

شناسایی و پراکنش سه ویروس مهم لیلیوم در استان تهران

Detection and distribution of three important lily viruses in Tehran province

محمد ترکیان^۱، رضا پوررحیم^۲ و مژده ملکی^۳

پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۲۰

دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۵

چکیده

سوسن (*Lilium spp.*)، از خانواده سوسن‌سانان (Liliaceae) از جمله گیاهان زینتی با اهمیت اقتصادی بالا می‌باشد که بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده تولید آن می‌باشند. در سال ۱۳۹۳، تعداد ۷۶ نمونه با علائم مشکوک به آلودگی ویروسی شامل موزائیک، بدشکلی، سبزدی، کاهش رشد و نکروز از گلخانه‌های زینتی در استان تهران جمع‌آوری گردید. آلودگی این نمونه‌ها به ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus-CMV*) و ویروس موزائیک آرابیس (*Arabis mosaic virus-ArMV*) با استفاده از روش‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس آزمون الایزا، ۴۵ و ۳ نمونه به ترتیب به CMV و ArMV و پنج نمونه دارای آلودگی توام این دو ویروس بودند. نتایج آزمون الایزا با روش بیولوژیکی و مایه‌زنی گیاهان محک مورد تایید قرار گرفت. همچنین با استفاده از روش مولکولی RT-PCR و به کارگیری آغازگرهای اختصاصی، قطعات DNA مورد انتظار ۱۱۰۰ و ۶۹۰ جفت‌باز به ترتیب مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی CMV و ArMV تکثیر گردید. به کمک روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی زیرگروه‌های I و II ویروس موزائیک خیار، آلودگی نمونه‌های لیلیوم به جدایه‌های زیرگروه I این ویروس تایید شد. برای ردیابی ویروس بدون علائم لیلیوم (*Lily symptomless virus-LSV*) و ویروس پیسک لیلیوم (*Lily mottle virus-LMoV*) از روش مولکولی RT-PCR و به کارگیری آغازگرهای اختصاصی استفاده شد که آغازگرهای LMoV منجر به تکثیر قطعه DNA به طول مورد انتظار حدود ۶۵۰ جفت‌باز در چهار نمونه شدند. در هیچ یک از نمونه‌ها آلودگی با LSV ردیابی نگردید. این اولین گزارش از وقوع آلودگی به ویروس‌های ArMV، CMV و LMoV از لیلیوم در کشور می‌باشد. روش‌های ردیابی بهینه‌سازی شده در این تحقیق، در مدیریت این بیماری‌ها از طریق تشخیص و حذف منابع آلودگی در برنامه‌های تولید پیازچه‌های سالم نقش کاربردی بسیار مهمی دارد.

واژه گان کلیدی: لیلیوم، ویروس موزائیک خیار، ویروس پیسک لیلیوم، ویروس موزائیک آرابیس، ردیابی.

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی

گیاهی، ورامین

۲- استادیار، بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران.

نویسنده مسئول مکاتبات: pourrahim@yahoo.com

مقدمه

سوسن (*Lilium sp.*) از خانواده Liliaceae، در بین ده گل شاخه بریده برتر دنیا قرار داشته و در بازار فروش و صادرات، مقاوم سوم را دارد (Singh et al., 2008; Sharma et al., 2005). کشور ایران در بین ۴۲ کشور تولید کننده گل و گیاه زینتی در رتبه ۱۶ قرار داشته و سطح زیر کشت گیاهان زینتی آن نسبت به سطح زیرکشت جهانی، حدود ۱/۳٪ است. ایران به دلیل موقعیت جغرافیایی و دارا بودن اقلیم‌های آب و هوایی مناسب از یک طرف و نزدیکی به بازارهای مصرف به ویژه کشورهای حاشیه خلیج فارس، قابلیت افزایش تولید و صادرات گل و گیاهان زینتی را دارا می‌باشد. استان تهران با داشتن ۱۷۲۰ هکتار کشت گیاهان زینتی، مقام اول و بعد از آن استان‌های مرکزی، خوزستان، مازندران و اصفهان به ترتیب با ۱۰۲۳، ۴۴۴، ۳۲۹ و ۷۹ هکتار در مقام‌های دوم تا پنجم قرار دارند (Anonymous, 2009).

بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده تولید لیلیوم می‌باشند (Chen et al., 2001). آلودگی‌های ویروسی در لیلیوم منجر به کاهش محصول، کوچک شدن گل‌ها و پیازها و در نهایت افت عملکرد می‌شود (Nimii et al., 1999; Derks, 1995). از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده کننده، می‌توان به ویروس بدون علائم لیلیوم (*Lily symptomless virus*-LSV) یکی از گونه‌های جنس *Carlavirus*، اشاره کرد (Zheng et al., 2003). دامنه میزبانی این ویروس محدوده به خانواده لیلیاسه است (Allen, 1972). البته گزارش‌هایی از انگلیس و هند ارائه شده است که علاوه بر لیلیوم می‌تواند خانواده Amaryllidaceae را نیز آلوده نماید (Sharma et al., 2005). لیلیوم‌های آلوده با LSV، پیاز کم‌تری تولید نموده و گیاهان شاخه بریده آن‌ها نیز طول عمر کم‌تری دارند (Blake and Wilson, 1996). بررسی‌ها نشان داده است که میزان کاهش عملکرد (تعداد گل) ارقام مختلف در نتیجه آلودگی با LSV متفاوت و حدود ۲۰ درصد می‌باشد (Schouten et al., 1997). کیفیت گل‌های لیلیوم عاری از LSV بسیار بالاتر از گیاهان آلوده است. گل‌ها بزرگ‌تر بوده و دارای رنگ بهتری می‌باشند (Asjes, 2000). ویروس پیسک لیلیوم (*Lily mottle virus*-LMoV) گونه‌ای از جنس *Potyvirus*، در خانواده *Potyviridae*، یکی دیگر از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده کننده لیلیوم است. از علائم LMoV می‌توان به رگبرک روشنی، پیسک برگی، موزائیک، خطوط سبزرده تا زردی کامل، پیچیدگی و باریک شدن برگ‌ها و نیز بروز لکه‌های بافت مرده اشاره نمود. بعضی ارقام با حساسیت بیشتر، بدشکلی و شکستگی رنگ گل را نشان می‌دهند. علائم در گیاهان گلخانه‌ای که برای تولید گل شاخه بریده در خارج از فصل، کشت می‌شوند بسیار شاخص‌تر از گیاهانی است که در مزرعه و برای تولید پیاز مورد کشت قرار می‌گیرند. برگ‌ها ممکن است زودتر رشد کرده و جوانه‌ها و گل‌ها قبل از بلوغ ریزش پیدا نمایند (Asjes, 1998; Lee et al., 1996; Derks, 1988). از دیگر ویروس‌های مهم لیلیوم می‌توان به ویروس موزائیک خیار (CMV) اشاره کرد (Chinestra et al., 2010). این ویروس، گونه تیپ جنس *Cucumovirus* از خانواده *Bromoviridae* می‌باشد. ویروس موزائیک خیار (CMV) دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی بوده و بیش از ۱۳۰۰ گونه گیاهی در ۱۰۰ خانواده از درختان میوه، سبزیجات و گیاهان زینتی از دو و تک لپه‌ای‌ها را آلوده می‌سازد (Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003). البته مشخص شده است که جدایه‌های این ویروس از لیلیوم، دارای دامنه میزبانی محدودی می‌باشند که این موضوع می‌تواند مربوط به تکامل اختصاصی این ویروس با گیاهان جنس لیلیوم باشد (Chen et al., 2001). علائم ناشی از CMV در مقایسه با LSV و LMoV نسبتاً شدیدتر بوده و شامل موزائیک، لکه‌های شبه حلقوی زرد و نیز در برخی ارقام حساس بافت مرده قهوه‌ای روی برگ است. همچنین پیچیدگی، تاولی شدن و زردی، پیری زودرس و افتادن گل‌ها قبل از بلوغ از علائم آلودگی به این ویروس می‌باشند. جوانه‌های گل دچار پیچیدگی و بدشکلی شده و گل‌های بعضی از ارقام دچار شکستگی رنگ می‌شوند (Derks et al., 1997). نتایج بررسی‌های انجام شده نشان دهنده تشابه نوکلئوتیدی بسیار بالای جدایه‌های CMV از لیلیوم بدون در نظر گرفتن منشأ جغرافیایی این جدایه‌ها است (Yamaguchi et al., 2005). هر سه ویروس LSV، LMoV و CMV توسط شته‌ها به روش ناپایا منتقل می‌شوند (Derks, 1995). علاوه بر این سه ویروس مهم و گسترده (Sharma et al., 2005)، ویروس موزائیک آرابیس

