



مقاله پژوهشی

توالی نوکلئوتیدی و تجزیه ژنتیکی قطعه کوچک ژنومی دو جدایه ایرانی ویروس لکه زرد زنبق (IYSV) از تره و پیاز

حسین بیات^{۱*}، افشین حسینی مهربان^۳، ناصر صفایی^۱ و مسعود شمس بخش^{۱*}

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۰)

چکیده

ویروس لکه زرد زنبق (*Iris yellow spot virus, IYSV*) یکی از گونه‌های گروه تبارزائی یوراسیایی جنس *Orthospovirus* است که مشابه سایر گونه‌های این جنس، از نظر ژنومی دارای سه قطعه ژنومی کوچک (*S*)، متوسط (*M*) و بزرگ (*L*) است. در مطالعه حاضر توالی کامل قطعه کوچک دو جدایه ویروس از میزبان تره ایرانی (*Allium ampeloprasum*) (*IYSV-Le1M*) و پیاز (*A. cepa*) (*IYSV-O2K*) و نیز ژن غیر ساختمانی قطعه متوسط (*M*) جدایه *IYSV-Le1M* تعیین شد. نتایج نشان داد که بر اساس توالی آمینواسیدی ژن‌های نوکلئوکسپید (*N*)، غیر ساختمانی قطعه کوچک (*NSs*) و غیر ساختمانی قطعه متوسط (*NSm*)، جدایه‌های استان مرکزی نسبت به سایر جدایه‌های ویروس لکه زرد زنبق بیشترین قرابت را با یکدیگر دارند. با این حال منطقه بین ژنی (*Intergenic Region, IGR*) قطعه آر ان ای کوچک این دو جدایه با سایر جدایه‌های تعیین توالی شده ویروس لکه زرد زنبق تفاوت‌های ساختمانی مشخصی را نشان داد. منطقه بین ژنی جدایه تره ایرانی دارای بیشترین طول در بین جدایه‌های ویروس لکه زرد زنبق تعیین توالی شده بود، این ناحیه در جدایه پیاز ۴۴۰ نوکلئوتید و در جدایه‌های هندی و هلندی به ترتیب ۳۱ و ۲۲ نوکلئوتید نسبت به جدایه تره ایرانی کوتاه‌تر بودند. یافته‌های بررسی حاضر اطلاعات جدیدی در خصوص تنوع ژنتیکی و تبارزایی جدایه‌های ویروس لکه زرد زنبق ارائه می‌دهد.

کلیدواژه: *Orthospovirus*، پیاز، تره ایرانی، بین‌ژنی

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

- دانش آموخته دکتری، دانشیار، استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.
- استادیار پژوهشگر گل و گیاهان زینتی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی.
- تهران بلوار کشاورز بین کارگر و جمالزاد، پلاک ۳۴۶، طبقه ۵، واحد ۱۹، شرکت بازرسی تاک



Research Article

Nucleotide sequence and genetic analysis of the small RNAs of two Iranian isolates of *Iris yellow spot virus* (IYSV) from leek and onion

H. Bayat^{1,2}, A. Hassani-Mehraban³, N. Safaie¹, and M. Shams-Bakhsh^{1*}

(Received: 23.05.2022; Accepted: 12.10.2022)

Abstract

Iris yellow spot virus (IYSV) is a member of the Eurasian phylogenetic group of the genus *Orthospovirus*. Similar to other species in the genus, the viral particles contain three genomic fragments: small (S), medium (M), and large (L) RNAs. In the present study, the complete nucleotide sequence of the small fragment (S) RNA of two IYSV isolates from leek (*Allium ampeloprasum*) (IYSV-Le1M) and onion (*A. cepa*) (IYSV-O2K) and the non-structural gene of the M RNA of the IYSV-Le1M isolate were determined. The results showed that based on nucleocapsid (N), small (NSs), and medium (NSm) RNA fragment non-structural genes, the isolates of Markazi Province are more closely related to each other than other IYSV isolates. However, the intergenic region (IGR) of the two isolates showed significant structural differences compared to other sequenced IYSV isolates. The IGR of the IYSV-Le1M isolate was longer than those of other IYSV isolates studied, while, for IYSV-O2K isolate, it was 440 nucleotides shorter. It was also found that for Indian and Dutch IYSV isolates, the IGR was 31 and 22 nucleotides shorter than that in the IYSV-Le1M isolate. These findings provide new information about the genetic diversity and phylogeny of IYSV isolates.

Keywords: *Orthospovirus*, Leek, Onion, IGR

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

1. Fomer Ph.D Student Associated Professor , Professor Plant Pathology Department, Faculty Of Agriculture Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor Of Ornamental Plants Research Center(OPRC), Horticultural Sciences Research Institute(HSRi), Agricultural Research, Education And Extension organization(AREEO), Mahallat, Iran.
3. TAK Inspection Company, North Karegar Ave., Ghadr St., No. 4, Tehran, Iran.

مقدمه

محصول آنزیم ار ان ای پلیمرز وابسته به آر ان ای RNA- (dependent RNA polymerase) ویروس است (de Haan et al. 1991). قطعه ژنومی متوسط دارای دو چارچوب ژنی روی رشته‌های ویروسی و مکمل آن است و به ترتیب رمز کننده پروتئین غیر ساختمانی (Non-M) و پروتئین پیش ساز (structural protein M, NSm) و پروتئین میزبانی گلیکوپروتئین است که پس از ترجمه توسط آنزیم میزبانی به دو پروتئین Gn و Gc شکسته می‌شود (Wijkamp et al. 1995, Sin et al. 2005, Ullman et al. 2005, Zheng et al. 2011, Li et al. 2009, Storms et al. 1995). ژنومی کوچک ویروس نیز دو چارچوب ژنی دارد که یکی بر روی رشته ویروسی قرار داشته و پروتئین غیر ساختمانی قطعه S (Non-structural protein S, NSs) را رمز می‌کند و دیگری روی رشته مکمل ویروسی است و پروتئین نوکلئوکپسید (N) را رمز می‌کند (Snippe et al. 2007, Zhang et al. 2012, Meng et al. 2015). ناحیه بین ژنی (Intergenic region, IGR) در قطعات کوچک و متوسط ژنوم ویروس غنی از بازهای آدنین و اوراسیل است. تاخوردگی این ناحیه منجر به تشکیل ساختار ثانویه و پایدار سنجاق سر (Hairpin) در بخشی از آن می‌شود (van Knippenberg et al. 2005, Kormelink et al. 1990, De Haan et al. 1992). جفت شدن بازهای این ساختار گاهی بیش از ۲۱ نوکلئوتید بوده و از اینرو هدف قرارگرفتن این توالی‌ها در فرآیند خاموش‌سازی ژن (RNA silencing) مورد توجه قرار گرفته است (Hedil et al., 2014).

هر چند تا کنون توالی کامل ژنوم هیچ جدایه‌ای از ویروس لکه زرد زنبق تعیین نشده است. اما توالی قطعات ژنومی متفاوت ویروس در جدایه‌های مختلف تعیین شده است. توالی قطعه کوچک در دو جدایه هندی

اورتوتوسپوویروس‌ها، یکی از خسارت‌زاترین ویروس‌های گیاهی هستند که دامنه وسیعی از گیاهان زراعی، باغبانی و زینتی را در سرتاسر جهان مورد حمله قرار می‌دهند (Pappu et al. 2009, Riley et al. 2011, Oliver & Whitfield 2016, Butkovic et al. 2021). ویروس لکه زرد زنبق (*Iris yellow spot virus, IYSV*) متعلق به جنس *Orthospovirus* از خانواده *Tospoviridae* اولین بار از زنبق (*Iris hollandica*) از هلند گزارش شد (Cortes et al. 1998). یک سال بعد، جدایه دیگری از پیاز و از برزیل گزارش شد که در توالی ژنومی و دامنه میزبانی با جدایه هلندی متفاوت است (Pozzer et al. 1999). ویروس به تدریج از سایر کشورهای دنیا در هر پنج قاره از گونه‌های مختلف جنس *Allium* شامل پیاز (*A. cepa*)، تره (*A. porrum*) و سیر (*A. tuberosum*) و همچنین انواع گیاهان زینتی و برخی علف‌های هرز گزارش و به عنوان یکی از گونه‌های *Orthospovirus* با پراکنش جهانی معرفی شد (Bag et al. 2015).

