

تعیین برخی ویژگی‌های ملکولی و بیولوژیکی توسپوویروس‌های مختلف از استان مرکزی*

حسین بیات^۱، افشین حسنی مهربان^۲، ناصر صفایی^۱ و مسعود شمس‌بخش^{۱*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۹)

چکیده

اعضای جنس *Orthotospovirus* عوامل مهم خسارت‌زا به انواع محصولات زراعی، سبزیجات و گیاهان زینتی در سراسر جهان هستند. به منظور ردیابی گونه‌های مختلف توسپوویروس‌ها در استان مرکزی، از مزارع و گلخانه‌های مختلف کشت گیاهان زراعی و زینتی نمونه-برداری شد. از مجموع حدود ۱۶۰ نمونه مشکوک با علائم شبه‌ویروسی جمع‌آوری شده، ۱۰۶ نمونه در آزمون DAS-ELISA، با آنتی‌بادی-های چند همسانه‌ای ویروس‌های حلقه زرد گوجه فرنگی (*Tomato yellow ring virus*, TYRV)، لکه زرد زنبق (*Iris yellow spot virus*, IYSV) و بافت مردگی جوانه بادام زمینی (*Groundnut bud necrosis virus*, GBNV) واکنش مثبت نشان دادند. بر اساس توالی‌های قطعات به دست آمده با استفاده از آغازگرهای عمومی گروه آسیایی و یوراسیایی توسپوویروس‌ها و اختصاصی ژن رمز کننده نوکلئوکسپید در آزمون RT-PCR، وقوع TYRV در گیاهان آلسترومریا، توتون، لادن و گوجه فرنگی، IYSV در گیاهان پیاز و تره و همچنین ویروس سبزد فلفل (*Capsicum chlorosis virus*, CaCV) در کوکب کوهی (*Rudbeckia* sp) تایید شد. بررسی جدایه‌های منتخب با استفاده از سه گونه گیاه آزمون *Nicotiana benthamiana*، *Vigna unguiculata* و *Capsicum annuum* نشان داد که جدایه‌های TYRV از نظر بیولوژیکی از یکدیگر متمایز هستند. همچنین ارزیابی‌های فیلوژنتیکی بر اساس توالی آمینواسیدی پروتئین نوکلئوکسپید نشان داد که جدایه‌های TYRV جمع‌آوری شده به زیر گروه TYRV-t تعلق داشت و جدایه‌های IYSV در زیر گروه IYSV-Eurasia گروه‌بندی شدند. جدایه CaCV کوکب کوهی در گروه یک آسیایی (*Watermelon silver mottle virus*, WsMoV) قرار گرفت و بیشترین قرابت را با جدایه‌ای از ایالات متحده نشان داد.

کلیدواژه: ویروس حلقه زرد گوجه فرنگی، ویروس لکه زرد زنبق، ویروس سبزد فلفل، *Orthotospovirus*، *Tospoviridae*

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیاران، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

۲. تهران، بلوار کشاورز، بین کارگر و جمالزاده، نرسیده به جمالزاده، پلاک ۳۴۶، طبقه ۵ واحد ۱۹، شرکت بازرسی تاک.

Partial biological and molecular characterization of various tospoviruses from Markazi province*

H. Bayat¹, A. Hassani-Mehraban², N. Safaie¹, and M. Shamsbakhsh^{1**}

(Received: 28.8.2017; Accepted: 1.10.2017)

Abstract

Members of the genus *Orthotospovirus* cause serious diseases in a variety of economically important crops, including ornamentals and vegetables, worldwide. To detect the orthotospoviruses infecting different crops and ornamental plants in Markazi province, Iran, about 160 suspected samples with viral-like symptoms were collected. Totally 106 of the specimens showed positive reaction in DAS-LEISA test using polyclonal antibodies raised against N proteins of *Tomato yellow ring virus* (TYRV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) and *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV). Sequence analysis of the obtained fragments from RT-PCR using generic primers of Asian and Eurasian clades of tospoviruses and nucleocapsid gene specific primers confirmed the occurrence of TYRV on alstroemeria, tobacco, tomato and nasturtium; IYSV on onion and leek and *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) on black-eyed susan (*Rudbeckia* sp.). Biological analysis of selected isolates of orthotospoviruses on *Nicotiana benthamiana*, *Capsicum annuum* and *Vigna unguiculata* showed that TYRV isolates were differentiated from each other. Phylogenetic analysis based on amino acid sequences of nucleocapsid protein indicated that TYRV isolates belong to TYRV-t strain and IYSV isolates belong to Eurasia-IYSV cluster. In addition, CaCV isolates were grouped into *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) clade with close relationship with the United State CaCV isolate.

Keywords: *Tomato yellow ring virus*, *Iris yellow spot virus*, *Capsicum chlorosis virus*, *Tospoviridae*, *Orthotospovirus*

* Part of Ph.D. thesis of the first author submitted to Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

**Corresponding author's E-mail: shamsbakhsh@modares.ac.ir

1. Former Ph.D. Student, Assoc. Prof., respectively, Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2. TAK Inspection Company, North Karegar Ave., Ghadr Str., no. 4, Tehran.

مقدمه

شده و گلیکوپروتئین‌های Gn و Gc در سطح این غشا پراکنده‌اند. ژنوم اعضای این جنس شامل سه قطعه آر آن ای تک لا است که قطعات کوچک (S) و متوسط (M) آن دارای قطبیت آمبی‌سنس و قطعه بزرگ (L) دارای قطبیت منفی می‌باشند. قطعه بزرگ آر آن ای، پروتئین RNA- dependent RNA polymeras (RdRp) را رمزگذاری می‌کند. رشته ویروسی (viral sense) قطعه متوسط، پروتئین غیرساختمانی M (NS_M) را رمزگذاری می‌کند که در حرکت سلول به سلول ویروس دخالت دارد در رشته مکمل ویروسی (viral complementary) این قطعه، ژن رمزنگارنده پیش‌سازهای گلیکوپروتئین‌های ساختمانی Gn و Gc قرار دارد که در انتقال ویروس با تریپس نقش دارند. قطعه کوچک آر آن ای در رشته ویروسی پروتئین غیر ساختمانی S (NS_S) را رمزگذاری می‌کند که در سرکوب خاموشی ژن دخالت دارد و در رشته مکمل ویروسی پروتئین ساختمانی نوکلئوکسپید (N) را رمزگذاری می‌کند. نُه نوکلئوتید ابتدایی انتهای ۵' هر سه قطعه آر آن ای به شدت محافظت شده‌اند و با نُه نوکلئوتید انتهای 3' به صورت وارونه مکمل هستند و در نتیجه ساختاری شبه‌حلقوی به قطعات ژنومی ویروس می‌دهند (Oliver & Whitfield 2016).

گونه‌های جنس *Orthotospovirus* بر اساس معیارهای اختصاصیت ناقل، دامنه میزبانی، روابط سرولوژیکی پروتئین نوکلئوکسپید و میزان مشابهت توالی آمینواسیدی پروتئین نوکلئوکسپید (N)، از یکدیگر تفکیک می‌شوند (Plyusnin et al. 2012). همچنین معرفی یک جدایه به عنوان یک گونه جدید براساس یکسانی کمتر از ۹۰ درصدی توالی آمینواسیدی پروتئین نوکلئوکسپید آن با سایر گونه‌های جنس می‌باشد (Plyusnin et al. 2012). به‌تازگی نشان داده شده است که گونه‌های شناخته‌شده

توسپوویروس‌ها، که اخیراً در جنس *Orthotospovirus*، خانواده‌ی *Tospoviridae* و راسته *Bunyavirales* طبقه بندی شده‌اند (Adams et al. 2017)، باعث بروز خسارت اقتصادی چشمگیری به انواع محصولات زراعی و زینتی در سرتاسر جهان می‌شوند (Riley et al. 2011). تا کنون ۲۹ گونه متعلق به جنس *Orthotospovirus* معرفی شده است که ۱۱ گونه آن قطعی و ۱۸ گونه غیرقطعی هستند (Adams et al. 2017, Hassani-Mehraban et al. 2016). دامنه میزبانی توسپوویروس‌ها بسیار گسترده است؛ به طوری که گونه‌ی تیپ این جنس، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)، به بیش از ۱۱۰۰ گونه در ۸۵ تیره گیاهی حمله می‌کند (Rybacki 2015). اگر چه برخی گونه‌های دیگر این جنس مانند ویروس لکه بافت مرده گل حنا (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) و ویروس لکه زرد زنبق (*Iris yellow spot virus*, IYSV) پراکنش جهانی دارند، اما ویروس پیسک نقره‌ای هنداونه (*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV) و ویروس لکه حلقوی علف هفت‌بند (*Polygonum ring spot virus*, PolRSV) به ترتیب تنها از آسیا و اروپا گزارش شده‌اند (Pappu et al. 2009). توسپوویروس‌ها توسط گونه‌های متعدد تریپس به روش گردشی- تکثیری منتقل می‌شوند (Pappu et al. 2009). تا کنون ۱۵ گونه تریپس در خانواده‌ی *Thripidae* به عنوان ناقل گونه‌های مختلف توسپوویروس شناخته شده‌اند (Riley et al. 2011, Rotenberg et al. 2015).

