

## شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌های آلوده کننده گل محمدی در گلستان‌های استان‌های اصفهان، مرکزی و کرمان

Detection and distribution of the important viruses infecting Damask rose in floricultures of Isfahan, Markazi and Kerman provinces

فائزه السادات ابطحی<sup>۱</sup>، مسعود شمس‌بخش<sup>\*</sup><sup>۱</sup>، مجید مهدیه<sup>۲</sup>، ناصر صفائی<sup>۱</sup>

- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیاران، دانشگاه تربیت مدرس  
- استادیار، دانشگاه اراک

Abtahi FS<sup>1</sup>, Shams-Bakhsh M<sup>\*1</sup>, Mahdiyeh M<sup>2</sup>, Safaei N<sup>1</sup>

1. PhD Student, Associate Professors, Tarbiat Modares University  
2. Assistant professor, Arak University

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۴)

### چکیده

ویروس لکه حلقی بافت مرده هسته‌داران (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) ویروس موزائیک سیب (*Apple mosaic virus*, ApMV) و ویروس موزائیک آراییس (*Arabis mosaic virus*, ArMV) از مهمترین ویروس‌های گل رز در دنیا به شمار می‌آیند. هدف از انجام این پژوهش ریاضی و تعیین پراکنش این ویروس‌ها در گلستان‌های گل محمدی واقع در استان‌های اصفهان، کرمان و مرکزی بود. به این منظور، ۷۴۹ نمونه برگی طی دو سال زراعی ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ و بصورت تصادفی از این گلستان‌ها جمع‌آوری شدند. آلوهگی این نمونه‌ها به PNRSV، ApMV و ArMV با استفاده از آزمون سرولوبیکی به روش الیزای مستقیم-Double Antibody Sandwich (DAS-ELISA) و با استفاده از پادتنهای اختصاصی برای هر کدام از سه ویروس، بررسی شد. نتایج نشان داد که در سال زراعی ۱۳۹۱، ۴/۴۱ درصد از نمونه‌ها به ArMV و ۶/۳ درصد از نمونه‌ها به ApMV و ۵/۳۲ درصد از نمونه‌ها به PNRSV و در سال زراعی ۱۳۹۲، ۲/۲۱ درصد از نمونه‌ها به ArMV و ۴/۱۶ درصد از نمونه‌ها به PNRSV نسبت به دو ویروس دیگر پیشرفت کننده پروتئین پوششی PNRSV برای بررسی بیشتر جدایه‌های این ویروس انجام، درخت فیلوبوتیکی ترسیم و ماتریس درصد تشابه و ردیابی و قایع نوترکیبی انجام شدند. بر اساس درخت فیلوبوتیکی، جدایه‌های ایرانی در گروه PV96 قرار گرفتند. این اولین گزارش از بررسی تنوع ژنتیکی PNRSV در ایران و اولین گزارش از وقوع آلوهگی گلستان‌های گل محمدی استان‌های مرکزی و اصفهان به ApMV و PNRSV می‌باشد.

### واژه‌های کلیدی

پروتئین پوششی  
تعیین ترادف  
ApMV  
ArMV  
PNRSV

## مقدمه

گل محمدی (*Rosa damascene* Miller) از مهمترین گیاهان معطر می‌باشد که از روغن و اسانس آن برای تولید دارو، عطر، اسانس و برخی دیگر از فرآورده‌های معطر استفاده می‌شود (Demirozer et al. 2009). این گیاه در بسیاری از مناطق دنیا از جمله ترکیه، بلغارستان، مراکش، ایران، مصر، فرانسه، چین و هندوستان کشت می‌شود (Weiss 1996). استان‌های اصفهان و کرمان از مهمترین استان‌های تولید کننده گل محمدی به لحاظ وسعت سطح زیر کشت هستند (Nikbakht and Kafi 2010). تنش‌های مختلف از جمله بیماری‌های ویروسی رز در کاهش کیفیت و کمیت محصول اهمیت ویژه‌ای دارند و چندین ویروس مختلف می‌توانند گونه‌های جنس *Rosa* را آلووده کنند که از این میان سه ویروس موزائیک سیب (*Apple mosaic virus*, ApMV) ویروس موزائیک آرابیس (*Arabis mosaic virus*, ArMV) و لکه (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) از مهمترین و خسارت‌زدترین این ویروس‌ها به شمار می‌آیند (Sertkaya 2009).

ویروس موزائیک آرابیس (ArMV) متعلق به جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* با دامنه میزانی وسیع می‌باشد. پیکره ویروس ایزومتریک بوده و ژنوم آن از دو قطعه RNA تک لا با قطبیت مثبت تشکیل شده است (Loudes et al. 1995). این *Xiphinema diversicaudatum* و *americanum* و نیز بوسیله بذر، دانه گرده و پیوند منتقل می‌شود. ویروس موزائیک آرابیس در ایران از رزکاری‌های مناطق مختلف تهران (Rakhshandehroo et al. 2006) و گوجه فرنگی و انگور Rakhshandehroo et al. 2005; Rakhshandehroo et al. 2006; (Massumi et al. 2009; Doustsedigh et al. 2012) گزارش شده است.

