

تعیین برخی از مشخصات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ایرانی ویروس بی بذری گوجه فرنگی

محمد مداحیان¹، حسین معصومی^{2*}

¹ دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

² دانشیار بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: 1390/11/15، تاریخ پذیرش: 1391/02/18

چکیده

ویروس بی بذری گوجه فرنگی (*Tomato aspermy virus, TAV*) دارای دامنه میزبانی وسیعی می‌باشد و اغلب در گیاهان زیتنی ایجاد آلودگی می‌نماید. به منظور شناسایی و بررسی خصوصیات ملکولی و بیولوژیکی این ویروس، تعداد 436 نمونه گیاهی از استان‌های مختلف ایران جمع آوری گردید. از بین نمونه‌های مورد بررسی آلودگی به TAV در سه نمونه از گیاهان زیتنی با استفاده از آزمون الیزا به روش ساندویچ دو طرفه مورد تایید قرار گرفت. قطعه 687 جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی با استفاده از آزمون RT-PCR و یک جفت آغازگر اختصاصی، تکثیر، سپس همسانه سازی و تعیین ترادف گردیدند. ترادف جدایه‌های ایرانی با دیگر جدایه‌های TAV، موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه فیلوژنتیکی بیانگر آن است که جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه اصلی I و II قرار می‌گیرند، که گروه II نیز به دو زیر گروه IIA و IIB تقسیم می‌گردد. هر سه جدایه ایرانی در زیر گروه IIA واقع می‌گردند. همچنین جدایه‌های ایرانی دارای مشابهت بالای ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه مربوط به ژن پروتئین پوششی به میزان بیش از 99% با یکدیگر می‌باشند. نتایج حاصل از تعیین دامنه میزبانی سه جدایه ایرانی TAV نشان‌دهنده آن است که جدایه‌های ایرانی از دامنه میزبانی گسترده‌ای بر روی گیاهان آزمون برخوردار می‌باشند. این بررسی اولین گزارش از وقوع ویروس بی بذری گوجه فرنگی در ایران و معرفی گیاه اطلسی به عنوان میزبان جدید این ویروس در دنیا می‌باشد.

واژه های کلیدی: ویروس بی بذری گوجه فرنگی، جایگاه تکاملی، آزمون RT-PCR

داوودی به صورت شکستگی رنگ گلبرگ‌ها، بد شکلی گیاه و کاهش اندازه و پژمردگی گل‌ها می‌باشد (Raj *et al.*, 2011; Hollings & Stone, 1971). ژنوم ویروس به صورت سه قطعه آر.ان.ای تک لای مثبت تحت نام های RNA-1، RNA-2 و RNA-3 بوده که قطعه RNA-1 پروتئین 1a، RNA-2 پروتئین های 2a و 2b و RNA-3 پروتئین‌های پوششی (CP)² و حرکتی (MP)³ را کد می‌نمایند (Canady *et al.*, 1995). پروتئین پوششی وظیفه محافظت RNA های ویروسی را عهده دار بوده و همچنین جهت حرکت سلول به سلول ویروس در گیاه مورد نیاز می‌باشد (Shi *et al.*, 1997). اولین مطالعات مولکولی در مورد ژنوم ویروس بی‌بذری گوجه فرنگی توسط Wilson & Symons (1981) انجام و بعد از آن مطالعات متعددی در مورد ژن پروتئین پوششی و جایگاه تکاملی جدایه‌های مختلف این ویروس صورت گرفته است (Raj *et al.*, 2011; Raj *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2009). از آنجائیکه این بررسی اولین گزارش از وجود ویروس بی‌بذری گوجه فرنگی در ایران می‌باشد، لذا اهداف این تحقیق شامل بررسی برخی از خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه های ایرانی این ویروس می‌باشد.

ویروس بی‌بذری گوجه فرنگی¹ گونه ای از جنس *Cucumovirus* و خانواده *Bromoviridae* بوده و دارای دامنه میزبانی وسیعی در بین گیاهان تک لپه و دو لپه می‌باشد. این ویروس گسترش جهانی داشته و در بین پایه‌های داوودی بسیار رایج است. به علاوه، TAV مهمترین عامل خسارت زا در گیاه گل داوودی در دنیا می‌باشد (Choi *et al.*, 2001). این ویروس در میزبان های متعددی از قبیل گوجه‌فرنگی، آهار، فلفل، سنبل، اختر، سوسن، گلابول، نعناع، تاج خروس، آفتابگردان، توتون و گل استکانی ایجاد بیماری می‌کند (Brierley *et al.*, 1955; Hollings & Stone, 1971; Palukaitis. & Garcia-Arenal, 2003). TAV توسط تعدادی از گونه های شته خانواده *Aphididae* به شیوه ناپایا، همچنین از طریق مایه زنی مکانیکی و بذر منتقل می‌گردد. این ویروس برای اولین بار توسط Ainsworth (1939) از گیاه داوودی گزارش گردیده و تاکنون از نقاط مختلف دنیا از جمله کشورهای هند، چین، کره جنوبی، استرالیا، نیوزیلند، آمریکا، کانادا، فیلیپین، مجارستان، هلند، نیوزیلند، روسیه و انگلستان گزارش شده است (Blencowe & Caldwell, 1949; Hollings & Stone, 1971; Lin *et al.*, 2004). علائم این ویروس بر روی گیاه گوجه فرنگی به صورت بدشکلی در برگ‌ها، کوتولگی بوته‌ها، بی‌بذری در گیاه و همچنین در گیاه

2-Coat Protein
3-Movement Protein

1-Tomato aspermy virus, TAV

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی و شناسایی ویروس بی بذری گوجه فرنگی در ایران طی دی ماه 1388 لغایت مرداد ماه 1390 از مزارع گوجه فرنگی استان های یزد، کرمان، همدان، آذربایجان غربی و مزارع فلفل واقع در استان های فارس، یزد و مناطق گلکاری شهرهای کرمان، شیراز، تبریز و همدان نمونه برداری به عمل آمد. گیاهان جمع آوری شده شامل گوجه فرنگی، فلفل و گل های اطلسی، داوودی، مارگریت، همیشه بهار، کوب، ستاره ای، جعفری، تاج خروس، ابری و اختر بودند. بر این اساس گیاهان دارای علائم مختلف ویروسی از قبیل موزائیک، کوتولگی بوته‌ها، زردی، تاولی و بدشکلی برگ ها و گل ها انتخاب گردیدند. مشخصات گیاهان مورد بررسی در جدول 1 آورده شده است.