اعضای جنس *Orthotospovirus* دارای پیکره‌های شبه‌کروی (quasi-spherical) به قطر ۸۰-۱۲۰ نانومتر هستند که توسط یک غشای فسفولیپیدی دولایه احاطه

(Mehraban et al. 2005, Moini & Izadpanah 2001).

با توجه به اینکه استان مرکزی یکی از مراکز اصلی کشور در تولید محصولات زیتنی و زراعی محسوب می‌شود و گزارش‌های وقوع برخی از اعضای جنس *Orthotospovirus* در این استان عمدتاً بر اساس مطالعات سرولوژیکی بوده است (Ghotbi et al. 2005, Shahraeen et al. 2002)، از اینرو علاوه بر بررسی‌های سرولوژیکی، شناسایی میزبان‌ها و تایید گونه‌های توسپوویروس‌ها بر اساس مطالعات ملکولی به ویژه تعیین ترادف پروتئین نوکلئوکپسید ضروری است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از گلخانه‌ها و مزارع

به منظور بررسی وقوع اعضای جنس *Orthotospovirus* در گلخانه‌ها و مراکز پرورش روباز گیاهان زیتنی و محصولات زراعی استان مرکزی، در طی بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ خورشیدی اقدام به جمع‌آوری حدود ۱۶۰ نمونه از گیاهان دارای علائم مشکوک به ویروس شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آزمون سرولوژی

به منظور بررسی اولیه آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده از آزمون الایزای مستقیم (Clark & Adams 1977) استفاده شد. به این منظور از آنتی‌بادی چند همسانه‌ای تهیه شده علیه ویروس‌های TYRV, IYSV, INSV, GBNV و TSWV (اهدایی توسط Dick Petres از دانشگاه واخنینگن هلند) با رقت (۱/۱۰۰۰) استفاده شد. پس از انجام آزمون الایزا، مقادیر جذب نمونه‌ها در طول موج

جنس *Orthotospovirus* در پنج گروه فیلوژنتیکی (Clade) گروه‌بندی می‌شوند. بر اساس گونه‌های تیپ هر گروه فیلوژنتیکی، این گروه‌ها تحت عنوان TSWV, WSMoV, IYSV، ویروس بافت مردگی رگبرگ سویا (*Soybean vein necrosis virus, SVN*) و ویروس لکه زرد بادام زمینی (*Groundnut yellow spot virus, GYSV*) نامیده شده‌اند (Plyusnin et al., 2012).

توسپوویروس‌ها را می‌توان از نظر سرولوژیکی با استفاده از آنتی‌بادی‌های چند همسانه‌ای تولیدشده علیه پروتئین نوکلئوکپسید این ویروس‌ها مورد شناسایی قرار داد. بر این اساس اعضای جنس *Orthotospovirus* در چهار گروه سرولوژیکی WSMoV, GYSV, IYSV و TSWV طبقه بندی می‌شوند. روابط سرولوژیکی نزدیک اعضای گروه‌های سرولوژیکی مانند WSMoV، ویروس بافت مردگی جوانه هندوانه (*Watermelon bud necrosis virus, WBNV*)، ویروس بافت مردگی جوانه بادام زمینی (*Groundnut bud necrosis virus, GBNV*) و ویروس سبزدرد فلفل (*Capsicum chlorosis virus, CaCV*)، سبب بروز واکنش‌های تقاطعی بین ویروس و آنتی‌بادی‌های هترولوگ می‌شود، به طوری که تمایز بین این گونه‌ها بر اساس روش سرولوژیکی حتی با استفاده از آنتی‌بادی‌های تک همسانه‌ای مشکل ساخته است (Bald-Blume et al. 2017).

در ایران تا کنون پنج گونه از اعضای جنس *Orthotospovirus* شامل TSWV, INSV, GBNV, IYSV و ویروس حلقه زرد گوجه فرنگی (*Tomato yellow ring virus, TYRV*) بر اساس مطالعات سرولوژیکی و ملکولی مورد شناسایی قرار گرفته و ویژگی‌های آن‌ها تعیین شده است (Bananej et al. 1998, Ghotbi et al. 2005, Golnaraghi et al. 2002, Hassani-

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1- Properties of the primers used in this study.			
Virus or virus clade name	Primer name	Sequence (5'-3')	Amplicon Size TA ^a Nucleotide position (RNA polarity) Reference
Asian-1-Clade ¹	AS-EA-F	GGGGGATCCAGAGCAATCGAGG	52 S 1-13(vc) ^b (Hassani-Mehraban et al. 2016)
	AS-R	GCCTCAGTCCTCTTAAATGTCC	S 339-360(vc)
Euro-Asian-Clade ²	AS-EA-F	GGGGGATCCAGAGCAATCGAGG	52 S 1-13(vc) (Hassani-Mehraban et al. 2016)
	EA-R	TTGTTCAATGAAGCAGCACCC	S 764-793(vc)
IYSV	IY1	ATGGCTACCGTTAGGG	45 S 3020-3037(v) ^c (Pozzer et al. 1999)
	IY2	TTAATTATATCTATCTTTCTTGG	S 2211-2236(v)
TYRV	N1	CCCGGATCCATGGCTACCGCACGAGTG	62 S 2973-2999(v) (Hassani-Mehraban et al. 2005)
	N2	CCCGGATCCGCACTCATTAATAATGCATC	S 2150-2177(v)
CaCV	CaCV-U-F	AGAGCAATCGAGGCACCTAATAAATCC	57 S 1-27(vc)
	CaCV-N-R	CTAGAGAAAGTACTAGGCTTTGAG	S 865-886(vc) This study

^aAT: Annealing temperature

^bVC: Viral complementary

^cV: Viral

۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا خوان (ELX 800 (ELISA reader , Bio-Tek Instruments, INC., USA قرائت شد. نمونه‌هایی آلوده در نظر گرفته شدند که مقدار جذب آنها از سه برابر میانگین جذب سه شاهد منفی بیشتر بود (Raikhy et al. 2003).

ارزیابی های بیولوژیکی

از بین نمونه‌هایی که در آزمون الیزا با آنتی‌بادی‌های علیه TYRV، IYSV و GBNV واکنش مثبت نشان دادند، ۵۰ نمونه با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار با اسیدیته ۷/۲ حاوی ۰/۱ درصد سولفیت سدیم با استفاده از پودر کاربراندوم به گیاهان *Nicotiana benthamiana*، *Vigna anguiculata* و *Capsicum annuum* مایه‌زنی شدند. تیمار شاهد با استفاده از بافر عصاره گیری مایه‌زنی شد.

