

ردیابی و تعیین پراکنش ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار (PNRSV) در تعدادی از باغات درختان میوه هسته دار موجود در برخی مناطق استان های فارس و گلستان

پویا رحمانیان^۱، فرشاد رخشنده رو^{۲*} و حمیدرضا زمانی زاده^۳
۱، ۲، ۳، دانشجوی کارشناسی سابق ارشد، استادیار و استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۳ تاریخ تصویب: ۹۲/۵/۲۴)

چکیده

در طی فصول بهار تا پاییز سال های ۸۷ و ۸۸ به منظور ردیابی و تعیین پراکنش ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه (PNRSV) تعداد ۳۴۳ نمونه برگگی علائم دار و بدون علائم به طور تصادفی از درختان میوه هسته دار موجود در برخی باغات شهرستان های جهرم، مینودشت و کلاله به ترتیب از استان های فارس و گلستان جمع آوری شد. جهت ردیابی ویروس (PNRSV) نمونه ها توسط آزمون های (TAS-ELISA) و (DIBA) با استفاده از آنتی سرم های چند همسانه ای و تک همسانه ای اختصاصی شرکت (Agdia, U.S.A) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد ویروس مذکور در مجموع به میزان ۱۵/۵٪ در باغات مورد بررسی پراکنده شده است. میزان این پراکنندگی در باغات مورد نمونه برداری در شهرستان جهرم از استان فارس ۱۶/۴٪ و در هر کدام از شهرستان های کلاله و مینودشت از استان گلستان ۱۳/۶٪ بود. مایه زنی مکانیکی برخی جدایه های ردیابی شده ویروس بر روی گیاهان علفی انجام پذیرفت و نتایج با آنچه که در گذشته برای نژاد PV-32 ویروس گزارش شده بود مطابقت داشت. با استفاده از آزمون مولکولی RT-PCR و جفت آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن پروتئین حرکتی نژادهای موجود در گروه های PV-32 و PV-96، نمونه ها مورد بررسی قرار گرفتند. برای نمونه های آلوده قطعات ژنتیکی مورد انتظار به طول ۲۸۳ bp مربوط به گروه PV-32 تکثیر شد. نتایج این بررسی نشان داد این جدایه ها با جدایه های گروه PV-32 از نظر ویژگی های مولکولی مشابه می باشند.

واژه های کلیدی: شناسایی مولکولی، ساندریج سه تائی آنتی بادی (TAS-ELISA)، تعیین پراکنش

مقدمه

هنگفتی را همه ساله به میوه کاری های سراسر جهان وارد می سازد.

در بعضی مواقع خسارت تا میزان ۵۰٪ در باغات گزارش شده است (Vaskova et al., 2000). ویروس به راحتی از طریق پیوند و اندام های تکثیری آلوده، دانه گرده و بذر منتقل می شود و از اینرو می شود آن را هر جا که درختان هسته دار کاشته می شوند ردیابی نمود (Moury et al., 2000). اولین بار این ویروس از آمریکا در سال ۱۹۴۱ از درختان هلو گزارش شده است

ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) جنس *Illarvirus* و خانواده *Bromoviridae* می باشد. این ویروس دارای ژنوم از نوع آر-ان-ای تک رشته ای مثبت سه بخشی می باشد (Fulton, 1970). این ویروس از جمله عوامل بیماری زای محدود کننده محصول در میوه کاری های جهان محسوب می شود. PNRSV موجب کاهش کمی و کیفی میوه ها شده و خسارت

محسوب شود. در ایران ویروس PNRSV برای اولین بار از استان اردبیل و دشت مغان در سال ۲۰۰۴ گزارش شد (Moini & Izadpanah, 2000). سپس این ویروس به همراه ویروس موزاییک آرابیس *Arabis mosaic virus* (ArMV) در سال ۲۰۰۶ توسط رخشنده رو و همکاران از رزهای زینتی از ایران گزارش شد (Rakhshandehroo et al., 2004). ردیابی و تعیین پراکنش عوامل ویروسی در میزبان های مختلف باعث می شود تا بتوان استراتژی مناسبی را جهت کنترل عوامل ویروسی انتخاب نمود و این امر باعث موفقیت انجام برنامه های کنترلی خواهد شد. در این بررسی کوشش شد تا با استفاده از روش های مولکولی و سرولوژیکی موجود نسبت به ردیابی ویروس PNRSV در درختان میوه موجود در شهرستان جهرم در استان فارس و شهرستان های کلاله و مینو دشت در استان گلستان اقدام نموده و میزان پراکندگی ویروس در مناطق مورد بررسی تعیین گردد.

مواد و روش ها

نمونه برداری

در طی فصول بهار تا پاییز سال های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ تعداد ۳۴۳ نمونه برگ از درختان میوه هسته دار شامل: آلو (*Prunus domestica* L.)، آلبالو (*Prunus cerasus* L.)، زردآلو (*Prunus armenaica* L.)، هلو (*Prunus persica* L.) و بادام (*Prunus amygdalus* L.) موجود در باغات مناطق مختلف شهرستان جهرم در استان فارس و شهرستان های کلاله و مینودشت در استان گلستان جمع آوری گردید. در مجموع تعداد ۲۴ باغ (۱۶ باغ در جهرم و ۸ باغ در کلاله و مینودشت) با فاصله هر ۸ تا ۱۰ کیلومتر یک باغ مورد نمونه برداری قرار گرفت و بر این اساس تعداد ۲۳۸ نمونه از درختان میوه هسته دار موجود در شهرستان جهرم و ۱۰۵ نمونه از باغات موجود در شهرستان های کلاله و مینودشت جمع آوری گردید. نمونه برداری به طور تصادفی از نمونه های برگ بدون علائم و یا دارای علائم مشکوک به آلودگی شامل غربالی، موزاییک، بد شکلی، لکه حلقوی نکروتیک برگ و کلروز بین رگبرگی به صورت تصادفی و با حرکت در قطر باغ با فاصله هر ۱۰ متر انجام

(Cochran & Hutchins, 1941) و تا کنون نژادهای متعددی از PNRSV از بیشتر گونه های هسته دار زراعی در نقاط مختلف جهان بدست آمده است (Aparicio & Palla, 2002).

