گل و گیاهان زینتی (۱۴۰۳)، ۹(۱): ۶۹-۸۲
مقاله پژوهشی

اولین گزارش از ردیابی و شناسایی بیمارگرهای فیتوپلاسمایی مرتبط با برخی از گیاهان زینتی شهر یزد

مهرداد صالح زاده[1*]، علیرضا افشاریفر[1]، سعیده دهقانپور فراشاه[2]

۱. مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲. گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
mehrdadsalehzadeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

چکیده

در بازدیدهای بهار و تابستان سال ۱۴۰۲ از نمونه‌های گیاهی فضای سبز و گلخانه‌های زینتی و علف‌های هرز همجوار این گیاهان در شهر یزد، نشانه های مشکوک به بیماری فیتوپلاسمایی مانند کتابی‌شدن ساقه، ریزبرگی و زردی مرتبط با گیاهان سنبل‌ختایی، برگ‌نو، لاله عباسی و کنف‌وحشی دیده شد. از هر گیاه ۵ نمونه جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشگاه شیراز منتقل شد. استخراج دی.ان.ای. به روش CTAB انجام شد و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای عمومی (P1 / P7) و آغازگرهای آشیانه‌ای (R16MF2 / R16MR2) فیتوپلاسماها صورت پذیرفت. برابر انتظار در پی.سی.آر. با آغازگرهای عمومی و آشیانه‌ای قطعاتی به‌ترتیب به اندازه‌ی ۱۸۰۰ و ۱۲۵۰ جفت‌باز تکثیر شد. قطعات حاصل از تکثیر پی.سی.آر. حاصل از آغازگرهای R16MF2 / R16MR2 از ژل برش یافته و بعد از خالص‌سازی جهت تعیین ترادف دوطرفه به شرکت سینوهه ارسال شدند. مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در NCBI توسط نرم‌افزار BLAST نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با گیاهان سنبل ختایی، برگ نو، لاله عباسی و کنف حشی بیشترین شباهت را به ترتیب با جدایه هندی (MH393563.1; host; *Datura stramonium*; identity: 98.94%)، جدایه ترکیه‌ای (HE649495.1; host; *Ligustrum* sp.; identity: 99.24%)، جدایه اوگاندایی (HE649495.1; host; *Hibicus rosae*;. identity: 99.14%) و جدایه ایرانی (KX685880.1; host; *Eucalyptus* sp. identity: 98.64%) داشتند. در ادامه درخت تبارزایی برای مقایسه جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های مشابه گزارش شده جهان با نرم‌افزار MEGA 8.0 ترسیم گردید.

واژه‌های کلیدی: آنالیز تبارزائی، گیاهان زینتی، زردی، علف‌های هرز، فیلودی.

مقدمه

فیتوپلاسماها پروکاریوت‌های بدون دیواره یاخته های هستند که توان ساخت مواد مورد نیاز برای تشکیل دیواره یاخته ای خود را ندارند. این گروه از موجودات، کوچک‌ترین یاخته‌های آزاد و انگل زنده می‌باشند (قطر ۱۷۵ تا ۲۵۰ نانومتر) و عمدتا در شیره‌ی پرورده‌ی یاخته‌های آوندهای آبکش گیاهان آلوده مستقر می‌شوند (Bertaccini *et al*., 2022). از زمان کشف فیتوپلاسماها بیش از ۸۰۰ بیماری همراه با فیتوپلاسماها در ۴۳۰ گونه گیاهی گزارش شده است. فیتوپلاسماها شدیدا بر

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

گیاهان چوبی و علفی اثر می‌گذارند. مهمترین خسارت فیتوپلاسما روی گیاهان زینتی خسارت و افت کیفی گیاه می‌باشد. بسیاری از فیتوپلاسماها در زمان آلودگی گیاه، اختلالات متنوعی (اغلب هورمونی) ایجاد می‌کنند که با تکامل، رشد و نمو گیاه تداخل دارند. نشانه‌های بارز شامل: فیلودی[۱] (برگ‌سانی اندام‌های زایشی)، وایرسنس[۲] (رنگ‌پذیری بخش‌هایی از گیاه که به‌طور عادی سبز نمی‌باشند)، جاروی جادوگر[۳] (رشد توده‌ی انبوهی از شاخه‌ها از یک نقطه)، تعداد غیرنرمال ریشه‌های موئین ظریف، بازداری از گلدهی، کوتولگی، زوال تدریجی و سبزردی می‌باشد (Hugenholtz *et al.*, 2021). مهم‌ترین خسارت فیتوپلاسماها روی گیاهان زینتی بیشتر افت کیفی گیاه می‌باشد (Bertaccini, 2022). همچنین فیتوپلاسماها از علف‌های هرز به‌عنوان پل سبز و میزبان حدواسط برای گسترش آلودگی خود استفاده می‌کنند (Mitrović *et al.*, 2022). تاکنون آلودگی به فیتوپلاسماها در ۱۶۳ گونه گیاه زینتی متعلق به ۱۴ خانواده گیاهی (Bertaccini, 2022) و ۱۱۲ گونه علف هرز متعلق به ۱۸ خانواده شناسایی شده است (Mitrović *et al.*, 2022). از گیاهان زینتی مهم که در ایران از آنها عوامل فیتوپلاسمایی گزارش شده است شامل همیشه‌بهار[۵] (Esmailzadeh Hosseini *et al.*, 2014)، سلوسیا[۶]، استبرق[۷]، لیمونیوم[۸]، گل‌جعفری[۹] (Aldagh & Bertaccini, 2015)، آفتابگردان[۱۰]، شب‌بوی خیری[۱۱] (Tazehkand *et al.*, 2010)، گل قاصد[۱۲]، اطلسی[۱۳] (Hemmati *et al.*, 2019)، شمعدانی[۱۴] (Amirmijani *et al.*, 2020)، پریوش[۱۵]، کاج افغانی[۱۶] (Movahedi-Parizi *et al.*, 2023) و نرگس شیراز[۱۷] (Gholami *et al.*, 2018) می‌باشد. همچنین، در چند سال اخیر نشانه‌های مشکوک به بیماری‌های فیتوپلاسمایی روی درختان، درختچه‌ها و گیاهان زینتی در فضای سبز و گیاهان زینتی مناطق مختلف کشور به‌ویژه جنوب ایران در حال گسترش است. برای شناسایی دقیق عوامل ایجاد کننده این نشانه‌ها و تفکیک آنها از نشانه‌های بیماری‌هایی که توسط ویروس‌ها و یا کمبودهای مواد غذایی به وجود می‌آیند، لازم بود تا با استفاده از روش‌های قابل اعتماد نسبت به تشخیص احتمال وقوع عوامل فیتوپلاسمایی موجود در این گیاهان اقدام شود. در این پژوهش با استفاده از روش‌های مبتنی‌بر پی.سی.آر. نسبت به تعیین فیتوپلاسماهای عامل ایجاد بیماری در گیاهان زینتی برگ نو، لاله عباسی، سنبل ختائی و کنف وحشی در منطقه یزد استفاده شد و بعد از انجام پی.سی.آر.، تعیین توالی نوکلئوتیدی، شناسایی گونه و تبارشناسی عوامل فیتوپلاسمایی آلوده‌کننده انجام گرفت.

