

# Etiology of Almond yellows and witch's broom in the Khorasan Razavi Province

Reza Tavanai-sarab, Mohammad Zakiaghl, Mohsen Mehrvar

1-PhD student in Plant Pathology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2-Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3-Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

zakiaghl@um.ac.ir

Doi: 10.22067/jpp.2024.87817.1186

## Introduction

Almond (*Prunus amygdalus*) is a plant native to Iran, and Iran is one of the most important almonds producing countries in the world. Phytoplasmas are prokaryotic cells that lack a cell wall and are restricted to the phloem of their host plants and are mainly transmitted by leaf hoppers. One of the most important diseases of the almond tree is witch's broom disease, which is caused by phytoplasmas. This disease has caused great damage to almond trees in Iran and Lebanon, leading to the death of more than a hundred thousand almond trees. *C. Phytoplasma phoenicium*, which belongs to the pigeon pea witch's broom phytoplasma group, has been reported as the causative agent of almond witch's broom disease. Almond witch's broom has been reported from almonds, peaches, nectarines, bitter almonds and apricots in the Iranian provinces of Chaharmahal and Bakhtiari, Isfahan, Kerman, Fars and Kurdistan. The symptoms of the disease are yellows, small leaves and witch's broom and dieback. Almond witch's broom disease has been reported from Khorasan-Razavi province, but different symptoms were observed in almond trees in different locations in this province. In this study, almond tree orchards in Razavi-Khorasan province were examined for the symptoms of almond witch's broom and the etiology of the disease was determined.

## Materials and methods

In 2022, samples were collected from almond orchards of Razavi-Khorasan province and grafted onto healthy almond seedlings and periwinkle plants. DNA extraction from the main vein or bark of the stems was performed using CTAB. Nested polymerase chain reaction with universal phytoplasma primers (P1/P7 followed by R16F2n/R16R2) was performed, and the PCR products were electrophoresed and sequenced. After blasting in the NCBI database, phylogenetic trees were constructed using the maximum likelihood method in MegaX software with 500 replicates in the bootstrap test.

## Results and discussion

In the northern, central and southern regions of Razavi-Khorasan province, random sampling was carried out in almond plantations. In the northern region, symptoms of almond witch's broom were observed only in Chenaran. In the central region, symptoms of witch's broom were found in Mashhad and Nishapur. However, in the southern region, the symptoms of almond witch's broom were more frequent and were observed in Kashmar, Kohsorkh, Torbat-Heydarieh and Sabzevar.

The symptoms of infected almond trees in the northern region were small leaves, mild witch's broom and dieback. The symptoms in the central region were severe small leaves, yellows, severe stunting, witch's broom and decline. Infested almond trees in the southern region showed severe small leaves, severe witch's broom and proliferation, dense growth of thin branches from the trunk. The disease symptoms in the northern areas of Razavi Khorasan are moderate

1 and in the central and southern areas were severe. In addition, there were significant differences in the type of  
2 symptoms in the central and southern regions.

3 In the nested polymerase chain reaction, a fragment of 1250 base pairs replicated from the infected samples.  
4 Sequencing and BLAST analysis revealed that the amplified fragments were similar to the phytoplasma 16S rRNA.

5 Two months after inoculation, disease symptoms appeared on the inoculated almond seedlings. Almond seedlings  
6 inoculated with the northern strain showed symptoms such as terminal bud dieback, dieback of lateral branches and  
7 necrotic spots on the leaves. Almond seedlings inoculated with the strain from the central areas showed symptoms  
8 such as yellows, severe witch's broom, stunting and small leaves. The symptoms in seedlings inoculated with the strain  
9 from the southern area of Khorasan-Razavi province were severe proliferation, severe stunting, small leaves and  
10 necrotic spots on the leaves. In periwinkle plants, isolates from the northern and southern regions induced mild yellows  
11 and phyllody; however, isolates from the central region induced severe yellows and phyllodes.

12 The sequence blast results showed that the Chenaran isolate from the northern region of Razavi Khorasan had 98.34%  
13 similarity with 16S rRNA strain Ei1090 of *C. Phytoplasma phoenicium*. The 16S rRNA sequence of the Kashmar  
14 isolate from the southern region is most closely related to the Khafr isolate (Khafr, Iran) of almond witches' broom  
15 phytoplasma. These two phytoplasma strains belong to the 16S rRNA (16SrIX) group of pigeon pea witches' broom  
16 phytoplasmas that can cause almond witches' broom. However, Ei1090 is a mild strain and the Khafer isolate is a  
17 severe strain of *C. Phytoplasma phoenicium*. The similarity of the isolates from Chenaran and Kashmar with other  
18 members of the 16SrIX group ranged from 98.79-99.33 and 98.48-98.95%, respectively. The 16S rRNA sequence of  
19 the Mashhad isolate from the central region of Razavi Khorasan was 94.99% similar to the CPh strain of Clover  
20 phyllody phytoplasma, a member of the Aster yellows phytoplasma group (16SrI). The similarity of the isolate from  
21 Mashhad with other members of the 16SrI group was between 90.99-95.98%.

22 In the phylogenetic tree, the isolates from Chenaran and Kashmar were located in the same branch together with the  
23 reference strain of the pigeon pea phytoplasma group (16SrXI group). In addition, the isolates from Chenaran and  
24 Kashmar were placed in the same branch with subgroups B and A of the 16SrXI group. In addition, the Mashhad  
25 isolate was classified in the aster yellows phytoplasma group (16SrI group) within subtype C, which is a new strain  
26 of subgroup C that causes almond witches' broom disease.

### 27 **Conclusion**

28 Almond witch's broom is a devastating disease in almond orchards in the Khorasan Razavi Province. Symptoms  
29 include yellows, small leaves, witch's broom, growth of many thin branches on the main trunk, decline and death of  
30 the almond tree. The symptoms of the disease were moderate in the northern regions and more severe in the central  
31 and southern regions of Razavi-Khorasan province. The results indicate that different strains of *C. Phytoplasma*  
32 *phoenicium* and Clover phyllody phytoplasma are associated with almond witch's broom disease in Razavi Khorasan  
33 province.

34 **Key words:** Almond witch's broom, Phylogeny, Prevalence, Phytoplasma, Razavi-Khorasan

# سبب شناسی زردی و جاروک درختان بادام در نواحی مختلف استان خراسان رضوی

رضا توانایی سراب<sup>۱</sup>، محمد زکی عقل<sup>۲\*</sup>، محسن مهرور<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۵/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۱

۱- دانشجوی دکتری رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴- zakiaghl@um.ac.ir

Doi: 10.22067/jpp.2024.87817.1186

## چکیده

بیماری جاروک بادام یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گیاه بادام است که سالانه خسارت‌های فراوانی به تولید بادام در ایران وارد می‌کند. این بیماری به خصوص در استان خراسان رضوی باعث محدود شدن کشت بادام در برخی مناطق شده است. همراهی چندین فیتوپلازما و به‌ویژه *Candidatus Phytoplasma phoenicium* (16sIX-B) از گروه جاروک نخود کبوتر با این بیماری گزارش شده است. در طی سال ۱۴۰۲ بررسی گسترده‌ای و نمونه‌برداری از مناطق شمالی، مرکزی و جنوبی در استان خراسان رضوی انجام شد. بررسی علائم بیماری در مناطق سه‌گانه استان نشان داد که شدت و نوع بروز علائم در مناطق مختلف متفاوت است. علائم بیماری جاروک بادام در نواحی شمالی جاروک خفیف، در نواحی مرکزی زردی و جاروک و در نواحی جنوبی جاروک شدید و رشد شاخه‌ها متراکم بود. از پیوند فیتوپلاسمای همراه با جاروک بادام از نواحی مختلف روی نهال‌های بادام علائم ریزبرگی، زردی، جاروک، افزولش شدید شاخه‌ها و سرخشکیدگی و در گیاهان محک پروانش زردی خفیف یا شدید و برگ‌سانی (فیلودی) ایجاد شد. علائم جدایه‌های مناطق سه‌گانه استان نیز بروی گیاهان محک با یکدیگر تفاوت داشت. استخراج DNA کل به روش CTAB انجام شد و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای با استفاده از آغازگرهای عمومی فیتوپلازما ردیابی عامل بیماری انجام شد. توالی‌یابی قطعه تکثیر شده و آنالیزهای تبارزایی نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بادام در نواحی شمالی و جنوبی استان خراسان رضوی به ترتیب سویه‌های خفیف و شدید *C. Phytoplasma phoenicium* هستند و بیشترین شباهت را با زیرگروه‌های A و B از گروه جاروک نخود کبوتر دارند؛ همچنین فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بادام در نواحی مرکزی استان خراسان رضوی *Candidatus Phytoplasma asteris* است که بیشترین شباهت را با زیرگروه C از گروه زردی مینا دارد.

