



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

مهرداد صالح زاده^{۱*}، علیرضا افشاریفر^۱، سعیده دهقانپور فراشاه^۲، طیبه کیانی بهرام‌آبادی^۳

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

به دلیل افزایش رویشی در بیشتر گونه‌های گیاهان زینتی، ویروس‌های بیمارگر گیاهی به سرعت در حال گسترش هستند. در بهار و تابستان سال ۱۴۰۱ نمونه‌هایی از گیاهان داودی با نشانه‌های موزائیک، بدشکلی برگ و گاهی لکه‌های سبز در فضای سبز شهرهای تهران، تبریز، یزد و شیراز و همچنین نمونه‌هایی از نیلوفر پیچ با نشانه‌های لکه‌های سبز در فضای سبز دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز و در پایان نمونه‌هایی از گیاهان آپارتمانی دیفن‌باخیا با نشانه‌های موزائیک و بدشکلی برگ از گلخانه‌های شهر یزد جمع‌آوری شد. برای ردیابی و شناسایی عامل یا عوامل ایجاد کننده‌ی نشانه‌های 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 موزائیک خیار انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با رونوشت برداری معکوس با جفت آغازگرهای عمومی توپاموویروس‌ها مبتنی بر بخشی از پروتئین پوششی ویروس، عامل ایجاد کننده‌ی نشانه‌های ویروسی در برگ‌های آلوده داودی را به عنوان توپاموویروس‌ها 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 مبتنی بر چارچوب خوانشی اینکلوزن‌بادی هسته‌ای ویروس، قطعاتی به طول ۳۵۰ جفت‌باز تکثیر شد. قطعات حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای انجام ترادفیابی نوکلئوتیدی دو طرفه به شرکت سینووه ارسال شد. بر اساس توالی‌یابی انجام شده، عامل ویروسی آلوده کننده در برگ‌های داودی به عنوان ویروس موزائیک تنباکو (Tobacco mosaic virus, TMV)، آلودگی برگ‌های دیفن‌باخیا به ویروس موزائیک داشین (Dasheen mosaic virus, DsMV) و آلودگی نیلوفر پیچ 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: توپاموویروس، پوتی‌ویروس، ویروس موزائیک تنباکو، ویروس موزائیک 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 بیماری‌گرهای مهم و اقتصادی در ارقام مهم گل‌ها و گیاهان زینتی پرداخته و با گزینش ارقام خوب و مقاوم به بیماری‌گرها، به تولید این محصول در سطوح بالا پرداخته‌اند تا بتوانند علاوه بر تأمین نیازهای داخل کشور، مبالغ قابل توجهی ارز از طریق صادرات این محصولات کسب کنند. هر چه کشورها به سمت صنعتی شدن 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 بیماری‌گرهای گیاهی به‌خصوص در ویروس‌های بیمارگر گیاهی به گیاهان زینتی و آپارتمانی افت شدید کیفی گیاه است (Salehzadeh et al., 2022).

داودی^۱ به دلیل تنوع در شکل و رنگ یکی از محبوب‌ترین گیاهان زینتی در سراسر جهان به‌شمار می‌رود (Zalewska et al., 2007). داودی به بسیاری از بیماری‌گرهای گیاهی از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها همچنن، ویروس‌ها، ویروئیدها، نماتدها و فیتوپلاسم‌ها حساس بوده و بیماری‌گرهای فوق به‌خصوص 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 موزائیک تنباکو^۵، ویروس بی‌بذری گوجه‌فرنگی^۶، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی^۷، ویروس دهلی‌نو پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی^۸، ویروس موزائیک 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 عشقه‌ای 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 تیره سبب زمینی سانان (Solanaceae) مستعد آلودگی‌های ویروسی به‌خصوص ویروس‌های جنس پوتی‌ویروس^{۱۲} است (Eguez, 2017).

- ۱- *Dendranthema × grandiflorum* -۲ Cucumber mosaic virus, CMV -۳ Chrysanthemum virus B, CVB
 ۴- Impatiens 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 به تدریج زرد شده و می‌ریزند و ساقه حالت سخت به خود می‌گیرد. بیشترین عواملی که به این گیاه آسیب وارد می‌کند 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 به‌خصوص ویروس‌های جنس *Potyvirus* و ویروس موزائیک خیار (CMV) است (Banerjee et al., 2024).

