

بررسی وقوع عوامل ویروسی لکه حلقوی گوجه فرنگی (ToRSV) و لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار (PNRSV) در برخی گلستان‌های استان‌های تهران، البرز، مازندران و مرکزی

Study on the occurrence of Tomato Ringspot Virus (ToRSV) and Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV) in some floricultures of Tehran, Alborz, Mazandaran and Markazi Provinces

سیمین صباغیان^۱، فرشاد رخشنده رو^{۲*}، توفیک البینو^۳ و حمیدرضا زمانی زاده^۴

دریافت: ۹۷/۸/۱۴

پذیرش: ۹۸/۲/۲۱

چکیده

در طی فصول زراعی سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ به منظور تعیین پراکنش PNRSV و ToRSV در گل رز و علف‌های هرز پیچک و شیرتیغی مجاور آن‌ها در استان‌های تهران، البرز، مازندران و مرکزی از ۶۰۰ نمونه برگ رز و ۵۰ نمونه برگ علف هرز بدون علائم و با علائم به صورت کاملاً تصادفی نمونه برداری شد. توسط آزمون الایزای مستقیم DAS-ELISA نمونه‌ها ارزیابی شدند. نتایج نشان داد گل رز در استان‌های تهران، البرز، مازندران و مرکزی به ترتیب $39/24\%$ ، $30/7\%$ ، $44/8\%$ و $38/1\%$ به PNRSV و $25/6\%$ ، $32/3\%$ و $28/3\%$ به ToRSV و علف‌های هرز پیچک و شیرتیغی به ترتیب 26% و 18% به PNRSV و ToRSV آلوده بودند. نمونه‌های آلوده با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (pH= 7/1) حاوی ماده ضد اکسیداتیو بر روی گیاهان علفی در گلخانه مایه‌زنی شدند. برای تأیید آلودگی ویروسی نمونه‌ها، از آزمون RT-PCR و پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعات اختصاصی از طول ژنوم PNRSV و ToRSV در نمونه‌های رز و گیاه محک استفاده شد. نمونه‌هایی که در آزمون‌های سرولوژیک آلوده به ویروس تشخیص داده شده بودند، با هر دو جفت آغازگر مورد استفاده واکنش دادند و قطعات ژنتیکی مورد انتظار با اندازه‌های ۲۱۰ جفت باز مربوط به پروتئین پوششی PNRSV و ۵۰۰ جفت باز مربوط به پلیمراز ToRSV برای نمونه‌های آلوده تکثیر شدند. در این بررسی برای اولین بار حضور عوامل ویروس PNRSV و ToRSV در گیاه رز و علف‌های هرز مورد ارزیابی قرار گرفت.

واژگان کلیدی: پراکنندگی، RT-PCR، DAS-ELISA، TAS-ELISA، گل سرخ، دامنه میزبانی

۱- دانشجوی دکتری رشته بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی،

تهران، ایران

۲- به ترتیب استادیار و استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- محقق، مؤسسه تحقیقات علمی بخش کشاورزی حوزه مدیرانه، باری، ایتالیا

نویسنده مسئول مکاتبات: Rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir

مقدمه

گیاه رز به تیره Rosaceae، جنس Rosa و گونه *Rosa hybrids* L. تعلق دارد. سطح زیر کشت گل‌های شاخه بریده رز در ایران ۵۷۷ هکتار است (بی‌نام، ۱۳۸۸). از مهم‌ترین عوامل ویروسی بیماری‌زا در رز مجموعه عوامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک رز می‌باشد. بیماری موزائیک رز از طریق چند ویروس ایجاد می‌گردد که در بیش‌تر موارد این عوامل با یکدیگر همراه می‌باشند و از این جهت میزان خسارت آن‌ها در رز تشدید می‌گردد (Doolittle and Walker, 1952). خسارت بیماری موزائیک رز در زمان آلودگی مرکب و چندتائی در هر گلستان چیزی در حدود ۶۵٪ تا ۴۰٪ می‌باشد (Murant and Lister, 1967; Horst, 1983). نتایج تحقیق‌های گسترده در کشورهای اروپائی و آمریکائی نشان داده است که عوامل ویروسی لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)، لکه حلقوی گوجه‌فرنگی *Tomato ringspot virus* (ToRSV) و موزائیک آرابیس *Arabis mosaic virus* (ArMV) از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده موزائیک رز در این کشورها می‌باشد (Golnaraghi et al., 2004; Sertkaya, 2010). PNRSV در ایران از پراکندگی بالایی برخوردار است. این ویروس در ایران از رزکاری‌های مناطق مختلف تهران و حومه ردیابی شده است و باعث ایجاد موزائیک گل‌های سرخ در این مناطق می‌شود (Pinkerton et al., 2008). همچنین قادر به بیماری‌زایی در گوجه‌فرنگی، انگور، و تعداد زیادی از درختان میوه هسته‌دار نیز می‌باشد (ستاری و همکاران، ۱۳۹۱). آلودگی PNRSV در گیاه رز در آب و هوای معتدل بیش‌تر مشاهده می‌شود (Ghotbi and Shahraeen, 2009; Massumi et al., 2009). دامنه میزبانی آن نسبتاً وسیع بوده و ۲۱ خانواده از دولپه‌ای‌ها را آلوده می‌سازد. ویروس مذکور یک عضو از جنس *Illavirus* از خانواده *Bromoviridae* می‌باشد، ویروس دارای یک پیکره جورق‌رطرا تا باسیلی فرم کوتاه می‌باشد و ژنوم از سه تا چهار RNA تک رشته‌ای مثبت تشکیل یافته است (Doolittle and Walker, 1952). یکی از دلایل پراکندگی گسترده ویروس مورد نظر تغییرات مولکولی شدید ژنوم آن می‌باشد (رحمانیان و همکاران، ۱۳۹۲).

ToRSV متعلق به خانواده *Secoviridae* و جنس *Nepovirus* می‌باشد. در این خانواده سه جنس *Comovirus*، *Fabavirus* و *Nepovirus* قرار دارد که بر اساس روش انتقال و تعداد پروتئین موجود در پوشش پروتئینی از هم تفکیک می‌شوند. یک تفاوت عمده ویروس ToRSV با سایر *Nepovirus*ها، اندازه وزن مولکولی RNA-2 آن با سایر اعضاء جنس مذکور می‌باشد (Powell et al., 1984). این ویروس از طریق مکانیکی، بذر، پیوند، دانه‌گرده، اندام‌های رویشی تکثیری و گونه‌های مختلفی از نماتد *Xiphinema* منتقل می‌شود (Moini, 2010). ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی در ایران از پراکندگی وسیعی برخوردار است. این ویروس از مزارع سویا در استان‌های گلستان، مازندران، خوزستان، اردبیل و لرستان (Fulton and Fulton, 1970)، تاکستان‌های شمال کشور (Murant and Lister, 1967)، گیاهان زینتی استان‌های مرکزی و تهران (Fulton, 1981)، گوجه‌فرنگی کاری‌های استان‌های جنوب کشور (Massumi et al., 2009)، فلفل در استان تهران (Sokhansanj et al., 2012) و نیز باغات سیب (Moini, 2010) استان خراسان گزارش شده است. به رغم حضور این عامل ویروسی در کشور بر روی درختان میوه هسته‌دار، هنوز تحقیق جامعی بر روی پراکنش و بررسی خصوصیات زیستی آن در کشور صورت نپذیرفته است. در حال حاضر مؤثرترین راه کنترل بیماری‌های ویروسی PNRSV و ToRSV در جهان جلوگیری از پراکندگی عامل بیماری و کشت گیاهان عاری از ویروس است (Howell and Mink, 1988; Walker et al., 2015). در این تحقیق تلاش شد تا علاوه بر ردیابی این دو ویروس در برخی مناطق عمده کاشت رز در ایران، میزان پراکندگی آن‌ها در گلستان‌های موجود در استان‌های مذکور نیز مشخص شود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

