

## شناسایی عامل خشکیدگی شاخه و زوال درختان میوه هسته‌دار (برگ نقره‌ای) در شرق استان مازندران

### Identification of the causal agent of stone fruits die back and decline (Silver Leaf) in east of Mazandaran province

پریسا تیموری<sup>۱</sup> و سید وحید علوی<sup>۲\*</sup>

دریافت: ۱۳۹۶/۴/۳

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲

#### چکیده

عارضه خشکیدگی شاخه و زوال درختان میوه هسته‌دار موجب خشکیدگی سرشاخه‌ها، نقره‌ای شدن برگ‌ها و زوال درخت می‌گردد. از درختان هلو و شلیل واجد علائم طی ماه‌های تابستان سال‌های ۹۵-۱۳۹۳، نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها از نظر آلودگی به عوامل بیماری‌زا با توانایی ایجاد چنین علائمی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها با روش RT-PCR و استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای فیتوپلاسمای زردی اروپایی (*Candidatus Phytoplasma prunorum*)، جاروک بادام (*Candidatus Phytoplasma phoenicium*)، ویروس لکه‌حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار (*Prunus necrotic ringspot ilarvirus* ((PNRSV))، لکه حلقوی گوجه‌فرنگی (*Tomato ringspot nepovirus* (ToRSV)) و آبله آلو (*Plum pox potyvirus* (PPV)) بررسی گردیدند. از هر نمونه قطعاتی در محیط PDA و NA کشت داده شد. کلنی باکتریایی در محیط کشت رؤیت نگردید. پرگنه‌های قارچی، خالص‌سازی شده و براساس خصوصیات مورفولوژیک، قارچ *Trametes versicolor* شناسایی شد. پس از اثبات بیماری‌زایی، ژنوم جدایه‌های مورد نظر خالص‌سازی و با آغازگرهای نواحی ITS1، ITS4 و LAC تکثیر شدند. محصول نهایی PCR پس از تعیین توالی و هم‌ردیف‌سازی، با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) توسط نرم‌افزار BLAST مقایسه و شباهت جدایه‌های مورد نظر با قارچ *Trametes versicolor* در سطح ۹۵ تا ۱۰۰ درصد مشخص گردید. هشت تا ده درصد از درختان موجود در باغات شرق استان مازندران به این بیماری مبتلا و در حال زوال بودند. همچنین بررسی احتمال آلودگی نمونه‌ها به عوامل مورد بررسی حاکی از عدم آلودگی نمونه‌ها به عوامل فوق‌الذکر بود.

**واژگان کلیدی:** برگ نقره‌ای، درختان میوه هسته‌دار، سرخشکیدگی و زوال، *Trametes versicolor*

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
۲- استادیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، ساری، ایران  
نویسنده مسنول مکاتبات: alavi\_v@yahoo.com

## مقدمه

درحال حاضر سطح زیر کشت ارقام مختلف هسته‌داران به بیش از بیست هزار هکتار در استان مازندران رسیده است (بی‌نام، ۱۳۹۳) و علی‌رغم افزایش چشمگیر سطح زیر کشت، تولید نهال در سطح استان محدود بوده و عموماً از کرج و گرگان وارد می‌گردد. پایه‌های مورد استفاده اغلب بذری بوده و از انواع بذور غیر بومی و فاقد اصالت مشخص هستند، و مطالعات سازگاری روی آنها انجام نگرفته است. ارقام پیوندک هلو، شلیل و آلو نیز از باغات سالم مادری تهیه نشده و احتمال ابتلا به انواع بیماری‌های قابل انتقال از طریق پیوندک را دارند. واردات بی‌رویه نهال درختان میوه هسته‌دار تبعات نامطلوبی را به همراه داشته که از جمله آنها بروز بیماری‌های مختلف ریشه، تنه و شاخ‌وبرگ است و با توجه به قرارگرفتن این درختان در شرایط آب‌وهوایی مرطوب این استان، شرایط برای گسترش و طغیان بیماری‌ها فراهم است. از سوی دیگر، آزمون‌های سلامت برای شناسایی و کنترل بیماری‌های ویروسی و فیتوپلاسمایی در نهالستان‌های مبدا نیز به صورت استاندارد انجام نمی‌گیرد. معدودی نهالستان در استان نیز با اخذ مجوز اقدام به تولید نهال هسته‌دار نموده که شرایط مشابهی دارند.

باتوجه به نرخ سازگاری محیطی پایین هسته‌داران، متوسط طول عمر این درختان بین ۱۵ تا ۲۵ سال ذکر گردیده است، اما فقدان سازگاری محیطی و بروز حاد انواع مشکلات تغذیه‌ای و بیماری‌ها (دو عامل مرتبط با یکدیگر) موجب شده تا متوسط عمر هسته‌داران به ده تا دوازده سال در این استان برسد (Beckman and Long, 2003).

یکی از مشکلات مهم درختان هسته‌دار در استان مازندران، خشکیدگی درختان است که از سرشاخه‌ها آغاز و پس از مدتی به شاخه‌ها سرایت نموده و با رسیدن آن به تنه اصلی موجب زوال و مرگ درختان می‌گردد و معمولاً علایمی از جمله تغییر شکل، پیچیدگی و ایجاد جلوه نقره‌ای رنگ در برگ‌ها، رشد می‌کند، گلدهی بالا با تعداد میوه اندک بر روی شاخه یا شاخه‌های مبتلا و عدم استحکام کافی شاخه‌ها را نشان می‌دهد. این عارضه با گسترش باغات هسته‌دار در شرق مازندران شیوع یافته و در طی سال‌های اخیر به یک معضل حاد و فراگیر تبدیل و منجر به کاهش میزان تولید و طول عمر درختان مبتلا گردیده است، که علی‌رغم گستردگی خسارت آن در مناطق کاشت درختان میوه هسته‌دار، عامل آن شناسایی نگردیده و تنها به صورت مشاهده‌ای عواملی مانند خفگی و پوسیدگی ریشه، بیماری‌های ویروسی و شبه‌ویروسی و گاه باکتریایی را در ایجاد آن مرتبط دانسته‌اند.

