شناسایی همزمان ویروس موزاییک خیار و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی از مزارع گوجه‌فرنگی و تجزیه و تحلیل تبارزایی آنها

مهسا آباد خواه[۱]، زهرا کاشیها[۲]، داود کولیوند[۳*]، و امید عینی گندمانی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، پردیس بین الملل دانشگاه تبریز، ایران
۳- *نویسنده مسوول: استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران(Koolivand@znu.ac.ir)
۴- استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۱۸

چکیده

ویروس موزاییک خیار (CMV) *Cucumber mosaic virus* و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) از ویروس‌های مهم مزارع گوجه‌فرنگی است. در تحقیق حاضر، ۳۶ نمونه گیاهی دارای علایم ویروسی از مزارع گوجه‌فرنگی در برخی مناطق غرب و شمالغرب کشور جمع‌آوری شد. جهت ردیابی این دو ویروس، با استفاده از اغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، یا آغازگر اختصاصی وآران‌ای کل استخراج شده از نمونه‌های گیاهی ،cDNA تهیه شد. سپس، آزمون‌های پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی CMV و TSWV به‌طور جداگانه انجام شد. نتایج حاصل نشان داد در شش نمونه‌ی مشکوک قطعه ٦٥٤ جفت بازی مربوط به ژن پروتئین‌پوششی CMV، و در سه نمونه، قطعه ۷۷۷ جفت بازی مربوط به ژن نوکلئوکپسید TSWV تکثیر شدند. در ادامه، آلودگی مخلوط نمونه‌های مشکوک با کاربرد همزمان آغازگرهای اختصاصی این دو ویروس در آزمون پی‌سی‌آر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون پی‌سی‌آر بیانگر ردیابی و تکثیر قطعات مربوط به این دو ویروس بصورت همزمان در دو نمونه گیاهی بود. نمونه‌های دارای آلودگی مخلوط، علائم موزاییک، پیچیده شدن و باریک شدن برگ همراه با زردی و نکروز شدید نشان دادند که نسبت به علائم هر کدام از این دو ویروس بصورت جداگانه شدیدتر بودند. بررسی روابط فیلوژنتیکی بر اساس توالی اسید نوکلئیکی و اسید آمینه‌ای در یکی از نمونه‌هایی که دارای آلودگی مخلوط بود نشان داد جدایه CMV با جدایه‌هایی از ایران و هند که از گوجه‌فرنگی و کدوئیان جدا شده اند در یک خوشه قرار گرفت و جدایه TSWV با جدایه-هایی از ترکیه، مونتنگرو، ایتالیا هم‌گروه بود.

کلید واژه‌ها: *آلودگی مخلوط، توسپوویروس، کوکوموویروس، RT-PCR*

مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی (*Solanum lycopersicum*)، یکی از مهمترین محصولات اقتصادی می‌باشد. طبق آمار سازمان خواروبار و کشاورزی جهانی (FAO)، ایران به عنوان یکی از تولید کنندگان عمده گوجه‌فرنگی در جهان به‌شمار می‌رود. در سال 2012، ایران در میان تولید کنندگان گوجه‌فرنگی در دنیا دارای مقام هفتم بوده‌است (Anonymous, 2012). استان زنجان و آذربایجان‌شرقی با داشتن آب و هوایی مناسب برای زراعت گوجه‌فرنگی، یکی از مناطق مهم کاشت گوجه‌فرنگی در ایران می‌باشد. سطح زیر کشت این محصول، در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ در استان زنجان و آذربایجان‌شرقی به ترتیب ۶۷۹۵ و ۵۸۷۹

هکتار و میزان تولید ۱۶۴۴۱۸ و ۲۷۴۶۴۹ تن برآورد شده است (Anonymous, 2012). گوجه‌فرنگی میزبان ویروس‌های متعددی است که معمولاً منجر به کاهش تولید محصول می‌شوند (Chiemsombat et al., 2008). از جمله این ویروس‌ها، می‌توان به ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus* (CMV)) و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus* (TSWV)) اشاره نمود که از مهمترین ویروس‌های خسارتزا روی گوجه‌فرنگی و اکثر کدوئیان می‌باشند (Elliot 1990; Sokhandan et al., 2008; Escriu et al., 2003). ویروس موزاییک خیار متعلق به جنس *Cucumovirus* است که دارای سه قطعه آرانای تک رشته‌ای مثبت است (King et al., 2012). این ویروس، سبب بروز علائم موزاییک، بندکفشی شدن و ایجاد تاول در برگ گوجه‌فرنگی می‌شود. ویروس موزاییک خیار از مناطق عمده کشور و همچنین شمالغرب کشور روی محصولات مختلف از جمله گوجه‌فرنگی گزارش شده است که با پراکنش زیادی همراه بوده است (Sokhandan et al., 2008). تفاوت و تنوع علائم در جدایه‌های مختلف ویروسی در مزارع گوجه‌فرنگی ممکن است در اثر فاکتورهای مختلفی باشد بطوریکه علائم ایجاد شده بسته به جدایه ویروس، نوع رقم و شرایط محیطی ممکن است متفاوت باشد و همچنین آلودگی همزمان با سایر ویروس‌ها می‌تواند علت چنین تنوعی در دامنه وسیع بروز علائم باشد (Rizos et al., 1992; Sokhandan et al., 2006). ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی عضو تیپ جنس *Tospovirus* است که دارای سه قطعه آرانای تک رشته‌ای می‌باشد. آرانای بزرگ با قطبیت منفی و آرانای‌های متوسط (M) و کوچک (S) دو قطبی (ambisensce) هستند (King et al., 1996). این ویروس در نواحی مختلف آب و هوایی بویژه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری در مزارع گوجه‌فرنگی گسترش دارد (Hull, 2014) و باعث ایجاد کلروز، نکروز و بافت مردگی در برگ‌ها و لکه‌های کلروزه حلقوی روی میوه می‌شود (Gallitelli, 2000; Chen et al., 2011).

گزارش‌هایی از وجود توسپوویروس‌ها و TSWV از مناطق مختلف ایران در گوجه‌فرنگی و سایر میزبان‌ها نظیر سیب‌زمینی، سویا و گیاهان زینتی بر اساس روش‌های سرولوژیکی و گیاهان میزبان وجود دارد (Hajiabadi et al., 2012, 2009; Golnaraghi et al., 2007, 2001; Ghotbi et al., 2005; Pourrahim et al., 2001; Bananej et al., 1996). با توجه به دامنه میزبانی وسیع این دو ویروس در محصولات مختلف احتمال آلودگی همزمان و خسارت زیاد وجود دارد (Zehnder et al, 2000). در طبیعت احتمال آلودگی یک گونه گیاهی به بیشتر از یک گونه ویروس وجود دارد که در برخی از موارد آلودگی همزمان سبب تشدید علائم ویروسی و نهایتاً خسارت شدیدتر خواهد شد (Hull, 2014).

