

شناسایی مولکولی سه گونه ویروس در مزارع گوجه فرنگی استان آذربایجان شرقی

داود کولیوند^{۱*}، نعمت سخندان بشیر^۲، شهین صبحی^۳ و مینا راستگو^۴

۱- استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تبریز.

۴- استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه.

*مسئول مکاتبه Koolivand@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۴

چکیده

آلودگی به ویروس های شایع مزارع گوجه فرنگی شامل *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)، *Tomato mosaic virus* (ToMV) و *Tobacco mosaic virus* (TMV) در آذربایجان شرقی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۲۰۵ نمونه دارای علائم موزاییک، کوتولگی، نکروز، باریک شدن، بدشکلی برگ‌ها و میوه‌ها جمع‌آوری و از نظر بررسی علائم، مورد مطالعات گلخانه‌ای قرار گرفتند. سپس آزمون الایزا برای ردیابی CMV روی نمونه‌های مشکوک به آلودگی با این ویروس انجام پذیرفت. پس از استخراج RNA کل از نمونه‌های آلوده، RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی CMV، آغازگرهای عمومی جنس توسپوویروس یا توباموویروس با توجه به علایم ویروسی انجام شد. با بهینه سازی PCR از نظر دمای اتصال، قطعات تکثیر یافته‌ی مورد انتظار در تعداد ۶، ۳۷ و ۲۳ نمونه به ترتیب با آغازگرهای توسپوویروس، توباموویروس یا CMV حاصل شد. پروفیل برش آنزیمی با *HindIII*، *EcoRI* و *XbaI* روی قطعات تکثیر یافته با آغازگرهای توسپوویروس از تعداد شش نمونه نشان داد که هویت ویروس در همه‌ی آنها TSWV بود. همسانه سازی و تعیین توالی این قطعات نیز ماهیت TSWV بودن جدایه‌ها را تایید نمود. قطعات DNA تکثیر یافته با آغازگرهای توباموویروس با *TaqI* برش داده شدند که طبق پروفیل برشی، آلودگی به ToMV در ۳۷ نمونه محرز شد در حالی که TMV در هیچیک از نمونه‌ها پیدا نشد. برش محصول PCR حاصل از آغازگرهای CMV با آنزیم *MspI* هم نشان داد که جدایه‌های CMV متعلق به زیر گروه I این ویروس بودند. همچنین، نتایج گویای فراوانی بیشتر آلودگی با CMV و ToMV در نمونه‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی، ویروس موزاییک خیار، ویروس موزاییک گوجه فرنگی، ویروس موزاییک توتون.

مقدمه

ویروس موزاییک خیار^۳، ویروس وای سیب زمینی^۴، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی^۵، ویروس بی بذری گوجه فرنگی^۶ و ویروس موزاییک آرابیس می-باشند (معصومی و همکاران ۲۰۰۹). ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی گونه‌ی تیپ جنس توسپوویروس در خانواده بنیاویریده است که بدلیل وارد آوردن خسارت

سطح زیر کشت گوجه فرنگی در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ در استان آذربایجان شرقی ۵۸۷۹ هکتار و میزان تولید آن ۲۷۴۶۴۹ تن برآورد شده است (بی نام ۱۳۹۴). بیش از ۲۵ گونه ویروس آلوده کننده‌ی گوجه فرنگی در سطح دنیا گزارش شده است که تعدادی از آنها شامل ویروس موزاییک توتون^۱، ویروس موزاییک گوجه فرنگی^۲،

³Cucumber mosaic virus

⁴Potato virus Y

⁵Tomato spotted wilt virus

⁶Tomato aspermy virus

¹Tobacco mosaic virus

²Tomato mosaic virus

شرایط آب و هوایی متنوع از اکثر محصولات کشاورزی گزارش گردیده است. همچنین، گزارشاتی مبنی بر آلودگی با این ویروس در شمال غرب ایران وجود دارد (سخندان و همکاران ۲۰۰۶، ۲۰۰۸) که بر اساس آن جدایه‌های این ویروس برای اولین بار به روش‌های سرولوژیک و مولکولی در مناطقی از آذربایجان شرقی ردیابی شدند، اغلب جدایه‌های CMV در ردیابی شده در شمال غرب کشور متعلق به زیرگروه CMV I بوده اند (سخندان و همکاران ۲۰۰۸).

اطلاعات اندکی از وجود توسپوویروس در گوجه-فرنگی در مناطق کشت این محصول در شمال غرب ایران موجود است و اغلب مطالعات با تکیه بر علائم و روش‌های سرولوژیک و بدون ترادف یابی ژنومی بوده است. گزارشاتی نیز از وجود توسپوویروس‌ها از مناطق مختلف ایران در گوجه‌فرنگی و سایر میزبان‌ها مانند سیب‌زمینی، سویا و گیاهان زینتی بر اساس روش‌های سرولوژیک و گیاهان میزبان وجود دارد (بنانچ و همکاران ۱۹۹۶، محمدی و همکاران ۲۰۰۰، پور رحیم و همکاران ۲۰۰۱، گلنراقی و همکاران ۲۰۰۱، قطبی و همکاران ۲۰۰۵، حاجی آبادی و همکاران ۲۰۰۹ و ۲۰۱۲). با توجه به اینکه گوجه‌فرنگی در سطح وسیع در شمال غرب کشور از جمله استان آذربایجان شرقی کشت می‌شود و علایم آلودگی‌های ویروسی اغلب در این مزارع مشاهده می‌شوند، بررسی وضعیت آلودگی به ویروس‌های مهم آلوده‌کننده این محصول در منطقه از اهمیت فراوانی برخوردار است. بنابراین، هدف از این تحقیق ردیابی و شناسایی جدایه‌های توسپوویروس، توباموویروس و جدایه‌های جدید ویروس موزاییک خیار در مزارع گوجه‌فرنگی استان آذربایجان شرقی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

تعداد ۲۰۵ نمونه‌ی گیاهی از مزارع گوجه‌فرنگی استان آذربایجان شرقی (جدول ۱) بر اساس علائم ویروسی از قبیل موزاییک، بدشکلی برگ و میوه‌ها، نکروز برگ‌ها، وجود لکه‌های کلروزه و حلقوی و سایر علائم

اقتصادی و دامنه‌ی میزبانی وسیع، مطالعات گسترده‌ای روی آن انجام گرفته است (حسنی-مهربان و همکاران ۲۰۱۰). ذرات توسپوویروس چند وجهی و دارای RNA تک رشته‌ای سه قسمتی می‌باشند که M، L و S نامیده شده‌اند (سامپانا و همکاران ۲۰۰۵). ویروس‌های متعلق به این جنس در طبیعت توسط تریپس به صورت پایا و تکثیری منتقل می‌شوند (جونز ۲۰۰۵؛ ویت فیلد و همکاران ۲۰۰۵). TSWV در ایران، نخستین بار از میزبانهای اطلسی، توتون، چشم بلبلی، گل دکمه‌ای و خیار در منطقه ورامین گزارش شده است (بنانچ و همکاران ۱۹۹۶). ویروس لکه نکروز گل حنا^۱ (INSV) نیز دیگر ویروس جنس توسپوویروس است که اولین گزارش از آن روی گیاهان زینتی در منطقه محلات ورامین صورت گرفته است (قطبی و همکاران ۲۰۰۵).

علاوه بر توسپوویروس‌ها، توباموویروس‌ها با دامنه‌ی میزبانی وسیع منجر به خسارت اقتصادی فراوان در گوجه‌فرنگی و گیاهان زینتی در سراسر دنیا می‌شوند (آلونسو و همکاران ۱۹۸۹). ویروس موزاییک توتون عضو تیپ این جنس، گسترش جهانی داشته و منجر به بیماری در وارسته‌های وسیعی از گونه‌های گیاهی نظیر توتون، گوجه‌فرنگی و فلفل می‌شود (وینایارانی و همکاران ۲۰۱۱، زیتلین، ۲۰۰۰). ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی (ToMV) اولین بار توسط کلینتون در سال ۱۹۰۹ توصیف شد (هولینگز و هوتینگ ۱۹۷۶). ژنوم این ویروس متشکل از یک قطعه RNA خطی تک رشته‌ای ۶۳۹۵ نوکلئوتیدی، قطبیت مثبت، دارای کلاهک در انتهای ۵' و ساختار شبه t-RNA در انتهای ۳' است که حداقل ۴ پروتئین را رمز می‌کند (کینگ و همکاران ۲۰۱۲).

