

ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی فیتوپلاسم‌های همراه با جاروک GF-677 در ایران*

Biological and molecular characterization of phytoplasmas associated with GF-677 witches'-broom in Iran

فریبا حق‌شناس^۱، محمد صالحی^{۲*} و ساسان قاسمی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۸)

چکیده

پایه GF-677 (هیبرید بین هلو و بادام) یکی از مناسب‌ترین پایه‌ها در تولید نهال‌های بادام و هلو می‌باشد. طی بازدیدهای سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ از درختان GF-677 در بیدزرد و استهبان (استان فارس) علائم جاروک در آن‌ها مشاهده گردید. عامل بیماری جاروک GF-677 در بیدزرد و استهبان از طریق پیوند از GF-677، به نهال‌های بادام تلخ، هلو و GF-677 و با استفاده از سس (*Cuscuta campestris* Yank.)، از نهال‌های آلوده بادام تلخ به پروانش و بادنجان منتقل شد و در آنها علائم بیماری‌های فیتوپلاسمایی تولید کرد. واکنش دی‌ان‌ای کل استخراج‌شده از درختان GF-677 در بیدزرد و استهبان و گیاهان مایه‌زنی‌شده با پیوند و سس، در آزمون پی‌سی آر مستقیم با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 و پی‌سی آر دو مرحله‌ای با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2 مثبت بود و باند مورد انتظار به ترتیب ۱۸۰۰ و ۱۲۰۰ جفت بازی تکثیر شد. محصول پی‌سی آر مستقیم جدایه‌های بیدزرد و استهبان همسانه‌سازی و تعیین ترادف شد و تحت رس شماره‌های JX445141 و JX445142 در بانک جهانی ترادف‌ها ثبت گردید. جستجو با برنامه بلاست نشان داد که فیتوپلاسم‌های عامل جاروک GF-677 در بیدزرد و استهبان، متعلق به گروه ار ان ای ریسوزومی جاروک نخود کبوتر (Pigeon pea witches'-broom, 16SrIX) می‌باشند. مقایسه چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) محصول پی‌سی آر مستقیم فیتوپلاسم‌های جاروک GF-677 نشان داد که جدایه‌های بیدزرد و استهبان، با یکدیگر و همچنین با فیتوپلاسم‌های عامل جاروک بادام نیریز یکسان می‌باشند. با استفاده از RFLP مجازی مشخص گردید که جدایه‌های جاروک GF-677 و فیتوپلاسم‌های عامل جاروک بادام نیریز، متعلق به زیرگروه 16SrIX-B می‌باشند و با فیتوپلاسم‌های عامل جاروک بادام خضر تفاوت دارند. جدایه‌های بیدزرد و استهبان و فیتوپلاسم‌های عامل جاروک بادام خضر از نظر علائم بیماری در بادام تلخ و پروانش نیز قابل تشخیص بودند. تعلق جدایه‌های جاروک GF-677 از بیدزرد و استهبان به گروه 16SrIX و نزدیکی آنها به زیرگروه 16SrIX-B در آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از ترادف‌های کامل ژن 16S rRNA و ناحیه SR نیز به اثبات رسید.

کلیدواژه: جاروک نخود کبوتر، جاروک بادام، چند شکلی طولی قطعات برشی، آنالیز فیلوژنتیکی، پایه GF-677

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه‌شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: salehi_abarkoochi@yahoo.com

۱ - به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز

۲- دانشیار پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

Biological and molecular characterization of phytoplasmas associated with GF-677 witches'-broom in Iran*

F. HAGHSHENAS¹, M. SALEHI^{2**} and S. GHASEMI¹

(Received: 14.8.2013; Accepted: 28.4.2015)

Abstract

GF-677 (*prunus amygdalus* × *prunus persica*) is one of the most suitable rootstocks for almond and peach trees. GF-677 cuttings were imported from Europe and planted in Bidzard and Estahban areas (Fars province) for further propagation and distribution to other Iranian stone fruit growing areas. During 2009 and 2010 surveys of GF-677 trees, witches'-broom disease (GFWB) was observed in both Bidzard and Estahban regions. The disease agents of GFWB from Bidzard (BGFWB) and Estahban (EGFWB) were transmitted from GF-677 to GF-677, bitter almond and peach seedlings by grafting and from experimentally inoculated bitter almond to seed-grown eggplant and periwinkle plants via dodder inoculation, causing phytoplasma-type symptoms. Total DNA extracted from naturally affected GF-677 trees in Bidzard and Estahban and experimentally inoculated plants reacted positively in direct PCR using P1/P7 and nested-PCR using P1/P7 (first round) and R16F2n/R16R2 (second round) primer pairs. On the basis of disease symptoms, positive reaction in PCR, transmission by dodder and grafting, BGFWB and EGFWB have phytoplasmal etiology. Blast searching showed that BGFWB and EGFWB phytoplasmas belong to the pigeon pea witches'-broom (16SrIX) group. Using *AluI*, *HpaII* and *HaeIII* enzymes, RFLP patterns of BGFWB and EGFWB phytoplasmas were indistinguishable from each other and those of Neyriz (Fars, Iran) almond Witches'-broom (NAWB) phytoplasma. P1/P7 PCR amplicon sequences of BGFWB and EGFWB isolates were submitted to the GenBank database under the accession numbers JX445141 and JX445142, respectively. Virtual RFLP using 17 enzymes showed that BGFWB and EGFWB isolates are indistinguishable from NAWB phytoplasma (representative of 16SrIX-B subgroup) but different from Khafr (Fars, Iran) almond witches'-broom (KAWB) phytoplasma which is classified with 16SrIX-C subgroup phytoplasmas. Phylogenetic analysis and homology percent, confirmed that among 16SrIX subgroups, BGFWB and EGFWB phytoplasmas were more similar to subgroup B of 16SrIX group than other subgroups.

Keywords: Pigeon pea witches'-broom, Almond witches'-broom, RFLP, Phylogenetic analyses, GF-677

* Part of MSc. Thesis of The First Author Submitted to Islamic Azad University, Shiraz Branch, Shiraz, Iran.

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

1. Respectively, Former MSc. Student and Assist. prof. of Plant Pathology. College of Agriculture, Islamic Azad Univ., Shiraz Branch, Shiraz, Iran.

2. Res. Assoc. Prof. of Plant Pathology, Agricultural and Natural Resources Research Center of Fars, Zarghan, Iran.

مقدمه

بافت و کرمان (استان کرمان) نیز گزارش شده است (Salehi et al. 2006; Pourali et al. 2012). جاروک بادام به عنوان یک بیماری بسیار مهم و اقتصادی، از کشور لبنان نیز گزارش شده است (Choueiri et al. 2001, Abou-Verdin et al. 2002, Jawdah et al. 2002). وردین و همکاران (2003) براساس ویژگی‌های مختلف نام *Candidatus Phytoplasma phoenicium* را برای فیتوپلاسمای همراه جاروک بادام در ایران و لبنان انتخاب کردند.

با توجه به اهمیت هسته‌دارها، اهمیت پایه GF-677 در تولید این درختان، تولید نهال سالم و نهایتاً پیشگیری از انتقال فیتوپلاسمای عامل جاروک GF-677 به گیاهان پیوندی و گسترش در مناطق میوه کاری، تعیین ویژگی‌های فیتوپلاسمای همراه با این بیماری از نظر مطالعات همه‌گیرشناسی و در نتیجه پیشگیری بیماری، ضرورت دارد و در همین راستا پژوهش‌هایی در زمینه ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی عامل جاروک GF-677 و گروهبندی آن در بین سایر فیتوپلاسمای انجام شد. گزارش حاضر نتیجه این پژوهش‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌های بررسی

منبع عامل بیماری

طی بازدید از درختان GF-677 در مناطق بیدزرد و استهبان در استان فارس از درختان دارای علائم جاروک شاخه‌هایی با علائم بارز بیماری تهیه و در کیسه پلاستیکی و روی یخ به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس انتقال داده شد. از این نمونه‌ها در مطالعات مربوط به انتقال بیماری و آزمون PCR استفاده گردید.

