

ردیابی و مقایسه فیلوژنتیکی جدایه‌های زعفران و گوجه‌فرنگی و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (TSWV) در استان خراسان جنوبی

سالار فرخوند^۱، سیده عاطفه حسینی^{۲*}، خدیجه سالاری^۳ و محمدحسین امینی فرد^۴
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
۳. مربی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت
۴. استادیار، گروه علوم باغبانی و مرکز پژوهشی گیاهان ویژه، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۱)

چکیده

ویروس عامل پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*) متعلق به جنس *Tospovirus* از خانواده *Bunyaviridae* است. به منظور ردیابی این ویروس در پاییز ۱۳۹۵، شمار ۱۶۱ نمونه زعفران و ۴۴ نمونه گوجه‌فرنگی دارای نشانه‌های موزاییک، پیچیدگی برگ‌های انتهایی در زعفران و بافت‌مردگی در گوجه‌فرنگی، از کشتزارهای استان خراسان جنوبی (شهرستان‌های قاین، خوسف، درمیان و فردوس) گردآوری شد. بررسی اولیه نمونه‌ها با آزمون الایزای ساندویچی و آنتی سرم TSWV بیانگر آلودگی ۸/۷ و ۱۱/۴ درصدی نمونه‌های زعفران و گوجه‌فرنگی به TSWV بود. مایه‌زنی مکانیکی نمونه‌های مثبت روی گیاهان *Nicotiana tabacum* cv. Samsun و *Chenopodium quinoa* سبب بروز نشانه‌های موزاییک، ابلقی، چین‌داری و لکه موضعی برگ در شرایط گلخانه شد. توالی کامل ناحیه کدکننده نوکلئوپروتئین پنج جدایه زعفران و دو جدایه گوجه‌فرنگی این ویروس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر، همسانه سازی و تعیین توالی و درخت تبارزایی آن رسم شد. سه جدایه ایرانی مربوط به زعفران در گروه یک، نزدیک به جدایه‌ای از آمریکا، دو جدایه دیگر در گروه سه نزدیک به جدایه‌ای از ایتالیا و دو جدایه مربوط به گوجه‌فرنگی در گروه دو نزدیک به جدایه‌ای از چین قرار گرفتند. بنابر دانش ما این تحقیق، نخستین ردیابی و مقایسه ترادف ناحیه ژنی نوکلئوپروتئین جدایه‌های منتخب این ویروس روی گیاه زعفران در ایران است.

واژه‌های کلیدی: ترادف نوکلئوپروتئین، خراسان جنوبی، زعفران، گوجه‌فرنگی، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی.

Detection and phylogenetic analysis of saffron and tomato isolates of *Tomato spotted wilt virus* from South Khorasan

Salar Farkhoond¹, Seyede Atefeh Hosseini^{2*}, Khadijeh Salari³ and Mohammad Hossein Amini Fard⁴

1, 2. M. Sc. Student and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran

3. Instructor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Iran

4. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran

(Received: Mar. 15, 2017 - Accepted: Sep. 23, 2017)

ABSTRACT

Tomato spotted wilt virus is a member of the genus *Tospovirus*, and family *Bunyaviridae*. TSWV has a wide range of hosts and is one of the most destructive viruses. In order to detect TSWV in South Khorasan province, a total of, 161 saffron and 44 tomato symptomatic samples were collected from Ghaen, Khosf, Darmyan and Ferdows counties, during fall 2016. Infection ratios on tomato and saffron were evaluated as 11.4 and 8.7 percent, respectively, by DAS-ELISA. Mechanical inoculation of ELISA-positive samples on *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* cv Samsun and *Chenopodium quinoa* caused mosaic, mottle, local lesion and rogues. The nucleoprotein gene of five saffron and two potato isolates of TSWV was amplified, cloned, and sequenced. In the Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of N protein gene, TSWV isolates derived into three groups. Three Iranian isolates of saffron grouped into clusters one and three and two Iranian isolates of tomato were placed in group two. Results showed that isolates from different geographical and host plants were separated into different groups. According to our knowledge this is the first report on molecular characterization of TSWV on saffron in the world.

Keywords: Nucleoprotein sequence, Saffron, South Khorasan, Tomato, *Tomato spotted wilt virus*.

* Corresponding author E-mail: ahosseini@birjand.ac.ir

مقدمه

زعفران گران‌ترین ادویه جهان بوده و جایگاه منحصر به فردی در میان محصولات صنعتی و صادراتی ایران دارد. خراسان جنوبی مرکز اصلی پرورش زعفران ایران است و در سال ۱۳۹۴ بیش از ۱۵ هزار هکتار از اراضی کشاورزی زیر کشت این گیاه با ارزش بوده است. به این جهت شناسایی عامل‌های خسارت‌زای آن از جمله ویروس‌ها اهمیت دارد (Behdani & Falahi, 2015). تاکنون پراکنش پوتی ویروس‌های آلوده‌کننده زعفران از مناطق عمده زعفران‌کاری ایران گزارش شده است که پس از توالی یابی بیشترین شباهت را به ویروس‌های *Ceratobium mosaic virus* و *Telosma mosaic virus* داشته‌اند (Parizad et al., 2016). همچنین ویروس موزاییک زرد لوبیا از کشتزارهای زعفران استان خراسان جنوبی ردیابی شده است (Dorri et al., 2014). ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*) ویروس تیپ جنس توسپوویروس است که نخستین بار در سال ۱۹۱۹ در استرالیا گزارش و موجب خسارت‌ها فراوانی به سبزی‌ها، حبوبات و گونه‌های زینتی می‌شود (Brittlebank 1919, Testa et al., 2011; Mateus et al., 2012). TSWV دامنه گسترده و گسترش جهانی دارد و جزو ده ویروس با بیشترین خسارت‌زایی در جهان است. TSWV در دو گونه از جنس *Crocus* به نام‌های *C. chrysanthus* و *C. vernus* در لیتوانی گزارش شده است (Samuitienė et al., 2008). نشانه‌های ویروس در برگ‌ها برنزه شدن، رشد یک‌سویه، پیچیدگی، تغییر شکل برگ‌ها و ایجاد لکه‌های قهوه‌ای مایل به سیاه است. TSWV در طبیعت به وسیله تریپس‌ها به روش گردشی- تکثیری و بیشتر با دو گونه *Frankliniella occidentalis* و *Thrips tabaci* منتقل می‌شود (Scholthof et al., 2011). نخستین بار این ویروس در ایران روی گوجه‌فرنگی گزارش شد (Bananej et al., 1996). همچنین روی گوجه‌فرنگی در استان خراسان رضوی و سویا از استان‌های اردبیل، گلستان، خوزستان، گلستان و مازندران و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی مناطق مرکزی و جنوبی ایران و در استان‌های اصفهان، لرستان، فارس،