ویروس موزاییک خیار یکی از ویروس‌های شایع مزارع سبزی و صیفی جات است که اولین بار در سال ۱۹۱۶ به عنوان عامل موزاییک روی خیار و هندوانه از ایالت میشیگان آمریکا گزارش گردید (پالوکیاتیس و همکاران ۱۹۹۲). این ویروس در سراسر دنیا تحت

¹Iris necrotic spot virus

ویروسی جمع آوری شد. قسمتی از نمونه‌ها برای مایه-زنی روی گیاهان تشخیصی در گلخانه و بخشی دیگر برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت و قسمت باقی مانده از نمونه‌ها در فریزر نگهداری گردید.

جدول ۱- مناطق و تعداد نمونه‌های برداشت شده از مزارع گوجه فرنگی استان آذربایجان شرقی.

مناطق نمونه برداری	تعداد نمونه گیاهی
۲۰	خسروشهر
۹	ممقان
۷۴	گوگان و روستاهای زینب خاتون، قشلاق
۱۶	تازه کند
۳۲	بناب
۲۷	عجب شیر
۱۰	تبریز و باسمنج
۵	مراغه
۷	آذرشهر
۵	ملکان

مطالعات گلخانه‌ای

به منظور بررسی علائم ناشی از آلودگی ویروسی، میزبان‌های مختلف تشخیصی مانند گیاه سلمه تره (*Chenopodium amaranticolor*)، کدو مسمایی (*Cucurbita pepo* L)، گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) و توتون (*Nicotiana tabacum* cv White barley & Samsun) مایه-زنی شدند. سلمه تره به عنوان میزبان لکه موضعی به منظور خالص سازی بیولوژیکی ویروس‌های مذکور مورد استفاده قرار گرفت. کدو در مرحله‌ی دوبرگی (کوتیلدونی)، توتون در مرحله‌ی دو برگگی کامل، گوجه فرنگی چند روز پس از مرحله‌ی دو برگگی و در زمان بروز برگ‌های سوم و چهارم و سلمه تره در مرحله‌ی چهار برگگی مایه زنی گردید، بدین منظور از برگ نمونه مورد نظر در داخل هاون استریل سرد (نگهداری شده در فریزر) با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۷/۴ به نسبت یک به ده (یک گرم بافت گیاه در ده میلی لیتر بافر) عصاره گیری و مایه‌زنی توسط ایجاد زخم با پودر کاربراندوم انجام گرفت. در طی آزمایش، گیاهان تحت شرایط ۲۸-۲۲ درجه‌ی سانتی گراد، رطوبت

نسبی ۳۰ تا ۴۰ درصد و دوره‌ی نوری ۱۶:۸ ساعت تاریکی:روشنایی) نگهداری شدند.

ردیابی با آزمون سرولوژیکی

در تحقیق حاضر تنها نمونه های مشکوک به آلودگی با CMV با استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی این ویروس (شرکت DSMZ، آلمان) و با آزمون TAS-ELISA (Triple antibody sandwich ELISA) مطابق روش توصیف شده کروتز (۲۰۰۹) مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA

RNA کل از نمونه‌های برگگی آلوده طبق پروتکل روحانی و همکاران (۱۹۹۳) با اندکی تغییرات که قبلاً گزارش شده است (سخندان و همکاران، ۲۰۰۸) استخراج شد. مقدار ۱۰۰ میلی گرم بافت گیاهی در یک میلی لیتر بافر استخراج مورد استفاده قرار گرفت و در آخر پلت در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به حالت محلول در آورده و در ۲۰°C- تا آزمایشات بعدی نگهداری شد.

آغازگرها

جفت آغازگر عمومی اختصاصی ناحیه‌ی حفاظت شده ژن L پلی مرز توسپوویروس برای تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۸۱۹ جفت باز به کار رفت (چو و همکاران ۲۰۰۱). در جنس توباموویروس، از یک جفت آغازگر که مطابق با توالی رمزکننده‌ی پروتئین پوششی و انتهای 3' ترجمه نشونده جنس توباموویروس بود، استفاده گردید (لتسچرت و همکاران ۲۰۰۲). با این آغازگرها، تکثیر قطعه‌ای به طول تقریباً ۸۰۰ - ۷۵۰ جفت باز در واکنش

PCR قابل انتظار بود. به منظور ردیابی ویروس موزاییک خیار از جفت آغازگر مبتنی بر بخشی از توالی نوکلئوتیدی RNA3 که منطبق بر منطقه‌ی رمزکننده‌ی پروتئین پوششی نژاد CMV-Q طراحی شده بود، استفاده شد (سخندان و همکاران ۲۰۰۶) و قطعه‌ای به طول تقریباً ۸۷۰ جفت باز در واکنش PCR تکثیر گردید (جدول ۲). بکارگیری هر کدام از جفت آغازگرها بر اساس نوع علایم ویروس و احتمال وجود ویروس مربوطه انجام گرفت.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق.

نام آغازگر	توالی	هدف	منبع
gl3637	5ACTTCGAATTC(GT)ACTGGGAGCAA(CT)CC(AG)GAGTGGG3	Tospovirus	چو و همکاران ۲۰۰۱
gL4435c	5CAT(A/T/G)GC(A/G)CAAGA(A/G)TG(A/G)3	Tospovirus	چو و همکاران ۲۰۰۱
Tob- uni1	5ATTTAAGTGGASGGAAAAVCAT3	Tobamovirus	لتسچرت و همکاران ۲۰۰۲
Tob- uni2	5GTYGTTGATGAGTTCRTGGA3	Tobamovirus	لتسچرت و همکاران ۲۰۰۲
CMV-CPF	5GCTTCTCCGCGAG3	CMV	سخندان و همکاران ۲۰۰۶
CMV-CPR	5GCCGTAAGCTGGATGGAC3	CMV	سخندان و همکاران ۲۰۰۶

RT-PCR

برای هر واکنش RT ۱۰ پیکومول (۰/۴ میکرولیتر) آغازگر با ۱/۱ میکرولیتر آب دیونیزه و دو میکرولیتر RNA کل مخلوط شد. در دمای 70°C به مدت پنج دقیقه برای باز کردن ساختارهای ثانویه مولکول RNA نگه داری و سپس سریعاً روی یخ قرار داده شد. مقدار ۷/۵ میکرولیتر از مخلوط ترانس کریپشن (نسخه برداری معکوس) که حاوی دو میکرولیتر بافر ترانس کریپتانز معکوس ۱۰X، dNTPs یک میلی مولار و ۴۰ واحد از RNAsin و ۲۰۰ واحد از M-MLV ترانس کریپتانز معکوس (۰/۵ میکرولیتر) (فرمنتاس) بود، به هر واکنش اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 37°C نگه‌داری شدند. مخلوط حاصل در دمای 42°C به مدت ۶۰ دقیقه در ترموسایکلر قرار داده شد و سپس به منظور غیر فعال نمودن آنزیم نسخه‌برداری معکوس، ۱۰ دقیقه در دمای 70°C گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۵ میکرولیتر محصول

RT، دو میکرولیتر از بافر PCR 10X، کلرید منیزیم با غلظت نهایی دو میلی مولار، آغازگر (۲/۵ پیکومول) و ۱/۲۵ واحد Taq DNA پلیمران بود. در هر سه مورد پس از بهینه سازی دمای اتصال آغازگرها با تغییرات دو درجه‌ای شرایط دمایی به این صورت اعمال شد که برای ردیابی جنس توسپوویروس یک چرخه‌ی 94°C به مدت چهار دقیقه جهت واسرشتگی اولیه، ۳۵ چرخه شامل 94°C به مدت ۴۵ ثانیه جهت واسرشت رشته‌های سنتز شده، 48°C به مدت یک دقیقه جهت اتصال آغازگرها، 72°C به مدت یک دقیقه جهت سنتز DNA و در نهایت یک چرخه‌ی در دمای 72°C به مدت ۱۰ دقیقه جهت کامل شدن رشته‌های ناقص به کار برده شد. در مورد جنس توباموویروس یک چرخه‌ی 94°C به مدت چهار دقیقه، سی و پنج چرخه‌ی 94°C به مدت ۱ دقیقه، 50°C به مدت ۴۵ ثانیه، 72°C به مدت یک دقیقه، و در آخر یک چرخه‌ی 72°C به مدت هفت دقیقه اعمال شد. برای ویروس موزاییک

