

Detection and identification of strawberry viruses in Iran

1. Mohammad Hajizadeh*: Associate Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
 2. Nasrin Ghaderi Zandan: Ph.D. Student of Plant Pathology, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
 3. Fahimeh Amirmia: Postdoctoral Researcher, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
- *Corresponding Author's Email Address: m.hajizadeh@uok.ac.ir

Article Type:

Original Research

How to Cite: Hajizadeh, M, Ghaderi Zandan, N., Amirmia, F. (2025). Detection and identification of strawberry viruses in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 61(1-2), 1-21.

DOI: [10.22034/IJPP.2026.2021889.509](https://doi.org/10.22034/IJPP.2026.2021889.509)

Abstract:

Viruses are among the major limiting factors in strawberry cultivation worldwide. Over a decade of research efforts on strawberry-infecting viruses in Iran, valuable insights into their occurrence and molecular characteristics were provided. In these studies, seven known viruses were identified using molecular techniques such as RT-PCR and next-generation sequencing. In addition, four novel viral species were identified from strawberry, and strawberry was identified as a natural host of ourmia melon virus. The known viruses included strawberry crinkle virus, strawberry mottle virus, strawberry pallidosis-associated virus, strawberry crinivirus 3 and 4, strawberry polerovirus 1, and strawberry virus 3, while the newly identified viruses comprised strawberry Kurdistan virus, strawberry polerovirus 2, and strawberry viruses 4 and 5. Furthermore, the molecular and biological characteristics of strawberry Kurdistan virus were determined, confirming it as a novel crinivirus. The results also revealed frequent mixed infections of these viruses in strawberry fields. Considering the extensive cultivation of strawberry in Iran and the lack of well-defined resistant cultivars, these viruses may pose a serious threat to strawberry production in the country.

Keywords: Strawberry; Virome; HTS; Novel viruses; Co-infection



© 2025 the authors. Published by Maher Publishing Institute. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

Extended Abstract

Introduction

Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duchesne) belongs to the genus *Fragaria*, and family Rosaceae (Qin et al. 2007). According to the latest agricultural statistics (Anonymous 2023), strawberry is cultivated on approximately 6,051 ha in Iran, with Kurdistan Province representing the country's major production center, covering about 3,500 ha. To date, nearly 30 virus species infecting strawberry have been reported worldwide (Yan et al. 2025).

Research on strawberry viruses in Iran began in 2016, when five viruses including strawberry crinkle virus (SCV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), raspberry mosaic virus (RpMV), arabis mosaic virus (ArMV), and tomato ringspot virus (ToRSV) were detected by ELISA, and strawberry mottle virus (SMoV) and strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) were identified using both ELISA and RT-PCR in strawberry fields of Gilan and Mazandaran provinces (Nasirinia et al. 2016). Subsequently, extensive virological investigations on strawberry crop in Kurdistan Province were conducted at the University of Kurdistan through graduate research projects, funded studies, and international collaborations. These efforts resulted in the characterization of the strawberry virome in Iran and the discovery of several virus species, which are reviewed and discussed in the present article.

Methods and Materials

Strawberry samples used in these studies were collected from commercial fields in Kurdistan Province, Iran, during 2017, 2018, 2019, 2020, 2023, and 2024. In addition, surveys were conducted during 2020–2021 in major strawberry-growing regions of northern Iran. Total RNA was extracted from selected samples using a modified silica-capture method (Foissac et al. 2000) and complementary DNA (cDNA) was synthesized using a commercial reverse transcription kit (Pars Tous Biotech, Iran). Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were carried out using

Ampliqon PCR Master Mix (Denmark) and virus-specific primers.

To ensure comprehensive virus detection and identify potential novel viruses, high-throughput sequencing (HTS) was performed on five selected samples chosen based on symptom expression and geographic origin. Raw sequencing reads were processed using CLC Genomics Workbench v24.0. Contig identities were determined by BlastX searches against the GenBank Virus RefSeq database. Following virus identification, each sample was individually tested using virus-specific primers to determine the distribution of detected viruses.

Results and Discussion

The combined application of RT-PCR and HTS revealed the presence of seven known strawberry-infecting viruses in Iran, including SCV, SMoV, strawberry pallidosis-associated virus (SPaV), strawberry crinivirus 3 (SCrV-3), strawberry crinivirus 4 (SCrV-4), strawberry polerovirus 1 (SPV-1), and strawberry virus 3 (StrV-3). In addition, HTS enabled the identification of four novel viruses: strawberry Kurdistan virus (SKV), strawberry virus 4 (StrV-4), strawberry virus 5 (StrV-5), and strawberry polerovirus 2 (SPV-2). Furthermore, strawberry was shown to be a natural host of ourmia melon virus (OuMV). Multiple viruses were detected simultaneously in the majority of the samples analyzed.

Molecular characterization of SKV genome exhibits all typical features of criniviruses and revealed that the virus possesses a bipartite genome with a total length of 16,533 nucleotides. RNA1 is 8,759 nucleotides in length, containing 67 nucleotides in the 5' untranslated region (UTR) and 240 nucleotides in the 3' UTR. RNA2 is 7,560 nucleotides long, with 212 nucleotides in the 5' UTR and 470 nucleotides in the 3' UTR. StrV-4 and StrV-5 were initially detected using HTS and subsequently confirmed by RT-PCR with specifically designed primers. StrV-4 belongs to the genus *Deltanucleorhabdovirus*, family *Rhabdoviridae* and shares approximately 70% nucleotide sequence identity with StrV-3. StrV-5 belongs to the genus *Betanucleorhabdovirus*,

family *Rhabdoviridae* and exhibits its highest nucleotide sequence similarity to *Betanucleorhabdovirus picridis* (Botermans et al., 2026).

Most of the viruses detected in Iranian strawberry samples exhibited relatively high infection frequencies among the surveyed plants. Most of the identified strawberry viruses are transmitted by aphids or whiteflies, both of which have been documented in Iranian strawberry fields. Consequently, healthy plants may become infected during the growing season through vector-mediated transmission. Because all of the detected viruses are restricted to *Fragaria* species and their vectors do not support viral replication, the production and distribution of certified virus-free planting material should constitute the first and most effective strategy for reducing disease incidence. As part of this study, PCR-based detection protocols were optimized either by employing previously published primers or by designing new primers based on Iranian isolates. These optimized molecular assays will provide valuable tools for both research applications and certification programs aimed at producing virus-free strawberry planting material.

The relatively low average strawberry yield in Iran compared with leading strawberry-producing countries (Hajizadeh & Ghaderi Zandan, 2021) may be partly attributable to the widespread occurrence of single and mixed viral infections reported in the present study. Therefore, comprehensive investigations are needed to evaluate the responses of commercially cultivated cultivars in Iran to both single and mixed viral infections. Future studies should also address virus–virus interactions in mixed infections, determine the distribution of strawberry viruses, evaluate the transmission efficiency of local vector species, and investigate the occurrence of other viruses in Iranian strawberry fields.

Furthermore, given the discovery of several novel viral species infecting strawberry in Iran, detailed characterization of their molecular and biological properties, together with assessment of their potential risks to strawberry production, should be considered a research

priority. Several of these investigations are currently underway.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest in conducting the present study.

Ethical Considerations

All ethical principles and standards were fully observed in the conduct of this research.

Acknowledgments

This research was supported by the Iran National Science Foundation, the European Virus Archive Global (EVA-GLOBAL) project, the University of Kurdistan, and the Kurdistan Agricultural Jihad Organization. The authors also express their gratitude to Dr. Igor Koloniuk (Institute of Plant Molecular Biology, Czech Republic), Dr. Ioannis Tzanetakis (University of Arkansas, USA), and everyone who contributed to various aspects of this research.

ردیابی و شناسایی ویروس‌های توت‌فرنگی در ایران

۱. محمد حاجی‌زاده^{1*}: دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۲. نسرين قادری زندان، دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۳. فهیمه امیرنیا، محقق پسادکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
*پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.hajizadeh@uok.ac.ir

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی اصیل

ویروس‌ها از عوامل محدود کننده کشت توت‌فرنگی در جهان هستند. در طول یک دهه پژوهش روی ویروس‌های آلوده کننده توت‌فرنگی در ایران، اطلاعات ارزشمندی از حضور و مشخصات مولکولی آن‌ها به دست آمد. در طی این پژوهش‌ها، با استفاده از روش‌های مولکولی RT-PCR و توالی‌یابی نسل جدید، هفت ویروس شناخته شده از توت‌فرنگی ردیابی شدند. همچنین، چهار گونه ویروسی جدید از توت‌فرنگی برای دنیا شناسایی و توت‌فرنگی به عنوان میزبان طبیعی ویروس خربزه ارومیه معرفی شد. ویروس‌های ردیابی شده شامل ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی، ویروس پیسک توت‌فرنگی، ویروس مرتبط با پالیدوسیس توت‌فرنگی، کرینی‌ویروس ۳ و ۴، پولروویروس ۱ توت‌فرنگی، ویروس ۳ توت‌فرنگی و ویروس‌های جدید شامل ویروس توت‌فرنگی کردستان، پولروویروس ۲ توت‌فرنگی و ویروس‌های ۴ و ۵ توت‌فرنگی بودند. همچنین در طی این پژوهش‌ها مشخصات مولکولی و بیولوژیکی ویروس توت‌فرنگی کردستان به عنوان یک کرینی‌ویروس جدید تعیین شد. نتایج همچنین حاکی از آلودگی مخلوط این ویروس‌ها در مزارع توت‌فرنگی بود که با توجه به وسعت کشت توت‌فرنگی در ایران و نبود ارقام مقاوم مشخص در برابر این ویروس‌ها، این عوامل می‌توانند تهدید جدی برای تولید توت‌فرنگی در ایران باشند.

کلیدواژه‌ها: توت‌فرنگی، ویروم، توالی‌یابی نسل جدید، ویروس‌های جدید، آلودگی مخلوط

تاریخ دریافت: ۲۴ آذر ۱۴۰۴

تاریخ بازنگری: ۳ اسفند ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: ۳ اسفند ۱۴۰۴

نحوه استناددهی: حاجی‌زاده، محمد. قادری

زندان، نسرين. امیرنیا، فهیمه. (۱۴۰۴). ردیابی و شناسایی ویروس‌های توت‌فرنگی در ایران. بیماری‌های گیاهی، ۶۱(۲-۱)، ۲۱-۱.

DOI:

10.22034/IJPP.2026.2021889.509



مجوز و حق نشر: © ۱۴۰۴ تمامی حقوق انتشار این مقاله متعلق به نویسنده است. انتشار این مقاله توسط انتشارات ماهر به صورت دسترسی آزاد مطابق با گواهی (CC BY 4.0) صورت گرفته است.

ویروس‌ها در جنس‌ها و خانواده‌های مختلف ویروسی قرار گرفته‌اند و ناقلین

بیولوژیکی متفاوتی از جمله شته‌ها، نماتدها و سفیدبالک‌ها دارند (Martin

2010, Moyer et al. 2004, Martin et al. 2006, Tzanetakis &).

