

ردیابی و بررسی روابط تبارزایی جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک انجیر بر اساس ژن کد کننده نوکلئوکپسید پروتئین

مرتضی شاه میرزائی^۱، فرشاد رخشنده‌رو^۱، محمدرضا صفرنژاد^۲✉، حمیدرضا زمانی‌زاده^۱ و توفیق البیانو^۳

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و استاد، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران،

ایران؛ ۲- دانشیار، بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و

ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛ ۳- پژوهشگر، مرکز بین المللی مطالعات پیشرفته زراعی حوزه مدیترانه، باری، ایتالیا

(تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶)

چکیده

ویروس موزائیک انجیر (*Fig mosaic emaravirus* (FMV) یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده بیماری موزائیک انجیر می باشد. این تحقیق به منظور شناسایی و ردیابی FMV در مناطق مختلف کشور و همچنین مطالعه روابط تبارزایی بر مبنای ژن کد کننده پروتئین نوکلئوکپسید (NP) صورت پذیرفت. برای این منظور تعداد ۵۴ نمونه برگ انجیر دارای علائم موزائیکی و کلروز از مناطق مختلف کشت انجیر در شمال، مرکز و جنوب ایران جمع آوری گردید. ردیابی اولیه از طریق آزمون الیزا با استفاده از آنتی بادی اختصاصی ویروس FMV انجام گرفت. آزمون RT-PCR به منظور تأیید نتایج ردیابی اولیه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن (NP) صورت پذیرفت. همسانه سازی، تعیین توالی نوکلئوتیدی و رسم درخت تبارزایی ۱۴ جدایه منتخب از مناطق جغرافیایی مختلف انجام گرفت. نتایج ردیابی سرولوژیکی و آزمون مولکولی حاکی از میزان ۵۵/۵٪ آلودگی در نمونه های مورد بررسی بود. نتایج مطالعات تبارزایی نشان داد که تمامی جدایه های مربوط به مناطق شمال و مرکز کشور به همراه جدایه های گزارش شده از سایر کشورها در گروه I قرار می گیرند در حالی که جدایه های استان فارس (استهبان و جهرم) در یک گروه تبارزایی جدا، گروه II، دسته بندی شدند. نتایج حاصله حاکی از وجود ارتباط معنی داری بین شدت علائم و گروه بندی تبارزایی می باشد. جدایه جهرم، JA2، از گروه II با داشتن بیشترین میزان تفاوت با سایر جدایه های کشور و دنیا، بنظر می رسد که دارای خصوصیات بیماری زایی و بیولوژیکی منحصر بفردی باشد که تعیین این خصوصیات در مطالعات تکمیلی ضروری می باشد.

واژه‌های کلیدی: تبارزایی، نوکلئوکپسید پروتئین، ویروس موزائیک انجیر، DAS-ELISA، RT-PCR.

Detection and phylogenetic analysis of Iranian *Fig mosaic emaravirus* isolates on the basis of the gene encoding Nucleocapsid protein (NP)

M. SHAHMIRZAEI¹, F. RAKHSHANDEHROO¹, M. R. SAFARNEJAD²✉, H. R. ZAMANIZADEH¹ and T. ELBEAINO³

1-PhD. Student, Assistant Professor & Professor, Respectively; Department of Plant Pathology, Science and Research Branch,

Islamic Azad University, Tehran, Iran; 2- Associate Professor, Department of Plant viruses, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran;

3- Research Scientist Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Via Ceglie 9, 70010 Valenzano (BA), Italy

Abstract

Fig mosaic emaravirus (FMV) is considered as one of the main causal agents of Fig Mosaic Disease complex (FMD). In order to detection and identification of FMV in different regions of Iran and better understanding of the phylogenetic relationships between isolates, a number of 54 symptomatic fig leaves with chlorosis and mosaic symptoms were collected from different fig-growing areas in the center, north and south of Iran. Primary detection for all collected samples performed by DAS-ELISA using polyclonal AP-conjugated antibody which was raised against nucleocapsid protein of FMV positive samples in DAS-ELISA were checked by RT-PCR using NP gene specific primers. The amplified fragments of 14 isolates were cloned and sequenced. DAS-ELISA results indicated to a 55.5% FMV infection of collected isolates. Phylogenetic analysis on the basis of nucleotide sequences categorized the isolates in two main groups in which isolates from the center and northern regions of Iran placed in a separate subgroup beside other isolates from other countries which their complete coding sequences were available in GenBank of NCBI whereas the isolates from south of Fars province (Estahban and Jahrum districts) clustered in a separate phylogenetic group distinct from other Iranian and the world isolates which may show that genetic makeup of FMV may be affected by geographical isolation. A significant correlation between symptoms severity and phylogenetic groups observed that may put forward the probability of having a new viral strains in Fars province

Key words: DAS-ELISA, *Fig mosaic emaravirus* (FMV), Nucleocapsid protein, Phylogenetic analysis, RT-PCR.

مقدمه

گیاه انجیر (*Ficus carica* L.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان بومی ایران بوده که در برخی مناطق جهان از جمله خاورمیانه می‌روید. این گیاه به جهت ارزش غذایی و دارویی بسیار زیاد آن از دیرباز در بسیاری از فرهنگ‌ها و کشورها مورد توجه بوده است. گیاه انجیر می‌تواند در شرایط مختلف آب و هوایی از جمله در مناطق خشک و نیمه خشک رشد و پرورش یابد (Stover *et al.*, 2007). بر اساس آمارنامه منتشر شده سازمان خواروبار جهانی ملل متحد FAO در سال ۲۰۱۶ ایران با تولید سالانه ۷۰۱۷۸ تن مقام چهارم را در بین کشورهای تولید کننده انجیر به خود اختصاص داده است و استان فارس با تولید ۳۶۰۶۱ تن انجیر در سال به دو صورت آبی و دیم بیشترین سهم تولید انجیر را به خود اختصاص داده است (Anonymous, 2015; Anonymous, 2016). یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی در انجیر، بیماری موزائیک انجیر Fig mosaic Disease (FMD) می‌باشد که امروزه در بیشتر کشورهای انجیر در آنها کشت می‌شود گسترش یافته است (Blodgett and Gomec, 1967). این بیماری اولین بار از ساحل غربی کالیفرنیا در آمریکا توسط Condit and Horne (1933) گزارش گردید. علائم در این بیماری گسترده و متنوع بوده و درختان آلوده الگوی خاصی از رنگ پریدگی اندام‌های هوایی شامل علائم موزائیکی و پیسه‌ای و همچنین بدشکلی برگ‌ها و وجود لکه‌های نکروز روی برگ‌ها و میوه‌ها به همراه ریزش پیش از موعد میوه‌ها را نشان می‌دهند، در مواردی هم در تعدادی از برگ‌ها علائم دیده می‌شود در حالی که بقیه برگ‌ها حتی روی همان شاخه بدون علائم هستند. میوه‌ها در برخی درختان انجیر آلوده ممکن است کوچک‌تر از اندازه معمول و بدشکل شوند، که این امر از لحاظ کمی و کیفی کاهش عملکرد را به دنبال خواهد داشت (Blodgett and Gomec, 1967). تا کنون چندین گروه ویروسی با ژنوم از نوع RNA و DNA مربوط به جنس‌های مختلف از جمله *Trichovirus*، *Alphacryptovirus*، *Maculavirus*، *Ampelovirus*

