Archive of SID

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸٤، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۵

# وقوع بیماری‌های ویروسی مهم توت‌فرنگی در استان‌های گیلان و مازندران

**قاسم نصیری‌نیا[۱و۲]، رضا پوررحیم[۲]✉، سید علی الهی‌نیا[۱]، احمد روحی‌بخش[۱] و شیرین فرزادفر[۲]**
۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان؛ ۲- بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی،
موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۳؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۴)

**چکیده**

طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۱، تعداد ۴۲۲ نمونه تصادفی و ۲۲۳ نمونه علائم‌دار شامل موزاییک، پیسک، لکه‌حلقوی، زردی، سبزردی، کاهش رشد و بد شکلی برگ‌ها از مزارع توت‌فرنگی مناطق رشت، صومعه‌سرا و سنگر در استان گیلان و بابلسر، جویبار و بهشهر در استان مازندران جمع‌آوری شد. آلودگی این نمونه‌ها به ویروس لبه زرد خفیف توت‌فرنگی (*Strawberry mild yellow edge virus*-SMYEV)، ویروس پیسک توت‌فرنگی (*Strawberry motlle virus*-SMoV)، ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی (*Strawberry crinkle virus*-SCV)، ویروس لکه‌حلقوی نهان توت‌فرنگی (*Strawberry latent ring spot virus*-SLRSV)، ویروس موزاییک تمشک (*Raspberry ringspot virus*-RpRSV)، ویروس موزاییک آرابیس (*Arabis mosaic virus*-ArMV) و ویروس لکه‌حلقوی گوجه‌فرنگی (*Tomato ringspot virus*-ToRSV) با استفاده از آزمون سرولوژیکی الایزا (DAS-ELISA) و آنتی‌بادی‌های اختصاصی بررسی شد. نتایج بیانگر آلودگی ۳۲/۳ و ۱۳/۷ درصدی به ترتیب نمونه‌های علائم‌دار و تصادفی به حداقل یکی از هفت ویروس یاد شده بود. واکنش گیاهان محک در برابر جدایه‌های چهار نپوویروس ArMV، RpRSV، ToRSV و SLRSV بدست آمده در این تحقیق، با اطلاعات توصیف شده در مورد این ویروس‌ها مطابقت داشت. در ردیابی مولکولی SMoV و SMYEV ، توالی ژن پروتئین پوششی دو جدایه ایرانی SMoV بیشترین شباهت (۹۷ درصد) را با جدایه SMoV ۱۲۷۸ از کشور هلند (رس شمار AJ496145) و سه جدایه ایرانی SMYEV دارای بیشترین مشابهت (۹۹ درصد) با جدایه SMYEV D/M.110 (رس شمار AJ577352) از آلمان بود. این نخستین گزارش از ردیابی ویروس‌های فوق از مزارع توت‌فرنگی ایران می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ایران، DAS-ELISA، RT-PCR.

# Incidence of Strawberry important virus diseases in Guilan and Mazandaran Provinces

**GH. NASIRINIA[1,2], R. POURRAHIM[2]✉, S. A. ELAHINIA[1], A. ROUHIBAKHSH[1] and SH. FARZADFAR[2]**
1- Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Guilan University, Iran; 2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

**Abstract**

During 2013 totally 422 and 223 random and symptomatic strawberry leaf samples were collected from strawberry fields in Rashat, Someh-sara and Sanghar (Guilan province) and Babolsar, Joibar and Behshahr (Mazandaran province). Samples were tested for *Arabis mosaic virus*-ArMV, *Raspberry ringspot virus*-RpRSV, *Tomato ringspot virus*-ToRSV, *Strawberry latent ringspot virus*-SLRSV, *Strawberry crinkle virus*-SCV, *Strawberry mild yellow edge virus*-SMYEV, and *Strawberry mottle virus*-SMoV infection by DAS-ELISA using specific antibodies. Results showed that 32.3 and 13.7 % of symptomatic and random samples, respectively, were positive in ELISA at least with one virus. Results of host range studies using isolates of ArMV, RpRSV, ToRSV and SLRSV nepoviruses obtained in this study were consistent with the previously reported descriptions of these viruses. Molecular detection of SMoV and SMYEV and nucleotide sequences of two Iranian SMoV isolates showed highest similarity (97%) with a SMoV isolate (SMoV1278) from the Netherlands (Acc. No. AJ496145), also three Iranian SMYEV isolates showed the highest similarity (99%) with SMYEV D/M110 isolate from Germany (Acc. No. AJ577352). This is the first report on occurrence of above mentioned viruses on strawberry in Iran.

**Key words:** Iran, DAS-ELISA, RT-PCR

✉ **Corresponding author: pourrahim@yahoo.com**

www.SID.ir

Archive of SID



**مقدمه**

توت‌فرنگی با نام علمی *Fragaria ananassa* گیاهی علفی، چند ساله و از خانواده گلسرخیان (Rosaceae) یکی از محصولات با ارزش اقتصادی در جهان و ایران می‌باشد که میوهٔ آن بطور تازه‌خوری و نیز در فرآورده‌های صنایع غذایی مصرف می‌شود (Biswas *et al*., 2009). براساس گزارش فائو سطح زیر کشت توت‌فرنگی در ایران در سال ۲۰۱۲ حدود ۲۴۰۰ هکتار با تولید ۳۲۰۰۰ تن بوده و ایران از نظر تولید این محصول رتبه‌ی هجدهم را در بین ۷۶ کشور تولید کننده‌ی توت‌فرنگی در جهان دارا می‌باشد (FAO, 2012).

پرورش توت‌فرنگی به واسطه بسیاری از عوامل عفونی و غیرعفونی با مشکل مواجه می‌شود و به دلیل تکثیر رویشی توت‌فرنگی، بیماری‌های ویروسی از اهمیت به‌سزایی برخوردار هستند (Maas, 1984). تاکنون بیش از ۳۰ ویروس مختلف از سراسر جهان از این محصول گزارش شده است (Martin and Tzanetakis, 2013; Matin and Tzanetakis, 2006; Converse, 1987; Plakidas, 1927). از جمله ویروس‌های مهم بیمارگر در توت‌فرنگی در جهان می‌توان به ویروس لبه‌زرد خفیف توت‌فرنگی *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV)، ویروس پیسک توت‌فرنگی *Strawberry motlle virus* (SMoV)، ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی *Strawberry crinkle virus* (SCV)، ویروس لکه‌حلقوی توت‌فرنگی *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV)، ویروس موزاییک تمشک *Raspberry ringspot virus* (RpRSV)، ویروس موزاییک آرابیس *Arabis mosaic virus* (ArMV)، ویروس رگ نواری توت‌فرنگی *Strawberry vein banding virus* (SVBV) و ویروس لکه‌حلقوی گوجه‌فرنگی *Tomato ringspot virus* (ToRSV) اشاره نمود (Converse, 1981; 1987; El-Gaied *et al*., 2008). بیماری‌های ویروسی از عوامل مهم دخیل در کاهش عملکرد و کیفیت ارقام مختلف توت‌فرنگی می‌باشند. ویروس پیسک توت‌فرنگی (SMoV) به تنهایی ممکن است سبب کاهش عملکرد تا ۳۰ درصد شود، ویروس‌های SMYEV، SCV و SVBV می‌توانند تا ۸۰ درصد سبب کاهش محصول شوند (Biswas *et al*., 2009). هر چند ممکن است برخی ویروس‌ها به تنهایی بی‌خطر باشند اما در آلودگی توام با سایر ویروس‌های بیماریزای گیاهی بسیار مشکل‌ساز می‌باشند (Martin and Tzanetakis, 2006).