تجزیه تحلیل توالی‌ها و تبارزایی

پس از آنکه توالی‌های با حداکثر مشابهت با توالی‌های بدست آمده از توسپوویروس در این مطالعه مشخص شده و گونه ویروس جدایه‌های تحت بررسی تعیین گردید توالی‌های حاصله در این تحقیق با سایر توالی‌هایی که دارای همولوژی بودند (جدول ۳) با استفاده از نرم افزار Mega6 و روش ClustalW هم‌ردیف سازی شدند (تامورا و همکاران ۲۰۱۳). پس از هم‌ردیف سازی، درخت فیلوژنتیکی منطبق بر منطقه‌ی ژنی مورد مطالعه، توسط روش Maximum Parsimony (MP) با ۱۰۰۰ بوت استرپ در نرم افزار Mega6 (Tamura et al., 2013) رسم گردید. به منظور رسم درخت فیلوژنی از نژاد PV-0529 ویروس نکروز ساقه گل داودی (*Chrysanthemum stem*) به عنوان عضو برون‌گروه (out-group) استفاده شد. در نهایت، پس از رسم درخت فیلوژنی، کلیه‌ی شاخه‌ها با ارزش بوت استرپ پایین‌تر از ۷۰ ادغام گردیدند.

نتایج

مشاهدات مزرعه‌ای

علائم ویروسی در مزارع بازدید شده شامل موزاییک، بند کفشی شدن و تغییر شکل برگ بود و موزاییک در اکثر نمونه‌ها مشاهده شد. در نمونه‌های آلوده به ویروس موزاییک گوجه فرنگی، موزاییک و برگ سرخسی شدن دیده شد. این علائم با غالبیت بیشتر در مزارع عجب شیر و بناب دیده شد، البته در مزارع مناطق دیگر از جمله روستای تازه کند نیز این علائم دیده شد. ویروس موزاییک توتون با علائم موزاییک و بدشکلی برگ‌ها در هیچ یک از نمونه‌های مشکوک به آلودگی با این ویروس ردیابی نشد. در نمونه‌های آلوده به ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی نکروز برگ‌ها، بدشکلی میوه و حلقه‌های کلروتیک در میوه دیده شد. تقریباً در اغلب مزارع گوجه فرنگی که از آنها بازدید به عمل آمد، آلودگی به ویروس موزاییک گوجه فرنگی محرز شد (شکل ۱). نمونه‌های آلوده به ویروس موزاییک خیار، بیشتر علائم موزاییک و بند کفشی شدن را نشان دادند،

خیار: یک چرخه‌ی 94°C به مدت ۱ دقیقه، سی و پنج چرخه‌ی 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، 50°C به مدت ۳۰ ثانیه، 72°C به مدت یک دقیقه، و در آخر یک چرخه‌ی 72°C به مدت پنج دقیقه به کار برده شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE 0/5X الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند.

آنالیز برشی

جهت تعیین گونه‌های ویروسی متعلق به جنس توسپوویروس، محصولات RT-PCR تکثیر یافته از همه-ی جدایه‌ها با آغازگرهای مربوطه، با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* (فرمنتاس) برش یافتند. سپس قطعات برش یافته در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند. برای تعیین زیرگروه‌های CMV و به منظور بررسی چند شکلی ژنتیکی همه‌ی قطعات DNA حاصل از PCR، آنزیم *MspI* به کار برده شد (سخندان و همکاران ۲۰۰۸). برای تعیین گونه‌های ویروسی متعلق به جنس توباموویروس، محصولات RT-PCR با آنزیم *TaqI* در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و در دمای 65°C به مدت ۳-۲ ساعت برش داده شده و سپس در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند.

همسانه سازی و توالی یابی

تعداد شش قطعه تکثیر یافته توسط آغازگرهای عمومی جنس توسپوویروس در حامل pGEM-T easy (پرومیگا، آمریکا) همسانه سازی شده و پلاسمیدهای نوترکیب به منظور تعیین ترادف به شرکت Bioneer (کره جنوبی) ارسال شد. تعیین ترادف با استفاده از آغازگرهای عمومی M13F/R در دو جهت انجام گردید. داده‌های نوکلئوتیدی به دست آمده از تعیین توالی منطقه‌ی تکثیر شده (۸۱۹ جفت باز) با استفاده از نرم افزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) با داده‌های نوکلئوتیدی موجود در ژن‌بانک مورد مقایسه قرار گرفتند و جدایه‌هایی که با توالی‌های موجود در این تحقیق بیشترین شباهت (همولوژی) را داشتند، مشخص شدند.

روی گیاهان توتون بعد از ۷-۸ روز از مایه زنی دیده شد.

نتایج الیزا

در آزمون TAS-ELISA با استفاده از آنتی بادیهای ویژه CMV که روی ۱۰۵ نمونه‌ی مشکوک به آلودگی با ویروس موزاییک خیار جمع آوری شده از مناطق مختلف انجام گرفت، ۲۸ نمونه واکنش مثبت نشان دادند که از مزارع گوگان، روستای زینب خاتون، بناب، عجب شیر، ایلخچی و یک جدایه از ممقان بود. ولی این ویروس از مزارع روستای تازه کند ردیابی نشد. بر اساس نتایج الیزا منطقه گوگان بیشترین میزان آلودگی را به CMV را نسبت به مناطق دیگر داشت.

نتایج RT-PCR

قطعه‌ای به طول ۸۱۹ جفت باز از شش نمونه از تعداد ۳۴ نمونه دارای علائم توسپوویروس‌ها، تکثیر شد در حالیکه از گیاه سالم، قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۲). پس از بهینه سازی دماهای آنیلینگ مختلف برای اتصال آغازگر، در نهایت دمای ۴۸ درجه‌ی سانتیگراد بعنوان بهترین دما برای تکثیر قطعه مورد نظر با آغازگرهای توسپوویروس‌ها تعیین گردید. همه این شش نمونه از شهرستان عجب شیر و دارای علائم نکروز برگ، بدشکلی میوه و حلقه‌های کلروتیک روی میوه بودند. با انجام PCR با آغازگرهای مربوط به منطقه‌ی رمز کننده پروتئین پوششی در نمونه‌های مشکوک به آلودگی با CMV قطعه DAN به طول ۸۷۰ جفت باز در ۲۳ نمونه از ۵۰ نمونه تکثیر شد در حالیکه در گیاه سالم قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۳). با انجام PCR در مورد نمونه‌های مشکوک به آلودگی با توباموویروس‌ها با آغازگرهای ژن پروتئین پوششی و قسمتی از انتهای ۳'، یک قطعه‌ی DNA به طول ۷۵۰-۸۰۰bp در ۳۷ نمونه از ۱۰۰ نمونه تکثیر یافت (شکل ۴).

البته موزاییک در نمونه‌ها بیشتر مشهود بود. این ویروس در نمونه‌های مزارع گوگان و روستاهای آن غالبیت بیشتری داشت گرچه در مناطق دیگر نیز دیده شد. در نمونه‌های آلوده به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی نکروز برگها، بدشکلی میوه و حلقه‌های کلروتیک در میوه دیده شد. این ویروس فقط از نمونه‌های منطقه عجب شیر ردیابی شد، البته در تعداد کمی از نمونه‌های جمع آوری شده از منطقه گوگان علائمی مشابه علائم مشکوک به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی دیده شد ولی آلودگی آنها به این ویروس با RT-PCR مشخص نشد (شکل ۲).