راه‌اندازی و توسعه یک سیستم دقیق ردیابی به موقع و زود هنگام، شناسایی و آگاهی دقیق از خصوصیات و تنوع این بیمارگرها و نژادهای وابسته به آنها در یک منطقه، در مدیریت کنترل بیماری در جهت کاهش خسارت ضروری به نظر می‌رسد. بر اساس این آگاهی می‌توان نسبت به انتخاب و کاشت ارقام مقاوم به ویروس اقدام نمود (Agrios, 2005).

با توجه به اهمیت و میزان سطح کشت گوجه‌فرنگی در کشور و خصوصاً منطقه شمالغرب کشور و شناسایی عوامل مختلف محدود کننده کشت این محصول، هدف از انجام این تحقیق، شناسایی و ردیابی ویروس موزاییک خیار و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در نمونه‌های گوجه‌فرنگی دارای علائم ویروسی بصورت جداگانه و همچنین بررسی وجود آلودگی همزمان این دو ویروس و تاثیر آن‌ها در بروز و شدت علائم نسبت به آلودگی انفرادی هر کدام از این ویروس‌ها در نمونه‌های برداشت شده از مزرعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

از مزارع گوجه‌فرنگی برخی مناطق شمالغرب شامل استان‌های زنجان (زنجان، طارم، ابهر) و آذربایجان‌شرقی

(تبریز، آذرشهر و عجب شیر) بازدید به عمل آمد و با توجه به مشاهده علایم مشکوک به آلودگی ویروسی شامل موزاییک، زردی، کلروز و نکروز، لکه حلقوی و بافت مردگی روی گیاهان مذکور، ۳۶ نمونه گیاهی جمع‌آوری شد. مشخصات نمونه‌های جمع‌آوری شده از قبیل علائم مشاهده شده، محل و تاریخ جمع‌آوری یادداشت و سپس نمونه‌های موردنظر روی یخ به آزمایشگاه برای بررسی بیشتر منتقل شدند.

استخراج آران‌ای

استخراج آران‌ای از حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بافت نمونه‌های آلوده، مطابق با روش چهارم روحانی (Rowhani et al., 1993) انجام شد. به همین منظور ابتدا بافت برگی در یک میلی‌لیتر بافر استخراج سرد هموژنیزه شد و در ۱۰۰۰g و در دمای ۴ ˚C به مدت سه دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی در لوله‌های جدید به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۶۸۰۰g مجدداً سانتریفوژ شدند. آن‌گاه رسوب ایجاد در ۲۰۰µl بافر سوسپانسیون کننده به حالت سوسپانسیون در آورده شد و سپس ۲۵µl محلول ۱۰ درصد SDS به لوله‌ها اضافه شد. لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰°C قرار داده شدند. با افزودن ۸۰µl استات پتاسیم پنج مولار به این لوله، به آرامی مخلوط شدند و سپس به مدت نیم ساعت در داخل یخ قرار داده شدند (یا به مدت شبانه در ۴°C می‌توان قرار داد). به دنبال آن، عمل سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۶۸۰۰g انجام گرفت. فاز رویی به لوله جدید انتقال و مقدار ۰/۱ حجم آن، استات سدیم سه مولار (۵/۲ pH) و به اندازه‌ی هم حجم آن ایزوپروپانول سرد به هر لوله افزوده و به آرامی مخلوط گردید و سپس لوله‌ها در دمای ۲۰°C – به مدت یک ساعت قرار داده شدند. پس از آن، لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۶۸۰۰g سانتریفوژ شدند. فاز رویی ایجادی، دور ریخته شد و پلت با اتانول سرد ۸۰٪ مورد شستشو قرار گرفت. در مرحله نهایی آران‌ای استخراج شده توسط ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شد و در دمای ۸۰°C –نگهداری شد. علاوه بر استخراج آران‌ای مطابق روش مذکور، از برخی نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج آران‌ای (RNX- PLUS) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، آران‌ای کل از بافت گیاهی استخراج شد.

ساخت دی‌ان‌ای مکمل

برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی و کیت ساخت cDNA[1] (HyperScript™) ساخت شرکت GeneAll در واکنشی با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر استفاده شد. برای هر نمونه یک میکرولیتر از محلول ۰/۲ میکروگرم در میکرولیتر این آغازگر (Random Hexamer) با چهار میکرولیتر از آران‌ای کل (معادل ۲ میکروگرم) مخلوط گردید و در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه قرار داده شد و نهایتاً بلافاصله پنج میکرولیتر از کیت ساخت cDNA (HyperScript™) به هر کدام از میکروتیوپ‌ها اضافه شد و میکروتیوپ‌ها در دستگاه ترموسایکلر (ASTEC, PC 320, Taiwan) قرار داده شدند. برنامه ساخت دی‌ان‌ای مکمل شامل یک چرخه دمای ۵۵ ˚C به مدت یک ساعت برای فعالیت آنزیم نسخه‌بردار معکوس و یک چرخه در درجه حرارت ۹۵ ˚C به مدت پنج دقیقه برای غیر فعال کردن این آنزیم اجرا شد. علاوه بر استفاده از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل، به منظور بررسی این آغازگرها، از آغازگرهای اختصاصی نیز برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل در مواردی استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ابتدا بصورت جداگانه با هر کدام از آغازگرهای اختصاصی ویروس موزاییک خیار (طراحی شده بر اساس جدایه AY871070 B13، توسط نرم افزار Primer premier 6) و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (Wu et al., 2009) (جدول ۱) در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Master mix[2] ساخت شرکت Ampliqon، ۰/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای مستقیم و معکوس اختصاصی هر کدام از ویروس‌ها (CMV

1- Hyperscript TM Reverse Transcriptase dNTPs (mixture), Reaction buffer, Stabilizer and RNase inhibitor
2- *Taq* DNA Polymerase Mix Red-Mgcl2 1.5 mM

و(TSWV بصورت جداگانه با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل الگو و ۳/۷۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه پی‌سی‌آر به صورت یک مرحله واسرشت-سازی اولیه در دمای C° ۹۴ برای ۲ دقیقه، واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در C° ۹۴، اتصال ۳۰ ثانیه در C° ۵۰ (برای TSWV) و C° ۵۴ (برای CMV) و بسط ۳۰ ثانیه در C°۷۲ برای ۳۵ سیکل و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در C° ۷۲ انجام گردید. به منظور بررسی نتایج حاصل از واکنش آرتی-پی-سی‌آر، ۴ میکرولیتر فرآورده حاصل از هر واکنش پی‌سی‌آر بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE 1X الکتروفورز شد.