اگرچه تمامی ویروس‌های بیمارگر در توت‌فرنگی از طریق اندام‌های تکثیر رویشی این گیاه منتقل می‌شوند، برخی از این عوامل به کمک شته‌های ناقل نیز در مزرعه به گیاهان دیگر انتقال می‌یابند. چهار ویروس اصلی شته برد آلوده‌کننده توت‌فرنگی شامل: SCV از جنس *Cytorhabdovirs*، SMoV از خانواده *Sequiviridae*، SMYEV از جنس *Luteovirus* و SVBV از جنس *Caulimovirus* می‌باشند (El-Gaied *et al*., 2008). این چهار ویروس توسط ناقلین حشره از جمله شته‌ها منتقل شده و به عنوان ویروس‌های مهم اقتصادی در اکثر مناطق تولید توت‌فرنگی در نظر گرفته شده و سبب بروز علائم موزاییک، پیسک، سبزردی، بدشکلی اندام‌های گیاه ازجمله میوه‌ها شده و سبب کاهش بازار پسندی می‌شوند (Ashkan, 2006). ویروس‌های SLRSV، ArMV، RpRSV و ToRSV همگی اعضای خانواده Secoviridae می‌باشند (King *et al*., 2012). ویروس‌های SLRSV، ArMV و ToRSV توسط گونه‌هایی از نماتدهای جنس *Xiphinema* و ویروس RpRSV توسط برخی نماتدهای جنس *Longidorus* منتقل می‌شوند (Martin and Tzanetakis, 2006). دامنه میزبانی این ویروس‌ها وسیع بوده و صدها گونه گیاهی تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای‌ها را آلوده می‌کنند و سبب خسارت قابل توجهی به محصول، به خصوص در آلودگی‌های مخلوط با سایر ویروس‌ها می‌شوند (Mackenzie *et al*., 1996; Milkus, 2001).

استان‌های گیلان و مازندران از جمله مناطقی می‌باشند که بدلیل شرایط مساعد اقلیمی، کشت توت‌فرنگی در آنها در سال‌های اخیر مورد توجه و توسعه قرار گرفته است. از آنجا که تاکنون بررسی‌های دقیقی در خصوص وضعیت بیماری-های ویروسی این زراعت در این مناطق انجام نشده است،

www.SID.ir

Archive of SID



تحقیق حاضر با هدف ردیابی ویروس‌های بیماری‌زای توت‌فرنگی در دو استان گیلان و مازندران انجام گرفت.

## روش بررسی

**۱- جمع‌آوری نمونه از مزارع توت‌فرنگی:** طی دو فصل زراعی ۹۲-۱۳۹۱ مناطق عمده کشت توت‌فرنگی در استان‌های گیلان (رشت، صومعه‌سرا و سنگر) و مازندران (بابلسر، جویبار و بهشهر) مورد بازدید قرار گرفتند و نمونه‌برداری از مزارع توت‌فرنگی به دو روش تصادفی (جهت تخمین فراوانی) و انتخابی (جهت افزایش احتمال ردیابی و تعیین وقوع ویروس‌های مورد بررسی) انجام شد. در نمونه‌برداری تصادفی ضمن حرکت به صورت M شکل انجام و ۴۲۲ نمونه تصادفی از ۲۲ مزرعه توت‌فرنگی جمع‌آوری شدند. همچنین از ۲۲ مزرعه مورد بازدید مجموعا ۲۲۳ نمونه با علائم مشکوک به آلودگی ویروسی شامل انواع موزاییک، پیسک، چروکیدگی، زردی، سبزردی، کاهش رشد، نکروز و بدشکلی جمع‌آوری شدند (جدول ۲). در هر منطقه، مزارع طوری انتخاب گردیدند که با فواصل مناسب از هم بتوانند تا حد امکان توزیع جغرافیایی بیشتری داشته‌باشند. نمونه‌ها تا زمان بررسی‌های آزمایشگاهی در یخچال نگهداری شدند.

**۲-آزمون سرولوژیکی الایزا به روش ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA):** آزمون الایزای مستقیم double antibody sandwich - enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) بر اساس روش توصیفی توسط کلارک و آدامز انجام گرفت (Clark and Adams, 1977). این آزمون با استفاده از عصاره نمونه‌های علائم‌دار و تصادفی با رقت ۱۰ برابر و آنتی سرم‌های اختصاصی برای هر کدام از ویروس‌ها مورد انجام شد. آنتی‌بادی‌های اختصاصی ArMV، RpRSV، SLRSV، SMYEV و ToRSV از شرکت بیوربا سوئیس و در مورد SCV و SMoV بترتیب توسط دکتر پوستوما (دانشگاه Utrecht هلند) و دکتر یوشیکاوا (دانشگاه ایواته، موریکا، ژاپن) تأمین شد. عصاره‌گیری از نمونه‌های برگی (یک گرم بافت در پنج میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری) درون کیسه‌های پلاستیکی انجام پذیرفت. حدود یک ساعت پس از افزودن سوبسترا میزان جذب نور هر چاهک در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader (مدل Multiscan-334، Lab-Systems، فنلاند) اندازه‌گیری و ثبت شد. نمونه‌هایی که میزان جذب نور آنها مساوی یا بیش از سه برابر میانگین میزان جذب نور شاهد سالم بود، بعنوان نمونه مثبت (آلوده) به ویروس و در غیر این صورت بعنوان نمونه غیرآلوده در نظر گرفته شد.

**۳- ارزیابی واکنش گیاهان محک:** در مورد هر یک از چهار *Nepovirus* مورد بررسی شامل ArMV، RpRSV، SLRSV و ToRSV دو نمونه که در آزمون الایزا فقط با آنتی‌بادی یک ویروس واکنش مثبت نشان داده بودند، انتخاب شده و به روش مایه‌زنی مکانیکی روی تعدادی گیاه محک معرف مایه-زنی شدند. برای این منظور از بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۷/۴ حاوی ۰/۱ درصد مرکاپتواتانول سرد به نسبت یک گرم بافت در پنج میلی‌لیتر بافر استفاده شد. گیاهان مایه-زنی شده در شرایط گلخانه ۲۲ تا ۲۵ درجه سلسیوس ، نور طبیعی ۱۴ ساعت روشنایی با شدت ۱۲ تا ۱۴ هزار لوکس و رطوبت نسبی ۶۰ تا ۸۰ درصد و عاری از حشرات ناقل نگهداری شدند. این گیاهان مورد بازدید و یادداشت برداری علائم قرار گرفته و سه هفته پس از مایه‌زنی، سیتمیک شدن ویروس مورد نظر روی آنها، به کمک آزمون الایزا مورد بررسی قرار گرفت.