Arabis mosaic virus-ArMV) نیز از هلند (Asjes and Segers, 1983) گزارش شده است که موجب بدشکلی گل‌ها و بازماندن شدید رشد در لیلیوم می‌شود. این ویروس یکی از گونه‌های جنس *Nepovirus* از خانواده *Secoviridae* است. ویروس‌های عضو این جنس قادر به انتقال توسط نامتدها بوده و بسیاری از خانواده‌های گیاهی را آلوده می‌سازند. این ویروس‌ها در دامنه وسیعی از گیاهان یک ساله، چند ساله و گیاهان چوبی منجر به خسارت جدی می‌گردند (Murant, 1970). دامنه میزبانی وسیع این ویروس‌ها ناشی از روش‌های انتقال آن‌ها با نماد، بذر و یا دانه گرده موجب شده است تا کنترل این ویروس‌ها به سختی امکان‌پذیر باشد (Card et al., 2007). این ویروس اولین بار در ایران از روی مو (Pourrahim et al., 2004) و پس از آن از محصولات دیگر نیز گزارش شده است (Massumi et al., 2009; Rakhshandehroo et al., 2006).

آلودگی همزمان ویروس‌های LSV، LMoV و CMV در لیلیوم در مقایسه با آلودگی تکی، منجر به افزایش شدت علائم می‌گردد (Blake and Wilson, 1996). هر سه این ویروس‌ها از طریق اندام‌های رویشی و نیز پیازهای تکثیری به نسل بعد منتقل می‌شوند (Masuta et al., 2002). همچنین انتقال آن‌ها با شته به روش ناپایا منجر به گسترش بیش‌تر آلودگی می‌شود (Raju and Olsen, 1985). آلودگی به این سه ویروس در بسیاری از کشورهای آسیایی، اروپایی، استرالیا و نیز ایالات متحده آمریکا گزارش شده است (Asjes, 1998).

علی‌رغم اهمیت اقتصادی لیلیوم، تا کنون مطالعه‌ای روی عوامل بیماری‌زای ویروسی این گیاه زینتی در ایران صورت نگرفته است. از آن‌جا که بررسی و ردیابی ویروس‌های گیاهی از مهم‌ترین اقدامات جهت برنامه‌ریزی و تدوین استراتژی‌های لازم جهت کنترل و کاهش خسارت ناشی از بیماری‌های ویروسی است. در این تحقیق از گلخانه‌های کشت لیلیوم در استان تهران بازدید و احتمال آلودگی با ویروس‌های ArMV، CMV، LMoV و LSV در آن‌ها با استفاده از روش‌های سرولوژیکی، بیولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این بررسی گلخانه‌های کشت لیلیوم در چهار منطقه مهم کشت این گیاهان در استان تهران شامل ورامین، پاکدشت، آبسرد و دماوند مورد بازدید قرار گرفته و در مجموع ۷۶ نمونه از ورامین (۲۰ نمونه)، پاکدشت (۱۱ نمونه)، آبسرد (۱۵ نمونه) و دماوند (۳۰ نمونه) جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها از بوته‌های لیلیوم با علائم مشکوک آلودگی ویروسی شامل موزائیک، پیسک، بدشکلی‌های برگ، سبزدی، زردی و کاهش رشد تهیه شدند. نمونه‌ها با ذکر مشخصات داخل کیسه‌های نایلونی و درون جعبه‌های یونولیتی حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شدند.

ردیابی سرولوژیکی آلودگی‌های ویروسی

نمونه‌های علائم‌دار از نظر آلودگی به ویروس‌های CMV و ArMV با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی این دو ویروس (تهیه شده از شرکت بیوربای سوئیس) و بر اساس روش الایزای مستقیم (DAS-ELISA) مورد آزمون قرار گرفتند (Clark and Adams, 1997). از شاهد مثبت (آلوده) و منفی (سالم) فراهم شده توسط شرکت سازنده آنتی‌بادی بر اساس رقت و روش توصیه شده توسط سازنده آن در آزمون استفاده شد. برای انجام آزمون ابتدا بشقاب‌های الایزا (Nunc Maxisorb, Denmark) با ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی اختصاصی رقیق توصیه شده در بافر پوششی کربنات شامل Na_2CO_3 ۱۵ میلی‌مول و NaHCO_3 ۳۵ میلی‌مول با اسیدیته ۹/۶ (pH 9.6)، اضافه گردید و به مدت یک شب در ۴ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شدند. عصاره‌های گیاهی تهیه شده به نسبت ۱/۵ (حجم/وزن) در بافر عصاره‌گیری (PBS) با

اسیدیتته ۷/۴، شامل ۲/۷ KCl میلی مول، ۸ Na₂HPO₄ میلی مول، ۱ Na₂H₂PO₄ میلی مول، ۰/۱۳ NaCl مول، حاوی ۲ درصد پلی وینیل پیرولیدان 24000، به چاهکها اضافه و به مدت یک شب در یخچال نگهداری شدند. قبل از اضافه نمودن عصارهها، بشقابکها سه بار و هر بار ۵ دقیقه با بافر شستشو (PBS) حاوی ۰/۰۵ درصد Tween 20 (PBS-T) شسته شدند. در مرحله بعد آنتی بادی متصل به آنزیم (IgG-conjugate) با رقت توصیه شده در بافر PBS-T حاوی ۲ درصد پلی وینیل پیرولیدان 24000، ۰/۲ درصد آلبومین گاوی و ۱ میلی مول MgCl₂، رقیق و پس از اضافه نمودن به چاهکها، بشقابکها به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. قبل از اضافه نمودن آنتی بادی متصل به آنزیم، شستشو همانند مرحله قبل انجام گرفت. در مرحله پایانی پس از شستشوی بشقابکها، محلول سوبسترا (۹/۷ درصد در اتانول آمین، اسیدیتته ۹/۸، حاوی پارانیتروفنیل فسفات) اضافه و یک ساعت پس از افزودن محلول سوبسترا به چاهکها میزان جذب نور هر چاهک در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader، اندازه گیری گردید. نمونه هایی که میزان جذب نوری آنها مساوی یا بیش از سه برابر میانگین میزان جذب نوری مربوط به شاهد سالم (منفی) بودند، به عنوان نمونه های آلوده به ویروس در نظر گرفته شد.

بررسی دامنه میزبانی جدایه های CMV و ArMV

از نمونه های با واکنش مثبت در آزمون الایزا، سه جدایه از هر ویروس انتخاب (ترجیحا از مناطق مختلف) و روی ۱۲ جنس گیاه محک متعلق به پنج خانواده گیاهی Fabaceae، Cucurbitaceae، Chenopodiaceae، Amaranthaceae، Solanaceae و Plantaginaceae مایه زنی گردیدند. مایه زنی مکانیکی با استفاده از بافر فسفات ۰/۱ مولار، اسیدیتته ۷/۲ و به کارگیری پودر خراش دهنده کاربوراندوم (۳۰۰ مش) انجام گرفت. این گیاهان در شرایط گلخانه ای (دمای ۳ ± ۲۲ درجه سانتی گراد، نور متناوب ۱۶ ساعت روشنایی، رطوبت نسبی ۱۰ ± ۷۰ درصد) تا سه ماه نگهداری و مورد بازدید قرار گرفتند. علائم ایجاد شده روی هر از این گیاهان ثبت گردید. برای خالص سازی بیولوژیکی ویروس مورد نظر، از گیاه سلمک (*Chenopodium quinoa*) و (*Ch. amaranticolor*) با واکنش لکه موضعی (کلروتیک) استفاده شد. پس از سه بار انتقال تک لکه، از میزبان توتون (*Nicotiana spp.*) و خیار (*Cucumis sativus*) با واکنش سیستمیک، برای مایه زنی استفاده شد. سیستمیک شدن ویروس روی این گیاهان با استفاده از آزمون الایزا (حدود ۱۴ تا ۲۱ روز پس از مایه زنی) مورد تایید قرار گرفت. جهت بررسی های بیولوژیک و مولکولی از این گیاهان به عنوان منابع آلودگی استفاده شد.