مرکزی، گلستان، مازندران، تهران، همدان و غرب آذربایجان روی گوجه‌فرنگی گزارش شده است (Golnaraghi et al., 2008; Massumi et al., 2009; Farzadfar et al., 2002). این ویروس پیکره چندوجهی به قطر ۱۲-۸۰ نانومتر دارد. که با پوشش لیپوپروتئینی پوشیده شده و دو نوع گلیکوپروتئین دارد. ژنوم (ژنگان) ویروس تک‌ رشته‌ای و از نوع RNA منفی یا دوقطبی است (Pappu et al., 2009) و از سه بخش بزرگ (۸/۹ جفت باز)، متوسط (۴/۸ جفت باز) و کوچک (۲/۹ جفت باز) تشکیل شده که روی هم‌رفته پنج نوع پروتئین را کد می‌کنند (Prins & Goldbach, 1998). آر.ان.ای بزرگ ویروس قطبیت منفی داشته و آنزیم آر.ان.ای پلیمرز وابسته به RNA را کد می‌کند، هر دو آر.ان.ای متوسط و کوچک با استراتژی دوقطبی^۱ بیان می‌شوند. گلیکوپروتئین و یک پروتئین غیر ساختاری متوسط (NSm) از قطعه M و پروتئین غیر ساختاری کوچک (NSs) و نوکلئوپروتئین (N) از قطعه S بیان می‌شوند (Pappu et al., 2009). بررسی تغییرات ژنتیکی صورت گرفته در ترادف کامل ژنوم ویروس نشان می‌دهد، جدایه‌های مربوط به مناطق جغرافیایی متفاوت همه در یک گروه واقع نشده و در گروه‌های متفاوتی قرار می‌گیرند و دلیل این تنوع در تبارزایی (فیلوژنتیکی)، بازآرایی و نوترکیبی بوده که در تکامل این ویروس مشارکت دارند (Simon-Loriere et al., 2011). نوکلئوپروتئین به در ارتباط با سه RNA ویروس است و با آن‌ها تشکیل نوکلئوپروتئین می‌دهد. این ناحیه ژنی در تبارزایی و طبقه‌بندی ویروس‌های جنس توسپوویروس استفاده شده است (Winter et al., 2005; Dong et al., 2008). تاکنون گزارشی از این ویروس روی گیاه زعفران در جهان دیده نشده است. این تحقیق به ردیابی TSWV در کشتزارهای زعفران و گوجه‌فرنگی استان خراسان جنوبی و همچنین تحلیل تبارزایی جدایه‌های مختلف این ویروس بر مبنای ناحیه کدکننده نوکلئوپروتئین پرداخته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و ردیابی ویروس با روش ایزا

شمار ۱۶۱ نمونه دارای نشانه‌های موزاییک، بافت‌مردگی، کوتولگی و پیچیدگی انتهایی برگ‌ها در آبان و آذرماه سال ۱۳۹۵ از مناطق زیرکشت زعفران در استان خراسان جنوبی، گردآوری شد. همچنین شمار ۴۴ نمونه گوجه‌فرنگی دارای نشانه‌های موزاییک و بافت‌مردگی نیز از کشتزارهای شهرستان‌های بیرجند و درمیان گردآوری شد. نمونه‌ها در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل و برای بررسی وجود ویروس در نمونه‌ها آزمون سرولوژیکی ایزای ساندویچ دوطرفه^۱ (DAS-ELISA) با استفاده از آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای TSWV (اهدایی دکتر Turina، دانشگاه تورینو ایتالیا) انجام شد (Clarck & Adams, 1977). در این آزمون آنتی‌بادی (پادتن) و آنتی‌بادی متصل به آنزیم با رقت یک به هزار استفاده شد. با استفاده از دستگاه ایزا خون، میزان جذب سه برابر شاهد منفی، به‌عنوان مثبت به کار رفت.

بررسی‌های گلخانه‌ای

دو جدایه از گوجه‌فرنگی و پنج جدایه از زعفران به‌صورت مکانیکی روی *Nicotiana benthamiana*، *Chenopodium* و *Nicotiana tabacum* cv. Samsun، با استفاده از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و pH ۷، در مرحله پنج برگی مایه‌زنی شد. گیاهان مایه‌زنی‌شده در شرایط گلخانه، در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و ۱۲ ساعت نور نگهداری شدند. گیاهان هر روز آبیاری شده و با محلول هوگلند به‌منظور رشد بهتر محلول‌پاشی شدند. نشانه‌های روی گیاهان آزمون مایه‌زنی‌شده، پس از دو هفته بررسی شد.

آزمون نسخه‌برداری معکوس- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR)^۲

روش آزمون زنجیره‌ای پلیمرز و نسخه‌برداری معکوس برای شناسایی مولکولی ویروس انجام شد. نمونه‌های زعفران و گوجه‌فرنگی دارای واکنش مثبت در آزمون