شناسایی نمونه‌ها با استفاده از آزمون الایزا

جهت تعیین آلودگی نمونه‌ها به TAV از آزمون ساندویچ دوطرفه الیزا¹ به روش کلارک و آدامز (Clark & Adams 1977) و با استفاده از آنتی سرم چند همسانه‌ای TAV تهیه شده از موسسه DSMZ کشور آلمان استفاده گردید. نتایج با استفاده از دستگاه الایزا خوان مدل EL800 (Biotek Instrument) در طول موج 405 نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) با استفاده از

فرمول $\bar{x} \pm 3SD$ + آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. در این فرمول \bar{x} میانگین جذب، SD انحراف معیار استاندارد چاهک‌ها جهت برگ سالم می‌باشد. بر این اساس نمونه‌های آلوده از سالم تفکیک گردید.

بررسی دامنه میزبانی ویروس در شرایط گلخانه

از آنجائیکه TAV برای اولین بار از کشور ایران گزارش می‌گردد، جهت بررسی دامنه میزبانی و علائم ویروسی از 34 گونه و رقم از هفت خانواده گیاهی استفاده گردید. به منظور خالص سازی بیولوژیکی از لکه‌های موضعی کلروتیک ظاهر شده بر سطح روی برگ‌های گیاه *Chenopodium quinoa* Wild و جهت تکثیر و نگهداری این ویروس از گیاه توتون رقم *Nicotiana tabacum* L. cv. Whiteburly استفاده گردید. جهت مایه زنی ویروس بر روی گیاهان آزمون در شرایط گلخانه از برگ‌های توتون آلوده به TAV پس از توزین به نسبت 1:4 و با استفاده بافر فسفات 0/1 مولار با pH 7 صورت گرفت. پس از مایه زنی زمان ظهور علائم و مشخصات آنها بطور منظم مورد بررسی و یادداشت برداری قرار گرفت. گیاهان مایه زنی شده در شرایط گلخانه با دمای 20-25 °C و رطوبت نسبی 60-70 درصد و نور مناسب نگهداری شدند. پس از ایجاد علائم بر روی گیاهان آزمون جهت تأیید آلودگی، گیاهان مذکور توسط آزمون الایزا به روش ساندویچ دوطرفه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

4- Double antibody sandwich-ELISA, DAS-ELISA

جدول 1- گیاهان، مناطق نمونه برداری و میزان آلودگی نسبت به ویروس بی بذری گوجه فرنگی.

Table 1- The location, sample plants and rate of infection of *Tomato aspermy virus*.

استان نمونه برداری province	منطقه نمونه برداری Region	میزبان host	تعداد نمونه Number of samples	میزان آلودگی Infection rate
Kerman کرمان	Kerman کرمان	<i>Chrysanthemum morifolium</i> داوودی	57	2
Kerman کرمان	Kerman کرمان	<i>Calandula officinalis</i> همیشه بهار	4	0
Kerman کرمان	Sarasiab سرآسیاب	<i>Calandula officinalis</i> همیشه بهار	10	0
Kerman کرمان	Kerman کرمان	<i>Cosmos atosanguineus</i> ستاره ای	9	0
Kerman کرمان	Kerman کرمان	<i>Chrysanthemum superbum</i> مارگریت	7	0
Kerman کرمان	Kerman کرمان	<i>Canna indica</i> اختر	9	0
Kerman کرمان	Kerman کرمان	<i>Petunia hybrida</i> اطلسی	22	0
Kerman کرمان	Sarasiab سرآسیاب	<i>Petunia hybrida</i> اطلسی	15	0
Kerman کرمان	Mahan ماهان	<i>Petunia hybrida</i> اطلسی	11	1
Kerman کرمان	Mahan ماهان	<i>Solanum lycopersicon</i> گوجه فرنگی	23	0
Kerman کرمان	Jiroft جیرفت	<i>Solanum lycopersicon</i> گوجه فرنگی	19	0
Hamedan همدان	Hamedan همدان	<i>Chrysanthemum superbum</i> مارگریت	29	0
Hamedan همدان	Hamedan همدان	<i>Calandula officinalis</i> همیشه بهار	5	0
Hamedan همدان	Hamedan همدان	<i>Dahlia imperialis</i> کوب	14	0
Hamedan همدان	Bahar بهار	<i>Solanum lycopersicon</i> گوجه فرنگی	15	0
Fars فارس	Siyakh سیاخ	<i>Capsicum annum</i> فلفل	28	0
Fars فارس	اسماعیل آباد	<i>Capsicum annum</i> فلفل	46	0
Fars فارس	Esmailabad			
Fars فارس	Shiraz شیراز	<i>Amaranthus caudatus</i> تاج خروس	6	0
Fars فارس	Shiraz شیراز	<i>Agreatum houstonisum</i> ابری	9	0
Yazd یزد	Ashkezar اشکذر	<i>Capsicum annum</i> فلفل	11	0
Yazd یزد	محمد آباد	<i>Solanum lycopersicon</i> گوجه فرنگی	28	0
West-Azərbayjan آذربایجان غربی	Mohammad abad			
West-Azərbayjan آذربایجان غربی	Tabriz تبریز	<i>Tagetes erecta</i> جعفری	12	0
West-Azərbayjan آذربایجان غربی	Tabriz تبریز	<i>Chrysanthemum morifolium</i> داوودی	33	0
East-Azərbayjan آذربایجان شرقی	Ourmia ارومیه	<i>Solanum lycopersicon</i> گوجه فرنگی	14	0
Azərbayjan				
-	-	Total کل	436	3

استخراج RNA کل و ساخت cDNA

جهت انجام آزمون RT-PCR، RNA کل از گیاهان توتون رقم *Nicotiana tabacum* L. cv. Whiteburly High Pure Viral با استفاده از کیت ایرانی TAV RNA Kit (ساخت شرکت Roche کشور آلمان) استخراج گردید. به منظور ساخت دی.ان.ای مکمل (cDNA)، 2/5 میکرولیتر RNA کل استخراجی با 2/5 میکرولیتر آغازگر برگشت (10 μ M) و 8/5 میکرولیتر آب دیونیزه استریل مخلوط و در حمام خشک در دمای 95 °C به مدت یک دقیقه قرار گرفتند. پس از سرد نمودن لوله‌ها بر روی یخ، مقدار چهار میکرولیتر بافر RT¹ (5x)، دو میکرولیتر مخلوط داکسی ریبونوکلوئید تری فسفات (dNTPs، 10 μ M)، 1/5 میکرولیتر آنزیم نسخه برداری معکوس (M-200U/ μ l) MuLV) ساخت شرکت Fermentas، 1/5 میکرولیتر آنزیم بازدارنده RNase (10U/ μ l) به لوله‌ها اضافه و به مدت 45 دقیقه درون دستگاه بن‌ماری در دمای 42°C قرار داده شدند. توقف واکنش با قرار دادن مخلوط به مدت 15 دقیقه در دمای 72°C انجام گرفت.

