

بیماریهای گیاهی، جلد ۴۲، ۱۳۸۵

شناسایی، پراکنش و تعیین فراوانی ویروس‌های همراه با پیچیدگی برگ  
مو (GLRaVs) و ویروس‌ای مو (GVA) در ایران و میزان آلودگی آنها  
در ارقام مختلف مو\*

Identification, distribution and prevalence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaVs)  
and grapevine virus A (GVA) in Iran and their rate of incidence in grapevine cultivars

وحید رومی، علیرضا افشاریفر\*\* و کرامت‌اله ایزد پناه  
بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

دریافت ۱۳۸۴/۹/۲۳ پذیرش ۱۳۸۵/۲/۱۳

چکیده

بیماری پیچیدگی برگ مو یکی از مهمترین بیماری‌های ویروسی مو در تاکستان‌های سراسر دنیا است که تا میزان ۴۰ درصد، باعث کاهش محصول شده‌اند. این بیماری توسط یک کلوستروویروس و چند آمپلوویروس متعلق به خانواده کلوستروویریده، که بطور کلی ویروس‌های همراه با پیچیدگی برگ مو (Grapevine leafroll associated viruses , GLRaVs) \* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه شیراز، به کمک اعتبارات قطب علمی ویروس‌شناسی  
\*\* مسئول مکاتبه

نامیده می‌شوند، ایجاد می‌گردد. در این تحقیق ویروس‌های همراه با پیچیدگی برگ مو و ویروس ای مو (Grapevine virus A, GVA) در تاکستان‌های استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، فارس و کهگیلویه و بویر احمد با آزمون RT-PCR ردیابی شدند و فراوانی آلودگی به این ویروس‌ها در مناطق مذکور مشخص شد. بعلاوه میزان آلودگی این ویروس‌ها در ارقام مختلف مو مطالعه گردید. آر. ان. ای کل از پوست سبز ساقه درختان مو استخراج جهت تکثیر قطعه‌ای از ژنوم ویروس‌های مورد مطالعه در نسخه‌برداری معکوس (reverse transcription, RT) و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۹ همراه با پیچیدگی برگ مو و آغازگرهای اختصاصی GVA بکار برده شد. در میان نمونه‌های آلوده قطعه مورد انتظار ویروس‌های شماره ۱، ۲، ۴ و ۵ پیچیدگی برگ مو و GVA از نمونه‌های تمام مناطق مذکور تکثیر گردید. قطعه مربوط به ویروس شماره ۹ که تنها در نمونه‌های استان‌های فارس و کهگیلویه و بویر احمد بدست آمد مقداری کوچکتر از اندازه مورد انتظار بود، اما در هیچ‌یک از آزمون‌های PCR بانندی در نمونه‌های سالم مشاهده نشد. نتایج حاصل از بررسی ۶۰۹ نمونه حاکی از گسترش ویروس GVA و بعضی از ویروس‌های همراه با پیچیدگی برگ مو در بیشتر مزارعی‌های مورد مطالعه بود. از نظر آلودگی به ویروس‌های GLRaVs استان کهگیلویه و بویر احمد با ۳۰/۱۷ درصد آلودگی، و از نظر GVA استان فارس با ۲۱/۶۶ درصد آلودگی، آلوده‌ترین منطقه‌ها بودند. از میان ویروس‌های مورد بررسی، GVA (۱۸/۲۲٪) و سپس GLRaV-1 (۱۳/۴۶٪) دارای بیشترین فراوانی بودند و در مجموع سهم آن‌ها در موهای آلوده چهار استان مورد مطالعه بترتیب، ۴۸/۱۹ و ۳۳ درصد بود. همچنین در بعضی نمونه‌ها GLRaV-1 و GVA، در تعدادی GLRaV-2 و GVA و در بعضی دیگر ویروس‌های شماره ۴، ۵ و ۹ پیچیدگی برگ مو بطور هم‌زمان در گیاهان آلوده وجود داشتند. در میان ارقام مختلف مو در ایران نیز، واریته قزل ازوم در استان آذربایجان غربی، کمترین میزان آلودگی و ریش بابا در استان فارس بیشترین میزان آلودگی را دارا بودند.

**واژه‌های کلیدی:** ایران، ویروس ای مو، ویروس‌های پیچیدگی برگ مو، ویروس‌های مو

## مقدمه

بیماری پیچیدگی برگ مو در حال حاضر مهمترین بیماری ویروسی مو است و تقریباً ۶۲ درصد از خسارت‌های ناشی از ویروس‌های مو مربوط به ویروس‌های همراه با این بیماری می‌باشد (Little *et al.* 2001). این بیماری گسترش جهانی داشته و تقریباً در تمام موکاری‌های دنیا دیده می‌شود (Goheen 1970). میزان خسارت بسته به شدت علائم، زمان برداشت و رقم مو فرق می‌کند. میانگین خسارت وارده بین ۴۰-۲۰ درصد گزارش شده است. این بیماری علاوه بر کاهش کمی تولید، کیفیت میوه را از طریق کاهش میزان قند انگور، افزایش اسیدیته و کاهش رنگ جبه‌ها تحت تاثیر قرار می‌دهد (Pearson & Goheen 1988, Mannini 2003).