Badnavirus و *Closterovirus* در ایجاد این علائم ویروسی دخیل بوده‌اند و در درختان انجیر دارای علائم موزائیکی در کشورهای مختلف شناسایی و معرفی شده‌اند (Gattoni *et al.*, 2009; Elbeaino *et al.*, 2011a, b; Elbeaino *et al.*, 2007; Laney *et al.*, 2012). در گذشته مطالعات فراساختاری توسط میکروسکوپ الکترونی در این بیماری همواره حضور یکسری اندامک‌هایی با غشاء دو لایه Double membrane bodies (DMBs) گرد تا تخم مرغی شکل را در سلول‌های پارانشیمی برگ‌های دارای علائم نشان می‌داد که بعدها ماهیت ویروسی بودن و نقش آنها در سبب شناسی این بیماری مشخص شد (Caglayan *et al.*, 2010; Nolasco and de Sequeira, 1991). این اندامک‌های با غشاء دو لایه پیکره‌های ویروسی ایزومتریک ویروس موزائیک انجیر *Fig mosaic emaravirus* (FMV) می‌باشند. در مطالعات تبارزایی این ویروس در جنس ویروسی *Emaravirus* (خانواده Fimoviridae) طبقه‌بندی شده است. علاوه بر ویروس *Fig mosaic emaravirus* چهار ویروس *Pigeonpea sterility mosaic virus*، *Rose rosette virus* و *Raspberry leaf blotch virus* و *European mountain ash ringspot associated virus* نیز در این جنس طبقه‌بندی شده‌اند (Elbeaino and Digiario, 2009; Mielke-Ehret and Mühlbach, 2012). این بیماری در طبیعت از طریق اندام‌های رویشی، پیوند و کنه *Aceria ficus* (Family: Eriophyidae) قابل انتقال به گیاهان سالم می‌باشد (Flock and Wallace, 1955). ژنوم ویروس FMV که بطور کامل توالی یابی شده است بصورت شش قطعه RNA تک رشته‌ای منفی می‌باشد که هر کدام از این قطعات ژنومی دارای یک قاب خواندنی باز^۱ تک ژنی (Monocistronic) می‌باشد که RNA3 در این ساختار ژنومی با طول ۱۴۹۰ جفت باز پروتئینی را با وزن مولکولی ۳۵ کیلوالتون به عنوان نوکلئوکسپید پروتئین Nucleocapsid protein (NP) ویروس تولید می‌کند (Elbeaino *et al.*, 2009; Elbeaino *et al.*, 2012). در واقع NP یک پروتئین

۱-Open reading frame (ORF)

میوه خصوصاً انجیر، به دلیل غلظت پائین ویروس و همچنین وجود متابولیت‌های ثانویه مانند تانین‌ها و پلی‌ساکاریدها در بافت‌های گیاهی لزوم استفاده از روش‌های تشخیصی که با دقت و حساسیت توانایی ردیابی ویروس را داشته باشند ضروری به نظر می‌رسد (Shahmirzaie *et al.*, 2012; Danesh- Amuz *et al.*, 2014; Ale-Agha and Rakhshandehroo, 2014; Khoshkhatti *et al.*, 2016; Ghorbani *et al.*, 2016). از این رو بکارگیری روش‌های شناسایی مولکولی و توالی‌یابی علاوه بر شناسایی و تشخیص دقیق عامل ویروسی می‌تواند در بررسی تنوع ژنتیکی و روابط تبارزایی بین جدایه‌ها و مطالعه ژنتیکی جمعیتی و تنوع ژنتیکی ویروس در مناطق مختلف بسیار سودمند بوده و نتایج حاصل از آن در درک پیچیدگی اپیدمیولوژی بیمارگر و تولید ارقام مقاوم بر مبنای ژن مقاومت جهت ارائه استراتژی کنترل سودمند باشد (Desbiez *et al.* 1996). ویروس‌های دارای ژنوم RNA به دلیل جهش بالا، تکثیر سریع و اندازه بالای جمعیت قابلیت تغییرات ژنومی در سطح وسیع را دارند و این تغییرات می‌تواند منجر به ظهور واریانت‌های جدید ویروس شود که ممکن است سبب غلبه بر ژن‌های مقاومت، آلوده کردن میزبان‌های جدید و پراکنش با ناقل‌های جدید شود. در این تحقیق ابتدا شناسایی و ردیابی ویروس موزائیک انجیر FMV در نمونه‌های دارای علائم بیماری موزائیک انجیر در مناطق مختلف ایران انجام شد و همچنین روابط تبارزایی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های گزارش شده در جهان بر مبنای ژن تولید کننده نوکلئوکسپید پروتئین بررسی شد.

روش بررسی

نمونه برداری: در طی فصول بهار و تابستان ۱۳۹۵ تعداد ۵۴ نمونه برگ انجیر که دارای علائم شاخص موزائیکی، شامل حاشیه زنگار نکروزه، کلروز و همچنین بد شکلی برگ‌ها و میوه‌ها از باغات انجیر خودرو، تجاری و تحقیقاتی،

اصلی ساختاری است که هر قطعه RNA توسط چندین نسخه از نوکلئوکسپید پروتئین‌ها پوشش داده می‌شود و تشکیل مجموعه‌های ریبونوکلئوپروتئین^۲ را می‌دهد که این مجموعه‌ها در فرآیندهای نسخه‌برداری، همانندسازی و گردایش پیکره ویروسی نقش مهمی را ایفا می‌کنند، در واقع ژن NP اولین ژن ویروسی می‌باشد که در فرآیند همانند سازی، نسخه‌برداری از آن صورت پذیرفته و به عنوان فراوان‌ترین نسخه ژنی در سلول‌های آلوده وجود دارد و به دلیل امکان وقوع تنوع در طی فرآیند نسخه‌برداری همانند پروتئین‌های پوششی به عنوان کاندید مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در ویروس‌ها مطرح می‌باشند (Shi *et al.*, 2007; Överby *et al.*, 2007; Callaghan and Dietzgen, 2005). در سال ۲۰۱۰ این ویروس توسط شاه میرزائی و همکاران از استان‌های تهران (شهرستان ورامین) و لرستان (شهرستان خرم آباد) بر مبنای شناسایی مولکولی بخشی از ژن رمزکننده آنزیم RNA پلی مرز ویروسی (RdRp) گزارش گردید (Shahmirzaie *et al.*, 2010). مطالعات تبارزایی روی جدایه‌های ویروس FMV از استان‌های مازندران، تهران، خراسان رضوی، مرکزی و لرستان بر مبنای ژن گلیکوپروتئین انجام شده است. نتایج حاصله حاکی از عدم تفاوت مشخص بین جدایه‌های مورد بررسی در کشور می‌باشد. تمامی سویه‌های مورد مطالعه به همراه سویه‌های گزارش شده از کشور ترکیه در یک زیرگروه قرار گرفته‌اند (Danesh-Amuz *et al.*, 2014). همچنین مطالعات تبارزایی سویه ایرانی ویروس موزائیک انجیر بر اساس ژن پلی مرز حاکی از عدم تفاوت در این سویه‌ها بوده و تمامی آنها به همراه سویه‌های مدیترانه‌ای در یک زیر گروه قرار گرفته‌اند (Shahmirzaie *et al.*, 2012). این نتایج می‌تواند نشان دهنده احتمال ورود استرین‌های این ویروس از کشور ترکیه به مناطق شمالی ایران و داشتن منشاء تکاملی مشترک باشد.