مشاهدات گلخانه‌ای

نمونه‌های مشکوک به آلودگی با ویروس موزاییک خیار روی کدو (*Cucurbita pepo*) مایه زنی شدند و ۵-۶ روز بعد از مایه زنی علائم اولیه دیده شد که بتدریج موزاییک بصورت سیستمیک مربوط به ویروس موزاییک خیار نمایان گردید. علائم روی کدو بخوبی مشخص بود و نسبت به سایر میزبان‌های تکثیری ویروس شدیدتر و زودتر بروز کرد (شکل ۱). علائم ویروس موزاییک خیار روی توتون به مراتب دیرتر از سایر میزبان‌های تکثیری ویروس دیده شد. علائم حاصل از مایه زنی جدایه‌های مختلف CMV روی توتون، ۲۰-۱۰ روز بعد از مایه زنی ظاهر شد که شامل موزاییک و تاول روی برگ بود (شکل ۱). روی گوجه فرنگی نیز مایه زنی با جدایه‌های مختلف CMV موزاییک، بند کفشی شدن و کوتولگی را ایجاد کرد.

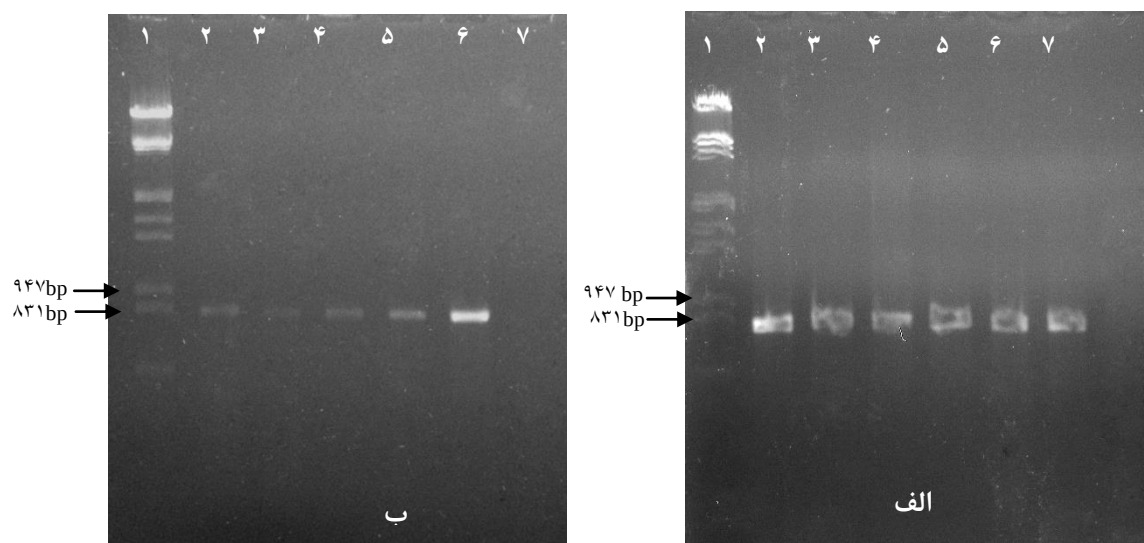
در مورد ویروس موزاییک گوجه فرنگی علائم در گیاهان گوجه فرنگی بصورت موزاییک و برگ سرخسی ۱۰ الی ۱۵ روز بعد از مایه زنی مشاهده گردید (شکل ۱). علائم حاصل از مایه زنی جدایه‌های مختلف ToMV روی توتون (*Nicotiana benthamiana*) بعد از ۱۵-۱۰ روز از مایه زنی موزاییک شدید، کوتولگی، بدشکلی و تاولی را در برگها ایجاد کردند (شکل ۱). علائم حاصل از مایه زنی با برخی از جدایه‌های ToMV

جدول ۳- رس شماره، منشا (کشور) و میزبان جدایه‌های TSWV موجود در ژنبانک NCBI و آنهایی که در این تحقیق از ایران مورد استفاده قرار گرفتند.

نام جدایه 1	میزبان	کشور منبع	رس شماره
PV-0529	-	روسیه	JQ284452
CG-1	<i>Lactuca sativa</i>	چین	JN664254
TSWV-YN	<i>Solanum lycopersicum</i>	چین	JF960237
P202/3WT	<i>Solanum lycopersicum</i>	ایتالیا	KJ575619
CY-CN2	<i>Capsicum annuum</i>	کره جنوبی	HM581940
NJ-JN	<i>Solanum lycopersicum</i>	کره جنوبی	HM581934
CY-CN1	<i>Capsicum annuum</i>	کره جنوبی	HM581937
ToSWsLgp1	-	هلند	NC002052
Japan	-	ژاپن	AB198742
South Korea	-	کره جنوبی	AB190813
TwPep2	<i>Capsicum annuum</i>	تایوان	HM180088
TSWLRPOLM	-	هلند	D10066
TwPep1	<i>Capsicum annuum</i>	تایوان	GU222652
Hawaii	-	تایوان	AY070218
TOS-1	<i>Lycopersicum esculentum</i>	ایران- عجب شیر	KC767954
TOS-2	<i>Lycopersicum esculentum</i>	ایران- عجب شیر	KC767955
TOS-5	<i>Lycopersicum esculentum</i>	ایران- عجب شیر	KC767956
TOS-6	<i>Lycopersicum esculentum</i>	ایران- عجب شیر	KC767957
TOS-91	<i>Lycopersicum esculentum</i>	ایران- عجب شیر	KC767958



شکل ۱- علائم ویروس‌های مختلف در میزبان‌های مزرعه‌ای و روی گیاهان مایه‌زنی شده. ۱، ۳ و ۵: به ترتیب، علائم ویروس موزاییک خیار در گوجه فرنگی در مزرعه، مایه زنی شده روی توتون و علائم موزاییک در برگ مایه زنی شده کدو. ۲، ۴، ۶: به ترتیب، علائم ویروس موزاییک گوجه فرنگی در مزرعه (برگ سرخسی)، مایه زنی شده روی توتون، مایه زنی شده روی کدو. ۷ و ۸: به ترتیب، علائم ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی روی میوه و برگ گوجه فرنگی.



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر عمومی جنس توسپوویروس (الف) ۱: مارکر (Lambda DNA/EcoRI+HindIII). ۲ تا ۷ نمونه‌های مثبت (آلوده). ۸: شاهد منفی (گیاه سالم). (ب) نتایج برش آنزیمی با آنزیم HindIII روی همان محصولات PCR در قسمت الف. ۱: همان مارکر لامیدا. ۲ تا ۷: محصولات برش آنزیمی.

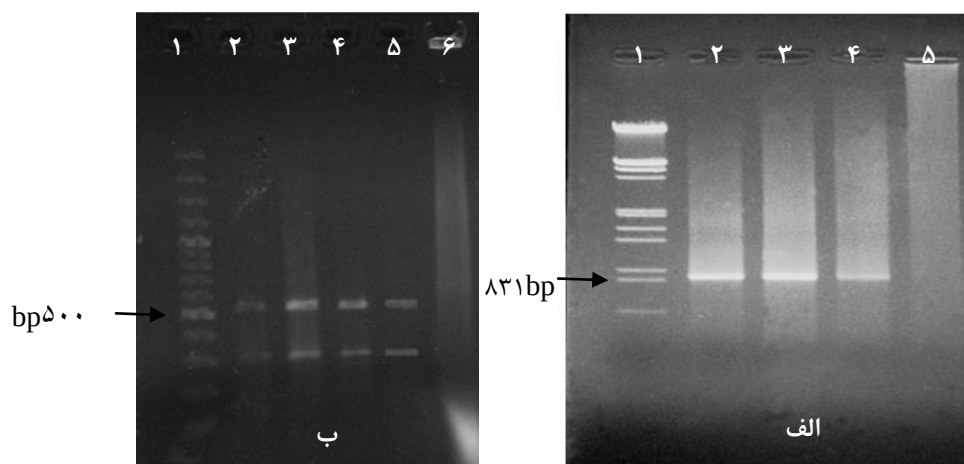
نتایج برش آنزیمی

برش با EcoRI، HindIII و XbaI روی شش قطعه‌ای حاصل از RT-PCR با آغازگرهای جنس توسپوویروس نشان داد که این قطعات فاقد محل اثر این آنزیم‌های برشی بودند به طوری که پس از برش آنزیمی، اندازه‌ی آنها در مقایسه با قبل از برش تفاوتی نداشت و تمام آنها الگوهای برشی مشابه در ژل آگارز ایجاد نمودند (شکل

