



تشخیص مولکولی ویروس حلقه زرد گوجه فرنگی در آلسترومریا در استان خراسان رضوی

ناصر بیک زاده^{*۱} - بهروز جعفرپور^۲ - حمید روحانی^۳ - دیک پیترز^۴ - افشین حسنی مهربان^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۲۲

چکیده

در پاییز ۱۳۸۸، در یکی از گلخانه های کشت آلسترومریا (*Alstroemeria* sp) (خراسان رضوی-مشهد)، علائم شبیه آلودگی های توسپوویروسی (به صورت نکروز) بر روی برگ، ساقه، دمبرگ و گل برخی گیاهان مشاهده گردید. از گیاهان آلوده عصاره گیری شده و این عصاره به تعدادی گیاه محک تلقیح گردید. بر روی اطلسی (*Petunia hybrida*) و سلمه (*Chenopodium quinoa*) علائم آلودگی به صورت زخم های بافت مرده موضعی ظاهر شد. علائم آلودگی بر روی تاتوره (*Datura stramonium*) و *Nicotiana benthamiana* ابتدا به صورت زخم های بافت مرده موضعی بوده و سپس علائم بافت مردگی سیستمیک ظاهر گردید. بر روی *N. glutinosa* نیز لکه های بافت مرده سیستمیک مشاهده شد. تلقیح مکانیکی آلسترومریا با عصاره تهیه شده از نمونه های آلوده آلسترومریا، ناموفق بود. با استفاده از آنتی بادی تهیه شده بر علیه نوکلئو پروتئین (Nucleoprotein; N) ویروس های (Tomato spotted wilt virus(TSWV)، Tomato yellow ring virus(TYRV)، Iris yellow spot virus(IYSV)، Impatiens necrotic spot virus(INSV)، Groundnut bud necrosis virus(GBNV)، Tomato chlorotic spot virus(TCSV)، Groundnut ring spot virus(GRSV) و Chrysanthemum stem necrosis virus(CSNV)، نمونه های آلوده با آزمون الایزا (DAS-ELISA) مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان داد که این نمونه ها به TYRV آلوده هستند. به منظور بررسی نمونه ها با آزمون RT-PCR، RNA کل از *N. benthamiana* که علائم آلودگی داشتند، با استفاده از تریزول استخراج گردید. در نتیجه آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن N ویروس TYRV، یک قطعه DNA در حدود ۸۰۵ جفت باز تکثیر گردید. توالی آمینواسیدی این قطعه، پس از تعیین، در GenBank با رس شماره HQ154130(Accession number) ثبت گردید. این توالی با توالی آمینواسیدی پروتئین N توسپوویروس های موجود در GenBank مقایسه گردید و مشخص شد که ۹۹ درصد با توالی آمینواسیدی پروتئین N ویروس TYRV از استان های فارس (رس شماره ABH07703)، تهران (رس شماره AAV98587) و مرکزی (رس شماره ACT09488) شباهت دارد. به منظور تعیین استرین ویروس، از پرایمرهای اختصاصی در آزمون RT-PCR استفاده گردید و مشخص شد که این جدایه، استرین گوجه فرنگی ویروس TYRV است. همچنین، این ویروس با استفاده از *Thrips tabaci* از تاتوره های آلوده به سالم منتقل گردید. این اولین گزارش از آلودگی یک گیاه تک لپه (آلسترومریا) به TYRV می باشد.

واژه های کلیدی: آلسترومریا، Tomato yellow ring virus(TYRV)، استان خراسان رضوی، ایران

مقدمه

زیادی از گیاهان باغی، زراعی و زینتی باعث بیماری شوند(۴، ۱۸). این ویروس ها توسط تریپس ها منتقل شده و فقط در سنبل لاری، به خصوص سن اول، کسب می شوند (۱۸). ذرات ویروس (به قطر ۱۱۰-۸۰ نانومتر) در گونه های این جنس، همچون سایر جنس های خانواده Bunyaviridae، دارای پوشش بوده و حاوی سه قطعه RNA تک رشته ای (کوچک، متوسط و بزرگ) هستند (۷). RNA بزرگ، منفی بوده و دو قطعه دیگر نیز دوقطبی هستند. RNA بزرگ، پروتئین RNA-dependent RNA polymerase(RdRp) را کد نموده در حالی که پروتئین حرکتی [cell-to-cell movement(NSm) و گلیکوپروتئین (Gn glycoproteins)]

جنس Tospovirus شامل Tomato spotted wilt virus(TSWV) و چندین گونه دیگر بوده که می توانند در تعداد

۱ - دانشجوی دکتری دانشگاه فردوسی مشهد و عضو هیات علمی موسسه آموزش عالی علمی-کاربردی جهاد کشاورزی

(*)- نویسنده مسئول: (Email: beiczadeh@yahoo.com)

۲ و ۳- به ترتیب استاد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴ و ۵- استادیاران آزمایشگاه ویروس شناسی، دانشگاه Wageningen، هلند

شناسایی عامل بیماری

- گیاهان آزمون

به منظور بررسی علائم آلودگی بر روی گیاهان آزمون، با استفاده از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH 7 که حاوی ۰/۱ درصد سولفیت سدیم بود از نمونه های آلوده عصاره گیری شده و عصاره به طریق مکا نیکی به گیاهان آزمون مورد بررسی مایه زنی گردید. گیاهان آزمون مورد استفاده شامل اطلسی (*Petunia hybrida*)، تاتوره (*Nicotiana glutinosa*)، *Datura stramonium* و *N. benthamiana* و سلمه (*Chenopodium quinoa*) بود (۱۳).



شکل ۱- علائم آلودگی بر روی برگ آلسترومریا به صورت لکه های نکروتیک و کلروتیک

سرم شناسایی

به منظور بررسی نمونه ها، از آزمون ساندویچ دوطرفه الایزا (Double-antibody sandwich ELISA; DAS-ELISA) استفاده شده و از آنتی بادی (IgG) تهیه شده بر علیه پروتئین N ویروس های *Tomato yellow ring virus (TYRV)*، *Iris yellow spot virus (IYSV)*، *Tomato spotted wilt virus (TSWV)*، *Impatiens necrotic spot virus (INSV)*، *Groundnut bud necrosis virus (GBNV)*، *Groundnut ring spot virus (GRSV)*، *Groundnut bud necrosis virus (INSV)*، *Tomato chlorotic spot virus (TCSV)* و *Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)* که در دانشگاه Wageningen تهیه شده بود، جهت ردیابی ویروس استفاده شد. با استفاده از بافر استخراجی، از نمونه ها *N. benthamiana* با علائم سیستمیک در هاون چینی

