

بررسی وقوع برخی بیماری‌گرهای مهم ویروسی آلوده کننده فلفل در شهرستان ورامین

Study on the occurrence of some important viral pathogens infecting pepper in Varamin area

آذین آقازاده^۱، مزده ملکی^۲ و علیرضا گل‌نراقی^۳

پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۱۲

دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۰

چکیده

در فصل‌های زراعی ۹۳-۱۳۹۱ از مناطق مختلف شهرستان ورامین، ۱۱۰ نمونه فلفل و ۱۱ نمونه علف هرز با علائم مشکوک به آلودگی ویروسی جمع‌آوری شد و با روش سرولوژیکی الایزا به کمک آنتی‌بادی‌های ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV)، ویروس ایکس سیب‌زمینی (PVX)، ویروس موزاییک خیار (CMV)، ویروس موزاییک توتون (TMV) و ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی (ToMV) مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین آلودگی نمونه‌ها به پوتی‌ویروس‌ها به کمک آنتی‌بادی وسیع‌الطیف این دسته از ویروس‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج الایزا، بیش‌ترین آلودگی ویروسی در نمونه‌های فلفل مربوط به TMV ۲۶/۷ درصد و سپس پوتی‌ویروس‌ها ۲۴/۳ درصد، TYLCV ۲۳/۸ درصد، CMV ۱۳/۳ درصد، ToMV ۱۳/۳ درصد و PVX ۱/۹ درصد بود. نتایج نشان داد که تقریباً ۶۴/۱ درصد از نمونه‌های برگ فلفل به ویروس‌هایی منتقل شونده با حشرات ناقل و ۳۴/۵ درصد به ویروس‌های فاقد ناقل شناخته شده آلوده بودند. همچنین، ۲۱ درصد و ۷۷ درصد از نمونه‌ها به ترتیب آلودگی ویروسی منفرد و توأم داشتند. در این تحقیق، آلودگی توباموویروسی و پوتی‌ویروسی نمونه‌ها توسط آزمون RT-PCR به ترتیب با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی قبلاً توصیف شده Tob-Uni1/Tob-Uni2 و Nib2F/Nib3R و با تکثیر قطعات DNA مورد نظر (به ترتیب با اندازه ۸۰۰ و ۳۵۰ جفت‌باز) تأیید گردید. به‌علاوه، حضور TYLCV در نمونه‌های مثبت الایزا با تکثیر قطعات DNA با اندازه مورد انتظار ۶۷۰ جفت‌باز در آزمون PCR به کمک آغازگر-های اختصاصی این ویروس شامل TYLCV-Sar و TYLCV-Isr تأیید شد. این مطالعه، نشان‌دهنده وقوع گسترده ویروس‌های مختلف به ویژه توباموویروس‌ها و پوتی‌ویروس‌ها در مزارع فلفل شهرستان ورامین بود. در این تحقیق، آلودگی پوتی‌ویروسی گیاه نیلوفر پیچ (*Ipomoea purpurea*) نیز به اثبات رسید.

واژگان کلیدی: ویروس‌های فلفل، آزمون الایزا، آغازگرهای عمومی، پوتی‌ویروس‌ها، توباموویروس‌ها.

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین

۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیماری‌شناسی، تهران
نویسنده مسئول مکاتبات: mojdehmaleki@yahoo.com

مقدمه

فلفل (*Capsicum annuum* L.) یکی از مهم‌ترین سبزیجات در جهان است. مکزیک و پرو اولین کشورهای بودند که کاشت این گیاه را رواج دادند (Bosland and Votata, 1999). براساس آمار سازمان خواروبار جهانی (FAO) در سال ۲۰۱۲، حدود ۳۱۱۷۱۵۶۷ تن فلفل سبز تازه از ۱۹۱۴۶۸۵ هکتار در سطح جهان برداشت شده است. در این بین، ایران با سطح زیر کشت ۳۰۰۰ هکتار و تولید ۵۲۰۰۰ تن فلفل سبز تازه، به ترتیب، رتبه ۳۸ و ۳۶ را در جهان در اختیار دارد (Anonymous, 2012). در ایران، گیاه فلفل در بسیاری از استان‌های کشور به صورت مزرعه‌ای یا گلخانه‌ای کشت می‌شود. در مجموع، میزان کشت فلفل گلخانه‌ای حدود دو درصد سطح کشت گلخانه‌ای کشور را شامل می‌گردد. مشابه دیگر محصولات زراعی، این گیاه نیز در برابر آلودگی به چندین ویروس گیاهی حساس است (Hartman *et al.*, 1999). بیش از ۴۰ ویروس یا سویه متعلق به جنس‌ها و خانواده‌های مختلف می‌توانند فلفل را به صورت طبیعی و آزمایشی آلوده نمایند. ژنوم این ویروس‌ها از نوع RNA یا DNA می‌باشد. فلفل از میزبان‌های مهمی است که بیماری‌های ویروسی می‌توانند کیفیت و کمیت آن را به‌طور قابل توجهی کاهش دهند (Vargas *et al.*, 2011). به عنوان مثال، ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus-CMV*) کیفیت محصول فلفل را مشخصاً و میزان محصول را ۶۰ تا ۱۰۰ درصد به خصوص در صورت آلودگی گیاه در مراحل اولیه رشد کاهش می‌دهد (George *et al.*, 1995؛ Deol and Rataul, 1978). همچنین، ویروس موزاییک توتون (*Tobacco mosaic virus-TMV*) نیز یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های فلفل محسوب می‌شود که در آلودگی در مراحل اولیه رشد، تا ۸۰ درصد به این گیاه خسارت وارد می‌کند (Feldman *et al.*, 1969).

با توجه به سطح کشت و میزان تولید فلفل در کشور و نیز اهمیت بیماری‌های ویروسی در کاهش بازپسندی و یا کاهش محصول، مطالعه و بررسی ویروس‌های آلوده کننده فلفل در کشور از اهمیت بالایی برخوردار است. از بین ویروس‌های آلوده کننده فلفل در جهان، تاکنون ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus-TYLCV*)، ویروس موزاییک خیار (*CMV*)، ویروس موزاییک توتون (*TMV*)، ویروس حلقه زرد میوه گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow fruit ring virus-TYFRV*)، ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y-PVY*)، ویروس موزاییک یونجه (*Alfalfa mosaic virus-AMV*) و ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی (*Tomato mosaic virus-ToMV*) روی این محصول در کشور گزارش شده‌اند (منوچهری، ۱۳۴۷؛ آهون‌منش و همکاران، ۱۳۶۸؛ Kaiser *et al.*, 1971؛ Mostafae *et al.*, 2012؛ Golnaraghi *et al.*, 2013؛ Shirazi *et al.*, 2014).

شهرستان ورامین در ۴۰ کیلومتری جنوب شرقی تهران، دارای ۷۰۰۰۰ هکتار سطح زیر کشت انواع گیاهان زراعی و باغی است و بنابراین یکی از قطب‌های کشاورزی استان تهران محسوب می‌شود. سطح زیر کشت محصولات سبزی و صیفی در شهرستان ورامین ۴۹۷/۲ هکتار است. همچنین میزان تولید فلفل این شهرستان در سال ۱۳۹۱، حدود ۱۲۰ تن اعلام شده است. از میان ویروس‌های گزارش شده از فلفل در کشور، تاکنون ویروس‌های PVY، TYLCV و TYFRV در منطقه ورامین از این گیاه گزارش شده‌اند (Mostafae *et al.*, 2012؛ Golnaraghi *et al.*, 2013؛ Shirazi *et al.*, 2014).

