

بررسی توالی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی ویروس ایکس هوستا

رضا پوررحیم✉ و شیرین فرزادفر

بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران
(تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۱؛ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۲)

چکیده

در بهار سال ۱۳۹۰ طی بازدیدی از مراکز تولید گیاهان زینتی در شهرستان‌های کرج و تنکابن، تعدادی بوته هوستا (*Hosta sieboldiana*) با علائم موزائیک، پیسک و بدشکلی برگ‌ها مشاهده شد. تعداد ۱۷ بوته علائم‌دار انتخاب شد و احتمال آلودگی آنها به ویروس‌های موزائیک آرابیس (*Arabis mosaic virus-ArMV*)، موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus-CMV*)، پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus-TSWV*)، لکه نکروز گل حنا (*Impatiens necrotic spot virus-INSV*) و لکه حلقوی گوجه‌فرنگی (*Tomato ring spot virus-ToRSV*) در آزمون سرولوژیک داس الایزا (DAS-ELISA) بررسی شد. نمونه‌های مورد بررسی با هیچ یک از آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس‌های فوق‌الذکر واکنش نشان ندادند. مایه‌زنی مکانیکی برخی از نمونه‌های علائم‌دار منجر به تولید لکه‌های نکروزه روی گل دکمه‌ای (*Gomphrena globosa*) و علائم سیستمیک پیسک در *Nicotiana bentamian* گردید. بررسی نمونه‌های هوستا با استفاده از روش مولکولی (RT-PCR) و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در این تحقیق برای تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی ویروس ایکس هوستا (*Hosta virus X-HVX*)، منجر به تولید قطعه دی.ان.ای به طول تقریبی ۷۰۰ جفت باز گردید. مقایسه توالی ژن پروتئین پوششی پنج جدایه ایرانی HVX با ۵۵ توالی موجود در بانک ژن حاکی از وجود درصد بالای یکنواختی (۹۸/۵ تا ۹۹/۵٪) در سطح توالی نوکلئوتیدی بین آنها بود. کمترین یکنواختی توالی (۹۸/۵ درصد) بین جدایه ایرانی HVX.Ir.TnK2 با جدایه AJ620114 از کره جنوبی تعیین گردید. این اولین گزارش از وقوع ویروس ایکس هوستا در ایران است و توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی HVX برای اولین بار در این تحقیق تعیین و مقایسه شد. واژه‌های کلیدی: RT-PCR، *Hosta virus X*، تبارزایی.

Coat protein sequence analysis of Iranian *Hosta virus X* (HVX) isolates

R. POURRAHIM✉ and SH. FARZADFAR

Department of Plant Virology Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

Abstract

During the spring of 2011, several symptomatic hosta plants *Hosta sieboldiana* with mosaic, mottling and leaf deformation were observed in commercial hosta propagation greenhouses and gardens in Karaj and Tonekabon regions in Iran. A total of 17 symptomatic samples were collected and tested for the presence of *Arabis mosaic virus-ArMV*, *Cucumber mosaic virus-CMV*, *Tomato spotted wilt virus-TSWV*, *Impatiens necrotic spot virus-INSV* and *Tomato ring spot virus-ToRSV* by DAS-ELISA method. None of the tested samples had positive reaction with any of the antibodies. Some of symptomatic samples induced necrotic local lesions on *Gomphrena globosa* indicator plant in mechanical inoculations without inducing any symptom on other inoculated plants. Samples were tested for *Hosta virus X* (HVX) infection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primers designed for coat protein (CP) gene in this study and a DNA fragment with the expected size about 700 bp was amplified. CP sequences of Iranian HVX isolates showed 98.5 – 99.5 % nucleotide identity with 55 other non-Iranian HVX isolates. This is the first report of HVX occurrence in Iran and CP nucleotide sequence of five Iranian HVX isolates was determined.

Key word: *Hosta virus X*, RT-PCR, Phylogenetic relationship.

✉ Corresponding author: pourrahim@yahoo.com

مقدمه

گیاه زینتی هوستا (*Hosta sieboldiana*) شامل مجموعه‌ای از گونه‌های متعلق به جنس *Hosta* از خانواده *Liliaceae* (اخیراً *Agavaceae*) می‌باشد، که به عنوان یک گیاه زینتی پوششی و چند ساله برای کاشت در باغ، پاسیو و گلدان در مناطق و اماکن نیمه سایه و کمی مرطوب در بسیاری از کشورها از جمله ایران مورد استفاده عموم قرار گرفته است. این جنس گیاهی، بومی جنوب شرق آسیا بوده و به نظر می‌رسد مناطق شرق چین و شبه جزیره کره خاستگاه آن باشد (Schmid, 1991). این گیاه در اواخر قرن هجدهم میلادی به اروپا و در اواسط قرن نوزدهم به قاره آمریکا منتقل و در آنجا کشت و پرورش داده شده است (Schmid, 1991). این گیاه دارای ریزوم (استولون) بوده و از طریق تقسیم بوته (ریزوم‌ها) تکثیر می‌شود. برگ‌های نیزه‌ای یا تخم‌مرغی شکل آن در گونه‌های اولیه سبز بوده ولی جهش‌های طبیعی موجب ایجاد انواعی با برگ‌های ابلق (سبز طلایی یا سفید) شده است. برخی ارقام آن پاکوتاه (تا ۱۵ سانتی‌متر) و برخی پابلند (تا ۶۰ سانتی‌متر) می‌باشند. تاریخچه کشت هوستا در ایران به حدود دو یا سه دهه قبل باز می‌گردد و از قدمت زیادی برخوردار نیست. عمدتاً دو نوع ابلق و غیر ابلق این گیاه در ایران رایج بوده و به عنوان یک گیاه زینتی پوششی و سایه دوست مورد استفاده می‌باشد (Anonymous, 2005).