علاوه بر انجام پی‌سی‌آر بصورت جداگانه، به منظور ردیابی همزمان این دو ویروس روش پی‌سی‌آر همزمان با برنامه واسرشت‌سازی اولیه در دمای C° ۹۵ برای ۲ دقیقه، واسرشت‌سازی ۴۵ ثانیه در C° ۹۵، اتصال ۶۰ ثانیه در C° ۵۲ و بسط ۶۰ ثانیه در C° ۷۲ برای ۳۵ سیکل و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در C°۷۲ با کاربرد همزمان آغازگرهای CMV و TSWV انجام شد. میزان مواد استفاده شده شامل، ۶/۲۵ میکرولیتر Master mix ساخت شرکت Ampliqon، ۰/۲ میکرولیتر از آغازگرهای مستقیم و معکوس اختصاصی (جدول ۱) هر کدام از ویروس‌ها (CMV و TSWV) با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۲/۵میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل الگو ساخته شده با استفاده از آغازگر تصادفی شش تایی و ۲/۹۵ میکرولیتر آب دیونیزه بود. ۴ میکرولیتر فرآورده حاصل از هر واکنش پی‌سی‌آر در ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE 1X الکتروفورز شد (Sambrook and Russel, 2001).

تعیین توالی محصولات پی‌سی‌آر و رسم درخت فیلوژنی

به منظور اطمینان از تکثیر اختصاصی قطعاتی از ژنوم ویروس‌های ذکر شده، آزمون پی‌سی‌آر بصورت جداگانه با هر کدام از آغازگرهای اختصاصی در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر مطابق شرایط ذکر شده در قبل در یکی از نمونه-هایی که آلودگی مخلوط داشتند انجام شد. محصولات پی-سی‌آر برای خالص‌سازی و تعیین توالی مستقیم با استفاده از آغازگر اختصاصی (آغازگر مستقیم) ویروس‌های مورد مطالعه به شرکت بیونیر Bioneer کره جنوبی ارسال شد.

توالی‌های به دست آمده از محصولات پی‌سی‌آر با اطلاعات و توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) مورد مقایسه قرار گرفتند. سپس، داده‌های نوکلئوتیدی توالی‌یابی-شده با داده‌های نوکلئوتیدی هر کدام از ویروس‌ها با جدایه-های مربوط به آن ویروس که ازقبل در پایگاه اطلاعاتی NCBI موجود بودند با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و روش ClustalW هم‌ردیف‌سازی چندگانه شدند و تجزیه تبارزایی آن‌ها بر اساس اسید نوکلئیک و اسید آمینه با استفاده از روش Neighbor-Joining توسط نرم افزارMEGA6 صورت گرفت. تعداد بوت‌استرپ‌های استفاده شده برای تجزیه و تحلیل هزار بود. کلیه شاخه‌ها با ارزش بوت‌استرپ پایین‌تر از ۵۰ درصد ادغام شدند. در این تجزیه‌تحلیل از *Peanut stunt virus* (PSV) جدایه ER (U15730) به همراه توالی‌های ویروس موزاییک خیار(جدول ۲) و *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) جدایه TCSV_DRSP1 (KJ399304) به همراه توالی‌های ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (جدول ۳) به عنوان عضو برون‌گروه (out group) استفاده شد.

نتایج

علائم بیماری ویروسی مانند موزاییک، تغییر شکل برگ، باریک شدن برگ، نقاط کلروزه و نکروزه و نکروز شدید در نمونه‌های برداشت شده قابل مشاهده بود. همچنین برخی نمونه‌ها علایم موزاییک خفیف تا شدید را نشان دادند (شکل ۱) که در آزمون‌های انجام شده چنین نمونه‌هایی دارای آلودگی به ویروس موزاییک خیار بودند و آلودگی به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در آنها مشاهده نشد (شکل ۱ و ۲). علاوه بر این، بر اساس علائم و سپس تایید آنها در آزمون آرتی-پی‌سی‌آر مشخص شد که آلودگی به ویروس موزاییک خیار در گوجه‌فرنگی نسبت به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در نمونه‌های برداشت شده بیشتر می‌باشد زیرا در بین نمونه‌های بررسی

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در تحقیق حاضر

Table1- Sequences of primers used in this study

Primers name	Sequences	Region	Reference
CMVCPF	CGGATCCATGGACAAATCT GAATCAACC	CP	This study
CMVCPR	GGCGGCCGCTCAGACTGGG AGCACCCCAG	CP	This study
TSWVNF	ATCGGATCCATGTCTAAGG TTAAGCTCAC	N	Wu et al., 2009
TSWVNR	ATCCTCGAGTTAAGCAAGT TCTGTGAGTTTTC	N	Wu et al., 2009

جدول ۲- رس‌شمار، منشا (کشور) و میزبان‌های جدایه‌های مختلف CMV موجود در بانک ژن NCBI برای رسم درخت فیلوژنتیکی

Table 2- Accession numbers, region and hosts of different strains of CMV in GenBank for phylogenetic tree

Strains	Host	Origin	GenBank Acc. No.
21Tahaa	*Momordica charantia*	France	FN554692
J&K	*Cymbopogon*	India	EF153737
Ker.Ker.Pep	*Piper*	Iran	JX112021
Ker.Ker.Mel.1	*Cucumis* sp.	Iran	JX112019
Ab	*Abutilon theophrasti*	Iran	KJ173756
Ker.Ker.Mel.2	*Cucumis* sp.	Iran	JX112020
ToM2	*Solanum lycopersicum*	Iran	JX865599
ToM3	*Solanum lycopersicum*	Iran	JX865600
ToM15	*Solanum lycopersicum*	Iran	JX865602
Bas3	*Cucurbita pepo*	Iran	JX025989
Bas3	–	China	AF127977
Hawaeii	*Musca* sp.	Hawaii	U31219
B23	*Cucumis* sp.	Iran	AY871071
B13	*Cucumis* sp.	Iran	AY871070
S337	*Cucumis* sp.	Iran	AY871069
SH17	*Cucumis* sp.	Iran	AY871068
Ri-8	*Solanum lycopersicum*	Spain	AM183119
Esf172	*Solanum lycopersicum*	Iran	JX025995
D8	–	Japan	AB004781
Y	–	Japan	D12499
VAL90	*Solanum lycopersicum*	Spain	AJ829779
Pl-1	*Solanum lycopersicum*	Spain	AM183116
Tfn	*Solanum lycopersicum*	Italy	Y10886
BAR92	*Solanum lycopersicum*	Spain	AJ829778
Ixora	*Solanum lycopersicum*	United states	U20219
Tsh	*Solanum lycopersicum*	China	EF202597
VAL90/1	*Solanum lycopersicum*	Spain	AJ829779
BJ-tomato	*Solanum lycopersicum*	China	HQ829827
CMV-to1	*Solanum lycopersicum*	Iran	KT962088

جدول ۳- رس‌شمار، منشا (کشور) و میزبان‌های جدایه‌های مختلف TSWV موجود در بانک ژن NCBI برای رسم درخت فیلوژنتیکی

Table 3- Accession numbers, region and hosts of different strains of TSWV in GenBank for phylogenetic tree