ردیابی مولکولی آلودگی های ویروسی

به منظور تایید نتایج آزمون های سرولوژیکی و بیولوژیکی در مورد CMV و ArMV، و نیز ردیابی ویروس های LMoV و LSV از روش رونوشت برداری برگردان و واکنش زنجیره ای پلیمرز (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction- RT-PCR) استفاده شد. جهت استخراج RNA از محلول تجاری RNXplus (سیناژن- ایران) طبق توصیه شرکت سازنده با اندکی تغییر (افزودن مرحله دو بار شستشو با فنل و کلروفورم به قبل از مرحله رسوب دهی) استفاده گردید. ابتدا از بافت گیاهی ۰/۱ گرم وزن و با استفاده از نیتروژن مایع به صورت پودر درآورده شده و پس از جمع آوری در میکروتیوب، بلافاصله یک میلی لیتر از محلول تجاری به آن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس گردید. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و اولین سانتریفیوژ در ۱۱ هزار دور در دقیقه انجام شد. پس از جمع آوری روشین، مجددا شستشوی آن با فنل و کلروفورم انجام گرفت. پس از سانتریفیوژ در ۱۱ هزار دور در دقیقه، روشین جمع آوری و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و نمونه ها به مدت ۲ ساعت در منفی ۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سانتریفیوژ بعدی در ۱۳ دور در دقیقه به منظور تهیه رسوب حاوی RNA استخراجی انجام گرفت. یک مرحله شستشوی رسوب با

الکل ۷۰ درصد انجام و سانتریفیوژ تکرار گردید. نمونه‌ها پس از خشک شدن در ۵۰ میکرولیتر آب استریل رقیق گردیدند. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۳ ارائه شده است.

واکنش رونوشت‌برداری برگردان (Reverse transcription-RT) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گردید. مواد مورد نیاز برای یک واکنش عبارت از یک میکرولیتر از آغازگر پایین دست (reverse primer) با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر، دو میکرولیتر بافر M-MuLV-10X (سیناژن-ایران)، دو میکرولیتر از مخلوط dNTP Mix با غلظت ۱۰ میلی‌مولار (سیناژن، ایران)، چهار میکرولیتر از RNA استخراج شده، یک میکرولیتر از آنزیم رونوشت‌برداری برگردان M-MuLV (سیناژن، ایران)، نیم میکرولیتر بازدارنده RNase (RNase inhibitor) (Fermentas، لیتوانی) با ۹/۵ میکرولیتر آب دوبر تقطیر استریل بود. مخلوط مورد نظر به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به این ترتیب رشته مکمل (cDNA) ساخته شد. این واکنش در دستگاه ترموسایکلر مدل Primus (ساخت شرکت MWG آلمان) انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction-PCR) در حجم ۵۰ میکرولیتری انجام شد. برای تهیه یک واکنش ۵۰ میکرولیتری، پنج میکرولیتر بافر 10XPCR، ۱/۵ میکرولیتر از محلول $MgCl_2$ (با غلظت ۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر dNTP Mix از غلظت ۱۰ میلی‌مولار (سیناژن، ایران)، یک میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase (معادل ۵ واحد)، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای بالادست و پایین‌دست (غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۳ میکرولیتر از محصول cDNA با هم مخلوط و حجم آن توسط آب دو بار تقطیر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Primus (ساخت MWG آلمان) انجام گرفت. برنامه این واکنش شامل یک مرحله ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه هر یک مشتمل بر مرحله واسرشتی (۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد)، مرحله اتصال (۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه) (برای CMV)، ۱ دقیقه در ۴۷ درجه (برای ArMV)، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه برای LMoV و LSV) و در نهایت مرحله بسط (۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) سانتی‌گراد بود. به منظور تکمیل مرحله بسط قطعات تمام واکنش‌ها در پایان به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. به منظور بررسی نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز پنج میکرولیتر از محصول این واکنش با سه میکرولیتر بافر نمونه مخلوط و در ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید (به نسبت یک میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۸۰ ولت ثابت به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. مشاهده و عکس‌برداری از قطعات DNA تکثیر یافته طی واکنش PCR با استفاده از دستگاه UV-illuminator مدل ایماکو (هلند) انجام گرفت.

نتایج

تعیین آلودگی‌های ویروسی در لیلیوم

بیش‌ترین علائم ویروسی در گیاهان لیلیوم نسل‌های سوم به بعد مشاهده گردید که از تکثیر پیازچه‌های وارداتی توسط تولیدکنندگان، کشت شده بودند. مجموعاً ۷۶ بوته لیلیوم دارای علائم مشکوک به آلودگی ویروسی شامل پیسک، موزائیک، سبزدی، نکروز و بدشکلی در بوته‌ها جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی CMV و ArMV به روش سرولوژیکی الی‌ایزا مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین تعداد ۲۰ نمونه با علائم شدید بازماندن از رشد، عدم تولید گل و پیچیدگی شدید برگ‌ها (شکل‌های ۱ و ۲) با استفاده از روش RT-PCR و به کارگیری آغازگرهای اختصاصی دو ویروس مهم LSV و LMoV ارزیابی شدند.

بر اساس آزمون سرولوژیکی الی‌ایزا از ۷۶ نمونه علائم‌دار لیلیوم جمع‌آوری شده ۵۷ نمونه (۷۵ درصد) دارای آلودگی ویروسی بودند. درصد آلودگی تکی و نیز همزمان دو ویروس در جدول ۱ نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان آلودگی تکی متعلق به CMV با ۴۵ نمونه آلوده (۵۹/۲ درصد) و پس از آن ArMV با سه نمونه لیلیوم (۳/۹ درصد) بود. مهم‌ترین علائم همراه با این نمونه‌ها شامل پیسک و موزائیک بود.



شکل ۱- علائم مشاهده شده در گیاه لیلیوم مشکوک به آلودگی ویروسی. (a) گیاه سالم، (b) علائم موزائیک، (c) زردی و شکستگی رنگ گل، (d) لکه‌های سبزد و بافت مرده.

Fig. 1. Virus like symptoms observed in lilium (a) Healthy plant; (b) Mosaic (c) Yellows and color breaking; (d) Chlorotic and necrotic spots.



شکل ۲- علائم شدید ویروسی در لیلیوم
Fig. 2. Severe virus infection symptoms in lilium

آلودگی همزمان با دو ویروس ArMV و CMV در پنج نمونه (۶/۵۷ درصد) ردیابی گردید (جدول ۱). در این لیلیوم‌ها شدت علائم بیماری بیش‌تر بود و روی برگ‌های آلوده لکه‌های بافت مرده تقریباً کل پهنک برگ را در بر گرفته بود (شکل ۲). نتایج حاصل از ردیابی LSV و LMoV با استفاده از روش مولکولی RT-PCR و به کارگیری آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه ژن پروتئین پوششی، نشان دهنده آلودگی چهار نمونه به LMoV بود که قبلاً در این نمونه‌ها علاوه بر LMoV، آلودگی با CMV نیز به روش سرولوژیکی ردیابی شده بود. بر این اساس در چهار نمونه از ۷۶ نمونه (۵/۲۶ درصد) آلودگی همزمان با دو ویروس LMoV و CMV ردیابی شد (جدول ۱) ولی در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی، آلودگی با ویروس بدون علائم لیلیوم (LSV) ردیابی نگردید. در این تحقیق در ۱۹ نمونه علائم‌دار، آلودگی با ویروس‌های مورد بررسی تشخیص داده نشد.

جدول ۱- مناطق و تعداد نمونه‌های لیلیوم جمع‌آوری شده و آلودگی تکی و همزمان آن‌ها با ArMV، CMV، LMoV و LSV*

Table 1. Location and number of tested lilium samples and their single and mix infections with ArMV, CMV, LMoV and LSV*

Location	مناطق	تعداد نمونه جمع‌آوری شده No. of collected samples	تعداد نمونه آلوده تکی		آلودگی همزمان	
			No. of single infection		No. of mixed infection	
			ArMV	CMV	ArMV+CMV	CMV+LMoV
(Absard)	آبسر	15	0	11	0	1
(Pakdasht)	پاکدشت	11	0	6	2	0
(Damavand)	دماوند	30	1	16	1	3
(Varamin)	ورامین	20	2	12	2	0
(Total)		76	3	45	5	4
مجموع			(3.9 درصد)	(59.2 درصد)	(6.57 درصد)	(5.26 درصد)

* LSV infection was not detected in studied samples.