در این ویروس نژادها بر مبنای تفاوت در بیماریزایی، خصوصیات بیولوژیکی، سرولوژیکی و تغییر در توالی نوکلئوتیدهای پروتئین پوششی از یکدیگر تفکیک می شوند (Salem et al., 2004). برخی جدایه های PNRSV لکه های بافت مرده در برگ ها ایجاد نموده و موجب غربالی شدن برگها می شوند. این نشانه در اولین سال وقوع آلودگی سیستمیک در برگ های جوان ایجاد می شود ولی بر روی برگ ها و میوه های سال های بعد این نشانه ها بسیار کم بروز می نماید. برخی جدایه ها نیز موجب ایجاد نقوش خطی و موزاییکی در ارقام آلو و بادام می شوند. در بیشتر گونه های هسته دار بروز نشانه ها به رقم و جدایه ویروس بستگی دارد (Moury et al., 2000). با توجه به رقم درختان آلوده امکان آلودگی ویروسی در میزبان بدون علائم وجود دارد (Uyemoto & Scott, 1992). شکل پیکره ویروس ایزومتریک تا باسیل گونه کوتاه با قطر ۲۳ تا ۲۷ نانومتر می باشد. در بسیاری از جدایه های این ویروس پیکره های ویروس در ۳ اندازه یافت می شوند (Brunt et al., 1996). این ویروس در عصاره بافت نسبتاً ناپایدار است ولی می توان با افزودن ضد اکسیدان ها به بافری که گیاه نمونه در آن خرد شده است ویروس را از برگ های خیار *Cucumis sativus*) یا برگ های سلمک (*Chenopodium quinoa*) خالص سازی نمود (Fulton, 1957). غلظت ویروس بسیار تحت تاثیر شرایط محیطی می باشد و از اینرو با تغییر فصل غلظت ویروس نیز در درختان میزبان تغییر می یابد و پراکندگی ویروس در درون میزبان یکنواخت نیست (Scott et al., 1989). این امر موجب می شود تا ردیابی و تشخیص ویروس در درختان میوه امری دشوار باشد، بویژه آنکه در فصل زمستان ردیابی ویروس با استفاده از روش های تشخیص سرولوژیک مانند الایزا از درختان چوبی تقریباً امکان پذیر نیست (Spiegel et al., 1996). دلایل فوق موجب شده است تا ویروس PNRSV همواره از عوامل ویروسی مهم در بخش قرنطینه بیماری های درختان میوه هسته دار

۰/۳ گرم بافت گرفته شد. عصاره گیری در هاون استریل به نسبت ۳ به ۱ (۳ سی سی بافر عصاره گیری و ۱ گرم بافت) انجام شد.

آزمون Dot-immunobinding assay

از آزمون سرولوژیکی DIBA برای تکرار ردیابی سرولوژیکی انجام پذیرفته توسط روش آزمون TAS-ELISA برای تعداد ۲۵ نمونه گیاهی آلوده به PNRSV استفاده شد. برای این منظور نمونه هایی که میزان عدد جذبی آن ها در آزمون الیزا برابر حد آلودگی بود و برای تأیید نتیجه نیاز به تکرار آزمون داشتند توسط آزمون DIBA مطابق روش اجرا شده توسط (Bantari & Goodwin, 1985) مورد ارزیابی مجدد قرار گرفتند. برای این آزمون از آنتی بادی های چند همسانه ای و تک همسانه ای تهیه شده از شرکت (Agdia, U.S.A. Inc) با رقت ۱/۲۰۰ و همچنین آنتی بادی (GAR) با رقت ۱/۱۰۰۰۰ استفاده شد. برای واکنش رنگزایی از مواد شیمیایی رنگ زا NBT و BCIP استفاده شد. حضور لکه های ارغوانی رنگ در سطح غشاء برابر نمونه آلوده به ویروس در نظر گرفته شد و حضور لکه ها تا ۳۰ دقیقه پس از اضافه نمودن سوپسترا در دمای اتاق مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون عصاره های گیاه های آلوده به ویروس بر روی غشاء لکه گذاری شدند و از عصاره گیاه های سالم و آلوده به عنوان شاهد های منفی و مثبت استفاده شد. بررسی خصوصیات بیولوژیکی ویروس در گلخانه برای این منظور تعداد ۹ نمونه از نمونه هایی که برای آلودگی ویروسی مثبت تشخیص داده شدند و دارای علائم متفاوتی بودند به صورت مکانیکی با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (KH₂PO₄ و K₂HPO₄)، ۰/۱ مولار با pH ۷/۱ دارای ۰/۱۵٪ از ماده ۲- مرکاپتواتانول به صورت مکانیکی بر روی گیاهان محک در گلخانه مایه زنی شدند. گیاهان آزمون علفی متعلق به خانواده های (Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Solanaceae) برای بررسی های گلخانه ای در مرحله ۲ تا ۴ برگی مورد مایه زنی قرار گرفتند (جدول ۴). هر گونه از گیاه سنجشی با یک بار تکرار برای هر جدایه مایه زنی گردید. در هر تکرار ۲ گلدان با هر جدایه مایه زنی شد. علائم ۱۰ روز پس از مایه زنی با ویروس یادداشت برداری شدند. به منظور اطمینان از آلوده بودن

شد. فاصله بین باغات مورد نمونه برداری با توجه به سطح زیر کشت در هر منطقه تعیین گردید.