Strains	Host	Origin	GenBank Acc. No.
TSWV_DRT2	*Solanum lycopersicum*	Dominican Repablic	KJ399315
Gerbera-14	*Solanum lycopersicum*	India	KF146703
TSWV_DRB1	*Pappa*	Dominican Repablic	KJ399313
NC-16	*Solanum lycopersicum*	United states	DQ777618
Chrysanthemum-27	*Chrysanthemum sp.*	Venezuela	KF146701
M8G7	*Arachis hypogaea*	United states	FJ234627
NC-32	*Solanum lycopersicum*	United states	DQ777105
p202/3WT	*Solanum lycopersicum*	Italy	HQ830187
TomUSA	*Solanum lycopersicum*	United states	FR693268
Gerbera-2	*Solanum lycopersicum*	India	KF146702
Sr-739	*Nicotiana tabacum*	Serbia	GU369724
Is-344	*Capsicum annuum*	Montenegro	GU369717
Is-56	*Nicotiana tabacum*	Montenegro	GU369729
Is-246	*Primula* sp.	Montenegro	GU339508
F1G6	*Arachis hypogaea*	United states	FJ234581
NC-20	*Solanum lycopersicum*	United states	DQ777505
P156	*Piper*	Spain	FR693096
M10G7	*Arachis hypogaea*	United states	FJ234585
L3N7	*Arachis hypogaea*	United states	FJ234601
NC-33	*Solanum lycopersicum*	United states	DQ777444
TN-2	*Solanum lycopersicum*	United states	JF808217
TP-16	*Solanum lycopersicum*	Turkey	KT192625
SC-13	*Solanum lycopersicum*	Turkey	KT192624
Antalya	*Solanum lycopersicum*	Turkey	KM407603
SC1-NRB	*Solanum lycopersicum*	Turkey	KM379142
p202/3RB	*Piper*	Italy	HQ830186
P302	*Piper*	Italy	KM096541
TOS-101	*Solanum lycopersicum*	Iran	KT899947

شده فراوانی نمونه‌هایی که آلودگی به ویروس موزاییک خیار داشتند بیشتر بود (شکل ۲). علائم انفرادی ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی بندرت در مزرعه قابل مشاهده بود (شکل ۱)، زیرا معمولاً همراه با علائم مشخصه ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (نقاط نکروزه در برگ‌ها و وجود علائم لکه‌ای در میوه) علائم دیگری مانند

موزاییک معمولی تا شدید و در مواردی باریک شدن برگ‌ها نیز قابل مشاهده بود که نتایج آزمون پی‌سی‌آر نیز حاکی از فراوانی کم آلودگی به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در نمونه‌های برداشت شده بود (شکل ۱ و ۳). علائم بیماری ویروسی در مواردی با شدت کم تا شدید در مزرعه قابل مشاهده بود که با توجه به نتایج آزمون پی‌سی‌آر بیانگر آلودگی همزمان ویروس موزاییک خیار و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی بود. هرچند وجود احتمالی سایر ویروس‌های گوجه‌فرنگی و همچنین نوع رقم میزبان نیز سبب تنوع این علایم می‌باشد. لازم به ذکر است که در برخی از مناطق که نمونه‌ها برداشت شدند ناقلین بیماری‌های ویروسی مانند شته‌ها و تریپس‌ها که ناقلین دو ویروس مورد مطالعه هستند نیز قابل مشاهده بود هر چند که تلاشی برای ردیابی ویروس در ناقلین انجام نشد.

آرتی-پی‌سی‌آر

نتایج ساخت cDNA و انجام پی‌سی‌آر با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی ویروس موزاییک خیار و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی حاکی از تکثیر جداگانه قطعات مورد انتظار در مورد هر کدام از ویروس‌ها در آزمون پی‌سی‌آر بود(شکل ۲ و ۳). در مجموع آلودگی ۳۶ نمونه گیاهی مشکوک و علائم‌دار به دو ویروس بطور جداگانه انجام شد. نتایج آزمون پی‌سی‌آر نشان داد در شش نمونه آلودگی به ویروس موزاییک خیار و در سه نمونه آلودگی به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی وجود داشت.

در شش مورد قطعه مورد انتظار برای ویروس موزاییک خیار که ۶۵۴ جفت باز بود تکثیر شد (شکل ۲). در آزمون پی-سی‌آر مجزا ژن نوکلئوکپسید ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه-فرنگی (۷۷۷ جفت باز) تنها در سه نمونه تکثیر شد (شکل ۳) که در دو نمونه از آنها آلودگی به ویروس موزاییک خیار بصورت جداگانه نیز به اثبات رسیده بود و در یک نمونه تنها آلودگی به TSWV وجود داشت(شکل ۱: د).

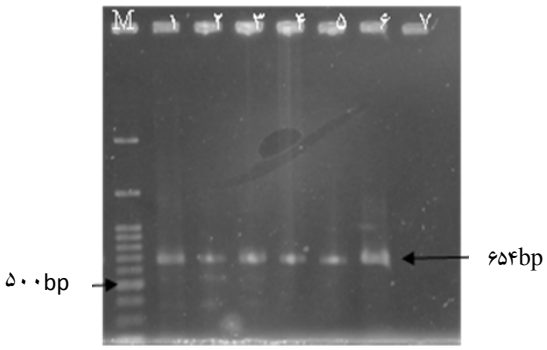
نتایج آزمون پی‌سی‌آر همزمان برای دو نمونه از نمونه‌هایی که علایم شدیدتری داشتند (شکل ۱: الف و ب) آلودگی همزمان را نشان داد. نتایج نشان داد که دو جفت آغازگر استفاده شده توانایی ردیابی همزمان ویروس موزاییک خیار و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی را دارا می‌باشد و دو نمونه آلودگی همزمان به TSWV و CMV نشان دادند (شکل ۴).

تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنتیک

نتیجه بلاست (Blast) نوکلئوتیدی یکی از جدایه‌های ویروس موزاییک خیار با سایر جدایه‌های گزارش شده از بانک ژن حاکی از شباهت ۹۸٪ با یکی از جدایه‌های ویروس موزاییک خیار گزارش شده از ایران (JX865599) بود. علاوه بر این بیشترین شباهت به جدایه ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی پس از بلاست در بانک ژن با جدایه‌ی LYE40 با شباهت ۹۹٪ از فرانسه بود که از گوجه‌فرنگی جداسازی شده‌است. بیشترین شباهت توالی آمینواسیدی بین جدایه ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در این تحقیق با دیگر جدایه‌ها در بانک ژن بین ۹۹٪-۹۸٪ بود.

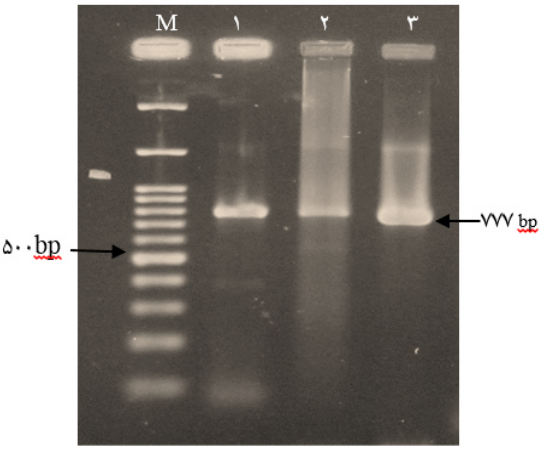
شکل ۱- علائم برخی از نمونه‌های برداشت شده در مزرعه. الف، ب، ج، ه ، ی: دارای آلودگی به ویروس موزاییک خیار. الف، ب و د: آلوده به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی. الف و ب: آلوده به CMV و TSWV بصورت همزمان.