تا کنون در دنیا آلودگی به ویروس موزائیک آرابیس (*Arabis mosaic virus-ArMV*)، ویروس ایکس هوستا (*Hosta virus X-HVX*)، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus-TSWV*)، ویروس لکه نکروز گل حنا (*Impatiens necrotic spot virus-INSV*) و ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی (*Tomato ring spot virus-ToRSV*) از گیاه زینتی هوستا گزارش شده است که در بین آن‌ها ویروس ایکس هوستا از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد (Currier and Lockhart, 1996). این ویروس اولین بار در کشور آمریکا از روی این گیاه شناسایی و گزارش شد

(Currier and Lockhart, 1996) و سپس از کشورهای کره جنوبی (Ryu et al. 2002)، هلند (Verhoeven et al. 2006)، لهستان (Cajza and Zielinska, 2007)، فرانسه (Jullien and Chauvel, 2007) و نیوزلند (Tang et al. 2012) گزارش گردید.

ویروس ایکس هوستا (HVX) متعلق به جنس *Potexvirus* از خانواده *Alphaflexiviridae* بوده و موجب بروز علائم موزائیک، پیسک، نکروز، بدشکلی برگ و در نهایت کاهش رشد در گیاه هوستا می‌گردد (Lockhart, 2002, Ryu et al. 2006). این ویروس در طبیعت فقط از روی گیاه هوستا گزارش شده و از طریق بذر، تماس مکانیکی و ازدیاد رویشی در این گیاه انتقال می‌یابد (Currier and Lockhart, 1996).

توالی کامل ژنومی این ویروس فقط در مورد یک جدایه از کره جنوبی (HVX-Kr) تعیین شده و طول آن حدود ۶۵۰۰ باز می‌باشد (شماره دسترسی رد بانک ژن AJ620114). سازمان ژنومی این ویروس مشابه سایر اعضای جنس *Potexvirus* متشکل از پنج قاب خواندنی باز می‌باشد. اولین قاب خواندنی باز از انتهای ۵ ژنوم، پروتئین آر.ان.ای پلیمرز وابسته به آر.ان.ای (RNA-dependent RNA polymerase) را رمز می‌نماید. در ادامه، سه قاب خواندنی باز که با یکدیگر دارای حالت همپوشانی می‌باشند، قرار دارند. این سه قاب، که اصطلاحاً بلوک سه ژنی نامیده می‌شوند، در انتقال سلول به سلول ویروس نقش دارند (Martelli et al. 2007). آخرین قاب خواندنی باز این ویروس در انتهای ۳ ژنوم، پروتئین پوششی ویروس (به وزن ۲۳ کیلو دالتون) را رمز می‌نماید. بررسی به عمل آمده روی ژن پروتئین پوششی ۳۰ جدایه HVX از ایالت تنسی آمریکا نشان‌دهنده وجود ۹۸/۳ تا ۱۰۰ و ۹۸/۲ تا ۱۰۰ درصد یکنواختی به ترتیب در توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای آن‌ها بود. مطالعه روی جدایه‌های آمریکایی و مقایسه آن‌ها با جدایه کره‌ای این ویروس نشان دهنده درصد بالای یکنواختی در بین آن‌ها بوده است (Fajolu et al. 2009).

در بهار ۱۳۹۰ تعدادی گیاه هوستا با علائم موزائیک، پیسک و بدشکلی برگ در شهرستان‌های کرج و تنکابن که از

استفاده شد (جدول یک). با استفاده از همردیفی دو توالی ژنومی HVX قابل دسترس در بانک ژن (رس شمار AY181252 و AJ620114) که در برگ‌برنده توالی ژن پروتئین پوششی و نیز توالی‌های پیرامونی آن بودند، دو آغازگر اختصاصی (Cp-F و Cp-R) توسط برنامه Primer select (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA; Burland, 2000) طراحی شد. این آغازگرها برای تکثیر قطعه‌ای به طول حدود ۷۰۰ جفت باز که دربرگیرنده توالی کامل ژن پروتئین پوششی این ویروس می‌باشد طراحی شد. ابتدا آر.ان.ای کل گیاه از نمونه‌های برگی جمع‌آوری شده، با استفاده از محلول تجاری TriReagent (سیگما-آمریکا) و طبق روش توصیه شده توسط شرکت سازنده استخراج گردید. کیفیت آر.ان.ای استخراجی با استفاده از تفکیک پنج میکرولیتر از آموده استخراج شده در ژل آگارز یک درصد در بافر تی.بی.ای مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. واکنش ساخت رشته اول cDNA در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. ابتدا ۴ میکرولیتر از آموده استخراج شده آر.ان.ای با یک میکرولیتر آغازگر پایین دست (Cp-R) به همراه ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل به یک میکروتیوب نیم میلی‌لیتری مخصوص پی.سی.آر افزوده شده و پس از ۵ دقیقه قرار گرفتن در ۷۰ درجه سلسیوس، بلافاصله به روی یخ منتقل شد. در ادامه به این واکنش، ۴ میکرولیتر بافر ۵x آنزیم آر.تی (فرمنتاس-لیتوانی)، نیم میکرولیتر RNasin (فرمنتاس-لیتوانی)، دو میکرولیتر مخلوط دی.ان.تی.پی (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر (معادل ۲۰۰ واحد) آنزیم رونوشت‌برداری برگردان (فرمنتاس-لیتوانی) و ۲/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شده و میکروتیوب به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر مدل مسترسایکلر (اپندورف-آلمان) قرار داده شد. مرحله پی.سی.آر در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. این واکنش شامل ۵ میکرولیتر از محصول cDNA مرحله آر.تی، ۵ میکرولیتر از بافر ۱۰x واکنش (سیناژن-ایران)، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر مخلوط

مراکز مهم تولید و تکثیر گیاهان زینتی متنوع باغی و آپارتمانی کشور می‌باشند، مشاهده شد. در تحقیق حاضر، ویروس ایکس هوستا در این گیاهان ردیابی و از آن‌ها جداسازی گردید. همچنین توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی پنج جدایه ایرانی HVX مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی

نمونه‌برداری: در بهار ۱۳۹۰ طی بازدید از مراکز تولید گیاهان زینتی در شهرستان‌های کرج و تنکابن، تعدادی بوته هوستا با علائم موزائیک، پیسک و بدشکلی برگ‌ها مشاهده شد (شکل ۱). تعداد ۱۷ بوته علائم‌دار (۶ و ۱۱ بوته بترتیب از کرج و تنکابن) در داخل گلدان‌های مستقل انتخاب شده و به گلخانه تحقیقاتی منتقل شد. گیاهان هوستا نمونه‌برداری شده همگی از نوع هوستا ابلق (*H. sieboldiana*) بودند.