آزمون ساندویچ سه تائی الیزا

TAS-(ELISA). این آزمون مطابق روش موری و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام پذیرفت (Moury *et al.*, 2001). پس از پوشش دار نمودن بشقابک الیزا با آنتی بادی چندهمسانه ای (Agdia, U.S.A) با غلظت ۱/۲۰۰، بشقابک ها برای مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پس از شستشوی بشقابک ها، چاهک ها با محلول شیر خشک بدون چربی که به میزان ۵٪ در بافر فسفات پتاسیم pH 7.4 حل شده بود برای مدت ۳ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس عصاره بافت برگ نمونه های گیاهی درون چاهک ها ریخته شد و برای یک شب در دمای ۴°C در یخچال نگهداری شدند. سپس بشقابک ها توسط آنتی بادی تک همسانه ای تولید شده بر علیه پروتئین پوششی ویروس پوشش دار شده و برای مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پس از انکوباسیون بشقابک ها با آنتی بادی (GAR¹) به رقت ۱/۵۰۰۰ برای مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بافر سوپسترا دارای ماده پارانیتروفیل فسفات (Sanofi, French) درون چاهک ها ریخته و سپس بشقابک ها دور از تابش نور نگهداری شدند و هر نیم ساعت یک بار جهت بروز واکنش رنگ زایی و حضور رنگ زرد با دستگاه الیزا خوان مدل (ELX 800-Biotek) در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه هایی که مقدار عددی جذب آن ها از ۳ برابر میانگین جذب چاهک های مربوط به شاهد سالم (حد آلودگی) بیشتر بود به عنوان نمونه های مثبت در نظر گرفته شدند. به دلیل توزیع غیر یکنواخت ویروس در بافت های درختات در زمان های مختلف از سال، در این تحقیق تلاش شد تا نمونه برداری ها در فصل زمستان انجام نشود و همچنین نمونه برداری از برگ های جوان تر در هر شاخه انجام شود. در زمان انجام آزمون فقط عصاره بخشی از پهنک که نزدیک به دم برگ بود گرفته شد. برای نمونه برداری از ۳ تا ۴ قسمت از منطقه مشخص شده از سطح برگ (نزدیک به دم برگ) باندازه

1. (Sigma Aldrich, Germany) - Goat anti-rabbit antibody

جفت آغازگرهای VP-90 و VP-91 واکنش نشان دادند به جدایه های PV-96 و نمونه هایی که با جفت آغازگرهای VP-90 و VP-92 واکنش نشان دادند به جدایه PV-32 تعلق داشته و هر دو جدایه متعلق به نژادهای اروپایی ویروس بودند (Aparicio and Palla, 2002). محصولات حاصل از تکثیر PCR برای بررسی اندازه و کیفیت بر روی آگاروز ۱/۵٪ با شدت جریان ۲۵ میلی آمپر به مدت ۴۵ دقیقه تفکیک شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر و غلظت نهایی ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰X (۱۰۰ mM KCl, Tris-HCl) (اسیدیته‌ی ۸/۴)، ۰/۲ میلی‌مولار دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs)، ۲/۵ میکرولیتر از cDNA و ۳ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq Polymerase) (سیناژن، ایران) در دستگاه ترموسایکلر (Ependorf, AG, Germany) انجام شد. واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت دو دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی cDNA در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس، به مدت ۶۰ ثانیه؛ اتصال آغازگرها به رشته‌ی الگو در دمای ۵۷ درجه-ی سلسیوس، به مدت ۴۵ ثانیه؛ گسترش رشته‌ی جدید در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه انجام شده و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

گیاهان علفی مایه زنی شده، آزمون الیزا بر روی آنها انجام پذیرفت. همچنین برای گیاهانی که علائم مشخصی را نشان ندادند مایه زنی برگشتی (Back inoculation) انجام پذیرفت.

ردیابی مولکولی ویروس با استفاده از آزمون RT-PCR
برای تشخیص دقیق ویروس در نمونه های مختلف مربوط به درختان میوه هسته دار از آزمون RT-PCR برای تعداد ۲۰ نمونه از گیاهانی که توسط آزمون های سرولوژیک مثبت شناخته شده بودند استفاده شد. برای این منظور گیاهان آلوده جهت ایجاد غلظت مناسب به صورت مکانیکی بر روی گیاه خیار در شرایط گلخانه مایه زنی شدند. ده روز پس از مایه زنی، total-RNA بافت برگ های جوان خیار با استفاده از بافر کلرید لیتیم LiCl مطابق روش (Channuntapipat et al., 2001) استخراج شد. فرایند سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس (M-MuLV) و مطابق دستورالعمل کیت تجارتي شرکت (Fermentas, Germany) و با استفاده از آغازگر برگشتی (Reverse Primer) اختصاصی برای ژن پروتئین حرکتی (mp-ArMV) انجام پذیرفت. واکنش مولکولی PCR با استفاده از ۲μL از cDNA ساخته شده و در حضور آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) انجام پذیرفت. در این آزمون برای تشخیص ویژگی های مولکولی ویروس از تنها یک آغازگر برگشتی (VP-90) و دو عدد آغازگر رفتی (VP-91, VP-92) استفاده شد. نمونه هایی که با

جدول ۱- ویژگی های آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر پروتئین حرکتی ویروس PNRSV

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر	دمای ذوب آغازگر	اندازه باند مورد نظر	رفرنس مورد استفاده
VP-90	5'-ATCAAGCTTATTGCAAATTCGGCAAAC-3'	۷۱/۶ °C	۲۸۳ bp	(Aparicio & Palla, 2002)
VP-91	5'-TCAGGATCCGTTTTTACAATCGAAATC-3'	۷۱/۶ °C		
VP-92	5'-TCAGGATCCGTTTTTACAAAATGAAATC-3'	۷۲/۶ °C	۲۸۴ bp	

PNRSV می باشد (شکل ۱). نتایج حاصل از تعیین پراکندگی نشان داد که ویروس PNRSV در طی سال های ۸۷ و ۸۸ در مجموع به میزان ۱۵/۵٪ در باغات درختان میوه هسته دار مناطق مورد بررسی پراکنده شده است (جدول ۲). تحقیق های متفاوت در گذشته نشان داده است که این ویروس در کشورهای مختلف از درصدهای آلودگی متفاوتی برخوردار می باشد. به عنوان