مواد و روش ها

نمونه‌برداری

طی بازدید از فضای سبز شهر یزد در بهار و تابستان ۱۴۰۲ از برخی گیاهان زینتی این مناطق و علف‌های هرز مجاور آن ها شامل برگ‌نو[۱۸]، سنبل‌ختایی[۱۹]، لاله‌عباسی[۲۰] و کنف‌وحشی[۲۱] با نشانه های مشکوک آلودگی به فیتوپلاسما مانند زردی، کتابی‌شدن ساقه، جاروک، تورم غنچه و فیلودی ، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها داخل کیسه‌های پلاستیکی مجزا روی یخ و

۱- Phyllody ۲- Virescence ۳- Witches broome ۴- *Ligustrum vulgare* ۵- *Calendula officinalis*
۶- *Celosia argentea* ۷- *Calotropis procera* ۸- *Limonium* spp. ۹- *Tagetes erecta* ۱۰- *Helianthus annuus*
۱۱- *Erysimum cheiri* ۱۲- *Taraxacum officinale* ۱۳- *Petunia hybrida* ۱۴- *Pelargonum graveolen*
۱۵- *Catharanthus roseus* ۱۶- *Pinus Geradiana* ۱۷- *Narcissus tazetta* ۱۸- *Ligustrum ovalifolium*
۱۹- *Angelica archangelica* ۲۰- *Mirabilis jalapa* ۲۱- *Hibiscus cannabinus*

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

در طی چند ساعت به مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز منتقل شدند. از گیاهان به ظاهر سالم و بدون نشانه‌های مذکور در همان مناطق نیز به‌عنوان شاهد برای آزمایش‌های مولکولی نمونه‌برداری شد. در شرایط آزمایشگاهی رگبرگ‌های اصلی و گاهی برگ‌های کوچک انتهایی از نمونه‌ها جدا شده و برای استخراج دی. ان. ای استفاده شدند.

استخراج DNA از نمونه‌ها

در این روش مقدار ۰/۲ گرم بافت برگ درون لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری با استفاده از ازت مایع به صورت پودر در آمد و مقدار ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (2.5% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% 2-mercaptoethanol) به بافت مورد نظر اضافه گردید و سپس به‌مدت ۰/۵ ساعت در دمای ۶۵°C قرار گرفت و هر از چند دقیقه لوله‌ها بهم زده شدند. سپس ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴: ۱) به عصاره افزوده گردید و پس از ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شدند. رونشین تشکیل شده به تیوپ جدیدی منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از حذف ایزوپروپانول، رسوب دی‌انا با ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ ٪ شستشو و مطابق قبل سانتریفوژ شد و سپس در دستگاه تغلیظ کننده (concentrator) خشک شد و در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شد (Gawel & Jarret, 1991).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[1]

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر(شرکت Techne با مدل FTGENE2D) انجام شد. واکنش در یک حجم ۲۵ میکرولیتری (10 mM dNTPs (0.5 µl), 10 µM Virion-sense strand primer (1 µl) , 10 µM Complementary-sensen strand primer (1 µl) , 10x buffer (2.5 µl) , $MgCl_2$ 50 Mm (0.75 µl), *Taq* DNA polymerase 5 U/µl (0.25 µl) , DNA template (1 µl) and Deionized water (up to 25 µl)) و مطابق با برنامه ذکر شده در جدول یک انجام شد.

آغازگرهای مورد استفاده در PCR

آغازگرهای مورد استفاده در PCR در این پژوهش از شرکت Metabion international AG کره‌جنوبی تهیه شدند. توالی مربوط به آغازگرهای اولیه شامل: P1: Forward (Deng & Hiruki 1991) و P7: Reverse (Schneider *et al*. 1995) به ترتیب 5´AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT 3´ و 5´ CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3´ و توالی مربوط به آغازگرهای آشیانه‌ای (PCR Nested) شامل R16F2n: Forward و R16R2: Reverse (Lee *et al*. 1995) به‌ترتیب 5´GAAACGACTGCTAAGACTGG3´ و 5´TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG3´ بود که انتظار میرفت به ترتیب قطعاتی به طول ۱۸۰۰ و ۱۲۵۰ جفت باز تکثیر یابند.

جدول ۱- برنامه دمایی واکنش PCR.

۱- Polymerase Chain Reaction, PCR

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

Table 1- PCR reaction temperature schedule.

مرحله واکنش Reaction stage	تعداد دوره Number of cycles	دما (درجه سلسیوس) Temperature (degrees Celsius)	زمان (دقیقه) Time (min)
Initial denaturation	1	94	3-5
Denaturation	30	94	1
Annealing		58	2
Extension		72	3
Final extension	1	72	10

انجام الکتروفورز و خالص سازی محصول PCR

یک گرم آگاروز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE حل و به مدت چند دقیقه جوشانده شد. پس از رسیدن دما به ۶۰ درجه سلسیوس جهت رنگ آمیزی ژل، ۶ میکرولیتر اتیدیوم بروماید (۵۰ µg/mL) اضافه شد. ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۵ میکرولیتر رنگ کرزول رد (۱۰ میلی مولار کرزول رد حاوی ۱۰ درصد سوکروز) مخلوط و در چاهک‌ها ریخته شد. پس از قرار دادن محفظه الکتروفورز، ولتاژ دستگاه در ۹۸ ولت تنظیم و به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. پس از پایان زمان مذکور، ژل برروی صفحه UV transilluminator مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از دستگاه gel documentation از آن عکس‌برداری شد. در ژل الکتروفورز، مارکر مولکولی Gen Ruler TM DNA Ladder Mix (Fermentas) مورد استفاده قرار گرفت. قطعه تکثیر یافته مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل (QIAGEN) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده خالص سازی شد.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی

برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی، قطعات تکثیرشده‌ی مورد نظر در PCR حاوی قطعات ۱۲۵۰ جفت‌بازی مورد نظر به شرکت سینوهه شیراز برای ترادف‌یابی ۲ طرفه ارسال گردید. برای بررسی مقدار تشابه دی.ان.ای. تعیین ترادف شده با توالی‌های موجود، ترادف‌های به‌دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST با ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه شد.

بررسی ترادف‌ها و ترسیم درخت تبارنما

با استفاده از نرم‌افزار Clustal X هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های نوکلئوتیدی حاصل با ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های موجود در GenBank مورد مقایسه قرار گرفت و درصد تشابه آن‌ها با نرم‌افزار Megalign تعیین شد. درخت تبارنمای مربوطه توسط نرم‌افزار MEGA 8.0 ترسیم شد و مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت.