**٤- ردیابی مولکولی SMYEV و SMoV:** به منظور تأیید نتایج آزمون سرولوژیکی الایزا در مورد SMYEV و SMoV از روش رونوشت برداری برگردان و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (آرتی- پی سی آر reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) در نمونه‌های مثبت برای تکثیر ناحیه ژن پروتیئن پوششی هر ویروس استفاده گردید. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول (۱) ارائه شده است. مراحل انجام این آزمون‌ها به شرح ذیل آمده است.

www.SID.ir

Archive of SID



**جدول ۱**- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی SMYEV و SMoV

**Table 1.** Primers that used for coat protein amplification of SMYEV and SMoV

| نام آغازگر Primer | توالی Nucleotide sequence | Tm | اندازه محصول RT-PCR product size (bp) | منبع Reference |
|---|---|---|---|---|
| SMYEV-F2 | CCGCTGCAGTTGTAGGGTA | 50 ºC | 860 | Li and Yang, 2011 |
| SMYEV-R2 | CATGGCACTCATTGGAGCTGGG | | | |
| SMoV-F2 | GGTTGATGCCGGGTACTGTCATAGGG | 50 ºC | 635 | This study |
| SMoV-R2 | TTGAGAACTTGAATCTCTTCGAGC | | | |

**استخراج آر.ان.ای کل:** بر اساس نتایج حاصل از آزمون سرولوژیکی الایزا تعداد ۱۰ نمونه با واکنش مثبت (شامل ۵ نمونه آلوده به SMYEV و ۵ نمونه آلوده به ویروس SMoV انتخاب و استخراج آر.ان.ای کل آنها با استفاده از محلول تجاری RNX$^{TM}$(-plus) (شرکت سیناژن، ایران) و طبق روش توصیه شده توسط سازنده آن با کمی تغییرات انجام گرفت. آموده‌های آر.ان.ای استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی وارد واکنش RT-PCR دو مرحله‌ای (two step) شد. در مورد SMoV از آغازگرهای طراحی شده با استفاده از توالی کامل ژن شماره دو این ویروس (رس شمار AJ311876) موجود در بانک ژن و در مورد SMYEV از آغازگرهای توصیفی توسط (Li and Yang, 2011) استفاده شد (جدول ۱). واکنش مرحله RT در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر آغازگر پایین‌دست (SMYEV-R2 یا SMoV-R2) با غلظت ۲۰ پیکومول در میکرولیتر، ۲ میکرولیتر بافر M-MuLV-10X (سیناژن-ایران)، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP Mix (دزاکسی نوکلئوتیدتری فسفات) با غلظت ۱۰ میلی مولار (سیناژن، ایران)، ۶ میکرولیتر از آر.ان.ای استخراج شده، یک میکرولیتر (۲۰۰ واحد) از آنزیم رونوشت‌برداری برگردان (Revert Aid M-MuLV)، یک میکرولیتر (۴۰ واحد) (RNase inhibitor) (Fermentas، لیتوانی) بود. برای انجام واکنش ابتدا آغازگر پایین‌دست به همراه آر.ان.ای استخراج شده به میکروتیوب افزوده و به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شده و بلافاصله به روی یخ منتقل شدند. سپس سایر اجزای واکنش به میکروتیوب اضافه و حجم واکنش با آب مقطر دوبار استریل (عاری از RNase) به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و سپس ۱۰ دقیقه در ۷۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. این واکنش در دستگاه ترموسایکلر Primus (ساخت MWG آلمان) انجام گرفت. پس از ساخته شدن اولین رشته دی. ان. ای مکمل (first stand cDNA)، جهت تکثیر این قطعه، از واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر استفاده گردید. اجزا هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر بافر 10XPCR، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت ۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی‌مولار) (سیناژن، ایران)، یک میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase (معادل ۵ واحد)، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای بالادست و پایین‌دست (غلظت ۲۰ پیکومول در میکرولیتر)، و در آخر ۵ میکرولیتر از محصول مرحله رونوشت‌برداری برگردان (cDNA) بود که پس از مخلوط شدن حجم آن توسط آب دوبار تقطیر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر مدل Primus (ساخت MWG آلمان) طبق برنامه ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۹۵ درجه یک دقیقه، ۵۰ درجه یک دقیقه و ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه و در پایان ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس، انجام گردید. به منظور ارزیابی قطعات دی.ان.ای حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، از روش الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد در بافر TBE حاوی اتیدیوم بروماید (یک میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد. دو نشانگر با وزن مولکولی یک کیلو جفت‌بازی (فرمنتاس-لیتوانی)و ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن-ایران) برای تعیین وزن قطعات تکثیر یافته

www.SID.ir

Archive of SID



مورد استفاده قرار گرفت. از دستگاه UV-illuminator مدل ایماکو (هلند) برای تصویر برداری از ژل استفاده شد.

**تعیین توالی قطعات تکثیر یافته:** به منظور تعیین توالی دو جدایه (SMoV/20 و SMoV/69) و سه جدایه (SMYEV/28، SMYEV/44 و SMYEV/121) بر اساس مناطق جغرافیایی انتخاب و قطعات تکثیر یافته طی واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از کیت استخراج محصول پی.سی.آر (پرومگا، آمریکا)، از ژل آگارز جدا سازی شد. توالی این قطعات با استفاده از سرویس‌های تجاری (شرکت پویا گستر ژن)، در دو جهت تعیین گردید. توالی‌های تعیین شده در مورد جدایه‌های ایرانی، با استفاده از ابز ار جستجوی BLAST ( Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al*., 1997) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI ( National Center for Biotechnology Information) با یکدیگر و با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن (GenBank) مقایسه شدند. هم ردیف سازی چندگانه توالی‌ها (multiple sequence alignment) با استفاده از برنامه CLUSTALX, ver. 1.83 (Thompson *et al*., 1997) انجام گردید.

## نتیجه و بحث

**نتایج آزمون الایزا:** نتایج بدست آمده از آزمون سرولوژیکی الایزا روی نمونه‌های علائم‌دار بیانگر آلودگی ویروسی در ۳۳/۱ و ۳۱/۱ درصد بترتیب در استان‌های گیلان و مازندران حداقل به یکی از ویروس‌های مورد بررسی SCV، SLRSV، ArMV، RpRSV، ToRSV، SMoV و SMYEV بود. در بین ویروس‌های مورد آزمایش در نمونه‌های علائم‌دار، ToRSV و ArMV بترتیب با ۵/۸ و ۵/۴ درصد دارای بیشترین فراوانی بوده و RpRSV (۴/۰٪)، SMoV (۴/۰٪)، SMYEV (۳/۶٪)، SCV (۳/۶٪) و SLRSV (۱/۸٪)، در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. همچنین هشت نمونه علائم‌دار به طور همزمان به دو ویروس و یک نمونه به سه ویروس آلوده بود (جدول ۲). مهم‌ترین علائم همراه با برخی نمونه‌های دارای آلودگی به SMoV شامل پیسک بود (شکل 1a). همچنین نشانه‌های سبزردی در حاشیه برگ‌ها در نمونه آلوده به SMYEV جمع‌آوری شده از بهشهر مشاهده شد (شکل 1b). پیسک، سبزردی، بدشکلی برگها و میوه و کاهش رشد از سایر علائم همراه با نمونه‌های دارای آلودگی ویروسی بودند. همچنین تعداد ۵ و ۴ نمونه بترتیب از استان‌های گیلان و مازندران دارای آلودگی به بیش از یک ویروس بودند (جدول ۲). در یک نمونهٔ با آلودگی همزمان به سه ویروس ArMV+SMoV+ToRSV (جمع‌آوری شده از بهشهر)، علائم بدشکلی و نکروز میوه نیز مشاهده شد (شکل 1c).