افزایش استفاده از تکثیر گیاهی و تجارت جهانی نشاها، انتشار این ویروس‌ها را در سراسر مناطق یک کشور و حتی بین کشورها و قاره‌ها تسهیل کرده و

نگرانی‌های جدی را به وجود آورده است. ویروس‌های توت‌فرنگی در

غلظت‌های کم و بدون علائم در حالت منفرد ظاهر می‌شوند و معمولاً به

صورت آلودگی مخلوط همراه با علائم غیراختصاصی در گیاه ظهور می‌یابند

(Conci et al. 2017, Martin & Tzanetakis 2006). علائم و خسارت

عمده ویروس‌ها روی توت‌فرنگی عموماً در آلودگی‌های مخلوط اتفاق می‌افتد

ولی اخیراً مطالعه‌ای روی میزان خسارت ویروس شماره ۱ توت‌فرنگی در دو

رقم کارمن و دارسلکت نشان داد که علیرغم عدم ایجاد علائم روی این ارقام،

کاهش عملکرد حدود ۳۰ درصد را باعث می‌شود (Valentová et al. 2022).

گیاه توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duchesne) متعلق به

جنس *Fragaria* زیرخانواده‌ی *Rosoideae* و خانواده‌ی *Rosaceae*

است. توت‌فرنگی از لحاظ اقتصادی یکی از مهم‌ترین میوه‌های تولید شده در

سراسر جهان است که با شرایط مختلف محیطی نیز سازگار است (Qin et al. 2007).

بر اساس آخرین آمارنامه کشاورزی (Anonymous 2023)،

سطح زیر کشت این محصول در کشور ۶۰۵۱ هکتار است و استان کردستان

به عنوان قطب تولیدکننده توت‌فرنگی در کشور با سطح زیر کشت ۳۵۰۰

هکتار شناخته شده است. استان مازندران (منطقه بهنمیر) با ۱۳۰۰ هکتار و

استان گلستان با ۱۰۰۰ هکتار به ترتیب در رتبه‌های دوم و سوم سطح زیرکشت

توت‌فرنگی در کشور قرار دارند.

شناسایی ویروس‌های توت‌فرنگی به صد سال قبل برمی‌گردد و تاکنون

حدود ۳۰ گونه ویروسی از توت‌فرنگی در سراسر جهان گزارش شده است

که اغلب آن‌ها تنها توت‌فرنگی را در طبیعت آلوده می‌کنند ولی برخی از آن‌ها

به جز توت‌فرنگی میزبان‌های دیگر را نیز آلوده می‌کنند (جدول ۱). این

جدول ۱. لیست ویروس‌های آلوده‌کننده توت‌فرنگی، اسم معمول و علمی ویروس، جنس، نحوه انتقال و سال اولین گزارش آن

Table 1. List of strawberry-infecting viruses, including their common and scientific names, genus, mode of transmission, and the year of their first report.

Virus	Acronyme	Scientific name	First report (Year)	Limited to strawberry	Transmission method
Apple mosaic virus	ApMV	<i>Illavirus ApMV</i>	1933	No	Pollen, seed
Arabid mosaic virus	ArMV	<i>Nepovirus arabis</i>	1944	No	Nematode, seed
Beet pseudo-yellows virus	BpYV	<i>Crinivirus pseudobetae</i>	1975	No	Whitefly
Brassica yellows virus	BrYV	<i>Polerovirus TUVV</i>	2011	No	Aphid
Cucumber mosaic virus	CMV	<i>Cucumovirus CMV</i>	1916	No	Aphid
<i>Fragaria chiloensis</i> cryptic virus	FCCV	Unassigned	2005	Yes	Unknown
<i>Fragaria chiloensis</i> latent virus	FCLV	<i>Fragaria chiloensis</i>	1993	Yes	Pollen, seed
Raspberry ringspot virus	RpRSV	<i>Nepovirus rubi</i>	1958	No	Nematode, seed
Strawberry chlorotic fleck virus	SCFV	<i>Closterovirus fragariae</i>	1962	Yes	Aphid
Strawberry crinkle virus	SCV	<i>Cytorhabdovirus fragariarugosus</i>	1932	Yes	Aphid
Strawberry feather-leaf virus	NA	-	1970	Yes	Unknown
Strawberry latent C virus	SLCV	-	1942	Yes	Aphid
Strawberry latent ringspot virus	SLRV	<i>Stralarivirus fragariae</i>	1964	No	Nematode, seed

Strawberry mild yellow edge virus	SMYEV	<i>Potexvirus fragariae</i>	1922	Yes	Aphid
Strawberry mottle virus	SMoV	<i>Sadwavirus fragariae</i>	1984	Yes	Aphid
Strawberry necrotic shock virus	SNSV	<i>Ilarvirus SNSV</i>	1956	No	Thrips, pollen, seed
Strawberry pallidosis associated virus	SPaV	<i>Crinivirus palidofragariae</i>	1957	Yes	Whitefly
Strawberry pseudo mild yellow edge virus	SPMYEV	<i>Carlavirus fragariae</i>	1966	Yes	Aphid
Strawberry vein banding virus	SVBV	<i>Caulimovirus venafragariae</i>	1955	Yes	Aphid
Strawberry polerovirus 1	SPV-1	<i>Polerovirus SPV</i>	2015	Yes	Aphid
Strawberry virus 1	StrV-1	<i>Alphacytorhabdovirus alphafragariae</i>	2019	Yes	Unknown
Strawberry virus 2	StrV-2	<i>Alphacytorhabdovirus betafragariae</i>	2022	Yes	Unknown
Strawberry virus 3	StrV-3	<i>Deltanucleorhabdovirus fragariae</i>	2023	Yes	Unknown
Strawberry virus A	StrVA	Unassigned	2022	Yes	Unknown
Strawberry crinivirus 3	SCrV-3	Unassigned	2016	Yes	Unknown
Strawberry crinivirus 4	SCrV-3	Unassigned	2016	Yes	Unknown
Tobacco necrosis virus	TNV	<i>Alphanecrovirus nicotianae</i>	1935	No	Oomycete
Tomato black ring virus	TBRV	<i>Nepovirus nigranuli</i>	1946	No	Nematode, seed
Tomato ringspot virus	TRSV	<i>Nepovirus lycopersici</i>	1961	No	Nematode, seed

سابقه مطالعه ویروس‌های توت‌فرنگی در ایران به سال ۱۳۹۵ بر می‌گردد. در این مطالعه، پنج ویروس شامل ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی (**strawberry crinkle virus, SCV**)، ویروس لکه حلقوی نهان توت‌فرنگی (**strawberry latent ring spot virus, SLRSV**)، ویروس موزاییک تمشک (**raspberry mosaic virus, RpmV**)، ویروس موزاییک آرابیس (**arabis mosaic virus, ArMV**) و ویروس لکه حلقوی گوجه-فرنگی (**tomato ring spot virus, ToRSV**) با روش سرولوژیک الایزا و دو ویروس پیسک توت‌فرنگی (**strawberry mottle virus, SMoV**) و لبه زرد خفیف توت‌فرنگی (**strawberry mild yellow edge virus, SMYEV**) با دو روش الایزا و RT-PCR از مزارع توت‌فرنگی استان‌های گیلان و مازندران ردیابی شدند (Nasirinia et al. 2016). سپس مطالعات روی این محصول استراتژیک برای استان کردستان در بخش ویروس‌شناسی دانشگاه کردستان در قالب پایان‌نامه‌ها، طرح‌های پژوهشی و فرصت مطالعاتی انجام که منجر به شناسایی ویروم این گیاه در ایران و کشف چندین گونه ویروسی شده است که در این مقاله به آن‌ها پرداخته خواهد شد.

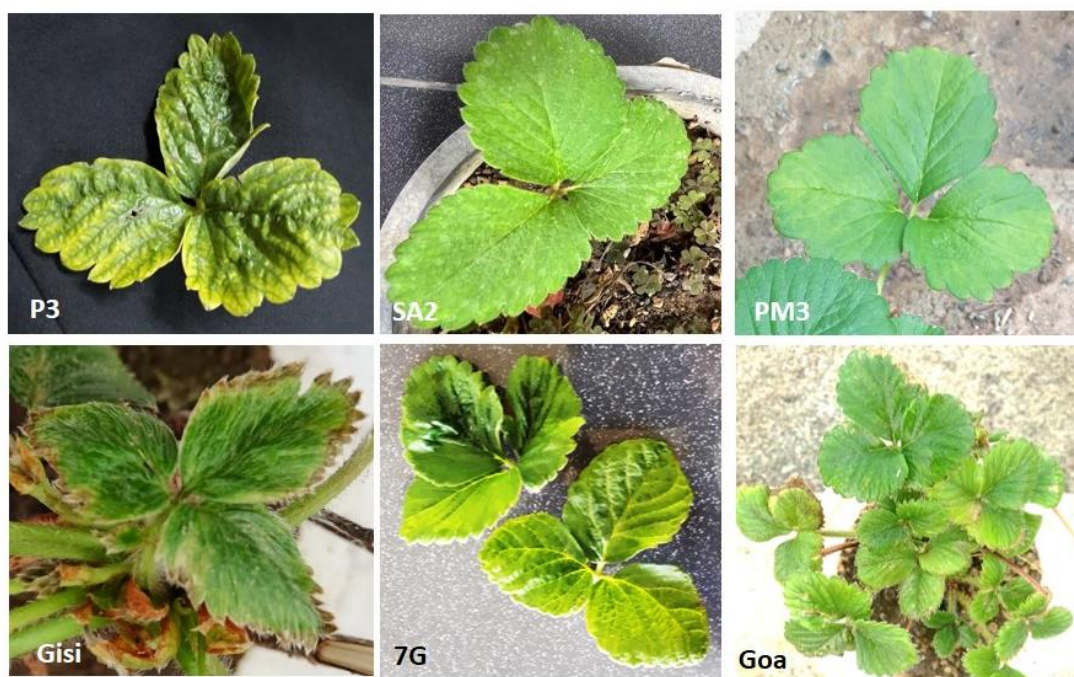
برای ردیابی ویروس‌ها، ابزارهای مولکولی مانند **ELISA**، **RT-PCR**، **qPCR** و توالی‌یابی نسل جدید (**HTS**)، دقت و گستره شناسایی ویروس‌ها را به‌طور چشمگیری بهبود بخشیده‌اند (Jones et al. 2017). با این حال، تکیه بر یک روش منفرد می‌تواند خطر بروز نتایج منفی کاذب یا شناسایی ناکامل ویروس‌ها را افزایش دهد (Medberry et al. 2023). امروزه **HTS** قابلیت‌های قدرتمندی برای کشف ویروس‌های جدید و ویروم گیاهان ارائه می‌دهد و تایید نتایج آن با روش‌های مبتنی بر **PCR** می‌تواند باعث افزایش اطمینان از نتایج به دست آمده گردد (Diaz-Lara et al. 2021). با کاربرد **HTS** ویروس‌های جدیدی در توت‌فرنگی شناسایی شده‌اند (Fránová et al. 2019. Hajizadeh & Ghaderi Zandan 2025. Medberry & Tzanetakis 2022. Medberry et al. 2023. Xiang et al. 2015). این حال، نتایج **HTS** معمولاً به صورت فهرستی از توالی‌ها ارائه می‌شوند و برای درک کامل تأثیر آلودگی ویروسی بر میزبان، نیازمند مطالعات دقیق‌تر بیولوژیکی است.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌های مورد مطالعه

نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش‌ها، طی سال‌های ۱۳۹۶، ۱۳۹۷، ۱۳۹۸، ۱۳۹۹، ۱۴۰۲ و ۱۴۰۳ از مزارع توت‌فرنگی استان کردستان جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین در یک مقطع زمانی ۱۳۹۹-۱۴۰۰، نمونه-برداری از چندین منطقه کشت توت‌فرنگی در شمال کشور (استان‌های

گلستان، گیلان و مازندران) انجام گرفت. این گیاهان دارای طیفی از علائم مرتبط با ویروس‌ها شامل موزاییک، زردی، چروکیدگی و بدشکلی برگ‌ها، کاهش رشد، سوختگی حاشیه برگ و زردی بودند (شکل ۱). از آنجایی که هدف، ردیابی ویروس‌ها و تعیین ویروم توت‌فرنگی بود، بیشتر از نمونه‌های دارای علائم در این مطالعات استفاده شدند، هرچند از گیاهان بدون علائم نیز نمونه‌برداری و برای ردیابی ویروس‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱. برخی علائم مرتبط با ویروس‌ها در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان کردستان و شمال کشور و ویروس‌های جدا شده از آن‌ها. P3، نمونه جمع‌آوری شده از استان کردستان که در مراحل بعدی تحقیق، آلودگی آن به سه ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی (SCV)، ویروس پسیک توت‌فرنگی (SMoV) و کرینی ویروس توت‌فرنگی شماره ۳ (SCrV-3) محرز شد. نمونه جمع‌آوری شده از استان کردستان که در مراحل بعدی تحقیق، آلودگی آن به پنج ویروس SCV، SMoV، SCrV-3، ویروس همراه با پالیدوسیس توت‌فرنگی (SpaV) و ویروس خربزه ارومیه (OuMV) تایید شد. PM3، نمونه جمع‌آوری شده از استان کردستان که در مراحل بعدی تحقیق چهار ویروس SCrV-3، SCV، کرینی ویروس توت‌فرنگی شماره ۴ (SCrV-4) و ویروس توت‌فرنگی کردستان (SKV) از آن ردیابی شد. Gisi، نمونه جمع‌آوری شده از شمال کشور که در مراحل بعدی تحقیق، آلودگی آن به ویروس SMoV محرز شد. 7G، نمونه جمع‌آوری شده از استان کردستان که در مراحل بعدی تحقیق، آلودگی آن به دو ویروس SCV و SMoV تایید شد. Goa، نمونه جمع‌آوری شده از شمال کشور که در مراحل بعدی تحقیق، چهار ویروس SCV، SMoV، SCrV-3 و SpaV از آن ردیابی شد.

Fig 1. Some viral-like symptoms in strawberry samples collected from Kurdistan Province and north of Iran, and detected associated viruses with the samples. P3) The sample collected from Kurdistan Province infected with three viruses SCV, SMOV, and SCrV-3; SA2) The sample collected from Kurdistan Province infected with four viruses SCV, SMOV, SCrV-3, SpaV and OuMV; PM3) The sample collected from Kurdistan Province infected with three viruses SCV, SCrV-3, and SCrV-4; Gisi) The sample collected from north of Iran infected with SMOV; 7G) The sample collected from Kurdistan Province infected with two viruses SCV, and SMOV; Goa) The sample collected from west of Iran infected with four viruses SCV, SMOV, SCrV-3, and SPaV.

RT-PCR

در این روش از آغازگرهای اختصاصی موجود در منابع و یا طراحی شده بر اساس توالی جدایه‌های ایرانی برای ردیابی ویروس‌های شناخته شده، تایید نتایج HTS و بهینه‌سازی روش‌های تشخیص ویروس‌های ردیابی شده استفاده شد.

استخراج RNA

استخراج RNA از نمونه‌های انتخاب شده با استفاده از روش سلیکا (Foissac et al. 2000) با تغییر مختصر انجام گرفت. به طور خلاصه، ۰/۱ گرم از بافت برگ توت‌فرنگی در ازت مایع به صورت کامل پودر و سپس یک میلی‌لیتر بافر استخراج (Guanidine thiocyanate (4.0 M), NaOAc (0.2 M), EDTA (25 mM), KOAc (1.0 M), PVP (2.5% (1% 2-mercaptoethanol (w/v) به آن اضافه شد. برای حذف بقایای درشت سلولی شامل دیواره سلولی، نمونه هموژنیزه شده به مدت ۴ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴°C سانتریفیوژ (مدل Hettich Zentrifugen Mikro 22 R) شد. فاز رویی شامل RNA به لوله جدید منتقل و ۱۰۰ میکرولیتر سارکوسیل ده درصد اضافه شد. لوله به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۷۰°C قرار داده شد و هر دو الی سه دقیقه یک بار محتویات لوله به وسیله ورتکس کردن هم زده شد. سپس، لوله دو دقیقه روی یخ قرار داده شد و جهت حذف سایر اجزای سلولی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C و ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در این مرحله، ۳۰۰ میکرولیتر از فاز رویی به لوله جدید منتقل و سپس ۳۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم یدید (شش مولار)، ۱۵۰ میکرولیتر اتانول خالص و ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سیلیکا اضافه شد. لوله به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و در این مدت دو بار

محتویات آن با ورتکس هم زده شد. بعد از آن، لوله به مدت یک دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و فاز رویی به آرامی دور ریخته شد. پلت به دست آمده حاوی RNA متصل به ذرات سیلیکا در مجاورت هوا به صورت مختصر خشک و ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50% ethanol) اضافه و با ضربات آرام دست به طور کامل حل شد. مرحله قبلی دوباره تکرار و سپس رسوب به صورت کامل خشک گردید. ۴۰ میکرولیتر از آب دیونیزه اضافه و به حالت سوسپانسیون درآمد. لوله به مدت ده دقیقه در ۷۰°C انکوبه و سپس در بیشینه سرعت به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، فاز رویی حاوی RNA به لوله جدید منتقل و از آن برای سنتز cDNA استفاده شد.

ساخت DNA مکمل و انجام RT-PCR

برای ساخت DNA مکمل از کیت شرکت پارس توس استفاده شد. مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، دو میکرولیتر RNA استخراج شده با پنج میکرولیتر از مخلوط بافر ۲x (بافر RT، یک میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدها، هشت میلی‌مولار MgCl2، آغازگر 16 d(t)Oligo، آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی)، یک میکرولیتر آنزیم M-MuLV (200 u/μl) و یک و نیم میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط شد. برنامه دمایی شامل ۱۰ دقیقه در ۲۵°C، ۴۷°C به مدت یک ساعت و ۸۵°C به مدت پنج دقیقه برای غیر فعال کردن آنزیم در ترموسایکلر مدل BioRad اجرا شد. cDNA به دست آمده برای ردیابی ویروس‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. جهت انجام PCR از مخلوط مواد PCR (Master Mix Ampliqon, Denmark) و آغازگرهای اختصاصی هر ویروس (جدول ۲) استفاده شد. همه PCRها در سیکل دمایی

شامل ۹۴ درجه سلیوس به مدت ۲ دقیقه (یک سیکل)، ۹۴ درجه سلیوس به
 مدت ۳۰ ثانیه، دمای بهینه شده جهت اتصال آغازگرها (جدول ۲) به مدت
 ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلیوس به مدت ۳۰ تا ۹۰ ثانیه (بسته به طول قطعه
 مورد انتظار برای تکثیر) به تعداد ۳۵ سیکل انجام شدند. سپس، محصول PCR
 در ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. برای هر ویروس محصولات تکثیر
 شده از چندین جدایه با روش سنگر توالی‌یابی و حضور ویروس تایید شد.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی ویروس‌های توت‌فرنگی

Table 2. Primers used for detection of strawberry- infecting viruses

Target virus	Primer name	Sequences (5'-3')	Expected amplicon size (bp)	Amplified segment	AT (°C)	Reference
SCV	SCV-P3F	TATGTTTAAATTACTGTCTCCGTGC	744	MP gene	54	(Hajizadeh & Ghaderi Zandan 2021)
	SCV-P3R	ATGGCTTTATCAGGATACGGGA				
SMoV	Smdetncr4a	TAAGCGACCACTGTGACAAAG	461	NCR	52	(Thompson et al. 2003)
	Sm2ncr1b	ATTCGGTTCACGTCCTAGTGTCAC				
SPaV	SPaV-CPf	ATCTTATCAGCTAGAACAAGGCA	794	CP gene	56	(Ghaderi Zandan et al. 2022)
	SPaV-CPr	AGGAAAAGGGGATGGTTCCTC				
SCrV-3	SCrV3mF	TTGTCATAAGGAGGCACAGC	673	Polyprotein 1a gene	64	(Hajizadeh et al. 2022)
	SCrV3mR	GCTCTTGTCATAGGCACGAA				
SCrV-4	SCrV4f1	CCAATTCTGATCCTATCCTTAGT	1362	Polyprotein 1a gene	64	(Chen et al. 2018)
	SCrV4mR1	AGGCGCGAAATCCAAACTTC				
SPV-1	SPV-1F	AGAGATCGCCGGATTCCGCAA	280	P1-P2 fusion	56	(Thekke-Veetil & Tzanetakis 2016)
	SPV-1R	TGACACGCTCGGTATTCACAAACAGT				
StrV-3	L1352F	CTGTGCCCCACAGGTATGAACATAGC	796	L gene	58	(Medberry et al. 2023)
	L2148R	TAGGACCTGGTTGTCCCTCC				
SKV	SCrV5 DF	GATTGAGTTGTTGAAGGCACT	397	RNA2	58	(Hajizadeh et al. 2025)
	SCrV5 DR	CCGATTTGGCGAGAAATTCTGA				
OuMV	OuMV-F2	GATGTGTCTCTCGCAGCTTCTC	585	RdRp gene	58	(Hajizadeh & Ghaderi Zandan 2025)
	OuMV-R2	GAAGGTGGGTGCATCTGGTATG				

آن‌ها مخلوطی از چهار نمونه مستقل بودند (S3، S5 و SK) و دو نمونه دیگر
 بصورت مستقل و بدون ترکیب با نمونه‌ی دیگر بودند (P1F و KM)، با روش
 HTS مورد بررسی قرار گرفتند. اولین نمونه توالی‌یابی شده با کد P1F در
 کشور چک در سال ۱۳۹۸ توالی‌یابی شد. RNA کل با استفاده از کیت Gene

توالی‌یابی نسل جدید (High-throughput sequencing)