گیاهان آزمون

گیاهان مورد استفاده شامل بادام تلخ، هلو، GF-677،

همسانه GF-677 (هیبرید هلو × بادام) در اواسط دهه ۱۹۴۰ بصورت تصادفی در فرانسه و در مناطقی که دارای خاک‌های آهکی بودند شناخته شد و در دهه ۱۹۵۰ پس از بررسی‌ها و مطالعات گسترده توسط برنارد و گراسلی در مؤسسه ملی تحقیقات زراعی گزینش شد (2012 Sepahvand et al.). با پیشرفت روش‌های ازدیاد ریشی در فرانسه، این پایه به عنوان یک پایه مهم برای هلو و بادام مورد توجه قرار گرفت (Kester 1970). پایه GF-677 در سال‌های اخیر از اروپا وارد ایران شده و در نقاطی از استان فارس شامل بیدزرد، استهبان و نی‌ریز کشت شده است تا از طریق تکثیر با قلمه در اختیار تولید کنندگان نهال در استان فارس و سایر نقاط ایران قرار داده شود. طی بازدیدهای سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ از درختان GF-677 در بیدزرد و استهبان، علائمی شبیه به علائم بیماری‌های فیتوپلاسمایی شامل ریزبرگی، زردی، ظهور جاروک در قسمت‌های تاج و طوقه، کوتولگی و سرخشکیدگی در آنها مشاهده گردید.

در درختان میوه هسته‌دار بیماری‌های بسیار مهم و اقتصادی به وسیله فیتوپلاسمایی از گروه‌های مختلف شامل زردی اروپایی درختان میوه هسته‌دار، بیماری ایکس، زردی هلو، درزه قرمز هلو، رزت هلو، بیماری مولیر، ناهنجاری شکوفه گیلان، زالی گیلان (Kirkpatrick et al. 1995) و جاروک بادام از سراسر دنیا گزارش شده است. بیماری جاروک بادام برای اولین بار در جهان در سال ۱۳۷۴ از ایران در مناطق خفر و میمند در استان فارس گزارش گردید (Salehi et al. 1995). این بیماری علاوه بر استان فارس در مناطق دیگری از ایران از جمله شهرکرد (استان چهارمحال و بختیاری)، شهرضا (استان اصفهان)،

گلخانه عاری از حشرات، برای مشاهده علائم بیماری تحت نظر قرار گرفتند. با همین روش پنج بوته بادنجان سالم از طریق سس با عامل جاروک GF-677 مایه‌زنی شدند. برای مقایسه با استفاده از سس به طور همزمان اقدام به انتقال فیتوپلاسمای عامل جاروک بادم خفر از یک بوته پروانش آلوده در گلخانه به پنج بوته سالم پروانش گردید.

استخراج دی ان ای کل و انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

از ۰/۲ گرم رگبرگ میانی برگ‌های درختان GF-677 دارای علائم جاروک و گیاهان مایه‌زنی‌شده با پیوند و سس، به روش ژانگ و همکاران (Zhang et al. 1998) دی ان ای کل استخراج گردید. از رگبرگ میانی گیاهان سالم بادم تلخ، هلو و پروانش به عنوان شاهد منفی و از رگبرگ میانی پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش به عنوان شاهد مثبت، دی ان ای کل استخراج گردید. در آزمون پی سی آر مستقیم از جفت آغازگر P1/P7 (Schneider et al. 1995) و در آزمون پی سی آر دو مرحله‌ای از جفت آغازگرهای P1/P7 (دور اول) و R16F2n/R16R2 (Gundersen & Lee 1996) (دور دوم) استفاده گردید. جفت آغازگر P1/P7 و R16F2n/R16R2 به ترتیب قطعاتی با اندازه تقریبی ۱۸۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز از اپرون ار ان ای ریبوزومی را تکثیر می‌کنند. در آزمون PCR، از مواد ساخته‌شده توسط شرکت سیناژن (ایران) استفاده گردید. PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل ۵۰ نانوگرم دی ان ای الگو، مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت نهایی ۰/۲ میکرومولار، آغازگرها با غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار، یک و نیم میکرولیتر بافر PCR، کلرید منیزیم با غلظت نهایی یک و نیم میلی مولار، آنزیم پلیمرز تک

پروانش و بادنجان، در یک گلخانه عاری از حشرات واقع در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، از طریق بذر تکثیر شدند تا از آنها در آزمایش‌های مایه‌زنی با پیوند و سس استفاده شود.

انتقال با پیوند

از سرشاخه‌های تازه و دارای علائم بارز بیماری در درختان GF-677، به عنوان پیوندک استفاده شد. این سرشاخه‌ها به روش جانبی روی نهال‌های یکساله بادم تلخ، هلو و GF-677 پیوند شدند. با این روش، پنج نهال از هر گیاه با سه پیوندک آلوده، مایه‌زنی شدند. پس از بستن محل پیوند با پارافیلیم، به منظور ایجاد شرایط مطلوب جهت گرفتن پیوند، ناحیه پیوندشده برای دو هفته به وسیله یک کیسه پلاستیکی شفاف پوشانده شد. گیاهان پیوند خورده برای مشاهده علائم بیماری به مدت یک سال، در یک گلخانه عاری از حشرات تحت نظر قرار گرفتند. یک ماه بعد از مایه‌زنی با پیوند و اطمینان از گرفتن پیوندک‌ها، گیاهان مایه‌زنی‌شده هفته‌ای یک بار از نظر ظهور و گسترش علائم بیماری بررسی شدند.

مایه‌زنی پروانش و بادنجان با عامل جاروک GF-677

بذر سس در یک گلدان کشت و گیاهچه‌های حاصل بر روی ۱۰ بوته پروانش سالم مستقر گردیدند. پس از استقرار سس، پنج بوته پروانش در کنار یک نهال بادم تلخ آلوده به جدایه بیدزرد و پنج بوته دیگر در کنار یک نهال بادم تلخ آلوده به جدایه استهبان قرار گرفتند تا سس سالم از روی بوته‌های پروانش به نهال بادم تلخ آلوده متصل شود. حدود یک ماه بعد و پس از اطمینان از استقرار سس روی بادم تلخ، بوته‌های پروانش عاری از سس شده و در

با اتیدیوم بروماید از نقوش حاصل با دستگاه ژل داکيومنت عکسبرداری گردید. نقوش بدست آمده با یکدیگر و با نقوش حاصل از برش سایر فیتوپلاسماها با همین آنزیم‌ها مقایسه گردید.

همسانه‌سازی، تعیین ترادف و تجزیه و تحلیل ترادف‌ها

محصول پی سی آر مستقیم با جفت آغازگر P1/P7 (۱۸۰۰ جفت باز از اپرون ار ان ای ریبوزومی) با استفاده از کیت InsT/A clone PCR product Cloning Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania) و دستورالعمل این شرکت در پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی و به جدایه DH5a باکتری *Escherichia coli* منتقل شد. پس از رشد باکتری حامل همسانه، پلاسمید نو ترکیب جدا و خالص‌سازی شد و برای تعیین ترادف به شرکت Bioneer در کشور کره ارسال گردید. ترادف‌های بدست آمده با استفاده از برنامه BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)، با ترادف‌های موجود در بانک جهانی ترادف‌ها (GenBank) مقایسه و نزدیکترین ترادف با عامل جاروک GF-677 در بیدزرد و استهبان جستجو شد. با استفاده از نرم افزار DNAMAN ترادف کامل ژن ار ان ای ریبوزومی 16S و ناحیه بین ژنی (SR) جدایه‌های بیدزرد و استهبان با ترادف‌های فیتوپلاسمایی انتخابی (جدول‌های ۱ و ۲) موجود در بانک جهانی ترادف‌ها مقایسه گردید. با انجام هم‌ردیف‌سازی چندگانه میزان تشابه نوکلئوتیدی مشخص و درخت فیلوژنتیکی مربوطه رسم گردید. در این آنالیزها ترادف مشابه در *Acholeplasma laidlawii* به عنوان Outgroup منظور گردید.