Figure 1. Symptoms of some samples collected from fields. A, B, C, E, F infected by CMV. A, B, D infected by TSWV. A and B mixed infected of CMV and TSWV.



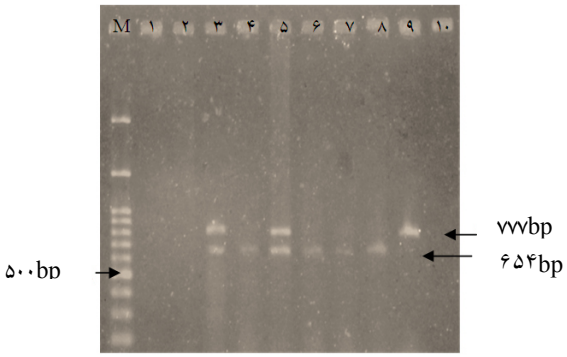
شکل ۲- الکتروفورز محصول RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر M, CMVPF/CMVCPR: نشانگر Gene Ruler 100bp DNA Ladder ۱ تا ٦: نمونه‌های مثبت آلوده به CMV (نمونه‌های ۲، ٣،٤، ٥ و ٦ به ترتیب برابر است با الف، ب، ج، ه و ی شکل شماره ۱)

Figure 2. Electrophoresis analysis of RT-PCR amplification using CMVCPF/CMVCPR primers. M: Gene Ruler DNA ladder 100bp. Lanes 1-6 positive samples infected by CMV. (lanes 2,3,4,5,6 respectively A, B, C, E, F in Fig 1).



شکل۳- الکتروفورز محصول RT-PCR با استفاده ازجفت آغازگر TSWVNF/TSWVNR، M: نشانگر Gene Ruler 100bp DNA Ladder ۱تا۳: نمونه‌های مثبت آلوده بهTSWV (۱، ۲ و ۳ به ترتیب برابر است با الف، ب و د شکل شماره ۱)

Figure 3. Electrophoresis analysis of RT-PCR amplification using TSWVF/TSWVR primers. M: Gene Ruler DNA ladder 100bp. 1, 2,3 positive samples infected with TSWV(1,2,3 respectively A,B and D in Fig 1).



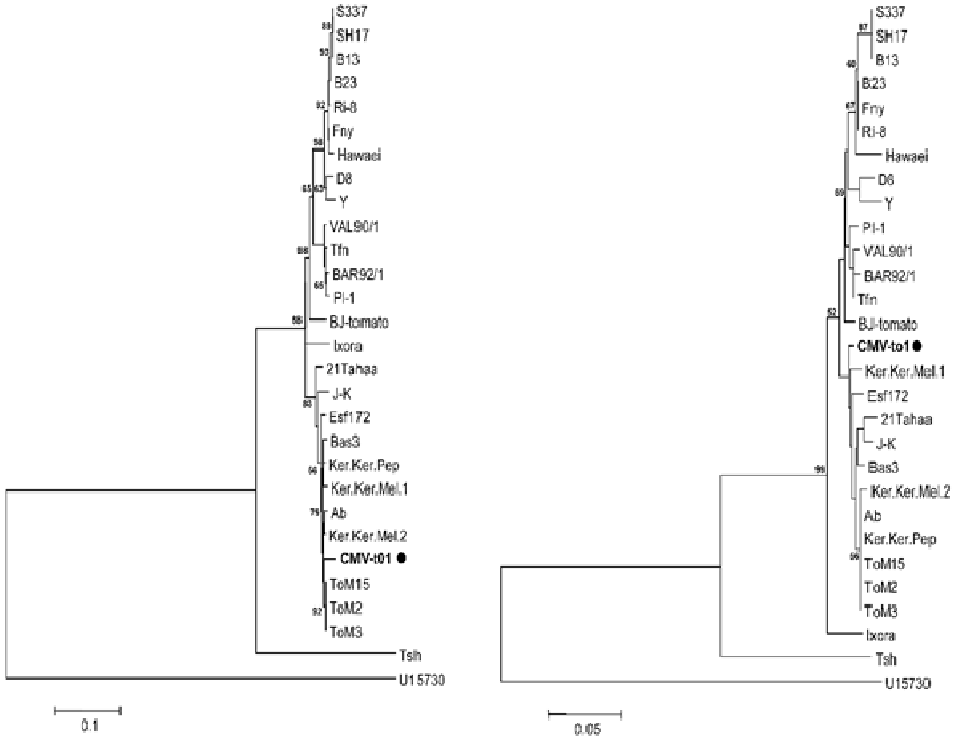
شکل ٤- الکتروفورز محصول RT-PCR با استفاده از دو جفت آغازگر TSWVNF/TSWVNR و CMVCPF/ CMVCPR بصورت همزمان M: نشانگر Gene Ruler 100bp DNA Ladder و۲ نمونه‌های فاقد علائم ویروسی و منفی ۳ تا ۸: آلوده به CMV، ۳، ٥ و ۹: آلوده به TSWV ، ۳ و ٥: آلودگی همزمان به TSWV و CMV (به ترتیب برابر است با الف، ب شکل شماره ۱).

Figure 4. Electrophoresis analysis of RT-PCR amplification using two pairs of primers (TSWVF/TSWVR, CMVCPF/CMVCPR) simultaneously. M: Gene Ruler DNA ladder 100bp. Lanes 1,2 negative control. Lanes 3-8 infected to CMV. Lanes 3, 5,9 infected TSWV. Lanes 3,5 mixed infected CMV and TSWV (respectively A,B in Fig 1).

هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی ناحیه ژنی پروتئین پوششی یکی از جدایه‌های ویروس موزاییک خیار و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی با سایر جدایه‌های گزارش‌شده از ایران (برای ویروس موزاییک خیار) و دنیا نشان داد که جدایه موردنظر متعلق به ویروس‌های مورد مطالعه بود. درخت تبارزایی حاصل از هم‌ردیف‌سازی چندگانه با ۲۰ جدایه ویروس موزاییک خیار (جدول ۲) و ۲۰ جدایه ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (جدول ۳) از مناطق مختلف دنیا و روی میزبان‌های مختلف نشان داد که جدایه‌های ویروس موزاییک خیار همراه با جدایه‌هایی از این ویروس که در میزبان گوجه-فرنگی که از برخی مناطق ایران جدا شده‌اند در یک خوشه قرار گرفتند(شکل ۵)، شایان ذکر است در خوشه مذکور برخی جدایه‌های ایرانی که از سایر میزبان‌ها نیز گزارش شده‌اند قرار داشت. درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس داده‌های اسید آمینه‌ای نیز نشان داد جدایه -