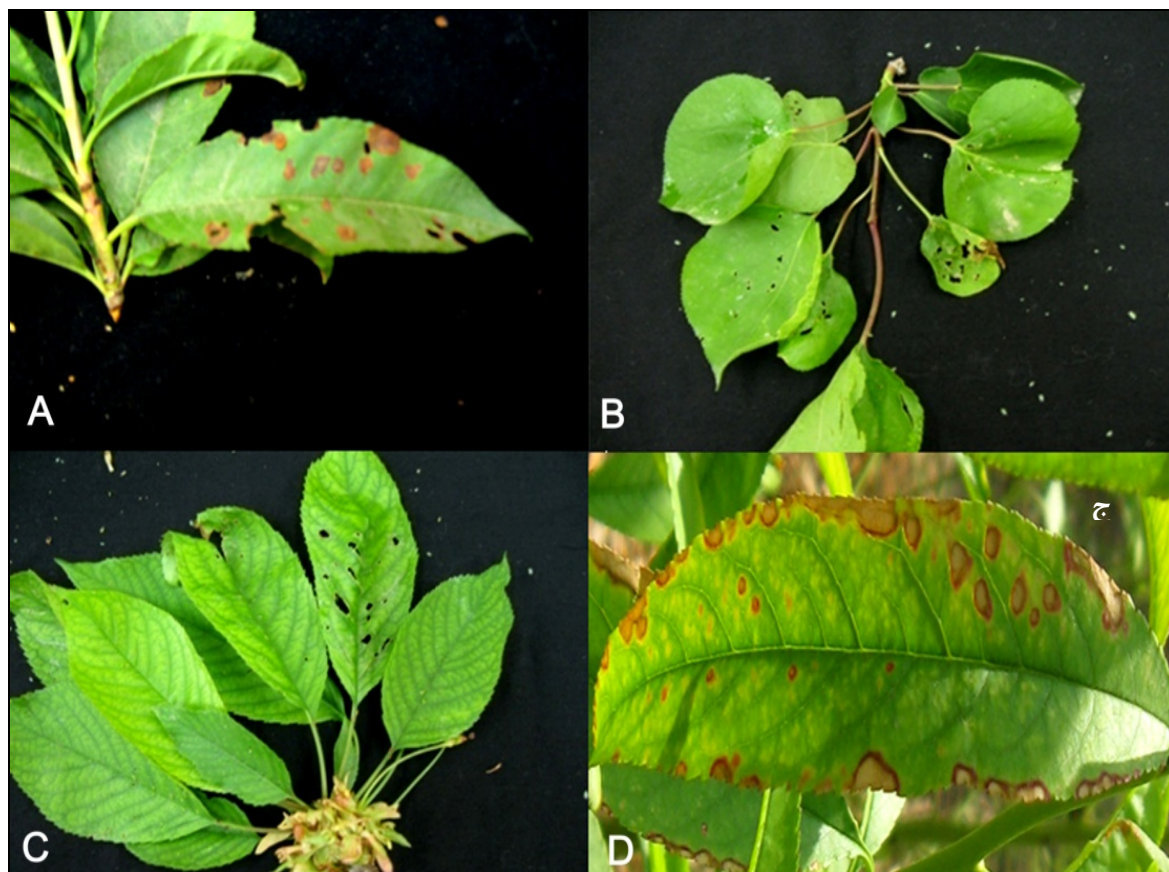
نتایج و بحث

ردیابی و تعیین پراکنش ویروس PNRSV

پس از مطابقت نتایج آزمون الیزا با علائم جمع آوری شده مشخص شد علائمی همچون لکه های حلقوی نکروتیک در سطح پهنک برگ، ایجاد حالت غربالی و سوراخ شدن برگ ها و نیز بدشکلی برگ ها در درختان میوه هسته دار مختلف مرتبط با آلودگی ویروس

این ویروس حدود ۶٪ بوده است (Ulubas & Ertunc, 2004; Matic *et al.*, 2008)

مثال در کشور ایتالیا به میزان ۶۰٪ در کل باغات درختان میوه هسته دار پراکنده شده ولی در کشور ترکیه میزان درصد کل آلودگی باغات میوه هسته دار به



شکل ۱- علائم بیماری حاصل از ویروس لکه حلقوی درختان میوه هسته دار (PNRSV) در درختان میوه هسته دار مختلف. (A) علائم لکه حلقوی نکروتیک در بادام، (B) علائم بد شکلی، غربالی و سوراخ شدن برگ در زردآلو، (C) علائم غربالی و کلروز برگ در برگ آلبالو، (D) علائم لکه های حلقوی نکروتیک و کلروز بین رگبرگ در هلو.

دارد که گرمای مناطق جنوبی کشور با تاثیر در میزبان موجب فراهم شدن شرایط مناسب برای تکثیر ویروس و در نتیجه امکان ردیابی بهتر آن توسط تکنیک الایزا شده باشد. البته نباید موضوع امکان انتقال موثر ویروس توسط اندام های رویشی تکثیری و دانه گرده و یا حساسیت ارقام زراعی درختان منطقه را در جنوب کشور از نظر دور داشت. اثبات این موارد نیازمند بررسی های بیشتر می باشد. همچنین نتایج نشان داد در طول سال های مورد بررسی کمترین میزان آلودگی به ویروس در درختان هلو (۱۲/۶٪) و بیشترین میزان در درختان آلبالو (۴۶/۱٪) می باشد (جدول ۲).

همچنین در این بررسی مشخص شد درختان میوه هسته دار مختلف باغات جهرم در استان فارس با میزان آلودگی ۱۶/۴٪ نسبت به باغات مینودشت و کلاله در استان گلستان با ۱۳/۶٪، بیشتر به این ویروس آلوده بودند (جدول ۲). در گذشته مشخص شده بود که ویروس PNRSV دارای تغییرات غلظت در بافت های میزبان های آلوده می باشد و در دماهای بالاتر به مناسبت حرکت سریعتر شیره گیاهی به سرعت در بافت های میزبان حرکت نموده و با تکثیر زیاد خود موجب افزایش غلظت پروتئین های خود در بافت های گیاه آلوده می شود (Salem *et al.*, 2003). این احتمال وجود

جدول ۲- میزان پراکنش ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار در باغات درختان میوه هسته دار شهرستان های مختلف استان های مورد بررسی در سال های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸

استان	شهرستان	تعداد نمونه های جمع آوری شده	تعداد نمونه های جمع آوری شده به تفکیک میزان					
			الو	زرد آلو	هلو	آلبالو	بادام	
فارس	چهرم	۲۴۲	۴۰	۵۴/۹	۷۰/۱۲	۶۶/۷	۸/۳	۴۵/۹
گلستان	مینو دشت	۸۸	۱۲	۴۰/۳	۵/۰	۴۰/۷	۳/۲	۰/۰
	کلاله	۲۲	۳	۰/۰	۰/۰	۲۰/۲	۲/۱	۰/۰
تعداد کل		۳۵۲	۵۵	۹۴/۱۲	۷۵/۱۲	۱۲۶/۱۶	۱۳/۶	۴۵/۹
درصد کل آلودگی		٪۱۵/۵	٪۱۶	٪۱۲/۷	٪۱۶	٪۱۲/۶	٪۴۶/۱	٪۲۰