بررسی احتمال آلودگی مخلوط فایتوپلاسماها با برخی از ویروس‌های مهم گیاهی

برای بررسی احتمال آلودگی مخلوط نمونه‌ها با ویروس‌های متعلق به خانواده‌های مهم ویروسی و احتمال ناشی شدن نشانه‌ها، به ویژه نشانه های زردی توسط ویروس‌ها، از آغازگرهای دژنره‌ی پوتی‌ویروس‌ها: Nib1 و Nib3R (Gibbs & Mackenzie, 1997)، آغازگرهای دژنره‌ی بگوموویروس‌ها: B^C primer (Deng *et al*., 1994) و $primer181^V$ (Rojas *et al*.,)

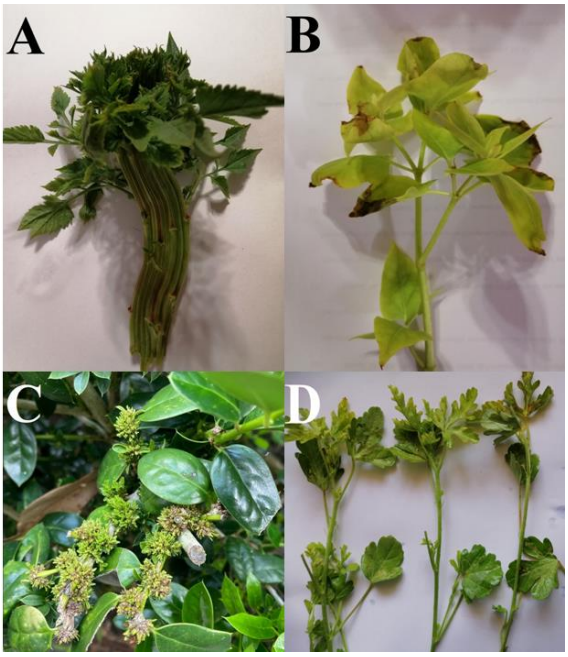
[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

1993)، آغازگرهای عمومی توباموویروس‌ها: TobamodF و TobamodR (Li *et al*., 2018) و آغازگرهای اختصاصی ویروس موزاییک خیار: CMVCP-F/CMVCP-R (Rizos *et al*., 1992) استفاده شد.

نتایج و بحث

خصوصیات فنوتیپی نمونه‌های جمع‌آوری شده از فضای سبز شهر یزد

در بازدیدهایی که در طی بهار و تابستان ۱۴۰۲ از فضای سبز شهر یزد صورت گرفت، نشانه های تیپیک بیمارهای ناشی از فیتوپلاسما شامل کتابی شدن، زردی، کوچک شدن برگ و فیلودی در بوته‌های سنبل ختایی، گل‌عباسی، کنف وحشی و برگ نو مشاهده شد. این نشانه ها از اواسط بهار شروع و به‌تدریج در اواخر دوره‌ی تابستان شدت نشانه ها افزایش یافته و تشدید می‌شدند (شکل ۱).



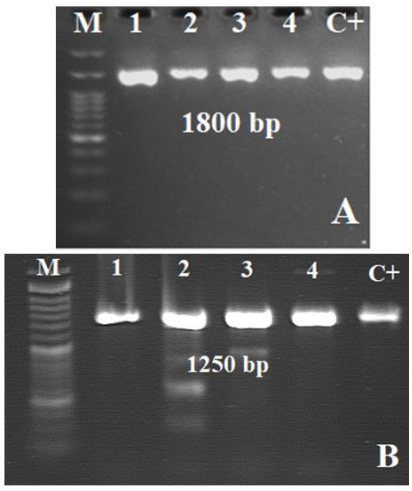
شکل ۱- A: نشانه های فیلودی و کتابی‌شدن ساقه در سنبل ختایی. B- نشانه های زردی در لاله عباسی. C- نشانه های پررشدی و ریزبرگی در برگ نو. D- نشانه های زردی در کنف وحشی.

Figure 1- A- Symptoms of phyllodes and stem flattening in *Angelica archangelica*. B- yellowing symptoms in *Mirabilis jalapa*. C- signs of proliferation and phyllody in *Ligustrum* sp. D- yellowing symptoms in *Hibiscus cannabinus*.

شناسایی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژنوم تعیین ترادف شده ۱۲۵۰ جفت‌بازی در واکنش پی.سی.آر

در واکنش PCR، با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی فیتوپلاسماها (P1 / P7) و آغازگرهای آشیانه‌ای (/ R16MF2 R16MR2) قطعاتی به‌ترتیب به اندازه‌ی ۱۸۰۰ و ۱۲۵۰ جفت‌باز تکثیر شدند (شکل ۲)

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی مربوط به قطعه تکثیرشده بخشی از ژنوم فیتوپلاسما با جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 (شکلA-۱۸۵۰ جفت باز) و آغازگرهای آشیانه‌ای R16MF2 / R16MR2 (شکل B-۱۲۵۰ جفت باز) منطبق بر ژن 16S rDNA. چاهک‌های شماره ۱ تا ۴ به ترتیب مرتبط با گیاهان آلوده سنبل ختایی، برگ‌نو، لاله عباسی و کنف وحشی و چاهک ۵ نمونه‌ی کنترل مثبت اخذ شده از گیاهان پروانش آلوده به فیتوپلاسمای کنجد از مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشگاه شیراز. M- DNA Ladder Mix (Fermentas).

Figure 2- Electrophoretic patterns related to the amplified fragment of a part of the phytoplasma genome with a pair of general primers P1/P7 (Figure: A1850 bp) and nested primers R16MF2 / R16MR2 (Figure: B1250 bp) corresponding to the 16S rDNA gene. Wells No. 1 to 4 are respectively related to infected plants of *Angelica archangelica*, *Ligustrum* sp., *Mirabilis jalapa* and *Hibiscus cannabinus*, and Well 5 is a positive control sample obtained from Vinca plants infected with Sesame Phytoplasma from Plant Virology Research Center. Shiraz university. M: .DNA Ladder Mix (Fermentas).