ردیابی ویروس: نمونه‌های جمع‌آوری شده از نظر احتمال آلودگی به ویروس‌های مهم گزارش شده از هوستا شامل: ویروس موزائیک آراییس (ArMV)، ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus-CMV*)، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (TSWV)، ویروس لکه نکروز گل حنا (INSV) و ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی (ToRSV) با روش سرولوژیک داس الایزا (DAS-ELISA) و بکارگیری آنتی‌بادی اختصاصی ویروس‌های فوق (تهیه شده از شرکت بایوربا سوئیس) و طبق غلظت‌های توصیه شده توسط شرکت سازنده، مورد آزمون قرار گرفتند (Clark and Adams, 1977). نتایج واکنش الایزا، یک ساعت پس از افزودن سوبسترا در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه خوانش الایزا (الایزا ریدر) مدل Multiscan (فنلاند) خوانده شده و ثبت گردید.

با توجه به عدم دسترسی به آنتی‌بادی اختصاصی ویروس ایکس هوستا (HVX)، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به روش رونوشت برداری برگردان (آر.تی.پی.سی.آر) جهت ردیابی این ویروس استفاده شد. از توالی‌های مربوط به ویروس ایکس هوستا موجود در بانک ژن برای طراحی آغازگرها

گردید. عدم آلودگی این بوته‌ها به HVX، قبلاً با استفاده از روش آر.تی.پی.سی.آر مورد آزمون و تأیید قرار گرفته بود. این بوته‌ها در شرایط گلخانه با دمای 25 ± 5 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 60 ± 10 درصد به مدت سه ماه نگهداری شده و سپس آلودگی آنها به HVX با استفاده از روش آر.تی.پی.سی.آر مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین توالی قطعات تکثیر یافته: در مورد پنج جدایه

انتخاب شده بر اساس مناطق جغرافیایی بنام HVX-Ir.Kaj1, HVX-Ir.Tnk1, HVX-Ir.Tnk2, HVX-Ir.Tnk3 و HVX-Ir.Kaj2 (جداسازی شده از شهرستان‌های کرج (با علامت اختصاری Kaj) و تنکابن (با علامت اختصاری Tnk))، قطعات تکثیر یافته طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از کیت استخراج محصول پی.سی.آر (پرومگا، آمریکا)، از ژل آگارز جدا سازی شد. توالی این قطعات با استفاده از سرویس‌های تجاری، در دو جهت تعیین گردید. توالی‌های تعیین شده در مورد جدایه‌های ایرانی، با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1997) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information)، با یکدیگر و با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن (GenBank) مقایسه شدند. هم‌ردیفی توالی‌ها (multiple sequence alignment)، با استفاده از برنامه Thompson et al. 1997) CLUSTALX, Ver. 1.83 و یا CLUSTAL W (Madison, WI, USA; Thompson et al. 1997) انجام گردید (Thompson et al. 1997). مشخصات توالی‌های بکار رفته جهت مقایسه‌های ژنومی در جدول شماره یک ارائه شده است.

آنالیز نو ترکیبی و رسم درخت تبارزایی: توالی کامل

نوکلئوتیدی پروتئین پوششی ۵۵ جدایه ویروس ایکس هوستا به همراه پنج توالی ایرانی تعیین شده در این مطالعه برای بررسی تبارزایی و نو ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). هم‌ردیفی توالی‌های پروتئین پوششی با استفاده از برنامه CLUSTALX2 (Larkin et al. 2007) انجام گرفت. از

دی.ان.تی.پی (۱۰ میلی‌مولار)، ۲۰ پیکومول از هر یک از آغازگرهای بالا و پایین دست (Cp-F و Cp-R)، یک میکرولیتر (۵ واحد) آنزیم دی.ان.ای پلیمرز Taq (سیناژن-ایران) و ۳۴/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل افزوده شد. برنامه واکنش پی.سی.آر شامل ۹۵ درجه سلسیوس ۲ دقیقه، سپس سی چرخه (۹۵ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، ۵۳ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه) و در نهایت ۷۲ درجه سلسیوس ۱۰ دقیقه بود که توسط دستگاه ترمال-سایکلر مدل مسترسایکلر (اپندورف-آلمان) تأمین شد. محصول واکنش پی.سی.آر در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شده و قطعات تکثیری ژنوم بکمک رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ثبت ژل مدل ایماکو (هلند) مورد مشاهده قرار گرفتند.

مطالعه دامنه میزبانی و انتقال آلودگی: پنج بوته که بر

اساس نتایج آزمون پی.سی.آر، آلوده به HVX تشخیص داده شده بود، انتخاب و به عنوان منبع آلودگی در شرایط گلخانه نگهداری شدند. خالص سازی بیولوژیک جدایه‌ها با استفاده از حداقل سه نوبت انتقال تک لکه روی میزبان با واکنش لکه موضعی گل دکمه‌ای (*Gomphrena globosa*) و در مرحله آخر انتقال آن به میزبان سیستمیک *Nicotiana bentamiana* انجام گرفت. جهت عصاره‌گیری از بافر فسفات ۰/۱ مولار سرد با اسیدیته ۷/۲ و حاوی ۰/۱ درصد ۲-مرکاپتواتانول استفاده گردید. مطالعه دامنه میزبانی با استفاده از گیاهان محک شامل *Cucumis sativus*, *Ch. quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana tabacum*, *G. globosa*, *Datura stramonium*, *N. bentamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, cv. Samsun و *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris* انجام شد. همچنین به منظور بررسی امکان انتقال ویروس از طریق وسایل هرس، قیچی باغبانی به عصاره تهیه شده از دو جدایه HVX-Ir.Kaj2 و HVX-Ir.Tnk1 (به ترتیب از شهرستان کرج و تنکابن) آغشته شده و با استفاده از آن پنج زخم در تنه بوته‌های جوان هوستا (سه بوته برای هر جدایه) و در مرحله رشد ایجاد

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های ویروس ایکس هوستا که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند

Table 1. Characteristics of *Hosta virus X* isolates used in this study for phylogenetic analysis