از جمله بیمارگرهایی که موجب سرخشکیدگی و زوال درختان هسته‌دار می‌شوند، می‌توان به *Fusicoccum amygdali* Del. عامل شانکر فوزیکوکومی، *Valsa* sp. عامل شانکر سیتوسپورایی، *Agrobacterium tumefaciens* *Pseudomonas syringae* pv. (Syn: *Rhizobium radiobacter*) Smith & Townsend عامل گال ریشه و طوقه، *Syringae* Van Hall عامل شانکر باکتریایی، *Armillaria mellea* (Vahl.Fr.) Karst. عامل پوسیدگی عسلی و *Phytophthora cryptogea* Pethybr. & *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl. عامل پوسیدگی تارعنکبوتی ریشه، *Laff.* عامل گموز و *Stereum purpureum* Pers. عامل بیماری برگ‌نقره‌ای اشاره نمود که تغییر رنگ متن برگ و ایجاد علائمی نظیر ابلقی یا نقره‌ای شدن روی درختان مبتلا تنها برای دو عامل آخر گزارش شده است (Rhouma et al., 2006; Agrios, 1988; Guzmán and Latorre, 2005; Romanazzi et al., 2012; Caprile, 2008; Gross, 1987). پیغامی، ۱۳۸۵).

درختان هسته دار میزان بیش از ۳۰ عامل بیماری‌زای ویروسی و شبه‌ویروسی هستند. بین عوامل ویروسی و فیتوپلاسمایی نیز ویروس‌های لکه‌حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار ( *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*, PNRSV)، لکه‌حلقوی گوجه‌فرنگی ( *Tomato ringspot nepovirus*, ToRSV)، ابله آلو ( *Plum pox potyvirus*, PPV) و انواعی از فیتوپلاسمها مانند عامل زردی اروپایی هسته‌داران ( *Candidatus Phytoplasma prunorum* ) و جاروک بادام ( *Candidatus Phytoplasma phoenicium* ) به عنوان عوامل بیماری‌زا با توانایی ایجاد سرخشکیدگی، زوال و دامنه‌ای از علائم برگی شامل زردی، ابلقی، لکه‌های نکروتیک و سبز زردی در سایر مناطق کشت درختان هسته‌دار

گزارش شده است (Powell *et al.*, 1991; Verdin *et al.*, 2003; Elibuyuk, 2006; Abou-Jawdah *et al.*, 2014; El-Saghir, 2017). باتوجه به عدم جداسازی و تشخیص دقیق عامل این عارضه، بررسی بیماری‌شناسی آن به منظور شناسایی علت یا عوامل مرتبط با ایجاد و نهایتاً کنترل و مدیریت آن ضرورت یافته و موضوع این بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری

در تابستان سال‌های ۱۳۹۳ الی ۱۳۹۵ از باغات شلیل رقم (spring crest) و هلو رقم (sun gold) در شهرستان‌های جویبار، ساری، نکا و بهشهر بازدید به عمل آمده و از هر شهرستان ۴۰ نمونه از درختان واجد علائم سرخشکیدگی و زوال (بیست نمونه از هر رقم) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. هر نمونه شامل قطعه‌ای از شاخه در نظر گرفته شد که واجد علائم برگ نقره‌ای یا زردی و بدشکلی برگ، قهوه‌ای شدن زیر پوست و ترشحات صمغی در ناحیه مابین پوست و چوب بود (شکل ۱).



شکل ۱- قهوه‌ای شدن و ترشح صمغ زیر پوست شاخه‌های مبتلا (سمت راست) و نقره‌ای شدن برگ در مقایسه با برگ سالم (سمت چپ).

Fig.1. Browning and gum secretion under the infected branch bark (right) and leaf silvering compared to healthy leaf (left).

## بررسی عوامل فیتوپلاسمایی و ویروسی

جهت مطالعه آلودگی نمونه‌ها به عوامل فیتوپلاسمایی، دی‌ان‌ای کل از بافت رگبرگ میانی و دم‌برگ نمونه‌های جمع‌آوری شده و شاهد‌های منفی و مثبت (Agdia Co., USA) استخراج و توسط آغازگرهای P1/P7 به منظور شناسایی قطعه ۱۸۰۰ bp ژن 16S rRNA (Deng and Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) تکثیر و واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و در لوله‌های درب‌دار آماده (AccuPower PCRPreMix; BioNEERCo., Korea) انجام گردید. میزان ۱/۵ میکرولیتر از آغازگرهای P1 و P7 (جدول ۱) به همراه ۸ میکرولیتر آب دیونیزه سترون به هر کدام از لوله‌ها افزوده و در دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini; Bio-Rad, USA) قرار داده شد و سپس واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه، تکثیر در ۳۵ درجه حرارتی (یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، دو دقیقه در ۵۵ درجه سلسیوس و سه دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس) و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول واکنش در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد (Zirak *et al.*, 2009; Abbasian and Salehi, 2010). جهت بررسی ویروس لکه‌حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار (*Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) آر. ان. ا. کل از بافت برگ نمونه‌ها و شاهد‌های منفی و مثبت (Agdia Co., USA) با استفاده از کیت استخراج شرکت

دنا زیست آسیا (Dena zist total RNA isolation kit .Cat.No. S-1010-1) استخراج شد. فرآیند سنتز DNA مکمل مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (AccuPower RT PCRPreMix, BioNEERCo., Korea) با افزودن دو میکرولیتر (10mM) dNTPs، ده میکرولیتر (5X) MmulvRT buffer، یک میکرولیتر آنزیم MmulvRevers transcriptase (200U/μl) و ۳ میکرولیتر آغازگر برگشتی (10μM) VP-90 (جدول ۱) انجام شد و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس نگهداری و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حضور ۱/۵ میکرولیتر از آغازگرهای VP-90 و VP-92 (جدول ۱)، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش 10X، ۰/۲ مولار dNTPs، ۲- میکرولیتر از DNA مکمل و ۳ واحد آنزیم پلی‌مراز در لوله‌های درب‌دار آماده و در دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini, Bio-Rad, USA) با واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه قرار گرفت؛ سپس تکثیر در ۳۵- چرخه حرارتی (یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه در ۵۷ درجه سلسیوس و ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس) و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس صورت گرفت. محصول واکنش روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد (Rahmanian *et al.*, 2013).