بر اساس نتایج حاصل از الایزا، به ترتیب ۱۵/۷ و ۱۱/۸ درصد از نمونه‌های تصادفی مربوط به دو استان گیلان و مازندران حداقل به یکی از هفت ویروس مورد بررسی آلوده بودند. همچنین پنج نمونه نیز دارای آلودگی مخلوط با بیش از یک ویروس بودند (جدول ۳). در مجموع براساس نتایج حاصل از بررسی ۴۲۲ نمونهٔ تصادفی توت‌فرنگی از دو استان مورد بررسی، ArMV با ۳/۸ درصد بیشترین فراوانی را داشته و RpRSV (۲/۱٪)، SMoV (۲٪)، ToRSV (۱/۹٪)، SMYEV (۱/۴٪)، SCV (۰/۷٪) و SLRSV (۰/۴٪) در رتبه‌های بعدی فراوانی قرار داشتند. همچنین پنج نمونه (۱/۲٪) از نمونه‌های تصادفی دارای آلودگی همزمان به بیش از یک ویروس بودند (جدول ۳).

**واکنش گیاهان محک:** نتایج حاصل از بررسی واکنش گیاهان محک مایه‌زنی شده با نمونه‌هایی که در آزمون الایزا فقط با یکی از چهار نپوویروس ArMV، ToRSV، RpRSV و SLRSV واکنش مثبت نشان داده بودند، در جدول ۴ ارائه شده است.

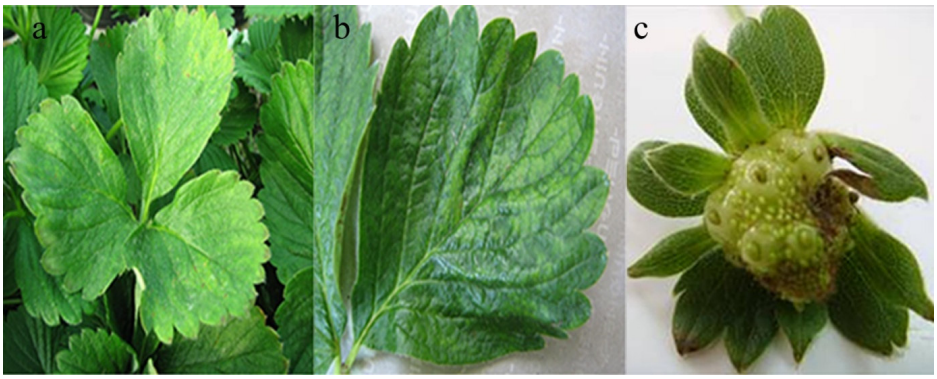
**آزمون مولکولی RT-PCR:** پنج نمونه که در آزمون الایزا با آنتی‌بادی SMoV واکنش مثبت نشان داده بودند، با استفاده از آزمون RT-PCR و به کمک آغازگرهای طراحی شده در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان‌دهنده تکثیر یک قطعه دی.ان.ای به طول مورد انتظار ۶۳۰ جفت باز مربوط به بخشی از ژن پروتئین پوششی این ویروس در دو

www.SID.ir

Archive of SID

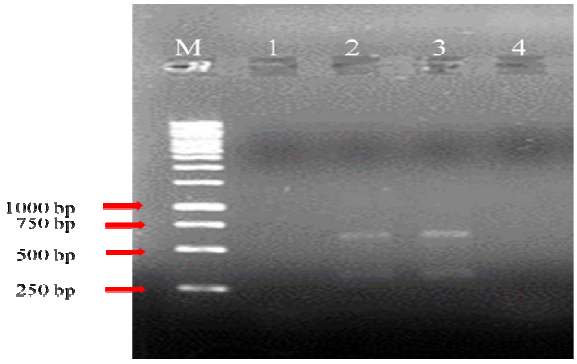


نمونه (SMoV/20 و SMoV/69) از پنج نمونه مورد بررسی بود (شکل ۴). همچنین سه نمونه (SMYEV/28، SMYEV/44 و SMYEV/121) از پنج نمونه توت‌فرنگی دارای واکنش مثبت در آزمون الایزا با آنتی‌بادی SMYEV، در آزمون RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی منجر به تکثیر یک قطعه دی.ان.ای بطول مورد انتظار ۸۶۰ جفت باز مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی این ویروس گردید (شکل ۵). توالی نوکلئوتیدی قطعات دی.ان.ای حاصل از واکنش RT-PCR تعیین گردید. توالی بدست آمده در مورد قطعه دی.ان.ای ۶۳۰ جفت‌بازی در دو جدایه SMoV/20 و SMoV/69 با استفاده از ابزار جستجوی BLAST با توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج حاصله نشان دهنده بیشترین مشابهت آن‌ها (۹۷ درصد) با جدایه ۱۲۷۸ SMoV از کشور هلند (رس شمار AJ496145) ثبت شده در GenBank بود. همچنین مقایسه توالی نوکلئوتیدی بدست آمده از قطعه دی.ان.ای ۸۶۰ جفت بازی در مورد سه جدایه SMYEV/28، SMYEV/44 و SMYEV/121 با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن نشان داد که آنها بیشترین مشابهت را (۹۹ درصد) با جدایه SMYEV D/M.110 از آلمان (رس شمار AJ577352) ثبت شده در بانک ژن جهانی داشتند.




**شکل ۱**- علائم ناشی از آلودگی توت‌فرنگی به ویروس، a: علائم پیسک در نمونه آلوده با SoMV؛ b: علائم سبزردی شدید حاشیه برگ در نمونه آلوده با SMYEV، c: علائم نکروز و بدشکلی میوه در آلودگی همزمان با ArMV+SMoV+ToRSV

**Fig. 1.** A: Symptoms induced by virus infections. a: Mottling in sample infected by SoMV; b: Severe chlorsis in leaf margin induced by SMYEV; c: Leaf deformation and necrosis on fruit in samples with ArMV+SMoV+ToRSV mixed infection




**شکل ۲**- نقشه الکتروفورز محصولات واکنش RT-PCR با استفاده ازآغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر بخشی از ژن پروتئین پوششی SMoV در ژل آگارز. راهک M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت‌بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، راهک‌های ۲ و ۳ به ترتیب جدایه‌های SMoV/20 و SMoV/69 با واکنش مثبت در آزمون الایزا هستند که منجر به تکثیر یک قطعه دی.ان.ای بطول مورد انتظار ۶۳۰ جفت‌بازی شده است. راهک‌های شماره یک و چهار کنترل منفی (سالم).