علائم این بیماری در ارقام دارای میوه رنگی شامل برگ‌شدن لبه برگ به سمت پشت برگ و قرمز یا بنفش شدن زودتر از موعد فاصله بین رگبرگ‌ها است، درحالی‌که رگبرگ‌ها سبز باقی می‌مانند. در ارقام انگور سفید، رنگ فاصله بین رگبرگ‌ها سبز کم‌رنگ یا زرد خفیف است (Pearson & Goheen 1988). این علائم ناشی از آلودگی به یک کلستروویروس و چند آمپلوویروس می‌باشد که با نام Grapevine leafroll associated virus, (GLRaV) از شماره‌های ۱ تا ۹ نامگذاری شده‌اند. ویروس GLRaV-2 از جنس *Closterovirus* و ویروس‌های شماره ۱، ۳، ۴، ۵ و ۹ همراه با پیچیدگی برگ مو از جنس *Ampelovirus* هستند. وضعیت تاکسونومیکی ویروس‌های ۶، ۷ و ۸ همراه با پیچیدگی برگ مو هنوز مشخص نیست (Martelli *et al.* 2001). پیکره این ویروس‌ها از نوع میله‌ای خمش‌پذیر به ابعاد، ۲۰۰۰-۱۴۰۰×۱۲-۱۰ نانومتر است. ژنوم بصورت آر. ان. ای تک لا و با قطبیت مثبت است (Boscia *et al.* 1995, Zee *et al.* 1987). این ویروس‌ها به روش مکانیکی منتقل نمی‌شوند و تنها از طریق پیوند و برخی از آنها توسط شپشک‌ها به روش نیمه پایا منتقل می‌شوند (Hu *et al.* 1990).

در بسیاری از موارد همراهی ویروس‌هایی از جنس *Vitivirus* و مخصوصاً (GVA) Grapevine Virus A با بیماری پیچیدگی برگ مو مشاهده شده است. GVA انتشار وسیعی داشته و یکی از عوامل ایجاد کننده بیماری rugose wood (RW) در مو می‌باشد. این ویروس از تیره *Flexiviridae* و عضو تپ جنس *Vitivirus* و دارای پیکره‌های رشته‌ای انعطاف‌پذیر به ابعاد ۸۲۵-۱۲×۷۲۵ نانومتر، حاوی یک قطعه آر. ان. ای تک لای مثبت می‌باشد

(Martelli 2001).

RW مجموعه‌ای از بیماریهای قابل انتقال با پیوند است که در آن علایمی مثل ساقه آبله‌ای، ایجاد شیار و اختلال در استوانه چوبی در پایه و یا پیوندک مشاهده می‌شود و در نهایت مرگ زود هنگام گیاه را در پی دارد. در ایتالیا این ویروس بین ۲۲-۵ درصد به محصول خسارت می‌زند (Martelli 2001).

روش‌های متداول برای ردیابی ویروس‌های مو شامل ELISA و RT-PCR است. به دلیل غلظت کم ویروس‌های پیچیدگی برگ مو در گیاه از یک سو و حساسیت و اختصاصیت بالای RT-PCR از سوی دیگر امروزه از این روش بطور وسیعی برای تشخیص و ردیابی ویروس‌های مزبور استفاده می‌شود (Fazeli et al. 1998).

ویروس‌های GLRaV-1 و GVA از ایران قبلاً گزارش شده‌اند (Habibi et al. 2003). در تحقیق حاضر ویروس‌های همراه با پیچیدگی برگ مو و GVA در استان‌های مختلف ایران با استفاده از آزمون RT-PCR ردیابی شدند و پراکندگی و اهمیت نسبی هر یک از آنها در مناطق مختلف کشور تعیین گردید. همچنین سعی گردیده تا تصویری از میزان آلودگی ارقام مختلف مو به ویروس‌های مورد بحث در استان‌های ذکر شده به دست آید.

