

ردیابی سرلوژیکی و مولکولی ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در برخی علف‌های هرز در مزارع زعفران

سالار فرخوند^۱، سیده عاطفه حسینی^{۲*}، خدیجه سالاری^۳ و محمدحسین امینی‌فرد^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲- استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۳- مربی بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت

۴- استادیار باغبانی، گروه باغبانی و مرکز پژوهشی گیاهان ویژه، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

*نویسنده مسئول: Email: ahosseini@birjand.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۴/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۰۹

چکیده

زعفران یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی و صادراتی ایران بوده و بررسی عوامل محدودکننده آن حائز اهمیت است. ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*) از مخرب‌ترین ویروس‌های گیاهی است و علف‌های هرز به عنوان کانون و منابع اولیه انتشار این ویروس می‌باشند، به منظور ردیابی و شناسایی علف‌های هرز آلوده به TSWV در مزارع زعفران، در فروردین و اردیبهشت سال ۱۳۹۶، تعداد ۳۷ نمونه علف هرز از مزارع استان خراسان جنوبی و شهرستان‌های بیرجند، فردوس، سراپان و قاین به صورت تصادفی جمع‌آوری گردید. ردیابی اولیه ویروس با آزمون ساندویچ دوطرفه الایزا (DAS-ELISA) صورت گرفت. نمونه‌های مثبت در الایزا با آزمون RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن نوکلئوپروتئین بررسی گردیدند و در دو نمونه علف هرز قطعه‌ای به طول ۷۷۷ جفت باز تکثیر و جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. نتایج مؤید آلودگی دو علف هرز شاهی‌وحشی و جوموشی به ویروس مذکور بود. تحلیل تبارزایی این دو جدایه در مقایسه با ۲۰ ترادف متناظر در بانک ژن، نشان از تشکیل دو گروه تبارزایی داشت که جدایه‌های ایرانی در گروه دو و زیر گروه A قرار گرفتند. بیشترین شباهت بین جدایه 21K.IR مربوط به شاهی‌وحشی با جدایه‌ای از مونتنگرو (GU339506) مربوط به میزبان سلمه‌تره، به میزان ۹۷/۳ درصد و کمترین شباهت با جدایه‌ای از ایتالیا (GU369718) مربوط به میزبان توتون به میزان ۸۸ درصد بود. تحقیق حاضر اولین ردیابی TSWV در مزارع زعفران در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: الایزا، جوموشی، شاهی‌وحشی، RT-PCR

مقدمه

ویروس TSWV در طبیعت بوسیله تریپس‌ها به روش گردشی تکثیری و بیشتر با دو گونه *Frankliniella occidentalis* و *Thrips tabaci* منتقل می‌شود (Scholthof et al., 2011). ویروس TSWV در ایران نخستین بار از میزبان‌های اطلسی (*Petunia hybrida* L.)، توتون (*Nicotiana tabacum* L.)، چشم‌بلیلی (*Vigna unguiculata* L.)، گل دکمه‌ای (*Gomphrena globosa* L.) و خیار (*Cucumis sativus* L.) در منطقه ورامین گزارش شده است (Bananej et al., 1996). همچنین روی گوجه‌فرنگی در استان خراسان رضوی و گلخانه‌های مناطق مرکزی و جنوبی ایران و نیز روی سویا (*Glycine max* L.) ردیابی گردیده است (Golnaraghi et al., 2008; Massumi et al., 2009). همچنین از نهالستان اصفهان، لرستان، فارس، مرکزی، گلستان، مازندران، تهران، همدان و غرب آذربایجان گزارش شده است (Farzadfar, 2002). این ویروس با داشتن دامنه میزبانی در بیش از ۹۰۰ گیاه، خسارات فراوانی به گیاهان زینتی، سبزیجات و محصولات زراعی وارد آورده و خسارت آن بر روی بادام‌زمینی (*Arachis hypogea* L.)، فلفل (*Capsicum annuum* L.)، توتون و گوجه‌فرنگی حائز اهمیت است. ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی اخیراً از ایران در مزارع زعفران خراسان جنوبی گزارش شده است (Farkhovand et al., 2018) این ویروس در دنیا روی گونه‌های متعدد علف هرزی که میزبان تریپس می‌باشند، شناسایی شده است. این گیاهان وحشی به عنوان نگهدارنده گیاه اصلی در مزارع به کار می‌روند، چون ویروس مذکور توسط مرحله اول لاروی کسب می‌شود، بنابراین، بعد از اینکه گیاه را آلوده کرد، بایستی بر روی گیاه میزبان تا نسل بعدی باقی بماند تا مجدداً ویروس را کسب نماید. بنابراین، میزبان‌های وحشی در زمان غیرفعال بودن گیاه این نقش واسط را برعهده دارند (Marsello et al., 2009; Srinivasan et al., 2014; Groves et al., 2002). جمعیت TSWV تنوع ژنتیکی بالایی وجود دارد، یکی از ژن‌هایی که در شناسایی مولکولی و بررسی این تنوع بکار می‌رود، ژن نوکلئوپروتئین (N) است (Dong et al., 2008). بنابراین با توجه به ردیابی این ویروس در مزارع زعفران در استان خراسان جنوبی (Farokhvand et al., 2017)، شناسایی میزبان‌های خودرو و بررسی سرولوژیکی و

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. دارای جایگاه ویژه صادراتی بوده و ایران مقام اول سطح زیر کشت، در جهان را دارد و بیش از ۹۰ درصد زعفران دنیا در ایران تولید می‌شود (Kafi et al., 2002). استان‌های خراسان رضوی و جنوبی قطب تولید زعفران در ایران بوده و استان خراسان جنوبی با دارا بودن ۵۷۰۰۰ هکتار، مقام دوم بعد از استان خراسان رضوی را دارد (Jihad Keshavarzi Khorasan Razavi, 2012).

