

سبب‌شناسی و انتقال فیتوپلاسمای همراه با فیلودی لوبیا چشم بلبلی از استان آذربایجان شرقی

سارا قارونی کاردانی^{*1} - الهام جمشیدی²

تاریخ دریافت: 1396/11/09

تاریخ پذیرش: 1397/01/26

چکیده

در بررسی‌های انجام شده از مزارع لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) استان آذربایجان شرقی در تابستان 1395، در برخی از بوته‌ها علائم ریز برگ، خشبی شدن برگ‌ها، فیلودی گل‌ها، ضخیم شدن و کنابی شدن ساقه، ازدیاد جوانه و کوتولگی بوته مشاهده شد. در گلخانه عامل بیماری به وسیله سس به پروانش انتقال داده شد و در پروانش مایه‌زنی شده علائم گل سبزی، برگسانی و کاهش فاصله میانگره‌ها ظاهر گردید. با استفاده از آغازگرهای عمومی P1/P7 و آغازگرهای آشیانه‌ای R16F2n/R16R2 در واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (پی سی آر) از کلیه نمونه‌های دارای علائم قطعات 1830 جفت باز در پی سی آر عمومی و 1245 جفت باز در پی سی آر آشیانه‌ای تکثیر شد. در حالی که در نمونه‌های گیاهان سالم، قطعه‌ای تکثیر نگردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مرز پس از همسانه‌سازی، تعیین ترادف گردید. جستجو با برنامه Blast، آنالیز فیلوژنتیکی و بررسی چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) محصول پی سی آر دو مرحله‌ای، با آنزیم‌های برشی *HinfI*, *RsaI*, *AluI*, *TaqI*, *HpaII* و مقایسه نقوش حاصله نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با فیلودی لوبیا چشم بلبلی بیشترین نزدیکی را با اعضای گروه افزولش شیدر (Clover proliferation group, 16SrVI) دارد. همچنین آنالیز توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار iPhyClassifier و انجام RFLP مجازی با استفاده از 17 آنزیم برشی، علاوه بر تأیید نتایج آنالیزهای RFLP فیزیکی و تبارزایی نشان داد که فیتوپلاسمای مورد بررسی در گروه 16SrVI-A (با ضریب تشابه 1) قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیکی، چند شکلی طولی قطعات برشی، فیتوپلاسمای لوبیا چشم بلبلی

(12)

مقدمه

استان آذربایجان شرقی یکی از مستعدترین نقاط شمال غرب کشور به لحاظ کشاورزی می‌باشد. حبوبات در سطح وسیعی در مزارع این استان کشت می‌شود و دارای اهمیت اقتصادی بالایی است. در سال‌های اخیر علائم ریزبرگی و فیلودی در مزارع حبوبات و بوته‌های لوبیا چشم بلبلی این استان فزونی یافته لیکن در رابطه با عامل بیماری اطلاعی در دست نیست.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های مشکوک به آلودگی

طی بازدید از مزارع کاشت لوبیا در استان آذربایجان شرقی (تبریز، قراملک، شبستر، نظرلو، جلفا، هادیشهر و سیه سران) در تابستان 1395، در مزارع تبریز، شبستر و نظرلو نمونه‌های گیاهی مشکوک به آلودگی فیتوپلاسمایی مشاهده شد. یک بوته مشکوک به آلودگی داخل گلدان قرار داده شد و به گلخانه منتقل گردید تا به عنوان منبع عامل بیماری در مطالعات انتقال عامل بیماری مورد استفاده قرار گیرد. سایر نمونه‌ها داخل پاکت‌های جداگانه قرار داده شدند و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در دمای 4°C و

فیتوپلاسمای پروکاریوت‌های فاقد دیواره سلولی هستند و عامل عمده محدودیت کشت بسیاری از گیاهان سبزی، صیفی، زینتی، زراعی و درختان شمر و غیرشمر می‌باشند (1، 13 و 22). این میکروارگانیسم‌ها محدود به آوندهای آبکشی گیاه بوده و به وسیله حشرات تغذیه کننده از آوندها انتقال می‌یابند (22).

این بیمارگر بر اساس ترادف ژن 16S rRNA و چند شکلی قطعات برشی (RFLP) حاصل از آن به 33 گروه تقسیم شده در هر گروه حداقل یک گونه *Candidatus phytoplasma* وجود دارد که بر اساس مشخصات بیولوژیکی، بیماری شناسی گیاهی و صفات ژنتیکی تعیین می‌شوند و هر گروه نیز شامل زیرگروه‌هایی است (1) و

1- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
(*) نویسنده مسئول: (Email: s.gharooni@areeo.ac.ir)
2- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

ای قالب با اجزاء یاد شده در مرحله دوم پی سی آر بکار برده شد. شرایط دمائی پی سی آر آشیانه‌ای مشابه قبل بود لیکن دمای اتصال آغازگرها 50 درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

آزمون چند شکلی طول قطعات برشی (RFLP) محصول پی سی آر آشیانه‌ای

هضم آنزیمی محصول پی سی آر با استفاده از آنزیم‌های *HinII*, *HpaII*, *RsaI*, *AluI*, *TaqI* طبق دستور شرکت سازنده آنها (Fermentas) انجام شد (12). محصولات RFLP در ژل آگارز 2 درصد الکتروفورز شدند و الگوهای بدست آمده از این روش با الگوهای موجود در منابع و الگوی بدست آمده از شاهد مثبت (8) مقایسه شد.

