



## Etiology of Almond Yellows and Witches' Broom in the Khorasan Razavi Province

R. Tavanai-Sarab<sup>1</sup>, M. Zakiaghl<sup>1</sup><sup>2\*</sup>, M. Mehrvar<sup>1</sup><sup>2</sup>

1 and 2- Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran,  
(\*- Corresponding author's Email: [zakiaghl@um.ac.ir](mailto:zakiaghl@um.ac.ir))

Received: 28-04-2024  
Revised: 28-07-2024  
Accepted: 01-09-2024  
Available Online: 29-04-2025

### How to cite this article:

Tavanai-Sarab, R., Zakiaghl, M., & Mehrvar, M. (2024). Etiology of almond yellows and witches' broom in the Khorasan Razavi province. *Iranian Plant Protection Research*, 39(1), 49-60. (In Persian with English abstract)  
<https://doi.org/10.22067/jpp.2024.87817.1186>

### Introduction

Almond (*Prunus amygdalus* Batsch.) 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 witches' 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 witches' broom phytoplasma group, has been reported as the causative agent of almond witches' broom disease. Almond witches' 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. Symptoms of the disease are yellows, small leaves, witches' broom and dieback. Almond witches' broom disease has been reported from Khorasan Razavi province, but different symptoms were observed on almond trees in different locations of this province. In this study, almond tree orchards in Khorasan Razavi province were examined for the symptoms of almond witches' broom and etiology of the disease was determined.

### Materials and Methods

In 2022, the samples were collected from almond orchards of Khorasan Razavi province and grafted onto healthy almond seedlings and periwinkle plants. The DNA extraction from the main vein or bark of the stems was performed using CTAB method. Nested polymerase chain reaction was performed with universal phytoplasma primers (P1/P7 followed by R16F2n/R16R2), 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 1000 replicates in the bootstrap test.

### Results and Discussion

In the northern, central and southern regions of Khorasan Razavi province, random sampling was carried out in almond plantations. In the northern region, symptoms of almond witches' broom were observed only in



©2024 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/jpp.2024.87817.1186>


Chenaran. In the central region, symptoms of witches' broom were found in Mashhad and Nishapur. However, in the southern region, the symptoms of almond witches' broom were more frequent and observed in Kashmar, Koohsorkh, Torbat-Heydariyeh and Sabzevar. The symptoms of infected almond trees in the northern region were small leaves, mild witches' broom and dieback. The symptoms in the central region were severe small leaves, yellows, severe stunting, witches' broom and decline. Infested almond trees in the southern region showed severe small leaves, severe witches' broom and proliferation, and dense growth of thin branches from the trunk. The disease symptoms in the northern areas of Khorasan Razavi were moderate and in the central and southern areas were severe. In addition, there were significant differences in the type of symptoms in the central and southern regions. In the nested polymerase chain reaction, a fragment of 1250 base pairs replicated from the infected samples. Sequencing and BLAST analysis revealed that the amplified fragments were similar to the phytoplasma 16S rRNA. Two months after inoculation, disease symptoms appeared on the inoculated almond seedlings. Almond seedlings inoculated with the northern strain showed symptoms such as terminal bud dieback, dieback of lateral branches and necrotic spots on the leaves. Almond seedlings inoculated with the isolate from the central areas showed symptoms such as yellows, severe witches' broom, stunting and small leaves. The symptoms in seedlings inoculated with the strain from the southern area of Khorasan Razavi province were severe proliferation, severe stunting, small leaves and necrotic spots on the leaves. In periwinkle plants, isolates from the northern and southern regions induced mild yellows and phyllody; however, isolates from the central region induced severe yellows and phyllodes. The sequence blast results showed that the Chenaran isolate from the northern region of Khorasan Razavi had 98.34% similarity with 16S rRNA strain Ei1090 of *C. Phytoplasma phoenicium*. The 16S rRNA sequence of the Kashmar isolate from the southern region was most closely related to the Khafr isolate (Khafr, Iran) of almond witches' broom phytoplasma. These two phytoplasma strains belong to the 16S rRNA (16SrIX) group of pigeon pea witches' broom phytoplasmas that can cause almond witches' broom. However, Ei1090 is a mild strain and the Khafer isolate is a severe strain of *C. Phytoplasma phoenicium*. The similarity of the isolates from Chenaran and Kashmar with other members of the 16SrIX group ranged from 98.79-99.33 and 98.48-98.95%, respectively. The 16S rRNA sequence of the Mashhad isolate from the central region of Razavi Khorasan was 94.99% similar to the CPh strain of Clover phyllody phytoplasma, a member of the Aster yellows phytoplasma group (16SrI). The similarity of the isolate from Mashhad with other members of the 16SrI group was between 90.99-95.98%. In the phylogenetic tree, the isolates from Chenaran and Kashmar were located in the same branch together with the reference strain of the pigeon pea phytoplasma group (16SrXI group). In addition, the isolates from Chenaran and Kashmar were placed in the same branch with subgroups B and A of the 16SrXI group. In addition, the Mashhad isolate was classified in the aster yellows phytoplasma group (16SrI group) within subtype C, which is a new strain of subgroup C that causes almond witches' broom disease.