آزمون PCR² جهت تکثیر قطعه ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی ویروس بی-بذری‌گوجه‌فرنگی با استفاده از آغازگرهای

اختصاصی طراحی شده توسط نرم‌افزار FAST PCR با آغازگرهای رفت (TAV-F1: 5' CTGAGATGGTACAAAACGCTA-3' و برگشت (TAV-R9: 5' TAGACAGCGATGCAGCTGGT-3')

در این روش هر لوله بترتیب شامل 0/2 μ M از هر کدام آغازگرهای رفت و برگشت، 1 mM MgCl₂، 0/2 mM مخلوط dNTP، 2/5 μ L، PCR (10x)، 1/25 U آنزیم Taq DNA polymerase از شرکت سیناژن و 2/5 μ L cDNA بود که با افزودن آب دیونیزه استریل حجم نهایی به 25 میکرولیتر رسانده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای 94 °C، 35 چرخه شامل مرحله واسرشت سازی در دمای 94 °C به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در 58 °C به مدت یک دقیقه، مرحله گسترش در 72 °C به مدت یک دقیقه و مرحله گسترش نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 °C صورت گرفت. قطعات تکثیر شده در ژل آگارز 1% الکتروفورز و با اتیدیوم برمایند رنگ آمیزی شدند.

همساز سازی، تعیین ترادف و تجزیه و تحلیل

داده‌ها

قطعات ژن پروتئین پوششی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آغازگرهای رفت (TAV-F1) و برگشت (TAV-R9) تکثیر شدند.

5-Revers-transcription
6-Polymerase Chain Reaction

داوودی با علائم رنگ پریدگی شدید برگ ها و بدشکلی در آنها از مناطق گلکاری شهر کرمان جمع آوری گردیدند (شکل 1-A).

به منظور بررسی دامنه میزبانی سه جدایه ایرانی مورد نظر (Ker.Mah.P، Ker.Ker.Ch.1 و Ker.Ker.Ch.2)، از گیاهان خانواده‌های *Leguminosae*، *Solonaceae*، *Compositae*، *Chenopodiaceae*، *Cucurbitaceae*، *Brassicaceae* و *Umbelliferae* استفاده گردید. جدایه‌های ایرانی ویروس بی‌بذری گوجه فرنگی قادر به آلوده کردن 21 نوع گیاه از 34 گونه گیاهی شدند (جدول 2). در خانواده *Solonaceae* میزبان های طبیعی (گوجه فرنگی، فلفل و اطلسی) و آزمایشگاهی (ارقام توتون و داتوره) این ویروس مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده جدایه‌های ایرانی TAV قادر به آلوده سازی تمامی گیاهان مورد نظر می‌باشند. علائم ایجاد شده بر روی گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) ابتدا به صورت موزائیک، رنگ پریدگی و ابلقی در برگ‌ها و سپس بدشکلی، سوزنی شدن برگ ها و کوتولگی می‌باشد (شکل 1-E). از جمله علائم ایجاد شده بر روی گیاه فلفل نیز می‌توان به زرد ابلقی (Calico) اشاره نمود (شکل 1-F). TAV بر روی گیاه اطلسی (که برای نخستین بار در دنیا به عنوان میزبان طبیعی این ویروس گزارش می‌گردد) علائمی به صورت بدشکلی، موزائیک خفیف، زردی و رنگ پریدگی ایجاد می‌نماید (شکل 1-D). جدایه‌های ایرانی TAV بر روی

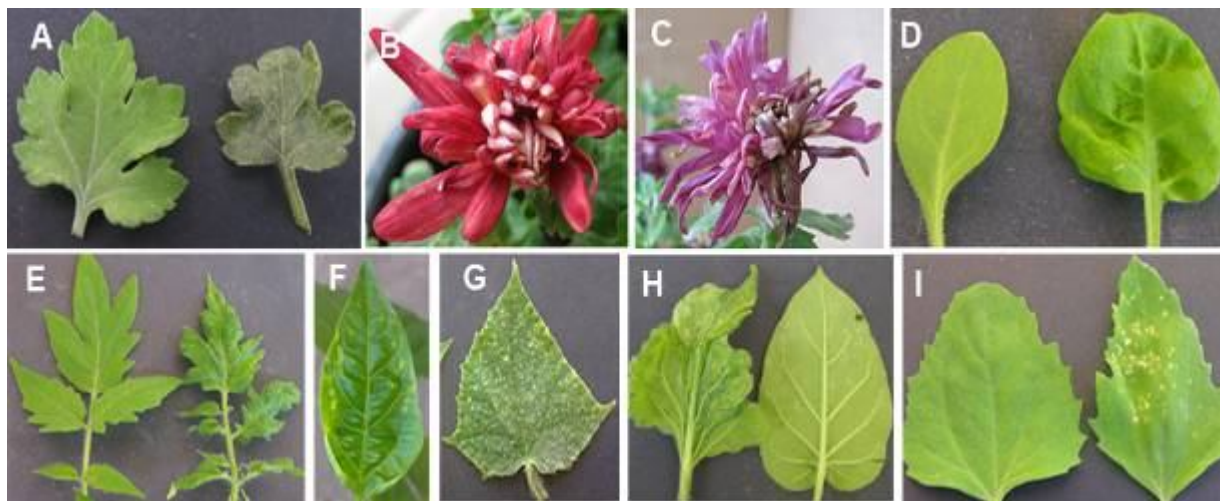
قطعات تکثیر شده با استفاده از کیت (InsTA clone™ PCR Cloning Kit) در پلاسמיד pTZ57R/T سویه JM 107 باکتری *Escherichia coli* وارد و سپس همسانه سازی گردیدند. پلاسמיד های نو ترکیب، به منظور تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی ارسال گردیدند. از ترادف‌های بدست آمده جهت جستجوی ترادف‌های مشابه در بانک ژن توسط نرم‌افزار بلاست استفاده گردید و تعداد 36 جدایه حاصله از بانک ژن جهت مقایسه مورد بررسی قرار گرفتند. پس از همردیف سازی چندگانه ترادف‌ها (multiple sequence alignment) با برنامه ClustalW دندروگرام مربوطه با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN Version 4.02 بر اساس روش Neighbor-Joining رسم گردید. ترجمه ترادف‌های نوکلئوتیدی به ترادف‌های اسید آمینه و محاسبه میزان تشابه بین ترادف‌های نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه جدایه‌ها توسط نرم‌افزار DNAMAN صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمون ساندریچ دوطرفه الایزا نشان دهنده وجود ویروس بی‌بذری گوجه فرنگی برای نخستین بار در کشور می‌باشد. این ویروس تنها در سه نمونه از 436 نمونه جمع آوری شده ردیابی گردید (جدول 1). اولین جدایه از مناطق گلکاری منطقه ماهان کرمان از روی گیاه اطلسی با علائم تاوولی و موزائیک در برگ‌ها بدست آمد. دو جدایه دیگر نیز از گیاهان