چند شکلی طولی قطعات برشی مجازی (Virtual RFLP) محصول پی سی آر آشیانه‌ای

با استفاده از برنامه *iPhyClassifier* در تارنمای <http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>، ناحیه تکثیر شده با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 در جدایه‌های آذربایجان شرقی و گروه‌های فیتوپلاسمایی (جدول 1) با 17 آنزیم شامل: *HaeIII*, *Sau3AI*, *MseI*, *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *HhaI*, *HinI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*، داده شد و جایگاه فیتوپلاسمای همراه با بیماری فیلودی لوبیا چشم بلبلی تعیین گردید (24).

همسانه‌سازی و تعیین ترادف

همسانه‌سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پی‌ام‌را، با استفاده از کیت *Ins T/A cloneTM PCR Cloning Kit (Fermentas)* طبق دستورالعمل شرکت سازنده در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T و سویه *DH5α* باکتری *Escherichia Coli* انجام شد. سپس پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) تعیین ترادف گردیدند. کلیه توالی‌های خوانده شده مربوط به هر جدایه با استفاده از نرم‌افزار *DNA Baser (V.3.2.5)* به یک توالی نهایی تبدیل شدند.

آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌ها و نزدیکی آنها ابتدا با گروه‌های فیتوپلاسمایی و سپس با زیرگروه‌های فیتوپلاسمایی (جدول 2) با استفاده از نرم‌افزار *Mega7* نسخه β و به روش الحاق همسایه‌ها با 1000 تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شد (10). از *Acholeplasma laidlawii* نیز به عنوان برون گروه استفاده گردید.

در طولانی مدت در دمای 20°C و یا به صورت خشک شده نگهداری شدند.

انتقال عامل بیماری از طریق سس به گیاه پروانش

عامل بیماری در گلخانه به کمک گیاه انگل سس به بوته‌های بذری پروانش انتقال داده شد. برای تهیه ریشه‌های سس (*Cuscuta campestris*) سالم، بذور این گیاه بر روی دستمال کاغذی مرطوب رشد داده شدند و ساقه‌های حاصل از جوانه‌زنی این بذور بر روی بوته‌های جوان پروانش منتقل گردیدند. سپس رشته‌های سس بر روی بوته لوبیا چشم بلبلی با علائم خشبی شدن برگ‌ها و فیلودی ارتباط داده شدند و پس از استقرار سس بر روی بوته آلوده، ارتباط آنها با گیاه مادری قطع شد. دو هفته پس از استقرار سس بر روی بوته‌های لوبیا با علائم فیلودی، ریشه‌ها به بوته‌های بذری پروانش متصل شدند. بعد از طی یک ماه این بوته‌ها عاری از سس شده و برای بروز علائم در شرایط رطوبتی و حرارتی مناسب در گلخانه و در زیر توری نگهداری شدند.

استخراج دی.ان.ای و واکنش زنجیره‌ای پی‌ام‌را

به منظور تعیین ماهیت عامل بیماری، استخراج دی.ان.ای با استفاده از بافر CTAB به روش ژانگ و همکاران از رگبرگ‌های برگ‌های دارای علائم ریز برگی، خشبی شدن برگ‌ها و فیلودی انجام شد (23).

از آغازگرهای عمومی

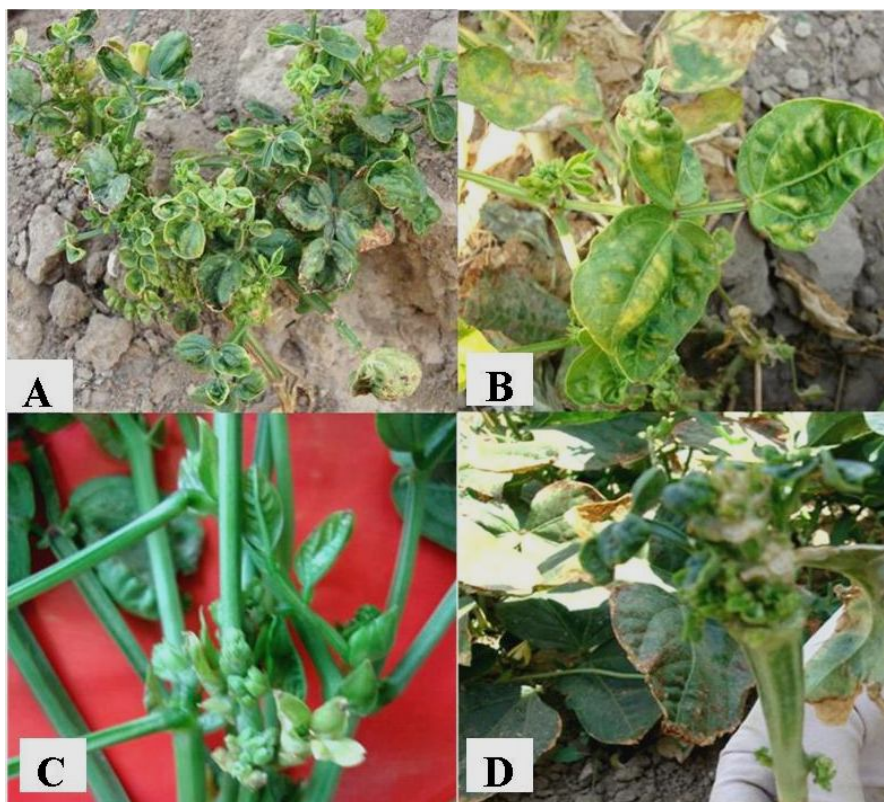
(AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT)P1 و P7 (CGTCCTTCATCGGCTCTT) (19) و آغازگرهای آشیانه‌ای (GAAACGACTGCTAAGACTGG) R16F2n و R16R2 (TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG) برای ردیابی عامل بیماری استفاده گردید (11).