ایزا، برای استخراج آر.ان.ای^۳ با استفاده از روش CTAB تغییریافته استفاده شد (Chang, 1993). آر.ان.ای‌های با غلظت بالا، و با کمترین آلودگی پروتئینی توسط دستگاه نانودراپ (Cole parmer- USA) تعیین و در واکنش نسخه‌برداری معکوس استفاده شد. یک جفت آغازگر S1938F/S2767R مربوط به ناحیه کدکننده نوکلئوپروتئین یا N با ترادف (5'- S1938F: CCCTCGAGGCTTTCAAGCAAGTTCTGCG-3') و (5'- S2767R: GCTCTAGAGCCATCATGTCTAAGGTTAA-3') (Tsompana et al., 2005) استفاده شد که قطعه‌ای به طول ۷۷۷ نوکلئوتید را تکثیر می‌کرد. در آغاز رشته مکمل DNA با واکنش نسخه‌برداری معکوس ایجاد شد. برای ساخت DNA مکمل، به ازای هر نمونه ۲/۵ میکرولیتر از آغازگر معکوس (۱۵ پیکومول) و ۶ میکرولیتر آب سترون اضافه شد، آنگاه به هر ریزلوله (میکروتیوپ) ۵ میکرولیتر RNA اضافه شد، به مدت ده دقیقه در حمام بن‌ماری دمای ۶۰ درجه سلسیوس نگهداری و سپس یک دقیقه روی یخ قرار گرفت. در نهایت ۴ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس (۱۰۰۰ u) (RevertAid Reverse Transcriptase Fermentase) به هر لوله اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Germany) قرار گرفت. به‌منظور تکثیر ژن کدکننده نوکلئوپروتئین، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. به ازای هر نمونه ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ پیکومول)، همچنین ۶/۵ میکرولیتر آب سترون اضافه و ۱۲/۵ میکرولیتر Premix (2X PCR Master mix Red)، مخلوط شد. ۲۱ میکرولیتر از مخلوط به‌دست‌آمده با ۴ میکرولیتر از دی.ان.ا^۴ مکمل هر جدایه درون لوله‌های کوچک انتقال داده شد. واکنش با برنامه دمایی یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و ۳۵ چرخه متشکل از دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه ثانیه، دمای ۵۰

3. RNA
4. DNA

1. Double antibody sandwich-Enzyme linked immunosorbent assay
2. Reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR)

مقایسه شد. مقایسه هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی بین جدایه‌های این ویروس‌ها و دیگر جدایه‌های ثبت‌شده در بانک ژن، با استفاده از برنامه ClustalW2 و نرم‌افزار Bioedit انجام شد. درخت تبارزایی به‌دست‌آمده از هم‌ردیف‌سازی چندگانه به روش Neighbor joining با برنامه MEGA6.1 و بر پایه هزار تکرار ترسیم شد (Tamura *et al.*, 2013). ماتریکس تشابه در سطح آمینواسیدی و نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار MegAlign و SDTV رسم شد. مقایسه اسیدآمینهای با نرم‌افزار CLC انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمون الایزا

بر پایه آزمون الایزای ساندویچی، آلودگی نمونه‌های زعفران و گوجه‌فرنگی از استان خراسان جنوبی به TSWV، به ترتیب ۸/۷ و ۱۱/۴ درصد کل نمونه‌ها است. میزان آلودگی در نمونه‌های گردآوری‌شده از کشتزارهای زعفران و گوجه‌فرنگی در شهرستان‌های مورد بررسی در جدول ۱ آمده است (جدول ۱).

نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای

جدایه‌های منتخب و مثبت در آزمون الایزا در شرایط گلخانه روی گیاه *N. benthamiana* نشانه‌های زردی، ابلقی و تاوولی، روی *N. tabacum cv. Samsun* نشانه‌های زردی سیستمیک (فراگیر) و تاوولی شدن و روی گیاه *C. quinoa* نشانه‌های بافت‌مردگی موضعی ایجاد کرد (شکل ۱). این نشانه‌های دو هفته پس از مایه‌زنی مشاهده شد.

درجه سلسیوس به مدت سی ثانیه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت سی ثانیه انجام شد. درنهایت دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه به‌عنوان تکمیل پلیمریزاسیون (بسپارزایی) به کار رفت. محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی رنگ DNA Green Viewer (پارس‌توس - ایران) الکتروفورز شد.

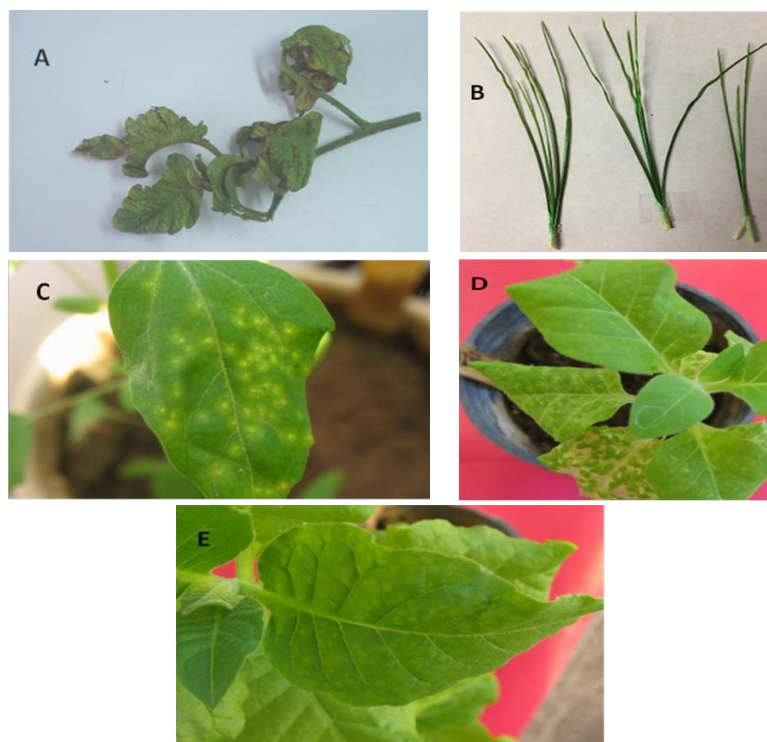
همسانه‌سازی و تعیین توالی کامل ناحیه کدکننده نوکلئوپروتئین

محصولات PCR مربوط به پنج نمونه زعفران و دو نمونه گوجه‌فرنگی، که در ناحیه مورد انتظار باند داده بودند، پس از جداسازی از ژل و خالص‌سازی با استفاده از کیت استخراج از ژل (دنا زیست) به درون ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T الحاق و پلاسمیدهای نوترکیب، درون سلول‌های باکتریایی مستعد *Escherichia coli* سویه DH5 α تراریخت شدند. همسانه‌سازی با استفاده از کیت InsT/Aclone PCR product Cloning Kit (Fermentase) و با دستورکار شرکت سازنده انجام شد. باکتری‌های تراریخت در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک (پادزی) انتخابی آمپی‌سیلین (۲۰ mg/ml) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد. همسانه‌های حاوی ژن مورد نظر از طریق کلونی پی سی آر با استفاده از آغازگرهای M13 شناسایی شدند (Soltani *et al.*, 2013). دی‌ان‌ای پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت (isolation DNA Plasmid) دناریست استخراج‌شده و تعیین ترادف (توسط شرکت تکاپوزیست) شد. ترادف‌های به‌دست‌آمده، در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLASTn با ترادف‌های موجود در GenBank