(Gc) and توسط قطعه متوسط کد می شود. نوکلئوکپسید پروتئین [nucleocapsid(N) protein] و پروتئین بازدارنده خاموشی ژن [suppressor of RNA silencing(NSs)] نیز توسط قطعه کوچک سنتز می شود (۷، ۱۳). توسپوویروس ها بر اساس تشابه توالی آمینواسیدی پروتئین N، دامنه میزبانی، روابط سرم شناسی در بین پروتئین N و اختصاصیت ناقل در چندین گونه طبقه بندی می شوند (۷). در ایران با استفاده از آزمون الایزا (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) چند گونه توسپوویروس شامل *Iris yellow spot virus (IYSV)*، *TSWV*، *Impatiens necrotic spot virus (INSV)* و *Groundnut bud necrosis virus (GBNV)* در میزبان های مختلف شناسایی شده اند (۱۳، ۲۴). در سال ۲۰۰۵، بر اساس توالی نوکلئوتیدی RNA کوچک، یک گونه جدید از توسپوویروس ها در ایران از روی گوجه فرنگی گزارش گردید و *Tomato yellow ring virus (TYRV)* نامگذاری شد (۱۳). این ویروس تاکنون فقط از ایران و گیاهان دولپه گزارش شده است. در ایران تعداد زیادی گیاهان زینتی شاخه بریده کشت می شوند. اگرچه برای تکثیر و پرورش برخی از این گیاهان از غده یا پیاز استفاده می شود، ارقام جدید به طور دائم از سایر کشورها وارد ایران می شود. آلسترومریا (*Alstroemeria sp.*) که یک گیاه تک لپه ای می باشد، بومی آمریکای جنوبی بوده (۸) و در ایران به عنوان یک گیاه زینتی شاخه بریده کشت می شود. این گیاه زینتی از کشورهایی مانند هلند وارد ایران می شود. در پاییز ۱۳۸۸، در یکی از گلخانه های کشت آلسترومریا در استان خراسان رضوی (مشهد)، بر روی ساقه، دمبرگ، گل و برگ های برخی گیاهان علائم آلودگی شبیه آلودگی های توسپوویروسی، مشاهده گردید. هدف از این تحقیق، شناسایی عامل این بیماری در آلسترومریا است.

مواد و روش ها

نمونه برداری

در پاییز ۱۳۸۸ در یکی از گلخانه های کشت آلسترومریا در مشهد بوته های مشکوک به آلودگی به توسپوویروس ها مشاهده گردید. علائم آلودگی بر روی ساقه و دمبرگ به صورت نوار های نکروتیک، بر روی برگ ها به صورت زخم های نکروتیک و کلروتیک و بر روی گل ها نیز به صورت پیچیدگی گلبرگ ها و تشکیل نواحی نکروتیک مشاهده شد (شکل ۱). از آن جا که این علائم شبیه آلودگی های ناشی از توسپوویروس هاست (۱۵، ۲۸)، از این بوته ها نمونه برداری شده و نمونه ها جهت بررسی بیشتر به آزمایشگاه منتقل شدند.

درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه جهت سنتز cDNA نگهداری گردید. cDNA به دست آمده از واکنش RT با واکنش زنجیره ای پلیمرز (polymerase chain reaction; PCR) تکثیر شد. مخلوط واکنش PCR، پنجاه میکرولیتر بوده که شامل 5x GoTaq buffer، 25mM MgCl₂، مخلوط dNTP 10mM، آنزیم GoTaq polymerase (5u/μl، Promega) دو آغازگر فوق (هر کدام ۱ میکرولیتر)، cDNA (۵ میکرولیتر) و آب دوبار تقطیر سترون بود. واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت دو دقیقه در دمای ۹۲ درجه سانتی گراد، ۳۰ چرخه شامل دمای ۹۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (denaturation)، دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (annealing) و در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه (extension) و یک مرحله نهایی به مدت هفت دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد (final extension) بود. قطعات تکثیر شده در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز در بافر TAE و با استفاده از اتیدیوم برمایند رنگ آمیزی شدند.

همسانه سازی (Cloning)، هضم آنزیمی (Digestion) و آنالیز فیلوژنتیک (Phylogenetic analysis)

به منظور تعیین توالی قطعه تکثیر یافته در واکنش PCR، ابتدا با استفاده از کیت GFXTTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare UK Limited) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، این قطعه DNA از ژل آگاروز خالص شده و سپس با استفاده از آنزیم لیگاز (T4 DNA Ligase)، در داخل ناقل پلاسمیدی pGEM-T Easy (Promega) قرار داده و در باکتری *Escherichia coli* DH5α همسانه سازی گردید. مخلوط واکنش ligation، به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد. بعد از این مدت، با استفاده از جریان الکتریسیته (Electroporator)، پلاسمید نو ترکیب شده به سلول های شایسته باکتری فوق منتقل گردید. سرانجام بر اساس کلنی سبز/آبی، کلنی های مناسب انتخاب شدند. سپس با استفاده از کیت GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit (Fermentas، Germany) و بر اساس دستورالعمل شرکت، پلاسمیدهای نو ترکیب شده استخراج گردید. به منظور بررسی و تایید وجود قطعه مورد نظر در داخل پلاسمید، از آنزیم برشی NotI استفاده گردید. سرانجام، پلاسمیدهایی که حاوی قطعه مورد نظر بودند جهت تعیین توالی با آغازگر SP6، ارسال گردیدند. توالی های نوکلئوتیدی به دست آمده، با نرم افزار ExPASy به پروتئین ترجمه شده و پس از بلاست (protein blast) در NCBI، تشابه این توالی ها با توالی های آمینواسیدی توپوویروس های موجود در GenBank مورد بررسی قرار گرفت. به منظور آنالیز توالی های به دست آمده و تعیین جایگاه تاکسونومیک ویروس های شناسایی شده، ابتدا توالی آمینواسیدی

عصاره گیری گردید [1:30(w/v)]. آنتی بادی و متصله آنزیم (الکالین فسفاتاز) - آنتی بادی، به میزان ۱:۱۰۰۰ رقیق گردید و از سوستره با غلظت 0.1mg/ml استفاده شد. یک ساعت پس از افزودن سوستره (نیتروفلور فسفات) به چاهک ها، میزان جذب نمونه ها در ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا خوان (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH GmbH, Germany) قرائت گردید و آنهایی که در مقایسه با کنترل منفی (گیاهان سالم *N. benthamiana*) میزان جذب بالایی را نشان می دادند (بیش از سه برابر میانگین جذب کنترل منفی)، به عنوان نمونه های آلوده جهت بررسی بیشتر در نظر گرفته شدند (۵، ۶، ۲۸).