* در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی آلودگی با LSV ردیابی نشد

دامنه میزبانی جدایه‌های ArMV و CMV

برای بررسی دامنه میزبانی جدایه‌های CMV و ArMV به دست آمده از لیلیوم، از روش مایه‌زنی مکانیکی روی گیاهان محک متعلق به جنس‌ها و گونه‌های مختلف استفاده شد (جدول ۲). جدایه‌های ویروس موزائیک خیار به دست آمده از لیلیوم روی هیچ یک از میزبان‌های مورد نظر واکنش سیستمیک نشان ندادند و فقط علائم پیسک خفیف در توتون بنتامیانا (*N. benthamiana*) حدود سه هفته پس از مایه‌زنی ایجاد گردید (شکل ۳). نتایج به دست آمده از مایه‌زنی، با استفاده از آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی مورد تایید قرار گرفت. سه جدایه ArMV مورد بررسی (یک جدایه از دماوند و دو جدایه از ورامین) جهت بررسی دامنه میزبانی ابتدا روی میزبان *Ch. amaranticolor* (با واکنش لکه موضعی) مایه‌زنی و خالص‌سازی بیولوژیکی گردیدند. پس از سه بار انتقال تک لکه روی این میزبان، روی گیاهان محک خیار در مرحله دو برگ مایه‌زنی گردیدند. نتایج حاصل از مایه‌زنی در جدول ۲ نشان داده است. دامنه میزبانی سه جدایه مورد نظر مشابه هم بود و تفاوتی از نظر واکنش بین آنها مشاهده نگردید. علائم سیستمیک ایجاد شده توسط این جدایه‌ها از بدون علائم تا رگبرگ روشنی، موزائیک به صورت لکه‌های موضعی سبزد و پیسک متفاوت بود. علائم پیسک در تاتوره (*D. stramonium*) (شکل ۴)، علائم لکه موضعی (شکل ۵a)، رگبرگ روشنی (۵b) و موزائیک سیستمیک (۵c)

در سلمک (*Ch. quinoa*) نشان داده شده است. روی برخی از میزبان‌ها شامل شبدر (*Trifolium* sp.)، عروسک پشت پرده (*Physalis floridana*)، ماش (*Vicia sativa*) و باقلا (*V. faba*) علائمی مشاهده نگردید (جدول ۲). آلودگی و یا عدم آلودگی گیاهان محک با استفاده از روش الایزا مورد تایید قرار گرفت.

جدول ۲- نتایج حاصل از مایه‌زنی سه جدایه ArMV (به دست آمده از لیلیوم) روی گیاهان محک مختلف

Table 2. Results of mechanical inoculation of three ArMV isolates (from liliium) in different indicator plants

تیره گیاهی Family	گونه گیاه محک Indicator plant species	علائم ایجاد شده توسط جدایه‌های ArMV		
		Symptoms induced by ArMV isolates		
		ArMV-Li1	ArMV-Li2	ArMV-Li3
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	NLL/M	-/M	-/M
	<i>Chenopodium quinoa</i>	CLL,NLL/M	CLL,NLL/M	CLL,NLL/M
Chenopodiaceae	<i>Ch. amaranticolor</i>	CLL,NLL/M,VC	CLL,NLL/M,VC	CLL,NLL/M,VC
	<i>Beta vulgaris</i>	-/CS	ND	ND
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	CLL/Mo,VC	CLL/Mo,VC	CLL/Mo,VC
Fabaceae	<i>Trifolium</i> sp.	-/-	-/-	-/-
	<i>Physalis floridana</i>	-/-	-/-	-/-
	<i>Vicia sativa</i>	-/-	-/-	-/-
	<i>V. faba</i>	-/-	-/-	-/-
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley	CLL, MMo,VC	CLL, MMo	CLL, MMo
	<i>N. tabacum</i> L. cv. Samsun	-/Mo	-/Mo	-/Mo
	<i>N. rustica</i>	-/SI	-/SI	-/SI
	<i>N. glutinosa</i> L.	-/M	-/M	-/M
	<i>Datura stramonium</i> L.	CLL/M,VC	ND	CLL/M,VC
	<i>D. metel</i> L	CLL/VC	CLL/VC	CLL/VC
	<i>Lycopersicum sculentum</i>	-/CS	-/CS	-/CS
	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.cv. Bountiful	CLL,NLL/VC	CLL,NLL/VC	CLL,NLL/VC
<i>Petunia hybrida</i>	-/M	-/M	-/M	

CLL: Chlorotic local lesion; Cs: Chlorotic spots; M: Mosaic; Mo: Mottle; MMo: Mild mottle; NLL: Necrotic local lesion; ND: Not determined; VC: Vein clearing; -: no infection.

آزمون رونوشت برداری برگردان و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

یازده نمونه لیلیوم با واکنش مثبت در آزمون الایزا با آنتی‌بادی اختصاصی CMV، انتخاب شد و با استفاده از آغازگر-های اختصاصی (جدول ۳) توصیف شده برای ردیابی زیرگروه I و زیرگروه II این ویروس، مورد بررسی قرار گرفتند. با انجام آزمون RT-PCR یک قطعه DNA به طول حدود ۶۰۰ جفت باز در تمام ۱۱ نمونه مورد بررسی تکثیر گردید ولی در نمونه شاهد سالم (لیلیوم وارداتی جدید از هلند) محصولی مشاهده نشد در حالی که در نمونه شاهد مثبت (دریافتی از دکتر پوررحیم، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور) قطعه مورد انتظار تکثیر شده بود (شکل ۶). طول این قطعه با اندازه مورد انتظار گزارش شده در مورد زیر گروه شماره I جدایه‌های CMV مطابق بود. در هیچ یک از نمونه‌ها قطعه DNA مربوط به زیر گروه شماره II تکثیر نگردید. همچنین ناحیه ژن پروتئین پوششی هفت جدایه CMV، با استفاده از آغازگرهای طراحی شده توسط چن و همکاران (Chen et al., 2011) طی واکنش RT-PCR تکثیر گردید که یک قطعه

DNA به طول حدود ۱۱۰۰ جفت باز در تمام جدایه‌های مورد بررسی حاصل شد (شکل ۷). طول این قطعه با اندازه مورد انتظار مطابق بوده و در نمونه‌های شاهد سالم نیز چنین قطعه‌ای تکثیر نگردید.

جدول ۳- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق و مشخصات آن‌ها

Table 3. Primers used in this study and their specification

ویروس	نام و توالی آغازگر	طول قطعه مورد نظر	منبع
Virus	Name and sequence of primer	Expected length	Reference
CMV	CMV I-F 5'-GCCACCAAAAATAGACCG-3'	600 bp	Chen <i>et al.</i> (2011)
	CMV I-R 5'-ATCTGCTGGCGTGGATTCT-3'		
	CMV II -F 5'- CTACGTTTATCTTCC -3'	704 bp	
	CMV II- R 5'-AACCGGTGATTTACCATCGC-3'		
ArMV	ArMV-F 5'-CAAGTTTCTGACTATCCCACC-3'	690 bp	Zheng <i>et al.</i> (2013)
	ArMV-R 5'-TTCCAAATCCCACATTACCT-3'		
LSV	LSVF 5'-ATGAAGGTTGGCGTCGTA-3	521 bp	
	LSVR 5'-TATTCGGTTTCTGGGCTC-3		
LMoV	LMOV1-5'-GCAAATGAGACACTCAATGCTG-3'	650 bp	Lim <i>et al.</i> (2009)
	LMOV2-5'-CGTGCGTGAAGTAACTTCATAG-3'		
	LMf-5'-ATAGTGAACACTGGGCACCTTGTG-3'	370 bp	This study
	LMr-5'-CGCTGAAGGCCGTACCTAGGCAT-3'		



شکل ۴- علائم پیسک در *D.*

stramonium مایه‌زنی شده با جدایه ArMV

Fig. 4. Mottle symptom on *D. stramonium* inoculated with ArMV isolate



شکل ۳- علائم پیسک خفیف در

توتون *N. benthamiana* مایه‌زنی شده با

جدایه از لیلیوم CMV

Fig. 3. Mottle symptom on *N. benthamiana* inoculated with lilium CMV isolate



شکل ۵- علائم جدایه ArMV-Li روی سلمک سفید *Ch. quinoa*. (a) لکه‌های موضعی کلروتیک، (b) علائم رگبرگ روشنی، (c) علائم سیستمیک موزائیک سه هفته پس از مایه‌زنی.