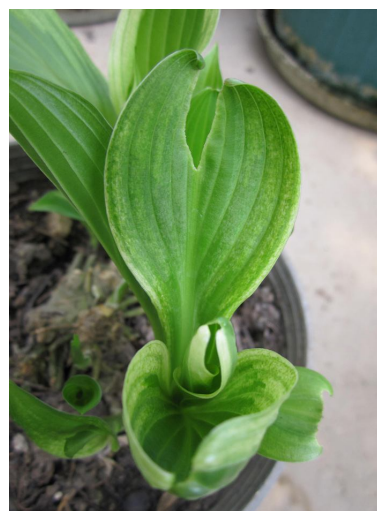
کشور Country	میزبان Host	جدایه/استرین Isolate/Strain	شماره دسترسی Acc. No.
New Zealand	<i>Hosta</i> sp. cv. Thomas Hogg	NZ	JF732917
Chez Rep.	<i>Hosta</i> sp.	HVXCR6	JF301953
Chez Rep.	<i>Hosta</i> sp.	HVXCR4	JF301951
Chez Rep.	<i>Hosta</i> sp.	HVXCR2	JF301949
Chez Rep.	<i>Hosta</i> sp.	HVXCR7	JF301954
Chez Rep.	<i>Hosta</i> sp.	HVXCR5	JF301952
Chez Rep.	<i>Hosta</i> sp.	HVXCR3	JF301950
Chez Rep.	<i>Hosta</i> sp.	HVXCR1	JF301948
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnSm1	FJ903415
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMp5	FJ903413
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMp7	FJ903411
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnJa13	FJ903409
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnJa16	FJ903407
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnJa11	FJ903405
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnFr2	FJ903403
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnNa8	FJ903401
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMt6	FJ903399
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMf5	FJ903397
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnGn3	FJ903395
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnKn14	FJ903393
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMf10	FJ903391
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnNa1	FJ903389
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnKn2	FJ903387
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMp9	FJ903414
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMp4	FJ903412
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnJa14	FJ903410
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMp2	FJ903408
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMp3	FJ903406
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMp1	FJ903404
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnNa9	FJ903402
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnFr4	FJ903400
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnNa5	FJ903398
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnMt5	FJ903396
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnKn16	FJ903394
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnFr3	FJ903392
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnNa6	FJ903390
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnJa7	FJ903388
USA/Tennessee	<i>Hosta</i> sp.	TnJn-1	FJ903386
South Korea	-	-	AJ620114
Netherlands	<i>Hosta</i> sp. cv. Sum and Substance	210F	FJ821702
Netherlands	<i>Hosta</i> sp. cv. Sum and Substance	210H2	FJ821705
Netherlands	<i>Hosta</i> sp. cv. Sum it Up	210H	FJ821703
Netherlands	<i>Hosta</i> sp. cv. Vim and Vigor	210G	FJ821704
USA/Ohio	<i>Hosta</i> sp. cv. Sum and Substance	HVX-39	FJ403389
USA/Ohio	<i>Hosta</i> sp. cv. Sum and Substance	HVX-37	FJ403387
USA/Ohio	<i>Hosta</i> sp. cv. Striptease	HVX-35	FJ403385
USA/Ohio	<i>Hosta</i> sp. cv. Sugar and Cream	HVX-20	FJ403383
USA/Ohio	<i>Hosta</i> sp. cv. Gold Standard	HVX-2	FJ403381
USA/Ohio	<i>Hosta</i> sp. cv. Sum and Substance	HVX-38	FJ403388
USA/Ohio	<i>Hosta</i> sp. cv. Sum and Substance	HVX-36	FJ403386
USA/Ohio	<i>Hosta</i> sp. cv. Sugar and Cream	HVX-25	FJ403384
USA/Ohio	<i>Hosta</i> sp. cv. fortunei 'Antioch	HVX-11	FJ403382
USA/Ohio	<i>Hosta</i> sp.'Gold Standard'	HVX-1	FJ403380
South Korea	-	HVX-Kr	NC-011544
USA/Minnesota	-	HVX-U	AJ517352

آنجا که در نتیجه هم‌ردیفی فواصل ایجاد شده سه تایی نبودند، بنابراین توالی آمینواسیدی مطابق با توالی نوکلئوتیدی پس از هم‌ردیفی با برنامه CLUSTALX2 با برنامه TRANSTable (Weiller, 1998) ALIGN مورد استفاده قرار گرفت تا حذف فواصل نوکلئوتیدی در برنامه CLUSTALX2 مطابق با سه نوکلئوتید انجام گیرد. برای بررسی نوترکیبی از برنامه‌های موجود در نرم افزار RDP3 نسخه 3.44b (Martin et al. 2010) شامل RDP، MAXCHI، BOOTSCAN، GENECONV و CHIMAERA و SISCAN استفاده شد. این بررسی با استفاده از تنظیمات پیش فرض هر یک برنامه‌های موجود و درجه اطمینان ۹۵ و ۹۹ درصد انجام گرفت. نتایج بدست آمده از این بررسی مجدداً با استفاده از دو برنامه PHYLPRO (Weiller, 1998) و نیز SISCAN version 2 مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های نوترکیب از تمامی بررسی‌های بعدی حذف گردیدند. برای رسم درخت تبارزایی از روش Neighbor joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) موجود در برنامه MEGA 5 (Tamura et al. 2011) با ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap) استفاده گردید. شاخه‌هایی که bootstrap آنها کمتر از ۵۰ درصد بود، حذف گردیدند. در ترسیم درخت تبارزایی از توالی ژن پروتئین پوششی ویروس ایکس کاکتوس (*Cactus virus X-CVX*; NC_002815) و ویروس موزائیک گل مرواریدی (*Alternanthera mosaic virus-AltMV*; NC_007731) به عنوان عضو برون گروه استفاده گردید.

نتیجه و بحث:

آلودگی نمونه‌ها: بر اساس نتایج حاصل از آزمون الایزا، از تعداد ۱۷ نمونه برگ‌گی هوستا علائم‌دار مورد بررسی، هیچیک با آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس‌های ArMV، CMV، INSV، TSWV و ToRSV واکنش نشان ندادند. علائم پیسک و موزائیک در اوایل فصل رشد از شدت بیشتری برخوردار بوده ولی با گذشت زمان و در تابستان از شدت آنها کاسته شده و علائم غالباً بصورت پیسک مشاهده گردید.

مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آزمون آر.تی.پی.سی.آر، از تعداد سه بوته مورد آزمون برای هر یک از دو جدایه Ir-Kaj2 و Ir-Tnk1، به ترتیب یک و دو بوته به ویروس آلوده شده بودند. آزمون این گیاهان پس از حدود ۴/۵ ماه نیز همین نتایج را بدنبال داشت. در این مدت هیچ علائمی از موزائیک، پیسک یا بدشکلی برگ در این گیاهان ظاهر نشد. در برگ‌های جدید حاصل از شروع رشد در آغاز فصل رویشی جدید (بهار ۱۳۹۱)، این بوته‌ها علائم کاهش رشد، سبزدی و پیسک نشان دادند (شکل ۳).



شکل ۱- گیاهان هوستا با علائم پیسک و بدشکلی برگ

Fig. 1. Hosta plants showing mottle and leaf deformation



شکل ۳- بوته هوستا آلوده به ویروس HVX با علائم کاهش رشد، سبزدی و پیسک ملایم (راست) در مقایسه با گیاه فاقد آلودگی (چپ)

Fig 3. Hosta plants infected with HVX showing reduced growth, chlorosis and mild mottling (right) and healthy plants (left)

بر اساس نتایج حاصل از آزمون آر.تی.پی.سی.آر، از تعداد ۱۷ نمونه مورد آزمون با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ویروس، ۱۴ نمونه (۶ و ۸ نمونه به ترتیب از شهرستان کرج و تنکابن) دارای واکنش مثبت بوده و در آن‌ها قطعه دی.ان.ای به طول مورد انتظار حدود ۷۰۰ جفت باز تکثیر گردید (شکل ۴). تکثیر چنین قطعه‌ای در مورد سایر نمونه‌ها مشاهده نشد.

تعیین توالی و آنالیز نوترکیبی: طول کامل توالی ژن

پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی ویروس ایکس هوستا ۶۶۳ نوکلئوتید بود که یک پروتئین فرضی بطول ۲۲۰ آمینواسید را کد می‌نماید. با استفاده از برنامه‌های موجود در نرم‌افزار RDP3 و نیز دو برنامه PHYLPRO و SISCAN احتمال نوترکیبی در جمعیت ویروس هوستا مورد بررسی قرار گرفت.

در مایه‌زنی مکانیکی، سه تا پنج روز پس از مایه‌زنی در گیاه *G. globosa* لکه‌های نکروزه و در گیاه *D. stramonium* لکه‌های سبزرده ریز تولید گردید (شکل ۲). همچنین سه تا چهار هفته پس از مایه‌زنی علائم پیسک ملایم در *N. bentamiana* ظاهر شد که بررسی این گیاهان به روش آر.تی.پی.سی.آر نشان دهنده آلودگی آن‌ها به HVX بود. در دیگر گیاهان مایه‌زنی شده علائمی ظاهر نشد و عدم آلودگی این گیاهان به HVX به روش آر.تی.پی.سی.آر تأیید گردید.



شکل ۲- ظهور لکه‌های نکروزه در گیاه *G. globosa* (سمت راست)

و لکه‌های سبزرده در *D. stramonium* مایه‌زنی شده با جدایه ایرانی HVX

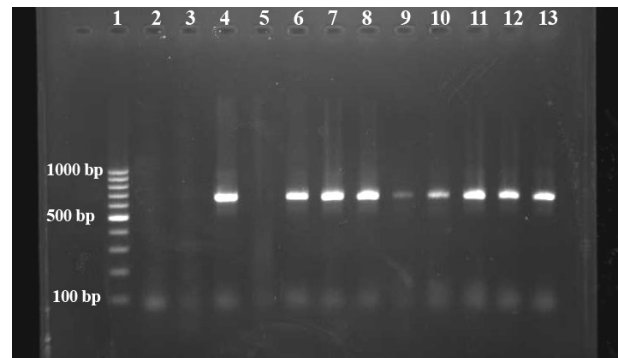
Fig 2. Necrotic and chlorotic local lesions on *G. globosa* and *D. stramonium*, respectively, after mechanical inoculation with an Iranian isolate of HVX

در آزمون دیگری، در مورد دو جدایه Ir-Kaj2 و Ir-Tnk1، احتمال انتقال آلودگی ویروس از طریق قیچی باغبانی آلوده،

جدایه‌های این ویروس بود. یکنواختی توالی در جدایه‌های ایرانی بین ۹۹/۰ تا ۱۰۰/۰ درصد متفاوت بود. همچنین کمترین یکنواختی توالی (۹۸/۵ درصد) بین جدایه ایرانی HVX.Ir.TnK2 با جدایه AJ620114 از کره جنوبی تعیین گردید (جدول ۲).

درخت تبارزایی با استفاده از روش NJ و ۱۰۰۰ بار تکرار (bootstarp) رسم گردید. آنالیز درخت تبارزایی با استفاده از توالی ژن پروتئین پوششی نشان دهنده وجود یک گروه مونوفلیتیک بود. در درخت تبارزایی رسم شده، جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق با جدایه‌های ویروس ایکس هوستا از هلند در کنار هم قرار گرفتند (شکل ۵).

هوستا از جمله گیاهان زینتی مورد توجه در بسیاری از کشورهای دنیا از جمله ایران می‌باشد. در این بررسی احتمال آلودگی گیاهان هوستای علائم‌دار جمع‌آوری شده از دو استان البرز و مازندران با HVX مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق ۱۷ نمونه علائم دار گیاه زینتی هوستا در آزمون آر.تی.پی.سی.آر مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این آزمون با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی منجر به تکثیر قطعه دی.ان.ای مورد انتظار به وزن ۷۰۰ جفت باز در ۱۴ نمونه (شامل ۶ و ۸ نمونه به ترتیب از شهرستان‌های کرج و تنکابن) گردید. آزمون بیولوژیکی این نمونه‌ها با استفاده از مایه‌زنی مکانیکی روی تعدادی از گیاهان محک منجر به ایجاد علائم لکه موضعی در گل دکمه‌ای و دانوره گردید ولی در توتون *N. bentamiana* علائم سیستمیک پیسک ملایم سه تا چهار هفته پس از مایه‌زنی ظاهر گردید. آلودگی گیاهان توتون علائم‌دار به HVX با استفاده از آزمون آر.تی.پی.سی.آر مورد تأیید قرار گرفت. تعیین توالی قطعات دی.ان.ای حاصل از آزمون آر.تی.پی.سی.آر و استفاده از ابزار جستجوی BLASTn قابل دسترسی در GenBank نشان دهنده وجود ۹۹ درصد مشابهت بین توالی‌های بدست آمده با توالی‌های گزارش شده در مورد ویروس ایکس هوستا بود که این موضوع تأیید کننده ماهیت HVX جدایه‌های ویروسی مورد بررسی می‌باشد.