تعیین جایگاه تاکسونومیکی جدایه‌های ایرانی فیتوپلاسمای همراه با گیاهان سنبل‌ختایی، برگ‌نو، کنف‌وحشی و لاله عباسی بر اساس ترادف بخشی از ژن 16S rDNA

ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژنوم 16S rDNA فیتوپلاسمای همراه با گیاهان سنبل‌ختایی، برگ‌نو، کنف‌وحشی و گل‌عباسی با سایر جدایه‌ها از نقاط و میزبان‌های مختلف که ژنوم آن‌ها تعیین ترادف شده و اطلاعات آن‌ها در بانک اطلاعاتی Genbank موجود است مورد مقایسه قرار گرفت. درخت تبارنمای ترسیم شده به روش Maximum Parsimony نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه در خوشه‌های مختلف مربوط به فیتوپلاسماهای آلوده‌کننده‌ی گیاهان قرار می‌گیرند (شکل ۳). مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در NCBI توسط نرم‌افزار BLAST نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با گیاهان سنبل ختایی، برگ‌نو، گل‌عباسی و کنف‌وحشی بیشترین شباهت را به ترتیب با جدایه‌ی هندی (MH393563.1; host; *Datura stramonium*; identity: 98.94%)، جدایه‌ی ترکیه (HE649495.1; host; *Ligustrum* sp.; identity: 99.24%)، جدایه‌ی اوگاندا (HE649495.1; host; *Hibicus rosae*;. identity: 99.14%) و جدایه‌ی ایرانی (KX685880.1; host; *Eucalyptus* sp. identity: 98.64%) دارند. برای شناسایی زیرگروه‌های مورد نظر، با مقایسه توالی‌های ردیابی شده فیتوپلاسماهای همراه با سنبل ختائی، برگ نو، گل‌عباسی و کنف وحشی در سایت آنلاین PCR-RFLP مشخص گردید که مشابه با توالی‌های نزدیک به زیرگروه 16SrII می‌باشند.

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

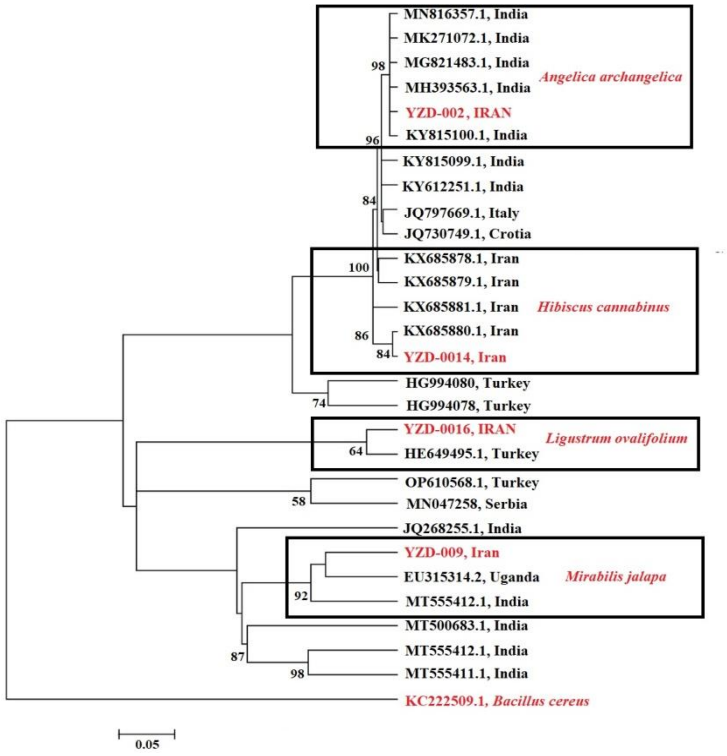
جدول ۲- اطلاعات موجود مربوط به توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژنوم 16S rDNA گونه‌های مورد استفاده در ترسیم درخت تبارنما شامل: نام گونه، نام جدایه، رسشمار مربوطه، میزبان و نام کشوری که گونه‌ها از آن گزارش شده است. و تعیین جایگاه جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش در بین گونه های مشابه گزارش شده از مناطق مختلف دنیا.

Table 2- The available information related to the nucleotide sequence of a part of the 16S rDNA genome of the species used in drawing the phylogenetic tree, including species name, isolate name, relevant census, host, and country name from which the species was reported. and determining the position of the isolates investigated in this research among similar species reported from different regions of the world.

نام گونه species name	نام جدایه Isolates name	رسشمار Accession number	نام کشور گزارش شده The name of the reported country	میزبان Host
Candidatus Phytoplasma trifolii	HSD1	MN861357	India	*Helichrysum sp.*
Manilkara zapota' flat stem little leaf phytoplasma	Unknown	MK271072	India	*Manilkara zapota*
Hyptis suaveolens' phytoplasma	Biswanath (Assam)	MG821483	India	*Mesosphaerum suaveolens*
Datura stramonium' witches'-broom phytoplasma	Gorakhpur	MH393563	India	*Datura stramonium*
Candidatus Phytoplasma trifolii	Orissa	KY815100	India	*Solanum tuberosum*
Candidatus Phytoplasma trifolii	Orissa	KY815099	India	*Solanum tuberosum*
Chilli witches'-broom phytoplasma	IARI	KY612251	India	*Capsicum annuum*
Candidatus Phytoplasma solani	SB1	JQ730749	Croatia	*Vitis vinifera*
Candidatus Phytoplasma solani	EC-KH-Dezfol	KX685881	Iran	*Eucalyptus sp.*
Candidatus Phytoplasma solani	EC-FA-Mamasani	KX685880	Iran	*Eucalyptus sp.*
Candidatus Phytoplasma solani	EC-FA-Kazeron	KX685879	Iran	*Eucalyptus sp.*
Candidatus Phytoplasma solani	BN-Fc6	JQ797669	Italy	*Vitis vinifera*
Ligustrum ovalifolium' phytoplasma	Fe2	HE649495	Turkey	*Ligustrum sp.*
Juniperus excelsa' phytoplasma	Jnp-Tr-K1	OP610568	Turkey	*Juniperus excelsa*
Ligustrum ovalifolium' phytoplasma	F2\57	HG994080	Turkey	*Zea mays*
Ligustrum ovalifolium' phytoplasma	F2\51	HG994078.1	Turkey	*Zea mays*
Ligustrum ovalifolium' phytoplasma	F1\4	HG994077.1	Turkey	*Zea mays*

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

Mirabilis jalapa' little leaf phytoplasma	4OC	JQ268255.1	India	*Mirabilis jalapa*
Candidatus Phytoplasma aurantifolia	Kawanda	EU315314.2	Uganda	*Hibiscus rosa-sinensis L.*
Candidatus Phytoplasma aurantifolia	CB01	MT555412.1	India	*Croton bonplandianus*
Candidatus Phytoplasma aurantifolia	SYDP1	MT555411.1	India	*Croton bonplandianus*
Exitianus indicus' phytoplasma	CLY1	MT500683.1	India	*Exitianus indicus*



شکل ۳- درخت تبارزایی رابطه فیتوپلاسمای جدایه‌های ایرانی با سایر فیتوپلاسماهای مختلف بر اساس ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژنوم 16S rDNA. هم‌ردیف‌سازی ترادف نوکلئوتیدی با استفاده از Clustal X و دندروگرام به روش Maximum Parsimony نرم‌افزار MEGA 8.0 ترسیم شده است. بخشی از توالی ژنوم *Bacillus subtilis* 16S rDNA به‌عنوان outgroup در نظر گرفته شده است. اعداد واقع شده در شاخه‌های درخت بیانگر Bootstrap بوده و میزان قابل اعتماد بودن این دندروگرام را نشان می‌دهد. اسامی کامل فیتوپلاسماها در جدول ۲ آورده شده است.