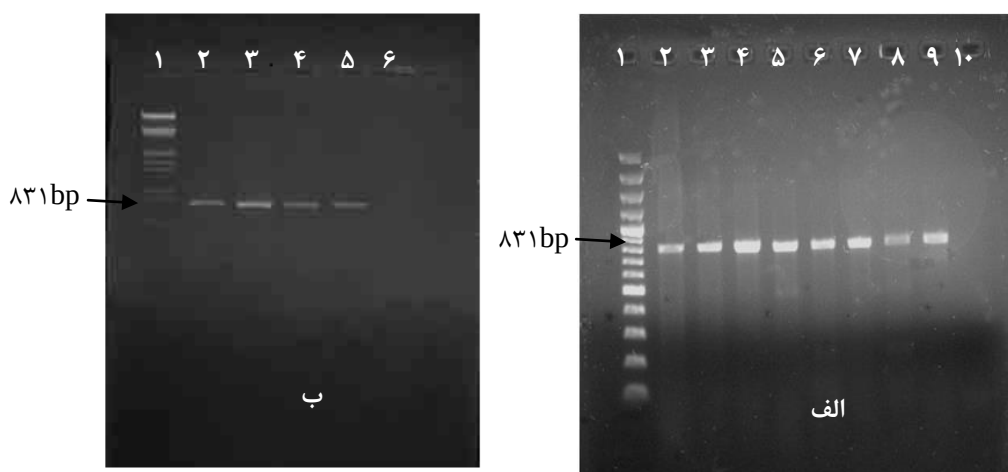
۲). این نتایج مشخص نمود که جدایه‌های مورد بررسی فاقد تنوع لازم برای قرار گرفتن در گونه‌های مختلف جنس توسپوویروس بودند و با توجه به نتایج برش آنزیمی با نقشه‌ی برشی موجود برای ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی مطابقت می‌کند. با توجه به بررسی‌های *in silico* منطقه‌ی تکثیر شده و نتایج برخی از محققین دیگر (چو و همکاران ۲۰۰۱) می‌توان نتیجه

نظر پروفیل برشی متعلق به TMV باشد مشاهده نشد (شکل ۴). در مورد ویروس موزاییک خیار در اثر برش با *MspI* قطعاتی به طول ۵۴۰ و ۳۴۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۳).

گیری نمود که ویروس ردیابی شده در بررسی حاضر، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی می‌باشد (شکل ۲). در تعداد ۲۰ جدایه از ۳۷ جدایه‌ی توپاموویروس ردیابی شده با PCR، وقتی که با آنزیم *TaqI* برش داده شدند قطعاتی به طول ۲۸۲bp و ۴۳۰ bp مشاهده شد که با پروفیل برشی ToMV مطابقت داشت و نمونه ای که از



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR با جفت آغازگر اختصاصی CMV (الف) ۱: مارکر (Lambda DNA/ *EcoRI+HindIII*). ۲ تا ۴: نمونه‌های مثبت (آلوده). ۵: شاهد منفی (گیاه سالم). (ب) نتایج برش با آنزیم *MspI* روی محصولات PCR. ۱: مارکر (100 bp DNA Ladder). ۲ تا ۵: محصولات برش آنزیمی.



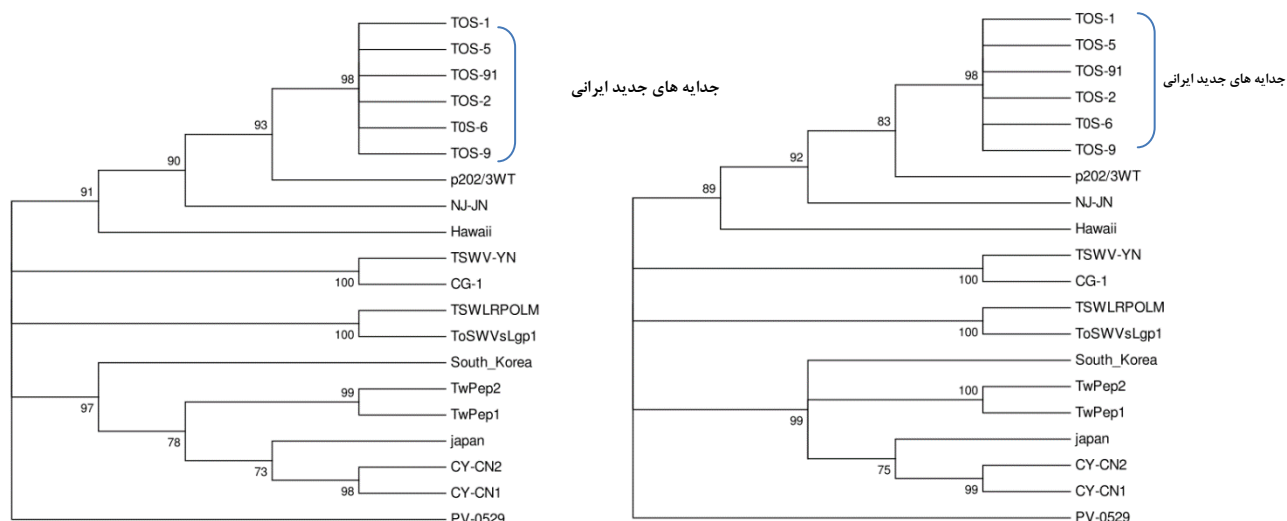
شکل ۴- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR با جفت آغازگر عمومی جنس توپاموویروس. (الف) ۱: مارکر (Lambda DNA/ *EcoRI+HindIII*). ۲ تا ۹: نمونه‌های مثبت (آلوده)، ۱۰: شاهد منفی (گیاه سالم). (ب) نتایج برش با آنزیم *Taq I* روی محصولات PCR. ۱: مارکر (100 bp DNA Ladder). ۲ تا ۵: قطعات حاصل از برش آنزیمی.

نتایج همسانه سازی و تعیین توالی

نتیجه‌ی مقایسه‌ی توالی‌های به دست آمده از همسانه‌های حاصل از قطعات تکثیر شده با آغازگرهای عمومی جنس توسپوویروس با سایر جدایه‌ها در ژن‌بانک NCBI نشان داد که همه‌ی جدایه‌ها متعلق به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی بودند. نتایج مقایسه‌ی نوکلئوتیدها نشان‌دهنده شباهت ۹۴ تا ۹۹ درصدی بین آنها بود و کمترین شباهت (۹۴٪) با جدایه V5 و Salabintana به ترتیب از کشور جمهوری چک و اندونزی و بیشترین شباهت (۹۹٪) با جدایه‌هائی از ایتالیا و کره جنوبی NJ-JN جدا شده از گوجه

فرنگی را نشان دادند. علاوه بر این، نتایج مقایسه‌ی توالی‌های اسید آمینه منطقه‌ی تکثیر شده با سایر جدایه‌ها حاکی از ۹۸ تا ۹۹ درصد شباهت بین آنها بود که این نتایج با نتایج حاصل از مقایسه‌ی داده‌های اسید نوکلئیکی مطابقت داشت.

نتایج تجزیه تحلیل تبارزایی منطبق بر منطقه‌ی تکثیر شده، شامل بیست جدایه همراه با جدایه‌های ایرانی بررسی شده در این تحقیق (جدول ۳) نشان داد که همه جدایه‌های ایرانی همراه با جدایه‌های NJ-JN، P202/3WT و Hawaii در یک زیر خوشه قرار میگیرند (شکل ۵).



شکل ۵- درخت تبارزایی Maximum Parsimony (MP) رسم شده با نرم افزار MEGA6. برای جدایه های ایرانی شناسایی شده در این تحقیق و سایر جدایه های TSWV بر اساس RNA بزرگ (L) توسپوویروس، راست (اسید نوکلئیک)، چپ (اسید آمینه). ارزش بوت استرپ بیشتر از ۷۰ درصد در بالای شاخه‌ها نشان داده شده و CSNV- PV-0529 به عنوان عضو برون گروه قرار داده شده است.

بحث

در این تحقیق علائم مختلف ویروسی در مزارع گوجه فرنگی مشاهده شد که شامل موزاییک معمولی تا شدید، بندکشی شدن، تاول روی برگ‌ها و تغییر شکل برگ‌ها بود. بطور کلی، لکه‌های نکروزه روی برگ‌ها و ساقه‌ها، لکه‌های حلقوی، نکروز بافتی و رگبرگ روشنی بودند. رنگ پریدگی میوه‌ها، پژمردگی و کوتولگی از علائم معمول روی گیاهان گوجه فرنگی در اکثر مزارع بودند (شکل ۱) که توسط سایر محققین نیز گزارش شده اند

(حاجی آبادی و همکاران ۲۰۱۲ و محمدی و همکاران ۲۰۰۰). در نمونه‌های گوجه‌فرنگی که آلودگی به ویروس موزاییک خیار در آنها به اثبات رسید، غالباً علائم بندکشی شدن و موزاییک در برگ‌ها قابل مشاهده بود. علائم عمده در نمونه‌های آلوده به ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی شامل موزاییک خفیف تا شدید و تغییر شکل برگ‌ها بود. لکه‌های نکروزه در برگ‌های گوجه فرنگی همراه با لکه‌های کلروزه روی میوه‌های رسیده گوجه-فرنگی نیز مشاهده شدند (شکل ۱). این علائم با علائم

توصیف شده ویروس‌های مذکور در توصیف نامه‌های آنها مطابقت دارد هر چند احتمال آلودگی همزمان با سایر ویروس‌های آلوده کننده گوجه فرنگی نیز وجود دارد که در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفته اند.

در مایه زنی گیاهان محک، علائم مشاهده شده روی کدو و *N. tabacum* cv Samsun با علائم توصیف شده ناشی از CMV (کومار و همکاران ۲۰۱۱) و ToMV مطابقت داشت. این علائم شامل موزاییک خفیف تا شدید همراه با تاولی شدن برگ‌ها بود (شکل ۱).

در این تحقیق، الایزا فقط برای ردیابی CMV انجام شد و از میان ۱۰۵ نمونه ای که مشکوک به آلودگی با ویروس موزاییک خیار بودند و مورد آزمون ELISA - TAS قرار گرفتند ۲۸ نمونه‌ی آلوده به CMV تشخیص داده شدند. نسبت آلودگی به این ویروس در مناطق مختلف متفاوت بود که احتمالاً این امر می تواند در نتیجه پایین بودن مقاومت نسبی ارقام استفاده شده و یا ناشی از بالا بودن جمعیت ناقل این ویروس در مناطق مختلف باشد.

در مطالعات قبلی، اعضای جنس توسپوویروس در مزارع گوجه فرنگی استان‌های خراسان رضوی و شمالی با استفاده از روش DAS-ELISA مورد ردیابی قرار گرفتند. هم چنین، گزارشات دیگری از وجود ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در مزارع گوجه فرنگی (حاجی آبادی و همکاران ۲۰۱۲، ۲۰۰۹، بنانج و همکاران ۱۹۹۶ و محمدی و همکاران ۲۰۰۰) و سایر میزبان‌ها (پوررحیم و همکاران ۲۰۰۱ و حاجی آبادی و همکاران ۲۰۰۹) از مناطق شرقی و جنوبی ایران وجود دارد. در برخی از نمونه‌های گیاهی با وجود مشاهده علائم ویروسی، هیچ بانندی در RT-PCR دیده نشد که احتمالاً دلیل آن آلودگی توسط سایر ویروس‌های آلوده کننده‌ی گوجه‌فرنگی در این گیاهان بود. بدون شک ژن پلی مرز (قطعه L) بالاترین حفاظت را در میان جنس توسپوویروس دارد و این ویژگی تکثیر قطعه‌ی مورد نظر را آسان کرده است، از طرف دیگر با استفاده از آغازگرهای موجود در این تحقیق و آنالیز برش آنزیمی، قابلیت تفکیک در بین اعضای جنس توسپوویروس وجود دارد (چو و همکاران ۲۰۰۱). در ادامه، نتایج برش

محصولات PCR با آنزیم *XbaI* برای تفکیک این دو ویروس از یکدیگر مشخص نمود که همه‌ی نمونه‌ها دارای آلودگی به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی می باشند، زیرا در برش با آنزیم *XbaI* در صورت آلودگی به ویروس پیسک نقره‌ای هندوانه^۱ محصولات PCR پس از برش دارای الگوی برشی متشکل از دو باند مجزا خواهند بود، در صورتیکه محصولات PCR حاصل از TSWV فاقد محل برش خواهند بود (چو و همکاران ۲۰۰۱) در نهایت، با توجه به اینکه محصولات PCR فاقد جایگاه برشی آنزیم‌های *EcoRI*، *HindIII* و *XbaI* بودند، می توان نتیجه گرفت که همه‌ی نمونه‌ها آلوده به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی بودند.

همینطور، آنالیز توالی‌ها نشان داد که قطعه L تکثیر یافته با استفاده از آغازگرهای جنس توسپوویروس متعلق به TSWV بودند. هر چند قطعه‌ی L در بین توسپوویروس‌ها به عنوان یک قطعه‌ی حفاظت شده ممکن است برای تفکیک قطعی گونه‌های مختلف این جنس مناسب نباشد با این حال، برخی از روش‌ها مانند برش آنزیمی و جایگاه‌های برش متفاوت می‌تواند تا حدی به تفکیک گونه‌ها کمک بنمایند. در میان توسپوویروس‌ها، TSWV معمولاً روی گوجه فرنگی شایع است و این ویروس از مزارع گوجه فرنگی ایران و دیگر کشورها از قبیل ژاپن، کره جنوبی و اندونزی با روش‌های مختلف گزارش شده است. از طرف دیگر شباهت بالا در میان جدایه‌های ردیابی شده و هم چنین بین جدایه‌های ایرانی و دیگر جدایه‌ها نشان می‌دهد که قطعه‌ی تکثیر شده، حفاظت شدگی بالایی دارد. گزارش شده که جهش از تاثیر قابل توجهی در شکل گیری ساختار جمعیتی TSWV برخوردار است (کی و همکاران ۲۰۱۱) و بررسی تنوع ساختار ژنتیکی جمعیت ویروس های گیاهی برای درک بهتر تکامل ویروس و تعامل بین ویروس و گیاه بسیار مهم است (سامپانا و همکاران ۲۰۰۵). از این رو، تشخیص و تعیین توالی جدایه‌های متعلق به جنس توسپوویروس بر مبنای مناطق مختلف ژنومی نقش مهمی در مدیریت ویروس دارد. اما مطمئناً

¹Watermelon silver mottle virus

توجهی ندارند. به همین دلیل، برخی از مطالعات در مورد توسپوویروس‌ها روی تنوع ژن N برای شناسایی نژادها متمرکز شده است (پاپو و همکاران ۲۰۰۶، نیشویتز و همکاران ۲۰۰۶ و کیمسومبات و همکاران ۲۰۰۸).

با توجه به اینکه شرایط محیطی مانند موقعیت جغرافیایی و میزبان اثر انتخابی مثبت در مناطق مختلف ژنوم TSWV (سامپانا و همکاران ۲۰۰۵) از جمله RdRp (کی و همکاران ۲۰۱۱) دارد، قرار گرفتن جدایه‌های TSWV در خوشه‌ها منطبق بر محل جغرافیایی و میزبان، غیر معمول و دور از انتظار نمی‌باشد.