استخراج RNA کل

از گیاه *N. benthamiana* که مایه زنی شده بود و علائم آلودگی سیستمیک نشان می داد، جهت استخراج RNA کل با تریزول (Invitrogen, USA) استفاده شد. ۰/۱ گرم بافت تازه برگ با استفاده از ازت مایع، در ۱۰۰۰ میکرولیتر تریزول هموژنیزه گردید. پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم و سانتریفیوژ (۱۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد)، فاز رویی جدا و به آن ایزوپروپانل سرد (۱:۱) اضافه گردید. سپس با سانتریفیوژ در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد، RNA کل رسوب داده شد. پس از شستشوی رسوب با الکل ۷۰ درصد و سانتریفیوژ در ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد، رسوب RNA کل خشک شده و پس از حل کردن آن در ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل عاری از آنزیم RNase، در ۸۰ - درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمرز با ترانوسکریپت معکوس (Reverse Transcription PCR (RT-PCR))

به منظور تکثیر ژن پروتئین N در نمونه هایی که در آزمون الیزا واکنش مثبت داشتند، از آغازگرهای اختصاصی (5'-ATGGCTACCGCAGAGTG-3' N-Start و (5'-TTAAAATGCATC-3' N-Stop (۱۳) استفاده شد. ابتدا در حضور دو آغازگر فوق، RNA کل و آب دوبار تقطیر سترون عاری از آنزیم RNase و در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، اولین مرحله سنتز cDNA انجام گردید. سپس مخلوط فوق به مدت سه دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. پس از این مدت، ۱۵ میکرولیتر از مخلوط ترانوسکریپت معکوس که شامل آنزیم AMV Reverse Transcriptase (22u/μl، Promega, USA) بافر 5x cDNA (Promega)، مخلوط dNTP (10mM) و آب دوبار تقطیر سترون بود، با مخلوط اولین مرحله سنتز cDNA مخلوط شده و در دمای ۶۰

از تغذیه روی برگ های آلوده و سالم تاتوره، تریپس ها بر روی قطعاتی از برگ سالم *D. stramonium* منتقل گردیده تا ضمن تغذیه از برگ، ویروس را منتقل کنند. چهار روز پس از تغذیه، با استفاده از آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی N-Start و N-Stop، شناسایی ویروس در قطعات برگ انجام شد. استخراج RNA کل، سنتز cDNA، آزمون PCR، همسانه سازی، استخراج پلاسمید و تعیین توالی همانطور که قبلا گفته شد، انجام گردید.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده جهت تعیین استرین

منبع	توالی	آغازگر
۱۴	5'-GAATTCACCTTTCCTGGG - 3'(F)	TYRV-t-Ndown2
۱۶	5'- TGIGGAAAATGTGGCTG - 3'(F)	Soybean-Ndown496
۱۶	5'-TTAAAATGCATC- 3'(R)	Varamin-N-Stop

نتایج و بحث

علائم مشاهده شده بر روی نمونه های جمع آوری شده شامل لکه های نکروز بر روی ساقه، برگ، دمبرگ و گل بود. علائم مشخص آلودگی گیاهان به توسپوویروس ها، معمولا متنوع هستند: زخم های کلروتیک و نکروتیک، کوتولگی، ابلقی، تغییر شکل برگ، نکروز و پژمردگی سیستمیک، رگبرگ زردی و لکه حلقوی (۲۲). نمونه های آلوده که جمع آوری شده اند، علائمی مشابه علائم آلودگی به توسپوویروس ها را نشان می دهند. با استفاده از آزمون های دامنه میزبانی، سرولوژی و واکنش زنجیره ای پلیمرز ثابت شد که این نمونه ها آلوده به توسپوویروس هستند.

گیاهان آزمون

مطالعات دامنه میزبانی نشان داد که توسپوویروس آلوده کننده این نمونه ها، به طریق مکانیکی به گیاهان محک مورد مطالعه منتقل می شود. بر روی اطلسی و *N. benthamiana* علائمی ظاهر شد که از علائم مشخص آلودگی این گیاهان به توسپوویروس هاست (۱۳، ۱۵). علائم آلودگی بر روی اطلسی، به صورت لکه های نکروتیک موضعی ظاهر شد. در *N. benthamiana* علائم آلودگی به صورت سیستمیک بود. علائم اولیه ابتدا بر روی برگ های تلقیح شده به صورت لکه های کلروتیک بوده و سپس علائم به صورت نکروز سیستمیک و پسی همراه با پیچیدگی برگ در برگ های بالایی و جدید مشاهده شد. این علائم نشان دهنده آلودگی نمونه های مورد بررسی به توسپوویروس ها است. تلقیح عصاره تهیه شده از نمونه آلوده بر روی تاتوره ابتدا علائم آلودگی به صورت لکه های کلروتیک سیستمیک ایجاد نمود اما به تدریج علائم نکروز

پروتئین N ویروس های شناسایی شده در این تحقیق با توالی پروتئین N برخی توسپوویروس ها که در GenBank موجود می باشد با استفاده از Clustal W، همردیف سازی چندگانه (Multiple alignment) شد (۲۶). داده های به دست آمده از همردیف سازی چندگانه ای، برای ساخت درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار 4 MEGA مورد استفاده قرار گرفتند (۲۵).

- تعیین استرین ویروس

به منظور تعیین نوع استرین ویروس حلقه زرد گوجه فرنگی [استرین گوجه فرنگی (TYRV-t) یا استرین سویا (TYRV-s)] از آزمون RT-PCR استفاده شد. پس از استخراج RNA کل با استفاده از تریزول، رشته cDNA سنتز و از آن به عنوان الگو در آزمون PCR استفاده شد. در جدول ۱ آغازگرهای مورد استفاده ذکر شده است. سه آغازگر فوق بر اساس بخشی از توالی پروتئین N ویروس TYRV طراحی شده اند (۱۶). به منظور سنتز cDNA تنها از آغازگر Varamin-N-Stop استفاده شد. در آزمون PCR هر کدام از دو آغازگر TYRV-t-Ndown2 (اختصاصی برای استرین گوجه فرنگی) و Soybean-Ndown496 (اختصاصی برای استرین سویا) با آغازگر Varamin-N-Stop ترکیب شده تا نوع استرین ویروس مشخص شود. سنتز cDNA، آزمون PCR، همسانه سازی، استخراج پلاسمید و تعیین توالی همانطور که قبلا گفته شد، انجام گردید.