در بخشی دیگر از این پژوهش، برای اطمینان از ردیابی همه ویروس‌ها و
 همچنین احتمال بررسی حضور ویروس‌های ناشناخته از روش HTS استفاده
 شد. در کل پنج نمونه انتخابی بر اساس علایم و منطقه جغرافیایی که سه تایی

ترکیبی، نمونه‌ها به صورت جداگانه برای هر ویروس با آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

شناسایی ویروس‌های توت‌فرنگی

نتایج حاصل از استفاده از دو روش PCR و HTS نشان داد که حداقل هفت ویروس شناخته شده آلوده‌کننده‌ی توت‌فرنگی شامل SCV، SMoV، ویروس مرتبط با پالیدوسیس توت‌فرنگی (strawberry pallidosis-associated virus, SPaV)، کرینی‌ویروس ۳ توت‌فرنگی (strawberry crinivirus 3, SCrV-3)، کرینی‌ویروس ۴ توت‌فرنگی (strawberry crinivirus 4, SCrV-4)، ویروس پولروویروس ۱ (strawberry polerovirus 1, SPV-1) و ویروس ۳ توت‌فرنگی (strawberry virus 3, StrV-3) در ایران حضور دارند. به علاوه، با استفاده از HTS چهار ویروس جدید شامل ویروس توت‌فرنگی کردستان (strawberry Kurdistan virus, SKV)، ویروس توت‌فرنگی ۴ (strawberry virus 4, StrV-4)، ویروس توت‌فرنگی ۵ (strawberry virus 5, StrV-5) و ویروس پولروویروس ۲ (strawberry polerovirus 2, SPV-2) در طی این پژوهش‌ها کشف شدند. همچنین در این پژوهش‌ها مشخص شد که توت-فرنگی میزبان طبیعی ویروس خربزه ارومیه (Ourmia melon virus, OuMV) است (جدول ۳). این ویروس‌ها هم با روش RT-PCR و سپس توالی‌یابی سنگر و هم در بررسی برخی نمونه‌ها با HTS ردیابی شدند که در زیر هر کدام از آن‌ها توضیح داده خواهند شد.

JET برای خالص‌سازی RNA (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) استخراج شد و کتابخانه‌های توالی‌یابی با استفاده از کیت آماده‌سازی کتابخانه RNA برای سیستم Illumina (Invitrogen) تهیه گردید. کتابخانه تهیه شده با استفاده از دستگاه NovaSeq 6000 توالی‌یابی شد. سپس در سال ۱۴۰۲، نمونه KM با روش سیلیکا (Poudel et al. 2012) استخراج شد و سپس آماده‌سازی کتابخانه RNA و توالی‌یابی با سیستم Illumina بر اساس روش توضیح داده شده توسط ویلامور و همکاران (۲۰۲۲) در مرکز علوم درمانی اوکلاهاما، کشور آمریکا انجام شد. در سال ۱۴۰۳ نیز سه نمونه که هر کدام ترکیبی از چهار نمونه بودند توالی‌یابی شدند. بطور خلاصه، از هر نمونه یک گرم وزن و پس از انجماد خشک با هم ترکیب شدند و به انستیتو تحقیقات کشاورزی، غذا و محیط زیست (INRAE) در شهر بردو، کشور فرانسه ارسال شدند. RNA نمونه‌ها با استفاده از کیت NucleoSpin kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) استخراج و پس از حذف RNAهای ریبوزومی برای انجام HTS آماده شدند. در نهایت، توالی‌یابی با روش Illumina HiSeq 3000 (2 × 150 nt) توسط GenWiz (Leipzig, Germany) انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench v24.0 توالی آداپتورها از خوانش‌ها حذف و سپس خوانش‌های مرتبط با ژنوم میزبان از داده‌ها حذف شدند. خوانش‌های باقیمانده در همین نرم‌افزار مونتاژ و توالی‌های بزرگ‌تر با نام کانتیگ به دست آمدند که هویت آن‌ها با BlastX کانتیگ‌ها در پایگاه داده‌ها GenBank Virus RefSeq مشخص شدند. بعد از شناسایی ویروس‌های هر نمونه

جدول ۳. ویروس‌های شناسایی شده از توت‌فرنگی از ایران

Table 3. Detected viruses-infecting strawberry in Iran

Virus	Detected method*	Infection rate (%)**	Detected vector	Reference
Strawberry crinkle virus	RT-PCR, HTS	50.9	Strawberry aphid	(Hajizadeh 2018)
Strawberry mottle virus	RT-PCR, HTS	58.5	Strawberry aphid	(Ghaderi Zandan & Hajizadeh 2019)
Strawberry pallidosis-associated virus	HTS, RT-PCR	50	Whitefly	(Ghaderi Zandan et al. 2022)
Strawberry crinivirus 3	HTS, RT-PCR	47.8	Unknown	(Hajizadeh et al. 2022)
Strawberry crinivirus 4	HTS, RT-PCR	17.4	Unknown	(Hajizadeh et al. 2022)
Strawberry polerovirus 1	HTS, RT-PCR	5.2	Potato aphid	(Hajizadeh et al. 2022)
Strawberry virus 3	HTS, RT-PCR	4.4	Unknown	(Hajizadeh et al. 2024)
Strawberry Kurdistan virus	HTS, RT-PCR	50.9	Unknown	(Hajizadeh et al. 2025)
Strawberry virus 2	HTS, RT-PCR	58.5	Unknown	Unpublished
Strawberry virus 5	HTS, RT-PCR	50	Unknown	Unpublished
Strawberry polerovirus 2	HTS, RT-PCR	***	Unknown	Unpublished
Ourmia melon virus	HTS, RT-PCR	17.4	Unknown	(Hajizadeh & Ghaderi Zandan 2025)

*ترتیب قرارگیری روش‌ها در جدول بر اساس زمانی است که هر روش برای نخستین بار منجر به ردیابی ویروس شده است.

**درصد آلودگی برای هر ویروس براساس نتایج RT-PCR محاسبه شده است.

***: میزان درصد آلودگی این ویروس در ایران بررسی نشده است.

ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی

KM شناسایی شد. با آنالیز توالی‌ها، توالی نزدیک به کامل جدایه ایرانی SCV

به دست آمد که با شماره دسترسی **PX680586** در ژن‌بانک در دسترس است. توالی به دست آمده با کد **SCV-IR** دارای ۱۴۰۷۸ نوکلئوتید و ۹۳/۳ درصد با توالی مرجع (**NC_076239**) تشابه نوکلئوتیدی دارد. در بررسی توالی‌های موجود در ژن‌بانک مشخص شد که تنها دو جدایه از این ویروس که از یک گیاه جدا شدند، به طور کامل توالی‌یابی شده‌اند که از لحاظ ژنتیکی اختلاف معنی‌داری دارند و با نام‌های جدایه **A** و **B** نامگذاری شده‌اند (Koloniuk et al. 2018). خصوصیات تمایزی این دو جدایه از لحاظ بیولوژیکی مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. جدایه **SCV-IR** و تمامی جدایه‌های به دست آمده از ایران رابطه نزدیک‌تری با جدایه **A** دارند و از لحاظ تبارزایی در کلاد جدایه **A** قرار گرفته‌اند (Hajizadeh 2018). در پژوهشی دیگر، تنوع ژنتیکی این

این ویروس از قدیمی‌ترین ویروس‌های شناخته شده از توت‌فرنگی است. **SCV** ابتدا در سال ۱۹۳۲ از آمریکا و دو سال بعد از بریتانیا گزارش شد (Ogilvie et al. 1934). این ویروس اکنون گسترش جهانی دارد و از مخرب‌ترین ویروس‌های توت‌فرنگی است که با شته *Chaetosiphon jacobi* منتقل می‌شود (Sylvester et al. 1974). **SCV** اولین ویروس شناسایی شده در استان کردستان بود هرچند قبلاً با روش سرولوژیک الیزا از مزارع توت‌فرنگی استان‌های شمالی کشور ردیابی شده بود (Nasirinia et al. 2016). این ویروس در سال ۱۳۹۷ از ۵۱ درصد نمونه‌های مورد مطالعه با روش **RT-PCR** ردیابی شد (Hajizadeh 2018). در بررسی نمونه‌ها با روش **HTS**، این ویروس از دو نمونه ترکیبی **S3** و **S5** و همچنین نمونه

ویروس در استان کردستان بر اساس پروتئین حرکتی (P3) تکثیر شده از ۲۰ جدایه انجام شد و نشان داد که تنوع کمتر از دو درصد بین این جدایه‌ها وجود دارد که نشان‌دهنده قدمتی کم این ویروس در ایران است (Hajizadeh & Ghaderi Zandan 2021).

ویروس پسیک توت‌فرنگی

این ویروس ابتدا در سال ۱۹۴۶ از عامل لبه زردی خفیف بر اساس اختلاف در خصوصیات انتقال با شته جدا شد (Prentice & Harris 1946). SMoV همانند SCV فقط جنس *Fragaria* را آلوده می‌کند. این ویروس به صورت نیمه‌پایا یا ناپایا بوسیله شته‌های *Chaetosiphon sp.* و *Aphis gossypii* منتقل می‌شود (Bonneau et al. 2019, Martin & Tzanetakis 2006). در یک بررسی، این ویروس با شته *C. fragaefolii* جمع‌آوری شده از مزارع توت‌فرنگی استان کردستان از گیاهان آلوده به گیاهان توت‌فرنگی رقم وسکا انتقال یافت (Hajizadeh & Ghaderi Zandan 2019). اگر چه این ویروس به تنهایی علائمی در گیاهان آلوده ایجاد نمی‌کند اما استرین‌های شدید این ویروس تا ۳۰ درصد ممکن است باعث کاهش عملکرد و قدرت رشد شوند (Freeman & Mellor 1962). در آلودگی‌های مخلوط با SMYEV و SCV، میزان خسارت به صورت معنی‌داری افزایش پیدا خواهد کرد (Bonneau et al. 2019). این ویروس برای اولین بار در سال ۱۳۹۸ با روش RT-PCR از ۵۸ درصد نمونه‌های مورد مطالعه ردیابی شد. همچنین، SMoV در چهار نمونه از پنج نمونه مورد بررسی با HTS نیز حضور داشت. در پژوهشی دیگر (منتشر نشده)، به منظور بررسی خصوصیات مولکولی جدایه‌های ایرانی SMoV، مناطق رمزشونده آران‌ای شماره یک و دو از چند جدایه تکثیر و توالی‌یابی شدند. در ارزیابی فاصله ژنتیکی جدایه‌های حاصل از این پژوهش با سایر جدایه‌های ژن‌بانک، جدایه‌های ایرانی کمترین فاصله ژنتیکی را با جدایه‌هایی از کشورهای چک و ژاپن نشان دادند.