در واکنش زنجیره‌ای پی‌ام‌را 1/5 میکرولیتر دی.ان.ای الگو با 2 میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت 5 پیکومول، 2/5 میکرولیتر بافر واکنش با غلظت 10 برابر، 1/25 میکرولیتر کلرید منیزیم 50 میلی‌مولار، 0/5 میکرولیتر مخلوط dNTPs (10 میلی‌مولار) و 0/25 میکرولیتر آنزیم *Taq DNA Polymerase* (با غلظت 5 واحد در میکرولیتر) در حجم نهائی 25 میکرولیتر مخلوط شد. پروفایل دمایی واکنش شامل 94°C به مدت 2 دقیقه بعنوان واسرشته‌سازی آغازین و به دنبال آن، 35 چرخه شامل 94°C به مدت 30 ثانیه، 55°C به مدت 90 ثانیه، 72°C به مدت 2 دقیقه و یک چرخه انتهایی به مدت 7 دقیقه در دمای 72°C به عنوان تکمیل پلیمریزاسیون بود. محصول این مرحله به نسبت 1:30 با آب مقطر استریل رقیق گردید و یک میکرولیتر از این رقت به عنوان دی.ان.

نتایج و بحث

فشرده و زرد رنگ با برگ‌هایی پیچیده، کوچک، خشبی و سخت نسبت به بوته‌های سالم هم شرایط داشتند (شکل 1). با استفاده از سس، عامل بیماری از بوته لوبیای آلوده به بوته‌های پروانش سالم منتقل شد و در پروانش‌های مایه‌زنی شده بعد از حدود یک ماه، علائم فیلودی ظاهر شد (شکل 2).

فیتوپلاسمای یکی از مهمترین بیمارگرهای گیاهی است که باعث کاهش میزان تولید چندین محصول اقتصادی می‌شود (3). در بوته‌های لوبیا چشم بلبلی آلوده، علائم کوچک ماندن، ضخیم شدن، چروکیدگی و بدشکلی برگ‌ها، سبز شدن گلبرگ‌ها، ضخیم شدن ساقه، عدم تشکیل میوه و کوتولگی مشاهده شد. بوته‌ها، ظاهری



شکل 1- علائم کوچک ماندن، ضخیم شدن، چروکیدگی و بدشکلی برگ‌ها (A و B)، سبز شدن گلبرگ‌ها (C)، کتابی شدن ساقه (D) در گیاه لوبیا چشم بلبلی آلوده به فیتوپلاسمای در مزارع استان آذربایجان شرقی

Figure 1- Symptoms of phytoplasma associated with phyllody cowpea showing little, thickened, wrinkled and malformed leaves (A,B), phyllody (C) and stem fasciation (D) collected from East Azarbaijan province

آنزیمی قطعه 1245 جفت بازی با آنزیم *AluI* قطعات 280، 700 و 150، با آنزیم *HinfI* قطعات 800 و 450، با آنزیم *HpaII* قطعات 850، 350 و 150، با آنزیم *RsaI* قطعات 700 و 500 و با آنزیم *TaqI* قطعات 800 و 380 جفت بازی تولید شد. مقایسه الگوی برشی بدست آمده با الگوهای موجود در منابع نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با فیلودی لوبیا چشم بلبلی در گروه افزولش شیدر (Clover proliferation group, 16SrVI) قرار می‌گیرد (24).

همچنین آنالیز RFLP مجازی قطعه 1245 جفت بازی نشان داد که فیتوپلاسمای عامل فیلودی لوبیا در استان آذربایجان شرقی

از نمونه‌های دارای علائم فیلودی و خشبی شدن برگ‌ها در آزمون‌های پی سی آر و پی سی آر آشیانه‌ای قطعات 1830 و 1245 جفت باز تکثیر شدند در حالی که از نمونه سالم بانندی سنتز نشد (شکل‌های 3 و 4). همانندسازی قطعه 1830 جفت باز، بوسیله آغازگرهای P1 و P7 و قطعه 1245 جفت باز به وسیله آغازگرهای R16F2n/R16R2 در لوبیای دارای علائم و فقدان آن در گیاه سالم نشان دهنده کننده آلودگی نمونه‌های لوبیا به فیتوپلاسمای بود. الگوی RFLP حاصل از قطعه تکثیر شده در پی سی آر آشیانه‌ای، در تمام جدایه‌ها، مشابه یکدیگر بود (شکل 5). از هضم

استرین رفرنس زیرگروه A از گروه 16SrVI (AY390261) مشابه و فیتوپلاسمای همراه با فیلودی لوبیا متعلق به زیر گروه 16SrVI-A می باشد (شکل 6).

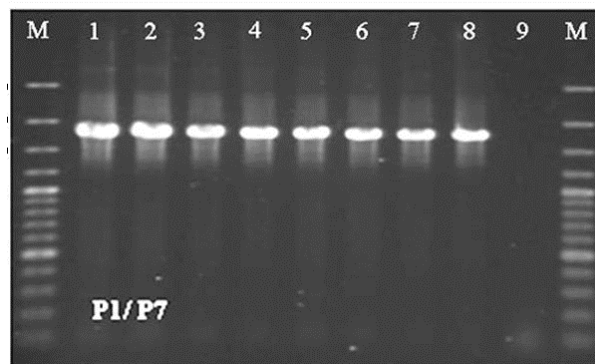
مشابه با گونه *Candidatus Phytoplasma trifolli* (GenBank accession: AY390261) می باشد. الگوی مجازی برش آنزیمی توالی حاصل از جدایه های توالی یابی شده (جدول 1) نشان داد که با