- انتقال ویروس به وسیله *Thrips tabaci*

به منظور بررسی انتقال ویروس با تریپس، از گونه *T. tabaci* استفاده شد. به منظور افزایش جمعیت این گونه، از ظروف شیشه ای مخصوص استفاده شد. گونه *T. tabaci* بر روی قطعاتی از ساقه تازه سیر در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور و دمای ۲۰ درجه سانتی گراد تکثیر داده شدند. بعد از تهیه جمعیت های عاری از ویروس، از آنها برای انتقال ویروس استفاده شد. برای انتقال، ابتدا *D. stramonium* با ویروس مورد مطالعه مایه زنی شده و پس از بروز علائم سیستمیک، از آنها به عنوان منبع ویروس جهت تغذیه تریپس و کسب ویروس استفاده شد. برای این کار در داخل پتری دیش های کوچک، قطعه ای از برگ تاتوره آلوده به ویروس گذاشته و سپس تعداد زیادی لارو سن یک از گونه فوق بر روی این قطعات قرار داده شدند (۲۷). سپس این پتری دیش ها در شرایط نوری ۱۲ ساعت نور و دمای ۲۰ درجه سانتی گراد گذاشته تا لارو ها ضمن تغذیه از برگ، ویروس را کسب کنند. همچنین تعدادی لارو سن یک نیز بر روی قطعاتی از برگ سالم تاتوره، به عنوان کنترل منفی، قرار داده شده و در شرایط فوق نگهداری شدند. چهار الی پنج ساعت پس

این پروتئین، وسیله ای راحت و مناسب برای ردیابی و طبقه بندی توسپوویروس هاست (۳). بر اساس روابط سرولوژیکی و آنالیز فیلوژنتیکی پروتئین N، گونه های تایید شده و موقتی توسپوویروس ها در سه گروه سرولوژیکی اصلی و چهار سروتیپ تک گونه ای، دسته بندی می شوند (۱۹) (جدول ۲). از آنجا که ASNv با آنتی سرم های تهیه شده بر علیه پروتئین N گروه سرولوژیکی TSWV (۱۵)، Tomato zonate spot virus (TZSV) با آنتی سرم تهیه شده بر علیه این پروتئین در گروه سرولوژیکی WSMoV (۷) و MeSMV نیز با گروه سرولوژیکی TSWV (۴) واکنش متقاطع سرولوژیکی نشان می دهد، به نظر می رسد که این سه گونه به ترتیب در گروه های سرولوژیکی TSWV، WSMoV و TSWV قرار دارند. همچنین بین توالی آمینواسیدی پروتئین N دو گونه IYSV و TYRV شباهت بالایی (۷۸ درصد) وجود دارد و در نتیجه TYRV نسبت به سایر توسپوویروس ها، به IYSV نزدیک تر است (۱۳). بنابراین پیش بینی می شود که TYRV در گروه سرولوژیکی IYSV قرار گیرد. با این حال، گاهی استفاده از مفهوم گروه های سرولوژیکی ممکن است با تضاد و اشتباه همراه باشد (۲). نتیجه آزمون الایزا نشان می دهد که جدایه TYRV-AS با سایر توسپوویروس های مورد بررسی در این آزمون، رابطه سرولوژیکی ندارند. از طرفی با این که TYRV و IYSV به لحاظ وجود تشابه بالایی توالی آمینواسیدی پروتئین N، به یکدیگر نزدیک ترند (۱۳)، اما هیچگونه واکنش متقاطع سرولوژیکی بین این دو در آزمون الایزا دیده نشد.

واکنش RT-PCR

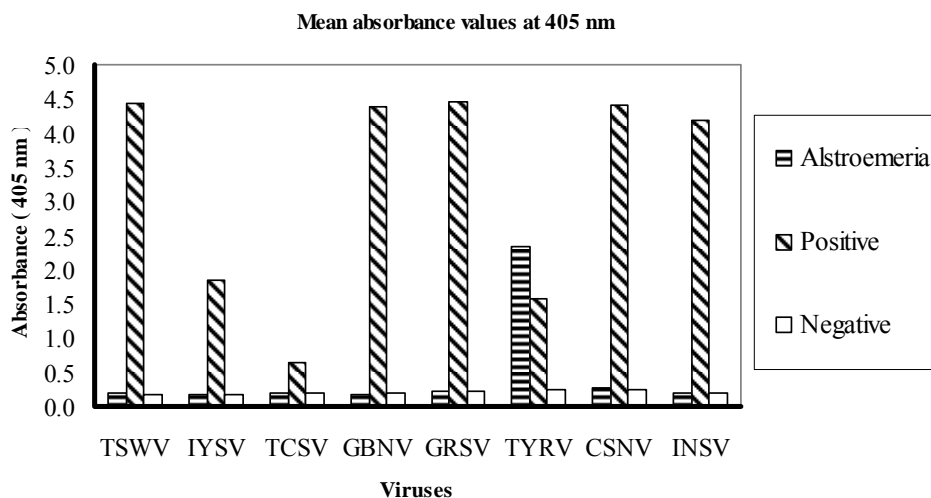
با توجه به این که در آزمون الایزا، آلودگی نمونه ها به TYRV تایید گردید، در آزمون PCR با استفاده از آغازگر های طراحی شده بر اساس ژن N این ویروس (N-Start و N-Stop)، این ژن تکثیر گردید و پس از الکتروفورز در ژل آگاروز، یک قطعه DNA نزدیک به باند ۸۰۵ جفت باز مشاهده گردید. در نمونه کنترل منفی (سالم) هیچگونه باندهی مشاهده نشد اما در برخی موارد باندهای غیراختصاصی دیده شد (شکل ۳). آغازگر N-Start با ۱۸ نوکلئوتید اول ژن N ویروس حلقه زرد گوجه فرنگی (TYRV) از ایران با رس شماره AY686718 یکسان بوده و آغازگر N-Stop نیز با ۱۲ نوکلئوتید انتهایی این ژن در این ویروس مکمل است. ژن این پروتئین در این ویروس، دارای ۸۲۵ نوکلئوتید است که سه نوکلئوتید انتهایی آن مربوط به کدن خاتمه است (۱۳)، بنابراین انتظار می رود که در آزمون PCR یک قطعه با وزن ۸۲۵ جفت باز تکثیر شود. نتایج آزمون PCR نشان داد که توسپوویروس آلوده کننده نمونه های مورد بررسی، دارای یک قطعه ژن با وزن ۸۲۵ جفت باز هستند.