ویروس لکه زرد زنبق مشابه سایر گونه‌های جنس *Orthospovirus* دارای پیکره‌های نیمه کروی به قطر ۸۰-۱۲۰ نانومتر بوده و دارای غشای چربی دو لایه‌ای به قطر حدود ۵ نانومتر است (King et al. 2012, Peters 1996, Mumford et al. 2003). ژنوم این ویروس از سه قطعه ار ان ای کوچک (S)، متوسط (M) و بزرگ (L) تشکیل شده است. قطعه بزرگ دارای قطبیت منفی و قطعات کوچک و متوسط آمبی‌سنس هستند. تنها چارچوب ژنی (Open Reading Frame, ORF) موجود در قطعه ژنومی بزرگ از طریق mRNA ای بیان می‌شود که اندازه اش تقریباً به اندازه خود قطعه ژنومی است و رمز کننده



شکل ۱) لکه های دوکی شکل نکروتیک روی برگ تره ایرانی (راست) ایجاد شده توسط ویروس لکه زرد زنبق و زخم های نکروتیک روی برگ *Nicotiana benthamiana* پس از مایه زنی با جدایه تره محلات ویروس لکه زرد زنبق (چپ)

Fig. 1. Spindle-shaped necrotic spots on leeks (right) caused by Iris yellow spot virus. Necrotic lesion on *Nicotiana benthamiana* leaf after inoculation with IYSV-Le1M isolate.

زنبق در ایران منحصر به تعیین توالی ژن نوکلئوکپسید جدایه های مختلف از این ویروس است (Beikzadeh *et al.* 2012, Bayat *et al.* 2018, منظور فهم دقیق تر تنوع ژنتیکی و تبارزائی جدایه های ایرانی ویروس لکه زرد زنبق، برای نخستین بار توالی قطعه کوچک ژنوم دو جدایه ویروس از میزبان تره ایرانی (*A. cepa*) و پیاز (*ampeloprasum*) (IYSV-Le1M) و نیز ژن غیر ساختمانی قطعه متوسط (M) (IYSV-O2K) و تعیین شد و خصوصیات ملکولی جدایه IYSV-Le1M تعیین شد و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

منبع جدایه های ویروس لکه زرد زنبق و آزمون الایزا

تعداد ۶۹ نمونه گیاه مشکوک به آلودگی با ویروس لکه زرد زنبق و دارای علائم لکه های دوکی شکل کلروتیک و نکروتیک (شکل ۱)، از مزارع پیاز و سبزی شهرستان های محلات، دلیجان و خمین طی سال ۱۳۹۵ جمع آوری شد.

(KJ868797) و هلندی (AF001387)، قطعه متوسط از سه جدایه هندی (KM035409)، هلندی (AF214014) و آمریکایی (FJ361359) و قطعه بزرگ از جدایه آمریکایی (FJ623474) ویروس تعیین شده اند (Gawande *et al.* 2015). با این حال بیش از ۱۴۰ رس شمار توالی ژن نوکلئوکپسید ویروس لکه زرد زنبق در بانک ژن (GenBank) ثبت شده است (Tabassum *et al.* 2021). مطالعه گسترده داده های توالی ژن نوکلئوکپسید جدایه های مختلف ویروس لکه زرد زنبق نشان داده است که بر اساس توالی این ژن می توان جدایه های ویروس را در دو گروه مجزا قرار داد. گروه اول (Eurasia clade) شامل بیشتر جدایه های آسیایی (هند، ژاپن، سریلانکا) سه جدایه از اقیانوسیه و سه جدایه از ایالات متحده و گروه دوم (Americas clade) شامل سایر جدایه های ویروس از قاره آمریکا و اوراسیا می باشند (Bag *et al.* 2015).

ویروس لکه زرد زنبق نخستین بار در ایران از مزارع پیاز استان خراسان رضوی گزارش شد (Jafarpour *et al.* 2009). مطالعات ملکولی انجام شده روی ویروس لکه زرد

جدول ۱. ویژگی‌های آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر قطعه ژنومی کوچک و ژن NSm جدایه‌های ایرانی ویروس لکه زرد زنبق.

Table 1. Properties of the primers used for amplification of S RNA and NSm gene of Iranian *Iris yellow spot virus* isolates.

Primer Name	Sequence (5'-3')	nt position in genome	Genome segment	Annealing Tem.	Reference
IYSV-NSs-F	GGGATCCAGAGCAATCGAGGTAC	1-16	S	58	Current study
IYSV-NSs-R	CAGAACTGAGACTGATACAGGTAGG	1298-1322			Current study
IYSV-IGR-F	AAGTGGAGATAGACGGTAGGAC	1216-1237		56	Current study
IYSV-IGR-R	GACTGCACTCCTGGAACCTTCGG	2398-2419			Current study
IYSV-IY2	TTAATTATATCTATCTTTCTTGG	2270-2292		55	(Pozzer <i>et al.</i> 1999)
IYSV-IY1	ATGGCTACCGTTAGGG	3076-3091			(Pozzer <i>et al.</i> 1999)
EA-R	TTGTTCAATGAAGCAGCACC	2379-2398		52	(Hassani-Mehraban <i>et al.</i> 2016)
AS-EA-F	GGGGATCCAGAGCAATCGAGG	3148-3161			(Hassani-Mehraban <i>et al.</i> 2016)
IYSV-NSm-F	TGGGTGCAGCAATCAAATATCC	8-29	M	54	Current study
IYSV-NSm-R	GGGCCAAAGCTGGCCTTGGCCTT	1224-1246			(Gawande <i>et al.</i> 2015)

استخراج آر ان ای کل و انجام پی سی آر با ترانویسی معکوس (RT-PCR)

استخراج آر ان ای کل از گیاهان *N. benthamiana* مایه‌زنی شده با جدایه‌های مختلف ویروس لکه زرد زنبق استفاده از کیت (RNeasy mini kit, Qiagen) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

آزمون RT-PCR با استفاده از کیت 2X HyperscriptTM RT master mix (GeneAll, South Korea) در دو مرحله شامل ساخت cDNA و سپس واکنش پی سی آر انجام گرفت. مقدار ۱ μg از آر ان ای کل استخراج شده به همراه ۰/۵ میکرومولار آغازگر تصادفی شش‌تایی و یا یکی از آغازگرهای پس‌سو (جدول ۱-۳) مخلوط و طبق دستورالعمل شرکت سازنده برای ساخت رشته cDNA استفاده شد. واکنش در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (iCycler, Bio-Rad, USA) انجام شد.

واکنش پی سی آر با استفاده از مخلوط آماده Red Master Mix (شرکت Amplicon، دانمارک) در حجم نهایی ۱۴ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. به این منظور دو میکرولیتر از cDNA تهیه شده در مرحله قبل

به منظور بررسی آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده به ویروس لکه زرد زنبق از آنتی‌بادی‌های چند همسانه‌ای تولید شده علیه این ویروس (اهدایی Dick Petres از دانشگاه واخنینگن هلند) در آزمون الایزای مستقیم (-DAS ELISA) استفاده شد (Cortes *et al.* 1998). مقادیر جذب نوری نمونه‌های مورد بررسی در آزمون الایزا با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (ELX 800 ELISA reader, Bio-Tek Instruments, INC., USA) در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شدند.