علائم ایجاد شده توسط جدایه‌های ایرانی TAV بر روی گیاهان آزمون می‌توان به ایجاد لکه‌های موضعی نکروتیک بر روی برگ‌های خیار رقم Peto Seed، توت‌های شدن سطح زیرین برگ در گیاه *N. glutinosa* L. اشاره نمود که از علائم افتراقی بین TAV و CMV می‌باشند (Hollings & Stone, 1971) (شکل‌های H-1 و G-1). TAV بر خلاف CMV قادر به ایجاد آلودگی سیستمیک در گیاه خیار نمی‌باشد (Taliansky & García Arenal, 1995). جدایه‌های ایرانی ویروس بی‌بذری گوجه‌فرنگی نیز همانند جدایه‌های V-TAV و HP-TAV (گزارش شده از کشورهای استرالیا و هند) قادر به ایجاد علائم توت‌های شدن سطح زیرین برگ و بدشکلی بر روی گیاهان *Nicotiana glutinosa* L. و گوجه‌فرنگی می‌باشند (Verma et al., 2007; Habili & Francki, 1974a). این در حالیست که جدایه‌های Luc-TAV و Kol-TAV قادر به ایجاد علائم توت‌های شدن در زیر برگ‌های این رقم از توتون نمی‌باشند. همچنین جدایه‌های ایرانی بر خلاف جدایه Dha-TAV (از کشور هند) قادر به ایجاد علائم آلودگی بر روی گیاه *Nicotiana glutinosa* L. و *Chenopodium amaranticolor* می‌باشند (Raj et al., 2009). نتایج حاصل از این بررسی بیانگر دامنه میزبانی وسیع جدایه‌های ایرانی TAV و تنوع علائم ایجاد شده بر روی گیاهان آزمون می‌باشد.

میزبان‌های آزمایشگاهی در گیاهان خانواده *Solanaceae* طیف وسیعی از علائم از جمله توت‌های شدن در زیر برگ‌های گیاه *Datura maxima* L. ماتل بر روی برگ‌های گیاه *N. debneyii* L. نقش حلقوی و نکروز بر روی برگ‌های گیاه *N. tabacum* L. cv. Whiteburly، و بدشکلی برگ‌های گیاه *N. tabacum* L cv Samsun NN. را ایجاد نمودند. گیاهان خانواده *Compositae* نیز از جمله میزبان‌های اصلی TAV محسوب می‌گردند، مهمترین علائم ایجاد شده بر روی گیاه داوودی از خانواده مذکور به صورت بدشکلی و پژمردگی گل‌ها می‌باشد. همچنین موزائیک، ابلقی، رگبرگ نواری، نکروز سطح برگ‌ها و کوتولگی از دیگر علائم ایجاد شده بر روی این گیاه می‌باشد (شکل‌های C-1 و B-1). در گیاهان خانواده *Chenopodiaceae* علائم به صورت ایجاد لکه‌های نکروتیک و کلروتیک موضعی در حدود 7 تا 10 پس از مایه زنی بر روی سه گونه *Ch. qinoa amaranticolor* Coste et Reyn Wild و *Ch. murale* L. ظاهر گردید (شکل I-1). همچنین جدایه‌های ایرانی TAV باعث کوتولگی شدید گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea* L. گردیدند. در گیاهان خانواده *Leguminosae* علائم بر روی لوبیا رقم Sunrise و لوبیا چشم بلبلی رقم مشهد به صورت لکه‌های کلروتیک و بدشکلی ظاهر گردید. از مهمترین



شکل 1- علائم ایجاد شده توسط جدایه‌های ایرانی TAV بر روی گیاهان آزمون. A: علائم بدشکلی در برگ های گیاه داوودی ایجاد شده توسط جدایه Ker.Ker.Ch.1. جمع آوری شده از مناطق گلکاری شهر کرمان، برگ سمت راست گیاه آلوده و برگ سمت چپ گیاه سالم. B: علائم بدشکلی بر روی گل های گیاه داوودی ایجاد شده توسط جدایه Ker.Mah.P. پژمردگی گل گیاه داوودی ایجاد شده توسط جدایه Ker.Mah.P. D: علائم بدشکلی بر روی برگ های گیاه اطلسی ایجاد شده توسط جدایه Ker.Ker.Ch.2. سمت راست برگ آلوده و برگ سمت چپ برگ سالم. E: علائم تاولی بر روی برگ های گیاه گوجه فرنگی ایجاد شده توسط جدایه Ker.Mah.P. سمت راست برگ آلوده و سمت چپ برگ سالم. F: علائم ابلقی زرد (Calico) بر روی برگ های گیاه فلفل ایجاد شده توسط جدایه Ker.Mah.P. علائم لکه های نکروتیک بر روی برگ های گیاه خیار رقم Peto Seed ایجاد شده توسط جدایه Ker.Mah.P. علائم توت‌های شدن بر روی سطح زیرین برگ های گیاه *Nicotiana glutinosa* L. داوودی ایجاد شده توسط جدایه Ker.Ker.Ch.1. سمت چپ برگ آلوده و سمت راست برگ سالم. I: علائم لکه های نکروتیک بر روی سطح برگ های گیاه *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn ایجاد شده توسط جدایه Ker.Ker.Ch.2. سمت راست برگ آلوده و برگ سمت چپ برگ سالم.

