گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد 34 شماره 2، اسفند ماه 1390

پراکنش ویروس موزاییک آرابیس (ArMV) در تاکستان ها و رز کاری های استان های آذربایجان غربی و شرقی

هاجر دوست صدیق[1]، فرشاد رخشنده رو[2*] و مسعود شمس بخش[3]

1- کارشناس ارشد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

2- **نویسنده مسؤول**: استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران (rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir)

3- دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ دریافت: 89/8/4 تاریخ پذیرش: 90/8/11

چکیده

ویروس موزاییک آرابیس *Arabis mosaic virus* (ArMV) متعلق به جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* می باشد. این ویروس با نماتدهای گونه *Xiphinema* spp. منتقل می شود و دارای میزبان های طبیعی زیادی از بین گیاهان زینتی و غیر زینتی می باشد. در این تحقیق کوشش بعمل آمد تا میزان پراکندگی ویروس ArMV در تاکستان‌ها و رزکاری‌های استان های آذربایجان غربی و شرقی تعیین گردد. به این منظور در طول فصول بهار تا پاییز سال های 1387 و 1388 تعداد 1043 نمونه شامل 251 نمونه برگی رز و 792 نمونه برگی انگور بدون توجه به علایم بیماری به صورت تصادفی از شهرهای مختلف استان های آذربایجان غربی و شرقی جمع آوری شد. برای ردیابی ویروس در نمونه‌های جمع آوری شده از آزمون های ایمنی سنجی-آنزیمی الیزای مستقیم (DAS-ELISA) و دیبا Dot-Immunobinding Assay (DIBA) استفاده شد. همچنین تائید آلودگی به ویروس در نمونه هایی که در آزمون های سرولوژیک به آنتی سرم ArMV واکنش مثبت نشان داده بودند توسط آزمون RT-PCR و با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی برای ژن رمز کننده پروتئین پوششی صورت پذیرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که ArMV در مجموع به میزان 30/3% و 46/6% به ترتیب در رز کاری ها و تاکستان های استان آذربایجان شرقی و 30/2% و 42% نیز در رز کاری ها و تاکستان های استان آذربایجان غربی پراکنده شده است. در آزمون RT-PCR قطعات ژنتیکی با اندازه های 440bp و 519 bp مربوط به ژن رمز کننده پروتئین پوششی ویروس از نمونه های آلوده تکثیر شد. این بررسی به طور جامع میزان پراکندگی ویروس موزاییک آرابیس را در تاکستان ها و رزکاری های استان آذربایجان شرقی نشان داد.

کلید واژه ها: پراکنش، ویروس موزاییک آرابیس (ArMV)، DAS-ELISA، DIBA، RT-PCR

مقدمه

ویروس موزاییک آرابیس *Arabis mosaic virus* (ArMV) برای نخستین بار از انگلستان در سال 1944 توسط اسمیت و مارخام[1] (21) گزارش شد. این ویروس فاقد غلاف بوده و دارای پیکره ایزومتریک با تقارن چند وجهی به قطر 27-25 نانومتر می باشد (15). ویروس موزاییک آرابیس متعلق به خانواده بزرگ ویروس های گیاهی *Secoviridae* و جنس *Nepovirus* می باشد و دامنه میزبانی فوق العاده وسیعی دارد (20).

1- Smith & Markham

Archive of SID

www.SID.ir

93 گونه گیاهی شامل گیاهان زینتی، درختان میوه هسته دار، انگور، چغندرقند، خیار، کاهو، کرفس، تمشک، توت فرنگی، ریواس، رازک و شبدرسفید میزبان ویروس موزاییک آرابیس می باشند (15). در بین گیاهان زینتی به رز (Rosa)، زنبق (Gladiolus)، زعفران (Crocus)، میخک (Dianthus)، آلستومریا (Alstromeria)، بگونیا (Begonia) و گل نرین (Nerine) را آلوده می کند (19). ویروس از دامنه پراکنش گسترده ای در نواحی شرقی آسیا، آمریکا، آفریقا، استرالیا، روسیه، ترکیه و کانادا برخوردار می باشد (15). این ویروس به سهولت بوسیله بذر، پیوند و نماتد های متعلق به خانواده Longidoridae مانند گونه های *Xiphinema index*، *X. diversicaudatum*، *X. coxi* و *X. americanum* منتقل می شود (7). ژنوم ویروس از دو مولکول RNA تک رشته ای مثبت با مجموع طول 13100 نوکلئوتید تشکیل شده است. در گذشته جهت ردیابیArMV از تکنیک الیزا استفاده شده است که در هر دو حالت مستقیم و غیر مستقیم با دقت بالا ویروس را ردیابی می کند (11 و 23). ویروس موزاییک آرابیس دارای روابط سرولوژیکی نزدیکی با سایر نپو ویروس ها از جمله ویروس بادبزنی برگ انگور *Grapevine fan leaf virus* (GFLV) می باشد و جداسازی این دو ویروس با استفاده از روش های سرولوژیکی به راحتی امکان پذیر نمی باشد (22، 24 و 25). ویروس ArMV به دلیل تغییرات زیاد ژنومی دارای دامنه میزبانی وسیع می باشد. با وجود این بررسی توالی ژنومی جدایه های مختلف ویروسی در نقاط مختلف جهان نشان داده است که در سطح ژنوم ویروس موزاییک آرابیس نواحی حفاظت شده ژنومی وجود دارد که می توان از آنها برای طراحی آغازگرهای اختصاصی با دقت بالا استفاده نمود (7). ArMV در بیشتر میزبان های خود ایجاد آلودگی پنهان می کند و از این رو شناسایی آن نیازمند روش های جدید تشخیص مولکولی مانند RT-PCR می باشد. با وجود آنکه مناطق زراعی در نقاط مختلف جهان به میزان زیادی به این ویروس آلوده نمی شوند در مناطقی که ArMV وقوع پیدا می کند، خسارت گسترده ای را به محصولات وارد می کند (10). ArMV در ایران از پراکندگی بالایی برخوردار است (18). این ویروس در ایران از رزکاری های مناطق مختلف تهران گزارش شده و باعث ایجاد موزاییک در گل های سرخ و کاهش ارزش اقتصادی گل های زینتی می شود (18).