به رغم اهمیت منطقه ورامین در کشت و تولید سبزیجات، از جمله فلفل، تاکنون مطالعات کمی در خصوص ویروس‌های آلوده کننده این گیاه انجام شده است. از این رو در این تحقیق، وقوع ویروس‌های مهم آلوده کننده فلفل (متعلق به جنس‌های مختلف ویروسی شامل بگوموویروس، توباموویروس، پوتکس‌ویروس، پوتی‌ویروس و کوکوموویروس) در این منطقه به روش سرولوژیکی و یا مولکولی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. اطلاعات به دست آمده در این پژوهش، گامی مهم در تدوین برنامه‌های مدیریت بیماری‌های ویروسی این محصول محسوب می‌گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع و گلخانه‌های فلفل

طی فصول زراعی سال‌های ۹۱-۱۳۹۳، نمونه‌برداری از هشت مزرعه در مناطق مختلف شهرستان ورامین و نیز

یک گلخانه فلفل در منطقه فرون آباد این شهرستان صورت پذیرفت. در مزارع مورد بازدید، نمونه برداری به صورت حرکت زیگزاگ انجام گردید. در مجموع، ۱۱۰ نمونه برگ فلفل از گیاهان دارای علائم شبه ویروسی شامل موزائیک، بدشکلی برگ، کوتولگی، زردی، پیچیدگی برگ، لوله‌ای شدن برگ، رگبرگ روشنی و لکه‌های نکروزه جمع‌آوری گردید. به علاوه، ۱۱ نمونه برگ علائم‌دار از گیاهان علف هرز واقع در داخل یا اطراف مزارع مورد بازدید جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در داخل کیسه نایلونی قرار گرفته و روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌ها تا زمان بررسی با آزمون الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-ELISA)، به دو روش سیلیکاژل و فریزدراي خشک و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

آزمون سرولوژیکی الایزا

به منظور انجام آزمون سرولوژیکی الایزا، از آنتی‌بادی‌ها و نمونه‌های شاهد مثبت خریداری شده از شرکت بیوربا (سوئیس) استفاده گردید. آزمون الایزا برای ویروس‌های CMV، TMV، ToMV، TYLCV و ویروس ایکس سیب‌زمینی (*Potato virus X-PVX*) به کار گرفته شد. همچنین، برای ردیابی پوتی ویروس‌ها از آنتی‌بادی‌های وسیع‌الطیف این دسته از ویروس‌ها استفاده شد.

برای ردیابی سرولوژیکی ویروس‌های CMV، TMV، ToMV، PVX و TYLCV از آزمون الایزا مستقیم، به روش ساندویچ دوطرفه آنتی‌بادی-الایزا (DAS-) Double-Antibody Sandwich ELISA (Clark and Adams, 1977). ابتدا آنتی‌بادی اختصاصی (IgG) ویروس مورد نظر در بافر پوششی کربنات (شامل ۱۵ میلی‌مولار Na_2CO_3 ، ۳۵ میلی‌مولار NaHCO_3 و ۵ میلی‌مولار NaN_3 ، pH=۹/۶) رقیق شده (به نسبت ۱/۱۰۰) و به هر چاهک بشقابک الایزا (مکسول، چین)، ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول اضافه گردید. بشقابک‌ها یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌های برگ به نسبت یک به ۱۵ (وزن به حجم) با بافر عصاره‌گیری شامل سه میلی‌مولار KCl، سه میلی‌مولار NaN_3 ، هشت میلی‌مولار Na_2HPO_4 ، یک میلی‌مولار NaH_2PO_4 و ۰/۱۳ مولار NaCl، pH=۷/۴ (PBS)، حاوی دو درصد پلی‌وینیل پاپرولیدون (PVP-24000) و توفین-۲۰ به میزان ۰/۰۵ درصد عصاره‌گیری شده و عصاره‌ها داخل میکروتیوب منتقل گردیدند. این عصاره‌ها به مدت ده ثانیه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. عصاره‌ها، تا زمان آزمون در یخچال نگهداری شدند. پس از شستشوی بشقابک‌ها (سه مرتبه و هر بار پنج دقیقه) با بافر شستشو (محلول PBS حاوی Tween-20 ۰/۰۵ درصد: PBS-T)، محلول بلاکینگ چهار درصد آلبومین سرم-گاو (Bovine Serum Albumin-BSA) در PBS در چاهک‌های بشقابک الایزا (۱۰۰ میکرولیتر) ریخته و بشقابک‌ها به مدت دو ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. در مرحله بعد و پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی به هر چاهک اضافه شده و بشقابک‌ها به مدت یک شب در یخچال قرار داده شدند. پس از چهار بار شستشو مانند مرحله قبل، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (IgG-AP) در بافر کانتیوگیت (PBS) حاوی PVP-24000 ۲ درصد، Tween-20 ۰/۰۵ درصد، BSA به میزان ۰/۲ درصد و یک میلی‌مولار MgCl_2 ، pH=۷/۴ به نسبت ۱/۱۰۰ تهیه و به هر چاهک اضافه گردید. در این مرحله، بشقابک‌های الایزا به مدت سه ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از شستشوی بشقابک‌ها با بافر PBS-T، واکنش نمونه‌ها در برابر ویروس‌های مورد آزمون، با استفاده از محلول سوبسترا شامل یک میلی‌گرم نمک پارانیتروفنیل فسفات در یک میلی‌لیتر بافر سوبسترا (محلول ۰/۹ مولار دی‌اتانول آمین حاوی سه میلی‌مولار NaN_3 ، pH=۹/۸) ارزیابی گردید.

به منظور ردیابی سرولوژیکی پوتی ویروس‌های آلوده کننده فلفل، آزمون الایزا غیرمستقیم (Pathogen- Trapped Antibody ELISA (PTA-ELISA)) به کار گرفته شد (Movat and Dawson, 1987). در این روش، ابتدا عصاره‌گیری نمونه‌های برگ به نسبت یک به پنجاه (وزن به حجم) با بافر تجاری PTA (خریداری شده از شرکت بیوربا) انجام شد و عصاره‌ها در مقادیر ۱۰۰ میکرولیتری، درون چاهک‌های بشقابک الایزا ریخته شدند. پس از سپری شدن یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، بشقابک الایزا چهار بار و هر بار به فاصله پنج دقیقه شسته شد.

سپس IgG رقیق شده در بافر کانجوگیت (به نسبت ۱/۱۰۰۰) در چاهک‌های بشقابک الایزا ریخته شده و بشقابک‌ها به مدت زمان دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از شستشوی بشقابک‌ها، آنتی‌بادی بز ضد موش (Goat Anti-Mouse) متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز با رقت ۱/۱۰۰۰ در بافر کانجوگیت تهیه و در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری در هر چاهک ریخته شد. پس از نگهداری به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بشقابک الایزا شسته شد. اضافه کردن سوبسترا مانند روش قبل انجام گرفت.