در چند سال اخیر نشانه‌های 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 ایجادکننده این علائم و تفکیک آنها از نشانه‌های 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 پلیمرز 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 پلیمرز، 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 آلوده‌کننده، 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 آزمایش‌های 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 نشانه‌های ویروسی از نیلوفر پیچ و یک نمونه به ظاهر سالم از دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز و در نهایت پنج نمونه مشکوک به نشانه‌های ویروسی به‌همراه یک نمونه‌ی به‌ظاهر سالم از برگ‌های دیفن‌باخیا از یزد جمع‌آوری شد (جدول ۱).

مشخصات فنوتیپی برگ‌های نیلوفر پیچنده دارای نشانه‌های ویروسی

نمونه‌ها بر اساس نشانه‌های مشاهده شده و معمول ویروس در برگ‌های نیلوفر پیچنده شامل: بدشکلی و لکه‌های سبزر در برگ (عدم وجود حشرات مکنده در پشت برگ) (شکل ۴)، بدشکلی موزائیک در برگ (عدم وجود کنه و آفات در پشت برگ) در دیفن‌باخیا و بدشکلی (شکل ۶)، وجود لکه‌های کلروز و موزائیک خفیف در برگ‌های داودی (عدم وجود کنه و



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 apparently healthy sample
داودی <i>Dendranthema × grandiflorum</i>	Tabriz	5	Figure 2, B	1
نیلوفر پیچنده <i>Ipomoea</i> sp.	Tehran	5	Figure 2, A, C	1
دیفن باخیا <i>Dieffenbachia</i> sp.	Shiraz	5	Figure 2, D	1
	Yazd	5	Figure 2, E	1
	Shiraz	5	Figure 4	1
	Yazd	5	Figure 6	1

استخراج آران‌ای 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 رونوشت برداری معکوس (RT-buffer) ۱/۵ میلی‌مولار، dNTP ۴۰ واحد (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 ریزلوله‌ها 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 میلی مولار $MgCl_2$ ، 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 TaqDNA polymerase (Fermentas Lithuania) بود. سپس ۲/۵ میکرولیتر از cDNA ساخته شده (۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) در واکنش آر تی پی سی آر به این ترکیب اضافه شد.

استخراج دی. ان. ای. از نمونه‌ها برای احتمال ردیابی ویروس‌های دی. ان. ای. دار (بگوموویروس‌ها)^۱

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 (CTAB 2.5%, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0) به بافت مورد نظر اضافه گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار گرفت و هر از چند دقیقه لوله‌ها بهم زده شدند. سپس ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزواکتانول (به نسبت ۲۴:۱) به عصاره افزوده گردید و پس از ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شدند. روشن شدن تشکیل شده به ریزلوله جدید منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از حذف ایزوپروپانول، رسوب دی.ان.ای. با ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو و مطابق قبل سانتریفوژ شد و سپس در دستگاه تغلیظ کننده^۲ خشک شد و در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شد (Bhat & Jarret, 1995).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز^۳

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 μM Virion-sense strand primer (1 μl), 10 mM dNTPs (0.5 μl), 10 μM Complementary-sense 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 به مدت 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.



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.

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

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 بر روی 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

به منظور تعیین ترادف نوکلئوتیدی، قطعه تکثیر یافته مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل (QIAGEN) و طبق دستور العمل شرکت سازنده خالص سازی 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 به دست 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



جدایه‌های موجود در بانک ژن 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 و تحلیل قرار گرفت.

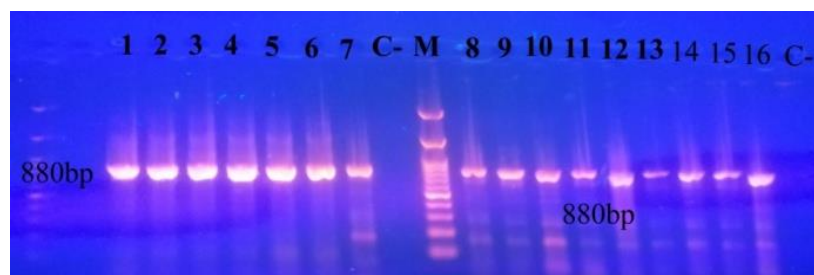
نتایج و بحث

مشخصات فنوتیپی برگ‌های داودی دارای نشانه‌های ویروسی

مشاهدات میدانی و جمع‌آوری نمونه‌ها از چهار استان مختلف (جدول ۱) نشان داد که تنوع زیادی از نشانه‌های 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 توپاموویروس‌ها (TobamodR, TobamodF) (جدول ۲) مبتنی بر 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 جدایه‌های توپاموویروس 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 جدایه‌های مذکور به عنوان TMV (ویروس موزاییک تنباکو) شناسایی شدند.