به همین دلیل شناسایی عوامل خسارت‌زایان از جمله ویروس‌ها حائز اهمیت است. از آنجا که گیاه مذکور دارای سرعت رشد آهسته است، تراکم و جمعیت علف‌های هرز در آن بالا است و گیاه اصلی رقیب قوی برای علف‌های هرز نمی‌باشد (Kafi et al., 2002). قربانی و همکاران (Ghorbani et al., 2008) گزارش نمودند که گونه‌های مختلف علف هرز در مزارع این گیاه وجود دارند که منجر به کاهش عملکرد شده و از طرف دیگر پوشش‌های انبوهی جهت فعالیت حشرات فراهم می‌آورند. علف‌های هرز و میزبان‌های گیاهی خودرو و وحشی، توسط تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی آلوده شده و به عنوان مخازن ویروسی، کانون اولیه آلودگی گیاهان زراعی به‌شمار می‌روند و نیز نقش محوری در ظهور نژادهای ویروسی ایفا می‌کنند (Silva et al., 2012).

ویروس‌ها تغییرات ژنتیکی زیادی را متحمل می‌شوند تا روی میزبان‌های وحشی سازگار گردند، به این دلیل امکان ظهور و تکامل واریانت‌های جدید ویروسی که بر مقاومت گیاهان میزبان فائق آمده و سبب شیوع بیماری می‌گردند، وجود دارد (Mansoor et al., 2003). ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی گونه تیپ جنس توسپوویروس (*Tospovirus*) در خانواده بنیاویریده (*Bunyaviridae*) است که بدلیل وارد آوردن خسارت اقتصادی و دامنه میزبانی وسیع، مطالعات گسترده‌ای روی آن انجام گرفته است (Hassani-Mehraban et al., 2010). این ویروس خسارت‌های شدیدی به دامنه وسیعی از گیاهان مهم خصوصاً سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) وارد می‌کند. ذرات توسپوویروس چندوجهی و اندازه ۱۲۰-۸۰ نانومتر دارد و دارای RNA تک‌رشته‌ای سه قسمتی بوده که M، L و S نامیده می‌شوند (Sampana et al., 2005).

در بازدیدهای به عمل آمده از مزارع زعفران در استان خراسان جنوبی، در فروردین و اردیبهشت ماه ۱۳۹۶، تعداد ۳۷ نمونه علف هرز مربوط به تیره‌های مختلف دارای علائم نکروتیک، بد شکلی یا فاقد علائم جمع‌آوری شد (جدول ۱). نمونه‌ها در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل گردید.

مولکولی آن ضروری به نظر می‌رسد. همچنین از آنجا که اطلاعات جامع و مستندی تاکنون در این خصوص در دسترس نیست، به نظر می‌رسد این اولین بررسی میزبان‌های وحشی TSWV در مزارع زعفران ایران است.

مواد و روش‌ها نمونه‌برداری

جدول ۱. مشخصات علف‌های هرز جمع‌آوری شده از مزارع زعفران استان خراسان جنوبی

Table 1. Characterization of weeds were collected from saffron fields of South Khorasan Province

محل نمونه‌برداری Location of samplings	تعداد Numbers	خانواده Family	نام عمومی Generalname	نام علمی Species name
قاین Ghaen	5	شب‌بوئیان Brassicaceae	ناخنک Cudweed	<i>Goldbachia laevigata</i>
قاین و سرایان Ghaen and Sarayan	9	میخکیان Caryophyllaceae	گندمک Common chickweed	<i>Stellaria media</i>
قاین Ghaen	2	شب‌بوئیان Brassicaceae	شاهی وحشی Hoary cress	<i>Cardaria draba</i>
قاین Ghaen	1	شاه‌تره‌ئیان Fumariaceae	شاه‌تره Fumitory	<i>Fumaria officinalis</i>
فردوس و سرایان Ferdows and Sarayan	4	شب‌بوئیان Brassicaceae	جلنگو Blue mustard	<i>Coriostoma tenella</i>
بیرجند، قاین و فردوس Birjand, Ghaen and Ferdows	5	غلات Poaceae	جوموشی Mediterranean barley	<i>Hordeum murinum</i>
بیرجند، سرایان و فردوس Birjand, Sarayan and Ferdows	6	هفت‌بندیان Polygonaceae	هفت بند Swamp smartweed	<i>Polygonum avicular</i>
قاین، فردوس و سرایان Ghaen, Ferdows and Sarayan	2	شب‌بوئیان Brassicaceae	درشتوک African rocket	<i>Malcolmia africana</i>
بیرجند (چاه زینی) Birjand (Zini)	2	چغندریان Chenopodiaceae	سلمه Lamb squarters	<i>Chenopodium album</i>
بیرجند (چاه زینی) Birjand (Zini)	1	حبوبات Fabaceae	یونجه Honey lotus	<i>Melilotus indicus</i>

دستگاه الیزاخوان مدل EL₈₀₀ (Biotek Instrument- آمریکا) و با طول موج ۴۰۵ نانومتر ارزیابی گردیدند. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) و با استفاده از معادله سه برابر جذب شاهد مثبت، آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید.

