



## خصوصیات مولکولی و بیولوژیکی عامل فیتوپلاسمای فیلودی پروانش در داراب و استهبان (استان فارس)

گلنوش شایگان<sup>۱</sup>، محمد صالحی<sup>۲</sup>، ساسان قاسمی<sup>\*</sup>

(۱) گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز

(۲) مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز

sassan.ghasemi@iau.ac.ir (\*)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۴

### چکیده

علائم فیلودی در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) در شهرستان های داراب و استهبان (استان فارس) مشاهده گردید. به منظور شناسایی عامل بیماری، انتقال بیماری از طریق پیوند و سس (*Cuscuta* sp.) بررسی شد و آزمون های مولکولی با استفاده از واکنش های PCR مستقیم (P1/P7) و Nested PCR (R16F2n/R16R2) انجام گرفت. محصول تکثیر شده با طول تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز از ژن 16S rRNA تعیین توالی شد. نتایج هم تراز و آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه های مورد بررسی به گروه فیتوپلاسمایی 16SrIX تعلق دارند و بیشترین شباهت را با زیرگروه 16SrIX-C نشان می دهند. بر اساس یافته های این پژوهش، برای افزایش دقت طبقه بندی و شناخت تنوع ژنتیکی، استفاده از نشانگرهای مکمل از قبیل *secY*، *tuf* و *imp* و نیز رویکرد چندلکسی (MLST) توصیه می شود. نتایج نشان داد گیاه پروانش می تواند به عنوان مخزن بالقوه آلودگی در مناطق مختلف استان فارس مطرح باشد.

واژه های کلیدی: پروانش، فیلودی، فیتوپلاسم، Nested PCR، 16SrIX، MLST

### مقدمه

پروانش (*Catharanthus roseus*) یکی از گیاهان زینتی و دارویی مهم در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است و به عنوان میزبان شاخص در شناسایی و مطالعه فیتوپلاسمها شناخته می شود (Zirak et al., 2021). فیتوپلاسمها گروهی از باکتری های دیواره ندار، اجباری و محدود به آوندهای آبکش هستند که عامل طیف وسیعی از بیماری ها در محصولات کشاورزی و گیاهان زینتی محسوب می شوند (Cho et al., 2020). این عوامل از طریق ناقلان حشره ای از خانواده Cicadellidae و نیز از طریق پیوند و سس منتقل می شوند (Gundersen & Lee, 1996).

در دهه های اخیر، مطالعات متعددی در ایران و سایر کشورهای منطقه (از جمله ترکیه، هند و چین) حضور گروه های مختلف فیتوپلاسمایی را در گیاهان مختلف گزارش کرده اند که گروه ۱۶SrIX یکی از مهم ترین و شایع ترین آن ها در گیاهان زینتی به شمار می رود (Wang et al., 2024; Kiss et al., 2024). با وجود گزارش هایی از حضور این گروه در برخی مناطق کشور، اطلاعات دقیقی درباره تنوع ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیکی جدایه های جنوبی ایران وجود ندارد (Zirak et al., 2021).

با توجه به اهمیت فیتوپلاسمای گروه 16SrIX در اپیدمیولوژی بیماری‌های گیاهی و نقش گیاهان زینتی در چرخه‌ی انتقال آن‌ها، هدف از این پژوهش شناسایی مولکولی عامل فیتوپلاسمای فیلودی در گیاه پروانش در شهرستان‌های داراب و استهبان و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی آن با استفاده از نشانگر ژن 16S rRNA و مقایسه با گروه‌های مرجع موجود در پایگاه داده‌های ژنتیکی بود.

## مواد و روش‌ها

### \* جمع آوری نمونه:

به منظور جستجوی بیماری‌های فیتوپلاسمایی در سال ۱۳۹۰ از پارکها و فضاهای سبز شهرستان‌های داراب و استهبان از پروانسه‌های کشت شده بازدید به عمل آمد. در هر شهرستان ۵ بوته پروانش دارای علائم بیماری فیتوپلاسمایی به ویژه علائم گل‌سبزی، فیلودی و جاروک انتخاب و پس از نشاء در گلدانهای سفالی به یک گلخانه عاری از حشرات انتقال داده شد تا از این گیاهان بعنوان منبع عامل بیماری برای مطالعات بیولوژیکی و مولکولی استفاده شود.

### \* انتقال از طریق پیوند:

از پروانش‌های دارای علائم يك شاخه كوچك با ۲ تا ۳ برگ كه در عین داشتن علائم تیپيك آلودگی، دچار زوال و پلاسیدگی نشده بود به عنوان پیوندك انتخاب و روی يك بوته سالم پروانش به روش جانبی پیوند گردید. موضع پیوند با پارافيلم بسته و گیاه پیوند شده در کیسه پلاستیکی شفافی قرار داده شد. با این روش عامل بیماری از هر بوته دارای علائم به ۵ بوته سالم و همسن پروانش انتقال داده شد. آلودگی گیاهان مایه زنی شده توسط آزمون nested PCR نیز بررسی گردید.

### \* انتقال از طریق سس:

جهت انتقال فیتوپلاسمای گیاهان پروانش آلوده به بادمجان ابتدا رشته‌هایی از سس سالم موجود روی چغندر قند به بوته‌های بادمجان سالم وصل شد. پس از استقرار سس بر روی بادمجان‌های سالم این بوته‌ها بادمجان بطور جداگانه در مجاورت پروانش مذکور قرار گرفت تا سس آلوده به فیتوپلاسمای گیاه بادمجان و پروانش وصل شود. پس از گذشت حدود چهار هفته سس از بادمجان و پروانش مورد آزمایش جدا شد. آلودگی بادمجان و پروانش مایه زنی شده به فیتوپلاسمای در آزمون nested PCR بررسی گردید.

### \* استخراج دی.ان.ای کل و PCR:

استخراج دی.ان.ای. از نمونه‌های گیاهی آلوده به فیتوپلاسمای گیاهان سالم با روش ژانگ و همکاران انجام شد (Zhang et al., 1998). آزمون PCR مستقیم به منظور تعیین آلودگی نمونه‌های دی.ان.ای. کل استخراج شده به فیتوپلاسمای انجام شد. در این آزمون از جفت آغازگرهای P1/P7 استفاده شد. (Schneider et al., 1995). حجم نهایی مخلوط واکنش PCR مستقیم ۲۵ میکرولیتر برای هر لوله در نظر گرفته شد. در PCR دو مرحله‌ای از محصول PCR مستقیم به عنوان دی.ان.ای الگو برای PCR دو مرحله‌ای با جفت آغازگر R16F2n/R16R2 (دور دوم) استفاده گردید (Gunderson & Lee, 1996). حجم نهایی مخلوط واکنش PCR دو مرحله‌ای ۵۰ میکرولیتر برای هر لوله در نظر گرفته شد. محصول PCR توسط الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد آنالیز گردید. سپس از باندهای دی.ان.ای به وسیله اتیدیوم بروماید و UV عکسبرداری شد.

### \* تعیین ترادف و آنالیزهای مولکولی محصول PCR دومرحله ای:

محصول PCR دومرحله ای (۱۲۰۰ جفت باز از ژن ار.ان.ای ریپوزومی 16S) برای تعیین ترادف و آنالیزهای بعدی مستقیماً به کره جنوبی (شرکت Bioneer South Korea) ارسال شد. از ترادف بدست آمده و برنامه BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) برای نشان دادن نزدیکترین فیتوپلاسمها به فیتوپلاسمهای مورد مطالعه استفاده گردید.

### \* آنالیز فیلوژنتیکی:

هم‌ردیف سازی ۱۲۰۰ جفت باز از ژن ار.ان.ای ریپوزومی 16S فیتوپلاسمهای فیلودی پروانش داراب و استهبان و ترادفهای مشابه در چند فیتوپلاسمها به عنوان نماینده های گروه‌های مختلف و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup (جدول یک) انجام شد. با استفاده از نرم افزار ClustalX گزینه MegAlign درخت فیلوژنتیکی رسم گردید. بعد از جستجو با برنامه بلاست و آنالیز فیلوژنتیکی هم‌ردیف سازی ۱۲۰۰ جفت باز از ژن ار.ان.ای ریپوزومی فیتوپلاسمهای عامل فیلودی پروانش داراب و استهبان با فیتوپلاسم‌هایی از زیرگروه‌های گروه مربوطه انجام گردید تا جایگاه این فیتوپلاسمها در بین زیرگروه‌ها نیز مشخص شود.

### \* چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) مجازی:

با استفاده از برنامه iphyclassifier مطابق روش (Zhae et al. 2009) و ۱۷ آنزیم برشی شامل AluI, BamHI, BfaI, BstUI, DraI, EcoRI, HaeIII, HhaI, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, Sau3AI, MseI, RsaI, HaeIII, SspI و TaqI ناحیه تکثیری جفت آغازگر R16F2n/R16R2 در فیتوپلاسمهای عامل فیلودی پروانش داراب و استهبان و فیتوپلاسمهای موردنظر برش داده شد و نقوش حاصل با یکدیگر مقایسه شدند.

## نتایج

### \* انتقال به وسیله پیوند و سس:

عامل بیماری فیلودی پروانش استهبان و داراب با استفاده از پیوند از تمامی بوته های پروانش دارای علائم در استهبان و داراب به پروانش سالم انتقال داده شد. حداقل دوره نهفتگی در یکی از جدایه های داراب حدود ۴۰ روز بعد از مایه زنی بود. علائم گل سبزی و فیلودی به ندرت در پروانش های مایه زنی شده با جدایه های استهبان ظاهر شد. در پروانش های مایه زنی شده با جدایه های داراب علائم گل سبزی، فیلودی، زردی، کاهش فاصله میانگره ها و جاروک ظاهر شد. ریزبرگی ناشی از جدایه های داراب در مقایسه با ریزبرگی ناشی از جدایه های استهبان کمتر بود. با استفاده از سس عامل جدایه استهبان به بادمجان سالم حاصل از بذر انتقال داده شد و در بادمجان مایه زنی شده علائم گل سبزی، ریزبرگی و کوتولگی ظاهر شد (شکل ۱). در هیچکدام از بوته های بادمجان مایه زنی شده با جدایه های داراب علائم بیماری دیده نشد و واکنش آنها در PCR منفی بود.

**جدول ۱-** نام فیتوپلاسمهای مورد استفاده، گروه ها، زیرگروه ها و شماره های مربوطه

**Table 1.** Names of the phytoplasmas used, their groups, subgroups, and corresponding accession numbers

| Phytoplasma strain                                 | 16Sr group | Accession number |
|----------------------------------------------------|------------|------------------|
| <i>Ca. P. asteris</i> , aster yellows (MAY)        | 16SrI      | M30790           |
| <i>Ca.p.aurantifolia</i> (WBDL)                    | 16SrII     | U15442           |
| Western X-disease (WX)                             | 16SrIII    | AF533231         |
| Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)                  | 16SrIV     | AF498307         |
| <i>Ca. P. ulmi</i> , elm yellows (EY)              | 16SrV      | AY197655         |
| <i>Ca. P. trifolii</i> , clover proliferation (CP) | 16SrVI     | AY390261         |
| <i>Ca. P. fraxini</i> , ash yellows (AshY)         | 16SrVII    | AF092209         |
| Loofah witches' broom (LufWB)                      | 16SrVIII   | AF086621         |
| <i>Ca.P.phoenicium</i> ,almondwitchesbroom(AIWB)   | 16SrIX     | AF515636         |
| <i>Ca. P. mali</i> , apple proliferation (AP)      | 16SrX      | AJ542541         |
| <i>Ca. P. oryzae</i> , rice yellow dwarf (RYD)     | 16SrXI     | AB052873         |
| <i>Ca. P. australiense</i> (AUSGY)                 | 16SrXII    | L76865           |
| Mexican periwinkle virescence (MPV)                | 16SrXIII   | AF248960         |
| <i>Ca. P. cynodontis</i> (BGWL)                    | 16SrXIV    | AJ550984         |
| <i>Ca. P. brasiliense</i> (HibWB)                  | 16SrXV     | AF147708         |
| Pigeon pea witches' broom phytoplasma (PPWB)       | 16SrIX-A   | AF248957         |
| <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> strain 21        | 16SrIX-B   | AF515637         |
| <i>Picris echinoides</i> yellows phytoplasma       | 16SrIX-C   | Y16389           |
| <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> strain 4         | 16SrIX-D   | AF515636         |
| Juniper witches' broom phytoplasma (JWB)           | 16SrIX-E   | GQ925918         |
| <i>Ca. P. phoenicium</i> MarN27-2                  | 16SrIX-F   | HQ407532         |
| <i>Ca. P. phoenicium</i> FegA1-1                   | 16SrIX-G   | HQ407514         |
| Estahban periwinkle phyllody (EPP)                 | 16SrIX-C   | kc332293         |
| Darab periwinkle phyllody (DPP)                    | 16SrIX-C   | kc332292         |



**شکل ۱-** پروانش مایه زنی شده با عامل فیلودی پروانش استهبان

**Figure 1.** Periwinkle affected with Estahban phyllody agent



**شکل ۲-** علائم فیلودی و گل سبزی در پروانش مایه زنی شده با عامل فیلودی پروانش داراب

**Figure 2.** Phyllody and virescence symptoms of Darab periwinkle

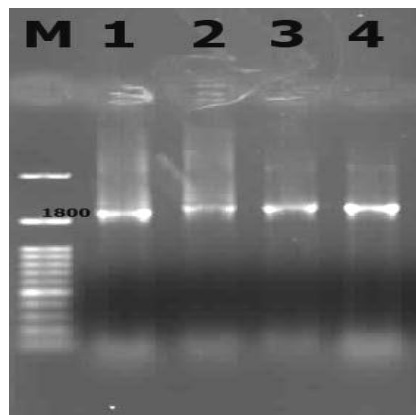


**شکل ۳-** علائم گل سبزی و کوتولگی در بادمجان مایه زنی با عامل فیلودی پروانش استهبان

**Figure 3.** Floral virescence and stunting of inoculated eggplant with Estahban periwinkle phyllody agent

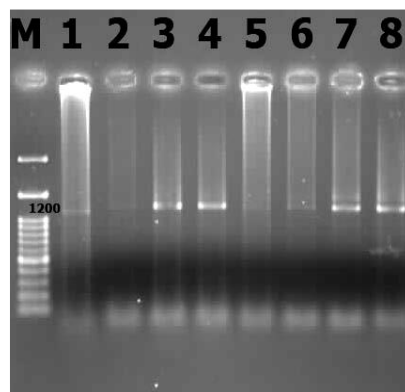
### \* آزمون PCR:

در آزمون PCR مستقیم و دومرحله ای قطعه مورد انتظار به ترتیب ۱۸۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز در نمونه های دی.ان.ای کل نمونه های دارای علائم در طبیعت، پروانسه های مایه زنی شده و دارای علائم و بادمجان دارای علائم مایه زنی شده با عامل فیلودی پروانش استهبان تکثیر شد. تحت همین شرایط در نمونه های دی.ان.ای گیاهان سالم هیچگونه باندی مشاهده نگردید (شکل های ۴ و ۵).



**شکل ۴-** نمونه ای از الکتروفورز محصول PCR مستقیم با جفت آغازگر P1/P7. چاهک های ۱ و ۲ نمونه های پروانش دارای علائم آلودگی در داراب، چاهک های ۳ و ۴ نمونه های دارای علائم آلودگی در استهبان و M، مارکر ۱۰۰ جفت بازی

**Figure 4.** Amplification of phytoplasmal DNA from phyllody-affected periwinkle by PCR using P1/P7 primer pair. M, DNA ladder; lanes 1 and 2 affected Darab periwinkle, lane 3 and 4 affected Estahban periwinkle

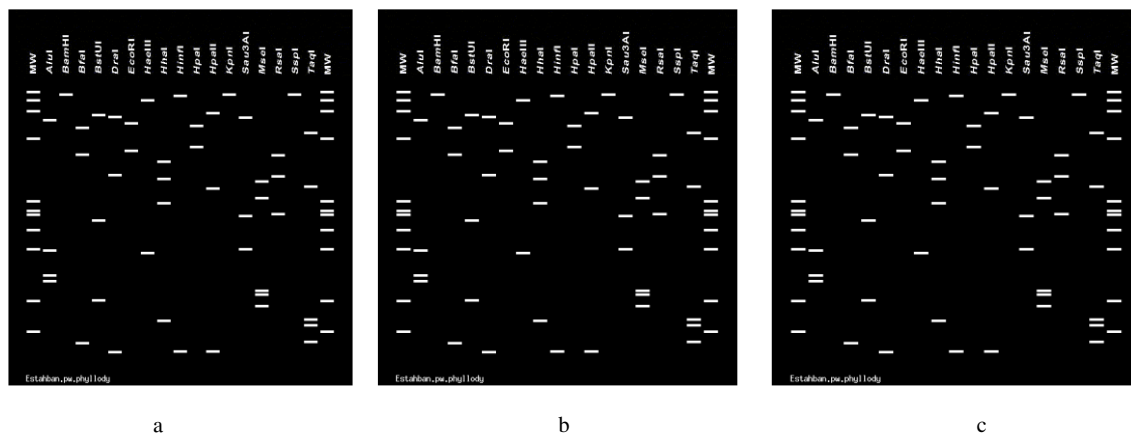


**شکل ۵-** نمونه ای از الکتروفورز محصول PCR دومرحله ای با جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2 چاهک های ۱ و ۵ به ترتیب نمونه های آب مقطر و پروانش سالم، چاهک های ۲ و ۳ نمونه های پروانش مایه زنی شده با دو جدایه از فیلودی پروانش داراب و ۴ و ۸ چاهک های پروانش های مایه زنی شده با دو جدایه فیلودی پروانش استهبان، چاهک ۶ نمونه بادمجان فاقد علائم و چاهک ۷ نمونه بادمجان دارای علائم مایه زنی شده با جدایه استهبان، چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت بازی

**Figure 5.** Electrophoresis pattern of 16S rDNA fragments (1.2 kbp) amplified by nested PCR using P1/P7 and R16F2n/R16R2 primer pairs from phyllody-affected Darab periwinkle (lanes 2 and 3), phyllody affected Estahban periwinkle (lanes 4 and 8), lanes 6 non-affected eggplant and lane 7 affected eggplant with Estahban strain, Lanes 5 healthy periwinkle, lane M, DNA ladder

## \* آنالیز RFLP کامپیوتری و آنالیز فیلوژنتیکی:

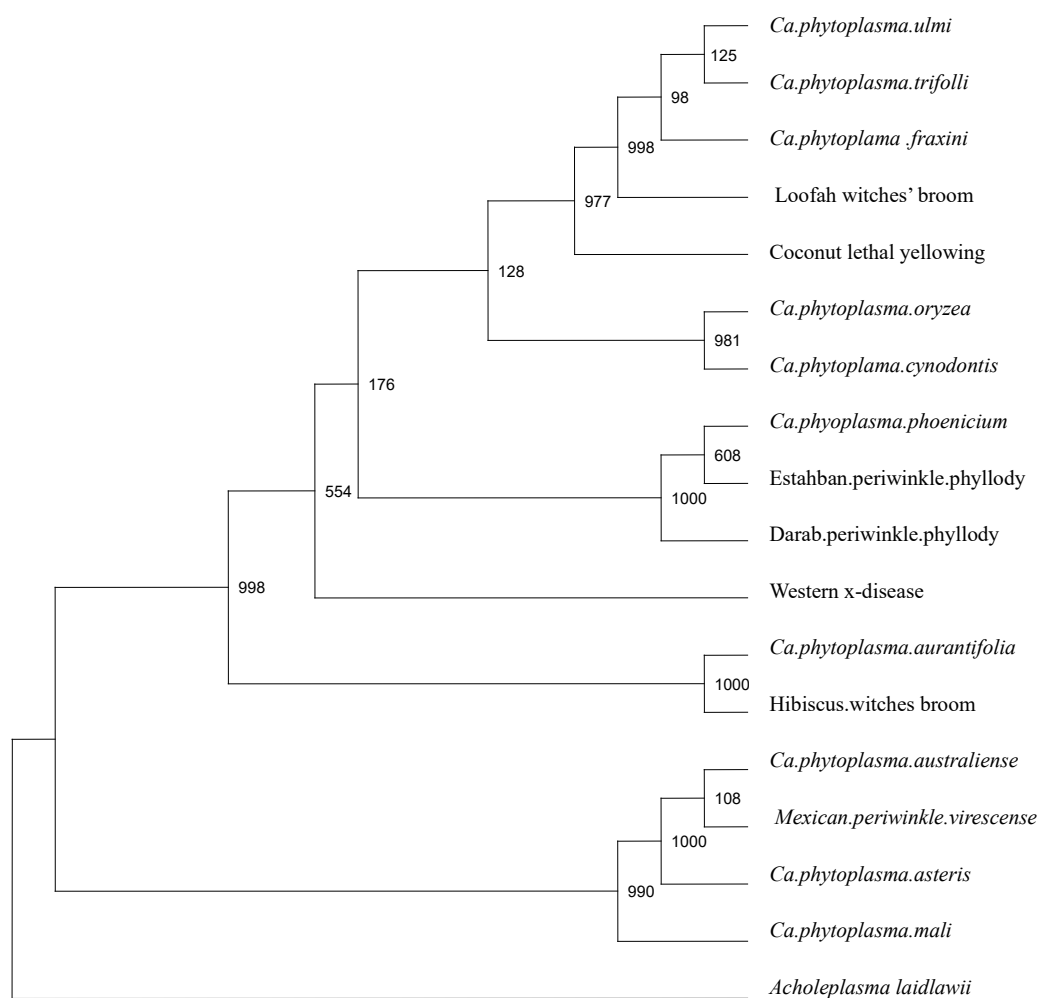
محصول PCR دو مرحله ای یک جدایه از استهبان و یک جدایه از داراب مستقیماً تعیین ترادف شد و به ترتیب تحت رس شماره های Kc332292 و Kc332293 در بانک جهانی ترادف ها (Gene bank) قرارداد شدند. جستجو با برنامه BLAST و ترادف های بدست آمده نشان داد که جدایه های استهبان و داراب متعلق به گروه جاروک نخود کبوتر (Pigeon pea witches broom) یا گروه ار.ان.ای ریپوزومی 16SrIX میباشند. مشاهده درخت فیلوژنتیکی (شکل های ۷ و ۸) نیز نشان داد که جدایه های استهبان و داراب با گروه جاروک نخود کبوتر (16SrIX) و زیر گروه 16SrIX-C طبقه بندی می شوند. همچنین با استفاده از گزینه MegAlign در نرم افزار ClustalX میزان تشابه نوکلئوتیدی جدایه های داراب و استهبان و فیتوپلاسمای زیرگروه 16SrIX تعیین گردید. در بین زیرگروه های گروه 16SrIX، جدایه داراب و استهبان بیشترین میزان تشابه نوکلئوتیدی را به ترتیب ۹۹/۹ و ۹۹/۷ درصد با زیرگروه *Picrisse chioides yellows phytoplasma* (16SrIX-C) نشان دادند و کمترین درصد تشابه را به ترتیب ۹۶/۹ و ۹۲ درصد با فیتوپلاسمای عامل جاروک بادام، زیرگروه های 16SrIX-G و 16SrIX-F داشتند. چند شکلی طولی قطعات برشی (RFLP) مجازی نشان داد که نقوش حاصل از فیتوپلاسمای عامل فیلودی داراب و استهبان با یکدیگر و با فیتوپلاسمای (16SrIX) کاملاً یکسان است (شکل ۶).