**Fig. 2.** Gel electrophoresis of partial coat protein amplification using specific primers of SMoV in agarose gel. M: 1 Kbp molecular weight marker (Fermentas-Lithuania); 2 & 3: SMoV/20 and SMoV/69 isolates respectively; 1 & 4 negative control.

www.SID.ir

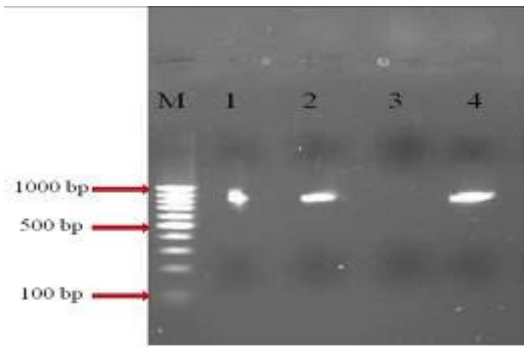
Archive of SID



**جدول ۲**- نتایج آزمون الایزا روی نمونه‌های علائم‌دار توت‌فرنگی جمع‌آوری شده از دو استان گیلان و مازندران

**Table 2.** ELISA results in symptomatic strawberry samples collected from Guilan and Mazandaran provinces

| منطقه county | تعداد مزرعه مورد بازدید No. of field visited | تعداد نمونه جمع‌آوری شده Collected samples | نمونه‌های علائم دار (Symptomatic samples) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | آلودگی انفرادی (٪) Single Infection (%) | | | | | | | آلودگی دوتایی (٪) Double Infection (%) | | | | | | | آلودگی سه‌تایی Triple Infection | آلودگی کل (٪) Total infection(%) |
| | | | SMYEV | SCV | SMoV | SLRSV | RpRSV | ToRSV | ArMV | ArMV+RpRSV | ArMV+ToRSV | RpRSV+ToRSV | SLRSV+RpRSV | SMYEV+SCV | SMoV+RpRSV | Ar+SMo+ToR | | |
| رشت Rasht | 4 | 63 | 4 6.3% | 1 1.6% | 2 3.2% | 2 3.2% | 2 3.2% | 4 6.3% | 2 3.2% | 1 1.6% | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 1 1.6% | 0 0.0 | 0 0.0 | 19 30.2% | |
| صومعه سرا Some-Sara | 4 | 47 | 0 0.0 | 4 8.5% | 1 2.1% | 1 2.1% | 1 2.1% | 5 10.6% | 3 6.4% | 0 0.0 | 0 0.0 | 1 2.1% | 1 2.1% | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 17 36.2% | |
| سنگر Sangar | 1 | 20 | 1 5% | 0 0.0 | 2 10% | 0 0.0 | 2 10% | 0 0.0 | 1 5% | 0 0.0 | 1 5% | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 7 35% | |
| جمع Total | 9 | 130 | 5 3.8% | 5 3.8% | 5 3.8% | 3 2.3% | 5 3.8% | 9 6.9% | 6 4.6% | 1 0.8% | 1 0.8% | 1 0.8% | 1 0.8% | 1 0.8% | 0 0.0 | 0 0.0 | 43 33.1% | |
| بابلسر Babolsar | 5 | 38 | 2 5.3% | 0 0.0 | 2 5.3% | 1 2.6% | 1 2.6% | 1 2.6% | 2 5.3% | 0 0.0 | 1 2.6% | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 1 2.6 % | 0 0.0 | 11 28.9% | |
| جویبار Joibar | 4 | 30 | 0 0.0 | 1 3.3% | 1 3.3% | 0 0.0 | 1 6.6% | 1 3.3% | 1 6.6% | 0 0.0 | 1 3.3% | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 8 26.7% | |
| بهشهر Behshar | 4 | 25 | 1 4% | 2 8% | 1 4% | 0 0.0 | 1 4% | 2 8% | 2 8% | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 1 4% | 10 40% | |
| جمع Total | 13 | 93 | 3 3.2% | 3 3.2% | 4 4.3% | 1 1.1% | 4 4.3% | 4 4.3% | 6 6.5% | 0 0.0 | 2 2.2% | 0 0.0 | 0 0.0 | 0 0.0 | 1 1.1 % | 1 1.1% | 29 31.1% | |
| جمع کل Total | 22 | 223 | 8 3.6% | 8 3.6% | 9 4% | 4 1.8% | 9 4% | 13 5.8% | 12 5.4% | 1 0.5% | 3 1.3% | 1 0.5% | 1 0.5% | 1 0.5% | 1 0.5 % | 1 0.5% | 72 32.3% | |




**شکل ۳**- الکتروفورز محصولات واکنش RT-PCR با استفاده ازآغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی SMYEV در ژل آگارز. راهک M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی (سیناژن، ایران)، راهک‌های ۱، ۲ و ۴ بترتیب نمونه‌های SMYEV/28، SMYEV/44 و SMYEV/121 می‌باشد که منجر به تکثیر یک قطعه دی.ان.ای بطول مورد انتظار ۸۶۰ جفت‌بازی شده است. راهک شماره سه کنترل منفی (سالم) است.

**Fig. 3.** Electrophoresis result of coat protein amplification using specific primers of SMYEV in agarose gel. M: 100 bp molecular weight marker (CinnaGen-Iran); 1, 2 & 4: SMYEV/28, SMYEV/44 and SMYEV/121 isolates respectively; 3: negative control.