آر. ان. ا. کل ویروس لکه‌حلقوی گوجه‌فرنگی *Tomato ring Spot virus* (ToRSV) از بافت برگ نمونه‌ها و شاهد-های سالم و آلوده مشابه قبل استخراج شد. فرآیند سنتز DNA مکمل مطابق با دستورالعمل و با استفاده از آغازگر برگشتی اختصاصی ToRS-R (Fuches *et al.*, 2010) انجام شد و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حضور ۱/۵ میکرولیتر از آغازگرهای ToRS-F و ToRS-R (جدول ۱) مشابه مرحله قبل بررسی گردید. پس از واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه، تکثیر در ۳۵ چرخه حرارتی (۴۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، یک دقیقه در ۴۸ درجه سلسیوس و یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس) و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد (Farmahini *et al.*, 2014).

آر. ان. ا. کل ویروس عامل آبله آلو *Plum pox virus* (PPV) از بافت برگ نمونه‌ها و شاهد‌های سالم و آلوده مشابه قبل استخراج شد. فرآیند سنتز دی. ان. ا. مکمل مطابق با دستورالعمل و با آغازگر برگشتی اختصاصی P4B (جدول ۱) انجام شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس نگهداری و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای P3D و P4B (جدول ۱) به همراه ۸ میکرولیتر آب سترون دیونیزه (Candresse *et al.*, 1998) و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و در لوله‌های درب‌دار آماده صورت گرفت. پس از واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه، تکثیر در ۴۰ چرخه حرارتی (۳۰ ثانیه در ۹۲ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۶۲ درجه سلسیوس و یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس) و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس صورت گرفت. محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد (Jafarpour and Sabok khiz, 2013).

## جدول ۱- مشخصات آغازگرهای اختصاصی

Table 1. The Specific Primers characterization.

بیمارگر Pathogen	آغازگر Primer	توالی Sequences	ماخذ طراحی آغازگر References
PNRSV	VP-90	5'-ATCAAGCTTATTGCAAATTCGGCAAAC-3'	Aparicio and Palla, 2002
	VP-92	5'-TCAGGATCCGTTTTTACCAAAAATGAAAATC-3'	
Phytoplasmas	P1	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'	Schneider <i>et al.</i> 1995; Deng and Hiruki, 1991
	P7	5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'	
ToRSV	ToRS-F	5'-CCACACACACTCCACCTAC-3'	Farmahini <i>et al.</i> , 2014
	ToRS-R	5'-ACTTCTGAAGGCTACCCGTT-3'	
PPV	P3D	5'-ACATTGCGGAGACAGCACTG-3'	Candresse <i>et al.</i> , 1998
	P4B	5'-TGCCTTCAAACGTGGCACTG-3'	

### بررسی عوامل باکتریایی

از حد فاصل بافت سالم و تغییر رنگ یافته ناحیه مابین پوست و چوب نمونه‌ها، قطعاتی به طول دو سانتی‌متر جدا و با الکل اتانول ۷۰٪ ضدعفونی گردید. سپس هر قطعه در لوله حاوی ده میلی‌لیتر آب مقطر سترون قرار گرفت، به مدت یک دقیقه تکان داده و یک ساعت به طور ثابت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. از محلول به دست آمده با لوپ برداشت و روی محیط غذایی NA پخش گردید (Roos and Hattingh, 1987).

### بررسی عوامل قارچی

پس از ضدعفونی سطحی نمونه‌ها با الکل اتانول ۷۰٪، از حد فاصل بافت سالم و تغییر رنگ یافته ناحیه مابین پوست و چوب قطعاتی پنج تا ده میلی‌متری جدا و به مدت سه دقیقه در محلول هیپو کلریت سدیم ۰/۵ درصد غوطه‌ور گردید. سپس روی کاغذ صافی سترون آگیری شد و به پتری دیش حاوی محیط غذایی PDA منتقل و در دمای ۲۵°C نگهداری شد. چهار تا شش روز بعد، خالص‌سازی جدایه‌های قارچی با کشت ریسه‌های منفرد (تک ریسه) روی محیط کشت PDA انجام شد و پس از هفت روز نگهداری در دمای فوق‌الذکر، بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی جدایه‌ها انجام شد (Ozgonen *et al.*, 2006).

### آزمون بیماریزایی

هر یک از جدایه‌های قارچی با قرار دادن بلوک‌های چهار میلی‌متری از کشت سه روزه آن روی محیط کشت PDA، در قسمت خراش داده شده تنه در بیست سانتی‌متری از سطح خاک ده نهال دو ساله از هر یک از ارقام شلیل اسپرینگ کرس و هلوی سان گلد نهال مایه کوبی شد و روی آن با پنبه مرطوب سترون پوشانده و با پارافیلیم بسته شد. سه نهال از هر رقم نیز به عنوان شاهد به همین روش با آب مقطر سترون مایه‌کوبی شدند. نهال‌ها در گلخانه (دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ تا ۷۰ درصد) نگهداری و پس از بیست روز بررسی گردیدند و کشت بافت تلقیح شده هر یک از نهال‌ها مشابه قبل انجام شد (Taylor, 1978; Jinlus *et al.*, 1992).

### شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی

استخراج DNA ژنومی براساس روش ژئو و همکاران (Guo *et al.*, 2005) با اندکی تغییرات انجام شد. سه روز پس از کشت روی محیط PDA، قطعه‌ای از انتهای ریسه هر یک از جدایه‌های خالص‌سازی شده به ارلن حاوی محیط کشت PDB منتقل شد. ارلن‌ها روی دستگاه لرزاننده دورانی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت و به مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. توده میسیلیومی رشد کرده در محیط PDB با آب مقطر شستشو و در هاون چینی با افزودن ازت مایع، پودر گردید. مقدار ۲ میلی‌گرم ریسه پودر شده به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری منتقل و ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج CTAB (CTAB 2% w/v, NaCl 1.4M, Tris-HCL100mM, EDTA 20mM, pH 8.0) به آن اضافه گردید و پس از ورتکس، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار داده شد. سپس ۸۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم-ایزوامیل الکل (۲۴:۱) به آن افزوده شد و تا یکنواخت شدن تکان داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. لایه رویی به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد و هم‌حجم آن ایزوپروپانول سرد (۲۰°C-) اضافه گردید و در ۱۳۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل با الکل اتانول ۷۰٪ شستشو و پس از خشک شدن در مجاورت هوا، ۵۰ میکرولیتر بافر TE به هر میکروتیوب اضافه و به مدت یک ساعت در یخچال و سپس تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید.

۱۰ میکرولیتر از محلول نوکلئیک اسید هر جدایه در لوله‌های درب‌دار آماده ریخته شد و به هر لوله میزان ۱/۵ میکرولیتر از آغازگرهای ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') اضافه و حجم نهایی با آب مقطر دیونیزه سترون به ۲۰ میکرولیتر رسانده

و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه و تکثیر در ۳۵ درجه حرارتی (یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، یک دقیقه در ۵۸ درجه سلسیوس و ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس) و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد (Innis *et al.*, 1990). برای شناسایی گونه از آغازگر طراحی شده برای ناحیه اختصاصی ژن لاکاز (Laccase gene) استفاده شد (Lac-f: 5'-CACTGGCATGGGTTCTTCCAG-3', Lac-r:3'-ATG GCTGTGGTACCAGAAAGT-5') و برای این آغازگر واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، سپس تکثیر در ۳۵ درجه حرارتی (سی ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، سی ثانیه در ۵۵ درجه سلسیوس و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس) با گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه در نظر گرفته شد (Souza *et al.*, 1996; Garcia-Mena *et al.*, 2005). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز هر یک از جدایه‌ها در ژل آگارز ۱/۵٪ با بافر TBE (Tris 90mM, EDTA 20mM, Boric acid 2mM) (TBE) (Acid 90mM) به مدت ۱/۵ ساعت در ولتاژ ۷۰ الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی ژل توسط بافر TBE حاوی غلظت ۱/۱۰۰۰۰ سایبرگرین (SYBR Green I) با دستگاه Prep One™ Sapphire (ABI 3730XL DNA Analyzer, BIONEER Co., Korea) و همردیف‌سازی توسط نرم‌افزار Sequin، با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (Basic local Alignment search tool) در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مقایسه شد.

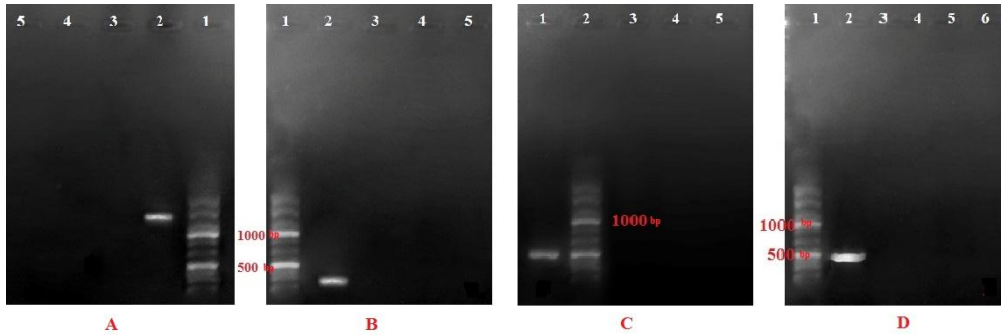
## نتیجه و بحث

### عوامل ویروسی و شبه ویروسی

در الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نوکلئیک‌اسید استخراج‌شده نمونه‌ها با آغازگرهای P1/P7 که به صورت فراگیر برای شناسایی اولیه آلودگی به طیفی از فیتوپلاسم‌های بیمارگر درختان هسته‌دار در گروه 16SrIX و زیرگروه‌های B یا D، F و G مورد استفاده قرار گرفته است، باندی مشاهده نگردید (شکل ۲-A) که نشان‌دهنده عدم تکثیر قطعه قابل انتظار ۱۸۰۰bp مربوط به شجره‌شناسی این گروه بود (Deng and Hiruki, 1991; Verdin *et al.*, 2003). در تکثیر نمونه‌ها با آغازگرهای اختصاصی ویروس لکه‌حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار (VP-90-VP) (92, نیز باندی مشاهده نگردید (شکل ۲-B)، در حالی که شاهد آلوده تکثیر شده با این آغازگرها باندی در حدود ۲۸۰bp تشکیل داد که قبلاً نیز برای این ویروس گزارش شده است (Rahmanian *et al.*, 2013). در الکتروفورز محصول به دست آمده از تکثیر نمونه‌ها با آغازگرهای ToRS-F و ToRS-R اختصاصی ویروس لکه‌حلقوی گوجه‌فرنگی (ToRSV) نیز باندی تشکیل نشد (شکل ۲-C) اما در محصول به دست آمده از تکثیر شاهد آلوده، قطعه‌ای در حدود ۵۸۰ باز رویت شد (Fermahini *et al.*, 2014). در الکتروفورز محصول تکثیر شده نوکلئیک‌اسید نمونه‌ها با آغازگرهای P3D و P4B ویروس عامل آبله آلو (PPV) باندی مشاهده نگردید (شکل ۲-D) ولی نمونه شاهد آلوده باندی در حدود ۴۶۰ ایجاد نمود (Jafarpour and Sabok khiz, 2013).