واژه‌های کلیدی: پراکنش، تبارزایی، جاروک بادام، خراسان رضوی، فیتوپلازما

۱  
۲ بادام (*Prunus amygdalus*) گیاهی بومی ایران است و ایران یکی از مهمترین کشورهای تولیدکننده بادام در دنیا است  
۳ (Ghayeb Zamharir, 2011; Salehi *et al.*, 2015). در ایران بادام به صورت آبی و دیم کشت می‌شود. بر اساس آمارنامه  
۴ سازمان جهاد کشاورزی بیشترین سطح زیرکشت بادام در ایران در استان فارس با ۲۷۳۷۳ هکتار است و پس از آن استانهای  
۵ خراسان رضوی و چهارمحال و بختیاری به ترتیب با ۲۴۹۴۸ و ۱۷۳۸۵ هکتار سطح زیرکشت در رده‌های بعدی قرار دارند.  
۶ (Anonymous, 2021).

۷ فیتوپلاسمها پروکاریوت‌های فاقد دیواره سلولی و محدود به آوندهای آبکشی گیاهان میزبان هستند که باعث بروز خسارت  
۸ شدید در گیاهان مختلف می‌شوند. از جمله بیماری‌های فیتوپلاسمایی مهم می‌توان به زردی کشنده نارگیل، زردی مو، جاروک  
۹ بادام و جاروک لیموترش و بیماری ایکس هلو اشاره کرد. فیتوپلاسمها به وسیله حشرات مکنده و به صورت پایا و تکثیری از  
۱۰ گیاهی به گیاه دیگر منتقل می‌شوند. دامنه میزبانی فیتوپلاسمها به گیاهان و حشرات محدود است و به‌طور کلی دامنه میزبانی  
۱۱ آن‌ها به دامنه میزبانی حشره ناقل بستگی دارد (Bertaccini & Duduk, 2009). به‌علاوه، این بیمارگرها به وسیله قلمه،  
۱۲ پیوند، پاجوش، غده و پیاز هم منتقل می‌شوند (Caglayan *et al.*, 2019).

۱۳ یکی از مهمترین بیماری‌های درخت بادام بیماری جاروک است. این بیماری باعث خسارت‌های فراوانی به درختان بادام در  
۱۴ کشورهای ایران و لبنان شده است (Verdin *et al.*, 2003). این بیماری در لبنان باعث زوال و نابودی بیش از صد هزار  
۱۵ اصله درخت بادام شده است (Dakhil *et al.*, 2011). در ایران نیز بیماری جاروک بادام از چهارمحال و بختیاری، اصفهان،  
۱۶ کرمان، فارس، کردستان و میزبان‌های هلو، شلیل، بادام تلخ و زردآلو گزارش شده است (Pourali & Salehi, 2012; Salehi *et al.*, 2015).  
۱۷ فیتوپلاسمای *C. Phytoplasma phoenicium* که عضوی از گروه فیتوپلاسمایی جاروک نخود  
۱۸ کبوتر (*Pigeon pea witches'-broom phytoplasma*) است به عنوان بیمارگر همراه با بیماری جاروک بادام گزارش  
۱۹ شده است (Molino Lova *et al.*, 2013). از مهمترین علائم این بیماری می‌توان به زردی برگها، ریزبرگی و جارویی شدن  
۲۰ شاخه‌ها، افزولش شاخه‌ها و کاهش فاصله میان‌گره‌ها اشاره کرد (Dakhil *et al.*, 2011). البته در ایران فیتوپلاسمهای  
۲۱ *C. Phytoplasma solani* و *Ca. Phytoplasma asteris* هم در درختان بادام ردیابی شده‌اند (Zirak *et al.*, 2009, 2021).

۲۲  
۲۳ با توجه به تکثیر فیتوپلاسمها در بدن ناقل و میزبان گیاهی و عدم امکان کشت این بیمارگرها در محیط‌های رایج آزمایشگاهی،  
۲۴ مطالعات مولکولی و مشخص کردن ژن‌ها و مسیرهای موثر در مقاومت گیاهان به بیماری‌های فیتوپلاسمایی می‌تواند  
۲۵ راهکارهای جدیدی برای مدیریت بیماری‌های فیتوپلاسمایی ارائه دهد. در حال حاضر برای بیماری جاروک بادام بهترین راه  
۲۶ مدیریت بیماری جلوگیری از انتقال مواد گیاهی آلوده به مناطق سالم و ریشه کنی درختان بادام آلوده است. بنابراین بررسی  
۲۷ گستردگی این بیماری در مناطق مختلف کشت بادام می‌تواند در جلوگیری از گسترش آن به مناطق سالم کمک کند. در لبنان

۱ برای کنترل بیماری از سال ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۴ میلادی شش هزار اصله درخت آلوده ریشه کن شد (Bianco *et al.*, 2019).  
۲ همچنین پیوند بادام روی پایه‌های غیرمیزبان و مقاوم می‌تواند در کنترل بیماری موثر باشد (Tawidian *et al.*, 2017).  
۳ بیماری جاروک بادام از منطقه کوه‌سرخ استان خراسان رضوی گزارش شده است (Karimi shahri *et al.*, 2014). لیکن  
۴ علائم متنوعی مانند زردی، جارویی و زوال در درختان بادام در نواحی مختلف این استان مشاهده می‌شود. در این پژوهش  
۵ برای اولین بار در ایران مناطق مختلف کشت بادام در استان خراسان رضوی از نظر آلودگی به بیماری جاروک بادام و ردیابی  
۶ فیتوپلاسمای همراه با بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین بررسی علائم بیماری در درختان بادام مناطق مختلف استان  
۷ خراسان رضوی و علائم ایجاد شده در گیاهان محک در این پژوهش انجام شد.

## ۸ مواد و روش‌ها

۹ **نمونه‌برداری و مایه‌زنی گیاهان:** در سال ۱۴۰۲ از درختان بادام مشکوک به آلودگی فیتوپلاسمایی در باغ‌های استان  
۱۰ خراسان رضوی نمونه‌برداری شد. بلافاصله پس از انتقال نمونه‌های آلوده به گلخانه تحقیقاتی گروه گیاهپزشکی دانشگاه  
۱۱ فردوسی، جوانه‌های شاخه‌های بادام آلوده بروش پیوند T بر روی نهال‌های سالم بادام، که سلامت آنها در آزمون PCR تایید  
۱۲ شده بود، پیوند زده شدند. از گیاه انگل سس برای انتقال آلودگی از نهال‌های بادام پیوند شده به گیاه محک پروانش استفاده  
۱۳ شد (Příbylová & Špak, 2013).

۱۴ **استخراج DNA کل:** استخراج DNA از رگبرگ اصلی و یا پوست ساقه‌های دارای علائم به روش CTAB انجام شد  
۱۵ (Zhang *et al.*, 1998).