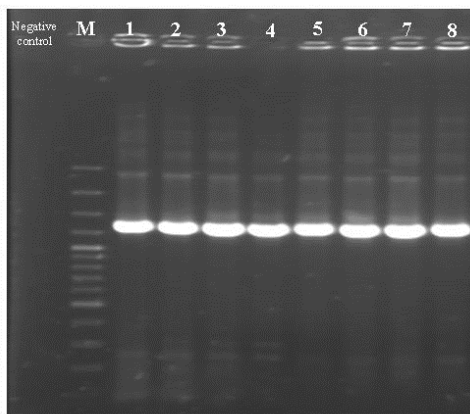
شکل 2- علائم فیلودی ناشی از انتقال فیتوپلاسمای همراه با فیلودی لوبیا چشم بلبلی از طریق سس به گیاه پروانش، بعد از یک ماه
Figure 2- Periwinkle plant infected by cowpea phyllody phytoplasma showing phyllody after one month

جدول 1- مشخصات جدایه های توالی یابی شده در تحقیق حاضر
Table 1- Characteristics of the sequences identified in this study

Isolates name نام جدایه	Location موقعیت	Host plant نام میزبان	GenBank acc No. رس شماره
Iranian vigna virescence phytoplasma isolate Nazarlou-182	Nazarlou, East Azarbayegan provinces نظرلو، آذربایجان شرقی	<i>Vigna unguiculata</i>	KC633092
Iranian vigna virescence phytoplasma isolate Shabestar	Shabestar, East Azarbayegan provinces شبهستر، آذربایجان شرقی	<i>Vigna unguiculata</i>	KC633093
Iranian vigna virescence phytoplasma isolate Tabriz-172	Tabriz, East Azarbayegan provinces تبریز، آذربایجان شرقی	<i>Vigna unguiculata</i>	KC633094



شکل 3- نقوش الکتروفورزی محصول پی سی آر با آغازگرهای P1/P7 از گیاهان لوبیا آلوده به فیتوپلاسمای در ژل آگارز یک درصد، ستون یک کنترل مثبت، 2-7 نمونه های لوبیا آلوده به فیتوپلاسمای، ستون 8 پروانش آلوده شده از طریق سس در گلخانه، ستون 9 کنترل منفی، M نشانگر 100bp
Figure 3- Result of electrophoresis of PCR product from cowpea infected by cowpea phyllody phytoplasma using P1/P7 phytoplasma specific primer pairs in 1 % agarose gel. Lane 1 positive control, lanes 2-7 infected cowpea, lane 8 infected Periwinkle by dodder in greenhouse, lane 9 negative control, M 100bp DNA ladder



شکل 4- نقوش الکتروفورزی محصول پی سی آر با آغازگرهای R16F2n/R16R2 از گیاهان لوبیا چشم بلبلی آلوده در ژل آگارز یک درصد، ستون اول از سمت چپ کنترل منفی، M نشانگر 100bp، ستون یک کنترل مثبت، ستون‌های 2-7 لوبیا چشم بلبلی آلوده به فیتوپلاسم، ستون 8 پروانش آلوده شده در گلخانه

Figure 4- Electrophoresis pattern of nested PCR using primer pairs R16F2n/R16R2 from infected cowpea in 1 % agarose gel. Left first lane negative control, M 100bp DNA ladder, lane 1 positive control, Lanes 2-7 infected cowpea, lane 8 infected Periwinkle by dodder in greenhouse

جدول 2- نام و شماره دسترسی گروه‌های فیتوپلاسمایی استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی

Table 2- List of Phytoplasmas with group designations and GenBank accession numbers used in phylogenetic study

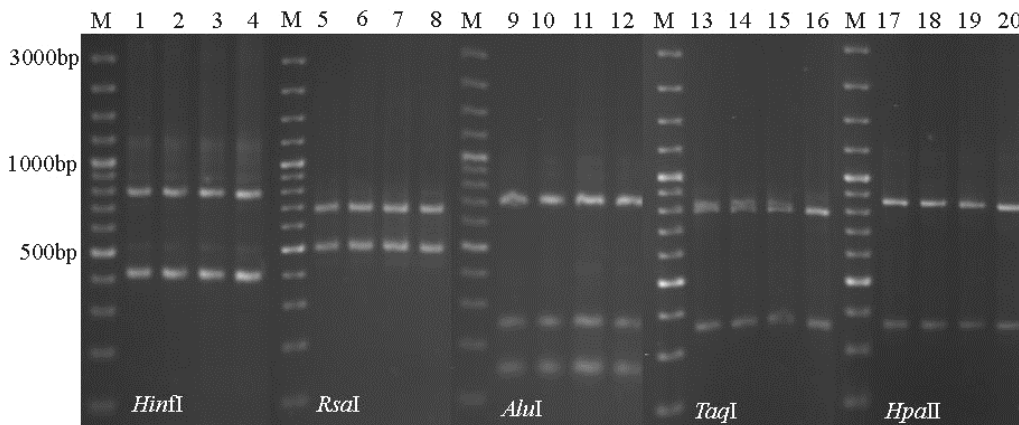
Phytoplasma	16S rRNA Group and subgroup	GenBank acc No.
Vinca virescence phytoplasma	16SrVI-A	AY500817
Strawberry multiplier disease	16SrVI-B	AF190224
Illinoise elm yellows	16SrVI-C	AF409070
Periwinkle little leaf	16SrVI-D	AF228053
Centarurea solstitialis virescence	16SrVI-E	AY270156
Catharanthus phyllody phytoplasma	16SrVI-F	EF186819
Portulaca little leaf phytoplasma	16SrVI-H	EF651786
'Candidatus Phytoplasma sudamericanum'	16SrVI-I	GU292081
'Candidatus Phytoplasma asteris'	16SrI	M30790
Behshahr(Iran) periwinkle phyllody	16SrVI-A	KC661072
Zanjan tomato big bud	16SrVI-A	KR150879
Khorasan Razavi tomato big bud	16SrVI-A	JF508509
'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'	16SrII	U15442
'Candidatus Phytoplasma trifolii'	16SrVI	AY390261
'Candidatus Phytoplasma fraxini'	16SrVII	AF092209
'Western X-disease'	16SrIII	L04682
'Candidatus Phytoplasma ulmi'	16SrV-A	AY197655
'Candidatus Phytoplasma australiense'	16SrXII	L76865
'Candidatus Phytoplasma palmae'	16SrIV	U18753
'Candidatus Phytoplasma luffae'	16SrVIII	AF086621
'Candidatus Phytoplasma cynodontis'	16SrXIV	AJ550984
'Candidatus Phytoplasma solani'	16SrXII	AF248959
'Candidatus Phytoplasma oryzae'	16SrXI	AB052873
'Candidatus Phytoplasma mali'	16SrX	AJ542541
'Vigna unguiculata' flat stem phytoplasma	16SrXIV-A	KY439870
Iranian potato witches-broom phytoplasma	16SrVI-A	FJ427295
Columbia Basin potato purple top phytoplasma	16SrVI	AY692279
'Vigna radiata' phyllody phytoplasma	16SrII-D	KY439871
Acholeplasma laidlawii	-----	M23932