آزمون سرلوژیکی

از روش ساندیوچ دوطرفه الیزا (DAS-ELISA) با استفاده از آنتی‌سرم TSWV اهدا شده (دکتر تورینا، دانشگاه تورینو ایتالیا) برطبق دستورالعمل کلارک و آدامز (Clark & Adams, 1977) برای شناسایی احتمالی TSWV در برگ‌های دارای علائم استفاده شد. چاهک‌ها با استفاده از

واکنش بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی $0.5 \mu\text{g/ml}$ بررسی گردید. قطعات تکثیر شده جدایه مورد نظر برای تعیین توالی به شرکت Macrogen (کره جنوبی) ارسال گردید.

تجزیه و تحلیل تبارزایی

توالی نواحی تکثیر شده ابتدا با برنامه Chromas version 2.13 بازینی و سپس با نرم‌افزار بلاست در پایگاه اطلاعاتی NCBI با ترادف‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. پس از تعیین میزان شباهت، قطعات مربوط به ژن نوکلئوپروتئین مورد بررسی توسط نرم‌افزار Bio Edit (Hull et al., 1999) هم‌ردیف‌سازی شدند. به منظور بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌ها، درخت فیلوژنتیکی به روش Maximum Likelihood توسط نرم‌افزار MEGA6 ایجاد شد (Tamura et al., 2013). همچنین جهت تبدیل توالی‌های نوکلئوتیدی به ترادف‌های اسیدآمینه‌ای از نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار MegAlign ماتریس تشابه توالی نوکلئوتیدی (شکل ۲) جدایه‌ها به همراه ماتریس فاصله ژنتیکی تعیین گردید.

نتایج و بحث

نتایج آزمون الیزا نشان داد که دو نمونه مربوط به شاهی‌وحشی (*Cardaria draba*) و جوموشی (*Hordeum murinum*) با جذب نزدیک به سه برابر از بین ۳۷ نمونه میزبان خودرو در مزارع زعفران به TSWV آلوده هستند (شکل ۱). نمونه‌ها مربوط به تیره‌های Brassicaceae و Poaceae بوده و هر دو این علف هرز فاقد علائم بودند. البته دو نمونه دیگر علف هرز نیز در این واکنش مثبت بودند، اما آلودگی آنها در آزمون RT-PCR تأیید نگردید.

در آزمون RT-PCR قطعه‌ای به طول ۷۷۷ جفت باز مربوط به ژن نوکلئوپروتئین در دو نمونه علف هرز شاهی‌وحشی و جوموشی تکثیر گردید که مؤید آزمون الیزا بود (شکل ۲). تعیین ترادف این نمونه‌ها و مقایسه آنها با ترادف‌های موجود در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه BLASTn نشان داد که قطعات حاصل در واکنش PCR مشابه با TSWV است.

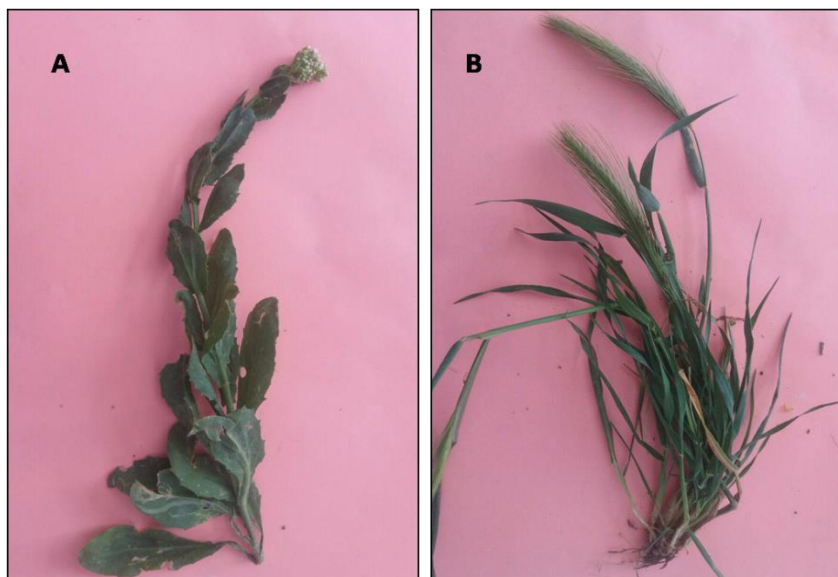
استخراج RNA کل و واکنش نسخه‌برداری معکوس
برای استخراج RNA کل گیاهان آلوده به جدایه مورد بررسی، از روش تریازول (Zindowich et al., 2014) و بر اساس دستورالعمل آن استفاده گردید. RNAهای استخراج شده در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