هر دو ویروس PNRSV و ApMV متعلق به جنس *Ilarvirus* و خانواده *Bromoviridae* می‌باشد. این ویروس‌ها ایزومتریک بوده و ژنوم آنها از سه قطعه RNA تک لا با قطبیت مثبت تشکیل شده است (Oliver et al. 2009). انتقال ApMV با پیوند و نیز اندام‌های تکثیری گیاه انجام می‌شود. این ویروس دامنه متفاوتی از

عالیم مانند پیسک<sup>۱</sup>، موزائیک<sup>۲</sup>، سبزردی<sup>۳</sup> و لکه حلقوی بافت مرده<sup>۴</sup> را در گیاهان میزان ایجاد می‌کند. در ایران نخستین بار ApMV از ارقام سیب گلاب شفیع آبادی و کهنس در مشهد، کرج و شهریار گزارش شد (Manouchehri 1968). سپس این ویروس (*Tomato ringspot virus*, ToRSV) از ارقام سیب فوجی و گلدن دلیشندر مزرعه (Mizani and Hajnajari 2013) ویروس PNRSV نیز از طریق تماس مکانیکی، اندام‌های تکثیری آلووده، پیوند و در بسیاری از گونه‌های هسته‌دارن با دانه گرده و بذر منتقل می‌شود. همچنین انتقال این ویروس توسط کنه و نماتند نیز گزارش شده است (Moury et al. 2000). عالیم آلوودگی به PNRSV در گیاه رز شامل خطوط و حلقه‌های سبزردی و نقش برگ بلوطی<sup>۵</sup> می‌باشد. در ایران نخستین بار PNRSV از استان اردبیل و دشت مغان گزارش شد (Moini and Izadpanah 2000). پس از آن این ویروس از رزهای زیستی در استان تهران (Rakhshandehroo et al. 2006)، باغهای هسته داران استان گلستان (Fallah and Nasrollanejad 2009) و گیاه پیچک صحرایی استان‌های تهران، البرز و مازندران (Sabaghian et al. 2013) گزارش شده است. همچنین پراکنش این ویروس در باغهای هسته داران استان‌های فارس و گلستان بررسی شده است و آلوودگی نمونه‌ها با استفاده از روش RT-PCR تایید شد. آلوودگی نمونه‌ها با استفاده از روش PNRSV بر اساس (Rahmanian et al. 2013). نژادهای PE5-III و PV96-II و PV32-I قرار می‌گیرند (Guo et al. 1995; Hammond and Crosslin 1995; Sanchez-Navarro and Pallas 1997). تجزیه جدایه‌ها نشان داده که بین دامنه میزانی، منشا جغرافیایی و توالی نوکلئوتیدی یا آسید آمینه ارتباط خاصی وجود ندارد. تجزیه توالی ژن پروتئین پوششی نشان داده که این

<sup>1</sup> Mottling<sup>2</sup> Mosaic<sup>3</sup> Chlorosis<sup>4</sup> Necrotic ring spot<sup>5</sup> Oak leaf pattern

عصاره هر نمونه به طور تصادفی در دو چاهک به عنوان تکرار بارگذاری شد. میزان تغییر رنگ ایجاد شده در ماده زمینه ۴-پارا نیتروفنیل فسفات (شرکت مرک، آلمان) در طول موج ۴۰۵ نانومتر به وسیله دستگاه الیزا خوان (ELISA –reader ELISA ساخت آمریکا) هر پانزده دقیقه تا یک ساعت استفاده از فرمول  $R = x + 3 SD$  که در آن  $x$  میانگین جذب نمونه منفی و SD انحراف معيار چاهک‌ها و R سطح آستانه آلوودگی می‌باشد، محاسبات انجام شد.

### استخراج RNA کل

با توجه به نتایج بدست آمده از الیزا و پراکنش بیشتر PNRSV نسبت به دو ویروس دیگر، از گیاهان آلووده به این ویروس RNA کل به روش توصیف شده (Chang et al. 1993) با اندکی تغییرات انجام شد. به این منظور یک گرم بافت برگ تازه درون نایلون‌های مخصوص عصاره گیری قرار داده شد و به هر نمونه مقدار سه میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل تریس-HCl ۱۰۰ میلی‌مolar pH = ۸، کلرید سدیم ۱/۴ مolar، ۲۰ میلی‌مolar EDTA، دو درصد CTAB، سولفیت سدیم یک درصد و دو درصد PVP-40) اضافه و بصورت یکنواخت عصاره گیری شد. یک میلی‌لیتر از عصاره حاصل به میکروتیوب منتقل و به مدت پنج دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به میزان ۷۰۰ میکرولیتر مخلوط آماده کلروفرم و ایزوآمیل الكل (به نسبت ۲۴ به یک) اضافه و مخلوط شد. در مرحله بعد، به مدت ۱۵ دقیقه در  $g \times 14000$  در دمای چهار درجه سانتی‌گراد میانگریز شد. فاز رویی به میکروتیوب جدیدی منتقل و یکبار دیگر به میزان هم حجم فاز رویی از مخلوط آماده کلروفرم و ایزوآمیل الكل اضافه و مخلوط شد. میانگریزش به مدت ۱۵ دقیقه در  $g \times 14000$  در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس فاز رویی به میکروتیوب جدیدی منتقل شده و به میزان برابر کلرید لیتیم چهار میلی‌مolar به مخلوط اضافه و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. عمل میانگریز به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام شد. رسوب بدست آمده در ۲۰۰ میکرولیتر بافری متشکل از تریس HCl ۱۰ میلی‌مolar pH = ۸ یک میلی‌مolar EDTA و دو درصد

(Aparicio et al. 1999; Vaškova et al. 2000; Moury et al. 2001; Glasa et al. 2002; Hammond 2003; Salem et al. 2004) پروتئین فوق العاده حفاظت شده است (Aparicio et al. 1999; Vaškova et al. 2000; Moury et al. 2001; Glasa et al. 2002; Hammond 2003; Salem et al. 2004). ردیابی و تعیین پراکنش عوامل ویروسی در میزان‌های مختلف پیش نیاز تدوین استراتژی مناسب برای کنترل خسارت ناشی از این عوامل است. همچنین با توجه به گزارش PNRSV از نقاط مختلف ایران، Rakhasandehroo et al. 2006; Rahmanian et al. 2013; Sabaghian et al. 2013) کنترل این ویروس ضروری می‌باشد. یکی از مهمترین راه‌های کنترل ویروس‌های گیاهی استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. پیش از آن که مقاومت نسبی ارقام و یا گیاه تاریخت برای کنترل ویروس بررسی شود، بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی ضروری به نظر می‌رسد. از این‌رو هدف پژوهش حاضر بررسی پراکنش سه ویروس PNRSV و ArMV و ApMV و تعیین تراالف قسمت‌هایی از توالی ژنوم جدایه‌های ویروس غالب می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### روش نمونه برداری