سیستمیک و ابلقی ظاهر شد. توسپوویروس ها بر روی تاتوره علائم متفاوتی ایجاد می کنند. جدایه های TYRV که تاکنون گزارش شده اند، باعث آلودگی سیستمیک بر روی تاتوره شده (۱۳، ۲۴) و در نوع علائمی که ایجاد می کنند (علائم موضعی یا بدون علائم) با یکدیگر تفاوتی ندارند. از آنجا که عصاره تهیه شده از نمونه آلوسترومریا، بر روی تاتوره علائمی مشابه جدایه های TYRV ایجاد کرده اند (۱۳، ۱۵، ۲۴)، بنابراین این نمونه ها به یک توسپوویروس و احتمالاً TYRV آلوده هستند. علائم آلودگی بر روی سلمه و *N. glutinosa*، به ترتیب به صورت لکه های نکروتیک موضعی و سیستمیک بود. تحقیقات قبلی نشان می دهد که توسپوویروس ها بر روی سلمه آلودگی موضعی ایجاد نموده (۲، ۷، ۱۳) در حالی که علائم آلودگی *N. glutinosa* به این ویروس ها متغیر است. برخی گونه ها باعث آلودگی موضعی (۲، ۴) و برخی نیز باعث آلودگی سیستمیک می شوند (۱۳، ۱۵). علائم ظاهر شده بر روی سلمه و *N. glutinosa* که با عصاره تهیه شده از نمونه آلوسترومریا تلقیح شده بودند، نشان می دهد که این نمونه به یک توسپوویروس و احتمالاً TYRV آلوده هستند. با تلقیح عصاره تهیه شده از نمونه های آلوسترومریا به آلوسترومریا، همچون تلاش های قبلی جهت تلقیح آلوسترومریا با TSWV و *Alstroemeria necrotic streak virus* (ANSV) (۱۵) ناموفق بود. بنابراین بررسی علائم بیماری و دامنه میزبانی نشان می دهد که نمونه های مورد بررسی به یک توسپوویروس آلوده بوده و آزمون های سرم شناسی و مولکولی (PCR)، ثابت می کند که این نمونه ها به چه گونه ای از توسپوویروس ها آلوده هستند.

سرم شناسی

از آنجا که علائم آلودگی بر روی نمونه های مورد بررسی و همچنین بر روی گیاهان آزمون مورد استفاده شبیه علائم آلودگی به توسپوویروس ها بود، بنابراین در آزمون الایزا از آنتی سرم تهیه شده بر علیه پروتئین N برخی توسپوویروس ها استفاده شد. از هشت آنتی بادی که بر علیه پروتئین N توسپوویروس های مختلف تهیه شده بود و در این آزمون مورد استفاده قرار گرفتند، آنتی بادی TYRV با عصاره تهیه شده از نمونه های تلقیح شده با آلوسترومریا (شکل ۲) واکنش مثبت نشان داد. با آنتی بادی سایر ویروس های مورد مطالعه، هیچگونه واکنش مثبتی مشاهده نشد. بر این اساس توسپوویروس آلوده کننده نمونه های آلوسترومریا، TYRV-AS نام گذاری می شود.

مفهوم گروه های سرولوژیکی (Serogroup)، به عنوان یک معیار مهم در طبقه بندی و تایید توسپوویروس های جدید، در بسیاری موارد مورد استفاده قرار می گیرد. از آنجا که پروتئین N فراوان ترین پروتئین توسپوویروس هاست، بنابراین مقایسه سرولوژیکی بر اساس



شکل ۲- نمودار میانگین جذب نمونه آلسترومریا و کنترل های مثبت و منفی در ۴۰۵ نانومتر

جدول ۲- طبقه بندی گونه های توسپوویروس ها به گروه های سرولوژیکی

Serogroup		Serotype				
TSWV	WSMoV	IYSV	PCFV	MYSV	INSV	PYSV
TSWV	WSMoV		PCFV	MYSV	INSV	PYSV
TCSV	GBNV					
GRSV	WBNV					
CSNV	CaCV					
ZLCV	CCSV					

* CCSV:Calla lily chlorotic spot virus, CaCV:Capsicum chlorosis virus, MYSV:Melon yellow spot virus, PCFV:Peanut chlorotic fan-spot virus, PYSV:Peanut yellow spot virus, WBNV:Watermelon bud necrosis virus, WSMoV:Watermelon silver mottle virus, ZLCV:Zucchini lethal chlorotic virus

مورد نظر، جهت تعیین توالی با آغازگر SP6 ارسال شدند. توالی آمینو اسیدی پروتئین N در این نمونه ها با رس شمار HQ154130 در GenBank ثبت شد. تشابه این توالی با توالی های آمینواسیدی پروتئین N توسپوویروس های موجود در GenBank جستجو شده و مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه این جستجو نشان داد که جدایه TYRV-AS (در این مطالعه) با TYRV از استان مرکزی با رس شمار ACT09488، با TYRV از استان فارس با رس شمار ABH07703 و با TYTV-t از استان تهران با

از آنجا که در آزمون PCR از آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر کل ژن N ویروس حلقه زرد گوجه فرنگی استفاده گردید، بنابراین قطعه تکثیر یافته در این آزمون می بایست با اندازه ژن N این ویروس یکسان باشد. به منظور تایید این موضوع، توالی این قطعه تعیین گردید.

همسازیه سازی و آنالیز فیلوژنتیک

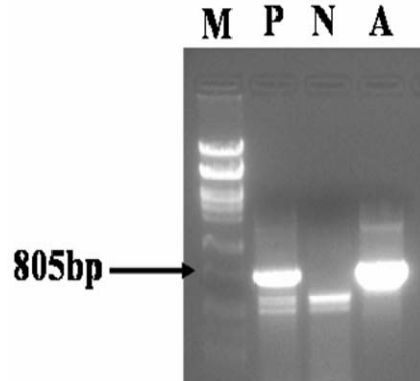
پس از آزمون PCR و همسازیه سازی، پلاسمیدهای حاوی قطعه