در هر دو روش الایزا، میزان جذب نور هر چاهک بشقابک الایزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه Biotek (ELISA-reader، مدل ELX800، آمریکا) اندازه‌گیری گردید. سپس نمونه‌هایی که میزان جذب چاهک مربوطه آن‌ها یک ساعت پس از اضافه کردن سوبسترا، مساوی یا بیش از سه برابر میانگین جذب چاهک شاهد منفی (سالن) بود، به عنوان نمونه آلوده (مثبت) در نظر گرفته شدند. در این تحقیق، آلودگی نمونه‌های مثبت، مجدداً به کمک روش الایزا مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

استخراج RNA کل، رونوشت‌برداری برگردان و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR)

در این تحقیق و به منظور تأیید آلودگی توباموویروسی و پوتی‌ویروسی در نمونه‌ها، به ترتیب دوازده و نه نمونه مثبت الایزا توسط آزمون RT-PCR به کمک آغازگرهای عمومی توصیف شده قبلی شامل جفت آغازگرهای Tob-Uni1 و Tob-Uni2 (Letschert *et al.*, 2002)، Nib2F و Nib3R (Zheng *et al.*, 2010) مورد بررسی قرار گرفتند. تمام آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه، توسط شرکت متابیون (آلمان) ساخته شدند.

استخراج RNA کل گیاه (Total RNA)، با استفاده از محلول RNX plusTM، خریداری شده از شرکت سیناژن (ایران) و بر اساس روش پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده با تغییراتی انجام گرفت. تمام مراحل سانتریفوژ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام گردید. ابتدا مقدار ۰/۰۵ گرم از نمونه برگ خشک با استفاده از یک میلی‌لیتر از این محلول، عصاره‌گیری شده و محلول به دست آمده به میکروتیوب منتقل و به مدت پنج دقیقه در یخ قرار داده شد. در مرحله بعد، میزان ۴۰۰ میکرولیتر کلروفورم به محلول اضافه و میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. فاز روشن‌ترین حاصله به میکروتیوب جدید منتقل و مرحله شستشو با کلروفورم تکرار گردید. سپس روشن‌ترین به میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در یخ قرار داده شد؛ سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از حذف روشن‌ترین، شستشوی رسوب به کمک یک میلی‌لیتر محلول اتانول ۷۵ درصد انجام گردید و متعاقباً میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از حذف روشن‌ترین و خشک شدن نسبی رسوب، ۱۰۰ میکرولیتر محلول یک میلی‌مولار EDTA اضافه و به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه، در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محلول حاصله به کمک یک دهم حجم استات سدیم سه مولار و ۲/۵ برابر حجم اتانول مطلق سرد و سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شد؛ شستشوی رسوب مانند قبل انجام گرفت. در نهایت، رسوب حاوی RNA در ۴۰ میکرولیتر محلول یک میلی‌مولار EDTA حل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. RNA استخراج شده در ژل آگاروز ۰/۸ درصد (تهیه شده در بافر Tris-borate EDTA) حاوی ۱ μg/ml اتیدیوم بروماید با ولتاژ مستقیم ۱۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شده و ژل در نور ماورای بنفش با استفاده از دستگاه UV-illuminator مورد ارزیابی و عکس‌برداری قرار گرفت (Ausubel *et al.*, 1993). لازم به ذکر است که از جفت آغازگرهای NAD (AtropaNad2.1a و AtropaNad2.2b) نیز به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (Thompson *et al.*, 2003).

ساخت cDNA با استفاده از پنج میکرولیتر (۱/۲ μg) RNA الگو (RNA template)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت‌برداری برگردان (۲۰۰ u/μl، RevertAidTMM-MuLV، فرمنتاس، لیتوانی)، دو میکرولیتر dNTP (غلظت ۱۰ mM) و یک میکرولیتر آغازگر پایین‌دست (۱۰ pmol/μl) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بر اساس روش توصیه

شده توسط شرکت سازنده انجام گردید، بدین صورت که مخلوط حاصله به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل شش میکرولیتر محلول حاوی cDNA، یک و نیم میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای بالادست و پایین‌دست (۱۰ pmol/μl)، پنج میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X)، دو میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ mM)، یک میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ mM) و نیم میکرولیتر از آنزیم DNA Taq پلیمرز (۲.۵ واحد، سیناژن) انجام گرفت. برنامه PCR مورد استفاده برای جفت آغازگرهای Tob-Uni شامل ۹۴°C، چهار دقیقه و به دنبال آن ۳۰ چرخه با برنامه ۹۴°C، ۱ دقیقه، ۵۵°C، چهل و پنج ثانیه و ۷۲°C، نود ثانیه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بود. در مورد جفت آغازگرهای Nib، از برنامه PCR شامل ۹۴°C، چهار دقیقه و به دنبال آن ۳۸ چرخه با برنامه ۹۴°C، یک دقیقه، ۴۵°C، چهل و پنج ثانیه و ۷۲°C، یک دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C استفاده گردید. همچنین، برنامه چرخه دمایی برای جفت آغازگرهای NAD شامل ۹۴°C، چهار دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه با برنامه ۹۴°C، یک دقیقه، ۵۰°C، چهل و پنج ثانیه و ۷۲°C، یک دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بود. محصول PCR به دست آمده به همراه مارکر مولکولی در ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز گردید.

استخراج DNA کل و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

به منظور تأیید آلودگی نمونه‌ها به ویروس TYLCV، ده نمونه مثبت در آزمون الیزا توسط آزمون PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی این ویروس شامل TYLCV-Sar و TYLCV-Isr (Pico et al., 1999) مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA کل (Total DNA) با استفاده از کیت DNeasy Plant Mini Kit (کیاژن، آمریکا) و بر اساس روش توصیه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. DNA به دست آمده با اضافه کردن سدیم استات و اتانول مطلق سرد رسوب داده شد و پس از شستشو با اتانول ۷۵ درصد، در ۴۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل گردید. به منظور ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده، DNA به دست آمده در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. آماده‌های DNA تا زمان استفاده در واکنش PCR، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل چهار میکرولیتر DNA استخراج شده، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای بالادست و پایین‌دست (۱۰ pmol/μl)، پنج میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X)، دو میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ mM)، یک میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ mM) و نیم میکرولیتر از آنزیم DNA Taq پلیمرز (۲.۵ واحد، سیناژن) انجام گرفت. برنامه PCR مورد استفاده شامل ۹۵°C، ده دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه با برنامه ۹۵°C، یک دقیقه، ۵۰°C، چهل و پنج ثانیه و ۷۲°C، دو دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بود. سپس محصول PCR به دست آمده به همراه مارکر مولکولی در ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز گردید.

نتایج

نمونه‌برداری

در این تحقیق طی فصول زراعی ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳، تعداد ۱۱۰ نمونه علائم‌دار از مزارع و یک گلخانه فلفل در منطقه ورامین (استان تهران) جمع‌آوری گردید. مشاهدات انجام شده، نشان‌دهنده وجود علائم ویروسی در تمامی نه مزرعه در مناطق مختلف بازدید شده بود. وقوع علائم مشاهده شده نه تنها بین مناطق مختلف، بلکه در میان مزارع موجود در یک منطقه نیز با یکدیگر تفاوت نشان می‌داد. براساس مشاهدات چشمی، میزان وقوع آلودگی ویروسی در مناطق قلعه‌سین، فرون‌آباد و رستم‌آباد بسیار بیش‌تر از سایر مناطق بود. بررسی‌های انجام شده روی نمونه‌های جمع‌آوری شده، نشان‌دهنده وجود علائمی نظیر موزائیک، بدشکلی برگ، کوتولگی، زردی، پیچیدگی برگ، رگبرگ روشنی، لکه‌های نکروزه، لوله‌ای شدن برگ بود (شکل‌های ۱ تا ۴). از میان علائم ذکر شده، موزائیک، پیسک، زردی،

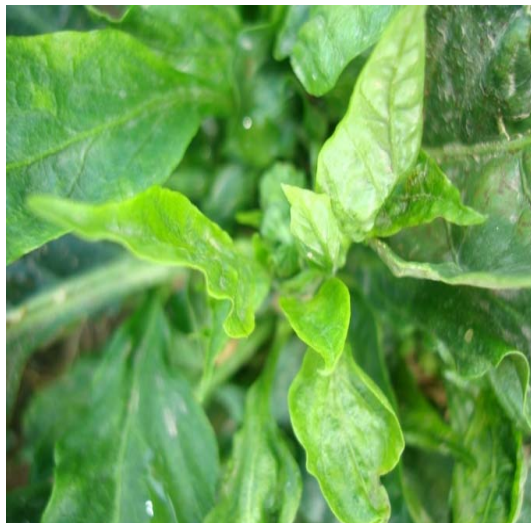
بدشکلی و پیچیدگی برگ‌ها در اکثر نمونه‌ها مشاهده شد و بیش‌تر نمونه‌هایی که دارای این علائم بودند ۹۶/۱ درصد، آلودگی ویروسی آن‌ها متعاقباً در آزمون الایزا نشان داده شد (جدول ۱).