ویروس مرتبط با پالیدوسیسیس توت‌فرنگی

اگرچه بیماری پالیدوسیسیس توت‌فرنگی به عنوان یک بیماری ویروسی در سال ۱۹۵۷ در دو کشور استرالیا و آمریکا گزارش شد (Frazier & Stubbs 1969) ولی عامل آن تحت نام ویروس مرتبط با پالیدوسیسیس توت‌فرنگی در سال ۲۰۰۴ شناسایی شد (Tzanetakis et al. 2004) که با سفیدبالک گلخانه (*Trialeurodes vaporariorum*) به صورت نیمه‌پایا منتقل می‌شود. علائم این ویروس در اکثر ارقام تجاری نهان است اما مشخص شده است که در آلودگی مخلوط با ویروس‌های SCV و SMoV علائم تشدید می‌شوند (Bonneau et al. 2019, Silva-Rosales et al. 2013). SPaV اغلب با ویروس زردی دروغین چغندرکند (*beet pseudo-yellows virus*) ظاهر می‌شود و باعث ایجاد علائم پالیدوسیسیس (کلروز برگ و روخمش) می‌شود (Tzanetakis et al. 2004). این ویروس از استرالیا، آمریکا، مصر و چین گزارش شده است. در ایران، SPaV ابتدا با روش HTS در نمونه P1F از استان کردستان شناسایی و سپس با آغازگرهای اختصاصی آن با روش RT-PCR مورد تایید قرار گرفت. در یک بررسی برای تعیین میزان آلودگی به این ویروس، ۵۰ درصد از نمونه‌های مورد مطالعه که اغلب دارای علائم شبیه به ویروس‌ها را داشتند، آلوده به این ویروس بودند (Ghaderi Zandan et al. 2022). این ویروس همچنین از نمونه‌های شمال کشور نیز ردیابی شد. ثابت شده است که SPaV همانند سایر کریبی‌ویروس‌ها با سفیدبالک *T. vaporariorum* منتقل می‌شود (Tzanetakis et al. 2004). در طی آزمایشات انتقال ویروس جدید توت‌فرنگی کردستان (*strawberry Kurdistan virus, SKV*) از توت‌فرنگی آلوده به سالم با استفاده از سفیدبالک *T. vaporariorum*، به صورت اتفاقی SPaV قابلیت انتقال پیدا کرد. این نشان داد که ناقل این ویروس در مزارع توت‌فرنگی استان کردستان حضور داشته و باید در مدیریت این ویروس مورد توجه قرار گیرد.

پولوویروس ۱ توت‌فرنگی

از استان کردستان ردیابی شد (Hajizadeh et al. 2022). همچنین، برای ردیابی این دو ویروس فرضی یک duplex-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) بهینه شد که توانایی ردیابی همزمان هر دو ویروس فرضی را داشته باشد.

ویروس ۳ توت‌فرنگی

این ویروس ابتدا در سال ۲۰۲۳ از کشور آمریکا گزارش و پیشنهاد شد که **StrV3** متعلق به جنس جدیدی از خانواده **Rhabdoviridae** است که **Deltanucleorhabdovirus** نام گرفت (Medberry et al. 2023). این ویروس تاکنون فقط از توت‌فرنگی گزارش شده است و تلاش برای انتقال بیولوژیکی آن توسط شته **C. fragaefolii** موفقیت‌آمیز نبود (Medberry et al. 2023). در ایران، این ویروس با روش HTS در نمونه KM شناسایی و سپس با آغازگرهای اختصاصی آن با روش RT-PCR تایید شد. در یک بررسی، از ۴۵ نمونه مورد آزمایش فقط دو نمونه آلودگی به این ویروس را نشان دادند (Hajizadeh et al. 2024). نکته قابل توجه در مورد این ویروس، درصد آلودگی کم آن هم در آمریکا (Medberry et al. 2023) و هم ایران بود که نشان‌دهنده عدم گسترش آن و یا عدم دسترس روش بهینه شده برای ردیابی آن به دلیل عدم شناخت تنوع ژنتیکی آن است.

ویروس خربزه ارومیه

این ویروس در سال ۱۹۸۸ از خربزه در شمال‌غرب ایران گزارش شد (Lisa et al. 1988). سپس، این ویروس از برخی میزبان‌های دیگر کدویان از مناطق مختلف کشور ردیابی شد (Gholamalizadeh et al. 2008). (Rastgou et al. 2010) ولی گزارشی از حضور این ویروس در سایر کشورها منتشر نشده است. در توت‌فرنگی، این ویروس ابتدا با روش HTS در نمونه SK ردیابی شد ولی در سایر نمونه‌های توالی‌یابی شده با HTS حضور نداشت. **OuMV** سپس با آغازگرهای اختصاصی با RT-PCR تایید شد. این ویروس از طریق مکانیکی به طیف وسیعی از گیاهان علفی قابل انتقال است

این ویروس ابتدا از توت‌فرنگی با علایم زوال در کانادا در سال ۲۰۱۵ با روش HTS کشف و گزارش شد (Xiang et al. 2015). این ویروس تاکنون از چندین کشور از قاره‌های مختلف گزارش شده است (Cultrona et al. 2024, Fránová et al. 2021, Luciani et al. 2016, Thekke-Veetil & Tzanetakis 2016). در ایران، این ویروس ابتدا با روش HTS در نمونه P1F ردیابی شد و سپس با آغازگرهای اختصاصی ویروس با RT-PCR تایید شد. مشخص شده است که مانند سایر پولروویروس‌ها با شته منتقل می‌شود که انتقال آن با شته‌های توت‌فرنگی و پنبه تایید شده است (Fránová et al. 2021). این ویروس علاوه بر نمونه‌های دارای علایم زوال شامل کوتولگی شدید، برگ‌های دارای کلروتیک و بدشکل، از گیاهان بدون علایم نیز ردیابی شده است (Cultrona et al. 2024, Fránová et al. 2021) که به نظر می‌رسد به استرین ویروس مرتبط باشد. در بررسی ۱۵۳ نمونه جمع‌آوری شده از استان کردستان و استان‌های شمال کشور، این ویروس در هشت نمونه از هر دو منطقه ردیابی شد. مطالعات دیگری برای تعیین توالی کامل چندین جدایه این ویروس، بررسی حضور ناقل آن در ایران و شناسایی دیگر میزبان‌های احتمالی آن در جریان است.

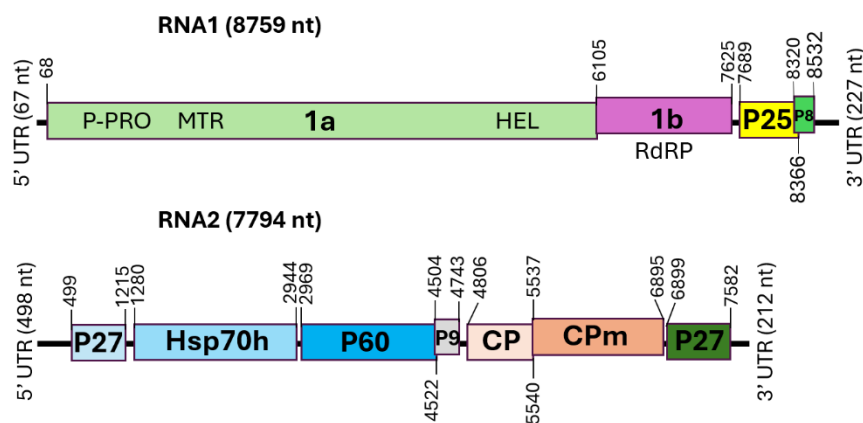
کرینی‌ویروس ۳ و ۴ توت‌فرنگی

توالی ناقص ژنومی از دو کرینی‌ویروس از مریلند آمریکا به دست آمد که تلاش‌ها برای توالی‌یابی کامل ژنوم این دو ویروس فرضی تاکنون نتیجه‌بخش نبوده است، بنابراین اطلاق نام ویروس برای این دو قطعه ژنومی جای بحث دارد. این دو ویروس فرضی تاکنون از کانادا (Ding et al. 2016)، آمریکا (Díaz-Lara et al. 2021) و چین (Chen et al. 2018) و تنها از میزبان توت‌فرنگی گزارش شده‌اند. در ایران، این دو ویروس فرضی ابتدا با روش HTS در نمونه P1F ردیابی و سپس با آغازگرهای اختصاصی با روش RT-PCR تایید شد. این دو توالی در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه با HTS حضور داشتند. **ScRV-3** از استان کردستان و استان‌های شمالی کشور و **ScRV-4** تنها

ویروس توت‌فرنگی کردستان

این ویروس ابتدا با روش HTS در نمونه P1F ردیابی شد و سپس در تمام نمونه‌های تست شده با HTS حضور داشت. SKV از لحاظ مولکولی تعیین مشخصات شد و نشان داد که این ویروس دارای ژنومی به طول ۱۶۵۳۳ است که در دو قطعه ژنومی قرار گرفته است (Hajizadeh et al. 2025). RNA1 شامل ۸۷۵۹ نوکلئوتید طول که دارای ۶۷ نوکلئوتید ناحیه غیرقابل ترجمه (UTR) در قسمت ۵' و ۲۴۰ نوکلئوتید در قسمت ۳' می‌باشد. RNA2 شامل ۷۵۶۰ نوکلئوتید طول با ۴۷۰ نوکلئوتید در 3'UTR و ۲۱۲ نوکلئوتید در 5'UTR می‌باشد. ژنوم SKV تمام خصوصیات کرینی ویروس‌ها را دارا می‌باشد و به علاوه دارای یک ORF ۲۷ کیلودالتونی در ابتدای قطعه دوم ژنوم با نقشی نامشخص می‌باشد که این ویروس را از بقیه کرینی ویروس‌ها متمایز می‌کند (شکل ۳). در آنالیز تبارزایی بر اساس توالی آمینواسیدی پلیمرز، این ویروس در گروه دو کرینی ویروس‌ها قرار گرفت. همه اعضای گروه دو کرینی ویروس‌ها با *Bemisia tabaci* منتقل می‌شوند (Tzanetakis et al. 2004).

ولی ناقل بیولوژیکی برای این ویروس شناخته نشده است. به نظر می‌رسد که بدلیل همجواری کاشت توت‌فرنگی و کدوئیان در استان کردستان، OuMV در طی زمان از این میزبان‌ها به توت‌فرنگی منتقل و توانایی آلوده سازی توت‌فرنگی را پیدا کرده باشد (Hajizadeh & Ghaderi Zandan 2025). این ویروس در کدوئیان علائمی مانند کلروز، نکروز، بدشکلی در میوه ایجاد می‌کند و باعث کاهش معنی‌داری در عملکرد می‌شود ولی توانایی ایجاد علائم در توت‌فرنگی نیاز به بررسی بیشتر دارد چون همه نمونه‌های آلوده به OuMV به ویروس یا ویروس‌های دیگر آلوده بودند. برای مثال، نمونه SA2 (شکل ۱) که آلوده به OuMV و دارای علائم کلروز بود، همزمان به ویروس‌های SCV، SMoV، SCrV-3 و SPaV نیز آلوده بود. همچنین یک duplex-PCR برای ردیابی این ویروس همزمان با کنترل داخلی NADH بهینه و مورد استفاده قرار گرفت (Hajizadeh & Ghaderi Zandan 2025). با این روش از ۶۰ نمونه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان کردستان، شش نمونه به OuMV آلودگی نشان دادند.