برای اولین بار از کشورهای اروپایی و آسیایی (Euroasian tospovirus clade) گزارش شده و اساساً در این نواحی گسترش دارند (۱۳، ۱۵). این آنالیز نشان می‌دهد که جدایه شناسایی شده در این مطالعه در Clade اروپایی-آسیایی قرار داشته و با TYRV و IYSV یک Cluster تشکیل داده و در Cluster TYRV-AS (رِس شماره AY686718) در یک سایر توسپوویروس های اروپایی-آسیایی قرار نمی‌گیرند. جدایه TYRV-AS (رِس شماره AY686718) در یک Cluster قرار می‌گیرند. این آنالیز، نتایج تحقیقات قبلی را که نشان می‌دهد TYRV و IYSV بسیار به یکدیگر نزدیک بوده و بین توالی آمینواسیدی پروتئین N این دو ویروس بیشترین همولوژی وجود دارد (۱۳)، تایید می‌کند. از آنجا که جدایه مورد بررسی در این تحقیق در Clade توسپوویروس های آمریکایی قرار ندارند، در نتیجه می‌توان گفت که منشاء آنها، کشورهای اروپایی-آسیایی هستند (۱۵). جدایه های TYRV در دو گروه استرینی مجزا قرار می‌گیرند. یکی استرین s (TYRV-s) که برای اولین بار از سویا جدا شده است و دیگری استرین t (TYRV-t) که برای اولین بار در گوجه فرنگی های آلوده به TYRV شناسایی شده است (۱۴). بررسی درخت فیلوژنی در شکل ۵ نشان می‌دهد که این دو استرین در دو Clade مجزا قرار دارند. در یکی از این دو Clade، جدایه TYRV-s با رِس شماره DQ462163 که برای اولین بار از سویا (در ایران) جدا شده و استرین آن s می‌باشد، قرار دارد. در Clade دوم نیز جدایه TYRV-t با رِس شماره AY686718 که برای اولین بار در ایران از گوجه فرنگی جدا شده و استرین آن t می‌باشد، همراه با سایر جدایه های TYRV که از میزبان های مختلف در ایران گزارش شده اند، قرار دارند. از آنجا که جدایه TYRV-AS در Clade استرین t قرار داشته و با TYRV-t یک Cluster تشکیل می‌دهند، بنابراین شباهت ۹۹ درصدی توالی آمینواسیدی پروتئین N آن با توالی آمینواسیدی پروتئین N استرین TYRV-t تایید شده و مشخص می‌شود که این جدایه، استرین t می‌باشند. تشابه توالی آمینواسیدی پروتئین N بین استرین s و سایر ایزوله های TYRV در جدول ۳ (۹۲ - ۹۱ درصد) نیز نتایج این آنالیز فیلوژنتیکی را تایید می‌کند.

تعیین استرین ویروس

ویروس حلقه زرد گوجه فرنگی دارای دو استرین گوجه فرنگی (TYRV-t) و سویا (TYRV-s) می‌باشد (۱۴). از آنجا که در این تحقیق، این ویروس شناسایی شده است بنابراین استرین جدایه شناسایی شده، تعیین گردید. با آزمون PCR فقط یک قطعه DNA در حدود ۲۱۳ جفت باز در حضور آغازگر اختصاصی برای استرین گوجه فرنگی تکثیر گردید و در حضور آغازگر اختصاصی برای استرین سویا، هیچگونه باندهی مشاهده نشد (شکل ۶).

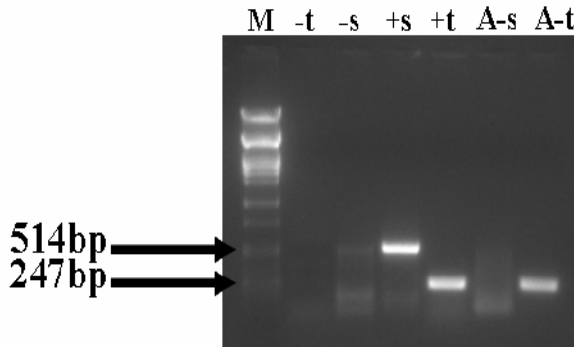
رِس شماره AAV98587 به میزان ۹۹ درصد شباهت دارند. از آنجا که تشابه توالی آمینواسیدی پروتئین N بین یک ویروس جدید و سایر توسپوویروس های تایید شده باید کمتر از ۹۰ درصد باشد تا به عنوان یک گونه جدید تایید شود (۶)، بنابراین جدایه مورد بررسی در این مطالعه، یک گونه جدید نبوده و بر اساس تشابه توالی آمینواسیدی پروتئین N، ویروس حلقه زرد گوجه فرنگی (TYRV) تایید می‌شود.



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی قطعه تکثیر یافته در PCR با آغازگرهای اختصاصی TYRV در نمونه آلسترومیا (M): مارکر، P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی، A: آلسترومیا

به منظور آنالیز توالی های به دست آمده، تعیین جایگاه تاکسونومیک ویروس های شناسایی شده در بین توسپوویروس ها و ترسیم درخت فیلوژنتیکی، ابتدا توالی آمینواسیدی پروتئین N جدایه شناسایی شده در این تحقیق با توالی کامل پروتئین N بیست توسپوویروس که در GenBank موجود بودند، با استفاده از Clustal W، همردیف سازی چندگانه شد (۲۶). همچنین توالی آمینواسیدی پروتئین N این جدایه با هفت جدایه دیگر این ویروس در GenBank نیز همردیف سازی چندگانه شد. داده های به دست آمده از همردیف سازی چندگانه ای، برای ساخت درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار 4 MEGA مورد استفاده قرار گرفتند (۲۵) (شکل های ۴ و ۵). درخت فیلوژنی توافقی (Consensus phylogenetic tree) از همردیف سازی چندگانه ای توالی های آمینواسیدی پروتئین N توسپوویروس های شناسایی شده و جدایه شناسایی شده در این تحقیق، به دست آمده است. در ترسیم این درخت از روش Neighbor-joining method استفاده شده و مقادیر Bootstrap نیز به صورت درصدی از ۵۰۰ تکرار نشان داده شده اند. بررسی درخت فیلوژنی در شکل ۴ نشان می‌دهد که توسپوویروس ها در دو Clade اصلی قرار می‌گیرند. یک گروه آنها می‌باشند که برای اولین بار از کشورهای آمریکایی گزارش شده (American tospovirus clade) و اساساً در این کشورها گسترش دارند و گروه دوم نیز سایر توسپوویروس های هستند که

رس شمار AAV98587 به میزان ۹۹ درصد شباهت دارد. بنابراین بر اساس نتایج آزمون PCR و بلاست، علاوه بر تایید وجود TYRV در نمونه برگ مورد بررسی، انتقال این ویروس توسط تریپس نیز تایید می شود. نتیجه این تحقیقات و تحقیقات قبلی (۲۴) نشان می دهد که *Thrips tabaci* یکی از ناقلین مهم TYRV در ایران می باشد. با این حال، مشخص نیست که آیا *F. occidentalis* می تواند TYRV را منتقل کند یا خیر؟



شکل ۶- نقوش الکتروفورزی قطعه تکثیر یافته در PCR جهت تعیین نوع استرین جدایه TYRV-AS (M: مارکر، -t: کنترل منفی با آغازگرهای اختصاصی استرین t، -s: کنترل منفی با آغازگرهای اختصاصی استرین s، +s: کنترل مثبت با آغازگرهای اختصاصی استرین s، +t: کنترل مثبت با آغازگرهای اختصاصی استرین t، A-s: نمونه آلسترومریا با آغازگرهای اختصاصی استرین s، A-t: نمونه آلسترومریا با آغازگرهای اختصاصی استرین t)