استخراج اسید نوکلئیک و پی سی آر با ترانویسی معکوس (RT-PCR)

استخراج آر ان ای کل از برگ گیاهان *N. benthamiana* مایه‌زنی‌شده با جدایه های مختلف توسط ویروس و یا گیاهان مثبت در آزمون الیزا، با استفاده از کیت RNX Plus (سینا کلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده و یا روش معصومی و همکاران (Masoomi-Aladizgeh et al. 2016) انجام شد. از دو جفت آغازگر عمومی آسیایی (AS-R/AS-EA-F) و یورو آسیایی (EA-R /AS-EA-F) توسط ویروس‌ها و آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن نوکلئوکسید سه گونه (IYSV (N2/N1)، TYRV (IY2/IY1) و CaCV (CaCV-N-R/U-F) در آزمون RT-PCR استفاده شد. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آمده است. واکنش

GF-1 Gel DNA Recovery (سینا کلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل استخراج و خالص شدند. این قطعات با استفاده از کیت PCR TA Cloning Kit در پلاسמיד pTG19-T (سینا کلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده همسانه‌سازی شده و پلاسמידهای نو ترکیب حاصل با روش Sanger توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) تعیین ترادف شدند. ترادف‌های به دست آمده با استفاده از برنامه BLAST با توالی‌های قابل دسترس در بانک ژن (GenBank) مقایسه شدند. مجموعه نرم افزاری DNASTAR 5 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) جهت ترجمه ترادف‌های نوکلئوتیدی به آمینواسیدی متناظر مورد استفاده قرار گرفت. انجام هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف‌های آمینواسیدی حاصل با سایر ترادف‌های موجود در بانک ژن با برنامه Clustal W انجام شد و درخت فیلوژنتیکی مورد نظر با استفاده از روش Neighbor joining با اعتبارسنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار در نرم افزار MEGA6 (Tamura et al. 2013) ترسیم شد.

نتایج

سرولوژی و تعیین پراکنش

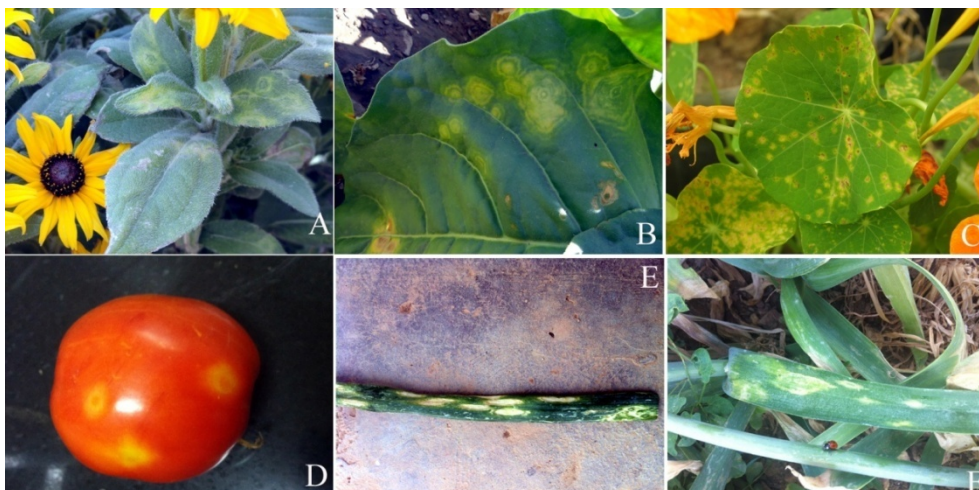
از مجموع ۱۵۹ نمونه جمع‌آوری شده از مزارع سیب زمینی، گوجه فرنگی، انواع صیفی‌جات، پیاز، تره (Allium sp.) و همچنین محصولات مختلف زیتنی در گلخانه‌ها و فضاهای آزاد شهرستان‌های خمین، محلات و دلیجان با نشانه‌های لکه‌های حلقوی سبزرده و بافت مرده، نقوش حلقوی متحدالمرکز، لکه‌های سبزرده بیضوی و الماسی شکل و لکه‌های حلقوی زرد روی سطح میوه (شکل ۱)، تعداد ۱۰۶ نمونه از گیاهان پیاز، تره، آلسترومریا، گوجه فرنگی، لادن، توتون (*N. tabacum*)، فلفل، خربزه و

ترانویسی معکوس با استفاده از یک میکروگرم آر ان ای کل به همراه ۰/۵ میکرومولار آغازگر تصادفی شش‌تایی و ۴ میکرولیتر از محلول کیت Hyperscript™ Reverse Transcriptas (GeneAll، کره جنوبی) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. واکنش در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (iCycler, Bio-Rad, USA) انجام گرفت.

واکنش پی سی آر با استفاده از مخلوط آماده Red Master Mix (شرکت Amplicon، دانمارک) در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر یادشده انجام شد. به این منظور دو میکرولیتر از cDNA به همراه نیم میلی‌مولار از هر جفت آغازگر با ۷ میکرولیتر از Master mix مخلوط شده و حجم نهایی با استفاده از آب مقطر استریل به ۱۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه پی سی آر شامل یک چرخه دمایی واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، در ادامه ۳۵ چرخه با برنامه دمایی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال (annealing) بر اساس جدول ۱ به مدت ۳۰ ثانیه و بسط رشته (Extension) در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه به ازای هر ۱۰۰۰ جفت باز و یک چرخه نگهداری به مدت ۷ دقیقه برای تکمیل ساخت دی ان ای بود. محصولات پی سی آر در ژل آگارز ۱٪ در بافر 1X TAE (40mM Tris base, 10mM EDTA, pH: 8) و 20mM Acetic acid الکتروفرز شدند و جهت تشخیص باندها در ژل، از رنگ Florescent FluoroDye DNA (شرکت Smobio، تایوان) استفاده شد و توسط دستگاه (Major science, Taiwan) Gel documentation عکس‌برداری شدند.

همسانه‌سازی، تعیین ترادف و تجزیه و تحلیل ترادف‌ها

قطعات تکثیرشده توسط پی سی آر با استفاده از کیت



شکل ۱- نشانه‌های گونه‌های مختلف توسپوویروس‌ها مشاهده شده بر روی گیاهان زراعی و زینتی (A)، لکه‌های بیضوی تا الماسی شکل روی کوکب کوهی ناشی از CaCV؛ (B)، لکه حلقوی متحدالمرکز بر روی برگ توتون ناشی از TYRV؛ (C)، لکه‌های سبزرده و بافت مرده روی برگ لادن ناشی از TYRV؛ (D)، لکه‌های حلقوی زرد رنگ بر روی میوه گوجه فرنگی ناشی از TYRV. لکه‌های بیضوی تا دوکی شکل روی برگ پیاز (E) و تره (F) ناشی از IYSV.

Figure 1. Symptoms induced by different tospoviruses on crop and ornamental plants. (A), ellipsoid and diamond spots on rudbeckia leaves caused by CaCV; (B), concentric ringspots on tobacco leaves caused by TYRV; (C), chlorotic and necrotic spots on tripaoelum caused by TYRV; (D), yellow ring spot on tomato fruit caused by TYRV; (E), necrotic and (F) chlorotic eye-like spots on onion and leek leaves, respectively, caused by IYSV.

فرنگی از شهرستان دلیجان با آنتی بادی GBNV واکنش مثبت نشان دادند. سایر نمونه‌های جمع‌آوری شده اگر چه نشانه‌های مشابهی با نمونه‌های مثبت در آزمون الیزا داشتند اما با هیچکدام از آنتی‌بادی‌های موجود واکنش مثبت نشان ندادند. هیچکدام از نمونه‌های جمع‌آوری شده با آنتی بادی‌های TSWV و IYSV واکنش مثبت نشان ندادند (جدول ۲).

ارزیابی‌های بیولوژیکی جدایه‌های منتخب

واکنش گیاهان *N. benthamiana* مایه‌زنی شده با جدایه‌هایی که در آزمون الیزا با یکی از سه آنتی بادی علیه GBNV، IYSV و TYRV واکنش مثبت نشان دادند در مورد همه جدایه‌ها کم و بیش یکسان بود. لکه‌های سبزرده و بافت مرده روی برگ‌های مایه‌زنی شده این گیاهان

کوکب کوهی با آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه TYRV و IYSV به عنوان نمایندگان گروه سرولوژیکی IYSV و همچنین GBNV به عنوان نماینده گروه سرولوژیکی WSMoV واکنش مثبت نشان دادند (جدول ۲). بیشترین نمونه‌هایی که با آنتی‌بادی‌های موجود واکنش مثبت نشان دادند مربوط به محصول پیاز خوراکی بود؛ به طوری که از ۶۲ نمونه جمع‌آوری شده پیاز از شهرهای استان، تعداد ۴۲ نمونه با آنتی بادی IYSV واکنش مثبت نشان دادند. محصول تره در یکی از مزارع تولید سبزیجات در شهرستان محلات هم با آنتی‌بادی IYSV واکنش مثبت نشان داد. نتایج بررسی نمونه‌های آلسترومریا، گوجه فرنگی، توتون و لادن با آنتی بادی TYRV در جدول ۲ آمده است. پانزده نمونه جمع‌آوری شده کوکب کوهی از شهرستان محلات و یک نمونه خربزه و دو نمونه گوجه