این نسبت در هر سال انجام تحقیق تکرار پذیر بود و همواره درصد های کمتر مربوط به هلو و درصدهای بیشتر به آلبالو تعلق داشت. در تحقیق های گوناگونی که در نقاط مختلف آمریکا، آسیا و آفریقا در گذشته انجام شده بود محققین نشان داده بودند که ویروس PNRSV در درختان آلبالو بیشتر از سایر درختان آلودگی ایجاد نموده و نتایج حاصل از این تحقیق نیز با نتایج گذشته مطابقت دارد (Gumus et al., 2007; Matic et al., 2008; Oliver et al., 2009). در این بررسی مشخص شد میزان آلودگی درختان میوه هسته دار به ویروس PNRSV در سال ۱۳۸۸ (با میزان آلودگی ٪۱۶/۵) نسبت به سال ۱۳۸۷ (با میزان آلودگی ٪۱۳/۷)، ٪۸/۳، ٪۱۷/۷ و ٪۱۳/۹ به ترتیب به شهرستان های چهرم، کلاله و مینودشت به ترتیب به ویروس PNRSV آلوده بوده اند (جدول ۳ و ۴).

این نسبت در هر سال انجام تحقیق تکرار پذیر بود و همواره درصد های کمتر مربوط به هلو و درصدهای بیشتر به آلبالو تعلق داشت. در تحقیق های گوناگونی که در نقاط مختلف آمریکا، آسیا و آفریقا در گذشته انجام شده بود محققین نشان داده بودند که ویروس PNRSV در درختان آلبالو بیشتر از سایر درختان آلودگی ایجاد نموده و نتایج حاصل از این تحقیق نیز با نتایج گذشته مطابقت دارد (Gumus et al., 2007; Matic et al., 2008; Oliver et al., 2009). در این بررسی مشخص شد میزان آلودگی درختان میوه هسته دار به ویروس PNRSV در سال ۱۳۸۸ (با میزان آلودگی ٪۱۶/۵) نسبت به سال ۱۳۸۷ (با میزان آلودگی ٪۱۳/۷)، ٪۸/۳، ٪۱۷/۷ و ٪۱۳/۹ به ترتیب به شهرستان های چهرم، کلاله و مینودشت به ترتیب به ویروس PNRSV آلوده بوده اند (جدول ۳ و ۴).

جدول ۳- میزان پراکنش ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار در باغات درختان میوه هسته دار شهرستان های مختلف استان های مورد بررسی در سال ۱۳۸۷.

استان	شهرستان	تعداد نمونه های جمع آوری شده	تعداد نمونه های جمع آوری شده به تفکیک میزان					
			الو	زرد آلو	هلو	آلبالو	بادام	
فارس	چهرم	۵۱	۷	۱۱/۰	۱۳/۲	۱۴/۲	۵/۲	۸/۱
گلستان	مینو دشت	۱۵	۱	۴/۱	۲/۰	۷/۰	۲/۰	۰/۰
	کلاله	۹	۱	۲/۰	۲/۰	۳/۰	۲/۱	۰/۰
تعداد کل		۷۵	۹	۱۷/۱	۱۷/۲	۲۴/۲	۹/۳	۸/۱
درصد کل آلودگی		٪۱۲	٪۵/۸	٪۱۱/۷	٪۸/۳	٪۳۳/۳	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵

همچنین درصد های آلودگی در هر سال در مناطق نمونه برداری در شهرستان های کلاله و مینودشت در استان گلستان نسبت به شهرستان چهرم در استان فارس کمتر بوده است. استفاده از اندام های تکثیری آلوده و نیز انتقال از طریق بذر و دانه گرده مهمترین روش های انتقال این ویروس می باشند، لذا بی توجهی

همچنین درصد های آلودگی در هر سال در مناطق نمونه برداری در شهرستان های کلاله و مینودشت در استان گلستان نسبت به شهرستان چهرم در استان فارس کمتر بوده است. استفاده از اندام های تکثیری آلوده و نیز انتقال از طریق بذر و دانه گرده مهمترین روش های انتقال این ویروس می باشند، لذا بی توجهی

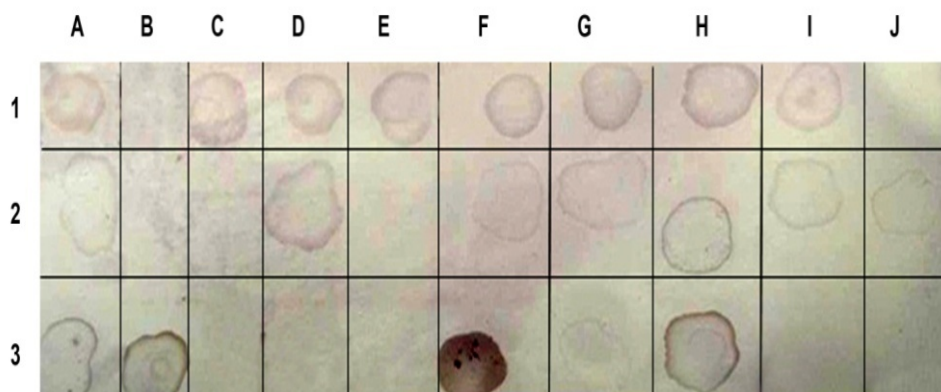
به حضور بیمارگر و عدم انجام اصول قرنطینه و بهداشت زراعی می تواند موجب گستردگی و بیشتر ویروس در باغات کشور شود.

جدول ۴- میزان پراکنش ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار در باغات درختان میوه هسته دار شهرستان های مختلف استان های مورد بررسی در سال ۱۳۸۸.