(ساخت شرکت سیناژن، ایران) به مقدار دو و نیم واحد و آب دو بار تقطیرشده استریل تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. لوله‌های محتوی مخلوط واکنش برای ۳۵ چرخه PCR در دستگاه ترموسایکلر (Biorad) قرار داده شدند. چرخه دمایی PCR عبارت بود از یک چرخه در دمای ۹۴°C به مدت دو دقیقه برای واسرشتگی اولیه و ۳۵ چرخه که هر یک شامل یک دقیقه در دمای ۹۴°C، دو دقیقه در دمای ۵۵°C و سه دقیقه در دمای ۷۲°C بود. تکمیل ساخت دی ان ای و بسط قطعه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. در آزمون پی سی آر دو مرحله‌ای، ابتدا محصول پی سی آر مستقیم با استفاده از آب دو بار تقطیر سترون به نسبت یک به ۳۰ رقیق شد و از آن به عنوان دی ان ای الگو استفاده گردید. سی و پنج چرخه دمایی آزمون دو مرحله‌ای PCR شامل ۹۴°C به مدت یک دقیقه (دو دقیقه در ۹۴°C برای واسرشته کردن اولیه)، ۵۵°C به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۱۵۰ ثانیه و در آخر ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بود. محصول PCR در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت از باندهای حاصل عکسبرداری شد.

آزمون چند شکلی طول قطعات برشی (RFLP)

آزمون RFLP به روش لی و همکاران (Lee et al. 1998) انجام شد. برای این منظور ۸ میکرولیتر از محصول PCR مستقیم با جفت آغازگر P1/P7 از هر نمونه، براساس دستورالعمل شرکت سازنده (Fermentas, Vilnius, Lithuania)، بطور جداگانه با آنزیم‌های *HaeIII*، *AluI* و *HpaII* هضم گردید. سپس محصول هضم آنزیمی در ژل آگاروز دو درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی ژل

جدول ۱. رس شمارهای فیتوپلاسم‌های مورد استفاده در ترسیم درخت فیلوژنتیکی و میزان شباهت نوکلئوتیدی

Table 1. Accession numbers of phytoplasmas used in phylogenetic tree construction and nucleotide similarity comparison

Phytoplasma	Phytoplasma strain designation	RFLP Group	Accession number
CPh	Clover phyllody phytoplasma	16SrI	AF222065
Ca. P. aurantifolia	<i>Candidatus</i> Phytoplasma aurantifolia	16SrII	U15442
WXd	Western X-disease	16SrIII	L04682
LYJ-C8	Coconut lethal yellowing	16SrIV	AF498307
Ca. P. ziziphi	<i>Candidatus</i> Phytoplasma ziziphi	16SrV	AY072722
Ca. P. trifolii	<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifolii	16SrVI	AY390261
Ca. P. fraxini	<i>Candidatus</i> Phytoplasma fraxini	16SrVII	AF092209
LWB	Loofah witches'- broom	16SrVIII	L33764
PPWB	Pigeon pea witches'- broom	16SrIX-A	AF248957
Ca. P. phoenicium	<i>Candidatus</i> Phytoplasma phoenicium	16SrIX-D	AF515636
		16SrIX-B	AF515637
Ca. P. mali	<i>Candidatus</i> Phytoplasma mali	16SrX	AJ542541
Ca. P. oryzae	<i>Candidatus</i> Phytoplasma oryzae	16SrXI	AJ542541
Ca. P. australiense	<i>Candidatus</i> Phytoplasma australiense	16SrXII	L76865
MPV	Mexican periwinkle virescence	16SrXIII	AF248960
Ca. P. cynodontis	<i>Candidatus</i> Phytoplasma cynodontis	16SrXIV	AJ550984
Ca. P. brasiliense	<i>Candidatus</i> Phytoplasma brasiliense	16SrXV	AF147708
Ca. P. graminis	<i>Candidatus</i> Phytoplasma graminis	16SrXVI	AY725228
Ca. P. caricae	<i>Candidatus</i> Phytoplasma caricae	16SrXVII	AY725234
Ca. P. americanum	<i>Candidatus</i> Phytoplasma americanum	16SrXVIII	DQ174122
Ca. P. omanense	<i>Candidatus</i> Phytoplasma omanense	16SrXIX	EF666051
Ca. P. pini	<i>Candidatus</i> Phytoplasma pini	16SrXXI	AJ310849
BGFWB	Bidzard GF-677 witches'-broom phytoplasma	16SrIX	JX445141
EGFWB	Estahban GF-677 witches'-broom phytoplasma	16SrIX	JX445142

نتایج

علائم بیماری جاروک GF-677

علائم بارز بیماری جاروک GF-677 در مناطق بیدزرد و استهبان عبارت بودند از: ریزبرگی، زردی، کاهش فاصله میانگره‌ها و تشکیل جاروک در سر شاخه‌ها (شکل ۱A)، رشد تعداد زیادی شاخه‌های باریک و عمودی همراه با برگ‌های ریز، باریک، زردرنگ با حاشیه قرمز و افزایش فاصله میانگره در محل طوقه (شکل ۱B)، کوتولگی (شکل ۱A) و سرخشیدگی.

انتقال فیتوپلاسمی همراه با جاروک GF-677

نهال‌های سالم بادام تلخ، هلو و GF-677 با روش پیوند

چند شکلی طولی قطعات برشی مجازی (Virtual

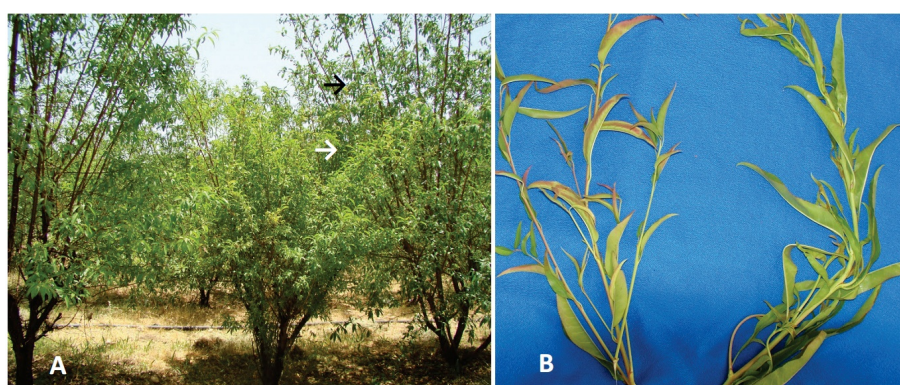
(RFLP

با استفاده از برنامه iPhyClassifier (Zhao et al. 2009) (<http://www.Usda.gov>), ناحیه تکثیرشده با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 در جدایه‌های بیدزرد و استهبان و فیتوپلاسم‌های مربوط به زیرگروه‌های گروه 16SrIX (جدول ۲)، با ۱۷ آنزیم شامل: *AluI*, *HhaI*, *HaeIII*, *EcoRI*, *DraI*, *BstUI*, *BfaI*, *BamHI*, *RsaI*, *MseI*, *Sau3AI*, *KpnI*, *HpaII*, *HpaI*, *HinfI*, *TaqI*, *SspI* برش داده شد و نقوش حاصل با یکدیگر مقایسه شدند.

جدول ۲: رس شمارهای فیتوپلاسم‌های زیرگروه‌های گروه 16SrIX مورد استفاده در ترسیم درخت فیلوژنتیکی و میزان شباهت نوکلئوتیدی

Table 2: Accession number of 16SrIX subgroup phytoplasmas used in phylogenetic tree construction and nucleotide similarity comparison

Phytoplasma	Phytoplasma strain designation	RFLP Group	Accession number
PPWB	Pigeon pea witches'- broom	16SrIX-A	AF248957
Ca. P. phoenicium	<i>Candidatus</i> Phytoplasma phoenicium	16SrIX-D	AF515636
		16SrIX-B	AF515637
KhAWB	Khafr(Iran) Almond witches'- broom	16SrIX-C	DQ195209
AWB	Almond witches'- broom	16SrIX-D	AF455039
JOWB	Juniperus occidentalis witches'- broom	16SrIX-E	GQ925918
BGFWB	Bidzard GF-677witches'-broom phytoplasma	16SrIX	JX445141
EGFWB	Estahban GF-677witches'-broom phytoplasma	16SrIX	JX445142
CPh	Clover phyllody phytoplasma	16SrI	AF222065
<i>A.laidlawii</i>	<i>Acholeplasma laidlawii</i>		M23932