نمونه‌های با واکنش مثبت در آزمون الایزا پس از انتقال به آزمایشگاه و گلخانه با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار با اسیدیته ۷/۲ حاوی یک درصد سولفیت سدیم و پودر کاربردوم به گیاه لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) مایه‌زنی شدند. یکی از لکه‌های ایجاد شده روی این گیاه برای مایه‌زنی به گیاه *Nicotiana benthamiana* انتخاب شد (شکل ۱). گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط گلخانه با دمای ۲۵-۳۰ درجه سلسیوس و نور ۱۶/۸ تاریکی/روشنایی نگهداری شدند.

خالص شده از ژل، از کیت PCR Cloning CloneJET™ Kit و حامل 1.2 pJET (Ferments, Lithuania) طبق دستورالعمل شرکت های سازنده استفاده شد. پلاسمیدهای نوترکیب به دست آمده برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن (Macogene, South Korea) ارسال و به روش سنگر تعیین توالی شدند. توالی های به دست آمده با استفاده از برنامه BLAST با توالی های قابل دسترس در بانک ژن مقایسه شدند. مجموعه نرم افزاری 5 DNASAR (DNASAR Inc., Madison, WI, USA) برای مونتاژ توالی های به دست آمده و تعیین توالی طول کامل قطعه کوچک جدایه های ویروس لکه زرد زنبق و همچنین پیش بینی توالی های آمینو اسیدی مورد استفاده شد. انجام زیرهمچینی چندگانه توالی های آمینو اسیدی حاصل با سایر توالی های موجود در بانک ژن (جدول ۲) با استفاده از برنامه Clustal W انجام شد و درخت های تبارزائی با استفاده از روش Neighbor joining با اعتبارسنجی (bootstrap) ۱۰۰۰ تکرار در نرم افزار MEGAX (Kumar *et al.* 2018) ترسیم شدند. از داده های توالی ژن های NSm (KX757228) و NSs (KX757228) و جدایه ایرانی ویروس سبزرده فلفل (*Capsicum chlorosis virus*) (KX757722) برای برون گروه (Outgroup) در ترسیم درخت های تبارزائی استفاده شد. مشخصات توالی های مورد استفاده در تجزیه و تحلیل تبارزائی در جدول ۲ ذکر شده است.

نتایج

آزمون سرولوژی

از مجموع ۶۹ نمونه گیاهی تره ایرانی و پیاز جمع آوری شده از شهرستان های محلات، دلیجان و خمین،

به همراه نیم میلی مولار از هر آغازگر با ۷ میکرولیتر از Master mix مخلوط شده و حجم نهایی با استفاده از آب مقطر استریل به ۱۴ میکرولیتر رسانده شد.

به منظور تعیین توالی انتهای 5' قطعه کوچک ژنومی و ژن NSs، یک جفت آغازگر بر اساس توالی مناطق حفاظت شده آر ان ای کوچک جدایه های ویروس لکه زرد زنبق موجود در بانک ژن با رس شماره های KJ868797 و AF001387 طراحی شد. در مورد انتهای 3' و ژن N از آغازگرهای طراحی شده توسط سایر محققان استفاده شد (Hassani-Mehraban *et al.* 2016, Pozzer *et al.* 1999). سپس بر اساس توالی های به دست آمده با این آغازگرها، یک جفت آغازگر مورد نیاز برای تعیین توالی مناطق مرکزی قطعه ژنومی کوچک جدایه های ایرانی ویروس لکه زرد زنبق طراحی شد. به منظور تکثیر ژن NSm و قسمتی از منطقه غیر ترجمه شونده انتهای 3' و 5' این ژن، از آغازگر طراحی شده بر اساس توالی های حفاظت شده قطعه ژنومی متوسط جدایه های ویروس لکه زرد زنبق موجود در بانک ژن با رس شماره های AF214014، FJ361359 و KM035409 و آغازگر پس سوی طراحی شده (Gawande *et al.* 2015) استفاده شد (جدول ۱).

برای هر جفت آغازگر، دمای اتصال مناسب با استفاده از برنامه شیب دمایی در دستگاه ترموسایکل محاسبه شد (جدول ۱) و مدت زمان مورد نیاز جهت گسترش رشته بر اساس زمان یک دقیقه به ازای هر هزار باز تعیین شد.

تعیین توالی و تجزیه و تحلیل داده ها

قطعات تکثیر شده توسط پی سی آر با استفاده از کیت Vivantis Technologies,) GF-1 Gel DNA Recovery (Malaysia) طبق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل استخراج و خالص شدند. برای همسانه سازی قطعات

جدول ۲. رس شماره‌های جدایه‌های مختلف ارتوتوسپوویروس‌های مورد استفاده جهت تجزیه و تحلیل تبارزایی جدایه‌های ایرانی ویروس لکه زرد زنبق.

Table 2. Accession numbers of different orthospoviruses isolates used for phylogenetic analysis of Iranian *Iris yellow spot virus* isolates.

Virus species/ isolate	Location	S			NSm
		N	NSs	IGR	
<i>Alstroemeria yellow spot virus</i> (AYSV)	The Netherland	-	MF469035	MF469035	MF469034
<i>Capsicum chlorosis virus</i> (CaCV)	Iran	KX757228	KX757228	-	KX757229
<i>Hippeastrum chlorotic ringspot virus</i> (HCRV)	China	-	KC290943	KC290943	JX833565
<i>Iris yellow spot virus</i>	Iran	HQ148174	-	-	-
<i>Iris yellow spot virus</i>	Iran	HQ148173	-	-	-
<i>Iris yellow spot virus</i>	India	KJ868797	KJ868797	KJ868797	KM035409
<i>Iris yellow spot virus</i>	India	EU310272	-	-	-
<i>Iris yellow spot virus</i>	The Netherland	AF001387	AF001387	AF001387	AF214014
<i>Iris yellow spot virus</i>	Japan	AB871451	-	-	-
<i>Iris yellow spot virus</i>	USA	KF263486	-	-	FJ361359
<i>Iris yellow spot virus</i>	USA	DQ233479	-	-	-
<i>Iris yellow spot virus</i>	Brazil	AF067070	-	-	AF213677
<i>Iris yellow spot virus</i>	Zimbabwe	MF359019	MF359021	-	MF359020
<i>Iris yellow spot virus</i>	Seri Lanka	GU901211	-	-	-
<i>Iris yellow spot virus</i>	Australia	AY345226	-	-	-
<i>Iris yellow spot virus</i>	Pakistan	MG676231	-	-	-
<i>Iris yellow spot virus</i>	Tajikistan Tajikistan	JQ814625	-	-	-
<i>Polygonum ringspot virus</i> (PoIRSV)	Italy	-	KX468762	KX468762	KX468763
<i>Tomato yellow ring virus</i> (TYRV)-t	Iran	-	AY686718	AY686718	JN560177
<i>Tomato yellow ring virus</i> (TYRV)-s	Iran	-	DQ462163	DQ462163	-
<i>Melon yellow spot virus</i> (MYSV)	Thailand	-	-	KX711613	-

نوکلئوکپسید این قطعات با توالی جدایه‌های مختلف ویروس لکه زرد زنبق موجود در بانک ژن به میزان ۹۷-۸۵ و ۹۹-۹۲ درصد به ترتیب در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی یکسانی داشتند. به این ترتیب تعلق جدایه‌های فوق به ویروس لکه زرد زنبق مورد تایید قرار گرفت.