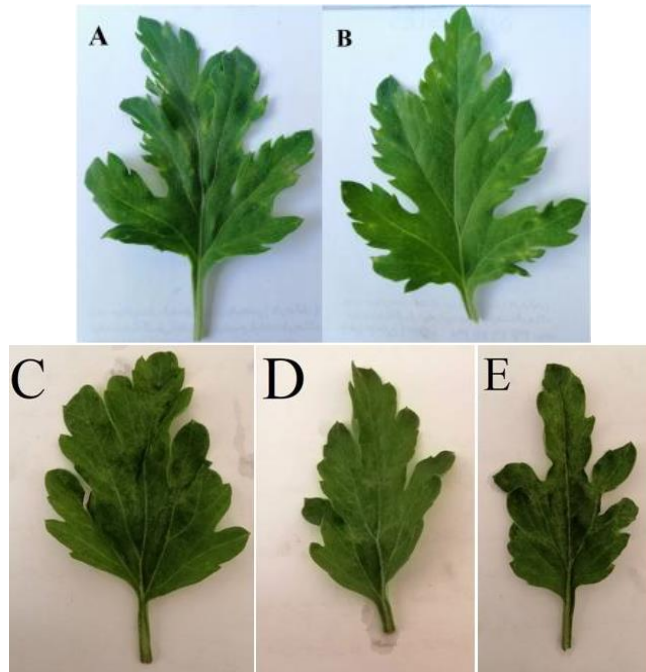


شکل ۱- نتایج آزمون RT-PCR در ژل آگارز ۱٪ شامل نمونه‌های آلوده به توپاموویروس از گیاه داودی، ۲ نمونه به عنوان شاهد منفی (جدایه‌های به ظاهر سالم جمع‌آوری شده از مزرعه) در نظر گرفته شد (چاهک‌های C-).

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 هسته‌ای ویروس^۱ قطعاتی به اندازه‌ی ۳۵۰ جفت‌باز تکثیر شدند (شکل ۳). تعیین توالی قطعه به دست آمده نشان داد که ۹۹/۲۶ درصد با جدایه‌ای از ویروس SPVG (ویروس G سیب زمینی شیرین) قرابت دارد. لذا این جدایه به عنوان ویروس SPVG مورد شناسایی قرار گرفت.



شکل ۲- نشانه های بیماری ویروسی روی برگهای داودی شامل: نشانه های تغییر شکل برگ (A, C, E, D)، کاهش قابل توجه در اندازه برگ (D, E)، لکه های کلروز (B)، بدشکلی برگ و موزائیک خفیف تا شدید (A, B, C, D, E) (این نمونه پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی به عنوان 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 نمونه های 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

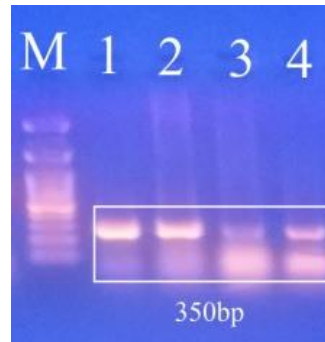


شکل ۴- نشانه های بیماری ویروسی روی برگ های نیلوفر پیچ شامل: لکه های سبزرده، بدشکلی و کاهش اندازه برگ (این نمونه پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی به عنوان SPGV شناخته شدند).

Figure 4- The symptoms of viral disease on the leaves of Ipomea sp. include: Chlorosis 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 جدایه‌ای 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.