Figure 3- Pedigree tree showing the relationship of phytoplasmas of Iranian isolates with other different phytoplasmas based on the nucleotide synonymy of a part of the 16S rDNA genome. Nucleotide synonym alignment was drawn using Clustal X and dendrogram by Maximum Parsimony method of MEGA 8.0 software. A part of the 16S rDNA genome sequence of Bacillus subtilis is considered an outgroup. The numbers located in the branches of the tree represent Bootstrap and show the reliability of this dendrogram. Full names of phytoplasmas are given in Table 2.

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

از آن جایی که کنترل بیماری‌های فیتوپلاسمایی بسیار مشکل است این گروه از عوامل بیماریزای می‌توانند معضلات جدی را در گلخانه‌های گیاهان زینتی و فضای سبز ایجاد نمایند و منجر به افت شدید کیفی و زیبایی این نوع گیاهان گردند. تاکنون گزارش‌های متعددی از آلودگی گیاهان زینتی و فضای شهری به فایتوپلاسماها گزارش شده است. در یک پژوهش بیماری‌های فیتوپلاسمایی همراه با جاروک یونجه[۱]، گلسانی همیشه‌بهار[۲] و کتابی شدن تاج‌خروس[۳] از فضای سبز شهری در استان خوزستان ردیابی و شناسایی شد. در ادامه بررسی ویژگی‌های مولکولی جدایه‌ها نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با این بیماری در محل‌های نمونه‌برداری، از اعضای گروه SrII-D16 می‌باشند (Babaei *et al.*, 2007). در یک بررسی دیگر همراهی یک فیتوپلاسمای از جنس *Candidatus Phytoplasma australiense* روی میزبان‌های زینتی شامل، اکالیپتوس[۴]، آکاسیا برگ بیدی [۵] و شیشه‌شور[۶] برای اولین‌بار از ایران گزارش شد (Nikooei *et al.*, 2017). در بازدیدهای به‌عمل‌آمده از فضای سبز شیراز از دو گونه گیاه زینتی آلترنانترا با نام‌های علمی *Alternantera ficoidea* و *A. repens* نمونه‌برداری صورت گرفت. نشانه های مشترک در هر دو نمونه، زردی برگ‌ها بود. در گونه‌ی *Altemanther ficoidea* قاشقی شدن برگ‌ها و در گونه‌ی *A. repens* چروکیدگی برگ‌ها به‌صورت نشانه های اختصاصی مشاهده شد (Tazehkand *et al.*, 2010). از گیاهان زینتی مربوط به خانواده تاج‌خروسیان و تیره‌ی گل مینا طیف وسیعی از فیتوپلاسماها از گروه SrI16 گزارش شده است (Tazehkand *et al.*, 2010). رشد متراکم بوته، گوشتی بودن ساقه و ظریف بودن برگ‌های گیاهان خانواده گل مینا و تاج‌خروسیان احتمالا در رفتار تغذیه‌ای ناقلان احتمالی موثر است. در بازدیدهای به‌عمل آمده نیز رشد انگل سس[۷] به‌صورت گسترده روی این گیاهان مشاهده شده است. انگل سس می‌تواند پل زیستی بین گیاهان آلوده و سالم باشد و احتمالا بیمارگر را به پاجوش درختچه‌های مجاور منتقل کند (Amirmijani *et al.*, 2020). در گزارشی از وقوع بیماری فیتوپلاسمایی همراه با گل همیشه‌بهار دراستان خراسان رضوی نشانه هایی نظیر ریزبرگی، زردی، برگی‌شدن اجزای گل، رشد جوانه‌های جانبی ساقه، سبز شدن گلبرگ‌ها، رشد جوانه‌های داخل گل و عقیمی، جارویی شدن و توقف رشد در برخی از بوته‌های گل همیشه‌بهار مشاهده شد. الگوی RFLP مجازی نیز با استفاده از *iPhy* Classifier نشان داد که گلسانی همیشه‌بهار در این استان متعلق به گروه Sr VI16 و زیرگروه A می‌باشد (Ashnaei & jamshidi, 2018). بررسی‌ها بر روی گل همیشه‌بهار را با نشانه های گلسانی از باغ گیاه‌شناسی استان یزد جمع‌آوری کردند و تعلق عامل فیتوپلاسمایی گلسانی گل همیشه‌بهار را به گروه (۱۶SrII) *Ca.* Phytoplasma aurantifoli ثابت کرد (Esmailzadeh *et al.*, 2011). بر اساس یک گزارش دیگر از ایران زیرگروه فیتوپلاسمای عامل گلسانی گل همیشه‌بهار گروه جاروک بادام‌زمینی (۱۶SrII-D) معرفی شد. با توجه به وقوع جاروک یونجه در ایران، احتمالا یونجه‌های آلوده نقش مهمی در وقوع همه‌گیری گلسانی‌گل‌همیشه‌بهار بازی می‌کند (Amirmijani *et al.*, 2020). در پژوهشی دیگر یک فیتوپلاسما از گروه SrVI 16 و زیرگروه A در گیاه نی لویی[۸] دارای نشانه های مشکوک به بیمارگرهای فیتوپلاسمایی به‌همراه یک نمونه بدون نشانه ها از حاشیه‌ی رود کارون و آب‌راهه‌های دانشگاه شهید چمران جمع‌آوری گردید. نشانه ها شامل لکه‌های زرد بوده که به مرور

۱- Alfalfa witches'-broom ۲- *Calendula officinalis* Phyllofy ۳- *Candidatus* phytoplasma aurantifolia
۴- *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh ۵- *Acacia salicina* ۶- *Melaleuca citrina* ۷- *Cascuta* sp.
۸- *Typha latifolia*