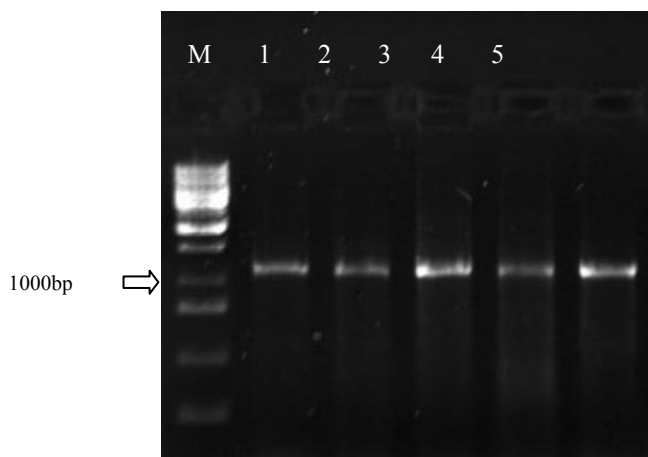
Fig. 5. Symptom induced by ArMV-Li on *Ch. quinoa*: (a) Chlorotic local lesions; (b) Vein clearing; (c) Systemic mosaic infection, three weeks after inoculation.

پس از تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی سه جدایه ArMV با استفاده از آغازگرهای طراحی شده توسط ژنگ و همکاران (Zheng *et al.*, 2013)، یک قطعه DNA به طول حدود ۶۹۰ جفت باز در تمام جدایه‌های مورد بررسی تکثیر گردید (شکل ۸). طول این قطعه با اندازه مورد انتظار مطابق بوده و در نمونه شاهد سالم نیز چنین قطعه‌ای تشکیل نگردید. ناحیه ژن پروتئین پوششی سه جدایه ویروس پیسک لیلیوم (LMoV) با استفاده از آغازگرهای طراحی شده توسط لیم و همکاران (Lim *et al.*, 2009) تکثیر شد. طی واکنش RT-PCR یک قطعه DNA بطول حدود ۶۵۰ جفت باز در تمام جدایه‌های مورد بررسی تکثیر گردید (شکل ۹). طول این قطعه با اندازه مورد انتظار مطابق بوده و در نمونه شاهد سالم نیز چنین قطعه‌ای تشکیل نگردید. همچنین به عنوان آزمون تاییدی، با استفاده از جفت آغازگرهای LMr و LMf (طراحی شده در این تحقیق)، یک قطعه DNA به طول مورد انتظار حدود ۳۷۰ جفت باز طی آزمون RT-PCR در سه جدایه فوق تکثیر شد. بر اساس نتایج حاصل از آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس LSV، هیچ قطعه DNA تکثیر نشد.



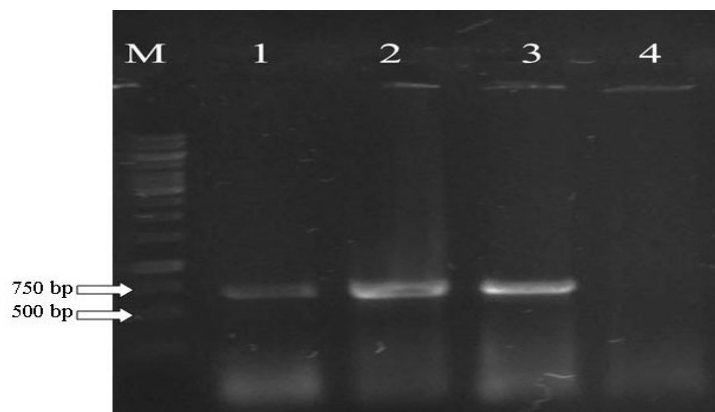
شکل ۶- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی زیرگروه I ویروس موزائیک خیار (CMV Subgroup I). ستون M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون ۱ و ۲: شاهد سالم، ستون‌های ۳ تا ۷: جدایه‌های CMV از لیلیوم، ستون ۸: شاهد آلوده. در همه نمونه‌های با واکنش مثبت (آلوده به CMV) یک قطعه DNA با اندازه مورد انتظار حدود ۶۰۰ جفت‌باز تکثیر گردید.

Fig. 6. Gel electrophoresis of RT-PCR products amplified using specific primers of subgroup I-CMV. Lane M: 100 bp ladder (Fermentas, Lithuania); lanes 1 and 2: negative control; lanes 3 to 7: CMV isolates from lily; lane 8: positive control. A DNA fragment with expected size about 600 bp was amplified in all CMV infected samples.



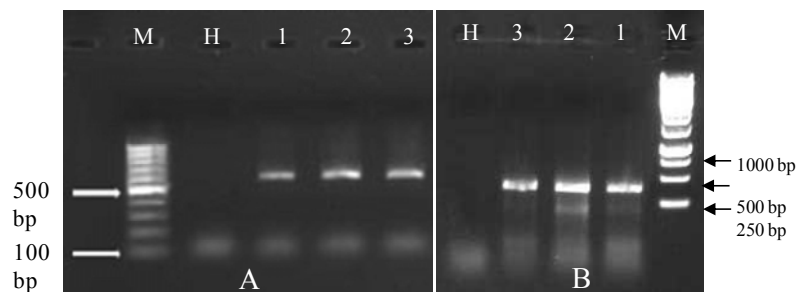
شکل ۷- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی CMV. ستون M: نشانگر وزن مولکولی یک کیلو جفت بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون ۱: شاهد مثبت، ستون‌های ۲ تا ۵: تکثیر قطعه DNA به اندازه حدود ۱۱۰۰ جفت باز مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی جدایه‌های CMV به دست آمده از لیلیوم.

Fig. 7. Gel electrophoresis of RT-PCR products amplified using specific primers of coat protein gene of CMV. Lane M: 1kbp ladder (Fermentas, Lithuania); lane 1: positive control; lanes 2 to 5: a DNA fragment about 1100 bp from coat protein was amplified in the samples infected with CMV.



شکل ۸- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی ArMV. ستون M: نشانگر وزن مولکولی یک کیلو بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون ۱: شاهد آلوده، ستون ۴: شاهد سالم، ستون‌های ۲ و ۳: تکثیر قطعه DNA به اندازه حدود ۶۹۰ جفت باز مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ArMV از لیلیوم.

Fig. 8. Gel electrophoresis of RT-PCR products amplified using specific primers of coat protein gene of ArMV. Lane M: 1 kbp ladder (Fermentas, Lithuania); lane 1: positive control; lanes 2 and 5: a DNA fragment about 690 bp of coat protein gene was amplified in lilium samples infected with ArMV; Lanes 3 and 4: negative control.



شکل ۹- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش RT-PCR. A: نتایج به دست آمده با استفاده از جفت آغازگر LMoV1 و LMoV2 اختصاصی ناحیه ژن پروتئین پوششی ویروس LMoV. ستون M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون H: شاهد سالم، ستون‌های ۱ تا ۳: نمونه‌های لیلیوم آلوده به LMoV. در همه نمونه‌های با واکنش مثبت (آلوده) یک قطعه DNA با اندازه مورد انتظار حدود ۶۵۰ جفت‌باز تکثیر گردید. B: نتایج به دست آمده با استفاده از جفت آغازگر LMf و LMr اختصاصی ناحیه ژن پروتئین پوششی LMoV. ستون M: نشانگر وزن مولکولی یک کیلو جفت‌بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون H: شاهد سالم، ستون‌های ۱ تا ۳: نمونه‌های لیلیوم آلوده به LMoV. در همه نمونه‌های با واکنش مثبت (آلوده) یک قطعه DNA با اندازه مورد انتظار حدود ۳۷۰ جفت‌باز تکثیر گردید.