جهت تعیین پراکنش ویروس‌های ToRSV و PNRSV در طی فصول بهار تا زمستان سال ۱۳۹۴ و فصول بهار و تابستان ۱۳۹۵، از گلخانه‌ها و فضا‌های سبز استان تهران (شهرهای: تهران و ورامین)، استان البرز (شهرهای: کرج، هشتگرد، ساوجبلاغ، ماهدشت، زیبا دشت، مهرشهر، آسارا و نظرآباد)، استان مازندران (شهرهای تنکابن، نشتارود و ساری) و استان مرکزی (شهرهای محلات، اراک و خمین) نمونه برداری انجام شد. در مجموع تعداد ۶۰۰ نمونه از نمونه‌های برگ‌ریز بدون علائم و یا با علائم شبه ویروسی شامل موزاییک، چروکیدگی، بدشکلی، لکه‌حلقوی نکروتیک و غربالی و ۵۰ نمونه برگ‌ریز علائم دار و بدون علائم، از علف‌های هرز کنار آن‌ها جمع‌آوری گردید. در گلستان‌ها نمونه برداری به صورت تصادفی از برگ‌های جوان رز دارای علائم و یا بدون علائم و با حرکت در قطر باغ و به فاصله هر ۱۰ متر انجام شد. در مجموع تعداد ۱۷ گلستان با سطح زیر کشت بالا مورد نمونه برداری قرار گرفت و به طور متوسط هر ۱۰ کیلومتر یک گلستان برای نمونه برداری انتخاب شد. انتخاب تعداد گل‌کاری‌ها در هر شهر وابسته به میزان سطح زیر کشت گل رز در هر شهر مورد بررسی بود.

آزمون ایزای غیر مستقیم (DAS-ELISA)

جهت بررسی حضور ویروس‌های ToRSV و PNRSV در نمونه‌های رز و علف هرز و نیز تعیین پراکنش آن‌ها در مناطق مورد بررسی و همچنین اثبات حضور آلودگی در گیاهان علفی محک مایه‌کوبی شده در گلخانه از آزمون سرولوژیک ایزای مستقیم DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) استفاده شد. آزمون سرولوژیک ایزای مستقیم به فرم ساندویچ دو طرفه آنتی بادی (DAS-ELISA) و مطابق با روش کلارک و آدامز (Casper, 1973) انجام پذیرفت. در این آزمون از آنتی‌بادی‌های چند همسانه‌ای (polyclonal) موجود در کیت تجارتي تهیه شده از شرکت Agdia, U.S.A آمریکا و شرکت Bioreba برای ردیابی ToRSV و PNRSV استفاده شد.

استخراج RNA، ساخت DNA مکمل (synthesis cDNA) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR)

برای بررسی دقیق حضور PNRSV و ToRSV در نمونه‌های آلوده رز، علف هرز و گیاهان محک مایه‌کوبی شده در گلخانه از آزمون RT-PCR استفاده شد و با استفاده از آن تعداد ۵۰ نمونه از انواع گیاه‌های محک، ۵ نمونه از هر دو علف هرز مورد بررسی و نیز ۷۰ نمونه گیاه رز به طور جداگانه برای PNRSV و ToRSV مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی نمونه‌های مورد آزمون قبلاً با استفاده از ELISA، آلوده به PNRSV و ToRSV تشخیص داده شدند. تشخیص آلودگی در نمونه‌های برگ رز و علف‌های هرز توسط آزمون‌های سرولوژیک انجام شد. ده روز پس از مایه‌زنی، RNA کل برگ‌های جوان خیار با استفاده از کیت تجارتي Vivantis technologies, Malaysia استخراج شد. فرایند ساخت DNA مکمل (cDNA) با استفاده از آنزیم نسخه‌بردار معکوس (M-MuLV) مطابق دستورالعمل شرکت Fermentas آلمان و با آغازگر برگشتی (ToRSV-D1) جهت تکثیر ژن آنزیم پلیمرز ویروس لکه‌حلقوی گوجه‌فرنگی و آغازگر برگشتی اختصاصی ژن پروتئین پوششی (Ilar1) ویروس لکه‌حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار انجام شد. واکنش مولکولی PCR با استفاده از ۲ μl از cDNA ساخته شده و در حضور جفت آغازگرهای اختصاصی (ToRSV, U1, D1) از قبل طراحی شده (رحمانیان و همکاران، ۱۳۹۲) با توالی‌های 5'-GACGAAGTTATCAATGGCAGC-3' و ToRSV-U1 و ToRSV-D1: 5'-TCCGTCCAATCACGCGAATA-3' برای تکثیر قسمتی از ژن آنزیم پلیمرز ToRSV به اندازه ۵۰۰

جفت باز و (Ilar1, Ilar2) از قبل طراحی شده توسط Moury و همکاران (Massumi et al., 2009) برای تکثیر قسمتی از پروتئین پوششی ویروس به‌اندازه ۲۱۰ جفت باز با توالی‌های '5'-TTCTAGCAGGTCTTCATCGA-3' Ilar1 و '5'- TTCTAGCAGGTCTTCATCGA-3' Ilar2 انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای ردیابی هر دو ویروس در حجم ۲۵ میکرولیتر و غلظت نهایی ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۱/۲۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ X Tris-HCl (500mM)، KCl با اسیدیته ۸/۴، ۰/۴ میلی‌مولار دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs)، ۲ میکرولیتر از cDNA و ۰/۴ میکرولیتر آنزیم پلیمرز (Taq Polymerase) (سیناژن ایران) در دستگاه ترموسایکلر (Ependorf, AG, Germany) انجام شد. واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۴ درجه سلسیوس به مدت ۷۰ ثانیه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR حاصل از تکثیر منطقه ژنتیکی مورد نظر برای بررسی کیفیت بر روی آگاروز ۱٪ با شدت جریان ۲۵ میلی‌آمپر به مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز شدند.

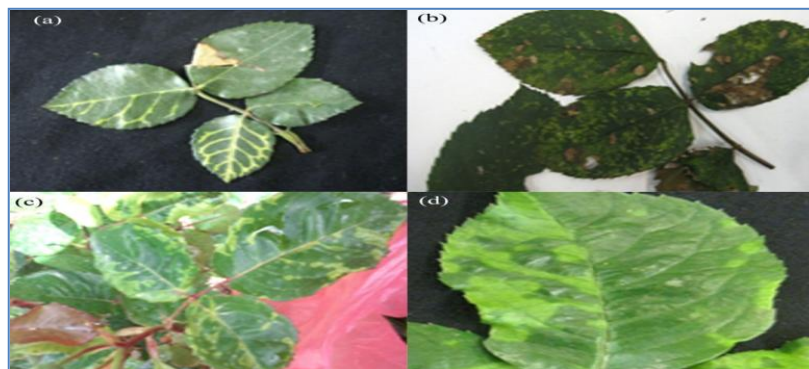
بررسی دامنه میزبانی آزمایشگاهی ویروس

به منظور بررسی برخی خصوصیات زیستی مربوط به جدایه‌های ToRSV و PNRSV در این تحقیق از دامنه میزبانی آزمایشگاهی استفاده شد. برای مایه‌زنی مکانیکی از جدایه‌های دارای نوع شاخص علایم ToRSV و PNRSV و جدایه‌هایی که در آزمون الیزا جذب بالایی داشتند، استفاده شد (Dardick, 2007). برای این منظور عصاره هر نمونه در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۱/۱ دارای ۰/۱۵٪ ماده ضد اکسیداتیو ۲- مرکاپتواتانول و ۰/۲٪ ماده sodium diethyldithiocarbamate استخراج و در مرحله رشدی ۲-۴ برگی با دو تکرار در گلخانه به صورت مکانیکی بر روی گیاهان محک سلمه‌تره (*Chenopodium amaranticolor*)، توتون (*Nicotinia tabacum cv. Samsun*)، لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*)، خیار (*Cucumis sativus*) و فلفل (*Capsicum annum*) مایه‌زنی شد. ۱۰ روز پس از مایه‌زنی علایم ظاهر شده روی گیاهان مایه‌زنی شده یادداشت‌برداری شد. به منظور اطمینان از آلوده بودن گیاه محک، آزمون الیزا هفت روز پس از مایه‌زنی انجام پذیرفت.

نتایج

پس از بررسی نتایج آزمون‌های سرولوژیک و مولکولی در نهایت علایم لکه‌های حلقوی کلروزه و نکروتیک، نکروز حاشیه برگ، رگبرگ روشنی، پیچیدگی برگ، غربالی و زردی از علایم این بیماری در بوته‌های گل رز شناخته شد (شکل‌های ۱ و ۲). نمونه‌ها از گلخانه‌ها و فضاهای سبز از ۴ استان کشور شامل استان تهران (مناطق شهرداری ۱، ۲، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ شهر تهران و ورامین)، استان البرز (شهرهای کرج، هشتگرد، ساوجبلاغ، ماهدشت، زیبا دشت، مهر شهر، آسارا و نظرآباد)، استان مازندران (شهرهای تنکابن، نشتارود، ساری) و استان مرکزی (شهرهای محلات، اراک، خمین) جمع‌آوری شدند (جداول ۱ و ۲). نتایج DAS-ELISA حاکی از آن بود که آلودگی به ToRSV و PNRSV در گلستان‌های تمام مناطق مورد تحقیق در این پژوهش وجود داشت. نتایج آزمون ELISA حاکی از آن بود که PNRSV در طی سال‌های مورد بررسی به میزان ۳۶/۸٪ گلستان‌های مهم موجود در استان‌های البرز، تهران، مازندران و مرکزی را آلوده نمود (جدول ۱). همچنین مشخص شد که گلستان‌های استان مازندران به بیش‌ترین میزان (۴۴/۸٪) در میان سایر استان‌ها به PNRSV آلوده بوده‌اند. استان‌های

تهران، مرکزی و البرز با درصدهای آلودگی ۳۹/۲۴٪، ۳۸/۱٪ و ۳۰/۷٪ به ترتیب در جایگاه‌های بعدی از لحاظ میزان آلودگی به PNRSV قرار داشتند.



شکل ۱- علائم آلودگی‌های ویروسی ToRSV و PNRSV در گل‌های رز ایران. (a) نقش زمینه‌ای و کلروز آوند برگ (b) لکه‌های نکروتیک و موزاییک برگ (c) موزاییک و کلروز حاشیه برگ‌ها (d) موزاییک و لکه‌های حلقوی کلروز برگ

Fig. 1. Symptoms of ToRSV and PNRSV infection in Iranian roses plants. (a) line pattern and leaf veinal chlorosis (b) leaf necrotic spots and mosaic (c) mosaic and leaf marginal chlorosis (d) mosaic and leaf chlorotic ringspot



شکل ۲- علائم آلودگی مشترک ToRSV و PNRSV در علف‌های هرز باغ‌های رز استان مازندران. (a) نقش زمینه‌ای و نکروز آوند برگ در علف هرز Convolvulus arvensis (b) لکه‌های نکروتیک و بدشکلی برگ علف هرز شیرتیغی Sonchus oleraceus

Fig. 2. Symptoms of ToRSV and PNRSV co-infection on herbaceous weeds in rosaries of Mazandaran province (a) line pattern and vein necrosis in Convolvulus arvensis weed (b) Necrotic spot and malformation on common sowthistle weed Sonchus oleraceus leaf

نتایج همچنین نشان داد که در زمان مشابه، ToRSV با درصد کمتری (۳۰/۵٪) نسبت به PNRSV در رز کاری‌های مناطق مورد بررسی در استان‌های مذکور حضور داد و استان تهران به میزان بیش‌تری (۳۸٪) در میان سایر استان‌ها به ویروس آلوده بوده است. از نظر میزان آلودگی به ToRSV گلستان‌های استان‌های مازندران (۳۲/۳٪)، مرکزی (۲۸/۳٪) و البرز (۲۵/۶٪) در جایگاه‌های بعدی قرار داشتند (جدول ۲).

جدول ۱- تعداد کل نمونه‌های آلوده به ویروس PNRSV در مناطق مختلف مورد نمونه‌برداری

Table 1. Total number of PNRSV infected samples in different surveyed regions

Sampling locations	مناطق نمونه‌برداری	ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار		
		PNRSVs		درصد نسبی
		تعداد کل نمونه‌ها	نمونه آلوده	
Total samples	Infected samples	Partial rate of infection (%)		
Tehran Pro.	استان تهران	158	62	39.24 %
Alborz Pro.	استان البرز	215	66	30.7 %
Mazandaran Pro.	استان مازندران	96	43	44.8%
Markazi Pro.	استان مرکزی	131	50	38.1 %
Total	جمع کل	600	221	36.8 %

جدول ۲- تعداد کل نمونه‌های آلوده به ویروس ToRSV در مناطق مختلف مورد نمونه‌برداری

Table 2. Total number of ToRSV infected samples in different surveyed regions

Sampling Locations	مناطق نمونه‌برداری	ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی				
		ToRSV			تعداد نمونه دارای آلودگی مشترک PNRSV و ToRSV	درصد نسبی آلودگی مشترک
		کل نمونه	نمونه آلوده	درصد نسبی		
Total samples	Infected samples	Partial rate of infection (%)	Samples with Combined infection by ToRSV and PNRSV	Partial rate of combined infection		
Tehran Pro.	استان تهران	158	60	38%	23	14.5 %
Alborz Pro/	استان البرز	215	55	26.5 %	64	30 %
Mazandaran Pro.	استان مازندران	96	31	32.3 %	24	25 %
Markazi Pro	استان مرکزی	131	37	28.3 5	15	11.45 %
Total	جمع کل	600	183	30.5 %	126	21 %

در این تحقیق تعداد ۵۰ نمونه علف هرز پیچک و شیرتیغی جمع‌آوری شده از استان‌های مختلف نیز برای حضور ویروس‌های ToRSV و PNRSV مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که علف‌های هرز مذکور در مجموع ۲۶٪ و ۱۸٪ به ترتیب به PNRSV و ToRSV آلوده هستند. بیش‌ترین میزان آلودگی به ToRSV و PNRSV در استان مازندران در علف‌های هرز پیچک و شیرتیغی وجود داشت (جدول ۳) و PNRSV به بیش‌ترین میزان (۳۶٪) در علف‌هرز پیچک (*Convolvulus arvensis*) و ToRSV به بیش‌ترین میزان (۲۸٪) در علف هرز شیرتیغی (*Sonchus oleraceus*) ایجاد آلودگی نموده است (جدول ۳).

در این تحقیق میزان آلودگی همزمان و مشترک نمونه‌ها به هر دو ویروس در مناطق مورد نمونه‌برداری نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از حضور آلودگی مشترک در تمام مناطق مورد نمونه‌برداری بود (جدول ۲). بیش‌ترین میزان آلودگی مشترک در نمونه‌های استان مازندران (۲۵٪) مشاهده شد. نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای و زیست‌سنجی نشان داد جدایه‌های مختلف ویروس که از میزبان‌ها و یا مناطق مختلف جمع‌آوری شده‌اند، علایم متنوعی (جدول ۴ و شکل ۴) بر روی گیاهان محک نشان دادند و گیاه محک خیار بهترین میزبان تکثیری برای PNRSV و ToRSV بود و از قابلیت تفکیک نژادهای ویروس بر مبنی تفاوت در علایم برخوردار بود. سایر گیاهان برای تمام جدایه‌ها واکنش یکسان دادند (شکل ۳).

جدول ۳- درصد آلودگی علف‌های هرز پیچک‌بند (*Convolvulus arvensis*) و شیرتیغی (*Sonchus oleraceus*) به PNRSV و ToRSV در گلستان‌های مورد بازدید

Table 3. Percent of infection with PNRSV and ToRSV in bindweed (*Convolvulus arvensis*) and sow thistle (*Sonchus oleraceus*) herbaceous weeds through in surveyed rosary

Sampling Locations	مناطق نمونه برداری	ویروس Virus	علف هرز weed	کل نمونه Total samples	نمونه آلوده Infected samples	درصد نسبی آلودگی Partial rate of infection
Tehran Pro.	استان تهران	PNRSV	<i>Convolvulus arvensis</i>	10	2	20 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	10	2	20 %
		ToRSV	<i>Convolvulus arvensis</i>	10	0	0 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	10	2	20 %
			<i>Convolvulus arvensis</i>	5	2	20 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	5	0	0 %
Alborz Pro.	استان البرز	PNRSV	<i>Convolvulus arvensis</i>	5	2	20 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	5	0	0 %
		ToRSV	<i>Convolvulus arvensis</i>	5	1	20 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	5	1	20 %
			<i>Convolvulus arvensis</i>	5	4	80 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	5	2	40 %
Mazandaran Pro.	استان مازندران	PNRSV	<i>Convolvulus arvensis</i>	5	1	20 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	5	3	60 %
		ToRSV	<i>Convolvulus arvensis</i>	5	0	0 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	5	1	20 %
			<i>Convolvulus arvensis</i>	5	1	10 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	5	0	0 %
Markazi Pro.	استان مرکزی	PNRSV	<i>Convolvulus arvensis</i>	5	0	0 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	5	1	20 %
		ToRSV	<i>Convolvulus arvensis</i>	25	9	36 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	25	4	16 %
			<i>Convolvulus arvensis</i>	25	2	8 %
			<i>Sonchus oleraceus</i>	25	7	28 %
Total	جمع کل	PNRSV				
		ToRSV				

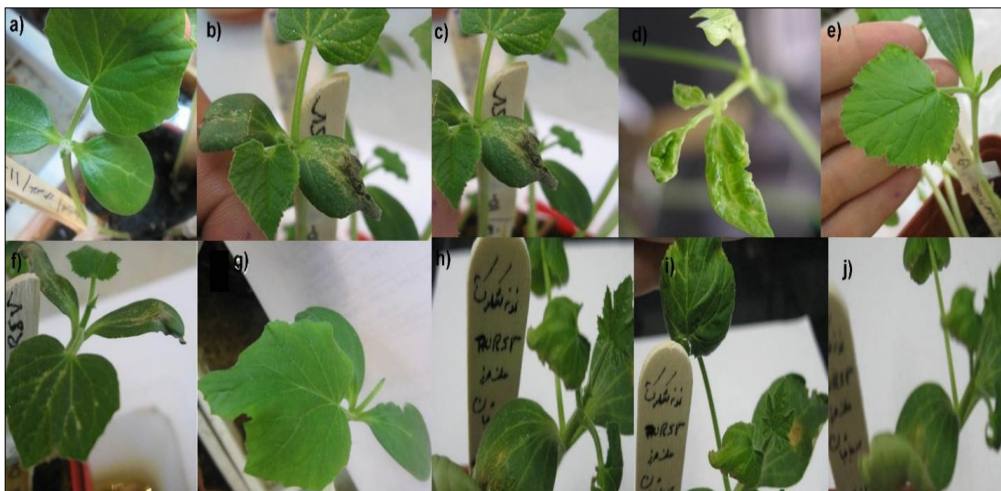
با استفاده از آزمون RT-PCR، ToRSV از بافت‌های برگ گیاه رز، علف‌های هرز شیرتیغی و پیچک و نیز گیاهان محک مایه‌کوبی شده تا دو هفته پس از مایه‌کوبی و هم‌زمان با بروز علائم از نمونه‌هایی که با سرم پلی‌کلونال در آزمون ELISA واکنش داده بودند، به راحتی ردیابی گردید (شکل ۴). با استفاده از آغازگر اختصاصی برای تکثیر قسمتی از توالی ژنوم ToRSV مربوط به آنزیم پلیمرز (RdRP)، نمونه‌های آلوده به ویروس مورد ردیابی قرار گرفتند. در تمام موارد قطعه مورد انتظار با اندازه ۵۰۰ bp برای نمونه‌های آلوده تکثیر شد (شکل ۴).

جدول ۴- نتایج آزمون زیست‌سنجی گلخانه‌ای ۲ هفته پس از مایه‌کوبی ویروس لکه‌حلقوی گوجه‌فرنگی (ToRSV)

Table 4. Greenhouse bioassay test results two weeks after *Tomato ringspot virus* (ToRSV) mechanical inoculation

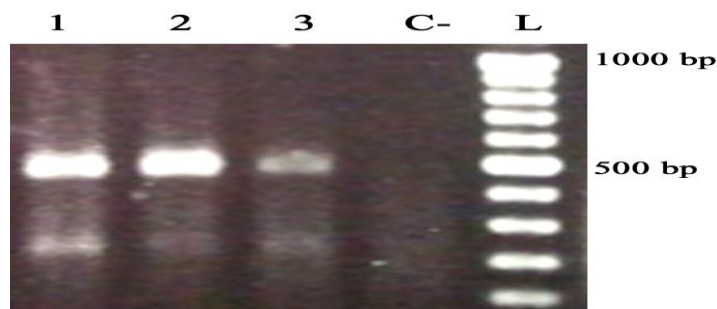
Test plants	گیاه محک	Symptoms	
		ToRSV	PNRSV
<i>Vigna unguiculata</i>		Nll, Cll, Wt, Def, Sy	Sm; Sy
<i>Chenopodium amaranticolor</i>		Sl	Cll
<i>Cucumis sativus</i>		Ch; Vn; Mo, Wt, Def	Ch, Def, Mo, Vn; Sm
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun, nn		Vc	Vc
<i>Capsicum annum</i>		Cll, Nll	Sl

Ch: Chlorosis; Mo: mosaic; NLL: Necrotic local lesion; Chlorotic local lesion; Wt: Wilting; Def: Deformation; Sy: Systemic yellowing; Sl: Symptomless; Sm: Systemic mosaic; Vc: Vein clearing; Vn: vein necrosis.



شکل ۳- علائم حاصل از آزمون زیست‌سنجی PNRSV و ToRSV (a) پیچیدگی برگ خیار مایه‌زنی شده با عصاره علف هرز شیرتیغک آلوده به PNRSV (b) نکروز حاشیه رگبرگ خیار مایه‌زنی شده با نمونه رز آلوده به PNRSV جمع‌آوری شده از شهر تهران (c) نکروز حاصل از مایه‌کوبی نمونه رز آلوده از استان مازندران به ToRSV روی گیاه محک خیار. (d) بدشکلی برگ حاصل از مایه‌کوبی نمونه رز جمع‌آوری شده از استان مرکزی و آلوده به ToRSV بر روی گیاه محک خیار. (e) موزاییک حاصل از مایه‌کوبی نمونه رز جمع‌آوری شده از استان البرز و آلوده به ToRSV بر روی گیاه محک خیار (f) بدشکلی برگ و کوتولگی در گیاه محک خیار مایه‌زنی شده با نمونه رز آلوده به PNRSV جدا شده از استان البرز. (g) کلروز حاشیه برگ و بدشکلی برگ خیار مایه‌زنی شده با نمونه رز آلوده به PNRSV جمع‌آوری شده از استان مازندران. (h, i, j) لکه‌های نکروتیک و بدشکلی برگ حاصل از مایه‌کوبی علف هرز آلوده به PNRSV جدا شده از شهر تهران روی گیاه محک خیار.

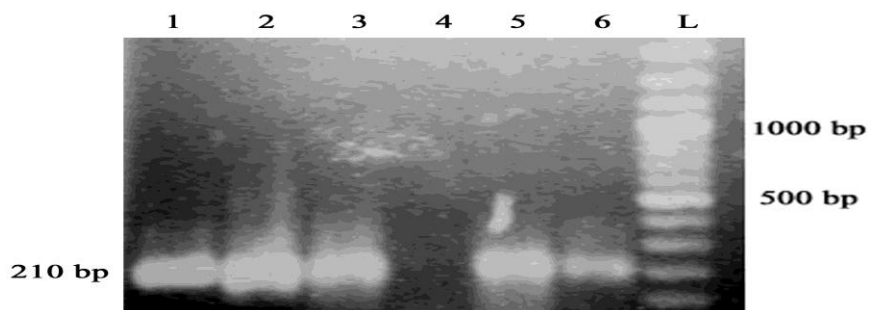
Fig. 3. Symptoms obtained for PNRSV and ToRSV bioassay a) cucumber leaf curl inoculated with the PNRSV- infected common sowthistle weed extract; b) necrosis in the margin of the leaf veins in cucumber plants inoculated with the PNRSV-infected rose sample collected from the Tehran city; c) necrosis on the leaf of the cucumber indicator plant induced by inoculating the ToRSV-infected rose sample from Mazandaran province; d) malformation on the leaf of the cucumber indicator plant induced by inoculating the ToRSV-infected rose sample collected from Markazi province; e) mosaic on the leaf of the cucumber indicator plant induced by inoculated ToRSV-infected rose sample collected from Alborz province; f) malformation on the leaves and dwarfing of the cucumber indicator plant inoculated with PNRSV-infected rose sample collected from Alborz province; g) marginal chlorosis and malformation on the leaf of the cucumber indicator plant inoculated with PNRSV-infected rose sample collected from Mazandaran province; h, i and j) necrotic leaf spots and malformation on the leaves of the cucumber indicator plant inoculated with the PNRSV-infected herbaceous weeds sample collected from Tehran province.



شکل ۴- الکتروفورز محصول پی سی آر حاصل از تکثیر آنزیم پلیمرز ToRSV به اندازه ۵۰۰ جفت باز برای نمونه های راهک ۱) رز تهران، راهک ۲) پیچک جدا شده از مازندران، راهک ۳) شیرتیغی جدا شده از استان البرز. راهک C- نمونه کنترل منفی که در آن از (total-RNA) گیاه رز سالم به عنوان نمونه در PCR استفاده شده بود. راهک L) 100 bp DNA ladder (Fermentas, Inc)

Fig. 4. Electrophoresis analysis of the ToRSV, polymerase enzyme coding gene PCR amplicon with a size about 500bp in samples lane 1) roses collected from Tehran province lane 2) bindweed collected from Mazandaran province lane 3) common sowthistle collected from Alborz province. lane C-: negative control sample in which total-RNA isolated from healthy rose plant used as target in PCR. Lane L) 100bp DNA ladder (Fermentas, Inc)

ویروس PNRSV نیز از بافت های برگ گیاه رز، علف های هرز شیرتیغی و پیچک و نیز گیاهان محک مایه کوبی شده به راحتی ردیابی گردید. در تمام موارد قطعات مورد انتظار با اندازه ۲۱۰bp مربوط به ژن پروتئین پوششی برای نمونه های آلوده به PNRSV تکثیر شد. با وجود حساسیتی که آزمون RT-PCR برای ردیابی ویروس های مورد آزمون داشت، ولی در برخی موارد مشاهده شد که نمونه هایی که در آزمون های سرولوژیک به PNRSV و ToRSV آلوده تشخیص داده شدند، حتی پس از مایه کوبی بر روی گیاهان محک در آزمون RT-PCR با آغازگر اختصاصی قابل ردیابی نبودند (شکل ۵).



شکل ۵- الکتروفورز محصول پی سی آر حاصل از تکثیر ژن بیان کننده پروتئین پوششی PNRSV به اندازه ۲۱۰ جفت باز در نمونه های راهک ۱) رز جدا شده از استان تهران، راهک ۲) مازندران، راهک ۳) البرز، راهک ۵) خیار مایه کوبی شده با نمونه رز آلوده جدا شده از استان مرکزی و راهک ۶) خیار مایه کوبی شده با رز جدا شده از استان البرز. راهک شماره ۴ مربوط به نمونه رز فاقد آلودگی می باشد. راهک L) 100 bp DNA ladder (Fermentas, Inc)

Fig. 5. Electrophoresis analysis of the PNRSV, coat protein coding gene PCR amplicon with a size about 210bp in samples lane 1) roses collected from Tehran province lane 2) Mazandaran province lane 3) Alborz province 5) cucumber plant mechanically inoculated with the infected rose sample collected from Markazi province and 6) cucumber plant mechanically inoculated with the infected rose sample collected from Alborz province. Lane 4) rose sample without infection. L) 100bp DNA ladder (Fermentas, Inc).

با استفاده از RT-PCR از ۷۰ نمونه رز، ۶۳ نمونه با آغازگرهای اختصاصی PNRSV و ۴۰ نمونه با آغازگر اختصاصی ToRSV واکنش دادند. از ۵ نمونه علف هرز تمامی نمونه‌ها و از ۵۰ نمونه گیاه محک مایه‌کوبی شده با هر دو ویروس تعداد ۳۵ نمونه با آغازگرهای اختصاصی مربوط به هر دو ویروس واکنش دادند.

بحث

ایران در جایگاه هفدهم از نظر تولید جهانی گل‌های زینتی می‌باشد و درآمد سالانه ایران از صادرات گل و گیاه زینتی معادل ۸۶ میلیون یورو است. بنابراین تولید با کیفیت گل‌های زینتی و محبوب‌ترین آن‌ها یعنی گل رز در ایران همواره از نظر اقتصادی حائز اهمیت بوده است. برای تولید و صدور محصول مناسب و با کیفیت به سایر کشورها نیازمند آن هستیم تا گیاهانی عاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی تولید کنیم. این عوامل اگر چه باعث بروز علائم شدید در میزبان نمی‌شوند ولی به آرامی موجب کاهش کمی و کیفی محصولات می‌شوند. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گل رز در جهان بیماری موزاییک رز می‌باشد. این بیماری (Rose mosaic disease) توسط مجموعه‌ای از ویروس‌های مختلف شامل ToRSV، PNRSV، Apple mosaic virus (AMV) و Arabis mosaic virus (ArMV) و Strawberry latent ring spot virus (SLRV) ایجاد می‌شود (Rakhshandehroo et al., 2006). با این وجود، PNRSV و ToRSV از عوامل اصلی بیماری موزاییک رز می‌باشند (Fulton, 1981). افزایش میزان خسارت این بیماری ویروسی بستگی به گونه گیاه آلوده شده و شرایط محیطی دارد (Li et al., 2011). در این تحقیق در مجموع ۶۰۰ نمونه برگی علائم‌دار از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری و بررسی شد. نتایج نشان داد اکثر مناطق مورد نمونه‌برداری به دو ویروس PNRSV و ToRSV آلوده بودند. در طی تحقیقی که توسط ستاری و همکاران (۱۳۹۱) در مورد پراکندگی ToRSV در درختان میوه هسته‌دار در برخی نقاط ایران انجام پذیرفته بود، مشخص شده بود که این ویروس به بیش‌ترین میزان در درختان میوه هسته‌دار شمال کشور (استان گلستان) وقوع دارد. همچنین نتایج تحقیقات گذشته نشان داده بود که PNRSV نیز در درختان میوه هسته‌دار شمال کشور از وقوع بالایی برخوردار هست (فلاح و نصرالله‌نژاد، ۱۳۸۸).

در تائید نتایج گذشته، نتایج این تحقیق نیز نشان داد که ویروس‌های ToRSV و PNRSV در گل‌کاری‌های استان‌های مازندران و تهران به بیش‌ترین میزان نسبت سایر مناطق حضور داشتند (جدول ۱ و ۲). یکی از مهم‌ترین دلایل بالا بودن درصد آلودگی در رز گل‌کاری‌های شمال کشور (استان مازندران) می‌تواند حضور میزبان‌های مختلف برای ویروس‌های مذکور باشد که از این طریق منابع پایدار آلودگی را در منطقه فراهم آورده‌اند. حضور درصد بالای آلودگی ویروس‌های مذکور در علف‌های هرز استان مازندران (جدول ۳) نیز این مطلب را تائید می‌نماید. توصیه می‌شود تا در این مناطق از کاشت میزبان‌های مشترک خانواده گل‌سرخیان مانند درختان میوه دانه‌دار، درختان میوه هسته‌دار و انواع گل سرخ در کنار یکدیگر خودداری شود و با علف‌های هرز میزبان ویروس‌های مذکور جهت جلوگیری از بقاء آنها در باغات مبارزه مناسب به عمل آید. ToRSV در گذشته از تعدادی از علف‌های هرز باغات گل‌سرخ و درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار گزارش شده بود (Ghotbi and Shahraeen, 2009؛ ستاری و همکاران، ۱۳۹۲). با این وجود در این پژوهش برای اولین بار ویروس‌های ToRSV و PNRSV از علف‌های پیچک و شیرتیغی گزارش شدند (جدول ۳). انتشار ویروس از علف‌های هرز به درون کشت اصلی ممکن است به وسیله ناقلین پرتحرک مثل شته‌ها و یا حشرات بال‌دار و یا از طریق ناقلین کم‌تحرک مانند قارچ‌ها و نماتدهای خاک‌زی صورت پذیرفته باشد. اهمیت وجود علف‌های هرز آلوده در داخل محصول به‌عنوان کانون‌های آلودگی از سال ۱۹۵۲ در ایالت ویسکانسین مشاهده گردید (Clark and Adams, 1977). علف‌های هرز داخل مزرعه همچنین به‌عنوان منابع مهم آلودگی نماتدهای مختلف ناقل ویروس می‌باشند (Aparicio et al., 1999; Johnstone et al., 1995). ویروس‌هایی که ناقل نماتدی دارند، اغلب به حد بالایی در این علف‌ها بذر زاد هستند (Mouray et al., 2000).

(McNamara *et al.*, 1981; Aparicio *et al.*, 1999). در این تحقیق نیز نمونه‌های محدودی از علف هرز مورد بررسی‌های سرولوژیکی و مولکولی قرار گرفت و نتایج نشان از آلودگی آنها به ویروس‌های مورد بررسی داشت. به طوری که دیده شده علف‌های هرز جمع‌آوری شده در کنار بوته‌های آلوده که در آزمون الایزا هم جذب بالایی داشتند، از جذب بالا در آزمون الایزا برخوردار بودند. نکته جالب توجه آن است که علف‌های هرز مورد مطالعه تنها در مناطقی آلوده بودند که شرایط جوی مناسب برای تکثیر ویروس بوده و گیاهان اطراف آنها نیز درصد آلودگی بالایی را داشتند و علائم نکروز و لکه‌های کلروتیک بین رگبرگ در آنها مشاهده شده بود. نتایج این بررسی حاکی از آلودگی مشترک نمونه‌های رز در مناطق مورد بررسی بود (جدول ۲). به نظر می‌رسد با افزایش درصد‌های آلودگی تکی در رز احتمال آلودگی مشترک نیز در آن افزایش یافته است و به‌عنوان مثال، بیش‌ترین درصد آلودگی مشترک رزها به ویروس‌های ToRSV و PNRSV در استان مازندران (۲۵٪) مشاهده شد که بیش‌ترین درصد‌های آلودگی تکی را به هر یک از ویروس‌ها داشت (جدول ۲). آلودگی مشترک به هر دو ویروس در گذشته در درختان میوه هسته‌دار مشاهده شده بود (Rakhshandehroo *et al.*, 2005). با این وجود آلودگی مشترک گل رز به این ویروس‌ها برای اولین بار در این تحقیق گزارش می‌شود. نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است که ویروس‌های ToRSV و PNRSV در زمان آلودگی مشترک باعث افزایش میزان بیان ژن‌های مسئول کلروز و مرگ سلول‌های توتون می‌شوند و در زمان آلودگی مشترک باعث تشدید پاسخ‌های تنشی میزبان و تسریع فرایند مرگ سلول‌ها می‌شوند (Chandel *et al.*, 2008). از آنجایی که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، از آنجا که هر دوی این ویروس‌ها در اکثر نمونه‌های مربوط به مناطق مورد نمونه‌برداری دارای آلودگی مشترک بوده‌اند (جدول ۲)، این احتمال وجود دارد تا میزان خسارت زیادی را در مناطق مذکور وارد آورده باشند. نیاز هست تا در تحقیقات تکمیلی میزان خسارت این ویروس‌ها در گل‌های سرخ به صورت تکی و در حالت آلودگی مشترک مورد بررسی قرار گیرد. در بررسی خصوصیات زیستی نمونه‌های PNRSV و ToRSV مربوط به مناطق مختلف مشاهده شد که نمونه‌های جدا شده از مناطق مختلف، علائم متفاوتی را در گیاه خیار (*Cucumis sativus* L.) ایجاد می‌نمایند. گیاه خیار از توان تفکیک نژادهای این ویروس‌ها بر مبنای تفاوت در علائم برخوردار بود (جدول ۴ و شکل ۳). این مطلب در مطالعات گذشته نیز بیان شده بود که گیاه خیار از توان تمایز جدایه‌های متفاوت ویروس‌های PNRSV و ToRSV برخوردار می‌باشد (Ghotbi and Shahrean, 2009). تفاوت در علائم در گیاه خیار در جدایه‌های متعلق به مناطق مختلف جغرافیایی بیانگر تغییر در توان بیماری‌زایی جدایه‌ها و تغییر ژنتیکی آنها با تفاوت در شرایط جغرافیایی می‌باشد و این احتمال وجود دارد نژادهای متفاوتی از این ویروس‌ها در مناطق مختلف مورد بررسی وجود داشته باشد.

در این پژوهش مشاهده شد برخی از نمونه‌هایی که در ELISA با آنتی‌سرم اختصاصی ویروس‌ها واکنش مثبت نشان داده‌اند، در آزمون RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی واکنش نمی‌دهند. این امر می‌تواند به دلیل حضور عوامل بیماری‌زا در مجموعه ویروسی ایجاد کننده بیماری موزاییک رز باشد که از قرابت ژنتیکی و سرولوژیکی با ویروس‌های ToRSV و PNRSV برخوردارند (Rott *et al.*, 1991; Youssef and Shalaby, 2009). به‌عنوان مثال، ویروس عامل موزاییک سیب ApMV از قرابت سرولوژیکی بسیار بالایی با PNRSV برخوردار می‌باشد و به خانواده گل‌سرخیان نیز خسارت می‌زند (Arli-Sokmen *et al.*, 2005) و یا ویروس لکه‌حلقوی توتون TRSV با ToRSV دارای رابطه سرولوژیکی نزدیکی است (Dardick, 2007). از طرفی این امر می‌تواند به دلیل تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های ویروسی ToRSV و PNRSV در مناطق مورد نمونه‌برداری باشد. با این وجود اثبات این امر، نیازمند تحقیقات تکمیلی با بررسی دقیق توالی‌های ژنتیکی ویروس‌های مذکور می‌باشد. در قالب این تحقیق مشخص شد که رزکاری‌های مناطق مختلف ایران با جمعیت‌های دارای نژادهای متنوع ویروس‌های ToRSV و PNRSV آلوده می‌باشند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات جناب مهندس شهاب حاج منصور، سرپرست آزمایشگاه‌های تخصصی کشاورزی مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به‌دلیل مساعدت‌های آزمایشگاهی بی‌دریغ ایشان در دوره انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

Reference

منابع

- بی‌نام. ۱۳۸۸. آمارنامه کشاورزی، معاونت امور برنامه‌ریزی اقتصادی و بین‌المللی، دفتر آمار و فناوری اطلاعات. وزارت جهاد کشاورزی، جلد اول.
- رحمانیان، پ.، رخشنده رو، ف. و زمانی‌زاده، ح. ۱۳۹۲. ردیابی و تعیین پراکنش ویروس لکه‌حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار PNRSV در تعدادی از باغات درختان میوه هسته‌دار موجود در برخی مناطق استان‌های فارس و گلستان. دانش گیاه پزشکی ایران ۴۴(۱): ۱۳۹-۱۲۹.
- ستاری، م.، رخشنده رو، ف. و مظفری، ج. ۱۳۹۱. شناسایی و تعیین پراکنش ویروس لکه‌حلقوی گوجه‌فرنگی (ToRSV) در باغ‌های درختان میوه هسته‌دار استان‌های گلستان و فارس. مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران ۴۳(۲): ۳۶۷-۳۷۸.
- فلاح، ط. و نصراله‌نژاد، س. ۱۳۸۸. شناسایی و پراکنش ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران در استان گلستان. پژوهش‌های تولید گیاهی ۱۶(۲): ۸۷-۹۸.
- Aparicio, F., Myrta, A., Terlizzi, B. and Pattas, V. 1999.** Molecular Variability among isolates of Prunus Necrotic Ringspot Virus from Different *Prunus* spp. *Phytopathology* 89: 991-999.
- Arli-Sokmen, M., Kutluk-Yilmaz, N. D. and Menan, H. 2005.** Natural weed hosts of Apple mosaic virus in hazelnut orchards in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 87: 239-242.
- Casper, R. 1973.** Serological properties of Prunus Necrotic Ringspot virus and Apple Mosaic virus isolates from rose. *Phytopathology* 63: 238-240.
- Chandel, V., Rana, T., Handa, A., Thakur, P. D., Hallan, V. and Zaidi, A. A. 2008.** Incidence of Prunus necrotic ring spot virus on *Malus domestica* in India. *Journal of Phytopathology* 156: 382-384.
- Clark, M. F. and Adams A. N. 1977.** Characterization of the microplate methods of enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Dardick, C. 2007.** Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses. *Molecular Plant Microbe Interaction* 20: 1004-1017.
- Doolittle, S. P. and Walker, M. N. 1952.** Further studies on the overwintering and dissemination of cucurbit mosaic. *Journal of Agricultural Research* 31: 1-58.
- Fulton, J. P. and Fulton, R. W. 1970.** A comparison of some properties of *Elm mosaic* and *Tomato ringspot viruses*. *Phytopathology* 60: 114-115.
- Fulton, R. W. 1981.** Iarvirus. Pp. 337-413. In: *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. Kurstak, E. (ed.) Elsevier/North- Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Golnaraghi, A. R., Shahraneen, N., Pourrahim, R., Farzadfar, S. H. and Ghasemi A. 2004.** Occurrence and relative incidence of viruses infecting soybeans in Iran. *Plant Disease* 88: 1069-1074.
- Ghotbi, T. and Shahraneen N. 2009.** Natural incidence and infectivity level of three nepoviruses in ornamental crops in Iran. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 1: 39-44.
- Horst, R. K. 1983.** Compendium of Rose Diseases. American Phytopathology Society. Research Station, St. Paul, Minnesota. 50pp.
- Howell, W. E. and 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.
- Johnstone, G. R., Munro D., Brown G. S. and Scotland C. B. 1995.** Serological Detection, Occurrence and Spread of Iarviruses in Temperate Fruit Crops, Hops and Roses in Tasmania. *Acta Horticulturae* 386: 132-135.

- Li, R. H., Mock, R., Fuchs, M., Halbrendt, J., Howell, B. and Liu, Z. R. 2011.** Characterization of the partial RNA1 and RNA2 3' Untranslated region of Tomato ringspot virus isolates from North America. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33(1): 94-99.
- Massumi, H., Shaabani, M., Hosseini-Pour, A., Heydarnejad, J. and Rahimian H. 2009.** Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant Disease* 93: 67-72.
- McNamara, D. G. and Flegg, J. J. M. 1981.** The distribution of virus-vector nematodes in Great Britain in relation to pest and present natural vegetation. Pp. 225-235. In: *Pests, pathogens and vegetation*. Thresh, J. M. (ed.) Pitman: London.
- Moini, A. A. 2010.** Identification of *Tomato ringspot virus* (ToRSV) on apple in Iran. *Australasian Plant Disease Note* 5: 105-106.
- Moury, B., Cardin, L., Onesto, J. P., Candresse, T. and Poupet, A. 2000.** Survey of Prunus Necrotic Ringspot virus in Rose and its variability in rose and *Prunus* spp. *Plant Disease* 91: 84-91.
- Murant, A. F. and Lister, R. M. 1967.** Seed-transmission in the ecology of nematode borne viruses. *Annals of Applied Biology* 59: 63-76.
- Pinkerton, J. N., Kraus J., Martin R. R. and Schreiner, R. P. 2008.** Epidemiology of *Xiphinema americanum* and *Tomato ringspot virus* on red raspberry. *Plant Disease* 92: 364-371.
- Powell, C. A., Forer, L. B., Stouffer, R. F., Cumminis, J. N., Gonsalves, D., Rosenberger, D. A., Hoffman, J. and Lister R. M. 1984.** Orchard weeds as hosts of Tomato Ringspot virus and Tobacco Ringspot virus. *Plant Disease* 68: 242-244.
- Rakhshandehroo F., Pourrahim R., Zamanizadeh, H. R. and Rezaee S. 2005.** Incidence and Distribution of viruses Infecting Iranian vineyards. *Journal of Phytopathology* 153: 480- 484.
- Rakhshandehroo, F., Zamanizadeh, H. R., Modarresi, A. and Hajmansour, S. H. 2006.** Occurrence of Prunus Necrotic Ringspot virus and Arabis Mosaic virus on Rose in Iran. *Plant Disease* 90: 975-976.
- Rott, M. E., Tremaine, J. H. and Rochan, D. M. 1991.** Nucleotide sequence of *Tomato ringspot virus* RNA-2. *Journal of General Virology* 72: 1505-1514.
- Sertkaya, G. 2010.** An investigation on Rose mosaic Disease of Rose in Hatay-Turkey. *Mitteilungen- Julius Kuhn Istitite* 427: 309-313.
- Sokhansanj, Y., Rakhshandehroo, F. and Pourrahim, R. 2012.** First report of Tomato Ringspot virus infecting pepper in Iran. *Plant Disease* 96: 1828-1828.
- Walker, M., Chisholm, J., Wei, T., Ghosha, B., Saeed, H., Rott, M. and Sanfaçon, H. 2015.** Complete Genome Sequence of Three Tomato Ringspot Virus Isolates: Evidence for Reassortment and Recombination. *Archive of Virology* 160: 534-537.
- Youssef, S. A. and Shalaby, A. A. 2009.** Single-Step Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (m-RT-PCR) for Simultaneous Detection of Five RNA Viruses Affecting Stone Fruit Trees. *International journal of Virology* 5: 100-108.

Study on the occurrence of Tomato Ringspot Virus (ToRSV) and Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV) in some floricultures of Tehran, Alborz, Mazandaran and Markazi Provinces

S. Sabaghian¹, F. Rakhshandehroo^{*2}, T. Elbeaino³ and H. R. Zamanizadeh⁴

Received: 5 Nov., 2018

Accepted: 11 May, 2019

ABSTRACT

During the growing seasons of the years 2013-2014, Alborz, Mazandaran, Markazi and Tehran provinces were surveyed to assess the distribution of PNRSV and ToRSV in rose plants, field bindweed and common sow thistle weeds grown nearby the sampled roses. A total numbers of 600 symptomatic and asymptomatic rose leaves and 50 weeds were sampled. Using with the DAS-ELISA serological test, samples were tested. Results indicated that roses are infected to PNRSV with the infection rates of 39.24%, 30.7%, 44.8% and 38.1% and to ToRSV with the infection rates of 38%, 25.6%, 32.3% and 28.3% through in Tehran, Alburz, Mazandaran and Markazi respectively. It was also revealed that PNRSV and ToRSV was respectively 26% and 18% incidence in weeds. Infected samples were mechanically inoculated on herbaceous propagative and indicator plants using with the potassium phosphate buffer pH 7.1 containing the antioxidant materials. To confirm the presence of viral infections in diseased roses and indicator plants, infected plants were analyzed by RT-PCR, using PNRSV-specific primers to amplify a related portion of the PNRSV and ToRSV genomes. Those infected samples have positively reacted with the both specific primers and desired DNA fragments with the size of about 210bp for the coat protein of PNRSV and 500bp for the polymerase of ToRSV were amplified for them. By this research and for the first time, presence of PNRSV and ToRSV in rose plant and herbaceous weeds was assessed.

Keywords: Distribution, *RT-PCR* .*DAS-ELISA* .*TAS-ELISA*. rose plant. host range

1. PhD Student, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences and Food industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2 and 4. Assistant Professor and Professor, respectively, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences and Food industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran 14515-775, Iran
3. Research Scientist, Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Via Ceglie 9, 70010 Valenzano (BA), Italy
Corresponding author: rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir