گل و گیاهان زینتی (۱۴۰۳)، ۹(۲): ۱۶۷-۱۸۴

مقاله پژوهشی

ردیابی و شناسایی برخی ویروس‌های بیمارگر گیاهی روی داودی، نیلوفر پیچ و دیفن‌باخیا در ایران

مهرداد صالح زاده[1*]، علیرضا افشاریفر[1]، سعیده دهقانپور فراشاه[2]، طیبه کیانی بهرام‌آبادی[3]

۱. مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

۲. گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

۳. دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

Mehrdadsalehzadeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۷، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۴/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۲۷

چکیده

به‌دلیل افزایش رویشی در بیشتر گونه‌های گیاهان زینتی، ویروس‌های بیمارگر گیاهی به‌سرعت در حال گسترش هستند. در بهار و تابستان سال ۱۴۰۱ نمونه‌هایی از گیاهان داودی با نشانه های موزائیک، بدشکلی برگ و گاهی لکه‌های سبزرد از فضای سبز شهرهای تهران، تبریز، یزد و شیراز و همچنین نمونه‌هایی از نیلوفر پیچ با نشانه های لکه‌های سبزرد از فضای سبز دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شیراز و در پایان نمونه‌هایی از گیاهان آپارتمانی دیفن‌باخیا با نشانه های موزاییک و بدشکلی برگ از گلخانه‌های شهر یزد جمع‌آوری شد. برای ردیابی و شناسایی عامل یا عوامل ایجاد کننده‌ی نشانه های به ظاهر ویروسی در گیاهان یاد شده، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای عمومی مرتبط با خانواده‌های مهم در ویروس‌های بیمارگر گیاهی و همچنین آغازگرهای اختصاصی ویروس موزاییک خیار انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با رونوشت برداری معکوس با جفت آغازگرهای عمومی توباموویروس‌ها مبتنی بر بخشی از پروتئین پوششی ویروس، عامل ایجاد کننده‌ی نشانه های ویروسی در برگ‌های آلوده داودی را به‌عنوان توباموویروس‌ها ردیابی کرد و قطعه‌ای به اندازه‌ی ۸۸۰ جفت‌باز تکثیر شد. همچنین در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با رونوشت برداری معکوس گیاهان آلوده نیلوفر پیچنده و دیفن‌باخیا با جفت آغازگرهای عمومی پوتی‌ویروس‌ها مبتنی‌بر چارچوب خوانشی اینکلوژن‌بادی هسته‌ای ویروس، قطعاتی به طول ۳۵۰ جفت‌باز تکثیر شد. قطعات حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای انجام ترادف‌یابی نوکلئوتیدی دو طرفه به شرکت سینوهه ارسال شد. بر اساس توالی‌یابی انجام شده، عامل ویروسی آلوده کننده در برگ‌های داودی به‌عنوان ویروس موزاییک تنباکو (Tobacco mosaic virus, TMV)، آلودگی برگ‌های دیفن‌باخیا به ویروس موزاییک داشین (Dasheen mosaic virus, DsMV) و آلودگی نیلوفرپیچ به ویروس G سیب‌زمینی شیرین (Sweetpotato virus G, SPVG) شناسایی شد. اما ویروس در گیاهان سالم (کنترل منفی) ردیابی نشد. بر اساس اطلاعات ما این اولین گزارش از آلودگی داودی، نیلوفر پیچ و دیفن‌باخیا به ویروس‌های مذکور از ایران است.

واژه‌های کلیدی: توباموویروس، پوتی‌ویروس، ویروس موزاییک تنباکو، ویروس موزاییک داشین، ویروس G سیب‌زمینی شیرین.

مقدمه

در حال حاضر پرورش و تکثیر گل‌ها و گیاهان زینتی از اهمیت بالایی برخوردار است و در بسیاری از کشورهای جهان، با بهره‌گیری از دانش روز، اقدام به شناسایی آفات و بیمارگرهای مهم و اقتصادی در ارقام مهم گل‌ها و گیاهان زینتی پرداخته و با گزینش ارقام خوب و مقاوم به بیمارگرها، به تولید این محصول در سطوح بالا پرداخته‌اند تا بتوانند علاوه‌بر تأمین نیازهای داخل کشور، مبالغ قابل‌توجهی ارز از طریق صادرات این محصولات کسب کنند. هر چه کشورها به سمت صنعتی‌شدن پیش می‌روند، میزان تقاضای سرانه مردم برای گل و گیاهان زینتی نیز افزایش می‌یابد. زیرا براساس تحقیقات انجام شده در این کشورها، مصرف گل و گیاهان زینتی در محیط‌های کاری و زندگی مردم اثرات مثبت زیادی از جمله افزایش میزان بهره‌وری، افزایش ضریب امید به زندگی، آرامش روح و روان، رسیدن به سلامت جسمی و تحمل زندگی ماشینی را ایجاد می‌کند. مهم‌ترین خسارت بیمارگرهای گیاهی به‌خصوص در ویروس‌های بیمارگر گیاهی به گیاهان زینتی و آپارتمانی افت شدید کیفی گیاه است (Salehzadeh *et al*., 2022).

داودی[۱] به‌دلیل تنوع در شکل و رنگ یکی از محبوب‌ترین گیاهان زینتی در سراسر جهان به‌شمار می‌رود (Zalewska *et al*., 2007). داودی به بسیاری از بیمارگرهای گیاهی ازجمله قارچ‌ها، باکتری‌ها همچنین، ویروس‌ها، ویروئیدها، نماتدها و فیتوپلاسماها حساس بوده و بیمارگرهای فوق بخصوص ویروس‌ها از عوامل برجسته و محدودکننده در صنعت تولید داودی به‌شمار می‌روند (Gao *et al*., 2023). روش اصلی و سنتی تکثیر داودی (تکثیر رویشی) گیاه را مستعد آلودگی‌های ویروسی می‌کند. استفاده از بوته‌ی مادری آلوده به ویروس، تعداد گیاهچه‌های آلوده را افزایش می‌دهد (Cho *et al*., 2013). بیش از ۱۰ ویروس مهم و مختلف گزارش شده است که داودی را آلوده کرده و خسارت وارد می‌کنند. ویروس موزائیک خیار[۲]، ویروس B داودی[۳]، ویروس لکه‌نکروز خفیف داودی[۴]، ویروس موزاییک تنباکو[۵]، ویروس بی بذری گوجه‌فرنگی[۶]، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی[۷]، ویروس دهلی‌نو پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی[۸]، ویروس موزاییک شلغم[۹] و ویروس موزائیک زرد کدو[۱۰] از جمله‌ی این ویروس‌ها هستند (Cho *et al*., 2013).

سرده نیلوفر پیچ[۱۱] به نام نیلوفر پیچ عَشَقه‌ای یا نیلوفر پیچ درختچه‌ای نیز شهرت دارد. گیاهی با ساقه نرم و لطیف و دارای برگ‌های سه‌قسمتی است. گل‌های قیفی شکل آن در رنگ‌های سفید تا صورتی میخکی، آبی و ارغوانی ظاهر و شکوفا می‌گردد. ارتفاع گیاه به حدود ۴ متر می‌رسد و فصل گلدهی در آن اغلب تابستان است. این گیاه نیز همانند سایر جنس‌های موجود در تیرهٔ سیب زمینی سانان (*Solanaceae*) مستعد آلودگی‌های ویروسی بخصوص ویروس‌های جنس پوتی‌ویروس[۱۲] است (Eguez, 2017).

۱- *Dendranthema×grandiflorum* ۲- Cucumber mosaic virus, CMV ۳- Chrysanthemum virus B, CVB
۴- Impatient necrotic spot virus, INSV ۵- Tobacco mosaic virus, TMV ۶- Tomato aspermy virus, TAV
۷- Tomato spotted wilt ,virus, TSWV ۸- Tomato leaf curl New Dehli virus, ToLCNDV
۹- Turnip mosaic virus, TuMV ۱۰- Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV ۱۱- *Ipomoea* sp. ۱۲- Potyvirus

دیفن‌باخیا[۱] نام یک سرده از تیره گل شیپوریان[۲] است. این گیاه برگ زینتی بومی آمریکای استوایی یا مرکزی است. ساقه‌ها در این گیاه نرم و آبکی و نقش و رنگ برگ‌ها سبز رنگ بوده و آراسته به لکه‌های سفید کرمی و زرد کمرنگ است که از دو طرف برگ دیده می‌شوند. ساقه‌ها غالباً بدون انشعاب و برگ‌های انتهایی، همیشه در حال رشد و فعالیت می‌باشند. با رشد گیاه برگ‌های پایینی به‌تدریج زرد شده و می‌ریزند و ساقه حالت سخت به خود می‌گیرد. بیشترین عواملی که به این گیاه آسیب وارد می‌کنند عوارض فیزیولوژیکی یا تنش‌های غیرزیستی می‌باشند. این گیاه نسبت به عدم تهویه هوای اتاق و آبیاری نامنظم حساس است. در بین ریزموجودات بیمارگر گیاهی یکی از مهم‌ترین عوامل خسارتزایی که برای این گیاه از سرتاسر دنیا گزارش شده است بیمارگرهای باکتریایی به‌خصوص پکتوباکتریوم‌ها[۳] هستند. این گیاه همچنین مستعد آلودگی‌های ویروسی بخصوص ویروس‌های جنس *Potyvirus* و ویروس موزائیک خیار (CMV) است (Banerjee *et al*., 2024).

در چند سال اخیر نشانه های مشکوک به بیماری‌های ویروسی بر روی گل‌ها و گیاهان زینتی در فضای سبز و گلخانه‌ها در مناطق مختلف کشور به‌خصوص در جنوب ایران در حال گسترش است (Salehzadeh *et al*., 2024a). به‌منظور شناسایی دقیق عوامل ایجاد کننده این علایم و تفکیک آنها از نشانه های بیماری‌هایی که توسط سموم بزاق حشرات یا کمبودهای عناصر غذایی به وجود می‌آیند، لازم است تا با استفاده از روش‌های قابل اعتماد نسبت به تشخیص احتمال وقوع عوامل ویروسی موجود در این گیاهان اقدام گردد. در این پژوهش با استفاده از روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اقدام به ردیابی و شناسایی عوامل ویروسی ایجادکننده بیماری در گیاهان زینتی شامل: داودی، نیلوفر پیچ و دیفن‌باخیا از مناطق مختلف ایران شد و پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جهت شناسایی قطعات حاصل، تعیین ترادف نوکلئوتیدی دوطرفه انجام شد. در ادامه موقعیت جدایه‌های ویروسی ایرانی نسبت به تعدادی از جدایه‌های گزارش شده از دنیا با ترسیم درخت تبارنما مشخص گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و نگهداری نمونه‌ها:

برای ردیابی و شناسایی ویروس‌های آلوده کننده، نمونه‌برداری از برخی گل‌ها و گیاهان زینتی در برخی مناطق کشور (جدول ۱) در بهار و تابستان سال ۱۴۰۲ انجام گرفت. از هر منطقه نیز یک نمونه به ظاهر سالم به‌عنوان کنترل منفی انتخاب شد که در مراحل بعدی عاری‌بودن آن از ویروس از راه آزمایش های مولکولی ثابت شد. در این پژوهش ۲۰ نمونه‌ی مشکوک به آلودگی ویروسی از گیاه داودی و چهار نمونه‌ی سالم از استان‌های تبریز، تهران، شیراز و یزد، پنج نمونه مشکوک به نشانه های ویروسی از نیلوفر پیچ و یک نمونه به ظاهر سالم از دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز و درنهایت پنج نمونه مشکوک به نشانه های ویروسی به‌همراه یک نمونه‌ی به‌ظاهر سالم از برگ‌های دیفن‌باخیا از یزد جمع‌آوری شد (جدول ۱).

مشخصات فنوتیپی برگ‌های نیلوفر پیچنده دارای نشانه های ویروسی

نمونه‌ها بر اساس نشانه های مشاهده شده و معمول ویروس در برگ‌های نیلوفر پیچنده شامل: بدشکلی و لکه‌های سبزرد در برگ (عدم وجود حشرات مکنده در پشت برگ) (شکل ۴)، بدشکلی موزاییک در برگ (عدم وجود کنه و آفات در پشت برگ) در دیفن باخیا و بدشکلی (شکل ۶)، وجود لکه های کلروز و موزاییک خفیف در برگ‌های داودی (عدم وجود کنه و

۱- *Dieffenbachia* sp. ۲- *Araceae* ۳- *Pectobacterium* spp.

آفات در پشت برگ) (شکل ۲) به تعداد پنج نمونه جمع‌آوری و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز منتقل شدند (شکل ۴).

جدول ۱- محل نمونه‌برداری و تعداد جدایه‌های گیاهی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران.

Table 1- Sampling location and number of plant isolates collected from different regions of Iran.

میزبان Host	محل نمونه‌برداری Sampling location	تعداد جدایه Number of isolates	شماره شکل Figure number	نمونه ی به ظاهر سالم An apparantly healthy sample
داودی *Dendranthema×grandiflorum*	Tabriz	5	Figure 2, B	1
نیلوفر پیچنده *Ipomoea* sp.	Tehran	5	Figure 2, A, C	1
دیفن باخیا *Dieffenbachia* sp.	Shiraz	5	Figure 2, D	1
	Yazd	5	Figure 2, E	1
	Shiraz	5	Figure 4	1
	Yazd	5	Figure 6	1

استخراج آر.ان.ای و ساخت cDNA

استخراج آرانای کل از نمونه‌ها با استفاده از روش Rowhani و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییرات انجام شد. در این روش ۰/۱ گرم از برگ آلوده در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج سرد پودر شد. جهت انجام آر تی پی سی آر برای ردیابی ویروس‌های مختلف از جفت آغازگرهای نام برده شده (جدول ۲) به‌صورت جداگانه برای هر جدایه‌ی جمع‌آوری شده در ۲ تکرار استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با رونوشت برداری معکوس در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در ترموسایکلر مدل Quanta biotech Q-24 انجام شد. مرحله اول برای از بین رفتن ساختار ثانویه و اتصال اولیه آغازگرها و الگو انجام شد و مواد واکنش شامل: یک میکرولیتر آرانای استخراج‌شده همراه ۱/۱ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل و ۰/۴ میکرولیتر از آغازگر معکوس (۵ pmol/µl) در ریزلوله مخلوط شده و سپس در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس جهت جلوگیری از تشکیل مجدد ساختارهای ثانویه ریزلوله‌ها بلافاصله بر روی یخ منتقل شدند. سپس ۷/۵ میکرولیتر از ترکیب حاوی دو میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با رونشت برداری معکوس (RT-buffer) X ۱/۵ میلی‌مولار، dNTP ۴۰ واحد RNasin (نیم میکرولیتر)، ۲۰۰ واحد (نیم میکرولیتر) آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (Fermentas, M-MulvLithuania) به هر ریزلوله اضافه شد. پس از اضافه نمودن مخلوط تهیه‌شده به هر کدام از ریزلوله ها برابر با دستورالعمل به‌مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند و سپس دوباره به دستگاه ترموسایکلر منتقل و تحت یک برنامه شامل: یک ساعت در ۴۲ درجه‌ی سلسیوس مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، قرار داده شدند. سپس در ۷۰ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌منظور غیرفعال نمودن آنزیم نسخه‌بردار معکوس قرار داده شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در

حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۲ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲/۵ پیکومول آغازگر پیشرو (آغازگر برگشتی در ساخت cDNA استفاده شده بود و در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از آغازگر پیشرو استفاده شد) و ۱/۲۵ واحد آنزیم *Taq*DNA polymerase (Fermentas Lithuania) بود. سپس ۲/۵ میکرولیتر از cDNA ساخته‌شده (۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) در واکنش آرتی پی‌سی‌آر به این ترکیب اضافه شد.