جدول ۱. میزان آلودگی به TSWV در نمونه‌های دارای نشانه‌های زعفران و گوجه‌فرنگی گردآوری‌شده از شهرستان‌های استان خراسان جنوبی با آزمون الایزا

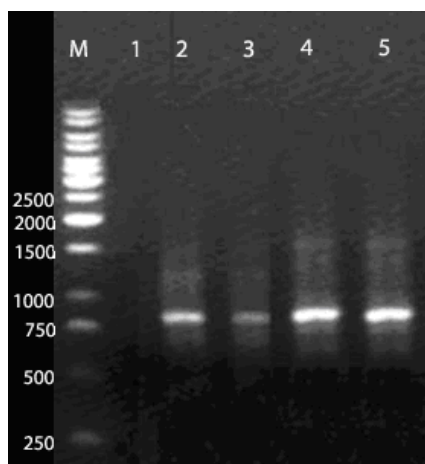
Table 1. Occurrence of TSWV on symptomatic saffron and tomato samples collected from different cities of South Khorasan by ELISA

City (area) of sampling	Host	Total samples	TSWV	Percentage
Khosf (Gol)	Saffron	64	5	7.8
Khosf (feriz)	Saffron	24	2	8.3
Ghaen (Deheshk)	Saffron	24	1	4.1
Birjand	Saffron	20	2	10
Ghaen (Abolkhayr)	Saffron	29	4	13.7
Total		161	14	8.7
Birjand	Tomato	23	3	13
Darmyan	tomato	21	2	9.5
Total		44	5	11.4



شکل ۱. نشانه‌های بافت‌مردگی و بدشکلی روی گوجه‌فرنگی (A) و موزاییک و بدشکلی روی زعفران (B) آلوده به TSWV، گردآوری شده از کشتزارهای استان خراسان جنوبی. نشانه‌های روی گیاهان *Chenopodium quinoa* به صورت لکه‌های موضعی (C)، روی *Nicotiana benthamiana* به صورت زردی، بافت‌مردگی و تاولی شدن برگ (D) و روی *N. t. cv. samsun* به صورت موزاییک (E) مایه‌زنی شده با TSWV در شرایط گلخانه.

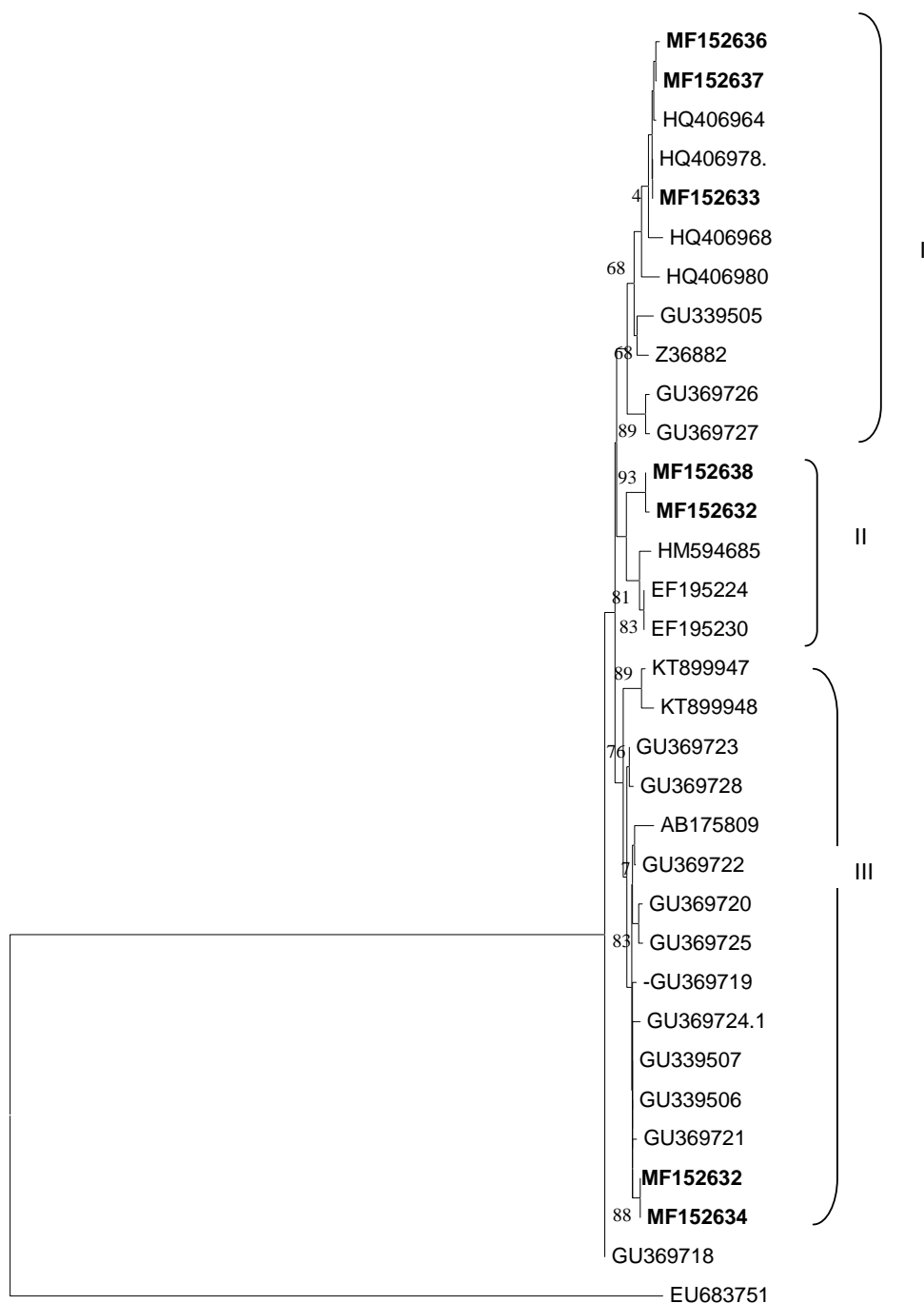
Figure 1. Symptoms of deformation and necrosis on tomato (A), mosaic and apical spring of leaf on saffron (B), infested with TSWV and collected, from South Khorasan. Symptoms of chlorosis, and local lesion on *C. quinoa* (C), Chlorosis, necrosis and rogues on *N. benthamiana* (D) and mosaic on *N. t. cv. Samsun* (E), inoculated by TSWV, under greenhouse condition. (3, 4).