www.SID.ir

Archive of SID



**جدول ۳**- نتایج آزمون الایزا روی نمونه‌های تصادفی توت‌فرنگی جمع‌آوری شده از دو استان گیلان و مازندران

**Table 3**. ELISA results in symptomatic strawberry samples collected from Guilan and Mazandaran provinces

| منطقه | تعداد مزرعه مورد بازدید No. of field visited | تعداد نمونه جمع‌آوری شده Collected samples | نمونه‌های علائم دار (Symptomatic samples) | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | آلودگی انفرادی (٪) Single Infection (%) | | | | | | | آلودگی دوتایی (٪) Double Infection (%) | | | | | | آلودگی سه‌تایی (٪) Triple Infection (%) | آلودگی کل (٪) Total infection(%) |
| | | | SMYEV | SCV | SMoV | SLRSV | RpRSV | ToRSV | ArMV | ArMV+RpRSV | ArMV+ToRSV | RpRSV+ToRSV | SLRSV+RpRSV | SMYEV+SCV | SMoV+RpRSV | Ar+SMo+ToR | |
| رشت Rasht | 4 | 89 | 2<br>2.2% | 2<br>2.2% | 3<br>3.4% | 0<br>0.0 | 2<br>2.2% | 2<br>2.2% | 5<br>5.6% | 0<br>0.0 | 1<br>1.1% | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 17<br>19.1% |
| صومعه سرا Some-Sara | 4 | 82 | 0<br>0.0 | 1<br>1.2% | 1<br>1.2% | 1<br>1.2% | 2<br>2.4% | 2<br>2.4% | 2<br>2.4% | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 9<br>11% |
| سنگر Sangar | 1 | 39 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 1<br>2.6% | 1<br>2.6% | 2<br>5.1% | 1<br>2.6% | 2<br>5.1% | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 7<br>17.9% |
| جمع Total | 9 | 210 | 2<br>1.1% | 3<br>1.6% | 5<br>2.6% | 2<br>1.1% | 6<br>3.2% | 5<br>2.6% | 9<br>4.7% | 0<br>0.0 | 1<br>0.5% | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 33<br>15.7% |
| بابلسر Babolsar | 5 | 72 | 1<br>1.4% | 0<br>0.0 | 1<br>1.4% | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 1<br>1.4% | 2<br>2.8% | 1<br>1.4% | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 6<br>8.3% |
| جویبار Joibar | 4 | 69 | 2<br>2.9% | 0<br>0.0 | 1<br>1.4% | 0<br>0.0 | 1<br>1.4% | 0<br>0.0 | 2<br>2.9% | 0<br>0.0 | 1<br>1.4% | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 7<br>10.1% |
| بهشهر Behshar | 4 | 71 | 1<br>1.4% | 0<br>0.0 | 2<br>2.8% | 0<br>0.0 | 2<br>2.8% | 2<br>2.8% | 3<br>4.2% | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 1<br>1.4<br>% | 1<br>1.4<br>% | 12<br>16.9% |
| جمع Total | 13 | 212 | 4<br>1.9% | 0<br>0.0 | 4<br>1.9% | 0<br>0.0 | 3<br>1.4% | 3<br>1.4% | 7<br>3.3% | 1<br>0.5% | 1<br>0.5% | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 1<br>0.5<br>% | 1<br>0.5<br>% | 25<br>11.8% |
| جمع کل Total | 22 | 422 | 6<br>1.4% | 3<br>0.7% | 9<br>2% | 2<br>0.4% | 9<br>2.1% | 8<br>1.9% | 16<br>3.8% | 1<br>0.2% | 2<br>0.4% | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 0<br>0.0 | 1<br>0.2<br>% | 1<br>0.2<br>% | 58<br>13.7% |

**جدول ٤**- واکنش گیاهان محک مایه‌زنی شده با جدایه‌های چهار نپوویروس ArMV، ToRSV، RpRSVو SLRSV مورد بررسی در این تحقیق

**Table 4**. Reaction of indicator plants inoculated with four nepoviruses ArMV, ToRSV, RpRSV and SLRSV isolates in this study

| نام علمی Scientific name | خانواده Family | ویروس (جدایه) Virus (isolate) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ArMV (AR2, ASo3) | ToRSV (TR1, TB1) | RpRSV (RSo1, RJ1) | SLRSV (SR2, SB1) |
| *Chenopodium amaranticolor* | Chenopodioideae | CLL, Mt* | CLL, N | CLL | CLL, C* |
| *Ch. quinoa* | | CLL, Mt | CLL, N | CLL, N | CLL, C |
| *Cucumis sativus* | Cucrbitacea | CLL, CS | CLL, C | NI | CLL, C |
| *Nicotiana tabacum* | Solanaceae | CLL, C* | NLL, C* | CLL, CS* | NI |
| *Phaseolus vulgaris* | Fabaceae | CLL | CLL | CLL, C | NI |

*: آلودگی سیستمیک ویروس در این گیاهان بوسیله آزمون الایزا مورد بررسی و تایید قرار گرفت.

C: chlorosis, CLL: chlorotic local lesion, CS: systemic chlorotic spots, Mt: mottling, N: necrosis, NI: no infection, NLL: necrotic local lesion.
*: Systemic infection confirmed by ELISA.

www.SID.ir

Archive of SID



بیماری‌های ویروسی در توت‌فرنگی از مهمترین عوامل محدود کننده توسعه کشت این محصول به حساب می‌آیند (Converse, 1987; Matin and Tzanetakis, 2006). ارزش اقتصادی قابل توجه توت‌فرنگی در سال‌های اخیر موجب توجه بیشتر به افزایش سطح کشت آن در بین کشاورزان مناطق شمالی کشور در دو استان گیلان و مازندران شده است. در این تحقیق ۴۲۲ نمونه تصادفی از سطح ۲۲ مزرعه در دو استان گیلان و مازندران جمع‌آوری شده و از نظر آلودگی به هفت ویروس شامل ArMV، RpRSV، SCV، SLRSV، SMoV، SMYEV و ToRSV به روش الایزا مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل فراوانی آلودگی در نمونه‌های استان گیلان ۱۵/۷ و در استان مازندارن ۱۱/۷ درصد تعیین شد. این اطلاعات بر اساس نمونه‌برداری بعمل آمده در طول یک فصل زراعی و بررسی تعداد محدودی نمونه بدست آمده است و در صورت تکرار آن می‌توان به نتایج قاطع‌تری دست یافت. در یک بررسی که اخیرا در مزارع توت فرنگی کالیفرنیای آمریکا بعمل آمده است، از ۱۰۴ نمونه برگی بدون علائم در ۶۰ مورد (۵۷/۷٪) آلودگی به حداقل یکی از ۱۰ ویروس مورد بررسی مشاهده شده است (Martin and Tzanetakis, 2013).

بین ویروس‌های مورد بررسی، ArMV، RpRSV و ToRSV بترتیب با ۳/۸، ۲/۱ و ۱/۹ درصد، دارای بیشترین فراوانی بودند. هرسه ویروس فوق (از جنس *Nepovirus*) توسط نماتدهایی از جنس *Xiphinema* منتقل شده و دارای دامنه میزبانی گسترده‌ای در بین گیاهان می‌باشند به طوری که ArMV بالغ بر ۱۰۰ گونه از ۲۸ خانواده گیاهی (Murant, 1970) و ToRSV و RpRSV به ترتیب ۳۵ و ۱۴ خانواده گیاهی را آلوده می‌کنند (Murant, Stace-Smith, 1970، 1978). با توجه به حضور و پراکنش برخی نماتدها از اعضای جنس *Xiphinema* در ایران (Mojtahedi *et al*., 1980) و نیز وقوع و پراکنش آلودگی به ویروس ArMV در میزبانهای زراعی و باغی دیگر در کشور (رجوع شود به Farzadfar *et al*., 2002)، بالا بودن وقوع آلودگی ArMV در مزارع توت‌فرنگی مورد بررسی در این تحقیق دور از انتظار نیست و آلودگی به این ویروس از مزارع توت‌فرنگی در غالب کشورهای اروپا گزارش شده است (Murant, 1970). آلودگی به ویروس ArMV غالبا علائم خاصی در اکثر ارقام توت‌فرنگی ایجاد نمی‌نماید ولی در برخی ارقام موجب سبزردی و کاهش رشد می‌شود (Matin and Tzanetakis, 2006). در این تحقیق نیز علائم خاصی در نمونه‌های توت‌فرنگی دارای آلودگی ArMV مشاهده نشد. ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی (ToRSV) در ایران از میربان‌های باغی و زراعی مانند درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار (Moini *et al*. 2010)، مو (Pourrahim *et al*., 2004)، سویا (Golnaraghi *et al*., 2004) و گوجه‌فرنگی (Massumi *et al*., 2009) و در سطح جهانی نیز از اکثر مناطق اروپا، آسیا و آمریکا گزارش گردیده است (Stace-Smith, 1970) ولی به تنهایی بعنوان یک ویروس پرخسارت برای توت‌فرنگی گزارش نشده است (Matin and Tzanetakis, 2006). آلودگی به ToRSV در برخی ارقام توت‌فرنگی منجر به نکروز و حتی پژمردگی و مرگ بوته می‌شود (Converse, 1981). در این تحقیق نیز آلودگی توام این ویروس با ArMV و SMoV در توت‌فرنگی در منطقه بهشهر مازندارن منجر به بروز علائم نکروز و بدشکی درمیوه‌ها شده بود. تاکنون RpRSV در ایران از روی مو گزارش شده است (Rakhshandehroo *et al*., 2005) ولی این اولین گزارش از وقوع آن در توت‌فرنگی در ایران می‌باشد. در این تحقیق آلودگی به نپوویروس SLRSV با فراوانی ۰/۴ و ۱/۴ درصد بترتیب در بین نمونه‌های تصادفی و علائم‌دار مشاهده شد. این ویروس به تنهایی علائم خاصی در اکثر ارقام توت‌فرنگی ایجاد نمی‌نماید (Matin and Tzanetakis, 2006) و از غالب کشورهای اروپایی و نیز کشور آمریکا گزارش شده است (Postman *et al*., 2004; Martin *et al*., 2004). نتایج بررسی واکنش گیاهان محک مایه‌زنی شده با نمونه‌هایی که در آزمون الایزا با آنتی‌بادی یکی از چهار نپوویروس ArMV، RpRSV، SLRSV و ToRSV واکنش مثبت