## Conclusion

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

**Keywords:** Iran, Phylogeny, Phytoplasma, Prevalence

## سبب‌شناسی 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>۲</sup> 

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۱

## چکیده

بیماری جاروک بادام یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گیاه بادام (*Prunus amygdalus* Batsch) است که سالانه خسارت‌های فراوانی به تولید بادام در ایران وارد می‌کند. این بیماری به‌خصوص 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 فیتوپلازمای 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 بر روی گیاهان محک با یکدیگر تفاوت داشت. استخراج DNA کل به روش CTAB انجام شد و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آسینانه‌ای با استفاده از آغازگرهای عمومی فیتوپلازما، ردیابی عامل بیماری انجام شد. توالی‌یابی قطعه تکثیر شده و آنالیزهای تبارزایی نشان داد که فیتوپلازماهای 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 فیتوپلازمای 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: ایران، پراکنش، تبارزایی، فیتوپلازما

## مقدمه

زیرکشت در رده‌های بعدی قرار دارند (Anonymous, 2021). فیتوپلازماها، پروکاریوت‌های فاقد دیواره سلولی و محدود به آوندهای آبکشی گیاهان میزبان هستند که باعث بروز خسارت شدید در گیاهان مختلف می‌شوند. از جمله بیماری‌های فیتوپلازمایی مهم می‌توان به زردی کشنده نارگیل، زردی مو، جاروک بادام، جاروک لیموترش و بیماری ایکس هلو اشاره کرد. فیتوپلازماها به‌وسیله حشرات مکنده و به‌صورت پایا و تکثیری از گیاهی به گیاه دیگر منتقل می‌شوند. دامنه میزبانی فیتوپلازماها به گیاهان و حشرات محدود است و به‌طور کلی، دامنه میزبانی آن‌ها به دامنه میزبانی حشره ناقل بستگی دارد (Bertaccini & Duduk, 2009). به‌علاوه، این بیمارگرها به‌وسیله قلمه، پیوند، پاجوش، غده و پیاز هم منتقل می‌شوند (Caglayan et al., 2019).

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درخت بادام، بیماری جاروک است.

بادام (*Prunus amygdalus* Batsch) گیاه بومی ایران است و ایران یکی از مهم‌ترین کشورهای تولیدکننده بادام در دنیا است (Ghayeb Zamharir, 2011; Salehi & et al., 2015). در ایران، بادام به‌صورت آبی و دیم کشت می‌شود. براساس آمارنامه سازمان جهاد کشاورزی، بیشترین سطح زیرکشت بادام در استان فارس با ۲۷۳۷۳ هکتار است و پس از آن، استان‌های خراسان رضوی و چهارمحال و بختیاری به ترتیب با ۲۴۹۴۸ و ۱۷۳۸۵ هکتار سطح

۱ و ۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(Email: zakiagh1@um.ac.ir)

\*- نویسنده مسئول:

<https://doi.org/10.22067/jpp.2024.87817.1186>

**نمونه برداری و مایه زنی گیاهان:** در سال ۱۴۰۲ از درختان بادام مشکوک به آلودگی فیتوپلاسمایی در باغ‌های استان خراسان رضوی نمونه برداری شد. بلافاصله پس از انتقال نمونه‌های آلوده به گلخانه تحقیقاتی گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی، جوانه‌های شاخه‌های بادام آلوده به روش پیوند T روی نهال‌های سالم بادام، که سلامت آن‌ها در آزمون PCR تأیید شده بود، پیوند زده شدند. از گیاه انگل سس (*Cuscuta campestris* Yunck) برای انتقال آلودگی از نهال‌های بادام پیوند شده به گیاه محک پروانش استفاده شد (Příbylová & Špak, 2013).

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

**واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز:** واکنش زنجیره‌ای پلیمرآز با استفاده از آغازگرهای عمومی فیتوپلاسم (P1/P7) انجام شد (Salehi et al., 2006). برای انجام واکنش، مقدار دو میکرولیتر از DNA به مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از Master Red (Ampliqon; Cat no. A180301) و ۱۰ پیکومول از آغازگرهای عمومی فیتوپلاسم (P1: AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT و P7: CGTCCTTCATCGGCTCTT) افزوده شد و سپس لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت‌سازی، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه برای اتصال آغازگر و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه به منظور گسترش و هفت دقیقه برای گسترش نهایی قرار گرفتند تا قطعه حدود ۱۸۰۰ جفت بازی تکثیر شود. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرآز آشیانه‌ای، یک میکرولیتر از محصول واکنش قبل با هشت میکرولیتر آب مقطر مخلوط و به لوله حاوی مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از Master Red (Ampliqon; Cat no. A180301) و ۱۰ پیکومول از آغازگرهای R16F2n: ACGACTGCTAAGGACTGG و R16R2: TGAGGGGCGGTGTGTACAAACCCCG افزوده شد. برنامه واکنش شامل دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار 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 دو دقیقه به منظور گسترش و ۱۰ دقیقه برای گسترش نهایی بود تا قطعه ۱۲۵۰ جفت بازی تکثیر شود. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرآز در ژل آگاروز یک درصد حاوی ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید در بافر دی سدیم تترابورات دکا هیدرات (*di-sodium tetraborate decahydrate*);

