



## گزارش علمی کوتاه

### اولین گزارش از وقوع ویروس تورادو گوجه‌فرنگی از ایران

مهرداد صالح‌زاده<sup>۱\*</sup>، علیرضا افشاریفر<sup>۱</sup> و سعیده دهقانپور فراشاه<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۱)

آفات و بیماری‌های نوظهور محصولات کشاورزی را در سراسر جهان تحت‌تاثیر قرار داده است. ویروس تورادو گوجه‌فرنگی (*Tomato torrado virus, ToTV*) برای اولین بار از بوته‌های گوجه‌فرنگی گلخانه‌ای با علائم بافت‌مردگی برگ‌ها، ساقه و میوه از جزیره قناری در اسپانیا گزارش شده است (Verbeek *et al.*, 2007). این گونه عضو تیب جنس *Torradovirus* از خانواده *Secoviridae* می‌باشد. پیکره‌های کوچک این ویروس دارای شکل چندوجهی (بیست‌وجهی) کوچک به قطر ۲۵ تا ۳۰ نانومتر با تقارن شبه  $T=3$ ، و ژنوم آر آن ای تک‌لای مثبت دویخشی می‌باشند (Verbeek *et al.*, 2014). در حال حاضر، ToTV به همراه ۵ گونه تورادوویروس دیگر شامل ویروس مارکیتز گوجه‌فرنگی (*Tomato marchitez virus, ToMarV*) تورادوویروس ۱ هویج (*Carrot torradovirus 1*)، ویروس پیچیدگی نکروز برگ کاهو (*Lettuce necrotic leaf curl virus*)، ویروس پیسک زرد دم‌شیر (*Motherwort yellow mottle virus*) و ویروس لکه برگ سبزرده کدو (*Squash chlorotic leaf spot virus*)، مهمترین ویروس‌های چندوجهی شناخته‌شده‌ای هستند که توسط سفیدبالک‌های *Trialeurodes vaporariorum*، *Bemisia tabaci* و *Trialeurodes abutilonea* به صورت نیمه‌پایا منتقل می‌شوند (Wintermantel *et al.*, 2018). به تازگی انتقال جدایی‌ی لهستانی ویروس تورادو گوجه‌فرنگی از طریق بذر (۱-۳٪) نیز گزارش شده است (Pospieszny *et al.*, 2019). تاکنون این ویروس از قاره‌ی آسیا گزارش نشده است. طی بررسی‌هایی که در سال ۱۴۰۰ خورشیدی از مزارع گوجه‌فرنگی اطراف شیراز به عمل آمد، علائم بافت‌مردگی و در برخی موارد سوختگی شدید در برگ‌ها، ساقه‌ها و میوه‌های گوجه‌فرنگی مشاهده شد (شکل ۱). لکه‌های روی ساقه کشیده و لکه‌های نکروز روی میوه گاهی با هاله‌ی زرد رنگ و علائمی شبیه به آفتاب‌سوختگی و چروکیدگی روی میوه مطابق آنچه در مورد علائم ویروس تورادو توصیف شده است، (Moodley *et al.*, 2019) مشاهده شد. پس از استخراج آر آن ای کل از بافت برگ و میوه‌های دارای علائم (۱۴ نمونه)، تلاش برای ردیابی ToTV با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با رونویسی معکوس (RT-PCR) با استفاده از یک جفت‌آغازگر اختصاصی (3A/Vp35seq F و 3A/Vp35seq R) (Wieczorek *et al.*, 2020) منجر به تکثیر قطعه‌ی ۲۷۵ جفت‌بازی در ۱۱ نمونه شد، در حالی که در نمونه‌های بدون علائم