برای ردیابی ویروس‌های متعلق به جنس توباموویروس نیز از یک جفت آغازگر منطبق بر ژن پروتئین پوششی و ناحیه‌ی ترجمه نشوندهی انتهای ۳' استفاده گردید که در ۳۷ نمونه از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده، ردیابی توباموویروس با آنها امکان پذیر شد. در مورد توباموویروس نیز برش با آنزیم TaqI برای تعیین گونه ویروسی انجام شد. دو قطعه با اندازه های ۲۸۲ و ۴۳۰ جفت باز بعد از برش محصول PCR با آنزیم مذکور حاکی از این بود که جدایه ها دارای هویت ToMV می باشند. این نتایج با نتایج آزمایشات قبلی که از همین جفت آغازگرها در تکثیر این قسمت از ژنوم ویروس استفاده شده بود و با این آنزیم برش خورده بود، مطابقت داشت (لتسچرت و همکاران ۲۰۰۲). طبق گزارش چیترا و همکاران (۱۹۹۹)، انتقال ToMV و TMV از بذر به نشاء بترتیب ۱۳٪ و ۱۰٪ می باشد که احتمالاً وجود ToMV در اکثر مزارع این مناطق ناشی از آلوده بودن بذر و تهیه‌ی نشاء از مزارع آلوده بوده است زیرا ناقل طبیعی اختصاصی برای آنها شناخته نشده و آلودگی اغلب در گوجه فرنگی و فلفل بواسطه‌ی آلودگی ریشه از خاک آلوده و یا نشاء آلوده می باشد و از این کانون‌های آلودگی نیز ویروس به آسانی بواسطه‌ی تماس برگ و عملیات زراعی گسترش می‌یابد (هولینگز و هوتینگا، ۱۹۷۶). لازم به ذکر است که TMV در هیچ یک از نمونه های مشکوک مشاهده نشد. این نتایج با گزارشات چیترا و همکاران ۱۹۹۹ همخوانی دارد که طی آن، TMV قادر به رقابت با ToMV در گیاه گوجه فرنگی نمی باشد زیرا ToMV نسبت به TMV مهاجم تر بوده و سازگاری

بررسی سایر نواحی ژنومی از قبیل RNA کوچک و ژن-های نوکلئوکسید در تخمین هرچه دقیق‌تر این تنوع کمک قابل توجهی خواهد نمود. در درخت فیلوژنتیکی، تمام جدایه‌های ایرانی TSWV در یک گروه واقع شدند. جدایه‌هایی از ایتالیا و کره جنوبی NJ-JN (جدول ۳) نزدیک به جدایه‌های ایرانی قرار گرفتند که احتمالاً گویای یک خاستگاه جغرافیایی مشترک برای آنها است. با توجه به بذرزد نبودن ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی، احتمال انتقال توسط بذر وجود ندارد اما ممکن است از طریق مواد گیاهی آلوده و ناقلین در بین مناطق جغرافیایی مختلف انتشار پیدا کنند. از طرفی با توجه به ماندگاری و انتقال ویروس توسط تریپس انتشار از طریق ناقل می‌تواند نقش بسزایی در جابجایی بین مناطق مختلف داشته باشد. در نهایت، چنین رابطه‌ی فیلوژنتیکی بین جدایه‌ها ممکن است با انتقال ویروس در ارتباط باشد. بطور کلی درخت فیلوژنتیک بر مبنای توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی نشان داد که چهار خوشه‌ی اصلی یکسان وجود دارند. همانطور که در این درخت نشان داده شده (شکل ۵) جدایه‌های ایرانی با همدیگر در یک زیر خوشه شامل جدایه‌هایی از کره جنوبی (NJ-JN)، ایتالیا و هاوایی قرار داده شدند که همه‌ی آنها از یک میزبان مشترک، گیاه گوجه‌فرنگی جداسازی شده‌اند. از طرف دیگر، همه‌ی جدایه‌های گزارش شده در فلفل از شرق آسیا مانند تایوان، ژاپن و کره جنوبی بر مبنای نوکلئوتید و آمینو اسید در یک شاخه‌ی جداگانه قرار گرفته‌اند (جدول ۳، شکل ۵). به همین دلیل، ممکن است منشأ میزبانی، در گروه‌بندی و تفاوت‌های ژنتیکی جدایه‌های ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی مهم باشد. همچنین، شاخه‌ای مستقل در درخت فیلوژنتیک دربردارنده‌ی دو جدایه از هلند بود (جدول ۳، شکل ۵). به همین ترتیب، شاخه‌ای دیگر شامل دو جدایه TSWV از چین بر مبنای اسید آمینه و داده‌ی نوکلئوتیدی وجود دارد.

با توجه به اینکه ژن پلی مرز یک ناحیه‌ی کاملاً حفاظت شده است، جدایه‌های تازه ردیابی شده دارای شباهت‌های بالایی می‌باشند (بیش از ۹۹-۹۸٪) بطوریکه جدایه‌های TSWV از شمال غرب ایران تفاوت قابل

ویروس‌ها می‌باشد که در برخی از موارد سبب تشدید علائم و یا کاهش آن می‌شود (سخندان و همکاران ۲۰۰۶، ۲۰۰۸). نتایج آزمون الایزا نشان داد که جدایه‌های مورد-نظر متعلق به زیرگروه I ویروس موزاییک خیار می‌باشد. گونه‌های میزبانی احتمالاً عوامل مهم در پیدایش زیرگروه‌های متفاوت CMV هستند، طوری‌که اکثر جدایه‌های گزارش شده از کدوئیان متعلق به زیرگروه I می‌باشند. در این مطالعه، از آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای (ویژه زیرگروه I)، برای تمایز جدایه‌های متعلق به دو زیرگروه CMV استفاده شد که این روش برای تمایز سرولوژیکی جدایه‌های متنوع CMV مناسب است.

نتیجه‌گیری کلی

طی این بررسی TSWV، ToMV و CMV از مزارع گوجه‌فرنگی آذربایجان شرقی با RT-PCR ردیابی گردید. در آزمون الایزا نمونه‌های آلوده به CMV شناسایی شدند. بررسی برش آنزیمی با *HindIII* و *EcoRI* روی جدایه‌های توسپوویروس حاکی از ماهیت TSWV آنها بود. همین‌طور، تعیین توالی نوکلئوتیدی این جدایه، TSWV بودن آنها را تایید کرد. برش آنزیمی با *TaqI* روی جدایه‌های توباموویروس، تعلق آنها به ToMV را تایید نمود. در مورد CMV، برش آنزیمی با *MspI* تعلق جدایه‌های بررسی شده را به زیرگروه I مشخص کرد. ویروس موزاییک توتون در نمونه‌های جمع‌آوری شده ردیابی نشد و برآورد گردید که TMV در مقایسه با ToMV قدرت بیماری‌زایی کمتری در گیاه گوجه‌فرنگی دارد. با توجه به اینکه در بسیاری از نمونه‌های دارای علائم، ویروس‌های مذکور ردیابی نشدند، وجود ویروس‌های دیگر غیرقابل انکار می‌باشد. علاوه بر این، در نمونه‌های بررسی شده، آلودگی مخلوط شناسایی نشد.

بیشتری با میزبان دارد و نشانگر آن است که TMV پاتوژن ویروسی مهم در گوجه‌فرنگی نمی‌باشد. به منظور شناسایی ویروس موزاییک خیار نیز از یک جفت آغازگر منطبق بر بخشی از RNA شماره ۳ نژاد Q که در برگ‌برنده‌ی ژن پروتئین پوششی ویروس باشد استفاده گردید. تعداد ۲۳ جدایه از این ویروس با RT-PCR مورد ردیابی قرار گرفت. این ویروس از برخی مناطق نمونه برداری شده ردیابی نشد که ممکن است بدلیل مقاومت ارقام استفاده شده، ناکارا بودن شته‌ی ناقل، پایین بودن جمعیت ناقل این ویروس و یا مناسب نبودن شرایط آب و هوایی باشد. در رابطه با قطعه‌ی حاصل از PCR با آغازگرهای پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار، تولید دو قطعه با اندازه‌های حدود ۵۴۰ و ۳۴۰ جفت باز در اثر برش با آنزیم *MspI* نشان داد که جدایه‌های ردیابی شده متعلق به زیرگروه I هستند. این نتایج با نتایج آزمایشات محققین قبلی که از همین جفت آغازگرها در تکثیر ژن پروتئین پوششی استفاده کرده و قطعات حاصله را با آنزیم *MspI* برش داده و بدین ترتیب جدایه‌ها را در دو زیرگروه قرار داده‌اند، مطابقت داشت (سخندان و همکاران ۲۰۰۸، ۲۰۰۶ و ریزوس و همکاران ۱۹۹۲). وجود دو باند مجزا نشان‌دهنده‌ی عدم احتمال وجود آلودگی مخلوط با زیرگروه II می‌باشد. مشخص نمودن زیرگروه‌های CMV برای شناسایی ترکیب جمعیت ویروس و درک واگیری ویروس، مهم به نظر می‌رسد. بطور کلی زیرگروه I ویروس CMV نسبت به زیرگروه II ویروس موزاییک خیار غالب است بطوریکه ۸۰ درصد جدایه‌های ویروس موزاییک خیار متعلق به زیرگروه I هستند (گل‌تلی، ۲۰۰۰). در شمال غرب کشور نیز اکثر ویرس‌های موزاییک خیار ردیابی شده متعلق به زیرگروه I هستند (سخندان و همکاران ۲۰۰۸). تفاوت در علائم ویروسی می‌تواند از عوامل زیادی ناشی شود که یکی از آنها آلودگی مخلوط این ویروس با سایر

منابع مورد استفاده

بی‌نام، ۱۳۹۴. آمار نامه کشاورزی ایران. اداره کل آمار و اطلاعات وزارت کشاورزی.