همچنین در گذشته این ویروس از گوجه فرنگی و انگور از مناطق محتلف ایران گزارش شده است (13، 17، 18). با توجه به سابقه حضور ویروس موزاییک آرابیس در محصولات مختلف در ایران و به دلیل حضور میزبان های ثانویه و ناقلین فعال برای انتقال ویروس در کشور بررسی میزان پراکندگی ویروس ArMV در محصولات زراعی جهت اجرای کنترل موفق ویروس موزاییک مورابیس امری لازم و ضروری می باشد (8). همچنین اخیراً از بروز علایم موزاییک، بدشکلی برگ و کاهش تولید میوه در تاکستان ها و نیز کاهش کیفیت گل ها در گلستان های استان های آذربایجان غربی و شرقی گزارش های مختلفی شده است. از این رو در این تحقیق میزان پراکنش ویروس موزاییک آرابیس در گل رز در گل کاری ها و در انگور در تاکستان های مناطق مختلف استان های آذربایجان غربی و شرقی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه برداری جهت تعیین پراکندگی ArMV

در طی فصول بهار تا پاییز سال های 87 و 88 بازدیدهایی از فضاهای سبز، گلخانه ها و تاکستان های شهرستان های مختلف استان های آذربایجان شرقی شامل: مراغه، بناب، ملکان، میانه، عجب

Archive of SID

www.SID.ir

شیر، سراب، کلیبر و تبریز و آذربایجان غربی شامل: ماکو، سلماس، ارومیه، مهاباد، بوکان، پیرانشهر و میاندوآب صورت پذیرفت (شکل 1). در مجموع تعداد 1043 نمونه برگی رز و انگور بدون توجه به نوع علایم و به صورت تصادفی و با حرکت در قطر مزرعه به فاصله هر 1 متر یک نمونه جمع آوری شد. در نمونه هایی که دارای علایم مشکوک به آلودگی بودند علایمی مانند پژمردگی و زوال بوته، تغییر سینوس برگ ها، موزاییک و بد شکلی برگ ها، حضور لکه های حلقوی متحدالمرکز بر روی برگ ها در انگور و موزاییک برگ، بدشکلی و لکه های نکروتیک در برگ و گل در رز مشاهده شد. از 1043 نمونه جمع آوری شده دارای علایم و بدون علایم تعداد 792 نمونه از انگور (305 نمونه در سال 1387 و 257 نمونه در سال 1388 از استان آذربایجان شرقی)، (64 نمونه در سال 1387 و 166 نمونه در سال 1388 از استان آذربایجان غربی) و همچنین 251 نمونه از رز (92 نمونه در سال 1387 و 63 نمونه در سال 1388 از استان آذربایجان شرقی)، (41 نمونه در سال 1387 و 55 نمونه در سال 1388 از استان آذربایجان غربی) جمع آوری شد.

آزمون های سرولوژیک جهت ردیابی ArMV

برای ردیابی ArMV در نمونه های رز و انگور جمع آوری شده از آزمون سرولوژیک الیزای مستقیم به صورت ساندویچ دو طرفه آنتی بادی (DAS-ELISA) استفاده شد. همچنین از آزمون دیبا (DIBA)[1] برای تائید آلودگی در نمونه هایی که جذب های پایین را در آزمون DAS-ELISA نشان دادند استفاده شد. آزمون ایمنی سنجی الیزای مستقیم به صورت ساندویچ دو طرفه آنتی بادی مطابق روش کلارک و آدامز[2] (6) با کمی تغییر انجام پذیرفت. در این آزمون از آنتی بادی های چند همسانه ای کیت تجاری شرکت (Agdia, U.S.A. Inc) برای ردیابی ArMV استفاده شد. برای انجام این آزمون از نمونه های برگی جمع آوری شده عصاره گیری با نسبت یک به پنج (یک گرم بافت برگ در پنج میلی لیتر بافر استخراج) در هاون چینی سرد انجام پذیرفت. بافر استخراج در این آزمون حاوی 3میلی مولار KCL ، 3 میلی مولار NaN3 ، 1میلی مولار Na_2HPO4 ، 0/13 مولار NaCl ، 2درصد PVP-24000 و 0/05 درصد روعن Tween20 با اسیدیته برابر 7/4 بود. ابتدا چاهک های موجود در بشقابک الیزا با میزان 100 میکرولیتر از آنتی سرم اختصاصی ArMV با رقت 1:200 پوشش دار شدند و در دمای 4 درجه سلسیوس به مدت یک شب نگهداری شدند. پس از شستشو در هر یک از چاهک ها مقدار 100 میکرولیتر از عصاره های گیاهی مورد بررسی ریخته شد و غیر از چاهک های مربوط به نمونه، چاهک هایی نیز به عصاره آلوده مربوط به ویروس (کنترل مثبت)، عصاره نمونه سالم (کنترل منفی) و بافر عصاره گیری (بلانک) اختصاص داده شدند. بشقابک ها به مدت یک شبانه روز در دمای 4 درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از شستشو، چاهک ها با شیر خشک بدون چربی 5% جهت بلوکه شدن فضاهای خالی درون چاهک در دمای اتاق برای مدت 3 ساعت نگهداری شدند. پس از شستشو به میزان 100 میکرولیتر ایمونوگلوبولین نوع G متصل شده به آنزیم آلکالین فسفاتاز به چاهک ها اضافه و برای مدت 4 ساعت بشقابک ها در دمای37 درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از شستشو، میزان 100 میکرولیتر از بافر سوبسترا دارای ماده پارانیتروفنیل فسفات[3] به درون هر چاهک ریخته شد و سپس بشقابک ها دور از تابش نور نگهداری شدند

1- Dot-Immunobinding assay
2- Clark & Adams
3- Sanofi, French

Archive of SID

www.SID.ir

شکل 1- نقشه استان های آذربایجان شرقی (سمت راست) و آذربایجان غربی (سمت چپ). مناطق مورد نمونه برداری در این تحقیق در نقشه ها با پیکان مشخص شده اند.