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Mehrdadsalehzadeh@gmail.com

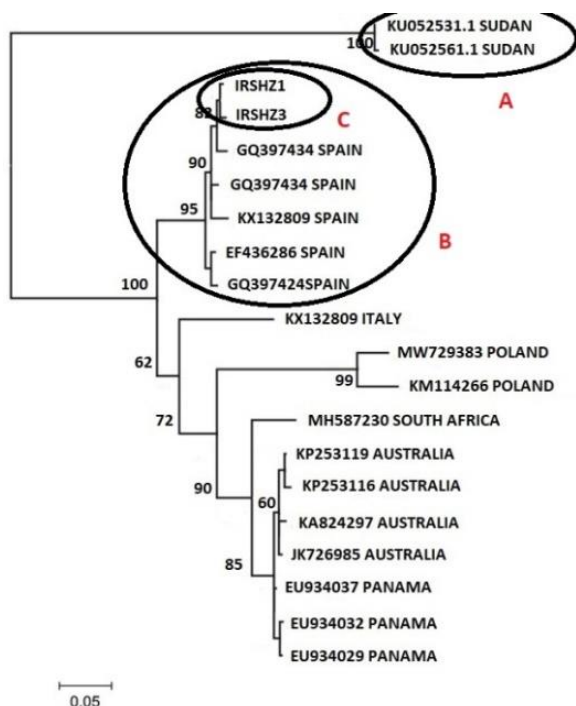
۱. مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز

۲. استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران



شکل ۱. علائم مشاهده شده در بوته گوجه فرنگی در یک گلخانه ای در اطراف شیراز آلوده به ویروس تورادو گوجه‌فرنگی A: بافت‌مردگی کشیده‌شده روی ساقه B: لکه‌های بافت‌مرده روی میوه و برگ. C: لکه‌های نکروز بافت‌مرده برگ و بدشکلی میوه در نمونه جمع‌آوری شده از مزارع اطراف شهرستان شیراز.

**Figure 1** Observed symptoms on Tomato torrado virus-infected tomato plants in a greenhouse in the vicinity of Shiraz. (A): Vertical necrosis on the stem (B): Necrotic lesions on fruits and leaves. (C): Necrotic lesion and fruit deformation in a sample collected from a tomato field in the vicinity of Shiraz city.



شکل ۲. درخت تبارزایی ترسیم شده براساس بخشی از توالی آر ان ای شماره‌ی دو (۲۷۵ نوکلئوتیدی) مربوط به دو جدایه ایرانی ویروس تورادو گوجه‌فرنگی (ToTV) و شانزده جدایه موجود در بانک ژن. درخت به روش بیشترین تشابه (ML) و توسط نرم‌افزار مگا ۷- (MEGA 7.0) بازسازی شده است. دو جدایه از ویروس لکه برگ سبزد کدو (*Squash chlorotic leaf spot virus*) از سودان از جنس *Torradovirus* با رس شماره‌های KU052561.1 و KU052531.1 به عنوان *Out group* انتخاب شدند (حلقه‌ی A). جدایه‌های ایرانی (حلقه‌ی C) به همراه جدایه‌های اسپانیایی (حلقه‌ی B) در یک گروه قرار گرفتند. گره‌هایی که کمتر از ۵۰ درصد مقادیر بوت استرپ را پشتیبانی می‌کردند، گزارش نشدند. رس‌شمار جدایه‌ها و خاستگاه جغرافیایی جدایه‌ها در درخت نشان داده شده است.

**Figure 2** Phylogenetic relationship of two Iranian Tomato Torrado virus (ToTV) isolates and sixteen exotic isolates of this virus obtained from GenBank, based on a part of the RNA 2 sequence (275 nucleotides). The Phylogenetic tree was reconstructed by the method of maximum likelihood (ML) by MEGA-7 software. Two isolates of *Squash chlorotic leaf spot virus* from Sudan from the genus *Torradovirus* with Accession numbers KU052531.1 and KU052561.1 were selected as *Out group* (circle A). Iranian isolates (ring C) were placed in one group with Spanish isolates (ring B). Nodes that support less than 50% of bootstrap values are not reported. The number of isolates and the geographical origin of the isolates is shown in the tree.