کرد. میزان تشابه نوکلئوتیدی ترادف‌های به دست آمده از نمونه‌های توالی یابی شده در تحقیق حاضر با یکدیگر کاملاً مشابه

نتایج تعیین ترادف قطعه تکثیر شده با آغازگرهای P1/P7 ماهیت فیتوپلاسمایی عامل همراه با فیلودی لوبیا چشم بلبلی را مشخص

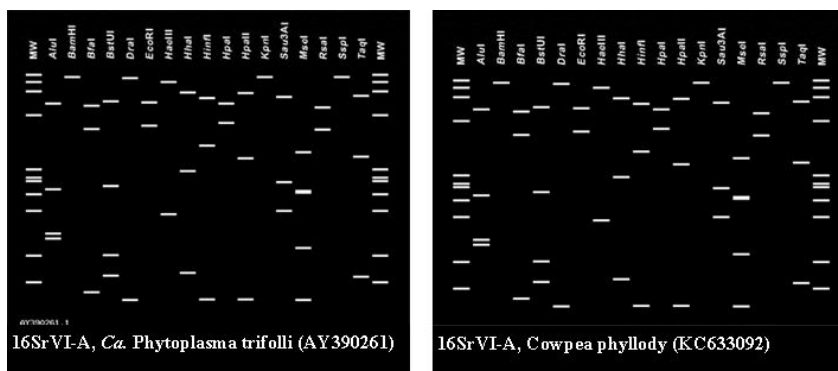
زمینی در ایران است (7).
آنالیز فیلوژنی نیز نشان داد که جدایه‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق متعلق به گروه 16SrVI بوده و دارای رابطه نزدیکی با *Vinca virescence* phytoplasma (AY500817) می‌باشد (شکل 7). در دندروگرام ترسیم شده بر اساس زیر گروه‌های موجود در گروه 16SrVI، فیتوپلاسمای عامل فیلودی لوبیا در ایران نیز دارای رابطه نزدیکی با اعضاء زیر گروه A از گروه 16SrVI بود (شکل 8).

بودند و ترادف سه نمونه از آنها تحت رس شماره‌های KC633092 تا KC633094 در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت شدند (جدول 1). از مقایسه ترادف‌های بدست آمده با ترادف موجود در بانک ژن بوسیله نرم‌افزار Blast مشخص شد که فیتوپلاسمای عامل فیلودی لوبیا دارای 99 درصد همولوژی با فیتوپلاسماهای *Vinca virescence* (AY500817) و *Columbia Basin potato purple* (AY692279) top است. همچنین فیتوپلاسمای عامل فیلودی لوبیا دارای 99% شباهت با فیتوپلاسمای عامل زردی کلم (17) و جارونی سیب



شکل 5- نقوش الکتروفورزی چند شکلی طولی (RFLP) محصول پی سی آر آشیانه‌ای با جفت آغازگر (R16F2n/R16R2) از شاهد مثبت و سه جدایه توالی‌یابی شده در تحقیق حاضر (جدول 1) به ترتیب از مناطق تبریز، نظرلو و شبستر با آنزیم‌های برشی *HinfI*, *RsaI*, *AluI*, *TaqI*, و *HpaII* ستون‌های ۱، ۵، ۹، ۱۳ و ۱۷ شاهد مثبت، M نشانگر 100b

Figure 5- RFLP pattern of nested PCR using R16F2n/R16R2 primer pair from positive control and three infected cowpea isolates (Table 1) from Tabriz, Nazariou and Shabestar with *HinfI*, *RsaI*, *AluI*, *TaqI*, and *HpaII* restriction enzymes; Lanes 1, 5, 9, 13 and 17 are positive control; M: 100bp DNA ladder