تعیین توالی قطعه ژنومی کوچک جدایه‌های ایرانی ویروس لکه زرد زنبق

توالی به دست آمده از مطالعه قطعه کوچک ژنومی دو جدایه تره محلات (Le1M) و پیاز خمین (O2K) ویروس لکه زرد زنبق به ترتیب با شماره‌های دسترسی NCBI MG065699 و MG065700 در پایگاه داده‌های NCBI ثبت شدند. بررسی این داده‌ها نشان داد که طول قطعه کوچک جدایه تره محلات، ۳۱۶۱ نوکلئوتید و جدایه پیاز

هفت نمونه تره ایرانی از شهرستان محلات با آنتی بادی ویروس لکه زرد زنبق در آزمون الایزا واکنش مثبت نشان دادند. از ۶۲ نمونه باقی مانده که از گیاه پیاز جمع آوری شد، واکنش ۴۲ نمونه با آنتی بادی ویروس واکنش مثبت بود. در نتیجه نمونه‌های پیاز دارای علائم مشکوک جمع-آوری شده از شهرستان محلات، دلیجان و خمین به ترتیب ۸۳، ۷۰ و ۴۵ درصد به ویروس لکه زرد زنبق آلوده بودند.

تعیین توالی قطعه تکثیر شده با آغازگرهای عمومی یوراسیایی از نمونه‌های پیاز و تره ایرانی

آنالیز BLAST توالی‌های به دست آمده از قطعه تکثیر شده حدود ۸۰۰ bp با استفاده از آغازگرهای عمومی یوراسیایی (AS-EA-F/EA-R) (جدول ۱) از جدایه‌های پیاز و تره ایرانی نشان داد که توالی قسمتی از ژن

جدول ۳. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی قطعه ژنومی کوچک جدایه های ویروس لکه زرد زنبق، جدایه های ایرانی O2k, Le1M و Le2M با سایر جدایه های این گونه و گونه های گروه فیلوژنی یوراسیایی ارتوتوسپوویروس ها. نام ویروس های بررسی شده در جدول ۲ ذکر شده است.

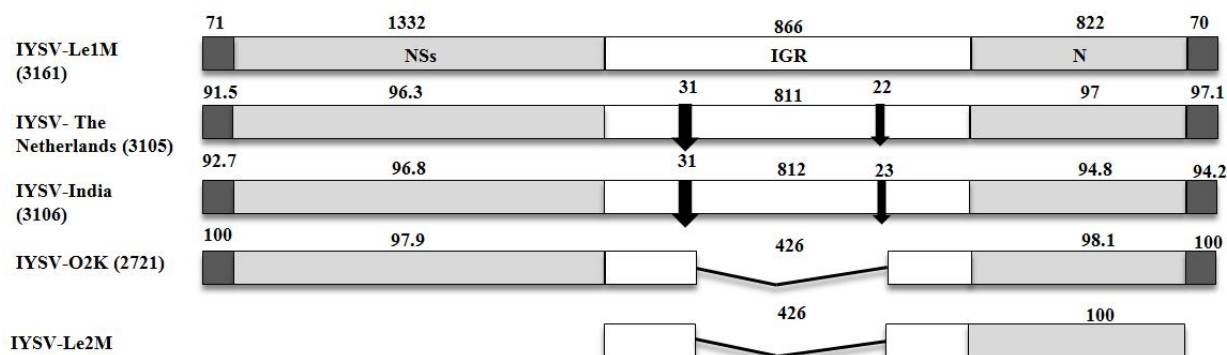
Table 3. Nucleotide and amino acid comparison complete S RNA fragment of Iranian Le1M, O2k and Le2M isolates with other IYSV isolates and other species of Eurasian phylogenetic group of orthospoviruses. Isolates names are listed in Table 2.

Virus Name	S RNA		5' UTR-S		NSs ORF			IGR-S		N ORF			3' UTR-S		NSm ORF		
	nt	%nt	nt	%nt	nt	%nt	%aa	nt	%nt	nt	%nt	%aa	nt	%nt	nt	%nt	%aa
IYSV-Le1M	3161	-	71	-	1332	-	-	866	-	822	-	-	70	-	936	-	-
IYSV-O2K	2721	84.2	71	100	1332	97.4	97.9	426	48.3	822	97.9	98.1	70	100	-	-	-
IYSV-Le2M	-	-	-	-	-	-	-	426	45.4	822	99.7	100	-	-	-	-	-
IYSV-Netherlands	3105	92.8	70	91.5	1332	95.8	96.3	811	83.8	822	96.9	97	70	97.1	936	96.7	98.7
IYSV-India	3091	93.2	70	92.9	1332	96.9	96.8	812	86	822	96.2	94.8	70	94.2	936	92.8	92.6
IYSV-USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	822	88.6	91.9	-	-	936	89.1	94.2
IYSV-Brazil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	822	90	92.6	-	-	936	87.2	91
IYSV-Zimbabwe	-	-	-	-	1332	91.1	96.6	-	-	822	92	94.8	-	-	936	89.9	94.8
AYSV	2734	58.7	72	59.7	1332	76.8	85.1	407	28.8	819	66.1	58.9	71	74.6	927	78.4	86.1
HCRV	2744	59.8	72	75	1338	73.4	76.2	437	25	825	71.3	68.9	72	85.9	927	78.6	82.3
PolRSV	2484	55.4	73	66.2	1332	73	74	183	11.5	825	71	69.7	72	79.1	927	76.2	84.2
TYRV-s	3006	66.3	71	70.8	1332	81.6	88	707	28.5	825	74.3	71.5	72	77.7	-	-	-
TYRV-t	3061	68.5	71	70.8	1332	83.6	90.5	762	26.2	825	75.6	72.2	71	84.5	927	80.8	89.3

جدایه های ایرانی نشان داد که طول هر دوی آنها ۷۱ نوکلئوتید است که نسبت به دو جدایه هلندی و هندی ویروس یک نوکلئوتید بلندتر هستند و میزان یکسانی آنها با همدیگر صد درصد بود. با این حال با دو جدایه هندی و هلندی ۹۲/۹-۹۱/۵ درصد یکسانی داشتند. طول توالی منطقه غیر قابل ترجمه انتهای 3' (3'-UTR) دو جدایه تره محلات و پیاز خمین با همدیگر یکسان و ۷۰ نوکلئوتید بود و با دو جدایه هندی و هلندی از نظر طول یکسان بودند (شکل ۲). میزان یکسانی توالی در سطح نوکلئوتید دو جدایه تره محلات و پیاز خمین صد درصد و با جدایه های هندی و هلندی ویروس لکه زرد زنبق ۹۷/۱-۹۴/۲ درصد تعیین شد.

توالی به دست آمده قطعه ژنومی کوچک دو جدایه ایرانی ویروس لکه زرد زنبق نشان داد که دارای دو چارچوب ژنی با ساختار ژنتیکی آمبی سنس مشابه سایر اعضای جنس *Orthospovirus* است. چارچوب ژنی بزرگ ۱۳۳۲ نوکلئوتید طول داشت که از نوکلئوتید ۷۲ از

خمین ۲۷۲۱ نوکلئوتید بود. این نتایج نشان داد که اندازه قطعه ژنومی کوچک جدایه تره محلات بزرگ تر از دو جدایه هندی (KJ868797) و هلندی (AF001387) ویروس است و اندازه این قطعه در جدایه پیاز خمین از سایر جدایه های تعیین توالی شده کوچک تر است (جدول ۳، شکل ۲). میزان یکسانی توالی نوکلئوتیدی قطعه ژنومی کوچک جدایه های ایرانی با همدیگر ۸۴/۲ درصد بود. توالی نوکلئوتیدی جدایه تره محلات ۹۳/۲-۹۲/۸ درصد با دو جدایه هلند و هند یکسانی نشان داد. همچنین میزان یکسانی قطعه کوچک ژنومی این جدایه با سایر گونه های گروه تبارزائی یوراسیایی توسپوویروس ها ۶۸/۵-۵۵/۴ درصد بود (جدول ۳). میزان یکسانی قطعه کوچک ژنومی جدایه پیاز خمین با دو جدایه هلند و هند در سطح نوکلئوتیدی به ترتیب ۸۳/۴ و ۸۳ درصد تعیین شد. همچنین توالی این جدایه با سایر گونه های گروه تبارزائی یوراسیایی، ۶۵/۲-۵۹/۱ درصد یکسانی نشان داد. بررسی منطقه غیر قابل ترجمه انتهای 5' (5'-UTR)



شکل ۲. مقایسه آر ان ا های کوچک جدایه‌های مختلف ویروس لکه زرد زنبق استفاده شده در مطالعه حاضر. مناطق رمز کننده N و NSs، مناطق غیر قابل ترجمه انتهای 3' و 5' و منطقه بین‌ژنی به ترتیب به رنگ خاکستری روشن، سیاه و سفید نشان داده شده‌اند. نام جدایه‌ها و اندازه طول قطعه ژنومی کوچک آنها در سمت چپ نشان داده شده است. اندازه ناحیه‌های ترجمه شدنی و ترجمه نشدنی در بالای هر قسمت آورده شده است. میزان یکسانی ناحیه ترجمه نشدنی جدایه‌ها نسبت به جدایه تره محلات در سطح نوکلئوتیدی و در مورد N و NSs در سطح آمینواسیدی ارایه شده است. پیکان‌های سیاه رنگ و خطوط شکسته قطعات احتمالا حذف شده را در منطقه بین‌ژنی نشان می‌دهند.