قطعه‌ای تکثیر نشد. محصول RT-PCR مربوطه به دو جدایه پس از خالص‌سازی از ژل (PCR purification kit - Qiagen) به شرکت سینوهه (ایران) برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی دوطرفه ارسال شد. بررسی و مقایسه ترادف‌های به‌دست آمده با ترادف‌های موجود در بانک ژن توسط نرم‌افزار n-Blast نشانگر بیشترین یکسانی ترادف‌ها با ترادف بخشی از ژن پروتئین پوششی (Vp35) ویروس تورادو گوجه‌فرنگی بود. زیرهم‌چینی چندگانه توالی‌های حاصل از محصول PCR جدایه‌های ایرانی ToTV با ترادف ژن Vp35 مربوط به ۳۱ جدایه‌ی ToTV موجود در ژن‌بانک نشان داد، جدایه‌های ایرانی بیشترین شباهت را به ترتیب ۹۸/۲ (IRSHZ1) و ۹۷.۳ درصد (IRSHZ3) را با ToTV استرین TEN-03 و کمترین شباهت ۹۶/۸ درصد (IRSHZ1) و ۹۵.۴ درصد (IRSHZ3) را با ToTV استرین GNC-06 که هر دو از اسپانیا گزارش شده اندرا نشان داد. درخت تبارزائی ارتباط بین جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌ها در شکل ۲ آمده است. در درخت تبارزایی جدایه‌های ایرانی همراه با برخی از جدایه‌های اسپانیایی در یک خوشه و دورتر از جدایه‌های آفریقایی، استرالیایی، هلندی و پانامایی قرار گرفتند که احتمالاً به دلیل تکامل مستقل در جدایه‌های مختلف است. احتمال آلودگی مخلوط این نمونه‌ها با سایر ویروس‌ها با استفاده از آغازگرهای عمومی پوتی ویروس‌ها: Nib1 و Nib3R (Riechmann *et al.* 2015)، آغازگرهای عمومی بگومو ویروس‌ها: B<sup>C</sup> primer و primer181<sup>V</sup> (Bridson *et al.*, 2010) و نیز آغازگرهای اختصاصی ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه‌ی گوجه‌فرنگی: TobamodR و TobamodF (Yan *et al.* 2021) بررسی شد که قطعه‌ای تکثیر نشد. با توجه به اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی در ایران، و خسارات اقتصادی قابل توجهی که توسط ToTV در بسیاری از نقاط جهان گزارش شده است، وجود این ویروس در ایران، ضرورت درک بهتر همه‌گیری آن و اتخاذ اقدامات مدیریتی مؤثر ضروری است. بررسی بیشتر جهت تعیین تنوع ژنتیکی، بیماری‌زایی جدایه‌ها، میزان پراکنش این ویروس در سایر نقاط کشور و شناسایی میزبان‌های دیگر این ویروس در دست انجام می‌باشد. با توجه به اطلاعات موجود این اولین گزارش از تورادو ویروس گوجه‌فرنگی در ایران است.

واژگان کلیدی: ToTV، بیماری نوظهور، فیلوژنی، شیراز



## Short Scientific Report

## The First Report of the Tomato torrado virus (ToTV) occurrence in Iran

A. Afsharifar<sup>1</sup>, S. Dehghanpour Farashah<sup>2</sup>, and M. Salezadeh<sup>1\*</sup>

(Received: 14.07.2022; Accepted: 12.11.2022)

Emerging plant diseases account for serious threats to agricultural crop yields and food security. *Tomato torrado virus* (ToTV) for the first time was reported in the Canary Islands (Spain) from greenhouse-grown tomato plants expressing yellowing areas at the base of the leaflets, which later turn into necrotic spots or large necrotic areas covering leaves, stem and fruit (Verbeek *et al.*, 2007). ToTV is the type member of the genus *Torradovirus* in the family *Secoviridae*. This virus has a non-enveloped icosahedral morphology (about 30 nm in diameter), with a bipartite genome composed of two linear single-stranded positive-sense RNA molecules (Wintermantel *et al.*, 2018). ToTV, together with five other members of the *Torradovirus* species, *Tomato marchitez virus* (ToMarV), *Carrot torradovirus 1* (CaTV1), *Lettuce necrotic leaf curl virus* (LNLCV), *Motherwort yellow mottle virus* (MYMOV), *Squash chlorotic leaf spot virus* (SCLSV), are the spherical viruses transmitted by three species of whiteflies (*Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci*, and *Trialeurodes abutilonea*) in a semi-persistent manner. Noteworthy, the seeds transmission of a Polish ToTV isolate (1-3%) has also been reported (Jaroszewska *et al.*, 2019). During a field survey carried out during the spring of 2021, a total number of 14 tomato plant samples showing severe necrosis symptoms on tomato leaves and fruits (Fig.1), similar to those described for ToTV (Moodley *et al.*, 2019), were collected from an open tomato field in the vicinity of Shiraz. Total RNA was extracted from leaf and fruit tissues of 14 symptomatic samples using Trizol reagent, and for the presence of ToTV was subjected to reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using a set of specific primer pairs (3Avp/35seq R and 3Avp/35seq F) targeting approximately a 275-nucleotide fragment in the coat protein gene (Wieczorek *et al.* 2020). Eleven symptomatic tomato samples yielded an amplicon of the expected size (about 275 bp) in the RT-PCR, while no band was amplified in the healthy tomato leaf sample. Amplified fragments of two samples were purified from the gel using a PCR purification kit (Qiagen Co) and sequenced directly using a paired-end sequencing strategy (Sinohe Co. Iran). Multiple alignments of the obtained nucleotide sequences showed that the Iranian ToTV isolates have the highest similarity of 98.2% (IRSHZ1) and 97.3% (IRSHZ3) with ToTV strain TEN-03 and the lowest similarity of 96.8% (IRSHZ1) and 95.4% (IRSHZ3) with ToTV strain GNC-06, both of which were reported from Spain. In phylogenetic analysis, the Iranian isolates, along with some Spanish isolates, were grouped in one cluster. In contrast, other ToTV isolates (including African, Australian, Netherlands and Panamanian isolates) were grouped into a separate clade (Figure 2). Which probably implies the independent evolution in these ToTV isolates. To identify the possibility of mixed infection with other viruses, four primer pairs, including a degenerate primer pair of potyviruses Nib1 / Nib3R (Riechmann *et al.* 2015); a degenerate primer pair of begomoviruses primer<sup>BC</sup> / primer<sup>181V</sup> (Anfoka *et al.* 2005) and ToBRFV specific primer pair TobamodF/TobamodR (Tamura *et al.* 2011) were used which had no result. Considering the economic importance of tomatoes in Iran and the presence of the tomato torrado virus, which is responsible for serious economic losses in many parts of the world, a deeper understanding of the epidemiology of these new emerging viral diseases' is imperative to improve the current control measures. Further investigations are underway to identify the genetic variation, pathogenicity of