با توجه به گسترش فراگیر و غیرمنتظره ویروس موزائیک انجیر (FMV) و همچنین مشکلات ردیابی ویروس در درختان

^۲-Ribonucleoprotein complexes (RNPs)

حجم بافر عصاره گیری (X PBS ۷/۵ pH EDTA ۵ میلی مولار، ۲ درصد PVP-40) در هاون چینی سرد روی یخ عصاره‌گیری شد و پس از انجام مراحل الیزا، نتایج با استفاده از دستگاه الیزا خوان مدل BioTeck instrument EL800 در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج RNA کل: جهت ردیابی ویروس موزائیک

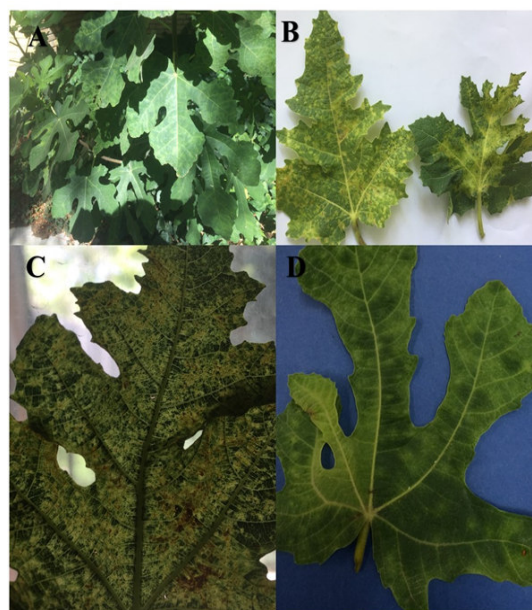
انجیر، استخراج RNA کل از نمونه‌هایی که در آزمون ELISA نسبت به آلودگی مثبت تشخیص داده شده بودند، بوسیله کیت استخراج HiYield™ Total RNA Mini Kit (Plant), RNA استخراج (Real-Biotech, Taiwan) از بافت گیاهی بر اساس دستورالعمل شرکت مربوطه انجام شد. بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده بوسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ و همچنین توسط اسپکتوفتومتری با دستگاه نانودراپ NanoDrop™1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) انجام شد و نمونه‌ها جهت نگهداری به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

آزمون رونوشت برداری معکوس-واکنش زنجیره ای

پلی مرآز (RT-PCR): در این بررسی آغازگرهای رفت FMV-NP (Forward) و برگشت FMV-NP (Reverse) (جدول ۲)، جهت تکثیر طول کامل قطعه ژنی نوکلئوکسپید پروتئین ویروس موزائیک انجیر توسط نرم افزار Clone Manager Professional (Scientific and Educational Software, USA) طراحی شد و سنتز آنها توسط شرکت MWG آلمان انجام شد.

به منظور تأیید نتایج آزمون‌های سرولوژیکی توسط آزمون RT-PCR، ابتدا ساخت دی.ان.ای مکمل^۳ با استفاده از ۵-۱۰ میکروگرم از RNA استخراج شده به همراه ۱۰ پیکومول از آغازگر اختصاصی برگشتی FMV-NP (Reverse) و همچنین ۲۰۰ واحد از آنزیم نسخه بردار معکوس^۴ در حجم

استان‌های تهران (ورامین)، مازندران (تنکابن)، گیلان (لاهیجان و آستارا)، مرکزی (ساوه)، یزد (زارچ)، کرمان (سیرچ) و فارس (جهرم، استهبان، ایچ و کرفت) جمع‌آوری و تا زمان انتقال به آزمایشگاه روی یخ نگهداری شد (جدول ۱ و شکل ۱).



شکل ۱- علائم بیماری موزائیک انجیر FMD در برگ‌های آلوده به ویروس موزائیک انجیر. (A): نمایی از درخت آلوده دارای علائم موزائیکی و ریزش پیش از موعد میوه‌ها، (B) و (C): موزائیک و کلروز در فواصل بین رگبرگ‌ها به همراه زنگار نکروزه، (D): بدشکلی برگ‌ها و کلروز.

Fig. 1. Symptoms of Fig Mosaic Disease (FMD) in FMV-infected leaves. (A): Infected fig tree showing mosaic, chlorosis and premature fruit drop. (B) and (C): interveinal mosaic and chlorosis associated with rust-color necrosis bands. (D): Deformity and chlorosis in fig leaves.

آزمون‌های سرولوژیک جهت تعیین آلودگی نمونه‌ها

به FMV: به منظور شناسایی اولیه و ردیابی FMV در نمونه‌های دارای علائم، آزمون الیزای مستقیم (DAS-ELISA) (Clark and Adams, 1977) با استفاده از آنتی بادی چند همسانه‌ای نشان دار شده با آنزیم آکالین فسفاتاز که علیه پروتئین نوکلئوکسپید جدایه ایرانی ویروس موزائیک انجیر (FMV) تهیه شده بود انجام شد (Unpublished Data). بدین منظور تعدادی از برگ‌های انجیر دارای علائم در سه برابر

^۳-cDNA

^۴-Moloney murine leukaemia virus (MMLV)

حرارتی و با استفاده از سلول‌های مستعد *E. coli* K12 DH5 α به همراه ناقل همسانه‌ساز نو ترکیب حامل ژن نوکلئوکسپید انجام شد. پس از کشت باکتری روی محیط LB (Luria-Bertani) حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (50 μ g/ml)، X-Gal (40 μ g/ml) و IPTG (0.2 mM) استخراج پلاسمید نو ترکیب از پرگنه‌های سفید رنگی که آزمون کلنی PCR صحت فرآیند همسانه‌سازی را در آنها تأیید کرده بود، با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Germany) انجام شد. تعیین توالی پلاسمیدهای نو ترکیب توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 انجام شد و سپس توالی‌ها با ۱۷ توالی کامل ژن نوکلئوکسپید پروتئین ویروس FMV موجود در بانک ژن NCBI توسط نرم افزار BLAST مقایسه شد (جدول ۳). پس از همردیف سازی توالی‌های نوکلئوتیدی توسط نرم افزار Clustal X، بررسی روابط تبارزایی و رسم درخت فیلوژنتیکی بصورت Bootstrap بر مبنای الگوی Neighbor joining با ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم افزار Mega 6 (MEGA Software, USA) انجام شد.

نتیجه و بحث

این تحقیق به منظور ردیابی ویروس موزائیک انجیر در درختان دارای علائم در مناطق مختلف کشور و همچنین بررسی تبارزایی سویه‌های جمع‌آوری شده بر اساس ژن نوکلئوکسپید صورت پذیرفت. برای این منظور از درختان دارای علائم موزائیک و زردی در باغات مناطق مختلف کشور نمونه‌برداری شد و وجود آلودگی با آزمون الیزا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ویروس انجام شد. نتایج آزمون‌های سرولوژیکی حاکی از آلوده بودن ۳۰ نمونه از مجموع ۵۴ نمونه (۵۵/۵ درصد)، به ویروس موزائیک انجیر بود. با توجه به نتایج تشخیص اولیه، این ویروس در نمونه‌های دارای علائم جمع‌آوری شده از استان‌های کرمان (سیرج) و یزد (زارج) ردیابی نشد. در این تحقیق نمونه‌های مورد بررسی از

۲۰ میکرولیتر بر اساس دستورالعمل کیت سنتز cDNA (Thermo Fisher Scientific, USA) صورت پذیرفت.

جهت تکثیر ژن NP به منظور ردیابی ویروس FMV، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز PCR با استفاده از آنزیم تک پلیمرز^۵ (Fermentas Inc, Germany) (5Unit/ml) به میزان ۰/۳ میکرولیتر، ۳ میکرولیتر از cDNA، ۱/۲ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشتی با غلظت ۱۰ پیکومولار، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X، ۱ میکرولیتر از ۵۰ میلی مولار MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs ۱۰ میکرومولار در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه به همراه ۳۰ چرخه دمایی شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. برای همانند سازی قطعه تکثیر شده ابتدا الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد به همراه بافر TAE1X (۴۰ میلی مولار Tris pH 7.6، ۲۰ میلی مولار Acetic acid، ۱ میلی مولار EDTA) انجام شد. پس از تأیید نتایج ردیابی اولیه نمونه‌های آلوده به FMV در آزمون RT-PCR، تعداد ۱۴ جدایه بر مبنای تفاوت جغرافیایی انتخاب گردید.