Fig. 2. Comparison of the small RNAs in different *Iris yellow spot virus* (IYSV) isolates used in the present study. The coding N and NSs genes, un-translated regions of 3' and 5' (UTRs) and intergenic regions (IGRs) are shown in light gray, dark and white boxes, respectively. The isolates and their S fragment sizes are shown on the left. The sizes of translated and un-translated regions are shown at the top of the boxes. The rate of identity (%) between the UTRs (vs. IYSV-Le1M) is presented at the nucleotide level, and that of the NSs and N proteins at the amino acid level. Black arrows and cursive lines show probable deleted parts in IGRs

اسیدی ۹۶/۷-۹۵/۸ و ۹۷ درصد با جدایه‌های هلندی و هندی ویروس لکه زرد زنبق یکسان بود.

از روی رشته مکمل قطعه کوچک ژنومی ویروس چارچوب ژنی کوچک‌تری به اندازه ۸۲۲ نوکلئوتید که ظرفیت رمز یک پلی‌پپتید به طول ۲۷۴ آمینواسید و با وزن ۳۰/۴۲ کیلودالتون را دارد، شناسایی شد. مقایسه یکسانی توالی این چارچوب ژنی که نوکلئوکپسید (N) را رمز می‌کند در جدایه‌های مختلف ویروس لکه زرد زنبق در جدول ۳ آورده شده است. مقایسه توالی این ژن در جدایه تره محلات با سایر گونه‌های گروه یوراسیایی نشان داد که میزان یکسانی در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به ترتیب ۷۵/۶-۶۶/۱ و ۷۲/۲-۵۸/۹ درصد بود. همچنین میزان یکسانی توالی چارچوب ژنی نوکلئوکپسید جدایه پیاز خمین با سایر گونه‌های یوراسیایی در سطح

انتهای 5' شروع شده و تا نوکلئوتید ۱۴۰۳ ادامه می‌یابد. این چارچوب ژنی می‌تواند پروتئینی به اندازه ۴۴۴ آمینواسید با وزن ملکولی ۵۰/۳ کیلو دالتون را رمز کند. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این چارچوب ژنی در دو جدایه ویروس لکه زرد زنبق استان مرکزی به ترتیب ۹۷/۴ و ۹۷/۹ درصد یکسانی را نشان داد. این در حالی است که میزان یکسانی توالی این چارچوب ژنی جدایه تره محلات با جدایه‌های هلندی و هندی ویروس ۹۶/۹-۹۶/۸ و ۹۵/۸ و ۹۶/۸-۹۶/۳ درصد به ترتیب در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی تعیین شد. میزان یکسان بودن توالی این چارچوب ژنی با سایر اعضای گروه یوراسیایی به ترتیب در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ۸۳/۶-۷۳ و ۹۰/۵-۷۴ درصد تعیین شد (جدول ۳). توالی چارچوب ژنی جدایه پیاز خمین به ترتیب در سطح نوکلئوتیدی و آمینو

توالی این ژن جدایه تره محلات با سایر جدایه های ویروس لکه زرد زنبق به ترتیب در سطح نوکلئوتید و آمینواسید ۹۶/۷-۸۷/۲ و ۹۸/۷-۹۱ درصد تعیین شد. همچنین مشخص شد که این توالی با سایر اعضای گروه تبارزائی یوراسیایی، ۸۰/۸-۷۶/۲ و ۸۹/۳-۸۲/۳ درصد یکسانی به ترتیب در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی دارد (جدول ۳).

تجزیه و تحلیل های تبارزائی

ژن نوکلئوکسپید جدایه های مختلف ویروس لکه زرد زنبق از هر پنج قاره دنیا تعیین توالی شده است. بر این اساس، درخت تبارزائی حاصل از توالی آمینواسیدی ۱۷ جدایه ویروس شامل سه جدایه از استان مرکزی نشان داد که این جدایه ها در دو گروه تبارزائی مجزا قرار می گیرند (شکل ۳a). این دو گروه تبارزائی شامل جدایه های یوراسیایی و آمریکایی هستند. جدایه های ایرانی ویروس لکه زرد زنبق شامل سه جدایه مورد بررسی در این مطالعه و دو جدایه از استان خراسان رضوی در گروه تبارزائی یوراسیایی قرار گرفتند. در این گروه جدایه های مختلفی از کشورهای هلند، استرالیا، ایالات متحده آمریکا، هند، سریلانکا و ژاپن قرار دارند. جدایه هایی از کشور تاجیکستان، پاکستان، ایالات متحده آمریکا و زیمبابوه در گروه آمریکایی گروه بندی شدند.

درخت تکاملی بر اساس توالی آمینواسیدی ژن NSs نشان داد که دو جدایه استان مرکزی ویروس لکه زرد زنبق با همدیگر گروه بندی شدند و رابطه نزدیک تری با جدایه هندی این ویروس دارند. دو جدایه ویروس لکه زرد زنبق از کشور های هلند و زیمبابوه در یک گروه تک تباری قرار گرفتند (شکل ۳b).

