پراکنش، مشخصات بیولوژیکی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک گوجه فرنگی (*Tomato mosaic virus*) *

DISTRIBUTION, BIOLOGICAL PROPERTIES and GENETIC DIVERSITY OF IRANIAN *Tomato mosaic virus* ISOLATES

سلمی علوی و حسین معصومی[۱**]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲۴)

چکیده

ویروس موزائیک گوجه فرنگی (ToMV) یکی از ویروس‌های مهم گیاه گوجه فرنگی بوده و دارای دامنه میزبانی وسیعی در میان گیاهان زراعی و غیر زراعی است. به منظور تعیین پراکنش، دامنه میزبانی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های این ویروس در مناطقی از ایران طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۷ بررسی‌هایی انجام شد. نمونه‌های گیاهی بر اساس علائم از مزارع گوجه فرنگی، فلفل و علف‌های هرز آنها واقع در استان‌های همدان، یزد، کرمان و هرمزگان جمع‌آوری گردیدند. به منظور تأیید آلودگی نمونه‌ها از آزمون‌های الایزای غیر مستقیم استفاده شد. در مجموع از ۴۳۴ نمونه، تعداد ۲۷ نمونه از گیاهان شامل گوجه فرنگی، فلفل، لوبیا و علف‌های هرز سلمه تره و تاجریزی به این ویروس آلوده بودند. به منظور مطالعات مولکولی و تعیین دامنه میزبانی، تعداد ده جدایه بر اساس موقعیت جغرافیائی و میزبان انتخاب و ژن پروتئین پوششی آنها تکثیر و همسانه‌سازی شد و درخت فیلوژنتیکی ترسیم گردید. بر مبنای این درخت جدایه‌های ToMV به سه گروه I ، II و III تقسیم گردیدند که جدایه‌های ایرانی این ویروس در گروه I، از گیاهان فلفل، تاجریزی و سلمه تره جدا شدند و بقیه جدایه‌ها در گروهIII قرار گرفتند. کمترین میزان تشابه در بین جدایه‌های ایرانی، مربوط به جدایه Jir.Che.4(از منطقه جیرفت استان کرمان و از گیاه سلمه تره) در گروه I و چهار جدایه دیگر(از گیاه گوجه فرنگی) از گروه III به میزان ۸۴/۴٪ از مناطق کرمان و همدان می‌باشد. در این بررسی هم چنین لوبیا به عنوان میزبان طبیعی این ویروس در ایران برای اولین بار معرفی می‌گردد و نتایج حاصل از دامنه میزبانی بر روی گیاهان آزمون بیانگر آن است که تفاوت‌هائی در بین جدایه‌های ایرانیToMV از نظر واکنش برروی ارقام مختلف توتون وجود دارد. محاسبه تنوع ژنتیکی (π) جمعیت‌های جغرافیائی دنیا نشان از آن دارد که بیشترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به جمعیت جدایه‌های ایرانی و برزیلی بوده و این میزان در بین جدایه‌های ایرانی نزدیک به دو برابر جدایه‌های گزارش شده از سایر نقاط دنیاست.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزائیک گوجه فرنگی، دامنه میزبانی، درخت فیلوژنتیکی، تنوع ژنتیکی

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی masoomi@mail.uk.ac.ir

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

مقدمه

ژنوم ویروس موزائیک گوجه فرنگی (ToMV) از یک قطعه ار ان ای تک لا به اندازه kb ٦/٦ – ٦/٣ تشکیل شده است که چهار نوع پروتئین مختلف را کد می‌نماید. پروتئین‌های مذکور شامل یک پروتئین به جرم مولکولی ۱۳۰ و دیگری ۱۸۰ کیلو دالتون هستند که توسط آر ان ای ژنومی کد می‌شوند. سومین پروتئین به جرم مولکولی ۳۰ کیلو دالتون است که پروتئین حرکتی (Movment protein, MP) و چهارمین پروتئین به جرم مولکولی ۱۸ کیلو دالتون می‌باشدکه همان پروتئین پوششی(Coat protein, CP) بوده و توسط آر ان ای زیرژنومی کد می‌شود (Ishikava & Okada 2004). پروتئین‌های ۱۳۰ و ۱۸۰ کیلو دالتونی جهت ترانویسی و همانند سازی ویروس مورد نیاز هستند. ToMV در تمامی مناطق دنیا که گوجه فرنگی کشت می‌شود، کم وبیش وجود دارد و باعث کاهش کمی وکیفی محصول می‌گردد (Hollings & Huottinga 1976). امروزه این ویروس دربسیاری از کشورها، گسترش یافته و در مناطق مختلف آمریکا، اروپا (از جمله ایتالیا و اسپانیا)، کشورهای آفریقایی(تانزانیا، زامبیا، اتیوپی) و آسیایی مانند چین، روسیه، هند و نیز ایران منجر به آلودگی‌های وسیع در مزارع گوجه فرنگی می‌گردد. هم چنین دامنه میزبانی این ویروس مرتب در حال افزایش است و از نقاط مختلف دنیا میزبان‌های جدیدی از خانواده‌های مختلف گیاهی آلوده به این ویروس گزارش شده‌اند (Pategas 1989, Castello *et al*. 1992, Jaccobi *et al*. 1998, Kamenova *et al*. 2004, Huang *et al*. 2004, Massumi *et al*. 2009).

به‌علاوه اینکه آلودگی توسط این ویروس در درختان جنگلی از قبیل صنوبر قرمز(*Picea rubens* Sarg.) نیز به اثبات رسیده است (Jacobi *et al*. 1998). بررسی‌های دیگر بیانگر آن است که فلفل و علف هرز سلمه تره سفید (*Chenopodium murale* L.) از جمله میزبان‌های ثانویه این ویروس می‌باشند (Sepulveda *et al*. 2005, Pategas 1989,). اولین گزارش از آلودگی گیاهان زینتی به ویروس موزائیک گوجه فرنگی مربوط به گیاه لیسیانتوس (*Eustoma rusellianum*) می‌باشد (Hartman & Vaillancourt 2004). هم چنین، ToMV از گیاه زینتی یاسمن (Burm.f.)Andrews *Jasminum multiflorum*) در فلوریدای آمریکا جداسازی گردیده است(Kamenova *et al*. 2004) . ToMV در گیاه زینتی دیگری با نام (*Hibiscus rosa.sinensis* Linn.) از خانواده *Malvaceae* نیزآلودگی ایجاد می‌کند (Huang *et al*. 2004).

ToMV به دلیل دارا بودن سویه‌های متعدد، علایم مختلفی روی گیاه گوجه فرنگی ایجاد می‌کند. این علایم با توجه به گیاه، ، شرایط محیطی و زمان آلودگی می‌تواند به صورت موزائیک، کم رشدی، نخی شکل شدن برگ‌ها، بد شکلی یا تغییر رنگ میوه‌ها ویا کاهش تعداد و اندازه میوه‌ها ظاهر شود (Cerkauskas 2005). ضمناً گاهی اوقات آلودگی‌های توام این ویروس با ویروس موزائیک خیار (CMV) در میوه‌های فلفل و گوجه فرنگی‌های آلوده، منجر به موزائیک و زردی می‌گردد. در برخی از مزارع گوجه فرنگی شهرستان‌های جیرفت و میناب آلودگی مخلوط نسبت به این دو ویروس گزارش شده است (Massumi *et al*. 2009).