## روش بررسی

### ۱- شناسایی ویروس‌های مولد پیچیدگی برگ مو و GVA در ایران

از پوست ساقه در محل گره‌های پائینی شاخه‌های مو عصاره‌گیری بعمل آمد و آر. ان. ای کل از موها به روش مکنزی و همکاران (Mackenzie et al. 1997) استخراج و برای تشخیص GLRaVs و GVA در واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ویروسها (جدول ۱) مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش one-tube RT-PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل یک میکرولیتر آر. ان. ای استخراج شده از ۲ گرم پوست ساقه، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (به غلظت ۱۰ میکرومولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X)، ۰/۷۵ میکرولیتر از  $MgCl_2$  (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدها (dNTPs) (۱۰ میلی‌مولار)، ۱/۲۴ میکرولیتر از

۰/۲۵، (DTT) dithiothreitol، میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) و ۰/۰۵ میکرولیتر از آنزیم AMV reverse transcriptase صورت گرفت. واکنش RT بمدت ۳۰ دقیقه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. برای غیر فعال کردن فعالیت آنزیم RT لوله‌ها بمدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و عمل PCR روی محصول باقی‌مانده طبق برنامه زیر صورت گرفت: زنجیره ۳۵ سیکلی با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد بمدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بمدت ۶۰ ثانیه و امتداد نهایی زنجیره بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. محصول PCR بوسیله الکتروفورز در آگاروز ۱/۲ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

### ۳- پراکنش بیماری و فراوانی آن

برای تعیین پراکندگی GLRaVs و GVA از موهای دارای علائم تاکستان‌های استان‌های فارس، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و کهگیلویه و بویر احمد در طی سال‌های ۸۳-۸۱ از اوایل مرداد تا اواخر آبان نمونه‌برداری شد. علاوه بر آن، نمونه‌برداری‌های تصادفی و بدون توجه به علائم نیز صورت گرفت تا فراوانی ویروس‌های GLRaVs و GVA در این استان‌ها تعیین گردد.

### نتیجه

#### ۱- علائم

علائم بیماری پیچیدگی برگ مو در تاکستان‌های مناطق مختلف استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، فارس و کهگیلویه و بویر احمد مشاهده گردید. از ۳۶۶ نمونه، تعداد ۱۲۸ نمونه به ویروس‌های مورد بحث آلوده بودند. تعداد ۵۳ نمونه آلوده، بدون علائم و بقیه نمونه‌ها دارای علائم متفاوتی به شرح زیر بودند:

#### - علائم برگ

در شرایط آب و هوای استان‌های فارس و کهگیلویه و بویر احمد علائم بیماری

پیچیدگی برگ مو در فصل بهار قابل تشخیص نبود و موهای آلوده ظاهراً سالم به نظر می‌رسیدند. در اوایل مرداد ماه در موهای آلوده‌ی این مناطق پیچیدگی جزئی لبه برگها بطرف پایین در ارقام مختلف مشاهده شد. در اواخر شهریور و اوایل مهر در موهایی که میوه رنگی داشتند پیچیدگی حاشیه برگ بطرف پایین بطور کامل مشخص بود و رنگ برگها قرمز مایل به جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور تشخیص ویروس‌های همراه پیچیدگی برگ مو و GVA در ایران

Table 1. Oligonucleotide primers used in detection of GLRaVs and GVA in Iran by PCR

Virus	PCR product size(bp)	Primer	Genome location	Accession number	Nucleotide sequences from 5' to 3'
GLRaV-1	398	LEV1-C447	9996-9972	AF195822	CGA CCC CTT TAT TGT TTG AGT ATG
		LQV1-H47	9575-9596	AF195822	GTT ACG GCC CTT TGT TTA TTA TGG
GLRaV-2	337	LR2CPV	7048-7029	GLAV4131	ACG ACC GAA CGT TCT AAG TT
		LR2CPV	6711-6730	GLAV4131	TGG AGT TGA TGT CCG ACA GC
GLRaV-3	542	LR3LC1	10979-10999	AF037268.2	CGC TAG GGC TGT GGA AGT ATT
		LR3LC2	11524-11504	AF037268.2	GTT GTC CCG GGT ACC AGA TAT
GLRaV-4	323	LR4HSP C	339 - 318	AF039553.1	CAT ACA AGC GAG TGC AAT TAC A
		LR4HSP V	19 - 40	AF039553.1	ACA TTC TCC ACC TTG TGC TTT T
GLRaV-5	275	LR5HSP C	298-275	AF039552.1	TCT CCA GAA GAC GGA CCA ATG TAA
		LR5HSP V	26-48	AF039552.1	AAC ACT CTG CTT TTC TGC TGG CA
GLRaV-9	393	LR9-FV	7938-7958	AY297819.1	CGG CAT AAG AAA AGA TGG CAC
		LR9-RC	8330-8311	AY297819.1	TCA TTC ACC ACT GCT TGA AC

Table 1. (continued)

جدول ۱- (ادامه)

GVA	238	GVA-f	7035-7051	AY244516.1	AGG TCC ACG TTT GCT AAG
		GVA-r	7272-7255	AY244516.1	CAT CGT CTG AGG TTT CTA

بنفش شده بود در حالی که رگبرگهای اصلی سبز باقی مانده بودند (شکل ۱) در واریته‌های سفید علاوه بر پیچیدگی حاشیه برگ بطرف پایین، برگها علائم سبز کم‌رنگ یا زردی خفیف داشتند (شکل ۲). آلودگی توام در این ویروسها بطور معمول اتفاق می‌افتد و توسعه بیماری و علائم را تشدید می‌کند (شکل ۳). در بعضی از نمونه‌ها قرمزی برگ بدون پیچیدگی وجود داشت و ساقه دارای برآمدگی‌هایی در قسمت چوب و فرورفتگی‌هایی در قسمت داخلی پوست، مشابه با علائم GVA بود.