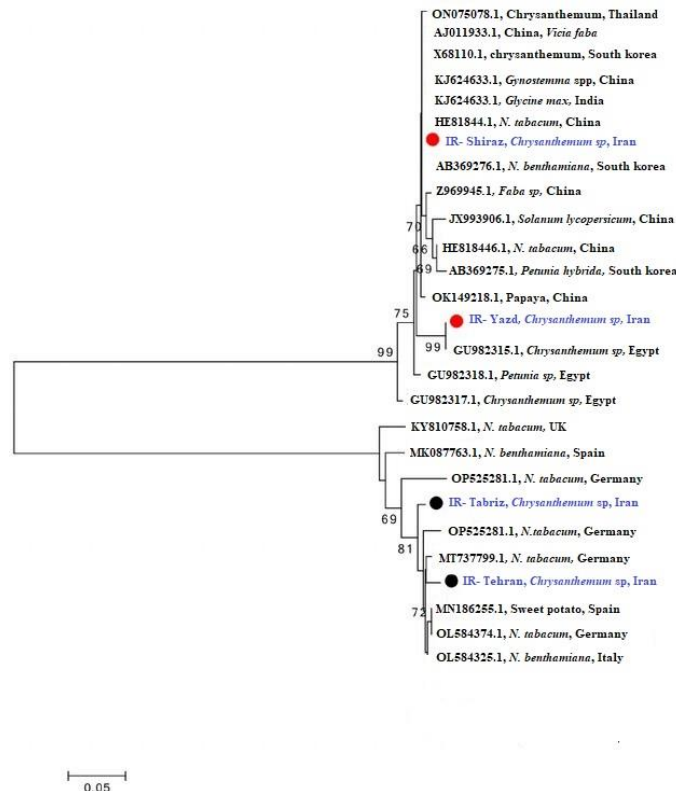
شکل ۶- نشانه‌های بیماری ویروسی روی برگ‌های دیفن‌باخیا شامل: نشانه‌های موزاییک، بدشکلی و کاهش اندازه برگ (این نمونه پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی به عنوان DsMV شناخته شدند).

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 شهر ذکر شده در مواد و روش‌ها) 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 تبارزایی تأیید کرد که جدایه‌های TMV توالی‌یابی شده در داودی در این پژوهش ۹۷/۲۱٪-۹۹/۵۶٪ با جدایه‌های TMV موجود در ژن‌بانک بر اساس ناحیه‌ی توالی‌یابی 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 احتمالاً بخاطر منشأ جغرافیایی متفاوت در آنها می‌باشد. نتیجه‌ی این بررسی‌ها نشان داد که جدایه‌های تبریز و تهران بیشترین شباهت را با جدایه‌های اروپایی TMV گزارش شده از میزبان‌های مختلف دارند. جدایه‌ی شیراز بیشترین شباهت را با جدایه‌های شرق آسیا مخصوصاً جدایه‌های چینی داشت. در نهایت جدایه‌ی یزد در کنار جدایه‌های TMV گزارش شده از مصر در یک خوشه قرار گرفتند.



شکل ۷- تجزیه تبارزایی به روش ¹maximum likelihood 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 می‌شود. 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.

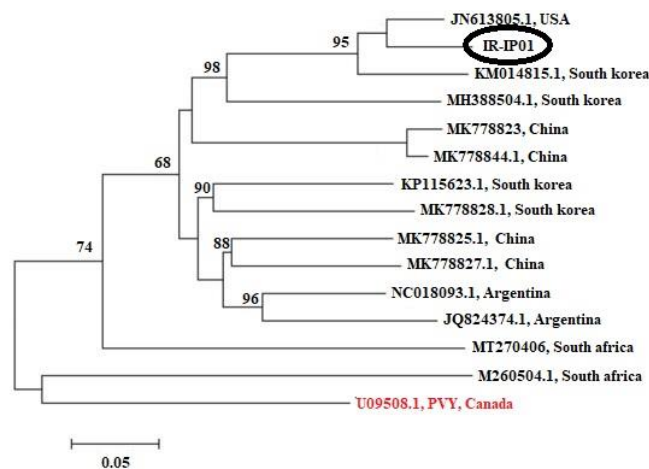
آنالیز تبارزایی مربوط به جدایه SPVG توالی‌یابی شده از نیلوفر پیچ در ایران