Figure 1- Symptoms of different Iranian TAV isolates in various test plants under greenhouse conditions. a Leaf deformation in *Chrysanthemum moniliform* L. caused by Ker.Ker.Ch.1 isolate. b Flower deformation in *Chrysanthemum moniliform* caused by Ker.Mah.P isolate. c Wilt of flower caused by Ker.Mah.P isolate. d Ker.Ker.Ch.2 isolate produced leaf deformation on *Petunia hybrida*. e Blistering produced on *Lycopersicon esculentum* Mill. by Ker.Mah.P isolate. f Mottle on *Capsicum annum* L. caused by Ker.Mah.P isolate. g Necrotic local lesions on *Cucumis sativus* L. cv. Peto Seed produced by Ker.Mah.P isolate. h Enations in *Nicotiana glutinosa* L. caused by Ker.Ker.Ch.2 isolate. i Necrotic local lesions on *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn. caused by Ker.Ker.Ch.2 isolate.

جدول 2- علائم ایجاد شده توسط جدایه‌های ایرانی ویروس بی‌بذری گوجه فرنگی بر روی گیاهان آزمون.

Table 2- Symptoms induced by Iranian TAV isolates on selected plant species.

نام علمی (Scientific name)	جدایه (Isolate)		
	Ker.Mah.P	Ker.Ker.Ch.1	Ker.Ker.Ch.2
Compositae			
<i>Chrysanthemum moniliform</i> L.	W, FD, VB, M, MO, M, ST, LD	-	-
<i>Agreatum houstonisum</i> L.	NS	-	-
<i>Calendula Officinalis</i> L.	NS	-	-
<i>Tagetes erecta</i> .L.	NS	-	-
<i>Zinnia elegans</i> L.	NLL, LD	NLL, LD	NLL, LD
<i>Gaillardia pulchella</i> L.	NS	-	-
<i>Dahlia apiculata</i> L.	NS	-	-
<i>Helianthus annuus</i> L.	LD, ST, M	-	-
<i>Lactuca sativa</i> L.	NS	-	-
Solanaceae			
<i>Petunia hybrida</i>	GI, M, Y, LD	M, Y, LD	GI, Y, LD
<i>Capsicum annum</i> L.	LD, MO	LD, MO	LD, MO
<i>Datura stramonium</i> L.	MM, VB	-	-
<i>Datura maxima</i> L.	M, EN, NLL	M, EN	M, EN, NLL
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Turkish	M, LD, MO	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i> var Samsun NN.	M, LD, MO, B, NLL	M, LD, B, NLL	M, LD, MO, B
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	EN, LD, B, M, MO, ST, Y	EN, LD, B, ST, Y	EN, LD, B, ST, Y
<i>Nicotiana Clevelemdii</i> Gray.	EN, LD, B, M, MO, ST, Y	EN, LD, B, SM, MO, ST, Y	EN, LD, B, SM, MO, ST, Y
<i>Nicotiana debneyii</i> L.	SB, MO, LD, EN	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Whiteburly	EN, RS, ST, B, MO, VB, LD, NLL	EN, RS, ST, MO, VB LD, NLL	EN, RS, ST, MO, VB, LD, NLL
<i>Solanum lycopersicon</i> Mill.	ST, M, MO, LD, BL, VB	ST, MO, LD, BL, VB	ST, M, MO, LD, BL
Leguminosae			
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv Sunrise.	LD	LD	LD
<i>Vigna unguiculata</i> L cv Mashhad	CLL	-	-
Cucurbitaceae			
<i>Cucurbita pepo</i> L. cv. Khoy	NS	-	-
<i>Cucurbita pepo</i> L. cv. Maragheh	NS	-	-
<i>Cucumis sativus</i> L. cv. Peto Seed	CLL, NLL	CLL, NLL	CLL, NLL
<i>Citrillus lantanus</i> Thunb.cv. Crimson Sweet	NS	-	-
Umbelliferae			
<i>Apium graveolens</i> L.	NS	-	-
Chenopodiaceae			
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste	CLL, NLL	CLL, NLL	CLL, NLL

نام علمی (Scientific name)	جدایه (Isolate)		
	Ker.Mah.P	Ker.Ker.Ch.1	Ker.Ker.Ch.2
et Reyn			
<i>Chenopodium quinoa</i> Wild	CLL, NLL	-	-
<i>Chenopodium murale</i> L.	CLL	-	-
<i>Spinacia oleracea</i> L.	LD, ST	LD, ST	LD, ST
<i>Beta vulgaris</i> L.	NS	-	-
Brassicaceae			
<i>Brassica rapa</i> L.	NS	-	-
<i>Brassica oleracea var capitata</i>	NS	-	-

CLL, chlorotic local lesions; **RS**, ring spots; **En**, enations; **FD**, flower deformation; **GI**, green island; **LD**, leaf deformation; **M**, mosaic; **Mo**, mottle; **NLL**, necrotic local lesions; **NS**, no symptoms; **B**, blistering; **M**, severe mosaic; **ST**, stunting; **VB**, vein banding; **VC**, vein clearing; **W**, wilt; **Y**, yellowing; -, not test.

شده جدایه‌های TAV در دو گروه I و II قرار می‌گیرند. گروه I شامل 6 جدایه گزارش شده از کشور هند (مجزا شده از گیاه داوودی) می‌باشد و این در حالیکه که دیگر جدایه‌های گزارش شده از دنیا در گروه II واقع می‌گردند (شکل 3). این گروه (II) نیز خود به دو زیر گروه IIA و IIB تقسیم می‌گردد که سه جدایه ایرانی TAV در زیر گروه IIA به همراه جدایه‌های گزارش شده از کشورهای مختلف دنیا از قبیل انگلستان، آمریکا، اسپانیا، استرالیا، هند، کره جنوبی، چین و مجارستان واقع می‌گردند. به علاوه اینکه سه جدایه TAV-GU، TAV-MP و TAV-BR گزارش شده از کشور هند در زیر گروه IIB واقع می‌گردند (شکل 3). براساس مقایسه درصد تشابه ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی، در بین جدایه‌های ایرانی و جدایه‌های گزارش شده از کشورهای مختلف دنیا، کمترین میزان تشابه بین جدایه ایرانی Ker.Ker.Ch.1 مجزا شده از گیاه داوودی و جدایه TAV-UT از کشور هند (مجزا

آزمون RT-PCR و همسانه‌سازی

آغازگرهای اختصاصی طراحی شده قادر به شناسایی جدایه‌های ویروس در گیاهان آلوده بودند. با استفاده از این آغازگرها در آزمون PCR قطعه ای 687 جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی سه جدایه ایرانی TAV حاصل گردید (شکل 2-A). تعیین ترادف محصولات همسانه سازی شده نشان داد که ترادف‌های ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی TAV حاوی 657 جفت باز می‌باشند.

