



<https://tbj.ui.ac.ir/?lang=en>

Taxonomy and Biosystematics

E-ISSN: 2322-2190

Document Type: Research Paper

Vol. 13, Issue 4, No.49, Winter 2022, P:2

Received: 12/10/2021 Accepted: 20/12/2021

Phytoplasma Classification Methods

Maryam Ghayeb Zamharir

Associate Professor, Phytobacteriology Laboratory, Department of Plant Pathology Research, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Tehran, Iran
zamharir2005@yahoo.com

Abstract

Phytoplasmas are specialized prokaryotes and obligate parasites of plant and insect vectors. Because these organisms are not culturable in vitro, many of the conventional phenotypic tests used for the taxonomy of cultured maillots are not applicable to phytoplasmas. This indicates the importance of molecular and phylogenetic properties in relation to phenotypic properties in determining the taxonomic position of phytoplasmas. In the last decade, methods based on biology and molecular genetics, such as comparing the nucleotide sequence of a portion of ribosomal RNA, have made it possible to establish evolutionary and phylogenetic relationships between different isolates of phytoplasmas with each other and with other prokaryotes. Comparison of the nucleotide sequence of a part of the 16S rRNA gene or the 16S-23S and tRNA-Ile gene regions can still be used to analyze a large number of unknown (large-scale) phytoplasmas. Subgroup clustering is done using less conserved regions, such as the ribosomal protein-coding gene and the 16S and 23S intergenic, the general cpn60 target gene, the SecA coding gene, the secY gene, the ribosomal protein (rp) gene, and the tuf gene.

Key words: Phytoplasma, Classification, 16S rRNA.

*Corresponding author

Ghayeb Zamharir, M. (2021). Phytoplasma classification methods. *Taxonomy and Biosystematics*, 13(49), 11-28.



2322-2190 / © 2021 The Authors. Published by University of Isfahan

This is an open access article under the BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



<http://dx.doi.org/10.22108/TBJ.2021.130967.1182>



<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20088906.1400.13.49.2.2>

روش های طبقه بندی فایتوپلاسمها

مریم غایب زمهریر، دانشیار بخش تحقیقات بیماری شناسی گیاهان، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران

zamharir2005@yahoo.com

چکیده

فایتوپلاسمها پروکاریوت های تخصص یافته و انگل اجباری بافت آبکش گیاه و حشرات ناقل هستند. از آنجایی که این موجودات در شرایط آزمایشگاهی کشت نمی شوند، امکان استفاده از بسیاری از آزمون های مرسوم فنوتیپی که برای تاکسونومی مالیکوت های کشت پذیر به کار می رود، برای فایتوپلاسمها وجود ندارد. این امر اهمیت ویژگی های مولکولی و فیلوژنتیکی را نسبت به خصوصیات فنوتیپی در تعیین موقعیت تاکسونومیک فایتوپلاسمها نشان می دهد. در دهه گذشته روش هایی بر پایه بیولوژی و ژنتیک مولکولی، مانند مقایسه توالی نوکلئوتیدی بخشی از rRNA ریوزومی، این امکان را فراهم کرده است که روابط تکاملی و فیلوژنی بین جدایه های مختلف فایتوپلاسمها با یکدیگر و با سایر پروکاریوت ها دقیق تر مشخص شود. مقایسه توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن rRNA 16S یا ناحیه بین ژنی 16S-23S و tRNA-Ile هنوز برای آنالیز تعداد زیادی از فایتوپلاسمهای ناشناخته (در مقیاس وسیع) استفاده می شود. گروه بندی زیرخوشه با استفاده از مناطق کمتر محافظت شده، مانند ژن کدکننده پروتئین ریوزومی و ناحیه بین ژن های 16S و 23S، ژن هدف عمومی *cpn60*، ژن کدکننده پروتئین *SecA*، ژن *secY*، ژن پروتئین ریوزومی (*rpl*) و ژن *tuf* انجام می شود.

واژه های کلیدی: فایتوپلاسم، طبقه بندی، 16S rRNA.

مقدمه

است؛ اما با این وجود، اخیراً در مرحله آزمایشگاهی، رشد فایتوپلاسم در محیط کشت مصنوعی اثبات شده است (Contaldo *et al.*, 2016). این پروکاریوت های بیمارگر گیاهان، برخلاف باکتری ها بدون دیواره سلولی هستند (Kuske and Kirkpatrick, 1992; Toth *et al.*, 1994; Schweigkofler, 2008). عامل بیماری های مهمی از جمله جاروک لیموترش (Bove *et al.*, 2000)، جاروک بادام (Salehi *et al.*, 2006)؛

فایتوپلاسمها، پروکاریوت های بدون دیواره سلولی هستند که تنها در بافت زنده میزبان های گیاهی و حشرات ناقل خود رشد می کنند و در سال ۱۹۶۷ توسط دانشمندان کشف و به نام ارگانسیم های شبیه مایکوپلاسم نامیده شدند. امکان کشت فایتوپلاسمها در محیط آزمایشگاه وجود ندارد و همین مسئله باعث محدود شدن اطلاعات درباره آنها شده

*مسئول مکاتبات



متعلق به پروکاریوت‌ها است (Woese *et al.*, 1987). در سال ۲۰۱۵ موجودات زنده به دو سلسله پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها تقسیم شد (Ruggiero *et al.*, 2015). فایتوپلاسمها در قلمروی باکتری‌ها (Bacteria)، شاخه تنریکیوت‌ها (Tenericutes)، رده مالیکیوت‌ها (Mollicutes)، راسته آکوله پلاسماتالس (Acholeplasmatales) و خانواده آکوله پلاسماتاسه (Acholeplasmataceae) قرار دارند (Schweigkofler, 2008; Ruggiero *et al.*, 2015; Perez-López *et al.*, 2016; Zhao and Davis, 2016).

گروه‌بندی فایتوپلاسمها

در دهه های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ طبقه‌بندی فایتوپلاسمها با تولید آنتی‌بادی‌های تک‌دودمانی و چنددودمانی انجام می‌شد. به تدریج، با تهیه نشانگر DNA مخصوص فایتوپلاسمها، انجام آنالیزهای RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) و هیبریداسیون DNA-DNA، روش تشخیص فایتوپلاسمها دقیق‌تر شد و چند خوشه (کلاستر (Cluster)) و زیرخوشه (زیرکلاستر (Subcluster)) مجزای ژنومیکی از فایتوپلاسمها (مثل خوشه زردی مینا با سه زیرخوشه و خوشه بیماری X هلو با هفت زیرخوشه) معرفی شد. در دهه گذشته، روش‌هایی برپایه بیولوژی و ژنتیک مولکولی، مانند مقایسه توالی نوکلئوتیدی بخشی از RNA ریوزومی، این امکان را فراهم کرده است که نخست، ارتباط بین علائم بیماری و عامل یا عوامل بیماری به‌طور دقیق‌تری تعیین شود و سپس روابط تکاملی و فیلوژنی بین جدایه‌های مختلف فایتوپلاسمها با یکدیگر و با سایر پروکاریوت‌ها واقع‌بینانه‌تر مشخص شود؛ اما بیشترین پیشرفت در این زمینه با مقایسه توالی

(Ghayeb Zmharir, 2014)، جاروک یونجه (Esmailzadeh- Hosseini, 2016)، زردی و زوال انگور (Ghayeb Zamharir *et al.*, 2017)، گل‌سبز (فیلودی) کنجد (Salehi *et al.*, 2016)، جوانه‌بزرگی گوجه‌فرنگی (Jamshidi *et al.*, 2014)، زردی هلو (Zirak *et al.*, 2010; Ghayeb Zamharir, 2014)، زردآلو (Salehi *et al.*, 2018) و خرما (Ghayeb Zamharir and Eslahi, 2019)، بیماری‌های فایتوپلاسمایی پسته (Ghayeb Zamharir, 2016) و چند بیماری دیگر که از کشورمان گزارش شده، همگی فایتوپلاسمایی است. عامل تعدادی از این بیماری‌ها متفاوت است با آنچه در سایر نقاط دنیا گزارش شده است. یکی از دلایل این تنوع ممکن است جغرافیای ایران باشد؛ زیرا از نظر اقلیمی و ژئومورفولوژیکی یکی از ناهمگن‌ترین مناطق آسیا است و این موضوع منجر به تنوع گیاهان ایران شده است (Saberamoli *et al.*, 2021; Bagheri *et al.*, 2021; Mehrnia *et al.*, 2021).