درخت تبارزائی مبتنی بر توالی آمینواسیدی ژن NSm

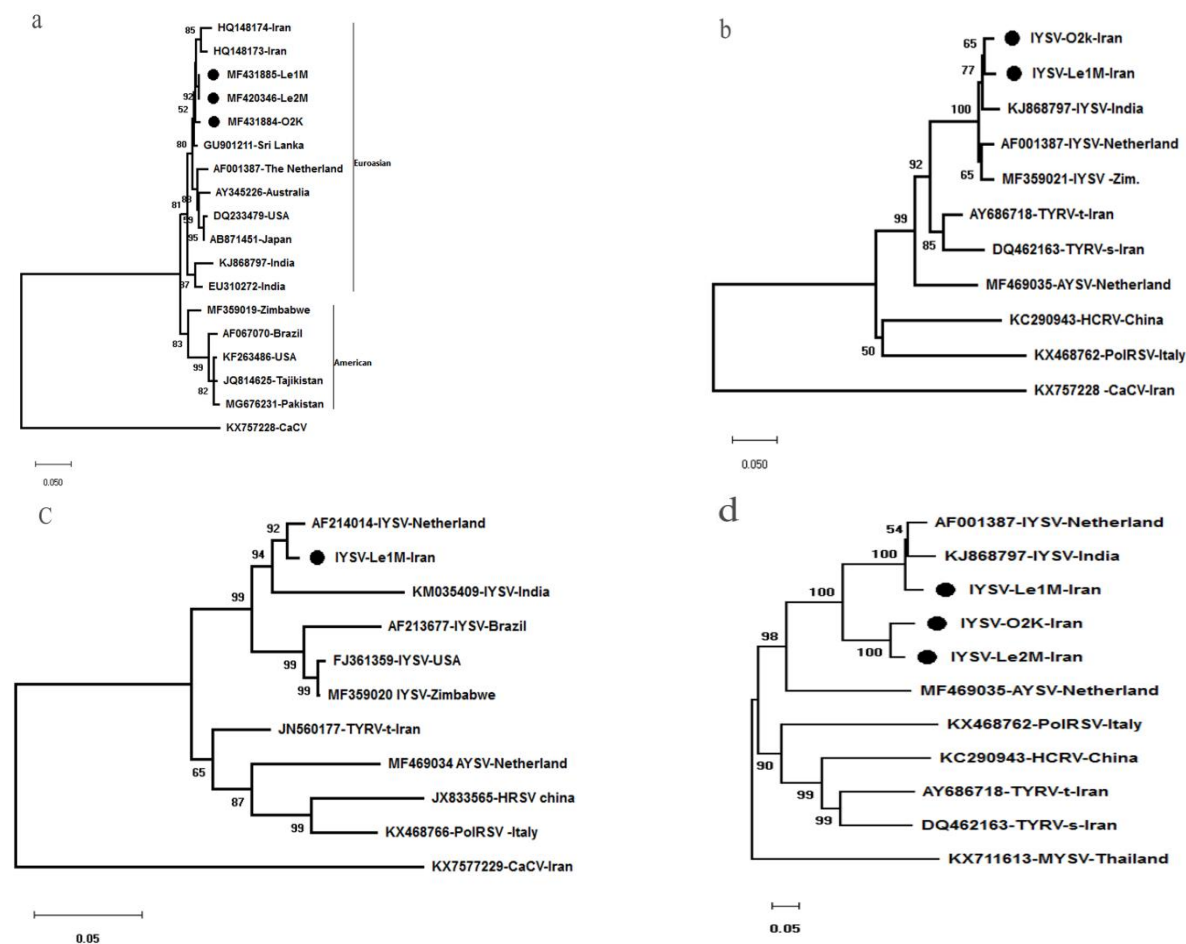
نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به ترتیب ۷۴/۷-۷۱ و ۷۱/۸-۶۸/۶ درصد تعیین شد.

متنوع ترین بخش توالی قطعه کوچک ژنوم ویروس لکه زرد زنبق، توالی منطقه بین ژنی است. در حالیکه طول منطقه بین ژنی در جدایه تره محلات، ۸۶۶ نوکلئوتید بود، این منطقه در جدایه پیاز خمین ۴۲۶ نوکلئوتید طول داشت. همچنین مشخص شد که این ناحیه در جدایه تره محلات به ترتیب ۵۳ و ۵۴ نوکلئوتید از دو جدایه هلندی و هندی ویروس طویل تر بود.

تکثیر و تعیین توالی منطقه بین ژنی جدایه دیگری از روی تره ایرانی به نام Le2M نشان داد که منطقه بین ژنی آن مشابه جدایه پیاز خمین بود. زیر هم چینی توالی منطقه بین ژنی سه جدایه ایرانی و دو جدایه دیگر از هلند و هند نشان داد که جدایه IYSV- O2K (پیاز خمین) و IYSV- Le2M در منطقه مرکزی بین ژنی ۴۴۰ نوکلئوتید کوتاه تر هستند (شکل ۲). بررسی این توالی ها نشان داد که منطقه بین ژنی جدایه هلندی ویروس لکه زرد زنبق دو توالی ۳۱ و ۲۲ نوکلئوتیدی از منطقه بین ژنی جدایه تره محلات کمتر دارد. فقدان دو توالی ۳۱ و ۲۳ نوکلئوتیدی در جدایه IYSV-DOGR از هند نیز مشاهده شد (شکل ۲).

یکسانی توالی منطقه بین ژنی جدایه تره محلات ویروس لکه زرد زنبق با سایر جدایه های این ویروس به میزان ۸۶-۴۵/۴ درصد تعیین شد (جدول ۳).

توالی ژن NSm جدایه تره محلات ویروس لکه زرد زنبق با شماره دسترسی OM289666 در پایگاه داده های NCBI ثبت شد. بررسی این توالی نشان داد که این چارچوب ژنی، ۹۳۶ نوکلئوتید طول دارد و پیش بینی می شود که یک پلی پپتید به طول ۳۱۲ آمینواسید و با وزنی معادل ۳۴/۸۵ کیلودالتون را رمز کند. این چارچوب ژنی توسط رشته ژنومی ویروس رمز می شود. میزان یکسانی



شکل ۳. روابط تبارزائی جدایه‌های استان مرکزی ویروس لکه زرد زنبق (IYSV) با سایر جدایه‌های این گونه و سایر گونه‌های ارتوتوسپوویروس‌ها بر اساس: a، توالی آمینو اسیدی ژن نوکلئوکپسید (N)، b؛ ژن رمز کننده پروتئین غیر ساختمانی قطعه S (NSs)، c؛ ژن رمز کننده پروتئین غیر ساختمانی قطعه M (NSm)، d، منطقه بین ژنی قطعه S (IGR). درخت‌ها با استفاده از روش Neighbour-joining با نرم افزار MEGA X ترسیم شدند. مقادیر Bootstrap نشان داده شده به صورت درصد ناشی از ۱۰۰۰ تکرار هستند. مقادیر کمتر از ۵۰٪ نشان داده نشده‌اند. مشخصات رس شماره‌های توالی‌های ژنومی ویروسی مورد استفاده در جدول ۲ ذکر شده‌اند.

Fig.3. Phylogenetic relationships of *Iris yellow spot virus* isolates from Markazi province with other species of *Orthotospovirus* based on; a. the amino acid sequence of the nucleocapsid (N) gene, b. non-structural protein genes NSs, c. NSm, and d. the intergenic region (IGR). Trees were constructed based on neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicates using MEGA X software. Bootstrap values less than 50% are not shown. Isolates origin and accession numbers are also listed in Table 2.

بحث

نتایج حاصل از تعیین توالی قطعه کوچک ژنومی دو جدایه ویروس لکه زرد زنبق به دست آمده از تره ایرانی و پیاز از ایران نشان داد که اندازه طول قطعه و توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی اینها با دو جدایه دیگر این

گونه‌های مختلف *Orthotospovirus* رابطه نزدیک جدایه ایرانی IYSV-Le1M را به جدایه‌های هلندی و هندی نشان داد. سه جدایه دیگر ویروس از کشورهای زیمباوه، برزیل و ایالات متحده آمریکا در گروه مستقل دیگری قرار گرفتند (شکل ۳).

در بروز علائم ویروسی نداشت، بنابراین به نظر می‌رسد که این ناحیه اثر غیر فعال‌کننده روی ویروس نداشته است. نتایج بررسی حاضر نشان داد که منطقه حذف شده توالی منطقه بین‌ژنی دو جدایه پیاز خمین و Le2M با اختلاف اندکی در منطقه ۵، با منطقه تشکیل ساختار سنجاق سری مطابقت داشت (نتایج نشان داده نشده است). این موضوع نشان داد که این دو جدایه توانایی تشکیل ساختار سنجاق سری را ندارند. مقایسه توالی این دو جدایه با جدایه تره محلات و دو جدایه دیگر از کشور هند و هلند هم این موضوع را تایید کرد. ویروس لکه حلقوی علف هفت بند (*Polygonium ring spot virus*) که دارای کوتاه‌ترین طول منطقه بین‌ژنی در بین تمام گونه‌های شناخته شده ارتوتوسپوویروس‌ها است هم فقط دارای توالی غنی از نوکلئوتید U می‌باشد و فاقد توانایی تشکیل منطقه سنجاق سری در این منطقه است (Ciuffo et al. 2008). گونه‌های جنس‌های *Tenuivirus* و *Phlebovirus* از خانواده *Phenuiviridae* برای بیان ژن‌های خود از استراتژی آمبی سنس در قطعات کوچک و متوسط ژنوم بهره می‌برند. منطقه بین‌ژنی در گونه‌های جنس *Phlebovirus* و گونه *Iranian wheat stripe virus* از جنس *Tenuivirus* هم فاقد توانایی تشکیل ساختار ساقه حلقه است (Ciuffo et al. 2008). در بررسی گونه‌ای از ویروس‌های جنس *Phlebovirus* مشخص شد که منطقه غیر قابل ترجمه (UTR) قطعه بزرگ ژنومی ویروس که آمبی سنس نیست ساختار ساقه حلقه‌ای را تشکیل می‌دهد که در توقف نسخه برداری نقش دارد. وجود چنین ساختارهای موضعی مشابهی در منطقه بین‌ژنی برخی از اعضای این جنس ثابت شده است (Kiening et al. 2017). بنابراین با توجه به نقش ثابت شده ساختارهای ساقه حلقه‌ای در افزایش کارایی ترجمه و توقف نسخه برداری، به نظر می‌رسد نیاز

ویروس گزارش شده از کشورهای هند و هلند اختلاف دارند.