استخراج دی. ان. ای. از نمونه‌ها برای احتمال ردیابی ویروس‌های دی.ان.ای‌دار (بگوموویروس‌ها[1])

در این روش مقدار ۰/۲ گرم بافت برگ درون لوله‌های ریزلولههای ۱/۵ میلی‌لیتری با استفاده از ازت مایع به صورت پودر در آمد و مقدار ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (2.5% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% 2-mercaptoethanol) به بافت مورد نظر اضافه گردید و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار گرفت و هر از چند دقیقه لوله‌ها بهم زده شدند. سپس ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم–ایزوآمیلالکل (به نسبت ۲۴: ۱) به عصاره افزوده گردید و پس از ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شدند. رونشین تشکیل شده به ریزلوله جدید منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از حذف ایزوپروپانول، رسوب دی‌انا با ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ ٪ شستشو و مطابق قبل سانتریفوژ شد و سپس در دستگاه تغلیظ کننده[2] خشک شد و در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شد (Bhat & Jarret, 1995).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[3]

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر(شرکت Techne با مدل FTGENE2D) انجام شد. واکنش در یک حجم ۲۵ میکرولیتری (10 mM dNTPs (0.5 µl), 10 µM Virion-sense strand primer (1 µl) , 10 µM Complementary-sensen strand primer (1 µl) , 10x buffer (2.5 µl) , $MgCl_2$ 50 Mm (0.75 µl) , *Taq* DNA polymerase 5 U/µl (0.25 µl) , DNA template (1 µl) and Deionized water (up to 25 µl)) و مطابق با برنامه ذکر شده انجام شد. در پی سی آر از پروفیل حرارتی یک سیکل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، سی و پنج سیکل متشکل از ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. دمای اتصال هر کدام از آغازگرها در جدول ۲ آمده است.

۱- Begomoviruses ۲- Concentrator ۳- Polymerase Chain Reaction, PCR

جدول ۲- نام، توالی، و موقعیت نوکلئوتیدی آغازگرهای عمومی و اختصاصی مورد استفاده در این پژوهش.

Table 2- Name, sequence, and nucleotide position of the degenerates and specific primers used in this research.

منابع References	اندازه قطعه مورد انتظار (bp) The Fragment Size	دمای اتصال (Annealing)	جنس ویروس Virus Genus	توالی آغازگرها Sequence of Primers	نام آغازگر Primers
(Gibbs *et al*., 1997)	350	58	*Potyvirus*	5'GTTTGYGTIG AYGYTTYAAYAA 3' 5'CCNGTYGGIAGITGICIACAICT3'	Nib2F Nib3R
(Li *et al*., 2018)	880	62	*Tobamovirus*	3' TKGAYGGNGTBCCNGGNTGYGG 5' 3'ACNGAVTBNABCTGTAATTGCTAT5'	TobamodF TobamodR
(Rizos *et al*., 1992)	675	57	*Cucumovirus*	5'-GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA-3' 5'-TCIACIACIGTIGAIGGYTGNCC-3'	CMVCP-F CMVCP-R
Deng *et*) (*al*., 1994	550	58	*Begomovirus*	5'-TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA-3'	primerB[C]
Rojas *et*) (*al*., 1993				5'-TAATATTACCGGWTGGCC -3'	primer181[V]
(Gibbs *et al*., 1998)	840	59	*Potexvirus*	5´- CAYCARCARGCXAARGAYSA-3´ 5´-TCDGTR TTDGCRTCRAADGT-3´	Potex1 Potex2

انجام الکتروفورز و خالص سازی محصول PCR

به منظور ارزیابی نتایج حاصل از RT-PCR، الکتروفورز افقی در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید در بافر 0.5X TBE انجام گردید . به این منظور یک گرم آگاروز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE[۱] حل و به مدت چند دقیقه جوشانده شد. پس از رسیدن دما به ۶۰ درجه سلسیوس جهت رنگ آمیزی ژل، شش میکرولیتر اتیدیوم بروماید (۵۰ µg/mL) به آن اضافه شد. پنج میکرولیتر از محصول PCR با پنج میکرولیتر رنگ بروموفنول بلو مخلوط و در چاهک‌ها ریخته شد. پس از قرار دادن محفظه الکتروفورز، ولتاژ دستگاه در ۹۸ ولت تنظیم و به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. پس از پایان زمان مذکور، ژل برروی صفحه UV transilluminator مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از دستگاه Gel documentation از آن عکسبرداری شد. در ژل الکتروفورز، نشانگر مولکولی Gen Ruler TM DNA Ladder Mix (Fermentas) مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی

به‌منظور تعیین ترادف نوکلئوتیدی، قطعه تکثیر یافته مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل (QIAGEN) و طبق دستور العمل شرکت سازنده خالص‌سازی شد و به شرکت سینوهه شیراز برای ترادف‌یابی دو طرفه ارسال گردید. برای بررسی تشابه دی.ان.ای. تعیین ترادف شده با توالی‌های موجود، ترادف‌های به‌دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST Nucleotide با ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه شد.

بررسی ترادف‌ها و ترسیم درخت تبارنما

با استفاده از نرم‌افزار Clustal X (Larkin *et al*., 2007) هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های نوکلئوتیدی حاصل با ترادف نوکلئوتیدی

۱- Tris-Borate-EDTA

جدایه‌های موجود در بانک‌ژن مورد مقایسه قرار گرفت و درصد تشابه آن‌ها با نرم‌افزار Megalign تعیین شد. درخت تبارنمای مربوطه توسط نرم‌افزار MEGA 8.0 (Tamura *et al*., 2007) ترسیم و مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت.

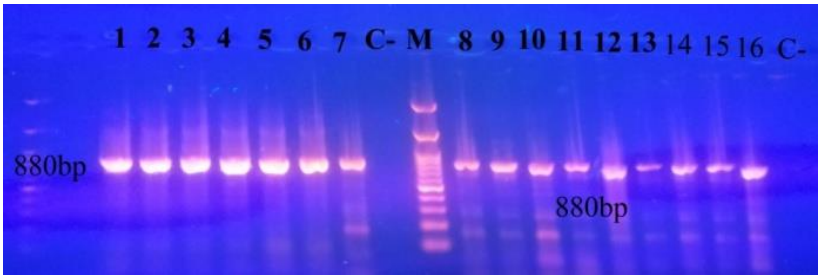
نتایج و بحث

مشخصات فنوتیپی برگ‌های داودی دارای نشانه های ویروسی

مشاهدات میدانی و جمع‌آوری نمونه‌ها از چهار استان مختلف (جدول ۱) نشان داد که تنوع زیادی از نشانه های ویروسی روی گیاهان زینتی مورد بررسی در این پژوهش در مناطق مختلف کشور به خوبی قابل مشاهده است. این تنوع علائم به احتمال زیاد ناشی از آلودگی‌های مخلوط، جدایه‌ی ویروسی و نوع ارقام کشت‌شده در این مناطق است. (شکل ۲، جدول ۱).

شناسایی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی عامل ویروسی در داودی

در واکنش RT-PCR، با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی توباموویروس‌ها (TobamodR, TobamodF) (جدول ۲) مبتنی‌بر بخشی از ژن پروتئین پوششی قطعاتی به اندازه‌ی ۸۸۰ جفت‌باز تکثیر شدند. این قطعات در نمونه‌های به ظاهر سالم تکثیر نشدند (شکل ۱) . تعیین توالی قطعه تکثیر شده در جدایه های توباموویروس داودی نشان داد که ۹۷/۲۱٪-۹۹/۵۶٪ با جدایه‌های TMV موجود در ژن‌بانک بر اساس ناحیه‌ی توالی یابی شده (CP) دارای هویت مشترک هستند. بنابراین جدایه-های مذکور به عنوان TMV (ویروس موزاییک تنباکو) شناسایی شدند.



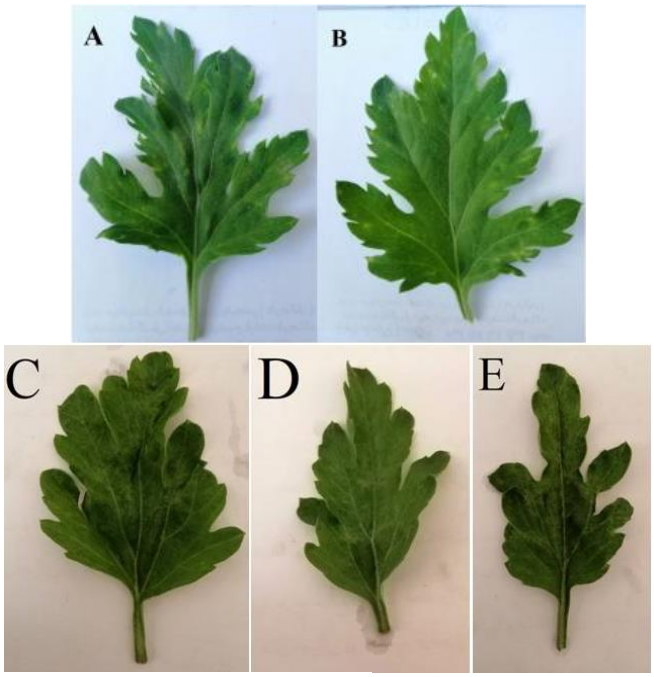
شکل ۱- نتایج آزمون RT-PCR در ژل آگارز ٪ ۱ شامل نمونه‌های آلوده به توباموویروس از گیاه داودی، ۲ نمونه به عنوان شاهد منفی (جدایه‌های به ظاهر سالم جمع‌آوری شده از مزرعه) در نظر گرفته شد (چاهک‌های -C).