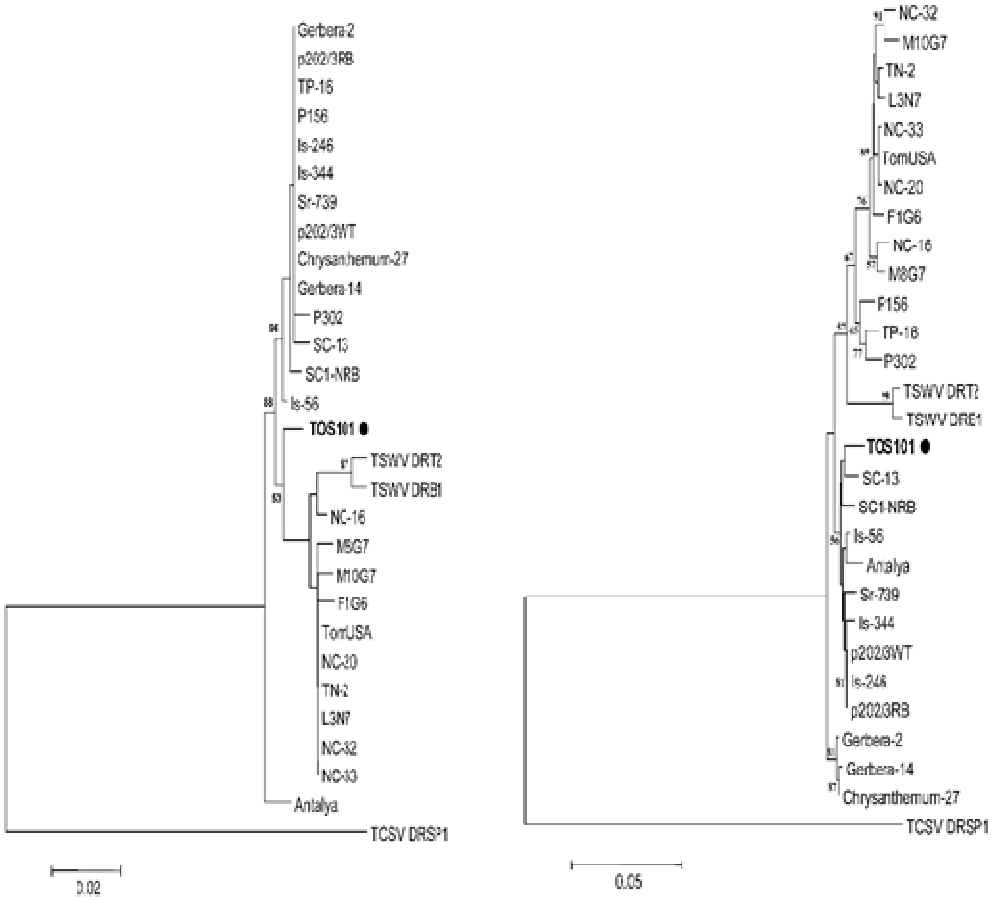
ایرانی موجود در این تحقیق همراه با جدایه‌هایی از هند و ایران در یک خوشه قرا گرفتند. همچنین درخت رسم شده بر اساس داده‌های اسید نوکلئیکی و اسید آمینه‌ای مشخص نمود که جدایه ایرانی متعلق به زیر گروه IA ویروس موزاییک خیار بود (شکل ۵). درخت فیلوژنتیک رسم شده برای جدایه‌های ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی بر اساس داده‌های اسید نوکلئیکی نشان داد جدایه توالی‌یابی شده (TOS 101; KT899947) در این تحقیق با جدایه‌هایی از ترکیه، مونتنگرو، ایتالیا و هند در یک خوشه قرار گرفتند که این جدایه‌ها از میزبان گوجه-فرنگی و گیاهان زینتی جدا شده‌اند. علاوه بر این، درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس داده‌های اسید آمینه‌ای نیز نشان داد که جدایه ایرانی ردیابی شده نزدیک به جدایه-های گزارش شده از ترکیه بود هر چند که در یک خوشه قرار نگرفت اما قرابت نزدیکی به هم داشتند (شکل ۶)، در خوشه مذکور علاوه بر جدایه‌های ذکر شده جدایه‌هایی از کشورهای مختلف مانند ایتالیا نیز قرار داشتند اما بیشترین قرابت را جدایه‌های کشور ترکیه داشتند.

تاکنون توالی دیگری از ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در ایران در بانک ژن موجود نمی‌باشد. توالی مربوط به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی و ویروس موزاییک خیار در بانک ژن با رس شماره‌های KT899947 و KT962088 به ترتیب ثبت شده‌اند.



شکل ۵- تجزیه تحلیل جدایه‌های ویروس موزائیک خیار بر اساس داده های اسید نوکلئیکی (راست) و اسید آمینه‌ای (چپ) ژن CP شامل جدایه ایرانی که آلودگی مخلوط داشتند براساس روش Neighbor-Joining که در نرم افزار Mega6 ترسیم شده است. درجه اطمینان بیش از ۵۰ درصد در بالای شاخه‌ها نمایش داده شده و جدایه ایرانی با دایره مشخص شده است. PSV-ER به عنوان عضو برون گروه انتخاب گردید.

Figure 5- Phylogenetic analysis based on the deduced nucleotide (right) and amino acid (left) sequences of the CP gene including Iranian strains that have mixed infection generated using neighbor-joining method by Mega 6. Bootstrap values on the branches represent the percentages out of 1000 bootstrap replicates program. PSV-ER used as the out group.



شکل ٦- تجزیه تحلیل جدایه‌های ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی بر اساس داده های اسید نوکلئیکی (چپ) و اسید آمینه‌ای (راست) ژن نوکلئوکپسید شامل جدایه ایرانی که آلودگی مخلوط داشتند براساس روش Neighbor-Joining که در نرم افزار Mega6 ترسیم شده است. درجه اطمینان بیش از ۵۰ درصد در بالای شاخه‌ها نمایش داده شده و جدایه ایرانی با دایره مشخص شده است. TCSV_DRSP1 به عنوان عضو برون گروه انتخاب گردید.

Figure 6- Phylogenetic analysis based on the deduced nucleotide (left) and amino acid (right) sequences of the nucleocapsid gene generated including Iranian strain that have mixed infection generated using neighbor-joining method by Mega 6. Bootstrap values on the branches represent the percentages out of 1000 bootstrap replicates program. TCSV-DRSP1 used as out group.