تعدادی از گونه های تریپس ها (راسته Thysanoptera)، ویروس های گیاهی و از جمله توسپوویروس ها را منتقل می کنند. ویروس هایی که توسط تریپس ها منتقل می شوند، بیماری های مهم و خطرناکی در تعداد زیادی از گیاهان، ایجاد می کنند (۲۱). در جنس های *Thrips*، *Frankliniella*، *Scirtothrips*، *Microcephalothrips* و *Ceratohripoides* گونه های ناقل ویروس های گیاهی قرار دارند. تنها شش گونه از *Frankliniella*، سه گونه از *Thrips* و یک گونه از *Scirtothrips* و *Ceratohripoides* به عنوان ناقل توسپوویروس ها گزارش شده اند (۱۷). تاکنون از ایران گونه های *Microcephalothrips* *Haplothrips sp.*، *Thrips tabaci abdominalis*، *Tenothrips frici*، *F. intonsa*، *Frankliniella tenuirnis*، *F. occidentalis* (۱۰) و *Tenothrips discolor* (۲۰) گزارش شده و با استفاده از آزمون الایزا، TSWV و INSV در گونه های *Thrips tabaci* و *M. abdominalis* که از روی گیاهان زینتی آلوده به این دو ویروس جمع آوری شده بودند، ردیابی و

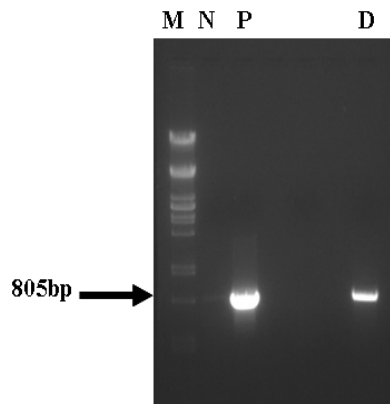
توالی های نوکلئوتیدی به دست آمده، به پروتئین ترجمه شده و پس از بلاست، تشابه این توالی با توالی های آمینواسیدی پروتئین N توسپوویروس های موجود در GenBank جستجو شده و مورد بررسی قرار گرفت. این توالی با ۷۰ آمینواسید بخشی از توالی آمینواسیدی پروتئین N در TYRV-t با رس شمار AAV98587 (از استان تهران)، در TYRV-TS با رس شمار ABH07703 (از استان فارس) و با TYRV با رس شمار ACT09488 (از استان مرکزی)، ۱۰۰ درصد شباهت نشان داد در حالی که با TYRV-s با رس شمار ABF59486 (از استان تهران)، ۹۰ درصد شباهت دارد. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، بر اساس بخشی از توالی ژن N در دو استرین TYRV-t و TYRV-s طراحی شده اند. این بخش از ژن N در TYRV-t دارای ۲۱۳ نوکلئوتید بوده در حالی که در TYRV-s دارای ۴۹۶ نوکلئوتید است (۱۴). بنابراین تکثیر یک قطعه DNA با ۲۱۳ جفت باز در نمونه های آلسترومریا، وجود شباهت ۱۰۰ درصدی بین توالی آمینواسیدی به دست آمده و استرین گوجه فرنگی TYRV و همچنین وجود شباهت ۹۰ درصدی بین این توالی و استرین سویا ثابت می کند که جدایه TYRV-AS استرین t بوده، نمونه های مورد بررسی آلوده به استرین S نمی باشند و آلودگی مخلوط این دو استرین در این نمونه ها وجود ندارد. با این که نوع استرین بیشتر جدایه های TYRV که در ایران شناسایی شده اند، مشخص نبوده و از آغازگرهای اختصاصی جدول ۱ برای تشخیص نوع استرین استفاده نشده است، اما داده های درخت فیلوژنی در شکل ۵ نشان می دهد که نوع استرین در آنها، استرین گوجه فرنگی بوده و به احتمال زیاد این استرین در ایران، غالب است. در صورتی که این احتمال صحیح باشد، در آن صورت حفاظت تقاطعی (۱۲) ممکن است یکی از دلایل غالب بودن استرین گوجه فرنگی در ایران و عدم آلودگی هم زمان این دو استرین در یک میزبان باشد. با این حال، تایید این موضوع به تحقیقات زیادی نیاز دارد.

انتقال ویروس با *Thrips tabaci*

در نتیجه آزمون PCR، یک قطعه DNA در حدود ۸۲۵ جفت باز در نمونه برگی که تریپس های آلوده به ویروس بر روی آن تغذیه کرده بودند، تکثیر گردید ولی در نمونه کنترل منفی (برگ سالم) چنین باندی مشاهده نشد (شکل ۷). توالی های نوکلئوتیدی به دست آمده، به پروتئین ترجمه شده و پس از بلاست، تشابه این توالی با توالی های آمینواسیدی پروتئین N توسپوویروس های موجود در GenBank جستجو شده و مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه این جستجو نشان داد که توالی به دست آمده با توالی این پروتئین در TYRV با رس شمار ACT09488، با TYRV با رس شمار ABH07703 و با TYRV-t با

سپاس‌گزاری

نگارندگان از دکتر Richard Kormelink و تمام کارکنان آزمایشگاه ویروس شناسی دانشگاه Wageningen در هلند، تشکر می‌کنند.



شکل ۷- نتیجه آزمون PCR نمونه تاتوره جهت بررسی انتقال TYRV با تریپس (M: مارکر، N: کنترل منفی یا نمونه سالم، P: کنترل مثبت، D: نمونه تاتوره جهت بررسی انتقال ویروس)

شناسایی شده اند (۹، ۱۰). همچنین TYRV نیز توسط *Thrips tabaci* از برگ‌های *D. stramonium* با علائم آلودگی سیستمیک به این ویروس به برگ‌های سالم این گیاه منتقل و این انتقال با بررسی سرولوژیکی (آزمون الایرا) این برگ‌ها، تایید گردید (۲۴). گونه‌های *Thrips tabaci* و *F. occidentalis* مهمترین گونه‌های ناقل توسپوویروس‌ها بوده و به عنوان یک آفت عمده در گلخانه‌ها و مزارع هستند (۱، ۱۱)، بنابراین می‌بایست گسترش جغرافیایی و همچنین کارایی و نقش آن‌ها در انتقال توسپوویروس‌ها در ایران مورد مطالعه قرار گیرد. از آنجا که انتقال مکانیکی (تلقیح عصاره) ANSV (۱۴) و TYRV (در این تحقیق) به آلسترومریا و IYSV به پیاز (۲۳) تاکنون ناموفق بوده است، بنابراین به نظر می‌رسد تریپس‌ها نقش مهمی در انتقال این ویروس‌ها به آلسترومریا و پیاز دارند. با توجه به گسترش ناقلین توسپوویروس‌ها در مزارع و گلخانه‌ها در ایران، احتمال گسترش این ویروس‌ها از جمله TYRV در ایران زیاد بوده، بنابراین به منظور کنترل تلفیقی موثر، داشتن اطلاعات کافی از میزان شیوع توسپوویروس‌ها و شناسایی ناقلین آنها، ضروری است.