شکل ۲- علائم شدید موزاییک و بدشکلی برگ در گیاه نیلوفرپیچ در مزرعه
Fig. 2. Severe mosaic and leaf deformation on morning glory t in field plant



شکل ۱- علائم موزاییک روی برگ گیاه فلفل در مزرعه
Fig. 1. Severe mosaic symptoms on pepper leaves in field



شکل ۴- علائم شدید موزاییک و بدشکلی برگ در گیاه فلفل در مزرعه
Fig. 4. Severe mosaic and leaf deformation symptoms on pepper plant in field



شکل ۳- علائم موزاییک خفیف روی برگ فلفل در مزرعه
Fig. 3. Mild Mosaic symptoms on pepper leaves in field

جدول ۱- نتایج آزمون الایزای نمونه‌های علائم‌دار فلفل جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شهرستان ورامین

Table 1. Serological test results of symptomatic pepper leaf samples collected from different regions of Varamin area

منطقه Location	تعداد نمونه‌ها Number of samples	تعداد نمونه دارای واکنش مثبت به ویروس‌ها Number of samples infected with viruses						
		ویروس موزاییک خیار CMV	ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی TYLCV	ویروس ایکس سیب‌زمینی PVX	ویروس موزاییک توتون TMV	ویروس موزاییک گوجه فرنگی ToMV	پوتی ویروس‌ها Potyvirus	آلودگی کل Total infections
مرکز تحقیقات ورامین Varamin research center	11	2 ^b (18.2) ^c	2 (18.2)	1 (9.09)	1 (9.09)	2 (18.2)	3 (27.3)	10 (90.9)
رستم آباد Rostamabad	5	0	1 (20)	0	0	0	2 (40)	4 (80)
یوسف رضا Yousefreza	26	2 (7.7)	6 (23.1)	0	10 (38.5)	2 (7.7)	5 (19.2)	25 (96.2)
عسگرآباد Asgarabad	38	7 (18.4)	8 (21.1)	1 (2.63)	11 (28.9)	6 (15.8)	10 (26.3)	37 (97.4)
قلعه سین Ghalesin	20	3 (15)	7 (35)	0	6 (30)	3 (15)	4 (50)	20 (100)
دانشکده کشاورزی Agriculture univeresity	3	0	0	0	0	0	0	0
فرون آباد Foronabad	2	0	1 (50)	0	0	1 (50)	2 (100)	2 (100)
مجموع ^d Total	110	14 (13.3)	25 (23.8)	2 (1.9)	28 (26.7)	14 (13.3)	26 (24.3)	98 (93.3)

^a نتایج ارائه شده در بالا بر اساس آزمون سرولوژیکی (الایزا) می‌باشد؛ ^b تعداد نمونه‌های برگی دارای آلودگی ویروسی؛ ^c میانگین آلودگی ویروسی (%); ^d میزان آلودگی هر ویروس در مناطق بازدید شده؛ ^e میزان آلودگی کل ویروسی در مناطق بازدید شده؛ ^f گلخانه

^a The results were based on serological reactions (enzyme-linked immunosorbent assay); ^b Number of infected pepper leaf samples; ^c Average of percent virus infection; ^d Infection rate of each virus in the surveyed regions; ^e Total virus infection in the surveyed regions. ^f Greenhouse

آزمون سرولوژیکی الایزا

بر اساس آزمون الایزا، بیش‌ترین میزان آلودگی ویروسی در نمونه‌های علائم‌دار مورد بررسی مربوط به TMV ۲۱/۶ درصد، و پس از آن به ترتیب مربوط به پوتی‌ویروس‌ها ۲۱/۶ درصد، TYLCV ۲۱/۶ درصد، CMV ۱۳/۸ درصد، ToMV ۶/۹ درصد و PVX ۲/۰ درصد بود (جدول ۱). در میان ویروس‌های مورد بررسی، توپاموویروس‌ها (TMV و ToMV) بیش‌ترین آلودگی را به خود اختصاص دادند. این ویروس‌ها در پنج مزرعه از مزارع بازدید شده ۷۱ درصد و در ۳۷ نمونه ۳۳/۶ درصد ردیابی گردیدند. علائم موزائیک و بدشکلی در غالب نمونه‌های آلوده به این ویروس‌ها مشاهده شدند. میزان آلودگی به TMV در تمام مناطق مورد بازدید، به جز مزرعه مرکز تحقیقات ورامین و فرون‌آباد، بیش از ToMV بود. پوتی‌ویروس‌ها دومین دسته از ویروس‌های شایع در نمونه‌های علائم‌دار مورد بررسی بودند. آلودگی پوتی‌ویروسی در ۲۲ درصد نمونه جمع‌آوری شده از شش مزرعه ردیابی گردید. به علاوه، واکنش مثبت با آنتی‌بادی اختصاصی پوتی‌ویروس‌ها در چهار نمونه از یازده نمونه علف هرز مورد بررسی مشاهده شد؛ این نمونه‌ها شامل دو نمونه از گیاه نیلوفرپیچ (*Ipomoea purpurea*) (شکل ۲) و دو نمونه علف هرز ناشناخته بود. گیاهان آلوده به پوتی‌ویروس دارای علائم موزاییک و پیسک بودند. ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV)، سومین ویروس مهم در نمونه‌های علائم‌دار مورد بررسی بود. این ویروس در ۲۱/۶ درصد نمونه جمع‌آوری شده از شش مزرعه ردیابی گردید. در بیش‌تر نمونه‌های آلوده به این ویروس، علائم موزائیک خفیف و بدشکلی مشاهده شد (شکل ۳). از میان نمونه‌های مورد سنجش، ۱۴ نمونه به CMV با میزان ۱۳/۳ درصد آلودگی داشتند. در بوته‌های آلوده به CMV جمع‌آوری شده از مزارع فلفل، علائمی شامل زردی شدید، موزائیک، بدشکلی و کوچک شدن برگ‌ها مشاهده گردید (شکل ۴). در این مطالعه، تنها دو نمونه با علائم موزاییک، پیسک و تا حدودی بدشکلی واکنش ضعیفی با آنتی‌بادی PVX داشتند.