شکل ۱- پیچیدگی برگ و قرمزی بین رگبرگ‌ها در یک واریته انگور سیاه آلوده به GLRaV-1 از شیراز.

Fig. 1. Leaf rolling and interveinal reddening in a Black variety of grapevine infected with GLRaV-1 from Shiraz.



شکل ۲- پیچیدگی برگ و سبزدی خفیف برگ در موهای آلوده به 2 GLRaV از سی سخت (استان کهگیلویه و بویر احمد).

Fig. 2. Leaf rolling and mild chlorosis in GLRaV-2 infected grapevines from Seesakht ( Kohgiluyeh - Boyerahmad).



شکل ۳- علایم شدید پیچیدگی و قرمزی برگ در اثر آلودگی همزمان به ویروس های 4, 5, 9 GLRaV در یک واریته انگور سیاه شیراز.

Fig. 3. Leaf rolling and interveinal reddening in a Black variety of grapevine infected with GLRaV-4, -5, -9 from Saadatshahr (Fars province).



#### - علایم شاخساره

در برخی نمونه‌های موآلوده به بیماری پیچیدگی برگ فاصله بین گره‌های ساقه در مقایسه با گیاهان سالم کاهش چشمگیری داشت (شکل ۴). ناسازگاری پایه و پیوندک و تورم ناحیه پیوند در تعدادی از موهای آلوده منطقه آذربایجان شرقی که به منظور اصلاح رقم پیوند زده شده بودند مشاهده گردید.

#### - علایم میوه و خوشه

موهای آلوده در همه واریته‌ها خوشه‌های تنک و کوچک داشتند، اندازه حبه‌ها در خوشه متفاوت بود و بدلیل کاهش محتوای قند آنها، رسیدن میوه‌ها غیر یکنواخت بود. رنگ حبه در واریته‌های میوه قرمز در زمان برداشت روشن‌تر از معمول بود (شکل ۵).



شکل

۴- کم شدن فاصله میان‌گره‌ها و تجمع برگ‌ها در موآلوده به GLRaV-1.

Fig. 4. Shortening of internodes in a GLRaV-1 infected grapevine.



شکل ۵- اندازه‌های متغیر و کاهش رنگ جبه‌ها ناشی از رسیدن نامنظم در یک رقم انگور سیاه آلوده به GLRaV-1 و GVA از آذربایجان غربی.

Fig. 5. Different sizes of berries and reduction in fruit color due to the irregular fruit ripening in a Black variety of grapevine infected with GLRaV-1 and GVA from Western Azarbaijan.

## ۲- شناسایی ویروس‌ها

با استفاده از روش RT-PCR و بکار بردن آغازگرهای اختصاصی (جدول شماره ۱)، ویروس‌های شماره ۱، ۲، ۴، ۵ و ۹ پیچیدگی برگ مو (GLRaVs) و ویروس ای مو (GVA)، در موهای مناطق مختلف استان‌های فارس، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و کهگیلویه و بویراحمد تشخیص داده شدند و قطعات مورد انتظار از ژنوم ویروس مربوطه (براساس جدول شماره ۱) از نمونه‌های آلوده تکثیر گردیدند. تنها تفاوت در اندازه قطعه تکثیر شده مربوط به GLRaV-9 بود که در جدایه ایران قطعه تکثیر شده کوچکتر از اندازه مورد انتظار (393bp؛ شکل ۷ - چاهک ۵) بود. قطعات تکثیر شده در ژل الکتروفور بصورت باندهای مشخصی مشاهده شدند در حالی که در گیاهان سالم حاصل از کشت بذر، باندهای مشاهده نشد (شکل‌های ۶ تا ۸). بعضی از جدایه‌ها (مانند جدایه‌های S4 و S7 مربوط به منطقه سعادت شهر) بطور همزمان به هر دو ویروس GLRaV-1 و GVA آلوده بودند.

نمونه‌های مناطق مورد مطالعه که با آغازگرهای ویروس‌های شماره ۲، ۴، ۵ و ۹ پیچیدگی

برگ مو (GLRaVs) و ویروس GVA آزمایش شده بودند با آغازگرهای اختصاصی GLRaV-3 نیز مورد آزمایش قرار گرفتند و علیرغم استفاده از دماهای مختلف در مراحل نسخه‌برداری معکوس و اتصال، هیچ قطعه‌ای در آزمون RT-PCR تکثیر نشد (جدول شماره ۲).

