

اثبات بیماری‌زایی یک بیماری نوظهور در بامیه (*Abelmoschus esculentus*) ناشی از
فیتوپلاسمای گروه 16SrVI-A در شمال شرق ایران
Demonstrating the ability of Phytoplasma group 16SrVI-A to cause an
emerging disease in okra in northeastern Iran

سارا قارونی کاردانی^{۱*}، الهه طاهری^۱

۱. بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران، (نگارنده مسئول^{*}).

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۰۹- شناسانه برنمود رقمی: 10.22092/mpt.2025.370008.1196

چکیده

قارونی کاردانی، س.، طاهری، ا.، اثبات بیماری‌زایی یک بیماری نوظهور در بامیه (*Abelmoschus esculentus*) ناشی از فیتوپلاسمای گروه 16SrVI-A در شمال شرق ایران

نشریه علمی فناوری و گیاهان دارویی ایران، دوره ۷- شماره ۱- پیاوند ۱۲- بهار و تابستان ۱۴۰۳ صفحه: ۲۷-۳۸

بامیه (*Abelmoschus esculentus* L.) گیاه دارویی مهم متعلق به خانواده پنیرکیان (Malvaceae) است. در فروردین‌ماه سال ۱۴۰۲، علایم پیچیدگی، خمیدگی یا چروکیدگی کپسول میوه، ناهنجاری‌های رشدی، کوتاه شدن میانگره‌ها، کوتولگی و جارویی شدن شاخه‌ها در گیاهان کشت‌شده در گلخانه‌های شهرستان چناران استان خراسان رضوی مشاهده شدند. جهت اطمینان از بیماری‌زایی و جداسازی عامل بیماری، انتقال بیمارگر از بامیه به بوته‌های بذری پروانش (*Catharanthus roseus*)، به کمک گیاه انگل سس (*Cuscuta campestris*) در گلخانه صورت گرفت. این گیاهان بعد از یک ماه علایم فیلودی را نشان دادند. جهت شناسایی عامل بیماری، استخراج DNA، از رگبرگ‌های میانی و دم‌برگ پنج گیاه بامیه بیمار و سه گیاه سالم (شاهد منفی) با روش CTAB انجام شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مستقیم و آشیانه‌ای به ترتیب با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی، P1/P7 و R16F2n/R16R2 انجام شدند. قطعات تکثیرشده با اندازه مورد انتظار، از محصولات PCR هر پنج گیاه بیمار به‌دست آمدند. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک و چند شکلی طولی قطعات برشی مجازی (Virtual RFLP) با استفاده از برنامه iPhyClassifier و در شرایط آزمایشگاهی با آنزیم‌های برشی نشان دادند که فیتوپلاسمای مرتبط با بیماری غلاف پیچ‌خورده بامیه بیشترین شباهت را با *Candidatus phytoplasma trifolii* متعلق به گروه افزولش شبدر (Clover proliferation group, 16SrVI-A) دارد (شماره دسترسی OR784662). این تحقیق که داده‌های تکمیلی نسبت به گزارش اولیه چاپ شده از آن را ارائه کرد، نه تنها نشان‌دهنده گسترش دامنه میزبانی فیتوپلاسمها در ایران است، بلکه ضرورت پژوهش‌های بیشتر برای شناسایی سایر میزبان‌ها و تعیین دقیق پراکنش این فیتوپلاسمها در دیگر نقاط کشور را به‌خوبی روشن می‌کند.

واژه‌های کلیدی: افزولش شبدر، بامیه، پروکاریوت، فیلودی، غلاف پیچ‌خورده

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: s.gharooni@areeo.ac.ir

مقدمه

بامیه (*Abelmoschus esculentus* L.) گیاهی یک‌ساله حساس به سرما از خانواده Malvaceae با نام لاتین Okra است. این گیاه بومی شرق آفریقا است که به دلیل ارزش تغذیه‌ای و دارویی بالا، در بسیاری از نقاط جهان به ویژه مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری کشت می‌شود (Adetuyi *et al.*, 2008). میوه این گیاه سرشار از ترکیبات زیستی فعال نظیر پلی‌ساکاریدهای محلول، فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی، تانن‌ها و موسیلاژها است که به آن ویژگی‌های ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضددیابتی بخشیده‌اند (Chukwuma *et al.*, 2011; Sabitha *et al.*, 2019). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که عصاره‌های بامیه می‌توانند فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز را مهار کرده و موجب کاهش جذب گلوکز در روده شوند که این امر در کنترل دیابت نوع ۲ بسیار مؤثر است (Khan *et al.*, 2013). همچنین خواص موسیلاژی بامیه سبب بهبود عملکرد دستگاه گوارش، کاهش کلسترول خون و بهبود زخم‌های مخاطی شده است (Lengsfeld *et al.*, 2004).

استفاده از این گیاه در طب سنتی ایران، چین و هند به عنوان داروی ضدالتهاب، مدر، ملین و حتی درمان بیماری‌های پوستی گزارش شده است (Mahfuzul Hoque *et al.*, 2007). با وجود اهمیت اقتصادی و دارویی بالای این گیاه، بامیه در سال‌های اخیر با ظهور بیماری‌های نوپدید مواجه شده است که بر کیفیت و کمیت محصول آن اثر منفی می‌گذارند. یکی

از عوامل بروز اختلالات رشدی و فیزیولوژیکی در بامیه، فیتوپلاسم‌ها هستند که به عنوان میکروارگانیسم‌های غیرقابل کشت، می‌توانند باعث بروز علائمی نظیر کوتولگی، ریزبرگی، پیچیدگی میوه و تغییر شکل اندام‌های زایشی شوند (Bertaccini & Lee, 2018).

ایران به دلیل موقعیت جغرافیایی خاص، تنوع ارتفاعات، فاصله از دریا، وسعت و اختلاف زیاد بین مناطق شمال و جنوب، دارای آب‌وهوایی بسیار متنوع و میزان بارندگی متفاوت است. وقوع خشکسالی در دهه‌های اخیر در کشور به دلیل افزایش فعالیت حشرات ناقل، بر شیوع و همه‌گیری بیماری‌های فیتوپلاسمایی مؤثر است. در سال‌های اخیر، بیماری‌های فیتوپلاسمایی در محصولات گلخانه‌ای مختلف، درختان بی‌ثمر و جنگل‌های کشور شیوع پیدا کرده‌اند. برخی از نمونه‌های بیماری‌های مهم خسارت‌زای فیتوپلاسمایی کشور که در گروه‌های 16SrI (زیرگروه‌های S و R, B)، 16SrII (Z و V, D, C, B)، 16SrIII (زیرگروه A)، 16SrVI (زیرگروه‌های A, D و F)، 16SrVII (زیرگروه A)، 16SrIX (زیرگروه‌های A, B)، 16SrX (D, E, H و I)، 16SrXI (زیرگروه C)، 16SrXII (زیرگروه A)، 16SrXXIX (زیرگروه‌های A و B) و 16SrXXX (زیرگروه A) جای دارند، در مقاله مروری اسماعیل‌زاده حسینی و همکاران (۲۰۲۳)، ارائه شده‌اند.

شناسایی و طبقه‌بندی دقیق عامل بیماری‌زا با روش‌های مولکولی، گامی اساسی در مدیریت بیماری‌های گیاهان دارویی حساس به تنش



شکل ۱. علایم غیرعادی بامیه (*Abelmoschus esculentus*) مشاهده شده در گلخانه چناران، استان خراسان رضوی. (الف)

تا (ج) پیچیدگی و بدشکلی کپسول میوه، (د) کوتاه شدن میان گره ها، (ه) تغییر شکل کپسول، کوتولگی و رشد متراکم

اندام های هوایی، در مقایسه با (و) گیاه سالم

پاکت کاغذی به آزمایشگاه منتقل و تا زمان آزمایش در دمای چهار درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

انتقال عامل بیماری به گیاه پروانش

Cuscuta با سس (*Catharanthus roseus*)

(*campestris*)

عامل بیماری به کمک گیاه انگل سس به بوته های بذری پروانش انتقال داده شد. برای تهیه ریشه های سس سالم، بذور این گیاه روی دستمال کاغذی مرطوب رشد داده شدند. ساقه های حاصل، روی بوته های جوان پروانش منتقل گردیدند. سپس رشته های سس به بوته بامیه با علایم غیرعادی ذکر شده، ارتباط داده شدند. پس از استقرار روی بوته آلوده، ارتباط آنها با گیاه مادری قطع شد. دو هفته بعد، ریشه ها به بوته های بذری پروانش متصل شدند. بعد از طی یک ماه این بوته ها عاری از سس شده و

زیستی مانند بامیه است. در فروردین ماه سال ۱۴۰۲، علایم جدیدی از بیماری در گیاهان بامیه کشت شده در گلخانه ها دیده شد. مطالعه حاضر به منظور بررسی علت بیماری انجام شد. بخشی از این داده ها پیش تر به صورت گزارش اولیه کوتاه منتشر شده اند (Gharouni-Kardani & Taheri, 2024). این مقاله، اطلاعات تکمیلی را ارائه می دهد و بیماری زایی عامل مذکور را اثبات می کند.

مواد و روش ها

نمونه برداری از مناطق آلوده

طی بازدید از گلخانه بامیه واقع در چناران (محسن آباد)، استان خراسان رضوی در سال ۱۴۰۲، نمونه هایی مشکوک به فیتوپلازما دارای علایم پیچیدگی کپسول میوه، کوتاه شدن میان گره ها، کوتولگی و جارویی شدن اندام های هوایی مشاهده شدند (شکل ۱). نمونه ها داخل

برای بروز علایم در شرایط رطوبتی و حرارتی مناسب در گلخانه نگهداری شدند (Přibyllová and Špak, 2013).

شناسایی عامل بیماری

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

(Polymerase chain reaction, PCR)

جهت شناسایی عامل بیماری، DNA از رگبرگ‌های میانی و دمبرگ‌های پنج گیاه بیمار و سه گیاه بدون علایم به عنوان شاهد منفی با استفاده از روش CTAB استخراج شدند (Zhang *et al.*, 1998).

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از آغازگرهای عمومی P1 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3') و P7 (5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') (Deng & Hiruki, 1991) برای PCR مستقیم و آغازگرهای R16F2n (5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3') و R16R2 (5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3') (Gundersen & Lee, 1996) برای PCR آشیانه‌ای استفاده شد.

برای انجام PCR، ۱/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۲ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۵ پیکومول و ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس قرمز ساخت کشور دانمارک (AMPLIQON®) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مخلوط شدند. برنامه PCR عبارت بود از: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه (واسرشته‌سازی آغازین) و به دنبال آن، ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته‌سازی)، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه (اتصال)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه (گسترش) و یک چرخه طولیل‌شدن انتهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت اطمینان از تبدیل DNAهای تک رشته به دو رشته انجام شد.

محصول این مرحله به نسبت ۱:۳۰ با آب مقطر ضدعفونی‌شده رقیق گردید و یک میکرولیتر از این رقت به عنوان DNA قالب با اجزاء یاد شده در مرحله دوم PCR به کار برده شد. شرایط دمایی PCR آشیانه‌ای مشابه قبل بود با این تفاوت که دمای اتصال آغازگرها ۵۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

محصولات PCR برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌های رفت و برگشت حاصل، با نرم افزار جنیوس (Geneious Prime® 2019.1.3) سر هم شدند، سپس ارزیابی آنها با برنامه BLAST انجام گردید (Altschul *et al.*, 1997). رسم درخت فیلوژنتیکی جهت ارزیابی توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌ها و نزدیکی آنها با گروه‌ها و زیرگروه‌های فیتوپلاسمایی با استفاده از نرم افزار MEGA-X و به روش الحاق همسایه‌ها با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی (Bootstrap) انجام شد (Saitou & Nei, 1987; Kumar *et al.*, 2018). از *Acholeplasma laidlawii* نیز به عنوان برون گروه استفاده گردید.

چند شکلی طولی قطعات برشی مجازی

(Virtual RFLP) و حقیقی محصول PCR

آشیانه‌ای

برای تعیین وابستگی گروه‌های ریبوزومی به کمک چند شکلی طولی قطعات برشی مجازی (Virtual RFLP)، توالی ژن 16S rRNA (ناحیه تکثیرشده با جفت آغازگر R16F2n/R16R2) با استفاده از نرم‌افزار iPhyClassifier در تارنمای (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>)، با ۱۷



شکل ۲. الف) بوته پروانش (*Catharanthus roseus*) سالم و استقرار

سس (*Cuscuta campestris*) روی آن. ب) علائم فیلودی و زردی ناشی از انتقال

فیتوپلاسمای همراه با غلاف پیچ خورده بامیه از طریق سس به گیاه پروانش بعد از یک ماه

تمامی تکرارهای گیاهان بیمار، علائم یکسانی نشان دادند و پروانش‌های متصل شده به گیاهان بامیه سالم، فاقد علائم بودند.

شناسایی عامل بیماری

قطعات تکثیرشده با اندازه مورد انتظار (۱۸۳۰ جفت باز حاصل از پرایمرهای P1/P7 و ۱۲۴۷ جفت باز حاصل از پرایمرهای R16F2/R16R2) از هر پنج گیاه بیمار به دست آمدند. همانندسازی قطعات مذکور در گیاهان بیمار و عدم حضور این نواحی تکثیرشده در گیاهان سالم، نشان‌دهنده آلودگی بامیه به فیتوپلاسم بود. نتایج تعیین توالی تأیید کردند که عامل همراه بیماری پیچیدگی غلاف بامیه، ماهیتی فیتوپلاسمایی دارد. نوکلئوتیدهای توالی‌های حاصل، ۱۰۰ درصد به یکدیگر شباهت داشتند و یکی از آنها در بانک جهانی ژن (NCBI) با شماره دسترسی OR784662 ثبت شد. از مقایسه ترادف به دست آمده با ترادف‌های موجود در بانک ژن، مشخص شد که فیتوپلاسمای

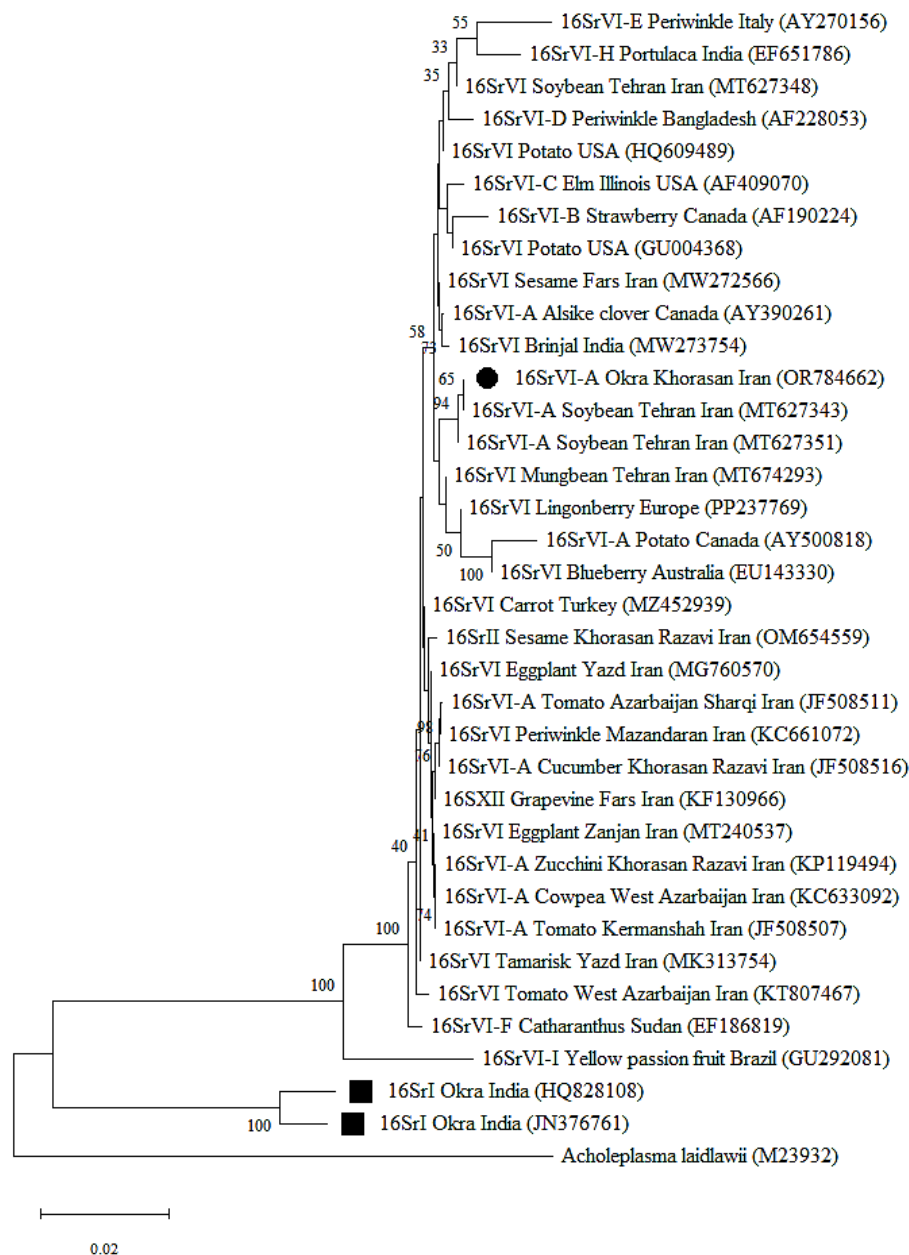
آنزیم شامل: *Bst*UI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Kpn*I, *Sau*3AI, *Mse*I, *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Rsa*I و *Ssp*I, *Taq*I, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II برش داده شد و جایگاه فیتوپلاسمای همراه با بیماری غلاف پیچ‌خورده بامیه تعیین گردید (Zhao et al., 2009).

هضم آنزیمی محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های *Hpa*II و *Taq*I, *Alu*I, *Rsa*I, *Hinf*I انجام شد (Lee et al., 1998). محصولات RFLP در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و الگوهای به دست آمده از این روش با الگوهای موجود در منابع مقایسه شدند.

نتایج و بحث

انتقال عامل بیماری به گیاه پروانش با سس

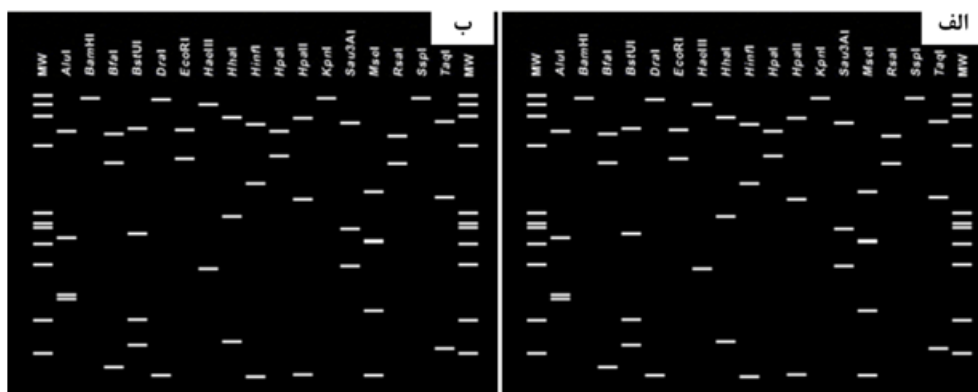
عامل بیماری، به کمک سس از بوته بامیه آلوده، به بوته‌های پروانش سالم منتقل شد. بعد از یک ماه، همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، علائم فیلودی، کوتولگی و زردی در پروانش‌های مایه‌زنی شده ظاهر گردیدند.



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم افزار MEGA-X به روش اتصال همسایه‌ای (۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی)

آمده از بامیه در هند (مربع) و توالی‌های موجود در بانک ژن با سایر زیرگروه‌های گروه فیتوپلاسمایی 16SrVI شماره‌های دسترسی در پراپرتز ذکر شده‌اند. از *Acholeplasma laidlawii* به عنوان گروه خارجی استفاده شد. از هضم آنزیمی قطعه ۱۲۴۷ جفت‌بازی حاصل از پرایمرهای R16F2n/R16R2 با آنزیم

عامل پیچیدگی غلاف بامیه ۱۰۰ درصد به فیتوپلاسمای حاصل از سویا (زیرگروه 16Sr VI-A) در ایران شباهت دارد. بر اساس توالی‌های 16SrRNA جزئی (۱۲۴۷ جفت باز) از فیتوپلاسمای غلاف پیچ‌خورده بامیه (*Abelmoschus esculentus* L.) شناسایی شده در این مطالعه (دایره)، جدایه‌های به‌دست



شکل ۴. الف) نقوش حاصل از RFLP معازی با استفاده از نرم افزار *iPhyClassifier* بر اساس مترادف نوکلئوتیدی ۱۲۴۷ جفت باز از ژن 16S rDNA فیتوپلاسمای همراه با پیچیدگی غلاف بامیه (*Abelmoschus esculentus* L.) توالیابی شده در تحقیق حاضر (OR784662) و ب) فیتوپلاسمای مرجع (AY390261) زیرگروه 16SrVI-A: نشانگر مولکولی DNA. اندازه‌های

قطعات از بالا به پایین به ترتیب عبارتند از ۱۳۵۳، ۱۰۷۸، ۸۷۲، ۶۰۳، ۳۱۰، ۲۸۱، ۲۷۱، ۲۳۴، ۱۹۴، ۱۱۸ و ۷۲ جفت باز

Ghayeb) Hosseini *et al.*, 2024)، سویا (Ghayeb) Zamharir *et al.*, 2022)، کدوسبز (Ghayeb) Zamharir *et al.*, 2018) و خیار (Esmailzadeh-) Hosseini *et al.*, 2015; Gharouni-Kardani and Jamshidi, 2018b)، گزارش شده بودند. در مقاله مروری اسماعیلزاده حسینی و همکاران، فیتوپلاسمای این زیرگروه بیمارگر ذکر شده‌اند که محققین ایرانی در سایر گیاهان موجود در کشور از جمله کلزا، کلم، گل همیشه بهار، هندوانه، بابونه زرد، پیربهارک کانادایی، ارس ژاپنی، یونجه، خرما، کاج ایتالیایی، تلخ بیان، انگور، ذرت و عناب گزارش کردند (Esmailzadeh-Hosseini *et al.*, 2023).

فیتوپلاسمای مختلفی که با بامیه ارتباط دارند، از سایر کشورها گزارش شدند. علایمی که گروه‌های 16SrXII و 16SrV فیتوپلاسمای در جزیره موریس در بامیه ایجاد کردند عبارت بودند از زردی و بدشکلی برگ‌ها، پیچیدگی برگ‌ها به سمت بالا و کوتولگی گیاه. این

HpaII *HinfI* قطعات ۸۰۰ و ۴۵۰، با آنزیم *AluI* قطعات ۸۵۰، ۳۵۰ و ۱۵۰، با آنزیم *TaqI* قطعات ۷۰۰، ۲۸۰ و ۱۵۰، با آنزیم *RsaI* قطعات ۷۰۰ و ۵۰۰ و ۳۸۰ و با آنزیم *RsaI* قطعات ۷۰۰ و ۵۰۰ جفت بازی تولید شدند. مقایسه الگوی به‌دست آمده با الگوهای موجود در منابع نشان داد که فیتوپلاسمای همراه با بامیه در گروه افزولش شبدر (Clover proliferation group, 16SrVI) قرار می‌گیرد.

در درخت فیلوژنتیکی رسم‌شده، جدایه بیمارگر بامیه، با فیتوپلاسمای متعلق به زیر گروه 16SrVI شباهت داشت، که در ایران پیش‌تر از گیاهان پروانش (Fattahi *et al.*, 2016)، گوجه‌فرنگی (Jamshidi *et al.*, 2014)، بادمجان (Salehi *et al.*, 2021)، لوبیا چشم‌بلبلی (Gharouni-Kardani and Jamshidi, 2018a)، ماش (Ghayeb Zamharir *et al.*, 2021)، کنجد (Salehi *et al.*, 2022)، گز (Esmailzadeh-) (Salehi *et al.*, 2022)

محققان بیان کردند که آلودگی فیتوپلاسمایی به میزان زیادی در جزیره انتشار یافته و وقوع این بیماری در برخی مناطق به ۷۵ تا ۱۰۰ درصد رسیده و حدود ۴۰ درصد از محصولات از بین رفتند (Gungoosingh-Bunwaree *et al.*, 2011). گروه دیگر فیتوپلاسمایی 16SrI از هند گزارش شد. علائم رایج مشاهده شده در گیاهان بیمار بامیه، شامل کوتاه شدن میانگره‌ها، تجمع برگ‌ها در ناحیه رأسی، کاهش پهنک برگ، قرمز شدن ساقه، خم شدن میوه، فیلودی و کوتولگی گیاهان بود. میزان شیوع بیماری از ۲ تا ۶۰ درصد متغیر بود و کاهش قابل توجهی در تولید گل و بذر ایجاد نمود (Kumar *et al.*, 2012).

پیش‌تر بخشی از این داده‌ها به صورت گزارش اولیه کوتاه چاپ شده‌اند (Gharouni- & Taheri, 2024). با توجه به بررسی‌های انجام شده، این اولین گزارش سویه مرتبط با (*Ca. P. Trifolii*) است که باعث بیماری غلاف پیچ‌خورده بامیه در ایران و جهان می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک و RFLP مجازی و حقیقی نشان دادند که فیتوپلاسمای مرتبط با بیماری غلاف پیچ‌خورده بامیه متعلق به زیرگروه 16SrVI-A است. این گروه از فیتوپلاسمها به دلیل تعداد زیاد اعضا، اهمیت اقتصادی بالا و گسترش قابل توجه در سطح جهانی، یکی از گروه‌های کلیدی و تأثیرگذار در اکوسیستم‌های کشاورزی به‌شمار می‌آید. یافته‌های این تحقیق حاکی از آن است که فیتوپلاسمها در حال گسترش دامنه میزبانی

خود در ایران هستند و این امر می‌تواند تهدیدی جدی برای کشاورزی کشور باشد. با توجه به ماهیت این عامل بیماری‌زا و اثرات مخربی که بر کاهش چشمگیر عملکرد محصول در گیاهان آلوده دارد، احتمال انتقال آن از طریق ناقلین هوایی، اهمیت مطالعات آتی در زمینه‌ی پراکنش این فیتوپلاسم در دیگر مناطق کشور را دوچندان می‌کند. بنابراین، بررسی دقیق‌تر روند گسترش این بیماری و شناسایی میزبان‌های جدید به‌منظور طراحی استراتژی‌های کنترل مؤثر و کاهش خسارات اقتصادی ناشی از آن ضروری به نظر می‌رسد.

در نهایت، این تحقیق نه تنها به شناسایی دقیق عامل بیماری پیچیدگی غلاف بامیه کمک کرده بلکه لزوم ادامه تحقیقات جهت مطالعه پراکنش این فیتوپلاسم در دیگر نقاط کشور و شناسایی میزبان‌های جدید را نیز روشن ساخته است. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که در آینده، پژوهش‌های بیشتری در این زمینه انجام شود تا بتوان به درک جامع‌تری از این بیماری و چگونگی مدیریت آن دست یافت.

References

- Adetuyi, F.O., Osagie, A.U. and Adekunle, A.T. 2008. Nutrient, antinutrient, mineral and zinc bioavailability of okra (*Abelmoschus esculentus*) cultivated in Nigeria. African Journal of Biotechnology, 7(14): 2102-2106. <https://doi.org/10.5897/AJB2008.000-5060>
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaeffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25 (17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Bertaccini, A. and Lee, I.M. 2018. Phytoplasmas: Plant pathogenic bacteria. Journal of Plant Pathology, 100(1): 5-17. <https://doi.org/10.4454/jpp.v100i1sup.388>
- Chukwuma, C.I., Matsabisa, M.G., Ibrahim, M.A., Erukainure, O.L. and Chabalala, M.H. 2019. Medicinal plants with potential antidiabetic properties: A review on okra (*Abelmoschus esculentus*) and other promising herbal candidates. Journal of Ethnopharmacology, 244: 112689. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112689>
- Deng, S. and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. Journal of Microbiological Methods, 14: 53-61. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D)
- Esmailzadeh-Hosseini, S.A., Azadvar, M., Babaei, G., Salehi, M., and Bertaccini, A. 2023. Diversity, distribution, and status of phytoplasma diseases in Iran, 87-99. In: Bertaccini, A., Quaglino, F., Contaldo, N., and Kumari, S.G. (eds.). Diversity, Distribution, and Current Status. Elsevier, Amsterdam, 456 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91896-1.00007-6>
- Esmailzadeh-Hosseini, S.A., Babaei, G., Pacini, F. and Bertaccini, A. 2024. Multilocus Gene Analyses Indicate *Tamarix aphylla* as Reservoir Host of Diverse Phytoplasmas Associated with Witches' Broom and Yellowing Symptomatology. Plants, 13(9): 1248. <https://doi.org/10.3390/plants13091248>
- Esmailzadeh-Hosseini, S., Salehi, M., Mirchenari, S., 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 Reports, 32: 5. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.032.005>
- 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: 135-141.
- Gharouni-Kardani, S. and Jamshidi, E. 2018a. Etiology and transmission of cowpea phyllody associated phytoplasma in East Azarbaijan province of Iran. Journal of Plant Protection Research, 32: 185-193. <https://doi.org/10.22067/jpp.v32i2.71083>
- Gharouni-Kardani, S., and Jamshidi, E. 2018b. First report of 16SrVI group phytoplasma on cucumber (*Cucumis sativus*) in North Khorasan province of Iran, 120-124. In: Proceedings of the International Conference on Agricultural Sciences, Medicinal Plants and Traditional Medicine. Mashhad, Iran, 340 p.
- Gharouni-Kardani, S. and Taheri, E. 2024. First report of a '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'-related strain (16SrVI) associated with okra curled pod disease in Iran. New Disease Reports, e12262. <https://doi.org/10.1002/ndr2.12262>
- Ghayeb Zamharir, M. and Azimi, H. 2018. Detection and characterisation of a phytoplasma associated with cucumber (*Cucumis sativus*) regional yellows disease in Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 51(15-16): 889-893. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1547091>
- Ghayeb Zamharir, M., Shameli, S. and Bertaccini, A. 2022. Epidemiology of soybean bud proliferation and seed pod abortion disease in Iran. Australasian Plant Pathology, 51(4): 383-390. <https://doi.org/10.1007/s13313-022-00866-9>
- Ghayeb Zamharir, M., Shameli, S. and Hoseini Gharalari, A. 2021. Detection and molecular characterization of two genetically distinct phytoplasmas associated with mungbean seed pod abortion in Iran. Australasian Plant Pathology, 50(4): 451-456. <https://doi.org/10.1007/s13313-021-00795-z>
- Gundersen, D.E. and Lee, I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer sets. Phytopathologia Mediterranea, 35: 144-151.
- Gungoosingh-Bunwaree, A., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Benimadhu, S.P. and Bertaccini, A. 2011. Detection of phytoplasma infection in okra in Mauritius. Bulletin of Insectology, 64: S103-S104.
- 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: 77-89.
- Khan, M.I., Siddiqui, Z.H. and Singh, R.A. 2013. Antidiabetic effects of

- Abelmoschus esculentus* (L.) Moench: A review of current evidence. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3(6): 492-498. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60100-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60100-7)
- Kumar, S., Singh, V. and Lakhanpaul, S. 2012. Molecular characterization and phylogeny of phytoplasma associated with bunchy top disease in its new host Okra (*Abelmoschus esculentus*) in India reveal a novel lineage within the 16SrI group. European Journal of Plant Pathology, 133: 371-378. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9910-3>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. and Battistuzzi, F.U. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6): 1547-1549.
- 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(4): 1153-1169. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1153>
- Mahfuzul Hoque, M., Bari, M. L., Inatsu, Y. and Kawamoto, S. 2007. Antibacterial activity of okra (*Abelmoschus esculentus*) against foodborne pathogens. International Journal of Food Science and Technology, 42(12): 1305-1311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01373.x>
- Příbylová, J. and Špak, J. 2013. Dodder transmission of phytoplasmas, 61-71. In: Dickinson, M., and Hodgetts, J. (eds.). Phytoplasma. Methods in Molecular Biology, Vol. 938. Humana Press, Totowa, NJ, 300 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2>
- Sabitha, V., Ramachandran, S., Naveen, K.R. and Panneerselvam, K. 2011. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 3(3): 397- 402. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.84447>
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Salehi, E., Salehi, M., Faghihi, M.M. and Ebadi, E. 2022. First report of a ‘*Candidatus* Phytoplasma trifolii’-related strain (16SrVI-A) associated with watermelon witches’ broom disease in Iran. New Disease Reports, 45(2): e12101. <https://doi.org/10.1002/ndr2.12101>

- Salehi, M., Esmailzadeh Hosseini, S.A., Salehi, E. and Bertaccini, A. 2021. Molecular diversity of phytoplasmas associated with eggplant phyllody disease in Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 161: 195-205. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02314-8>
- Zhang, Y.P., Uyemoto, J.K. and Kirkpatrick, B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)
- 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 Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2582-2593. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.010249-0>

Demonstrating the ability of Phytoplasma group 16SrVI-A to cause an emerging disease in okra in northeastern Iran

Sara Gharouni-Kardani^{1*}, Elaheh Taheri¹

1. Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (AREEO), Mashhad, Iran. (Corresponding author*)

Received: July 2025 Accepted: August 2025 - DOI: 10.22092/mpt.2025.370008.1196

Abstract

Gharouni-Kardani, S., Taheri, E., Demonstrating the ability of Phytoplasma group 16SrVI-A to cause an emerging disease in okra in northeastern Iran

Iranian Medicinal Plants and Technology, Vol 7, No. 1, 2024 4-5: 27-38(in Persian)

Abstract

Okra (*Abelmoschus esculentus*) is an important medicinal plant belonging to the Malvaceae family. In April 2023, new symptoms in greenhouse-grown okra, including twisted, curled, or wrinkled fruit capsules, growth abnormalities, shortened internodes, dwarfing, and witches' broom, were observed in the Chenaran district of Khorasan Razavi province. To confirm the pathogenicity and identify the causal agent, the pathogen was transferred from infected okra plants to periwinkle seedlings (*Catharanthus roseus*) using dodder (*Cuscuta campestris*) under greenhouse conditions. After one month, the periwinkle plants exhibited phyllody symptoms. DNA was extracted from the midribs and petioles of five infected okra plants and three healthy plants (negative controls) for pathogen identification using the CTAB method. Direct and nested polymerase chain reaction (PCR) assays were performed using universal phytoplasma primers, P1/P7 and R16F2n/R16R2, respectively. The expected amplicons were obtained from PCR

Email address of the corresponding author: s.gharooni@areeo.ac.ir

products of all five infected plants. Phylogenetic and virtual RFLP analyses using the *iPhyClassifier* software and in vitro RFLP with restriction enzymes revealed that the phytoplasma associated with okra's twisted pod disease closely resembled *Candidatus* phytoplasma trifolii from the Clover proliferation group (16SrVI-A) (accession number OR784662). This study adds more data to the initial published report. It not only demonstrates the expanding host range of phytoplasmas in Iran but also underscores the need for further research to identify other hosts and determine the precise distribution of these phytoplasmas in Iran and worldwide.

Keywords: Clover proliferation, Curled pod, Okra, Phyllody, Prokaryote.