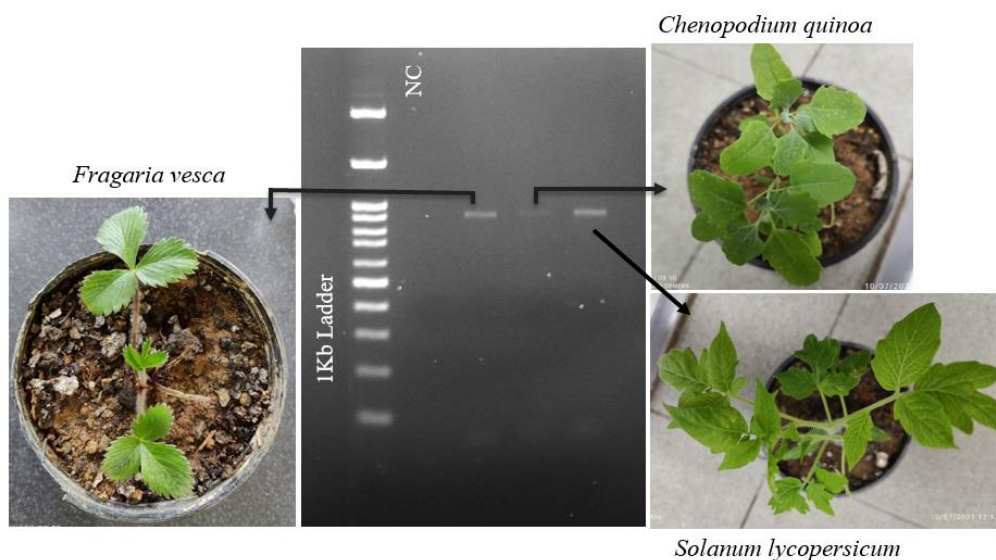
شکل ۲. ساختار ژنومی ویروس توت‌فرنگی کردستان. شماره توالی نوکلئوتیدی شروع و پایان هر ORF نشان داده شده و نام هر پروتئین رمزگذاری شده نیز

در داخل جعبه‌ها نشان داده شده است (Hajizadeh et al. 2025).

Fig 2. Genome organization of the strawberry Kurdistan virus (SKV). The start and end coordinates of the ORFs (boxes) are shown. The names of putative proteins and/or motifs are listed within each reading frame. P-PRO: proteinase, MT: methyltransferase, HEL: helicase, RdRP: RNA-dependent RNA polymerase, Hsp70h: heat shock protein 70 homologue, CPh: coat protein homolog, CP: coat protein, CPm: minor coat protein (Hajizadeh et al. 2025).

تمامی سفیدبالک‌ها با حشره‌کش از بین رفتند و گیاهان به مدت یک ماه در داخل قفسه نگهداری شدند و سپس با RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی ویروس مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج حاکی از انتقال ویروس به گیاهان مورد مطالعه داشت (شکل ۳). با توجه به انتقال یکی از ویروس‌های گروه دو کرینی ویروس‌ها، ویروس کلروز گوجه‌فرنگی (*tomato chlorosis virus*, TCV)، با سفیدبالک گلخانه و در دسترس بودن کلون خالص آن، انتقال SKV توسط این حشره به میزبان‌های اشاره شده انجام شد که نتایج موفقیت‌آمیز نبود. پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که SKV مانند TCV با سفیدبالک گلخانه منتقل نمی‌شود. احتمالاً SKV مانند همه کرینی ویروس‌های گروه دو توسط *B. tabaci* منتقل می‌شود ولی مطالعات بیشتری برای تعیین نوع بیوتیپ سفیدبالک انتقال دهنده آن لازم است.

در ادامه پژوهش برای ردیابی این ویروس یک duplex-PCR بهینه شد که همزمان کنترل داخلی را نیز تکثیر می‌داد (Hajizadeh et al. 2025). با این روش، SKV در ۶۵ درصد از نمونه‌های مورد مطالعه از استان کردستان و استان‌های شمالی کشور ردیابی شد ولی تلاش برای ردیابی این ویروس در آمریکا با بررسی ۸۲۸ نمونه از چندین ایالت موفقیت‌آمیز نبود. گونه‌های جنس کرینی ویروس با گونه‌های مختلف سفیدبالک منتقل می‌شوند و پیش‌بینی می‌شد که این ویروس هم با سفیدبالک قابل انتقال باشد. به این منظور، گیاهان حاوی سفیدبالک از مزارع توت‌فرنگی جمع‌آوری شدند و با آغازگرهای اختصاصی این ویروس مورد بررسی قرار گرفتند. سفیدبالک از گیاهان آلوده جمع‌آوری و در داخل یک قفسه توری به برخی گیاهان شامل توت‌فرنگی رقم وسکا (*Fragaria vesca*)، سلمه‌تره (*Chenopodium quinoa*) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) منتقل شدند. بعد از دو روز



شکل ۳. نتایج RT-PCR از ردیابی ویروس SKV در گیاهان مایه‌زنی شده با سفیدبالک‌های جمع‌آوری شده از مزارع توت‌فرنگی یک ماه بعد از مایه‌زنی. NC:

گیاه توت‌فرنگی رقم وسکا بدون مایه‌زنی توسط سفیدبالک.

Fig 3. RT-PCR results of SKV detection on inoculated plants using collected whiteflies of strawberry fields a month after inoculation.

NC: *Fragaria x ananassa* var. *vesca* without inoculation.

ویروس ۴ توت‌فرنگی

این ویروس ابتدا با روش HTS در نمونه KM ردیابی شد و سپس با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای آن با روش RT-PCR تایید شد. StrV-4 متعلق به جنس *Deltanucleorhabdovirus* است و ارتباط نزدیکی (حدود ۷۰ درصد تشابه نوکلئوتیدی) با StrV-3 دارد. StrV-4 با شماره دسترسی PQ848120 در ژن‌بانک ثبت شد. در یک بررسی دیگر، ۸۶ نمونه از ایالت اورگون کشور آمریکا برای حضور این ویروس تست شدند که تعداد ۱۳ نمونه به این ویروس آلوده بودند.

ویروس ۵ توت‌فرنگی

این ویروس نیز همراه با StrV-4 ابتدا با روش HTS در نمونه KM شناسایی و سپس با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای آن با روش RT-PCR تایید شد. StrV-5 از دو نمونه مجزا از ایران و آمریکا که همزمان برای HTS ارسال شده بودند، ردیابی شد. StrV-5 متعلق به جنس *Betanucleorhabdovirus* است و بیشترین تشابه نوکلئوتیدی با *Betanucleorhabdovirus picridis* دارد. توالی این ویروس با شماره دسترسی PV933990 در ژن‌بانک ثبت شد. گزارش این ویروس با نام پیشنهادی *Betanucleorhabdovirus kurdistanfragariae* همراه با ویروس ۴ توت‌فرنگی با نام پیشنهادی *Deltanucleorhabdovirus kurdistanfragariae* و ۳۰ ویروس جدید دیگر متعلق به خانواده *Rhabdoviridae* از میزبان‌های مختلف از چندین کشور در قالب یک مقاله در حال انتشار است (Boterman et al. 2026).

پولروویروس ۲ توت‌فرنگی

این ویروس ابتدا با روش HTS در نمونه SK ردیابی شد و سپس با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای آن با RT-PCR تایید شد. این

ویروس بر اساس توالی‌یابی به دست آمده آن که نزدیک به توالی کامل ویروس است و معیارهای تفکیک جنس پولروویروس‌ها، یک گونه ویروسی جدید در جنس *Polerovirus* و خانواده *Solemoviridae* قرار می‌گیرد. این ویروس با SPV-1 که نزدیک‌ترین گونه ویروسی به آن است، ۵۶ درصد تشابه نوکلئوتیدی دارد.

آلودگی‌های مخلوط ویروس‌های توت‌فرنگی

در اغلب نمونه‌های مورد مطالعه چندین ویروس ردیابی شد. از آنجایی که در طی سالیان مختلف از نمونه‌های متفاوتی برای بررسی حضور ویروس‌ها استفاده شده بود، امکان ارزیابی میزان آلودگی مخلوط آن‌ها وجود نداشت. در نتیجه، برای ارزیابی میزان آلودگی مخلوط در نمونه‌های مورد مطالعه، ۴۲ نمونه بصورت تصادفی که مواد گیاهی و یا cDNA آن‌ها در دسترس بود انتخاب و آلودگی آن‌ها با پنج ویروس SCV، SMoV، SPaV، SCrV-3 و SCrV-4 مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۴). نتایج RT-PCR نشان داد که ۳۱ نمونه به بیش از یک ویروس آلوده بودند. از ۲۴ ترکیب ممکن از پنج ویروس مورد بررسی (بدون حضور سایر ویروس‌ها)، ۱۱ ترکیب ویروس در نمونه‌های مورد مطالعه وجود داشت که ترکیب دوگانه در ۱۳ نمونه، ترکیب سه‌گانه در ۱۱ نمونه و ترکیب چهارگانه در هفت نمونه مشاهده شد. ترکیب SCV + SCrV-3 در شش نمونه با هم حضور داشتند که بیشترین ترکیب آلودگی مخلوط در نمونه‌ها در مقایسه با سایر ترکیب ویروسی بود. پس از آن، ترکیب SCV + SMoV + SCrV-3 در پنج نمونه، SCV + SMoV + SCrV-3 و SCV + SMoV + SPaV + SCrV-3 در چهار نمونه با هم حضور داشتند. بیشترین ترکیب ویروسی در استان کردستان، SCV + SMoV + SCrV-3 و در استان‌های شمالی کشور، SCV + SCrV-3 در پنج گیاه بود. ارتباطی بین نوع علائم ایجاد شده و نوع ترکیب ویروسی آلوده کننده این گیاهان پیدا نشد.