نتایج آزمون الایزا نشان‌دهنده وجود آلودگی ویروسی در نه مزرعه مورد بازدید بود و همچنین میزان آلودگی در نمونه‌های علائم‌دار مورد بررسی، از یک درصد تا ۱۰۰ درصد متفاوت بوده و میانگین کل آلودگی ویروسی در نمونه‌ها، ۹۸ درصد محاسبه گردید (جدول ۱). تقریباً ۶۴ درصد از نمونه‌های علائم‌دار برگ‌های فلفل به ویروس‌های CMV، TYLCV و پوتی‌ویروس‌ها که با ناقل منتقل می‌شوند و ۳۵ درصد به ویروس‌های PVX، TMV و ToMV که ناقل شناخته شده‌ای ندارند، آلوده بودند. نتایج نشان داد که به ترتیب ۲۱ درصد و ۷۷ درصد از نمونه‌ها آلودگی ویروسی منفرد و توأم داشتند (جدول ۲). به علاوه، چهار نمونه (۳/۹ درصد) با علائم شبه ویروسی با هیچ یک از آنتی‌بادی‌های مورد استفاده واکنشی نداشتند.

جدول ۲- میزان آلودگی منفرد و توأم ویروسی در نمونه‌های علائم‌دار فلفل جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شهرستان ورامین

Table 2. Rates of single and mixed virus infections occurring in symptomatic pepper samples collected from different regions of Varamin area

منطقه Location	تعداد نمونه‌ها Number of samples	آلودگی منفرد Single infection	آلودگی توأم Mixed infection	آلودگی کل Total infections
فرون‌آباد Foronabad	2	0	2 ^b (100) ^c	2 (100)
مرکز تحقیقات ورامین Varamin research center	11	2 (18.2)	8 (72.7)	10 (90.9)
رستم‌آباد Rostamabad	5	0	4 (80)	4 (80)
ورامین یوسف رضا Yousefreza	26	7 (28)	18 (72)	25 (96.15)
عسگر‌آباد Asgarabad	38	11 (28.94)	26 (68.42)	37 (97.36)
قلعه سین Ghalesin	20	2 (10)	18 (90)	20 (100)
دانشکده‌ی کشاورزی Agriculture university	3	0	0	0
Total مجموع	110	22 (21)	76 (72.4)	98(93.3)

^a نتایج ارائه شده در بالا بر اساس آزمون سرولوژیکی (الایزا) می‌باشد؛ ^b تعداد نمونه‌های برگ‌ی دارای آلودگی ویروسی؛ ^c درصد آلودگی ویروسی (%).
^a The results were based on serological reactions (enzyme-linked immunosorbent assay); ^b Number of infected pepper leaf samples; ^c Average of percent virus infection.

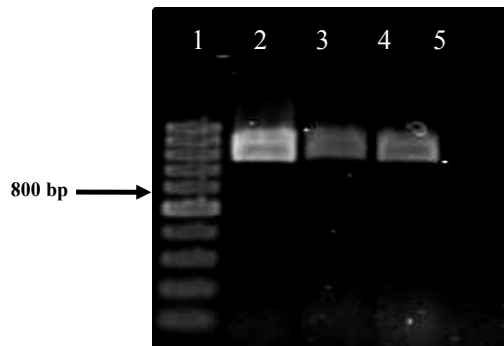
رونوشت‌برداری برگردان و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR)

بر اساس نتایج سرولوژیکی، آلودگی توپاموویروسی و پوتی‌ویروسی به عنوان شایع‌ترین آلودگی‌های ویروسی در نمونه‌های علائم‌دار مورد بررسی در این تحقیق شناسایی شدند، از این‌رو، آلودگی این نمونه‌ها در آزمون RT-PCR به کمک آغازگرهای عمومی (جدول ۳) بررسی گردید. در مجموع، نه نمونه از دوازده نمونه مورد مطالعه در آزمون RT-PCR با جفت آغازگر Tob-Uni باند مورد نظر ۸۰۰ جفت بازی را تشکیل دادند (Letschert *et al.*, 2002) که تأیید کننده‌ی آلودگی توپاموویروسی در این نمونه‌ها بود (شکل ۵). به علاوه، وجود آلودگی به پوتی‌ویروس در شش نمونه از نه نمونه بررسی شده (شامل چهار نمونه فلفل و دو نمونه نیلوفرپیچ) در آزمون RT-PCR به کمک جفت آغازگر Nib و تکثیر باند مورد انتظار ۳۵۰ جفت بازی (Zheng *et al.*, 2010) تأیید گردید (شکل ۶). در سه نمونه آلوده به توپاموویروس و یک نمونه آلوده به پوتی‌ویروس، علی‌رغم کیفیت مناسب RNA استخراج شده که با استفاده از روش الکتروفورز در ژل و نیز آزمون RT-PCR به کمک جفت آغازگر NAD تأیید شده بود (شکل ۷)، DNA با اندازه‌ی مورد انتظار تکثیر نگردید.

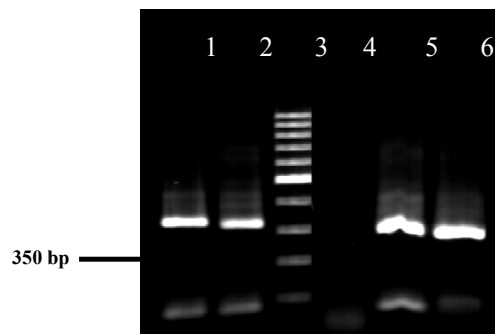
جدول ۳- نام و توالی ژنومی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 3. Name and sequence of primers used in this study

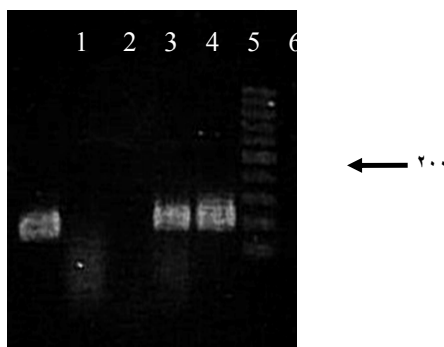
نام آغازگر	توالی ۵'-۳'	باند مورد انتظار	منبع
Primer	Sequence	Expected bands	References
Begomo R	ACGCGTATGGGCTGYCGAAGTTSAGAC	280 bp	Akhter <i>et al.</i> (2009)
Begomo F	ACGCGTGCCGTGCTGCTGCCCCATTGTCC		
NIb2F	GTITGYGTIGAYGAYTTYAAAYAA	400 bp	Zheng <i>et al.</i> (2008)
NIb3R	TCIACIACIGTIGAIGGYTGNC		
AtropaNad2.1a	GGACTCCTGACGTATACGAAGGATC	500 bp	Thompson <i>et al.</i> (2003)
AtropaNad2.2b	AGCAATGAGATTCCCCAATATCAT		
TYLCV-SAR	GCCATATACAATAACAAGGC	670 bp	Pico <i>et al.</i> (1999)
TYLCV-ISR	CGCCCGTCTCGAAGGTTC		
Tob-Uni 1	ATT TAA GTG GAS GGA AAA VCA CT	800 bp	Letschert <i>et al.</i> (2002)
Tob-Uni 2	GTY GTT GAT GAG TTC RTG GA		



شکل ۵- آزمون RT-PCR به کمک جفت آغازگر Tob-Uni برای تکثیر قطعات DNA با اندازه‌ای حدود ۸۰۰ جفت باز. ستون ۱، نشانگر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاس (لیتوانی)؛ ستون ۲ تا ۴، سه نمونه با آلودگی توباموویروسی در آزمون الایزا؛ ستون ۵، گیاه سالم. Fig. 5. RT-PCR test using the primer pair Tob-Uni1 to amplify DNA fragments of ca. 800 bp. Lane 1, 100-bp DNA ladder (Fermentas, Lithuania); lanes 2-4, three samples with positive reactions in ELISA to tobamoviruses; lane 5, healthy plant.