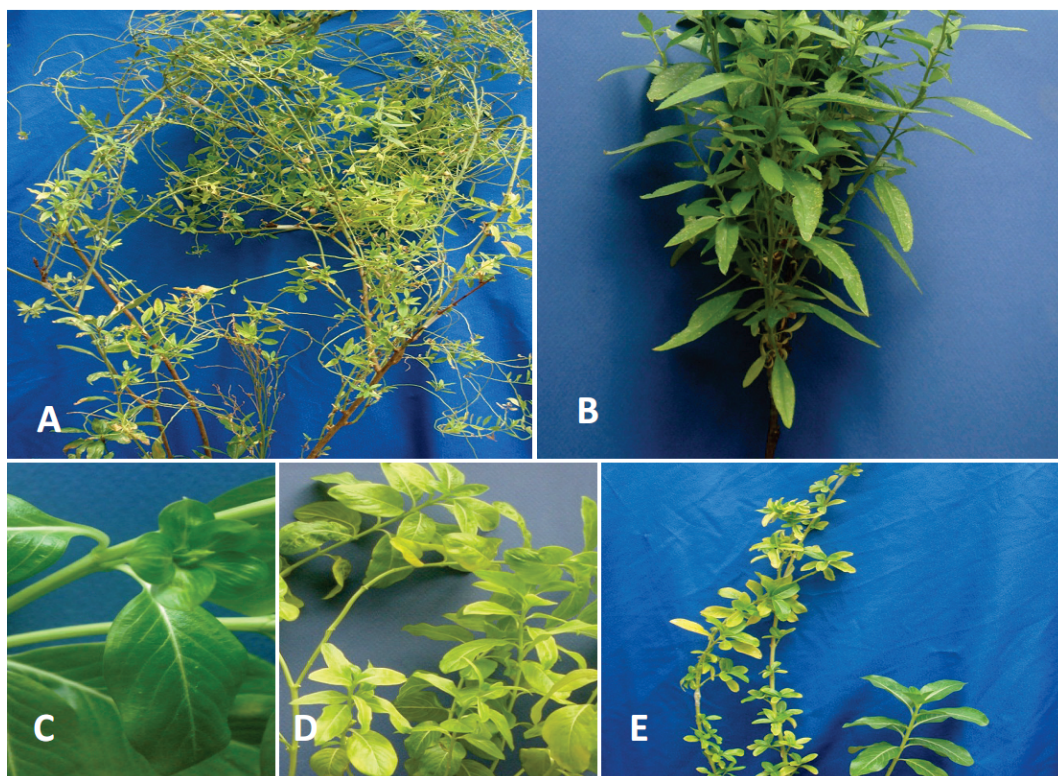


شکل ۱. علائم بیماری جاروک GF-677. A: ریزبرگی، زردی، کاهش فاصله میانگره و جاروک (پیکان سفید) و کوتولگی در یک درخت GF-677 (وسط) در بیدزرد فارس در مقایسه با درختان سالم GF-677 (راست و چپ) با سر شاخه های عادی (پیکان سیاه). B: یک سرشاخه (سمت چپ) با برگ‌های ریز، باریک، زردرنگ با حاشیه قرمز و افزایش فاصله میانگره در محل طوقه یک درخت دارای علائم جاروک در استهبان در مقایسه با یک سر شاخه سالم (سمت راست).

Figure 1. Symptoms of GF-677 witches'-broom. A, Little leaf, yellowing, internode shortening, witches'- broom (white arrow) and stunting in an affected GF-677 tree (middle) in Bidzard of Fars, compared with healthy GF-677 trees (right and left) with normal shoots (black arrow), B: a shoot with small, narrow and yellow (red at margins) leaves and elongated internode located on crown of a witches'- broom affected GF-677 tree in Estahban (left) compared with a healthy shoot (right).

تلخ متغیر بود. علائم حاصل از مایه‌زنی با جدایه‌های بیدزرد و استهبان در بادام، هلو و GF-677 تقریباً یکسان بود. یکی از علائم بارز بیماری ناشی از انتقال جدایه‌های جاروک GF-677 در بیدزرد و استهبان بر روی هلو، ظهور جاروک در محل طوقه بود. جدایه‌های جاروک GF-677 در بیدزرد و استهبان از طریق سس از نهال‌های بادام تلخ آلوده‌شده بوسیله پیوند، به گیاهان پروانش و بادنجان منتقل

جانبی با فیتوپلاسمای عامل جاروک GF-677 مایه‌زنی شدند. عامل بیماری از درختان GF-677 در بیدزرد و استهبان، به تمامی نهال‌های سالم بادام تلخ، هلو و GF-677 منتقل گردید و در آنها علائمی شبیه به علائم بیماری‌های فیتوپلاسمایی شامل: ریزبرگی، زردی، کاهش فاصله میانگره‌ها، جاروک و کوتولگی ظاهر شد (شکل ۲A,B). دوره نهفتگی بیماری از شش ماه در هلو تا ۱۳ ماه در بادام

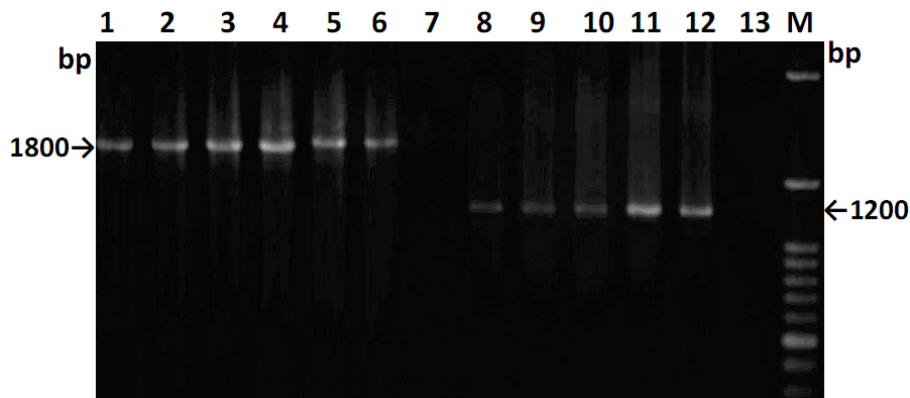


شکل ۲. علائم بیماری در گیاهان مایه‌زنی شده با عامل جاروک GF-677 از طریق پیوند (A و B) و سس (C و D) و پروانش مایه زنی شده با عامل جاروک بادام خفر (E). A: ریزبرگی شدید، کاهش فاصله میانگره، جاروک و زردی در نهال بادام تلخ، B: ریزبرگی، کاهش فاصله میانگره و جاروک در هلو، C: گل سبزی و D: زردی، ریزبرگی و کاهش فاصله میانگره در پروانش، E: علائم ناشی از انتقال عامل جاروک بادام خفر به پروانش از طریق سس شامل زردی، ریزبرگی شدید و کاهش فاصله میانگره (سمت چپ) در مقایسه با پروانش سالم (سمت راست).

Figure 2. Disease symptoms in test plants inoculated with agent of GF-677 witches'- broom via graft (A and B) and dodder (C and D) and periwinkle plant dodder inoculated with Khafr almond witches'- broom agent (E). A: Severe little leaf, yellowing and internode shortening and witches'- broom in bitter almond seedling, B: Little leaf, internode shortening and witches'- broom in peach seedling, C: Virescence and D: yellowing, reduction of leaf size and internode shortening in periwinkle, E: Yellowing, severe little leaf and internode shortening in a periwinkle plant inoculated with Khafr almond witches'- broom phytoplasma (left) as compared with healthy periwinkle (right).