Figure 1- The results of RT-PCR test in 1% agarose gel including samples infected with Tobamovirus from the chrysanthemum plant, 2 samples were considered as negative control (apparently healthy isolates collected from the field) (C-).

شناسایی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی عامل ویروسی در نیلوفر پیچنده

در واکنش RT-PCR، با استفاده از یک جفت آغازگر دژنره پوتی‌ویروس‌ها (Nib2F, Nib3R) (جدول ۲) مبتنی بر ژن تولید کننده‌ی پروتئین‌های هسته ای ویروس[۱] قطعاتی به اندازه‌ی ۳۵۰ جفت‌باز تکثیر شدند (شکل ۳).تعیین توالی قطعه به دست آمده نشان داد که ۹۹/۲۶ درصد با جدایه ای از ویروس SPVG (ویروس G سیب زمینی شیرین) قرابت دارد. لذا این جدایه به عنوان ویروس SPVG مورد شناسایی قرار گرفت.

۱- Nuclear inclusion body



شکل ۲- نشانه های بیماری ویروسی روی برگهای داودی شامل: نشانه های تغییر شکل برگ (**A, C, E, D**)، کاهش قابل‌توجه در اندازه برگ (**D, E**)، لکه‌های کلروز (**B**)، بدشکلی برگ و موزائیک خفیف تا شدید (**A, B, C, D, E**) (این نمونه پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی به‌عنوان **TMV** شناخته شدند).

Figure 2- Symptoms of viral disease on chrysanthemum leaves include: symptoms of leaf deformation (A, C, E, D), significant reduction in leaf size (D, E), chlorosis spots (B), leaf deformity and Mild to severe mosaic (A, B, C, D, E) (this sample was identified as TMV after determining the nucleotide sequence).

شکل ۳- نتایج آزمون**RT-PCR** در ژل آگارز ٪ ۱ شامل نمونه‌های آلوده به پوتی ویروس ها از گیاه نیلوفر پیچنده.

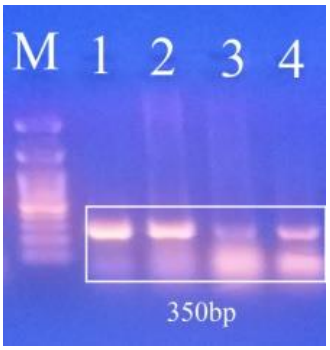
Figure 3- The results of the RT-PCR test in 1% agarose gel including samples infected with Potyvirus from the *I. tricolor* plant

شکل ۴- نشانه های بیماری ویروسی روی برگ‌های نیلوفر پیچ شامل: لکه‌های سبزرد، بدشکلی و کاهش اندازه برگ (این نمونه پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی به‌عنوان **SPGV** شناخته شدند).

Figure 4- The symptoms of viral disease on the leaves of Ipomea sp. include: Cholorosis spots, deformity and reduced leaf size (this sample was identified as SPGV after determining the nucleotide sequence).

شناسایی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی عامل ویروسی در دیفن باخیا

در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی پوتی‌ویروس‌ها (Nib2F, Nib3R) (جدول ۲) قطعاتی به اندازه‌ی ۳۵۰ جفت‌باز در جدایه دیفن باخیا تکثیر شدند (شکل ۵). تعیین توالی قطعه به دست آمده نشان داد که (۹۹/۰۶٪)درصد با جدایه ای از ویروس DsMV (ویروس موزاییک دیفن باخیا) قرابت دارد. لذا این جدایه به عنوان ویروس DsMV مورد شناسایی قرار گرفت.



شکل ۵- نتایج آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس در ژل آگارز ۱٪ شامل نمونه‌های آلوده به پوتی‌ویروسها از گیاه دیفن باخیا.

Figure 5- The results of RT-PCR test in 1% agarose gel including samples infected with Potyvirus from *Dieffenbachia* sp. Plants.

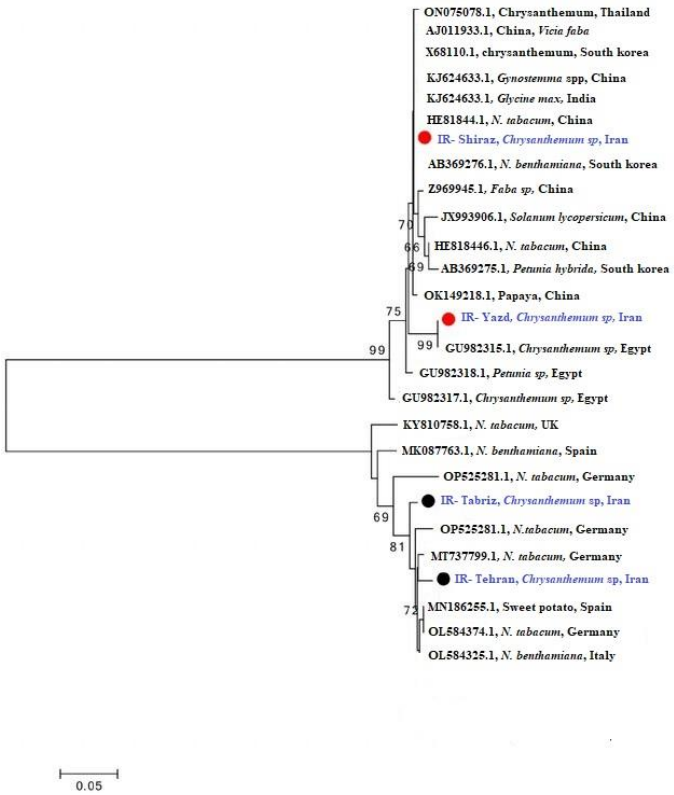
شکل ۶- نشانه های بیماری ویروسی روی برگ‌های دیفن‌باخیا شامل: نشانه های موزاییک، بدشکلی و کاهش اندازه برگ (این نمونه پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی به‌عنوان DsMV شناخته شدند).

Figure 6- Symptoms of viral disease on *Dieffenbachia* leaves including mosaic symptoms, deformity, and reduced leaf size (this sample was identified as DsMV after determining the nucleotide sequence).

آنالیز تبارزایی مربوط به جدایه‌های TMV توالی‌یابی شده از داودی در ایران

در این بررسی چهار جدایه (یک جدایه نماینده از هر شهرذکر شده در مواد و روش ها) از گیاهان داودی آلوده توالی‌یابی و توالی‌های حاصل با اطلاعات سایر جدایه‌های مختلف موجود در بانک اطلاعات ژنی (۲۴ جدایه) مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل درخت تبارزائی تأیید کرد که جدایه‌های TMV توالی‌یابی‌شده در داودی در این پژوهش ۹۷/۲۱٪-۹۹/۵۶٪ با جدایه‌های TMV موجود در ژن‌بانک بر اساس ناحیه‌ی توالی یابی شده (CP) دارای هویت مشترک هستند. چنانچه مشاهده می‌شود چهار جدایه‌های بررسی شده ایرانی در چهار خوشه جداگانه قرار گرفتند (شکل ۷). موقعیت جدایه‌های ایرانی در بین

سایر جدایه‌ها متمایز است و این موضوع احتمالا بخاطر منشأ جغرافیایی متفاوت در آنها می‌باشد. نتیجه‌ی این بررسی‌ها نشان داد که جدایه‌های تبریز و تهران بیشترین شباهت را با جدایه‌های اروپایی TMV گزارش‌شده از میزبان‌های مختلف دارند. جدایه‌ی شیراز بیشترین شباهت را با جدایه‌های شرق آسیا مخصوصا جدایه‌های چینی داشت. درنهایت جدایه‌ی یزد در کنار جدایه‌های TMV گزارش شده از مصر در یک خوشه قرار گرفتند.