بحث

مشاهدات مزرعه‌ای در تحقیق حاضر حاکی از تنوع علائم ویروسی مزارع گوجه‌فرنگی مناطق مورد مطالعه بود. این تنوع علایم می‌تواند نشان‌دهنده وجود استرین‌های متنوع از یک ویروس، یا آلودگی همزمان چند ویروس و همچنین پاسخ‌های متنوع ارقام مختلف گوجه‌فرنگی در مناطق متفاوت باشد. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌است که به‌طور کلی، درطبیعت گیاهان معمولاً توسط دو یا بیشتر از دو ویروس به طور همزمان آلوده می‌شوند (Hull, 2014). برهمکنش ویروس‌ها در یک میزبان ممکن است باعث هم‌افزایی یا دگرپادی شود (Zeng et al., 2007). در گوجه‌فرنگی بیماری‌های ویروسی متعددی از جمله ویروس موزاییک خیار، ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی و ویروس موزاییک توتون گزارش شده است (Sokhandan et al., 2006, 2008: Escriu et al., 2003). در تحقیق حاضر علائم

موزاییک معمولی تا شدید و علائم بند کفشی شدن در غالب جدایه‌ها مشاهده شد که چنین علائم معمولاً در آلودگی به ویروس موزاییک خیار دیده می‌شود (شکل ۱)، نتایج این تحقیق نیز نشان‌دهنده ردیابی ویروس موزاییک خیار درشش نمونه از ۳۶ نمونه برداشت شده بود (شکل ۲ و ۴). علاوه بر علائم ذکر شده، موزاییک خفیف تا شدید و نکروز در برگ‌ها به همراه لکه‌های حلقوی کلروز در میوه‌ها دیده شد که احتمالا به سبب آلودگی همزمان CMV با سایر ویروس‌ها بخصوص ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی بود که در تعدادی از نمونه‌ها وجود همزمان هر دو ویروس مشاهده گردید (شکل ۱ و۴). اگرچه وجود سایر ویروس‌های گوجه‌فرنگی از قبیل ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی و ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی نیاز به بررسی دارد. در ردیابی ویروس موزاییک خیار با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در راهک شماره یک و دو و به مقدار کمتر در راهک شماره ۳ (شکل ۲) باندهای غیر اختصاصی کوچکتر از باند اختصاصی مشاهده شد این امر ممکن است به علت وجود سایت‌های برشی در آغازگر طراحی شده باشد و با توجه به اینکه T_m آغازگر طراحی شده بالا بود با تغییر دما امکان حذف باندهای غیر اختصاصی به خوبی میسر نبود. همچنین وجود باندهای غیر اختصاصی ضعیف نیز در تکثیر ژن نوکلئوکپسید ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی دیده شد که البته به مقدار بسیار زیادی با تغییر دمای اتصال این باندها کاهش پیدا کردند. بطور کلی یکی از مشکلات تکثیر این باندها می‌تواند به علت ساخت دی-انای مکمل با استفاده از آغازگرهای تصادفی شش‌تایی باشد.

نتایج ردیابی همزمان با استفاده ازآغازگرهای CMV و TSWV نشان داد، قطعات مورد انتظار مربوط به ژن پروتئین‌پوششی CMV به اندازه ۶۵۴bp و ژن نوکلئوکپسید TSWV در حدود ۷۸۰bp تکثیر شدند، در بین ۳۶ نمونه بررسی شده برای آلودگی ویروسی، CMV (شش نمونه مثبت) نسبت به TSWV از فراوانی بالاتری برخوردار بود که این امر می تواند به علت پراکندگی بیشتر CMV، دامنه میزبانی وسیع آن و گسترش بیشتر ناقلین این ویروس (شته‌ها) باشد. گستردگی ویروس CMVنسبت به TSWV درعلف‌های هرز مزارع گوجه و اطراف آن بیشتر بوده که این گستردگی بسته به نوع میزبان و شرایط اقلیمی متفاوت می‌باشد (Lavina et al., 1996). نتایج سایر محققین (Sokhandan et al., 2006, 2008) نیز حاکی از فراوانی ویروس موزاییک خیار در محصولات جالیزی و گوجه‌فرنگی می‌باشد. وجود علائم نکروزه در برگ‌های دارای علائم موزاییک و لکه‌های روی میوه‌ها نشان داد برخی از نمونه‌ها علاوه بر ویروس موزاییک خیار دارای آلودگی به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی نیز بودند. فراوانی این ویروس و علائم مشخصه آن در نمونه‌ها نسبت به ویروس موزاییک خیار کمتر بود که ممکن است این امر به علت گسترش کمتر ناقل این ویروس، عدم بذربرد بودن آن و غالبیت سایر ویروس‌های گوجه‌فرنگی مانند ویروس موزاییک خیار باشد. بدون شک تکیه بر علائم به تنهایی نمی‌تواند به‌صورت دقیق آلودگی به ویروس و آلودگی مخلوط را مشخص نماید، برای رفع این مشکل، در این بررسی از روش حساس‌تر آرتی-پی‌سی‌آر برای ردیابی و در نهایت تعیین نوع ویروس آلوده کننده استفاده شد.

در این آزمون پس از ساخت cDNA با استفاده از آغازگرهای شش‌تایی تصادفی، در پی‌سی‌آر، آغازگرهای اختصاصی هر کدام از ویروس‌ها، باندهای اختصاصی مربوطه را تکثیر نمودند. نتایج پی‌سی‌آر نیز تایید کننده مشاهدات مزرعه‌ای بود ودر شش نمونه باند اختصاصی مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار (۶۵۴ جفت باز) تکثیر شد در حالیکه تنها در یک نمونه منفرد و در دو نمونه بصورت مشترک با ویروس موزاییک خیار، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی شناسایی شد (شکل ۱ و۴).

ازجمله روش‌هایی که به صورت دقیق آلودگی‌های ویروسی و آلودگی‌های مخلوط را نشان می‌دهد روش RT-PCR است که جهت ردیابی و تعیین نوع ویروس آلوده‌کننده از سایر روش‌ها حساس‌تر و دقیق‌تر می‌باشد (Sokhandan et al., 2006, 2008). لازم به یادآوری است مشخص نمودن میزان دقیق‌تر غلظت و تکثیر ویروس‌ها نیاز به آزمون‌های تکمیلی و بیشتری دارد.

برای اطمینان بیشتر از نوع ویروس‌های تکثیر شده، یکی از نمونه‌هایی که دارای آلودگی مخلوط بودند و شدت باند بیشتری داشتند بصورت جداگانه تکثیر شدند و توالی آنها مشخص شد. نتایج تعیین توالی حاکی از تعلق جدایه‌ها به هر کدام از ویروس‌های مورد مطالعه بود. با توجه به درخت فیلوژنتیکی، جدایه تازه ردیابی شده ویروس موزاییک خیار همراه با جدایه‌های ایرانی جداسازی شده ازگوجه‌فرنگی و کدوییان در یک خوشه قرار گرفتند. در این خوشه اغلب جدایه‌ها همانند جدایه مورد مطالعه از گوجه‌فرنگی جداسازی شده بودند. انتقال این ویروس توسط ناقلینی مانند شته‌ها پراکنش آلودگی از یک میزبان به سایر میزبان‌ها را فراهم می سازد. همچنین مطالعات قبلی نیز نشان داده که جدایه‌های ویروس موزاییک خیار از نظر تخصص میزبانی تفکیک پذیری منظم و قطعی ندارند(Palukaitis and García-Arenal, 2003; Yu et al., 2005). نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنتیکی برای جدایه ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی نیز نشان داد این جدایه با جدایه‌هایی از ترکیه بیشترین نزدیکی را دارد و در یک خوشه قرار گرفتند. با توجه به نزدیکی منطقه مورد مطالعه به کشور ترکیه می‌توان چنین بیان نمود که ممکن است ارتباط جغرافیایی بین این جدایه و جدایه‌های ترکیه وجود داشته باشد که این می‌تواند در اثر انتقال توسط ناقل مهم این ویروس یعنی تریپس باشد و یا توسط جابجایی مواد گیاهی مانند نشا صورت گرفته باشد. با توجه به گستردگی ویروس موزاییک خیار در مزارع گوجه‌فرنگی شمالغرب کشور و احتمال انتقال ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی از کشور ترکیه، آلودگی مخلوط رخ داده‌است که این موضوع ممکن است سبب تشدید آلودگی شود. شناخت الگو و نوع گسترش هر بیماری امری مهم است که می‌تواند کمک شایانی به مدیریت و برنامه‌های مهم کنترلی برای بیماری‌های ویروسی نماید.