و هر نیم ساعت یکبار جهت بروز واکنش رنگ زایی و حضور رنگ زرد با دستگاه الیزا خوان مدل (ELX 800-Biotek) در طول موج 405 نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه هایی که مقدار عددی جذب آن ها از 3 برابر میانگین جذب چاهک های مربوط به شاهد سالم بیشتر بود به عنوان نمونه های مثبت و آلوده به ویروس در نظر گرفته شدند.

از آزمون سرولوژیک DIBA برای تائید نتایج آزمون DAS-ELISA برای تعداد 30 نمونه گیاهی آلوده به ArMV استفاده شد. برای این منظور نمونه هایی که در آزمون الیزای مستقیم واکنش رنگ زایی ضعیفی داشتند برای تائید حضور ویروس در آنها مورد آزمون DIBA مطابق روش اجرا شده توسط بانتاری و گودوین[1] (4) قرار گرفتند. برای این منظور از آنتی بادی چند همسانه ای تهیه شده از شرکت (Agdia, U.S.A. Inc) با رقت 1/250 و همچنین آنتی بادی Goat Anti-Rabbit (GAR) با رقت 1/10000 استفاده شد. جهت بلوکه نمودن غشاء نیتروسلولزی از محلول شیر خشک بدون چربی 5% استفاده شد. همچنین برای واکنش رنگزائی از مواد شیمیایی رنگزا NBT و BCIP استفاده شد. حضور لکه های آبی رنگ در سطح غشاء به عنوان نمونه آلوده به ویروس در نظر گرفته شدند و حضور لکه ها تا 40 دقیقه پس از اضافه نمودن سوبسترا در دمای اتاق مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون از عصاره گیاه سالم و آلوده به عنوان شاهد های منفی و مثبت استفاده شد.

ردیابی مولکولی ویروس با استفاده از آزمون RT-PCR

برای تکثیر بخشی از ژنوم ویروس در نمونه های رز و انگور از آزمون RT-PCR برای تعداد 15 نمونه از گیاهانی که توسط آزمون های سرولوژیک مثبت شناخته شده بودند استفاده شد. برای این منظور عصاره گیاهان رز و انگور آلوده برای ایجاد غلظت مناسب ویروس در گیاه محک خیار به برگ های آن در گلخانه مایه زنی شدند. ده روز پس از مایه زنی، آر.ان.ای کل از 0/3 گرم از بافت برگ های جوان خیار با استفاده از بافر کلرید لیتیم (LiCl) (0/1 مولار LiCl، 0/1 مولار Tris-HCl با

1- Banttari & Goodwin

Archive of SID
www.SID.ir

اسیدیته 8، 0/01 مولار EDTA با اسیدیته 8، 1 درصد SDS، 5% ماده PVP-24000 و 2 درصد Na2So3) مطابق روش چوناپیات و همکاران[1] (5) استخراج شد. فرایند سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس M-) (MuLV و مطابق دستورالعمل کیت تجارتی شرکت Fermentas آلمان و با استفاده از آغازگرهای برگشتی (Reverse Primer) (جدول 1) اختصاصی برای ژن پروتئین پوششی ArMV انجام پذیرفت. برای این منظور میزان 5 ماکروگرم از آر.ان.ای کل استخراج شده به همراه 1 ماکرومولار آغازگر برگشتی در حجم 11 ماکرولیتر مخلوط واکنش برای مدت 5 دقیقه در دمای 70 درجه سلسیوس حرارت داده شد. سپس به میزان 2 میلی مولار PCR 4dNTP Mix، 4 ماکرولیتر 5X Reaction Buffer، 20 واحد آنزیم Ribonuclease inhibitor و 200 واحد آنزیم نسخه بردار معکوسM-MuLV به مخلوط واکنش اضافه و برای مدت یک ساعت در دمای 42 درجه سلسیوس قرار داد شد. مخلوط واکش برای توقف فعالیت آنزیم برای مدت 5 دقیقه در 70 درجه سلسیوس قرار داده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از 2µL cDNA و در حضور آغازگرهای اختصاصی (جدول 1) انجام پذیرفت. آغازگرهای مورد استفاده برای جدایه اروپایی با شماره ثبت موجود در بانک ژن جهانی (X55460.1) در گذشته طراحی شده بودند. محصولات حاصل از تکثیر PCR برای بررسی اندازه و کیفیت در ژل آگاروز 1% با شدت جریان 25 میلی آمپر به مدت 45 دقیقه آنالیز شدند.