طبقه‌بندی این موجودات تنها براساس یک ویژگی بیولوژیکی، یعنی فقدان دیواره سلولی، کافی نیست و ممکن است گمراه‌کننده باشد؛ برای مثال *Thermoplasma acidophilum* پروکاریوتی فاقد دیواره سلولی است و در ابتدا در رده مالیکیوت‌ها قرار داشت؛ اما مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی تکمیلی نشان داد این موجود به قلمروی آرکه‌آ یا باکتری‌های باستانی (Archaea) تعلق دارد (Lim and sears, 1989).

موجودات زنده در سه قلمروی باکتری‌های حقیقی (Eubacteria)، آرکه‌آها و یوکاریوت‌ها (Eucarya) قرار گرفته‌اند که دو قلمروی آن (باکتری‌ها و آرکه‌آ)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرراز روی ژن ۱۶S rRNA) با استفاده از آنزیم‌های برشی خاص، در فایتوپلاسماهای مختلف نقوش متفاوتی را تشکیل می‌دهد که آنها را از یکدیگر متمایز می‌سازد. ثابت شده است این روش، ساده، مطمئن و کاربردی است (Bertaccini *et al.*, 2014).

بر اساس آنالیز RFLP روی فرآورده‌های حاصل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرراز روی ژن ۱۶S rDNA توسط Lee و همکاران (۱۹۹۲)، ۱۰ خوشه و ۱۵ زیرخوشه برای فایتوپلاسماها تعیین شد. در حال حاضر، فایتوپلاسماها به ۳۴ گروه (Zhao and Davis, 2016) و ۴۶ جنس کاندید تقسیم شده‌اند که اسامی این جنس‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

نوکلئوتیدی بخشی از ژن ۱۶S rRNA یا ناحیه بین ژنی ۱۶S-۲۳S و tRNA-Ile انجام شده است (Lim and Sears, 1989). این روش هنوز برای آنالیز تعداد زیادی از فایتوپلاسماهای ناشناخته (در مقیاس وسیع) استفاده می‌شود. گروه‌بندی دقیق‌تر زیرخوشه‌ها با استفاده از مناطق کمتر محافظت شده، مانند ژن کدکننده پروتئین ریپوزومی و ناحیه بین ژن‌های ۱۶S-۲۳S و tRNA-Ile انجام می‌شود.

طبقه‌بندی فایتوپلاسماها بر اساس ژن S 16rRNA

در پژوهش‌های جدید، طبقه‌بندی فایتوپلاسماها بر اساس مقایسه توالی ژن ۱۶S rRNA صورت می‌گیرد (Bertaccini *et al.*, 2014; Zhao and Davis 2016). آنالیزهای RFLP (هضم فرآورده‌های حاصل از انجام

جدول ۱- فهرست گونه‌های فایتوپلاسما (*Candidatus Phytoplasma*) که تاکنون معرفی شده‌اند.

منبع	گروه	نام بیماری	نام گونه	ردیف
Lee <i>et al.</i> , 2004	16SrI-B	aster yellows and related diseases	<i>Ca. P. asteris</i>	۱
Arocha <i>et al.</i> , 2007	16SrI-B	'hoja de perejil' disease in Bolivia.	<i>Ca. P. lycopersici</i>	۲
Zreik <i>et al.</i> , 1995	16SrII-B	witches'-broom disease of lime	<i>Ca. P. aurantifolia</i>	۳
White <i>et al.</i> , 1998	16SrII-D	dieback, yellow crinkle and mosaic diseases of papaya,	<i>Ca. P. australasia</i>	۴
Davis <i>et al.</i> , 2013	16SrIII	Peach X-disease	<i>Ca. P. pruni</i>	۵
IRPCM (2004)	16SrIV-B	lethal yellowing of coconut	<i>Ca P.palmae</i>	۶
IRPCM (2004)	16SrIV-D	lethal yellowing-type disease (LYD) of coconut (<i>Cocos nucifera</i> L.) in Tanzania	<i>Ca. P.cocostanzaniae</i>	۷
Lee <i>et al.</i> , 2004	16SrV-A	elm yellows	<i>Ca. P. ulmi.</i>	۸
Jung <i>et al.</i> , 2003	16SrV-B	jujube witches'-broom disease	<i>Ca. P. ziziphi</i>	۹
Marzorati <i>et al.</i> , 2006	16SrV-C	in <i>Scaphoideus titanus</i> , the insect vector of flavescence doree in <i>Vitis vinifera</i> .	<i>Ca. P. vitis</i>	۱۰
Malembeic-Maher <i>et al.</i> , 2011	16SrV-E	blackberry witches' broom	<i>Ca. P.rubi</i>	۱۱

Win <i>et al.</i> , 2013	16SrV-G	<i>Balanites triflora</i> witches' broom	Ca. P. balanitae	۱۲
Hiruki and Wang, 2004	16SrVI-A	Clover proliferation	Ca. P. trifolii	۱۳
Davis <i>et al.</i> , 2012	16SrVI-B	passion fruit witches' -broom	Ca. P. sudamericanum	۱۴
Griffiths <i>et al.</i> , 1999	16SrVII	ash yellows and lilac witches'-broom	Ca. P. fraxini	۱۵
Davis <i>et al.</i> , 2017	16SrVIII	witches' broom disease of loofah	Ca. P. luffae	۱۶
Verdin <i>et al.</i> , 2003	16SrIX-B	lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran.	Ca. P. phoenicium	۱۷
Seemüller and Schneider, 2004	16SrX-A	apple proliferation	Ca. P. mali.	۱۸
Seemüller and Schneider, 2004.	16SrX-B	European stone fruit yellows	Ca. P. prunorum	۱۹
Seemüller and Schneider, 2004	16SrX-C	pear decline	Ca. P. pyri.	۲۰
Marcone <i>et al.</i> , 2004	16SrX-D	spartium witches'-broom	Ca. P. spartii	۲۱
Jung <i>et al.</i> , 2003	16SrXI-A	rice yellow dwarf disease	Ca. P. oryzae	۲۲
Safarova <i>et al.</i> , 2016	16SrXI-B		Ca. P. cirsii	۲۳
Firrao <i>et al.</i> , 2005	16SrXII-A	stolbur disease in wild and cultivated herbaceous and woody plants	Ca. P. solani	۲۴
Davis <i>et al.</i> , 1997	16SrXII-B	Australian grapevine yellows, papaya dieback, strawberry lethal yellows (SLY), strawberry green petal and pumpkin yellow leaf curl.	Ca. P. australiense	۲۵
Martini <i>et al.</i> , 2012	16SrXII-C	bindweed yellows	Ca. P. convolvuli	۲۶
Sawayanagi <i>et al.</i> , 1999	16SrXII-D	Japanese <i>Hydrangea</i> phyllody	Ca. P. japonicum	۲۷
Valiunas <i>et al.</i> , 2006	16SrXII-E	yellows diseased strawberry, <i>Fragaria X ananassa</i>	Ca. P. fragariae	۲۸
Davis <i>et al.</i> , 2016	16SrXIII	Mexican periwinkle virescence (MPV) phytoplasma	Ca. P. hispanicum	۲۹
Marcone <i>et al.</i> , 2004	16SrXIV	Bermuda grass white leaf disease	Ca. P. cynodontis	۳۰
Montano <i>et al.</i> , 2001	16SrXV	hibiscus witches' broom disease	Ca. P. brasiliense	۳۱
Arocha <i>et al.</i> , 2005	16SrXVI	sugarcane in Cuba	Ca. P. graminis	۳۲
Arocha <i>et al.</i> , 2005	16SrXVII	papaya in Cuba	Ca. P. caricae	۳۳
Lee <i>et al.</i> , 2006	16Sr XVIII-A	potato purple top wilt disease complex.	Ca. P. americanum	۳۴
Jung <i>et al.</i> , 2002	16SrXIX	chestnut witches' broom disease.	Ca. P. castaneae	۳۵
Marcone <i>et al.</i> , 2004	16SrXX	buckthorn witches' -broom	"Ca. P. rhamnii"	۳۶