این بیماری باعث خسارت‌های فراوانی به درختان بادام در کشورهای ایران و لبنان شده است (Verdin et al., 2003). این بیماری در لبنان باعث زوال و نابودی بیش از ۱۰۰ هزار اصله درخت بادام شده است (Dakhil et al., 2011). در ایران نیز بیماری جاروک بادام از چهارمحال و بختیاری، اصفهان، کرمان، فارس، کردستان و در میزبان‌های هلو، شلیل، بادام تلخ و زردآلو گزارش شده است (Pourali & Salehi, 2012; Salehi et al., 2015). فیتوپلاسمایی جاروک نخود کبوتر (*Phytoplasma phoenicium* Pigeon pea witches'-broom) است به‌عنوان بیمارگر همراه با بیماری جاروک بادام گزارش شده است (Molino Lova et al., 2013). از مهم‌ترین علائم این بیماری می‌توان به زردی برگ‌ها، ریزبرگی و جارویی شدن شاخه‌ها، افزولش شاخه‌ها و کاهش فاصله میان‌گره‌ها اشاره کرد (Dakhil et al., 2011). البته در ایران، فیتوپلاسماهای *Ca. Phytoplasma solani* و *Phytoplasma asteris* در درختان بادام ردیابی شده‌اند (Zirak et al., 2009, 2021).

با توجه به تکثیر فیتوپلاسمها در بدن ناقل و میزبان گیاهی و عدم امکان کشت این بیمارگرها در محیط‌های رایج آزمایشگاهی، مطالعات مولکولی و مشخص کردن ژن‌ها و مسیرهای مؤثر در مقاومت گیاهان به بیماری‌های فیتوپلاسمایی می‌تواند راهکارهای جدیدی برای مدیریت بیماری‌های فیتوپلاسمایی ارائه دهد. در حال حاضر، برای بیماری جاروک بادام بهترین راه مدیریت بیماری، جلوگیری از انتقال مواد گیاهی آلوده به مناطق سالم و ریشه‌کنی درختان بادام آلوده است. بنابراین، بررسی گستردگی این بیماری در مناطق مختلف کشت بادام می‌تواند در جلوگیری از گسترش آن به مناطق سالم کمک کند. در لبنان برای مهار بیماری از سال ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۴ میلادی، شش هزار اصله درخت آلوده ریشه کن شد (Bianco et al., 2019). همچنین پیوند بادام روی پایه‌های غیرمیزبان و مقاوم می‌تواند در مهار بیماری مؤثر باشد (Tawidian et al., 2017).

بیماری جاروک بادام از منطقه کوه‌سرخ استان خراسان رضوی گزارش شده است (Karimi shahri et al., 2014)، اما علائم متنوعی مانند زردی، جارویی و زوال در درختان بادام در نواحی مختلف این استان مشاهده می‌شود. در این پژوهش، برای اولین بار در ایران، مناطق مختلف کشت بادام در استان خراسان رضوی از نظر آلودگی به بیماری جاروک بادام و ردیابی فیتوپلاسمایی همراه با بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین در این پژوهش، علائم بیماری در درختان بادام مناطق مختلف استان خراسان رضوی و علائم ایجاد شده در گیاهان محک مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

## 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 طرقيه شانديز بازدید شد و باغ‌های شهرهای مشهد و نیشابور دارای علائم جاروک بودند. در ناحیه جنوبی استان خراسان رضوی از 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 همه شهرهای نمونه‌برداری شده مشاهده شد. جزئیات مربوط به مناطق مورد نمونه‌برداری و علائم مشاهده شده در باغات هر منطقه در **جدول ۱** نشان داده شده است.

(هشت گرم NaOH به همراه ۴۸ گرم اسید بوریک در ۰/۹ لیتر آب مقطر) الکتروفورز شد.

### توالی‌یابی و آنالیزهای فیلوژنتیکی: به‌منظور توالی‌یابی،

قطعه تکثیر شده حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای با استفاده از کیت DNA gel Purification kit-Gel Recovery شرکت کیاژن براساس دستورالعمل شرکت سازنده از ژل آگاروز خالص‌سازی شد. دو نمونه از ناحیه شمالی، چهار نمونه از ناحیه مرکزی و شش نمونه از ناحیه جنوبی برای توالی‌یابی انتخاب شدند. توالی‌یابی قطعه خالص‌سازی شده توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد. سپس ماهیت توالی به‌دست 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 هم‌ردیف‌سازی توالی‌های به‌دست آمده از جدایه‌های این مناطق و توالی 16S rRNA سایر فیتوپلاسمای شناخته شده و رسم درخت فیلوژنتیکی در نرم‌افزار MegaX به‌روش maximum likelihood با ۵۰۰ تکرار در آزمون بوت استرپ انجام شد.

**جدول ۱-** مناطق نمونه‌برداری در استان خراسان رضوی و علائم بیماری جاروک در درختان بادام هر منطقه

**Table 1-** Sampling regions in Khorasan Razavi province and symptoms of witches' broom disease on almond trees of each region