PCR در حجم 25 میکرولیتر و غلظت نهایی 10 پیکومول از هر آغازگر، 1/5 میلی‌مولار کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، 2 میکرولیتر بافر واکنش 10x (500 mM KCl, Tris-HCl (اسیدیته‌ی 8/4))، 0/2 میلی‌مولار دزوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (dNTPs)، 2/5 میکرولیتر از cDNA و 3 واحد آنزیم پلی‌مراز (*Taq* Polymerase) (سیناژن، ایران) و در دستگاه ترموسایکلر (Ependorf,AG, Germany) انجام شد. واسرشته‌سازی اولیه در دمای 94 درجه‌ی سلسیوس به مدت دو دقیقه صورت گرفت. سپس 35 چرخه شامل واسرشته-سازی DNA ژنومی در دمای 94 درجه‌ی سلسیوس، به مدت 30 ثانیه؛ اتصال آغازگرها به رشته‌ی الگو در دمای52 درجه‌ی سلسیوس، به مدت 45 ثانیه ؛ گسترش رشته‌ی جدید در دمای 72 درجه‌ی سلسیوس به مدت 60 ثانیه انجام شد و در پایان گسترش نهایی در دمای 72 درجه‌ی سلسیوس به مدت ده دقیقه انجام شد.

بررسی دامنه میزبانی و خصوصیات بیولوژیکی ویروس در گلخانه: ویژگی های بیولوژیکی ArMV در گلخانه جهت تائید آلودگی نمونه ها به ArMV علاوه بر آزمون های الایزا و RT-PCR انجام پذیرفت. برای این منظور نمونه هایی که برای آلودگی به ویروس مثبت تشخیص داده شدند به صورت مکانیکی با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (KH_2PO_4و K_2HPO_4)، 0/1 مولار با pH= 7/1 دارای 15%. از ماده 2-مرکاپتواتانول به صورت مکانیکی بر روی گیاهان محک شامل سلمک (*Chenopodium amaranticolor*)، توتون (*Nicotiana glutinosa*)، لوبیای چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) و خیار (*Cucumis sativus*) در مرحله 2 تا 4 برگی مایه زنی شدند. علایم 10 روز پس از مایه زنی با ویروس یادداشت برداری شدند. مایه زنی ها در 2 تکرار انجام پذیرفت. به منظور اطمینان از آلوده بودن گیاهان محک، آزمون الایزا هفت روز پس از مایه زنی مجدد انجام پذیرفت. همچنین برای گیاهانی که علایم مشخصی را نشان

1- Channuntapipat *et al*.

Archive of SID
www.SID.ir

ندادند مایه زنی برگشتی (Back Inoculation) انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

خصوصیات بیولوژیکی ArMV

پس از ردیابی آلودگی در نمونه های دارای علایم آلوده به ArMV مشخص شد علایمی مانند: کلروز و نکروز در فواصل بین رگبرگ ها در برگ، تغییر در سینوس در برگ ها، زردی عمومی و همچنین موزاییک در رز (شکل 2 الف تا د) مرتبط با آلودگی

جدول 1- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر پروتئین پوششی ویروس ArMV

دامنه قطعه مورد تکثیر توسط آغازگرها	نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر	دمای ذوب آغازگر	اندازه قطعه مورد تکثیر	رفرنس مورد استفاده
توالی 1124 تا 1642	ArMV-F (H1124)	5'-CAGCGGATTGGGAGTTCGT-3'	57°C	۵۱۹ bp	(12)
	ArMV-R (C1642)	5'-TTGGCCCAG ATATAGCGTAA-3'	57°C		
توالی 428 تا 867	ArMV-(H428)	5'-GCGGCGGATTGGGAGTT-3'	57.8°C	۴۴۰ bp	(16)
	ArMV-(C867)	5'-CGATGGTAGGGGGAGCGTATT-3'	58.7°C		

شکل 2- علایم حاصل از آلودگی ArMV در برگ نمونه های مختلف رز و انگور الف) علایم کلروز و نکروز در فواصل بین رگبرگ ها در برگ انگور رقم دست ارچین ارومیه، ب) تغییر سینوس برگ ها در برگ انگور رقم کشمشی، ج) زردی برگ ها در انگور رقم حسینی، د) موزاییک برگ ها در گیاه رز آلوده به ویروس.

Archive of SID
www.SID.ir

ArMV می باشند. علایمی که تا 10 روز پس از مایه زنی ویروس در گیاهان محک نمایان شد با علایم گزارش شده قبلی (15) برای ویروس مطابقت داشت (جدول 2). جدایه های ArMV که از میزبان های رز و انگور جدا شده بودند علایمی یکسانی در گیاهان محک ایجاد نمودند. تنها شدت علایم در گیاه محک خیار برای جدایه های رز بسیار شدیدتر از جدایه های انگور بود (شکل 3).

تشخیص و ردیابیArMV از نمونه های آلوده با استفاده از آزمون های سرولوژیکی

ویروس موزاییک آرابیس به راحتی توسط سرم تجارتی شرکت Agdia و با آزمون الیزای مستقیم قابل ردیابی بود. اما به دلیل توان ایمنی زائی کم ویروس گاهاً مشاهده می شد نمونه هایی با علایم ویروسی جذب های پایینی را در آزمون الیزای مستقیم نشان می دادند و یا به دلیل اثر زمینه ای در برخی موارد نتایج آنها با ابهام رو به رو می شد. از این رو از آزمون دیبا در تائید نتایج آزمون الیزای مستقیم استفاده شد. تمامی نمونه هایی که از میزان جذب پایین در آزمون DAS-ELISA برخوردار بودند با بروز باندهای آبی رنگ بر روی غشاء نیتروسلولزی در آزمون دیبا با دقت بالا آلوده به ویروس تشخیص داده شدند.

ردیابی ArMV با استفاده از آزمون RT-PCR.