در ایران این ویروس در سال ۱۳٦۴ توسط ایزد پناه گزارش گردید (Izadpanah 1983). حیاتی ۱۲ رقم گوجه فرنگی را جهت ارزیابی مقاومت و یا حساسیت آنها به بیماری‌های ویروسی گوجه فرنگی از جمله ToMV در شرایط گلخانه و مزرعه مورد ارزیابی قرار داده

است(Hayati *et al*. 1991). آهون منش و همکاران، مزارع گوجه فرنگی در مناطق مختلف کشور از جمله اصفهان، نجف آباد، شهرکرد، بندر عباس، میناب، جیرفت، کهنوج، اهواز، خوی، مرند و گرگان را جهت شناسایی علایم و برآورد خسارت وارده در اثر آلودگی به ویروس موزائیک گوجه فرنگی مورد بررسی قرار دادند (Ahoonmanesh *et al*. 1992). هم‌چنین در بررسی ویروس‌های گوجه فرنگی در منطقه جنوب شرق ایران مشخص شد که میزان آلودگی این ویروس در مزارع این مناطق به میزان ۸/ ۴ درصد است (Massumi *et al*. 2009).

با توجه به بررسی‌های محدود انجام شده در مورد ویژگی‌های مولکولی جدایه‌های ویروس موزائیک گوجه فرنگی در ایران (رس شمارهای HQ593624 تا HQ593627 موجود در بانک ژن)، هدف اصلی این تحقیق، مطالعه ژن پروتئین پوششی و تنوع ژنتیکی تعدادی از جدایه‌های ایرانی ویروس و مقایسه آنها با جدایه‌های گزارش شده در دنیا بود. ضمناً در تحقیق حاضر پراکنش ویروس در برخی از استان‌های ایران و دامنه میزبانی جدایه‌های ایرانی این ویروس روی گیاهان آزمون و میزبان‌های ثانویه آن نیز بررسی شد.

روش بررسی

الف) نمونه‌برداری

به منظور بررسی پراکندگی، تعیین علایم، بررسی میزبان‌های ثانویه و شناسایی جدایه‌های مختلف ToMV، طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷ از مزارع گوجه فرنگی و فلفل استان‌های همدان، کرمان و هرمزگان و یزد نمونه‌برداری به عمل آمد. ضمناً از علف‌های هرز این مزارع نیز نمونه‌برداری شد. تعداد ۴۳۴ نمونه بر مبنای علایمی مانند موزائیک، پیچیدگی، برجستگی و بدشکلی برگ‌ها و میوه‌ها جمع‌آوری گردیدند و برای انجام آزمایش‌های سرولوژیک و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند.

ب) آزمون سرولوژیکی

به منظور شناسایی ویروس ToMV، آزمون سرولوژیکی الایزای غیرمستقیم (Indirect-ELISA) بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آنتی سرم چند همسانه‌ای ToMV تهیه شده از انگلستان (IACR-Rothamsted, Harpenden, Herts, UK) و براساس روش کلارک و آدامز (Clark & Adams. 1977) انجام شد. نتایج با استفاده از دستگاه الایزا خوان مدل EL800(Biotek Instrument) در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) با استفاده از فرمول $\bar{x}$ + 3 SD آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. در این فرمول $\bar{x}$ میانگین جذب و SD انحراف معیار استاندارد چاهک‌ها جهت برگ سالم می‌باشد. بر این اساس نمونه‌های آلوده مشخص و درصد آلودگی مناطق مختلف تعیین شد(جدول ۱).

پ) تعیین دامنه میزبانی ویروس

از بین نمونه‌های آلوده به ویروس بر اساس میزبان و موقعیت جغرافیائی، تعداد ۱۰ نمونه مثبت در آزمون الیزا انتخاب و به منظور خالص سازی بیولوژیکی، بر روی گیاه *Datura metel L.* مایه‌زنی گردیدند. علائم ایجاد شده بر روی این گیاه آزمون ۴-۳ روز پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های موضعی مشاهده شد. سپس تک لکه‌های موضعی

جدول ۱. تعداد نمونه، محل نمونه برداری گیاهان مختلف و تعداد نمونه های آلوده به ToMV در مزارع گوجه فرنگی و فلفل در استان‌های کرمان، هرمزگان، یزد، و همدان در طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۷.

Table 1. Location, number of collected samples, and number of ToMV-infected samples in tomato and pepper fields of Kerman, Hormozgan, Yazd and Hamedan provinces from 2006 to 2008 based on ELISA test

استان/ناحیه Region/Province	گیاه میزبان Host plant	تعداد نمونه بررسی شده Number tested	تعداد نمونه آلوده Number infected
Kerman/Kerman	Tomato(گوجه فرنگی)	67	7
Kerman/Kerman	Pepper(فلفل)	45	6
Kerman/Kerman	Kidney bean(لوبیا)	7	1
Kerman/ Kerman	Black Nightshade (تاج ریزی)	6	0
Jirfot/Kerman	Tomato(گوجه فرنگی)	67	2
Jirfot/Kerman	Black Nightshade (تاج ریزی)	13	1
Kerman/Jirfot	*C.amaranticolor*(سلمه تره)	10	1
Kerman/Kahnuj	Tomato(گوجه فرنگی)	40	0
Kahnuj/Kerman	Black Nightshade (تاج ریزی)	5	0
Hormozgan/Minabe	Tomato(گوجه فرنگی)	32	2
Minabe/Hormozgan	Eggplant(بادمجان)	5	0
Hormozgan-Minabe	Pepper(فلفل)	6	0
Rudan/Hormozgan	Tomato(گوجه فرنگی)	35	2
Rudan/Hormozgan	Eggplant(بادمجان)	6	0
Rudan/Hormozgan	Pepper(فلفل)	5	0
Yazd/Yazd	Tomato(گوجه فرنگی)	40	0
Asdabad/Hamedan	Tomato(گوجه فرنگی)	45	5
Total		434	27

مربوط به هر نمونه انتخاب و جهت تکثیر بر روی میزبان‌های تکثیری شامل *Nicotiana debneyi* و *N. tabacum* L.cv. Samsun NN مایه‌زنی گردید. جدایه‌های مذکور به منظور تعیین دامنه میزبانی بر روی گیاهان آزمون متعلق به خانواده‌های Leguminosae، Chenopodiaceae، Cucurbitaceae، Amaranthaceae و Solanaceae مایه‌زنی گردیدند. برای این منظور از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH= ۷/۴ و یک درصد (نسبت وزن به حجم) پودرکربوراندوم با مش ۶۰۰ استفاده گردید. سپس گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط گلخانه در دمای ۲۵-۲۰°C و رطوبت نسبی ۷۰-۶۰ درصد و نور مناسب نگهداری شدند. بعد از مشاهده علائم آلودگی ویروسی کلیه بوته‌های مایه‌زنی شده توسط آزمون الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ت) استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA از نمونه‌های آلوده با استفاده از کیت High Pure Viral Nucleic Acids Kit (ساخت شرکت Roche کشور آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. برای ساخت دی. ان. ای مکمل (cDNA)، ۲ میکرولیتر آر ان ای کل با ۲ میکرولیتر آغازگر معکوس(10μM) مخلوط و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به لوله‌ها اضافه و پس از یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد. پس از آن به این مخلوط۴/۵ میکرولیتر از بافر RT (5x)، دو میکرولیتر مخلوط از داکسی ریبونوکلئوتیدتری فسفات ۱۰ میکرومولار (dNTPmix, 10μM)، یک میکرولیتر RNase inhibitor (10U/μl) و۰/۷۵ میکرولیتر از آنزیم MMLV(200U/μl) اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲°C قرار داده شدند. توقف واکنش با قرار دادن مخلوط در دمای ۷۰°C و به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