همسانه سازی ژن نوکلئوکسپید پروتئین و تعیین توالی:

قطعه ژنی تکثیر یافته از جدایه‌های منتخب حاوی طول کامل توالی نوکلئوکسپید پروتئین جهت همسانه‌سازی و تعیین توالی ابتدا با استفاده از کیت Ultra-Clean purification kit بر اساس پروتوکل شرکت سازنده Gene JET TM Gel Extraction Kit (Fermentas Inc, Germany) از ژل آگارز خالص سازی گردید و سپس در ناقل همسانه ساز pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific, USA) قرار داده شد. عمل انتقال به روش شوک

^۵-Taq DNA Polymerase

کمترین آلودگی را به ویروس موزائیک انجیر نشان دادند (جدول ۱).

استان‌های فارس (استهبان، جهرم، کرفت و ایچ) و مازندران (تنکابن) به ترتیب با ۸۲/۳ و ۷۷/۷ درصد، بیشترین آلودگی و نمونه‌های استان گیلان (آستارا و لاهیجان) با ۳۰/۷ درصد،

جدول ۱- نتایج ردیابی اولیه ویروس FMV در نمونه‌های جمع‌آوری شده در آزمون سرولوژی DAS-ELISA و RT-PCR.

به همراه تعداد جدایه‌های توالی یابی شده منتخب از هر منطقه جغرافیایی

Table 1. Results of FMV primary detection in collected samples using serological assay DAS-ELISA and RT-PCR and number of sequenced isolates which were selected from each geographical region

Province	Region	Collected and Tested samples	Infected samples		Sequenced isolates
		No	No	%	No
Tehran	Varamin	3	2	66.6	1
	Jahrom	7	4	57.1	3
Fars	Estahban	4	4	100	4
	Iej	3	3	100	-
	Karft	3	3	100	-
Kerman	Sirch	3	-	-	-
Gilan	Astara	7	2	28.5	1
	Lahijan	6	2	33.3	2
Mazandaran	Tonekabon	9	7	77.7	2
Markazi	Saveh	5	3	60	1
Yazd	Zarch(Sarcheshmeh)	4	-	-	-
Total		54	30	55.5	14

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن رمز کننده نوکلئوکپسید پروتئین ویروس موزائیک انجیر

Table 2. Sequences of the primers used in amplification of FMV nucleocapsid protein

Primer name	Nucleotide sequence of primer	Expected size	Annealing region
FMV-NP(Forward)	5' CCATGGCACCTAAGAGTAAGACTAC 3'	950	Nucleocapsid Protein
FMV-NP(Reverse)	5' CTCGAGAACATGAGCACTTGCAATC 3'		

در این نمونه‌ها می‌تواند ناشی از وجود سایر ویروس‌های بیماری‌زای انجیر باشد از قبیل:

Fig latent virus-1(FLV-1), *Fig leaf mottle associated virus-1*(FLMaV-1) (Shahmirzaie *et al.*, 2012), *FLMaV-2* (Danesh-Amuz *et al.* 2014), *FLMaV-3* (Norozian *et al.*, 2014), *Fig fleck associated virus* (FFKaV), *Fig cryptic virus* (FCV) (Ale-Agha & Rakhshandehroo, 2014), *Fig badnavirus-1*(FBV-1) (Alishiri *et al.*, 2016; Alimoradian *et al.*, 2014).

در تعدادی از نمونه‌ها با وجود علائم موزائیکی و کلروز، آلودگی آنها در آزمون الایزا مشخص نگردید ولی پس از انجام آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی، ویروس FMV در آنها ردیابی گردید، که این موضوع ممکن است در اثر کم بودن غلظت ویروس در گیاه و یا ویژگی‌های متفاوت سرولوژیکی در جدایه‌های ویروسی باشد. در برخی دیگر از نمونه‌ها با وجود علائم، ویروس FMV با هیچ یک از آزمون‌های الایزا و RT-PCR در آنها ردیابی نشد. وجود علائم

جدول ۳- رس شماره‌ها، منشأ و میزبان جدایه‌های ویروس موزائیک انجیر (FMV)، مورد بررسی در این تحقیق

Table 3. Accession numbers, hosts and origins of *Fig mosaic emaravirus*(FMV) isolates/strains analyzed in this study

Origin (Number of isolates)	Nucleotide Accession Numbers	Protein-ID	Isolate Name/strain	Host
Australia(1)	KU674950	AQR59327	Aust	<i>Ficus carica</i>
Canada(1)	HQ703345	AEI98678	CAN01	<i>F.carica</i>
	MG880766, MG880758, MG880759, MG880760, MG880754, MG880753,	-	VA22, JA1, JA2, JA3, ES1, ES2,	<i>F.carica</i>
Iran(14)	MG880755, MG880756, MG880757, MG880761, MG880762, MG880764, MG880765, MG880763		ES3, ES4, AS1, LA2, LA4, TO4, TO7, SA5	
Italy(2)	FM991954, LC002800	CAX21211, BAU20387	GR10, IR-1	<i>F.carica</i>
	AB697843, AB697844, AB697846, AB697847,	BAM13802, BAM13803, BAM13805, BAM13806,	JS1, JF1, JTT-Au, JTT-Ki,	<i>F.carica</i> cv. Hourashi, <i>F.carica</i> cv. Hourashi,
Japan(7)	AB697848, AB697849, AB697850	BAM13807, BAM13808, BAM13809	JTT-Li, JTT-Pa, JTT-Vi	<i>F.carica</i> cv. Athenes, <i>F.carica</i> cv. King, <i>F.carica</i> cv. Lisa, <i>F.carica</i> cv. Panachee, <i>F.carica</i> cv. Violette de Sollies
	AB697851, AB697852,	BAM13810, BAM13811,	SB1, SB2-2,	<i>F.carica</i>
Serbia(6)	AB697853, AB697854, AB697855, AB697856	BAM13812, BAM13813, BAM13814, BAM13815	SB2-3, SB2-4, SB2-5, SB2-6	

در میکروولتر محاسبه شد. نتایج آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن کد کننده نوکلئوکپسید، حاکی از تکثیر قطعه ژنی به طول ۹۵۰ جفت باز در نمونه‌های آلوده بود، که این قطعه با اندازه ژن مورد نظر تطابق داشت (شکل ۲).

به منظور همسانه سازی ژن نوکلئوکپسید، باند مورد نظر در جدایه‌های منتخب از روی ژل آگارز جداسازی شد و در ناقل pTZ57R /T وارد گردید. صحت همسانه سازی با آزمون کلنی پی سی آر تأیید شده و پس از استخراج پلاسمید از کلنی‌های منتخب، تعیین توالی قطعه ژنی با استفاده از پرایمرهای یونیورسال صورت پذیرفت. پس از بررسی، توالی‌ها با رس شماره‌های 66-66 MG880753 در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت شدند. نتایج آنالیز BLAST و همچنین هم ردیفی توالی‌های مورد بررسی، مشابهت ۹۲-۹۶ درصد را با توالی نوکلئوتیدی و مشابهت ۹۱-۹۸ درصد با توالی آمینواسیدی ژن نوکلئوکپسید (N-gene) مربوط به توالی رفرانس (رس شماره FM991954.1) نشان داد.