شکل ۲. الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی ژن N، TSWV با باند ۷۷۷ جفت بازی در ژل آگارز. (M) نشانگر DNA. (۱) شاهد منفی. ۲-۵ نمونه‌های آلوده به ویروس.

Figure 2. Gel electrophoresis of PCR product of 777bp of N gene of TSWV amplified by specific primers on agarosis gel. M) DNA ladder, 1) Negative sample 2-4) positive samples

نتایج نسخه‌برداری معکوس- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، همسانه‌سازی و تعیین ترادف جدایه‌های ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی تکثیر قطعه‌ای به طول ۷۷۷ جفت باز با آغازگرهای اختصاصی TSWV با روش RT-PCR، آلودگی پنج نمونه زعفران و دو نمونه گوجه‌فرنگی به این ویروس را تأیید کرد (شکل ۲). محصول PCR هفت جدایه ویروس همسانه‌سازی و پس از تأیید موفقیت با کلونی پی سی آر، از دو جهت تعیین توالی شدند. مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده با داده‌های موجود در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI و با استفاده از ابزار BLASTn نشان داد، قطعه‌های همانندسازی مربوط به TSWV است. در تحلیل تبارزایی، بررسی جدایه‌های تعیین توالی شده (با شماره دسترسی موجود در جدول ۳) با شماری از جدایه‌های موجود در بانک ژن انجام شد (شکل ۳).



شکل ۳. درخت تبارزایی رسم شده بر پایهٔ ترادف نوکلئوتیدی ژن نوکلئوپروتئین جدایه‌های ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی مربوط به پنج جدایهٔ زعفران، دو جدایهٔ گوجه‌فرنگی و جدایه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 به روش Neighbor joining. برای هر جدایهٔ جهان نام جدایه، میزبان، کشور و شمارهٔ دسترسی در شمارهٔ ۳ آمده است. ویروس *Impatient necrotic spot virus* به‌عنوان برون گروه در نظر گرفته شده است. جدایه‌های ایرانی تعیین ترادف‌شده این تحقیق به‌صورت پررنگ نشان داده شده است و ویژگی‌های آن‌ها در جدول ۳ آمده است.

Figure 3. Phylogenetic tree obtained from the alignment of nucleotide (A) sequences of the TSWV nucleoprotein isolates from five Iranian isolates of saffron and two isolates of tomato compared to N sequences of the world. For each sequence the country of origin, name of isolate and accession No. are included in Table 4. *Impatient necrotic spot virus* is an outgroup. Phylogenetic trees were constructed using MEGA version 6 and the Neighbor joining tree test with 1000 bootstrap replications. Iranian isolates are bolded.

تحلیل تبارزایی

یکدیگر در سطح نوکلئوتیدی دارند (شکل ۴). بیشترین یکسانی جدایه‌های ایرانی و دیگر جدایه‌های مورد مقایسه جهان در این تحقیق، به میزان ۹۹/۳ بین جدایه ایرانی SKG11 و SKG21 مربوط به زعفران قائن، با جدایه‌ای از ایتالیا (GU369721) بود که در درخت تبارزایی نیز در یک گروه قرار گرفتند و کمترین شباهت نیز بین جدایه SKB14 با جدایه‌ای از چین (HM594685) به میزان ۹۵/۶ بود که در دو گروه جداگانه در درخت تبارزایی قرار گرفتند (شکل ۴). ماتریکس تشابه در سطح اسیدآمینه‌ای با نرم‌افزار SDTV در شکل چهار بیان شده است. هم‌ردیف سازی ترجمه اسید آمینه‌ای با نرم‌افزار CLC نشان از جایگزینی شماری اسیدآمینه در جدایه‌های ایرانی در مقایسه با دیگر جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق داشت که در جدول ۲ آورده شده است.

در بررسی‌های تبارزایی پنج جدایه زعفران و دو جدایه گوجه‌فرنگی در ناحیه کدکننده نوکلئوپروتئین ویروس یادشده در مقایسه با جدایه‌های جهان موجود در بانک ژن که مربوط به مناطق مختلف جغرافیایی بودند، سه گروه جداگانه تشکیل شد. از پنج جدایه ایرانی مربوط به زعفران، سه جدایه (SKK29، SKB64 و SKB14) در گروه یک نزدیک به جدایه‌هایی از آمریکا و دو جدایه (SKG21 و SKG11) در گروه سه نزدیک به جدایه‌هایی از ایتالیا قرار گرفتند. دو جدایه گوجه‌فرنگی (SKB12 و SKD24) ویروس نیز در گروه دو نزدیک به جدایه‌هایی از چین و کره قرار گرفتند. تشابه توالی در سطح نوکلئوتیدی با نرم‌افزار Meg Align (داده‌ها نشان داده نشده است) نشان داد، جدایه‌های ایرانی، یکسانی ۹۹/۸ تا ۹۵/۶ درصدی با

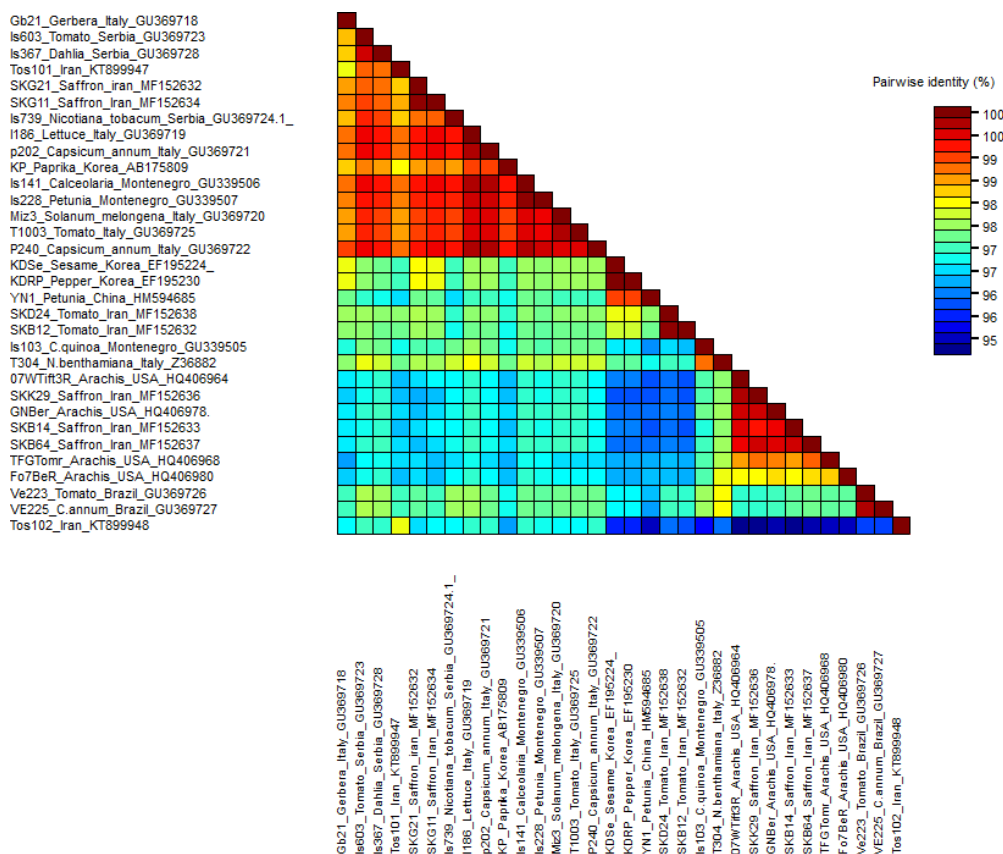
جدول ۲. مقایسه جایگزینی اسیدآمینه‌ای جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های متناظر جهان در پروتئین N ویروس TSWV

Iranian isolates	Position of substitution of amino acids in Iranian isolates compared to deduced sequences on Nucleoprotein of TSWV				
	26 (D)	187 (R)	205 (N)	222(S)	230(I)
SKG21					
SKB14			T	C	V
SKG11					
SKG64			T	C	V
SKD24	N				V
SKB12	N	K			V
SKK29		K	T	C	V

جدول ۳. رس شمار و مبدأ ناحیه کدکننده نوکلئوپروتئین جدایه‌های TSWV موجود در بانک جهانی ژن و جدایه‌های ایرانی این تحقیق، برای مقایسه و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی (تبارزایی) ویروس

Table 3. Accession numbers and origins of TSWV isolates from gene bank and Iranian isolates of this research for phylogenetic analysis

Accession Number	Country	Isolate	Host
HQ406964	USA	07W	Arachis
HQ406978	USA	GN-Ber	Arachis
HQ406968	USA	TFG-Tmor	Arachis
HQ406980	USA	Fo7	Arachis
GU406980	Monenegro	Is-103	<i>Chenopodium quinoa</i>
Z36882	Italy	T304	<i>Nicotiana benthamiana</i>
GU369726	Brazil	Ve223	Tomato
GU369727	Brazil	VE-225	<i>C. annuum</i>
HM594685	China	YN-1	Petunia
EF195224	Korea	KDSe	Sesame
EF195230	Korea	KDRP	Pepper
KT899947	Iran	Tos-101	Tomato
KT899948	Iran	Tos-102	Tomato
GU369723	Serbia	Is-603	Tomato
GU360728	Serbia	Is-367	Dahlia
AB175809	Korea	KP	Paprika
GU369722	Italy	P240	<i>Capsicum annuum</i>
GU369720	Italy	Miz3	<i>Solanum melongena</i>
GU369725	Italy	T-1003	Tomato
GU369719	Italy	I-186	Lettuce
GU369724	Serbia	Is739	<i>N. tabacum</i>
GU339506	Monenegro	Is141	Calceolaria
GU369721	Italy	P202	<i>Capsicum annuum</i>
GU369718	Italy	Gb21	Gerbera
MF152635	Iran (Ghaen)	SKG21	Saffron
MF152634	Iran (Ghaen)	SKG11	Saffron
MF152633	Iran (Birjand)	SKB14	Saffron
MF152637	Iran (Birjand)	SKB64	Saffron
MF152636	Iran (Khosf)	SKK29	Saffron
MF152638	Iran (Darmyan)	SKD24	Tomato
MF152632	Iran (Birjand)	SKB12	Tomato
MF152635	Iran (Ghaen)	SKG21	Saffron



شکل ۴. مقایسه درصد همولوژی ژن نوکلئو پروتئین در سطح اسید آمینه هفت جدایه ایرانی با جدایه‌های جهان که به روش Clustal W با برنامه SDTV ترسیم شده است.

Figure 4. Homology matrix of nucleoprotein amino acids of 7 Iranian isolates of TSWV compared to some of the world isolates using Clustal W by SDTV.

گوجه‌فرنگی، حساسیت بیشتر میزبان و گیاهان نگهدارنده باشد (Pappu *et al.*, 2009). البته در زمینه رقم‌های گوجه‌فرنگی و زعفران در استان خراسان جنوبی داده‌های جامعی وجود ندارد، اما از آنجائی که ناقل *Frankliniella occidentalis* در دمای بالاتر (۳۰ درجه سلسیوس) شمار نسل بیشتری ایجاد می‌کند و گوجه‌فرنگی در این دما در فصل بهار و تابستان در کشتزارها وجود دارد، اما زعفران در پاییز و در دمای پایین‌تری رشد می‌کند، بنابراین کارایی ناقل روی گوجه‌فرنگی بیشتر است. همچنین از آنجائی که ویروس دامنه میزبانی گسترده‌ای دارد و ناقلان روی علف‌های هرز، مدت طولانی باقی می‌مانند، لذا نقش گیاهان نگهدارنده در کشتزارهای زعفران و گوجه‌فرنگی، در اپیدمیولوژی (همه‌گیری شناختی) ویروس مهم است (Sivamani Sundaraj *et al.*, 2014). نشانه‌های مشاهده‌شده روی گیاهان توتون