استان	شهرستان	تعداد نمونه های جمع آوری شده	تعداد نمونه آلوده	تعداد نمونه های جمع آوری شده به تفکیک میزبان				
				آلو	زرد آلو	هلو	آلبالو	بادام
فارس	جهرم	۱۹۲	۳۴	۴۳	۵۷	۵۲	۳	۳۷
				۹	۱۰	۵	۲	۸
				۱۶/۵	۱۶/۱	۱۳/۷	۷/۵	۲۱/۶
گلستان	مینو دشت	۴۹	۹	۱۷	۲	۳۰	۰	۰
				۲	۰	۷	۰	۰
				۱۳	۰	۲۰	۱	۰
تعداد کل	کلاله	۳۷	۳	۱۳	۳	۲۰	۱	۰
				۰	۰	۲	۱	۰
				۷۳	۶۲	۱۰۲	۴	۳۷
		۲۷۸	۴۶	۷۳	۱۰	۱۴	۳	۸
		۱۶/۵	۱۵	۱۶/۱	۱۳/۷	۷/۵	۲۱/۶	

ردیابی مجدد قرار گرفتند. تمام نمونه هائی که نتایج مشکوکی را نشان داده بودند به راحتی از طریق روش DIBA مورد ردیابی قرار گرفتند (شکل ۲).

برای تکرار ردیابی سرولوژیکی، تعداد ۲۵ نمونه از میزبان های مختلف که در آزمون TAS-ELISA جذب های ضعیفی را نشان داده بودند توسط DIBA مورد



شکل ۲- نتایج آزمون DIBA جهت ردیابی ویروس PNRSV از درختان میوه هسته دار. نمونه های ردیف ۱ (A تا J) مربوط به آلبالو می باشد. نمونه های ردیف ۲ (A تا D) مربوط به هلو و (F تا J) مربوط به زرد آلو. نمونه های ردیف ۳ (A تا F) مربوط به زرد آلو و (G تا J) مربوط به بادام جمع آوری شده از مناطق مختلف مورد بررسی می باشد. نمونه (E2, I3) شاهد منفی؛ عصاره زرد آلو و هلو فاقد آلودگی. نمونه (F3) شاهد مثبت؛ عصاره نمونه شاهد مثبت خریداری شده با کیت تجارتي شرکت (Agdia, U.S.A).

برنامه های قرنطینه ای استفاده نمود. با این وجود در این تحقیق دقت و حساسیت این روش در مقایسه با روش TAS-ELISA مورد بررسی قرار نگرفت که این امر نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه دارد. ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار از برخی درختان میوه هسته دار و نیز گل های رز از استان های

در گذشته نیز به این مطلب اشاره شده بود که روش DIBA در ردیابی این ویروس به مانند روش الایزا کاربرد دارد (Abdel-Salem et al., 2008). روش DIBA هم از لحاظ روش و زمان انجام آن و هم نیازمندی به آنتی بادی، ساده تر از روش TAS-ELISA مستقیم می باشد از اینرو می توان از این روش در ردیابی سریع ویروس در

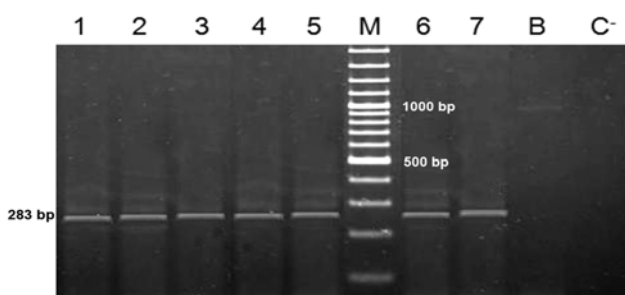
مینودشت و جهرم واقع در استان های گلستان و فارس مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی خصوصیات بیولوژیکی ویروس

تمام جدایه های مورد بررسی تا ۱۰ روز پس از مایه زنی بر روی گیاهان آزمون علائم مرتبط با آلودگی ویروس PNRSV را نشان دادند که با گزارش های قبلی مطابقت داشت (جدول ۵) (Fulton, 1957). از بین گیاهان آزمون مورد استفاده جهت بررسی خصوصیات بیولوژیکی جدایه های مختلف ویروس تنها گیاه خیار (*Cucumis sativus* L.) بود که قدرت تفکیک نژادهای ویروس را بر مبنای تفاوت در علائم داشت و سایر گیاهان برای تمام جدایه ها واکنش یکسان دادند (جدول ۵ و شکل ۴).

این مطلب در مطالعات گذشته نیز بیان شده بود (Howell & Mink, 1988; Abdel-Salem *et al.*, 2008). تفاوت در علائم در گیاه خیار در جدایه های متعلق به مناطق مختلف جغرافیایی مشاهده نشد و این تفاوت در جدایه های PNRSV جدا شده از میزبان های مختلف درختان میوه هسته دار مشاهده شد که می تواند بیانگر توان بیماریزایی متفاوت جدایه ها باشد و احتمال دارد میزبان در تنوع ژنتیکی نژادهای ویروس تاثیر گذار باشد (شکل ۴).

شمالی ایران در گذشته گزارش شده بود (Moini & Izadpanah, 2000; Rakhshandehroo *et al.*, 2006; Fallah & Nasrollanejad, 2009). با این وجود در تحقیقات قبلی در ایران ردیابی ویروس تنها با روش های سرولوژیکی انجام پذیرفته بود. نتایج پژوهش های گذشته نشان داده است که روش های ردیابی سرولوژیکی مانند الایزا در ردیابی و تشخیص ویروس PNRSV باندازه روش های مولکولی مانند RT-PCR کارآمد و دقیق نیستند (Spiegel & Scott, 1996; Sanchez-Navarroa *et al.*, 1998). دلیل آن نیز وجود نژادهای متعدد از ویروس مذکور می باشد که امکان دارد تنها با یک آنتی سرم خاص واکنش نشان ندهند (Stein *et al.*, 1987). از طرفی پراکندگی ویروس PNRSV در بافت های مختلف میزبان یکنواخت نیست و از اینرو در طول یک فصل رشدی و یا در بین فصل های مختلف رویش میزبان، ویروس از غلظت های متفاوتی در بافت های مختلف برخوردار است و امکان دارد در زمان نمونه برداری ردیابی در بافت نمونه برداری شده با غلظت بسیار پایین حضور داشته باشد و قابل ردیابی با روش های معمول سرولوژیکی نباشد (Spiegel *et al.*, 1996). در این بررسی علاوه بر ردیابی دقیق ویروس PNRSV با استفاده از آزمون های سرولوژیکی و مولکولی، میزان پراکندگی آن در شهرستان های کلاله،



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی قطعه DNA باندازه ۲۸۳ bp حاصل از تکثیر ژن پروتئین حرکتی نژاد PV-32 ویروس PNRSV با استفاده از آزمون RT-PCR. ژل آگاروز ۱/۵٪ در محلول اتیدیم بروماید رنگ آمیزی شده است. چاهک ۱: نمونه بادام آلوده از شهرستان جهرم. چاهک ۲: نمونه آلبالو آلوده از جهرم. ۳- نمونه زردآلو آلوده از جهرم. ۴: نمونه هلو آلوده از جهرم. ۵: نمونه آلو آلوده از شهرستان مینودشت. ۶- نمونه هلو آلوده از شهرستان کلاله. ۷- نمونه آلبالو آلوده از کلاله. B: نمونه پوچ: به جای نمونه در آن از آب استفاده شد. C: نمونه شاهد سالم. از cDNA هلوی سالم به عنوان نمونه استفاده شد. M: نردبان وزن مولکولی باندازه ۱ kbp (شرکت فرمنتاس آلمان).