با انجام آزمون PCR ، ArMV از بافت های برگی گیاه رز و گیاهان محک مایه زنی شده تا 10 روز پس از مایه زنی و همزمان با بروز علایم به راحتی قابل ردیابی بود. در حالی که با استفاده از این آزمون ویروس از بافت برگی گیاه انگور به طور مستقیم قابل ردیابی نبود. دلیل آن می تواند حضور ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدهای گیاهی مهار کننده واکنش PCR باشد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که برای مناطق ژنتیکی مختلف از توالی مربوط به ژن رمز کننده پروتئین پوششی طراحی شده بود (جدول 1) قطعاتی با اندازه های bp 519 و bp 440 در نمونه های آلوده به ArMV توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد (شکل 4). با وجود حساسیتی که آزمون RT-PCR برای ردیابی ویروس دارد ولی در برخی موارد مشاهده شد نمونه هایی که در آزمون های سرولوژیک برای آلودگی ArMV مثبت بودند حتی پس از مایه زنی بر روی گیاهان محک در آزمون RT-PCR با آغازگر اختصاصی قابل ردیابی نبودند.

جدول2- خصوصیات بیولوژیکی ویروس موزاییک آرابیس بر روی گیاهان محک علفی

گیاه محک	علایم
Chenopodium quinoa	(Ll) , (Mo)
Cucumis sativus	(M) , (Lm) , (Ch), (Scll)
Nicotiana glutinosa	(Crs) , (Lm)
Vigna ungiculata	(Ch) , (Ll)

Ch: Chlorosis ; Crs: Chlorotic ringspot; Ll: Local lesion ; Lm: Leaf malformation ;M: Mosaic ; Mo: Mottling, Scll: Systemic chlorotic local lesion

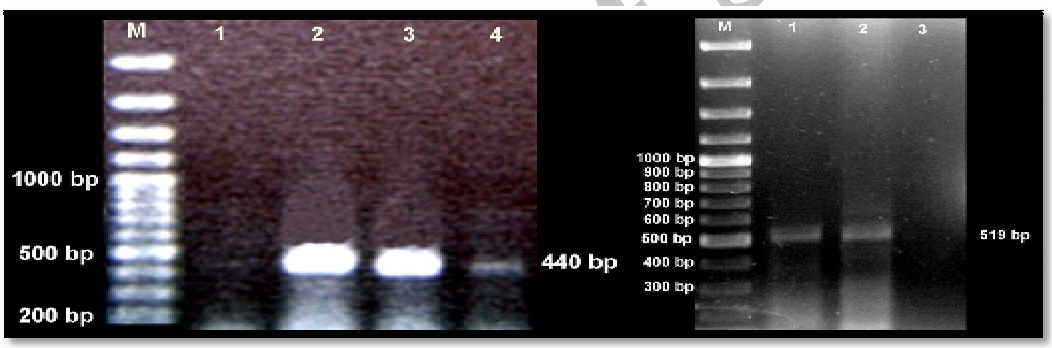
Archive of SID

www.SID.ir

ب

الف

شکل 3- **کلروز سیستمیک در برگ های خیار برای جدایه های رز (الف) و انگور (ب)**



شکل 4- **تکثیر مولکولی ArMV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی توسط آزمون RT-PCR. شکل الف) قطعه تکثیر شده از پروتئین پوششی باندازه** 519 **جفت باز با استفاده از جفت آغازگر طراحی شده توسط مک کنزی و همکاران**[1] (12) . 1: **نمونه رز،** 2: **نمونه انگور و** 3: **نمونه گیاه عاری از ویروس. ب) تکثیر قطعه** 440 **جفت بازی از پروتئین پوششی ArMV با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده توسط ناسوت و همکاران**[2](16) 1: **نمونه گیاه عاری از ویروس،** 2: **نمونه گیاه رز،** 3 **و** 4: **نمونه های انگور. M: مارکر وزن مولکولی DNA با اندازه** 1 **کیلوجفت باز (Germany. Fermentas. Inc)**

1- Makenzie *et al.*
2 - Nassuth *et al*.

www.SID.ir

میزان پراکندگی ArMV در تاکستان های استان های آذربایجان غربی و شرقی: نتایج این بررسی نشان داد ArMV در مجموع به میزان42% در انگور کاری ها و 30/2% در گل های رز هر دو استان مورد بررسی پراکنده بود (جدول 3). همچنین مشخص شد که ویروس مذکور در طول سال های 87 و 88 به بیشترین میزان (46/6%) در تاکستان های استان آذربایجان شرقی پراکنده شده است و تاکستان های استان آذربایجان غربی، رز کاری های استان آذربایجان شرقی و رز کاری های آذربایجان غربی با درصدهای پراکندگی های 30/8%، 30/3% و 30/2% از نظر میزان آلودگی به ArMV به ترتیب در جایگاه های بعدی قرار داشتند (جدول 3). همانطور که نتایج نشان داد ArMV در نمونه های جمع آوری شده در سال 1388 نسبت به سال 1387 از پراکندگی بیشتری در استان های مورد نمونه برداری برخوردار بود (جدول 3). همچنین مشخص شد در سال های 87 و 88 در بین شهرهای مورد بررسی ArMV توانسته است به بیشترین میزان در تاکستان ها و رز کاری های شهرهای ملکان از استان آذربایجان شرقی و ارومیه از استان آذربایجان غربی پراکنده شود (جداول 4 و 5). در این بررسی میزان پراکندگی ArMV در ارقام مختلف انگور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد ویروس به بیشترین میزان در رقم حسینی در مقایسه با سایر ارقام پراکنده شده است و در مقابل در ارقام انگور شیرازی سیاه و سفید Black (Lal و White Alhaghi) ویروس قابل ردیابی نبود (جدول 6).