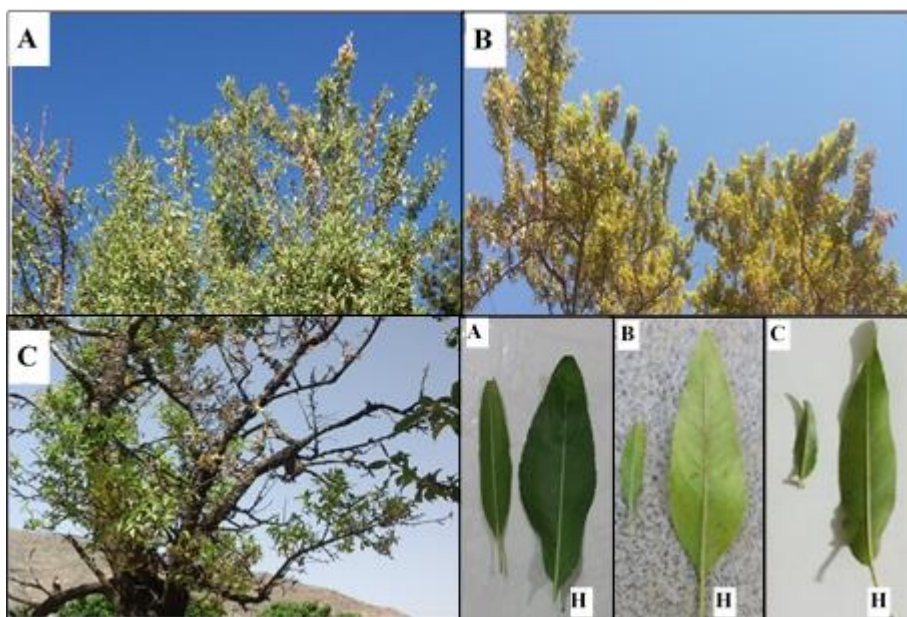
Symptoms	Number of infected samples	Number of samples	Geographical coordinates	City
-	0	5	37.060/58.340	Quchan
Mild little leaf, dieback	2	5	36.394/59.063	Chenaran
-	0	5	37.252/59.042	Dargaz
Severe yellowing and little leaf	4	5	36.132/59.381	Mashhad
Yellowing, internode shortening	3	5	36.120/58.524	Neyshabur
-	0	5	35.425/59.471	Fariman
-	0	3	36.232/59.203	Torghabe-o-Shandiz
Severe witches' broom	5	5	35.285/58.272	Kuhsorkh
Severe witches' broom	5	5	35.135/58.251	Kashmar
Yellowing, witches' broom	3	5	35.222/59.102	Torbat-e Heydariyeh
Yellowing, witches' broom	3	5	36.130/57.434	Sabzevar

سایر محققان نیز گزارش شده است (Salehi *et al.*, 2015); (Molino Lova *et al.*, 2013). علائم بیماری در نواحی شمالی خراسان رضوی خفیف و در نواحی مرکزی و جنوبی شدید بود. به‌علاوه نوع علائم ایجاد شده در نواحی مرکزی و جنوبی دارای تفاوت‌های قابل توجهی بود. همچنین علائم مشاهده شده در نواحی جنوبی با علائم گزارش شده در مطالعه کریمی شهری و همکاران (Karimi Shahri *et al.*, 2014) از منطقه کوه‌سرخ تا حدودی تفاوت داشت و تورم جوانه‌ها و سرشاخه‌های جوان و زردی شدید برگ‌ها در پژوهش حاضر مشاهده نشد. در مطالعات قبلی نیز گزارش

علائم در درختان بادام آلوده در ناحیه شمالی خراسان رضوی شامل ریزبرگی خفیف، جاروک خفیف و سرخشکیدگی برخی از شاخه‌های تاج درخت بود (شکل ۱- A). علائم بیماری در باغ‌های ناحیه مرکزی استان خراسان رضوی ریزبرگی شدید، زردی، کاهش شدید فاصله میان‌گره‌ها، جاروک و تحلیل تاج درخت بود (شکل ۱- B). درختان بادام آلوده در منطقه جنوبی خراسان رضوی علائم ریزبرگی شدید، جارویی شدن شاخه‌های جانبی، رشد متراکم شاخه‌های نازک از تنه و شاخه‌های اصلی داشتند (شکل ۱- C). علائم مشاهده شده در درختان بادام آلوده به فیتوپلاسم، در مطالعات

(*al.*, 2006

C. *Phytoplasma phoenicium* مختلف شده است که جدایه‌های متفاوتی در میزبان خود شونند (Salehi *et al.*)



شکل ۱- علائم بیماری جاروک و ریزبرگی در درختان بادام در نواحی مختلف استان خراسان رضوی. A: نواحی شمالی، B: نواحی مرکزی، C: نواحی جنوبی و H: نشان‌دهنده برگ درخت سالم است

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

رضوی، علائم توقف رشد جوانه انتهایی، سرخشکیدگی شاخه‌های جانبی و لکه‌های نکروزه در برگ‌ها ایجاد شد (شکل ۳- B). 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).