در مواردی ترکیبات GVA+GLRaV-1، GVA+GLRaV-2 و در بعضی دیگر ویروس‌های 9-، 5-، 4- GLRaV بطور همزمان در گیاهان آلوده وجود داشتند (جدول شماره ۲). لازم به ذکر است که در مواردی علائم مشخص ویروس‌های مورد بحث در نمونه‌های آلوده مشاهده نگردید.

### ۳- پراکندگی و فراوانی ویروس‌های همراه پیچیدگی برگ مو و GVA در ایران

برای تعیین پراکنش این ویروس‌ها از استان‌های آذربایجان شرقی (شهرستان‌های ملکان، بناب و مراغه)، آذربایجان غربی (ارومیه و سردشت)، فارس ( شیراز، بوانات، سعادت شهر، بیضاء، میمند و کوار) و کهگیلویه و بویراحمد (سی سخت و حومه) بصورت تصادفی نمونه‌برداری صورت گرفت و نمونه‌ها با آزمون RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی در جدول ۲ آورده شده است. در میان نمونه‌های آلوده، قطعه مورد انتظار ویروس‌های 5-، 4-، 2-، 1- GLRaV و GVA از تمام مناطق فوق تکثیر گردید. در مورد 9- GLRaV فقط در نمونه‌های استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد یک بانندی که کمی کوچکتر از اندازه مورد انتظار بود تکثیر گردید (شکل ۷).

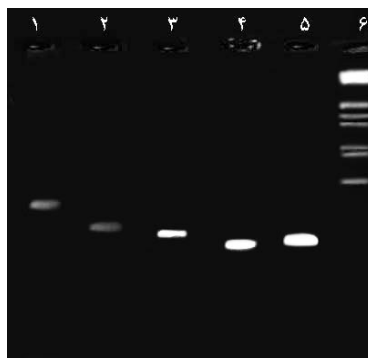
بیشترین میزان آلودگی به ویروس‌های GLRaVs در استان کهگیلویه و بویر احمد به میزان ۳۰/۱۷ درصد و کمترین آن در استان آذربایجان شرقی به میزان ۲۵/۲۶ درصد بود. در حالی که بیشترین میزان آلودگی به GVA در استان فارس (۲۱/۶۶ درصد) و کمترین میزان آن (۱۶/۴۵ درصد) در استان آذربایجان غربی بود.

در بین این ویروس‌ها 1- GLRaV با ۱۴/۷۳ درصد در استان آذربایجان شرقی بیشترین میزان آلودگی را به خود اختصاص داده است و 9- GLRaV در کهگیلویه و بویر احمد با ۲/۶ درصد و 4- GLRaV در استان آذربایجان غربی با ۲/۵ درصد کمترین میزان آلودگی را داشتند. در نمونه‌های استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی 9- GLRaV تشخیص داده نشد. در مجموع سهم ویروس‌های شماره ۱، ۲، ۴، ۵ و ۹ پیچیدگی برگ مو و GVA در آلودگی



شکل ۶- نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR از ژنوم GLRaV-1 (سمت راست) و GVA (سمت چپ) از دو جدایه مختلف (سعادت شهر- فارس) در ژل آگاروز یک درصد. ۱- مو سالم ۲- جدایه S7 ۳- جدایه S4 ۴- نشانگر.

Fig. 6. Electrophoresis pattern of RT-PCR products with GLRaV-1(right) and GVA (left) specific primers in two different isolates (Saadatshahr-Fars): 1. healthy grapevine; 2. S7 isolate; 3. S4 isolate; 4. Marker.



شکل ۷- نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR از ویروسهای همراه با پیچیدگی برگ مواز مناطق مختلف در ژل آگاروز یک درصد. ۱- GLRaV-1 (سعادت شهر- فارس)، ۲- GLRaV-2 (سی سخت)، ۳- GLRaV-4 (آذربایجان غربی)، ۴- GLRaV-5 (آذربایجان شرقی)، ۵- ۹- GLRaV-9 (فارس) ۶- نشانگر.

Fig. 7. Electrophoresis pattern of RT-PCR products of GLRaVs infected grapevines from different provinces: 1. GLRaV-1 (Saadatshahr-Fars), 2. GLRaV-2 ( Kohgiluyeh – Boyerahmad ), 3. GLRaV-4 ( Western Azarbaijan ), 4. GLRaV-5 (Eastern Azarbaijan), 5. GLRaV-9 (Fars), 6. Marker.



شکل ۸- نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR ژنوم GVA در ژل آگاروز یک درصد. ۱- نشانگر ، ۲- کنترل مثبت GVA از استرالیا ، ۳- کنترل منفی (آب تیمار شده با DEPC)، ۴- نمونه S4 آلوده به GVA از سعادت شهر، ۵- نمونه S2 آلوده به GVA از سعادت شهر.