استفاده از آزمون TAS-(ELISA) اثبات شده بود جهت ردیابی مولکولی توسط آزمون RT-PCR در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی جدایه ها جهت گروه

آزمون RT-PCR

تعداد ۲۰ نمونه از هسته داران مختلف دارای علائم آلودگی که آلودگی آنها نسبت به ویروس PNRSV با

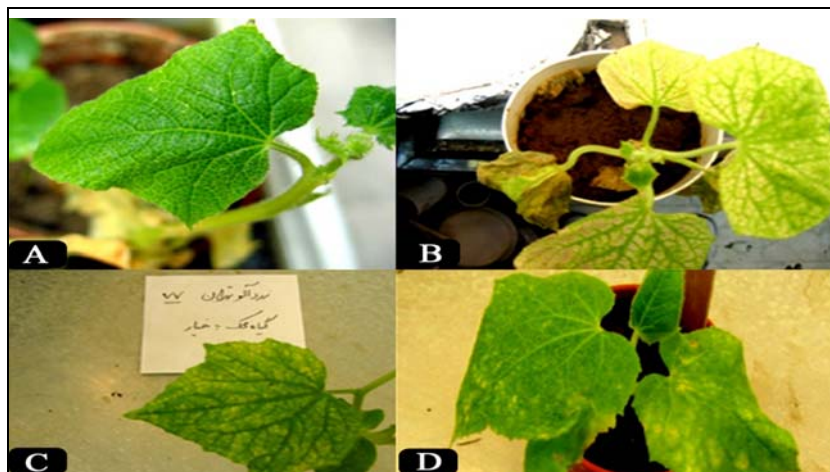
شهرستان های مورد بررسی واقع در مناطق شمالی و جنوبی کشور جدا شدند به گروه فیلوژنتیکی PV-32 تعلق دارند (شکل ۳). در گذشته محققین بر مبنای تفاوت در ترتیب نوکلئوتیدهای ژن پروتئین حرکتی ویروس که بر روی قطعه سوم از ژنوم ۳ بخشی ویروس قرار دارد به این مطلب اشاره نمودند که می توان نژادهای ویروس PNRSV را در سه گروه (PV-32, PV-96 و PE-05) قرار داد (Vaskova et al., 2002).

فیلوژنتیکی PV-96 توسط جفت آغازگرهای VP-90 و VP-91 و نیز گروه فیلوژنتیکی PV-32 با استفاده از آغازگرهای VP-90 و VP-92 مورد بررسی قرار گرفتند. هیچکدام از جدایه های مورد بررسی با آغازگرهای اول مربوط به گروه PV-96 واکنش نشان نداد. در حالی که تمامی جدایه ها با آغازگرهای مربوط به گروه فیلوژنتیکی PV-32 واکنش مثبت نشان دادند و بنابر این جدایه های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق که از

جدول ۵- واکنش گیاهان آزمون نسبت به مایه زنی مکانیکی یک هفته پس از مایه زنی با جدایه های مختلف ویروس.

گیاه محک	علامه	مایه زنی برگشتی
<i>Solanaceae</i>		
<i>Lycopersicon esculentum</i>	SM	+
<i>Capsicum annum</i>	NS	-
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Sumsun	Svc	+
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Cocker	VC	+
<i>Nicotiana glutinosa</i>	NS	-
<i>Cucurbitaceae</i>		
<i>Cucumis sativus</i>	Sch, Ich, Cl, MI	+
<i>Cucurbita maxima</i>	M	+
<i>Chenopodiaceae</i>		
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Mo	+
<i>Chenopodium album</i>	NS	-
<i>Leguminosae</i>		
<i>Vigna unguiculata</i>	NS	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	NS	+

SM: (Severe mosaic) موزاییک شدید. NS: (No Symptom) بدون علامه. Svc: (Systemic vein clearing) روشن شدن سیستمیک رگبرگ ها. VC: (Vein Clearing) روشن شدن رگبرگ ها. Sch: (Systemic chlorosis) کلروز سیستمیک. Ich: (Interveinal Chlorosis) کلروز بین رگبرگ. Cl: (Chlorosis) کلروز برگ. M: (Mosaic) موزاییک. MI: (Malformation) بدشکلی برگ. Mo: (Mottle) پیسک. +: ویروس توسط آزمون الیزا ردیابی شد. -: ویروس ردیابی نشد.



شکل ۴- واکنش گیاه خیار پس از مایه زنی مکانیکی با جدایه های متفاوت ویروس PNRSV. (A) علامه بدشکلی و پیسک برگ پس از مایه زنی با جدایه هلو مینودشت (B) کلروز سیستمیک برگ پس از مایه زنی با جدایه آلو جهرم (C) کلروز بین رگبرگ پس از مایه زنی با جدایه زردآلو تهران (D) پیسک و کلروز بین رگبرگ پس از مایه زنی با جدایه آلبالو کلاله.

میوه هسته دار در گروه PV-96 قرار دارند (Ulubas & Ertunc, 2004).