Schneider <i>et al.</i> , 2005	16SrXXI	<i>Pinus silvestris</i> and <i>Pinus halepensis</i> shoot proliferation	Ca. P. pini	۳۷
Harrison <i>et al.</i> , 2014	16SrXXII	lethal yellowing-type disease (LYD) of coconut (<i>Cocos nucifera</i> L.) in Mozambique	Ca. P. palmicola	۳۸
IRPCM (2004)	16SrXXII	lethal yellowing-type disease (LYD) of coconut (<i>Cocos nucifera</i> L.) in Nigeria	Ca. Phytoplasma cocosnigeriae	۳۹
Al-Saad <i>et al.</i> , 2008	16SrXXIX	witches'-broom of <i>Cassia italica</i> (Mill.) Spreng. in Oman	Ca. P. omanense	۴۰
				۴۱
Zhao <i>et al.</i> , 2009	16SrXXX	witches'-broom-diseased salt cedar (<i>Tamarix chinensis</i> Lour.).	Ca. P. tamaricis	۴۲
Lee <i>et al.</i> , 2011	16SrXXXI	Soybean stunt phytoplasma	Ca. P. costaricanum	۴۳
Nejat <i>et al.</i> , 2013	16SrXXXII	Malaysian periwinkle virescence	'Ca. P. malaysianum	۴۴
Marcone <i>et al.</i> , 2004	16Sr XXXIII-A	allocasuarina yellows diseases	Ca. P. allocasuarinae	۴۵
Naderali <i>et al.</i> , 2017 and 2018	16SrXXXVI	foxtail palm yellow decline	Candidatus Phytoplasma wodyetiae'	۴۶

al., 2000; Marcone *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2006).

طبقه بندی فایتوپلازماها بر اساس ژن *tuf*

ژن *tuf* نیز برای طبقه بندی فایتوپلازماها استفاده می شود. این ژن، فاکتور طویل شدن Tu (EF-Tu) را در خلال فرآیند تولید پروتئین کد می کند و نقشی محوری در جریان ترجمه ژن ها بر عهده دارد. با بررسی توالی EF-Tu ثابت شده است که این ژن نیز در مطالعات فیلوژنتیک کارآمد و نتایج حاصل از بررسی این فاکتور با نتایج مطالعات rRNA ۱۶S قیاس شدنی است (Schneider *et al.*, 1997). توالی ژن *tuf* برای دو استرین از فایتوپلازماهای زردی مینا و فایتوپلازماهای عامل بیماری X هلو تعیین شده است. مطالعات سترن بلات نشان می دهد این ژن به صورت تک نسخه در فایتوپلازماها وجود دارد (Schneider *et al.*, 1997). تشابه توالی نوکلئوتیدی ژن *tuf* در میان گروه

طبقه بندی فایتوپلازماها بر اساس ناحیه بین

ژنی ۱۶S و ۲۳S

ناحیه بین ژنی rRNA ۱۶S-۲۳S فایتوپلازماها که حدود ۲۳۲ جفت باز (bp) است، دارای قسمتی است که tRNA Ile (tRNAIle) مربوط به انتقال اسید آمینه ایزولوسین و بسیار محافظت شده است. را کد می کند؛ با این حال توالی جانبی که از tDNA Ile به S rDNA ۱۶ و به rDNA ۲۳ امتداد دارد، در میان فایتوپلازماهای مختلف بسیار متنوع است. به دلیل محدود بودن اطلاعات موجود در توالی به نسبت کوتاه، ناحیه بین ژنی rRNA ۱۶S-۲۳S، تمام زیرگروه های ۱۶Sr را متمایز نمی کند؛ به عبارت دیگر چندین بار ثابت شده است ترکیب بررسی های ژن rRNA S ۱۶ به علاوه توالی ناحیه بین ژنی rRNA ۱۶S-۲۳S برای تمایز انواع جدایه های بین یک زیرگروه ۱۶Sr مناسب است (Griffiths *et al.*, 1999; Padovan *et*

گاهی اعضای زیرگروهها از نظر ویژگی‌های بیولوژیکی و اکولوژیکی از یکدیگر متمایز می‌شود؛ برای مثال فایتوپلاسمای عامل سرکپه‌ای ذرت (maize bushy stunt (MBS)، عضوی از زیرگروه ۱۶SrI-B طبقه بندی شده است؛ در حالی که از نظر دامنه محدود میزبان گیاهی و ناقلین اختصاصی، از سایر اعضای گروه ۱۶SrI متمایز است و زیرگروه متمایزی را از نظر پروتئین ریوزومی نمایش می‌دهد؛ به علاوه زیرگروه ۱۶SrV-C براساس آنالیزهای RFLP با چندین آنزیم برشی کلیدی، به چند زیرگروه براساس پروتئین ریوزومی تقسیم می‌شود (Martini et al., 2002; Lee et al., 2004).

طبقه بندی فایتوپلاسمها براساس ژن *SecY*

ژن *secY*، مارکر مولکولی دیگری برای تمایز ظریف بین جدایه‌های فایتوپلاسمایی است. تنوع توالی این ژن در بین جدایه‌های فایتوپلاسمایی شبیه به پروتئین ریوزومی است. میانگین تشابه توالی بین توالی‌های ژن *secY* در دو گروه ۱۶Sr فایتوپلاسمایی بین ۵۷/۴ تا ۷۶ درصد متغیر است. زیرگروههای ترسیم شده براساس آنالیزهای RFLP توالی ژن *secY* از دو گروه ۱۶SrI و ۱۶SrV به طور معمول شباهت دارد به آنچه برای ژن پروتئین ریوزومی طراحی شده است (Lee et al., 2004; Martini et al., 2007)؛ با این حال قدرت تمایز ژن *secY* به وضوح از ژن پروتئین ریوزومی بهتر است. این ژن نیز مانند ژن پروتئین ریوزومی گزینه مناسبی برای طبقه بندی جدایه‌های فایتوپلاسمایی در سطح زیرگروه است.

زردی مینا، بیماری X هلو و جوانه‌بزرگی بین ۸/۸۷ تا ۹۷ درصد است (Schneider et al., 1997; Marcone et al., 2000). گروهها و زیرگروههای فایتوپلاسمایی براساس هضم آنزیمی این ناحیه با چند آنزیم تفکیک می‌شود (Schneider et al., 1997; Marcone et al., 2000). کارایی این روش در تفکیک فایتوپلاسمها کمتر از ژن 16S rRNA است؛ ولی در برخی مواقع ژن *tuf* برای تفکیک استرین‌های مختلف اکولوژیکی در میان زیرگروههای 16S rRNA مفید بوده است (Langer and Maixner, 2004)؛ برای مثال چندین استرین در بین زیرگروههای 16XII-A و 16XII-B با آنالیز توالی ژن *tuf* تشخیص داده شده است (Iriti et al., 2008).

طبقه بندی فایتوپلاسمها براساس ژن پروتئین ریوزومی

ژن پروتئین ریوزومی (*rplV* (*rpl22*) و *rpsC* (*rps3*)) نسبت به ژن‌های 16S rRNA متنوع تر است و ویژگی‌های فیلوژنتیکی مفیدی دارد؛ در نتیجه قدرت تمایز در تعیین استرین‌های مختلف فایتوپلاسمایی را در گروهها و زیرگروههای مختلف 16S rRNA تقویت می‌کند (Martini et al., 2002; Lee et al., 2004). مطالعات اخیر روی تمایز جدایه‌های فایتوپلاسمایی در گروههای ۱۶SrI و ۱۶SrV نشان می‌دهد بررسی ژن پروتئین ریوزومی نه تنها به آسانی برخی زیرگروههای فایتوپلاسمایی متعلق به گروههای ۱۶Sr را ترسیم می‌کند، جدایه‌های مختلف در بین یک زیرگروه را نیز از یکدیگر متمایز می‌کند (Martini et al., 2002; Lee et al., 2004).