طی فصول بهار تا پاییز سال‌های ۹۱ و ۹۲ بازدیدهایی از گلستان‌های گل محمدی شهرستان‌های قم‌سر، نیاسر و مشهد، اردبیل از استان اصفهان، نراق و جاسب از استان مرکزی و شهرستان بردسیر از استان کرمان انجام گرفت. در مجموع ۷۴۹ نمونه به صورت تصادفی و با حرکت در قطب گلستان‌ها جمع آوری شدند. تعداد ۱۱۵ نمونه در سال ۱۳۹۱ و ۱۰۳ نمونه در سال ۱۳۹۲ از استان مرکزی، تعداد ۱۴۴ نمونه در سال ۱۳۹۱ و ۲۱۲ نمونه در سال ۱۳۹۲ از استان اصفهان و تعداد ۵۸ نمونه در سال ۱۳۹۱ و ۶۷ نمونه در سال ۱۳۹۲ از استان کرمان جمع آوری شد (جدول‌های ۱ و ۲).

#### آزمون سرولوزیکی

بررسی آلوودگی نمونه‌های جمع آوری شده به ویروس‌های موزائیک سیب، موزائیک آراییس و لکه حلقوی بافت مرده هسته داران با استفاده از پاتن‌های اختصاصی تهیه شده از شرکت DSMZ (برانشوایک- آلمان) و به روش ساندویچ دو طرفه<sup>۱</sup> الیزا (DAS-ELISA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

<sup>۱</sup> Double antibody sandwich

جدول ۱- نتایج آزمون الیزا برای تعیین میزان پراکندگی ویروس‌های ArMV، PNRSV و ApMV در گلستان‌های استان‌های اصفهان، مرکزی و کرمان در سال ۱۳۹۱.

استان	شهر	مورد بررسی	ApMV		ArMV		PNRSV		تعداد نمونه
			درصد آلوودگی	تعداد نمونه آلووده	درصد آلوودگی	تعداد نمونه آلووده	درصد آلوودگی	تعداد نمونه آلووده	
قمص	قمص	%۶	۳	%۱۰	۵	%۱۲	۶	۵۰	
اصفهان	نیاسر	%۱/۹۲	۱	%۱/۹۲	۱	%۷/۷	۴	۵۲	
مشهد اردبیل	مشهد اردبیل	.	۰	%۷/۱۴	۳	%۷/۱۴	۳	۴۲	
مرکزی	نراق	%۱/۸۱	۱	%۵/۴۵	۳	%۱۴	۷	۵۵	
جاسب	جاسب	%۳/۳۳	۲	%۳/۳۳	۲	۰	۰	۶۰	
کرمان	بردسیر	.	۰	۰	۰	۰	۰	۵۸	
کل	کل	%۲/۲۰	۷	%۴/۴۱	۱۴	%۶/۳	۲۰	۳۱۷	

جدول ۲- نتایج آزمون الیزا برای تعیین میزان پراکندگی ویروس‌های ArMV، PNRSV و ApMV در گلستان‌های استان‌های اصفهان، مرکزی و کرمان در سال ۱۳۹۲.

استان	شهر	بررسی	ApMV		ArMV		PNRSV		تعداد نمونه مورد
			درصد آلوودگی	تعداد نمونه آلووده	درصد آلوودگی	تعداد نمونه آلووده	درصد آلوودگی	تعداد نمونه آلووده	
قمص	قمص	%۱۱/۲۶	۸	%۵/۶۳	۴	%۸/۴	۶	۷۱	
اصفهان	نیاسر	%۴/۴۷	۳	%۲/۹۸	۲	%۴/۴۷	۳	۶۷	
مشهد اردبیل	مشهد اردبیل	%۵/۴۰	۴	۰	۰	%۵/۴	۴	۷۴	
مرکزی	نراق	%۲/۶۳	۵	%۳/۹۴	۳	%۶/۵۷	۵	۷۶	
جاسب	جاسب	%۱/۲۹	۳	%۱/۲۹	۱	۰	۰	۷۷	
کرمان	بردسیر	.	۰	۰	۰	۰	۰	۶۷	
کل	کل	%۵/۳۲	۲۲	%۲/۳۱	۱۰	%۴/۱۶	۱۸	۴۲۲	

برای ردیابی PNRSV، از آغازگرهای رفت Ilar1 با توالی ۳'-TTCTAGCAGGTCTTCATCGA (Candresse et al. ) ۵'-CCACCGAGAGGTTGGCA-۳' ۱۹۹۷ برای تکثیر قسمتی از منطقه ژنی مسئول بیان پروتئین پوششی ویروس به اندازه ۲۰۶ نوکلئوتید در فاصله نوکلئوتیدهای ۱۵۶۸ تا ۱۷۷۲ بر اساس ژنوم جدایه PE5 (Hammond and Crosslin 1995) و برای تکثیر کامل ژن پروتئین پوششی PNRSV به طول ۶۷۵ نوکلئوتید از آغازگر رفت MG1 با توالی ۵'-ACTCTAGATCTCAAGCAGGTC-۳' ۵'-ATGGTTGCCGAATTGCAAT-۳' MG2 با توالی ۳' (Glasa et al. 2002) استفاده شد.