شکل ۷- تجزیه تبارزائی به‌روش maximum likelihood[1] بدست آمده از همردیف‌سازی توالی‌های ۸۸۰ نوکلئوتیدی از ژن پروتئین پوششی از ۴ جدایه‌ی TMV جمع‌آوری شده از ۴ استان کشور. جدایه‌های با فاصله‌ی ژنتیکی یکسان حذف شده‌اند و ۲۴ جدایه مرتبط با هم در درخت فیلوژنتیک مشاهده می شود. تعداد ۱۰۰ تکرار bootstrap [۲] برای حصول اطمینان از روابط فیلوژنتیک به کار رفته است. مقادیر bootstrap بیشتر از ۶۶ روی گره‌ها نشان داده شده‌اند و ریشه‌های با ارقام کمتر از آن فشرده شده‌اند.

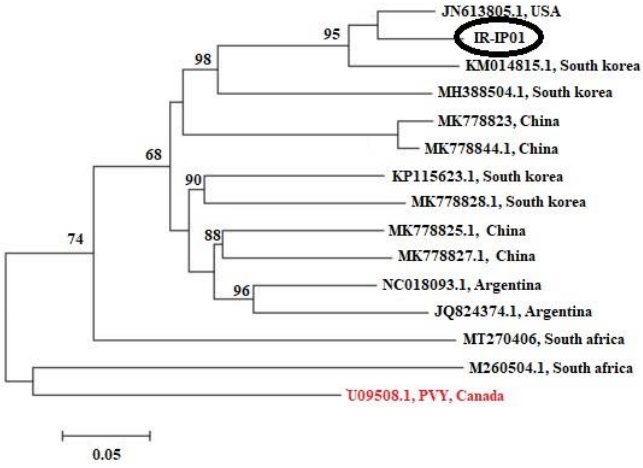
Figure 7- Phylogenetic analysis by maximum likelihood method obtained from the alignment of 880 nucleotide sequences of coat protein gene from 4 TMV isolates collected from 4 provinces of the country. Isolates with the same genetic distance have been removed and 24 related isolates are observed in the phylogenetic tree. 100 bootstrap replicates were used to ensure phylogenetic relationships. Bootstrap values greater than 69 are shown on the nodes and the roots with lower.

آنالیز تبارزایی مربوط به جدایه SPVG توالی‌یابی شده از نیلوفر پیچ در ایران

توالی جدایه‌ی نماینده با توالی‌های سایر جدایه‌های مختلف موجود در Genbank (۱۴ جدایه) مقایسه شدند. هم‌ردیفی توالی جدایه SPVG با سایر جدایه‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنتیکی NCBI نشان داد که جدایه‌ی ایرانی بیشترین شباهت (۹۹٪/۲۶) را به یک جدایه از کشور آمریکا با رس‌شمار JN613805.1 گزارش شده از روی گیاه *Ipomea betata* داشت. در

۱- تخمین درست نمایی بیشینه
۲- حداکثر مقادیر معیار صحت به تخمین‌های نمونه های آنالیز تبارزایی

این واکاوی از یک جدایه مربوط به ویروس Y در سیب‌زمینی (PVY) به‌عنوان گروه خارجی (Out Group) استفاده شد (شکل ۸).



شکل ۸- تجزیه فیلوژنتیکی به روش maximum likelihood بدست آمده از همردیف‌سازی توالی‌های ۳۵۰ نوکلئوتیدی از ژن Nib از جدایه‌ی ویروس جی سیب‌زمینی شیرین[1] جمع‌آوری شده از شیراز. جدایه‌های با فاصله‌ی ژنتیکی یکسان حذف شده‌اند و ۱۴ جدایه مرتبط با هم در درخت فیلوژنتیک مشاهده می شود. تعداد ۱۰۰ تکرار bootstrap برای حصول اطمینان از روابط فیلوژنتیک به کار رفته است. مقادیر bootstrap بیشتر از ۶۶ روی گره‌ها نشان داده شده‌اند و ریشه‌های با ارقام کمتر از آن فشرده شده‌اند. یک جدایه از گونه potato virus Y, PVY به عنوان outgroup به کار رفت.

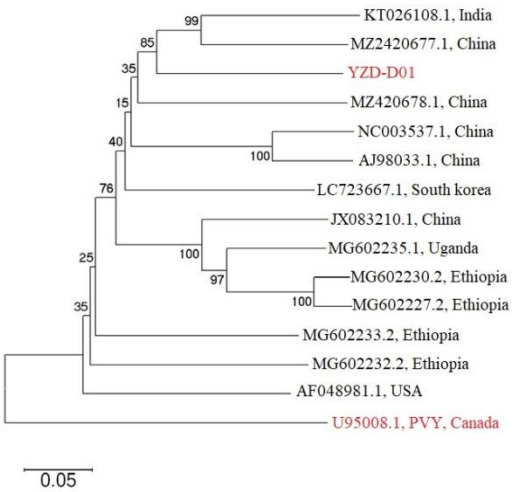
Figure 8- Phylogenetic analysis by maximum likelihood method obtained from the alignment of 350 nucleotide sequences of NIb gene from SPVG isolate collected from Shiraz. Isolates with the same genetic distance have been removed and 14 related isolates are observed in the phylogenetic tree. 100 bootstrap replicates were used to ensure phylogenetic relationships. Bootstrap values greater than 66 are shown on the nodes, and the roots with lower numbers are compressed. An isolate of potato virus Y, PVY was used as an outgroup.

ج) آنالیز تبارزایی مربوط به جدایه DsMV توالی‌یابی شده از دیفن باخیا در ایران

زیرهمچینی جدایه‌ی ویروس موزاییک دیفن‌باخیا[2] ایرانی توالی‌یابی شده با سایر جدایه‌های مشابه در پایگاه داده‌های اطلاعات ژنتیکی یا NCBI نشان داد که جدایه‌ی یزد بیشترین تشابه (۹۹/۰۶٪) را با یک جدایه از DsMV گزارش شده از دیفن‌باخیا از کشور چین با رس‌شمار MZ2420677.1 دارد. تجزیه و تحلیل درخت تبارزائی تأیید کرد که جدایه‌ی DsMV دیفن باخیای توالی‌یابی‌شده در این پژوهش در کنار جدایه‌های آسیایی (جدایه‌های هند و چین) قرار گرفت و کمترین تشابه را با جدایه های آفریقایی و آمریکایی دارد. در این واکاوی از یک جدایه مربوط به ویروس Y در سیب‌زمینی (PVY) با رسشمار U95008.1 گزارش شده از کانادا به‌عنوان گروه خارجی (Out Group) استفاده شد (شکل ۹).

۱- Sweet Potato Virus G, SPVG

۲- Dasheen mosaic virus, DsMV



شکل ۹- تجزیه فیلوژنتیکی به روش maximum likelihood بدست آمده از همردیف‌سازی توالی‌های ۳۵۰ نوکلئوتیدی از ژن Nib از جدایه‌ی DsMV نماینده از یزد. جدایه‌های با فاصله‌ی ژنتیکی یکسان حذف شده‌اند و ۱۴ جدایه مرتبط با هم در درخت فیلوژنتیک مشاهده می شود. تعداد ۱۰۰ تکرار bootstrap برای حصول اطمینان از روابط فیلوژنتیک به کار رفته است. مقادیر bootstrap بیشتر از ۲۵ روی گره‌ها نشان داده شده‌اند و ریشه‌های با ارقام کمتر از آن فشرده شده‌اند. یک جدایه از گونه Potato virus Y, PVY به عنوان outgroup به کار رفت.

Figure 9- Phylogenetic analysis by maximum likelihood method obtained from the alignment of 350 nucleotide sequences of NIb gene from DsMV isolate collected from Yazd. Isolates with the same genetic distance have been removed and 14 related isolates are observed in the phylogenetic tree. 100 bootstrap replicates were used to ensure phylogenetic relationships. Bootstrap values greater than 25 are shown on the nodes, and the roots with lower numbers are compressed. An isolate of potato virus Y, PVY was used as an outgroup.

