بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۹ / شماره ۱ / سال ۱۴۰۲: ۶۸-۶۴ DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021784.441

CC BY

گزارش علمی کوتاه

اولین گزارش از وقوع ویروس موزاییک یونجه از گوجه‌فرنگی و فلفل بر اساس توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن رمز کننده پروتئین پوششی ویروس از استان هرمزگان

مهرداد صالح زاده[1*]، علیرضا افشاریفر[1] و سعیده دهقانپور فراشاه[2]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۲۹)

آفات و بیماری‌های نوظهور محصولات کشاورزی را در سراسر جهان تحت‌تاثیر قرار داده‌اند. ویروس موزاییک یونجه (***Alfalfa mosaic virus*, AMV**) گونه‌ای از جنس ***Alfamovirus*** از خانواده ***Bromoviridae*** است. **AMV** دامنه‌ی میزبانی گسترده‌ای داشته و حداقل از روی ۱۵۰ گونه‌ی گیاهی از جمله محصولات تجاری و مهم مثل یونجه (***Medicago sativa***)، کاهو (***Lactuca sativa***)، سیب‌زمینی (***Solanum tuberosum***)، گوجه‌فرنگی (***Licopersicon esculentum***)، فلفل (***Capsicum annuum***) و لوبیا (***Phaseolus vulagris***) گزارش شده است. **AMV** اولین‌بار از استان‌های فارس و تهران از روی یونجه گزارش شد، سپس در اکثر مناطق یونجه کاری کشور آلودگی به ویروس ردیابی شد (**Zainadini *et al*. 2005**). همچنین سویه‌های **AMV** توسط آزمون‌های سرولوژی نیز انجام شده است (**Golnaraghi *et al.* 2004; Massumi & Hosseini Pour 2007; Massumi *et al*. 2012**). در ادامه جدایه‌های **AMV** ایرانی با آزمون‌های مولکولی نیز ردیابی و شناسایی شدند (**Mangeli *et al*. 2012; Pourrahim & Farzadfar 2015**). در نهایت وجود این ویروس از روی برخی از علف‌های هرز مهم، مزارع یونجه و برخی صیفی‌جات مانند سیب‌زمینی و فلفل با تلفیق دو روش سرولوژی و آزمون پی سی آر از مناطق مختلف ایران گزارش گردید (**Mangeli *et al*. 2019**). طی بررسی‌هایی که در سال ۱۴۰۲ خورشیدی از گلخانه‌های گوجه‌فرنگی (حاجی‌آباد) و فلفل (بندرعباس) شهر بندرعباس به‌عمل آمد، علائم زردی، لکه‌های زرد و در برخی موارد نکروز میوه در بوته‌های گوجه‌فرنگی و فلفل مشاهده شد (شکل ۱). لکه‌های زرد به مرور زمان گسترش یافته و در برخی موارد در کل بوته علائم زردی مشاهده شد. پس از استخراج آر. ان. ای. کل از بافت برگ و میوه‌های دارای علائم (۵ نمونه فلفل و ۵ نمونه گوجه‌فرنگی و از هر گیاه یک نمونه بدون علائم به‌عنوان شاهد نمونه‌برداری شد)، تلاش برای ردیابی **AMV** با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با رونویسی معکوس (**RT-PCR**) با استفاده از یک جفت‌آغازگر اختصاصی (**AMV-R, AMV-F**) (**Masoumi *et al*., 2012**) مبتنی‌بر بخش کوچکی از ژن پروتئین پوششی (**Coat Protein, CP**) ویروس منجربه تکثیر قطعه‌ی ۷۸۰ جفت‌بازی در تمامی نمونه‌های دارای علائم شد، در

کلید واژه‌ها: AMV، ویروس‌های نوظهور، تبارزائی، بندرعباس.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Mehrdadsalehzadeh@gmail.com