جدول 3- درصد پراکندگی ArMV در میزبان های رز و انگور در استان های آذربایجان غربی و شرقی در سال های 1387 و 1388

	استان آذر بایجان شرقی				استان آذر بایجان غربی			
	رز		انگور		رز		انگور	
	1387	1388	1387	1388	1387	1388	1387	1388
تعداد نمونه جمع آوری شده	92	63	305	257	41	55	64	166
تعداد نمونه آلوده به ویروس	6	41	187	75	6	23	8	63
درصد آلودگی	%6/5	%65	%61/3	%29/1	%14/6	%41/8	%12/5	%37/9
درصد کل آلودگی در طی 2 سال	%30/3		%46/6		%30/2		%30/8	

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 4- درصد پراکندگی ArMV در شهرهای مختلف استان های آذربایجان غربی و شرقی در سال 1387

نام استان	آذربایجان شرقی								آذربایجان غربی							
نام شهر	عجب شیر	بناب	ملکان	مراغه	میانه	کلیبر	سراب	تبریز	بوکان	مهاباد	میاندوآب	ماکو	ارومیه	پیرانشهر	سلماس	
درصد آلودگی	%33/92	%43/28	%63/90	%31/07	%12/03	%11/07	%3/06	%34/99	%26/78	%79/76	%21/42	%5/95	%40/35	%22/73	%7/14	

جدول 5- درصد پراکندگی ویروس ArMV در شهرهای مختلف استان های آذربایجان غربی و شرقی در سال 1388

نام استان	آذربایجان شرقی								آذربایجان غربی							
نام شهر	عجب شیر	بناب	ملکان	مراغه	میانه	کلیبر	سراب	تبریز	بوکان	مهاباد	میاندوآب	ماکو	ارومیه	پیرانشهر	سلماس	
درصد آلودگی	%29/59	%27/26	%38/15	%60/28	%24/02	%14/48	%26/98	%19/33	%3/57	%13/09	0	0	%40/47	0	0	

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 6- درصد آلودگی به ArMV در ارقام انگور موجود در مناطق مورد نمونه برداری

ارقام انگور	تعداد نمونه جمع آوری شده	تعداد نمونه آلوده به ویروس	درصد آلودگی
Maleki	18	5	%27/77
Dast Archine Urumieh	18	9	% 50
Garmiane Maragheh	32	16	%50
Dash Gara	20	2	% 10
Khalili	16	2	% 12/5
Hoseini (Galin Barmaghi)	30	22	% 73/33
White Unseed Keshmesh	23	5	% 21/73
Black Unseed Keshmesh	20	3	% 15
White Sahebi	16	5	% 31/25
Black Sahebi	18	2	% 11/11
White Shahani	22	2	% 9/09
Dark Red Shahani	22	2	% 9/09
Asgari	18	9	% 50
Unseed Lal	45	1	% 2/22
White Alhaghi	6	0	0
Black Lal	4	0	0
White Shirazi	4	0	0
Black Shirazi	8	0	0
Gizil Uzum	30	19	% 63/33
Fakhri	18	2	% 11/11
Razeghi	16	1	% 6/25
White Peikani (Rish Baba)	17	7	% 41/17
Red Peikani (Rish Baba)	15	6	% 40

Archive of SID

www.SID.ir

ارقام انگور	تعداد نمونه جمع آوری شده	تعداد نمونه آلوده به ویروس	درصد آلودگی
Sighil Solian	18	2	% 11/11
Abi Bablu	22	2	% 9/09
Sargula	20	6	% 30
Jighjigha	22	2	% 9/09
Sachakh	17	7	% 41/17
Mambrima	21	1	% 4/76
At Uzum	19	3	% 15/78
Agh Mahli	18	3	% 16/66
Gara Mahli	45	1	% 2/22
Agh Shani	22	12	% 54/54
Anj Amji	20	4	% 20
Kalani	17	7	% 41/17
Bolmazi	18	9	% 50
Iaghoti	16	1	% 6/25
White Shakh Shakh	25	1	% 4
Gara Gandoma	16	1	% 6/25
Kalak Riavi	20	2	% 10

Archive of SID

استان های آذر بایجان غربی با در اختیار داشتن 7/4 % و آذربایجان شرقی با 5/9% از کل تولید انگور بارور کشور در سال 1387 در رتبه های 3 و 5 تولید انگور کشور قرار داشته اند و از این رو به عنوان عمده مناطق کشت و تولید انگور در کشور محسوب می شوند (1). در این پژوهش برای نخستین بار تحقیقی جامع در زمینه میزان پراکندگی ArMV در تاکستان های موجود در شهرهای مختلف استان های آذربایجان غربی و شرقی انجام پذیرفت. همچنین از آنجایی که ArMV از دامنه میزبانی گسترده ای در بین گیاهان زینتی برخوردار می باشد میزان پراکندگی ویروس در بین گل های رز در گلستان های هر دو استان مورد بررسی قرار گرفت.

در این بررسی میزان متوسط آلودگی به ArMV در بیشتر تاکستان ها و گل کاری های استان های مورد تحقیق 44/3% تعیین شد (جدول 3). در طی تحقیقی که در سال 1381 در مورد پراکندگی