منابع

- 1- Anon. 2002. Plant Protection Compendium, CAB International, Wallingford, UK.
- 2- Bezerra I. C., Resende R. de O., Pozzer L., Nagata T., Kormelink R. and de Ávila A. C. 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from Chrysanthemum and one from Zucchini. *Phytopathology* 89:823-830.
- 3- Chu F.-H., Chao C.-H., Peng Y.-C., Lin S.-S., Chen C.-C. and Yeh S.-D. 2001. Serological and molecular characterization of Peanut chlorotic fanspot virus, a new species of the genus tospovirus. *Phytopathology* 91:856-863.
- 4- Ciuffo M., Kurowski C., Vivoda E., Copes B., Masenga V., Falk B. W. and Turina M. 2009. A new tospovirus sp. in cucurbit crops in Mexico. *Plant Dis.* 93:467-474.
- 5- Clark M. F., and Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- 6- de Ávila A. C., Huguenot C., Resende R. de O., Kitajima E. W., Goldbach R. W. and Peters D. 1990. Serological differentiation of 20 isolates of Tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* 71: 2801-2807.
- 7- Dong J.-H., Cheng X.-F., Yin Y.-Y., Fang Q., Ding M., Li T.-T., Zhang L.-Z., Su X.-X., McBeath, J. H. and Zhang Z.-K. 2008. Characterization of Tomato zonate spot virus, a new tospovirus in China. *Arch. Virol.* 153:855-864.
- 8- Fuji S. I., Mochizuki N., Fujinaga M., Ikeda M., Kouichi S., Seiji U., Hiromitsu F., Hideki N. and Fumiyoshi F. 2007. Incidence of viruses in alstroemeria plants cultivated in Japan and characterisation of Broad bean wilt virus-2, Cucumber mosaic virus and Youcai mosaic virus. *J. Gen. Plant Pathol.* 73:216-221.
- 9- Ghotbi T. and Baniameri V. 2006. Identification and determination of transmission ability of thrips species as vectors of two tospovirus, Tomato spotted wilt virus (TSWV) and Impatiens necrotic spot virus

- (INSV) on ornamental plants in Iran. Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate IOBC/wprs Bulletin Vol. 29(4).
- 10- Ghotbi T., Shahraeen N. and Winter S. 2005. Occurrence of tospoviruses in ornamental and weed species in Markazi and Tehran provinces in Iran. *Plant Dis.* 89:425-429.
 - 11- Goldbach R. and Peters D. 1994. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminars in Virology* 5:113-120.
 - 12- Hassani-Mehraban A. 2008. Virus-host interaction of Tomato yellow ring virus, a new tospovirus from Iran. PhD thesis. Wageningen University. 130 pp.
 - 13- Hassani-Mehraban A., Saaijer J., Peters D., Goldbach R. and Kormelink R. 2005. A new tomato-infecting tospovirus from Iran. *Phytopathology* 95:852-858 .
 - 14- Hassani-Mehraban A., Saaijer J., Peters D., Goldbach R. and Kormelink R. 2007. Molecular and biological comparison of two tomato yellow ring virus (TYRV) isolates: challenging the tospovirus species concept. *Arch. Virol.* 152:85-96 .
 - 15- Hassani-Mehraban A., Botermans M. , Verhoeven J., Th. J., Meekes E., Saaijer J., Peters D., Goldbach, R. and Kormelink R. 2010. A distinct tospovirus causing necrotic streak on *Alstroemeria* sp. in Colombia. *Arch. Virol.* 155:423-428.
 - 16- Hassani-Mehraban A., Brenkman A. B., Van den Broek N. J. F., Goldbach R. and Kormelink R. 2009. RNAi-mediated transgenic tospovirus resistance broken by intraspecies silencing suppressor protein complementation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:1250-1257.
 - 17- Jones D. R. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *Eur. J. Plant Pathol.* 113:119-157.
 - 18- Kritzman A., Lampel, M., Raccach, B. and Gera, A. 2001. Distribution and transmission of Iris yellow spot virus. *Plant Dis.* 85:838-842.
 - 19- Lin Y.-H. Chen T.-C., Hsu H.-T., Liu F.-L. Chu F.-H. Chen C.-C., Lin Y.-Z. and Yeh S.-D. 2005. Serological comparison and molecular characterization for verification of Calla lily chlorotic spot virus as a new tospovirus species belonging to Watermelon silver mottle virus serogroup. *Phytopathology* 95:1482-1488.
 - 20- Malkeshi S. H., Alavi J. and Gilasian A. 2004. Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* Pergande, a threatening pest for flowers and ornamental plants of Iran. The first scientific seminar on problems of flower and ornamental plants in Iran. Pakdasht, Tehran, Iran.
 - 21- Mumford R. A., Barker I. and Wood K. R. 1996. The biology of the tospoviruses. *Ann. Appl. Biol.* 128:159-183.
 - 22- Peters D. and Goldbach R. 1995. The biology of tospoviruses. In: Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Vol. III. Viruses and Viroids (Eds. Singh, R.P., Singh, U.S. and Kohmoto, K.). pp. 199-210. Pergamon Press, Oxford, UK.
 - 23- Pozzer L., Bezerra I. C., Kormelink R., Prins M., Peters D., Resende R. de O. and de Ávila, A. C. 1999. Characterization of a tospovirus isolate of Iris yellow spot virus associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Dis.* 83:345-350.
 - 24- Rasoulpour, R. and Izadpanah, K. 2007. Characterisation of cineraria strain of Tomato yellow ring virus from Iran. *Australas. Plant Pathol.* 36: 286-294.
 - 25- Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
 - 26- Thompson J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
 - 27- van de Wetering, F., Goldbach, R. and Peters, D. 1996. Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology* 86:900-905.
 - 28- Williams L. V., López Lambertini P. M., Shohara K. and Biderbost E. B. 2001. Occurrence and geographical distribution of tospovirus species infecting tomato crops in Argentina. *Plant Dis.* 85:1227-1229.