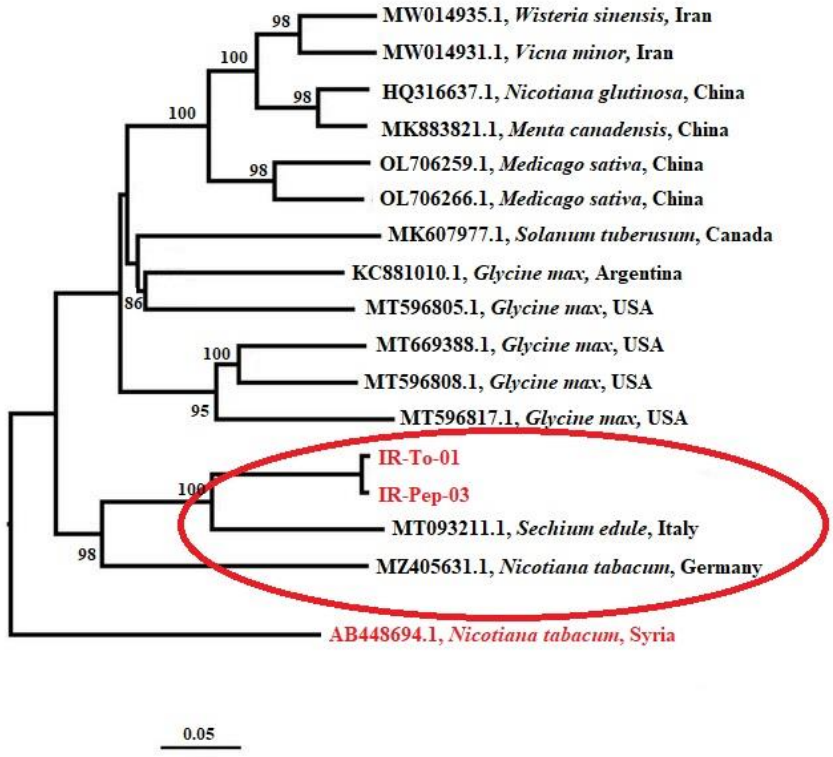
۱ مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز.

۲ استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران.

حالی‌که در نمونه‌های بدون علایم قطعه‌ای تکثیر نشد. محصول **RT-PCR** مربوطه به دو جدایه از هر کدام از گیاهان گوجه‌فرنگی و فلفل پس از خالص‌سازی از ژل **(PCR purification kit - Qiagen)** به شرکت سینوهه (ایران) برای تعیین ترادف‌نوکلئوتیدی دوطرفه ارسال شد. بررسی و مقایسه ترادف‌های به‌دست آمده با ترادف‌های موجود در بانک ژن توسط نرم‌افزار **n-Blast** نشانگر بیشترین یکسانی ترادف‌ها با ترادف بخشی از ژن پروتئین پوششی **AMV** بود. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های حاصل از محصول **PCR** جدایه‌های ایرانی **AMV** با ترادف ژن **CP** مربوط به ۱۵ جدایه‌ی **AMV** موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه‌های ایرانی بیشترین شباهت را به‌ترتیب ۹۷/۹ ٪ (**IR-To-01**) و ۹۸/۳ ٪ (**IR-Pep-03**) با **AMV** استرین **See-1** جدا شده از گیاه کوشیا (***Sechium elude***) از ایتالیا و کمترین شباهت را به ترتیب ۹۵/۸ ٪ (**IR-To-01**) و ۹۵/۴ ٪ (**IR-Pep-03**) با **AMV** استرین **IRWS2** جدا شده از گیاه گلسین (***Wisteria sinensis***) از ایران نشان دادند. درخت تبارزائی ارتباط بین جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌ها را نشان داد (شکل ۲). در درخت تبارزایی جدایه‌های ایرانی همراه با برخی از جدایه‌های اروپایی در یک خوشه و دورتر از جدایه‌های ایرانی، آسیایی و آمریکایی قرار گرفتند که احتمالا به‌دلیل ورود ویروس از طریق بذر به کشور می‌باشد. احتمال آلودگی مخلوط این نمونه‌ها با سایر ویروس‌ها با استفاده از آغازگرهای عمومی پوتی‌ویروس‌ها: **Nib1** و **Nib3R** (**Gibbs & Mackenzie 1997**)، آغازگرهای عمومی بگومو‌ویروس‌ها: **B^C primer** (**Deng *et al*. 1994**) و **$primer181^V$** (**Rojas *et al*. 1993**) و نیز آغازگرهای عمومی توباموویروس‌ها: **TobamodF** و **TobamodR** (**Li *et al*. 2018**) بررسی شد که قطعه‌ای تکثیر نشد. با توجه به اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی در ایران و خسارت اقتصادی قابل‌توجهی که توسط **AMV** در بسیاری از نقاط جهان روی این محصول گزارش شده است، وجود این ویروس در ایران، ضرورت درک بهتر همه‌گیری آن و اتخاذ اقدامات مدیریتی مؤثر ضروری می‌باشد. بررسی بیشتر جهت تعیین تنوع ژنتیکی، بیماری‌زایی جدایه‌ها، میزان پراکنش این ویروس در سایر نقاط کشور و شناسایی میزبان‌های دیگر این ویروس در دست انجام می‌باشد. با توجه به اطلاعات موجود این اولین گزارش از وقوع **AMV** بر اساس نتایج حاصل از توالی‌یابی نوکلئوتیدی، مبتنی‌بر بخشی از پروتئین پوششی ویروس از روی گوجه‌فرنگی (حاجی‌آباد) و فلفل (بندرعباس) از استان هرمزگان یکی از قطب‌های کشت گلخانه‌ای و فضای آزاد این محصولات در ایران است.