متنوع‌ترین بخش ژنوم در جدایه‌های ویروس لکه زرد زنبق منطقه بین‌ژنی تشخیص داده شد. بین جدایه‌های مختلف ویروس سبزرده فلفل (*Capsicum chlorosis*) هم چنین تنوعی وجود دارد اما جدایه‌های ویروس سبزرده فلفل از منطقه‌های جغرافیایی با فواصل بسیار زیاد جمع‌آوری شده‌اند (Huang et al. 2017) در حالیکه منطقه پراکنش جدایه‌های ایرانی ویروس لکه زرد زنبق فاصله بسیار اندکی با یکدیگر داشتند. زیر همچینی توالی بین‌ژنی جدایه‌های ویروس لکه زرد زنبق نشان داد که مشابه جدایه‌های ویروس سبزرده فلفل، قسمت مرکزی توالی ناحیه بین‌ژنی دو جدایه ایرانی بسیار متفاوت بود. مطالعات قبلی نشان داده بود که نسخه برداری mRNA های مشتق شده از قطعه کوچک ژنومی ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*) در قسمت انتهایی ۳' منطقه سنجاق‌سری بین‌ژنی خاتمه می‌یابد (van Knippenberg et al. 2005). مهمترین نقش گزارش شده برای منطقه بین‌ژنی، توقف محل نسخه برداری است (De Haan et al. 1990, van Knippenberg et al. 2005). همچنین در مطالعه ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی نشان داده شده است که منطقه سنجاق سری تشکیل شده در منطقه بین‌ژنی نقش مهمی در افزایش کارایی ترجمه دارد (Geerts-Dimitriadou et al. 2012). همچنین وجود دو رشته مکمل در ساختار سنجاق‌سری در رابطه با القای خاموش سازی ژن مورد مطالعه قرار گرفته و بر این اساس هدیل و همکاران (۲۰۱۴) نتیجه گرفتند که این ساختار توانایی ضعیفی برای القای فرآیند خاموشی سازی ژن را دارد. با توجه به اینکه حذف قسمت مرکزی منطقه بین‌ژنی در جدایه‌های پیاز خمین و Le2M تاثیری

فرنگی با ۳۶۵ نوکلئوتید طول بیشتر در منطقه بین‌ژنی نسبت به سایر جدایه‌ها به خطای آنزیم همانند سازی و تکرار تکثیر یک توالی تکراری و یا نوترکیبی غیر همولوگ نسبت داده شده است (Heinze *et al.* 2003). تعیین علت(های) وقوع این پدیده در جدایه‌های ویروس لکه زرد زنبق نیاز به تعیین توالی تعداد بیشتری از جدایه‌های ویروس و انجام تحلیل‌های تبارزایی آنها دارد.

درخت‌های تبارزایی رسم شده بر اساس توالی آمینواسیدی ژن‌های سه گانه NSs, N و NSm نشان دادند که جدایه‌های مورد مطالعه رابطه نزدیک‌تری با جدایه‌های کشور هند و هلند نسبت به سایر کشورها دارند. در سال-های اخیر نشان داده شده‌است که مطالعه توالی آمینو اسیدی ژن نوکلئوکسپید به عنوان یک معیار در مطالعات تبارزایی اعضای جنس *Orthospovirus* پذیرفته شده است و این موضوع سبب شده است که تعیین توالی سایر قسمت‌های ژنوم در جدایه‌های مختلف یک گونه انجام نپذیرد (Oliver & Whitfield 2016). مطالعه تبارزایی مبتنی بر توالی پیش‌بینی شده آمینواسیدی ژن نوکلئوکسپید ۱۷ جدایه ویروس لکه زرد زنبق شامل سه جدایه از استان مرکزی و دو جدایه از استان خراسان رضوی نشان داد که جدایه‌های ویروس لکه زرد زنبق استان مرکزی در گروه یوراسیایی و در دو خط سیر تکاملی مجزا قرار گرفتند. تنوع تبارزایی بین جدایه‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه محدود قبلاً از کشور ایتالیا نیز گزارش شده است (Tomassoli *et al.* 2009). نوترکیبی، انتخاب منفی (Purifying selection) و رانش ژنتیکی سه منبع اصلی برای تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌های ویروس لکه زرد زنبق پیشنهاد شده است (Iftikhar *et al.* 2014). با توجه به نزدیکی مناطق نمونه برداری در استان مرکزی و وجود تنوع در این جدایه‌ها، وجود همزمان دو جمعیت در یک

است توالی‌های جایگزینی در منطقه بین‌ژنی در جدایه‌های پیاز خمین و Le2M وجود داشته باشد. برای اظهار نظر دقیق لازم است بررسی‌های دقیق‌تر و بیشتری روی ساختار ژنتیکی توالی‌های ناحیه بین ژنی این جدایه‌ها انجام شود. توالی ناحیه بین ژنی قطعه کوچک ژنومی هشت گونه از *Orthospovirus* و شش جدایه از گونه ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی بررسی شده‌است (Pappu *et al.* 2000)، نتایج نشان داده‌است که درصد یکسانی بازها در منطقه بین‌ژنی قطعه کوچک ژنومی در بین جدایه‌های یک گونه ۷۹-۹۹ درصد متغیر است. در حالیکه برای قطعه متوسط ژنومی میزان یکسانی ۹۸-۸۴ درصد است. بر این اساس، درخت تبارزایی مبتنی بر توالی ناحیه بین‌ژنی قطعات کوچک و متوسط مشابه درخت مبتنی بر توالی نوکلئوتیدی ژن نوکلئوکسپید است (Pappu *et al.* 2000).

در خصوص تنوع موجود در منطقه بین‌ژنی جدایه‌های مختلف ویروس لکه زرد زنبق در ایران دو نظریه را می‌توان مطرح کرد: اول اینکه عمده جدایه‌های ایرانی دارای توالی منطقه بین‌ژنی کوتاه هستند و وقوع توالی‌های منطقه بین‌ژنی بلند ناشی از یک رویداد نوترکیبی غیر همولوگ می‌باشد و دوم اینکه جدایه‌هایی با طول توالی منطقه بین‌ژنی بلندتر گروه قدیمی‌تر هستند و جدایه‌های با توالی بین‌ژنی کوتاه‌تر در اثر رخداد حذف ظهور کرده‌است. برای هر دو نظریه هم شواهدی در سایر گونه‌های ویروسی گزارش شده است. هوآنگ و همکاران (۲۰۱۷) وقوع جدایه‌های مختلف ویروس سبزرده فلفل با طول منطقه بین‌ژنی مختلف را ناشی از یک پدیده حذفی ۳۲۵ نوکلئوتیدی در جدایه CaCV-Qld3432 دانسته و منشأ منطقه بین‌ژنی سایر جدایه‌های ویروس سبزرده فلفل را این جدایه می‌داند. در حالیکه وقوع جدایه‌ای از ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه

نظر می‌رسد این اختلاف طول در قطعه ژنومی کوچک ناشی از توالی‌های درجی و یا حذفی در منطقه بین‌ژنی باشد.