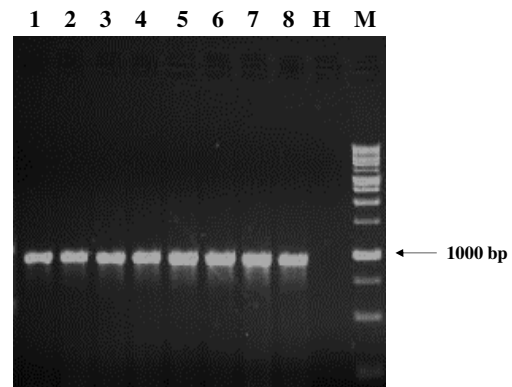
این نتایج نشان می‌دهد که به منظور اطمینان از سلامت درختان، استفاده از روش‌های سرولوژیک و مولکولی ضروری می‌باشد. با توجه به امکان وجود آلودگی همزمان یک گیاه به چند ویروس، استفاده از روش‌های مکمل از قبیل multiplex-PCR و یا روش‌های مبتنی بر نسل جدید توالی‌یابی^۶ پیشنهاد می‌گردد. نتایج تحقیقات گذشته در ایران نشان می‌دهد که FMV به عنوان مهم‌ترین ویروس درختان انجیر دارای علایم بیماری موزائیک وجود دارد (Danesh-Amuz et al., 2014).

در این تحقیق پراکندگی و تنوع ژنتیکی ویروس موزائیک انجیر بر پایه توالی کامل ژن رمزکننده نوکلئوکپسید پروتئین FMV در بین جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران انجام شد. برای این منظور ابتدا RNA از نمونه‌ها استخراج شد.

مشاهده باندهای RNA ریوزومی در ژل آگارز حاکی از خلوص بالای اسید نوکلئیک حاصله می‌باشد و غلظت RNA کل استخراج شده توسط دستگاه ناندراپ حدود ۲/۳ نانوگرم

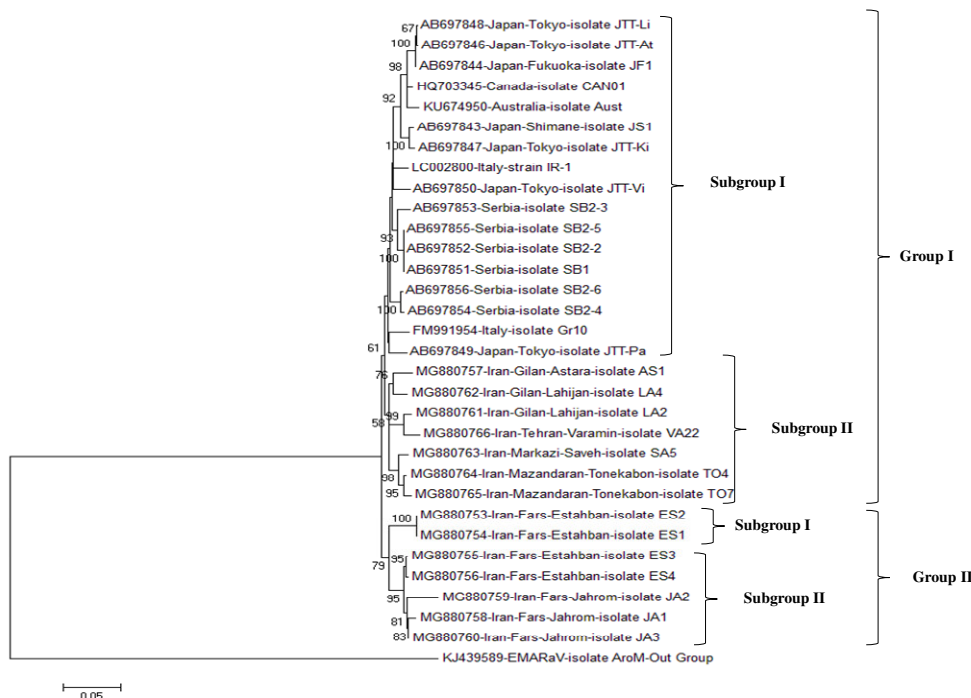
۶-Next generation sequencing (NGS)

در بررسی روابط تبارزایی بر مبنای توالی نوکلئوتیدی، جدایه‌های مورد بررسی و جدایه‌های سایر کشورها در دو گروه فیلوژنتیکی مجزا دسته‌بندی شدند. بر اساس این گروه‌بندی، تمامی جدایه‌های مربوط به مناطق مرکزی و شمالی ایران به همراه جدایه‌های گزارش شده از سایر مناطق جهان در گروه I دسته بندی شدند. مجموعه جدایه‌های مربوط به استان فارس (استهبان و جهرم) بصورت مجزا در گروه فیلوژنتیکی II قرار گرفتند. در این گروه دو جدایه ES2 و ES3 مربوط به شهرستان استهبان در زیرگروه I و جدایه‌های ES4 و ES3 (شهرستان استهبان) به همراه جدایه‌های شهرستان جهرم در زیرگروه II دسته‌بندی شدند. (شکل ۳).



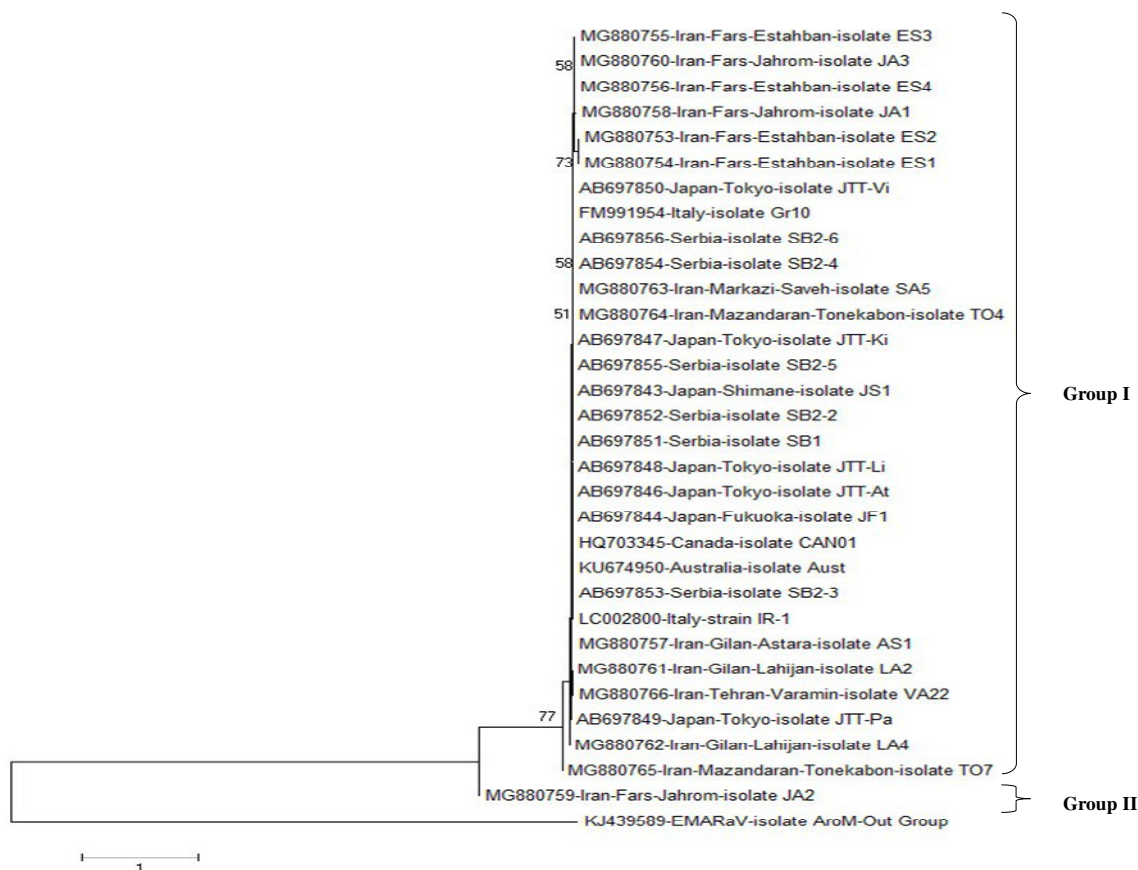
شکل ۲- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن رمزکننده Nucleocapsid Protein ویروس *Fig mosaic emaravirus*(FMV) استفاده از آغازگرهای اختصاصی FMV-NP(Forward) و FMV-NP(Reverse) روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. M: 1Kb DNA ladder (Excel Band, SMOBIO); H: گیاه سالم انجیر، 1-8: گیاه انجیر آلوده به FMV