شکل 6- نقوش حاصل از RFLP مجازی با استفاده از نرم‌افزار iPhyClassifier بر اساس ترادف نوکلئوتیدی 1245 جفت باز از ژن آر. ان. ای ریبوزومی 16S فیتوپلاسمای همراه با فیلودی لوبیا چشم بلبلی توالی‌یابی شده در تحقیق حاضر (سمت راست) و فیتوپلاسمای مرجع زیر گروه 16SrVI-A (سمت چپ)

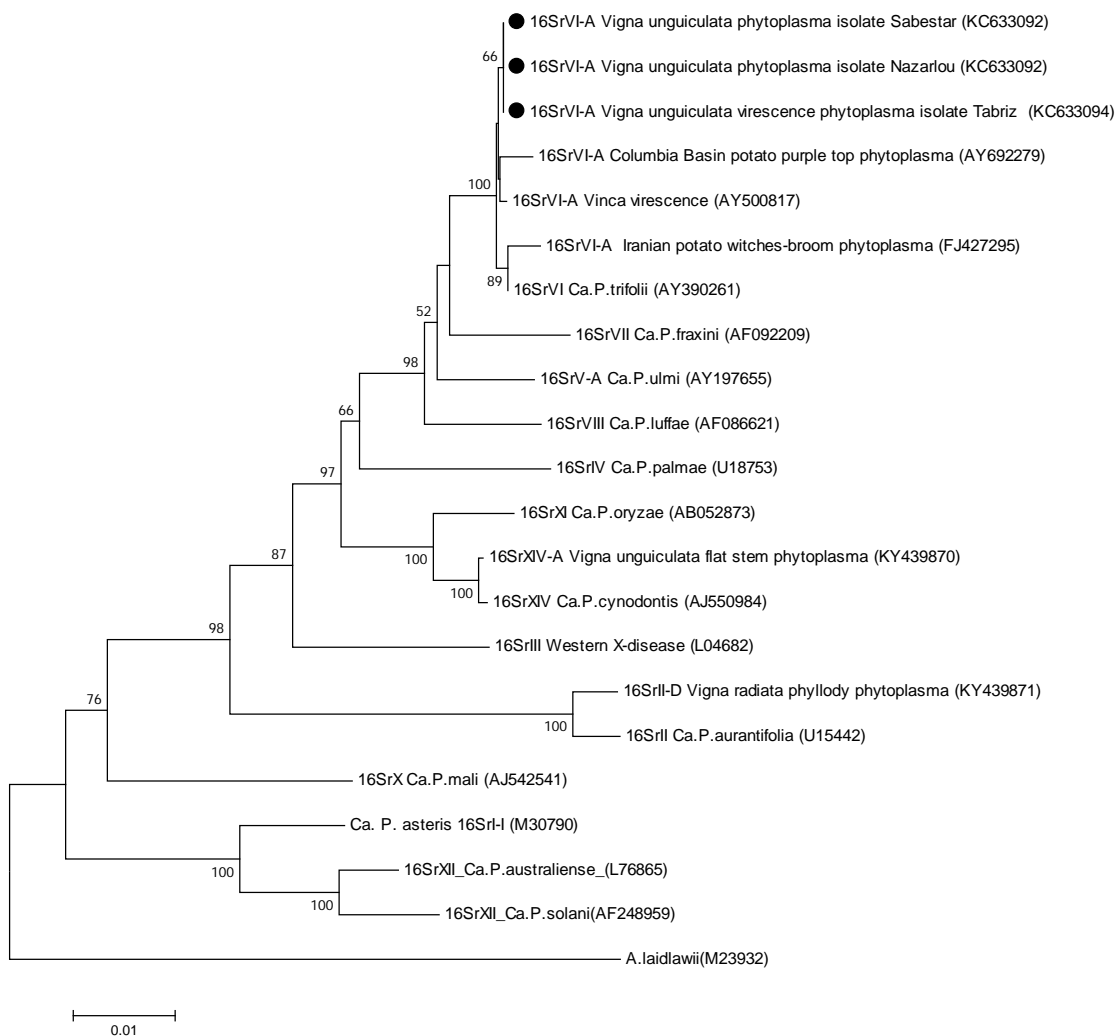
Figure 6- Virtual RFLP patterns of 1245 bp fragment of 16S ribosomal RNA gene from cowpea phyllody phytoplasma (Right) and reference isolate of 16SrVI-A subgroup of phytoplasmas (Left)

عنوان عامل بیماری فیتوپلاسمایی تورم جوانه گوجه فرنگی در

در ایران پیش‌تر فیتوپلاسماهایی از زیر گروه 16SrVI-A به

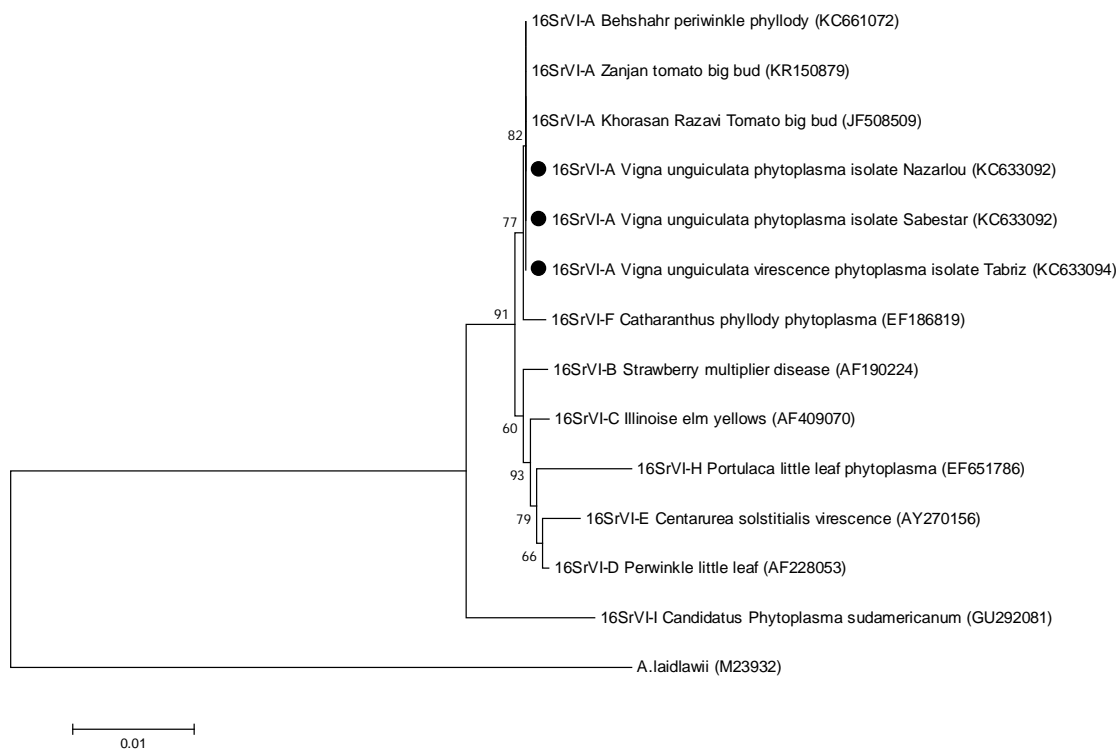
کوتولگی ذرت توسط زیبا دوست و همکاران از آذربایجان غربی گزارش شده است (25). بررسی حاضر اولین گزارش از وجود فیتوپلاسمای همراه با فیلودی لوبیا چشم بلبلی از مزارع لوبیا در ایران است.

استان‌های آذربایجان شرقی، خراسان رضوی، کرمانشاه، کردستان (8)، زنجان (16)، آذربایجان غربی (25)، فیتوپلاسمای جاروئی سیب زمینی (7)، فیلودی پروانش در مازندران (5)، فیلودی خیار از خراسان شمالی (6)، یزد (4) و آذربایجان غربی (25) گزارش شده‌اند. همچنین اخیراً ذرت نیز به عنوان میزبان طبیعی جدید بیماری فیتوپلاسمایی زردی و



شکل 7- دندروگرام رسم شده در برنامه Mega7 با استفاده از الگوریتم الحاق همسایه‌ها Neighbor-joining (Bt × 1000) بر اساس توالی بخشی از ناحیه 16S، توالی کامل ناحیه جداکننده (SR) و قسمتی از 23S برای تعیین نزدیکی سه جدایه توالی یابی شده در تحقیق حاضر (جدول 1) که با علامت • مشخص شده‌اند با سایر گروه‌های فیتوپلاسمایی. *Acholeplasma laidlawii* به عنوان برون گروه انتخاب شده است. شماره دسترسی مربوط به هر جدایه در جدول 2 آورده شده است

Figure 7- A neighbor-joining tree (Bt × 1000) constructed by Mega7 program using the 16S rRNA, intergenic spacer region (SR) and portion of 23S rRNA of three phytoplasma strains (Table 1) used in this study (shown with •) associated with some phytoplasmas groups selected phytoplasmas from GenBank. The sequence of *Acholeplasma laidlawii* served as an out group. See Table 2 for abbreviations and accession numbers



شکل 8- دندروگرام رسم شده در برنامه Mega7 با استفاده از الگوریتم الحاقی همسایه‌ها Neighbor-joining (Bt × 1000) بر اساس زیر گروه‌های گروه فیتوپلاسمایی 16SrVI. جدایه‌های توالی‌یابی شده در تحقیق حاضر که با علامت ● مشخص شده‌اند. *Acholeplasma laidlawii* به عنوان برون گروه انتخاب شده است. شماره دسترسی مربوط به هر جدایه در جدول 2 آورده شده است

Figure 8- A neighbor-joining tree (Bt × 1000) constructed by Mega7 program using subgroups of 16SrVI group. Strains used in this study (showed with ●). The sequence of *Acholeplasma laidlawii* served as an out group. See Table 2 for abbreviations and accession numbers

شناسایی دیگر میزبان‌های آن که از نظر اپیدمیولوژی و کنترل این بیماری اهمیت دارد باید مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد. گروه 16SrVI از نظر تعداد اعضا، اهمیت اقتصادی و گسترش، یکی از گروه‌های مهم فیتوپلاسمایی است (5). تاکنون فیتوپلاسماهایی از این گروه به عنوان عامل بیماری در درختان، سبزیجات، گیاهان زینتی و زراعی و علف‌های هرز (1 و 21) گزارش شده است. همراهی فیتوپلاسمایی از زیر گروه 16SrVI-A در گیاه لوبیا در این استان نشان می‌دهد که احتمالاً سایر بیماری‌های فیتوپلاسمایی در استان آذربایجان شرقی قابل ردیابی است.

تا بحال از سایر نقاط جهان، فیتوپلاسماهایی از دیگر گروه‌ها و زیر گروه‌های آر.ان.ای ریپوزومی، همراه با لوبیا چشم بلبلی شامل B-16SrI، 16SrXIV-A و 16SrII-D از بوته‌های لوبیا چشم بلبلی در هندوستان (9، 15، 20) و گروه‌های 16SrV (2) و 16SrXII-B از استرالیا (18) گزارش شده‌اند. همچنین از گروه 16SrVI-A لوبیا معمولی (*Phaseolus vulgaris*) از آمریکا گزارش شده است (14).

به دلیل ماهیت فیتوپلاسمایی و کاهش محصول در بوته‌های آلوده و در نتیجه پتانسیل انتقال با ناقل (ناقلین) هوایی، تحقیق بیشتر جهت تعیین میزان پراکنش این فیتوپلاسمای در سایر نقاط کشور،

منابع

- Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S., and Contaldo N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *America Journal of Plant Science*, 5:1763-1788.
- De La Rue S., Padovan J., and Gibb K. 2001. *Stylosanthes* is a host for several phytoplasmas, one of which shows unique 16S 23S intergenic spacer region heterogeneity. *Journal of Phytopathology*, 149, 613-619.
- Deeley J.W., Stevens A., and Fox R.T.V. 1979. Use of Dienes's stain to detect plant diseases induced by

- mycoplasma like organisms. *Phytopathology*, 69:1169-1171.
- 4- Esmailzadeh Hosseini S.A., Salehi M., Mirchenari S.M., Tarizeh D., and Gholampoor H. 2015. First report of a 16SrVI group related phytoplasma associated with cucumber phyllody in a greenhouse in Iran. *New Disease Report*, 32:35.
 - 5- Fattahi M., Salehi M., Sharzehi A., and Esmailzadeh Hosseini S.A. 2016. Partial biological and molecular characteristics of a phytoplasma associated with Behshahr (Mazandaran) periwinkle phyllody. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52(1), Pages 135-141. (In Persian with English abstract).
 - 6- Gharouni Kardani S., and Jamshidi E. 2018. First report of 16SrVI group phytoplasma on cucumber (*Cucumis sativus*) in North Khorasan province of Iran. International conference on Agricultural Science, Medicinal Plants and Traditional medicine. Mashhad. Iran (In Persian with English abstract).
 - 7- Hosseini P., Bahar M., Madani G., and Zirak L. 2011. Molecular Characterization of a Phytoplasma Associated with Potato Witches-broom Disease in Iran. *Journal of Phytopathology*, 159:120-123.
 - 8- Jamshidi E., Jafarpour B., Rouhani H., and Salehi M. 2014. Association of members of clover proliferation (16SrVI) and pigeon pea witches' broom (16SrIX) phytoplasma groups with tomato big bud disease in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 50:79-89.
 - 9- Kumar S., Singh V., and Lakhanpaul S. 2012. A '*Candidatus* Phytoplasma asteris' isolate associated with bud proliferation disease of cowpea in India. *New Disease Reports*, 25, 28.
 - 10- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33:1870-1874.
 - 11- Lee I.M., Hammond R.W., Davis R.E., and Gundersen D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842.
 - 12- Lee I.M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., and Bartoszyk I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153-1169.
 - 13- Lee I.M., Davis R.E., and Gundersen-Rindal D.E. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54, 221-55.
 - 14- Lee I.M., Bottner K.D., Miklas P.N., and Pastor-Corrales M.A. 2004. Clover proliferation group (16SrVI) subgroup A (16SrVI-A) phytoplasma is a probable causal agent of dry bean phyllody disease in Washington. *Plant Disease*, 88:429.
 - 15- Rao G.P., Madhupriya Kumar M., Tomar S., Maya B., Singh S. K., and Johnson J.M. 2018. Detection and identification of four 16Sr subgroups of phytoplasmas associated with different legume crops in India. *European Journal of Plant Pathology*, 150: 507-513.
 - 16- Salehi E., Salehi M., and Masoumi M. 2016. Biological and molecular characterization of the phytoplasma associated with tomato big bud disease in Zanjan province, Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 52 (3):415-427. (In Persian with English abstract).
 - 17- Salehi M., Izadpanah K., and Siampour M. 2007. Characterization of a phytoplasma associated with cabbage yellows in Iran. *Plant Disease*, 91: 625-630.
 - 18- Saqib M., Bayliss K.L., and Jones M.G.K. 2006. Identification of sweet potato little leaf phytoplasma associated with *Vigna unguiculata* Var. *sesquipedalis* and *Lycopersicon esculentum*. *Australasian Plant Pathology*, 35, 293-296.
 - 19- Schneider B., Seemuller E., Smart C.D., and Kirkpatrick B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG. (eds) *Molecular and diagnostics procedures in Mycoplasmaology*, Vol I. San Diego, CA, Academic Press, pp 369-380.
 - 20- Thorat V., Bhale U., Sawant V., More V., Jadhav P., Mane S.S., Nandanwar R.S., Tripathi S., and Yadav A. 2016. Alternative weed hosts harbors 16SrII group phytoplasmas associated with little leaf and witches' broom diseases of various crops in India. *Phytopathogenic Mollicutes*, 6(1), 50-55.
 - 21- Wei W., Lee I.M., Davis R.E., Suo X., and Zhao Y. 2007c. Virtual RFLP analysis of 16S rDNA sequences identifies new subgroups in the clover proliferation phytoplasma group. *Bulletin of Insectology*, 60:349-350.
 - 22- Weintraub P.G., Jones P., (eds). 2010. *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* CAB International. 348 pages.
 - 23- Zhang Y.P., Uyemoto J.K., Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Virology Method*, 71: 45-50.
 - 24- Zhao Y., Wei W., Lee I.M., Shao J.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 Systemic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2582-2593.
 - 25- Zibadoost S., Rastgou M., Asghari S., Tazehkand S.A. 2016. Detection and molecular identification of '*Candidatus* phytoplasma trifoli' infecting some cultivated crops and vegetables in West Azarbaijan province. *Australasian Plant Disease Notes*, 11: 3.

Arch