تعیین جایگاه تکاملی جدایه‌های ایرانی TAV

نتایج حاصل از تعیین ترادف، وجود ویروس بی‌بذری گوجه‌فرنگی را در کشور برای اولین بار از گیاهان اطلسی و داوودی تأیید نمود. ترادف‌های بدست آمده جهت تعیین موقعیت فیلوژنتیکی آن‌ها به همراه 33 جدایه گزارش شده در دنیا (موجود در بانک ژن) مورد بررسی قرار گرفتند (جدول 3). بر اساس دندروگرام رسم

رابطه تکاملی نزدیک بین این دو جدایه می‌باشد. لازم به ذکر است که جدایه V-TAV-a در سال 1974 و از روی گیاه داوودی گزارش گردیده و اولین جدایه TAV می‌باشد که در سال 1991 طول کامل ژنوم آن تکثیر گردیده است (O'Reilly *et al.*, 1991; Habili & Francki, 1974). بر پایه درخت فیلوژنتیکی رسم شده جدایه ایرانی Ker.Ker.Ch.2 نیز دارای رابطه تکاملی نزدیکی با جدایه‌های B-TAV (از کشور انگلستان، گیاه گوجه فرنگی) و V-TAV-s (از کشور اسپانیا، گیاه داوودی) بوده و میزان مشابهت ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه این جدایه‌ها با جدایه ایرانی به میزان 100 درصد می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از این تحقیق همانند نتایج Verma *et al.*, (2009 & 2011) و Raj *et al.*, (2009) بیانگر آن است که جدایه های ایرانی TAV، علی رغم وجود در یک منطقه جغرافیایی جدید (کشور ایران) و میزان متفاوت (گیاه اطلسی)، همانند دیگر جدایه های این ویروس (گزارش شده از مناطق مختلف در دنیا و از گیاهان متفاوت) دارای درصد تشابه بالایی از نظر میزان ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه ژن پروتئین پوششی می‌باشند. لذا با توجه به آلودگی گیاهان اطلسی و داوودی نسبت به TAV و افزایش کاشت گل‌های زینتی و گیاهان گلخانه‌ای به خصوص گیاه گوجه فرنگی، تحقیق بیشتر جهت تعیین میزان پراکنش این ویروس در سایر نقاط کشور، شناسایی دیگر میزبان‌های آن و مطالعه ساختار ژنوم کامل TAV لازم می‌باشد.

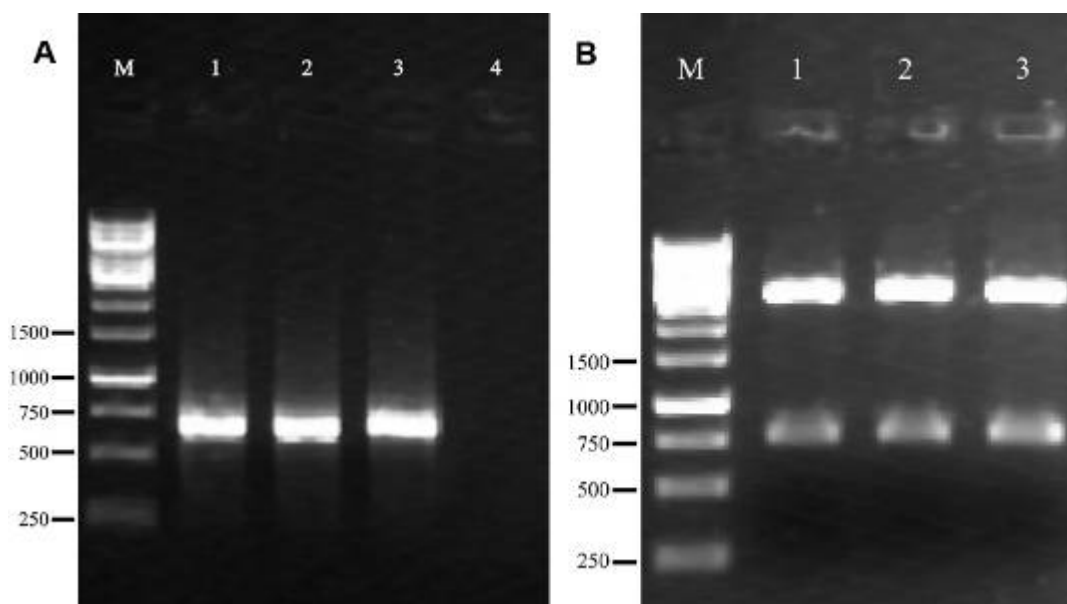
شده از گیاه داوودی) به میزان 91/5 درصد می‌باشد. همچنین بیشترین درصد تشابه مربوط به جدایه ایرانی Ker.Ker.Ch.2 مجزا شده از گیاه داوودی و جدایه های B-TAV، V-TAV-s، P-TAV، V-TAV-a، KC-TAV، BJ-TAV، NBRI-TAV، 1-TAV، Kol-TAV و TAV-Ba به میزان 100 درصد می‌باشد. همچنین در مورد مقایسه درصد تشابه اسیدهای آمینه ژن پروتئین پوششی مابین جدایه های ایرانی TAV و جدایه‌های گزارش شده از سایر نقاط دنیا، کمترین درصد تشابه بین جدایه‌های ایرانی Ker.Mah.P و Ker.Ker.Ch.1 با جدایه TAV-UT از کشور هند به میزان 87/6 درصد می‌باشد. بعلاوه اینکه بیشترین میزان مشابهت اسیدهای آمینه را جدایه ایرانی Ker.Ker.Ch.2 با جدایه های B-TAV، V-TAV-S، V-TAV-A، KC-TAV و TAV 1- به ترتیب گزارش شده از کشورهای کره جنوبی، استرالیا، اسپانیا، انگلستان و آمریکا و سه جدایه NBRI-TAV، TAV-Be و Kol-TAV گزارش شده از کشور هند به میزان 99/5 درصد دارا بوده است. همچنین جدایه‌های ایرانی دارای میزان تشابه بالای ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه مربوط به ژن پروتئین پوششی به میزان بیش از 99 درصد با یکدیگر می‌باشند. موقعیت جدایه ایرانی Ker.Ker.Ch.1 و جدایه V-TAV-a (از کشور استرالیا و گیاه داوودی) در درخت فیلوژنتیکی رسم شده و میزان مشابهت بالای ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه آن‌ها (به ترتیب به میزان 99/7 و 99/5 درصد) بیانگر

جدول 3- جدایه های مورد بررسی ویروس بی بذری گوجه فرنگی موجود در بانک ژن جهت مقایسه و رسم دندروگرام و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه های ایرانی این ویروس.