Fig. 8. Electrophoresis pattern of RT-PCR products from GVA infected grapevines: 1, Marker; 2, Positive control (Australian GVA-isolate); 3, Negative control ( DEPC-treated water ); 4, S4 isolate of GVA (Saadatshahr); 5, S2 isolate of GVA (Saadatshahr).

موهای چهار استان مورد مطالعه بترتیب ۳۳، ۱۴/۵، ۸/۹، ۱۰، ۵/۲۲ و ۴۸/۱۹ درصد بود. علاوه بر این، ترکیب های GVA+GLRa-1 GVA+GLRa-2 و GLRa- 4+5+9 با ۱۳، ۱/۴۷ و ۶۷٪ درصد به ترتیب بیشترین سهم را در آلودگی های توام (mixed infection) موهای آلوده تاکستان های مورد مطالعه داشتند.

جدول ۲- تعداد گیاهان آزمایش شده از چند استان ایران و درصد آلودگی به GLRaVs و

GVA براساس نتایج آزمون RT-PCR

Table 2. Number of tested grapevine samples and % GLRaVs and GVA infection in four Iranian provinces, based on RT-PCR results

Provinces	E. Azarbaijan	W. Azarbaijan	Fars	Kohgiluyeh – Boyerahmad
GLRaV-1 infected samples	8.42%	8.86%	7.2%	9.48%
GLRaV-2 infected samples	3.15%	4.43%	4.1%	6%

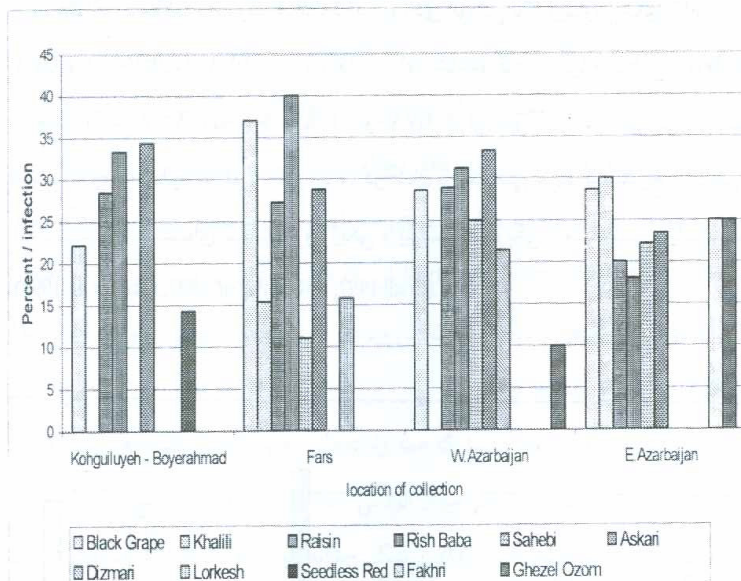
Table 2. (continued)

جدول ۲- (ادامه)

GLRaV-3 infected samples	0	0	0	0
GLRaV-4 infected samples	3.15%	2.53%	2.9%	3.44%
GLRaV-5 infected samples	4.21%	3.16%	2.9%	4.31%
GLRaV-9 infected samples	0	0	2.5%	2.58%
GVA infected samples	13.68%	8.86%	14.1%	15.51%
GVA + GLRaV-1 infected samples	6.31%	5.69%	5%	4.31%
GVA + GLRaV-2 infected samples	0	1.89%	2.5%	0
GLRaV 4+5+ 9 infected samples	0	0	1.6%	0
Total number of samples	95	158	240	116
Total number of infected samples	37	56	103	53
% GVA infection	20%	16.45%	21.66%	19.82%
% GLRaVs infection	25.26%	26.58%	28.75%	30.17%

#### ۴- مقایسه میزان آلودگی ارقام مختلف انگور به ویروس های مولد پیچیدگی برگ مو و GVA

میزان آلودگی ارقام مختلف مو به ویروس های مورد مطالعه در مناطق مذکور در شکل های ۹ و ۱۰ آورده شده است. بیشترین میزان آلودگی به ویروس های GLRaVs در رقم ریش بابا با ۴۰ درصد آلودگی در استان فارس مشاهده شد و کمترین میزان آلودگی به این ویروس ها در واریته قزل اوزوم در آذربایجان غربی با ۱۰ درصد آلودگی بود. بیشترین میزان آلودگی به GVA نیز در رقم ریش بابا و بمیزان ۲۵/۳۱ درصد و کمترین آن در رقم قزل اوزوم با ۱۰ درصد هر دو در آذربایجان غربی بود. داده های بدست آمده در طرح بلوک با هم مقایسه شدند. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده ها با استفاده از نرم افزار آماری MSTATC انجام شد. مقایسه داده ها نشان داد که در سطح ۵ درصد اثر نوع رقم و منطقه نمونه برداری بر میزان آلودگی برای هیچ کدام از ویروس های