۱۶ **واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز:** واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای عمومی فیتوپلازما (P1/P7) انجام شد  
۱۷ (Salehi *et al.*, 2006). برای انجام واکنش مقدار دو میکرولیتر از DNA به مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از Master  
۱۸ Red (Ampliqon; Cat no. A180301) و ۱۰ پیکومول از آغازگرهای عمومی فیتوپلازما (P1: AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT  
۱۹ و P7: CGTCCTTCATCGGCTCTT) افزوده شد و سپس لوله  
۲۰ ها در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، ۹۵ درجه سانتی  
۲۱ گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت‌سازی، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه برای اتصال آغازگر و ۷۲ درجه سانتی‌گراد  
۲۲ به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه به منظور گسترش و ۷ دقیقه برای گسترش نهایی قرار گرفتند تا قطعه حدود ۱۸۰۰ جفت بازی  
۲۳ تکثیر شود. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای یک میکرولیتر از محصول واکنش قبل با هشت میکرولیتر آب  
۲۴ مقطر مخلوط و به لوله حاوی مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از Master Red (Ampliqon; Cat no. A180301)  
۲۵ و ۱۰ پیکومول از آغازگرهای R16F2n: ACGACTGCTAAGGACTGG و R16R2: TGAGGGGCGGTGTGTACAAACCCCG  
۲۶ افزوده شد. برنامه واکنش شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت

۴ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه برای واسرشت‌سازی، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه برای اتصال آغازگر و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه به منظور گسترش و ۱۰ دقیقه برای گسترش نهایی بود تا قطعه ۱۲۵۰ جفت بازی تکثیر شود. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ژل آگاروز یک درصد حاوی ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید در بافر دی سدیم تترابورات دکا هیدرات (di-sodium tetraborate decahydrate)؛ ۸ گرم NaOH به همراه ۴۸ گرم بوریک اسید در ۰,۹ لیتر آب مقطر؛ الکتروفورز شد.

**توالی یابی و آنالیزهای فیلوژنتیکی:** به منظور توالی‌یابی، قطعه تکثیر شده حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای با استفاده از کیت DNA gel Purification kit-Gel Recovery شرکت کیاژن بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده از ژل آگاروز خالص سازی شد. دو نمونه از ناحیه شمالی، چهار نمونه از ناحیه مرکزی و شش نمونه از ناحیه جنوبی برای توالی یابی انتخاب شدند. توالی‌یابی قطعه خالص سازی شده توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد. سپس ماهیت توالی بدست آمده با استفاده از ابزار blastn در پایگاه داده NCBI تعیین شد. بررسی رابطه فیلوژنتیکی فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بادام در مناطق مختلف استان خراسان رضوی با همدریف سازی توالی‌های بدست آمده از جدایه‌های این مناطق و توالی 16S rRNA سایر فیتوپلاسماهای شناخته شده و رسم درخت فیلوژنتیکی در نرم‌افزار MegaX به روش maximum likelihood با ۵۰۰ تکرار در آزمون بوت استرپ انجام شد.

## نتایج و بحث

**نمونه‌برداری و بررسی علائم بیماری جاروک بادام در استان خراسان رضوی:** نمونه‌برداری از باغ‌های بادام در سه ناحیه شمالی، مرکزی و جنوب استان خراسان رضوی انجام شد. در ناحیه شمالی از باغ‌های بادام شهرستان‌های قوچان، درگز و چناران بازدید شد ولی علائم جاروک بادام فقط در باغ‌های شهرستان چناران مشاهده و نمونه‌برداری انجام شد. در ناحیه مرکزی از باغ‌های شهرهای نیشابور، مشهد، فریمان و طرقله شان‌دیز بازدید شد و باغ‌های شهرهای مشهد و نیشابور دارای علائم جاروک بودند. در ناحیه جنوبی استان خراسان رضوی باغ‌های بادام در شهرستان‌های کاشمر، کوه‌سرخ، تربت‌حیدریه و سبزوار بازدید شدند. علائم بیماری جاروک در باغ‌های منطقه جنوبی استان فراوان‌تر بود و علائم بیماری در باغ‌های همه‌ی شهرهای نمونه‌برداری شده مشاهده شد. جزئیات مربوط به مناطق مورد نمونه‌برداری و علائم مشاهده شده در باغات هر منطقه در جدول یک نشان داده شده است.

جدول ۱- مناطق مورد نمونه‌برداری و علائم مشاهده شده در هر منطقه

Sampling areas and symptoms observed in each area

علائم symptoms	تعداد نمونه آلوده Number of infected samples	تعداد نمونه Number of samples	مختصات جغرافیایی Geographical coordinates	شهر City
-	0	5	37.060/58.340	قوچان

سرخشکیدگی، ریزبرگی خفیف Mild little leaf, dieback	2	5	36.394/59.063	چناران
-	0	5	37.252/59.042	درگز
زردی و ریزبرگی شدید Severe yellowing and little leaf	4	5	36.132/59.381	مشهد
زردی و کاهش فاصله میانگره‌ها Yellowing, internode shortening	3	5	36.120/58.524	نیشابور
-	0	5	35.425/59.471	فریمان
-	0	3	36.232/59.203	طرقبه شانديز
جاروک شدید Severe witches' broom	5	5	35.285/58.272	کوه سرخ
جاروک شدید Severe witches' broom	5	5	35.135/58.251	کاشمر
زردی و جاروک Yellowing, witches' broom	3	5	35.222/59.102	ترت حیدریه
زردی و جاروک Yellowing, witches' broom	3	5	36.130/57.434	سبزوار

۱

۲ علائم در درختان بادام آلوده در ناحیه شمالی خراسان رضوی شامل ریزبرگی خفیف، جاروک خفیف، و سرخشکیدگی برخی از

۳ شاخه‌های تاج درخت بود (شکل ۱- A). علائم بیماری در باغ‌های ناحیه مرکزی استان خراسان رضوی ریزبرگی شدید، زردی،

۴ کاهش شدید فاصله میان‌گره‌ها، جاروک و تحلیل تاج درخت بود (شکل ۱- B). درختان بادام آلوده در منطقه جنوبی خراسان

۵ رضوی علائم ریزبرگی شدید، جارویی شدن شاخه‌های جانبی، رشد متراکم شاخه‌های نازک از تنه و شاخه‌های اصلی داشتند

۶ (شکل ۱- C). علائم مشاهده شده در درختان بادام آلوده به فیتوپلازما، در مطالعات سایر محققین نیز گزارش شده است (

۷ Molino Lova et al., 2013; Salehi et al., 2015). علائم بیماری در نواحی شمالی خراسان رضوی خفیف و در نواحی

۸ مرکزی و جنوبی شدید بود. بعلاوه نوع علائم ایجاد شده در نواحی مرکزی و جنوبی دارای تفاوت‌های قابل توجهی بود.

۹ همچنین علائم مشاهده شده در نواحی جنوبی با علائم گزارش شده در مطالعه کریمی شهری و همکاران از منطقه کوه‌سرخ

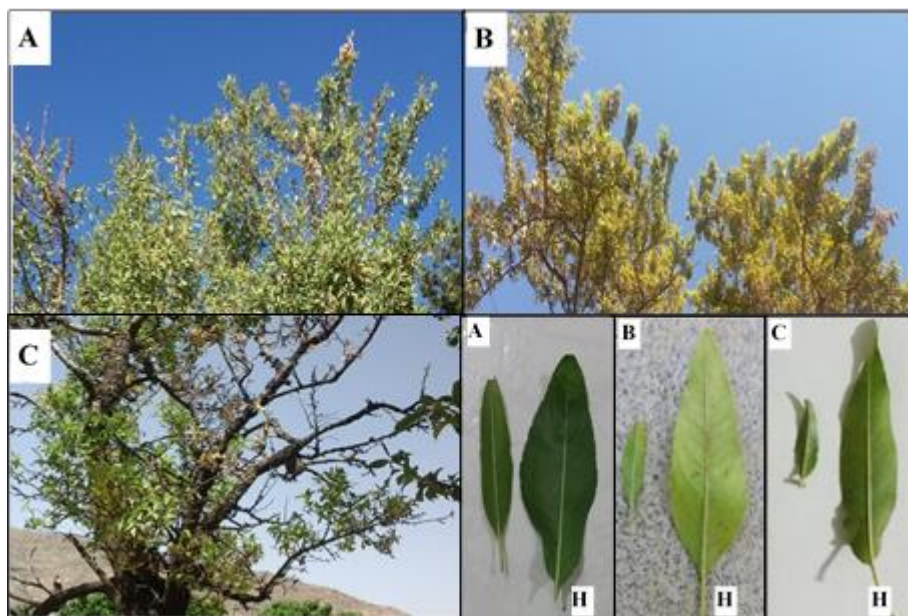
۱۰ تا حدودی تفاوت داشت و تورم جوانه‌ها و سرشاخه‌های جوان و زردی شدید برگ‌ها (Karimi shahri et al., 2014) در

۱۱ پژوهش حاضر مشاهده نشد. در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است که جدایه‌های مختلف *C. Phytoplasma phoenicium*

۱۲ می‌توانند باعث بروز علائم متفاوتی در میزبان خود شوند (Salehi et al., 2006).