کوتولگی (شکل C, D). عکس العمل بوته‌های بادنجان مایه‌زنی شده با جدایه‌های جاروک GF-677 بیدزرد و استهبان، به صورت زردی، کاهش اندازه برگ و فاصله میانگره، ریزش گل و کوتولگی بود. فیتوپلاسمی عامل جاروک بادام خفر به وسیله سس از پروانش به پروانش منتقل شد و در چهار بوته از پنج بوته پروانش مایه‌زنی شده علائم بیماری به صورت ریزبرگی و زردی شدید، کاهش

شدند. عامل جاروک GF-677 در بیدزرد به چهار بوته از پنج بوته پروانش مایه‌زنی شده و دو بوته از پنج بوته بادنجان مایه‌زنی شده انتقال داده شد. تعداد بوته‌های پروانش و بادنجان آلوده شده توسط عامل جاروک GF-677 در استهبان به ترتیب پنج از پنج و یک از پنج بود. علائم ناشی از انتقال بیماری در پروانش عبارت بودند از: زردی، کاهش اندازه برگ و فاصله میانگره، گل سبزی، برگسانی و



شکل ۳. الکتروفورز محصول پی سی آر مستقیم (راهک‌های ۱-۷) با استفاده از جفت آغازگر P1/P7 و پی سی آر دومرحله‌ای (راهک‌های ۸-۱۳) با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2: راهک‌های ۱-۵، به ترتیب نمونه‌های بادام تلخ، GF-677، هلو، پروانش و بادنجان مایه‌زنی شده با عامل جاروک GF-677؛ راهک‌های ۶ و ۷، به ترتیب پروانش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش (کنترل مثبت) و بادام تلخ سالم (کنترل منفی)؛ راهک‌های ۸-۱۱، به ترتیب نمونه‌های بادام تلخ، هلو، GF-677 و بادنجان مایه زنی شده با عامل جاروک GF-677؛ راهک ۱۲، GF-677 دارای علائم از استهبان؛ راهک ۱۳، بادام تلخ سالم (کنترل منفی) و راهک M، مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

Figure 3. Electrophoresis pattern of direct PCR products (Lanes 1-7) using primer pair P1/P7 and nested PCR products (Lanes 8-13) using P1/P7 and R16F2n/R16R2 primer pairs: Lanes 1-5, bitter almond, GF-677, peach, periwinkle and eggplant plants inoculated with agent of GF-677 witches'-broom, respectively; Lanes 6 and 7, periwinkle infected with witches'-broom disease of lime phytoplasma (positive control), and healthy bitter almond (negative control), respectively; Lanes 8-11, bitter almond, peach, GF-677, and eggplant inoculated with agent of GF-677 witches'-broom, respectively; Lane 12, naturally witches'-broom affected GF-677 plant from Estahban and Lane M, 100bp DNA marker.

در آزمون پی سی آر دومرحله‌ای با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 باند ۱۲۰۰ جفت بازی در نمونه‌های تمامی درختان GF-677 دارای علائم از بیدزرد و استهبان، تمامی نهال‌های هسته‌دار مایه‌زنی شده با پیوند و دارای علائم، پروانش‌ها و بادنجان‌های علائم‌دار و مایه‌زنی شده با سس و دو بوته بادنجان مایه‌زنی شده با سس ولی فاقد علائم بیماری و شاهد مثبت، تکثیر شد. تحت همین شرایط در آزمون‌های PCR مستقیم و دو مرحله‌ای در نمونه‌های شاهد منفی بانندی مشاهده نگردید.

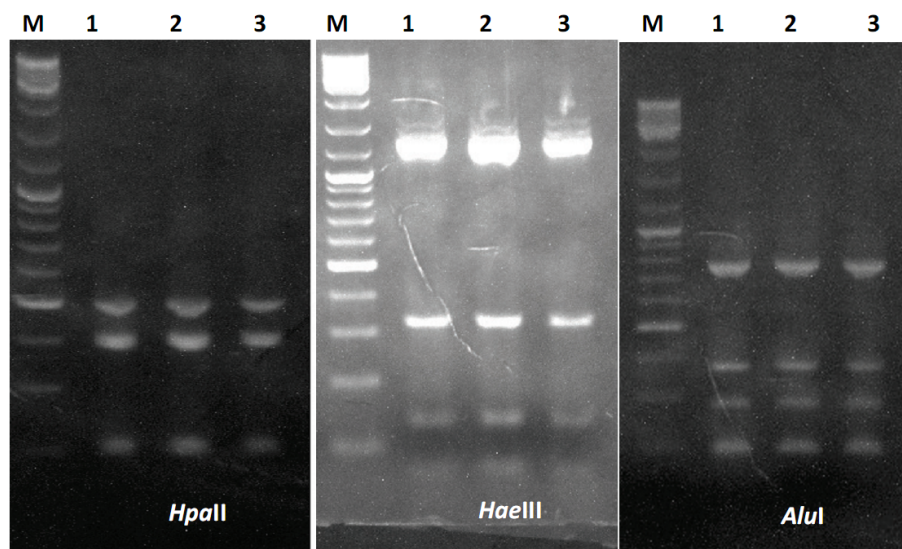
آزمون چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP)

در آزمون RFLP، محصول پی سی آر مستقیم با آنزیم‌های *HpaII*، *AluI* و *HaeIII* هضم شد. نقوش

فاصله میانگره و کوتولگی ظاهرشد (شکل ۲E). در پروانش‌های مایه‌زنی شده با فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام خفر گل سبزی مشاهده نگردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

در آزمون‌های پی سی آر مستقیم و دومرحله‌ای، آلودگی به فیتوپلاسمای در ۲۰ نمونه دی ان ای کل از درختان دارای علائم در بیدزرد و استهبان و تمامی گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط گلخانه، بررسی شد (شکل ۳). در پی سی آر مستقیم با جفت آغازگر P1/P7 در نمونه‌های هفت درخت GF-677 (چهار درخت از بیدزرد و سه درخت از استهبان)، تمامی پروانش‌ها و بادنجان‌های مایه‌زنی شده و علائم‌دار و شاهد مثبت، قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی تکثیر شد.



شکل ۴: نقش الکتروفورز هضم آنزیمی محصول PCR (۱۸۰۰ جفت باز) با جفت آغازگر P1/P7 با آنزیم‌های *HpaII*، *HaeIII* و *AluI* در ژل آگاروز دو درصد: راهک های ۱، ۲، به ترتیب فیتوپلاسم‌های عامل جاروک GF-677 در استهبان و بیدزرد؛ راهک ۳، فیتوپلاسمی جاروک بادام نیریز و راهک M، مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

Figure 4. Electrophoresis pattern of P1/P7 primed PCR products (1800 bp) digested with *AluI*, *HpaII* and *HaeIII* enzymes in 2% agarose gel: Lanes 1 and 2, phytoplasmas associated with Bidzard and Estahban GF-677 witches'- broom, respectively; Lane 3, a phytoplasma associated with Neyriz almond witches'- broom and Lane M, 100bp DNA ladder.