شکل ۱. علایم مشاهده شده در گوجه‌فرنگی و فلفل آلوده به **AMV** در بندرعباس **A**: زردی شدید روی برگ فلفل **B**: لکه‌های زرد روی برگ گوجه‌فرنگی. C: لکه‌های بافت‌مرده روی میوه گوجه‌فرنگی

Figure 1. Symptoms observed in tomato and pepper infected with AMV in Bandar Abbas A: severe yellowing on pepper leaves B: yellow spotss on tomato leaves. C: Necrotic spots on tomato fruit.



شکل ۲. درخت تبارزایی ترسیم شده براساس بخشی از توالی آر. ان. ای شماره‌ی ۳ (۷۸۰ نوکلئوتیدی) مربوط به دو جدایه ایرانی ویروس موزاییک یونجه و ۱۵ جدایه موجود در بانک ژن. درخت به روش بیشترین تشابه **(ML)** و توسط نرم‌افزار مگا ۸- (**MEGA 8.0.**) ترسیم شده است. یک جدایه از ویروس موزاییک خیار (**Cucumber mosaic virus**) از سوریه از جنس **Cucumovirus** با رس شمار **AB448694.1** به‌عنوان **Out group** انتخاب شد. جدایه‌های ایرانی به همراه جدایه‌های اروپایی در یک گروه قرار گرفتند. گره‌هایی که کمتر از ۸۶ ٪ مقادیر بوت استرپ را پشتیبانی می‌کردند، گزارش نشدند. رس‌شمار و خاستگاه جغرافیایی جدایه‌ها در درخت نشان داده شده است.

Figure 2 :A phylogenetic tree constructed based on the alignment of a 780 base pair fragment of the coat protein (CP) gene of two Iranian Alfalfa mosaic virus (AMV) isolates from tomato and pepper in comparison with fifteen exotic AMV isolates retrived from GenBank. The Maximum Likelihood (ML) Method in MEGA-8 Software was Utilized for Tree Reconstruction. An isolate of cucumber mosaic virus from Syria (AC: AB448694.1) was used as an out group species. Iranian isolates clustered with European isolates. Branches with less than 86 % support were excluded from consideration. Nodes that support less than 86% of bootstrap values are not reported. The tree depicts isolate numbers and geographical origins.

DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021784.441

Short Scientific Report

The First Report of Alfalfa mosaic virus Occurrence on Pepper and Tomato Crops Based on Partial Nucleotide Sequence analysis of the Virus Coat Protein Open Reading Frame from Hormozgan Province

Mehrdad salehzadeh[1*], Alireza Afsharifar[1], Saeedeh dehghanpour farashah[2]

(Received: 17.02.2024; Accepted: 17.04.2024)