۱۳

۱۴

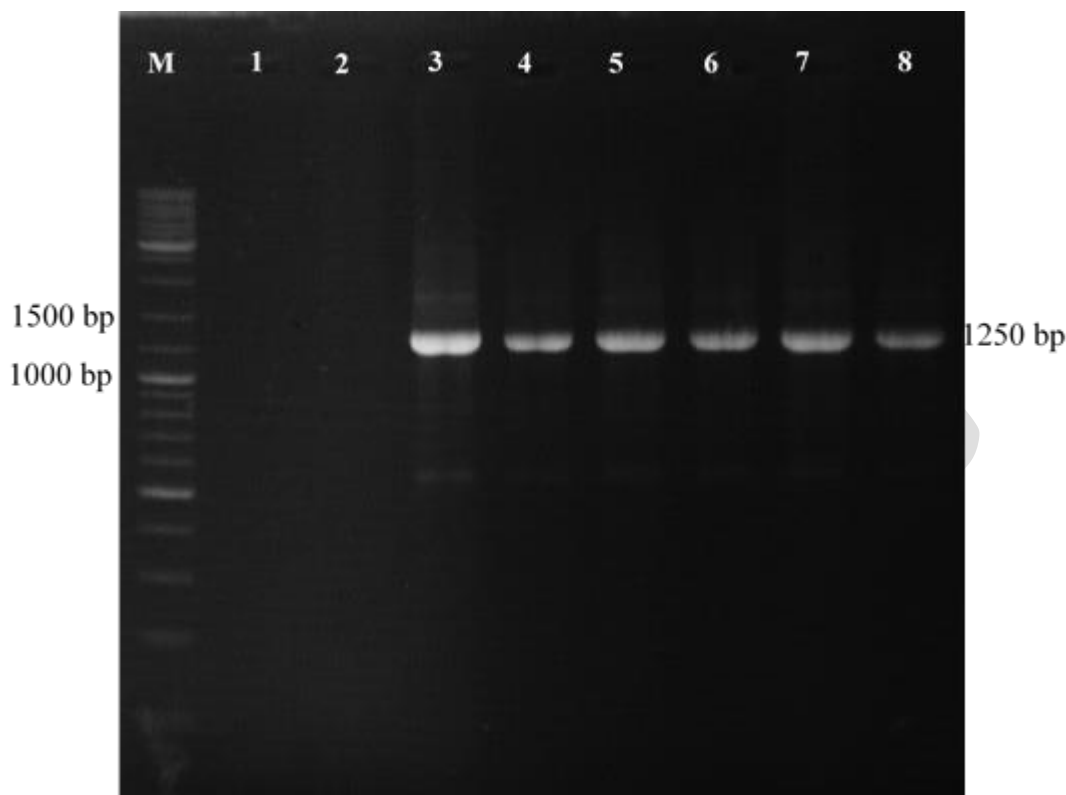


شکل ۱- علائم بیماری جاروک و ریز برگی در درختان بادام در نواحی مختلف استان خراسان رضوی. A: نواحی شمالی؛ B: نواحی مرکزی؛ C: نواحی جنوبی. H نشان دهنده برگ درخت سالم است

**Figure 1-** Symptoms of almond witch's broom disease and little leaf in various regions of the Khorasan Razavi Province. A: northern areas; B: central areas; C: southern areas; H indicate leaf of healthy almond

ردیابی فیتوپلازما در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: در ابتدا از بافت رگبرگ اصلی و پوست شاخه‌های آلوده جهت ردیابی استفاده شد. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان داد که بافت رگبرگ اصلی کارایی بیشتری جهت ردیابی فیتوپلازما در نمونه‌های آلوده دارد، بنابراین از این بافت برای استخراج DNA کل استفاده شد. با توجه به محدود بودن فیتوپلازماها به آوندهای آبکشی ردیابی آنها از آوندها انجام می‌شود (Namba, 2019). در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اولیه قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی و در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای قطعه ۱۲۵۰ جفت بازی از نمونه‌های مشکوک و دارای علائم تکثیر شد در حالیکه از نمونه سالم این قطعه تکثیر نشد (شکل ۲). قطعه‌های تکثیر شده از نمونه‌های باغ‌های بادام شهرستان‌های کوه‌سرخ، کاشمر، تربت‌حیدریه، مشهد، نیشابور و چناران توالی یابی شدند. نتیجه بلاست توالی‌ها نشان داد که قطعات توالی یابی شده با ناحیه ژنی 16S rRNA فیتوپلازما شباهت دارند. از قطعه 16S rRNA برای ردیابی و تعیین روابط فیلوژنی در فیتوپلازماها و فیتوپلازمای جاروک بادام استفاده می‌شود (Kirdat et al., 2023).



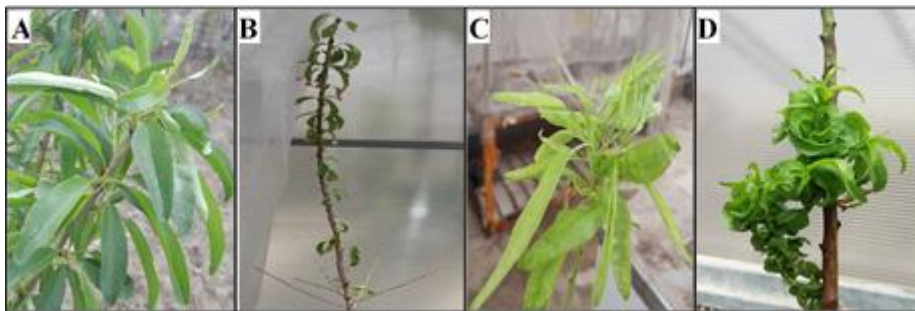


شکل ۲- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای با آغازگرهای R16F2n/R16R2 از نمونه‌های بادام جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان خراسان رضوی. M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp (Thermo Fisher Scientific, USA); راهک شماره ۱: کنترل منفی (آب مقطر); راهک شماره ۲: گیاه سالم; راهک‌های شماره ۳، ۴ و ۵: نمونه‌های جمع‌آوری شده از کوه‌سرخ، کاشمر و تربت‌حیدریه از ناحیه جنوبی; راهک‌های شماره ۶ و ۷: نمونه‌های جمع‌آوری شده از مشهد و نیشابور در ناحیه مرکزی; راهک شماره ۸: نمونه جمع‌آوری شده از چناران از منطقه شمالی

**Figure 2-** Electrophoresis of products of the nested PCR using R16F2n/R16R2 primer pair from the almond samples collected from different regions of the Khorasan Razavi Province. M: 100 bp molecular size marker (Thermo Fisher Scientific, USA); Lane 1: negative control (distilled water); Lane 2: healthy almond; Lines 3, 4, and 5: samples collected from Koh-Sorkh, Kashmar, and Torbat-Hydariah in the southern area; Lines 6 and 7: samples collected from Mashhad and Neyshabur in the central area; Lane 8: sample collected from Chenaran in the northern area