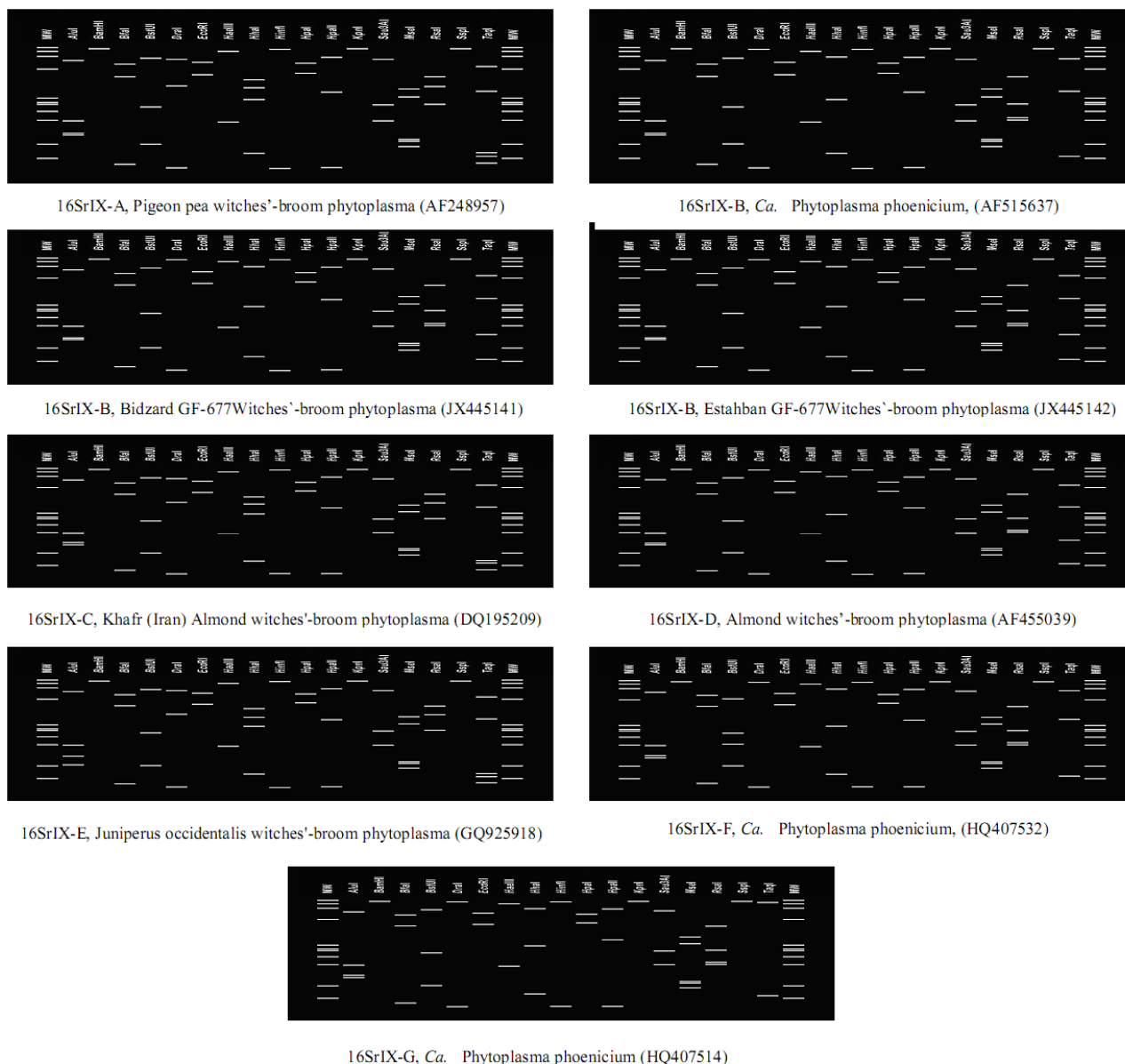
جاروک بادام خفر در چهار آنزیم *RsaI*، *HhaI*، *DraI* و *TaqI* متفاوتند (شکل ۵). همین آنالیز نشان داد که نقوش حاصل از RFLP مجازی جاروک بادام خفر در ایران با نقوش حاصل در فیتوپلاسمی عامل (16SrIX-C) *Picris* *echioides* yellows phytoplasma یکسان می‌باشند و با نمونه جاروک بادام نیریز (16SrIX-B) یکسان نمی‌باشد.

تعیین ترادف و آنالیز فیلوژنتیکی

قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی از اپرون از ان ای ریبوزومی جدایه‌های بیدزرد و استهبان پس از همسانه‌سازی و تعیین ترادف، به ترتیب تحت رس شماره‌های (Accession numbers)، JX445141 و JX445142 در بانک جهانی ترادف‌ها ثبت شد. جستجو با برنامه بلاست با استفاده از قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی، ضمن تایید فیتوپلاسمی بودن

الکتروفورزی حاصل از آزمون RFLP در جدایه‌های فیتوپلاسم‌های همراه با جاروک GF-677 بیدزرد و استهبان با یکدیگر و با فیتوپلاسمی همراه جاروک بادام نیریز (16SrIX-B) از لحاظ تعداد باند و موقعیت باندها، یکسان بودند (شکل ۴).

مقایسه نقوش حاصل از RFLP مجازی براساس ۱۲۰۰ جفت باز از ژن ار ان ای ریبوزومی 16S (ناحیه تکثیرشده توسط جفت آغازگر R16F2n/R16R2) نمونه‌های بیدزرد و استهبان و زیرگروه‌های انتخابی گروه 16SrIX شامل زیرگروه‌های A, B, C, D, E, F, G نشان داد که جدایه‌های بیدزرد و استهبان با یکدیگر و با فیتوپلاسمی عامل جاروک نیریز (*Ca. P. phoenicium*) یعنی زیر گروه 16SrIX-B یکسان می‌باشند و با فیتوپلاسمی همراه با

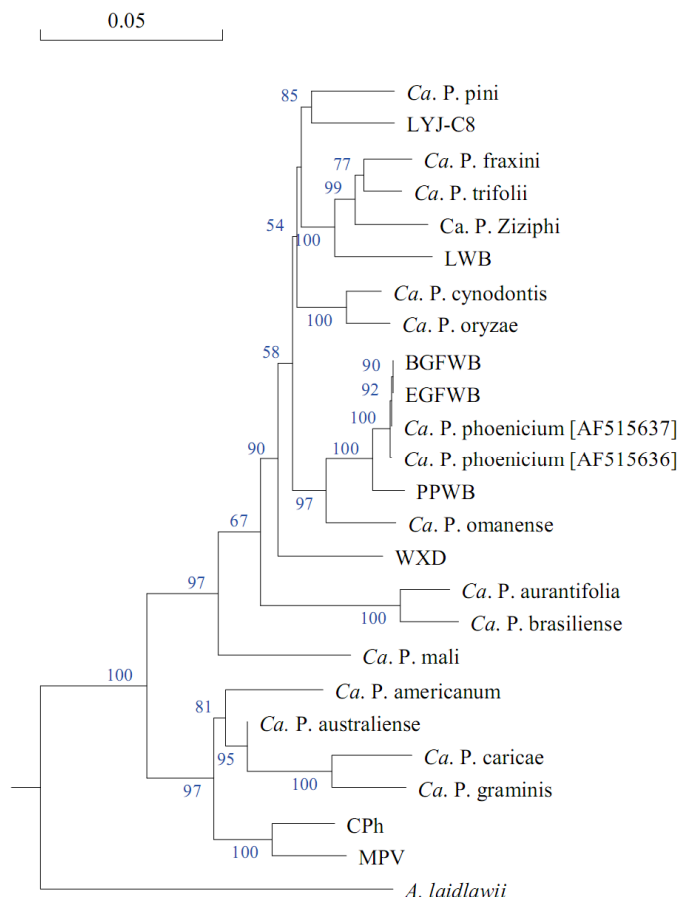


شکل ۵. نقوش حاصل از RFLP کامپیوتری بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ۱۲۰۰ جفت باز از ژن ار ان ای ریپوزومی 16S فیتوپلاسمهای همراه با جاروک GF-677 بیدزرد و استهبان و هفت زیرگروه 16SrIX با استفاده از آنزیم‌های: *AluI*, *BamHI*, *BclI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*.

Figure 5. Virtual RFLP patterns obtained by digestion of 1200 bp nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene of phytoplasmas associated with Bidzrd and Estahban GF-677 witches'- broom and seven subgroups of 16SrIX group using *AluI*, *BamHI*, *BclI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI* enzymes.

نزدیکی را با فیتوپلاسمهای گروه (PPWB, 16SrIX)، جاروک GF-677 در بیدزرد و استهبان، نشان داد که ترادف‌های مورد مطالعه در این تحقیق در میان فیتوپلاسمهای موجود در بانک جهانی ترادف‌ها، بیشترین

کامل ژن ار ان ای ریپوزومی 16S جدایه‌های بیدزرد و Pigeon pea witches'-broom دارند. با استفاده از ترادف