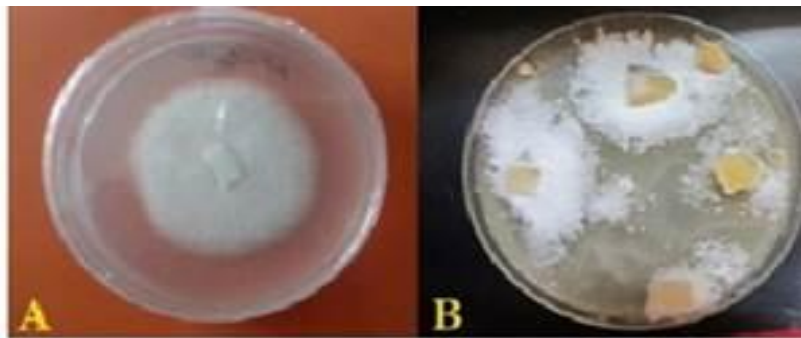
### عوامل قارچی و باکتریایی

در چهل نمونه کشت شده، کلنی باکتریایی روی محیط‌های کشت PDA و NA مشاهده نگردید ولی پرگنه‌های قارچی سفیدرنگ مشابه با هم روی محیط غذایی PDA ظاهر شد. پرگنه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد نسبتاً سریع داشته و پس از پنج الی شش روز کل سطح پتری را فرا می‌گرفت. اسپورهای تولید شده دارای سطحی صاف و استوانه‌ای شکل و به ابعاد تقریبی  $2-1/5 \times 5-6$  بودند. پس از ۱۵ روز بازیدیوکارب‌هایی به رنگ قهوه‌ای روشن تا کرم و به ابعاد  $2 \times 1/10$  سانتی‌متر روی محیط کشت رویت شد (شکل ۳). مشخصات به دست آمده با گونه *Trametes versicolor* (L.) Lloyd Syn: *Coriolus versicolor* (L.) Quél. (Ajay Kumar, 2013) تطبیق داشت.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژنوم عوامل ویروسی و شبه‌ویروسی با آغازگرهای اختصاصی در ژل آگارز ۱ درصد. (A) فیتوپلازما (۱: نشانگر جرم مولکولی با فواصل ۱۰۰bp، ۲: شاهد مثبت، ۳: شاهد منفی، ۴: سان گلد، ۵: اسپرینگ کرست). (B) PNRSV (۱: نشانگر جرم مولکولی با فواصل ۱۰۰bp، ۲: شاهد مثبت، ۳: شاهد منفی، ۴: سان گلد، ۵: اسپرینگ کرست). (C) ToRSV (۱: شاهد مثبت، ۲: نشانگر جرم مولکولی با فواصل ۱۰۰bp، ۳: شاهد منفی، ۴: سان گلد، ۵: اسپرینگ کرست). (D) PPV (۱: نشانگر جرم مولکولی با فواصل ۱۰۰bp، ۲: شاهد مثبت، ۳: شاهد منفی، ۴: سان گلد، ۵: اسپرینگ کرست).

Fig. 2. PCR products of the amplified virus and virus-like genomes with the specific primers in 1% agarose gel. A. Phytoplasma (1. molecular weight marker with 100bp intervals, 2. positive control, 3. negative control, 4. Sungold sample, 5. Spring crest sample). B. PNRSV (1. molecular weight marker with 100bp intervals, 2. positive control, 3. negative control, 4. Sungold sample, 5. Spring crest sample). C. ToRSV (1. positive control, 2. molecular weight marker with 100bp intervals, 3. negative control, 4. Sungold sample, 5. Spring crest sample). D. PPV (1. molecular weight marker with 100bp intervals, 2. positive control, 3. negative control, 4. Sungold sample, 5. Spring crest sample).



شکل ۳- (A) پرگنه قارچ *Trametes versicolor* پس از ۴ روز و (B) پس از ۱۵ روز روی محیط کشت PDA.

Fig. 3. Colony of *Trametes versicolor* after 4 (A) and 15-days (B) on PDA medium.

### آزمون بیماری‌زایی

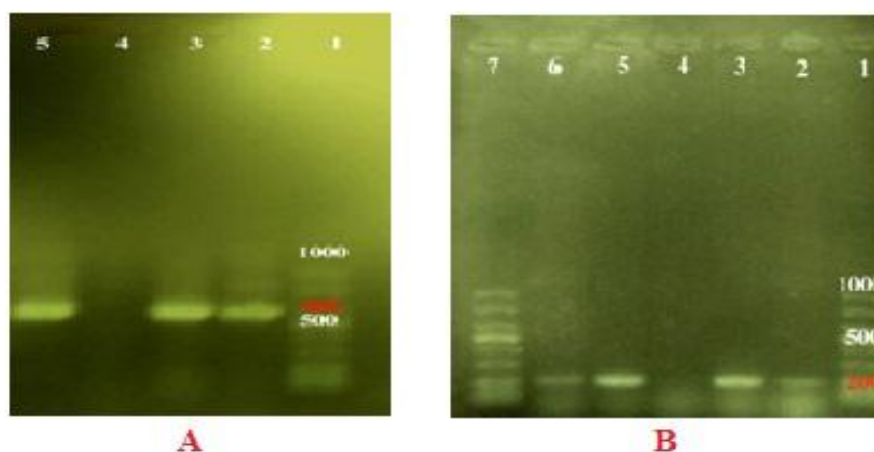
بیست روز پس از مایه‌کوبی جدایه‌ها، تغییر رنگ بافت آوند در محل مابین پوست و چوب مشاهده شد که آوندهای آبکش را کاملاً نکروز و سپس به لایه‌های اولیه کامبیوم چوب نفوذ کرده بود. درکشت مجدد بافت‌های آلوده در محیط PDA، پرگنه‌های مشابه با قبل رشد نمود. درنهال‌های شاهد مایه‌کوبی شده تغییر رنگ بافت دیده نشد و قارچی از بافت آن‌ها جداسازی نشد.