Table 3-GenBank accession number and origin of several TAV isolates used for phylogenetic analysis.

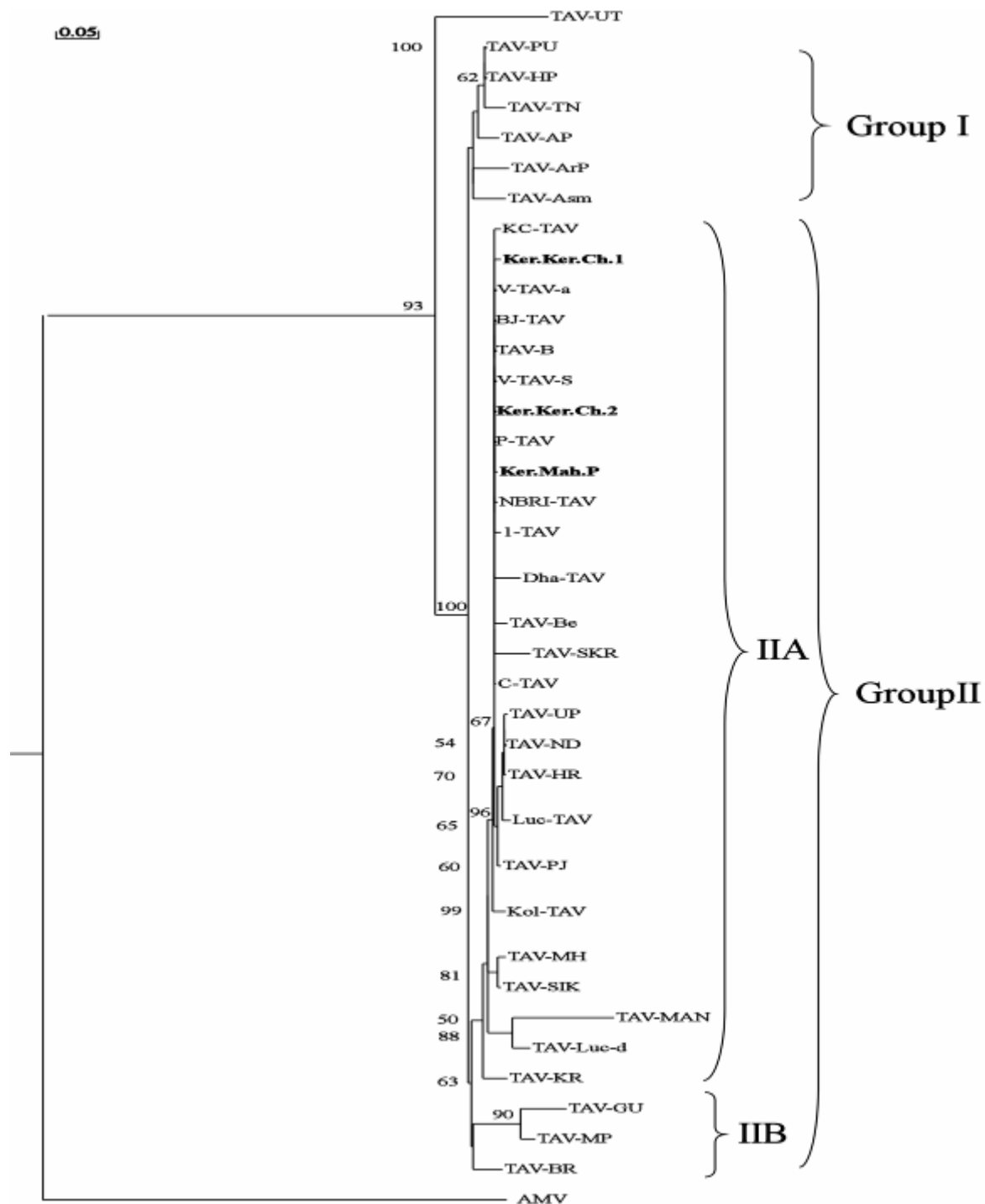
شماره ردیف Row number	شماره ثبت Accession number	جدایه Isolate	منطقه Region	میزبان Host
1	JQ403614	Ker.Mah.P	ایران Iran	اطلسی <i>Petunia hybrida</i>
2	JQ403613	Ker.Ker.Ch.1	ایران Iran	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
3	JQ403612	Ker.Ker.Ch.2	ایران Iran	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
4	S72468.1	TAV-B	انگلستان England	گوجه فرنگی <i>Solanum lycopersicon</i>
5	AJ277269.1	1-TAV	آمریکا USA	گوجه فرنگی <i>Solanum lycopersicon</i>
6	L15335.1	P-TAV	مجارستان Hungary	لفل <i>Capsicum annum</i>
7	AJ237849.2	KC-TAV	کره جنوبی South Korea	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
8	EU888909.1	NBRI-TAV	هند India	گلایول <i>Gladiolus spp.</i>
9	L79972.1	V-TAV-s	اسپانیا Spain	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
10	D01015.1	C-TAV	انگلستان England	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
11	EU573929.1	TAV-SKR	هند India	گلایول <i>Gladiolus spp.</i>
12	AJ277268.1	V-TAV-a	استرالیا Australia	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
13	HQ424165.1	BJ-TAV	چین China	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
14	EU163410.1	Dha-TAV	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
15	EU163411.1	Luc-TAV	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
16	AJ550020.2	TAV-PU	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
17	AJ580841.1	TAV-UP	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
18	AJ582718.1	TAV-PJ	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
19	AJ586134.1	TAV-HP	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
20	AJ965491.1	TAV-MH	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>