Bimari-Giahi-G42-N2-p-237

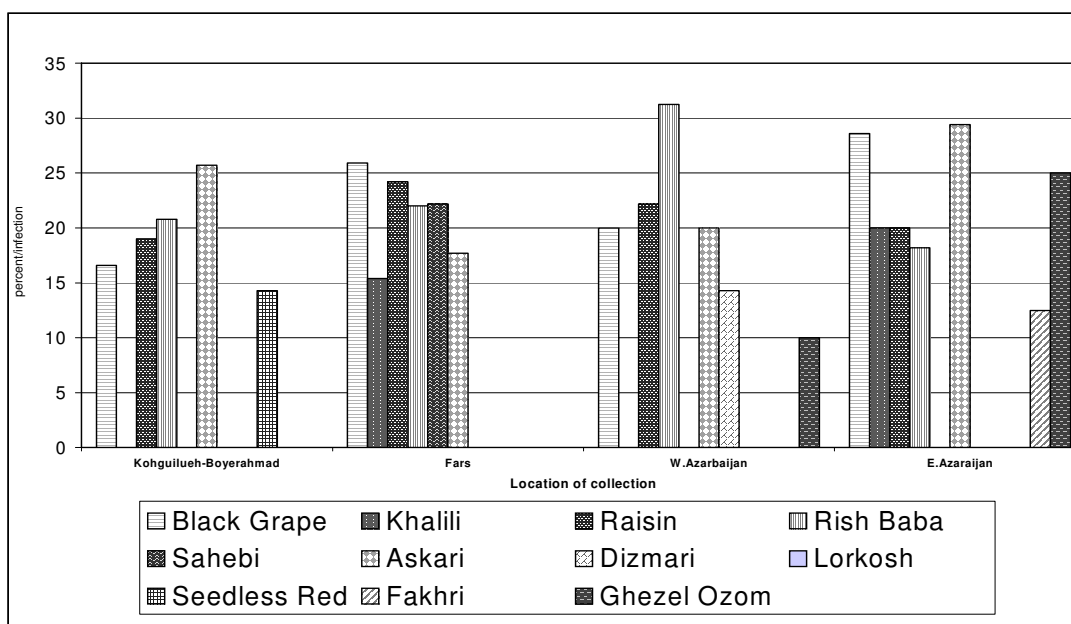
شکل ۹- میزان آلودگی واریته‌های مختلف انگور به ویروس‌های GLRaVs.  
 Fig. 9. Rate of GLRaVs infection in different grapevine cultivars.

GLRaVs و GVA معنی‌دار نبود.

بحث

علائم مشخص بیماری پیچیدگی برگ مو شامل پیچیدگی برگ (leaf rolling)، قرمزی برگها (leaf reddening) در ارقام قرمز و زردی خفیف در ارقام سفید و واکنش مثبت موهای دارای علائم در آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی نشان داد که ویروس‌های همراه با

پهچیدگی برگ مو و GVA در ایران وجود داشته و از گسترش وسیعی در استان‌های استان‌های مورد مطالعه برخوردار می‌باشند. در مواردی آلودگی توام ویروس‌های GLRaVs و GVA بویژه GVA + GLRaV-1 و GVA + GLRaV-2 مشاهده گردید. پدیده آلودگی هم‌زمان مو به چند ویروس از GLRaVs و یا GLRaVs و GVA که از سایر نقاط دنیا نیز گزارش شده است، علاوه بر تشدید علائم و حتی مرگ درختان باعث می‌گردد که نتایج مشابهی از آزمون‌های سیرولوژیکی و بیولوژیکی بدست نیاید (Credi 1997, Rowhani *et al.* 1997, Fazeli *et al.* 1998).



شکل ۱۰- میزان آلودگی واریته‌های مختلف انگور به ویروس GVA در چهار استان کشور.  
 Fig. 10 . Rate of GVA infection in different grapevine cultivars in four Iranian provinces.



مناسب‌ترین زمان جهت مشاهده علائم بیماری‌های مورد بحث اواخر شهریور و اوائل مهر ماه می‌باشد. لازم به ذکر است که در بعضی موارد بوته‌های آلوده فاقد هر گونه علائم بودند که این می‌تواند مربوط به جدایه ویروس و یا تحمل گیاه باشد.