SDS به حالت سوسپانسیون در آورده شده و پس از آن RNA کل با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر کلرید سدیم پنج میلیمolar و ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد رسوب داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای -۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس میانگریزش به مدت ۱۵ دقیقه در ۸×۱۴۰۰۰ و در دمای چهار درجه سانتی- گراد انجام شد. پس از آن رسوب بدست آمده با اتانول ۷۰ درصد شستشو شد. در نهایت رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (شرکت مرک، آلمان) به حالت سوسپانسیون در آمد و تا زمان استفاده در دمای -۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. واکنش نسخه برداری معکوس

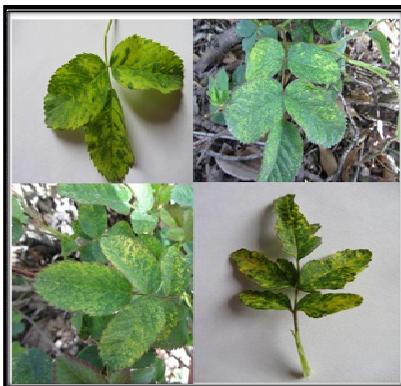
واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. ابتدا ۱۵ میکروگرم RNA به همراه ۲۰ پیکومول آغازگر برگشت به لوله‌های PCR انتقال یافته و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه در ترموسایکلر تیمار شدند. سپس مخلوطی از دو میکرولیتر بافر واکنش با پنج برابر غلظت، یک میلی‌مولار دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها (dNTPs)، ۲۰ واحد آنزیم بازدارنده ریبونوکلئاز (Ribonuclease inhibitor)، ۵۰ واحد آنزیم M-MuLV RT و آب تیمار شده با DEPC به هر تیوب اضافه شد، به طوری که حجم نهایی واکنش ۱۰ میکرولیتر شد. واکنش ساخت cDNA در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، سپس در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و در آخر ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر (پندورف، آلمان) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، همسانه‌سازی و تعیین توالی DNA واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر از محصول واکنش نسخه‌برداری معکوس به عنوان الگو، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، دو میلی‌مولار کلرید مینزیم ( $MgCl_2$ )، دو میکرولیتر بافر واکنش با غلظت ده برابر (شامل  $KCl$  و  $Tris-HCl$  (اسیدیته  $8/4$ ،  $1/5$  میلی‌مولار از dNTPs و  $1/25$  PE5-HCl) و واحد آنزیم تک پلیمراز (*Taq Polymerase*) (پرومگا، آمریکا) و در دستگاه ترموسایکلر (پندورف، آلمان) انجام شد. چرخه‌های دمایی مورد استفاده در این مرحله شامل یک چرخه واسرت-سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، ۳۳ چرخه شامل واسرت-سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۰ ثانیه و سرانجام یک چرخه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز یک درصد تفکیک شد و برای تعیین توالی ابتدا محصول به دست آمده از روی ژل با استفاده از کیت Wizard® SV Gel and PCR Clean up system (پرومگا، آمریکا) جدا و قطعات استخراج شده برای الحاق به حامل پلاسمیدی pGEM-Teasy طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام و پس از آن با

جدول -۳- مشخصات جدایه‌های PNSRV منتشر شده در GenBank که در

این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

جدایه	کشور	میزان	شماره دسترسی بانک زن	گروه فیلوزنیکی
6-54	چک	آلر	AF170160	PV96-II
30-4	آمریکا	هلو	U57046	PV32-I
AlmCl.car1	شیلی	بادام	EF565247	PV96-II
AlmIt-cor1	ایتالیا	بادام	AJ133204	PV96-II
AlmIt-pre1	ایتالیا	بادام	AJ133202	PV96-II
AprIt-cafl	ایتالیا	زرد آلر	AJ133199	PV96-II
AprIt-try1	ایتالیا	زرد آلر	AJ133201	PV32-I
CH30	آمریکا	آلبالو	AF034994	PE5-III
CH38	آمریکا	آلبالو	AF034991	PV32-I
CH57	آمریکا	آلبالو	AF034993	PV32-I
CH9	آمریکا	آلبالو	AF034992	PV32-I
Ch71	آمریکا	آلبالو	AF03445	PE5-III
Chr1	کانادا	آلبالو	JQ005030	PV96-II
ChrIt.bla1	ایتالیا	آلبالو	AJ133210	PV96-II
ChrIt-lam1	ایتالیا	آلبالو	AJ133203	PV96-II
ChrIt-mrs1	ایتالیا	آلبالو	AJ133209	PV96-II
E260	هنگ	کل رز	AJ619958	PV32-I
I-9	لهستان	زرد آلر	DQ983493	PV96-II
Nahnuta	چک	آلر	AF170169	PV96-II
NctSp-mur1	اسپانیا	شلیل	AJ133208	PV96-II
Pch1	کانادا	هلو	JQ005047	PV96-II
PchIt-may1	ایتالیا	هلو	AJ133205	PV96-II
PchIt-mry1	ایتالیا	هلو	AJ133207	PE5-III
PchTu-unk1	تونس	هلو	AJ133206	PV32-I
PE-5	آمریکا	هلو	L38823	PE5-III
PlmAl-unk1	آلبانی	آلر	AJ133211	PV32-I
PlmIt-clf1	ایتالیا	آلر	AJ133212	PV96-II
PNRSV-AL1	استرالیا	بادام	EU368735	PV96-II
PNRSV-Ch41	چین	آلبالو	FJ610341	PV96-II
PNRSV-Mk	مجارستان	گیلاس	EU368738	PV96-II
PNRSV-RP84	لهستان	کل رز	DQ003584	PV32-I
PS 14-22	چک	آلبالو	AF170159	PV32-I
PS12-16	چک	آلبالو	AF170158	PV32-I
PS7-12	چک	آلبالو	AF170162	PV96-II
PV-32	امریکا	سیب	Y07568	PV32-I
PV-96	آلمان	محلب	S78312	PV96-II
RM-	هنگ	کل رز	AY948440	PV32-I
2.India.Rose	ایران-مشهد اردہال	گل محمدی	KJ599816	-
RosIr1-Mas1	ایران-نیاسر	گل محمدی	KJ599817	-
RosIr2-Nis1	ایران-قصر	گل محمدی	KJ599818	-
RosIr3-Ghs1	ایران-زراق	گل محمدی	KJ599819	-
RosIr4-Nag1	ایران-مشهد اردہال	گل محمدی	AJ969095	PV32-I
RSIn-95	هنگ	کل رز	EU869295	PV32-I
S-Ch95	چین	آلبالو	AF170163	PV96-II
UH1	چک	آلر	AF170171	PV96-II
Valticka	چک	هلو	AY684271	PV32-I
Yunnan	چین	کل رز		



شکل ۱- علایم موazئیک و بد شکلی ایجاد شده در برگ‌های بوته گل محمدی در اثر ابتلا به ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته داران.

شامل موazئیک، کلروز بین رگبرگی و بد شکلی مشاهده شد (شکل ۱).

نتایج الیزاهای نشان داد که در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ گلستان‌های گل محمدی در قمصر نسبت به سایر مناطق مطالعه شده دارای آلودگی بیشتری به هر سه ویروس ArMV، ApMV و PNRSV بودند. رویشگاه‌های گل محمدی در شهرستان قمصر از قدیمی‌ترین و سنتی‌ترین مناطق پرورش این محصول در کشور محسوب می‌شوند، به علاوه این مراکز در مجاورت باغ‌های میوه هسته‌داران و دانه‌داران واقع شده‌اند (Nikbakht and Kafi 2010) از اینرو شیوع بالاتر ویروس‌های مورد مطالعه نسبت به سایر مناطق استان اصفهان و استان‌های مرکزی و کرمان مورد انتظار بوده و به نظر می‌رسد ویروس از این مناطق به سایر گلستان‌ها انتقال یافته باشد. بی‌شک مطالعات بیشتر برای تعیین منشا آلودگی اولیه ضروری است.

نتایج نشان داد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه بردسیر کرمان به ویروس‌های مورد مطالعه آلوده نبودند، با این وجود بررسی بیشتر و دقیق‌تر منطقه برای آلودگی به سایر ویروس‌ها ضروری می‌باشد. در صورت اثبات عدم آلودگی به ویروس، اعمال قرنطینه استانی برای جلوگیری از ورود ویروس‌ها پیشنهاد می‌شود. بردسیر کرمان یکی از قطب‌های تجاری پرورش گل محمدی در کشور به شمار می‌رود (Nikbakht and Kafi 2010) و پرورش دهنده‌گان گل در این منطقه از روش‌های ازدیاد درون شیشه‌ای برای احداث گلستان‌های جدید استفاده می‌کنند که می‌تواند دلیلی برای عدم وقوع آلودگی ویروس در این منطقه باشد.

استفاده از شوک الکتریکی (اپندورف، آلمان) به داخل سلول‌های مستعد *Escherichia coli* 1022 ترانسفورم شدن. برای استخراج Wizard® Plus SV Miniprep DNA پلاسمید از کیت Purification system (پرومگا، آمریکا) استفاده شد. پس از آن به منظور هضم حامل‌های نوترکیب برای بررسی قطعات الحاقی به حامل چهار میکرولیتر از حامل نوترکیب با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *NotI* به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم شد و در نهایت نمونه‌ها روی ژل آگارز یک درصد بررسی شدند. تعدادی از همسانه‌های حاوی قطعات مورد انتظار انتخاب و برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت آلمانی MWG Biotech ارسال شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تعیین توالی

توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده به وسیله نرم‌افزار Vector NTI advance 11.5 (اینویترون، آمریکا) همگذاری<sup>۱</sup> شدند. سپس توالی جدایه‌های تعیین شده در این پژوهش با توالی‌های ثبت شده در GenBank با استفاده از CLASTAL W موجود در نرم‌افزار MEGA6 (Tamura et al. 2013) هم‌دیفسازی<sup>۲</sup> شدند. سپس درصد تشابه توالی‌ها توسط نرم‌افزار BioEdit (Hall 1999) محاسبه شد. برای بررسی روابط فیلوزنیکی و تعیین فشار انتخابی موجود بر روی پروتئین پوششی PNSRV از نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد. وقایع نوترکیبی احتمالی از طریق نرم‌افزار (Martin et al. 2010) RDP v.4 بررسی شدند.

## نتایج و بحث

نتایج آزمون الیزای انجام شده بر روی ۳۱۷ نمونه جمع‌آوری شده از استان‌های مرکزی، اصفهان و کرمان در سال زراعی ۱۳۹۱ نشان داد که ۱۴ نمونه (۴/۴۱ درصد) به ArMV، هفت نمونه (۲/۲۱ درصد) به ApMV و ۲۰ نمونه (۶/۳۲ درصد) به PNRSV آلوده بودند (جدول ۱). در سال زراعی ۱۳۹۲ از ۴۳۲ نمونه بررسی شده، ده نمونه (۲/۳۱ درصد) به ArMV، ۲۳ نمونه (۵/۳۲ درصد) به ApMV و ۱۸ نمونه (۴/۱۶ درصد) به PNRSV آلوده بودند (جدول ۲). در گیاهان گل محمدی آلودگی به PNRSV علایمی