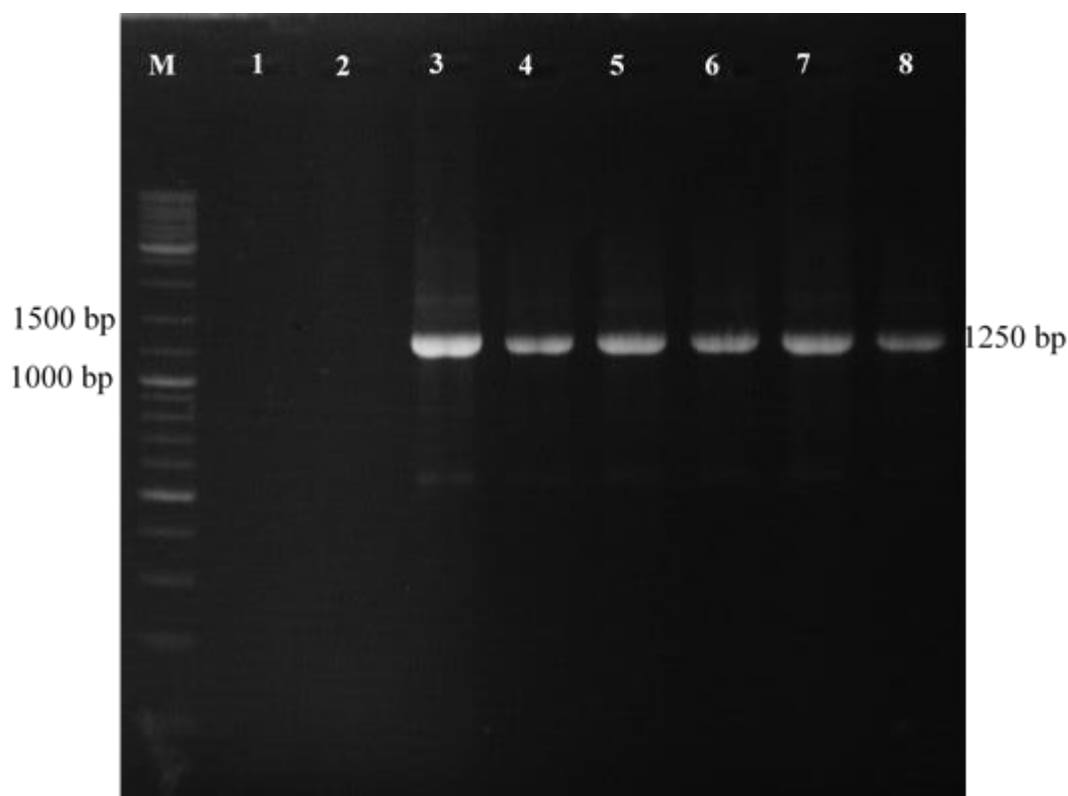
ده روز پس از استقرار گیاه سس، علائم بیماری در گیاهان پروانش ظاهر شد. جدایه‌های نواحی مختلف به‌وسیله سس به گیاهان پروانش منتقل شدند. انتقال جدایه نواحی شمالی استان خراسان رضوی باعث ایجاد برگ‌سانی و زردی خفیف در برگ‌های انتهایی پروانش شد (شکل ۴- B)، ولی در مایه‌زنی پروانش با نمونه‌های جنوب استان خراسان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

### 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، درحالی‌که از نمونه سالم این قطعه تکثیر نشد (شکل ۲). قطعه‌های تکثیر شده از نمونه‌های باغ‌های بادام شهرستان‌های کوه‌سرخ، کاشمر، تربت حیدریه، مشهد، نیشابور و چناران توالی‌یابی شدند. نتیجه بلاست توالی‌ها نشان داد که قطعات توالی‌یابی شده با ناحیه ژنی 16S rRNA فیتوپلازما شباهت دارند. از قطعه 16S rRNA برای ردیابی و تعیین روابط فیلوژنی در فیتوپلازماها و فیتوپلاسمای جاروک بادام استفاده می‌شود (Kirdat *et al.*, 2023).

### انتقال فیتوپلازما و علائم در گیاهان پیوند شده: دو ماه

پس از پیوند، علائم بیماری به‌تدریج روی نهال‌های بادام پیوند شده ظاهر شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق سه‌گانه استان خراسان رضوی به‌صورت جداگانه روی نهال‌های بادام پیوند زده شدند. در نهال‌های بادام پیوند شده با نمونه‌های شمال استان خراسان



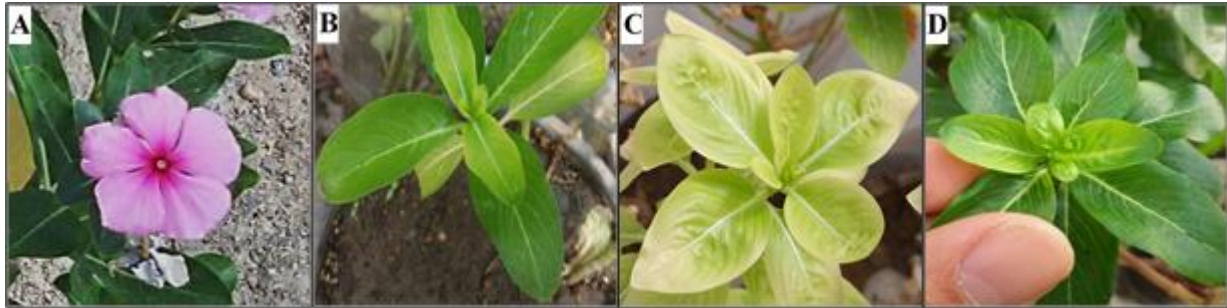
**شکل ۲-** الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای با آغازگرهای R16F2n/R16R2 از نمونه‌های بادام جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان خراسان رضوی. M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp (Thermo Fisher Scientific, USA)، راهک شماره ۱: شاهد منفی (آب مقطر)، راهک شماره ۲: گیاه سالم، راهک‌های شماره ۳، ۴ و ۵: نمونه‌های 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 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.