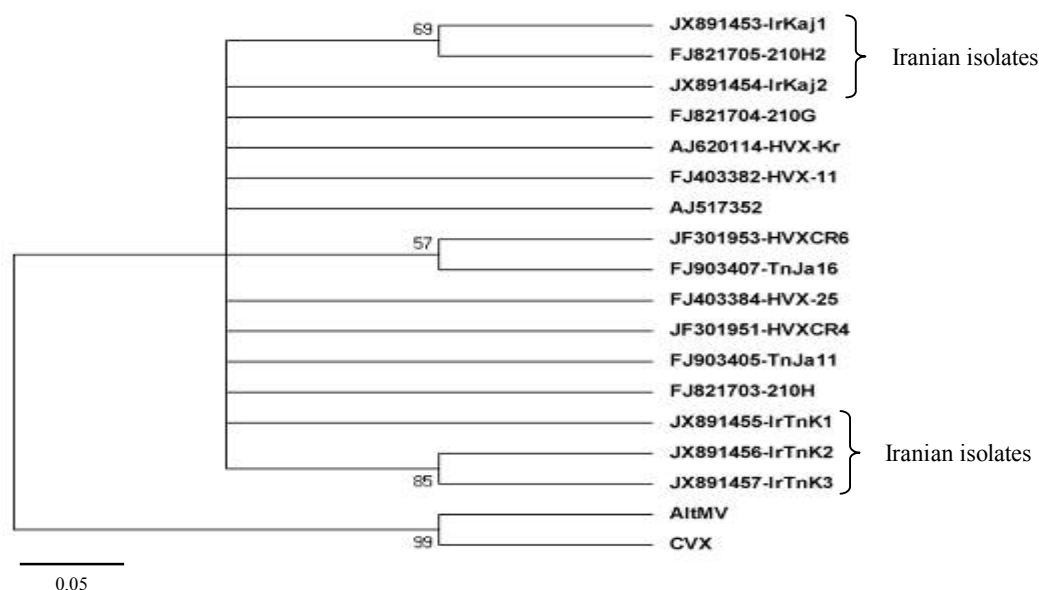


شکل ۴- نتیجه الکتروفورز محصول واکنش آر.تی.پی.سی.آر در ژل آگارز یک درصد. از سمت چپ به راست به ترتیب ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی، ستون‌های ۲ و ۳: شاهد منفی، ستون‌های ۴ و ۶ تا ۱۳: نمونه‌های دارای واکنش مثبت که منجر به تکثیر قطعه دی.ان.ای با اندازه مورد انتظار ۷۰۰ جفت باز شده است، ستون ۵: نمونه با واکنش منفی

Fig 4. Results of the electrophoresis of RT-PCR products in 1% agarose gel. Columns 1: 100 bp molecular weight marker; 2 & 3: negative controls; 4 & 6-13: hosta samples with positive reaction resulted to amplification of a DNA fragment with the expected size about 700 bp; 5: hosta sample with negative reaction

برای بررسی مدارک و شواهد از نوترکیبی نه تنها در کل موقعیت‌های نوکلئوتیدی، بلکه در موقعیت‌های مترادف (synonymous) و غیر مترادف (nonsynonymous) به طور جداگانه مورد استفاده قرار گرفت. این بررسی پیچیده برای پیدا کردن همه موقعیت‌های نوترکیبی و نیز به منظور کاهش احتمال به دست آوردن شواهد نادرست از نوترکیبی انجام گرفت. در نهایت، هیچ موقعیت نوترکیبی با احتمال $(p < 1 \times 10^{-6})$ در توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی این ویروس مشخص نشد.

وضعیت تبارزایی جدایه‌های ایرانی HVX: در این تحقیق پنج جدایه ایرانی HVX شامل دو جدایه از شهرستان کرج و سه جدایه از شهرستان تنکابن انتخاب شده و توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژن پروتئین پوششی آن‌ها تعیین و از نظر درصد یکنواختی با توالی‌های متناظر مربوط به ۱۲ جدایه خارجی مورد مقایسه قرار گرفت. این نتایج نشان دهنده یکنواختی بالای توالی نوکلئوتیدی (۹۸/۵ تا ۱۰۰/۰) در بین



شکل ۵- درخت تبارزایی مربوط به پروتئین پوششی ویروس ایکس هوستا که با روش Neighbor joining (NJ) و ۱۰۰۰ مرتبه bootstrap بدست آمده است. شاخه‌های با bootstrap کمتر از ۵۰ حذف شده‌اند. در این درخت از دو ویروس ایکس کاکتوس (CVX) و موزائیک گل مرواریدی (AltMV) به عنوان عضو برون گروه استفاده شده است

Fig. 5. Phylogenetic tree of some available coat protein sequences of Hosta virus X using neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates. The phylogenetic tree was edited to collapse nodes with bootstrap value less than 50%. Sequences of *Cactus virus X* and *Alternanthera mosaic virus* were used as the outgroup.