www.SID.ir

Archive of SID



نشان داده بودند (جدول ۴) با نتایج گزارش شده توسط محققان دیگر در مورد دامنه میزبانی این ویروس‌ها مطابقت داشت (Murant, 1970, 1974, 1978; Stace-Smith, 1970).

یکی از شایع‌ترین ویروس‌های بیمارگر در مزارع توت فرنگی در دنیا SMYEV گزارش شده است. این ویروس عضو جنس *Potexvirus* از خانواده *Alphaflexiviridae* بوده و توسط گونه‌های شته جنس *Chaetosiphon* از جمله *C. fragaefolii* و *C. thomasi* به روش پایا منتقل می‌شود (King *et al*., 2010; Maas, 1984). فراوانی این ویروس در بین نمونه‌های تصادفی ۱/۴ درصد بود. گونه‌هایی از این جنس شته در ایران گزارش شده است (Kiani *et al*., 2012) ولی در مورد جزئیات دقیق آنها در استان‌های شمالی کشور هنوز اطلاعات دقیقی در دسترس نیست. همچنین دو ویروس شته‌زاد دیگر مورد بررسی در این تحقیق، شامل SCV و SMoV بودند که بترتیب دارای ۰/۷ و ۲/۰ درصد آلودگی در بین ۴۲۲ نمونه تصادفی مورد بررسی بودند. تصور بر این است که SMoV شایع‌ترین ویروس در مزارع توت‌فرنگی بوده و در تمامی مناطقی که این گیاه زراعت می‌شود حضور داشته‌باشد (Matin and Tzanetakis, 2006). تاکنون سویه‌های متعددی از این ویروس شناسایی شده‌اند که اکثر آنها در گیاه توت‌فرنگی علائمی ایجاد نکرده یا منجر به علائم پیسک ملایم می‌کنند. در این تحقیق نیز اکثر نمونه‌های تصادفی آلوده به این ویروس فاقد علائم خاصی بودند. این ویروس عضو جنس *Sadwavirus* از خانواده *Sequiviridae* بوده و علاوه بر شته‌های جنس *Chaetosiphon* توسط شته پنبه (*Aphis gossypii*) نیز به روش نیمه‌پایا منتقل می‌شود (Thompson and Jelkmann, 2003). شته پنبه از جمله شته‌های فعال در مناطق شمالی کشور بوده (Rezvani, 2001) و عدم توجه به افزایش فعالیت این شته در مناطق کشت توت‌فرنگی می‌تواند به توسعه آلودگی SMoV کمک نماید. اگرچه تقریبا اکثریت سویه‌های این ویروس جزو ویروس‌های پرخسارت در توت‌فرنگی محسوب نمی‌شوند (Matin and Tzanetakis, 2006) ولی آلودگی توام آن با سایر ویروس‌های بیمارگر در توت‌فرنگی می‌تواند منجر به افزایش شدت علائم و بیماری شود. بعنوان مثال اخیرا آلودگی توام SMoV و SMYEV در ایجاد عارضه زوال توت‌فرنگی در برخی ایالت‌های آمریکا مشاهده و گزارش شده است (Martin and Tzanetakis, 2013). در این بررسی نیز در دو مزرعه توت‌فرنگی حومه رشت و بهشهر که میزان آلودگی به SoMV بیشتر بود، میزان علائم سبزردی و پیسک در سطح مزرعه نسبتا بیشتر از سایر مزارع مورد بازدید بود.

پنج نمونه که در آزمون الایزا با آنتی‌بادی SMoV واکنش مثبت داشتند، با استفاده از روش RT-PCR و به کمک آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در این تحقیق، یکبار دیگر مورد بررسی تکمیلی قرار گرفتند. در این آزمون فقط دو نمونه واکنش مثبت داشتند و قطعه دی.ان.ای بطول مورد انتظار ۶۳۰ جفت‌باز در آنها تکثیر شد در حالیکه سه نمونه دیگر علی‌رغم واکنش مثبت در آزمون الایزا، در آزمون RT-PCR منجر به تکثیر قطعه دی.ان.ای مورد انتظار نشدند. چنین نتایجی در ردیابی مولکولی SMYEV نیز مشاهده شد بطوریکه از پنج نمونه توت‌فرنگی الایزا مثبت با SMYEV فقط در سه نمونه قطعه دی.ان.ای مورد انتظار در آزمون RT-PCR تکثیر گردید. برگ‌های توت‌فرنگی حاوی ترکیبات پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنلی متعددی می‌باشد که موجب اختلال در استخراج آر.ان.ای با کیفیت مطلوب برای واکنش‌های RT-PCR می‌شود (Cai *et al*., 2008; Li, 2001). در این بررسی نیز سن غیریکنواخت و نامناسب بافت‌های برگی و نیز کیفیت نامطلوب آر.ان.ای استخراجی می‌تواند منجر به چنین نتایجی شده باشد.