شکل ۶- نقوش حاصل از هضم آنزیمی RFLP کامپیوتری ترادف ۱۲۰۰ جفت باز زیر گروه های گروه 16SrIX،  
a: *Candidatus Phytoplasma phoenicium* (16SrIX-C)، b: جدایه داراب، c: جدایه استهبان

**Figure 5.** Restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles of 16S rDNA amplified in nested polymerase chain reaction (PCR) of periwinkle phyllody phytoplasmas.

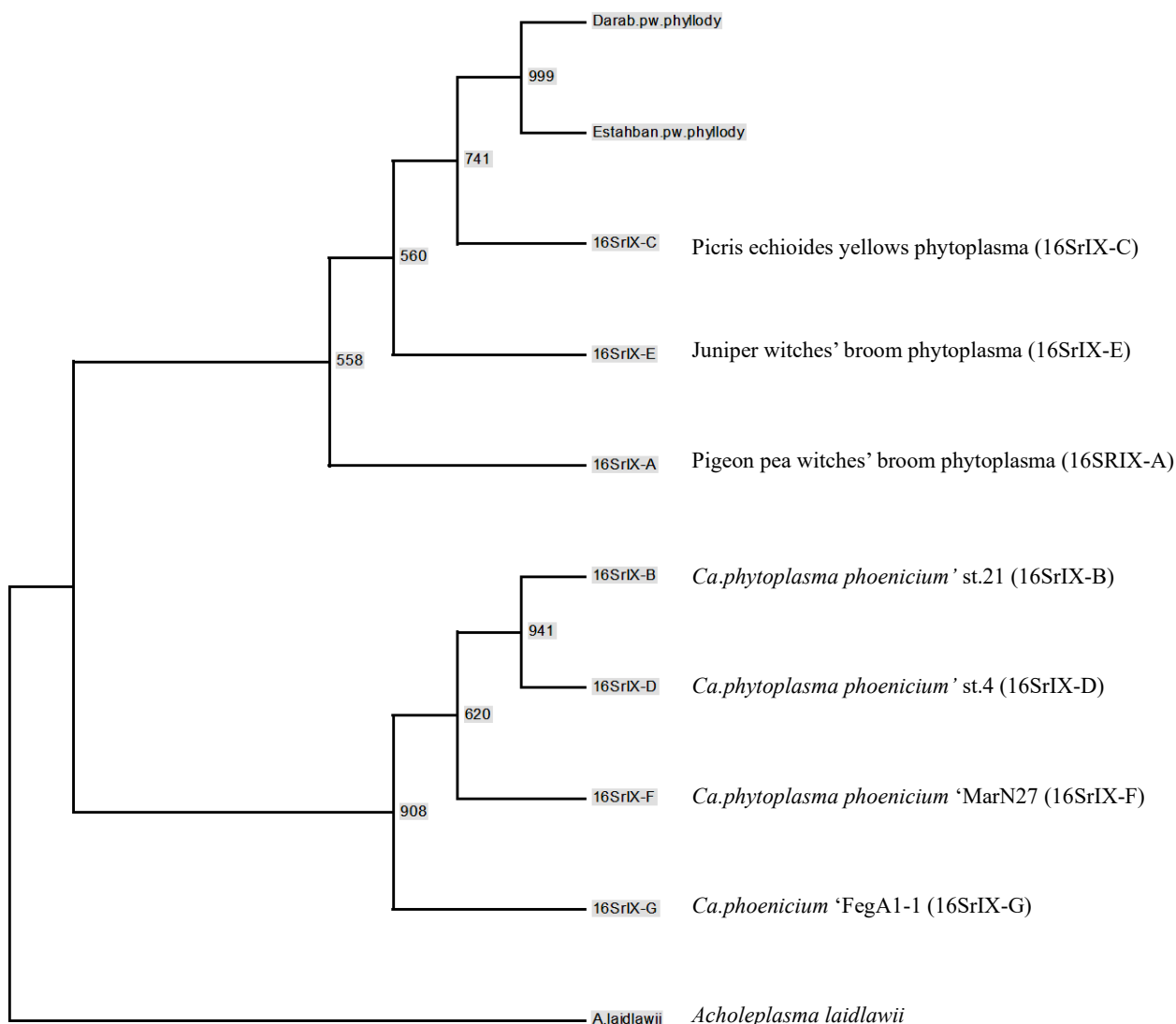
a: *Candidatus Phytoplasma phoenicium* (16SrIX-C), b: Darab strain, c: Estahban strain



**شکل ۷-** درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ۱۲۰۰ جفت باز از ار.ان.ای ریپوزومی 16S در ۱۷ فیتوپلازما و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup با استفاده از گزینه درخت فیلوژنتیکی در نرم افزار CLUSTALX