پس از استخراج RNA ویروس، اقدام به ساخت DNA مکمل (cDNA^۱) از روی RNA ویروسی با استفاده از آغازگر اختصاصی معکوس گردید. بدین‌منظور، $2/5$ میکرولیتر RNA کل، $2/5$ میکرولیتر آغازگر پس‌سو ($10 \mu\text{M}$) و $8/5$ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به لوله‌ها اضافه و پس از یک دقیقه در دمای 95°C درجه سانتی‌گراد، بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد. سپس مقدار چهار میکرولیتر بافر RT(5x)، دو میکرولیتر مخلوط dNTPs ($10 \mu\text{M}$)، نیم میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV ($200 \text{U}/\mu\text{L}$)، نیم میکرولیتر آنزیم RNase ($10 \text{U}/\mu\text{L}$) به لوله‌ها اضافه گردید و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای 42°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت توقف واکنش مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 72°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

یک جفت آغازگر مستقیم (5'-
CCCTCGAGGCTTTCAAGCAAGTTCTGCG-3'
معکوس 5'-

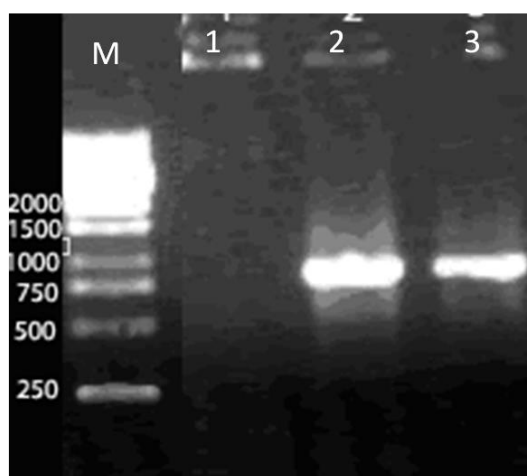
GCTCTAGAGCCATCATGTCTAAGGTTAAGCTCAC-3) (Tsompana et al., 2005) با

نام‌های S1938F/S2767R مربوط به ناحیه کدکننده نوکلئوپروتئین یا N که قطعه‌ای به طول ۷۸۰ نوکلئوتید را تکثیر می‌کرد، استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از cDNA در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Germany) انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل شش میکرولیتر آب، ۱۲ میکرولیتر Master mix (ساخت شرکت ویراژن ایران)، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (۱۰ پیکومول) و پنج میکرولیتر cDNA بود. برنامه حرارتی PCR در یک چرخه 94°C درجه به مدت یک دقیقه، ۳۰ چرخه متشکل از 94°C درجه به مدت ۳۰ ثانیه، 54°C درجه یک دقیقه، 72°C درجه دو دقیقه و یک چرخه 72°C درجه‌ای به مدت ده دقیقه (جهت کامل شدن رشته‌های ناقص) اعمال گردید. کیفیت قطعات تکثیرشده حاصل از



شکل ۱. علف‌های هرز شاه‌ی وحشی (A) بدون علائم و جوموشی (B) با علائم زردی عمومی آلوده به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی جمع‌آوری شده از مزارع زعفران در استان خراسان جنوبی

Fig.1. *Cardaria draba* (Asymptome) and *Hordeum murinum* (with general yellowing symptom) were infected by TSWV collected from saffron fields in South Khorasan



شکل ۲. الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR تکثیر شده با آغازگراختصاصی با باند ۷۷۷ جفت بازی در ژل آگارز. (M) نشانگر DNA (Ladder, MBI, Fermentas)، (۱) نمونه سالم و (۲ و ۳) نمونه‌های گیاهی آلوده به ویروس TSWV

Fig.2. Agarose gel electrophoresis of PCR product was amplified 777bp fragments by specific primers. M) Marker, 1) health sample, 2-3) samples were infected by TSWV

سازی صورت گرفت. در دندروگرام حاصل از مطالعات تبارزایی دو گروه (Group I,II) تشکیل شد (شکل ۳).

در تحلیل تبارزایی، جدایه‌های تعیین توالی شده این تحقیق (21K.IR و 32K.IR) و مربوط به علف‌های هرز شاه‌ی وحشی و جوموشی، همراه تعدادی از جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن^۱ بررسی شد. سپس ترادف‌های مربوط به ژن نوکلئوپروتئین بانک ژن انتخاب و هم‌ردیف-

1- Gene bank



شکل ۳. درخت تبارزایی رسم شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن نوکلئوپروتئین جدایه‌های ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی مربوط به دو جدایه علف هرز و جدایه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 به روش

Maximum likelihood

Fig. 3. Phylogenetic tree based on Nucleoprotein of TSWV related to two weed isolates of this research and Gen bank isolates by Mega6 and Maximum likelihood method

برای هر جدایه دنیا نام جدایه، میزبان، کشور و شماره دسترسی آمده است. ویروس Impatiennecroticspotvirus به عنوان برون‌گروه در نظر گرفته شده است.

For each isolates, the name of isolate, host, country and accession numbers were included. Iranian isolates were bolded.