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق حضور هفت ویروس بیمارگر توت‌فرنگی شامل: ArMV، RpRSV، SCV، SLRSV، SMoV، SMYEV و ToRSV در دو استان گیلان و مازندران مورد ردیابی و تایید قرار گرفت. این اولین گزارش از وقوع آلودگی این ویروس‌ها در مزارع توت فرنگی کشور می‌باشد. بدلیل تکثیر رویشی توت‌فرنگی، انتقال و اشاعه

www.SID.ir

Archive of SID



بیماری‌های ویروسی در این گیاه، از احتمال بیشتری برخوردار می‌باشد. نتایج حاصل در این تحقیق نیز نشان داد که توالی‌های تعیین شده در مورد دو جدایه SMoV/20 و SMoV/69 دارای بیشترین مشابهت با جدایه SMoV ۱۲۷۸ از کشور هلند و توالی‌های بدست آمده در مورد سه جدایه SMYEV/28، SMYEV/44 و SMYEV/121 دارای بیشترین مشابهت با جدایه SMYEV D/M.110 از آلمان بود. با توجه به افزایش واردات گیاهچه‌های ارقام خارجی توت‌فرنگی در سال‌های اخیر از خارج از کشور، احتمال ورود آلودگی‌های ویروسی همراه با این مواد گیاهی دور از انتظار نیست. برای جلوگیری از توسعه آلودگی‌های ویروسی و مدیریت این بیماری‌ها، تدوین و اجرای دقیق برنامه‌های کنترل و گواهی سلامت برای مراکز تولید گیاهچه‌های توت‌فرنگی در کشور ضرورت دارد.

## References


ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHAFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER and D. J. LIPMAN, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.

ASHKAN, C. M. 2006. Important disease of fruit trees in Iran. Second edition .Tehran. Abizh. 472 pp.

BISWAS, M. K., M. DUTT, U. K. ROY, R. ISLAMI and M. HOSSAIN, 2009. Development and evaluation of in vitro somaclonal in Strawberry for improved horticultural traits. Scientia Horticulturae 122: 409-416.

CAI, B., J. ZHANG, Z. GAO, S. QU, Z. TONG, L. MI, Y. QIAO and Z. ZHANG, 2008. An improved method for isolation of total RNA from the leaves of *Fragaria* spp. Jiangsu Journal of Agriculture Science, 24: 875-677.

CLARK, M. F. and A. N. ADAMS, 1977. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-485.

CONVERSE, R. H. 1981. Infection of cultivated strawberries by *Tomato ring spot virus*. Phytopathology 71: 1149-1152.

CONVERSE, R. H. 1987. Virus and Viruslike Diseasea of Fragaria. In: Virus Diseases of Small Fruits.1-100.USDA Agricture Handbooks No. 631.

EL-GAIED, L. F., M. I. SALAMA, A. M. SALEM, A. F. N. EL-DEEN and N. A. ABDALLAH, 2008: Molecular and serological studies on a plant virus affecting strawberry. Arab Journal of Biotechnology 2: 303-314.

FAO. 2012. FAOSTAT Database results from FAO website. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FARZADFAR, SH., A R. GOLNARAGHEI and R. POURRAHIM, 2002. Plant Viruses in Iran. Saman Publication Co., Tehran, 199 pp.

GOLNARAGHI, A. R., N. SHAHRAEEN, R. POURRAHIM, SH. FARZADFAR and A. GHASEMI, 2004. Occurrence and relative incidence of viruses infecting soybeans in Iran. Plant Disease 88: 1069-1074.

KIANI, L., M. YAZDANIAN and B. TAFAGHODINIA, 2012. Effects of sanitation and using insect proof screens on population density of *Chaetosiphon fragaefolii* (Cockerell) on strawberry under greenhouse conditions. Proceedings of resilience of agricultural systems against crises, Tropentag, September 19-21, Gottingen Kassel, Witzenhausen, Germany.

KING, A. M. Q., M. J. ADAMS, E. B. CARSTENS and E. J. LEFKOWITZ, 2012. Virus Taxonomy, Clacssification and Nomenclature of Virus Nine Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London, UK,, 1327pp.

LI, D. 2001. The method of extracting total RNA from plants with plenty of secondary products. Journal of Nanjing University of Science and Technology 25: 547-549.

LI, L. and H. YANG, 2011. First report of strawberry necrotic virus in China. Plant Disease, 95: 1198.

MAAS, L. G. 1984. Compendium of strawberry diseases. APS Press. The American phytopathological society.


www.SID.ir

Archive of SID



pp. 138.

MACKENZIE, D. J., R. C. JOHNSON and C. WARNER, 1996. Incidence of four important viral pathogens in Canadian vineyards. Plant Disesae 80: 955-958.

MARTIN, R. R. and I. E. TZANETAKIS, 2013. High risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: Implications for certification, nurseries, and fruit production. Plant Disease 97: 1358-1362.

MARTIN, R. R. and I. E. TZANETAKIS. 2006. Chractrization , detection and management of strawberry viruses. Plant Disease 90: 384- 396.

MARTIN, R. R., I. E. TZANETAKIS, J. E. BARNES and J. F. ELMHIRST, 2004. First report of *Strawberry latent ringspot virus* in strawberry in the United States and Canada. Plant Disease 88: 575.

MASSUMI, H., M. SHAABANIAN, A. HOSSEINI POUR, J. HEYDARNEJAD and H. RAHIMIAN, 2009. Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. Plant Disease 93: 67-72.

MILKUS, B. N. 2001. Incidence of four nepoviruses in Missouri vineyards. American journal of Enology and Viticulture 52: 56-57.

MOINI, A. A., V. ROUMI, M. MASOUMI and K. IZADPANAH, 2010. Widespread occurrence of Tomato ringspot virus in deciduous fruit trees in Iran. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Julius-Kuhn-Archiv, 427,2010.

MOJTAHEDI, H., D. STURHAN, A. AKHIANI and S. BAROOTI, 1980. *Xiphinema* species in Iranian vineyards. *Nematologia Mediterranea,* 8: 165-170.

MURANT, A. F. 1970. CMI/AAB Descr. Plant Viruses – Arabis mosaic. No. 16. p. 4.

MURANT, A. F. 1974. CMI/AAB Descr. Plant Viruses – Strawberry latent ringspot virus. No. 126, p. 4.

MURANT, A. F. 1978. CMI/AAB Descr. Plant Viruses – Raspberry ringspot virus. No. 198, p. 4.

PLAKIDAS, A. G. 1927. Strawberry xanthosis (yellows) a new insect-borne disease. Journal of Agricultural Research, 35: 1057–1090.

POSTMAN J. D., I. E. TZANETAKIS and R. R. MARTIN, 2004. First report of *Strawberry latent ringspot virus* in a *Mentha* sp. from North America. Plant Disease 88: 907.

POURRAHIM, R., F. RAKHSHANDEHRO, SH. FARZADFAR and A. GOLNARAGHI, 2004. Natural occurrence of *Tomato ringspot virus* on grapevines in Iran. Plant Pathology 53: 237.

RAKHSHANDEHROO, F., R. POURRAHIM, H. ZAMANI ZADEH, S. REZAEE and M. MOHAMMADI, 2005. Incidence and distribution of viruses infecting Iranian vineyards, Journal of Phytopathology 153: 480-484.

REZVANI. A. 2001. Identification Key of Iran aphids. Agricultural research, education and extension organization of Iran's publication, Tehran, 316 p.

STACE-SMITH, R. 1970. CMI/AAB Descr. Plant Viruses – Tomato ringspot virus. No. 18. p. 4.

THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN and D. G. HIGGINS, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25: 4876-4882.

THOMPSON, J. R. and W. JELKMANN, 2003. The detection and variation of Strawberry mottle virus. Plant Disease 87: 385-390.

www.SID.ir