخه های مختلف یک گیاه برای جداسازی فیتوپلاسما مهم است.

روش تشخیص فیتوپلاسما توصیه شده

• استخراج DNA کل با استفاده از روش توصیف شده توسط گرین و همکاران. (1999) که از a بافر استخراج CTAB و DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Cat. No. 69104).

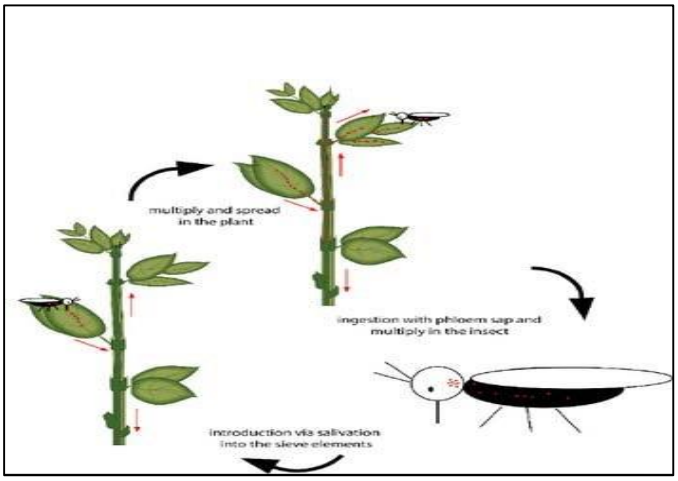
• PCR کنترل داخلی را با پرایمرهای rP1/fD2 انجام دهید. پرایمرهای rP1/fD2 ژن S rRNA16 را از بیشتر پروکاریوت‌ها و همچنین کلروپلاست‌ها تقویت می‌کنند. اگر این آزمایش منفی باشد، DNA وجود ندارد یا مهارکننده‌های DNA پلیمراز استخراج شده با اسید نوکلئیک وجود دارد. در این شرایط، سعی کنید اسید نوکلئیک را تمیز کنید (پیوست 1) یا استخراج را با روش دیگری تکرار کنید (پیوست 2).

PCR را با استفاده از روش زیر انجام دهید:

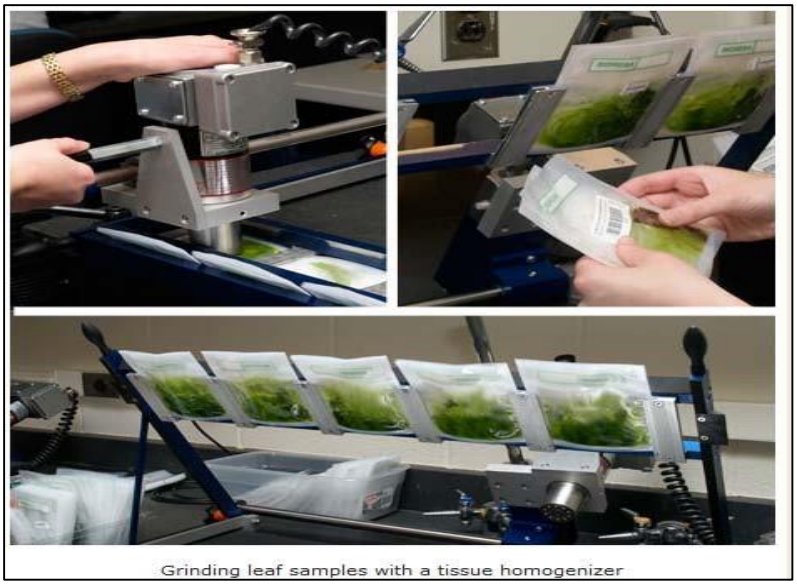
• از یک PCR تو در تو روی DNA خالص شده با استفاده از جفت پرایمر جهانی فیتوپلاسما، P1/P7 برای PCR مرحله اول و سپس جفت پرایمر R16F2n/R16R2 برای مرحله دوم PCR استفاده کنید (جدول 4).

• محصولات PCR را با الکتروفورز ژل آگارز آنالیز کنید.