Fig. 9. Gel electrophoresis of RT-PCR products amplified using specific primers of coat protein gene of LoMV. A: RT-PCR results using LMoV1 and LMoV2 primers, Lane M: 100bp ladder (Fermentas, Lithuania); lane H: negative control; Lanes 1 to 3: Lilium samples infected with LMoV. All LoMV infected samples resulted to amplification of a DNA fragment with expected size about 650 bp in length. B: RT-PCR results using LMf and LMr primers, Lane M: 1 kbp ladder (Fermentas, Lithuania); lane H: negative control; Lanes 1 to 3: Lilium samples infected with LMoV. All LoMV infected samples resulted to amplification of a DNA fragment with expected size about 370 bp in length.

بحث

گل شاخه بریده لیلیوم یکی از مهم‌ترین محصولات باغی و زینتی در استان تهران می‌باشد. ویروس‌ها از مهم‌ترین عوامل ایجاد آلودگی در این گیاه زینتی هستند، به علاوه آلودگی همزمان با چند ویروس، کیفیت گل‌ها و بازارپسندی آن‌ها را کاهش می‌دهد و از ارزش اقتصادی آن به میزان قابل توجهی می‌کاهد (Bellardi *et al.*, 2002). در این بررسی آلودگی ویروسی لیلیوم در واحدهای تولیدی چهار شهرستان پاکدشت، آبسرد، دماوند و ورامین در استان تهران با استفاده از روش‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. در بازدیدهای انجام شده از گلخانه‌های تولید لیلیوم، در یک گلخانه در منطقه دماوند در سالن کشت پیازچه‌های وارداتی همان سال از خارج (عمدتاً از هلند) علائم موزائیک و پیسک به ندرت مشاهده شد و چند مورد از سبزدی، موزائیک و پیسک و یک مورد کوتولگی، موزائیک و نکروز در یک بوته مشاهده شد. در همین گلخانه در سالن‌های حاصل از کشت نسل‌های بعدی پیازچه‌های لیلیوم، درصد بوته‌های علائم‌دار بیشتر بوده و در یکی از سالن‌های کشت پیازچه‌های نسل چهارم تا ۳۰ درصد بوته‌ها دارای علائم پیسک، موزائیک و نکروز برگی بودند. گیاه لیلیوم به دلیل تکثیر رویشی از طریق پیازچه، مستعد توسعه و اشاعه بیماری‌های ویروسی می‌باشد (Asjes, 2000). در صورت آلودگی گیاه مادری به ویروس، پیازچه‌های دختری حاصل از آن نیز دارای آلودگی ویروسی خواهند بود. در این بررسی نیز روند افزایشی درصد آلودگی ویروسی با افزایش نسل‌های لیلیوم‌های تکثیری به خوبی در گلخانه‌های مورد بازدید در استان تهران مشاهده شد. این موضوع همچنین موجب افزایش درصد آلودگی‌های توام (آلودگی همزمان به بیش از یک ویروس در یک گیاه) می‌گردد. بررسی‌های به عمل آمده توسط محققان دیگر نشان داده است که شدت خسارت در آلودگی توام به چند ویروس در گیاه لیلیوم بیش‌تر از خسارت آلودگی تکی می‌باشد (Pecchioli *et al.*, 2010).

نتایج آزمون سرولوژیکی با استفاده از روش الیزا نشان‌دهنده شیوع آلودگی ویروس موزائیک خیار و ویروس موزائیک آرابیس در نمونه‌های علائم‌دار برداشت شده بود. از مجموع ۷۶ نمونه علائم‌دار، ۵۷ نمونه (۷۵ درصد) حداقل به یکی از ویروس‌های CMV، ArMV و LMoV آلودگی داشتند. ویروس‌های موزائیک خیار و موزائیک آرابیس به ترتیب با ۵۹/۲ و ۳/۹ درصد دارای بیش‌ترین آلودگی بودند. سنتی و غیرفنی بودن غالب سازه‌های ساختمانی سالن‌های پرورش لیلیوم و از طرفی سهولت انتقال CMV از طریق شته‌ها به روش ناپایا و دامنه میزبانی وسیع آن، بالا بودن درصد آلودگی این ویروس در این بررسی را می‌تواند توجیه نماید. آلودگی همزمان دو ویروس ArMV و CMV در پنج نمونه (۶/۵۷ درصد) ردیابی گردید (جدول ۱). در این لیلیوم‌ها علائم بیماری شدیدتر بوده و روی برگ‌های آلوده لکه‌های بافت مرده تقریباً کل پهنک برگ را در بر گرفته بود. در تعداد بیست نمونه، احتمال آلودگی با LSV و LMoV با روش مولکولی RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت که چهار نمونه آلوده به LMoV تشخیص داده شدند ولی در هیچ‌یک از نمونه‌های مورد بررسی آلودگی با ویروس بدون علائم لیلیوم (LSV) ردیابی نگردید. چهار نمونه آلوده با LMoV دارای آلودگی توام با CMV نیز بودند. بر این اساس در این تحقیق مجموعاً تعداد نه نمونه (۱۱/۸٪) دارای آلودگی توام به بیش از یک ویروس (پنج نمونه CMV+ArMV و چهار نمونه CMV+LSV) بودند. تکثیر رویشی این گیاه از طریق پیازچه یکی از دلایل بالا بودن نسبی احتمال بروز آلودگی‌های ویروسی توام در آن می‌باشد (Pecchioli *et al.*, 2010). این اولین گزارش آلودگی ویروسی CMV از لیلیوم در ایران می‌باشد. عوامل متعددی از جمله سلامت پیازچه‌های اولیه مورد کشت، زمان و نحوه نمونه‌برداری، تفاوت در مدیریت گلخانه بویژه از نظر کنترل اصول بهداشت گلخانه و مبارزه با ناقلین و نیز نوع ارقام لیلیوم مورد کشت می‌تواند در ایجاد تفاوت در فراوانی علائم و نیز آلودگی ویروسی تاثیر گذار باشند. چنین حالتی در مورد برخی کمپلکس‌های ویروس-میزبان دیگر از جمله ویروس Y سیب‌زمینی در برخی مناطق مشاهده و گزارش شده است (Loebenstein *et al.*, 2001).

در این تحقیق در نوزده نمونه با علائم مشکوک به آلودگی ویروسی از جمله رگبرگ روشنی و موزائیک، آلودگی به ویروس‌های مورد بررسی ردیابی نشد. این موضوع احتمال حضور دیگر ویروس‌های بیمارگر لیلیوم (Bellardi *et al.*, 2002) در این نمونه‌ها را مطرح می‌نماید که نیازمند بررسی‌های تکمیلی می‌باشد. همچنین عدم ردیابی آلودگی ویروسی در برخی از نمونه‌ها به ویژه نمونه‌های علائم‌دار می‌تواند علاوه بر عللی که در بالا اشاره شد مربوط به دخالت سایر عوامل بیماری‌زای غیرویروسی و یا شرایط محیطی باشد. به عبارت دیگر با توجه به محدود بودن تعداد نمونه‌های مورد آزمون در این بررسی و از طرفی تعدد عوامل بیماری‌زای ویروسی گزارش شده از روی لیلیوم در دنیا مانند TBV و LXV، ضرورت دارد تا حضور عوامل ویروسی بیمارگر دیگر در مناطق فوق مورد بررسی دقیق قرار گیرد. از مهم‌ترین ناقل‌های ویروس‌های لیلیوم می‌توان به شته‌های *Mysus persicae*، *Macrosiphum euphorbiae* و *Aphis fabae* اشاره نمود (Ortego *et al.*, 2004). در بازدیدهای انجام شده در گلخانه‌های مورد نمونه‌برداری در این تحقیق، در برخی سالن‌های پرورش لیلیوم تعدادی شته اکثراً از نوع شته سبز هلو مشاهده شدند. این شته‌ها همچنین در پوشش گیاهی اطراف خارج گلخانه روی علف‌های هرز و نیز گیاهان زینتی مستقر در این فضاها مشاهده شدند. برنامه کنترل ناقلین در بین کشاورزان تولید کننده لیلیوم منسجم و یکنواخت نیست که همین موضوع، افزایش میزان آلودگی‌های ویروسی را طی چند نسل کشت ازدیادی پیازهای لیلیوم موجب می‌گردد. بنابراین برای جلوگیری از گسترش آلودگی ویروسی، لازم است برنامه‌هایی جهت مبارزه با ناقلین به طور جدی پیگیری شود (Asjes and Blom-Barnhoorn, 2002).