www.SID.ir

ویروس های گیاهی در تاکستان های ایران صورت پذیرفت بررسی های مقدماتی تعیین پراکندگی ArMV در شهرهای ارومیه، میاندوآب، شیرآمین و ملکان از استان های آذربایجان شرقی و غربی نشان داد که ArMV در مناطق مذکور از میزان 6/6% پراکندگی برخوردار بوده است (17). در مجموع این داده ها نشان می دهند که ویروس موزاییک آرابیس به میزان حدود 7 برابر در تاکستان های استان های آذربایجان غربی و شرقی پراکنده شده است. این احتمال وجود دارد بررسی دقیقی که با تعداد بیشتر نمونه و مناطق مورد بررسی در تحقیق حاضر انجام پذیرفته است داده های دقیق تری را به دست داده است. همچنین عدم مبارزه با عوامل بیماریزای ویروسی و اجرای کشاورزی سنتی و استفاده از اندام های تکثیری آلوده می تواند موجب پراکندگی زیاد ویروس در مناطق مورد بررسی شده باشد. در هر صورت روند رو به افزایشی در میزان پراکندگی ArMV در فاصله سال های 87 تا 88 در هر دو میزبان رز و انگور در استان های آذربایجان دیده می شود که نشان دهنده انتقال موثر و سریع توسط عوامل انتقال دهنده می باشد (جداول 4 و 5). همچنین نتایج این بررسی نشان داد که ArMV در میزبان انگور در مقایسه با گیاه رز از پراکندگی بیشتری برخوردار می باشد (جدول 3). این امر می تواند احتمالاً به دلیل حضور قدیمی و سازگار تر ویروس با میزبان انگور باشد. لازم می باشد تا در آینده برآوردی دقیق از میزان خساراتی که ویروس در هر دو میزبان وارد می آورد انجام پذیرد. همچنین لازم هست تا توالی های نوکلئوتیدی استرین های موجود در مناطق مورد نمونه برداری در این تحقیق مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان در مورد میزان حساسیت میزبان های مورد اشاره و نیز سازگاری میزبان به ویروس و مباحث احتمالی در مورد سابقه حضور ویروس در میزبان های رز و انگور به راحتی قضاوت نمود. نتایج حاصل از بررسی های گذشته نشان داده بود که ArMV به میزان 18/8% در گلستان های شهرهای مختلف استان تهران در گل رز پراکنده شده است (18). نتایج این بررسی نشان داد ویروس به میزان 30% در رز کاری های استان های آذربایجان غربی و شرقی پراکنده شده است که این میزان چیزی حدود 1/5 برابر بیشتر از استان تهران می باشد. شاید دلیل این افزایش میزان آلودگی در استان های مورد نمونه برداری آب و هوای سرد تر و حضور ناقلین موثر و احتمالاً میزبان های متعدد در مناطق مورد بررسی در مقایسه با تهران باشد. در گذشته اثبات شده بود که ناقلین موثر در انتقال ویروس در کشور وجود دارند (9 و 14). ناقلین نماتود ویروس ArMV بیشتر در خاک های رسوبی و فشرده حضور دارند (2). شاید بتوان دلیل درصد بالای آلودگی ArMV در شهر ارومیه (جداول 4 و 5) را حضور نماتودهای ناقل به میزان زیاد در خاک رسوبی و فشرده حاشیه دریاچه ارومیه دانست. همچنین اثبات شده بود که ویروس موزاییک آرابیس که از گروه نپوویروس های اروپایی محسوب می شود با آب و هوای خنک و مرطوب در اروپا سازگاری زیادی در مقایسه با آب و هوای گرم و خشک دارد (3). این احتمال نیز وجود دارد که ویروس از اروپا وارد استان های استان آذربایجان غربی و شرقی که همجوار با کشورهای اروپایی می باشند شده باشد. این امر می تواند از داده های مربوط به ردیابی ویروس با آزمون RT-PCR در این بررسی نیز اثبات گردد. آغازگرهایی که در این بررسی از آنها استفاده شد برای تکثیر ژن مربوط به پروتئین پوششی جدایه های اروپایی ArMV طراحی شده بودند (شکل 4). با این وجود نمونه هایی که حضور ArMV با آزمون های سرولوژیک برای آنها اثبات شده بود گاهاً با آغازگرهای موجود واکنش نمی دادند و این احتمال وجود دارد تا استرین های غیر اروپایی نیز در کشور وجود داشته باشند. در بررسی گلخانه ای جدایه های متفاوت

Archive of SID

www.SID.ir

ویروس که از شهرهای مختلف استان جمع آوری شده بودند علایم مشابه ای را در میزبان های محک از خود نشان دادند (جدول 2). تنها جدایه های موجود در میزبان رز از شدت علایم بیشتری در گیاه خیار در مقایسه با جدایه های انگور برخوردار بودند. این امر می تواند به دلیل تاثیر تنوع میزبان در تنوع ژنتیکی در استرین های ویروس باشد و احتمالاً تغییر جغرافیایی تاثیری در تنوع ژنتیکی ویروس نداشته است. اثبات این نظریه نیاز به تحقیقات بیشتر و آنالیزهای ژنتیکی وابسته به استرین های ویروس در ایران دارد که توسط محققین این پژوهش در حال انجام می باشد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که ArMV در انگور رقم حسینی از پراکندگی بیشتری در مقایسه با سایر ارقام برخوردار می باشد اما در ارقام انگور شیرازی سیاه و سفید (Black Lal و White Alhaghi) ویروس ردیابی نشد (جدول 6). توصیه می شود تا منابع مقاومت به ویروس موزاییک آرابیس انگور در ارقام اخیر و امکان استفاده از آنها در برنامه های مدیریتی و کنترل بیماری در تاکستان ها مورد بررسی قرار گیرد و پژوهش های مشابه برای سایر محصولات انجام پذیرد. ایران به عنوان یکی از کشورهای مطرح در تولید محصول انگور در جهان محسوب می شود و از آنجائی که محصولات آن به سایر کشورها صادر می شود و با توجه به آنکه بیشتر عوامل ویروسی بیماریزا در انگور از طریق اندام های تکثیری پایه های آلوده انتقال می یابند لذا ضروری می باشد تا وضعیت آلودگی این محصول به عوامل بیماریزا مشخص گردد (3). تعیین وضعیت پراکندگی عوامل بیماریزای ویروسی در جهت کنترل آن ها برای جلوگیری از احتمال برخورد با قوانین سخت گیرانه پست های قرنطینه ای در سایر کشورها برای محصولاتی مانند انگور و گیاهان زینتی که در صادرات ارزشمند می باشند امری لازم و ضروری می باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر حمیدرضا زمانی زاده مدیر محترم گروه تخصصی بیماری شناسی گیاهی واحد علوم و تحقیقات تهران در این پژوهش ابراز می دارند.