جدول ۲- درصد یکنواختی توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی بین جدایه‌های ایرانی و برخی از جدایه‌های ویروس ایکس هوستا

Table 2. Nucleotide identity of coat protein between Iranian and some other *Hosta virus X* isolates

	Ir.TnK1	Ir.Kaj1	Ir.TnK2	Ir.Kaj2	Ir.TnK3	FJ821702	FJ821703	FJ821704	FJ821705	F301951	F301953	FJ903405	FJ903407	FJ403382	FJ403384	AJ620114	AJ517352
Ir.TnK1	0.0	99.2	99.8	99.2	100.0	99.7	99.5	99.3	99.2	99.2	99.0	99.2	99.8	99.2	99.0	98.7	98.8
Ir.Kaj1		0.0	99.0	100.0	99.2	98.8	99.3	99.8	99.2	99.3	99.2	99.3	99.0	99.3	99.2	99.2	99.0
Ir.TnK2			0.0	99.0	99.8	99.8	99.7	99.2	99.0	99.3	99.2	99.3	99.0	99.0	99.2	98.5	99.0
Ir.Kaj2				0.0	99.2	98.8	99.3	99.8	99.2	99.3	99.2	99.3	99.0	99.3	99.2	99.2	99.0
Ir.TnK3					0.0	99.7	99.5	99.3	99.2	99.2	99.0	99.2	98.8	99.2	99.0	98.7	98.8
FJ821702						0.0	99.5	99.3	98.8	99.5	99.3	99.5	99.2	99.2	99.3	98.7	99.2
FJ821703							0.0	99.5	99.3	99.7	99.5	99.7	99.3	99.3	99.5	98.8	99.3
FJ821704								0.0	99.8	99.5	99.3	99.5	99.2	99.5	99.3	99.3	99.2
FJ821705									0.0	99.3	99.2	99.3	99.0	99.3	99.2	99.2	99.0
JF301951										0.0	99.8	100.0	99.7	99.7	99.8	99.2	99.7
JF301953											0.0	99.8	99.8	99.5	99.7	99.0	99.5
FJ903405												0.0	99.7	99.7	99.8	99.2	99.7
FJ903407													0.0	99.3	99.5	99.2	99.3
FJ403382														0.0	99.5	99.2	99.3
FJ403384															0.0	99.0	99.5
AJ620114																0.0	98.8
AJ517352																	0.0

Ir.TnK1 تا Ir.TnK3 و Ir.Kaj1 و Ir.Kaj2 (جدایه‌های ایرانی تعیین توالی شده در این بررسی)، FJ821702 تا FJ821705 جدایه‌های هلندی، JF301951 و JF301953 دو جدایه مربوط به جمهوری چک، FJ903405 و FJ903407 دو جدایه از ایالت تنسی - آمریکا، FJ403382 و FJ403384 از اوهایو - آمریکا، جدایه AJ517352 از مینه سوتا - آمریکا و AJ620114 جدایه ویروس ایکس هوستا از کره جنوبی.

همچنین بر اساس نتایج حاصل از آزمون الایزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس‌های CMV، ArMV، واکشن مثبتی نشان نداده و ویروس‌های یاد شده در آنها

هیچیک از نمونه‌های مورد بررسی ToRSV و TSWV، INSV، واکشن مثبتی نشان نداده و ویروس‌های یاد شده در آنها

HVX در دنیا صورت گرفته است. بررسی توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژن پروتئین پوششی ۴۰ جدایه آمریکایی به همراه چند جدایه اروپایی و کره‌ای این ویروس نشان دهنده وجود به ترتیب ۹۸/۳ تا ۱۰۰ و ۹۸/۲ تا ۱۰۰ درصد یکنواختی در بین آن‌ها بوده است (Fajolu et al. 2009). نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که ژن پروتئین پوششی ۵ جدایه ایرانی مورد بررسی دارای ۹۸/۵ تا ۱۰۰/۰ درصد یکنواختی در سطح توالی نوکلئوتیدی در بین خود می‌باشند (جدول ۲). همچنین مقایسه توالی ژن CP پنج جدایه ایرانی HVX با جدایه‌های خارجی این ویروس حاکی از وجود درصد بالای یکنواختی (۹۸/۵ تا ۹۹/۵) در سطح توالی نوکلئوتیدی بین آن‌ها بود. وجود درصد بالای یکنواختی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن CP بین جدایه‌های متفاوت HVX این نظریه را که تمام جدایه‌های فوق از یک جد مشترک منشا گرفته‌اند، تأیید می‌نماید (Fajolu et al. 2009). با توجه به عدم یافتن مستندات قوی مبنی بر وقوع نوترکیبی در ناحیه ژن پروتئین پوششی این ویروس، به نظر می‌رسد که تکامل HVX کند می‌باشد (نتایج نشان داده نشده است). این موضوع قبلاً در مورد ویروس ایکس سیب زمینی (*Potato virus X-PVX*) (Malcuit et al. 2000) و برخی از ویروس‌های دیگر مانند (*Tobacco mild green mosaic virus- TMGMV*) نیز نشان داده شده است که طی ۱۰۰ سال گذشته تفاوت نوکلئوتیدی کمی را نشان داده‌اند (Fraile et al. 1997). از آنجا که برای این ویروس‌ها ناقلی شناخته نشده و تنها با روش مکانیکی انتقال می‌یابند، بنابراین برای ایجاد آلودگی و انتشار در طبیعت باید از موانع زیادی عبور کنند (Yu et al. 2010). به همین دلیل به نظر می‌رسد که نرخ تنوع در این ویروس‌ها در مقایسه با ویروس‌های منتقل شونده با حشرات از جمله شته‌ها کمتر باشد (Cox and Jones, 2010). این اولین گزارش از وقوع ویروس ایکس هوستا در گیاهان هوستا در ایران بوده و توالی نوکلئوتیدی ژن CP پنج جدایه ایرانی HVX برای اولین بار در این تحقیق تعیین و مورد مقایسه قرار گرفته است.

ردیابی نگردید. نتایج حاصل از مایه‌زنی مکانیکی عصاره بدست آمده از نمونه‌های برگ هوستا با علائم موزائیک و پیسک روی گیاهان محک نیز مؤید نتایج حاصل از روش سرولوژیک الایزا بود. مجموع این نتایج تأیید کننده آلودگی گیاهان هوستای علائم‌دار مورد بررسی در این تحقیق به ویروس ایکس هوستا است. این اولین گزارش از وقوع آلودگی به HVX در ایران می‌باشد.