ث) واکنش زنجیره‌ای پلی مراز(PCR)

با استفاده از آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی طراحی شده با نرم‌افزار Fast-PCR (Kalendal, R. 2005) واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به منظور تکثیر قطعه پروتئین پوششی ژنوم(CP) انجام شد. این آغازگرها بر مبنای جدایه گزارش شده از کشور قزاقستان رس شمار AJ243571 طراحی گردیدند. موقعیت آغازگر ToMV-F (5´AGATGAAGCCGAGACGTCGGTC3') بر روی ژنوم در محدوده نوکلئوتیدهای ۵۶۷۸-۵۶۵۶ و آغازگر ToMV-R (5'ACCCTTCGATTTAAGTGGAGGGA3') ۶۲۷۸-۶۲۵۵ می‌باشد. واکنش در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر دی. ان. ای مکمل (cDNA)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (غلظت ۱۰ میکرومولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x) ، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲/۵ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط dNTPs (غلظت ۱۰ میکرومولار) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم*Taq* DNA polymerase (5U/μl) تهیه گردید. واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴°C، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، واکنش اتصال۳۰ ثانیه در دمای ۵۸°C و ساخت ۶۰ ثانیه در ۷۲°C و یک مرحله نهائی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C بود . جهت انجام الکتروفورز از ژل آگاروز ۱/۵ درصد و بافر 1X TBE (Tris Boric Acid EDTA) استفاده گردید.

ج) همسانه‌سازی و تجزیه و تحلیل داده‌ها

از ۱۰ جدایه انتخاب شده بر اساس میزبان و موقعیت جغرافیائی (جدول ۲) ژن پروتئین پوششی آنها با استفاده از روش PCR تکثیر و در ناقل pTZ57R/T InsT/A (clone PCR Product Cloning Kit) از شرکت Fermentas قرار داده شد. عمل انتقال بااستفاده از سلول‌های مستعد *Escherichia coli* نژاد DH5a و پلاسمید نوترکیب حاوی ژن CP صورت گرفت. بعد از کشت باکتری روی محیط (Luria–Bertani) LB، پرگنه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب انتخاب و با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation Ki(Roche, High Pure Plasmid Isolation Kit Germany) استخراج و به منظور دقت در همسانه سازی، عمل هضم آنزیمی (digestion) صورت گرفت. به منظور تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی ToMV، پلاسمیدهای نوترکیب آنها جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن

جدول ۲. مبدا و میزبان جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک گوجه فرنگی بررسی شده

Table 2. Origin and host of ToMV isolates used in this study

استان/ناحیه Region/Province	جدایه ها Isolates	گیاه میزبان Host plant	رس شمار بانک ژن Accession number
Jirfot/Kerman	Jir-Che-4[a]	*C.amaranticolor* (سلمه تره)	JX135609
Hamedan/Asdabad	Ham-Tom-19	Tomato (گوجه فرنگی)	JX112025
Hamedan/Asdabad	Ham-Tom-6	Tomato (گوجه فرنگی)	JX121576
Hamedan/Asdabad	Ham-Tom-9	Tomato (گوجه فرنگی)	JX112024
Kerman/Kerman	Ker-Pha-2	Kidney bean (لوبیا)	JX121570
Kerman/Kerman	Ker-Dat-24	Black Nightshade (تاج ریزی)	JX121571
Kerman/Kerman	Ker-Pep-18	Pepper (فلفل)	JX121572
Kerman/Kerman	Ker-Pep-38	Pepper (فلفل)	JX121573
Kerman/Kerman	Ker-Pep-3	Pepper (فلفل)	JX121574
Kerman/Kerman	Ker-Tom-41	Tomato (گوجه فرنگی)	JX121575

[a] مبنای نام‌گذاری جدایه‌های ایرانی به ترتیب براساس استان یا منطقه نمونه‌برداری شده، میزبان نمونه‌برداری شده و شماره می‌باشد.

(کشور کره جنوبی) ارسال و تعیین ترادف شدند. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی، وضعیت ترادف‌ها با کمک نرم‌افزاز بلاست مورد بررسی قرار گرفت. این توالی‌ها با ۱۹ ترادف انتخاب شده در بانک ژن (جدول ۳) مقایسه شدند. همردیف سازی چندگانه (multiple alignment) توسط برنامه Clustal x (Thompson *et al*. 1997) انجام و سپس توسط نرم افزار MEGA 3 (Kumar *et al.* 2004) با روش UPMEGA دندروگرام مربوط رسم گردید. هم‌چنین ترجمه ترادف ها از اسیدنوکلئیک به پروتئین و تعیین درصد تشابه بین ترادف‌ها توسط نرم‌افزار DNAMAN (Lynnon, Biosoft, , Canada) صورت گرفت.

جهت تخمین فاصله ژنتیکی ترادف‌ها و تعیین میزان تنوع ژنتیکی بین و درون گروه‌های فیلوژنتیکی و هم‌چنین جمعیت‌های ToMV از ایران و دنیا که جداگانه همردیف‌سازی شده بودند به روش دو پارامتری کیمورا (Kimura 1980) از نرم افزار MEGA 3 و برای انتخاب طبیعی و تعیین نسبت جانشینی نامترادف (non synonymous substitution) به جانشینی مترادف (synonymous substitution) از نرم‌افزار DnaSP (Rozas and Rozas,1999) استفاده شد.

نتیجه

الف) شناسایی وتعیین پراکنش ToMV

از بین ۱۲۵ نمونه گیاهی گوجه فرنگی، لوبیا، فلفل و علف‌های هرز این مزارع که طی سه مرحله جمع‌آوری گردید، تعداد ۱۴ نمونه (۷ نمونه گوجه فرنگی، ۶ نمونه فلفل و یک نمونه لوبیا) به ToMV آلوده بودند. در

حالی‌که این ویروس در منطقه جیرفت گسترش بسیار محدودی دارد و از بین تعداد ۹۰ نمونه جمع‌آوری شده از مزارع گوجه فرنگی و فلفل در طی سه مرحله نمونه‌برداری، تنها ۳ نمونه گوجه فرنگی و یک نمونه سلمه تره (*Chenopodium amaranticolour*) آلوده بودند(جداول ۱). در مناطق میناب و رودان از توابع استان هرمزگان (از مناطق مهم کشت محصول گوجه فرنگی، فلفل و بادمجان)، از میان ۷۰ نمونه جمع‌آوری شده در طی دو مرحله نمونه‌برداری، تنها ۴ نمونه گوجه فرنگی به ویروس ToMV آلوده بودند و هیچ کدام از نمونه‌های فلفل و بادمجان دارای علایم، به ویروس ToMV آلودگی نشان ندادند. هم چنین ویروس موزائیک گوجه فرنگی در استان همدان گسترش نسبتاً محدودی داشت. به گونه‌ای که از میان ۴۶ نمونه جمع آوری شده طی یک مرحله نمونه‌برداری، ۵ نمونه به ToMV آلوده بودند. هیچ کدام از نمونه‌های گوجه فرنگی جمع‌آوری شده از استان یزد به ToMV آلودگی نشان ندادند (جدول ۱).