شکل ۶- آزمون RT-PCR به کمک جفت آغازگر Nib برای تکثیر قطعات DNA با اندازه‌ای حدود ۳۵۰ جفت باز. ستون ۱، ۲، ۵ و ۶، چهار نمونه با آلودگی پوتیوویروسی در آزمون الایزا؛ ستون ۳، نشانگر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاس (لیتوانی)؛ ستون ۴، گیاه سالم. Fig. 6. RT-PCR test using the primer pair Nib to amplify DNA fragments of ca. 350 bp. Lanes 1, 2, 5 and 6, four samples with positive reactions in ELISA to potyviruses; lane 3, 100-bp DNA ladder (Fermentas, Lithuania); lane 4, healthy plant.

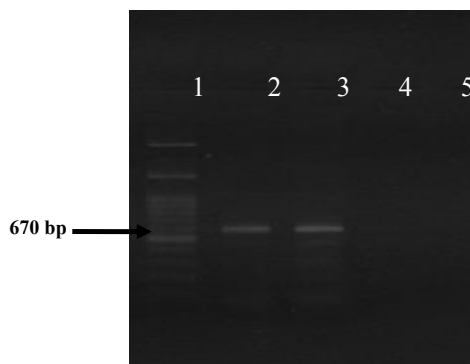


شکل ۷- آزمون RT-PCR به کمک جفت آغازگر NAD برای تکثیر قطعات DNA با اندازه‌ای حدود ۲۰۰ جفت باز به عنوان کنترل داخلی. ستون ۱، ۴ و ۵، سه نمونه دارای کیفیت مناسب RNA استخراج شده؛ ستون ۲ و ۳، دو نمونه‌ی فاقد کیفیت مناسب RNA استخراج شده؛ ستون ۶، نشانگر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاس (لیتوانی).

Fig. 7. RT-PCR test using the primer pair NAD to amplify DNA fragments of *ca.* 200 bp used as internal control. Lanes 1, 4 and 5, three samples having good quality RNA extracts; lanes 2 and 3, two samples having not-good quality RNA extracts; lane 6, 100-bp DNA ladder (Fermentas, Lithuania).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

بر اساس نتایج الایزا، ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) یکی از شایع‌ترین ویروس‌ها در نمونه‌های علائم‌دار فلفل بود. از این رو در این تحقیق، آلودگی نمونه‌ها به این ویروس توسط آزمون PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی این ویروس (جدول ۲) بررسی و تأیید گردید. از مجموع ده نمونه مورد بررسی، شش نمونه در آزمون PCR باند مورد نظر ۶۷۰ جفت بازی را تشکیل دادند (Pico *et al.*, 1999) که تأیید کننده آلودگی ویروسی در این نمونه‌ها بود. با این حال و علی‌رغم کیفیت مناسب DNA استخراج شده که با استفاده از روش الکتروفورز در ژل تأیید شده بود، DNA با اندازه مورد انتظار در چهار نمونه تکثیر نگردید (شکل ۸).



شکل ۸- آزمون PCR به کمک جفت آغازگر اختصاصی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV-Sar و TYLCV-Isr) برای تکثیر قطعات DNA با اندازه‌ای حدود ۶۷۰ جفت‌باز. ستون ۱، نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی شرکت فرمنتاس (لیتوانی)؛ ستون ۲ تا ۴، سه نمونه دارای آلودگی به ویروس TYLCV در آزمون الایزا؛ ستون ۵، گیاه سالم.

Fig. 8. PCR test using the primer pair TYLCV-Sar/Isr to amplify DNA fragments of *ca.* 670 bp. Lane 1, 100-bp DNA ladder (Fermentas, Lithuania); lanes 2 to 4, three samples with positive reactions in ELISA to TYLCV; lane 5, healthy plant.

بحث

بیماری‌های ویروسی سالانه عملکرد و کیفیت محصول فلفل در سراسر جهان را کاهش می‌دهند. در این تحقیق، مناطق اصلی تولید و کشت فلفل در شهرستان ورامین به منظور تعیین وقوع ویروس‌های آلوده کننده این محصول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق، وقوع CMV، TYLCV، TMV، ToMV و نیز پوتی‌ویروس‌ها را

تقریباً در تمام مناطق نمونه برداری شده در این شهرستان تأیید نمود. در این مطالعه، توپاموویروس‌ها (TMV و ToMV با ۴۰ درصد) به عنوان شایع‌ترین ویروس‌ها در نمونه‌های علائم‌دار جمع‌آوری شده شناسایی شدند. این ویروس‌ها ناقل شناخته شده‌ای برای انتقال ندارند. لازم به ذکر است که برخی حشرات (به عنوان مثال ملخ) می‌توانند به صورت مکانیکی توپاموویروس‌ها را انتقال دهند (Laterrot and Pecaut, 1965). با این حال، به نظر می‌رسد که مهم‌ترین عامل وقوع بالای توپاموویروس‌ها در مزارع فلفل شهرستان ورامین، احتمالاً عدم رعایت نکات بهداشتی زراعی توسط زارعین و کارگران مزرعه و نیز کشت نشاهای آلوده است (Broadbent, 1976). با توجه به نتایج به دست آمده و وقوع بالای توپاموویروس‌ها در مزارع فلفل این منطقه، انجام پژوهش‌های بیشتر در مورد خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی آن‌ها در آینده ضروری به نظر می‌رسد.

نتایج به دست آمده، نشان‌دهنده میزان بالای آلودگی (۲۴/۳ درصد) نمونه‌های جمع‌آوری شده به پوتی‌ویروس‌ها بود. این موضوع می‌تواند به دلیل دامنه میزبانی وسیع بسیاری از گونه‌های جنس پوتی‌ویروس (Yamamoto and Fuji, 2008) و تنوع بالای کاشت محصولات مختلف در دشت ورامین باشد. به علاوه، شرایط آب و هوایی در بسیاری از فصول سال برای وقوع ناقلین پوتی‌ویروسی یا میزبان‌های آن‌ها در منطقه ورامین تا حدودی مساعد است. در این تحقیق، وقوع آلودگی پوتی‌ویروسی در سه نمونه از علف‌های هرز جمع‌آوری شده مورد تأیید قرار گرفت که می‌تواند نقش مهمی در زمستان‌گذرانی و انتشار این دسته از ویروس‌ها ایفا نمایند، همان‌طور که پیش از این نیز در مورد پوتی‌ویروس‌ها و سایر ویروس‌های گیاهی نشان داده شده است (Masumi and Izadpanah, 1996). به علاوه، علف‌های هرز می‌توانند میزبان گونه‌های جدید یا نوظهوری از جنس پوتی‌ویروس با پتانسیل ایجاد خسارت و اپیدمی در گیاهان زراعی باشند؛ مطالعات قبلی نیز تأیید کننده وقوع سویه یا گونه‌های پوتی‌ویروسی جدید در این گونه گیاهان در کشور است (Valouzi et al., Yazdani-Khameneh et al., 2013a). در این مطالعه، آلودگی پوتی‌ویروسی گیاه نیلوفریج (*Ipomoea purpurea*؛ خانواده Convolvulaceae) برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود؛ این گیاه قبلاً به عنوان میزبان پوتی‌ویروس‌ها و ویروس‌های دیگر در جهان گزارش شده بود (Swapna Geetanjali et al., 2015; Zhang et al., 2014).