بررسی احتمال انتقال HVX از طریق وسایل باغبانی آلوده مانند چاقوی باغبانی، تأیید نمود که استفاده از چاقوی آلوده به عصاره گیاهان مبتلا به این ویروس در هرس و برش برگ و ریشه این گیاهان، بخوبی موجب انتقال آلودگی و پیروسی می‌گردد. با توجه به اینکه برش ریشه و تقسیم آن یکی از روش‌های اصلی ازدیاد هوستا می‌باشد، توجه به این موضوع در مدیریت این بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. به علاوه نتایج این بررسی نشان داد که بوته‌های تلقیح شده با این روش، در همان فصل رویشی غالباً علائم مشخصی ایجاد نموده و در شروع فصل رویشی جدید، علائم موزائیک و پیسک ناشی از آلودگی را از خود بروز دادند. این موضوع در شیوع و انتشار این ویروس نقش مهمی داشته و ضرورت استفاده از روش‌های آزمایشگاهی در ردیابی آلودگی به این ویروس را به ویژه در واحدهای عمده تولید و تکثیر این گیاه زینتی تأیید می‌نماید. وجود دوره تأخیری طولانی بین زمان آلوده شدن به ویروس و زمان بروز علائم بیماری، در مورد برخی بیماری‌های ویروسی در دیگر گیاهان نیز گزارش شده است (Hull, 2002). همچنین طول این دوره علاوه بر شرایط محیطی، به غلظت اولیه ویروس بکار رفته به عنوان منبع آلودگی نیز بستگی دارد (Brakke, 1970). از آنجا که اطلاعات دقیقی در مورد انواع ارقام گیاه زینتی هوستا در ایران وجود ندارد، کسب اطلاعات دقیق در مورد واکنش این ارقام در برابر آلودگی به HVX از نظر نوع علائم و زمان بروز آن‌ها در شرایط اقلیمی متفاوت مستلزم بررسی‌های بیشتر می‌باشد. تاکنون تحقیقات محدودی در خصوص تنوع جدایه‌های

References

- ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHAFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER and D. J. LIPMAN, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- ANONYMOUS, 2005. Cover plants. Tehran Parks and Green Spaces Organization Publications, 198 pp.
- BRAKKE, M. K. 1970. Systemic infections for the assay of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 8: 61-84.
- BURLAND, T. G. 2000. DNASTAR's lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology* 32: 71-91.
- CAJZA, M. and L. ZIELINSKA, 2007. *Hosta virus X*- a new pathogen of ornamental plants in Poland [Polish]. *Programme Plant Protection* 47: 69-72.
- CLARK, M. F. and A. N. ADAMS, 1997. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-83.
- COX, A. B. and R. C. JONES, 2010. Genetic variability in the coat protein gene of *Potato virus X* and the current relationship between phylogenetic placement and resistance grouping. *Archives of Virology* 155: 1346-1356.
- CURRIER, S. and B. E. L. LOCKHART, 1996. Characterization of a *Potexvirus* infecting *Hosta* spp. *Plant Disease* 80: 1040-1043.
- FAJOLU, O. L., R. H. WEN, A. S. WINDHAM, M. T. WINDHAM, J. K. MOULTON and M. R. HAJIMORAD, 2009. Genetic variability and phylogenetic analysis of *Hosta virus X*. *Archives of Virology* 154: 1909-1916.
- FRAILE, A., F. ESCRUI, M. A. ARANDA, J. M. MALPICA, A. J. GIBBS and F. GARCÍA-ARENAL, 1997. A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *Journal of Virology* 71: 8316-8320.
- HULL, R. 2002. *Matthews' plant virology*. 1001 p. Academic press, London, UK.
- JULLIEN, J. and G. CHAUVEL, 2007. Phytosanitary situation for production of flowering and foliage plants [French]. *P.H.M. Revue Horticole*, 491: 34-39.
- LARKIN, M. A., G. BLACKSHIELDS, N. P. BROWN, R. CHENNA, P. A. MCGETTIGAN, H. MCWILLIAM, F. VALENTIN, I. M. WALLACE, A. WILM, R. LOPEZ, J. D. THOMPSON, T. G. GIBSON, and D. G. HIGGHINS. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- LOCKHART, B. E. L. 2002. Different response of *Hosta* cultivars to infection by *Hosta virus X* Potexvirus-a basis for practical disease management. *Acta Horticulture* 568: 69-72.
- MALCUIT, I., W. JONG, D. C. BAULCOMBE, D. C. SHIELDS and T. A. KAVANAGH, 2000. Acquisition of multiple virulence/avirulence determinants by *Potato virus X* (PVX) has occurred through convergent evolution rather than through recombination. *Virus Genes* 20: 165-172.
- MARTELLI, G. P., M. J. ADAMS, J. F. KREUZE and V. V. DOLJA, 2007. Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology* 45: 73-100.
- MARTIN, D. P., P. LEMEY, M. LOTT, V. MOULTON and D. POSADA, 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26: 2462-2463.
- RYU, K. H., M. H. PARK and J. S. LEE, 2002. Occurrence of mosaic disease of *Hosta* plants caused by *Hosta virus X*. *Plant Pathology Journal* 18: 313-316.
- RYU, K. H., M. H. PARK, M. Y. LEE and J. S. LEE, 2006. Characterization and seed transmission of *Hosta virus X* isolated from *Hosta* plants. *Acta Horticulture* 722: 91-93.
- SAITOU, N. and M. NEI, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- SCHMID, W. G. 1991. *The genus Hosta*. Timber Press, Portland, USA, 428 pp.
- TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI and S. KUMAR, 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using

- Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- TANG, J., C. HARDY, B. S. M. LEBAS and L. I. WARD. 2012. Presence of *Hosta virus X* in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes*, DOI 10.1007/s13314-012-0042-1.
- THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN and D. G. HIGGINS, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.
- VERHOEVEN, J. TH. J., E. T. M. MEEKES and J. W. ROENHORST, 2006. Threatening viral problems for the ornamental flowers sector [Dutch]. *Gewasbescherming*, 37: 188-193.
- Weiller, G. F. 1998. Phylogenetic profiles: a graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences. *Molecular Biology and Evolution* 15: 326–335.
- YU, X. Q., J. L. JIA, C. L. ZHANG, X. D. LI and Y. J. WANG, 2010. Phylogenetic analyses of an isolate obtained from potato in 1985 revealed *Potato virus X* was introduced to China via multiple events. *Virus Genes*, 40:447-451.