<sup>1</sup> Assembly

<sup>2</sup> Alignment

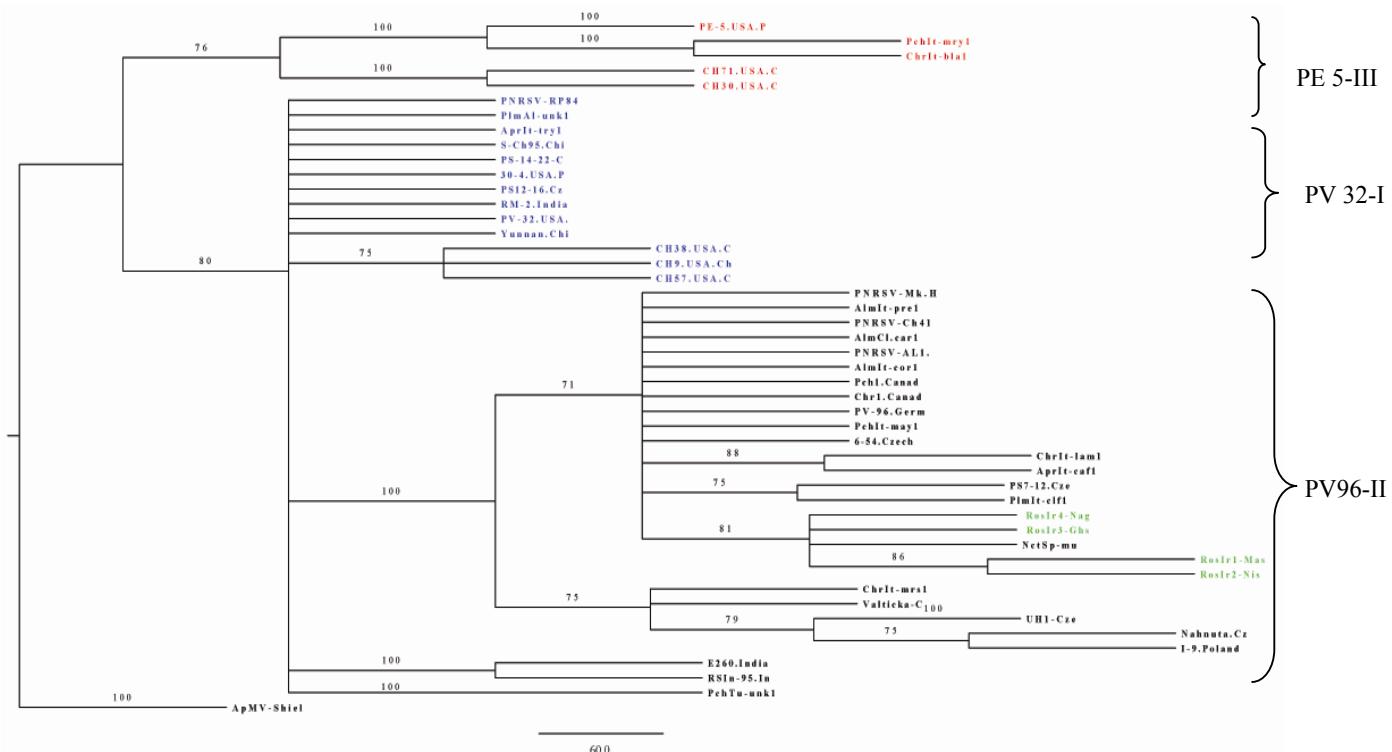
جدول ۴- ماتریس درصد برابری دوبه دو بین نوکلئوتیدهای (پایین شکل) و آمینواسیدهای (بالای شکل) ژن پروتئین پوششی جدایهای ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران ایران و نماینده سه تیپ PV96، PV32، PE5 و

شد (شکل ۲). توالی چهار جدایه از PNRSV‌های جمع‌آوری شده در این پژوهش، پس از تعیین توالی در پایگاه اطلاعاتی GenBank با رس شماره‌های KJ599816 تا KJ599819 ثبت شد. تجزیه و تحلیل توالی‌های ویروسی و ترسیم ماتریس برابری چهار جدایه تعیین شده در این پژوهش در سطح اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه به ترتیب  $99.4\%$ – $100$  و  $98.6\%$ – $100$  درصد تشابه داشتند. تشابه در سطح نوکلئوتید در منطقه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی در جدایه‌های ایران با سه تیپ گروه Aparicio et al. (1999) معرفی شده توسط (Phylogroup) شامل PV32 (رس شمار Y07568 ، Sanchez-Navarro and Pallas 1997)، PV96 (رس شمار S78312 ، Guo et al. 1995)، PE5 (رس شمار L38823 ، Hammond and Crosslin 1995) و می‌باشد به ترتیب  $95.2\%$ ،  $98.1\%$  و  $88.8\%$  درصد و در سطح اسید‌آمینه به ترتیب  $94.6\%$ ،  $98.6\%$  و  $89.7\%$  درصد بود (جدول ۴). بنابراین بیشترین شباهت در هر دو سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با گروه PV96 مشاهده شد.

تشابه توالی در سطح نوکلئوتید بین جدایه‌های ایران و جدایه‌های PV96 و PV32 بیش از ۹۰ درصد بود. ارتباط بین توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایران و سه مدل تیپ گروه نشان داد که هر چهار جدایه ایرانی در گروه PV96 طبقه-بنده، شدنی.

از اینرو گلستانهای بررسی می‌تواند خزانه مناسبی در تکثیر و تولید قلمه گل محمدی باشد. مطالعات قبلی در مورد درصد آلودگی و تعیین شایع ترین ویروس‌های رزکاری‌های نشان داد که ArMV به ترتیب با ۲۳/۱ درصد و ۱۸/۸ درصد آلودگی با PNRSV (Rakhshandehroo et al. 2006) اهمیت ترین ویروس‌های رز در استان تهران (Doustsedigh et al. 2012) و در استان‌های آذربایجان غربی و شرقی به ArMV ترتیب ۳۰/۳ درصد و ۳۰/۲ درصد گزارش شده است، در حالی که در پژوهش حاضر بیشترین درصد آلودگی به این ویروس‌ها کمتر از هفت درصد بود. روش نمونه‌برداری (جمع آوری نمونه‌های دارای عالیم یا نمونه‌برداری تصادفی)، تنوع گیاهان مورد مطالعه، حضور و جمعیت حشرات گرده افshan با توجه به شرایط آب و هوایی و تراکم بالای باغ‌های دانه‌داران وجود تاکستانهای متعدد را می‌توان از علل تفاوت در نتایج پژوهش‌های یاد شده با مطالعه حاضر تلقی کرد. یافته‌های این پژوهش با نتایج Sertkaya (2009) که حضور سه ویروس موزائیک سیب، ویروس موزائیک آراییس و ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار را در طی دو سال بررسی کرد مطابقت دارد.