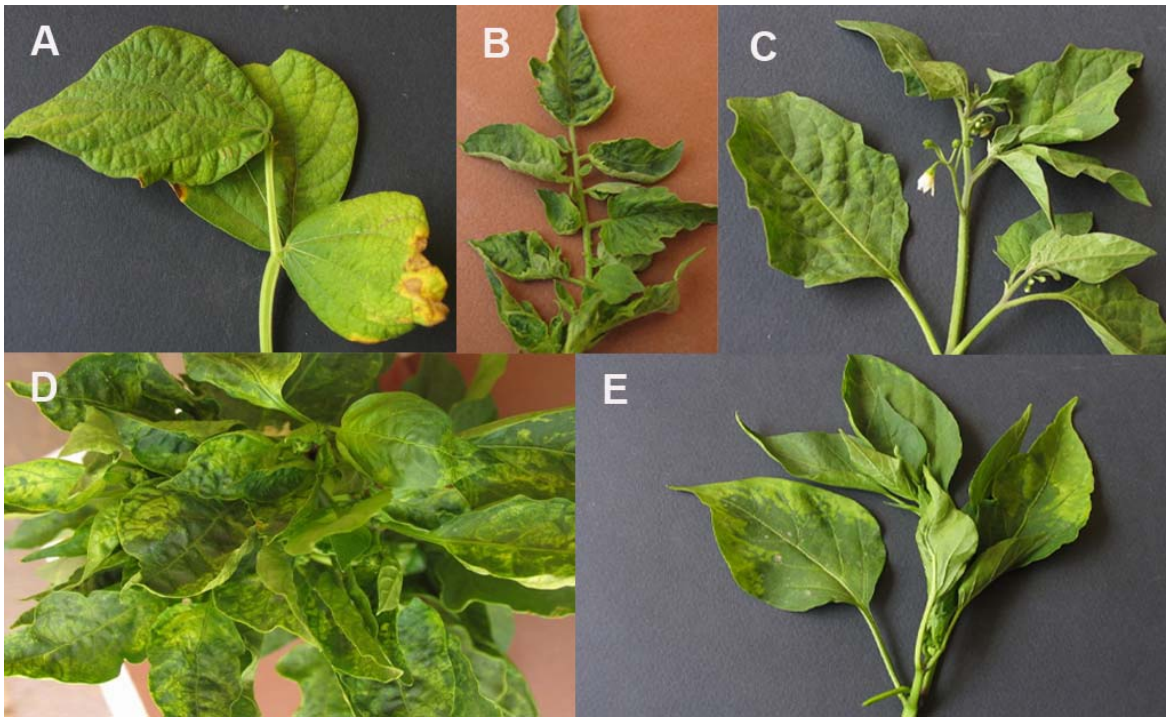
از نظر ایجاد علائم آلودگی به ویروس ToMV، درگیاه لوبیا علایم آلودگی به صورت کلروز و تاولی شدن سطح برگ‌ها می‌باشد(شکل ۱-A). در گیاه گوجه فرنگی علائم به صورت موزائیک، تاولی و نخی شکل شدن برگ‌ها مشاهده گردید (شکل ۱-B). در گیاه سلمه تره (*Chenopodium amaranticolour*) هیچ‌گونه علایم ویروسی مشاهده نگردید، در حالی‌که علایم موجدار شدن و موزائیک شدید بر روی گیاه تاجریزی (*Solanum nigrum*) (که دارای آلودگی توام با CMV می‌باشد) مشاهده شد (شکل ۱-C). علایم آلودگی در گیاه فلفل به صورت پیچیدگی، تاولی شدن شدید، نواری شدن رگبرگ‌ها و موزائیک مشاهده گردید(شکل ۱-D)، هم چنین در مواردی بر روی این گیاه علائم به صورت زردی و ابلقی در برگ‌ها دیده شد (شکل ۱-E).

ب) تعیین دامنه میزبانی ToMV

به منظور مطالعات بیولوژیکی و مولکولی، جدایه‌های ToMV در توتون رقم های *Nicotinia debneyii* و *N. tabacum* L.cv. Samsun NN تکثیرشدند. جهت بررسی دامنه میزبانی ویروس، از گیاهان آزمون متعلق به چهار خانواده: Cucurbitaceae, Chenopodiaceae, Leguminosae و Solanaceae استفاده گردید. نتایج این بررسی در جدول ۳ منعکس شده است. جدایه‌های ایرانی ToMV فقط قادر به آلودگی درگیاهان خانواده Solanaceae و Chenopodiaceae به استثنای گونه‌های *N. clevelandii* و *N. tabacum* L.cv. white burley می‌باشند. زیرا بر روی این دو گونه ازتوتون هیچ‌گونه علایمی نسبت به این ویروس مشاهده نگردید. هم‌چنین گیاه لوبیا(*Phaseolus vulgaris* cv. Red kidney) از خانواده Leguminoseae نیز علایم آلودگی به این ویروس را نشان داد. علایم آلودگی بهToMV بر روی توتون‌های رقم *Nicotiania debneyi* وNN *N. tabacum* L.cv. Samsun به صورت تاولی، موزائیک، پیچیدگی، روشن شدن رگبرگ‌ها، بدشکلی و سرخسی شدن برگ‌ها (Fern Leaf) بود (شکل ۲). هم‌چنین بر روی گیاهان آزمون از خانواده‌های کدوئیان هیچ‌گونه علائم ویروسی مشاهده نگردید و آزمون الایزا ی آنها نیز منفی بود.