گوجه‌فرنگی، توتون و خارشتر می‌باشد و دو جدایه مربوط به ایران که در تحقیقات پیشین تعیین توالی شده و شماره دسترسی آن در بانک ژن ثبت می‌باشد، اما مقاله آن در دسترس نمی‌باشد، قرار گرفت. در گروه دو زیر گروه A و B تشکیل شد. در زیر گروه A دو جدایه مورد بررسی در این تحقیق و مربوط به دو میزبان جوموشی و

گروه یک به دو زیر گروه A و B تقسیم گردید. در زیر گروه A یک جدایه TSWV مربوط به کره از روی فلفل، چهار جدایه مربوط به ایتالیا از میزبان‌های بادمجان، کاهو، گوجه، فلفل و سه جدایه مربوط به کشور مونتنگرو و از میزبان‌های فلفل، *Petunia* و *Calceolaria* قرار گرفتند. در زیر گروه B سه جدایه از صربستان که میزبان آن

جوموشی به میزان ۹۶ درصد می‌باشد. بیشترین شباهت بین جدایه 21K.IR مربوط به شاهی‌وحشی با جدایه‌ای از موننتگرو (GU339506) مربوط به میزان سلمه‌تره، به میزان ۹۷/۳ درصد و کمترین شباهت با جدایه‌ای از ایتالیا (GU369718) مربوط به توتون به میزان ۸۸ درصد می‌باشد (شکل ۴).

شاهی‌وحشی، یک جدایه مربوط به موننتگرو از سلمه‌تره، یک جدایه از ایتالیا مربوط به توتون و دو جدایه از برزیل مربوط به میزان‌های گوجه‌فرنگی و فلفل قرار می‌گیرند. در زیر گروه B نیز دو جدایه از کره مربوط به فلفل و کنجد و یک جدایه از چین مربوط به *Petunia* قرار گرفتند. در ماتریکس تشابه، شباهت بین جدایه‌های این تحقیق (21K.IR و 32K.IR) به ترتیب مربوط به شاهی‌وحشی و

		Percent Identity																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Divergence	1	■	96.7	96.7	96.5	99.2	99.1	89.2	98.8	98.8	98.8	99.1	98.5	98.3	98.8	96.5	96.5	98.3	97.8	95.8	97.3	97.3	96.5	1	AB175809
	2	3.2	■	100.0	96.4	97.3	97.2	89.1	97.4	97.4	97.4	97.4	97.3	96.9	97.4	96.5	96.5	97.2	96.9	95.2	95.9	95.9	98.8	2	EF195224
	3	3.2	0.0	■	96.4	97.3	97.2	89.1	97.4	97.4	97.4	97.4	97.3	96.9	97.4	96.5	96.5	97.2	96.9	95.2	95.9	95.9	98.8	3	EF195230
	4	3.5	3.6	3.6	■	97.0	96.9	87.9	97.3	97.0	97.0	97.0	97.2	97.0	97.0	97.3	97.3	97.0	96.5	95.0	96.7	96.7	95.9	4	GU339505
	5	0.8	2.6	2.6	2.9	■	99.9	89.7	99.6	99.4	99.6	99.6	99.2	99.1	99.4	97.0	97.0	99.1	98.6	96.5	97.3	97.3	97.2	5	GU339506
	6	0.9	2.8	2.8	3.1	0.1	■	89.6	99.5	99.2	99.5	99.5	99.1	99.0	99.2	96.9	96.9	99.0	98.5	96.4	97.2	97.2	97.0	6	GU339507
	7	1.9	2.2	2.2	3.4	1.3	1.4	■	89.8	89.6	89.8	90.1	89.4	89.4	89.6	88.2	88.2	89.3	89.1	87.9	88.0	88.0	88.3	7	GU369718
	8	1.0	2.6	2.6	2.6	0.3	0.4	1.3	■	99.5	99.7	99.7	99.4	99.2	99.5	97.4	97.4	99.2	98.7	96.7	96.9	96.9	96.8	8	GU369719
	9	1.0	2.6	2.6	2.9	0.5	0.6	1.6	0.5	■	99.5	99.5	99.1	99.0	99.7	97.2	97.2	99.0	98.5	96.4	96.9	96.9	96.8	9	Solanum
	10	1.0	2.6	2.6	2.9	0.3	0.4	1.3	0.3	0.5	■	99.7	99.4	99.2	99.5	97.2	97.2	99.2	98.7	96.7	96.9	96.9	96.8	10	Capsicum
	11	0.8	2.6	2.6	2.9	0.3	0.4	1.0	0.3	0.5	0.3	■	99.4	99.2	99.5	97.2	97.2	99.2	98.7	96.7	97.2	97.2	96.8	11	Capsicum
	12	1.4	2.8	2.8	2.8	0.6	0.8	1.7	0.6	0.9	0.6	0.6	■	99.1	99.1	97.6	97.6	99.6	98.8	96.8	97.0	97.0	96.7	12	GU369723
	13	1.6	3.2	3.2	2.9	0.8	0.9	1.7	0.8	1.0	0.8	0.8	0.9	■	99.0	97.4	97.4	99.0	98.2	96.5	96.9	96.9	96.3	13	Nicotiana
	14	1.0	2.6	2.6	2.9	0.5	0.6	1.6	0.5	0.3	0.5	0.5	0.9	1.0	■	97.2	97.2	99.0	98.5	96.4	96.9	96.9	96.8	14	GU369725
	15	3.5	3.6	3.6	2.6	2.9	3.0	3.2	2.6	2.9	2.9	2.9	2.5	2.6	2.9	■	99.7	97.4	96.9	95.4	96.9	96.9	96.1	15	GU369726
	16	3.5	3.6	3.6	2.6	2.9	3.0	3.2	2.6	2.9	2.9	2.9	2.5	2.6	2.9	0.3	■	97.4	96.9	95.4	96.9	96.9	95.9	16	GU369727
	17	1.6	2.9	2.9	2.9	0.8	0.9	1.9	0.8	1.0	0.8	0.8	0.4	1.0	1.0	2.6	2.6	■	98.7	96.5	97.2	97.2	96.5	17	GU369728
	18	2.1	3.2	3.2	3.5	1.3	1.4	2.2	1.3	1.6	1.3	1.3	1.2	1.8	1.6	3.2	3.2	1.3	■	97.7	96.7	96.7	96.3	18	KT899947
	19	4.1	4.8	4.8	5.0	3.3	3.4	3.5	3.3	3.6	3.3	3.3	3.2	3.6	3.6	4.7	4.7	3.3	2.2	■	94.5	94.5	94.6	19	KT899948
	20	2.8	4.1	4.1	3.3	2.8	2.9	3.2	3.0	3.0	3.0	2.8	2.9	3.0	3.0	3.0	3.0	2.8	3.3	5.4	■	100.0	96.0	20	21K
	21	2.8	4.1	4.1	3.3	2.8	2.9	3.2	3.0	3.0	3.0	2.8	2.9	3.0	3.0	3.0	3.0	2.8	3.3	5.4	0.0	■	96.0	21	32K
	22	3.4	1.0	1.0	4.2	2.9	3.0	2.9	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.3	3.7	3.2	3.9	4.1	3.5	3.7	5.4	4.1	4.1	■	22
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		