### تعیین توالی قطعات DNA تکثیر شده جدایه‌ها

محصول به دست آمده از تکثیر ژنوم جدایه‌های قارچی با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 روی ژل آگارز، باندی در حدود ۶۰۰bp نشان داد (شکل ۴- A)، که جرم آن با جدایه‌های اروپایی جنس *Trametes* sp. مطابقت داشت

(Tomšovský *et al.*, 2006). پس از هم‌ردیف‌سازی و تعیین توالی محصولات PCR، مقایسه با دیگر توالی‌های مرتبط با همان ناحیه در Genbank انجام شد. آنالیز بلاست شباهت ۹۵ تا ۱۰۰ درصد را با توالی *Trametes versicolor* نشان داد. توالی‌های حاصل از تکثیر با آغازگرهای ITS1 و ITS4 برای این گونه قارچی به ترتیب با شماره دسترسی KR149809 و KR071880 در بانک جهانی (NCBI) ثبت شد.

تکثیر ژنوم جدایه‌ها با آغازگر اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی ژن لاکاز قارچ *Trametes versicolor* محصولی در محدوده ۲۰۰bp روی ژل آگارز ایجاد نمود (شکل ۴-۲) که اختصاصی فرم بیمارگر این گونه بوده و حضور این ژن، توانایی تجزیه لیگنین و تهاجمی بودن جدایه‌ها با ورود به بافت‌های گیاهی سالم و همچنین یکی از موارد تفاوت با فرم‌های گندروی (چوب‌زی) این گونه است (Garcia-Mena *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2005).



شکل ۴-

الکتروفورز نوکلئیک اسید استخراجی جدایه‌های قارچی در ژل آگارز ۱/۵ درصد: (A) تکثیر شده با آغازگرهای عمومی ITS1 و ITS4: ۱. نشانگر جرم مولکولی با فواصل ۱۰۰bp، ۲، ۳ و ۵. نوکلئیک اسید استخراج شده از جدایه‌های مورد بررسی، ۴: شاهد منفی، (B) تکثیر شده با آغازگر اختصاصی لاکاز (۱ و ۷): نشانگر جرم مولکولی با فواصل ۱۰۰bp، ۲، ۳، ۵ و ۶: نوکلئیک اسید استخراج شده از جدایه‌های مورد بررسی، ۴: شاهد منفی).

Fig. 4. PCR products of the amplified fungal isolates genomes in 1.5% agarose gel. A. with ITS1 and ITS4 primers (1: molecular weight marker with 100bp intervals; 2, 3 and 5: extracted genomes of the isolates, 4: negative control). B. with Laccase primer (1 and 7: molecular weight marker with 100bp intervals; 2, 3, 5 and 6: extracted genomes of the isolates, 4: negative control).

با توجه به نتایج به دست آمده، عامل بیماری سرخشکیدگی و زوال هسته‌داران با جلوه نقره‌ای‌رنگ برگ‌ها، قارچ *Trametes versicolor* (L.) Lloyd تعیین گردید. عامل این بیماری از رده بازیدیومیست، راسته Polyporales و خانواده Polyporaceae، در ابتدا *Condrostereum purpureum* نام گرفته (Hesler, 1917; Dye, 1967) و تا سالیان اخیر مورد قبول بوده است (Simpson *et al.*, 2001)، اما در حال حاضر عامل این بیماری با نام *Trametes versicolor* پذیرفته شده و به عنوان یکی از مهمترین عوامل سرخشکیدگی، پوسیدگی و زوال درختان سیب، هلو، آلو، بادام، زیتون و سایر درختان دانه‌دار و هسته‌دار از نواحی مختلف جهان گزارش شده که با کاهش ظرفیت فتوسنتز، کاهش کیفیت میوه و فعالیت قارچ عامل بیماری در آوندهای چوبی منجر به تخریب بافت‌ها، قطع ارتباط غذایی شاخه‌های آلوده و با رسیدن به تنه اصلی، منجر به مرگ درختان میزبان گردیده است (Ozgonen *et al.*, 2006; Melzer and Berton, 1988; Covey *et al.*, 1981; Luley, 2005; Grand *et al.*, 2009). بیماری برگ نقره‌ای در ایران از روی درختان آلو، گوجه و درختان جنگلی در مازندران گزارش شده است (بهداد، ۱۳۶۱) و این بررسی، اولین گزارش از وجود این بیماری در باغات درختان میوه هسته‌دار در شمال کشور است. در مقایسه با سایر درختان میوه، مطالعات محدودی روی عوامل