جدول ۴. نمونه‌های توت‌فرنگی با آلودگی مخلوط به چند ویروس، جمع‌آوری شده از در استان کردستان و استان‌های شمالی ایران

Table 4. Strawberry samples with mixed infection with several viruses collected from Kurdistan and northern provinces of Iran

Row	Sample	Cultivar	Region	Virus					Symptoms ¹
				SCV	SMoV	SpaV	SCrV-3	SCrV-4	
1	P1F	Paros	Kurdistan	+		+	+	+	C, D, Mo
2	SB	Paros	Kurdistan		+	+	+		NS
3	SSA2	Paros	Kurdistan	+		+			D, LD
4	SpF3	Paros	Kurdistan		+				NS
5	PA	Paros	Kurdistan	+	+		+		LMC, LD
6	SAm	Paros	Kurdistan	+	+				D, Mo, LD
7	SS2	Paros	Kurdistan		+	+	+		MN, Y
8	QEM	Queen Elisa	Kurdistan	+		+			M, D
9	K5	Paros	Kurdistan	+	+				LD, Y
10	K6	Paros	Kurdistan	+	+		+		NS
11	ST	Kurdistan	Kurdistan	+	+		+		D, LD
12	5A2	Queen Elisa	Kurdistan	+			+		Mo, D
13	PM2	Paros	Kurdistan	+		+	+	+	M, LC
14	Ngh	Paros	Kurdistan	+	+	+			LC, VB, FD
15	Ka	Kurdistan	Kurdistan	+	+		+	+	M, LD
16	KM	Kurdistan	Kurdistan	+	+		+		M, D, FD
17	P3	Paros	Kurdistan	+	+		+		Y, LD, LC
18	7G	Camarosa	Kurdistan	+	+				Y, LC
19	Z1	Ventana	Kurdistan		+				NS
20	PM3	Paros	Kurdistan	+			+	+	M, Y, VB
21	SD	Paros	Kurdistan	+	+	+	+		D, Y, LMC
22	P2	Paros	Kurdistan		+	+			M, Y, Mo
23	K10	Ventana	Kurdistan	+	+	+	+		M, Y, FD
24	Gisi2	Queen Elisa	North	+	+	+	+		M, LD, LMC
25	Goa	Camarosa	North	+	+	+	+		M, P
26	Mba1	Camarosa	North	+	+				NS
27	God2	Camarosa	North		+	+	+		D, Y, LMC
28	Qash2	Camarosa	North	+					LC, LD
29	Mbh2	Camarosa	North	+		+	+		Mo, LMC
30	Gor2	Camarosa	North	+			+		M, Y, Mo
31	Givi2	Camarosa	North	+			+		NS
32	Qah1	Camarosa	North	+			+		Mo, LMC
33	Qah2	Camarosa	North	+					Mo, LMC
34	Givi1	Camarosa	North	+					D, LC
35	Qah1	Camarosa	North	+					LMC, Y
36	Mab2	Camarosa	North	+			+		NS
37	Gor1	Camarosa	North	+			+		M, Y, Mo
38	Goa2	Camarosa	North						M
39	Qash1	Camarosa	North				+		P
40	Mbh1	Camarosa	North						Mo, LC
41	God1	Camarosa	North						NS
42	Gisi	Queen Elisa	North		+				M, LD, LMC

¹ M: Mosaic, Y: Yellowing, VB: Vein Banding, LD: Leaf Deformation, LC: Leaf Curl, Fruit Deformation, D: Dwarf, Mo: Mottle, LMC: Leaf margin Scorch, P: Pallidosis, NS: Non Symptoms.

بحث

تا قبل از این پژوهش‌ها، اطلاعات محدودی در مورد ویروس‌های آلوده کننده توت‌فرنگی در ایران در دسترس بود و تنها محدود به پژوهش نصیری‌نیا و همکاران (۱۳۹۵) بود (Nasirinia et al. 2016). در آن پژوهش، هفت ویروس شامل *ArMV*, *RpRSV*, *SLRSV*, *SCV*, *SMoV*, *SMYEV* و *ToRSV* با روش سرولوژیک الایزا ردیابی شدند که تنها دو ویروس *SMYEV* و *SMoV* با روش مولکولی نیز تایید شدند. در پژوهش‌های ما، حضور برخی از این ویروس‌ها شامل *SLRV*, *RpRSV*, *ArMV* و *ToRSV* که تنها با روش سرولوژیک الایزا ردیابی شده‌اند، با هیچکدام از روش‌های *HTS* و *RT-PCR* ردیابی نشدند. باید ذکر کرد که از بین نمونه‌های تست شده با *HTS* تنها یک نمونه از شمال کشور بود و بقیه نمونه‌ها از استان کردستان بودند و ارزیابی نمونه‌های بیشتری برای اطمینان از عدم حضور این ویروس‌ها لازم است. *SMYEV* که با هر دو روش مولکولی و سرولوژیکی در شمال کشور ردیابی شده بود، در پژوهش‌های ما ردیابی نشد. بر اساس اطلاعات موجود، بخش عمده نشاهای توت‌فرنگی مورد استفاده در شمال کشور از استان کردستان تامین می‌شود لذا، به نظر می‌رسد که این تفکیک جغرافیایی برای حضور ویروس‌ها چندان معنی‌دار نباشد.

اغلب ویروس‌های ردیابی شده از توت‌فرنگی در ایران، میزان آلودگی بالایی در بین نمونه‌های مورد مطالعه نشان دادند (جدول ۲). هر چند بخش عمده نمونه‌های مورد بررسی دارای علائم مشکوک به آلودگی ویروسی بودند و این میزان درصد آلودگی را نمی‌توان به پراکنش این ویروس‌ها تعمیم داد. از طرف دیگر، با توجه به اینکه اغلب ویروس‌های شناخته شده در این ایران دارای ناقل هوازاد هستند و ناقلین این ویروس‌ها شامل شته‌ها یا سفیدبالک‌ها در مزارع توت‌فرنگی کشور ((Hajizadeh 2018) و مشاهدات مزرعه‌ای) شناسایی شده‌اند، گیاهان سالم نیز در طی فصل زراعی آلوده خواهند شد. از

آنجایی که تمام ویروس‌های ردیابی شده محدود به جنس فراگاریا هستند و ناقل آن‌ها نیز رابطه تکثیری با ویروس ندارد، سالم‌گزینی مواد تکثیری توت-فرنگی در نهالستان‌ها به عنوان اولین قدم می‌تواند راهکار مناسبی برای کاهش آلودگی باشد. در بررسی نتایج ردیابی ویروس‌های مختلف بخصوص *SCV* و *SMoV* که بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند، افزایش درصد آلودگی در نمونه‌های مورد مطالعه در طی چند سال مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشده-اند) که می‌تواند چند دلیل عمده داشته باشد. دلیل اول، انتشار نشاهای آلوده به ویروس‌های مختلف توت‌فرنگی توسط نهالستان‌ها به دلیل عدم سالم-گزینی نشاها می‌باشد. دلیل دوم، حضور ناقلین این ویروس‌ها در مزارع توت-فرنگی که باعث انتشار آلودگی از گیاهان آلوده به سالم می‌شوند و دلیل سوم، عدم مدیریت صحیح این ویروس‌ها در این ده سال که باعث گسترش آلودگی شده‌اند و به نظر می‌رسد که در سالیان آتی نمود بیشتری پیدا خواهد کرد. مطالعه تبارزایی و تنوع ژنتیکی سایر ویروس‌های ردیابی شده از ایران از جمله *SCV* و *SMoV* نشان داد که این ویروس‌ها قدمت خیلی زیادی در ایران ندارند و بعید نیست که این ویروس‌ها در آلودگی مخلوط به ایران به دلیل قرنطینه ناکارآمد وارد شده و گسترش یافته باشند. در این پژوهش‌ها سعی شد بهینه‌سازی روش *PCR* برای ردیابی ویروس‌های ردیابی شده با استفاده از آغازگرهای منتشر شده و یا طراحی آغازگرها بر اساس جدایه‌های ایرانی، انجام گیرد. این روش‌های بهینه شده برای ردیابی این ویروس‌ها در کارهای تحقیقاتی و صدور گواهی سلامت نشاها کمک شایانی خواهند کرد. آلودگی مخلوط ویروس‌ها در گیاهان مختلف از جمله کاساوا (Jacobson et al. 2018)، کدوئیان (Mohammadi et al. 2016)، سیب‌زمینی (Hameed et al. 2014)، توتون (Liu et al. 2014) و توت‌فرنگی (Diaz-Lara et al. 2021. Fránová et al. 2019. Martin & Tzanetakakis 2006. Martin et al. 2004. Silva-Rosales et al. 2013. Thompson et al. 2003) گزارش شده است و در توت‌فرنگی ثابت شده که آلودگی مخلوط

همچنین با توجه به کشف چندین گونه ویروسی جدید از توت‌فرنگی در ایران، تعیین مشخصات مولکولی و بیولوژیکی آن‌ها و همچنین ارزیابی میزان ریسک آن‌ها برای توت‌فرنگی باید مورد توجه قرار گیرد که برخی از این پژوهش‌ها در جریان هستند.

تعارض منافع

در انجام مطالعه حاضر، هیچ‌گونه تضاد منافع وجود ندارد.

موازن اخلاقی

در انجام این پژوهش تمامی موازن و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش‌ها با حمایت بنیاد علم ایران، پروژه آرشیو جهانی ویروس اروپا (EVA-GLOBAL)، دانشگاه کردستان و جهاد کشاورزی استان کردستان انجام شده است. همچنین از دکتر ایگور کولونوئیک (انستیتو بیولوژی مولکولی گیاهی، کشور چک)، دکتر یانیس تزانتاکیس (دانشگاه آرکانزاس آمریکا) و تمامی دانشجویانی که به نحوی در اجرای این پژوهش‌ها نقش داشته‌اند، قدردانی می‌شود.

ویروس‌های شته‌زاد با ویروس‌های الفا‌کننده علایم پالیدوسیس در توت-فرنگی باعث شدت علایم می‌شوند و رابطه هم‌افزایی دارند (Martin & Tzanetakis 2006). در اغلب موارد، آلودگی منفرد در توت‌فرنگی علایمی را ایجاد نمی‌کند (Fránová et al. 2021. Martin & Tzanetakis 2006) اما ممکن است باعث کاهش عملکرد شود (Valentová et al. 2022). در مورد ویروس‌های توت‌فرنگی، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه سازوکارهای مولکولی افزایش شدت علایم در اثر آلودگی مخلوط، نقش ارقام و ناقلین در این سازوکارها انجام نشده است. میانگین عملکرد پایین توت-فرنگی در ایران به نسبت به کشورهای دارای رتبه‌های برتر در تولید توت-فرنگی (Hajizadeh & Ghaderi Zandan 2021), Figure 1)) می‌تواند ناشی از آلودگی‌های وسیع و مخلوط ویروس‌های آن در ایران باشد. با توجه به حضور ویروس‌های مختلف در توت‌فرنگی در کشور و آلودگی مخلوط آن‌ها با هم، ارزیابی ارقام مختلف در حال کشت در ایران شامل پاروس، کاماروزا، کوئین الیزا، ونتانا، سابربنا، آلبیون و کردستان نسبت به تحمل به این ویروس‌ها در آلودگی‌های تکی و چندگانه، اثر متقابل این ویروس‌ها در آلودگی‌های مخلوط، تعیین پراکنش این ویروس‌ها در ایران، بررسی کارایی ناقلین موجود در منطقه در انتقال ویروس‌ها و مطالعه حضور سایر ویروس‌ها در مزارع توت‌فرنگی در ایران ضروری به نظر می‌رسد.