نتایج ردیابی مولکولی و تعیین توالی پروتئین پوششی PNRSV قطعه ۲۰۶ جفت بازی مورد انتظار با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Ilar1 و Ilar2) Ilarviruses و نیز قطعه ۶۷۵ جفت بازی برای تکثیر پروتئین پوششی PNRSV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی MG1 و MG2 در واکشن RT-PCR تکثیر



شکل ۳- درخت فیلوزنیکی در طول نوکلئوتیدهای ژن رمز کننده پروتئین پوششی جدایه‌های موجود در GenBank و جدایه‌های ایران، با روش Minimum evolution بر اساس مدل Tajima-Nei (Tajima and Nei 1984) و درصد حمایتی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار. درخت با ApMV-Shiel (رس شمار U15608) ریشه دهنده است. گروه بندی جدایه‌ها براساس رنگ نشان داده شده است: قرمز برای PE5-III، آبی برای PV32-I و مشکی برای PV96-II. جدایه‌های ایران داخل کادر و با رنگ سبز از سایر جدایه‌ها متمایز شده اند.

MEGA6 نشان داد که جدایه‌های ایران در گروه PV96 قرار می‌گیرند (شکل ۳). نام‌گذاری این گروه‌ها براساس اولین مطالعات انجام گرفته روی توالی نوکلئوتیدی PNRSV در دنیا می‌باشد Aparicio et al. 1999, Vaskova et al. 2000, Hammond (2003). این مطالعات نشان دادند که پاتوتیپ‌های شناخته شده PNRSV به طور کلی در سه گروه تقسیم‌بندی می‌شوند؛ گروه I (PV32) شامل جدایه‌هایی می‌باشد که سبب بروز علایم شدیدی می‌شوند در حالی که جدایه‌های گروه II (PV96) علایم ملایمی در میزان‌های خود ایجاد می‌کنند. جدایه‌های گروه III (PE5) سبب بروز هر دو نوع علایم شدید و ملایم می‌شوند. یک ساختار سنjac سری (Stem-Loop) که شامل یک تکرار شش نوکلئوتیدی (دو اسید آمینه) در طول توالی ژن پروتئین پوششی در موقعیت نوکلئوتید ۱۲۲۶ (بر اساس ژنوم جدایه PV32)

ردیابی وقایع نوترکیبی با استفاده از بسته نرم‌افزاری ردیابی وقایع نوترکیبی 4 (Martin et al. 2010) RDP v.4 و با روش‌های SiScan, Chimaera, MaxChi, BootScan, GENECONV 3Seq با رعایت پارامترهای پیش فرض موجود در نرم‌افزار، در مقایسه ناحیه مورد نظر پروتئین پوششی هم در مقایسه جدایه‌های PNRSV با هم هیچ گونه شواهد اولیه نوترکیبی را نشان نداد؛ این نتایج نشان داد که نوترکیبی در ناحیه بررسی شده پروتئین پوششی این ویروس رخ نداده است.

درخت فیلوزنیکی ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران درخت فیلوزنیکی ترسیم شده براساس ناحیه پروتئین پوششی، با روش Rzhetsky and Nei 1992 Minimum evaluation (Tajima – Nei 1984) در جدایه‌های حاصل از اساس مدل Tajima-Nei (Tajima and Nei 1984) در جدایه‌های ثبت شده در GenBank با نرم افزار تعیین توالی و جدایه‌های ثبت شده در GenBank با شماره ۱/بهار ۱۳۹۴

## منابع

- Aparicio F, Myrta A, Di Terlizzi B, Palls V (1999) Molecular variability among isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* from different *Prunus* spp. *Virology* 89: 991-999.
- Bouila M, Ben-Tiba S, Jilani S (2013) Molecular adaptation within the coat protein-encoding gene of Tunisian almond isolates of *Prunus necrotic ringspot virus*. *Journal of Genetics* 92: 11-24.
- Candresse T, Kofalvi SA, Lanneau M, Dunez J (1997) A PCR-ELISA procedure for the simultaneous detection and identification of *Prunus necrotic ringspot* (PNRSV) and Apple mosaic (ApMV) ilarviruses. *Acta Horticulturae* 472: 219-225.
- Chang S, Puryear L, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116.
- Demirozer O, Kaydan MB, Karaca I, Ben-Dov Y (2009) First records of armored scale insect (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) from oil-rose, Rosa damascene, in Turkey. *Hellenic Plant Protection Journal* 2: 33-35.
- Doustsdeigh H, Rakhshandehroo F, Shams-bakhsh M (2012) Distribution of *Arabis mosaic virus* on grapevine in West and eastern Azarbaijan province. *Plant Protection (Science Journal of Agriculture)* 34: 59-74.
- Fallah T, Nasrollanejad S (2009) Detection and distribution of PNRSV on stone fruits in Golestan provinces. *Journal of Plant Production* 16: 88-98.
- Fiore N, Fajardo TVM, Podan S, Herranz MC, Aparicio F, Montealegre J, Elena SF, Pallás V, Sánchez-Navarro J (2008) Genetic diversity of the movement and coat protein genes of South American isolates of *Prunus necrotic ringspot virus*. *Archive of Virology* 153: 909-919.
- Glasa M, Betinova M, Kùdela O, Šubr Z (2002) Biological and molecular characterisation of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates and possible approaches to their phylogenetic typing. *Annals of Applied Biology* 140: 279-283.
- Guo D, Maiss E, Günter A, Casper R (1995) *Prunus necrotic ringspot* ilarvirus: nucleotide sequence of RNA3 and relationship to other ilarviruses based on coat protein comparison. *Journal of General Virology* 76: 1073-1079.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids* 41:95-98
- Hammond RW (2003) Phylogeny of isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* from the Ilarvirus ring test and identification of group-specific features. *Archives of Virology* 148: 1195-1210.
- Hammond RW, Crosslin JM (1995) The complete nucleotide sequence of RNA3 of peach isolate of *Prunus necrotic ringspot virus*. *Virology* 208: 349-353.
- Loudes AM, Ritzenthaler C, Pinck M, Serghini MA, Pinck L (1995) The 119 KDA and 124 Kda polyproteins of *Arabis mosaic* Nepovirus (isolates) are encoded by two distinct RNA-2 species. *Journal of General Virology* 76: 899-906.