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 batata* داشت. در

۲- حداکثر مقادیر معیار صحت به تخمین‌های نمونه‌های آنالیز تبارزایی

۱- تخمین درست نمایی بیشینه

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

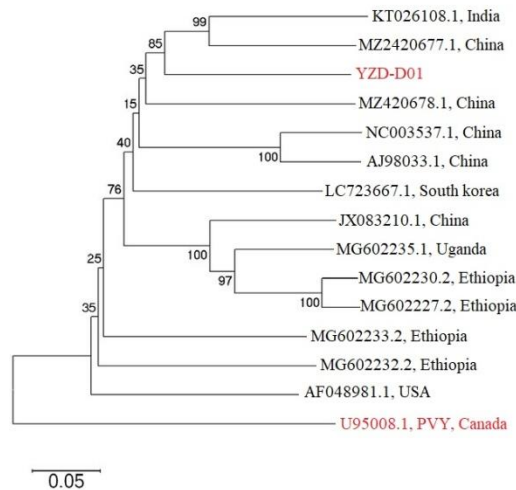


شکل ۸- تجزیه فیلوژنتیکی به روش maximum likelihood بدست آمده از هم‌دیف‌سازی توالی‌های ۳۵۰ نوکلئوتیدی از ژن Nib از جدایه‌ی ویروس جی سیبزمینی شیرین^۱ جمع‌آوری شده از شیراز. جدایه‌های با فاصله‌ی ژنتیکی یکسان حذف شده‌اند و ۱۴ جدایه مرتبط با هم در درخت فیلوژنتیک مشاهده می‌شود. تعداد ۱۰۰ تکرار bootstrap برای 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 دیفن باخیا^۲ 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 دیفن باخیا از کشور چین با رس‌شمار MZ2420677.1 دارد. تجزیه و تحلیل درخت تبارزایی تأیید کرد که جدایه‌ی DsMV دیفن باخیای توالی‌یابی شده در این پژوهش در کنار جدایه‌های آسیایی (جدایه‌های هند و چین) قرار گرفت و کمترین تشابه را با جدایه‌های 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 به عنوان گروه خارجی (Out Group) استفاده شد (شکل ۹).



شکل ۹- تجزیه فیلوژنتیکی به روش **maximum likelihood** بدست آمده از همدیف سازی توالی های ۳۵۰ نوکلئوتیدی از ژن **Nib** از جدایه **DsMV** نماینده از یزد. جدایه های با فاصله ی ژنتیکی یکسان حذف شده اند 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 گره ها نشان داده شده اند و ریشه های با ارقام کمتر از آن فشرده شده اند. 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.

پوتی ویروس ها (*Potyviridae*) یکی از بزرگترین گروه های ویروس های گیاهی هستند و بعد از جمینی ویروس های^۱ بیمارگر گیاهی بیشترین خسارت را در بین ویروس های بیمارگر در گیاهان ایجاد می کنند (Mäkinen *et al.*, 2023). به دلیل آسانی انتقال این ویروس ها (مکانیکی، بذر، شته ها، کنه ها)، ردیابی آن ها به منظور کنترل بیماری های ناشی از آن ها در گیاهان زینتی و فضای سبز مهم می باشد. تاکنون گونه های مختلفی از جنس پوتی ویروس از گیاهان زینتی متنوعی از ایران شامل اخترا^۲ (Salehzadeh *et al.*, 2022)، پتونای مکزیک^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)، گلپسین^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 نهاده های کشاورزی، قلمه، بذر و اعمال قرنطینه ی ضعیف داخلی و مرزی... از دلایل اصلی ورود ویروس های مرتبط با گل های زینتی به کشور و گسترش آن در استان های مختلف و میزبان های جدید می باشد. (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 سبز و در برخی موارد بدشکلی برگ مرتبط با همان نشانه هایی است که در بررسی های 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 دیفن باخیا 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).

توباموویروس ها 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)، انگشته^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 توباموویروس ها، مخصوصاً 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 خانواده های 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). ویروس های این جنس از طریق بذر، انتقال مکانیکی، پیوند، آب آبیاری و... قابلیت انتقال دارند (Groth-Helms & Zhang, 2024). در ایران اطلاعات اندکی روی توباموویروس های 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 کرده اند. این علایم عمدتاً شامل بدشکلی و موزاییک و ایجاد لکه های سبز و می باشد (Zhao et al., 2015; Supakitthanakorn et al., 2022).

از آنجایی که شرایط قرنطینه ای در کشور ما کمتر رعایت می گردد و بر ورود و خروج مواد گیاهی بخصوص گیاهان زینتی کنترل قابل توجهی وجود ندارد و بعلاوه گلخانه های کشور ما هم کمتر دارای شرایط ایده آل برای نگهداری این گیاهان می باشند در نتیجه خطر وقوع و گسترش این بیماری های خسارت زا بسیار اهمیت پیدا می کند. با توجه به اینکه در زمینه مطالعه عوامل بیماریزای ویروسی و بخصوص بیماری های ویروسی گیاهان زینتی در ایران تحقیقات مدون قابل ملاحظه ای صورت نگرفته است، اولین قدم در این زمینه ردیابی و شناسایی این گونه عوامل بیماریزا در گیاهان زینتی و علف های 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 این گونه 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 به وسیله 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 گزارش شده در این پژوهش با سایر جدایه‌های 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 بیمارزا 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., Vichitrangoontavorn, 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](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>





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

Mehrdad Salehzadeh^{1*}, Alireza Afsharifar¹, Saeedeh Dehghanpour Farshah², Tayebbeh Kiyani Bahramabadi³

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.