جدول ۲. واکنش سرولوژیکی نمونه‌های گیاهان زراعی و زینتی جمع‌آوری شده از جنوب استان مرکزی به آنتی‌بادی‌های گروه‌های سرولوژیکی مختلف توسپوویروس‌ها در آزمون الایزا

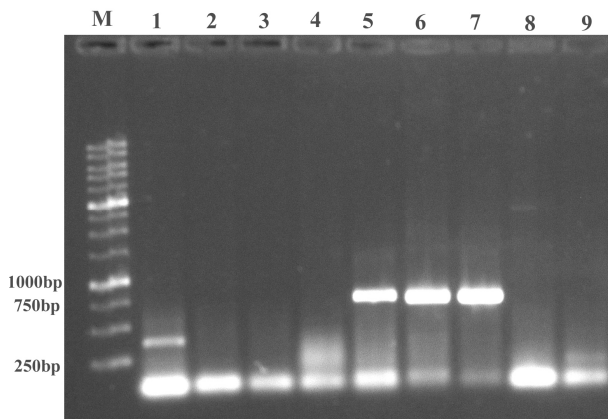
Table 2. Serological reaction of the field and ornamental plants samples collected from south of Markazi province to antibodies of tospoviruses from different serological groups by ELISA

City	Plant	Samples No.	Antibody				
			TSWV serogroup		WsMoV serogroup	IYSV serogroup	
			TSWV	INSV	GBNV	IYSV	TYRV
Mahallat	rudbeckia	26	-	-	15	-	-
	onion	30	-	-	-	25	-
	leek	7	-	-	-	7	-
	alstroemeria	14	-	-	-	-	10
	tobacco	15	-	-	-	-	11
	nasturtium	8	-	-	-	-	5
	tomato	12	-	-	-	-	10
Khomein	onion	22	-	-	-	10	-
Delijan	onion	10	-	-	-	7	-
	tomato	10	-	-	2	-	-
	melon	5	-	-	1	-	-
Total		159	-	-	18	49	36

نتایج پی سی آر با ترانویسی معکوس

واکنش پی سی آر با ترانویسی معکوس با استفاده از آغازگر عمومی آسیایی (AS-R/AS-EA-F) در نمونه کوکب کوهی منجر به تکثیر قطعه‌ای به اندازه حدود ۳۶۰ جفت باز شد. در حالیکه در نمونه فاقد علایم، قطعه متناظر تکثیر نشد (شکل ۳). این جفت آغازگر، ناحیه غیر ترجمه شونده انتهای ۳' (3'UTR) ژنوم S و قسمتی از ژن رمز کننده نوکلئوکپسید را در اعضای گروه آسیایی توسپوویروس‌ها تکثیر می‌کند. اگر چه برخی از نمونه‌های جمع‌آوری شده، با آنتی‌بادی GBNV در آزمون الایزا واکنش مثبت نشان دادند (جدول ۲)، اما واکنش پی سی آر با ترانویسی معکوس از این جدایه‌ها قطعه مشابهی را از جدایه کوکب کوهی تکثیر نکرد (شکل ۳). جفت آغازگر عمومی یوروآسیایی (EA-R /AS-EA-F) توسپوویروس‌ها قطعه‌ای حدود ۸۰۰ جفت بازی را در نمونه‌های لادن، گوجه فرنگی، توتون، پیاز و تره تکثیر کردند. با این وجود، در نمونه‌های سالم قطعه دی ان ای متناظر تکثیر

بعد از حداکثر یک هفته ظاهر شد (شکل ۲H). نشانه‌های سیستمیک شامل بافت مردگی برگ‌های انتهایی بوته و نهایتاً مرگ گیاهان حداکثر دو هفته تا ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی پدیدار شدند (شکل ۲D). مایه‌زنی گیاهان *C. annuum* با جدایه‌هایی که با آنتی‌بادی‌های علیه TYRV یا IYSV در آزمون الایزا واکنش مثبت نشان دادند، سبب بروز نشانه‌های سیستمیک به صورت لکه‌های بافت مرده شد (شکل ۲F)، در حالیکه در مورد نمونه‌های مثبت با آنتی‌بادی علیه GBNV، این نشانه‌ها به صورت نقوش حلقوی سبزدرد در برگ‌های جوان‌تر ظاهر شد (شکل ۲B). در مورد *V. unguiculata*، مایه‌زنی نمونه‌ها منجر به واکنش‌های متفاوتی شد. جدایه‌های پیاز و تره سبب بروز نشانه‌های موضعی به صورت نقطه‌های بافت مرده شدند (شکل ۲I). این نشانه‌ها در مورد جدایه‌های توتون و لادن به صورت نقوش حلقوی بافت مرده روی برگ‌های مایه زنی شده مشاهده شد (شکل‌های ۲C و ۲G)، جدایه لادن سبب بروز لکه‌های بافت مرده سیستمیک، زردی عمومی و کوتولگی نیز شد (شکل ۲E).



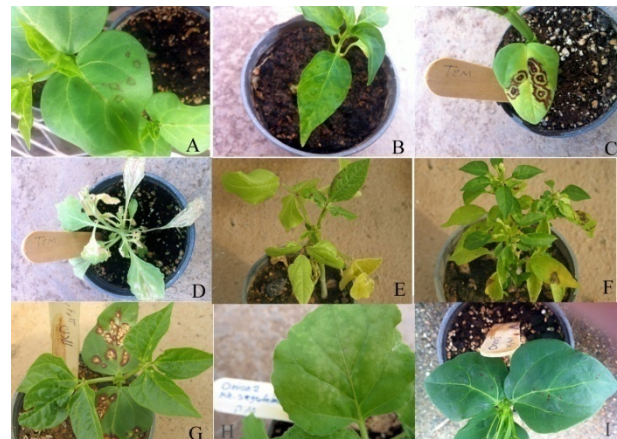
شکل ۳. الکتروفورز محصولات RT-PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی آسیایی (AS-R/ AS-EA-F) و یوروآسیایی (EA-R/AS-EA-F) توسپوویروس‌ها روی نمونه‌های مختلفی که در آزمون الیزا مثبت تشخیص داده شدند. راهک ۱ تا ۴ به ترتیب نمونه‌های کوکب کوهی، فلفل، خربزه و گوجه فرنگی با واکنش مثبت به آنتی بادی GBNV، راهک‌های ۵ نمونه توتون با واکنش مثبت به آنتی بادی TYRV، راهک ۶ و ۷ به ترتیب نمونه‌های پیاز و تره با واکنش مثبت به آنتی بادی IYSV. راهک ۸ کوکب کوهی سالم. راهک ۹ پیاز سالم. M : GenRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas).

Figure 3. Electrophoresis of RT-PCR products amplified of Orthotospovirus-infected and ELISA-positive samples collected from south Markazi province using Asian (AS-EA-F/AS-R) and Euro-Asian (AS-EA-F/ EA-R) generic primer pairs. Lanes 1 to 4, rudbeckia, pepper, melon and tomato samples that reacted with GBNV antiserum, respectively; lane 5, tobacco sample reacted with TYRV antiserum; lanes 6 and 7, onion and leek samples reacted with IYSV antiserum, respectively; lanes 8 and 9, healthy rudbeckia and onion, respectively. M GenRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas).

نوکلئوکپسید، توالی منطقه غیر ترجمه شونده انتهای ۳' قطعه S را نیز در بر دارد.