پوتی‌ویروس‌ها (*Potyviridae*) یکی از بزرگترین گروه‌های ویروس‌های گیاهی هستند و بعد از جمینی‌ویروس‌های[۱] بیمارگر گیاهی بیشترین خسارت را در بین ویروس‌های بیمارگر در گیاهان ایجاد می‌کنند (Mäkinen *et al*., 2023). به‌دلیل آسانی انتقال این ویروس‌ها (مکانیکی، بذر، شته‌ها، کنه‌ها)، ردیابی آن‌ها به منظور کنترل بیماری‌های ناشی از آن‌ها در گیاهان زینتی و فضای سبز مهم می‌باشد. تاکنون گونه‌های مختلفی از جنس پوتی‌ویروس از گیاهان زینتی متنوعی از ایران شامل اختر[۲] (Salehzadeh *et al*., 2022)، پتونیای مکزیکی[۳] (Salehzadeh *et al*., 2022)، کوکب[۴] (Salehzadeh *et al*., 2022)، زعفران[۵] (Parizad *et al*., 2018) (Tavoosi *et al*., 2023)، نرگس[۶] (Valouzi *et al*., 2022)، زنبق[۷] (Naseri *et al*., 2022)، آنتوریوم[۸] (Ghotbi & Nooh, 2022)، گلیسین[۹] (Al-Jaberi *et al*., 2019)، شوکران زینتی[۱۰] (Nury *et al*., 2020)، آفتابگردان[۱۱] (Rabiee *et al*., 2015) و... گزارش شده و انتشار ویروس در حال توسعه است. صادرات نهاده‌های کشاورزی، قلمه، بذر و اعمال قرنطینه‌ی ضعیف داخلی و مرزی... از دلایل اصلی ورود ویروس‌های مرتبط با گل‌های زینتی به کشور و گسترش آن در استان‌های مختلف و میزبان‌های جدید می‌باشد (Salehzadeh, 2018).

۱- Gemeniviruses ۲- *Canna indica* ۳- *Rudbeckia hirta* ۴- *Dahlia* sp. ۵- *Crocus sativus* ۶- *Narcissus* sp.
۷- *Iris* sp. ۸- *Anthurium* sp. ۹- *Wisteria* sp. ۱۰- *Conium maculatum* ۱۱- *Helianthus* sp.

در این بررسی نشانه های فنوتیپی مرتبط با SPVG نیلوفر پیچ شامل لکه های سبزرد و در برخی موارد بدشکلی برگ مرتبط با همان نشانه هایی است که در بررسی‌های پژوهشگران مختلف از گیاهان تیره *Solanaceae* گزارش شده است (Maich *et al*., 2019; Wang *et al*., 2013; Almeyda *et al*., 2013; Trenado *et al*., 2007).

همچنین نشانه های موزاییک و بدشکلی مشاهده شده ناشی از آلودگی دیفن‌باخیا به DsMV مشابه نشانه هایی است که پژوهشگران مختلف از روی این گیاه از مناطق مختلف دنیا گزارش نموده اند (Zettler *et al*., 1990; Jordan *et al*., 2000, van den Meer, 1985; Hakkaart, 1976).

توباموویروس‌ها نیز از گیاهان زینتی متنوعی مانند اطلسی[۱] (Alexandre *et al*., 2000)، زنبق دشتی[۲] (Duarte *et al*., 2007)، گل حنا[۳] (Duarte *et al*., 2007)، ارغوان بنفش[۴] (Huang *et al*., 2004)، لبدیسی رونده[۵] (Fisher & Nameth, 2000)، آنسونیا[۶] (Rosner *et al*., 2000)، انگشتانه[۷] (Grant, 1934)، آهار[۸] (Adkins *et al*., 2021)، فلوکس[۹] (Grant, 1934)، آنتوریوم[۱۰] (Grant, 1934)، فاسیلیا[۱۱] (Grant, 1934)، زبان پس قفا[۱۲] (Grant, 1934) و داودی (Verma *et al*., 2003; Zhao *et al*., 2015; Gao *et al*., 2023; Supakitthanakorn *et al*., 2022) در سراسر جهان گزارش شده است. با تاسف، با توجه به اطلاعات ما پژوهشی در مورد ردیابی و شناسایی توباموویروس‌ها، مخصوصا TMV بر روی گیاهان زینتی و آپارتمانی در ایران در دسترس نیست. فقط در یک مورد از روی ختمی چینی[۱۳] (Ghodoum Parizipour *et al*., 2020) وجود این گونه ویروسی گزارش شده است. این ویروس در دنیا بر روی خانواده‌های مهمی از گیاهان زینتی، زراعی، جالیزی و باغی خسارت شدیدی وارد میکند و افزون بر ۷۲۰ گونه ی گیاهی میزبان دارد (Groth-Helms & Zhang, 2024). ویروس‌های این جنس از طریق بذر، انتقال مکانیکی، پیوند، آب آبیاری و... قابلیت انتقال دارند (Groth-Helms & Zhang, 2024). در ایران اطلاعات اندکی روی توباموویروس‌های گیاهان زینتی وجود دارد و بر اساس اطلاعات ما این اولین گزارش از وقوع TMV از روی داودی از ایران است. در این بررسی نشانه های ویروسی مشاهده شده روی داودی ناشی از TMV مشابه نشانه هایی است که پژوهشگران مختلف از داودی از مناطق مختلف دنیا گزارش کرده‌اند . این علایم عمدتاً شامل بدشکلی و موزاییک و ایجاد لکه‌های سبزرد می‌باشد (Zhao *et al*., 2015; Supakitthanakorn et al., 2022).

از آنجایی که شرایط قرنطینه‌ای در کشور ما کمتر رعایت می‌گردد و بر ورود و خروج مواد گیاهی بخصوص گیاهان زینتی کنترل قابل‌توجهی وجود ندارد و بعلاوه گلخانه‌های کشور ما هم کمتر دارای شرایط ایده‌آل برای نگهداری این گیاهان می‌باشند در نتیجه خطر وقوع و گسترش این بیماری‌های خسارت‌زا بسیار اهمیت پیدا می‌کند. با توجه به اینکه در زمینه مطالعه عوامل بیماریزای ویروسی و بخصوص بیماری‌های ویروسی گیاهان زینتی در ایران تحقیقات مدون قابل ملاحظه‌ای صورت نگرفته است، اولین قدم در این زمینه ردیابی و شناسایی این گونه عوامل بیماریزا در گیاهان زینتی و علف‌های هرز همراه با این گیاهان بوده تا اینکه راه برای ادامه مسیر در این باره و از جمله کنترل این عوامل باز گردد (Salehzadeh et al., 2024b). بر این اساس و بدلیل اهمیت کشور در پرورش و کشت گیاهان زینتی در کشور و همچنین بروز و مشاهده نشانه های مشکوک به اینگونه عوامل بیماریزا در روی گیاهان

۱- *Petunia* sp. ۲- *Hemerocallis fulva* ۳- *Impatiens hawkeri* ۴- *Syringa oblata* ۵- *Ajuga reptans*
۶- *Tabernaemontana* sp. ۷- *Digitalis purpurea* ۸- *Zinnia elegans* ۹- *phlox* sp. ۱۰- *Antirrhinum majus*
۱۱- *Phacelia whitlavia* ۱۲- *Delphinium consolida* ۱۳- *Hibiscus rosa-sinensis*

زینتی، نمونه‌برداری مذکور جهت تشخیص و بررسی ویژگی‌های بیماری(های) ویروسی در روی گیاهان زینتی و فضای باز انجام شد. هدف از تحقیق حاضر شناسایی عوامل بیمارگر ویروسی همراه با برخی از گیاهان مانند داودی، نیلوفر پیچنده و دیفن باخیا در مناطق مختلف ایران بود. این موضوع دارای اهمیت بالایی است چرا که بر اساس اطلاعات ما این اولین گزارش از همراهی این‌گونه ویروس‌ها با گیاهان مذکور در ایران می باشد. احتمال آلودگی نمونه های گیاهی جمع‌آوری شده در این تحقیق با سایر ویروس‌های بیمارگر گیاهی با آغازگرهای عمومی مربوط به سایر خانواده‌های ویروسی بررسی گردید. نتایج نشان داد نمونه‌های جمع‌آوری شده، هیچ آلودگی مخلوطی با سایر ویروس‌های بیمارگر گیاهی ندارند.