در مطالعات قبلی انجام شده، وقوع ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) از گیاه فلفل در منطقه ورامین گزارش شده بود (Shirazi et al., 2014). با این حال، نتایج حاصل از این تحقیق، نشان‌دهنده وقوع نسبتاً بالا و گسترده ویروس فوق در این منطقه است. این مطلب می‌تواند به دلیل دامنه میزبانی وسیع این ویروس، به ویژه در خانواده سولاناسه، و نیز فعالیت بالای ناقل آن (*Bemisia tabaci*) باشد (ایزدپناه و همکاران، ۱۳۸۹). نکته جالب توجه این که در برخی از نمونه‌ها با علائم ملایم که به سختی با چشم قابل مشاهده بود نیز TYLCV ردیابی گردید (شکل ۳). به عبارت دیگر و در برخی مواقع، آلودگی گیاهان سولاناسه مانند گوجه‌فرنگی، بادنجان، سیب‌زمینی، توتون و فلفل توسط این ویروس، علائم مشخصی در بر نداشته و این گیاهان در ظاهر سالم به نظر می‌رسند (Melzer et al., 2010)؛ بنابراین، ردیابی چشمی این ویروس در مزارع آلوده به سختی صورت پذیرفته و در نتیجه، موجب تسهیل گسترش ویروس در مزرعه می‌گردد.

با توجه به پتانسیل بالای خسارت‌زایی TYLCV، انجام مطالعات بیشتر در خصوص اپیدمیولوژی و کنترل این ویروس در منطقه ورامین ضروری است. نتایج به دست آمده، وقوع و تنوع بیماری‌های ویروسی را در مزارع فلفل شهرستان ورامین نشان می‌دهد. این مطلب می‌تواند به دلیل کوچکی و نیز نزدیکی مزارع به یکدیگر در این منطقه باشد. در واقع، انتشار ویروس‌ها بین مزارعی که با فواصل کم و نزدیک به هم قرار دارند، با سهولت بیش‌تری امکان‌پذیر است. مشابه این وضعیت قبلاً در مورد ویروس‌های آلوده کننده سایر محصولات از جمله سویا، چغندر قند و سیب‌زمینی گزارش شده است (Farzadfar et al., 2006; Golnaraghi et al., 2004; Pourrahim et al., 2007).

نتایج نشان داد که میزان آلودگی مربوط به هر ویروس و نیز آلودگی کل ویروسی در مناطق مختلف شهرستان ورامین کاملاً با یکدیگر متفاوت است. تمامی ویروس‌های مورد مطالعه در این تحقیق قبلاً از سایر میزبان‌ها در کشور گزارش شده‌اند (Hajimorad *et al.*, 1996؛ Ahoonmanesh *et al.*, 1997؛ Shahraneen *et al.*, 2003؛ Golnaraghi *et al.*, 2004؛ Pourrahim *et al.*, 2007؛ Bananej *et al.*, 2009؛ Aghamohammadi *et al.*, 2013؛ Yazdani-Khameneh *et al.*, 2013c؛ Alishiri *et al.*, 2013). ویروس‌های منتقل شونده با ناقل آلوده بودند. در واقع، آب و هوای منطقه ورامین به گونه‌ای است که شرایط برای رشد و کشت متراکم و مستمر میزبان‌های مختلف و متعاقباً ناقلین آن‌ها را تقریباً در تمام سال فراهم کرده و منجر به ظهور و گسترش بیماری‌های ویروسی می‌شود. به علاوه، به دلیل جذب ناقلین به رنگ زرد گیاهان آلوده (Irwin, 1980) و نیز رهاسازی مواد فرار از این گیاهان که موجب جذب ناقلین می‌شود (Eigenbrode *et al.*, 2002)، میزان آلودگی توأم به دست آمده در این مطالعه بسیار بالا بود (۷۲/۴ درصد)؛ مشابه این نتایج، قبلاً نیز از محصولات دیگر گزارش شده است (Farzadfar *et al.*, 2006؛ Pourrahim *et al.*, 2007). در این تحقیق، برخی از نمونه‌های دارای واکنش مثبت در الایزا، علی‌رغم کیفیت مناسب اسید نوکلئیک استخراج شده، در آزمون PCR با جفت آغازگرهای مورد استفاده، باند مورد نظر را تشکیل ندادند. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده عدم کارایی آغازگرهای فوق در تکثیر جدایه‌های ایرانی ویروس‌های مورد آزمون بوده و یا وقوع سویه‌ها یا گونه‌های جدید ویروسی در کشور را نشان دهد؛ مشابه این نتایج قبلاً نیز گزارش شده است (حامدی، ۱۳۹۱؛ یزدانی، ۱۳۹۲).

نتایج مطالعات اخیر نیز تأیید کننده ظهور ویروس‌های جدید در ایران است (Fazeli *et al.*, 2009؛ Heydarnejad *et al.*, 2009؛ Yazdani-Khameneh *et al.*, 2013a,b,c). این مطلب به نوبه خود، اهمیت پژوهش‌های مستمر روی ویروس‌های آلوده کننده گیاهی در کشور به منظور بهینه‌سازی سیستم‌های تشخیصی و پیش‌آگاهی از وقوع ویروس‌های نوظهور با پتانسیل ایجاد خسارت را بیش از پیش روشن می‌سازد.

سپاسگزاری

نگارندگان، از مسئولین دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی ورامین-پیشوا که فرصت انجام این تحقیق را فراهم نمودند، قدردانی می‌نمایند. همچنین، نگارندگان سپاسگزاری ویژه خود را از آقای مهندس خزائی و خانم کریمی (کارشناس آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی) و آقای مهندس ذاکری (مسئول آزمایشگاه) به خاطر کمک‌های آن‌ها ابراز می‌نمایند. بخشی از اعتبارات این تحقیق توسط گروه ترویج علم ایران (IGPS)، شماره ۹۲۰۰۱۰۰۱، تأمین شده است.

References

منابع

- آهون‌منش، ع.، بهار، م.، قبادی، س. و فدائی، ع. ا. ۱۳۶۸. ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی ToMV در ایران. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، مشهد. صفحه ۴۳۰.
- ایزدپناه، ک.، اشکان، م.، بنی‌هاشمی، ض.، رحیمیان، ح. و میناسیان، و. ۱۳۸۹. بیماری‌شناسی گیاهی. انتشارات آبیژ، تهران. ۳۶۰ صفحه.
- حامدی، ا. ۱۳۹۱. شناسایی ویروس‌های عامل موزائیک در سبزیجات شهرستان سمنان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. گروه بیماری‌شناسی گیاهی. واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.
- منوچهری، ع. ۱۳۴۷. بیماری‌های ویروسی نباتات. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۹۴ صفحه.
- یزدانی‌خامنه، س. ۱۳۹۲. ردیابی و شناسایی پوتی‌ویروس‌ها و جمینی‌ویروس‌های آلوده‌کننده سبزی و صیفی در استان خوزستان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. گروه بیماری‌شناسی گیاهی. واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