**انتقال فیتوپلازما و علائم در گیاهان پیوند شده:** دو ماه پس از پیوند، علائم بیماری به تدریج بر روی نهال‌های بادام پیوند شده ظاهر شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق سه‌گانه استان خراسان رضوی به صورت جداگانه بر روی نهال‌های بادام پیوند زده شدند. در نهال‌های بادام پیوند شده با نمونه‌های شمال استان خراسان رضوی علائم توقف رشد جوانه انتهایی، سرخشیدگی شاخه‌های جانبی و لکه‌های نکروزه در برگ‌ها ایجاد شد (شکل ۳- B). بر روی نهال‌های بادام پیوند شده با نمونه‌های نواحی مرکزی استان، علائم زردی، جاروک شدید، کاهش فاصله میان‌گره‌ها و ریزبرگی ایجاد شد (شکل ۳- C). نهال‌های بادام پیوند شده با نمونه‌های نواحی جنوبی استان علائم افزولش شدید شاخه‌های جانبی، کاهش فاصله میان‌گره‌ها، ریزبرگی و پدیدار شدن لکه‌های نکروزه در برگ‌های مسن را نشان دادند (شکل ۳- D).

۱ ده روز پس از استقرار گیاه سس، علائم بیماری در گیاهان پروانش ظاهر شد. جدایه های نواحی مختلف به وسیله سس به  
 ۲ گیاهان پروانش منتقل شدند. انتقال جدایه نواحی شمالی استان خراسان رضوی باعث ایجاد برگ‌سانی و زردی خفیف در  
 ۳ برگ‌های انتهایی پروانش شد (شکل ۴- B) ولی در مایه زنی پروانش با نمونه‌های جنوب استان خراسان رضوی تنها برگ‌سانی  
 ۴ ایجاد شد (شکل ۴- D). مایه زنی با جدایه های نواحی مرکزی استان در گیاهان پروانش زردی شدید برگ و برگ‌سانی ایجاد  
 ۵ کرد (شکل ۴- C). بروز این علائم در پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک بادام در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است  
 ۶ (Haghshenas *et al.*, 2015).



۷  
 ۸ **شکل ۳-** علائم در نهال‌های بادام پیوند شده با جدایه‌های مختلف بیماری جاروک بادام از نواحی مختلف استان خراسان رضوی. A: گیاه سالم؛ B: توقف رشد جوانه  
 ۹ انتهایی و سرخشیدگی شاخه‌ها در اثر پیوند با جدایه نواحی شمالی؛ C: زردی، جاروک و کاهش فاصله میان‌گره‌ها ناشی از پیوند با جدایه نواحی مرکزی؛ D: افزولش شدید  
 ۱۰ شاخه‌های جانبی، کاهش فاصله میان‌گره‌ها و ریزبرگی ایجاد شده با پیوند جدایه نواحی جنوبی

۱۱ **Figure 3-** Symptoms in almond seedlings inoculated with different isolates of almond witch's broom phytoplasma from various  
 ۱۲ regions of the Khorasan Razavi Province. A: healthy plant; B: suppression of the terminal bud growth and dieback as a result of  
 ۱۳ inoculation with isolates from the northern area; C: yellows, witch's broom and shortening the internodes caused by inoculation  
 ۱۴ with isolates of the central areas; D: severe witch's broom, stunting and little leaves generated by the isolates from the southern  
 ۱۵ areas



شکل ۴- علائم در گیاهان پروانش مایه زنی شده با نمونه‌های عامل بیماری جاروک بادام از نواحی مختلف استان خراسان رضوی. A: گیاه سالم؛ B: زردی خفیف و برگ‌سانی در اثر مایه زنی با جدایه نواحی شمالی؛ C: زردی شدید و برگ‌سانی ناشی از مایه زنی با جدایه نواحی مرکزی؛ D: برگ‌سانی ایجاد شده در اثر مایه زنی جدایه نواحی جنوبی

**Figure 4-** Symptoms of almond witch's broom in periwinkle plants inoculated with isolates from various regions of the Khorasan Razavi Province. A: healthy; B: pale yellows and phyllody caused by inoculation with isolates from the northern areas; C: severe yellowness and phyllody as a result of inoculation by isolates of the central areas; D: Phyllody induced by inoculation of isolates from the southern areas

## شناسایی و تعیین رابطه فیلوژنی فیتوپلاسم‌های همراه با بیماری جاروک بادام در مناطق مختلف خراسان رضوی

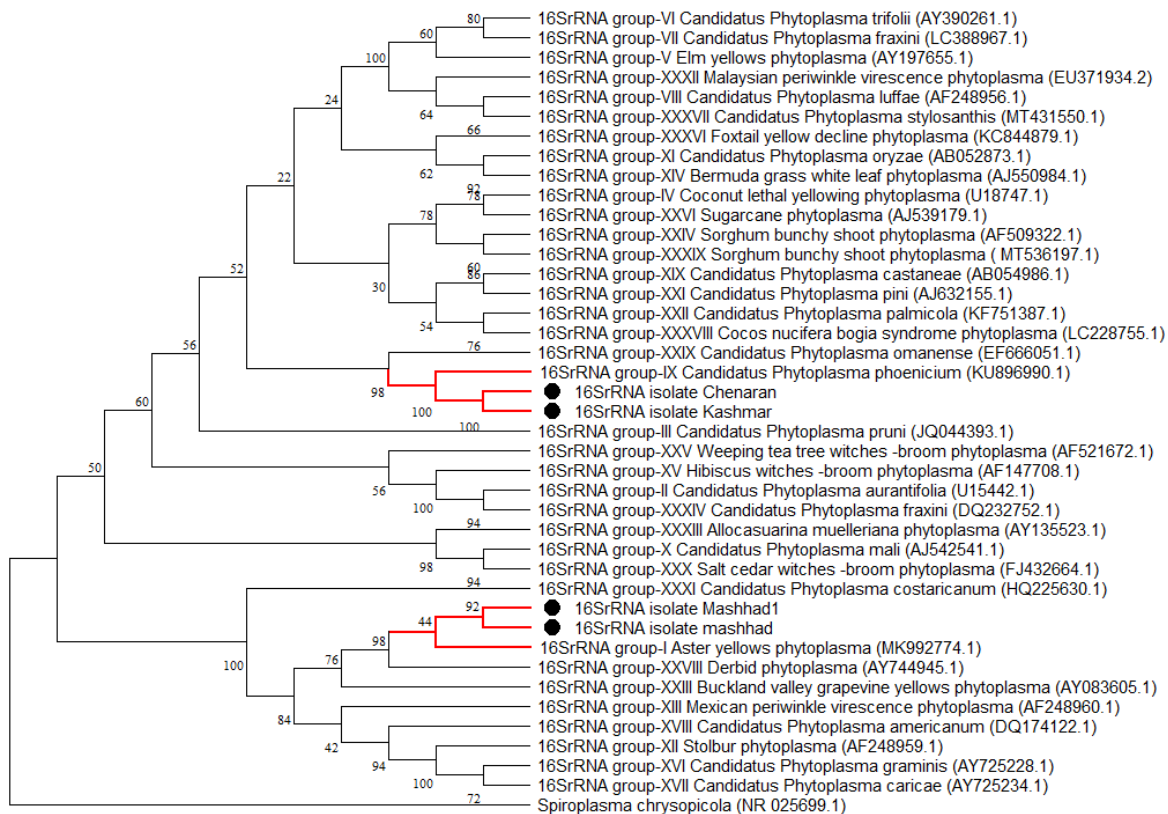
نتیجه جستجوی توالی‌های بدست آمده از هر منطقه در پایگاه داده NCBI نشان‌دهنده ماهیت فیتوپلاسمایی آنها بود. توالی حاصل از جدایه چناران (PP928397) از ناحیه شمالی خراسان رضوی بیشترین شباهت را به میزان ۹۸/۳۴ درصد با 16S rRNA استرین Ei1090 از *C. Phytoplasma phoenicium* داشت. توالی 16S rRNA بدست آمده از جدایه کاشمر (PP928398) از ناحیه جنوبی خراسان رضوی نزدیک‌ترین رابطه را با جدایه خفر (Khافر, Iran) از *C. Phytoplasma phoenicium* به میزان ۹۷/۷۴ درصد نشان داد. این دو استرین فیتوپلاسم متعلق به گروه فیتوپلاسمی جاروک نخود کبوتر (Pigeon pea witches'-broom phytoplasma) از گروه نه 16S rRNA (16SrIX) هستند که می‌توانند باعث بروز بیماری جاروک در بادام شوند. استرین Ei1090 سویه خفیف و جدایه خفر سویه شدید از *C. Phytoplasma phoenicium* هستند (Jakovljević *et al.*, 2020; Salehi *et al.*, 2006). شباهت جدایه چناران و جدایه کاشمر با سایر اعضای گروه 16SrIX به ترتیب بین ۹۹/۳۳ تا ۹۸/۷۹ و ۹۸/۴۸ تا ۹۸/۹۵ درصد بود.

توالی بدست آمده از 16S rRNA جدایه مشهد (PP928399) از ناحیه مرکزی خراسان رضوی به‌میزان ۹۹/۹۴ درصد با استرین CPh از فیتوپلاسمی برگ‌سانی شبدر (Clover phyllody phytoplasma) شباهت داشت. این فیتوپلاسمای عضو از گروه فیتوپلاسمایی زردی گل مینا (Aster yellows phytoplasma) از زیرگروه یک 16S rRNA (16SrI) است (Fránová *et al.*, 2009). همراهی فیتوپلاسم از گروه زردی مینا با جاروک بادام در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Zirak *et al.*, 2021). شباهت جدایه مشهد با سایر اعضای گروه 16SrI بین ۹۹/۹۰ تا ۹۵/۹۸ درصد بود.

۱ برای رسم درخت فیلوژنی، توالی جدایه های چناران، کاشمر و مشهد به همراه توالی 16S rRNA استرین های مرجع از تمام  
۲ گروه های فیتوپلاسمایی گزارش شده در نرم افزار MegaX همردیف سازی و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد (شکل ۵). در  
۳ درخت فیلوژنتیکی نیز جدایه های چناران و کاشمر (به ترتیب نواحی شمالی و جنوبی خراسان رضوی) به همراه استرین مرجع  
۴ گروه فیتوپلاسمای جاروک نخود کبوتر در یک شاخه قرار گرفتند. همچنین جدایه مشهد (ناحیه مرکزی خراسان رضوی) به  
۵ همراه استرین مرجع گروه فیتوپلاسمایی زردی مینا و گروه 16SrXXVIII در یک شاخه قرار گرفتند. در مطالعات قبلی  
۶ گزارش شده است که گروه فیتوپلاسمایی 16SrI و گروه 16SrXXVIII از نظر فیلوژنتیکی رابطه نزدیکی داشته و در درخت  
۷ فیلوژنتیکی حاصل از ژن 16S rRNA در یک شاخه قرار می گیرند (Cao et al., 2020).

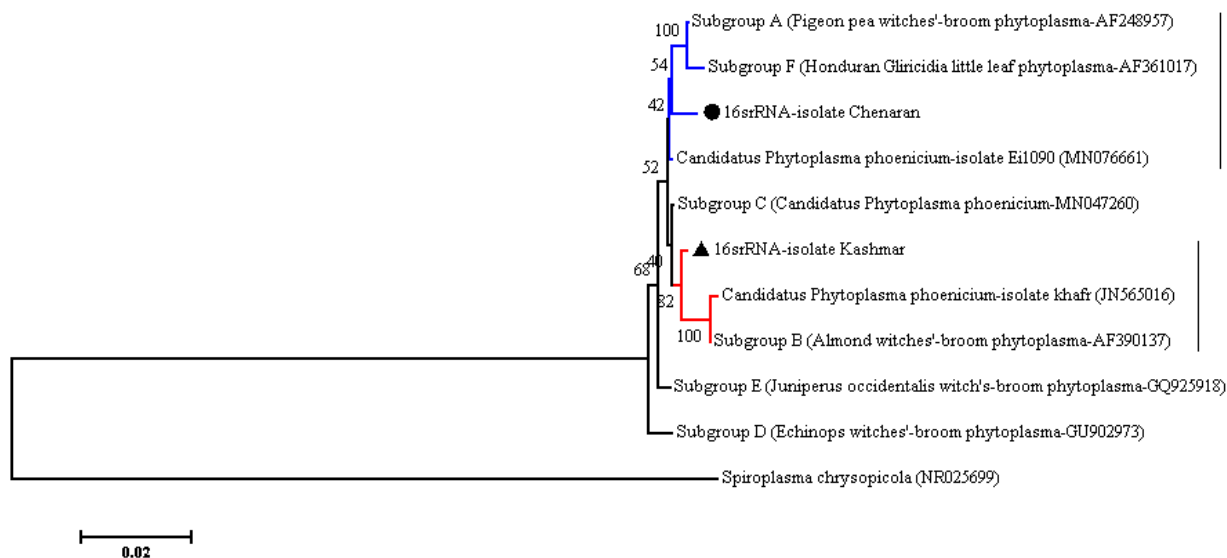
۸ به منظور تعیین رابطه جدایه های چناران و کاشمر با سایر زیرگروه های گروه جاروک نخود کبوتر توالی 16S rRNA این  
۹ جدایه ها به همراه توالی استرین های مرجع مهمترین زیرگروه های گروه جاروک نخود کبوتر در نرم افزار MegaX همردیف  
۱۰ سازی و درخت فیلوژنتیکی رسم شد (شکل ۶). در درخت فیلوژنتیکی دو جدایه چناران و کاشمر با زیرگروه های B، A و F در  
۱۱ یک شاخه قرار گرفتند. مشابه با پژوهش حاضر، در مطالعه کریمی شهری و همکاران نیز گزارش شده است که جدایه فعال  
۱۲ در منطقه کوهسرخ (ناحیه جنوبی خراسان رضوی) متعلق به زیرگروه A از گروه جاروک نخود کبوتر است (Karimi shahri  
۱۳ et al., 2014). در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که این سه زیرگروه از مهمترین زیرگروه های همراه با بیماری  
۱۴ جاروک درخت بادام هستند (Lova et al., 2011; Ghayeb Zamharir, 2011). بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده به  
۱۵ نظر می رسد که فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بادام در نواحی شمالی خراسان رضوی سویه خفیف و عامل بیماری  
۱۶ جاروک بادام در نواحی جنوبی استان خراسان رضوی سویه شدید *C. Phytoplasma phoenicium* است.

۱۷ برای تعیین رابطه فیلوژنی جدایه مشهد با سایر زیرگروه های فیتوپلاسمایی در گروه زردی گل مینا، توالی آنها نیز در نرم افزار  
۱۸ MEGAX همردیف سازی و درخت فیلوژنتیکی آنها رسم شد. با توجه به شکل ۷ مشاهده می شود که جدایه مشهد در  
۱۹ زیرگروه C از گروه زردی گل مینا قرار دارد و رابطه نزدیکی با *Clover phyllody phytoplasma* دارد. در مطالعات قبلی  
۲۰ حضور این زیرگروه روی برخی از گیاهان زینتی در ایران گزارش شده است (Babaie et al., 2007). از گروه زردی گل مینا  
۲۱ قبلا زیرگروه B به عنوان فیتوپلاسمای همراه با جاروک بادام از ایران گزارش شده است (Zirak et al., 2021). لیکن  
۲۲ تاکنون همراهی یک فیتوپلاسمای از زیرگروه C گروه زردی گل مینا (16SrI-C) با بیماری جاروک بادام گزارش نشده است.  
۲۳ از این زیر گروه همراهی یک فیتوپلاسمای با بیماری پیچیدگی و قرمز شدگی برگ درختان هلو (Peach red leaf disease)  
۲۴ گزارش شده است (Marcone et al., 2014). بنابراین فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بادام در نواحی مرکزی خراسان  
۲۵ رضوی استرینی از زیر گروه C گروه زردی گل مینا است. در مطالعه  
۲۶