تجزیه و تحلیل توالی و فیلوژنی

آزمون BLAST با استفاده از مترادف قطعه حدود ۳۶۰ جفت بازی با استفاده از آغازگر عمومی گروه یک آسیایی، مربوط به جدایه کوکب کوهی، ۹۷-۸۸ و ۹۹-۹۱ درصد

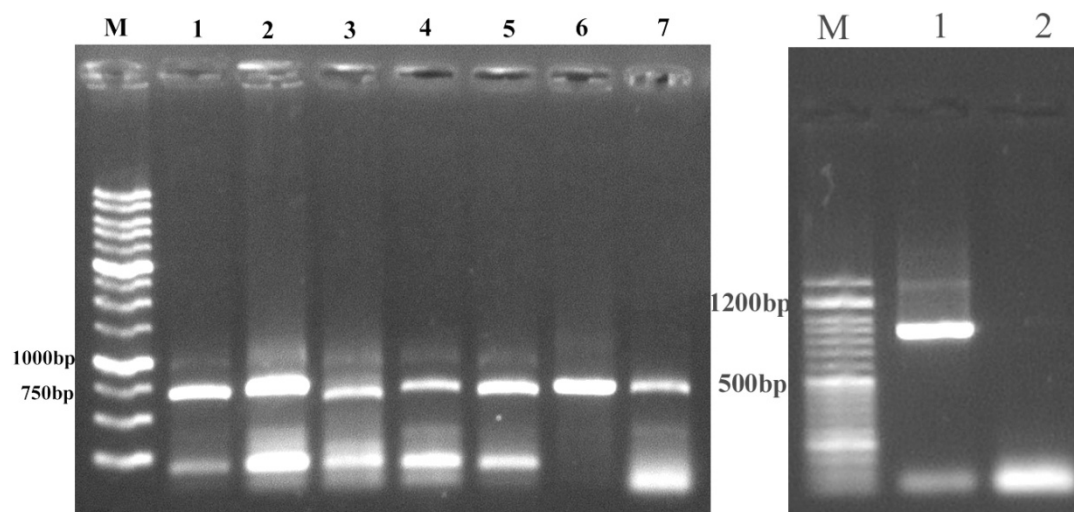


شکل ۲. لکه‌ها، نقاط و نقوش حلقوی کلروتیک و بافت مرده موضعی و سیستمیک ایجاد شده بر روی سه گیاه *Nicotiana benthamiana*، *Vigna unguiculata* و *Capsicum annuum* پس از مایه زنی با (A و B) عصاره کوکب کوهی مثبت به آنتی بادی GBNV: (C و D)، عصاره توتون مثبت به آنتی‌بادی TYRV؛ (E، F و G)، عصاره لادن مثبت به آنتی‌بادی TYRV؛ (H و I) عصاره پیاز مثبت به آنتی‌بادی IYSV.

Figur 2. Chlorotic and necrotic local and systemic spots, lesion and ringspots on *Nicotiana benthamiana*, *Vigna unguiculata* and *Capsicum annuum* induced after inoculation with the plant saps of positive ELISA samples using GBNV, TYRV and IYSV antibodies; A and B positive ELISA rudbeckia using GBNV antibody; C and D positive ELISA tobacco using TYRV antibody; E, F and G positive ELISA nasturtium using TYRV antibody; H and I, positive ELISA onion using IYSV antibody.

نشد (شکل ۳). جفت آغازگر اخیر، منطقه غیر ترجمه شونده انتهای ۳' (3'UTR) و قسمتی از ژن رمز کننده نوکلئوکپسید جدایه‌های یوروآسیایی را تکثیر می‌کند.

استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر کننده ژن نوکلئوکپسید (جدول ۱) در آزمون پی سی آر، منجر به تکثیر قطعات حدود ۹۰۰-۸۰۰ جفت بازی مربوط به سه گونه TYRV، IYSV و CaCV شد (شکل ۴). قطعات مربوط به TYRV و IYSV شامل طول کامل ژن رمز کننده نوکلئوکپسید دو ویروس TYRV و IYSV است در حالیکه در مورد CaCV، این قطعه علاوه بر ژن رمز کننده



شکل ۴. الکتروفورز محصولات RT-PCR نمونه‌های گیاهی دارای علائم جمع‌آوری شده از جنوب استان مرکزی که در آزمون الایزا مثبت تشخیص داده شدند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن نوکلئوکسپید گونه‌های مختلف توسپوویروس‌ها در ژل آگارز. سمت چپ، راهک‌های ۱ و ۲: نمونه‌های پیاز و راهک‌های ۳ و ۴: نمونه‌های تره تکثیر شده با آغازگرهای IY1/IY2، راهک ۵ تا ۷: به ترتیب نمونه‌های توتون، لادن و گوجه فرنگی تکثیر شده با آغازگرهای N1/N2. سمت راست، راهک ۱ نمونه کوکب کوهی تکثیر شده با آغازگر CaCV-U-F/CaCV-N-R، راهک ۲ کوکب کوهی سالم. M: GenRuler™ 1 kb DNA ladder, Fermentas (left), GenRuler™ 50bp DNA ladder, Fermentas (right)

Figure 4. Electrophoresis of RT-PCR products amplified of ELISA-positive symptomatic samples from south of Markazi province using specific primer pairs designed on nucleocapside genes of different tospoviruses species. Left, lanes 1 and 2, onion and lanes 3 and 4, leek samples amplified by IY1/IY2 primers, lanes 5-7, tobacco, nasturtium and tomato samples, respectively, amplified by N1/N2 primers. Right, lane 1 rudbeckia sample amplified by CaCV-U-F/CaCV-N-R primers, lane 2 healthy rudbeckia. M: GenRuler™ 1 kb DNA ladder, Fermentas (left), GenRuler™ 50bp DNA ladder, Fermentas (right).

گوجه فرنگی به TYRV و جدایه‌های پیاز و تره به IYSV تایید شد.

ترادف ۸۲۲ جفت بازی ژن رمز کننده نوکلئوکسپید جدایه‌های IYSV که در این پژوهش شناسایی شدند در سطح نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی به ترتیب ۹۹/۸-۹۶/۴ و ۹۹/۶-۹۶ درصد یکسانی نشان دادند. همسانی ترادف ۸۲۵ جفت بازی ژن نوکلئوکسپید جدایه‌های ایرانی TYRV در سطح نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی به ترتیب ۹۹/۵-۸۸/۵ و ۹۱/۲-۱۰۰ درصد محاسبه شد. ترادف ژن رمز کننده پروتئین نوکلئوکسپید جدایه CaCV در سطح نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی بیشترین شباهت را با سایر جدایه‌های CaCV شناسایی شده از سایر نقاط دنیا نشان داد و

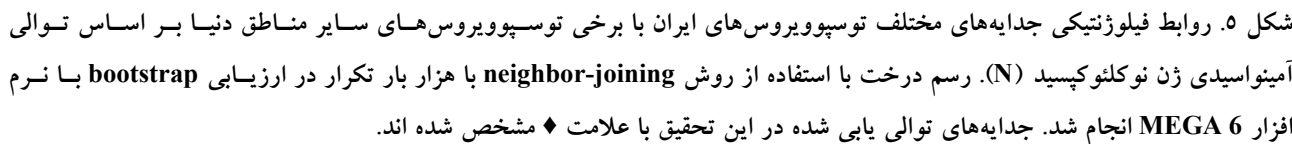
یکسانی (identity) به ترتیب در سطح نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی با سایر جدایه‌های CaCV موجود در بانک ژن را نشان داد. قطعات تکثیر شده ۸۰۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای عمومی یوروآسیایی مربوط به جدایه‌های توتون، گوجه فرنگی و لادن ۹۹-۸۸ و ۹۹-۹۱ درصد یکسانی را به ترتیب در سطح نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی با جدایه‌های مختلف TYRV موجود در بانک ژن نشان دادند. همین قطعه تکثیر شده در جدایه‌های مختلف پیاز و تره ۹۹-۹۲ و ۹۷-۸۵ درصد یکسانی را به ترتیب در سطح آمینواسیدی و نوکلئوتیدی با جدایه‌های مختلف IYSV موجود در بانک ژن نشان دادند. با توجه به این نتایج تعلق جدایه کوکب کوهی به CaCV، جدایه‌های توتون، لادن و