\* Corresponding author's email: Mehrdadsalezadeh@gmail.com

1. Plant Virology Research Center, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

2. Assistant professor of plant pathology, Department of Agriculture, Payame Noor University, Thehran, Iran.

different strains, natural host range and virus distribution in the country. To our knowledge, this is the first report of a torradovirus infecting tomato plants in Iran.

**Keywords:** ToTV, emerging disease, phylogeny, Shiraz

## References

## منابع

- Briddon R. W., Mansoor S., Bedford I. D., Pinner M. S., Saunders K., Stanley J. and Markham P. G. 2001. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology* 285(2), 234-243.
- Moodley V., Gubba A. and Mafongoya P. L. 2019. A survey of whitefly-transmitted viruses on tomato crops in South Africa. *Crop Protection* 123, 21-29.
- Pospieszny H., Borodynko-Filas N., Hasiów-Jaroszewska B., Rymelska N. and Elena, S. F. 2019. Transmission rate of two Polish Tomato torrado virus isolates through tomato seeds. *Journal of General Plant Pathology* 85(2), 109-115.
- Riechmann J. L., Cervera M. T. and Garcia J. A. 1995. Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *Journal of General Virology* 76(4), 951-956.
- Verbeek M., Dullemans A. M., Van den Heuvel J. F. J. M., Maris P. C. and Van der Vlugt R. A. A. 2007. Identification and characterisation of Tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato. *Archives of Virology* 152(5), 881-890.
- Verbeek M., van Bekkum P. J., Dullemans A. M. and van der Vlugt R. A. 2014. Torradoviruses are transmitted in a semi-persistent and stylet-borne manner by three whitefly vectors. *Virus Research* 186, 55-60.
- Wintermantel W. M., Hladky L. L. and Cortez A. A. 2018. Genome sequence, host range, and whitefly transmission of the torradovirus Tomato necrotic dwarf virus. In V International Symposium on Tomato Diseases: Perspectives and Future Directions in Tomato Protection 1207 (pp. 295-302).
- Wieczorek P., Budziszewska M., Frąckowiak P. and Obrepalska-Stepłowska A. 2020. Development of a new Tomato torrado virus-based vector tagged with GFP for monitoring virus movement in plants. *Viruses* 12(10), 1195.
- Yan Z. Y., Zhao M. S., Liu L. Z., Yang, G. L., Chao G. E. N. G., Yanping T. I. A. N. and LI X. D. 2021. Biological and molecular characterization of *tomato brown rugose fruit virus* and development of quadruplex RT-PCR detection. *Journal of Integrative Agriculture* 20(7), 1871-1879.