Emerging plant viral diseases account for serious threats to agricultural crop yields and food security in many parts of the world. *Alfalfa mosaic virus* (AMV), a member of the *Alfamovirus* genus within the *Bromoviridae* family, exhibits a wide host range, infecting more than 150 plant species, including economically important crops such as alfalfa (*Medicago sativa*), lettuce (*Lactuca sativa*), potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Licopersicon esculentum*), pepper (*Capsicum annuum*) and bean (*Phaseolus vulagris*). AMV was initially documented infecting alfalfa in the Fars and Tehran provinces in 1968, subsequently spreading to all alfalfa-growing regions of Iran country (Zainadini *et al*. 2005). Serological assays have traditionally identified AMV strains, with molecular characterizations also being conducted on Iranian AMV isolates (Golnaraghi *et al.* 2004; Massumi & Hosseini Pour 2007; Massumi *et al*. 2012; Mangeli *et al.* 2012; Pourrahim & Farzadfar 2015). However, a number of Iranian AMV isolates have also been characterized molecularly (Mangeli *et al.* 2012; Pourrahim & Farzadfar 2015). Notably, based on ELISA tests and molecular examinations, Mangeli and colleagues identified AMV in various weeds, alfalfa, and vegetables such as potatoes and peppers across different Iranian regions (Mangeli *et al.* 2019). A greenhouse survey in Bandar Abbas, Iran, in spring 2023 revealed severe leaf chlorotic spots, yellowing symptoms, and fruit necrosis in tomato (Haji-Abad) and pepper (Bandar-Abbas) plants (Figure 1). To confirm AMV infections, total RNA was extracted from five symptomatic and one asymptomatic sample of tomato and pepper plants using TRIzol reagent (Sinaclone), followed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays with a set of specific AMV primers (AMV-R, AMV-F) targeting a 780-nucleotide segment of the coat protein gene (Massumi *et al.* 2012). PCR products of the expected size (approximately 780 bp) were obtained from all of the symptomatic samples (five samples of tomato and pepper plants), while no amplified products were generated from any of the healthy leaf samples of tomato and pepper plants. Amplified fragments from one sample of each plant were gel purified using a PCR purification kit (Qiagen Co.) and sequenced directly using a paired-end sequencing strategy (Sinohe Co. Iran). Multiple alignments of the obtained nucleotide sequences (corresponding to a part of CP gene) with 15 AMV isolates obtained from GenBank showed the highest identity (97.9%. for IR-To-01 isolate and 98.3% for IR-Pep-03 isolate) with an Italian AMV strain See-1 isolated from *Sechium elude* and the lowest identity (95.8% for IR-To-01 and 95.4% for IR-Pep-03) with an Iranian AMV isolate (IRWS2) from *Wisteria sinensis*. Phylogenetic analysis grouped Iranian isolates with European strains, while, the other AMV isolates (including Iranian, Asian and American isolates) were grouped into a separate clade (Figure 2), suggesting a possible introduction through seed trade. Further PCR assays targeting other viral groups, using four primer pairs, including a degenerate primer pair of potyviruses Nib1 / Nib3R (Gibbs and Mackenzie 1997); a degenerate primer pair of begomoviruses primer BC (Deng *et al*. 1994) / primer181V (Rojas *et al.* 1993) and Tobamovirus degenerate primer pair TobamodF/TobamodR (Li *et al*. 2018), yielded no positive results, suggesting no mixed infection of AMV with other viruses. Given the economic importance of tomatoes and related industries in southern Iran and the potential of emerging viruses which can rapidly spread and infect tomato crops, leading to reduced fruit production and quality, understanding the epidemiology and genetic variations of emerging viral diseases such as AMV is crucial for effective control measures. Ongoing research aims to elucidate genetic variations, pathogenicity, host range, and distribution of AMV in tomato and pepper plants under greenhouse and open-field conditions in Iran. Based on the results of nucleotide sequencing, based on a small part of the virus envelope protein from tomato (Haji Abad) and pepper (Bandar Abbas) under different cultivation conditions in Iran, particularly in Hormozgan province, a major center for greenhouse and outdoor tomato and pepper cultivation.

Key words: AMV, Emerging viruses, Phylogenic, Bandar Abbas

[*]Corresponding author's, E-mail address: Mehrdadsalehzadeh@gmail.com
[1] Plant Virology Research Center, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
[2]Assistant professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Thehran, Iran.

References

منابع

Deng, D., McGrath, P. F., Robinson, D. J., & Harrison, B. D. (1994). Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of applied Biology, 125(2),* 327-336. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1994.tb04973.x.

Gibbs, A., & Mackenzie, A. (1997). A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods, 63(1-2),* 9-16. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(96)02103-9.

Golnaraghi, A. R., Shahraeen, N., Pourrahim, R., Farzadfar, S., & Ghasemi, A. (2004). Occurrence and relative incidence of viruses infecting soybeans in Iran. *Plant Disease*, *88*(10), 1069-1074.

Li, Y., Tan, G., Lan, P., Zhang, A., Liu, Y., Li, R., & Li, F. (2018). Detection of tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. *Journal of Virological Methods*, *259*, 122-128. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.012.

Mangoli, F., Massumi, H., Alipour, F., Maddahian, M., Heydarnejad, J., Hosseinipour, A., ... & Varsani, A. (2019). Molecular and partial biological characterization of the coat protein sequences of Iranian alfalfa mosaic virus isolates. *Journal of Plant Pathology*, *101*, 735-742. https://doi.org/10.1007/s42161-019-00275-w.

Mangoli, F., Massomi, H., Heydarnejad, J., & Poor, A. H. (2012). Host range and partial molecular characterization of Alfalfa mosaic virus isolates in Kerman province. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 43:179. (In Persian)

Massumi, H., Maddahian, M., Heydarnejad, J., Hoseinpour, A., & Farahmand, A. (2012). Incidence of viruses infecting alfalfa in the southeast and central regions of Iran. *Journal of Agriculture Science and Technology, 14(5)*: 1141-1148. http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807073.2012.14.5.5.3.

Massumi, H., & Hosseini Pour. A. (2007). Serological characterization of Alfalfa mosaic virus in alfalfa (*Medicago sativa*) in some regions of Iran. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 9: 341-347.

Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., & Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease, 77(4),* 340-347. http://dx.doi.org/10.1094/PD-77-0340.

Zainadini, A., Jafarpour, B., & Rastegar, M. F. (2005). Study of Alfalfa mosaic virus in central and northern regions of Khorasan province. *JWSS-Isfahan University of Technology*, *9*(2), 147-157. http://dorl.net/dor/20.1001.1.24763594.1384.9.2.13.3.