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

زمان به هم متصل شده و کل پهنک برگ‌ها را فرا می‌گیرد. این نشانه ها شبیه به زوال آخر فصل و خشک شدن گیاه بود (Azimi *et al*., 2018). محققان همراهی فیتوپلاسمای *Ca.* ulmi Phytoplasma را در چین روی میزبان گیاهی نی‌قلم (*australis Phragmites*) از تیره‌ی گندمیان گزارش کردند. نشانه ها روی گیاه مذکور شامل جاروک و ریزماندن برگ‌ها بود. در بررسی‌های فیلوژنتیکی و مقایسه‌ی الگوی چند شکلی قطعات برشی، این فیتوپلاسما با زیرگروه SrV-B16 مرتبط شناخته شد (Marcone *et al*., 2018). اخیرا نیز ، گیاه نی‌قمیش زینتی (*Phragmites australis*) به‌عنوان میزبان جدید فیتوپلاسمای برگ سفیدی مَرغ (*Candidatus* phytoplasma cynodontis) از استان قسیم عربستان سعودی گزارش شده است. با توجه به بررسی‌های تبارشناختی، فیتوپلاسمای همراه با گیاهان مذکور متعلق به گروه SrXIV16 و زیرگروه A بود (Duduk *et al*., 2018). در گیاهان برگ نو با نشانه های مشابه به بیماری فیتوپلاسمایی از کشور ترکیه (Çağlar *et al*., 201) ، کره‌ی‌جنوبی (Jung, 2023) و ایتالیا (Marcone *et al*., 2016) فیتوپلاسمایی متعلق به زیرگروه 16SrII گزارش شده است. از گیاه گل‌عباسی نیز چندین گزارش از آلودگی به فیتوپلاسما در دنیا گزارش شده است. نخستین گزارش مرتبط با آلودگی گیاه لاله عباسی با نشانه های زردی از اسرائیل (Sobolev *et al*., 2007) است که عامل زردی، فیتوپلاسما ردیابی و گزارش شده که از زیر گروه 16SrII بود. محققین نشانه های زردی مرتبط با فیتوپلاسمای گل‌عباسی متعلق‌به زیرگروه 16SrII را از هند گزارش نمودند (Kumar *et al*., 2012). در گزارشی دیگر فیتوپلاسمای آلوده‌کننده گل‌عباسی و گل داودی از هلند متعلق به زیرگروه 16SrI گزارش گردید (Chaturvedi *et al*., 2010). در یک بررسی عامل جاروک بادام‌زمینی رااز روی گل‌عباسی ردیابی و شناسایی کردند که متعلق‌به زیرگروه 16SrII بود (Rao *et al*., 2017). از همین زیرگروه، یعنی 16SrII، فیتوپلاسمای عامل زردی گل‌عباسی گزارش شد (Omar & Alsohim, 2016). از گیاه کنف وحشی عوامل فیتوپلاسمایی از کشورهای هند (16SrII) (Biswas *et al*., 2017)، (16SrII) (Rao *et al*., 2020)، (16SrII) (Sardar *et al* ., 2016)، مصر (16SrII) (Mokbel, & El-Attar, 2014)، تایوان (16SrI) (Tseng *et al*., 2014)، مصر (16SrI) (Mokbel *et al*., 2013)، هند (16SrV-D) (Marcone *et al*., 2013) و ایتالیا (16SrIB) (Mahapatra *et al*., 2016) گزارش شده است. با توجه به اطلاعات ما هیچ گزارشی از آلودگی گیاه سنبل ختائی به فیتوپلاسما در دنیا گزارش نشده است.

از آنجا که شرایط قرنطینه‌ای در کشور ما کمتر رعایت می‌گردد و بر ورود و خروج مواد گیاهی به‌خصوص گیاهان زینتی کنترل قابل توجهی وجود ندارد و به‌علاوه گلخانه‌های کشور ما هم کمتر دارای شرایط ایده‌آل برای نگهداری این گیاهان می‌باشند در نتیجه خطر وقوع و گسترش این بیماری‌های صعب‌العلاج بسیار اهمیت پیدا می‌کند. با توجه به اینکه در زمینه مطالعه عوامل بیماریزای فیتوپلاسمایی و به‌خصوص بیماری‌های فیتوپلاسمایی گیاهان زینتی در ایران تحقیقات مدون قابل ملاحظه‌ای صورت نگرفته است، اولین قدم در این زمینه ردیابی و شناسایی این گونه عوامل بیماریزا در گیاهان زینتی و علف‌های هرز همراه با این گیاهان بوده تا اینکه راه برای ادامه مسیر در این باره و از جمله کنترل این عوامل باز گردد. بر این اساس و به‌دلیل اهمیت کشور در پرورش و کشت گیاهان زینتی و همچنین بروز و مشاهده نشانه های مشکوک به اینگونه عوامل بیماری‌زا روی گیاهان زینتی، نمونه‌برداری مذکور جهت تشخیص و بررسی ویژگی‌های بیماری(های) فیتوپلاسمایی روی گیاهان زینتی و فضای باز انجام شد. هدف از تحقیق حاضر شناسایی عوامل بیمارگر همراه با زردی، فیلودی و کتابی شدن برخی از گیاهان زینتی و علف‌های هرز مجاور آنها مانند کنف‌وحشی، برگ نو، لاله عباسی و سنبل ختایی در فضای سبز شهر یزد بود. این موضوع دارای اهمیت بالایی است

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

چرا که بر اساس اطلاعات ما این اولین گزارش از همراهی فیتوپلاسما با گیاهان کنف وحشی، لاله عباسی، برگ نو و سنبل ختائی در ایران می‌باشد. تقریبا در تمامی مناطق مورد بازدیـد که بعدا با آزمایش‌های مولکولی به بیمارگرهای فیتوپلاسمایی نسبت داده شدند، نشانه های بیماری شامل زردی، ریزبرگی، کتابی‌شدن شاخه‌ها و همچنین برگ‌هایی که گوشوارک در آن به‌طور غیر عادی کشیده شده شامل می‌شد (شکل ۱). در تحقیق حاضر، نتایج حاصل از آزمـون PCR دو مرحله‌ای، تعیین ترادف، میزان تشابه نوکلئوتیدی و آنالیز تبارزایی، همراهـی یـک فیتوپلاسما با اینگونه نشانه ها در فضای سبز شهر یزد را نشان داد (شکل ۲). احتمال آلودگی مخلوط نمونه‌ها با سایر ویروس‌های متعلق به خانواده‌های مهم ویروسی و احتمال ناشی شدن نشانه ها، مخصوصا نشانه های زردی توسط ویروس‌ها با استفاده از آغازگرهای دژنره‌ی پوتی‌ویروس‌هاو بگوموویروس‌ها، آغازگرهای عمومی توباموویروس‌ها و آغازگرهای اختصاصی ویروس موزاییک خیار بررسی شد که قطعه‌ای تکثیر نشد. آنالیز تبارشناسی جدایه‌های ایرانی نشان داد موقعیت جدایه‌های ایرانی در بین سایر جدایه‌ها متمایز است و این مساله احتمالا به‌دلیل منشأ جغرافیایی متفاوت آن می‌باشد (Oren *et al*., 2021). در حالت کلی جدایه‌های ایرانی بیشترین شباهت را به جدایه‌های مختلف هندی، اوگاندایی و ترکیه‌ای دارند. درخـت تبارزایی نشان داد توزیـع جغرافیـایی جدایه‌ها با هم هـم‌خـوانی زیادی ندارد و قرابـت فیلوژنتیکی یا هم‌گروه شدن بعضـی از جدایـه‌هـای ایرانی با جدایه‌هایی از منـاطق مختلـف جهان که در بعضی از شـاخه‌هـا دیـده مـی‌شـود همـاهنگی توزیـع جغرافیـایی بـا قرابـت فیلوژنتیک را بر هم می‌زند. این توزیع نشان می‌دهد که انتشار جهانی و گسترده فیتوپلاسماها نمی‌تواند تنها به‌وسیله ناقلین طبیعی صورت گیرد و این مسئله احتمال دخالت انسان و به بیان دیگر انتشـار و تجارت جهانی قلمه و نهال را تقویت می‌کند (Oren *et al*., 2021). نکته دیگری که بایستی در مورد تنوع جدایـه‌های ایرانی بیان کرد این است که این احتمال وجود دارد که جدایه‌های فیتوپلاسمایی موجود در فضای سبز شهر یزد بیش از یک‌بار به طرق مختلـف بـه مناطق مختلف ایران وارد شـده اسـت.