نتیجه گیری کلی

در مجموع این تحقیق نشان داد که ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار PNRSV در درختان

برخی از کشورها به تازگی بر مبنای توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن پروتئین حرکتی اقدام به شناسایی گروه های ژنتیکی نژادهای ویروس PNRSV در کشورهای خود نموده اند به عنوان نمونه در کشور ترکیه تمامی نژادهای ویروس مذکور در درختان

که بسیار نیز مهاجم می باشند سبب آلودگی درختان میوه هسته دار گردیده است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات و راهنمایی های دکتر Tufic Elbeaino محقق مرکز تحقیقات مدیترانه و خاورمیانه Bari, Inst ایتالیا که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

میوه هسته دار موجود در برخی باغات واقع در شهرستان های کلاله و مینودشت در شمال کشور و شهرستان جهرم در جنوب کشور پراکنده شده است و به دلیل حضور شرایط مناسب در باغات کشور، ویروس از درصد پراکندگی نسبتا بالایی برخوردار می باشد که این امر موجب افزایش میزان درصد آلودگی باغات از سالی به سال دیگر شده است. از طرفی به نظر می رسد نژادهای متفاوتی از این ویروس متعلق به گروه PV-32

REFERENCES

1. Abdel-Salam, A.M., Ibrahim, A.M., Abdelkader, H.S., Aly, A.M.E., & El-Saghir, S.M. (2008). Characterization of two isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) from peach and apricot in Egypt. *Arab Journal of Biotechnology*, 11, 107-124.
2. Aparicio, F., & Pallas, V. (2002). The molecular variability analysis of the RNA 3 of fifteen isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* sheds light on the minimal requirements for the synthesis of its subgenomic RNA. *Virus Genes*, 25, 75-84.
3. Bantari, E.E., & 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.
4. Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Watson, L., & Zucher, E.J. (eds.). (1996). Plant viruses online. Description and lists from the vide data base. <http://biology.anuedu/Groups/MES/Vide>.
5. Channuntapipat, C., Sedgley, M., & Collins, G. (2001). Sequences of the cDNA_s and genomic DNA_s encoding the S1, S7, S8 and Sf alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Theoretical Apply of Genetic*, 103, 1115-1122.
6. Cochran, L. C., & Hutchins, L. M. (1941). A severe ring-spot virus on peach. *Phytopathology*, 31, 860.
7. Gümüs, M., Paylan, C., Matic, S., Myrta, A., Sipahioglu, H.M & Erkan. S. (2007). Occurrence and distribution of stone fruit viruses and viroids in commercial plantings of prunes species in Western Anatolia. *Journal of Plant Pathology*, 89, 265-268.
8. Fallah, T., & Nasrollanejad, S. (2009). Detection and distribution of PNRSV on stone fruits in Golestan province. *Journal of Plant Production*, 16, 87-97.
9. Fulton, R.W. (1957). Comparative host ranges of certain mechanically transmitted viruses of prunus. *Phytopathology*, 47, 215-220.
10. Fulton, R.W. (1970). *Prunus necrotic ringspot virus*. No. 5 in: CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists. Kew, Surrey, England.
11. Howell, W.E. & Mink, G. I. (1988). Natural spread of cherry rugose mosaic disease and two *Prunus necrotic ringspot virus* biotypes in a Central Washington sweet cherry orchard. *Plant Disease*, 72, 636-640.
12. Matic, S., Sánchez-Navarro, J.A., Mandic, B., Myrta, A., & Pallás, V. (2008). Tracking three ilarviruses in stone fruits trees throughout the year by elisa and tissue-printing hybridization. *Journal of Plant Pathology*, 90, 137-141.
13. Moini, A., & Izadpanah, K. (2000). Serological identification of *Prunus necrotic ring spot virus* and PPV in Dasht-e-Moghan. In: *Proceedings of the 14th Plant Protection Congress of Iran*, 5-8 September, Isfahan, Iran, p. 338.
14. Moury, B., Cardin, L., Onesto, J.P., Candresse, T., & Poupet, A. (2000). Enzyme-linked immunosorbent assay testing of shoots grown in vitro and the use of immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction improve the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in rose. *Phytopathology*, 90, 522-528.
15. Moury, B., Cardin, L., Onesto, J.P., Candresse, T., & Poupet, A. (2001). Survey of *Prunus necrotic ringspot virus* in rose and its variability in rose and *Prunus* spp. *Phytopathology*, 91, 84-91.
16. Oliver, J.E., Freer, J., Andersen, R.L., Cox, K.D., Robinson, T. L., & Fuchs, M. (2009). Genetic diversity of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates within a cherry orchard in New York. *Plant Disease*, 93, 599-606.
17. Rakhshandehroo, F., Zamani Zadeh, H.R., Modarresi, A., & Hajmansoor, S. (2006). Occurrence of

- Prunus necrotic ringspot virus* and *Arabis mosaic virus* on rose in Iran. *Plant Disease*, 90, 975.
18. Salem, N., Mansour, A., AL-Musa, A., & AL-Nsour, A. (2003). Seasonal variation of *Prunus necrotic ringspot virus* concentration in almond, peach, and plum cultivars. *Phytopathologia Mediterranea*, 42, 155–160.
 19. Salem, N., Mansour, A., Al-Musa, A., Al-Nsour, A., & Hammond, R. (2004). Identification and partial characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* on stone fruit in Jourdan. *Journal of Plant Pathology*, 86, 85-90 .
 20. Sanchez-Navarro, J.A., Aparicio, F., Rowhanib, A., & Palla'sa, V. (1998). Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in herbaceous and *Prunus* hosts. *Plant Pathology*, 47, 780–786.
 21. Scott, S.W., Barnett, O.W., & Burrows, P.M. (1989). Incidence of *Prunus necrotic ringspot virus* in selected peach orchards of South Carolina. *Plant Disease*, 73, 913-916.
 22. Spiegel, S., Scott, S. W., Bowman-Vance, V., Tam, Y., Galiakparov, N. N, & Rosner, A. (1996). Improved detection of *Prunus necrotic ringspot virus* by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 681–685.
 23. Stein, A., Levy, S., & Loebenstein, G. (1987). Detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in several rosaceous hosts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Pathology*, 36, 1–4.
 24. Ulubas, C., & Ertunc, F. (2004). RT-PCR Detection and molecular characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates occurring in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 152, 498-502.
 25. Uyemoto, J.K., & Scott, S. (1992). Important diseases of *prunus* caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant Disease*, 76, 5-11.
 26. Vaskova, D., Pertzik, K., Spak, J., & Karesova R. (2000). Variability and molecular typing of the woody-tree infecting *Prunus necrotic ringspot virus*. *Archive of Virology*, 145, 699–709.