References

- Anonymous. (2023). *Agricultural statistics of Iran* (Vol. Vol. 3). Information Technology Center of the Ministry of Agricultural Jihad.
- Bonneau, P., Hogue, R., Tellier, S., & Fournier, V. (2019). Evaluation of various sources of viral infection in strawberry fields of Quebec, Canada. *Journal of Economic Entomology*, 112, 2577-2583. [Link]
- Boterman, M., de Koning, P. P. M., Westenberg, M., & Adams, I. P. (2026). Expanding insights into plant rhabdovirus diversity through the discovery of viruses representing 32 putative novel species. *Archives of Virology*, 171, 156. [Link]
- Chen, D., Ding, X., Wang, A., Zhang, J., & Wu, Z. (2018). First report of strawberry crinivirus 3 and strawberry crinivirus 4 on strawberry in China. *New Disease Reports*, 37, 24. [Link]
- Conci, V. C., Luciani, C. E., Celli, M. G., Perotto, M. C., & Torrico, A. K. (2017). Advances in characterization and epidemiology of strawberry viruses and phytoplasmas in Argentina. *Acta Horticulturae*, 1156, 801-809. [Link]
- Cultrona, M., Bonini, N., Margaria, P., Menzel, W., Pacifico, D., & Tessitori, M. (2024). First Report of Strawberry Polerovirus 1 in Strawberry in Italy. *Plant Disease*, 108(4), 1122. [Link]
- Diaz-Lara, A., Stevens, K. A., Klaassen, V., Hwang, M. S., & Al Rwahnih, M. (2021). Sequencing a strawberry germplasm collection reveals new viral genetic diversity and the basis for new RT-qPCR assays. *Viruses*, 13(8), 1442. [Link]
- Ding, X., Li, Y., Hernández-Sebastià, C., Abbasi, P. A., Fisher, P., & Celetti, M. J. (2016). First report of strawberry crinivirus 4 on strawberry in Canada. *Plant Disease*, 100, 1254. [Link]

- Foissac, X., Savalle-Dumas, P., Dulucq, M. J., Gentit, M. J., & Candresse, T. (2000). Polyvalent detection of fruit tree tricho-, capillo- and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine-containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 550, 37-43. [Link]
- Fránová, J., Lenz, O., Příbylová, J., Čmejla, R., Valentová, L., & Koloniuk, I. (2021). High Incidence of Strawberry Polerovirus 1 in the Czech Republic and Its Vectors, Genetic Variability and Recombination. *Viruses*, 13(12), 2487. [Link]
- Fránová, J., Příbylová, J., & Koloniuk, I. (2019). Molecular and biological characterization of a new strawberry cytorhabdovirus. *Viruses*, 11(11), 982. [Link]
- Frazier, N. W., & Stubbs, L. L. (1969). Pallidosis - A new virus disease of strawberry. *Plant Disease Reports*, 53, 524-526.
- Freeman, J. A., & Mellor, F. C. (1962). Influence of latent viruses on vigor, yield and quality of British Sovereign strawberries. *Canadian Journal of Plant Science*, 42, 602-610. [Link]
- Ghaderi Zandan, N., & Hajizadeh, M. (2019). Molecular identification of Strawberry mottle virus in strawberry fields of Kurdistan Province based on the 3' NCR. *Applied Entomology and Phytopathology*, 87(1), 107-116.
- Ghaderi Zandan, N., Hajizadeh, M., & Koloniuk, I. (2022). First report of strawberry pallidosis-associated virus infecting strawberry from Iran. *Journal of Plant Pathology*, 104, 813. [Link]
- Gholamalizadeh, R., Vahdat, A., Hossein-Nia, S. V., Elahinia, A., & Bananej, K. (2008). Occurrence of ourmia melon virus in the Guilan province of northern Iran. *Plant Disease*, 92, 1135. [Link]
- Hajizadeh, M. (2018). Molecular Detection and Phylogenetic Determinant of Strawberry crinkle virus in strawberry fields of Kurdistan Province based on the partial polymerase gene sequences. *Applied Research Plant Protection*, 7(2), 96-105.
- Hajizadeh, M., Amirnia, F., Srivastava, A., & Tzanetakis, I. E. (2024). First Report of Strawberry Virus 3 Infecting Strawberry in Iran. *Plant Disease*, 108, 539. [Link]
- Hajizadeh, M., & Ghaderi Zandan, N. (2021). Iranian Strawberry crinkle cytorhabdovirus variation assessed using its movement protein (P3) gene. *Molecular Biology Reports*, 48(10), 7035-7040. [Link]
- Hajizadeh, M., & Ghaderi Zandan, N. (2025). Strawberry, a new natural host for ourmia melon virus. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 132, 168. [Link]
- Hajizadeh, M., Ghaderi Zandan, N., Kashiha, Z., & Koloniuk, I. (2022). First report of strawberry crinivirus 3 and strawberry crinivirus 4 in strawberry in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 104, 825. [Link]
- Hajizadeh, M., Ghaderi Zandan, N., Koloniuk, I., Sierra-Mejia, A., & Tzanetakis, I. E. (2025). Characterization, detection, and prevalence of a novel strawberry crinivirus. *Plant Disease*, 109(5), 988-991. [Link]
- Hameed, A., Iqbal, Z., Asad, S., & Mansoor, S. (2014). Detection of multiple potato viruses in the field suggests synergistic interactions among potato viruses in Pakistan. *Plant Pathology Journal*, 30, 407-415. [Link]
- Jacobson, A. L., Duffy, S., & Sseruwagi, P. (2018). Whitefly-transmitted viruses threatening cassava production in Africa. *Current Opinion in Virology*, 33, 167-176. [Link]
- Jones, S., Baizan-Edge, A., MacFarlane, S., & Torrance, L. (2017). Viral diagnostics in plants using next-generation sequencing: computational analysis in practice. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1770. [Link]
- Koloniuk, I., Fránová, J., Sarkisova, T., & Příbylová, J. (2018). Complete genome sequences of two divergent isolates of strawberry crinkle virus coinfecting a single strawberry plant. *Archives of Virology*, 163(9), 2539-2542. [Link]
- Lisa, V., Milne, R. G., Accotto, G. P., Boccardo, G., & Caciagli, P. (1988). Ourmia melon virus, a virus from Iran with novel properties. *Annals of Applied Biology*, 112, 291-302. [Link]
- Liu, F., Tan, G., Li, X., Chen, H., Li, R., & Li, F. (2014). Simultaneous detection of four causal agents of tobacco bushy top disease by a multiplex one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 205, 99-103. [Link]
- Luciani, C. E., Celli, M. G., Merino, M. C., Perotto, M. C., Pozzi, E., & Conci, V. C. (2016). First Report of Strawberry polerovirus 1 in Argentina. *Plant Disease*, 100(7), 1510. [Link]
- Martin, R. R., & Tzanetakis, I. E. (2006). Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Disease*, 90, 384-396. [Link]
- Martin, R. R., Tzanetakis, I. E., Barnes, J. E., & Elmhirst, J. F. (2004). First report of Strawberry latent ringspot virus in strawberry in USA and Canada. *Plant Disease*, 88, 575. [Link]
- Medberry, A., & Tzanetakis, I. E. (2022). Identification, characterization, and detection of a novel strawberry cytorhabdovirus. *Plant Disease*, 106(11), 2784-2787. [Link]
- Medberry, A. N., Srivastava, A., Diaz-Lara, A., Rwahnihi, M. A., Villamor, D. E. V., & Tzanetakis, I. E. (2023). A novel, divergent member of the Rhabdoviridae family infects strawberry. *Plant Disease*, 107, 620-623. [Link]
- Mohammadi, K., Hajizadeh, M., & Koolivand, D. (2016). Detection and identification of four vegetable fruit viruses in west and northwest of Iran. *Iranian Journal Plant Pathology*, 52, 279-288.
- Moyer, C., Whitaker, V. M., & Peres, N. A. (2010). Viral Diseases of Strawberries. *PP273*. [Link]
- Nasirinia, G. H., Pourrahim, R., Elahinia, S. A., Rouhibakhsh, A., & Farzadfar, S. (2016). Incidence of important strawberry virus diseases in Guilan and Mazandaran Provinces. *Applied Entomology and Phytopathology*, 84(1), 31-42.
- Ogilvie, L., Swarbrick, T., & Thompson, C. R. (1934). A note on a strawberry disease resembling the American crinkle. *Long Ashton Research Station Report for 1933*, 96-97.
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutierrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, I., & Boonham, N. (2017). Next-generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: comparison of two approaches. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1998. [Link]
- Prentice, I. W., & Harris, R. V. (1946). Resolution of strawberry virus complexes by means of the aphid vector *Capitophorus fragariae* Theb. *Annals of Applied Biology*, 33, 50-53. [Link]
- Qin, Y., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, L., & Zhang, S. (2007). Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. *Biotechnology Advances*, 26, 219-232. [Link]

- Rastgou, M., Koohi Habibi, M., Izadpanah, K., Mosahebi, G. H., Milne, R. G., & Turina, M. (2010). Biological characterization of Ourmia melon virus, incidence of the virus in few provinces of Iran and assessment of local and commercial summer squashes and cucumbers response to virus. *Journal of Iranian Plant Protection Science*, 41, 217-224.
- Silva-Rosales, L., Vázquez-Sánchez, M. N., Gallegos, V., Ortiz-Castellanos, M. L., & Rivera-Bustamante, R. (2013). First report of *Fragaria chiloensis* cryptic virus, *Fragaria chiloensis* latent virus, Strawberry mild yellow edge virus, Strawberry necrotic shock virus, and Strawberry pallidosis associated virus in single and mixed infections in strawberry in central Mexico. *Plant Disease*, 97, 1002. [Link]
- Sylvester, E. S., Richardson, J., & Frazier, N. W. (1974). Serial passage of strawberry crinkle virus in the aphid *Chaetosiphon jacobi*. *Virology*, 59(1), 301-306. [Link]
- Thekke-Veetil, T., & Tzanetakis, I. E. (2016). First Report of Strawberry polerovirus-1 in Strawberry in the United States. *Plant Disease*, 104, 867. [Link]
- Thompson, J. R., Wetzel, S., Klerks, M. M., Vaskova, D., & Schoen, C. D. (2003). Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA-specific internal control. *Journal of Virological Methods*, 111, 85-93. [Link]
- Tzanetakis, I. E., Halgren, A. B., Keller, K. E., Hokanson, S. C., Maas, J. L., McCarthy, P. L., & Martin, R. R. (2004). Identification and detection of a virus associated with strawberry pallidosis disease. *Plant Disease*, 88, 383-390. [Link]
- Valentová, L., Rejlová, M., Fránová, J., & Cmejla, R. (2022). Symptomless infection by strawberry virus 1 (StrV-1) leads to losses in strawberry yields. *Plant Pathology*, 71, 1220-1228. [Link]
- Xiang, Y., Bernardy, M., Bhagwat, B., Wiersma, P. A., DeYoung, R., & Bouthillier, M. (2015). The complete genome sequence of a new polerovirus in strawberry plants from eastern Canada showing strawberry decline symptoms. *Archives of Virology*, 160(2), 553-556. [Link]
- Yan, B., Lu, M., Han, J., Cao, Y., Yan, F., & Song, X. (2025). Molecular insights and diagnostic advances in strawberry-infecting viruses. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1655696. [Link]