نتیجه‌گیری

برای نتیجه‌گیری بهتر تعیین ترادف چندین جدایه از مناطق مختلف کشور و از روی گیاهان دیگر نیز ضروری به نظر می‌رسد. این موضوع می‌تواند تهدید جدی برای سایر استان‌های همجوار و حتی سایر محصولات کشاورزی در این مناطق باشد. با توجه به گسترش فیتوپلاسما روی گیاهان مختلف در ایران، پیش‌بینی می‌شود که این عامل بیماری‌زا ناقل یا ناقلین حشره‌ای موثر در منطقه نیز داشته‌اند. در همین راستا مطالعه روی ناقلین و ارائه روش‌های مناسب برای مقابله با این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است (Tan *et al*., 2021). همچنین، در مناطق مورد بررسی امکان حضور سایر فیتوپلاسماهای مربوط به گروه‌های مختلف بر روی محصولات مختلف ضروری به نظر می‌رسد، که نیازمند تحقیقات بیشتر برای دستیابی به این مهم می‌باشد تا با تخمین پراکنش فیتوپلاسماها بر روی محصولات مختلف اقدامات لازم جهت کاهش خسارت برنامه‌ریزی گردد.

منابع

Ashnaei, M., Jamshidi, E. (2016, August). First report of association of a 16SrVI phytoplasma with pot marigold phyllody in Khorasan Razavi province. In *Iranian Plant Protection Congress* (pp. 27-30).

Amirmijani, A. R., Salari, M. R., Amirmijani, A., Khoshsohbat, M. S., Azadvar, M. (2020). First Report of Association of a 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'16SrII-D Related Phytoplasma with Geranium (Pelargonium hortorum) Little Leaf Disease in Iran. *Plant Disease*, *104*(10), 2723. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0561-PDN

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

Aldaghi, M., Bertaccini, A. (2015). Preliminary study on some ornamental plant phytoplasma diseases in north of Iran. *Phytopathogenic Mollicutes*, *5*(1s), S67-S68. http://dx.doi.org/10.5958/2249-4677.2015.00028.6.

Azimi, M., Mehrabi-Koushki, M., Farokhinejad, R. (2018). Association of two groups of phytoplasma with various symptoms in some wooden and herbaceous plants. *Journal of Phytopathology*, *166*(4), 273-282. https://doi.org/10.1111/jph.12684.

Amirmijani, A. R., Salari, M. R., Amirmijani, A., Khoshsohbat, M. S., Azadvar, M. (2020). First Report of Association of a 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'16SrII-D Related Phytoplasma with Geranium (Pelargonium hortorum) Little Leaf Disease in Iran. *Plant Disease*, *104*(10), 2723. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0561-PDN.

Babaie, G., Khatabi, B., Bayat, H., Rastgou, M., Hosseini, A., Salekdeh, G. H. (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.

Bertaccini, A., Arocha-Rosete, Y., Contaldo, N., Duduk, B., Fiore, N., Montano, H. G., Zamorano, A. (2022). Revision of the 'Candidatus Phytoplasma'species description guidelines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *72*(4), 005353. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005353.

Biswas, C., Dey, P., Satpathy, S. (2014). First report on molecular detection of a stolbur phytoplasma (Group16SrXII-A) associated with kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) in India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *47*(14), 1746-1751. https://doi.org/10.1080/03235408.2013.856549

Çağlar, B. K., Pehlivan, S., Atakan, E., Elbeaino, T. (2021). Maize (*Zea mays* L.): A New Host for Ligustrum witches' Broom Phytoplasma. *Pathogens*, *10*(6), 723. https://doi.org/10.3390/pathogens10060723

Chaturvedi, Y., Rao, G., Tiwari, A., Duduk, B., Bertaccini, A. (2010). Phytoplasma on ornamentals: detection, diversity and management. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, *45*(1), 31-69. https://doi.org/10.1556/aphyt.45.2010.1.3.

Duduk, B., Stepanović, J., Yadav, A., Rao, G. P. (2018). Phytoplasmas in weeds and wild plants. *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases*, 313-345. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3_11.

Esmailzadeh Hosseini, S. A., Salehi, M., Khanchezar, A., Shamszadeh, M. (2011). The first report of a phytoplasma associated with pot marigold phyllody in Iran. *Bulletin of Insectology*, *64*(Supplement), S109-S110.

Gibbs, A., Mackenzie, A. (1997). A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 63(1-2), 9-16. doi:10.1016/S0166-0934(96)02103-9. https://doi.org/10.1111/jph.12838.

Gholami, J., Ranjbar, R., Bahar, M., Choupannejad, R., Saed Moucheshi, S. (2018). Molecular detection and characterization of a stolbur phytoplasma associated with *Narcissus tazetta* phyllody in Iran. *Journal of Phytopathology*, *166*(5), 372-377. https://doi.org/10.1111/jph.12697

Hemmati, C., Nikooei, M., Bertaccini, A. (2019). Identification, occurrence, incidence and transmission of phytoplasma associated with *Petunia violacea* witches' broom in Iran. *Journal of Phytopathology*, *167*(10), 547-552. https://doi.org/10.1111/jph.12838

Hugenholtz, P., Chuvochina, M., Oren, A., Parks, D. H., Soo, R. M. (2021). Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data. *the ISME Journal*, *15*(7), 1879-1892. https://doi.org/10.1038/s41396-021-00941-x.

Jung, H. Y. (2023). Phytoplasma diseases in Korea. In *Diversity, Distribution, and Current Status* (pp. 233-248). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91896-1.00010-6.

Kumar, S., Singh, V., Lakhanpaul, S. (2012). First report of Mirabilis and Chrysanthemum little leaf associated with 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' in India. *Australasian Plant Disease Notes*, *7*, 71-73. https://doi.org/10.1007/s13314-012-0051-0

Mahapatra, B. S. Chinmay Biswas, Piyali Dey, Subrata Satpathy, Manoj Kumar, Pratik Satya. Bertaccini, A. (2018). Bertaccini, Phytoplasma diseases of medicinal and aromatic plants. *Journal of Plant Pathology*, 379-404. https://www.jstor.org/stable/44280481

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

Marcone, C., Franco-Lara, L., Toševski, I. (2018). Major phytoplasma diseases of forest and urban trees. *Phytoplasmas: Plant pathogenic bacteria-I: Characterisation and epidemiology of phytoplasma-associated diseases*, 287-312. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3_10.