می‌باشد را به عنوان ویژگی جدایه‌های گروه I معرفی کردند (Aparicio et al. 1999) و پیشنهاد شده که نوآرایی درون مولکولی<sup>۱</sup> ناشی از رونویسی ناپیوسته آنزیم RNA پلیمراز سبب شکل گیری آن شده است. همچنین آنها با شناسایی یک ناحیه ترجمه نشدنی در انتهای<sup>۲</sup> مولکول RNA چهار، اعضاء گروه PE5 را از دو گروه دیگر تمایز کردند. برآوردهای Tajimas's D و نسبت dN/dS در dN/dS با نرم‌افزار MEGA6 نشان داد که نسبت dN/dS پروتئین پوششی PNRSV کمتر از یک بود (0/11) که موید فشار انتخاب منفی بر روی این ناحیه است. به عبارت دیگر بیشتر جهش‌های انجام شده منجر به تغییر اسیدآمینه نشده‌اند و با توجه به نقش‌های پروتئین پوششی این نتایج قابل پیش‌بینی بود. نتایج آزمون Tajima's D نیز منفی برآورد شد (۰/۱۳) که انتخاب منفی در این ناحیه را تایید می‌کند که با نتایج محققان دیگر (Fiore et al. 2008; Oliver et al. 2009; Boulila et al. 2013) مخوانی دارد.

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که ویروس لکه حلق‌وی بافت مرده هسته‌داران در بوته‌های گل محمدی موجود در برخی گلستان‌های واقع در شهرستان‌های قمصر، نیاسر، مشهد اردہال و نراق در مرکز کشور پراکنده شده است و به دلیل حضور شرایط مناسب در گلستان‌های مرکز کشور، ویروس از درصد پراکنده‌گی متوسطی برخوردار بودند که این امر موجب افزایش میزان آلوودگی گلستان‌ها از سالی به سال دیگر شده است. تجزیه توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده نشان داد که جدایه‌های PNRSV آلووده کننده گل محمدی در گروه PV96، که در برگیرنده نژادهای غیر مهاجم می‌باشد، قرار می‌گیرد. از طرفی تنوع ژنتیکی نسبتاً کم در جدایه‌های PNRSV می‌تواند ناشی از گسترش سریع و وسیع این ویروس در یک منطقه باشد.

<sup>1</sup> Intermolecular rearrangement

- Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010) RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics 26: 2462-2463.
- Massumi H, Shaabanian M, Hosseini Pour A, Heydarnejad J, Rahimian H (2009) Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. Plant Disease 93: 67-72.
- Manouchehri A (1968). Plant viral diseases. Tehran University Press 1189:194.
- Mizani A, Hajnajari H (2013) Detection of ApMV and ToRSV in apple trees and inhibitive effect of seed rootstocks against viral infections. International Journal of Agronomy and Plant Production 4: 3109-3114.
- Moini A, Izadpanah K (2000) Serological identification of *Prunus necrotic ringspot virus* and PPV in Dasht-e-Moghan. In: Proceedings of 14<sup>th</sup> Plant protection congress of Iran. Iran, Isfahan 338 (In Farsi).
- Moury B, Cardin L, Onesto JP, 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.
- Nikbakht A, Kafi M (2010) The Rosa damascene of Iran. Iranian Academic Center for Education Culture and Research, IUT branch press, Isfahan, Iran (In Farsi).
- Oliver JE, Freer J, Andersen RL, Cox KD, Robinson TL, Fuchs M (2009) Genetic diversity of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates within a cherry orchard in New York. Plant Disease 93: 599-606.
- Rahmanian P, Rakhshandehroo F, Zamanizadeh H (2013) Detection and distribution of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) on stone fruits in some gardens located in Fars and Golestan provinces. Iranian Journal of Plant Protection Science 44: 129-139.
- Rakhshandehroo F, Pourrahim R, Zamanizadeh H, Rezaee S, Mohammadi M (2005) Incidence and distribution of viruses infecting Iranian vineyards. Journal of Phytopathology 153: 480-484.
- Rakhshandehroo F, Zamanizadeh H, Modarresi A, Hajmansour, SH (2006) Occurrence of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Arabis mosaic virus* on Rose in Iran. Plant Disease 90: 975-976.
- Rzhetsky A, Nei M (1992) A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. Molecular Biology and Evolution 9:945-967.
- Sabaghian S, Rakhshandehroo F, Rezaee S (2013) First report of *Prunus necrotic ringspot virus* infecting binweed in Iran. Journal of Plant Pathology 95:659-668.
- Salem N, Mansour A, Al-Musa A, Al-Nsour A, Hammond R (2004) Identification and partial characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* on stone fruits in Jordan. Journal of Plant Pathology 86:85-90.
- Sanchez-Navarro JA, Pallas V (1997) Evolutionary relationships in the Ilarviruses: nucleotide sequence of prunus necrotic ringspot virus RNA3. Archive of Virology 142: 749-763.
- Sertkaya G (2009) An investigation on Rose mosaic disease of Rose in Hatay-Turkey. In proceeding of 21<sup>st</sup> International conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops. Germany, Neustadt Julius Kühn Institute 309-313.
- Tajima F, Nei M (1984) Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. Molecular Biology and Evolution 1: 269-285.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipskiA, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
- Vaškova D, Petrzík K, Karešová R (2000) Variability and molecular typing of the woody-tree infecting *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*. Archives of Virology 145: 699-709.
- Weiss EA (1996) Essential oil crops. CABI Pub 608p.