منابع

1. بی نام. 1389. نتایج طرح آمارگیری نمونه ای محصولات باغی 1387. دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی تهران. جلد 1، 95 ص.

2. Allen, W.R., Stobbs, L.W., and Vanschagen, J.G.1988. Association of *Xiphinema* species with soil type and grapevines infected with tomato ring spot virus in Ontario of Canada. Plant Disease, 72: 861-863.

3. Anonymous, 1992. *Arabis mosaic nepovirus.* In Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R., Harris, K.M., (eds.) Quarantine pests for Europe. CAB International, Wallingford, UK., pp: 1-5.

4. Banttari, E.E, and Goodwin, P.H.1985. Detection of *Potato virus X* and *Y* by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-ELISA). Plant Disease, 69: 202-205.

Archive of SID
www.SID.ir

5. Channuntapipat, C., Sedgley, M., and Collins, G. 2001. Sequences of the cDNA$_s$ and genomic DNA$_s$ encoding the S1, S7, S8 and Sf alleles from almond, *Prunus duleis*. Theoretical and Applied Genetics, 103: 1115-1122.

6. Clark, M.F., and Adams, A.N. 1977. Characterization of the microplate methods of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.

7. Digiaro, M., Elbeaino, T., and Martelli, G.P. 2006. Development of degenerate and species – specific primers for the differential and stimultaneous RT-PCR detection of grapevine – infecting nepoviruses of subgroups A , B and C. Journal of Virological Methods, 141: 34 -40 .

8. Fadaei, A.A., and Kheiri, A. 2003. Three species of the *Xiphinema americanum* lineage (Nematoda : Longidoridae) from Iran. Nematology, 5: 453-461.

9. Izadpanah, K., Zaki-Aghl, M., Zhang, Y.D., Daubert, S.P., and Rowhani. A. 2003. Bermuda grass as a potential reservoir host for *grapevine fanleaf virus.* Plant Disease, 87 : 1179-1182 .

10. Jones, A.T., Mitchell, M.J., and Brown, D.J.F. 1989. Infectibility of some new raspberry cultivars with *Arabis mosaic virus* and further evidence for variation in British isolates of this *Nepovirus.* Annals of Applied Biology, 113: 483-491.

11. Loudes, A. M., Ritzenthaler, C., Pinck, M., Serghini, M. A., and Pinck, L. 1995 . The 119 KDA and 124 Kda polyproteins of *Arabis mosaic Nepovirus* (isolates) are encoded by two distinct RNA-2 species. Journal of General Virology, 76: 899-906 .

12. Mackenzie, D.J., Mclean, M.A., Mukerji, S., and Green, M. 1997. Improved RNA exteraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Disease. 81: 222-226.

13. Massumi, H., Shaabanian, M., Hosseini Pour, A., Heydarnejad, J., and Rahimian, H. 2009. Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. Plant Disease, 93: 67-72.

14. Mojtahedi, H., Sturhan, D., Akhiani, A., and Barooti, S. 1980. *Xiphinema* species in Iranian vineyards. Nematology of Mediterranean, 8: 165-170.

15. Murant, A.F. 1970. *Arabis mosaic virus* . CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 16. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.

16. Nassuth, A., Pollari, E., Helmezy, K., Stevart, S., and Kolfavi, S.A. 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extract. Journal of Virological Methods, 13: 37-49.

17. Rakhshandehroo, F., Pourrahim, R., Zamanizadeh, H., Rezaee, S., and Mohammadi, M. 2005. Incidence and distribution of viruses Infecting Iranian vineyards. Journal of Phytopathology, 153: 480- 484.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Rakhshandehroo, F., Zamanizadeh, H., Modarresi, A., and Hajmansour, SH. 2006. Occurrence of *Prunus necrotic ring spot virus* and *Arabis mosaic virus* on Rose in Iran. Plant Disease, 90: 975-976.

19. Samuitiene, M. 2008. *Arabis mosaic virus* on ornamental plants. Biologic, 32: 264-268.

20. Sanfacon, H., Wellink, J., LeGall, O., Karasev, A., Van Der Vlugt, R., and Wetzel, T. 2009. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. Archives of Virology, 154: 899-907.

21. Smith, K.M., and Markham, R. 1944. Two new viruses affecting tabacco and other plants. Phytopathology, 34: 324-329.

22. Steinkellner, H., Weinhausl, A., Laimer, M., Camara Machado, A., and Katinger, H. 1991. Identification of the coat protein gene of *Arabis mosaic Nepovirus* and its expression in transgenic plants. Acta Horticulture, 308: 37-41.

23. Walter, B., Vuittenez, A., Kuszala, J., Stocky, G., and Burckard, A. 1984. Serological detection of grapevine court-noue viruses by the ELISA test. Agronomie, 4: 527-534.

24. Wetzel, T., Fuehs, M., and Krezal, G. 2001. Size and sequence variability of *the Arabis mosaic virus* protein 2A. Journal of General Virology, 147: 1643-1653.

25. Wetzel, T., Jardak, R., Meunier, T., Ghorbel, A., and Kraczal, G. 2000. Simultaneuse RT-PCR detection and differentiation of *Arabis mosaic* and *grapevine fanleaf* nepoviruses in grapevines with a single pair of primer. Journal of Virological Methods, 101: 63-69.

Archive of SID

www.SID.ir