**Figure 7.** Phylogenetic tree of 1200 bp of 16SrRNA gene sequences of 17 phytoplasmas and *Acholeplasma laidlawii* as outgroup. The tree was constructed using Clustal X program





**شکل ۸-** درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ۱۲۰۰ جفت باز از ژن ار.ان.ای ریبوزومی 16S مربوط به هفت فیتوپلاسمای متعلق به هفت زیرگروه 16SrIX، دو جدایه استهبان و داراب و *Acholeplasma laidlawii* به عنوان outgroup با استفاده از گزینه درخت فیلوژنتیکی نرم افزار Clustalx

**Figure 7.** phylogenetic tree of 1900bp of 16SrRNA gene sequence of 7 16SrIX- subgroups, Darab and Estahban strains and *Acholeplasma laidlawii* using clustalX software

## بحث

تاکنون در ایران ده ها بیماری همراه با فیتوپلازما در انواع مختلف گیاهان از جمله گیاهان زینتی گزارش شده و لیست اینگونه بیماریها در حال افزایش است. در ایران بیشتر بیماری های فیتوپلازمایی پروانش از چابهار (استان سیستان و بلوچستان)، باجگاه (استان فارس) و جیرفت (استان کرمان) گزارش شده است. با استفاده از ویژگی های بیولوژیکی و مولکولی مشخص گردید که فیتوپلازمای عامل بیماری در پروانش چابهار و جیرفت متعلق به گروه 16SrII و فیتوپلازمای عامل بیماری در پروانش باجگاه متعلق به گروه 16SrI می باشد (Salehi et al., 2005). نتایج این پژوهش نشان داد که عامل بیماری فیلودی در گیاه پروانش در مناطق داراب و استهبان از طریق پیوند و سس به گیاهان سالم منتقل می شود و سبب بروز علائمی نظیر گل سبزی، فیلودی، کوتولگی و جاروی شدگی می گردد. این نتایج با گزارش های پیشین از انتقال فیتوپلازمای گروه 16SrIX در گیاهان زینتی و زراعی هم خوانی دارد (Zirak et al., 2021; Salehi et al., 2023). انتقال مؤثر از طریق سس در این تحقیق نیز همانند یافته های (Lee et al., 1998) نشان دهنده نقش بالقوه گیاهان نیمه انگلی در گسترش طبیعی فیتوپلازماها است. نتایج PCR مستقیم و د مرحله ای در این مطالعه بیانگر حضور قطعات 16SrRNA با طول های ۱۸۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز بود که از نظر اندازه و الگوی باندها مشابه گزارش های مربوط به فیتوپلازمای گروه 16SrIX است (Cho et al., 2020; Zhao et al., 2023). درخت فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه های داراب و استهبان به زیرگروه 16SrIX-C تعلق دارند که این نتیجه با گزارش های اخیر از کشورهای منطقه شامل ترکیه، هند و چین نیز مطابقت دارد (Wang et al., 2024; Kiss et al., 2024).

مشاهده تفاوت های جزئی در درصد شباهت نوکلئوتیدی بین جدایه های داراب و استهبان (۹۹/۹٪ و ۹۹/۷٪) می تواند بیانگر وجود تنوع ژنتیکی درون گروهی در جمعیت های محلی فیتوپلازمای 16SrIX باشد. این موضوع پیش تر نیز در مطالعات Bekele et al. (2022) و Salehi et al. (2023) گزارش شده و به نقش شرایط اقلیمی و ناقلان در پویایی ژنتیکی این فیتوپلازماها نسبت داده شده است. مطالعات جدید پیشنهاد می کنند که استفاده از نشانگرهای مکمل مانند *secY*، *tuf* و *imp* و رویکرد چند لایه (MLST) می تواند در تفکیک دقیق تر زیرگروه های فیتوپلازمایی نقش کلیدی داشته باشد (Cho et al., 2020; Zhao et al., 2023). بنابراین، در مطالعات آینده بر روی فیلودی پروانش، استفاده از چند نشانگر و نمونه برداری گسترده از مناطق مختلف کشور برای درک بهتر تنوع ژنتیکی و الگوی پراکنش توصیه می شود. به طور کلی نتایج این تحقیق ضمن تأیید حضور فیتوپلازمای گروه 16SrIX-C در استان فارس، بر اهمیت گیاهان زینتی مانند پروانش به عنوان منابع بالقوه آلودگی برای محصولات زراعی تأکید دارد. این موضوع می تواند در طراحی راهبردهای کنترل بیماری ها، از جمله حذف میزبان های آلوده و کنترل ناقلان حشره ای، مورد توجه قرار گیرد.

## منابع

- Bekele, K., Tesfaye, K., & Hailu, A. 2022. Molecular characterization and diversity analysis of phytoplasmas infecting ornamental and crop plants in Ethiopia. *Plant Pathology Journal*, 38(5), 515–523.
- Cho, S. T., Chen, M. J., & Kuo, C. H. 2020. Phylogenetic diversity and multilocus sequence analysis of 16SrIX group phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2135.
- Don, G. 1999. *Catharanthus roseus*. pp109-118, In: Ross, I. A. (Ed.), *Medicinal Plants of the World*, Human press, Totowa, New Jersey,
- Gundersen, D.E., Lee, I.M., Schaff, D.A., Harrison, N.A., Chang, C.J., Davis, R.E. & Kingsbury, D.T. 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 64–75.
- Kiss, E., Nagy, B., & Koltai, H. 2024. Genetic variability of 16SrIX phytoplasmas associated with ornamental plants in Europe. *Microbial Pathogenesis*, 194, 106622.
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., & 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.
- Marwitz, R. 1990. Diversity of yellows disease agents in plant infections. *Zentralblatt für Bakteriologie*, Suppl. 20: 431- 434.
- Nejat, N., Sijam K., Abdullah, S. N. A., Vadamalai, G. & Dickinson, M., 2010. Molecular characterization of an aster yellows phytoplasma associated with proliferation of periwinkle in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 9 (15): 2305-2315.
- Omar, A. F., Emeran, A. A. and Abass, J. M., 2008. Detection of a phytoplasma associated with periwinkle virescence in Egypt. *Plant Pathology Journal*, 7 (1): 92-97.
- Salehi M., Heydarnejad J. & Izadpanah K. 2005. Molecular characterization and grouping of 35 phytoplasmas from central and southern provinces of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 41: 62-64
- Salehi, M., Shams-Bakhsh, M., & Zirak, L. 2023. Identification and genetic differentiation of 16SrIX phytoplasmas associated with various hosts in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*, 62(2), 235–244.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D. & Kirkpatrick, B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenetic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. pp. 369-380, In: Tully J.G. & Razin S. (Eds). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Sertkaya, G., Martini, M., Ermacora, P., Musetti, R. & Osler, R. 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. *Bulletin of Insectology*, 60 (2): 141-142.
- Torres, L., Galdeano, E., Docampo, D. & Conci, L. 2004. Characterization of an Aster yellows phytoplasma associated with Catharanthus little leaf in Argentina. *Journal of Plant Pathology*, 86 (3): 209-214.
- Wang, H., Li, Z. & Sun, Y. 2024. Molecular detection and phylogenetic analysis of 16SrIX group phytoplasmas in China. *Molecular Plant Pathology*, 25(1), 77–90.

- Zhang, H., Zhang, D., Chen, J., Yang, Y., Huang, Z., Huang, D., Wang, X. C. & Huang, R., 2004. Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Molecular Biology*, 55:825–834.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I. M., Shao, J., Suo, X. & Davis, R. E. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peachX-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59:2582-2593.
- Zhao, Y., Chen, L. & Wei, W. 2023. Comprehensive genome analysis of 16SrIX phytoplasmas reveals genetic diversity and host adaptation mechanisms. *Microorganisms*, 11(8), 2051.
- Zirak, L., Salehi, M., & Shams-Bakhsh, M. 2021. Molecular identification and phylogenetic analysis of phytoplasmas associated with periwinkle and ornamental plants in Iran. *Australasian Plant Pathology*, 50: 115–123.



## Biological and Molecular Characterization of Periwinkle Phyllody in Darab & Estahban

Golnoosh Shayegan<sup>1</sup>, Mohammad Salehi<sup>2</sup>, Sassan Ghasemi<sup>\*1</sup>

(1) Department of Plant Pathology, Shi.C., Islamic Azad University, Shiraz, Iran

(2) Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO,  
Shiraz, Iran

(\*) sassan.ghasemi@iau.ac.ir

### Abstract

During a survey in Darab and Estahban (Fars Province), phyllody symptoms were observed on periwinkle (*Catharanthus roseus*). Graft and dodder (*Cuscuta* sp.) transmission, followed by molecular assays using direct PCR (P1/P7) and nested PCR (R16F2n/R16R2), confirmed the phytoplasmal nature of the disease. Sequencing of the amplified 16S rRNA fragment (~1200 bp) revealed that the isolates belong to the 16SrIX group and are closely related to the 16SrIX-C subgroup. Phylogenetic analysis supported this classification. It is suggested that additional molecular markers such as *secY*, *tuf*, and *imp*, and a multilocus sequence typing (MLST) approach be used to improve taxonomic resolution. The findings indicate that infected periwinkle plants may serve as a potential reservoir for phytoplasma dissemination in the region.

**Keywords:** Periwinkle, Phyllody, virescence, yellowing, phytoplasma, Nested PCR, RFLP