ویروسی و شبه‌ویروسی بیماری‌زا روی درختان هسته‌دار کشور صورت گرفته است. در یکی از آخرین مطالعات ردیابی ویروس‌های مهم هسته‌داران شامل لکه حلقوی بافت مرده هسته داران، لکه حلقوی گوجه‌فرنگی، آبله آلو، کوتولگی آلو، پیچیدگی برگ گیلان (Cherry leaf roll virus, CLRV) و ویروس موزائیک آرابیس (Arabis mosaic virus, ArMV) در استان مازندران، تنها آلودگی به دو ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران و لکه حلقوی گوجه‌فرنگی محرز گردیده است (علوی و همکاران، ۱۳۹۷). بیماری‌گرهای دیگری مانند ویروس کوتولگی آلو (Prune dwarf virus, PDRV) از درختان هسته‌دار استان فارس (حسن‌پور و ایازپور، ۱۳۹۶) و فیتوپلاسمای خانواده سیب‌زمینی (Candidatus 'Phytoplasma solani') از درختان هلو و شلیل استان گلستان (اله‌وردی‌پور و همکاران، ۱۳۹۲) گزارش شده که ضمن تفاوت در نوع علائم برگ‌گی با این بیماری، علائم مشخصی روی تنه ایجاد نکرده‌اند. در بین عوامل بیماری‌زای ویروسی و شبه‌ویروسی گزارش شده از درختان هسته‌دار ایران، عوامل بررسی شده در این مطالعه، مهم‌ترین مواردی بوده که توانایی ایجاد ضعف و زوال و در نهایت مرگ را داشته و به همین علت ردیابی گردیدند، ولی ذکر این نکته ضروری است که علائم ایجاد شده توسط این عوامل بیمارگر، از نظر ایجاد علائم بارز برگ‌گی و همچنین روی تنه و زیر پوست، کاملاً با علائم ناشی از بیماری برگ‌نقره‌ای متفاوت بوده است. لذا از نتایج به‌دست آمده این چنین استنباط می‌گردد که اگرچه وجود عوامل ویروسی و شبه‌ویروسی در درختان هسته‌دار استان مازندران به اثبات رسیده، ولی نوع علائم ایجاد شده در این عارضه که در حال حاضر در مازندران شیوع دارد، مختص این عامل بیماری می‌باشد و آلودگی مخلوط نیز در این بررسی شناسایی نگردیده است. هرگونه آسیب در شاخه‌ها و تنه اصلی درخت، زمینه را برای هجوم این عامل فراهم می‌آورد. به علاوه فقر خاک، افزایش دما و رطوبت سبب می‌شود تا این قارچ وارد فاز تهاجمی شده و به‌عنوان عامل بیماری‌زا موجب زوال و نابودی درختان میزبان، حتی با ظاهری شاداب گردد (Grand et al., 2009).

به نظر می‌رسد شرایط اقلیمی شرق مازندران با تابستان‌های گرم و مرطوب به همراه افزایش قابل ملاحظه سطح زیر کشت هسته‌داران در سال‌های اخیر، موجب گسترش بیوتیپ یا زیرگونه‌ای مهاجم با توانایی بیماری‌زایی بالا در این منطقه گردیده است. قضاوت صحیح در این خصوص نیاز به تعیین توالی قسمت‌های دیگری از ژنوم مرتبط با بیماری-زایی این گونه و مقایسه کامل توالی ژنوم را دارد که در دست بررسی است. علت عدم گزارش این بیماری از سایر مناطق کشت درختان هسته‌دار در کشور را می‌توان مرتبط با شرایط خاص رطوبتی-حرارتی مورد نیاز عامل این بیماری دانست.

## References

## منابع

- بهداد، ا. ۱۳۶۱. بیماری‌های درختان میوه در ایران. انتشارات ندا، تهران، ایران.
- اله‌وردی‌پور، ت.، رحیمیان، ح.، و بابایی‌زاد، و. ۱۳۹۲. ردیابی مولکولی فایتوپلاسمای همراه درختان هلو و شلیل در استان گلستان. هشتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران و چهارمین همایش ملی امنیت زیستی. انجمن بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، دانشگاه تهران، تهران، ایران. ۱۶۱ صفحه.
- پیغامی، ا. ۱۳۸۵. بیماری‌های مهم درختان میوه. انتشارات آبیژ. تهران، ایران.
- حسن‌پور، م. ح.، و ایازپور، ک. ۱۳۹۶. بررسی وجود و پراکنش ویروس کوتولگی گوجه در باغات درختان میوه هسته‌دار استان فارس. دو فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی ۲: ۶۹-۷۶.
- بی‌نام. ۱۳۹۳. آمارنامه کشاورزی محصولات باغی، سازمان جهاد کشاورزی مازندران. معاونت برنامه ریزی و امور اقتصادی، اداره آمار و فناوری اطلاعات.
- علوی، س. و، فلکی، ف.، و تیموری، پ. ۱۳۹۷. شناسایی بیماری‌های ویروسی در درختان هسته‌دار شرق استان مازندران. بیست و سومین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صفحه ۶۹۸.