سپاس‌گزای

نویسندگان از کمک های ارزنده جناب آقای دکتر افشین حسنی مهربان تشکر و قدردانی می کنند.

REFERENCES

Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. amsterdam: elsevier academic, 948 pp.

Anonymous. 2012. FAOSTAT data. Food and Agriculture Organization. Online at http://faostat.fao.org/faostat/ Collections subset=agriculture.

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.

Chen, S., Gu, H., Wang, X., Chen, J., and Zhu, W. 2011. Multiplex RT-PCR detection of *Cucumber mosaic virus* subgroups and tobamoviruses infecting tomato using 18S rRNA as an internal control. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 43: 465-471.

Chiemsombat, P., Gajanandana, O., Warin, N., Hongprayoon, R., Bhunchoth, A., and Pongsapich, P. 2008. Biological and molecular characterization of tospoviruses in Thailand. Archives of Virology, 153: 571-577.

Elliott, R. M. 1990. Molecular biology of the Bunyaviridae. Journal of General Virology, 71: 501-522.

Escriu, F., Fraile, A., and García-Arenal, F. 2003. The evolution of virulence in a plant virus. Evolution, 57(4):755-765.

FAOSTAT F. (2014). Agricultural Organization of the United Nations. Available at: faostat fao org Accessed May 2.

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., Pourrahim, R., Farzadfar, S., and Ahoonmanesh, A. 2007. Identification and partial characterization of a Tospovirus causing leaf and stem necrosis on potato. Plant Pathology Journal, 6, 227-234.

Golnaraghi, A., Shahraeen, N., Pourrahim, R., Ghorbani, S., and Farzadfar, S. 2001. First report of *Tomato spotted wilt virus* on soybean in Iran. Plant Disease, 85, 1290-1290.

Hajiabadi, A. M., Asaei, F., Abdollahi, M. B., and Rastgou, M. 2012. Natural incidence of tomato viruses in the North of Iran. Phytopathologia Mediterranea, 51, 390-396.

Hajiabadi, A. M., Jafarpour, B., Rastegar, M. F., and Mandoulakani, B. A. 2009. Detection of *Tomato spotted wilt* virus in North-East of Iran. International Journal of Food, Agriculture and Environment, 7, 471-474.

Hull, R. 2014. Comparative plant virology. Second edition, academic press, London, UK. 393 pp.

King, A., Lefkowitz, E., and Adams, M. J. 2012. Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, London, UK. 1327 pp.

Lavina, A., Arambura, J., and Moriones, E. 1996. Occurrence of *Tomato spotted wilt* and *Cucumber mosaic virus* in field-grown tomato crops and associated weeds in northeastern Spain. Plant Pathology, 45:837-842.

Palukaitis, P., and Garcia-Arenal, F. 2003. Cucumoviruses. Advances in Virus Research, 62:241-323.

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, L.V., Pares, R.D., and Gillings, M.R. 1992. Differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates using the polymerase chain reaction. Journal of General Virology, 73: 2099-2103.

Rowhani, A., Chay, C., Golino, D.A., and Falk, B.W. 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of *Grapevine fanleaf virus* in grapevine tissue. Phytopathology, 83: 749-758.

Sambrook, J., and Russel, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual (Vol3). Cold spring harbor laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Sokhandan, N.B., Nematollahi, S., and Torabi, E. 2008. *Cucumber mosaic virus* subgroup IA frequently occurs in the northwest Iran. Acta Virologica, 52: 237-242.

Sokhandan, N.B., Kalhor, M.R., and Nourinejhad, S.Z. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. Virus Genes, 32: 277-288.

Wu, J., Yu, C., Yang, C., and Xueping, X. 2009. Monoclonal antibodies against the recombinant nucleocapsid protein of *Tomato spotted wilt virus* and its application in virus detection. Journal of Phytopathology, 157:344–349.

Yu, C., Wu, J., and Zhou, X. 2005. Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. Journal of Virological Methods, 123: 155-161.

Zehnder, G., Yao,C., Murphy, J.F., Sikora, E., and Kloepper, J. 2000. Induction of resistance in tomato against *Cucumber mosaic cucumovirus* by plant growth-promoting rhizobacteria. Biocontrol, 45:127-137.

Zeng, R., Liao, Q., Feng, J., Li, D., and Chen, J. 2007. Synergy between *Cucumber mosaic virus* and *Zucchini yellow mosaic virus* on Cucurbitaceae hosts tested by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 39: 431–437.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 40(1) Spring 2017

Simultaneous identification of *Cucumber mosaic virus* and *Tomato spotted wilt virus* from tomato fields and their phylogenetic analysis

M. Abadkhah[1], Z. Kashiha[2], D. Koolivand[3*] and O. Eini Gandomani[4]

1. M.Sc. student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran
2. M.Sc. student of Plant Pathology, International Campus, University of Tabriz, Iran
3. [*]**Corresponding author:** Assistant Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran (Koolivand@znu.ac.ir)
4. Assistant Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan , Iran

Received: 30 January 2016 Accepted: 9 October 2016

Abstract

Cucumber mosaic virus (CMV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) are important viruses in tomato fields. In this research, 36 tomato plant samples showing viral symptoms were collected from fields in various regions of the west and northwest of Iran. To detect CMV and TSWV, cDNAs were prepared using Random Hexamer primer and total RNAs extracted from the collected samples. The prepared cDNAs and specific primers for CMV-coat protein (CP) gene and TSWV-nucleocapsid (N) gene were used to amplify a part of each virus genome by Polymerase Chain Reaction (PCR), separately. The results revealed that a 654 bp fragment from the CMV-CP and a 777 bp fragment from TSWV-N were amplified from six and three samples, respectively. To detect mixed infection of CMV and TSWV in tomato plants simultaneously, we used their specific primers in a single PCR assay. DNA fragments from both viruses were amplified from two samples. In these plants, more severe symptoms such as deformation, mosaic, chlorosis and necrosis on the leaves were observed and compared to the specific symptoms in plants infected by either CMV or TSWV. Phylogenetic tree of mixed isolates based on nucleic acid and amino acids showed that the isolates of CMV in this research were grouped with isolates from Iran and India whereas TSWV isolates were grouped with isolates from different countries such as Turkey, Italy and Montenegro.

Key Words: Cucumovirus, Tospovirus, Mixed infection, RT-PCR