Marcone, C., Bellardi, M. G., Bertaccini, A. (2016). Phytoplasma diseases of medicinal and aromatic plants. *Journal of Plant Pathology*, 379-404.

Mitrović, M., Marinković, S., Cvrković, T., Jović, J., Krstić, O., Jakovljević, M. (2022). Framework for risk assessment of 'Candidatus Phytoplasma solani'associated diseases outbreaks in agroecosystems in Serbia. *Journal of Plant Pathology*, *104*(2), 537-552. https://doi.org/10.1007/s42161-022-01055-9.

Mokbel, S. A., El-Attar, A. K. (2014). Effect of gamma irradiation on production of phytoplasma-free Hibiscus plantlets. *Egyptian J. Virol*, *11*(2), 35-45. https://doi.org/10.1111/aab.12810

Mokbel, S. A., El Attar, A. K., Farag, A. G. (2013). Detection and molecular characterization of phytoplasma associated with Hibiscus Witches'-Broom in Egypt. *Egyptian Journal of Virology*, *10*, 162-171. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056.

Movahedi-Parizi, F., Hosseinipour, A., Azadvar, M., Massumi, H. (2023). Molecular detection and identification of phytoplasmas associated with Catharanthus roseus, Pinus eldarica, and Petunia hybrida in southeastern Iran's urban green spaces. *Annals of Applied Biology*, *182*(2), 205-215. https://doi.org/10.1111/aab.12810.

Nikooei, M., Hemmati, C., Bagheri, A. (2017). Association of'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'with Cosmos bipinnatus phyllody disease in Iran. *Journal of plant protection research*. DOI: 10.1515/jppr-2017-0037

Omar, A. F., Alsohim, A. S. (2016). Identification of new plant hosts of 16SrII group phytoplasmas in Saudi Arabia. *Phytopathogenic Mollicutes*, *6*(2), 71-76. http://dx.doi.org/10.5958/2249-4677.2016.00017.7.

Oren, A., Garrity, G. M. (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *71*(10), 005056. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056.

Raj, S. K., Snehi, S. K., Kumar, S., Khan, M. S. (2009). First molecular detection and identification of a potyvirus associated with severe mosaic disease of amaryllis (*Hippeastrum hybridum* Hort.) in India. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1), 50-53. https://doi.org/10.1071/DN09021

Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D., Gillings, M. R. (1992). Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, 73(8), 2099-2103. doi:10.1099/0022-1317-73-8-2099

Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, 77(4), 340-347. doi:10.1094/pd-77-0340

Rao, G. P., Reddy, M. G., Ravi, M., Bahadur, A., Bertaccini, A. (2020). Confirmation of the association of an aster yellows phytoplasma with flat stem and witches' broom disease of Hibiscus cannabinus in the North East Region of India. *Pythopathogenic Mollicutes*, *10*(2), 152-157. http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.5958/2249-4677.2020.00019.5.

Rao, G. P. (2017). Phytoplasma diseases of ornamental plants: an Indian overview. *Journal of Ornamental Horticulture*, *20*(3and4), 87-102. http://dx.doi.org/10.5958/2249-880X.2017.00001.9.

Sardar, K. K., Bibekananda, B., Mitali, S., Safik, M. (2006). Yellow crown of mesta (*Hibiscus cannabinus* L.)-a new phytoplasmal disease in India. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, *36*(1), 38-39. CABI Record Number: 20073007297.

Sobolev, I., Weintraub, P. G., Gera, A., Tam, Y., Spiegel, S. (2007). Phytoplasma infection in the four o'clock flower (Mirabilis jalapa). *Bulletin of Insectology*, *60*(2), 281. http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.5958/2249-4677.2020.00019.5.

Tan, Y., Li, Q., Zhao, Y., Wei, H., Wang, J., Baker, C. J., Wei, W. (2021). Integration of metabolomics and existing omics data reveals new insights into phytoplasma-induced metabolic reprogramming in host plants. *PLoS One*, *16*(2), e0246203. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246203.

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

Tazehkand, S. A., Pour, A. H., Heydarnejad, J., Varsani, A., Massumi, H. (2010). Identification of phytoplasmas associated with cultivated and ornamental plants in Kerman province, Iran. *Journal of Phytopathology*, *158*(11-12), 713-720. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01682.x.

Tseng, Y. W., Chang, C. J., Chen, J. W., Deng, W. L., Jan, F. J. (2014). First report of a 16SrI group phytoplasma associated with roselle (*Hibiscus sabdariffa*) wrinkled leaves and phyllody disorder in Taiwan. *Plant Disease*, *98*(7), 991-991. https://doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1256-PDN.

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]

Flower and Ornamental Plants (2024), 9(1): 69-82
Research article

The first report on the detection and identification of phytoplasma pathogens associated with some ornamental plants of Yazd city

M. Salehzadeh[1*], A. Afsharifar [1], S. Dehghanpour Farashah[2]

1. Plant Virology Research Center, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2. Agriculture Department, Payame Noor University, Tehran, Iran.
✉ Mehrdadsalehzadeh@gmial.com
Received: 2023/12/23, Revised: 2024/03/02, Accepted: 2024/03/02

Abstract
In spring and summer 2023, a survey of plant samples from green spaces and ornamental greenhouses, along with adjacent weeds in Yazd City, showed symptoms likely linked to phytoplasma disease. Notable symptoms included stem flattening, phyllody, and yellowing observed in *Angelica archangelica*, *Ligustrum* sp., *Mirabilis jalapa*, and *Hibiscus cannabinus*. Five samples from each plant were sent to the Plant Virology Research Center at Shiraz University for DNA extraction via the CTAB method. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted using general primers (P1/P7) and nested primers (R16MF2/R16MR2) specific for phytoplasma. As expected, fragments of 1800 bp and 1250 bp were amplified with the general and nested primers, respectively. These fragments were excised from the gel, purified, and sent to Sinohe Company for sequencing. Comparison of the sequences with those in the NCBI database using BLAST showed that the phytoplasmas from *Angelica archangelica*, *Ligustrum* sp., *Mirabilis jalapa*, and *Hibiscus cannabinus* were closely related to Indian (MH393563.1; host: *Datura stramonium*; identity: 98.94%), Turkish (HE649495.1; host: *Ligustrum* sp.; identity: 99.24%), Ugandan (HE649495.1; host: *Hibiscus rosae*; identity: 99.14%), and Iranian (KX685880.1; host: *Eucalyptus* sp.; identity: 98.64%) isolates. A phylogenetic tree was created to compare Iranian isolates with similar global isolates using MEGA 8.0 software.
Keywords: Phylogenetic analysis, Ornamental plants, Yellowing, Phyllody.

[DOI: 10.61882/flowerjournal.9.1.69]