تعارض منافع

نویسندگان در انجام این پژوهش هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

منطقه را می‌توان به اثرات بنیانگذار (Founder effect) که نوعی از رانش ژنتیکی محسوب می‌شود نسبت داد.

در این بررسی برای نخستین بار توالی کامل قطعه ژنومی کوچک دو جدایه ویروس لکه زرد زنبق از کشور تعیین شد و مشخص شد که جدایه تره ایرانی بلندترین طول قطعه ژنومی کوچک را در جدایه‌های ویروس لکه زرد زنبق دارد. همچنین تعیین توالی قطعه کوچک جدایه پیاز از ایران نشان داد که کوتاهترین طول قطعه کوچک را در بین جدایه‌های مختلف ویروس لکه زرد زنبق دارد. به

References

منابع

- 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.
- Bayat H., Hassani-Mehraban A., Safaie N. and Shams-bakhsh M. 2018. Partial biological and molecular characterization of various tospoviruses from Markazi province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 53:431-447.
- 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.
- Butković A., González R. and Elena S. F. 2021. Revisiting Orthotospovirus phylogeny using full-genome data and testing the contribution of selection, recombination and segment reassortment in the origin of members of new species. *Archives of Virology* 166:491-499.
- Ciuffo M., Tavella L., Pacifico D., Masenga V. and Turina M. 2008. A member of a new Tospovirus species isolated in Italy from wild buckwheat (*Polygonum convolvulus*). *Archives of Virology* 153:2059-2068.
- Cortes I., Livieratos I. C., Derks A., Peters D. and Kormelink R. 1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology* 88:1276-1282.
- de Haan P., Kormelink R., de Oliveira Resende R., van Poelwijk F., Peters D. and Goldbach R. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *The Journal of General Virology* 72:2207-2216.
- De Haan P., Wagemakers L., Peters D. and Goldbach R. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *Journal of General Virology* 71:1001-1007.
- Gawande S., Gurav V., Ingle A., Martin D., Asokan R. and Gopal J. 2015. Sequence analysis of Indian iris yellow spot virus ambisense genome segments: evidence of interspecies RNA recombination. *Archives of Virology* 160:1285-1289.
- Geerts-Dimitriadou C., Lu Y.-Y., Geertsema C., Goldbach R. and Kormelink R. 2012. Analysis of the Tomato spotted wilt virus ambisense S RNA-encoded hairpin structure in translation. *PloS one* 7:e31013.
- Hassani-Mehraban A., Dulleman A., Verhoeven J. T. J., Roenhorst J., Peters D., Van Der Vlugt R. and Kormelink R. 2019. Alstroemeria yellow spot virus (AYSV): a new orthotospovirus species within a growing Eurasian clade. *Archives of Virology* 164:117-126.
- 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., 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.

- Hedil M., Hassani-Mehraban A., Lohuis D. and Kormelink R. 2014. Analysis of the AU rich hairpin from the intergenic region of tospovirus S RNA as target and inducer of RNA silencing. *PLoS One*, 9(9), e106027.
- Heinze C., Willingmann P., Schwach F. and Adam G. 2003. An unusual large intergenic region in the S-RNA of a Bulgarian tomato spotted wilt virus isolate. *Archives of Virology* 148:199-205.
- Huang Y., Hong H., Zhao X.-H., Li J. and Tao X.-R. 2017. Complete genome sequence of a Capsicum chlorosis virus in China and the structural variation and evolutionary origin of its S RNA intergenic region. *Archives of Virology* 162(10): 3229-3232
- Iftikhar R., Ramesh S. V., Bag S., Ashfaq M. and Pappu H. R. 2014. Global analysis of population structure, spatial and temporal dynamics of genetic diversity, and evolutionary lineages of Iris yellow spot virus (Tospovirus: Bunyaviridae). *Gene* 547:111-118.
- Jafarpour B., Sabokkhiz M. and Falahati R. 2009. *Iris Yellow Spot Virus (IYSV) A New Viral Disease of Onion in Iran*. *Journal of Plant Protection* 23:106-107.
- Kiening M., Weber F. and Frishman D. 2017. Conserved RNA structures in the intergenic regions of ambisense viruses. *Scientific Reports* 7:1-14.
- King A. M., Adams M. J., Lefkowitz E. J. and Carstens E. B. 2012. *Virus taxonomy: IXth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Access Online via Elsevier.
- Kormelink R., De Haan P., Meurs C., Peters D. and Goldbach R. 1992. The nucleotide sequence of the M RNA segment of Tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *Journal of General Virology* 73: 2795–2804.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547.
- Li W., Lewandowski D. J., Hilf M. E. and Adkins S. 2009. Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390:110-121.
- Meng J., Liu P., Zhu L., Zou C., Li J. and Chen B. 2015. Complete genome sequence of mulberry vein banding associated virus, a new tospovirus infecting mulberry. *PloS one* 10:e0136196.
- Mumford R. A., Barker I. and Wood K. R. 1996. The biology of the tospoviruses. *Annals of Applied Biology* 128:159-183.
- Oliver J. and Whitfield A. 2016. The genus Tospovirus: emerging bunyaviruses that threaten food security. *Annual Review of Virology* 3:101-124.
- Pappu S. S., Bhat A. I., Pappu H. R., Deom C. M. and Culbreath A. K. 2000. Phylogenetic studies of tospoviruses (Family: Bunyaviridae) based on intergenic region sequences of small and medium genomic RNAs. *Archives of Virology*, 145(5): 1035-1045.
- 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.
- Peters D. 2003. Tospoviruses: a threat to the intensive agriculture in the tropics. . In: Loebenstein, G. & Thottappilly, G. (eds), *Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries*. Dordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp. 719-742.
- 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.
- Riley D. G., Joseph S. V., Srinivasan R. and Diffie S. 2011. Thrips vectors of tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management* 2:11-110.
- Sin S.-H., McNulty B. C., Kennedy G. G. and Moyer J. W. 2005. Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:5168-5173.
- Snippe M., Willem Borst J., Goldbach R. and Kormelink R. 2007. Tomato spotted wilt virus Gc and N proteins interact in vivo. *Virology* 357:115-123.
- Storms M., Kormelink R., Peters D., Van Lent J. and Goldbach R. W. 1995. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214:485-493.
- Tabassum A., Ramesh S., Zhai Y., Iftikhar R., Olaya C. and Pappu H. R. 2021. *Viruses Without Borders: Global Analysis of the Population Structure, Haplotype Distribution, and Evolutionary Pattern of Iris Yellow Spot*

- Orthospovirus (Family *Tospoviridae*, Genus *Orthospovirus*). *Frontiers in microbiology* 12: 1-12
- Tomassoli L., Tiberini A., Masenga V., Vicchi V. and Turina M. 2009. Characterization of Iris yellow spot virus isolates from onion crops in northern Italy. *Journal of Plant Pathology* 91:733-739.
- Ullman D. E., Whitfield A. E. and German T. L. 2005. Thrips and tospoviruses come of age: mapping determinants of insect transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4931-4932.
- van Knippenberg I., Goldbach R. and Kormelink R. 2005. Tomato spotted wilt virus S-segment mRNAs have overlapping 3'-ends containing a predicted stem-loop structure and conserved sequence motif. *Virus Research* 125: 110-131.
- Wijkamp I., Almarza N., Goldbach R. and Peters D. 1995. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* 85:1069-1074.
- Zheng Y.-X., Chen C.-C. and Jan F.-J. 2011. Complete nucleotide sequence of capsicum chlorosis virus isolated from *Phalaenopsis* orchid and the prediction of the unexplored genetic information of tospoviruses. *Archives of Virology* 156:421-432.