شکل ۴. ماتریکس تشابه نوکلئوتیدی ژن N دو جدایه بررسی شده ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (TSWV) در این تحقیق با ترادف‌های ژن هم‌تا جدایه‌های موجود در بانک ژن. ماتریس با استفاده از روش Clustal W نرم‌افزار MegAlign ایجاد شده است.

Fig.4. Homology matrix of of two weed isolate of this research and isolates of gene bank according to Nucleoprotein gene of TSWV using MegAlign software and Clustal W method.

گیاه زعفران به عنوان گران‌ترین ادویه جهان، نقش مهمی در صادرات بخش کشاورزی ایران دارد و بررسی عوامل خسارت‌زای آن حائز اهمیت است (Kafi et al., 2002). تاکنون ویروس‌هایی از جنس پوتی‌ویروس بر روی زعفران شناسایی و اخیراً TSWV در مزارع زعفران ردیابی شده است (Farokhvand et al., 2017; Parizad et al., 2013). علف‌های هرز وحشی و خودرو به عنوان ظرف‌های مخلوط کننده جمعیت‌های ویروسی و همچنین از نظر اپیدمیولوژی منابع اولیه آلودگی و مخزن ویروس در پیدایش واریانت‌های جدید به حساب می‌آیند و در اپیدمیولوژی ویروس حائز اهمیت می‌باشند (Hosseinzadeh et al., 2013). تحقیق حاضر به ردیابی و شناسایی ویروس مذکور

در این تحقیق با ترادف‌های ژن هم‌تا جدایه‌های موجود در بانک ژن. ماتریس با استفاده از روش Clustal W نرم‌افزار MegAlign ایجاد شده است.

این تحقیق در مقایسه با جدایه‌های بانک ژن بررسی گردید. دو جدایه مربوط به دو علف هرز در گروه دو و زیر گروه A قرار گرفتند که مجزا از دو جدایه ایرانی که قبلاً تعیین توالی شده بود، می‌باشند و میزان تشابه نوکلئوتیدی در سطح ۹۴/۵ درصد دارند. در این گروه جدایه‌هایی از میزبان‌های سلمه‌تره، توتون، گوجه فرنگی، کنجد، فلفل و اطلسی و مربوط به کشورهای ایتالیا، مونتنگرو، چین و کره می‌باشند، قرار دارند. بنابراین بررسی فیلوژنی جدایه‌ها، نشان داد که محل جغرافیایی نمونه‌برداری و میزبان نقش بارزی در طبقه‌بندی این ویروس ندارد (Zindowich, 2014). همچنین قرارگیری جدایه‌های این تحقیق در گروه مجزا از جدایه‌های ایرانی نشان می‌دهد که این ویروس در ایران و در ژن نوکلئوپروتئین، دارای جمعیت‌های متنوعی می‌باشد. دو علف هرز ردیابی شده در مزارع زعفران به عنوان علف‌های هرز غالب مزارع مشاهده شده است. اگر چه کنترل شیمیایی آنها مشکل است، اما با روش‌هایی نظیر عملیات زراعی، سوزاندن و استفاده از علف‌کش‌ها، بایستی جمعیت آن‌ها کنترل گردد تا به صورت غیرمستقیم از انتشار ویروس روی زعفران جلوگیری نماید (Sabokkhiz et al., 2014).