**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 انتهایی و سرخشکیدگی شاخه‌ها در اثر پیوند با جدایه نواحی شمالی، C: زردی، جاروک و کاهش فاصله میان‌گره‌ها ناشی از پیوند با جدایه نواحی مرکزی و D: افزودن شدید شاخه‌های جانبی، کاهش فاصله میان‌گره‌ها و ریزبرگی ایجاد شده با پیوند جدایه نواحی جنوبی

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



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

**Figure 4-** Symptoms of almond witches' 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 and D: Phyllody induced by inoculation of isolates from the southern areas

مشهد به همراه توالی 16S rRNA استرین‌های مرجع از تمام گروه‌های فیتوپلاسمایی گزارش شده در نرم‌افزار MegaX هم‌ردیف‌سازی و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد (شکل ۵). در درخت فیلوژنتیکی نیز جدایه‌های چناران و کاشمر (به ترتیب نواحی شمالی و جنوبی خراسان رضوی) به همراه استرین مرجع گروه فیتوپلاسمای جاروک نخود کبوتر در یک شاخه قرار گرفتند. همچنین جدایه مشهد (ناحیه مرکزی خراسان رضوی) به همراه استرین مرجع گروه فیتوپلاسمایی زردی مینا و گروه 16SrXXVIII در یک شاخه قرار گرفتند. در مطالعات قبلی گزارش شده است که گروه فیتوپلاسمایی 16SrI و گروه 16SrXXVIII از نظر فیلوژنتیکی رابطه نزدیکی داشته و در درخت فیلوژنتیکی حاصل از ژن 16S rRNA در یک شاخه قرار می‌گیرند (Cao et al., 2020).

به منظور تعیین رابطه جدایه‌های چناران و کاشمر با سایر زیرگروه‌های گروه جاروک نخود کبوتر توالی 16S rRNA، این جدایه‌ها به همراه توالی استرین‌های مرجع مهم‌ترین زیرگروه‌های گروه جاروک نخود کبوتر در نرم‌افزار MegaX هم‌ردیف‌سازی و درخت فیلوژنتیکی رسم شد (شکل ۶). در درخت فیلوژنتیکی، دو جدایه چناران و کاشمر با زیرگروه‌های A، B و F در یک شاخه قرار گرفتند. مشابه با پژوهش حاضر، در مطالعه کریمی شهری و همکاران (Karimi Shahri et al., 2014) نیز گزارش شده است که جدایه فعال در منطقه کوهسرخ (ناحیه جنوبی خراسان رضوی) متعلق به زیرگروه A از گروه جاروک نخود کبوتر است. در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که این سه زیرگروه از مهم‌ترین زیرگروه‌های همراه با بیماری جاروک درخت بادام هستند (Lova et al., 2011; Ghayeb Zamharir, 2011). بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بادام در نواحی شمالی خراسان رضوی سویه خفیف و عامل بیماری جاروک بادام در نواحی جنوبی استان خراسان رضوی سویه شدید C.

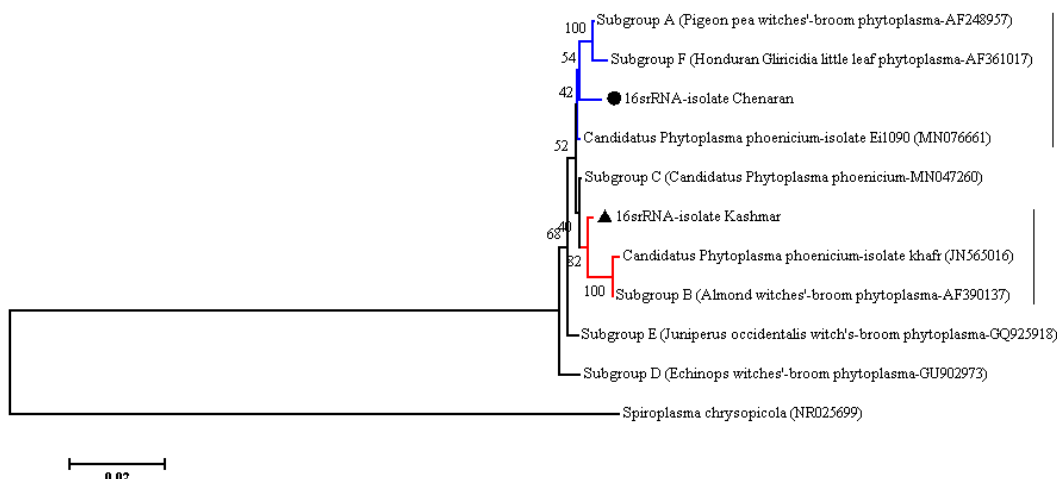
### شناسایی و تعیین رابطه فیلوژنی فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک بادام در مناطق مختلف خراسان رضوی

نتیجه جستجوی توالی‌های به دست 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 به دست آمده از جدایه کاشمر (PP928398) از ناحیه جنوبی خراسان رضوی، نزدیک‌ترین رابطه را با جدایه خفر (Khaftr, Iran) از *C. Phytoplasma phoenicium* به میزان ۹۷/۷۴ درصد نشان داد. این دو استرین فیتوپلاسمای متعلق به گروه فیتوپلاسمای 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 (Salehi et al., 2006; Jakovljević et al., 2020). 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 به دست آمده از 16S rRNA جدایه مشهد (PP928399) از ناحیه مرکزی خراسان رضوی به میزان ۹۹/۹۴ درصد با استرین CPh از فیتوپلاسمای 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 فیتوپلاسمای 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. برای رسم درخت فیلوژنی، توالی جدایه‌های چناران، کاشمر و