Fig. 2. PCR Amplification of Nucleocapsid Protein Gene of *Fig mosaic emaravirus* (FMV) Using FMV-NP (Forward) and FMV-NP (Reverse) Primers. M, 1Kb DNA ladder (Excel Band, SMOBIO); H, healthy fig plants; 1-8: FMV infected fig plants.



شکل ۳- درخت تبارزایی حاصل از بررسی توالی های نوکلئوتیدی منطقه رمز کننده نوکلئوکسپید پروتئین FMV که در آن ۱۴ جدایه منتخب ایرانی با ۱۷ جدایه از جهان که در بانک ژن NCBI توالی کامل آنها ثبت شده بود بررسی شد. فاصله ژنتیکی ۰/۰۵، خط برش ۸۰ درصد، ارزش‌های کمتر از ۵۰ درصد از روی گره ها حذف شدند. ویروس *European mountain ash ring spot associated virus* (EMARaV)(KJ439589) به عنوان outgroup انتخاب گردید.

Fig. 3. Phylogenetic tree constructed using nucleotide sequences of FMV nucleocapsid protein coding region of 14 Iranian isolates in comparison with 17 related FMV isolates in NCBI. Genetic distance and Cut off are 0.05 and 80% respectively. Bootstrap values less than 50% are omitted. *European mountain ash ring spot associated virus* (EMARaV) (Accession No. KJ439589) is selected as an out-group species.



شکل ۴- درخت تبارزایی حاصل از بررسی توالی‌های آمینواسیدی منطقه رمز کننده نوکلئوکسپید پروتئین FMV که در آن ۱۴ جدایه منتخب ایرانی با ۱۷ جدایه از جهان که در بانک ژن NCBI توالی کامل آنها ثبت شده بود بررسی شد. فاصله ژنتیکی ۱، خط برش ۸۰ درصد، ارزش‌های کمتر از ۵۰ درصد از روی گره‌ها حذف شدند. ویروس *European mountain ash ring spot associated virus* (EMARaV)(KJ439589) به عنوان outgroup انتخاب گردید.

Fig. 4. Phylogenetic tree constructed using amino acid sequences of FMV nucleocapsid protein coding region of 14 Iranian isolates in comparison with 17 related FMV isolates in NCBI. Genetic distance and Cut off are 1 and 80% respectively. Bootstrap values less than 50% are omitted. *European mountain ash ring spot associated virus* (EMARaV) (Accession No. KJ439589) is selected as an out-group species

NP در فرآیندهای نسخه‌برداری، همانندسازی و گردایش پیکره ویروسی این تفاوت‌ها می‌تواند موجب بهبود سطح عملکردی پروتئین به منظور ارتقا بیماری‌زایی در سویه ویروسی گردد (Garcia-Arenal *et al.*, 2001). مقایسه نتایج گروه‌بندی جدایه‌ها بر مبنای توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی نشان می‌دهد که در هر دو مورد جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه جداگانه قرار می‌گیرند. همانطور که اشاره گردید در گروه‌بندی بر مبنای ترادف نوکلئوتیدی ژن NP تمامی جدایه‌های استان فارس در یک گروه مجزا قرار گرفتند در حالیکه در گروه‌بندی بر مبنای ترادف آمینواسیدی ژن مربوطه

همچنین بررسی روابط تبارزایی بر مبنای توالی‌های آمینواسیدی ژن کد کننده نوکلئوکسپید پروتئین نشان داد جدایه‌های مورد بررسی در ۲ گروه مجزا دسته‌بندی می‌گردند. در این گروه‌بندی تنها یک جدایه مربوط به استان فارس (جهرم)، JA2، به صورت مجزا در یک گروه فیلوژنتیکی قرار می‌گیرد که نشان دهنده فاصله ژنتیکی دورتر آن نسبت به سایر جدایه‌ها می‌باشد (شکل ۴).

به نظر می‌رسد فشار انتخاب مثبت (positive selection pressure) موجب گردیده تا تنوع نوکلئوتیدی موجب تنوع آمینواسیدی در جدایه جهرم (JA2) گردد. با توجه به نقش ژن

ترکیه، در این تحقیق امکان مقایسه آن با جدایه‌های ایرانی امکان پذیر نبود. نتایج این تحقیق نشان داد که تمامی جدایه‌های مربوط به مناطق شمالی و مرکز ایران (استان‌های گیلان، مازندران، تهران و مرکزی) به همراه جدایه‌های مربوط به کشورهای ایتالیا، ژاپن، صربستان، کانادا و استرالیا در یک گروه فیلوژنتیکی قرار می‌گیرند که این امر حاکی از تشابه بالای این جدایه‌ها می‌باشد. نتایج یک تحقیق بر مبنای قطعه ژنومی ۳ (NP-gene) جدایه ویروس موزائیک انجیر از استان لرستان حاکی از نزدیکی این جدایه با جدایه‌هایی از صربستان و ژاپن می‌باشد (Ghorbani *et al.*, 2016).

در این تحقیق برای اولین بار مطالعه تبارزایی جدایه‌های استان فارس صورت پذیرفت. با وجود سطح زیر کشت بالای انجیر در این استان و وجود گزارشات متعدد از بروز خسارات فراوان بیماری موزائیک انجیر در این گیاه، تاکنون در خصوص تنوع ژنتیکی جدایه‌های این استان بررسی صورت نگرفته است. نتایج بررسی روابط تبارزایی در سطح نوکلئوتیدی (شکل ۳) نشان داد که تمامی جدایه‌های استان فارس (استهبان و جهرم) در یک گروه فیلوژنتیکی مستقل از سایر جدایه‌های ایران و جهان می‌باشد. این تفاوت در جدایه‌های استان فارس، احتمال حضور یک سویه جدید را برای آن منطقه مطرح می‌سازد. فرآیندهایی مانند همانندسازی مستعد خطا^۷ که در اثر خطای آنزیم آر.ان.ای پلی‌مراز وابسته به آر.ان.ای^۸ ایجاد می‌گردد و رخدادهایی نظیر نوترکیبی^۹، نوجوری ژنتیکی^{۱۰} و همچنین اثرات متقابل میزبان-پاتوژن از طریق ناقلین و عوامل محیطی می‌توانند در ایجاد تنوع ژنتیکی موثر باشند (Zarghani *et al.*, 2013; Schneider and Roossinck, 2001). از آنجا که هر کدام از این عوامل می‌توانند در ایجاد تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های مناطق شمال و مرکز با