بیماری زایی و سایر خصوصیات بیولوژیکی فایتوپلاسمها هنوز به وضوح مشخص نشده است، به طور وسیعی در تمایز و طبقه بندی فایتوپلاسمها استفاده می شود. ژن *rRNA* ۱۶S به قدری متنوع نیست که فایتوپلاسمهایی را که از نظر میزبان و ناقل اختصاصی هستند، از یکدیگر تفکیک کند؛ همچنین ناحیه بین ژنی *rRNA* ۲۳S و *rRNA* ۱۶S قطعه کوچکی است که حتی از آن برای آزمایش های روزمره تشخیص، طبقه بندی فایتوپلاسمها و آنالیزهای RFLP استفاده نمی شود.

سیستم تاکسونومی پلی فازی براساس خصوصیات فیلوژنتیکی و فنوتیپی در کمیته بین المللی سیستماتیک باکتری شناسی و زیر کمیته تاکسونومی مالیکوت ها ارائه شده است (IRPCM, 2004). توافق بر این شده است که توالی کامل ژنوم باکتریایی، اساس فیلوژنی و تاکسونومی باشد؛ بر این اساس نام گذاری باید منطبق بر اطلاعات ژنومی و انعکاس دهنده آن باشد. به دلیل در دسترس نبودن توالی های کامل ژنومی، تاکسونومی فایتوپلاسمها باید بر ترکیبی از خصوصیات فنوتیپی و فیلوژنی تکیه داشته باشد. علاوه بر ژن های *rRNA* ۱۶S، از ژن های پروتئین ریپوزومی *rpl22* و *rps3* ناحیه بین *rRNA* ۲۳S و *rRNA* ۱۶S نیز برای طبقه بندی فایتوپلاسمها استفاده شده است که ناحیه بین *rRNA* ۲۳S و *rRNA* ۱۶S به طور چشمگیری از ژن S *rRNA* ۱۶S متنوع تر است.

تاکسونومی براساس الگوی مجازی RFLP از ناحیه *rDNA* ۱۶S

به پشتوانه پیشرفت های تکنولوژیکی اخیر، روش های جدیدی برای طبقه بندی فایتوپلاسمها ارائه

طبقه بندی فایتوپلاسمها براساس ژن *SecA* و سایر ژن ها

ژن کد کننده پروتئین *SecA* اخیراً برای طبقه بندی فایتوپلاسمها استفاده شده است. قسمتی از توالی ژن یاد شده که حدود ۴۸۰ جفت باز است، با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مرارز از فایتوپلاسمهای مختلف متعلق به گروه ۱۶SrXII تکثیر شد. تشابه توالی ها بین هر دو گروه بین ۶۷/۷ تا ۸۴/۴ درصد بود. قدرت تفکیک ژن *SecA* در جایگاه عامل فیلوژنی برای تمایز فایتوپلاسمها شبیه به ژن های پروتئین ریپوزومی و *secY* است (Shao et al., 2006).

ژن *nusA* (Shao et al., 2006) و ژن های فولایت (Folate)، برای مثال ژن های *folP* و *folK* (Davis et al., 2003)، برای تمایز جدایه های فایتوپلاسمی گروه های ۱۶SrI و ۱۶SrXII به کار رفته و ثابت شده که این ژن ها برای تمایز فایتوپلاسمها مفید است. چندین ژن، شامل *dnaA* (پروتئین آغازگر رونویسی کروموزومی را کد می کند)، *polC* (زیر واحد آلفای آنزیم DNA پلی مرارز III را کد می کند) و *dnaE* (زیر واحد آلفای ژن DNA پلی مرارز III را کد می کند) در جایگاه ژن های نامزد برای طبقه بندی فایتوپلاسمها مطرح است. تنوع توالی این ژن ها شبیه یا بیشتر از ژن *secY* است (Shao et al., 2006).

سیستم طبقه بندی پلی فازی

مطالعات فیلوژنتیکی با استفاده از سه ژن S *rRNA* ۱۶S، ناحیه بین ژنی *rRNA* ۲۳S-۱۶S و ژن *tuf* در فایتوپلاسمها، نتایج یکسانی را در بر داشته است (IRPCM, 2004). اگر چه روابط خویشاوندی بین طبقه بندی فیلوژنی فایتوپلاسمها و طبقه بندی مبتنی بر

شده است. در حال حاضر، هزینه تعیین توالی نوکلئوتیدی کاهش پیدا کرده و روش‌های بیوانفورماتیک جدید برای تجزیه داده‌های نوکلئوتیدی توسعه یافته است. تا سال ۲۰۱۸، توالی نوکلئوتیدی ژن rRNA ۱۶S بیش از ۱۸۰۰۰ فایتوپلازما در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) قرار داده شده بود.

دردسترس بودن داده‌های مربوط به توالی نوکلئوتیدی قطعه‌هایی از ژنوم فایتوپلازماها با کیفیت زیاد، این امکان را فراهم کرد تا الگوی RFLP مجازی برای شناسایی و طبقه‌بندی فایتوپلازماهای مختلف تهیه شود. این الگوی مجازی، بررسی‌های RFLP را براساس تخمین کامپیوتری انجام می‌دهد، منجر به پیدایش گروه‌های جدید برای فایتوپلازما شده و به‌طور مشخص طبقه‌بندی فایتوپلازماها براساس توالی ژن S rDNA ۱۶ را بهبود و توسعه داده است. اندازه قطعات استفاده شده در این روش، به‌طور تقریبی ۱۲۵۰ جفت باز و مربوط به ناحیه تکثیرشده با آغازگرهای عمومی (Universal primers) R16F2n/R16R2 است (Wei et al., 2007).

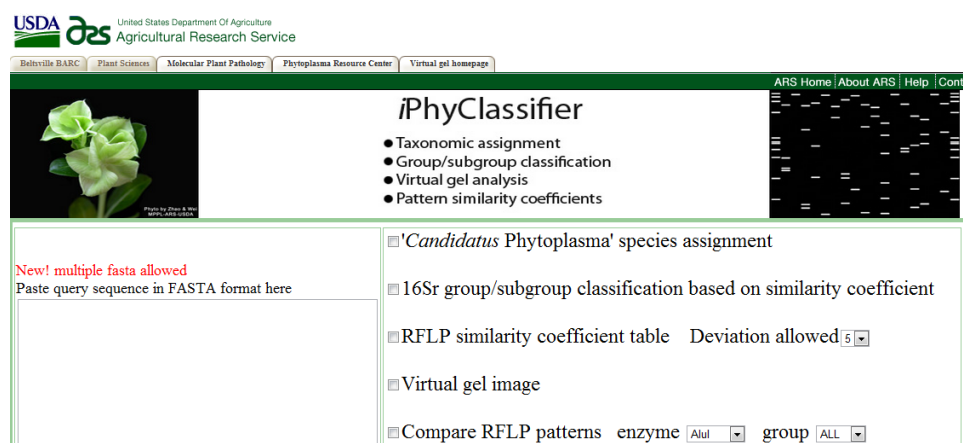
نرم افزار iPhyClassifier برای بهبود و توسعه اثر و ظرفیت سیستم طبقه‌بندی مجازی فایتوپلازماها براساس توالی ژن rDNA ۱۶S تهیه شده است. این ابزار، آنالیزهای تشابه توالی را انجام می‌دهد، هضم آنزیمی

آن را تخمین می‌زند و به دنبال آن الگوی قطعات حاصل از هضم آنزیمی (RFLP) را تهیه می‌کند. نرم افزار iPhyClassifier براساس محاسبه ضریب تشابه الگوی RFLP (RFLP pattern similarity coefficients) و نمره تشابه توالی (Sequence similarity scores)، موقعیت تاکسونومیک گروه و زیرگروه تجربی rDNA ۱۶S فایتوپلازما را فوری پیشنهاد می‌کند و گونه پیشنهادی فایتوپلازما (*Candidatus Phytoplasma*) تعیین می‌شود. از آنجایی که این ابزار تنها براساس اطلاعات توالی کار می‌کند، هر خطایی در توالی منجر به تشخیص اشتباه گروه یا زیرگروه مربوطه خواهد شد. این خطا ممکن است در حین انجام واکنش PCR، همسانه‌سازی در وکتور یا تعیین توالی قطعه همسانه‌سازی شده اتفاق بیفتد. برای تکرارپذیری و اطمینان از عملکرد این ابزار توصیه می‌شود حداقل، توالی قطعه تکثیرشده از دو نمونه مجزا (گیاه یا زنجیرک) بررسی شود. اگر تنها یک نمونه آلوده دردسترس است، باید حداقل دو قطعه rDNA ۱۶S همسانه‌سازی شده حاصل از دو واکنش PCR مجزا بررسی شود. این ابزار به‌صورت اینترنتی از طریق آدرس <http://www.ba.ars.usda.gov/data/mppl/iPhyClassifier.html> (Zhao et al., ۲۰۰۹) (شکل ۱) دردسترس است (۲۰۰۹).

جدول ۲- طبقه‌بندی فایتوپلاسمها براساس آنالیز RFLP ژن 16S rDNA (Zhao and Davis, 2016)

گروه 16S rDNA	جدایه
Aster yellows group (16S rI)	
I-A	Aster yellows witches'-broom phytoplasma (AYWB) rrnA
I-A	Aster yellows witches'-broom phytoplasma (AYWB) rrnB
I-B	Onion yellows phytoplasma mild strain (OY-M) rrnA
I-B	Onion yellows phytoplasma mild strain (OY-M) rrnB
I-B	<i>Ca. Phytoplasma lycopersici</i>
I-B	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i> '
I-C	Clover phyllody phytoplasma strain CPh
I-D	Aster yellows phytoplasma strain PaWB
I-E	Blueberry stunt phytoplasma strain BBS3
I-F	Aster yellows phytoplasma strain ACLR-AY
Peanut witches' broom group (16S rII)	
II-A	Peanut witches'-broom phytoplasma
II-B	<i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i>
II-C	Cactus witches'-broom phytoplasma
II-D	<i>Ca. Phytoplasma australasiae</i>
X-disease group (16S rIII)	
III-A	<i>Ca. Phytoplasma pruni</i>
III-B	Clover yellow edge phytoplasma
Coconut lethal yellows group (16S rIV)	
IV-A	<i>Ca. Phytoplasma palmae</i> (LYJ-C8)
IV-B	Phytoplasma sp. LfY5 (PE65)-Oaxaca
IV-D	<i>Ca. Phytoplasma cocostanzaniae</i>
Elm yellows group (16S rV)	
V-A	<i>Ca. Phytoplasma ulmi</i>
V-B	<i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> strain JWB-G1
V-C	<i>Ca. Phytoplasma vitis</i>
V-D	FD-D
V-E	<i>Ca. Phytoplasma rubi</i>
V-G	<i>Ca. Phytoplasma balanitae</i>
Clover proliferation group (16S rVI)	
VI-A	<i>Ca. Phytoplasma trifolii</i>
VI-B	<i>Ca. Phytoplasma sudamericanum</i>
Ash yellows group (16S rVII)	
VII-A	<i>Ca. Phytoplasma fraxini</i>
Loofah witches' broom group (16S rVIII)	
VIII-A	<i>Ca. Phytoplasma luffae</i>
Pigeon pea witches' broom (16S rIX)	
IX-A	Pigeon pea witches'-broom phytoplasma
IX-B	<i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i>
IX-C	<i>Knautia arvensis</i> phyllody, <i>Picris echioides</i> yellow, Periwinkle virescence
IX-D	<i>Lactuca sativa</i> phyllody, <i>Echinops</i> witches'-broom
IX-E	Juniper witches'-broom, Blueberry stunt
IX-F	Honduran <i>Gliricidia</i> little leaf
IX-J	chicory bushy stunt disease
Apple proliferation group (16S rX)	
X-A	<i>Ca. Phytoplasma mali</i>

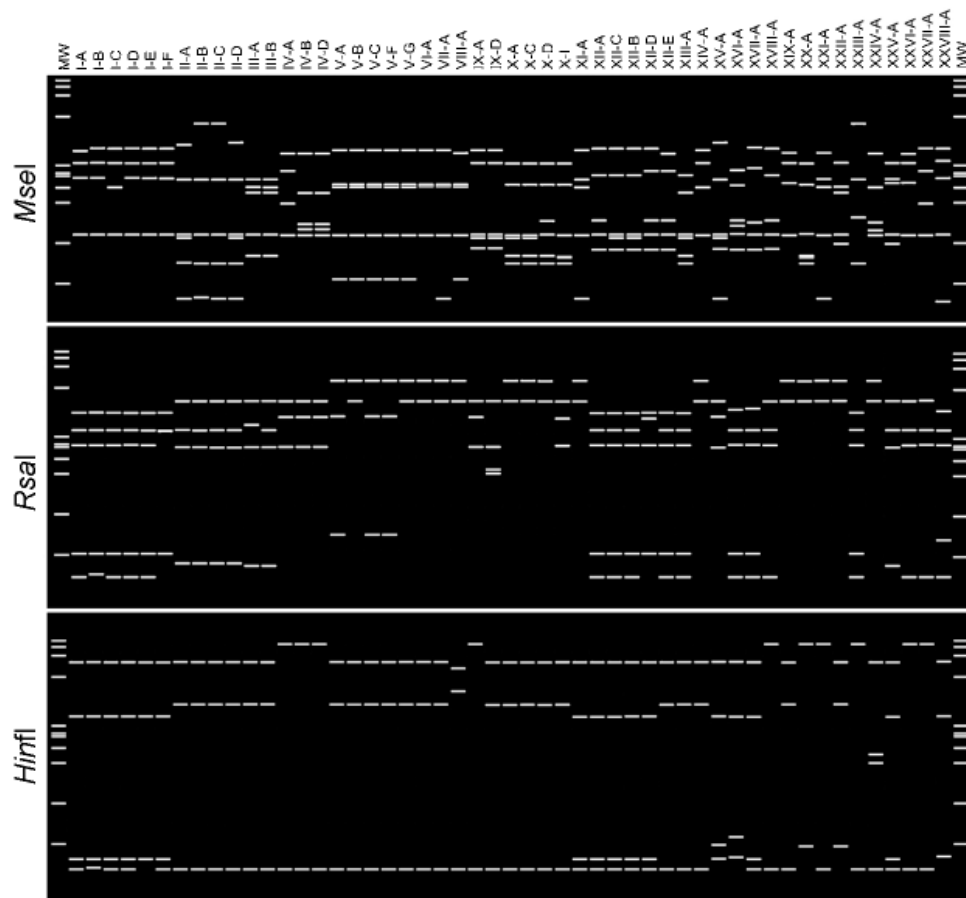
X-B	<i>Ca. Phytoplasma prunorum</i>
X-C	<i>Ca. Phytoplasma pyri</i>
X-D	<i>Ca. Phytoplasma spartii</i>
Rice yellow dwarf group (16SrXI)	
XI-A	<i>Ca. Phytoplasma oryzae</i>
XI-B	<i>Ca. Phytoplasma cirsi</i>
Stolbur group (16SrXII)	
XII-A	<i>Ca. Phytoplasma solani</i>
XII-B	<i>Ca. Phytoplasma australiense</i>
XII-C	<i>Ca. Phytoplasma convolvuli</i>
XII-D	<i>Ca. Phytoplasma japonicum</i>
XII-E	<i>Ca. Phytoplasma fragariae</i>
XII-I	Potatoes disease
Mexican periwinkle virescence group	
XIII-A	<i>Ca. Phytoplasma hispanicum</i>
Bermudagrass white leaf group	
XIV-A	<i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i>
Hibiscus witches'-broom group	
XV-A	<i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i>
Sugarcane yellow leaf group	
XVI	<i>Ca. Phytoplasma graminis</i>
Papaya bunchy top group	
XVII-A	<i>Ca. Phytoplasma caricae</i>
American (TX+NE) potato purple top wilt group	
XVIII-A	<i>Ca. Phytoplasma americanum</i>
Japanese chestnut witches'-broom group	
XIX-A	<i>Ca. Phytoplasma castaneae</i>
Buckthorn witches' broom group	
XX-A	<i>Ca. Phytoplasma rhamni</i>
Pine shoot proliferation group	
XXI-A	<i>Ca. Phytoplasma pini</i>
Nigerian coconut lethal decline (LDN) group	
XXII-A	<i>Ca. Phytoplasma palmicola</i>
Buckland Valley grapevine yellows group	
XXIII-A	Buckland valley grapevine yellows phytoplasma
Sorghum bunchy shoot group	
XXIV-A	Sorghum bunchy shoot phytoplasma
Weeping tea tree witches'- broom group	
XXV-A	Weeping tea witches'-broom phytoplasma
Mauritius sugar cane yellows D3T1 group	
XXVI-A	Sugar cane phytoplasma D3T1
Mauritius sugar cane yellows D3T2 group	
XXVII-A	Sugar cane phytoplasma D3T2
Havana derbid phytoplasma group	
16SrXXVIII	Havana derbid phytoplasma
Cassia witches' broom group	
16SrXXIX	<i>Ca. Phytoplasma omanense</i>
Salt cedar witches' broom group	
16SrXXX	<i>Ca. Phytoplasma tamaricis</i>
Soybean stunt phytoplasma group	
16SrXXXI	<i>Ca. Phytoplasma malaysianum'</i>
Malaysian periwinkle virescence phytoplasma group	
16SrXXXII	<i>Ca. Phytoplasma malaysianum'</i>
Allocasuarina phytoplasma group	
16SrXXXIII	<i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae'</i>



شکل ۱- تصویر صفحه اول iPhyClassifier در شبکه اینترنت

۱۶SrIII) فاقد این ژن باشند که استفاده از این تکنیک را برای طبقه‌بندی فایتوپلازماها محدود می‌کند؛ با این وجود روش های پیشرفته امروزی برای استفاده از توالی *cpn60* UT فایتوپلازماها، این امکان را برای طبقه‌بندی از این ژن در طبقه‌بندی فایتوپلازماها به گروهها و زیرگروههای اصلی فراهم آورده است. براساس RFLP مجازی قطعات تعیین توالی ژن *cpn60* UT، ۱۴ گروه اصلی و ۲۵ گروه فرعی به شرح جدول زیر برای طبقه‌بندی جدایه‌های مختلف فایتوپلازمایی تعیین شده است (شکل ۲) (Perez-López *et al.*, 2016).

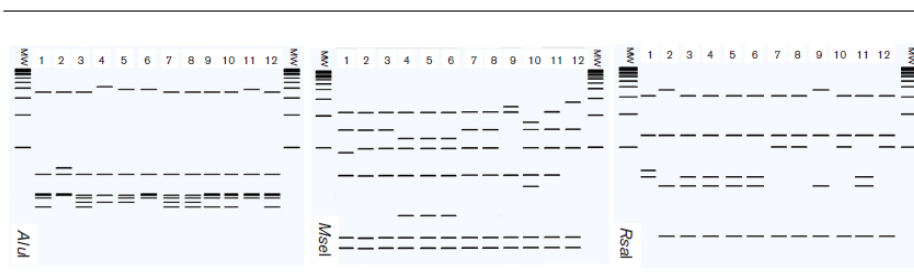
طبقه‌بندی براساس RFLP مجازی ژن *cpn60*
ژن هدف عمومی *cpn60*، یک قطعه به‌طور تقریبی ۵۵۰ جفت بازی است که به‌طور گسترده‌ای در مطالعه جمعیت‌های میکروبی استفاده می‌شود (Town *et al.*, 2014) و در جایگاه بارکد مولکولی برای دامنه باکتری ها پیشنهاد شده است. اگرچه همه مالیکیوت‌ها این ژن را در ژنوم خود ندارند، این ژن در ژنوم همه فایتوپلازماهای تعیین توالی شده و همه جدایه‌های تاکنون گزارش شده وجود دارد (Bai *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Oshima *et al.*, 2013)؛ با این حال به نظر می‌رسد جدایه‌های متعلق به گروه سه



شکل ۲- تفکیک گروههای مختلف فایتوپلاسمایی و طبقه‌بندی با برش ژن 16S rDNA توسط آنزیم‌های MseI، RsaI و HinfI (Wei et al., 2007).

تفکیک جدایه‌های گروه یک در شکل ۳ نشان داده شده است (Perez-López et al., 2016).

بعد از تعیین توالی ژن هدف *cpn60* UT به منظور تعیین گروه و زیرگروه مربوط، آنالیزهای RFLP مجازی انجام خواهد شد. نمونه‌ای از این آنالیزها برای



شکل ۳- آنزیم‌های کلیدی برای تفکیک جدایه‌های مختلف فایتوپلاسمایی به زیرگروهها در گروه یک براساس ژن *cpn60* UT (اندازه مارکر لدر یک کیلو باز ژن آزمایشگاهی (اینویترژن) است).

جدول ۳- تعداد باندهای حاصل از RFLP توالی cpn60 UT در جدایه های رفرنس در گروه های مختلف فایتوپلاسمایی

cpn60 UT group	Strain	No. of bands generated						
		Afal	Bfal	HinfI	HpaI	MseI	RsaI	TaqI
cpn60 UT I								
cpn60 UT I-IA	AY-Ruta	6	2	3	1	6	4	1
cpn60 UT I-IA	GD	5	2	3	2	7	4	1
cpn60 UT I-IB	SF1	7	2	3	1	6	5	1
cpn60 UT I-IB	AY-J	5	2	3	1	7	5	1
cpn60 UT I-IIIB	MBS-Ver	6	2	3	1	7	5	1
cpn60 UT I-IVB	MBS-Pueb	5	2	4	1	7	5	1
cpn60 UT I-VB	IPY	7	2	3	1	6	4	1
cpn60 UT I-VIB	ED	6	2	3	1	6	4	1
cpn60 UT I-IC	AY-Col	6	2	4	1	5	4	1
cpn60 UT I-IE	BbSP	6	2	4	1	7	4	1
cpn60 UT I-IF	AY-A	5	2	4	1	6	5	1
cpn60 UT I-IP	PopD	6	1	4	1	5	4	1
cpn60 UT II								
cpn60 UT II-IA	PaWB	6	1	5	1	9	1	1
cpn60 UT V								
cpn60 UT V-IA	FD	5	2	3	1	14	1	3
cpn60 UT VII								
cpn60 UT VII-IA	AshY	5	1	3	1	12	1	1
cpn60 UT IX								
cpn60 UT IX-IH	Cr	6	1	3	1	6	1	2
cpn60 UT IX-IB	SA213	6	2	3	1	5	2	3
cpn60 UT X								
cpn60 UT X-IA	AP	3	1	4	2	6	1	2
cpn60 UT X-IC	12MG305	3	2	4	1	5	1	2
cpn60 UT X-IF	ESFY	3	1	4	1	8	1	1
cpn60 UT XII								
cpn60 UT XII-IA	BN44948	1	2	6	1	7	2	3
cpn60 UT XII-IB	AT	1	2	6	1	8	2	3
cpn60 UT XIII								
cpn60 UT XIII-IA	MPV-583	7	1	6	1	9	3	2
cpn60 UT XIV								
cpn60 UT XIV-IA	AL85/11	4	1	3	1	10	2	2
cpn60 UT XIV-IC	RS59/11	4	1	4	1	9	2	2

نام گذاری فایتوپلازماها

نام گذاری فایتوپلازماها و بیماری های ناشی از آنها نظم خاصی ندارد. بیماری های فایتوپلاسمایی قبل از مشاهده یا شناسایی عامل آنها، نام گذاری می شوند. نام فایتوپلاسمای عامل بیماری، در بیشتر مواقع، شبیه نام بیماری است که ایجاد می کند و آن نیز به طور معمول براساس نوع علائمی است که در اثر آن بیماری در گیاه بروز کرده است. این روش در بسیاری از مواقع گویا کننده و مشکل زا است؛ زیرا خصوصیات بیولوژیک به تنهایی برای شناسایی مناسب نیست. گاهی یک فایتوپلازما ممکن است عامل چند بیماری مختلف روی گیاهان گوناگون باشد و علائم مختلفی در میزبان های متفاوت ایجاد کند؛ همین طور ممکن است فایتوپلازماهای گوناگون علائم مشابهی را در یک یا

چند میزبان مختلف ایجاد کنند (Firrao *et al.*, 2007; Schweigkofler, 2008)؛ بنابراین نام گذاری فایتوپلازماها موقتی و دائم در حال تغییر است. پژوهشگران زمان و فعالیت بسیاری را برای نیل به سیستم صحیح نام گذاری فایتوپلازماها و بیماری های ناشی از آنها لازم می دانند (Welliver, 1999; Bertaccini *et al.*, 2014). موری و شلیفر (1994) پیشنهاد کردند واژه «*Candidatus*» قبل از نام علمی عوامل بیماری زای کشت نشدنی درج شود. این امر ضمن حل موقت و علمی موضوع، شرایط ثبت مناسب تاکسون های بالقوه ای را فراهم کرد که بر مبنای تعیین توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژنوم آنها، شناسایی شده اند (Firrao *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 1998).

جمع‌بندی

فایتوپلاسماها، پروکاریوت‌های بدون دیواره سلولی هستند و تنها در بافت زنده میزبان‌های گیاهی و جانوری خود رشد می‌کنند. بیمارگرهای گیاهی شبه مایکوپلاسما، به دلیل نداشتن دیواره سلولی، در رده مالیکوت‌ها منظور شده‌اند. این بیمارگرها برای ادامه حیات و تأمین بسیاری از مواد لازم خود، با میزبان‌های گیاهی و جانوری سازگار شده‌اند. نام فایتوپلاسمای عامل بیماری در بیشتر مواقع شبیه نام بیماری است که ایجاد می‌کند و آن هم به‌طور معمول براساس نوع علائمی است که در اثر آن بیماری در گیاه بروز کرده است. در دهه گذشته روش‌هایی برپایه بیولوژی و ژنتیک مولکولی، مانند مقایسه توالی نوکلئوتیدی بخشی از rRNA ریبوزومی، این امکان را فراهم آورده است که نخست، ارتباط بین علائم بیماری و عامل یا عوامل بیماری به‌طور دقیق تری تعیین شود و دوم، روابط تکاملی و فیلوژنتیکی بین جدایه‌های مختلف فایتوپلاسماها با یکدیگر و با سایر پروکاریوت‌ها واقع‌بینانه تر مشخص شود. تلاش‌هایی برای تشخیص و طبقه‌بندی فایتوپلاسمای ناشناخته براساس ژن S rRNA یا ناحیه بین ژنی S۱۶ و S۲۳ انجام شده است. این روش هنوز برای آنالیز تعداد زیادی از فایتوپلاسمای ناشناخته (در مقیاس وسیع) کاربردی است. گروه بندی دقیق تر زیرخوشه‌ها با استفاده از مناطق کمتر محافظت شده، مانند ژن کدکننده پروتئین ریبوزومی و ناحیه بین ژن‌های S۱۶ و S۲۳، ژن هدف عمومی *cpn60* ژن کدکننده پروتئین *SecA*، ژن *secY*، ژن پروتئین ریبوزومی (rp) و ژن *tuf* انجام می‌گیرد.

نام گذاری جدایه‌های کشت‌نشده پروکاریوت‌ها به صورت «*Candidatus*» بر مبنای داده‌های نوکلئوتیدی DNA، زیستگاه آنها و داده‌های متابولیکی است. در فایتوپلاسماها زیستگاه، همان میزبان محسوب می‌شود. هر چند فایتوپلاسماها در بدن حشره ناقل خود نیز تکثیر می‌شوند و زندگی می‌کنند، فرض بر این است که آنها در میزبان گیاهی خود تکامل یافته‌اند (Firrao *et al.*, 2007)؛ همچنین بر مبنای پیشنهاد موری و شلیفر (۱۹۹۴) در توصیف گونه به صورت «*Candidatus*»، باید توالی یک قطعه از توالی ژن srRNA ۱۶ (بیش از ۱۲۰۰ جفت باز) آن گونه کمتر از ۹۷/۵ درصد شباهت داشته باشد با هر «*Ca*» که از قبل توصیف شده است و توالی این ناحیه در بانک‌های اطلاعاتی عمومی ثبت شود تا در صورت لزوم در جایگاه مرجع از آن استفاده شود؛ همچنین باید فهرست توالی‌های الیگونوکلئوتیدی شاخص و منحصر به فرد آن گونه ارائه شود. بر مبنای پژوهش‌های زیادی که طی سال‌های اخیر انجام شده، مشخص شده است که بعضی جدایه‌ها به‌طور کامل به هم نزدیک و خویشاوند هستند؛ حتی اگر توالی S rDNA آنها کمتر از ۹۷/۵ درصد شبیه به هم نباشد (Firrao *et al.*, 2007). به دلیل ماهیت بسیار حفاظت شده ژن rDNA ۱۶S، بسیاری سویه‌های فایتوپلاسمای ممکن است از نظر بیولوژیکی یا اکولوژیکی متمایز باشند؛ ولی توالی rDNA ۱۶S آنها کمتر از ۹۷/۵ درصد شبیه به هم نباشد و نیاز به نام گذاری جدید داشته باشند؛ پس به این منظور از ویژگی‌های بیولوژیکی منحصر به فرد دیگر مانند واکنش به آنتی‌بادی اختصاصی، دامنه میزبانی و ناقل اختصاصی و همچنین سایر معیارهای مولکولی (ژن‌ها) استفاده می‌شود (Seemüller and Schneider, 2004).

منابع

- Andersen, M. T., Newcomb, R. D., Liefting, L. W., & Beever, R. E. (2006). Phylogenetic analysis of 'Candidatus Phytoplasma australiense' reveals distinct populations in New Zealand. *Phytopathology*, 96, 838–845.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Radek, A. J., Shevchenko, D. V., & Hogenhout, S. A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188, 3682–3696.
- Bagheri, B., Yousefi, M., & Mirjalili, S. A. (2021). Life forms, endemism and medicinal potentials of the flora of the western part of the protected area of Tang-e Sayad in Chaharmahal Bakhtiari province. *Journal of Taxonomy and Biosystematics*, 13, 3-24.
- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., & Contaldo, N. (2014). Phytoplasmas and phytoplasma diseases: A severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 1763-1788.
- Bove, J. M., Danet, J. L., Bananej, K., Haasanzadeh, N., Taghizadeh, M., Salehi, M. and Garnier, M. (2000). Witches' broom disease of lime (WBDL) in Iran. In: Proceeding 14th Conference International Organization of Citrus Virology, Riverside, CA, 207-212.
- Contaldo, N., Satta, E., Zambon, Y., Paltrinieri, S., Bertaccini, A., & Nicolaisen, M. (2016). Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. *Journal of Microbiology Methods*, 127, 105-110.
- Davis, R. E., Jomantiene, R., Zhao, Y., & Dally, E. L. (2003). Folate biosynthesis pseudogenes, *yfolP* and *yfolK*, and an O-sialoglycoprotein endopeptidase gene homolog in the phytoplasma genome. *DNA Cell Biology*, 22, 697–706.
- Esmailzadeh Hosseini, S. A., Khodakaramian, G., Salehi, M., & Bertaccini, A. (2016). First report of 16SrVI-A and 16SrXII-A phytoplasma associated with alfalfa witches' broom disease in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 98(2), 72.
- Firrao G., Garcia-Chapa, M., & Marzachi, C. (2007). Phytoplasmas: Genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Journal of Frontiers in Bioscience*, 12, 1353-1375.
- Ghayeb Zamharir, M. (2014). Molecular study of a new disease of peach in Iran associated with a phytoplasma. *Advances in Microbiology*, 4(1), 20-24.
- Ghayeb Zamharir, M. (2016). Association of a 'Candidatus Phytoplasma solani'-related strain with pistachio in Iran. *New Disease Reports*, 34(9).
- Ghayeb Zamharir, M., Hajivand, S., Paltrinieri, S., & Bertaccini, A. (2017). Molecular identification of diverse 'Candidatus Phytoplasma' species associated with grapevine decline in Iran. *Journal of Phytopathology*, 165, 407-413.
- Ghayeb Zamharir, M., & Eslahi, M. R. (2019). Molecular study of two distinct phytoplasma species associated with streak yellows of date palm in Iran. *Journal of Phytopathology*, 167(1), 19-25.
- Griffiths, H. M., Sinclair, W. A., Smartt, C. D., & Davis R. E. (1999). The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches'-broom: 'Candidatus phytoplasma fraxini. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1 605-1614.
- Iriti, M., Quaglino, F., Maffi, D., Casatti, P., Bianco, P. A., & Faoro, F. (2008). *Solunum malacoxylon*, a new natural host of stolbur phytoplasma. *Journal of Phytopathology*, 156, 8–14.
- IRPCM, Phytoplasma/Spiroplasma Working Team– Phytoplasma Taxonomy Group. (2004). 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1243–1255.

- Jamshidi, E., Jafarpour, B., Rouhani, H., & Salehi, M. (2014). Association of members of clover proliferation (16SrVI) and pigeon pea witches' broom (16SrIX) phytoplasma group with tomato big bud disease in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 50(2), 77-89.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A.M., Reinhardt, R., & Seemüller, E. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *BMC Genomics*, 9, 306.
- Kuske, C. R., & Kirkpatrick, B. C. (1992). Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma like organisms and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 226-233.
- Langer, M. and Maixner, M. (2004). Molecular characterization of grapevine yellows associated with phytoplasmas of stolbur group based on RFLP-analysis of nonribosomal DNA. *Vitis*, 43, 185-189.
- Lee, I. M., Gundersen, D. E., Davis, R. E. and Chiykowski, L. N. (1992). Identification and analysis of a genomic strain cluster of mycoplasma-like organisms associated with canadian peach (eastern) x disease, western x disease, and clover yellow edge. *Journal of Bacteriology*, 174, 6694-6698.
- 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.
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bottner, K. D., Marcone, C., Seemüller, E. (2004). '*Candidatus Phytoplasma asteris*', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1037-1048.
- Lim, P. O., & Sears, B. B. (1989). 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 171, 5901-5906.
- Marcone, C., Lee, I. M., Davis, R. E., Ragozzino, A. and Seemüller, E. (2000). Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of ribosomal RNA and tuf gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1703-1713.
- Marcone, C., & Seemüller, E. (2001). A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. *Microbiology*, 147, 1213-1221.
- Martini, M., Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., & Pastore, M. (2007). A real-time PCR method for detection and quantification of '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' in its natural hosts. *Bulletin of Insectology*, 60, 251-252.
- Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachi, C., Casati, P., Bianco, P. A., Benedetti, R., & Bertaccini, A. (2002). Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Journal of Molecular Cell Probes*, 16, 197-208.
- Mehrnia, M., Asri, Y., & Hosseini, Z. (2021). A floristic study of the western part of Oshtrokooh region in Lorestan province. *Journal of Taxonomy and Biosystematics*, 12, 5-48.
- Murray, R. G. E. and Schleifer, K. H. (1994). Taxonomic notes, a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 174-176.
- Oshima, K., Maejima, K., & Namba, S. (2013). Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-8.
- Padovan, A. C., Firrao, G., Schneider, B., & Gibb, K. S. (2000). Chromosome mapping of the sweet potato little leaf phytoplasma reveals genome heterogeneity within the phytoplasmas. *Microbiology*, 146, 893-902.

- Perez-López, E., Olivier, C. Y., Luna-Rodríguez, M., & Dumonceaux, T. J. (2016). Phytoplasma classification and phylogeny based on in silico and in vitro RFLP analysis of cpn60 universal target sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 5600-5613.
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., & Brusca, R. C. (2015). Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLoS ONE* 10(6), e0130114.
- Saberamoli, S., Asri, Y., Mozaffarian, V., Balali, G., Afsharzadeh, S., & Esmaili, R. (2021). Chorological and endemism analysis of the central Alborz protected area flora (Slopes of Welwesht, Dahla, and Azadkouh). *Journal of Taxonomy and Biosystematics*, 13(3), 27-56.
- Salehi, M., Izadpanah, K., & Heydarnejad, J. (2006). Characterization of a new almond witches' broom phytoplasma in Iran. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 386-391.
- Salehi, M., Esmailzadeh Hosseini, S. A., Salehi, E., & Bertaccini, A. (2016). Genetic diversity and vector transmission of phytoplasmas associated with sesame phyllody in Iran. *Folia Microbiologica*, 62(2), 99-109.
- Salehi, M., Salehi, E., Siampour, M., Quaglino, F., & Bianco, P. A. (2018). Apricot yellows associated with 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(2), 269-283.
- Schneider, B., Gibb, K. S., & Seemüller E. (1997). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143, 3381-3389.
- Schweigkofler, W. (2008). *Phytoplasma: General information*. Research Centre for Agriculture and Forestry Laimburg. Retrieved from: <http://www.laimburg.it/files/PhytoplasmaHomepageENG.pdf>
- Seemuller, E. and Schneider, B. (2004). 'Candidatus phytoplasma mali', 'candidatus phytoplasma pyri' and 'candidatus phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and european stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1217-1226.
- Shao, J., Jomantiene, R., Dally, E. L., Zhao, Y., Lee, I. M., Nuss, D. L., & Davis R. E. (2006). Phylogeny and characterization of phytoplasmal NusA and use of the nusA gene in detection of group 16SrI strains. *Journal of Plant Pathology*, 88, 193-201.
- Toth, K. F., Harrison, N., & Sears, B. B. (1994). Phylogenetic relationships among members of the class Mollicutes deduced from rps3 gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44, 119-124.
- Town, J., Annand, H., Pratt, D., Dumonceaux, T., & Fonstad, T. (2014). Microbial community composition is consistent across anaerobic digesters processing wheat-based fuel ethanol waste streams. *Journal of Bioresource Technology*, 157, 127-133.
- Tran-Nguyen, L. T. T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., & Gibb, K. S. (2008). Comparative genome analysis of 'Ca. P. australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. Phytoplasma asteris' strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190, 3979-3991.
- Wei, W., Davis, R. E., Lee, I. M., & Zhao, Y. (2007). Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma Groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1855-1867.
- Welliver, R. (1999). Diseases caused by phytoplasmas. *Journal of Regulatory Horticulture*, 25, 17-22.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology Review*, 51, 221-271.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheels, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains of Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.

- Zhao, Y., & Davis, R. E. (2016). Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 2121–2123.
- Zhao, Y., Sun, Q., Wei, W., Davis, R. E., Wu, W., & Liu, Q. (2009). *Candidatus* Phytoplasma tamaricis', a novel taxon discovered in witches'-broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2496-2504.
- Zirak, L., Bahar, M., & Ahoonmanesh, A. (2010). Molecular characterization of phytoplasmas associated with peach diseases in Iran. *Journal of Phytopathology*, 158(2), 105-110.