مشخص شد که به گروه فیلوژنتیکی WSMoV تعلق دارد. درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس مترادف آمینواسیدی ژن نوکلئوکپسید نه جدایه توسپوویروس شناسایی شده در این پژوهش به همراه ۲۰ مترادف از جدایه‌های توسپوویروس ایران و ۲۱ مترادف از جدایه‌های سایر نقاط دنیا نشان داد که تنوع قابل توجهی بین جدایه‌های مختلف گونه‌های شناسایی شده وجود دارد. جدایه‌های TYRV شناسایی شده در این پژوهش، همگی متعلق به زیر گروه TYRV-t این گونه بودند. علیرغم تنوع میزبانی و جغرافیایی، جدایه‌های مختلف استرین TYRV-t ایران در یک گروه قرار گرفتند. البته در داخل این زیر گروه، سه جدایه TYRV شناسایی شده در این پژوهش در دو شاخه مجزا قرار گرفتند؛ در حالیکه جدایه‌های گوجه فرنگی و لادن استان مرکزی با جدایه‌هایی از استان‌های فارس، تهران، خراسان و مرکزی در یک شاخه قرار گرفتند، جدایه توتون در شاخه جداگانه‌ای همراه با جدایه‌ای از استان فارس گروه‌بندی شد. پنج جدایه IYSV شناسایی شده در این پژوهش، همراه با دو جدایه دیگر از استان خراسان رضوی در زیر گروه موسوم به یوروآسیایی IYSV (IYSV-Eurasia) (Bag et al. 2015) گروه‌بندی شدند (شکل ۵). برغم نزدیکی مکان‌های نمونه‌برداری جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش (جدول ۲)، دو جدایه تره محلات و یک جدایه پیاز از شهرستان دلیجان (رس ششمارهای MF431883، MF431885 و MF420346) در یک زیر شاخه قرار گرفتند در حالیکه دو جدایه پیاز دیگر از شهرهای خمین و محلات (MF431884 و MF420345) در زیر شاخه دیگر گروه‌بندی شدند. دو جدایه استان خراسان رضوی هم در این زیر گروه به صورت یک زیر شاخه جداگانه گروه‌بندی شدند (شکل ۵). این نتایج نشانگر روند تکاملی جداگانه

این گونه می‌باشد. جدایه‌های ایرانی بیشترین قرابت را با جدایه تره از کشور سریلانکا نشان دادند. جدایه CaCV محلات همراه با جدایه‌های دیگری از این ویروس از کشورهای آمریکا، تایوان، استرالیا، هندوستان و تایلند در یک گروه قرار گرفت. جدایه CaCV از کشور چین با سایر جدایه‌های این ویروس گروه بندی نشد و در شاخه دیگری قرار گرفت (شکل ۵).

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون‌های الیزا و تعیین توالی قطعات تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی، وقوع TYRV در نمونه‌های توتون، لادن و گوجه فرنگی، IYSV در نمونه‌های تره و پیاز و CaCV در نمونه کوکب کوهی جمع‌آوری شده از استان مرکزی تایید شد. تنوع زیاد در نشانه‌های ناشی از آلودگی به انواع توسپوویروس‌ها، شناسایی اولیه نمونه‌های مشکوک را بر اساس علایم مشکل می‌سازد. بر همین اساس آلودگی تعدادی از نمونه‌های دارای نشانه‌های بیماری در آزمون‌های الیزا و پی سی آر با ترانویسی معکوس به توسپوویروس‌ها تایید نشد. بروز نشانه‌های حلقوی متحدالمرکز بر روی برگ‌های توتون ناشی از TYRV برای اولین بار گزارش می‌شود. آلودگی کوکب-کوهی به TSWV از طریق آزمون سرولوژیکی بدون ذکر نشانه‌های بیماری گزارش شده است (Ghotbi et al. 2005). با این حال بروز نقوش حلقوی و بیضی شکل متحدالمرکز ناشی از CaCV برای نخستین بار گزارش شده است. همچنین لکه‌های سبز و بافت مرده بر روی گل لادن ناشی از TYRV نیز برای نخستین بار گزارش می‌شود. سایر نشانه‌های ناشی از آلودگی گیاهان پیاز، تره و گوجه فرنگی قبل از این گزارش شده است (Gent et al.



442

(2006, Hassani-Mehraban et al. 2005).

نتایج این بررسی نشان داد که آزمون الایزا قادر به تایید وقوع یک گونه خاص از اعضای جنس *Orthospovirus* نیست. مطالعات ملکولی و تعیین توالی قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای عمومی و اختصاصی از نمونه‌های کوکب کوهی که با آنتی‌بادی GBNV واکنش مثبت داشتند، نشان داد که به CaCV آلوده بودند روابط سرولوژیک گونه‌های عضو جنس *Orthospovirus* منجر به گروه‌بندی اعضای این جنس در چهار گروه سرولوژیکی شده است. ویروس‌های TSWV، IYSV، WSMoV و GYSV به عنوان اعضای تیپ این چهار گروه سرولوژیکی شناخته می‌شوند. با این حال برخی گونه‌های این جنس به صورت یک mono-serotype طبقه‌بندی می‌شوند (Bald-Blume et al. 2017, Chen et al. 2016). این موضوع نشان می‌دهد که تایید وقوع یک گونه توسط ویروس تنها بر اساس معیار سرولوژیکی بسیار دشوار و در مواردی غیر ممکن است (Bald-Blume et al. 2017). در استان مرکزی و سایر مناطق کشور، اکثر گزارش‌های وقوع توسط ویروس‌ها بر اساس مطالعات سرولوژیکی با استفاده از آنتی‌بادی‌های چند همسانه‌ای انجام شده است (Ghotbi et al. 2005, Golnaraghi et al. 2002, Golnaraghi et al. 2001, Moini & Izadpana, 2001, Pourrahim et al. 2001, Shahraeen et al. 2002).

با توجه به نتایج این تحقیق، گونه‌های معرفی شده در این بررسی‌ها باید با روش‌های مولکولی تایید شود. هرچند نمونه‌های خربزه و گوجه فرنگی جمع‌آوری شده از شهرستان دلجان واکنش مثبتی با آنتی‌بادی GBNV در آزمون الایزا نشان دادند و حتی مایه‌زنی نمونه خربزه منجر به بروز علائم در گیاه *V. unguiculata* شد اما آزمون پی سی آر با ترانویسی معکوس با استفاده از آغازگرهای

عمومی منجر به تکثیر دی ان ای در محدوده اندازه مورد انتظار نشد. نتایج مثبت کاذب در آزمون الایزا ممکن است به دلیل وجود برخی ناخالصی‌های گیاهی آنتی‌بادی و یا وجود توسپوویروس‌های ناشناخته دیگر در نمونه گیاهی باشد.

بررسی واکنش گیاهان مایه‌زنی شده با نمونه‌های مختلفی که در آزمون الایزا مثبت تشخیص داده شدند، مشخص کرد که علائم ظاهر شده روی گیاه *N. benthamiana* نتوانست بین جدایه‌های مختلف تمایز ایجاد کند. در حالیکه علائم ظاهر شده روی دو گونه *V. unguiculata* و *C. annuum* سبب تمایز جدایه‌های مختلف شد. مایه‌زنی *V. unguiculata* با نمونه‌های لادن و توتون منجر به بروز واکنش متفاوتی شد در حالیکه هر دوی این نمونه‌ها با آنتی‌بادی TYRV واکنش مثبت نشان دادند. مطالعات قبلی هم تمایز بین جدایه‌های مختلف یک گونه توسط ویروسی توسط *V. unguiculata* را نشان داده‌اند (Chiemsoombat et al. 2008, Kunkaliker et al. 2010). قرار گرفتن جدایه توتون و لادن در دو زیر شاخه مجزا در گروه TYRV-t در درخت فیلوژنتیکی (شکل ۵) تایید کننده تفاوت این دو جدایه بود.

آغازگرهای عمومی استفاده شده در این تحقیق با توجه به قطعه‌ای که تکثیر می‌کنند انتخاب مناسبی برای شناسایی توسط ویروس‌ها هستند. تعیین توالی قطعه تکثیر شده با استفاده از آغازگر زیر گروه یک آسیایی توسط ویروس‌ها مشخص کرد که نمونه کوکب کوهی که در آزمون الایزا با آنتی‌بادی GBNV واکنش مثبت نشان داد به گونه CaCV تعلق دارد، این نتایج تایید کرد که برای ردیابی و شناسایی توسط ویروس‌ها نمی‌توان فقط به نتایج روش‌های سرولوژیکی اکتفا کرد. آغازگرهای دجنره‌ای که برای شناسایی توسط ویروس‌ها معرفی شده‌اند (Chen et al.