آنالیز تبارشناسی جدایه‌های ایرانی نشان داد موقعیت جدایه‌های ایرانی در بین سایر جدایه‌ها متمایز است و این مساله احتمالا بدلیل منشأ جغرافیایی متفاوت آن می‌باشد. در حالت کلی جدایه‌های ایرانی بیشترین شباهت را به جدایه‌های مختلف از کشورهای همسایه دارند. درخت تبارزایی نشان داد توزیع جغرافیایی جدایه‌ها با هم همخوانی زیادی ندارد و قرابت فیلوژنتیکی یا هم‌گروه شدن بعضی از جدایه‌های ایرانی با جدایه‌هایی از مناطق مختلف جهان که در بعضی از شاخه‌ها دیده می‌شود هماهنگی توزیع جغرافیایی با قرابت فیلوژنتیک را بر هم میزند. این توزیع نشان می‌دهد که انتشار جهانی و گسترده ویروس‌های مذکور نمی‌تواند تنها به‌وسیله ناقلین طبیعی صورت گیرد و این مسئله احتمال دخالت انسان و به بیان دیگر انتشار و تجارت جهانی قلمه و نهال را تقویت می‌کند (Salehzadeh *et al.*, 2024c). نکته دیگری که بایستی در مورد تنوع جدایه‌های ایرانی بیان کرد این است که این احتمال وجود دارد که جدایه‌های ویروسی موجود در فضای سبز شهری مناطق مختلف یزد بیش از یک‌بار به طرق مختلف به مناطق مختلف ایران وارد شده است.

نتیجه‌گیری

برای نتیجه‌گیری بهتر، شناسایی و تعیین ترادف جدایه‌های ویروسی گزارش‌شده در این پژوهش با سایر جدایه های موجود در مناطق مختلف کشور و از روی گیاهان دیگر نیز ضروری به نظر می‌رسد. این موضوع می‌تواند تهدید جدی برای سایر استان‌های همجوار و حتی سایر محصولات کشاورزی در این مناطق باشد. با توجه به گسترش ویروس‌ها روی گیاهان مختلف در ایران، پیش‌بینی می‌شود که این عامل بیماریزا ناقل یا ناقلین حشره‌ای موثر در منطقه نیز داشته‌اند. در همین راستا مطالعه روی ناقلین ویروس‌های بیمارگر گیاهی و ارائه روش‌های مناسب برای مقابله با این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین، در مناطق مورد بررسی امکان حضور سایر ویروس‌های مربوط به گروه‌های مختلف بر روی محصولات مختلف ضروری به نظر می‌رسد، که نیازمند تحقیقات بیشتر برای دستیابی به این مهم می‌باشد تا با تخمین پراکنش ویروس‌ها بر روی محصولات مختلف اقدامات لازم جهت کاهش خسارت برنامه‌ریزی گردد.

منابع

Adkins, S., Dey, K. K., Warfield, C. Y., Scott-Brown, A., Tian, T., Estévez de Jensen, C., & D Elia, T. (2021). Emerging viruses of ornamentals in Florida and beyond. In *XV International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants, 1392* (pp. 95-98). https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2024.1392.11.

Al-Jaberi, M., Mehrvar, M., & Zakiahgl, M. (2019). Molecular identification of an isolate of Wisteria vein mosaic virus in Khorasan Razavi Province. https://doi.org/10.22067/jpp.v33i1.73604.

Alexandre, M. A. V., Soares, R. M., Rivas, E. B., Duarte, L. M. L., Chagas, C. M., Saunal, H., ... & Richtzehain, L. J. (2000). Characterization of a strain of Tobacco mosaic virus from Petunia. *Journal of Phytopathology*, *148*(11-12), 601-607. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2000.00563.x.

Almeyda, C. V., Abad, J. A., & Pesic-VanEsbroeck, Z. (2013). First report of Sweet potato virus G and Sweet potato virus 2 infecting sweet potato in North Carolina. *Plant Disease*, *97*(11), 1516-1516. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0359-PDN.

Bhat, K. V., & Jarret, R. L. (1995). Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian *Musa germplasm*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *42*, 107-118. https://doi.org/10.1007/BF02539514.

Banerjee, A., Katakam, M., Panja, B., Saha, J., & Nath, P. S. (2017). Diseases of *Dieffenbachia* spp. Caused Fungi, Bacteria, Viruses and Nematodes: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(11), 549-557. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.066.

Cho, W. K., Jo, Y., Jo, K. M., & Kim, K. H. (2013). A current overview of two viroids that infect chrysanthemums: Chrysanthemum stunt viroid and Chrysanthemum chlorotic mottle viroid. *Viruses*, *5*(4), 1099-1113. https://doi.org/10.3390/v5041099.

Duarte, L. M. L., Alexandre, M. A. V., Rivas, E. B., Cattai, M. B., Soares, R. M., Harakava, R., & Fernandes, F. M. C. (2007). Phylogenetic analysis of Tomato mosaic virus from *Hemerocallis* sp. and *Impatiens hawkeri*. *Summa Phytopathologica*, *33*, 409-413. https://doi.org/10.1590/S0100-54052007000400016.

Eguez, F. E. H. (2017). *Sweetpotato Virus C and Its Contribution to the Potyvirus Complex in Sweet potato (Ipomoea Batatas)*. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College.

Gao, K., Chen, Q., Pan, B., Sun, Y., Xu, Y., Chen, D., ... & Huang, C. (2023). Current Achievements and Future Prospects in Virus Elimination Technology for Functional Chrysanthemum. *Viruses*, *15*(8), 1770. https://doi.org/10.3390/v15081770.

Gibbs, A., & Mackenzie, A. (1997). A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. Journal of Virological Methods, 63(1-2), 9-16. doi:10.1016/S0166-0934(96)02103-9.

Ghodoum Parizipour, M. H., & Keshavarz-Tohid, V. (2020). Identification and phylogenetic analysis of a tobamovirus causing hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) mosaic disease in Iran. *Journal of Plant Pathology*, *102*(3), 813-824. https://doi.org/10.1007/s42161-020-00510-9.

Ghotbi, T., & Nooh, S. (2022). Diagnosis of important virus diseases of Ornamental anthurium in screen-houses in Tehran Province. *International Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, *12*(05), 1.http://dx.doi.org/10.31782/IJMPS.2022.12501.

Groth-Helms, D., & Zhang, S. (2024). Common and emerging viral pathogens of annual ornamental plants. In *Viral Diseases of Field and Horticultural Crops* (pp. 765-776). Academic Press.

Grant, T. J. (1934). The host range and behavior of the ordinary Tobacco-mosaic virus.

Hakkaart, F. A. (1976). Virus disease of Dieffenbachia cv. Exotica. *Vakblad voor de Bloemisterij*, *31*(5), 20-21. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1976.59.24.

Huang, J., Deng, C., Fan, Z., Tian, G., & Li, H. (2004). Isolation and identification of Tobacco mosaic virus infecting Syringa oblata. *Acta Phytopathologica Sinica*, *34*(3), 215-220. CABI Record Number: 20043139665.

Fisher, J. R., & Nameth, S. T. (2000). Virus assessment of Ajuga reptans cultivars reveals alfalfa mosaic, tobacco streak, and cucumber mosaic (CMV) viruses, and a CMV satellite RNA. *HortScience*, *35*(2), 230-234.

Jordan, R., Guaragna, M. A., Kinard, G., & Lynn, S. (2000, May). Detection and first report of Dasheen mosaic virus and a second potyvirus infecting the terrestrial orchid Spiranthes cernua. In *X International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants 568* (pp. 253-260). https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.568.37.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*(21), 2947-2948. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404.

Li, Y., Tan, G., Lan, P., Zhang, A., Liu, Y., Li, R., & Li, F. (2018). Detection of tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. *Journal of Virological Methods*, *259*, 122-128. doi:10.1016/j.jviromet.2018.06.012.

Maich, S. L. S. P., Nascimento, M. B., Neves, C. G., Souza Junior, I. T., da Silva, F. N., & Barros, D. R. (2019). First Report on Sweet Potato Symptomless Virus 1 in Ipomoea batatas in State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Plant disease*, *103*(3), 593. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0731-PDN.