شماره ردیف Row number	شماره ثبت Accession number	جدایه Isolate	منطقه Region	میزبان Host
21	AJ965492.1	TAV-TN	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
22	AJ968727.1	TAV-MAN	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
23	AJ970532.1	TAV-SIK	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
24	AM049403.1	TAV-ArP	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
25	AM049404.1	TAV-Asm	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
26	AM055591.1	TAV-GU	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
27	AM055592.1	TAV-UT	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
28	AM055753.1	TAV-ND	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
29	AM055754.1	TAV-AP	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
30	AM055755.1	TAV-KR	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
31	AM055756.1	TAV-MP	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
32	AM055757.1	TAV-BR	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
33	AM055758.1	TAV-HR	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
34	DQ191798.2	TAV-Luc-d	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
35	EU442883.1	TAV-Be	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>
36	EF153735.1	Kol-TAV	هند India	داوودی <i>Chrysanthemum moniliform</i>



شکل 2- A: الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی R9/F1 منجر به تشکیل باند 678 جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی جدایه های ایرانی ویروس TAV درون ژل آگاروز 1% گردید. (M نشانگر اندازه DNA (Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentase)).
 ۱، ۲ و 3) نمونه های گیاهی آلوده به جدایه های ایرانی ویروس TAV. 4) گیاه سالم. B: الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه ژن پروتئین پوششی جدایه های ایرانی TAV هضم شده با آنزیم های *EcoR1* و *Pst1* درون ژل آگاروز 1% (M نشانگر اندازه DNA (Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentase)). باندهای 687 جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی به همراه باند 2850 جفت بازی پلاسمید.

Figure 2- A: Reverse transcription-polymerase chain reaction used for the detection of *Tomato aspermy virus*. Lane M, 1-kb DNA ladder; lane 1, 2 & 3 plant infected samples with Iranian TAV isolates, Lane 4 healthy plant. B: Digested recombinant plasmids comprising coat protein gene of Iranian isolates of TAV with *EcoR1* and *Pst1* restriction enzymes. 687bp fragments of coat protein gene of Iranian TAV isolates and 2850bps fragments of plasmid.



شکل 3- درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس روش Neighbor-joining با استفاده از نرم افزار DNAMAN بر پایه ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه های ایرانی ویروس TAV و سایر جدایه های موجود در بانک ژن. جدایه های ایرانی به صورت Bold نشان داده شده‌اند. جدا یه ای از AMV به نام HQ316637.1 به عنوان Outgroup انتخاب گردیده است.

Figure 3- Neighbor-joining tree illustrating the Phylogenetic relationships between the Iranian TAV isolates and other published TAV isolates. The tree was drawn using the 657 bp of coat protein sequences. Multiple sequence alignments were generated with DNAMAN software (Version 4.02). The Iranian isolates are shown in bold.

- Blencowe JW, Caldwell J (1949). Aspermy-A new virus disease of the tomato. *Annals of Applied Biology* 36: 320-326.
- Brierley P, Smith FF, Doolittle SP (1955). Some hosts and vectors of tomato aspermy virus. *Plant Disease Reports* 39: 152-156.
- Canady MA, Leja CA, Day J, McPherson A (1995). Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of tomato aspermy virus (TAV). *Proteins: Structure, Function and Genetics* 21: 265-267.
- Choi SK, Choi JK, Ryn KH, Park WM (2001). Generation of infectious clones of a Korean strain of Tomato aspermy virus. *Molecules and Cells* 13: 52-60.
- Clark MF, Adams AN (1977). Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Habili N, Francki IB (1974). Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. I. Physical and chemical properties. *Virology* 57: 302-401.
- Hollings M, Stone OM (1971). Tomato aspermy virus. CMI/AAB descriptions of plant viruses. no. 79. Association of Applied Biologists, Warwick, United Kingdom.
- Lin MJ, Chang CA, Chen CC, Cheng YH (2004). Molecular and serological detection of tomato aspermy virus infecting chrysanthemum in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 13: 291-298.
- Palukaitis P, Garcia-Arenal F (2003). Cucumoviruses. *Advances in Virus Research* 62: 241-323.
- Raj SK, Kumar S, Choudhari S, Verma DK (2009). Biological and molecular characterization of three isolates of Tomato aspermy virus infecting chrysanthemums in India. *Phytopathology* 157: 117-125.
- Raj SK, Kumar S, Verma DK, Snehi SK (2011). First report on molecular detection and identification of Tomato aspermy virus naturally occurring on gladiolus in India. *Phytoparasitica* 39: 303-307.
- Shi BJ, Ding SW, Symons RH (1997). In vivo expression of an overlapping gene encoded by the cucumoviruses. *Journal of General Virology* 78: 237-241.
- Taliansky ME, Garcia-Arenal F (1995). Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant. *Journal of Virology* 69: 916-922
- Verma N, Kumar K, Kulshrestha S, Raikhy G, Hallan V, Ram R (2009). Molecular studies on Tomato aspermy virus isolates infecting chrysanthemums. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42: 99-111.
- Wilson PA, Symons RH (1981). The RNAs of cucumoviruses: 3'-terminal sequence analysis of two strains of tomato aspermy virus. *Virology* 112: 342-345.

Partial biological and molecular characterization of Iranian isolates of *Tomato aspermy virus*

Maddahian M.¹, Massumi H.^{*2}

¹ MSc Student, Shahid Bahonar university of Kerman, Kerman, Iran.

² Associate Professor of Shahid Bahonar university of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Tomato aspermy virus (TAV) has a wide host range and usually infects ornamental plants. To identify and characterize molecular and biological properties of the virus, 436 samples were collected from various provinces of Iran. TAV was detected in three samples of ornamental plants through double antibody sandwich ELISA test using specific polyclonal antibody. The 687 bp segment including the coat protein (CP) gene was amplified by RT-PCR, cloned and sequenced. Nucleotide sequences of the CP gene of Iranian TAV isolates were compared with available GenBank isolates. Phylogenetic analysis showed that TAV isolates were classified into two groups I and II, and the group II was divided in two subgroups IIA and IIB. All the Iranian TAV isolates were classified in subgroup IIA and shared the high nucleotide and amino acid sequence identities (more than 99%). The results of this study also showed a wide host range of the Iranian TAV isolates among test plants. This study is the first report of TAV occurrence in Iran and the first natural occurrence of TAV on *Petunia hybrida* in the world.

Key words: *Tomato aspermy virus*, *Phylogenetic position*, *RT-PCR*.

* Corresponding Author: Massumi H.

Tel: 0341-3202673

Email: masoomi@mail.uk.ac.ir