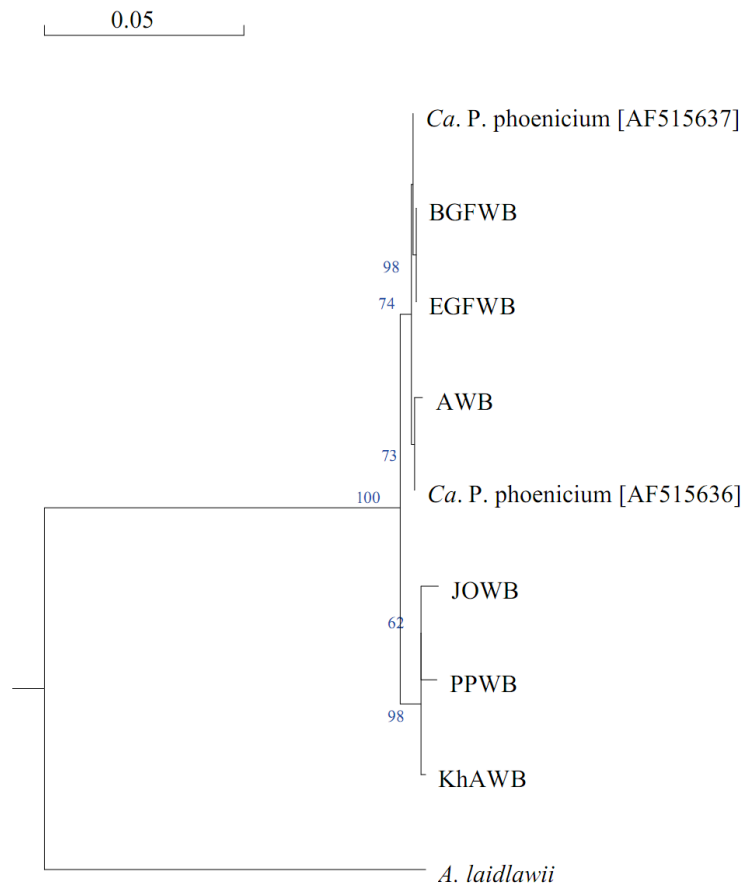


شکل ۶. دندروگرام حاصل از تطابق نوکلئوتیدی ۲۴ فیتوپلاسم و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup با استفاده از گزینه های درخت فیلوژنتیکی و neighbor-joining در نرم افزار DNAMAN بر اساس ترادف نوکلئوتیدی کامل ژن ار ان ای ریبوزومی 16S. اعداد نمایانگر درصد bootstrap می باشند. برای اسامی فیتوپلاسم‌ها و رس شماره‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.

Figure 6. Phylogenetic tree constructed from alignment of 24 phytoplasmas and *Acholeplasma laidlawii* as the outgroup based on complete nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene using phylogenetic and neighbor-joining options of DNAMAN Software. The numbers indicate bootstrap percentage. See Table 1 for phytoplasma names and related accession numbers.

طبقه‌بندی می‌شوند. در بین فیتوپلاسم‌های گروه 16SrIX، فیتوپلاسم‌های همراه با جاروک GF-677 با *Ca. P. Phoenicium*، عامل جاروک بادام رابطه نزدیک‌تری داشتند. در درخت تبارزایی حاصل از مقایسه ناحیه SR، جدایه بیدزد در مقایسه با سایر زیرگروه‌ها، ارتباط نزدیکتری با فیتوپلاسم‌های زیرگروه B داشت ولی جدایه استهبان به فیتوپلاسم‌های زیرگروه D نزدیکتر بود. با استفاده از نرم افزار DNAMAN میزان

استهبان و ترادف‌های مشابه از فیتوپلاسم‌های مختلف (جدول ۱) و همچنین ناحیه میانی ژن‌های ار ان ای ریبوزومی 16S و 23S (Spacer region, SR) این جدایه‌ها و ترادف‌های مشابه در فیتوپلاسم‌های زیرگروه‌های 16SrIX (جدول ۲) درخت تبارزایی ترسیم گردید (شکل‌های ۶ تا ۸). براساس درخت تبارزایی حاصل از مقایسه ترادف ژن ار ان ای ریبوزومی 16S، جدایه‌های بیدزد و استهبان با فیتوپلاسم‌های گروه 16SrIX

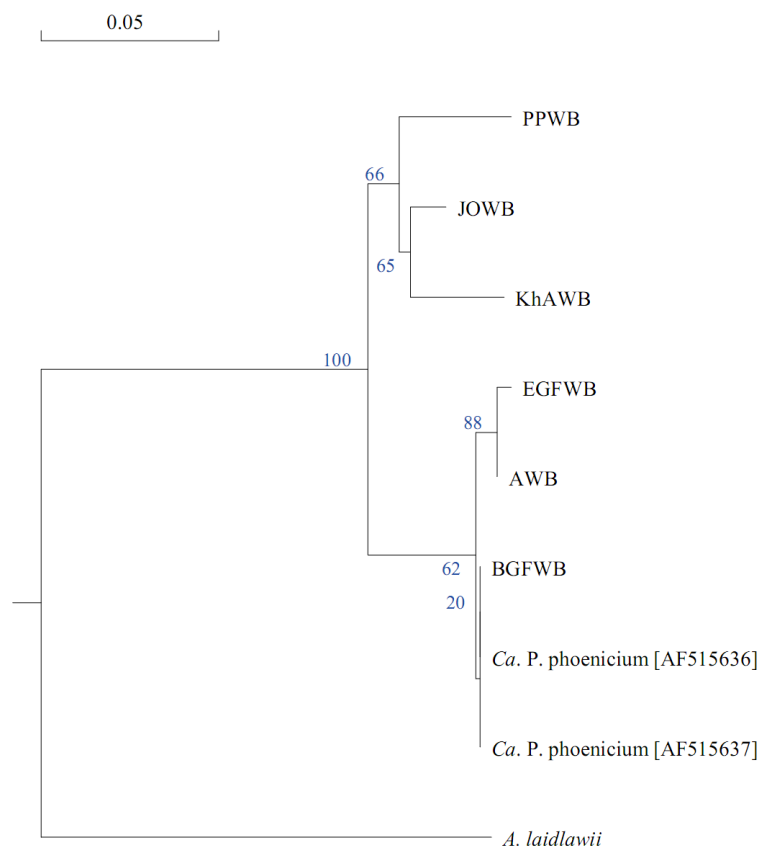


شکل ۷: دندروگرام حاصل از تطابق نوکلئوتیدی هشت فیتوپلاسمای متعلق به زیرگروه‌های گروه 16SrIX و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup با استفاده از گزینه های درخت فیلوژنتیکی و neighbor-joining در نرم‌افزار DNAMAN بر اساس مترادف نوکلئوتیدی کامل ژن ار ان ای ریبوزومی 16S. اعداد نمایانگر درصد bootstrap می باشند. برای اسامی فیتوپلاسمها و رس شمارهها به جدول ۲ رجوع شود

Figure 7: Phylogenetic tree constructed from eight phytoplasmas related to 16SrIX subgroups and *Acholeplasma laidlawii* as the outgroup based on complete nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene using phylogenetic and neighbor-joining options of DNAMAN Software. The numbers indicate bootstrap percentage. See Table 2 for phytoplasma names and related accession numbers.

تشابه جدایه‌های بیدزرد و استهبان، ۱۰۰ درصد بود. بر همین اساس این دو جدایه بیشترین شباهت را با جدایه‌ای از *Candidatus Phytoplasma phoenicium* (Acc. No. از AF515637)، نماینده زیر گروه 16SrIX-B و کمترین شباهت را به ترتیب با *Acholeplasma laidlawii* و Clover phyllody phytoplasma داشتند. کمترین میزان شباهت جدایه‌های بیدزرد و استهبان در میان اعضا گروه

تشابه نوکلئوتیدیهای چند زیرگروه انتخابی از گروه 16SrIX از جمله جدایه‌های بیدزرد و استهبان، فیتوپلاسمای عامل فیلودی شبدر Clover phyllody (phytoplasma) به عنوان یک فیتوپلاسمای خارج از این گروه و *Acholeplasma laidlawii* یک مالیکوت نزدیک به فیتوپلاسمها، محاسبه گردید. براساس مترادف نوکلئوتیدی کامل ژن ار ان ای ریبوزومی 16S، میزان



شکل ۸: دندروگرام حاصل از تطابق نوکلئوتیدی هشت فیتوپلاسمی متعلق به زیرگروه‌های 16SrIX و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup با استفاده از گزینه های درخت فیلوژنتیکی و neighbor-joining در نرم افزار DNAMAN بر اساس مترادف نوکلئوتیدی ناحیه SR. اعداد نمایانگر درصد bootstrap می باشند. برای اسامی فیتوپلاسم‌ها و رس شماره‌ها به جدول ۲ مراجعه شود.

Figure 8: Phylogenetic tree constructed from eight phytoplasmas related to 16SrIX subgroups and *Acholeplasma laidlawii* as outgroup based on nucleotide sequence of SR region using phylogenetic and neighbor-joining options of DNAMAN Software. The numbers indicate bootstrap percentage. See Table 2 for phytoplasma names and related accession numbers.