پ) استخراج آر.ان.ای کل و تکثیر ژن پروتئین پوششی

الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای ToMV-R و ToMV-F و cDNA در گیاهان آلوده به ویروس موزائیک گوجه فرنگی، منجر به تشکیل قطعه‌ای در حدود ٦٢١ جفت باز درون ژل آگاروز یک درصد



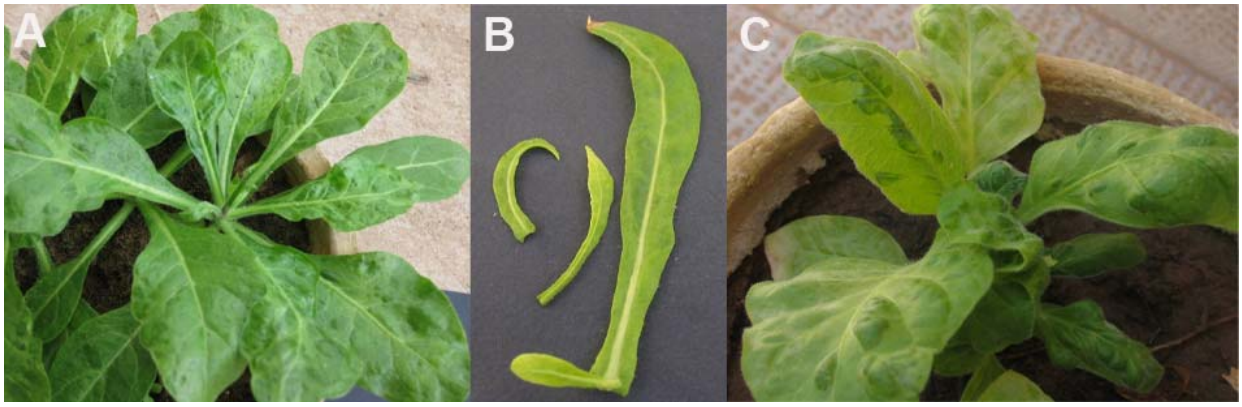
شکل ۱. علائم گیاهان آلوده به ویروس موزائیک گوجه فرنگی (ToMV) جمع آوری شده از منطقه سرآسیاب استان کرمان

A : علایم کلروز و تاولی در سطح برگ های لوبیا آلوده به ویروس موزائیک گوجه فرنگی، B : علایم موزائیک و تاولی برگ ها در گوجه فرنگی آلوده به ویروس موزائیک گوجه فرنگی، C : علایم موجدار شدن و موزائیک سطح برگ ها در علف هرز تاج ریزی با آلودگی توام به ویروس موزائیک گوجه فرنگی و ویروس موزائیک خیار، D: علایم پیچیدگی، تاولی شدن شدید، نواری شدن رگبرگ‌ها و موزائیک در برگ های فلفل آلوده به ویروس موزائیک گوجه فرنگی، E : علایم زردی و ابلقی در برگ های فلفل آلوده به ویروس موزائیک گوجه فرنگی.

Fig. 1. Symptoms on ToMV infected plants collected from Sarasyabe region in Kerman province. A: Chlorosis and blistring symptoms in ToMV infected bean leaves, 1B: Mosaic and blistering symptoms in ToMV infected tomato leaves, C: Crinkling and mosaic symptoms in mixed infection by ToMV and CMV on black nightshade, D: Leaf curl, blistering, vein banding and mosaic symptoms of ToMV infected pepper leaves, E: Yellowing and leaf variegation symptoms of ToMV infected pepper leaves

شد. در شرایط مشابه این قطعه در نمونه‌های سالم توتون تکثیر نشد.

محصولات به‌دست آمده ازPCR همسانه‌سازی گردید و پس از آن پرگنه‌های سفید رنگ توسط همین آزمون، برای شناسائی پلاسمیدهای نوترکیب مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج پلاسمیدهای نوترکیب، هضم آنزیمی بر روی آنها با استفاده از آنزیم‌های *EcoR*I و *Pst*I نیز منجر به تشکیل قطعه‌هایی با اندازه ۲۸۵۰ و ۶۲۱ جفت باز به ترتیب مربوط به پلاسمید و قطعه CP گردید. تعیین ترادف محصولات همسانه‌سازی شده پس از حذف نوکلئوتیدهای اضافی نشان داد که ترادف‌های ژنCP جدایه‌های ایرانی این ویروس به طول ۴۸۰ جفت باز و حاوی کدون‌های شروع و خاتمه ATG وTAA می‌باشند. ضمناً قسمت تعیین ترادف شده متناظر با موقعیت ۵۷۰۳ تا ۶۱۸۲ از ترادف کامل جدایه قزاقستانی K1 (رس شمار AJ243571) است.



شکل۲. بوته‌های ارقام مختلف توتون مایه زنی شده با جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک گوجه فرنگی

A : علایم تاولی، بدشکلی و پیچیدگی در برگ‌های توتون *Nicotiana debnyeii* مایه زنی شده باجدایه Ker.Pep.3 ویروس موزائیک گوجه فرنگی، B : باریک شدن برگ توتون رقم *N. debnyeii* مایه‌زنی شده با جدایه Ker-Pep-19 ویروس موزائیک گوجه فرنگی،C : علایم روشن شدن برگ‌ها و تاولی شدن سطح برگ های *N. tabacum* L.cv Samsun NN. مایه زنی شده با جدایه Ham.To.9 ویروس موزائیک گوجه فرنگی.

Fig. 2. Symptoms of ToMV isolates on different varieties of tobacco plants. A: Blistering and leaf curl symptoms in a ToMV inoculated *Nicotiana debnyeii* leaves by Ker.Pep.3 isolate, B: Thread likesymptoms in a ToMV inoculated *N. debnyeii* leaves by Ker-Pep-19 isolate, C: Vein clearing and blistering in *N. tabacum* L.cv Samsun NN leaves inoculated by ToMV isolate Ham.To.9 isolate.

ت) بررسی موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های ToMV

درخت فیلوژنتیکی با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی (CP) جدایه‌های ایرانی و تعداد ۲۴ جدایه خارجی این ویروس (که بر اساس کشورهای مختلف دنیا و میزبان های متفاوت انتخاب شدند(جدول ۴)) رسم گردید. بر این اساس کلیه جدایه‌هایToMV آنالیز شده در سه گروه I، II و III قرار گرفتند (شکل ۳). گروه I تقریباً اکثر جدایه‌های گزارش شده در دنیا به جز شش جدایه ایرانی و چهار جدایه از کشور برزیل را در بر گرفته است. در این گروه چهار جدایه ایرانی ToMV مربوط به سرآسیاب استان کرمان و همدان و هم‌چنین جدایه‌هایی از مناطق مختلف جهان قرار گرفته که از روی گیاهان فلفل، تاجریزی و سلمه تره جدا ا شدند. به‌علاوه جدایه‌های ایرانی Ker.Pep.38 و Ker.Dat.24 با جدایه‌های گزارش شده ازاسپانیا (رس شمار JN3811931) و کره جنوبی (رس شمار EU885417) در یک زیر گروه قرار گرفتند. میزان مشابهت ژنتیکی دو جدایه ایرانی با این دو جدایه به میزان ۹۹/۸ در صد بود. هم‌چنین دیگر جدایه ایرانی (Jir.Che.4) جدا شده از گیاه سلمه تره(*Chenopodium amaranticolour*) با جدایه گزارش شده از برزیل(رس شمار AY063743) جدا شده از گیاه *Impatiens hawkeri* در یک زیر گروه قرار گرفت و به میزان ۹۹/۴ ٪ با یکدیگر مشابهت داشتند. Ker.Pep.18 دیگر جدایه ایرانی در گروه I می‌باشد که با دیگر جدایه ایرانی ثبت شده در بانک ژن (رس شمار HQ593624) در یک زیر گروه واقع شد.

در گروه II تنها یک جدایه از برزیل (رس شمار

جدول ۴. رس شمار و مبدا ژن پروتئین پوششی جدایه های ویروس موزائیک گوجه فرنگی موجود در بانک ژن با ۴۸۰ نوکلئوتید، جهت مقایسه و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه های ایرانی این ویروس.

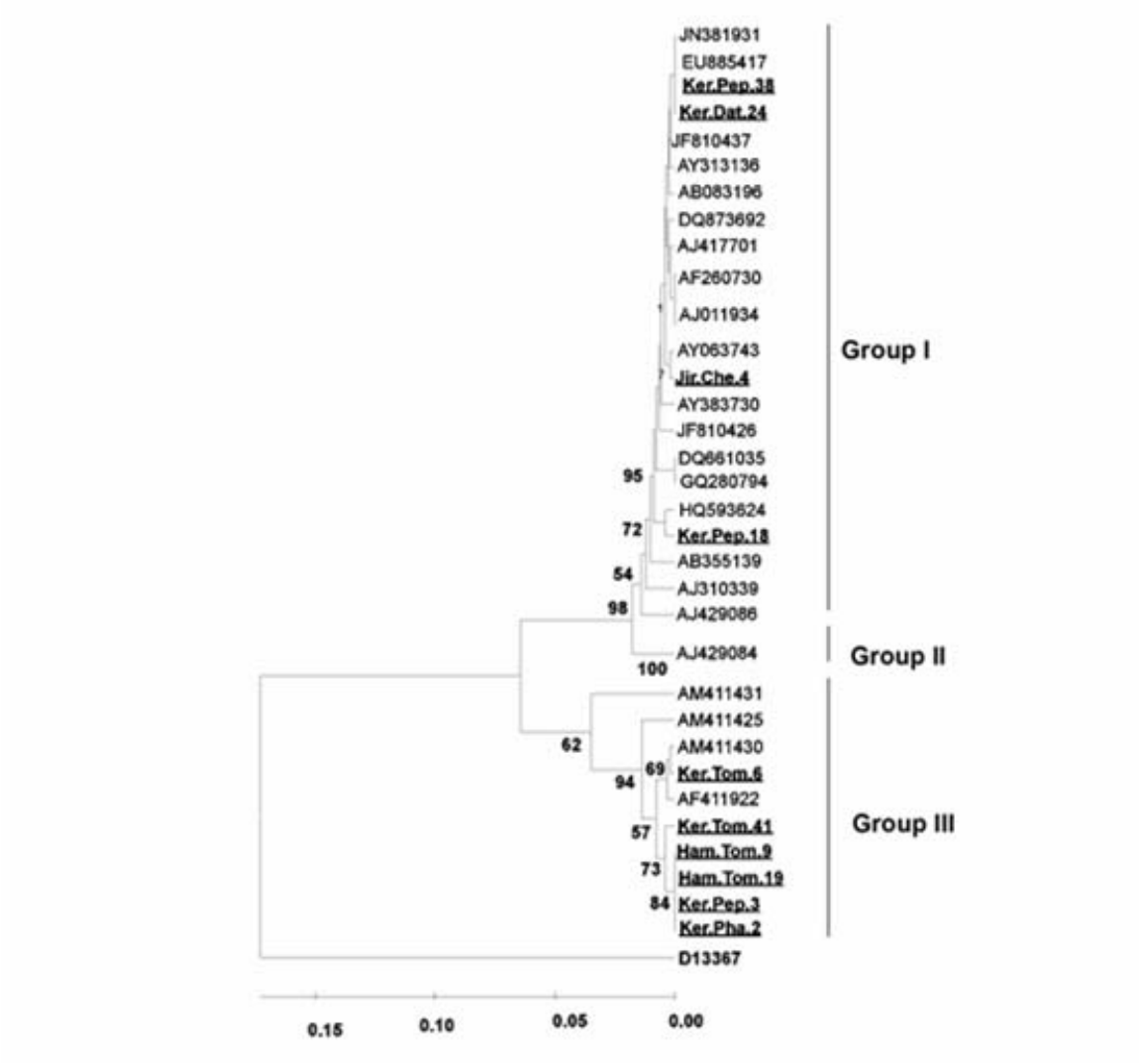
Table 4. GenBank accession numbers and origin of several previously reported ToMV isolates used for phylogenetic comparison of a 480 nt fragment of the CP gene

رس شمار بانک ژن Accession number	کشور Country	جدایه / سویه – Isolate/strain	گیاه میزبان Host plant
AY313136	China	ToMV-Hib	Hibiscus
AJ011934	China	S1	Tomato
AJ417701	China	Camellia	Camellia
DQ661035	China	SH-5	Pepper
AB083196	Japan	L11A Fukushima	Tomato
AB355139	Japan	L11Y	Tomato
DQ873692	Germany	ToMV1-2	Tomato
AJ429086	Germany	PV-472	Tomato
AJ429084	Germany	DSMZ	Tomato
EU885417	South Korea	ToMV-tom	Tomato
AF260730	South Korea	Potato.1	Tomato
AY383730	Taiwan	Lisianthus	Lisianthus
AY063743	Brazil	Tobamo-I	Impatiens hawkeri
AF411922	Brazil	Brezil isolate,1	Tomato
D13367	Germany	MAFF	Tobacco
JN381931	Spain	T1	Tomato
JF810437	Brazil	S1	Tomato
JF810426	Brazil	S2	Pepper
GQ280794	China	N5	Tomato
HQ593624	Iran	G6	Tomato
AJ310339	Kazakhstan	K3	؟
AM411431	Brazil	Salto-BR13	Pepper
AM411425	Brazil	Sorocaba-BR02	Pepper
AM411430	Brazil	Salto-BR11	Pepper

HQ593624) قرار گرفت و شش جدایه ایرانی و سه جدایه گزارش شده از برزیل در گروه III قرار گرفتند. در این گروه پنج جدایه ایرانی Ham.Tom.19, Ker.Pha.2 Ker.Pep.3, Ham.Tom.9 و Ker.Tom.41 در یک زیر گروه قرار گرفتند. همچنین دیگر جدایه ایرانی(Ham.Tom.9) با دو جدایه برزیلی جدا شده از فلفل(رس شمار AM311430) و گوجه فرنگی(رس شمار AF411922) نیر با تشابه نوکلئوتیدی ۹۹/۴– ۹۹ /۷ در صد در زیر گروه دیگری قرار گرفتند.

میزان مشابهت اسیدهای نوکلئیک اسیدی و آمینواسیدی مربوط به CP در بین جدایه‌های ایرانی به ترتیب بین ۸۳/۸–۹۹/۸٪ و ۸۹/۸–۱۰۰٪ می‌باشد. براین اساس جدایه Jir.Che.4 از گروه I با جدایه Ker.Tom.41 از گروه III کمترین میزان تشابه نوکلئوتیدی (۸۳/۸٪) را داشت. هم‌چنین دو جدایه Ker.Tom.41 وKer.Pep.18 کمترین میزان شباهت آمینو اسیدی (۸۹/۸٪) را با یکدیگر نشان دادند.

کمترین تشابه بین جدایه‌های ToMV، مربوط به جدایه ایرانی Ker.Tom.41 (جدا شده از گیاه گوجه فرنگی، از گروه III) با جدایه چینی AJ417701 (جدا شده از گیاه



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی ایجاد شده به روش Neighbor-joining نشان دهنده ارتباط بین جدایه‌های ایرانی (جدول ۲) و دیگر جدایه‌های ToMV از بانک ژن(جدول ۳). دندروگرام از همردیف‌سازی ۶۲۱ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی این جدایه‌ها به‌دست آمد. مقادیر bootstrap بیش از ۵۰ روی خطوط نشان داده شده است. جدایه‌های تعیین ترادف شده در این بررسی با حروف سیاه و زیر آنها با خط مشخص شده است جدایه .D13367 از ویروس موزائیک توتون به عنوان outgroup انتخاب شد.

Fig. 4. Neighbor-joining tree illustrating the phylogenetic relation-ships between the Iranian *Tomato mosaic virus* (ToMV) isolates (Table 2) and other published isolates (Table 3). The tree was drawn using the 621 bp CP sequences. Bootstrap values higher than 50 are indicated on nodes. The Iranian isolates are shown in bold and underlined. D13367 is a *Tobacco mosaic virus* (TMV) isolate used as outgroup.

کاملیا، از گروه I) به میزان ۸۳/۳٪ است. بیشترین تشابه در میان جدایه‌های گزارش شده از نقاط مختلف دنیا (به جز جدایه‌های ایرانی)، مربوط به جدایه برزیلی AY063743 (جدا شده از گیاه *Impatiens hawkeri*) و جدایه کره‌ای EU885417 (جدا شده از گیاه گوجه فرنگی) به میزان ۹۹/۸٪ می‌باشد که هر دو در گروه I قرار دارند.

ث) بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ToMV

میزان تنوع زنتیکی در میان جدایه‌های ToMV گزارش شده از نقاط مختلف دنیا به جز ایران ۰/۵۲ و در میان

جدایه‌های ایران ۰/۸۹ می‌باشد. این در حالی است که در مورد گروهای I و III این میزان به ترتیب ۰/۰۱۳ و ۰/۰۱۲ می‌باشد (جدول ۵). براین اساس میزان تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های ایرانی نزدیک به دو برابر جدایه‌های دنیا می‌باشد. تخمین میزان فشار انتخاب جایگزینی‌های مترادف (Synonymous substitution) و نامترادف (Nonsynonymous substitution) و نسبت dN/dS به طور جداگانه تعیین گردیدند. در مورد جدایه‌های ایرانی این نسبت برابر است با۰/۰۴۷۸۸ و برای جدایه‌های دنیا ۰/۰۷۴۱۸ می‌باشد. این در حالی است که این میزان در مورد جدایه‌های گروه III شامل جدایه‌های ایرانی و برزیلی ۰/۲۱۴۳ است.

بحث

از دامنه میزبانی و علائم ایجاد شده روی آنها جهت شناسایی و اختلاف جدایه‌های ویروسی استفاده می‌شود (Xiao *et al.* 1993, Shukla *et al.* 1994). در این بررسی ۱۰ جدایه ایرانی ToMV روی گیاهان آزمون *Chenopodium amaranticolor* و *Phaseolus vulgaris* cv. Red kidney لکه‌های سبزرد زایجاد کردند. هم‌چنین این جدایه‌ها روی برگ‌های گیاه *Datura metel L.* لکه‌های نکروتیک و روی برگ‌های *Lycopersicon esculentum* علائم موزائیک و بدشکلی را ایجاد نمودند. اما تنها چهار جدایه ایرانی (Ker.Pep.3, Jir.Che.4, Ham.To.9 و Ham.To.19) بر روی توتون رقم *Nicotiana clevelandeii* لکه‌های نکروز ایجاد کردند. به‌علاوه روی گیاهان *N. tabacum* cv. Samsun NN. و *N. debneyii* تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای از نظر نوع علائم در بین جداهای ایرانی دیده شد (جدول ۳). اما هیچ‌گونه ارتباطی بین موقعیت جدایه‌ها در درخت تبارزائی و ایجاد علائم برروی گیاهان آزمون مشاهده نشد. این موضوع شاید به آن دلیل باشد که قسمت‌های دیگری از ژنوم ToMV به جز ژن CP در ایجاد علائم نقش دارند. براساس گزارش‌های موجود (Boyle & Bergman, 1967; Scholthof *et al.* 2000)، اکثر جدایه‌های ToMV روی برگ‌های گیاهان توتون رقم *Nicotiana tabacum* cv. White Bburley و *N .glutinosa* لکه‌های موضعی نکروتیک ایجاد می‌نمایند در حالی‌که هیچ‌کدام از جدایه‌های ایرانی روی این گیاهان علائمی ایجاد ننمودند.

بر اساس گزارش‌های موجود و درخت تبارزایی جدایه‌های این ویروس به دو (Duarte *et al.* 2007) یا سه (Rangel *et al.*2010) گروه تقسیم می‌گردند. در این بررسی نیز جدایه‌ها به سه گروه (I, II و III) تقسیم می‌شوند. در تمام طبقه‌بندی‌های انجام شده گروه I شامل جدایه‌های گزارش شده از نقاط مختلف دنیا و از میزبان‌های مختلف می‌باشد. این جدایه‌ها از حداقل ۶ منطقه جغرافیایی متفاوت شامل اروپا (اسپانیا و آلمان)، امریکای جنوبی (برزیل)، شرق آسیا (چین، کره جنوبی، تایوان و مالزی)، آسیای مرکزی(ایران و قزاقستان)، امریکای شمالی (ایالات متحده امریکا) و یونان می‌باشند. اما گروه II تنها یک جدایه گزارش شده از کشور برزیل را شامل می‌شود. هم چنین تا قبل از این گزارش گروه III تنها شامل جدایه‌های گزارش شده از برزیل بوده است (Rangel *et al.* 2010). اما بر اساس این تحقیق شش جدایه ایرانی نیز به این گروه اضافه شدند (شکل۳). جدایه‌های ایرانی واقع در گروه‌های III و I در ۱۲موقعیت با یکدیگر متفاوت می‌باشند. به همین دلیل نیز این جدایه‌ها در دندروگرام در دو گروه جداگانه قرار گرفته‌اند.

جدول۵. تنوع ژنتیکی (π) و میانگین تعداد جایگزینی آمینو اسیدی در ناحیه کد شونده پروتئین پوششی (CP) در جدایه‌های ویروس موزائیک گوجه فرنگی (ToMV) در جمعیت‌های جغرافیایی و گروه‌های فیلوژنتیک

Table 5. Genetic diversity and average of nucleotide substitution for CP region of ToMV isolates grouped by geographical population and phylogenetic analysis

جمعیت های جغرافیائی و گروه‌های فیلوژنتیک (Geographical populations/Phylogenetic groups)	تعداد توالی (No of sequence)	dN[a]	dS[b]	dN/dS	تنوع ژنتیکی (π) (Genetic diversity)
World[c]	23	0.21474	0.01593	0.07418	0.052
Iran	10	0.49537	0.02372	0.04788	0.098
Europe	6	0.04620	0.00684	0.14805	0.016
Barazil	5	0.32663	0.02302	0.0704	0.078
West Asia	11	0.03534	0.00375	0.10611	0.011
Group I	23	0.03556	0.00596	0.16760	0.013
Group III	9	0.02939	0.00630	0.2143	0.012

a. جایگزینی‌های نامترادف با اعمال تصحیح Jukes and Cantor (1969) correction

b. جایگزینی‌های مترادف با اعمال تصحیح Jukes and Cantor (1969) correction

c. همردیف سازی چندگانه ۲۳ توالی نوکلئوتیدی انتخاب شده از دنیا به جزجدایه‌های ایرانی محاسبه گردیده‌اند

a. Nonsynonymous substitution, with Jukes and Cantor (1969) correction
b. Synonymous substitution, with Jukes and Cantor (1969) correction
c. Multiple alignment of 23 selected sequences of the world excluding Iran.

ضمنا از آنجایی که جدایه‌های ایرانی واقع در گروه‌های یاد شده، بر اساس دامنه میزبانی و ایجاد علائم روی گیاهان آزمون از یکدیگر مجزا نیستند، لذا وجود تفاوت در اسیدهای آمینه در موقعیت‌های ذکر شده را نمی‌توان احتمالاً با ایجاد علائم مرتبط دانست.

در بررسی به عمل آمده در مورد جدایه‌های ToMV، به نظر می رسد محل جغرافیایی نمونه‌برداری، نقش بارزی در طبقه‌بندی این ویروس نداشته و نوع گیاه میزبان اهمیت بیشتری دارد. به طوری که تمامی جدایه‌های ایرانی ToMV جدا شده از گوجه فرنگی (Ham.Tom.41, Ham.Tom.9 ،Ham.Tom.19) به همراه یک جدایه جدا شده از فلفل (Ker.Pep.3) و یک جدایه جدا شده از لوبیا (Ker.Pha.2) در یک گروه (III) جدا شدند و میزان تشابه نوکلئوتیدی بالایی(۹۹/۲ الی ۹۹/۸ ٪) داشته و این جدایه‌ها مربوط به استان‌های همدان وکرمان می‌باشند. سایر جدایه‌های ایرانی ToMV (Ker.Dat.24، Ker.Pep.38،Jir.Che.4 و Ker.Pep.18) با میزبان‌های مختلف شامل علف‌های هرز تاجریزی و سلمه تره و فلفل در گروه I قرار می‌گیرند و از استان کرمان جمع‌آوری شدند و میزان تشابه نوکلئوتیدی آنها بین ۹۸/۷ تا ۹۹/۸ درصد بود. هم‌چنین این جدایه‌ها با جدایه‌های جدا شده از گوجه فرنگی تشابه کمتری دارند (۸۳/۸ تا ۸۵/۶ درصد). بنابراین

به‌نظر می‌رسد جدایه‌های ایرانی ToMV جدا شده از گوجه فرنگی در مقایسه با جدایه‌های جدا شده از سایر گیاهان از نظر ژن پروتئین پوششی مشابهت نوکلئوتیدی بیشتری دارند.

انتخاب منفی به دلیل محدودیت‌های عملکردی در نواحی کد کننده پروتئینی قادر است تغییرات ژنتیکی را در جمعیت‌های ویروسی کاهش دهد. براین اساس در این بررسی جهت و انتخاب مؤثر بر ناحیه کد کننده پروتئین پوششی جدایه‌های این ویروس بر اساس گروه‌بندی‌های فیلوژنتیک و مناطق جغرافیائی با استفاده از نسبت تنوع نوکلئوتیدی بین جایگزینی‌های نامترادف (d_S) به جایگزینی‌های مترادف (d_N) (توصیف شده توسط پالیمو و بیانچی و هم‌چنین لی (Palimo and Bianchi 1993 و Li 1993) محاسبه شدند. نسبت dN/dS جهت گروه های I و II به ترتیب ۰/۰۱۶۷۶۰ و ۰/۰۲۱۴۳ بوده که این میزان جهت مناطق مختلف جغرافیایی بین ۰/۰۴۷۸۸ (جدایه‌های ایرانی ToMV) و ۰/۰۱۴۸۰۵(جدایه‌های اروپایی ToMV) می‌باشد (جدول ۵). بنابراین از آنجایی‌که این نسبت (dN/dS) در جمعیت‌های مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف و گروه‌بندی‌های فیلوژنتیکی کمتر از یک بود، بیانگر نقش مؤثر انتخاب منفی در تکامل این ویروس است. چنین نتایجی جهت ژن پروتئین پوششی ویروس‌های مختلف نیز گزارش شده است (Garcia-Arenal et al., 2001). هم‌چنین میزان بالای dS در بین جدایه‌های ایرانی (۰/۴۹۵۳۷) و برزیلی (۰/۳۲۶۶۳) مؤید آن است که جمعیت‌های قدیمی از این ویروس در این مناطق وجود داشته و نقش مؤثر انتخاب منفی در تکامل این ویروس را نشان می‌دهد. میزان مشابهت توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی ۶ جدایه ایرانی واقع در گروه III ، ۹۸/۵-۹۹/۸٪ می‌باشد. این جدایه‌ها با جدایه‌های برزیلی AF411922 (۹۸/۳-۹۹/۴٪)، AM411430(۹۶/۹-۹۸/۶٪) و AM411425 (۹۶/۹-۹۸/۶٪) واقع در همین گروه نیز مشابهت بالایی دارند. تا قبل از این مطالعه به دلیل آن‌که جدایه‌های واقع در گروه‌های II و III در دندروگرام (Rangel *et al*.2010) منحصر به جدایه‌های گزارش شده از کشور برزیل بوده و این جدایه‌ها در مقایسه با جدایه‌های واقع در گروه I (گزارش شده از سایر نقاط دنیا) از تنوع نسبتا بالایی نیز برخوردارند، بر همین اساس نامبردگان (Rangel *et al*.2010) اظهار نموده‌اند که منشأ احتمالی یک جدایه و یا ژنوتیپ این ویروس از کشور برزیل و یا امریکای جنوبی است. حال بر اساس این مطالعه و میزان مشابهت بالای ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی و برزیلی به‌علاوه میزان بالای dS در این دو منطقه و هم‌چنین تنوع ژنتیکی (π) بالای جدایه‌های ایرانی (۰/۰۹۸) و برزیلی (۰/۰۷۸) این ویروس در مقایسه با سایر مناطق جغرافیائی دنیا این سوال مطرح می‌شود که ToMV از کدام منطقه منشا گرفته و به سایر نقاط دنیا گسترش یافته است؟ هم چنین بر اساس نتایج حاصله منعکس شده در جدول ۵ تعداد جایگزینی نامترادف (dN) به جایگزینی مترادف (dS) کمتر بوده، که این موضوع نیز نقش مؤثر انتخاب منفی و در نتیجه جلوگیری از تغییرات زیاد در امینو اسیدهای ژن CP این ویروس می‌باشد. در پایان به نظر می‌رسد پراکنش ویروس ToMV در مناطق جنوب کشور طی سال‌های اخیر نسبتاً محدود شده باشد. شاید این موضوع به دلیل تغییر در نوع ارقام کشت شده گوجه فرنگی در آن مناطق باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (23-21) متن انگلیسی مراجعه شود.