بر اساس نتایج مطالعه دامنه میزبانی، جدایه‌های CMV لیلیوم تنها منجر به تولید علائم خفیف پيسک در توتون *N. benthamiana* گردیدند و در دیگر میزبان‌های مورد آزمایش علائمی مشاهده نشد که بررسی سرولوژیک نیز تایید کننده عدم آلودگی آن‌ها بود. ویروس موزائیک خیار دارای دامنه میزبانی وسیعی است و تاکنون سویه‌های بسیار زیادی از

این ویروس گزارش شده‌اند (Palukaitis and García-Arenal, 2003). البته مشخص شده است که جدایه‌های این ویروس از لیلیوم در مقایسه با جدایه‌های آن از دیگر گیاهان، دارای دامنه میزبانی محدودی می‌باشند که این موضوع می‌تواند مربوط به تکامل اختصاصی این ویروس با گیاهان جنس لیلیوم باشد (Lee et al., 1996; Yamaguchi et al., 2005). علاوه بر *N. benthamiana* برخی دیگر از گیاهان محک توتون از جمله *N. glutinosa* نیز به عنوان میزبان جدایه‌های CMV از لیلیوم گزارش شده‌اند (Lee et al., 1996). تعیین توالی RNA3 و ژن پروتئین پوششی نشان دهنده تشابه بالای توالی جدایه‌های این ویروس از فرانسه، هلند و تایوان با یکدیگر بوده است. این نتایج نشان دهنده تشابه بالای جدایه‌های CMV از لیلیوم بدون در نظر گرفتن منشا جغرافیایی این جدایه‌ها است (Yamaguchi et al., 2005).

بر اساس نتایج آزمون الایزا، از ۷۶ نمونه علائم‌دار لیلیوم مورد بررسی در این تحقیق، هشت نمونه (شامل سه نمونه به طور تکی و پنج نمونه به طور توأم با سایر ویروس‌ها) دارای آلودگی به ویروس موزائیک آرابیس بودند. وجود آلودگی به ArMV با استفاده از آزمون مولکولی RT-PCR نیز مورد تایید قرار گرفت. این ویروس یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زا در بسیاری از گیاهان زارعی، باغی و زینتی است که به عنوان یکی از قدیمی‌ترین بیمارگرهای مو نیز در دنیا شناخته شده است (López-Fabuel et al., 2013; Sanfaçon et al., 2009). ویروس موزائیک آرابیس، دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده (Murant, 1970) و جدایه‌های آن از نظر بیمارگری، شدت بیماری‌زایی و دامنه میزبانی با یکدیگر متفاوت هستند. بنابراین بقای مایه ویروسی در میزبان‌های چند ساله و نیز در اندام‌های ازدیاد رویشی مانند پیاز لیلیوم طی مرحله خواب (dormant)، منبع خوبی برای گسترش آلودگی محسوب شده و در صورت وجود نماتدهای ناقل Longidorid دسترسی آن‌ها را به منبع آلودگی فراهم می‌نماید. جدایه‌های ArMV از لیلیوم در این تحقیق، در مطالعه دامنه میزبانی تفاوت مشهودی با یکدیگر نشان ندادند. این جدایه‌ها منجر به بروز آلودگی سیستمیک در اکثر میزبان‌های مورد بررسی در خانواده‌های *Chenopodiaceae*، *Amaranthaceae* و *Cucurbitaceae* شدند، هر چند شدت علائم در برخی میزبان‌ها متفاوت بود (جدول ۲). این اولین گزارش از آلودگی ArMV از لیلیوم در ایران می‌باشد.

اگرچه استفاده از روش‌های سرولوژیک یک روش معمول در ردیابی ویروس‌هاست، ولی در صورت پایین بودن غلظت ویروس، تشخیص ویروس به کمک این روش امکان‌پذیر نمی‌باشد. همچنین ردیابی ویروس در پیازهای در حال خواب گیاه با روش معمول الایزا به سختی امکان‌پذیر است (Derks et al., 1997). در حالی‌که پس از رویش برگ‌ها و نیز در زمان گلدهی به دلیل افزایش غلظت، ویروس به خوبی قابل ردیابی توسط روش الایزا می‌باشد. در مقایسه استفاده از روش مولکولی RT-PCR با حساسیت بیش‌تری ردیابی ویروس‌ها را امکان‌پذیر می‌نماید (Sato et al., 2002). ویروس پیسک لیلیوم (LMoV) نیز یکی از پوتی‌ویروس‌های الوده‌کننده لیلیوم است که از بسیاری از کشورهای آسیایی، استرالیا، اروپا و ایالات متحده گزارش شده است (Asjes, 1998). در این بررسی، آلودگی به ویروس LMoV در چهار نمونه (۵/۳ درصد) از لیلیوم‌های جمع‌آوری شده از آبرد و دماوند با استفاده از آزمون RT-PCR و به کارگیری دو جفت آغازگر اختصاصی مورد ردیابی قرار گرفت. این ویروس قبلاً از کشورهای آسیایی، استرالیا، اروپا و ایالات متحده گزارش شده است (Asjes, 1998) ولی این اولین گزارش از وقوع آلودگی به LMoV در لیلیوم زینتی از ایران می‌باشد. در این تحقیق، لیلیوم‌های آلوده با LMoV دارای آلودگی همزمان با CMV نیز بودند. همان‌طور که قبلاً هم گزارش شده است، شدت علائم در صورت آلودگی همزمان روی لیلیوم بسیار شدیدتر است (Asjes, 1998). در این بررسی آلودگی همزمان ویروس‌های CMV و ArMV با ۶/۶ درصد و ویروس‌های CMV با LMoV با ۵/۳ درصد در نمونه‌های لیلیوم با علائم نسبتاً شدید ردیابی گردید (جدول ۱).

علی‌رغم گسترش کشت و پرورش این گیاه زینتی، تولید پیاز سالم لیلیوم در کشور گسترش نیافته و پیاز این گیاه عمدتاً از هلند وارد کشور می‌شود. تولید کنندگان لیلیوم پس از کشت پیازهای وارداتی، آن‌ها را تکثیر و برای کشت مجدد مورد استفاده قرار می‌دهند. پیازهایی که از هلند وارد می‌شوند، علی‌رغم اعمال مقررات سختگیرانه قرنطینه‌ای به

هر حال می‌توانند دارای درصد ولو بسیار اندک از آلودگی‌های ویروسی باشند. بر اساس گزارش موسسه حفظ نباتات مدیترانه و اروپا (The European and Mediterranean Plant Protection Organization) میزان آلودگی مورد قبول در پیاز لیلیوم در مورد ویروس بدون علائم لیلیوم (LSV) و ویروس پیسک لیلیوم (LMOV) به ترتیب کم‌تر از ۱۰ و یک درصد آلودگی در نسل دوم پیازهای تکثیری حاصل از کشت بافت در نظر گرفته شده است که عدم رعایت نکات بهداشت زراعی در روند تکثیر نسل‌های بعدی منجر به افزایش آلودگی ویروسی در پیازهای تولیدی جدید می‌شود (Wei et al., 2012, Chinestra et al., 2010). در شهرستان دماوند، تولیدکنندگان گل ضمن استفاده از پیازهای خود از پیازهای وارداتی جدید از هلند هم استفاده می‌کنند و به این ترتیب احتمال انتقال آلودگی بین گیاهان نسل‌های مختلف بویژه نسل‌های جدید افزایش می‌یابد. این اولین گزارش از وقوع آلودگی‌های ویروسی ArMV، CMV و LMOV از گیاه لیلیوم در ایران می‌باشد و بر اساس نتایج حاصله سنجش آلودگی‌های ویروسی در پیازهای لیلیوم تولیدی کشور و صدور گواهی سلامت برای آن‌ها مورد توصیه می‌باشد.

References

- Allen, T.C. 1972. *Lily symptomless virus*. Description of Plant Viruses, Number 96 ([http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php? dpvno=96](http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=96), website verified February 2011).
- Anonymous. 2009. A Statistical Glance at 2010 Agriculture in Iran. Deputy of Planning and Economy, Statistics and Information Technology Office, Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran.
- Asjes, C.J. 1998. Data Sheet on *Lily symptomless carlavirus* for CABI Crop Protection Compendium. CABI Information, Wallingford, Oxon, UK.
- Asjes, C.J. 2000. Control of aphid-borne *Lily symptomless virus* and *Lily mottle virus* in *Lilium* in the Netherlands. *Virus Research* 71: 24-25.
- Asjes, C.J. and Blom-Barnhoorn, G.J. 2002. Control of aphid vector spread of *Lily symptomless virus* and *Lily mottle virus* by mineral oil/insecticide sprays in *Lilium*. *Acta Horticulturae* 570: 277-281.
- Asjes, C.J. and Segers, L.C. 1983. Incidence and control of necrotic leaf mosaic caused by *Arabis mosaic virus* in *Lilium tigrinum splendens* in the Netherlands. *Phytopathology* 196: 115-126.
- Bellardi, M.G., Nanni, G. and Bertaccini, A. 2002. Old and new viruses of lily in Italy. *Acta Horticulturae* 568: pp. 215-220.
- Blake, M.R. and Wilson, C. R. 1996. Significance of secondary infections with *Lily symptomless carlavirus* to cut flower production of *Lilium*. *Annals of Applied Biology* 129: 39-45.
- Card, S.D., Pearson, M.N. and Clover, G.R.G. 2007. Plant pathogens transmitted by pollen. *Australasian Plant Pathology* 36: 455-461
- Chen, Sh., Gu, H., Wang, X., Chen, J. and Zhu, W. 2011. Multiplex RT-PCR detection of *Cucumber mosaic virus* subgroups and Tobamoviruses infecting tomato using 18S rRNA as an internal control. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 43: 465-471.
- Chen, Y.K., Derks, A.F., Langeveld, S., Goldbach, R. and Prins, M. 2001. High sequence conservation among cucumber mosaic virus isolates from lily. *Archives of Virology* 146: 1631-1636.
- Chinestra, S.C., Facchinetti, C.F., Curvetto, N.R. and Marinangeli, P.A. 2010. Detection and frequency of lily viruses in Argentina. *Plant Disease* 94: 1188-1194.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 474-483.
- Derks, A.F.L.M. 1988. Symptomen van tulpemozaiekvirus. *Vakwerk* 62: 13-15.
- Derks, A.F.L.M. 1995. Lily. PP. 313-321. In: Loebenstein, G., Lawson, R. H. and Brunt, A. A. (eds.) *Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Derks, A.F.L.M., Lemmers, M.E.C. and Hollinger, T.C. 1997. Detectability in lily bulbs depends on virus, host and storage conditions. *Acta Horticulturae* 430: 633-640.
- Lee, K.H., Choi, H.S., Choi, G.S. and Kim, J. S. 1996. Virus diseases of lilies in Korea. *Acta Horticulturae* 414: 195-201.
- Lim, J.H., Bae, E.H. , Lee, Y.J., Park, S.H., Lee, K.J., Kim, S.R.M. and Jung, Y.T. 2009. Detection of *Lily symptomless virus*, *Lily mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* from *lilium* grown in Korea by RT-PCR. *Korean Journal of Microbiology* 45: 251-256.

- Loebenstein, G., Berger, Ph., Brunt, A., Lawson, R.H. 2001.** Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. 460pp.
- López-Fabuel, I., Olmos, A., Bassler, A., Dupuis-Maguiraga, L., Torres, L. B., Bertolini, E. and Wetzl, T. 2013.** Molecular analysis of the genomic RNAs 1 and 2 of the first *Arabid mosaic virus* isolate detected in Spanish grapevines. Spanish Journal of Agricultural Research 11: 199-203.
- 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.
- Masuta, C., Seshimo, Y., Mukohara, M., Jung, H.J., Ueda, S., Ryu, K.H. and Choi, J.K. 2002.** Evolutionary characterization of two lily isolates of *Cucumber mosaic virus* isolated in Japan and Korea. Journal of Genetics and Plant Pathology 68: 163-168.
- Murant, A.F. 1970.** *Arabid mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No 16. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.
- Nimii, Y., Gondaira, T., Kutsuwanda, Y. and Tsuji, H. 1999.** Detection by ELISA and DBIA test of *Lily symptomless virus* (LSV), *Tulip breaking virus-lily* (TBV-lily) and *Cucumber mosaic virus* in *Lilium* spp. grown in the field. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 68: 176-183, In Japanese with English summary.
- Ortego, J., Difabio, M.E. and Mier Durante, M.P. 2004.** New records and actualized check list of aphids (Hemiptera: Aphididae) from Argentina. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 63: 19-30.
- Palukaitis, P. and Garcia-Arenal, F. 2003.** Cucumoviruses. Advances in Virus Research 62: 241-323.
- Pecchioli, S., Grassotti, A., Rizzo, D., Stefani, L., Paoli, M., Nesi, B. and Lazzereschi, S. 2010.** Biotechnological approaches for identification of the main viruses in lily. Proceeding of the II International Symposium on the Genus *Lilium*. Tuscany, Italy, pp. 339-345.
- Pourrahim, R., Ahoomanesh, A., Farzadfar, Sh. and Rakhshandehro, F. 2004.** Occurrence of *Arabid mosaic virus* and *Grapevine leaf roll associated virus-3* on grapevines in Iran. Journal of Plant Disease 88: 424.1-424.1
- Raju, B.C. and Olsen, C.J. 1985.** Indexing systems for producing clean stock for disease control in commercial floriculture. Plant Diseases 69: 189-192.
- Rakhshandehroo, F., Zamanizadeh, H., Modarresi, A. and Hajmansour, SH. 2006.** Occurrence of *Prunus necrotic ring spot virus* and *Arabid mosaic virus* on Rose in Iran. Plant Disease 90: 975-976.
- Sanfaçon, H., Wellink, H., Le Gall, O., Karasev, A., van der Vlugt, A. and Wetzl, T. 2009.** *Secoviridae*: A proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. Archives of Virology 54: 899-907.
- Sato, H., Hagiwara, K., Nakamura, S., Morikawa, T., Honda, Y. and Omura, T. 2002.** A comparison of sensitive and specific methods for the detection of *Lily mottle virus* in lily plants. Journal of Phytopathology 150: 20-24.
- Schouten, R.T.J., van Aanholt, H. and Vlaming, E., 1997.** LSV in oriental lilies. Schdelijkheid symptomloos lelivirus (LSV) gekwantificeerd. Vakwerk 71: 50-51.
- Sharma, A., Mahinghara, B.K., Singh, A.K., Kulshrestha, S., Raikhy, G., Singh, L., Verma, N., Hallan, V., Ram, R. and Zaidi, A.A. 2005.** Identification, detection and frequency of lily viruses in Northern India. Scientia Horticulturae 106: 213-227.
- Singh, A.K., Mahinghara, B.K., Hallan, V., Ram, R. and Zaidi, A.A. 2008.** Recombination and phylogeographical analysis of *Lily symptomless virus*. Virus Genes 36: 421-427.
- Wei, T., Lebas, B. S.M., Shiller, J.B., Quinn, B.D. and Clover, G.R.G. 2012.** Detection of five viruses infecting dormant bulbs by TaqMan-based real-time RT-PCR. Australian Journal of Plant Pathology 41: 93-98.
- Yamaguchi, N., Seshimo, Y. and Masuta, C. 2005.** Mapping the sequence domain for systemic infection in edible lily on the viral genome of *Cucumber mosaic virus*. Journal of General Plant Pathology 71: 373-376.
- Zheng, H.Y., Chen, J., Zhao, M.F., Lin, L., Chen, J.P., Antoniw, J.F. and Adams, M.J. 2003.** Occurrence and sequences of *Lily mottle virus* and *Lily symptomless virus* in plants grown from imported bulbs in Zhejiang province, China. Archives of Virology 148: 2419-2428.
- Zheng, Y., Zhang, W., Lu, X., Zhang, G., Wang, H., Zhang, X., Feng, J. and Long, H. 2013.** Specific and rapid detection of *Lily symptomless virus* and *Arabid mosaic virus* in lily by dual IC-RT-PCR. Journal of Phytopathology 161: 823-827.