خوشه قرار گرفتند. این نتایج نشان داد که گروه‌بندی اعضای این زیر شاخه ارتباطی با موقعیت جغرافیایی و یا میزبان ندارد. این ویروس علاوه بر ایران از دو کشور لهستان و کنیا نیز گزارش شده است (Birithia *et al.* 2012, Hassani-Mehraban *et al.* 2005, Zarzyńska-Nowak *et al.* 2015). جدایه‌های کشور لهستان در زیر گروه TYRV-s قرار دارند. اگر چه در ابتدای معرفی استرین‌های گونه TYRV، با توجه به دامنه میزبانی و شناسایی اولیه بر روی دو محصول گوجه فرنگی و سویا دو نام TYRV-soybean(s) و TYRV-tomato(t) نامگذاری شدند (Hassani-Mehraban *et al.* 2007). اما گزارش اخیر استرین TYRV-s بر روی محصول گوجه فرنگی از کشور لهستان (Zarzyńska-Nowak *et al.* 2015) اساس این گروه‌بندی بر مبنای میزبان را به چالش کشانده است. بعد از اولین گزارش رسمی TYRV از ایران (Hassani-Mehraban *et al.* 2005)، ویروس یادشده از استان‌های مختلف کشور از شمال شرق تا جنوب غرب کشور گزارش شده‌است (Beikzadeh *et al.* 2011, Rasoulpour & Izadpanah 2007). پراکنش وسیع *Thrips tabaci* که به عنوان ناقل مؤثر این ویروس در کشور شناخته شده است (Rasoulpour & Izadpanah 2007) و افزایش تبادلات مواد گیاهی بین تولیدکنندگان محصولات زراعی و زینتی می‌تواند از عوامل مؤثر در پراکنش ویروس در ایران طی دهه اخیر باشند.

بررسی‌های فیلوژنتیکی در مورد پنج جدایه IYSV شناسایی شده در این پژوهش نشان داد که همگی در زیر گروه IYSV-Eurasia (Bag *et al.* 2015) قرار گرفتند. این جدایه‌ها با جدایه‌های شناسایی شده از استان خراسان نسبت به سایر جدایه‌ها از کشورهای دیگر، قرابت بیشتری نشان دادند. با این حال جدایه‌های ایران در سه خوشه

(2012, Chu *et al.* 2001) قدرت تفکیک بین زیر گروه‌های اصلی توسپوویروس‌ها را ندارند، چرا که بر اساس توالی قطعات M و L توسپوویروس‌ها طراحی شده‌اند. در حالیکه آغازگرهای عمومی اخیر که بر اساس زیر گروه‌های اصلی توسپوویروس‌ها طراحی شده‌اند قادر به تعیین موقعیت فیلوژنتیکی هر کدام از گونه‌ها است و با توجه به ناحیه طراحی آنها که ناحیه حفاظت‌شده مربوط به ژن رمز کننده نوکلئوکسپید می‌باشد، بعد از تعیین توالی، گونه ویروس را هم مشخص می‌کند (Hassani-Mehraban *et al.* 2016).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مبتنی بر توالی آمینو اسیدی نوکلئوکسپید جدایه‌های TYRV مورد بررسی در این پژوهش نشان داد که این جدایه‌ها رابطه نزدیکی با استرین TYRV-t (Hassani-Mehraban *et al.* 2005) داشتند. جدایه‌های قرار گرفته در زیر گروه TYRV-t علاوه بر گوجه فرنگی (Hassani-Mehraban *et al.* 2005) در گیاهان مختلف زینتی مانند آلسترومریا، سینر، آنمون، گازانیا و داودی نیز ردیابی شده‌اند (Beikzadeh *et al.* 2011, Hassani-Mehraban *et al.* 2007, Rasoulpour & Izadpanah 2007). جدایه‌هایی که در زیرگروه TYRV-s قرار دارند، تنها محدود به محصولات زراعی و یا صیفی-جات هستند و در ایران تا کنون تنها از استان تهران گزارش شده‌اند (Golnaraghi *et al.* 2013, Hassani-Mehraban *et al.* 2007, Pourrahim *et al.* 2012) (شکل ۵). جدایه توتون قرابت بیشتری به جدایه گوجه فرنگی از استان فارس (رس شمار DQ810195) نشان داد و با سایر جدایه‌های TYRV-t در یک گروه قرار نگرفت (شکل ۵). همچنین جدایه‌های مختلف استرین TYRV-t از استان‌های فارس، مرکزی، خراسان شمالی و خراسان رضوی که همگی در گیاهان زینتی مختلف ردیابی شده‌اند هم در یک

داده نشده است). از این گروه سرولوژیکی تا کنون در ایران تنها رس شمار مربوط به جدایه GBNV از استان سیستان و بلوچستان در بانک ژن ثبت شده است (رس شمار KM111720). بعلاوه، وقوع GBNV در ایران بر روی سویا بر اساس مطالعات سرولوژیکی گزارش شده است (Golnaraghi et al. 2002) که با توجه به نتایج این پژوهش صحت وقوع آن نیاز به تایید دارد.

نتایج این پژوهش نشان داد که توسپوویرس‌های شایع در منطقه مرکزی ایران عمدتاً متعلق به دو گروه فیلوژنتیکی یک آسیایی (گروه سرولوژیکی WSMoV) و یوروآسیایی (گروه سرولوژیکی IYSV) هستند. در این پژوهش برای اولین بار تره به عنوان میزبان جدید برای IYSV از ایران و گل لادن و توتون به عنوان میزبان‌های جدید TYRV معرفی شدند. همچنین وقوع CaCV در ایران که تا قبل از این، محدود به قاره اقیانوسیه و منطقه شرق آسیا بود، نشان داد که انتشار ویروس‌ها امروزه به دلایل افزایش تجارت بین المللی مواد گیاهی و تبادلات منابع گیاهی با سرعت بیشتری انجام می‌گیرد.

با توجه به نتایج این پژوهش و با در نظر گرفتن پیشرفت‌های اخیر در موضوع تعیین توالی و طبیعت چند قطعه‌ای ژنوم توسپوویروس‌ها، پیشنهاد می‌شود توالی سایر ژن‌های جدایه‌های شاخص این دو گونه هم تعیین شود. این موضوع کمک قابل توجهی به تعیین بروز پدیده بازآرایی (Reassortment) در میان گونه‌های نزدیک در یک گروه فیلوژنتیکی و همچنین تعیین دقیق روابط فیلوژنتیکی بین جدایه‌های مختلف خواهد کرد. همچنین با توجه به تایید حضور CaCV در ایران، شناسایی گونه ناقل تریپس این ویروس در ایران ضروری به نظر می‌رسد.

مختلف در این زیر گروه طبقه بندی شدند (شکل ۵). تنوع مشاهده شده در جدایه‌های ایرانی IYSV با وجود مشاهده تنوع کمتر بین جدایه‌های کشورهای مختلف (شکل ۵) خارج از محدوده منطقه خاورمیانه، فرضیه منشاء خاورمیانه‌ای این ویروس را که قبلاً ارایه شده بود (Bag et al. 2015) تقویت می‌کند.

سطح زیر کشت پیاز خوراکی در ایران در سال زراعی ۹۴-۹۳ حدود ۶۳ هزار هکتار برآورد شده است (Anonymous 2016). تریپس پیاز (*T. tabaci*) مهم‌ترین و خسارت‌زاترین آفت این محصول و ناقل IYSV می‌باشد (Alimousavi et al. 2007). نتایج این بررسی نشان داد که میزان شیوع IYSV بر روی محصول پیاز خوراکی در مزارع مورد بازدید گاهی به بیش از ۵۰ درصد هم می‌رسید. وقوع همزمان ویروس به همراه تراکم بالای جمعیت *T. tabaci* بر روی محصول پیاز سبب گسترش وسیع ویروس به مناطق مختلف خواهد شد. تا قبل از این پژوهش، IYSV فقط از استان خراسان رضوی گزارش شده بود. اما با توجه به آلودگی وسیع مزارع پیاز کشور به آفت *T. tabaci* که ناقل اصلی این ویروس می‌باشد (Bag et al. 2015) به نظر می‌رسد بیشتر مناطق پیازکاری کشور آلوده به IYSV هستند.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی بر اساس توالی آمینواسیدی نوکلئوکسپید جدایه CaCV از گیاه کوب کوهی نشان داد که این جدایه همراه با سایر جدایه‌های CaCV از استرالیا، ایالات متحده آمریکا، تایوان هندوستان و تایلند به گروه سرولوژیکی WSMoV تعلق دارند (شکل ۵). جدایه ایران در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بیشترین قرابت را با جدایه CaCV از ایالات متحده نشان داد (داده‌ها نشان

منابع

- Adams M. J., Lefkowitz E. J., King A. M. Q., Harrach B. z., Harrison R. L., Knowles N. J., Kropinski A. M., Krupovic M., Kuhn J. H., Mushegian A. R., Nibert M., Sabanadzovic S., Sanfac, on H. l. n., Siddell S. G., Simmonds P., Varsani A., Zerbini F. M., Gorbalenya A. E. and Daviso A. J. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). Archives of Virology 162:2505-2538.
- Alimousavi S. A., Hassandokht M. R. and Moharrampour S. 2007. Evaluation of Iranian onion germplasms for resistance to thrips. International Journal of Agriculture and Biology 9:897-900.
- Anonymous 2016. <http://amar.maj.ir/Portal/Home/Default.aspx?CategoryID=117564e0-507c-4565-9659-fbabb4acb9b>.
- Bag S., Schwartz H. F., Cramer C. S., Havey M. J. and Pappu H. R. 2015. *Iris yellow spot virus* (Tospovirus: Bunyaviridae): from obscurity to research priority. Molecular Plant Pathology 16:224-237.
- Bald-Blume N., Bergervoet J. H. and Maiss E. 2017. Development of a molecular assay for the general detection of tospoviruses and the distinction between tospoviral species. Archives of Virology 162:1519-1528.
- Bananej K., Shahraeen N., Ahoonmanesh A., Lesemann D. and Shahriary D. 1998. Identification of tomato spotted wilt virus from tomato fields in Varamin area. Iranian Journal of Plant Pathology 32:30-36.
- Beikzadeh N., Jafarpour B., Rouhani H., Peters D. and Hassani-Mehraban A. 2012. Molecular diagnosis of *Iris yellow spot virus* (IYSV) on onion in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology 14:1149-1158.
- Beikzadeh N., Jafarpour B., Rouhani H., Peters D. and Hassani Mehraban A. 2011. Molecular Diagnosis of *Tomato yellow ring virus* (TYRV) on Alstroemeria in Khorasan Razavi Province, Iran. Journal of Plant Protection 25:314-324.
- Birithia R., Subramanian S., Villinger J., Muthomi J. W., Narla R. D. and Pappu H. R. 2012. First Report of *Tomato yellow ring virus* (Tospovirus, Bunyaviridae) Infecting Tomato in Kenya. Plant Disease 96:138.
- Chen T. C., Li J. T., Lin Y. P., Yeh Y. C., Kang Y. C., Huang L. H. and Yeh S. D. 2012. Genomic characterization of *Calla lily chlorotic spot virus* and design of broad-spectrum primers for detection of tospoviruses. Plant Pathology 61:183-194.
- Chen Y.-H., Dong J., Chien W.-C., Zheng K., Wu K., Yeh S.-D., Sun J.-H., Wang Y.-C. and Chen T.-C. 2016. Monoclonal antibodies for differentiating infections of three serological-related tospoviruses prevalent in Southwestern China. Virology journal <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0525-3>.
- Chiemsombat P., Gajanandana O., Warin N., Hongprayoon R., Bhunchoth A. and Pongsapich P. 2008. Biological and molecular characterization of tospoviruses in Thailand. Archives of Virology 153:571-577.
- Chu F.-H., Chao C.-H., Chung M.-H., Chen C.-C. and Yeh S.-D. 2001. Completion of the genome sequence of *Watermelon silver mottle virus* and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. Phytopathology 91:361-368.
- Clark M. F. and Adams A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34:475-483.
- Gent D. H., du Toit L. J., Fichtner S. F., Mohan S. K., Pappu H. R. and Schwartz H. F. 2006. *Iris yellow spot virus*: an emerging threat to onion bulb and seed production. Plant Disease 90:1468-1480.
- Ghotbi T., Shahraeen N. and Winter S. 2005. Occurrence of tospoviruses in ornamental and weed species in Markazi and Tehran provinces in Iran. Plant Disease 89:425-429.
- Golnaraghi A., Pourrahim R., Shahraeen N. and Farzadfar S. 2002. First report of *Groundnut bud necrosis virus* in Iran. Plant Disease 86:561.
- Golnaraghi A. R., Hamed A., Yazdani-Khameneh S. and Khosroshahi T. S. 2013. First report of a natural occurrence of *Tomato yellow fruit ring virus* on pepper in Iran. Plant Disease 97:1259.
- Golnaraghi A. R., Shahraeen N., Pourrahim R., Ghorbani S. and Farzadfar S. 2001. First report of *Tomato spotted wilt virus* on soybean in Iran. Plant Disease 85:1290.
- Hassani-Mehraban A., Saaijer J., Peters D., Goldbach R. and Kormelink R. 2005. A new tomato-infecting tospovirus from Iran. Phytopathology 95:852-858.
- Hassani-Mehraban A., Saaijer J., Peters D., Goldbach R. and Kormelink R. 2007. Molecular and biological

- comparison of two *Tomato yellow ring virus* (TYRV) isolates: challenging the *Tospovirus* species concept. Archives of Virology 152:85-96.
- Hassani-Mehraban A., Westenberg M., Verhoeven J., van de Vossen B., Kormelink R. and Roenhorst J. 2016. Generic RT-PCR tests for detection and identification of tospoviruses. Journal of Virological Methods 233:89-96.
- Kunkalika S. R., Sudarsana P., Rajagopalan P., Zehr U. B. and Ravi K. S. 2010. Biological and molecular characterization of *Capsicum chlorosis virus* infecting chilli and tomato in India. Archives of Virology 155:1047-1057.
- Masoomi-Aladizgeh F., Jabbari L., Khayam Nekouei R. and Aalami A. 2016. A simple and rapid system for DNA and RNA isolation from diverse plants using handmade kit. <http://dx.doi.org/10.1038/protex.2016.015>.
- Moini A. A. and Izadpanah K. 2001. Report of impatiens necrotic spot virus infection of tobacco in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 37:93.
- Oliver J. and Whitfield A. 2016. The Genus *Tospovirus*. Annual Review of Virology 3:101-124.
- Pappu H., Jones R. and Jain R. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. Virus Research 141:219-236.
- Plyusnin A., Beaty B., Elliott R., Goldbach R., Kormelink R., Lundkvist A., Schmaljohn C. and Tesh R. 2012. Family Bunyaviridae, pp. 725-741. In: King, A. M., Adams, M. J., Lefkowitz, E. J. and Carstens, E. B. (Eds). Virus Taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego, CA
- Pourrahim R., Farzadfar S. H., Moini A. A., Shahraeen N. and Ahoonmanesh A. 2001. First report of *Tomato spotted wilt virus* on potatoes in Iran. Plant Disease 85:442-442.
- Pourrahim R., Golnaraghi A. R., Farzadfar S. H. and Ohshima K. 2012. Partial biological and molecular characterization of *Tomato yellow fruit ring virus* isolates from potato. The Plant Pathology Journal 28:390-400.
- Pozzer L., Bezerra I. C., Kormelink R., Prins M., Peters D., Resende R. d. O. and De Avila A. C. 1999. Characterization of a tospovirus isolate of iris yellow spot virus associated with a disease in onion fields in Brazil. Plant Disease 83:345-350.
- Raikhya G., Hallan V., Kulshrestha S., Lal Sharma M., Ram R. and Zaidi A. 2003. Molecular characterization of a *Carnation etched ring virus* isolate from India. Acta Virologica 47:105-112.
- Rasoulpour R. and Izadpanah K. 2007. Characterisation of cineraria strain of *Tomato yellow ring virus* from Iran. Australasian Plant Pathology 36:286-294.
- Riley D. G., Joseph S. V., Srinivasan R. and Diffie S. 2011. Thrips vectors of tospoviruses. Journal of Integrated Pest Management 2:11-110.
- Rotenberg D., Jacobson A. L., Schneweis D. J. and Whitfield A. E. 2015. Thrips transmission of tospoviruses. Current Opinion in Virology 15:80-89.
- Rybicki E. P. 2015. A Top ten list for economically important plant viruses. Archives of Virology 160:17-20.
- Shahraeen N., Ghotbi T. and Mehraban A. H. 2002. Occurrence of *Impatiens necrotic spot virus* in ornamentals in Mahallat and Tehran provinces in Iran. Plant Disease 86:694-694.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30:2725-2729.
- Zarzyńska-Nowak A., Rymelska N., Borodynko N. and Hasiów-Jaroszewska B. 2015. The occurrence of *Tomato yellow ring virus* on tomato in Poland. Plant Disease 100:234.