تنها یک جدایه از استان فارس (جدایه جهرم JA2) در گروه دوم قرار گرفت. با توجه به وجود کدان‌های متفاوت برای قرار گیری یک اسید آمینه در فرایند ترجمه، در بسیاری از موارد، تغییر در ترادف نوکلئوتیدها منجر به تغییر در ترادف آمینواسید مربوطه نمی‌گردد. این وضعیت سبب می‌گردد که در بسیاری از موارد تشابه جدایه‌ها در سطح آمینواسیدی با یکدیگر بیشتر بوده و تفاوت‌هایی در گروه بندی جدایه‌ها مشاهده گردد (Alishiri *et al.*, 2013). در بررسی انجام شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی، جدایه‌های گروه I به میزان ۹۲ تا ۹۶ درصد با جدایه‌های گروه II شباهت داشتند. با مقایسه ترادف آمینواسیدی، میزان شباهت بین این دو گروه در حدود ۹۰ تا ۹۸ درصد تعیین گردید. جدایه جهرم JA2 از گروه II با ۹۰ درصد تشابه با اعضا گروه I دارای کمترین میزان شباهت در سطح آمینواسیدی می‌باشد. این جدایه با داشتن بیشترین میزان تفاوت با سایر جدایه‌های کشور و دنیا، بنظر می‌رسد که دارای خصوصیات بیماری زایی و بیولوژیکی منحصر بفردی باشد که تعیین این خصوصیات در مطالعات تکمیلی ضروری می‌باشد.

در گذشته مطالعات تبارزایی جدایه‌های ویروس FMV از باغات انجیر استان‌های خراسان رضوی، مازندران و تهران بر مبنای توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن گلیکوپروتئین و همچنین پلی‌مراز صورت گرفته بود (Danesh-Amuz *et al.*, 2014; Shahmirzaie *et al.*, 2012; Ale-Agha and Rakhshandehroo, 2014). نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که تمامی جدایه‌های ایرانی به همراه جدایه‌های گزارش شده از کشور ترکیه در یک زیر گروه جداگانه قرار می‌گیرند که این امر می‌تواند نشان دهنده سازگاری جغرافیایی این جدایه‌ها با یکدیگر نسبت به سایر جدایه‌های گزارش شده از جهان باشد. از آنجا که منشاء گیاه انجیر منطقه غرب آسیا می‌باشد داشتن منشاء تکاملی مشترک جدایه‌های گزارش شده از کشور ترکیه با جدایه‌های مناطق شمالی ایران دور از انتظار نمی‌باشد. توجه به عدم ثبت توالی ژن نوکلئوکپسید پروتئین جدایه‌های کشور

۷- error-prone replication

۸- RdRp

۹- Recombination

۱۰- Genetic reassortment

تفاوت‌های ژنتیکی مشاهده شده می‌تواند منجر به تفاوت در خصوصیات ویروسی از جمله میزان و شدت بیماری‌زایی در جدایه‌های مربوطه گردد که این تفاوت ژنتیکی و بروز سویه جدید بیماری‌زا می‌تواند به عنوان عامل شدت بالای علائم و بروز خسارت عمده در منطقه مطرح باشد.

در طی سالیان اخیر موارد متعددی از بروز خسارت بالا توسط بیماری موزائیک انجیر در استان فارس گزارش شده است. با توجه به اهمیت این استان از جهت تولید انجیر در کشور و همچنین تفاوت مشاهده شده در سویه‌های ویروسی این منطقه با سایر مناطق کشور، بنظر می‌رسد که نوع سویه‌های ویروسی موجود در منطقه نقش مستقیمی در شدت بیماری‌زایی داشته باشد که تأیید این نظریه احتیاج به انجام مطالعات تکمیلی در این خصوص دارد.

References

- ALE-AGHA, G. N. and F. RAKHSHANDEHROO, 2014. Detection and Molecular Variability of Fig Fleck-Associated Virus and Fig Cryptic Virus in Iran. *Journal of Phytopathology*, 162 (7-8), pp. 417-425.
- ALIMORADIAN, P., F. RAKHSHANDEHROO and M. SHAMS-BAKHS, 2014. First record of Fig Badnavirus-1 in fig trees in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 96 (4SUP), pp. 4-124.
- ALISHIRI, A. F. RAKHSHANDEHROO, G. H. SALEHI JOUZANI and M. SHAMS-BAKHS, 2016. Detection and Molecular Characterization of Fig badnavirus-1 Iranian isolates on the Basis of the Protease Gene. *Applied Entomology and Phytopathology*, 84(1), pp.119-130.
- ALISHIRI, A., F. RAKHSHANDEHROO, H. R. ZAMANIZADEH and P. PALUKAITIS, 2013. Prevalence of tobacco mosaic virus in Iran and evolutionary analyses of the coat protein gene. *The Plant Pathology Journal*, 29(3), pp. 260-273
- ANONYMOUS, 2014. Preliminary 2014 Production Data. Statistical Data. FAOSTAT. Available at: <http://www.fao.org/faostat>.

جدایه‌های مربوط به استان فارس (شهرستان استهبان و جهرم)، موثر باشند، بنابراین مطالعات تکمیلی در این خصوص ضروری می‌باشد. در گذشته وقوع فرآیند نوجوری ژنتیکی در ایجاد تنوع ژنتیکی در ویروس‌های گیاهی دارای ژنوم چند بخشی از نوع آر.ان.ای تک رشته‌ای منفی از جمله *Tomato spotted wilt virus (TSWV)* گزارش شده است (Tentchev *et al.*, 2011). این فرآیند به عنوان عامل محتمل در ایجاد تنوع و ایجاد سویه‌های جدید در جدایه‌های ویروس موزائیک انجیر نیز گزارش شده است (Walia *et al.*, 2014). مطالعات قبلی صورت گرفته در ترکیه نشان داده است که نوع سویه‌های ویروسی جدا شده از ارقام مختلف انجیر متفاوت می‌باشد. این امر می‌تواند حاکی از نقش ارقام بومی منطقه در ایجاد تنوع و توسعه نژادهای جدید ویروس موزائیک انجیر باشد (Elçi *et al.*, 2013). از آنجا که ارقام کشت شده در استان فارس (خصوصاً شهرستان استهبان) عمدتاً رقم سبز و بومی منطقه بوده و متفاوت از ارقام عمده در شمال کشور مانند (سیاه، زرد، منجیفی و کشانی) می‌باشند، لذا نقش ارقام بومی در ایجاد تفاوت‌های ژنتیکی و سویه‌های جدید ویروس دور از انتظار نیست. البته مطالعات تکمیلی و دقیق‌تر در مورد نقش سویه‌های بومی در شدت بیماری‌زایی و علائم و همچنین توانایی انتقال روی ارقام بومی منطقه باید صورت پذیرد. با توجه به نزدیکی جغرافیایی دو منطقه جهرم و استهبان در استان فارس و وجود تبادلات گسترده نهال و مواد تکثیری گیاهی در بین این دو منطقه، تشابه در جدایه‌های مربوط به این مناطق منطقی بنظر می‌رسد. قرار گرفتن جدایه‌های مربوط به استان فارس (جنوب کشور) در یک گروه مجزا نشان دهنده اثر جدایی جغرافیایی در ایجاد تنوع ژنتیکی و تکامل است و می‌تواند نشان دهنده وجود ژنوتیپ‌های مختلف و اگر در منطقه باشد. در گذشته نیز وجود ژنوتیپ‌های واگرا جمعیت‌های ویروس برگ باد بزنی مو^{۱۱} در مناطق جنوب غربی کشور گزارش گردیده است (Kargar *et al.*, 2016).

^{۱۱} - *Grapevine fanleaf virus (GFLV)*

- ANONYMOUS, 2015. Statistical annual report of Iranian agricultural crops.
- BLODGETT, E. C. and B. GOMEZ, 1967. Fig mosaic. *Plant Disease Reports*, 51, pp.893–896.
- CAGLAYAN, K., C. U. SERCE, E. BARUTCU, K. KAYA, V. MEDINA, M. GAZEL, S. SOYLU and O. CALISKAN, 2010. Comparison by Sequence-Based and Electron Microscopic Analyses of Fig mosaic virus Isolates Obtained from Field and Experimentally Inoculated Fig Plants. *Plant Disease*, 94(12), pp.1448–1452.
- CALLAGHAN, B. and R. G., DIETZGEN, 2005. Nucleocapsid gene variability reveals two subgroups of Lettuce necrotic yellows virus. *Archives of Virology*, 150(8), pp. 1661–1667. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0528-7>.
- CLARK, M. F. and A. N. ADAMS, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology*, 34(3), pp. 475–483.
- CONDIT, I. J. and W. T. HORNE, 1933. A mosaic of the fig in California. *Phytopathology*, 23(11), pp. 887–896.
- DANESH-AMUZ, S., RAKHSHANDEHROO, F. and S. REZAEI, 2014. Prevalence and genetic diversity of fig mosaic virus isolates infecting fig tree in Iran. *Acta Virologica*, 58(3), pp. 245–252.
- DESBIEZ, C., C. WIPF-SCHEIBEL, F. GRANIER, C. ROBAGLIA, T. DELAUNAY and H. LECOQ, 1996. Biological and molecular variability of zucchini yellow mosaic virus on the Island of Martinique. *Plant disease*, 80(2), pp. 203–207.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO, A. DE STRADIS and G. P. MARTELLI, 2007. Identification of a second member of the family Closteroviridae in mosaic-diseased figs. *Journal of Plant Pathology*, pp.119–124.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2011b. Complete sequence of Fig fleck-associated virus, a novel member of the family Tymoviridae. *Virus Research*, 161(2), pp. 198–202.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO, A. ALABDULLAH, A. DE STRADIS, A. MINAFRA, N. MIELKE, M. CASTELLANO and G. P. MARTELLI, 2009. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *Journal of General Virology*, 90, pp.1281–1288.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2009. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. *Archives of virology*, 154(11), p.1719.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2012. RNA-5 and -6, two additional negative-sense RNA segments associated with fig mosaic virus. *Journal of Plant Pathology*, 94(2), pp. 421–425.
- ELBEAINO, T., R. A. KUBAA, M. DIGIARO, A. MINAFRA and G. P. MARTELLI, 2011a. The complete nucleotide sequence and genome organization of Fig cryptic virus, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin. *Virus Genes*, 42(3), pp. 415–421.
- ELÇI, E., Ç. U. SERÇE and K. ÇAĞLAYAN, 2013. Phylogenetic analysis of partial sequences from Fig mosaic virus isolates in Turkey. *Phytoparasitica*, 41(3), pp. 263–270.
- FLOCK, R. A. and J. M. WALLACE, 1955. Transmission of fig mosaic by the eriophyid mite *Aceria ficus*. *Phytopathology*, 45(1), pp.52–54.
- GARCÍA-ARENAL, F., A. FRAILE and J. M. MALPICA, 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual review of phytopathology*, 39(1), pp. 157–186.
- GATTONI, G., A. MINAFRA, M. A. CASTELLANO, A. DE STRADIS, D. BOSCIA, T. ELBEAINO, M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2009. Some properties of Fig latent virus 1, a new member of the family Flexiviridae. *Journal of Plant Pathology*, pp. 555–564.
- GHORBANI, A., K. IZADPANA, R. A. AFSHARIFA and F. MEHDINIA, 2016. Phylogenetic study of Fig mosaic virus Lorestan isolate and detection of Closteroviruses associated. In *Proceedings of 22nd Iranian Plant Protection Congress*. p. 26.
- KARGAR, M. M. ZAKIAGHL, M. MASOUMI, M. MEHRVAR and K. IZADPANA, 2016. Analysis of genetic diversity of Grapevine fanleaf virus isolate

- from Fars and Kohgiluyeh-Boyer Ahmad provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 52(3).
- KHOSHKHATTI, N., M. ABADKHAH and D. E. O. KOOLIVAND, 2016. Occurrence of Fig mosaic virus in fig orchards from Tarom region in Zanjan province. In *Proceedings of 22nd Iranian Plant Protection Congress*. p. 28.
- LANEY, A. G., M. HASSAN and I. E. TZANETAKIS, 2012. An integrated badnavirus is prevalent in fig germplasm. *Phytopathology*, 102(12), pp.1182–1189.
- MIELKE-EHRET, N. and H. P. MÜHLBACH, 2012. Emaravirus: a novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. *Viruses*, 4(9), pp.1515–1536.
- NOLASCO, G. and O. A. DE SEQUEIRA, 1991. Double-stranded RNA (dsRNA) associated with fig mosaic disease. In *Proceedings of the 4th Portuguese-Spanish Biochemistry Congress*, Lisbon, 1991.
- NOROZIAN, E., F. RAKHSHANDEHROO and M. SHAMS-BAKHS, 2014. Presence of fig leaf mottle-associated virus 3 in an Iranian fig Orchard. *Journal of Plant Pathology*, 96(4SUP), pp.4–131.
- ÖVERBY, A. K., R. F. PETTERSSON, and E. P. A. NEVE, 2007. The glycoprotein cytoplasmic tail of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) interacts with ribonucleoproteins and is critical for genome packaging. *Journal of virology*, 81(7), pp.3198–3205.
- SCHNEIDER, W. L. and M. J. ROOSSINCK, 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *Journal of virology*, 75(14), pp. 6566–6571.
- SHAHMIRZAIE, M. M., F. RAKHSHANDEHROO, H. R. ZAMANIZADEH and T. ELBEAINO, 2012. Current status of fig mosaic disease in Iran. *Journal of Phytopathology*, 160(7-8), pp.324–330.
- SHAHMIRZAIE, M., F. RAKHSHANDEHROO, H. R. ZAMANIZADEH, T. ELBEAINO and G. P. MARTELLI, 2010. First report of Fig mosaic virus from fig trees in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 92(4), pp.S120–S120.
- SHI, X., A. KOHL, P. LI and R. M. ELLIOTT, 2007. Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. *Journal of virology*, 81(18), pp.10151–10160.
- STOVER, E., M. ARADHYA, L. FERGUSON and C. H. CRISOSTO, 2007. The fig: overview of an ancient fruit. *HortScience*, 42(5), pp.1083–1087.
- TENTCHEV, D., E. VERDIN, C. MARCHAL, M. JACQUET, J. M. AGUILAR and B. MOURY, 2011. Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of general Virology*, 92(4), pp.961–973.
- WALIA, J. J., A. WILLEMSSEN, E. ELICI, K. CAGLAYAN, B. W. FALK and L. RUBIO, 2014. Genetic Variation and Possible mechanisms driving the evolution of worldwide Fig mosaic virus Isolates. *Phytopathology*, 104(1), pp. 108–114.
- ZARGHANI, S. N., M. SHAMS BAKHS, N. S. BASHIR, and T. WETZEL, 2013. Molecular characterization of whole genomic RNA2 from Iranian isolates of Grapevine fanleaf virus. *Journal of Phytopathology*, 161(6), pp.419–425.