بحث

تجارت جهانی اندام‌های رویشی و سبزی‌ها همراه با پراکنش گسترده تریپس به‌عنوان ناقل آن سبب گسترش بالای ویروس TSWV در بیشتر مناطق و محصولات پرشمار شده است. گسترش بالای این ویروس زمینه را برای تکامل آن به‌منظور آلوده سازی میزبان‌های بیشتر با توجه به شرایط آب و هوایی متفاوت فراهم آورده است (Zhang *et al.*, 2016). این تحقیق به ردیابی و مقایسه ترادف ژن نوکلئوپروتئین جدایه‌های منتخب این ویروس در کشتزارهای گوجه‌فرنگی و زعفران استان خراسان جنوبی پرداخته است. میزان آلودگی به‌طور کلی در نمونه‌های گردآوری‌شده از کشتزارهای زعفران و گوجه‌فرنگی به ترتیب ۸/۷ و ۱۱/۴ درصد بود. آلودگی بالاتر گیاه گوجه‌فرنگی نسبت به زعفران، می‌تواند به دلایلی مانند توان بیماری‌زایی بالاتر جدایه‌های TSWV روی

داده شده است که، به دلیل پراکنش گسترده TSWV با تبادل‌های گسترده محصولات کشاورزی در سطح جهانی، جدایه‌های ویروس، همیشه بر پایه منطقه جغرافیایی از یکدیگر قابل جداسازی نبوده و جدایه‌های آمریکایی، اروپایی و آسیایی ممکن است در یک گروه قرار گیرند (Hassani mehraban *et al.*, 2005). احتمال وقوع نوترکیبی بر پایه تحقیقات پیشین در جدایه‌های TSWV بسیار اتفاق می‌افتد و این یک سازوکار تکاملی برای ویروس‌های با ژنوم RNA تک رشته است. این سازوکار به یقین در ایجاد جدایه‌های نوظهور در یک منطقه و قرارگیری جدایه‌های یک منطقه جغرافیایی در گروه‌های متفاوت تبارزایی مؤثر است و از سوی دیگر امکان آلوده‌سازی میزبان‌های جدید را فراهم می‌آورد (Lian *et al.*, 2013). جایگاه‌های حفاظت‌شده Arg⁶⁰, Lys⁶⁵, Lys⁶⁸, Arg⁹⁴, Arg⁹⁵, Lys¹⁸³ و Tyr¹⁸ روی ژن نوکلئوپروتئین جدایه‌های ایرانی مشابه با جدایه‌های جهان دیده می‌شود که در باند شدن آن با RNA، نقش دارد (Li *et al.*, 2015). البته تغییرهایی در برخی اسیدآمین‌های جدایه‌های این تحقیق در ناحیه کدکننده یادشده، دیده می‌شود که بررسی تأثیر آن در زیست‌شناختی ویروس، نیاز به تحقیقات گسترده‌تری دارد.

نتیجه‌گیری کلی

بنابر نتایج این تحقیق، آلودگی طبیعی این ویروس برای نخستین بار روی زعفران در جهان و نیز نخستین بار روی گوجه‌فرنگی استان خراسان جنوبی گزارش می‌شود. میزان آلودگی در نمونه‌های گردآوری‌شده از کشتزارهای زعفران و گوجه‌فرنگی به ترتیب ۸/۷ و ۱۱/۴ درصد بود. در تحلیل تبارزایی این ویروس بر مبنای ژن نوکلئوپروتئین سه گروه تشکیل شد که جدایه‌های ایرانی در هر سه گروه قرار گرفتند. مقایسه ناحیه کدکننده نوکلئوپروتئین TSWV در دو میزبان متفاوت نیز برای نخستین بار در جمعیت جدایه‌های ایرانی ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی صورت گرفته و مشخص شد در این ناحیه ژنی، جدایه‌های TSWV، بیشتر بر مبنای تفاوت جغرافیایی تا میزبان از یکدیگر جداسازی شدند.

مایه‌زنی‌شده با این ویروس، با نشانه‌های گزارش شده در تحقیقات پیشین که در آغاز به‌صورت لکه‌های بافت مرده و سپس بافت مردگی (نکروز) ساقه و پژمردگی گیاه بود، انطباق دارد (Esmaili far *et al.*, 2010). تحلیل تبارزایی جدایه‌های TSWV در این تحقیق، بر مبنای ناحیه کدکننده N که ناحیه ژنی مهمی در طبقه‌بندی توستوپوویروس‌ها است، صورت گرفت (Hassani mehraban *et al.*, 2005; Golnaraghi *et al.*, 2008). در درخت تبارزایی مربوط به جدایه‌های ایرانی بررسی‌شده در این تحقیق و جدایه‌های جهان، سه گروه جداگانه تشکیل شد که برابر تحقیقات پیشین بود (Zindowich *et al.*, 2014) (شکل ۳). در گروه یک جدایه‌های ایرانی مربوط به گیاه زعفران جداشده از شهرستان‌های بیرجند و خوسف که فاصله جغرافیایی بسیار کمی دارند قرار گرفتند، در صورتی که دو جدایه مربوط به گیاه زعفران از شهرستان قائن بافاصله حدود ۱۱۰ کیلومتر از شهرستان بیرجند، در گروه سه قرار گرفتند. همچنین دو جدایه ایرانی (KT899948, KT899947) که بیشتر تعیین توالی شده بودند، در این گروه اما در زیرگروه جداگانه‌ای قرار گرفتند. بیشترین شباهت بین KT899948 با SKG11 به میزان ۹۸ درصد و مربوط به زعفران بود و چون این دو جدایه مربوط به دو میزبان متفاوت بوده اما در ژن N شباهت بالایی داشتند، می‌توان نتیجه گرفت، این ناحیه ژنی در دامنه میزبانی ویروس اهمیت زیادی ندارد (Zindowich *et al.*, 2014). در گروه دو تبارزایی، دو جدایه مربوط به میزبان دیگر یعنی گوجه‌فرنگی قرار گرفتند. بنابراین در ظاهر جدایه‌های این تحقیق، در این ناحیه ژنی، بیشتر بر مبنای تفاوت جغرافیایی تا میزبان از یکدیگر جداسازی شدند. بررسی‌های تبارزایی جدایه‌های مربوط به کشور کره، مونتنگرو و آفریقای جنوبی نیز نتایج مشابه نشان داد و در گروه‌بندی این جدایه‌ها، تفاوت جغرافیایی نقش مهم‌تری نسبت به میزبان و زمان نمونه‌برداری داشت (Silva *et al.*, 2001; Sivparsad & Gubba, 2008; Tsompana *et al.*, 2005; Zindovic, 2014). البته در بررسی‌های پیشین تبارزایی در جنس توستوپوویروس و جدایه‌های TSWV و IYSV نشان