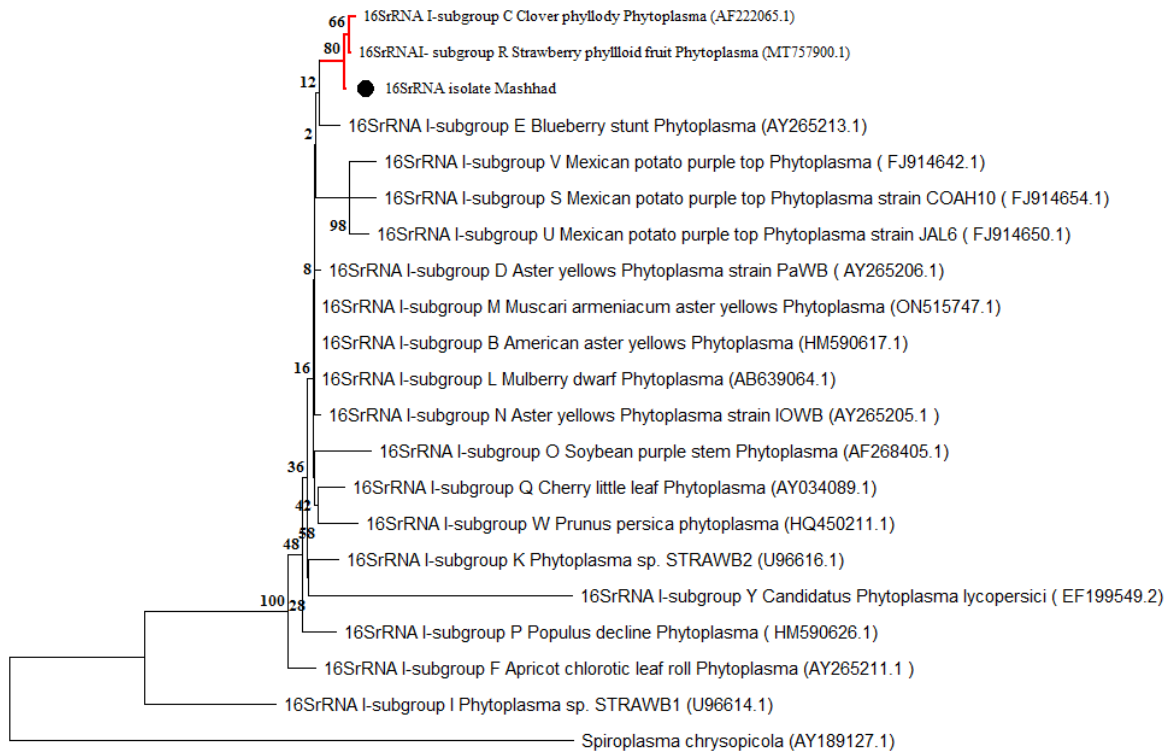
۱  
 ۲ شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده توالی 16S rRNA جدایه های چناران، کاشمر و مشهد فیتوپلاسمهای همراه با جاروک بادام در استان خراسان رضوی  
 ۳ به همراه توالی 16S rRNA استرین های مرجع گروه های فیتوپلاسمایی گزارش شده به روش maximum likelihood در نرم افزار MegaX. Spiroplasma  
 ۴ chrysopicola به عنوان خارج گروه (outgroup) در نظر گرفته شده است. جدایه های این تحقیق با • مشخص شده است

۵ **Figure 5-** Phylogenetic tree constructed from the 16S rRNA sequence of Chenaran, Kashmer and Mashhad isolates of  
 ۶ phytoplasmas associated with almond witch's broom in Razavi-khorasan province along with the 16S rRNA sequence of the  
 ۷ reference strains of the reported phytoplasma groups using the maximum likelihood method in MegaX. *Spiroplasma*  
 ۸ *chrysopicola* is used as outgroup. The isolates from this study are marked with•



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده توالی 16S rRNA جدایه های چناران و کاشمر از *C. Phytoplasma phoenicium* به همراه توالی 16S rRNA استرین های مرجع تعدادی از مهمترین زیرگروه های گروه فیتوپلاسمای جاروک نخود کبوتر (Pigeon pea witches'-broom phytoplasma) به روش maximum likelihood در نرم افزار MegaX: *s.chrysopicola* به عنوان outgroup در نظر گرفته شده است. جدایه های این تحقیق با • مشخص شده است

**Figure 6-** Phylogenetic tree drawn using the 16S rRNA sequence of Chenaran and Kashmer isolates of *C. Phytoplasma phoenicium* together with the 16S rRNA sequence of the reference strains of the members of the major subgroups of the pigeon pea witch's- broom phytoplasma group using the maximum likelihood method in MegaX. *s.chrysopicola* is considered as outgroup. The isolates from this study are labelled with•



شکل ۷- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده توالی 16S rRNA جدایه مشهد بیماری جاروک بادام به همراه توالی 16S rRNA استرین‌های مرجع مهمترین زیرگروه‌های گروه فیتوپلاسمای زردی گل مینا به روش maximum likelihood در نرم افزار MegaX. *s.chrysopicola* به عنوان outgroup استفاده شده است. جدایه مشهد با \* مشخص شده است

**Figure 7-** Phylogenetic tree drawn using the 16S rRNA sequence of the Mashhad isolate of almond witches' broom disease and the 16S rRNA sequence of the reference strains of the major subgroups in Aster yellows phytoplasma group using the maximum likelihood method in MegaX. *s.chrysopicola* is used as outgroup. Mashhad isolate is marked with\*

## نتیجه گیری

بیماری جاروک بادام باعث خسارت زیادی در باغ‌های بادام در استان خراسان رضوی می‌شود. علائم بیماری شامل زردی، ریزبرگی، جارویی شدن شاخه‌های جانبی، رشد تعداد زیادی شاخه از تنه اصلی، سرخشکیدگی، زوال و مرگ درختان بادام بود. علائم بیماری جاروک بادام در مناطق مختلف استان خراسان رضوی متفاوت بود. به طور کلی علائم بیماری در نواحی شمالی ملایم‌تر و در نواحی مرکزی و جنوبی استان شدیدتر بود. با توجه به نتایج این پژوهش، سویه‌های مختلف *C. Phytoplasma phoenicium* و *Clover phyllody phytoplasma* به عنوان عوامل همراه با بیماری جاروک بادام در

۱ استان خراسان رضوی هستند. بنابراین تفاوت در نوع و شدت علائم بیماری در مناطق مختلف را می‌توان ناشی از حضور  
۲ فیتوپلاسم‌های متفاوت از گروه‌ها و زیرگروه‌های مختلف در درختان بادام دانست ( Salehi et al., 2006; Gupta et al.,  
۳ 2023). بعلاوه گستردگی بیماری در نواحی شمالی استان خراسان رضوی کمتر بوده و با حرکت به سمت نواحی قسمت‌های  
۴ جنوبی استان بر شدت گستردگی بیماری افزوده می‌شود. با توجه به اینکه مناطق شمالی استان خراسان رضوی از نظر آب و  
۵ هوایی جزو نواحی سردسیر محسوب می‌شوند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گسترش بیماری که ناشی از فعالیت ناقل  
۶ (شناخته نشده) بیماری است در نواحی گرمسیر استان بیشتر خواهد بود. بنابراین با توجه به تغییرات اقلیمی پیش رو و افزایش  
۷ دما در مناطق سردسیر احتمال دارد که در سال‌های آتی بر گسترش این بیماری در نواحی سردسیر افزوده شود. اثر افزایش  
۸ دما بر افزایش سرعت گستردگی بیماری‌های فیتوپلاسمایی در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است ( Zamorzaeva et al.,  
۹ 2019). بررسی گستردگی بیماری جاروک بادام در استان خراسان رضوی نشان داد که تقریباً تمامی مناطق مهم کاشت بادام  
۱۰ در این استان آلوده به بیماری است؛ بنابراین احداث باغ‌های بادام و یا تهیه و تولید نهال در این مناطق باید با احتیاط بیشتری  
۱۱ صورت پذیرد.