- Alonso E, Garcia- Luque I, Avila- Rincon MJ, Wicke B, Serra MT, and Diaz- Ruiz, JR, 1989. A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. *Journal of Phytopathology* 125: 67- 76.
- Bananej K, Ahoonmanesh A, Shahraeen N and Lesemann D, 1996. Identification of Tomato spotted wilt virus from tomato fields in Varamin area. *Iranian Journal of Plant Pathology* 32: 29-30.
- Chiemsombat P, Gajanandana O, Warin N, Hongprayoon R, Bhunchoth A, Pongsapich P, 2008. Biological and molecular characterization of tospoviruses in Thailand. *Archives of Virology* 153: 571-577.
- Chitra TR, Prakash, HS, Albrechtsen SE, Shetty HS, and. Mathur SB, 1999. Infection of tomato and bell pepper by ToMV and TMV at different growth stages and establishment of virus in seeds. *Journal of Plant Pathology* 81:123-126
- Chu FH, Chao CH, Chung MH, Chen CC and Yeh SD, 2001. Completion of genom sequence of Watermelon silver mottle virus and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. *Phytopathology* 91: 361-368.
- Crowther J.R. (ed.). 2009. The ELISA Guidebook. 2nd edition, Springer Protocols: Methods in Molecular Biology, Vol. 516 (J. Walker, Series ed.) Humana Press, NJ, USA, 566 pp.
- Gallitelli D, 2000. The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research* 71:9- 21.
- Ghotbi T, Shahraeen N and Winter S, 2005. Occurrence of tospoviruses in ornamental and weed species in Markazi and Tehran provinces in Iran. *Plant Disease* 89: 425-429.
- Golnaraghi A, Shahraeen N, Pourrahim R, Ghorban S and Farzadfar S, 2001. First report of *Tomato spotted wilt virus* on soybean in Iran. *Plant Disease* 85: 1290-1290.
- Hajiabadi AM, Asaei F, Abdollahi MB and Rastgou M, 2012. Natural incidence of tomato viruses in the north of Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 390-396.
- Hajiabadi AM, Jafarpour B, Rastegar MF and Mandoulakani BA, 2009. Detection of Tomato spotted wilt virus in north-East of Iran. *International Journal of Food, Agriculture and Environment* 7: 471-474.
- Hassani-Mehraban A, Botermans M, Verhoeven JTJ, Meekes E, Saaijer J, Peters D, Goldbach R and Kormelink R, 2010. A distinct tospovirus causing necrotic streak on *Alstroemeria* sp. in Colombia. *Archives of Virology* 155: 423-428.
- Hollings M, Huttinga H, 1976. *Tomato mosaic virus*. Description of plant viruses. <http://www.dpv.net/dpvno: 156>.
- Jones DR, 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology* 113: 119-157.
- Kaye A, Moyer J, Parks E, Carbone I and Cubeta M, 2011. Population genetic analysis of Tomato spotted wilt virus on peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology* 101: 147-153.
- King A MQ., Andams MJ, Carstens EB, and Lefkowitz EJ, 2012. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses
- Kumar S, Udaya Shankar AC, Nayaka SC Lund OS and Prakash HS, 2011. Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letters in Applied Microbiology* 53: 359- 363.
- Letschert B, Adam G, Lesemann DE, Willingmann P and Heinze C, 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *Journal of Virological Methods* 106: 1- 10.

- Massumi H, Shaabani M, Hosseinipour A, Heydarnejad J and Rahimian H, 2009. Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant Disease* 93: 67- 72.
- Mohammadi M, Esmaeeli-far A, Zad J, Mossahebi G, and Okhovat M, 2000. Serological Detection and Symptomology of Tomato spotted wilt virus in Tehran Province, Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2: 107-117.
- Nischwitz C, Mullis S W, Gitaitis R D, and Csinos A S, 2006. First report of *Tomato spotted wilt virus* in soyabean (*Glycine max*) in Georgia. *Plant Disease* 90:524.
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG and Francki RIB, 1992. Cucumber mosaic virus. *Advanced Virus Research* 41:281-348.
- Pappu HR, Toit LJ, Schwartz HF, and Mohan SK, 2006. Sequence diversity of the nucleoprotein gene of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*) isolates from the western region of the United States. *Archives of Virology* 151: 1015–1025.
- Pourrahim R, Farzadfar S, Moini A, Shahraeen N and Ahoonmanesh A, 2001. First report of Tomato spotted wilt virus on potatoes in Iran. *Plant Disease* 85: 442-442.
- Rizos H, Gunn LV, Pares RD and Gillings RM, 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, 73:2099-2103.
- Rowhani A, Chay C, Golino DA and Falk W, 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology* 83:749-753.
- Sokhandan bashir N, Nematollahi S and Torabi E, 2008. Cucumber mosaic virus subgroup IA frequently occurs in the northwest Iran. *Acta virologica* 52: 237 – 242.
- Sokhandan Bashir N, Rasaei Kalhor M and Nourinejhad Zarghani S, 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes* 32:277-288.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kuma S, 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Tsompana M, Abad J, Purugganan M and Moyer J, 2005. The molecular population genetics of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) genome. *Molecular Ecology* 14: 53-66.
- Vinayarani G, Madhusudhan KN, Deepak SA, Niranjana SR and Prakash HS, 2011. Detection of mixed infection of tobamoviruses in tomato and bell pepper by using RT-PCR and Duplex RT-PCR. *International Journal of Plant Pathology* 2: 89-95.
- Whitfield AE., Ullman DE and German TL, 2005. Tospovirus-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43: 459-489.
- Zaitlin M, 2000. Tobacco mosaic virus. Description of plant viruses. [http:// www.dpv.net/](http://www.dpv.net/) dpv= 370.

Molecular Detection of Three Virus Species in Tomato Fields of Azarbaijan-e-Sharqi Province

D Koolivand^{1*}, N Sokhandan Bashir², Sh Sobhi³ and M Rastgo⁴

¹ Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

² Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

³ Former M Sc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

⁴ Assistant Professor, Department of Plant protection, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.

*Corresponding author: Koolivand@znu.ac.ir

Received: 17 August 2016

Accepted: 24 May 2017

Abstract

Infections with predominant viruses including *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and *Tobacco mosaic virus* (TMV) in tomato fields of Azarbaijan-e-Sharqi Province were surveyed. 205 samples showing symptoms such as mosaic, dwarfing, necrosis, leaf narrowing, leaf and fruit deformation were collected fromand subjected to glasshouse inoculations. Samples suspected to be infected by CMV were first screened against the virus by ELISA, and then RNA were extracted. RT-PCR reactions were performed by the use of CMV-, *Tospovirus* or *Tobamovirus* specific primers depending on virus symptoms. Upon optimization of the annealing temperature in the PCR the anticipated bands were amplified corresponding to *Tospovirus*, *Tobamovirus* or CMV in 6, 37 and 23 samples, respectively. Restriction analyses with *HindIII*, *EcoRI* and *XbaI* of the fragments which were amplified with *Tospovirus*-specific primers showed, TSWV was in all the six samples. In addition, cloning and sequencing of the amplified fragments proved the TSWV identity of the isolates. When the fragments amplified with the *Tobamovirus* primers were restricted by *TaqI* the resultant restriction profile revealed ToMV identity of the virus in 37 samples, but no TMV was present in the samples. Also, *MspI* restriction digestion of the fragments amplified with the CMV primers showed that the CMV isolates were placed in Subgroup I. In addition, the resultant data were indicative of high frequency of infection with CMV and ToMV in the collected samples.

Keywords: CMV, ELISA, Restriction analysis, RT-PCR, TMV, ToMV, TSWV.