گزارش‌های موجود در خصوص اثر ویروس‌های پیچیدگی برگ مو در کاهش سالیانه محصول مو به میزان ۷۰-۲۰ درصد در نقاط مختلف دنیا و نیز نقش آن‌ها در افزایش حساسیت گیاهان مو به تنش‌های محیطی از قبیل سرما زدگی (Martelli & Digiario 1999, Habili *et al.* 1997) از یک طرف و گسترش وسیع این ویروس‌ها در تاکستان‌های کشور از طرف دیگر، اهمیت این ویروس‌ها را به عنوان یکی از عوامل خسارت‌زا در تاکستان‌های کشور مطرح می‌سازد.

براساس این مطالعه به نظر می‌رسد که همه واریته‌های معمول مو در کشور به ویروس‌های مورد بررسی آلوده می‌شوند و از نظر میزان آلودگی اختلاف معنی‌داری در بین آن‌ها وجود ندارد لکن با توجه به احتمال تفاوت‌های ژنتیکی جدایه‌های ویروس، آلودگی هم‌زمان گیاهان مو به چند ویروس و نیز واریته‌های انگور که دقیقاً مشخص نمی‌باشند انجام تحقیقات بیشتر جهت تعیین دقیق اثرات کمی و کیفی این ویروس‌ها در تاکستان‌های کشور ضروری می‌شد.

نتایج این تحقیق که بر روی حدود ۶۰۹ نمونه صورت گرفت نشان داد که اولاً از نظر آلودگی به ویروس‌های GLRaVs استان کهگیلویه و بویر احمد با ۳۰/۱۷ درصد آلودگی، و از جهت آلودگی به GVA استان فارس با ۲۱/۶۶ درصد آلودگی، آلوده‌ترین منطقه‌ها بودند. ثانیاً: ویروس‌های شماره ۱، ۲، ۴ و ۵ همراه با پیچیدگی برگ مو و نیز GVA در تمام مناطق مورد مطالعه وجود دارند به نحوی که GVA دارای بیشترین فراوانی (۱۸/۲۲٪) و از میان ویروس‌های همراه با پیچیدگی برگ مو GLRaV-1 (۱۳/۴۶٪) در رتبه بعد قرار داشت. ویروس GLRaV-9 که اخیراً از استرالیا و امریکا گزارش گردیده است (Habili & Rowhani 2002) تنها در استان‌های فارس و کهگیلویه و بویر احمد وجود داشت با این تفاوت که اندازه قطعه تکثیر شده در PCR مقداری از اندازه مورد انتظار کوچکتر بود. با توجه به این که قطعه مذکور در آزمایش‌های مختلف به صورت یک تک باند مشخص تکرار گردید و تنها در بعضی از نمونه‌های استان‌های فارس و کهگیلویه و بویر احمد وجود داشت

و در نمونه‌های سالم نیز بانندی مشاهده نگردید، باند تکثیر شده بعنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته شد که اظهار نظر قطعی نیاز به تعیین ترادف دارد که در دست انجام می باشد. از طرف دیگر علیرغم اینکه GLRaV-3 در بین ویروس‌های پیچیدگی برگ مو از بیشترین گسترش در تاکستان‌های دنیا برخوردار می باشد، در این بررسی‌ها وجود آن به اثبات نرسید. هرچند نمونه برداری‌ها بطور تصادفی صورت گرفت ولی با توجه به کمبود اطلاعات در خصوص اپیدمیولوژی ویروس‌های مورد مطالعه (Habili 1997, Gugerli 2003) نمی توان در خصوص دلیل عدم وجود GLRaV-3 در مناطق مورد مطالعه و همچنین عدم وجود GLRaV-9 در دو استان آذربایجان شرقی و غربی اظهار نظر دقیق نمود. معهذ، احتمال دارد که مشابه نظریه هیوویت در خصوص منشا ویروس برگ بادبزی مو، ایران خواستگاه حداقل تعدادی از این ویروس‌ها (GLRaVs و GVA) نیز بوده است که از طریق مواد تکثیری به سایر نقاط دنیا منتقل شده‌اند و به تدریج در طی دوره تکامل در این نقاط جدید ویروس‌ها به نحوی دچار تغییر گردیده‌اند که امروزه صرفاً بعنوان واریانت‌هایی از ویروس‌های اصلی محسوب می شوند (Hewitt 1970). علاوه بر این، نتایج بدست آمده در بررسی‌های اخیر از قبیل گسترش وسیع این بیماری در کشور، وجود بیماری در تاک‌های قدیمی، وجود GVA و GLRaV-1 در موهای وحشی منطقه سردشت و عدم وجود علائم مشخص در این موها (اطلاعات منتشر نشده) فرضیه گوهین را که منشا بیماریهای پیچیدگی برگ مو را احتمالاً ارقام *Vitis vinifera* در خاور نزدیک می داند تقویت می کند (Goheen 1998).

#### منابع

جهت ملاحظه به متن انگلیسی (57-60) مراجعه شود.

---

نشانی نگارندگان: وحید رومی، علیرضا افشاریفر و کرامت‌اله ایزدپناه، شیراز، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز