

ORIGINAL ARTICLE

Detection and differentiation of two complications of disorder and lack of podding of soybeans in the fields of Golestan and Mazandaran provinces

Sonay Baghdadi¹ Abdolhossein Taheri*¹, Saeed Nasrollahnejad^{1*}, Farzad Aliramaji¹, Leila Fahmideh²

¹Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran.

²Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran

Correspondence

Abdolhossein Taheri

Saeed Nasrollahnejad

Email: a.taheri@gau.ac.ir

&

snasrollanejad@yahoo.com

How to cite

Baghdadi, S., Taheri, A., Nasrollahnejad, S., Aliramaji, F., & Fahmideh, L. (2023). Detection and differentiation of two complications of disorder and lack of podding of soybeans in the fields of Golestan and Mazandaran provinces. *Crop Biotechnology*, 12(41), 49-60.

ABSTRACT

In order to detection and differentiation of two complications of disorder and lack of podding in soybeans, while visiting 185 soybean fields in Golestan and Mazandaran provinces, only from the summer cultivation of 17 fields from five different places in Golestan province, plants with signs of disorder and the lack of acute podding were identified and 17 samples were selected from each field and sampling was done from the leaves or stems of the mentioned plants in order to extract RNA and DNA. Then, PCR was performed to detect nepovirus using the degenerate primer of nepovirus and to detect phytoplasma using a pair of general primers and a nested PCR test. The results of electrophoresis confirmed the amplification of the 1800 bp band in the general PCR, the 1250 bp fragment in the nested PCR related to phytoplasma, and also the amplification of the 640 bp band related to a nepovirus. Besides, no band of healthy plants was observed. at the same time, tissue grafting and mechanical inoculation were performed on GPX soybean benchmark plant using the mentioned samples and two types of symptoms appeared. From the sequencing of the disordered samples (production of a small number of seeds and small pods), *Tomato ring spot virus* strain ep31_63026 and from the sequencing of the samples with non-encapsulation (grassiness and no formation of pods and seeds), *Aster yellows phytoplasma* from the 16SrI-B group were identified, which confirmed the results of the reference plant. The phylogenetic analysis of sequencing results confirmed the presence of Phytoplasma and Nepovirus only in the summer culture of samples that had symptoms of disorder and lack of podding.

KEYWORDS

Sequencing, Phytoplasma, Nepovirus, Nested PCR.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

ردیابی و تفکیک دو عارضه اختلال و عدم غلافبندی سویا در مزارع استان‌های گلستان و مازندران

سون‌آی بغدادی^۱، عبدالحسین طاهری^{۱*}، سعید نصرالله‌نژاد^{۱*}، فرزاد علی‌رمجی^۱، لیلا فهمیده^۲

چکیده

به منظور ردیابی و تفکیک دو عارضه اختلال و عدم غلافبندی در سویا، ضمن بازدید از ۱۸۵ مزرعه سویا واقع در استان‌های گلستان و مازندران، فقط از کشت تابستانه ۱۷ مزرعه از پنج نقطه مختلف استان گلستان، بوته‌های دارای علائم اختلال و عدم غلافبندی حاد شناسایی و در ادامه هفده نمونه از هر مزرعه انتخاب و نمونه‌برداری از برگ یا ساقه بوته‌های مذکور به منظور استخراج RNA و DNA انجام شد. سپس PCR برای ردیابی نیو ویروس، با استفاده از پرایمر دژنره نیو ویروس و برای ردیابی فیتوپلازما با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی و یک مرحله آزمون PCR آشیانه‌ای انجام گردید، نتایج الکتروفورز، تکثیر باند ۱۸۰۰ جفت‌بازی را در PCR عمومی، قطعه ۱۲۵۰ جفت‌بازی را در PCR آشیانه‌ای مربوط به فیتوپلازما و همچنین تکثیر باند ۶۴۰ جفت‌بازی مربوط به یک نیو ویروس را تایید کرد. ضمن اینکه هیچ باندی از بوته‌های سالم مشاهده نشد. همزمان پیوند پوست و مایه‌زنی مکانیکی روی گیاه محک سویا چی پی ایکس با استفاده از نمونه‌های مذکور انجام گرفت که منجر به بروز دو نوع علائم شد. از توالی‌یابی نمونه‌های دارای اختلال (تولید تعداد کمی بذر و غلاف ریز)، *Tomato ring spot virus* استرین ep31_63026 و از توالی‌یابی نمونه‌های دارای عدم غلافبندی (علفی شدن و عدم تشکیل غلاف و بذر)، فیتوپلازمای *Aster yellows phytoplasma* از گروه 16SrI-B شناسایی شدند که نتایج گیاه محک را تایید کرد. بررسی فیلوژنتیکی نتایج توالی‌یابی حضور فیتوپلازما و نیو ویروس را فقط در کشت تابستانه نمونه‌هایی که دارای علائم اختلال و عدم غلافبندی بودند، تایید نمود.

واژه‌های کلیدی

توالی‌یابی، حشرات ناقل، فیتوپلازما، نیو ویروس، PCR آشیانه‌ای.

^۱گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
^۲گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران.

نویسندگان مسئول:

عبدالحسین طاهری و سعید نصرالله‌نژاد

رایانامه: a.taheri@gau.ac.ir

snasrollanejad@yahoo.com

استناد به این مقاله:

بغدادی، سون‌آی، طاهری، عبدالحسین، نصرالله‌نژاد، سعید، علی‌رمجی، فرزاد و فهمیده، لیلا (۱۴۰۱). ردیابی و تفکیک دو عارضه اختلال و عدم غلافبندی سویا در مزارع استان‌های گلستان و مازندران. فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۱)، ۶۰-۴۹.

مقدمه

Wrather, 2010). اگرچه حدود سی گونه ویروس از مزارع سویا در دنیا گزارش شده است اما غالباً نیو ویروس‌ها در ایجاد اختلال در غلافبندی سویا معرفی شده‌اند.

از سوی دیگر، فیتوپلاسماها بیمارگرهایی از رده‌ی مولیکوت‌ها هستند که گیاهان را از طریق ناقل‌های حشره‌ای مانند زنجره و زنجرک‌ها آلوده می‌کنند. همچنین این گروه از بیمارگرها باعث علائم مختلفی مانند زردی، کوتولگی و جاروی جادوگر در سویا می‌شوند. فیتوپلاسماها همچنین با اختلال غلاف سویا مرتبط هستند، اگرچه نقش دقیق آن‌ها در این اختلال به طور کامل شناخته نشده است (Malapi-Nelson et al, 2009). گزارش شده است که آفات مکنده مانند سنک، پسیل و زنجرک ناقل بیماری فیتوپلاسما در سویا هستند که وجود این آفات در ایران هم گزارش شده است. مطالعات مختلف نشان داده است که بروز بیماری فیتوپلاسما در مزارع با جمعیت بالای آفات مکنده در طول ماه‌های تابستان بیشتر بوده است (Bahar, et al, 2008; Cheng et al, 2023). در ایران وجود فیتوپلاسما در ایجاد عارضه عدم غلافبندی و علفی شدن بوته‌های سویا گزارش نشده است اما در مزارع سویا در ایالت میسیگان آمریکا عارضه ریزبرگی، فیلودی، جارویی شدن (بی‌باری) توسط نوعی فیتوپلاسما *Aster yellow phytoplasma* گزارش شده است (Mollov et al, 2014). همچنین محققین از کشورهای دیگر وجود فیتوپلاسما را در توت فرنگی، پاپایا، لوبیا، ماش و ... گزارش کردند که سبب ریزبرگی و عدم غلاف و باردهی در این محصولات شده است (Sedano and Morales, 2023).

مطالعات نشان داده است که آلودگی گیاهان دیگر خانواده بقولات از جمله لوبیا با نیو ویروس‌ها و فیتوپلاسماها می‌تواند سبب عدم تشکیل غلاف و اختلال در تشکیل بذر گردد (Sinclair and Backman, 2014). وجود هر کدام از این بیمارگرها ممکن است نقش مهمی در ایجاد اختلال و عدم غلافبندی سویا داشته باشند (Elmore et al, 2022). با توجه به سابقه طولانی دو عارضه عدم غلافبندی و اختلال در غلافبندی سویا در مزارع استان گلستان و مازندران و از آنجا که در ایران شناسایی مولکولی و تعیین توالی استرین ویروس‌های مذکور انجام نشده است، لذا تحقیق حاضر با هدف ردیابی و تفکیک دو عارضه عدم غلافبندی و اختلال در غلافبندی مزارع سویا با استفاده روش‌های مولکولی انجام شده است.

سویا (*Glycine max*) یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی در سرتاسر جهان به خصوص در استان‌های گلستان و مازندران است که منبع قابل توجهی از پروتئین و روغن برای مصرف انسان و خوراک دام را تامین می‌کند. این گیاه به طور گسترده در بسیاری از کشورها از جمله ایالات متحده، ایران، چین، برزیل و آرژانتین کشت می‌شود (Koenning and Wrather, 2010). بر اساس گزارش سازمان غذا و کشاورزی (FAO)، ایران در سال ۲۰۲۳ حدود ۲.۶ میلیون تن سویا تولید کرد که نوزدهمین تولیدکننده بزرگ جهان است (FAO, 2023). با این حال، تولید سویا اغلب توسط بیماری‌های مختلف گیاهی ناشی از ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و سایر عوامل بیماری‌زا تهدید می‌شود. این بیماری‌ها می‌توانند عملکرد و کیفیت محصول را کاهش دهند و در نتیجه زیان اقتصادی قابل توجهی برای کشاورزان و صنایع غذایی به همراه داشته باشند (Zhang et al, 2020). در میان عوامل مختلف ذکرشده، خسارت ناشی از فیتوپلاسماها و ویروس‌ها مهم‌ترین عاملی هستند که می‌توانند بهره‌وری این محصول بین ده الی ۹۰ درصد کاهش دهند (Jadhav Pravin et al, 2015).

از میان ویروس‌ها، نیو ویروس‌ها (مانند *Tomato ring spot virus*, *Tobacco ring spot virus*, *Tomato black ring virus*, *Arabidopsis mosaic virus*) گروهی از ویروس‌های گیاهی هستند که طیف وسیعی از محصولات از جمله سویا را آلوده می‌کنند. در بررسی‌های اولیه با روش الایزا توسط رحیمیان و همکاران سه نوع ویروس *Tobacco ring spot virus* (TRSV)، *ring spot virus* (TmRSV) و *Tobacco strike virus* (TSV) را از مزارع سویا گزارش کردند (Rahimian, et al, 2004). گلنراقی و همکاران وجود هشت ویروس را به روش سرولوژیک در مزارع سویا شمال کشور ردیابی و گزارش کردند (Gholnaraghi et al, 2002). شاملی و همکاران گزارش کردند مایه‌زنی یک نیو ویروس در بوته‌های سویا در گلخانه و شرایط طبیعی سبب بروز عارضه اختلال در غلافبندی نگردید ولی ویروس‌ها در بوته‌های سویا به دلیل تنشی که به گیاه سویا وارد می‌آورند موجب کاهش شاخص‌های رشدی و تشدید عارضه می‌شوند (Shameli et al, 2022). نیو ویروس‌ها غالباً با حشرات و نامتدها منتقل می‌شوند و می‌توانند در سویا باعث نکرور غلاف و منجر به بروز اختلال در غلافبندی شوند (Koenning and

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع سویا استان گلستان

به منظور ردیابی و تفکیک دو عارضه اختلال و عدم غلاف‌بندی از ۱۸۵ مزرعه سویا واقع در استان‌های گلستان و مازندران در سال ۱۴۰۱ بازدید به عمل آمد و نمونه‌برداری از مزارع شهرستان‌های مختلف استان گلستان و مازندران از جمله بهشهر، کردکوی، بندرگز، گرگان، گنبدکاووس و علی‌آباد قبل از برداشت محصول انجام شد و از بوته‌هایی که دارای علائم عفلی شدن، کوتولگی، جاروی جادوگر و عدم تشکیل غلاف و بذر بودند در دو دوره‌ی زمانی کشت بهاره (در بازه‌ی زمانی خرداد تا تیر) و کشت تابستانه (در بازه‌ی زمانی اواخر مرداد الی اواخر شهریور) نمونه‌برداری انجام شد (جدول ۱). در مجموع فقط در کشت تابستانه ۱۷ مزرعه از پنج نقطه مختلف استان گلستان (بندرگز، کردکوی، گرگان، علی‌آباد و گنبد) علائم اختلال و عدم غلاف‌بندی حاد شناسایی شد و در ادامه ۱۷ نمونه از هر مزرعه انتخاب و نمونه‌برداری از برگ یا ساقه بوته‌های مذکور به منظور استخراج RNA و DNA انجام شد.

روش استخراج DNA و RNA

جهت انجام آزمون PCR از نمونه‌های جمع‌آوری شده مشکوک به آلودگی با ویروس و فیتوپلازما، ابتدا استخراج DNA با هدف شناسایی فیتوپلازما و استخراج RNA با هدف شناسایی نیپو ویروس‌ها در دستور کار قرار گرفت. استخراج DNA ژنومیک گیاهی با استفاده از کیت تجاری آماده دنا زیست آسیا (Genomic DNA isolation kit IV; DENA Zist Asia, Iran) و استخراج RNA نیز از کیت غیر ستونی آماده دنا زیست آسیا (Total RNA isolation kit; DENA Zist asia, Iran) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت DNA و RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از NanoDrop و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد سنجیده شد. سپس نمونه‌های DNA با استفاده از آب دیس استریل شده با غلظت نهایی ۵۰ نانوگرم میکرولیتر رقیق شدند و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های RNA استخراج شده نیز در دمای ۸۰- برای سنتز cDNA نگهداری شدند.

جدول ۱. اطلاعات تعدادی از مزارع سویا دارای علائم اختلال و عدم غلاف‌بندی واقع در مناطق مختلف استان گلستان.

محل نمونه‌برداری	نمونه بافت گیاهی	علائم	مختصات GPS	دوره کشت	تعداد
گرگان	برگ	عفلی شدن و عدم غلاف بندی	۵۴.۳۳۴۳۹۵, ۳۶.۸۳۲۸۸۸	تابستانه	۱
گرگان	برگ	زردی و کوتولگی	۵۴.۲۸۷۳۶۰, ۳۶.۸۱۳۹۲۶	بهاره	۲
گنبدکاووس	برگ و ساقه	زردی	۵۵.۱۸۳۹۵۰, ۳۷.۲۰۵۶۱۸	بهاره	۲
بندرگز	برگ	عفلی شدن، عدم تشکیل بذر	۵۴.۰۳۵۴۱۱, ۳۶.۷۷۹۵۵۲	تابستانه	۱
بندرگز	برگ	عفلی شدن و عدم غلاف بندی	۵۳.۹۶۰۱۶۸, ۳۶.۷۵۱۰۶۲	بهاره	۲
کردکوی	برگ	نکروز غلاف و زردی	۵۴.۰۷۲۴۹۰, ۳۶.۷۸۵۸۷۶	بهاره	۱
کردکوی	برگ	نکروز غلاف	۵۴.۰۷۴۰۳۵, ۳۶.۷۷۹۲۷۷	بهاره	۲
کردکوی	برگ و ساقه	عفلی شدن و عدم تشکیل بذر و غلاف	۵۴.۰۷۵۷۵۲, ۳۶.۷۷۵۸۴۰	تابستانه	۳
کردکوی	برگ	عدم تشکیل غلاف و بذر	۵۴.۰۷۹۸۲۱, ۳۶.۷۸۹۶۳۱	تابستانه	۱
علی‌آباد	برگ	اختلال در غلاف‌بندی	۵۴.۸۰۷۰۷۰, ۳۶.۸۹۳۲۶۸	تابستانه	۲
تعداد کل مزرعه					۱۷



شکل ۱. علائم بوته‌های مشکوک به آلودگی فیتوپلازما (سمت چپ، عدم غلاف‌بندی) و نیپو ویروس (سمت راست، اختلال در غلاف بندی) در مزارع سویا استان گلستان.

سنتز cDNA و آزمون PCR نیو ویروس‌ها

جهت سنتز cDNA از کیت آماده (Easy cDNA Synthesis) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای اطمینان از سنتز cDNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد که مشاهده‌ی باندهای اسمیر نشان‌دهنده‌ی سنتز cDNA بود. علاوه بر این، جهت اطمینان از صحت روند سنتز cDNA یک کنترل منفی شامل ۱۰ میکرولیتر آب دپس و یک کنترل مثبت شامل ۱۰ میکرولیتر cDNA همراه با آغازگر کنترل مثبت شرکت پارس طوس مورد آزمون قرار گرفت. در ادامه، نمونه‌های سنتز شده همراه با مسترمیکس و آغازگرهای دژنره گروه‌های مختلف نیو ویروس (جدول ۳) شامل آغازگر Nepo-A (قادر به تکثیر باند با طول ۲۵۵ جفت باز برای شناسایی *Arabis mosaic Grapevine fanleaf virus virus deformation virus* و آغازگر Nepo-C (قادر به تکثیر باند به طول ۶۴۰ جفت باز برای شناسایی *Grapevine Tunisian Tomato ringspot virus ringspot virus* و *Grapevine Bulgarian latent virus*) پس از رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر، وارد برنامه PCR شدند (Digiario et al, 2007). برنامه‌ی PCR شامل: یک چرخه با یک تکرار برای واسرشت سازی اولیه با دمای °C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه؛ یک چرخه سه مرحله‌ای با ۳۵ تکرار به ترتیب شامل °C ۹۴ برای ۳۵ ثانیه، °C ۵۰ برای ۴۵ ثانیه و °C ۷۲ برای ۳۵ ثانیه و همچنین یک چرخه نهایی با یک تکرار در دمای °C ۷۲ به مدت ۷ دقیقه بود. پس از اتمام PCR، نمونه‌ها جهت بررسی تکثیر باند مدنظر با ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند.

روش آزمون PCR برای شناسایی فیتوپلازما

آزمون PCR به‌طور مستقیم با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی P1/P7 جهت تکثیر توالی اپرون ریبوزومی 16s-23s rRNA فیتوپلازما استفاده شد (Lee, et al, 2004) و جهت حصول اطمینان بیشتر از نمونه‌های دارای فیتوپلازما، مرحله اول آزمون PCR آشیانه‌ای با استفاده از آغازگرهای P1/P7 و از آغازگرهای R16F2n و R16R2 برای تکثیر قطعه ۱.۲ Kbp، 16srRNA نیز انجام گردید (Hiruki, 2001) (جدول ۲). در آزمون PCR عمومی از DNA کل استخراج شده به عنوان رشته‌ی الگو و جهت تهیه مخلوط PCR به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر از مسترمیکس آماده (2X Taq PreMix; Parstous;)

(Iran) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در آزمون PCR با آغازگرهای عمومی، چرخه‌های دمایی PCR شامل: یک برنامه تک چرخه‌ای با دمای °C ۹۵ برای ۲ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، یک چرخه با ۳۵ تکرار با دمای °C ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه، دمای °C ۵۴ برای ۷۵ ثانیه و دمای °C ۷۲ برای ۹۰ ثانیه و همچنین یک چرخه نهایی با یک تکرار با دمای °C ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. سپس محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز شد و سپس PCR همراه با آغازگرهای R16R2 و R16F2n با محصول PCR عمومی به عنوان رشته الگو و مشابه مرحله قبل با مسترمیکس آماده انجام شد. چرخه‌ی دمایی PCR آشیانه‌ای نیز در این مرحله کمی با مرحله‌ی قبلی متفاوت بود و عبارت بود از یک برنامه‌ی تک چرخه‌ای با دمای °C ۹۴ برای ۲ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، یک چرخه با ۳۵ تکرار شامل: دمای °C ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، دمای °C ۶۰ به مدت ۷۵ ثانیه و دمای °C ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و همچنین یک چرخه نهایی با یک تکرار ۱۰ دقیقه‌ای با دمای °C ۷۲ بود. در صورت وجود فیتوپلازما بایستی محصول PCR آشیانه‌ای شامل قطعه تکثیر شده ۱۲۵۰ جفت باز از ژن RNA ریبوزومی 16S باشد، لذا پس از اتمام PCR آشیانه‌ای همانند مرحله‌ی قبل، محصولات سنتز شده در ژل آگارز ۱/۲ الکتروفورز شدند تا پس از شناسایی محصولات تکثیر شده دارای طول باند ۱۲۵۰ جفت باز بتوان وجود فیتوپلازما را در نمونه‌های استخراج شده تأیید نمود.

تعیین توالی و ترادف نوکلئوتیدی

تعداد ۱۷ نمونه محصول PCR آشیانه‌ای با جفت آغازگرهای R16F2n/R16R2 مربوط به فیتوپلازما و محصول PCR حاصل از آغازگرهای دژنره مربوط به نیو ویروس، جهت تعیین توالی به شرکت Microsynth سوئیس ارسال گردید، پس از دریافت نتایج توالی‌یابی با روش سانگر، نتایج به‌دست‌آمده در نرم‌افزار Mega-X وجود فاصله‌های اضافی اصلاح گردید و سپس توالی‌های مذکور در پایگاه داده NCBI با تمام توالی‌های مرتبط با بیمارگرهای مورد نظر موجود در بانک ژن مقایسه و نزدیک‌ترین توالی به آن‌ها شناسایی گردید. آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌ها و نزدیکی آن‌ها با گروه‌ها و زیرگروه‌های مختلف بیمارگر با استفاده از نرم‌افزار Mega-X و به روش تخمین درست‌نمایی بیشینه (Maximum likelihood) با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی بوتاسترپ انجام شد.

جدول ۲. اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده‌شده در آزمون‌های PCR و PCR آشیانه‌ای برای شناسایی فیتوپلازما.

Primer name	Sequence(5'- 3')	Amplified fragment size	Position	Reference
P1: Forward	AAGAATTTGATCCTGGCTCAGGATT	1800 bp	16sr DNA	Deng and Hiruki 1991
P7: Reverse	CGTCCTTCATCGGCTCTT		23sr DNA	Schneider <i>et al.</i> 1995
R16F2n: Forward	GAAACGACTGCTAAGACTGG	1250 bp	16sr DNA	Gundersen and Lee, 1996
R16R2: Reverse	TGACGGGGCGGTGTGTACAAACCCCG		16sr DNA	Lee <i>et al.</i> , 1993

جدول ۳. اطلاعات مربوط به آغازگرهای دژنره استفاده شده در آزمون‌های PCR برای شناسایی نیو ویروس.

Primer name	Sequence	Amplified fragment size	Position	Reference
Nepo - A: Forward	5'GGHDTBCAKTMYSSARRARGG-3'	255 bp	CP-RNA2	Digiario <i>et al.</i> , 2007
Nepo - A: Reverse	5'TGDCCASWVARYTCYCCATA-3'		CP-RNA2	
Nepo - C: Forward	5' TRKDYTGGYKAAMYCCA-3'	640 bp	UTR-RNA1	
Nepo - C: Reverse	5'TMATCSWASCRHGTGSKKGCCA-3'		UTR-RNA1	

فیتوپلازمای *Aster yellows phytoplasma* از گروه 16SrI-B شناسایی شدند که نتایج گیاه محک را تایید کرد. همچنین از نمونه‌های جمع‌آوری شده مشکوک به فیتوپلازما تعداد ۱۷ نمونه مثبت و دارای باند در ناحیه ۱۲۵۰ جفت بازی بود که به علت وجود شباهت بین نمونه‌ها، دو توالی به شماره دسترسی‌های OQ851498 و OR039630 در بانک ژن به ثبت رسید. جستجو با برنامه برخط بلاست با استفاده از توالی هم‌تراز شده نشان داد که توالی مورد مطالعه در این تحقیق در میان فیتوپلازمای موجود در بانک ژن، بیشترین نزدیکی (۱۰۰٪ شباهت) را با فیتوپلازمای گونه *Aster yellows phytoplasma* که جدایه‌ای از چین با میزبان سویا بود، نشان داد.

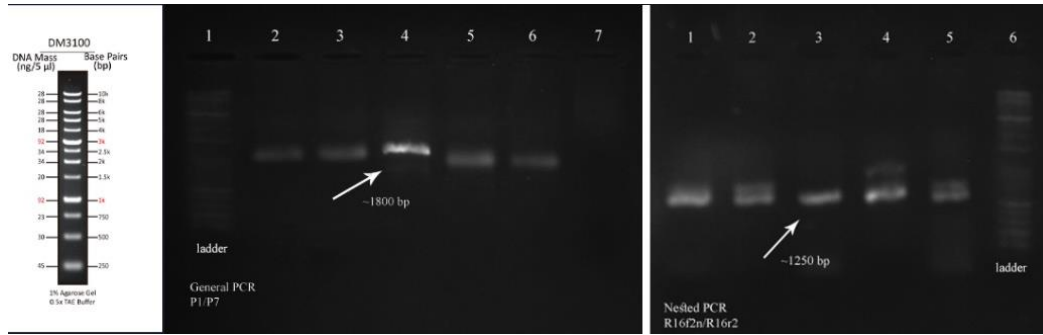
جهت آنالیز تبارزایی و رسم درخت فیلوژنتیک از توالی‌های مربوط به گروه‌های مختلف فیتوپلازمایی و همچنین توالی‌های مربوط به زیرگروه‌های گزارش شده فیتوپلازمایی که با عدم غلاف بندی سویا در ایران و جهان همراه بودند با استفاده از نرم‌افزار Mega-x و با الگوریتم تخمین درست‌نمایی بیشینه (Maximum likelihood) و مدل Tamura-Nei و با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ استفاده شد که در آن‌گونه‌ی مورد مطالعه در درخت فیلوژنتیک با گونه *Aster yellows phytoplasma* در یک گروه جداگانه و در شاخه نزدیک به جدایه‌ای از چین با میزبان سویا قرار گرفت (شکل ۵). الگوی RFLP مجازی مشتق شده از قطعه 16S rDNA F2nR2 با الگوهای مرجع همه گروه‌ها/زیرگروه‌های 16Sr که قبلاً ایجاد شده بودند و با گروه مرجع 16SrI، زیرگروه B (دسترسی: AP006628 GenBank)، با ضریب شباهت ۱۰۰٪ مطابقت داشت که نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیک را تأیید نمود (شکل ۴).

برای آنالیز فیتوپلازما از *Acheloplasma axanthum* به‌عنوان گروه خارجی و برای نیو ویروس‌ها گونه‌ی *Satsuma dwarf virus* از خانواده Secoviridae به‌عنوان گروه خارجی در آنالیز فیلوژنتیکی استفاده شد. جهت تطبیق بیشتر و آنالیزی دقیق‌تر از فیتوپلازمای توالی‌یابی شده از روش مقایسه نقوش RFLP مجازی با استفاده از برنامه *iPhyClassifier* (در تارنمای <https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج ردیابی فیتوپلازما

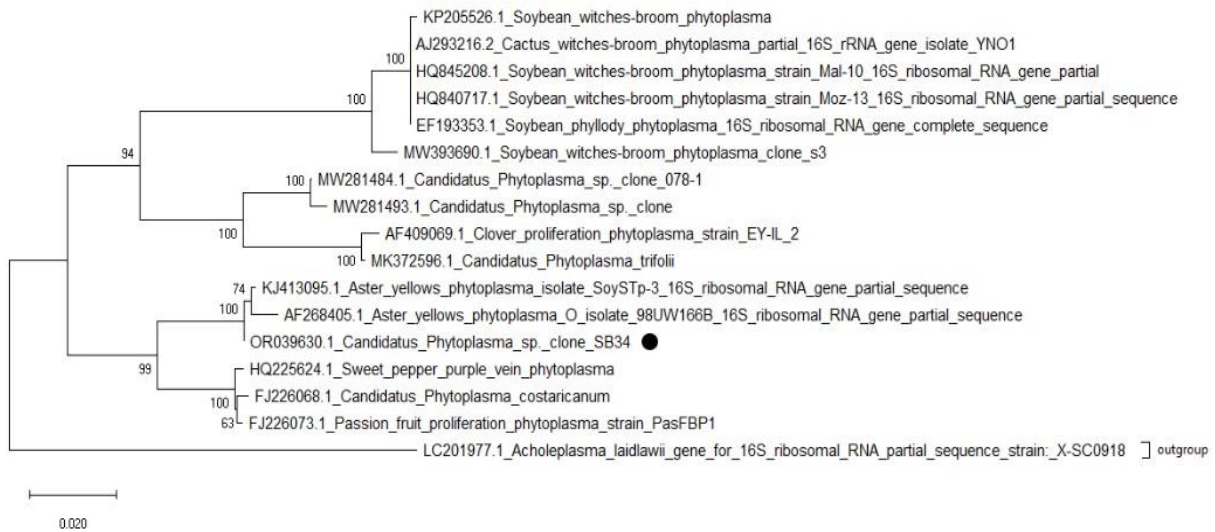
عارضه‌ی عدم غلاف بندی در مزارع استان گلستان همراه با علائمی چون عدم تشکیل غلاف و بذر، کوتولگی و نکروز غلاف مشاهده شد (شکل ۱ و شکل ۳). نمونه‌های جمع‌آوری شده دارای علائم برای بررسی وجود یا عدم وجود فیتوپلازما با آزمون PCR عمومی همراه با آغازگرهای P1/P7 و PCR آشیانه‌ای با آغازگرهای R16F2/R16R2 بررسی شدند که در هر دو آزمون پس از انجام مرحله الکتروفورز، محصول PCR حاوی DNA نمونه‌های آلوده، قطعات مورد انتظار ۱۸۰۰ جفت‌باز را در PCR عمومی و قطعه ۱۲۵۰ جفت‌باز را در PCR آشیانه‌ای تکثیر کردند (جدول ۳ و شکل ۲). در همین راستا هیچ باندی از بوته‌های سالم و بدون علائم مشاهده نشد. با انجام پیوند پوست و مایه‌زنی مکانیکی روی گیاه محک سویا جی پی ایکس با استفاده از نمونه‌های مذکور، دو نوع علائم ظاهر شد. از توالی‌یابی نمونه‌های دارای اختلال (تولید تعداد کمی بذر و غلاف ریز)، *Tomato ring spot virus* استرین ep31_63026 و از توالی‌یابی نمونه‌های دارای عدم غلاف‌بندی (علفی شدن و عدم تشکیل غلاف و بذر)،



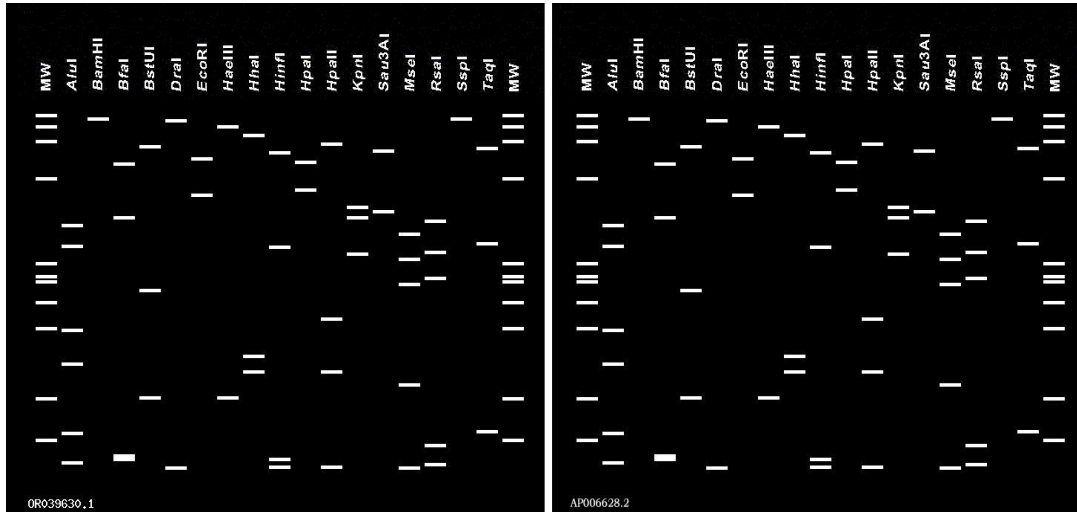
شکل ۲. نتایج الکتروفورز محصولات PCR با آغازگرهای P1/P7 و R16F2/R16R2. سمت چپ تصاویر مربوط به آغازگر P1/P7 و تشکیل باند در محدوده‌ی ۱۸۰۰ جفت‌باز که به ترتیب کشت تابستانه نمونه کردکوی (شماره ۲ و ۳)، نمونه بندر گز (شماره ۴ و ۵) و نمونه گنبدکاووس (شماره ۶) می‌باشد و آن دسته از نمونه‌هایی که تشکیل باند ندادند مربوط به نمونه‌های سالم و یا فاقد فیتوپلازما می‌باشند. سمت راست مربوط به آغازگرهای R16F2/R16R2 و تشکیل باند در محدوده‌ی ۱۲۵۰ جفت‌باز و ترتیب قرارگیری نمونه‌ها مشابه موارد آغازگرهای عمومی بوده است.



شکل ۳. مقایسه نتیجه مایه زنی فیتوپلازما (شماره ۲) و نیو ویروس (شماره ۱) در گیاه سویا رقم دی بی ایکس، (شماره یک اختلال در تشکیل بذر اما شماره ۲ عدم تشکیل بذر و غلاف سالم).



شکل ۴. درخت فیلوژنتیک رسم شده با برنامه Mega-X با استفاده از الگوریتم تخمین درست‌نمایی بیشینه و بوت‌استرپ ۱۰۰۰ بر اساس ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژن 16S rRNA، برای تعیین نزدیکی جدایی‌توالی‌یابی شده در مطالعه حاضر که با علامت مشخص شده ● با گروه‌های مختلف فیتوپلازمایی و *Acheloplasma laidlawii* به‌عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

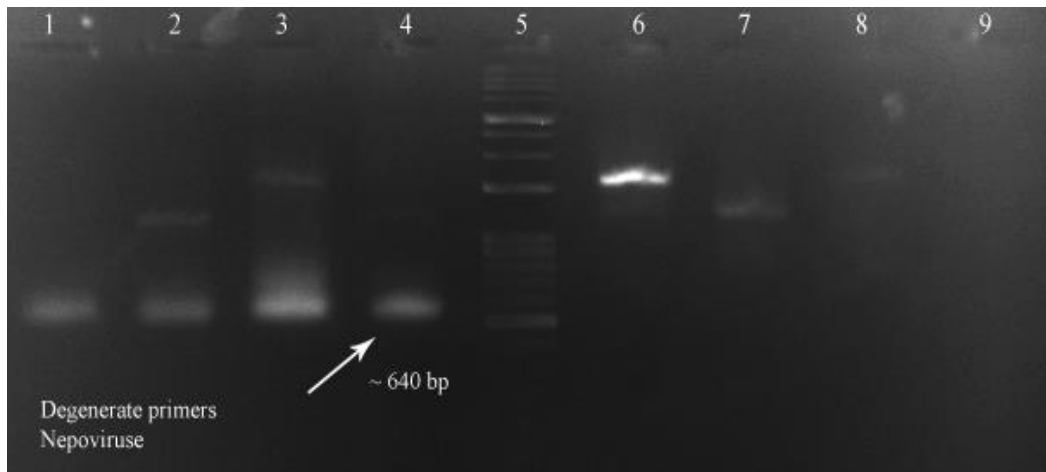


شکل ۵. نقوش حاصل از RFLP مجازی با استفاده از نرم‌افزار PhyClassifier بر اساس ترادف نوکلئوتیدی محصول PCR آشیانه‌ای فیتوپلاسمای توالی‌یابی شده در تحقیق حاضر (سمت چپ) و فیتوپلاسمای زیرگروه 16SrI-B.

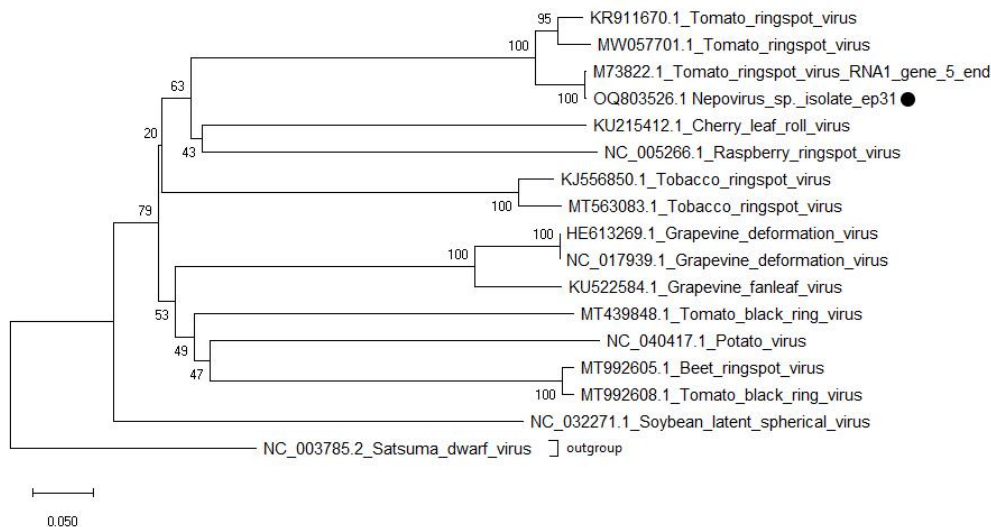
نتایج ردیابی نیپو ویروس

نمونه‌هایی که برای شناسایی نیپو ویروس‌ها با استفاده از آغازگر Nepo-C مورد ارزیابی قرار گرفتند توانستند قطعه ناحیه ۶۴۰ جفت باز را تکثیر کنند. در نتیجه وجود باند در محدوده ۶۴۰ جفت بازی وجود نیپو ویروس را تایید کرد. ضمن اینکه هیچ باندهایی از بوته‌های سالم مشاهده نشد (جدول ۳ و شکل ۶). از ۱۷ نمونه نیپو ویروس دارای باند در ناحیه مورد نظر و با دارا بودن توالی کوتاه‌تر از ۷۰۰ نوکلئوتید، یک توالی به نمایندگی از ۱۷ نمونه نیپو ویروس با شماره دسترسی OQ803526 به صورت Partial gene در بخش Bankit بانک ژن ثبت شد.

نمونه نیپو ویروس مورد مطالعه بیشترین شباهت (حدود ۹۹ درصد) را بین گونه‌های نیپو ویروس با گونه‌ی *Tomato ring spot virus* از کشور چین و میزبان تمشک نشان داد. آنالیز تبار زایی و رسم درخت فیلوژنتیک توالی نیپو ویروس در مقایسه با گونه‌های گزارش شده از این خانواده بر روی سویا و دیگر گونه‌های مشابه، با الگوریتم تخمین درست‌نمایی بیشینه (Maximum likelihood) و مدل Tamura-Nei و با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ نشان داد که این گونه با گونه‌ی *Tomato ring spot virus* با جدایی‌ای از چین در یک گروه و شاخه جداگانه قرار دارد (شکل ۷).



شکل ۶. نتایج الکتروفورز محصولات PCR با آغازگر دژنره Nepo-C و تشکیل باند در محدوده‌ی ۶۴۰ جفت‌باز. به ترتیب نمونه کردکوی (شماره ۱ کشت تابستانه و ۲ کشت بهاره)، نمونه بندرگز (۳ کشت تابستانه و ۴ کشت بهاره)، نشانگر (۵)، کنترل مثبت (۶) و کنترل منفی (۹) می‌باشند و آن دسته از نمونه‌هایی که تشکیل باند ندادند مربوط به نمونه‌های سالم و یا فاقد نیپو ویروس در این آغازگر می‌باشند.



شکل ۷. درخت فیلوژنتیک رسم شده با برنامه Mega-X با استفاده از با الگوریتم تخمین درست‌نمایی بیشینه و بوت‌استرپ ۱۰۰۰ بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه RNA1، برای تعیین نزدیکی جدایه توالی یابی شده در مطالعه حاضر که با علامت مشخص شده ● با گونه‌های مختلف نیپو ویروس گزارش شده بروی سویا و *Satsuma dwarf virus* به‌عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

جدول ۳. جدایه‌های مختلف از میزبان سویا و مطابقت آن‌ها از نظر تکثیر باند الکتروفورز با نتایج فیتوپلازما و یا نیپو ویروس در استان گلستان.

نام جدایه	محل جداسازی	نوع آلودگی	دوره کشت	شماره باند الکتروفورز
Kb-1100	کردکوی	فیتوپلازما	بهاره	۲ (شکل ۲)
Kt-0600	کردکوی	فیتوپلازما	تابستانه	۳ (شکل ۲)
Kt-0300	کردکوی	نیپو ویروس	تابستانه	۱ (شکل ۶)
Kt-0400	کردکوی	نیپو ویروس	بهاره	۲ (شکل ۶)
Bt-0500	بندرگز	نیپو ویروس	تابستانه	۳ (شکل ۶)
Bb-0700	بندرگز	نیپو ویروس	بهاره	۴ (شکل ۶)
Bt-0800	بندرگز	فیتوپلازما	تابستانه	۴ (شکل ۲)
Bb-0900	بندرگز	فیتوپلازما	بهاره	۵ (شکل ۲)
Gb-0200	گنبد کاووس	فیتوپلازما	بهاره	۶ (شکل ۲)

عارضه اختلال و عدم غلاف‌بندی سویا (SPD) یک بیماری پیچیده است که محصولات سویا را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطالعات اخیر حضور عاملی از نیپو ویروس را دلیل اصلی SPD و حضور فیتوپلازما زردی گل مینا عامل اصلی SPSFS شناسایی کرده‌اند (Cheng et al, 2023). با این حال، مطالعات نشان داده که نیپو ویروس‌هایی مانند *Alfalfa mosaic virus* (AMV) و *Tobacco streak virus* (TSV) می‌توانند موجب بروز علائمی غیر از عدم غلاف‌بندی در سویا شوند (Elmore et al, 2022). نیپو ویروس‌ها یک ویروس RNA دار تک‌رشته‌ای هستند، درحالی‌که فیتوپلازما یک عامل بیمارگر گیاهی از شاخه پروکاریوت‌ها و از رده‌ی مولیکیوت‌ها است که هر دو آنها در آوند آبکش فعالیت می‌کنند و آلودگی آنها در گیاهان از طریق حشرات مکنده و غالباً قبل از گلدهی اتفاق می‌افتد (Bertin et al, 2018). براساس نتایج تحقیق حاضر مشخص شد که عوامل فیتوپلازمایی شدت خسارت بالاتری دارند و به‌طور کامل از تشکیل بذر و غلاف جلوگیری می‌کنند و ممکن است صددرصد مزارع را علفی کرده و راندمان را به صفر برسانند در حالی که در عارضه اختلال در غلاف‌بندی که توسط نیپو ویروس ایجاد می‌شود غلاف‌بندی تشکیل شده اما بذر کم و بی‌کیفیتی تولید می‌شود و راندمان را بطور محسوسی کاهش می‌دهد، نتایج مطالعه حاضر همراستا با نتایج تحقیقات Li و همکاران (Li et al, 2019). می‌باشد.

فیتوپلازماها در بسیاری از گونه‌های حشرات مکنده از جمله زنجرفک‌ها شناسایی (از طریق PCR و میکروسکوپی) و گزارش شده است و حدود ۲۰۰ گونه حشره در خانواده‌های مختلف مانند *Fulgoromorpha Hemiptera* *Auchenorrhyncha*

عارضه اختلال و عدم غلاف‌بندی سویا (SPD) یک بیماری پیچیده است که محصولات سویا را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطالعات اخیر حضور عاملی از نیپو ویروس را دلیل اصلی SPD و حضور فیتوپلازما زردی گل مینا عامل اصلی SPSFS شناسایی کرده‌اند (Cheng et al, 2023). با این حال، مطالعات نشان داده که نیپو ویروس‌هایی مانند *Alfalfa mosaic virus* (AMV) و *Tobacco streak virus* (TSV) می‌توانند موجب بروز علائمی غیر از عدم غلاف‌بندی در سویا شوند (Elmore et al, 2022). نیپو ویروس‌ها یک ویروس RNA دار تک‌رشته‌ای هستند، درحالی‌که فیتوپلازما یک عامل بیمارگر گیاهی از شاخه پروکاریوت‌ها و از رده‌ی مولیکیوت‌ها است که هر دو آنها در آوند آبکش فعالیت می‌کنند و آلودگی آنها در گیاهان از طریق حشرات مکنده و غالباً قبل از گلدهی اتفاق می‌افتد (

به حداقل رساندن خسارت می‌تواند بسیار مهم باشد (Bertin *et al* 2019; Li *et al* 2018; *al*). همچنین برتین و همکاران (۲۰۱۸) اهمیت درک اپیدمیولوژی و بوم‌شناسی هر دو بیمارگر فیتوپلاسمایی و نیو ویروس را برای توسعه استراتژی‌های کنترل مؤثر مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها همچنین نیاز مبرم به رویکردهای مدیریت تلفیقی آفات مکنده یا ناقلین این بیمارگرها که ترکیبی از روش‌های کنترل زراعی، شیمیایی و بیولوژیکی باشد را تأکید کردند (Bertin *et al* 2018). Wu و همکاران (۲۰۲۰) به تعاملات مولکولی بین سویا، فیتوپلازما و نیو ویروس پرداختند. آن‌ها در مورد اینکه چگونه این دو پاتوژن می‌توانند با یکدیگر و با گیاه میزبان در سطح مولکولی تعامل داشته باشند، بحث کردند که منجر به تغییر در بیان ژن، سیگنال دهی هورمونی و پاسخ‌های استرس می‌شود. آن‌ها همچنین نقش بالقوه مولکول‌های RNA کوچک را در تنظیم این فعل و انفعالات مورد ارزیابی قرار دادند (Wu *et al* 2020).

در مطالعه‌ای که در ایران توسط گل نراقی و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شد نشان داد، نیو ویروس‌هایی چون *Tomato ring* و *Tobacco ring spot virus* (TRSV) *spot virus* (ToRSV) که در ۷ درصد مزارع سویا مورد ارزیابی، شناسایی شده بودند با عارضه‌ی عدم غلاف بندی نیز همراه بوده‌اند (Golnaraghi *et al*, 2002). در مطالعه‌ای که توسط Haudenschild و همکاران (۲۰۱۸) صورت گرفت و یک مرور کلی از گروه‌های مختلف فیتوپلازما ارائه داد که بر گیاهان سویا تأثیر می‌گذارند. بر اساس گزارش آنها، چهار گروه فیتوپلاسمایی در سویا شناسایی شده است: 16SrII، 16SrI، 16SrIII و 16SrXII که هر گروه با علائم خاص، ناقلان اختصاصی و توزیع جغرافیایی، مشخص شده‌اند. گروه 16SrI رایج‌ترین و گسترده‌ترین گروه فیتوپلازما در سویا است که باعث بیماری‌هایی مانند جاروی جادوگر سویا، زردی و لکه‌های ارغوانی روی پهنک برگ می‌شود. گروه 16SrII با بیماری کوتولگی سویا مرتبط است، درحالی که گروه 16SrIII باعث بیماری کوتولگی و زرد می‌شود. گروه 16SrXII یک گروه فیتوپلازما نسبتاً جدید است که در سویا در برزیل شناسایی شده است. همچنین تحقیقات نشان داده است که چندین گونه فیتوپلازما می‌تواند با اختلال غلاف بندی سویا مرتبط باشد، از جمله آن‌هایی که متعلق به گروه 16SrI (مانند فیتوپلازما aster yellows) و گروه 16SrIII هستند (Ziems *et al*, 2007).

Cicadomorpha و *Psylloidea* با فیتوپلازماها مرتبط هستند. شدت علائم آلودگی فیتوپلازما ممکن است بسته به شرایط آب و هوایی متفاوت باشد، به‌عنوان مثال، دمای بالای محیط ممکن است گیاهان را قادر سازد تا آلودگی را کمتر تحمل کنند، از طرف دیگر دمای بالا ممکن است فعالیت ناقلین فیتوپلازما از جمله سنک و زنجره را که ناقلین اصلی و مهم فیتوپلازما هستند را افزایش دهد (Soufi and Komar, 2014). در مطالعه‌ای مشابه در ذرت برای بررسی وجود فیتوپلازما، گزارش شد که علائم بیماری عامل استولبور از اواخر تیرماه ظاهر و تا اوایل شهریور تشدید می‌شود، در آن مطالعه عوامل محیطی هم در شدت و هم در بروز بیماری نقش دارند و بیماری با خسارت شدیدتر مربوط به مزارع زودرس و تابستان‌های گرم و خشک است که در واقع ناشی از افزایش فعالیت ناقلین و بروز تنش‌های شدید محیطی بود (Jović *et al*, 2009). بیولوژی زنجره‌های ناقل فیتوپلازما نشان داد که اوج فعالیت این آفات در اواخر تابستان بوده که با ظهور حشرات ماده بالغ بروی میزبان‌های مختلف همراه است و این موضوع نرخ بروز بیماری فیتوپلازما را افزایش می‌دهد (Weintraub and Jones, 2009).

تحقیقات نشان داده است احتمال آلودگی گیاهان به بیماری ویروسی و فیتوپلاسمایی بعد از گلدهی در میزبان کاهش می‌یابد و احتمالاً گیاه در این مرحله به‌خاطر تولید ترکیبات فنل و فیتوآلکسین بیشتر، به این بیمارگرها مقاوم می‌شود و معمولاً آلودگی میزبان توسط حشرات ناقل قبل از گلدهی که گیاه حساس تر است صورت می‌گیرد و علایم حاد بعد از گلدهی در میزبان ظاهر می‌شود (Bertin *et al*, 2018). بنابراین در مزارع سویای استان‌های شمالی کشور، کشت‌های بهاره که گلدهی آنها با اواخر بهار مصادف می‌شود می‌تواند نوعی فرار از بیماری باشد اما در کشت‌های تابستانه که گلدهی آنها با اواسط تابستان و اوج فعالیت حشرات ناقل مصادف می‌شود و احتمال آلودگی به این دو عارضه در مزارع سویا افزایش می‌یابد.

مطالعات گذشته توسط برتین و همکاران (۲۰۱۸)، Li و همکاران (۲۰۱۹)، Wu و همکاران (۲۰۲۰) شناسایی دو بیمارگر فیتوپلازما و نیو ویروس در سویا و تأثیر اقتصادی آن بر تولید سویا را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که آلودگی هم‌زمان این دو بیمارگر در یک بوته اتفاق نمی‌افتد اما ظهور هر دو آنها در یک زمان در یک منطقه می‌تواند اتفاق بیفتد و باعث کاهش عملکرد قابل توجه در محصول شود. تشخیص زود هنگام برای جلوگیری از گسترش این عوامل بیماری‌زا و به‌منظور

نداشتند نیز تأیید گردید. همچنین نتایج نشان داد که هر دو بیمارگر نپو ویروس و فیتوپلازما تنها در کشت تابستانه بوته‌هایی که علائمی چون علفی شدن و عدم تشکیل غلاف و بذر داشتند ردیابی و شناسایی شد، این مورد می‌تواند نشان دهنده‌ی این موضوع باشد که با توجه به گرم‌تر شدن هوا و اوج جمعیت و فعالیت حشرات ناقل ویروس و فیتوپلازما، نرخ بروز این دو بیماری فقط در کشت تابستانه بالا رفته است. لذا با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق که بروز فیتوپلازما و نپو ویروس در مزارع سویا استان گلستان و حضور ناقلین عامل بیمارگر همزمان اتفاق می‌افتد، پیشنهاد می‌شود که تنها کشت بهاره سویا در دستور کار برنامه‌ریزان قرار گیرد و از کشت تابستانه سویا خودداری شود و یا اینکه پس از برداشت گندم، کشت تابستانه سویا به صورت محدود انجام شود. اما اگر در صورت لزوم کشت تابستانه در سطح زیاد صورت گرفت؛ به علت افزایش فعالیت ناقلین حشره‌ای و وجود شرایط تنش‌زا مانند افزایش ناگهانی دما، مبارزه با حشرات مکنده حداقل یک بار قبل از گلدهی در دستور کار کشاورزان قرار گیرد تا موجب کاهش جمعیت حشرات ناقل شده و نرخ آلودگی مزارع سویا به دو عارضه مذکور را کاهش دهد.

References

- Allington, W. B. (1946). Bud blight of soybean caused by the *Tobacco ring spot virus*. *Phytopathology*, 36(4), 319-322. ALLINGTON, W. B.
- Arocha, Y., Peralta, E. L., & Jones, P. (2023). Genetic characterization of phytoplasmas associated with yellow leaf syndrome (YLS) in Cuba. *Phytopathology*, CENSA, Apdo 10. Carretera.
- Bertin, S., Galletti, R., Paltrinieri, S., & Contaldo, N. (2018). Phytoplasma and virus diseases of soybean in Italy: state of the art and future perspectives. *Journal of Plant Pathology*, 100(3), 403-413.
- Cheng, R., Yan, R., Mei, R., Wang, Y., Niu, W., Ai, H., Qiao, S., Xu, M., Yu, W., Ye, W., Wang, Y., Tao, X., Zhou, X., & Xu, Y. (2023). Epidemiological evaluation and identification of the insect vector of 2 soybean stay-green associated virus. *Biorxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.03.13.532384>
- Digiario, M., Elbeaino, T., & Martelli, G. P. (2007). Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting

از آنجایی که ناپایداری ژنوم فیتوپلازماها به یکپارچگی فاز و رویدادهای نوترکیب محدود نمی‌شود. ترانسپوزون‌های پیچیده که واحدهای متحرک بالقوه (PMUs) نامیده می‌شوند، تأثیر قابل توجهی در تکثیر بخشی از ژنوم‌های فیتوپلازما دارند و طبقه‌بندی گونه‌ها را دچار مشکل می‌کند با این اوصاف، شناسایی قاطع زیر گونه‌های فیتوپلازمایی در مطالعات با آغازگرهای جدید می‌تواند اطلاعات جدیدتری را بازگو کند که نیاز به بررسی و مطالعه بیشتر دارد (Kube et al, 2012).

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر ردیابی و تفکیک و همچنین احتمال همراهی نپو ویروس و فیتوپلازما در ایجاد عارضه اختلال در غلاف بندی سویا در نمونه‌های جمع‌آوری شده استان گلستان مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته از جمله نتایج حاصل از آزمون‌های PCR، نتایج توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی، وجود فیتوپلازما در ۱۷ نمونه سویا با روش‌های فوق مورد تأیید قرار گرفت. همچنین حضور گونه‌ی *Tomato ring spot virus* که از خانواده نپو ویروس‌ها در نمونه‌های دیگر که فیتوپلازما

- nepoviruses of subgroups A, B and C. *Journal of virological methods*, 141(3): 34-40.
- Deng, S. J., & Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S ribosomal-RNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J Microbiol Methods*, 14(1), 53-61.
- Elmore, M. G., Groves, C. L., Hajimorad, M. R. et al. (2022). Detection and discovery of plant viruses in soybean by metagenomic sequencing. *Virology*, 19, 149. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01872-5>.
- FAO. (2023). FAOSTAT: Production - Crops, 2023 data. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Farzadfar, Sh., Golnaragi, A. R., & Pourrahim, R. (2002). *Plant Viruses of Iran*. Saman Co. Tehran. Iran. 145p.
- Garison, A. S. (2004). *Tobacco ring spot virus*. <http://www.soydiseases.uiuc.edu/diseases>.
- Golnaraghi, A. R., Shahraeen, N., Purrahim, R., Farzadfar, Sh., & Ghasemi, A. (2002). First report of the natural occurrence of eight viruses affecting soybeans in Iran. *New Disease Reports*, 5 (1).

- Gundersen, D. E., & Lee, I.-M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr*, 35, 144-151.
- Haudenschild, J. S., Hartman, G. L., & Kabbage, M. (2018). *Management of Soybean Diseases*. In J. R. Smith & H. W. Hunt (Eds.), *Soybean: Improvement, Production, and Uses* (pp. 445–486). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr63.c13>.
- Heinrich, M., Botti, S., Caprara, L., Arthrofer, W., Strommer, S., & Hanzer, V. (2001). Improved detection method for fruit tree phytoplasmas. *Plant Mol. Biol. Rep. Egyptian J. Virol*, 11 (2), 35-45, 2014. 19, 169-179.
- Jović, J., Cvrković, T., Mitrović, M., Krnjajić, S., Petrović, A., Redinbaugh, M. G., Pratt, R.C., Hogenhout, S.A., & Tosevski, I. (2009). Stolbur phytoplasma transmission to maize by *Reptalus panzeri* and the disease cycle of maize redness in Serbia. *Phytopathology*, 99(9), 1053-1061. <https://doi.org/10.1094/PHTO-99-9-1053>.
- Lee, I. M., Martini, M., Marcone, C., & Zhu, S. F. (2004). Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposition of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the Phytoplasma. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Mar 54(Pt 2), 337-47
- Lee, I. M., Hammond, R. W., Davis, R. E. *et al.* (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology*, 83, 834-842.
- Li, R., Li, Y., Zhang, Y., Liu, X., & Wang, Q. (2019). Co-infection of soybean with *Soybean mosaic virus* and phytoplasma reduces yield and quality. *Plant Disease*, 103(4), 708-714.
- Jadhav Pravin, V., Mane, S. S., Nandanwar, R. S., Kale, P. B., Dudhare, M. S., & Moharil, M. P. (2015). Floral bud distortion in soybean and incidence in Central India. *Egyptian Journal of Biology*, 15, 59-65.
- Koenning, S. R., & Wrather, J. A. (2010). Suppression of Soybean Yield Potential in the Continental United States by Plant Diseases from 2006 to 2009. *Plant Health Progress*, 11(1), 1-9. <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-0106-01-RS>.
- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R., & Seemuller, E. (2012). Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism. *The Scientific World Journal*, 1(1).
- Rahimian, H., Hamdollazadeh, A., & Motazari, M. (1996). Identification of viral agent associated with Soybean podding disorder. *Iranian J of Plant Pathology*, 32(1), 491-498.
- Sedano, R. E., & Morales, F. (2023). Aster yellow phytoplasma adapted to *Phaseolus vulgaris* L. in El Salvador, Colombia Central America. *JOURNAL Virology*, NCBI.Submitted (04-FEB-2002).
- Shameli, S., Shahraeen, N., & Safarnejad, M. R. (2022). Assessment of Yield and Soybean Cultivars Response to Nepoviruses, and Possible Effect of Nepoviruses on Soybean Podding Disorder. *Journal of Plant Protection*, 29(4): 165-183.
- Sinclair, J. B., & Backman, P. A. (2014). Compendium of soybean diseases. *American Phytopathological Society*, 147-149.
- Soufi, Z., & Komor, E. (2014). Latent infection of asymptomatic Hawaiian sugarcane cultivars with 16SrI and 16SrXI phytoplasmas. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 255-263.
- Schneider, B., Seemu'ller, E., Smart, C. D., *et al.* (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG (eds) *Molecular. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, 1(2).
- Tu, J. C. (1986). Strains of *Tobacco ring spot virus* isolated from soybean (*Glycine max*) in southwestern Ontario (Canada). *Canadian Journal of Plant Science*, 66, 491-498.
- Malapi-Nelson, M., Wen, R. H., Ownley, B. H., & Hajimorad, M. R. (2009). Co-infection of Soybean with *Soybean mosaic virus* and *Alfalfa mosaic virus* Results in Disease Synergism and Alteration in Accumulation Level of Both Viruses. *Plant disease*, 93(12), 1259-1264. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-12-1259>
- Weintraub, P., & Jones, P. (2009). PHYTOPLASMAS Genomes, Plant Hosts and Vectors, *CAB International*, United Kingdom.432p.
- Wu, Y., Huang, L., Zhang, J., & Chen, Y. (2020). RNA interference technology for controlling plant viruses and phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1168.
- Yu, S., & Zhu, A.N. (2023). Carica papaya Represents a New Host of 16SrI-B Subgroup Phytoplasma Associated with Yellow Symptoms in China. *Plant Protection Tropical Center*, NCBI.
- Ziems, A. D., Giesler, L. J., Graef, G. L., Redinbaugh, M. G., Vacha, J. L., Berry, S., Madden, L., & Dorrance, A. (2007). Response of Soybean Cultivars to *Bean pod mottle virus* Infection. *Plant Disease*, 91(6), 719-726.