REFERENCES

1. Bananej, K., Ahoonmanesh, A., Shahraeen, N. & Lasemann, D. E. (1996). Occurrence of *Tomato spotted wilt virus* in tomato fields in Varamin. *Iranian Journal of Plant Disease*, 32(8), 44-45.
2. Behdani, M. & Falahi, H. R. (2015). *Saffron technical knowledge based on research approaches*. University of Birjand Publication. 411 p. (in Farsi)
3. Brittlebank, C. C. (1919). Tomato diseases. *Journal of Agriculture*, 17, 231-235
4. Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977). Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
5. Chang, A. (1993). Modified, CTAB RNA extraction method. *Plant Molecular Biology Report*, 11(1), 113-116.
6. Dong, J. H., Cheng, X. F., Yin, Y.Y., Fang, Q., Ding, M., Li, T. T., Zhang, L. Z., Su, X. X., McBeath, J. H. & Zhang, Z. K. (2008). Characterization of *Tomato zonate spot virus*, a new tospovirus in China. *Archives of Virology*, 153(5), 855-864.
7. Dorry, R., Mehrvar, M. & Zakiaghl, M. (2014). *21th Congress of Plant Protection*, 23-26 Aug. Oromie University, Oromie, Iran. pp. 387. (in Farsi)
8. Esmaili Far, A., Masahebi, G. & Okhovat, M. (2010). Investigation of symptoms of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Agriculture Sciences*, 31(4), 807-812. (in Farsi)
9. Farzadfar, Sh., Golnaraghi, A. R. & Pourrahim, R. (2002). *Plant viruses of Iran*. Saman Co. Tehran, Iran.
10. Golnaraghi, A.R., Pourrahim, R., Ahoonmanesh, A., Zamani-Zadeh, H. R. & Farzadfar, Sh. (2008). Detection and characterization of a distinct isolate of *Tomato yellow fruit ring virus* from potato. *Plant Disease*, 92(9), 1280-1287.
11. Hassani-Mehraban, A., Saaijer, J., Peters, D., Goldbach, R. & Kormelink, R. (2005). A new tomato-infecting *Tospovirus* from Iran. *Phytopathology*, 95(8), 852-855.
12. Lian, S., Lee, J. S., Cho, W. K., Yu, J., Kim, M. K., Choi, H. S. & Kim, K. H. (2013). Phylogenetic and recombination analysis of *Tomato spotted wilt virus*. *PLOS ONE*, 8(5) 63380- 63390
13. Li, J., Feng, Z., Wu, J., Huang, Y., Lu, M., Wang, B., Mao, X. & Tao, X. (2015). Structure and function analysis of nucleocapsid protein of *Tomato spotted wilt virus* interacting with RNA using homology modeling. *Journal of Biology and Chemistry*, 29(7), 3650-3961.
14. Massumi, H., Shaabani, M., Hosseini Pour, A., Heydarnejad, J. & Rahimian, H. (2009). Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant Disease*, 93(1), 67-72.
15. Mateus, C., Pequito, A., Teixeira, S., Queiro, S. R. & Godinho, M. C. (2012). Development of a *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) risk evaluation methodology for a processing tomato region. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10(1), 191-197.
16. Parizad, S., Dizaji, A., Arnal, F. G., Izadpanah, F. (2016). *22th Congress on Plant Protection*, 27-30 Aug. University of Tehran, Tehran, Iran, P.37
17. Pappu, H. R., Jones, R. A. C. & Jain, R. K. (2009). Global status of Tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, 141(2), 219-236.
18. Samuitienė, M., Navalinskienė, M. & Jacevičienė, E. (2008). *Arabis mosaic virus* on ornamental plants. *Biologija*, 54(4), 264-268
19. Scholthof, K., Adkin, S., Czosneh, H. & Foster, G. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938-954.
20. Sundaraj, S., Srinivasan, R., Culbreath, A., Riley, D. & Pappu, H. (2014). Host plant resistance against *Tomato spotted wilt virus* in peanut (*Arachis hypogaea*) and its impact on susceptibility to the virus, virus population genetics, and vector feeding behavior and survival. *Phytopathology*, 104(2), 2020-210.
21. Soltani, M., Sadrebazzaz, A., Nassiri, M. & Tahmoorespoor, M. (2013). Cloning, nucleotide sequencing and bioinformatics study of NcSRS2 gene, an immunogen from Iranian isolate of *Neospora caninum*. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(1), 114-127.
22. Silva, M. S., Martins, C. R. F., Bezerra, I. C. M., Nagata, I., de Avila, A. C. & Resende, R.de O. (2001). Sequence diversity of NSm movement protein of Tospoviruses. *Archives of Virology*, 146, 1267-1281.
23. Simon-Loriere, E. & Holmes, E.C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Natural Review of Microbiology*, 9(8), 617-626.
24. Sivparsad, B. J. & Gubba, A. (2008). Isolation and molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolates occurring in South Africa. *African Journal of Agricultural Research*, 3(6), 428-434.
25. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A & Kumar. S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.

26. Testa, M., Sanna, D., Pintore, R., Marongiu, G. & Marras, P. A. (2011). A two-year survey of TSWV occurrence in globe artichokes in Sardinia (Italy). *Acta Horticulture*, 917, 297-302.
27. Tsompana, M. Abad, J., Purugganan, M. & Moyer, J. W. (2005). The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Molecular Ecology*, 14(1), 53-66.
28. Tsompana, M. & Moyer, J. W. (2008). Tospoviruses. In: Mahy, B.W.J. and Van Regenmortel, M.H.V. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, 5(3), 157-162.
29. Winter, S., Shahraeen, N., Koerbler, M. & Lesemann, D. E. (2006). Characterisation of *Tomato fruit yellow ring virus*: a new *Tospovirus* species infecting tomato in Iran. *Plant Pathology*, 55(2), 287-288.
30. Zhang, Z., Wang, D., Yu, Ch., Wang, Z., Dong, J., Shi, K. & Yuan, X. (2016). Identification of three new isolates of *Tomato spotted wilt virus* from different hosts in China: molecular diversity, phylogenetic and recombination analyses. *Virology Journal*, 13(8), 1-12.
31. Zindovic, J., Ciuffo, M. & Turina, M. (2014). Molecular characterization of *Tomato spotted wilt virus* in Montenegro. *Journal of Plant Pathology*, 96(1), 201-205.