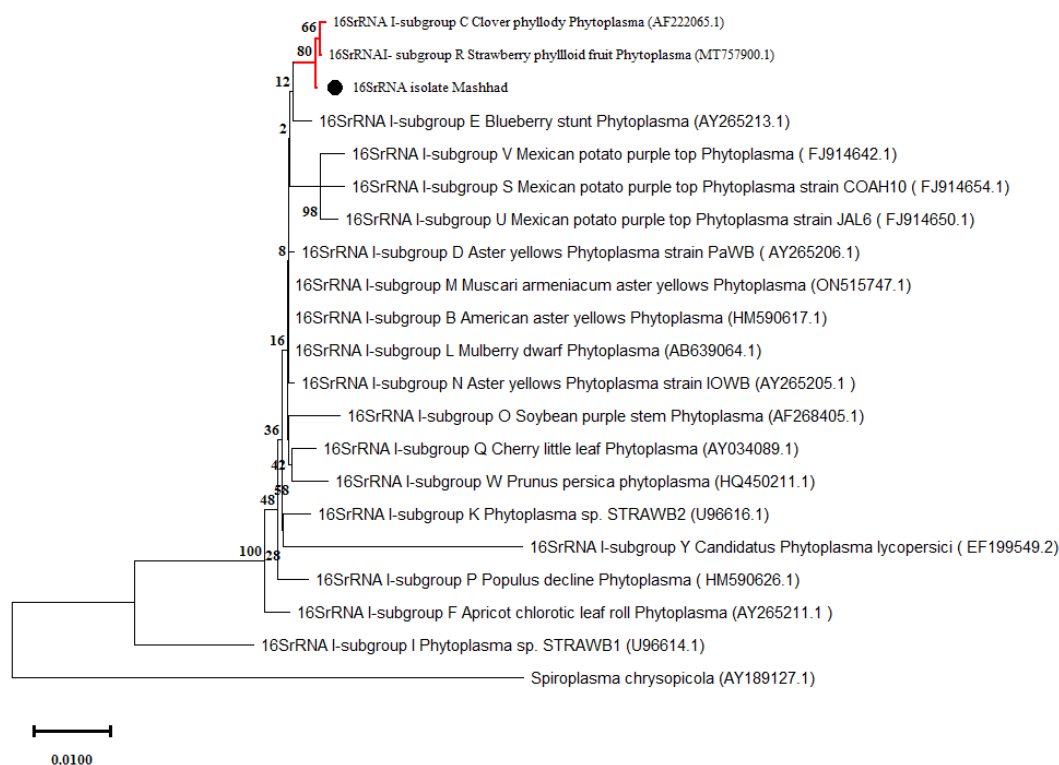






**شکل ۶-** درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از توالی 16S rRNA جدایه‌های چناران و کاشمر از *C. Phytoplasma phoenicium* به همراه توالی 16S rRNA استرین‌های مرجع تعدادی از مهم‌ترین زیرگروه‌های گروه فیتوپلاسمای جاروک نخود کیوتر (Pigeon pea witches'-broom phytoplasma) به روش maximum likelihood در نرم‌افزار MegaX. *Spiroplasma chrysopicola* به‌عنوان outgroup در نظر گرفته شده است. جدایه‌های این تحقیق با • مشخص شده اند.

**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 witches'-broom phytoplasma group using the maximum likelihood method in MegaX. *Spiroplasma chrysopicola* is considered as outgroup. The isolates from this study are labelled with•



**شکل ۷-** درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از 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 نرم‌افزار MegaX. *Spiroplasma chrysopicola* به‌عنوان 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. *Spiroplasma chrysopicola* is used as outgroup. Mashhad isolate is marked with•

## نتیجه‌گیری

به سمت نواحی قسمت‌های جنوبی استان بر شدت گستردگی بیماری افزوده می‌شود. با توجه به اینکه مناطق شمالی استان خراسان رضوی از نظر آب‌وهوایی جزء نواحی سردسیر محسوب می‌شوند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گسترش بیماری که ناشی از فعالیت ناقل (شناخته نشده) بیماری است، در نواحی گرمسیر استان بیشتر خواهد بود. بنابراین، با توجه به تغییرات اقلیمی پیش رو و افزایش دما در مناطق سردسیر، احتمال دارد که در سال‌های آتی بر گسترش این بیماری در نواحی سردسیر افزوده شود. اثر افزایش دما بر افزایش سرعت گستردگی بیماری‌های فیتوپلاسمایی در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Zamorzaeva et al., 2019). بررسی گستردگی بیماری جاروک بادام در استان خراسان رضوی نشان داد که تقریباً تمامی مناطق مهم کاشت بادام در این استان آلوده به بیماری است، بنابراین احداث باغ‌های بادام و یا تهیه و تولید نهال در این مناطق باید با احتیاط بیشتری صورت پذیرد.