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی، برای اولین بار در مزارع زعفران استان خراسان جنوبی و بر روی دو علف هرز شاهی‌وحشی و جوموشی با روش‌های سرولوژیکی و مولکولی شناسایی شد. تحلیل تبارزایی آن نشان از قرارگیری آن در گروهی متفاوت از جدایه‌های ایرانی پیشین و وقوع جمعیت‌های جدیدی ویروسی در جدایه‌های ایرانی می‌باشد.

به عنوان یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های گیاهی و با دامنه میزبانی وسیع، بر روی میزبان‌های وحشی در مزارع زعفران پرداخته است.

در این تحقیق، علی‌رغم اینکه علائم ویروسی مشخصی، به جز زردی عمومی در برخی برگ‌های جو موشی، روی علف‌های هرز آلوده مشاهده نشد، آلودگی با روش الایزا قابل ردیابی بود. دلیل ردیابی دو نمونه علف هرز با الایزا و عدم ردیابی با RT-PCR، چنانچه در نتایج بیان شد می‌تواند این باشد که امکان خطا در ردیابی سرولوژیکی ویروس به دلایلی نظیر اتصال غیراختصاصی وجود دارد. بنابراین به منظور اجتناب از این اشکال از روش RT-PCR و تعیین توالی به عنوان روش مکمل در شناسایی علف‌های هرز استفاده می‌گردد (Smith et al., 2006). در این تحقیق دو علف هرز جوموشی و شاهی‌وحشی پس از ردیابی و تحلیل تبارزایی شدند. تاکنون TSWV از علف‌های هرز متعددی نظیر *Stellaria media*, *Gamochaeta falcata* و *Geranium carolinianum* گزارش شده است (Mullis & Martinez 2009; Smith et al., 2006). از آنجا که تریپس فقط در مراحل لاروی ویروس را دریافت می‌کند، تنها گونه‌های گیاهی که هم میزبان ویروس و هم تریپس باشند، در اپیدمیولوژی آن نقش دارند (Batista et al., 1996). علف‌های هرز زعفران می‌توانند به عنوان پناهگاه و نگهدارنده ویروس در سراسر طول سال عمل کنند. علف‌های هرز در اوایل بهار در مزارع زعفران همزمان با فعالیت ناقلین مستعد دریافت TSWV می‌باشند (Riley et al., 2012) و به عنوان پل سبزی ویروس را نگه داشته و همزمان با فعال شدن گیاه زعفران و با فعالیت ناقلین روی گیاه اصلی منتقل می‌کنند (Snirivasan et al., 2014). در این تحقیق بر اساس ژن نوکلئوپروتئین، تنوع ژنتیکی دو جدایه علف هرز

منابع

- Bautista, R., Mau, R.F.L., Cho, J.J., and Custer, D., 1996. Thrips, tospoviruses, and host-plant associations in a Hawaiian farm ecosystem: Prospects for reducing disease losses. *Acta Hort.* 431,477-482.
- Bananej, K., Ahoonmanesh, A., Shahraeen, N., and Lasemann, D.E., 1996. Occurrence of *Tomato spotted wilt virus* in tomato fields in Varamin. *J. Plant Dis.* 32(8), 44-45. [in Persian with English Summary].
- Clark, M.F., and Adams, S.A., 1977. Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.
- 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., and Zhang, Z.K., 2008. Characterization of *tomato zonate spot virus*, a new tospovirus in China. *Arch. Virol.* 153(5), 855-864.