- Abbasian, M. and Salehi, M. 2010.** Reaction of stone fruit cultivars to Almond witches' broom Phytoplasma. Iranian Journal of Plant Pathology 46: 153-160. (in Persian with English abstract).
- Abou-Jawdah, Y., Abdel Sater, A., Jawhari, M., Sobh, H., Abdul-Nour, H., Bianco, P. A., Molino Lova, M. and Alma, A. 2014.** *Asymmetrasca decedens* (Cicadellidae, Typhlocybiniae), a natural vector of 'Candidatus Phytoplasma phoenicium'. Annals of Applied Biology 165: 395-403.
- Aparicio, F. and Pallas, V. 2002.** The molecular variability analysis of the RNA 3 of fifteen isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* sheds light on the minimal requirements for the synthesis of its sub genomic RNA. Virus Gene 25: 75-84.
- Agrios, G. N. 1988.** Plant Pathology, 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press, California, USA. 845pp.
- Ajay Kumar, G. 2013.** Notes on wood rotting fungi from India (1): *Trametes versicolor*- The Turkey Tail. Journal on New Biological Reports 2(2): 67-70.
- Beckman, T. G. and Long, G. A. 2003.** Rootstock breeding for stone fruits. Acta Horticulture 622: 531-551.
- Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M. T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J. B. and Dunez, J. 1998.** Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of *Plum pox potyvirus*. Phytopathology 88: 198-204.
- Caprile, J. 2008.** Integrated Pest Management for Stone Fruits", UC IPM Manual 3389.
- Covey, R. P., Larsen, H. J., Fitzgerald, T. J. and Dilley, M. A. 1981.** *Coriulus versicolor* infection of young apple trees in Washington State. Plant Disease 62: 280.
- Deng, S. and Hiruki, C. 1991.** Genetic relatedness between two non culturable mycoplasma like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. Phytopathology 81: 1475-1479.
- Dye, M. H. 1967.** Effect of pruning on silver leaf disease and yield of Peach and Nectarine trees. New Zeland Journal of Agricultural Research 10: 435-44.
- El-Saghir, S. M. 2017.** Detection of mixed infection of *Prunus necrotic ringspot virus* and phytoplasma in peach trees in Egypt. Journal of Virological Sciences 1: 91-99.
- Elibuyuk, I. O. 2006.** Investigation of *Plum pox virus* in different tissues of apricot and plum trees. Plant Pathology Journal 5: 208-211.
- Farmahini, M., Pourrahim, R., Elahinia, A., Rouhikhsh, A. and Farzadfar, Sh. 2014.** An investigation of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) and *Tomato ringspot virus* (ToRSV) in some Iranian pear gardens. Iranian Journal of Virology 8: 25-32.
- Fuches, M., Abawi, G. S., Marsella-Herrick, P., Cox, R., Cox, K. D., Carrol, J. E. and Martin, R. R. 2010.** Occurrence of *Tomato ring spot virus* and *Tobacco ringspot virus* in highbush Blueberry in Newyork state. Journal of plant pathology 92: 451-459.
- Garcia-Mena, J., Cano-Ramirez, C., Garibay-Orijel, C., Ramirez-Canseco, S. and Poggi-Varaldo, H. M. 2005.** A PCR method for the detection and differentiation of *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor* in defined-mixed cultures used for wastewater treatment. Applied Microbiology and Biotechnology 67: 524-531.
- Grand, L. F., Vernia, C. S. and Munster, M. J. 2009.** Biography and hosts of wood decay fungi in North Carolina: Species of *Trametes* and *Trichaptum*. Mycotaxon 106: 243-246.
- Gross, H. L. 1987.** Cytospora canker of black cherry. Plant Disease Reporter 51: 261-267.
- Guo, M., Lu, F., Pu, J., Bai, D. and Du, L. 2005.** Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Trametes versicolor* and heterologous expression in *Pichia methanolica*. Applied Microbiology and Biotechnology 69:178-83.
- Guzmán, G. and Latorre, B. A. 2005.** First Report of *Phytophthora cryptogea* root and crown rot on Peach trees in Chile. Disease Notes 89: 1010.
- Han, M. J., Hyoung, T. C. and Hong, G. S. 2005.** Purification and Characterization of Laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. The Journal of Microbiology 43: 555-560.
- Hesler, L. R. 1917.** Manual of Fruit Diseases. The Macmillan Company. New York,
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. 1990.** PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, CA.
- Jafarpour, B. and Sabok khiz, M. A. 2013.** Detection of Plum pox virus (PPV) of stone fruit trees in Khorasane Razavi province. Journal of Plant Protection 25: 132-135. (in Persian with English abstract)
- Jinlus, X., Liping, L. and Ziqin, D. 1992.** Isolation and Identification of two new metabolites from silver leaf fungus *Streum purpureum*. Journal of Organic Chemistry 57: 2313-2316.

- Luley, C. J. 2005.** Wood Decay Fungi Common to Urban Living Trees in the Northeast and Central United States. Naples, New York, Urban Forestry LLC. 60 pp.
- Melzer, R. and Berton, O. 1988.** Survey of wood attacking fungi in apple orchards of Santa Catarina State, Brazil. *Acta Horticulture*, 232: 219-222.
- Ozgonen, H., Erkilic, A., Koc, G. and Baloglu, S. 2006.** First report of *Chondrostereum purpureum* causing silver leaf disease on apricot (*Prunus armeniaca*) in Malatya, Turkey. *New Zealand Journal of crop and Horticultural Science*, 34: 357-357.
- Powell, C. A., Hadidi, A., and Halbrendt, J. M. 1991.** Detection of *Tomato ringspot virus* in nectarine trees using ELISA and transcribed RNA Probes. *Hort. Sc.* 26(10): 1290-1292.
- Rahmanian, P., Rakhshandehroo, F. and Zamanizadeh, H. 2013.** Detection and distribution of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) on stone fruits in some gardens located in Fars and Golestan provinces. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 44: 129-139.
- Rhouma, A., Boubaker, A., Nesme, X. and Dessaux, Y. 2006.** Plasmid and chromosomal diversity of a Tunisian collection of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Tunisian Journal of Plant Protection* 1: 73-84.
- Romanazzi, G., Mancini, V. and Murolo, S. 2012.** First report of *Leucostoma cinctum* on sweet cherry and European plum in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 365-368.
- Roos, I. M. M. and Hattingh, M. J. 1987.** Systemic invasion of cherry leaves and petioles by *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. *Phytopathology* 77: 1246-1252.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D. and Kirkpatrick, B. C. 1995.** Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. Pp. 369-380. In: Razin, S. and Tully, J. G. (eds.). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Simpson, R. M., Hekezen, R., Lune, F., Brewster, D., Christeller, J. and Spiers, A. G. 2001.** Extracellular enzymes of *Chondrostereum purpureum*, causal fungus of silver leaf disease. *New Zealand Plant Protection* 54: 202-208.
- Souza, T. M. D., Boominatha, K. and Reddy, C. 1996.** Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied Environmental Microbiology* 62: 37-39.
- Taylor, J. B. 1978.** A pathogenicity test for basidiomycete fungi isolated from roots. *New Zealand Journal Experimental Agriculture* 6: 91-94.
- Tomšovský, M., Kolařík, M., Pažoutová, S. and Homolka, L. 2006.** Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS(nrDNA) sequences. *Nova Hedwigia* 82: 269-280.
- Verdin, E., Salar, P., Danet, J. L., Choueiri, E., Jreijiri, F., Zammar, S. E., Ge'lie, B., Bove, J. M. and 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: 833-838.
- Zirak, I., Bahar, M. and Ahonmanesh, A. 2009.** Molecular characterization of phytoplasmas related to peanut witches broom and stolbure groups infecting plum in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 91: 713-716.