بود. 16SrIX، با یک فیتوپلاسم از زیرگروه 16SrIX-A به نام

Pigeon pea witches'-broom phytoplasma بود. استفاده

از مترادف ناحیه SR در تعیین میزان تشابه نوکلئوتیدی نشان

داد که میزان تشابه جدایه‌های بیدزرد و استهبان ۹۸/۹

درصد است. میزان تشابه نوکلئوتیدی جدایه‌های بیدزرد و

استهبان با *Candidatus Phytoplasma phoenicium*

(Acc. No. AF515637) به ترتیب ۱۰۰ و ۹۸/۸ درصد

بود. میزان تشابه نوکلئوتیدی ناحیه SR جدایه‌های بیدزرد

و استهبان با جاروک خفر به ترتیب ۹۲/۸ و ۹۲/۴ درصد

بحث

براساس علائم بیماری، انتقال با پیوند و سس و واکنش مثبت در PCR، جاروک GF-677 در ایران ماهیت فیتوپلاسمایی دارد. در مورد وجود بیماری جاروک GF-677 در ایران و ماهیت فیتوپلاسمایی آن پیشتر گزارش‌های کوتاهی منتشر شده است (Salehi et al. 2011, Haghshenas et al. 2012). به دلیل ماهیت فیتوپلاسمایی

بیماری جاروک GF-677، در قلمه‌گیری از درختان GF-677 و یا ازدیاد این گیاه از طریق کشت بافت باید دقت کافی به عمل آید زیرا عامل بیماری از طریق قلمه، یا قسمت‌های دیگر گیاه آلوده به نهال‌های حاصل که به عنوان پایه در تولید نهال‌های هسته‌دارها استفاده می‌شود، قابل انتقال می‌باشد. پایه آلوده به دلیل ضعف در جذب و انتقال آب و املاح به طور مستقیم و به دلیل انتقال فیتوپلاسمای عامل بیماری به گیاهان پیوندی و انتقال بعدی به گیاهان حساس، خسارات جبران ناپذیری را متوجه باغداران می‌کند. براساس نتایج حاصل از انتقال بیماری از طریق پیوند (پژوهش حاضر)، هلو و بادام میزبان‌های عامل جاروک GF-677 می‌باشند. براساس RFLP حقیقی و مجازی، تشابه نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیکی، جدایه‌های جاروک GF-677 متعلق به گروه ار ان ای ریپوزومی جاروک نخود کبوتر (16SrIX) می‌باشند. در ایران پیشتر آلودگی بادام و هلو به فیتوپلاسمایی از گروه 16SrIX به اثبات رسیده است (Salehi et al. 2006) اما در درختان هسته‌دار اروپا تا به حال فیتوپلاسمایی از این گروه گزارش نشده است. بر این اساس فیتوپلاسمای همراه با جاروک GF-677 به احتمال بسیار قوی منشأ ایرانی دارد و قلمه‌های وارداتی از فرانسه به ایران، آلوده به این فیتوپلاسمای نبوده‌اند. نتایج حاصل از آنالیز RFLP حقیقی و مجازی، نشان دادند که جدایه‌های GF-677 در ایران با جدایه جاروک بادام نیریز در ایران یکسان می‌باشند اما با جدایه جاروک بادام خفر متفاوت هستند. علائم ناشی از جدایه‌های بید زرد و استهبان در بادام تلخ و پروانش با علائم ناشی از فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام خفر در

منابع

این گیاهان متفاوت بود که دلیل دیگری بر تفاوت جدایه‌های جاروک GF-677 با فیتوپلاسمای جاروک بادام خفر می‌باشد. احتمالاً بادام‌های آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام نیریز یکی از منابع آلودگی درختان GF-677 می‌باشند. براساس آنالیز RFLP مجازی در این پژوهش و پژوهش‌های دیگر (Verdin et al. 2003, Salehi et al. 2006, Molino Lova et al. 2012)، جدایه جاروک بادام نیریز در ایران (رس شمار: AF515637) متعلق به زیرگروه 16SrIX-B می‌باشد. بنابراین جدایه جاروک GF-677 در ایران نیز متعلق به زیرگروه 16SrIX-B است و با جدایه جاروک بادام خفر (رس شمار: DQ195209) که متعلق به زیرگروه 16SrIX-C می‌باشد (Molino Lova et al. 201)، تفاوت دارد. براساس آنالیزهای ترادف کامل ژن ار ان ای ریپوزومی ۱۶S در جدایه‌های بیدزرد و استهبان تنوع ژنتیکی وجود ندارد و کاملاً یکسان می‌باشند اما میزان تشابه نوکلئوتیدی و آنالیز تبارزایی با استفاده از ترادف ناحیه SR نشان داد که جدایه‌های بیدزرد و استهبان کاملاً یکسان نیستند. پیشتر اهمیت ناحیه SR در تشخیص دقیق‌تر فیتوپلاسمایا به اثبات رسیده است (Kirkpatrick et al. 1994, Smart et al. 1996).

سپاسگزاری

نگارندگان از گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و بخش گیاهپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، کمال تشکر را دارند.

Abou-jawdeh Y., Karakashin A., Sobh H., Martini M. and Lee I.-M. 2002. An epidemic of almond witches' broom in Lebanon: classification and phylogenetic relationships of the associated phytoplasma. Plant Disease 86: 477-484.

- Choueiri E., Jreijiri F., Issa S., Verdin E., Bové J. and Garnier M. 2001. First report of a phytoplasma disease of almond (*Prunus amygdalus*) in Lebanon. *Plant Disease* 85: 802.
- Gundersen D. E. and Lee I.-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Medditeranea* 35: 144-151.
- Haghshenas F., Salehi M. and Ghasemi S. 2012. Witches' broom disease of GF-677 in Iran. 20th Iranian Plant Protection Congress, Shiraz, Iran, p: 517.
- Kester D. E. 1970. Growth *in vitro* of tissue of almond, almond hybrids and some other prunus. *Horticulture Science* 5(4): 349.
- Kirkpatrick B. C., Smart C. D., Gardner S. L., Gao J.-L., Ahrens U. and Maurer R., Schneider B., Lorenz K. H., Seemüller E., Harrison N.A., Namba S. and Daire X. 1994. Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16S/23S rDNA spacer sequences. *IOM Letters* 3: 228-229.
- Kirkpatrick B. C., Uyemoto J. K. and Purcell A. H. 1995. X-disease. pp. 57-58, In: J. M. Ogawa, E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Richie, K. Uriu and J. K. Uyemoto (Eds.), *Compendium of Stone Fruit Diseases*, APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E. and Bartoszyk I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.
- Molino Lova M., Quaglino F., Abou-Jawdah Y., Choueiri E., Sobh H., Casati P., Tedeschi R., Alma A., and 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 Medditeranea* 50: 273-282.
- Pourali H. and Salehi M. 2012. Genetic diversity of the phytoplasma isolates associated with almond witches' broom in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 48: 121-122. [In Persian with English abstract].
- Salehi M., Izadpanah K. and Ebrahim-Nesbat F. 1995. Etiology, transmission and host range of alfalfa witches' broom in southern Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 31: 1-15. [In Persian with English abstract].
- Salehi M., Izadpanah K. and Heydarnejad J. 2006. Characterization of a new almond witches' broom phytoplasma from Iran. *Journa of Phytopathology* 154: 1-6.
- Salehi M., Haghshenas F., Khanchezar A. and Esmailzadeh-Hosseini S. A. 2011. Association of 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' with GF-677 witches' broom in Iran. *Bulletin of Insectology* 64: 113-114.
- Schneider B., Seemuller E., Smart C. D. and Kirkpatrick B. C. 1995. Phylogenetic Classification of Plant Pathogenic Mycoplasma like Organisms or Phytoplasmas. pp. 369-80. In: S. Razin and J.G. Tully (Eds.). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol. 1. Academic Press.
- Sepahvand S., Ebadi A., Kamali K. and Ghaemmaghami S. A. 2012. Effects of Myo-Inositol and Thiamine on Micropropagation of GF677 (Peach × Almond Hybrid). *Journal of Agricultural Science* 4:275-280.
- Smart C. D., Schneider B., Blomquist C. L., Guerra L. J., Harrison N. A., Ahrens U., *et al.* 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S-23S spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2988-2993.
- Verdin E., Salar P., Danet J., Choueiri E., Jreijiri F., El Zammar S., *et al.* 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: 833-838.
- Zhang Y., Uyemoto J. K., and 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: 45-50.
- Zhao Y., Wei W., Lee I.-M., Shao J., Suo X. and Davis R. E. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2582-2593.