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 ار تنه اصلی، سرخشکیدگی، زوال و مرگ درختان بادام بود. علائم بیماری جاروک بادام در مناطق مختلف استان خراسان رضوی متفاوت بود. به‌طور کلی، علائم بیماری در نواحی شمالی ملایم‌تر و در نواحی مرکزی و جنوبی استان شدیدتر بود. با توجه به نتایج این پژوهش، سویه‌های مختلف *Clover phyllody* و *C. Phytoplasma phoenicium* phytoplasma به‌عنوان عوامل همراه با بیماری جاروک بادام در استان خراسان رضوی هستند. بنابراین، تفاوت در نوع و شدت علائم بیماری در مناطق مختلف را می‌توان ناشی از حضور فیتوپلاسماهای متفاوت از گروه‌ها و زیرگروه‌های مختلف در درختان بادام دانست (Gupta et al., 2023; Salehi et al., 2006). به‌علاوه گستردگی بیماری در نواحی شمالی استان خراسان رضوی کمتر بوده و با حرکت

## References

1. Anonymous. (2021). Ministry of agriculture, information and communication technology center, agricultural statistics. vol. 3, p. 83-85, Ministry of Jihad-agriculture (In Persian)
2. Babaie, G., Khatabi, B., Bayat, H., Rastgou, M., Hosseini, A., & Salekdeh, G. (2007). Detection and characterization of phytoplasmas infecting ornamental and weed plants in Iran. *Journal of Phytopathology*, 155(6), 368-372. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01247.x>
3. Bertaccini, A., & Duduk, B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: A review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(3), 355-378.
4. Bianco, P.A., Romanazzi, G., Mori, N., Myrie, W., & Bertaccini, A. (2019). Integrated management of phytoplasma diseases. p. 237-258. In: *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-II: Transmission and Management of Phytoplasma-Associated Diseases*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_11)
5. Caglayan, K., Gazel, M., & Škorić, D. (2019). Transmission of phytoplasmas by agronomic practices. p. 149-163. In: *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-II: Transmission and Management of Phytoplasma-Associated Diseases*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_11)
6. Cao, Y., Trivellone, V., & Dietrich, C.H. (2020). A timetree for phytoplasmas (Mollicutes) with new insights on patterns of evolution and diversification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 149, 106-826. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106826>
7. Dakhil, H.A., Hammad, E.A.F., El-Mohtar, C., & Abou-Jawdah, Y. (2011). Survey of leafhopper species in almond orchards infected with almond witches' broom phytoplasma in Lebanon. *Journal of insect Science*, 11(1). <https://doi.org/10.1673/031.011.6001>
8. 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>
9. Ghayeb Zamharir, M. (2011). Phytoplasmas associated with almond witches' broom disease: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, 5(33), 6013-6017. <https://doi.org/10.5897/AJMRX11.021>
10. 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. *Peer Journal*, 11, e15926. <https://doi.org/10.7717/peerj.15926>
11. 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)
12. 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>
13. 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)
14. 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), Iran.p.153. (In Persian)
15. 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>
16. 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.
17. Marcone, C., Guerra, L.G., & Uyemoto, J.K. (2014). Phytoplasmal diseases of peach and associated phytoplasma taxa. *Journal of Plant Pathology*, 96(1) 15-28. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I1.004>
18. Molino Lova, M., Bianco, P.A., Casati, P., & Quaglino, F. (2013). Almond witches' broom phytoplasma: Disease monitoring and preliminary control measures in Lebanon. p. 71-75. In: *Phytoplasmas and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact*, IPWG - International Phytoplasma Working Group.
19. 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>
20. Pourali, H., & Salehi, M. (2012). Genetic diversity of the phytoplasma isolates associated with almond witches' broom in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 48(3), 353-366. (In Persian)
21. Příbylová, J., & Špak, J. (2013). Dodder transmission of phytoplasmas. *Phytoplasma: Methods and Protocols*, vol. 938, p. 41-46. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2\\_40](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_40)
22. Salehi, M., Izadpanah, K., & Heydarnejad, J. (2006). Characterization of a new almond witches' broom phytoplasma in Iran. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 386-391. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01109.x>
23. Salehi, M., Salehi, E., Abbasian, M., & Izadpanah, K. (2015). Wild almond (*Prunus scoparia*), a potential source of almond witches' broom phytoplasma in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 97(2), 377-381.
24. Tawidian, P., Jawhari, M., Bianco, P.A., & Sobh, H. (2017). The potential of grafting with selected stone fruit varieties for management of almond witches' broom. *Phytopathologia Mediterranea*, 56(3) 458-469. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-20609](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-20609)
25. Verdin, E., Salar, P., Danet, J.L., Choueiri, E., Jreijiri, F., Zammar, S.El., Gelie, B., Bove, J.M., & Garnier, M. (2003). 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 833-838. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02453-0>
26. Zamorzaeva, I., Bahşiev, L., & Mihnea, N. (2019). Spread of phytoplasma infection in the tomato field depending on the climatic conditions of the year. *Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection, Chisinau*. 2(4) 662-668
27. Zhang, Y.P., Uyemoto, J.K., & Kirkpatrick, B.C. (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. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)
28. Zirak, L., Bahar, M., & Ahoonmanesh, A. (2009). Characterization of phytoplasmas associated with almond diseases in Iran. *Journal of Phytopathology*, 157(11-12), 736-741. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01567.x>
29. Zirak, L., Khakvar, R., Zarrini, G., & Hasanpour, K. (2021). Detection and molecular characterization of phytoplasmas associated with stone fruit trees in northwest of Iran. *Crop Protection*, 142, 105526. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105526>