برای تعیین هویت فیتوپلاسما، محصول PCR تودرتو را توالی مستقیم کنید. اگر توالی یابی مستقیم مشکل ساز باشد، محصول PCR را می توان کلون کرد و سپس با استفاده از روش های شبیه سازی و توالی یابی استاندارد، توالی یابی کرد. داده‌های توالی را می‌توان با استفاده از ابزار اصلی جستجوی هم‌ترازی محلی (BLAST) که در آدرس: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi موجود است، تجزیه و تحلیل کرد. اگر امکانات توالی یابی در دسترس نباشد، می توان از یک PCR تودرتو با استفاده از محصول PCR برای محصول PCR مرحله اول (P1/P7) و پرایمرهای اختصاصی گروه SrIII16 (جدول 4) برای شناسایی فیتوپلاسما در سطح گروه استفاده کرد، اما این مشخص نمی کند که کدام گونه فیتوپلاسمای SrIII16 وجود دارد.

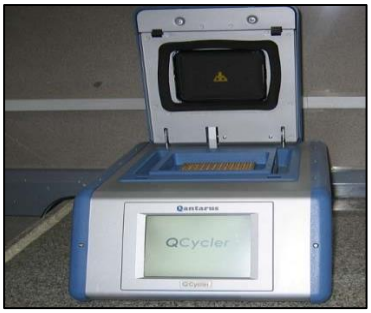


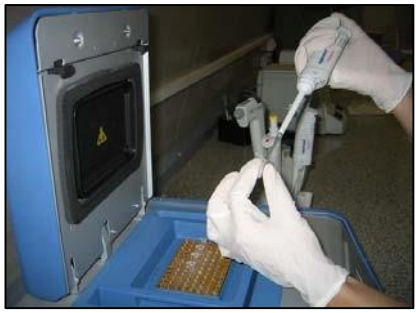
Excision of leaf tissue from orchard or homeowner samples to be processed



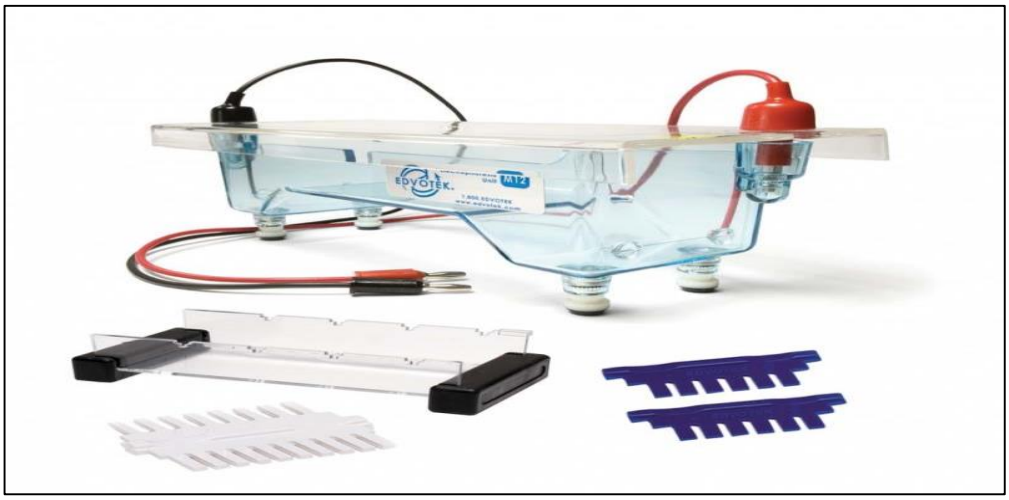
Grinding leaf samples with a tissue homogenizer

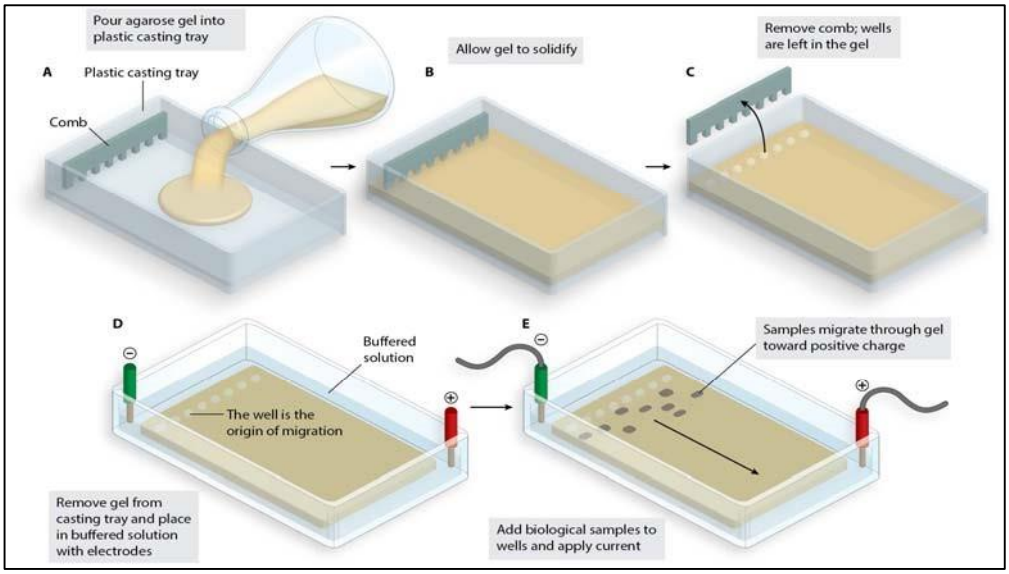
Grinding buffer is added to samples.