Mäkinen, K., Aspelin, W., Pollari, M., & Wang, L. (2023). How do they do it? The infection biology of potyviruses. *Advances in Virus Research*, *117*, 1-79. https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2023.07.001.

Nury, S., Hosseini, A., Gibbs, A. J., & Mohammadi, M. (2020). Poison hemlock virus Y (PHVY), a novel potyvirus from Iranian *Conium maculatum* (Apiaceae). *Australasian Plant Pathology*, *49*, 119-126. https://doi.org/10.1007/s13313-020-00681-0.

Parizad, S., Dizadji, A., Koohi Habibi, M., Winter, S., Kalantari, S., Movi, S., ... & Ayllón, M. A. (2018). Description and genetic variation of a distinct species of Potyvirus infecting saffron (*Crocus sativus* L.) plants in major production regions in Iran. *Annals of Applied Biology*, *173*(3), 233-242. https://doi.org/10.1111/aab.12456.

Rabiee, S., Hosseini, S., & Hosseini, A. (2015). Occurrence and distribution of some sunflower viruses from sunflower fields in Kerman and Isfahan provinces, Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *48*(3), 223-228. https://doi.org/10.1080/03235408.2014.884827.

Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D., & Gillings, M. R. (1992). Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, *73*(8), 2099-2103. doi:10.1099/0022-1317-73-8-2099.

Rowhani, A., Maningas, M. A., Lile, L. S., Daubert, S. D., & Golino, D. A. (1995). Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, *85*(3), 347-352.

Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., & Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, *77*(4), 340-347. doi:10.1094/pd-77-0340.

Rosner, A., Kagan, S., Lampel, S., Beckelman, H., Maslenin, L., Zeidan, M., & Cohen, J. (2000). A new disease in Tabernamontana caused by tobacco mild green mosaic virus. In *X International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants 568* (pp. 103-109). https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.568.13.

Salehzadeh, M., Afsharifar, A., & Farashah, S. D. First report of canna yellow streak virus in Iran. (2022). *Iran Agricultural Research 41*(2)159-163. 10.22099/IAR.2023.47324.1540.

Salehzadeh, M., Afsharifar, A., & Dehghanpour Farashah, S. (2024a). First report of the incidence of potato virus Y in some ornamental plants in Iran. *Iran Agricultural Research*, *42*(1), 47-54. 10.22099/IAR.2023.48019.1550.

Salehzadeh, M., Afsharifar, A., Pakdel, A., & Kiyani, T. (2024b). The first report of the occurrence of alfalfa mosaic virus *on Tropaeolum majus* and *Rudbeckia hirta* in Iran. *Iran Agricultural Research*, *42*(2), 1-3. doi: 10.22099/iar.2024.50526.1613.

Salehzadeh, M., Afsharifar, A., Dehghanpour Farashah, S. (2024c). The first report on the detection and identification of phytoplasma pathogens associated with some ornamental plants of Yazd city. *Flower and Ornamental Plants*, *9* (1), 69-82.

Salehzadeh, M. (2018). Survey on presence of Cucumber mosaic virus (CMV) in single and mixed infections with potyviruses in North-West of Iran. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, *7*(2), 163-173. http://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1397.7.2.4.5.

Supakitthanakorn, S., Vichittragoontavorn, K., Sunpapao, A., Kunasakdakul, K., Thapanapongworakul, P., & Ruangwong, O. U. (2022). Tobacco mosaic virus infection of Chrysanthemums in Thailand: Development of colorimetric reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT–LAMP) technique for sensitive and rapid detection. *Plants*, *11*(14), 1788. https://doi.org/10.3390/plants11141788.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(8), 1596-1599. https://doi.org/10.1093/molbev/msm092.

Tavoosi, M., Moradi, Z., & Mehrvar, M. (2023). Virome analysis of potyvirus populations infecting saffron in Iran: the discovery of a novel potyvirus. *European Journal of Plant Pathology*, 1-14. https://doi.org/10.1007/s10658-023-02767-z.

Trenado, H. P., Lozano, G., Valverde, R. A., & Navas-Castillo, J. (2007). First report of Sweet potato virus G and Sweet potato virus 2 infecting sweet potato in Spain. *Plant Disease*, *91*(12), 1687-1687. https://doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1687C.

Valouzi, H., Shahmohammadi, N., Golnaraghi, A., Moosavi, M. R., & Ohshima, K. (2022). Genetic diversity and evolutionary analyses of potyviruses infecting narcissus in Iran. *Journal of Plant Pathology*, *104*(1), 237-250. https://doi.org/10.1007/s42161-021-00985-0.

van den Meer, F. W. (1985). Occurrence of dasheen mosaic virus in South Africa. *Phytophylactica*, *17*(2), 95-111. https://hdl.handle.net/10520/AJA03701263_987.

Verma, N., Sharma, A., Ram, R., Hallan, V., Zaidi, A. A., & Garg, I. D. (2003). Detection, identification and incidence of Chrysanthemum B carlavirus in chrysanthemum in India. *Crop Protection*, *22*(2), 425-429. https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00184-9.

Wang, L. Y., Cheng, Y. H., Wang, N. Y., Chen, K. C., & Yeh, S. D. (2013). First report of sweet potato virus G infecting sweet potato in Taiwan. *Plant Disease*, *97*(9), 1260-1260. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0111-PDN.

Zhao, X., Liu, X., Ge, B., Li, M., & Hong, B. (2015). A multiplex RT-PCR for simultaneous detection and identification of five viruses and two viroids infecting chrysanthemum. *Archives of Virology*, *160*, 1145-1152. https://doi.org/10.1007/s00705-015-2360-z.

Zettler, F. W., Hartman, R. D., Knauss, J. F., Taylor-Knauss, M. E., & Chase, A. R. (1980, May). Evaluation of Dieffenbachia maculata'perfection'plants free of dasheen mosaic virus. In *V International Symposium on Virus diseases of Ornamental Plants 110* (pp. 259-264). https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1980.110.34

.

Flower and Ornamental Plants (2024), 9(2): 167-184
Research article

Survey and identification of some plant pathogenic viruses from *Dendranthema×grandiflorum*, *Ipomoea* sp., and *Dieffenbachia* sp. from Iran

Mehrdad Salehzadeh[1*], Alireza Afsharifar[1], Saeedeh Dehghanpour Farshah[2], Tayebeh Kiyani Bahramabadi[3]

1. Plant Virology Research Center, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz
2. Agriculture Department, Payam Noor University, Tehran
3. Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz

✉ Mehrdadsalehzadeh@gmail.com

Received: 2024/17/03, Revised: 2024/07/12, Accepted: 2024/07/17

Abstract

The spread of plant pathogenic viruses is exacerbated by vegetative propagation, which facilitates rapid transmission. In the spring and summer of 2022, symptomatic samples of *Dendranthema×grandiflorum* plants exhibiting mosaic symptoms, leaf deformation, and occasional chlorotic spots were collected from green spaces in Tehran, Tabriz, Yazd, and Shiraz. Additionally, *Ipomoea* sp. samples with chlorotic spots were collected from the Faculty of Agriculture at Shiraz University, while *Dieffenbachia* sp. houseplant samples with mosaic symptoms and leaf deformities were obtained from greenhouses in Yazd. To identify the causative viral agents in these symptomatic plants, degenerate primers targeting significant virus families, as well as specific primers for the Cucumber mosaic virus, were utilized. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with Tobamovirus-specific primers, based on a fragment of the viral coat protein, confirmed Tobacco mosaic virus (TMV) infection in symptomatic *Dendranthema* leaves, amplifying an 880 bp fragment. Additionally, RT-PCR on *Ipomoea* sp. and *Dieffenbachia* sp. samples with Potyvirus degenerate primers, targeting the nuclear inclusion body region, amplified 350 bp fragments. Subsequent sequencing confirmed Dasheen mosaic virus (DsMV) in *Dieffenbachia* sp. and Sweet potato virus G (SPVG) in *Ipomoea* sp. Control assays indicated no viral presence in asymptomatic plants. To our knowledge, this study presents the first report of *Dendranthema*, *Ipomoea*, and *Dieffenbachia* species infections with these viruses in Iran.

Keywords: Tobamovirus, Potyvirus, Tobacco mosaic virus, Dashin mosaic virus, Sweet potato virus G.