## منابع

- ۱۳ Babaie, G; Khatabi, B; Bayat, H; Rastgou, M; Hosseini, A; Salekdeh G. (2007). Detection and  
۱۴ characterization of phytoplasmas infecting ornamental and weed plants in Iran. *Journal of*  
۱۵ *Phytopathology*, 155(6), 368-372. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01247.x>
- ۱۶ Bertaccini, A; & Duduk, B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent  
۱۷ research. *Phytopathologia mediterranea*, 48(3), 355-378.  
۱۸ [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-3300](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-3300)
- ۱۹ Bianco, P.A; Romanazzi, G; Mori, N; Myrie, W; Bertaccini, A. (2019). Integrated management of  
۲۰ phytoplasma diseases. *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-II: Transmission and*  
۲۱ *Management of Phytoplasma-Associated Diseases*, 237-258. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_11)  
۲۲ [2832-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_11)
- ۲۳ Caglayan, K; Gazel, M; Škorić, D. (2019). Transmission of Phytoplasmas by Agronomic Practices.  
۲۴ *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-II: Transmission and Management of Phytoplasma-*  
۲۵ *Associated Diseases*, 149-163.
- ۲۶ Cao, Y; Trivellone, V; Dietrich, C.H. (2020). A timetree for phytoplasmas (Mollicutes) with new  
۲۷ insights on patterns of evolution and diversification. *Molecular phylogenetics and evolution*, 149,  
۲۸ 106-826. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106826>
- ۲۹ Dakhil, H.A; Hammad, E.A.F; El-Mohtar, C; Abou-Jawdah, Y. (2011). Survey of leafhopper  
۳۰ species in almond orchards infected with almond witches' broom phytoplasma in Lebanon.  
۳۱ *Journal of insect Science*, 11(1). <https://doi.org/10.1673/031.011.6001>



- Fránová, J; Příbylová, J; Petrzik, K. (2009). Purple coneflower with reddening and phyllody: a new host of clover phyllody phytoplasma. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 85-90. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9320-3>
- Gupta, S., Handa, A; Brakta, A; Negi, G; Tiwari, R.K; Lal, M.K; Kumar, R. (2023). First report of 'Candidatus Phytoplasma asteris' associated with yellowing, scorching and decline of almond trees in India. *PeerJ* 11, e15926. <https://doi.org/10.7717/peerj.15926>
- Haghshenas, F; Salehi, M; Ghasemi, S. (2015). Biological and molecular characterization of phytoplasmas associated with GF-677 witches'-broom in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 51(2), 229-244. (In Persian)
- Jakovljević, M; Jović, J; Krstić, O; Mitrović, M; Marinković, S; Toševski, I. (2020). Diversity of phytoplasmas identified in the polyphagous leafhopper *Euscelis incisus* (Cicadellidae, Deltocephalinae) in Serbia: pathogen inventory, epidemiological significance and vectoring potential. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 201-221. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01878-w>
- Jensen, D. (1959). A plant virus lethal to its insect vector. *Virology*, 8(2), 164-175. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(59\)90002-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(59)90002-9)
- Karimishahri, M.R; Kamali, H; Sajjadinezhad, M; Aliakbari, R. (2014). Report on the presence of Almond Witches Broom agent in Koohsorkh (Kashmar) region of Razavi Khorasan province. *The First National Congress of Biology and Natural Sciences of Iran* (Vol. 1). (In Persian)
- Kirdat, K; Tiwarekar, B; Sathe, S; Yadav, A. (2023). From sequences to species: Charting the phytoplasma classification and taxonomy in the era of taxogenomics. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1123783. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1123783>
- Lova, M.M; Quaglino, F; Abou-Jawdah, Y; Choueiri, E; Sobh, H; Casati, P; Tedeschi, R; Alma, A; Bianco, P.A. (2011). Identification of new 16SrIX subgroups, -F and -G, among 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' strains infecting almond, peach and nectarine in Lebanon. *Phytopathologia mediterranea*, 50(2), 273-282. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-9253](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9253)
- Marcone, C; Guerra, L.G; Uyemoto, J.K. (2014). Phytoplasmal diseases of peach and associated phytoplasma taxa. *Journal of Plant Pathology*, 96(1). <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I1.004>
- Molino Lova, M; Bianco, P.A; Casati, P; Quaglino, F. (2013). Almond witches' broom phytoplasma: disease monitoring and preliminary control measures in Lebanon.
- Namba, S. (2019). Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 95(7), 401-418. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.028>

- ۱ Pourali, H; & Salehi, M. (2012). Genetic Diversity of the phytoplasma isolates associated with  
۲ almond witches' broom in iran. *Iranian Journal Of Plant Pathology*, 48(3), 353-366. (In Persian)
- ۳ Přebilová, J; & Špak, J. (2013). Dodder transmission of phytoplasmas. *Phytoplasma: Methods and*  
۴ *protocols*, 41-46. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_4)
- ۵ Anonymous. (2021). Ministry of agriculture, information and communication technology center,  
۶ agricultural statistics. (In Persian)
- ۷ Salehi, M; Izadpanah, k; Heydarnejad, j. (2006). Characterization of a new almond witches' broom  
۸ phytoplasma in Iran. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 386-391.  
۹ <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01109.x>
- ۱۰ Salehi, M; Salehi, E; Abbasian, M; Izadpanah, K. (2015). Wild almond (*Prunus scoparia*), a  
۱۱ potential source of almond witches' broom phytoplasma in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 97(2),  
۱۲ 377-381. <https://doi.org/10.4454/JPP.V97I2.017>
- ۱۳ Tawidian, P; Jawhari, M; Bianco, P.A; Sobh, H. (2017). The potential of grafting with selected  
۱۴ stone fruit varieties for management of almond witches' broom. *Phytopathologia mediterranea*,  
۱۵ 458-469. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-20609](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-20609)
- ۱۶ Verdin, E; Salar, P; Danet, J.L; Choueiri, E; Jreijiri, F; Zammar, S.El; Gelie, B; Bove, J.M;  
۱۷ Garnier, M. (2003). 'Candidatus *Phytoplasma phoenicium*' sp. nov., a novel phytoplasma  
۱۸ associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *International*  
۱۹ *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 833-838.  
۲۰ <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02453-0>
- ۲۱ Ghayeb Zamharir, M. (2011). Phytoplasmas associated with almond witch's broom disease: an  
۲۲ overview. *African Journal of Microbiology Research*, 5(33), 6013-6017.  
۲۳ <https://doi.org/10.5897/AJMRX11.021>
- ۲۴ Zamorzaeva, I; Bahşiev, L; Mihnea, N. (2019). Spread of phytoplasma infection in the tomato  
۲۵ field depending on the climatic conditions of the year. *Institute of Genetics, Physiology and Plant*  
۲۶ *Protection, chisinau*.
- ۲۷ Zhang, Y.p; Uyemoto, J.K; Kirkpatrick, B.C. (1998). A small-scale procedure for extracting  
۲۸ nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of*  
۲۹ *Virological Methods*, 71(1), 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)
- ۳۰ Zirak, L; Bahar, M; Ahoonmanesh, A. (2009). Characterization of phytoplasmas associated with  
۳۱ almond diseases in Iran. *Journal of Phytopathology*, 157(11-12), 736-741.  
۳۲ <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01567.x>

١ Zirak, L; Khakvar, R; Zarrini, G; Hasanpour, K. (2021). Detection and molecular characterization  
٢ of phytoplasmas associated with stone fruit trees in northwest of Iran. *Crop Protection*, 142,  
٣ 105526. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105526>

٤

٥

نسخه پیش از انتشار