- Farzadfar, S., Golnaraghi, A.R., and Pourrahim, R., 2002. Plant Viruses of Iran. Saman Co. Tehran, Iran. [in Persian].
- Farokhvan, S., Hosseini, S.A., Salari, K., and Amini Fard, M.H. 2018. Detection and phylogenetic analysis of saffron and tomato isolates of *Tomato spotted wilt virus* from South Khorasan. Iran. J. Plant Protect Sci. 48 (2), 217-227
- Groves, R.L., Walgenbach, J.F., Moyer, J.W., and Kennedy, G.G., 2002. The role of weed hosts and tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, in the epidemiology of Tomato spotted wilt virus. Plant Dis. 86, 573-582.
- Golnaraghi, A.R., Pourrahim, R., Ahoonmanesh, A., Zamani-Zadeh, H.R., and Farzadfar, S., 2008. Detection and characterization of a distinct isolate of *Tomato yellow fruit ring virus* from potato. Plant Dis. 92(9), 1280-1287.
- Ghorbani, R., Rashed Mohassel, M.H., Makkarian H., and Rastgoo, M., 2008. Effect of sheep grazing on weed control in saffron fields. Proceeding of the 2nd International Symposium on Saffron Biology and Technology. Mashhad, Iran, 28-30 October, p. 389-394. [in Persian].
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41, 95-98.
- Hassani-Mehraban, A., Saaijer, J., Peters, D., Goldbach, R., and Kormelink, R., 2005. A New Tomato-Infecting Tospovirus from Iran. Phytopathol. 95(8), 852-855.
- Hosseinzadeh, M., Shamsbakhsh, M., and Kazempour, S., 2013. Full-length genome sequencing and phylogeny of severe strain isolates of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL) originating from *Datura stramonium* L. in Bojnurd region, Iran. Agri. Biotech. J. 6(1), 61-75. [in Persian with English Summary].
- Jihad Keshavarzi Khorasan Razavi., 2012. Report on Agronomic Researches for Saffron, Korasan, Iran. [in Persian].
- Kafi, M., Rashed Mohassel, M.H., Koocheki, A., and Mollafilabi, A., 2002. Saffron, Production and Processing. Zaban va Adab Publications, Iran 276 pp. [in Persian].
- Mansoor, S., Amin, I., Iram, S., Hussain, M., Zafar, Y., Malik, K.A., and Briddon, R.W., 2003. Breakdown of resistance in cotton to cotton leaf curl disease in Pakistan. Plant Pathol. 52, 784-784.
- Massumi, H., Shaabani, M., Hosseini Pour, 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 Dis. 93, 67-72.
- Morsello, S.C., and Kennedy, G.G., 2009. Spring temperature and precipitation affect tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, population growth and tomato spotted wilt virus spread within patches of the winter annual weed *Stellaria media*. Entomol. Exp. Appl. 130, 138-148.
- Mullis, S., and Martinez-Ochoa, N., 2009. Tospoviruses in solanaceae and other crops in the coastal plain of Georgia. University of Georgia, CAES Bulletin. 1354, p. 51.
- Parizad, S., Dizaji, A., Arnal, F.G., and Izadpanah, F., 2016. Potyvirus distribution infected Saffron on most important areas of cultivation. 22nd Congress on Plant Protection, 27-30 Aug. University of Tehran, Tehran, Iran, p. 37. [in Persian].
- Riley, D.G., Joseph, S.V., and Srinivasan, R., 2012. Temporal relationship of thrips populations to tomato spotted wilt incidence in tomato in the field. J. Entomol. Sci. 47, 65-75.
- Sabokkhiz. M.A., Jafarpour, B., Shahriari Ahmadi, F., and Tarighi, S., 2012. Identification of *Turnip mosaic virus* isolated from canola in northeast area of Iran. Afr. J. Biotech. 11, 14553-14560.
- Scholthof, K., Adkin, S., Czosneh, H., and Foster, G., 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 12(9), 938-954.
- Silva, S.J.C., Castillo-Urquiza, G.P., Hora-Júnior, B.T, Assunção, I.P., Lima, G.S.A., Pio-Ribeiro, G., Mizubuti, E.S.G., and Zerbini, F.M., 2012. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in Northeastern Brazil. Plant Pathol. 61(3), 457-467.
- Srivivasan, R., Rilley, D., Diffie, S., Shreshta, A., and Culbreath, A., 2014. Winter weeds

- as inoculum sources of tomato spotted wilt virus and as reservoirs for its vector, *Frankliniella fusca* (Thysanoptera: Thripidae) in Farmscapes of Georgia. *Plant Insect Interact.* 43(2), 411-420.
- Smith, T.N., Wylie, S.J., Coutts, B.A., and Jones, R.A.C., 2006. Localized distribution of *Iris yellow spot virus* within leeks and its reliable large-scale detection. *Plant Dis.* 90, 729-733.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S., 2013. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M., and Moyer, J.W., 2005. The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Mol. Eco.* 14, 53-66.
- Zindovic, J., Ciuffo, M., and Turina, M., 2014. Molecular characterization of tomato spotted wilt virus in Montenegro. *J. Plant Pathol.* 96(1), 201-205.



Serological and Molecular Detectionsof Tomato Spotted Wilt Virus on some Weed Reservoirs of Saffron Fields

Salar Farokhvand¹, Seyyede Atefeh Hosseini^{2*}, Khadije Salary³ and Mohammad Hossein Aminifard⁴

1-M.Sc. student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.

2- Assistant Professor of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.

3- Lecturer of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Iran.

4- Department of Horticultural Science and Special Plants Regional Research Centre, College of Agriculture, University of Birjand, Iran.

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

Received 4 July 2017; Accepted 30 December 2017

Abstract

Saffron is one of the most important crop in agriculture and export of Iran and identification of the reduced agents is important. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is one of the destructive viruses. Weeds are reservoir plants of viruses. In order to detect and identify the TSWV on reservoir plants, 37 weed samples were collected from South Khorasan, including Birjand, Sarayan, Ferdows and Ghaen during May and April 2017 and were tested by DAS-ELISA. The positive samples in ELISA were tested by RT-PCR and specific primers of Nucleoprotein (N) gene were amplified a fragments with 777 bp length and sequenced by Macrogen company. The results showed that *Cardaria draba* and *Hordeum murinum* were infected by TSWV. In Phylogenetic analysis with two isolates and 20 isolates of gene bank two groups were formed. Two isolates of this study, fell in Group II and subgroup A. The closest gene bank isolate was from Montenegro (GU₃₃₉₅₀₆) with 97.3% on *Chenopodium Quinoa* and the furthest isolate was from Italy (GU₃₆₉₇₁) on *Nicotiana tabacum*. This research was the first survey of weeds as a natural host of TSWV in saffron fields of South Khorasan.

Keywords: *Cadaria draba*, *Hordeum murinum*, ELISA, RT-PCR