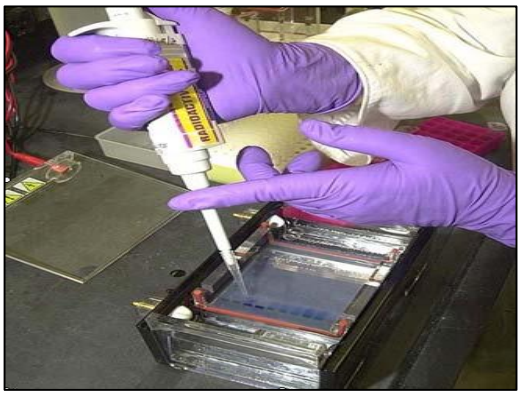


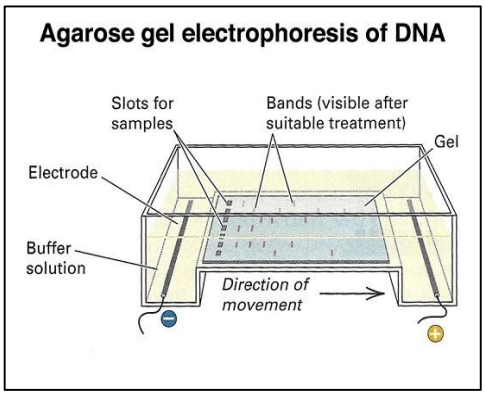


Detection and inspection Phytoplasma by PCR









Detection and inspection Phytoplasma by PCR

منابع:

CAB International. 2025. Crop Protection Compendium. 2025 Edition. CAB International. Wallingford, Oxon, UK.
https://gd.eppo.int/taxon/PHYP64/distribution
Hasanzadeh ,Nader, 1995, principles and methods of plant bacteriology, scientific publication center of Islamic azad university,P 641.
http://images.search.yahoo.com/search/images;_ylt=A0oG7jLFXLlSkk4AQwVXNyoA?p=Candidatus+Phytoplasma+prunorum+&fr=yfp-t-742&fr2=piv-web#index=srp
http://images.search.yahoo.com/search/images;_ylt=A0PDoQ4odLpSvgYAu66JzbkF?p=Apricot+chlorotic+leafroll+phytoplasma&fr=yfp-t-742&ei=utf-8&n=60&x=wrt#index=srp
http://images.search.yahoo.com/search/images;_ylt=A0PDoKtfc7pS1x4AqEyJzbkF?p=European+stone+fruit+yellows+phytoplasma&fr=yfp-t-742&ei=utf-8&n=60&x=wrt#index=srp
http://images.search.yahoo.com/search/images;_ylt=A0PDoS6sp79SbjMAflOJzbkF?p=prunus+survey&fr=yfp-t-742&ei=utf-8&n=60&x=wrt#index=srp
http://images.search.yahoo.com/search/images;_ylt=A0PDoTCSqL9SF2cAujOJzbkF?p=Fieberiella+florii+&fr=yfp-t-742&ei=utf-8&n=60&x=wrt&y=Search#index=srp
http://www.cabi.org/isc/datasheet/34065 http://www.ogrodinfo.pl/ochrona-roslin/rzadziej-wystepujace-wirusy-oraz-fitoplazmy-iwiroidy-drzew-pestkowych
http://portal.nebih.gov.hu/fumagteszt/-
http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136664/4810
https://www.researchgate.net/publication/282604076_Implications_of_Candidatus_Phytoplasma_mali_infection_on_phloem_function_of_apple_trees
http://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/03/Peach-X-disease-FS.pdf
http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/wordpress/wp-content/uploads/2015/03/NDP-17-Xdisease-phytoplasma-V1.2.pdf