- Aghamohammadi, A., Gholizadeh Moghaddam Z., Abolhassani, H., Hallaji, Z., Mortazavi, H., Pourhamdi, S., Mohammadinejad, P. and Rezaei, N. 2013. Investigation of underlying primary immunodeficiencies in patients with severe atopic dermatitis. *Allergologia et Immunopathologia* 42: 336-41.
- Ahoonmanesh, A., Alavi, V. and Mosahebi Mohammadi, G. H. 1997. Concurrent presence of *Cucumber mosaic virus* in certain tomato growing areas of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 33: 111-125.
- Akhter, A., Gavrilin, M. A., Frantz, L., Washington, S., Ditty, C., Limoli, D., Day, C., Sarkar, A., Newland, C., Butchar, J., Marsh, C. B., Wewers, M. D., Tridandapani, S., Kanneganti, T. D. and Amer, A. O. 2009. Caspase-7 activation by the Nlrc4/Ipafl inflammasome restricts *Legionella pneumophila* infection. *PLoS Pathogens* 5, e1000361. doi: 10.1371/journal.ppat.1000361.
- Alishiri, A., Rakhshandehroo, F., Zamanizadeh, H.R. and Palukaitis, P. 2013. Prevalence of *Tobacco mosaic virus* in Iran and evolutionary analyses of the coat protein gene. *The Plant Pathology Journal* 29: 260-273.
- Anonymous, 2012. FAOSTAT Database results from FAO website. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at: <http://faostat.fao.org>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1993. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York, USA.
- Bananej, K., Vahdat, A. and Hosseini-Salekdeh, G. 2009. Begomoviruses associated with yellow leaf curl disease of tomato in Iran. *Journal of Phytopathology* 157: 243-257.
- Broadbent, L. 1976. Epidemiology and control of *Tomato mosaic virus*. *Annual Review of Phytopathology* 14: 76-96.
- Bosland, P. W. and Votata, E. J. 1999. *Peppers: Vegetable and Spice Capsicums*. (Crop Production Science in Horticulture, 12). CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Clark, M. S. and Adams, A. M. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *Journal of General Virology* 34: 475-83.
- Deol, G. S. and Rataul, H. S. 1978. Influence of plant age inoculation by *Cucumber mosaic virus* on disease incidence and yield of chilli (*Capsicum annum*). *Indian Journal of Plant Protection* 6: 82-83.
- Eigenbrode, S. D., Ding, H., Shiel, P. and Berger, P. H. 2002. Volatiles from potato plants infected with *Potato leafroll virus* attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proceedings of the Royal Society of London* 269: 455-460.
- Farzadfar, Sh., Pourrahim, R., Golnaraghi, A. R. and Ahoonmanesh, A. 2006. Distribution and incidence of some aphid and leafhopper transmitted virus infecting sugar beets in Iran. *Plant Disease* 90: 252-258.
- Fazeli, R., Heydarnejad, J., Massumi, H., Shaabani, M. and Varsani, A. 2009. Genetic diversity and distribution of tomato-infecting begomoviruses in Iran. *Virus Genes* 38: 311-319.
- Feldman, J. M., Garcia, O., Pontis, R. E. and Boninsegna, J. 1969. Effect of pepper virus on pepper yield. *Plant Disease Reporter* 53: 541-543.
- George, T. E., Anand, N. and Singh, S. J. 1995. Influence of *Potato virus Y* (PVY) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) on growth and yield of bell pepper (*Capsicum annum*). *Indian Cocoa, Arecanut and Spices Journal* 19: 1-4.
- 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.
- Golnaraghi, A. R., Hamedi, A., Yazdani-Khameneh, S. and Khosroshahi, T. S. 2013. First report of a natural occurrence of *Tomato yellow fruit ring virus* on pepper in Iran. *Plant Disease* 97(9): 1259-1269.
- Hajimorad, M. R., Kheyr-Pour, A., Alavi, V., Ahoonmanesh, A., Bahar, M., Rezaian, M. A. and Gronenborn, B. 1996. Identification of whitefly transmitted *Tomato yellow leaf curl geminivirus* from Iran and a survey of its distribution with molecular probes. *Plant Pathology* 45: 418-425.
- Hartman, G. L., Sinclair, J. B. and Rupe, J. C. 1999. *Compendium of Soybean Diseases*, 4th ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A.
- Heydarnejad, J., Mozaffari, A., Massumi, H., Fazeli, R., Gray, A. J. A., Meredith, S., Lakay, F., Shepherd, D. N., Martin, D. P. and Varsani, A. 2009. Complete sequences of *Tomato leaf curl Palampur virus* isolates infecting cucurbits in Iran. *Archives of Virology* 154: 1015-1018.
- Irwin, M. E. 1980. Sampling aphids in soybean fields. Pp.239-259. IB:Rogan, M. and Hezogh, D.C.(eds.) *Sampling Methods in Soybean Entomology*. Springer-Verlag, New York.

- Kaiser, W. J., Mosahebi, G. H. and Okhovat, M. 1971.** Alternative hosts of viruses affecting food legumes in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 7(2): 85.
- Laterrot, H. and Pecaut, P. 1965.** La production de semences de tomato. Ann. Epiphyties 24: 437-466.
- Letschert, B., Adam, G., Lesemann, D., Willingmann, P. and Heinze, C. 2002.** Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. Journal of Virological Methods 106: 1-10.
- Masumi, M. and Izadpanah, K. 1996.** Properties of the Iranian isolate of *Bermudagrass Etched-line Virus*. Journal of Phytopathology 144: 231-234.
- Melzer, M. J., Ogata, D. Y. and Fukuda, S. K. 2010.** First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Hawaii. Plant Disease 94: 641-643.
- Mostafae, S., Mosahebi, G.H. and Kuhl Habibi, M. 2012.** The first report of PVY incidence in Iran pepper fields. Global Advanced Research Journal of Microbiology:1(2): 13-18.
- Mowat, W. P. and Dawson, S. 1987.** Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. Journal of Virological Methods 15: 233-293.
- Pico, B., Diez, M. J. and Nuez, F. 1999.** Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus – a review. Science of Horticulture 67: 151-196.
- Pourrahim, R., Farzadfar, S., Golnaraghi, A. R. and Ahoonmanesh, A. 2007.** Incidence and distribution of important viral pathogens of in some Iranian potato fields. Plant Disease 91: 609-615.
- Shahraeen, N., Farzadfar, Sh. and Lesemann, D. E, 2003.** Incidence of viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* spp. *oleifera*) in Iran. Journal of Phytopathology 151: 614-616.
- Shirazi, M., Mozafari, J., Rakhshandehroo, F. and Shams-Bakhsh, M. 2014.** Genetic diversity, and distribution of *Tomato yellow leaf curl virus* in Iran. Acta Virologica 58: 128-136.
- Swapna Geetanjali, A., Shilpi, S. and Mandal, B. 2013.** Natural association of two different betasatellites with *Sweet potato leaf curl virus* in wild morning glory (*Ipomoea purpurea*) in India. Virus Genes 47: 184-188.
- Thompson, J. R., Wetzel, S. and Klerks, M. M. 2003.** Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. Journal of Virological Methods 111: 85-93.
- Valouzi, H., Golnaraghi, A. R. and Rakhshandehroo, F. 2015.** Molecular detection of potyvirus infecting beans in Markazi province of Iran. 1st International & 9th Iranian Biotechnology Congress. May 23-25, 2015, Tehran, Iran.
- Vargas, J. A., Hammond, R., Hernandez, E., Barboza, N., Mora, F. and Ramirez, P. 2011.** First report of *Tomato chlorosis virus* infecting sweet pepper in Costa Rica. Plant Disease 95: 1482.
- Yamamoto, H. and Fuji, S. 2008.** Rapid determination of the nucleotide sequences of potyviral coat protein genes using semi-nested RT PCR with universal primers. Journal of General Plant Pathology 74: 97-100.
- Yazdani-Khameneh, S., Golnaraghi, A. R. and Rakhshandehroo, F. 2013a.** A *Potyvirus* of *Malva neglecta* in Iran. Journal of Plant Pathology 95: 666.
- Yazdani-Khameneh, S., Golnaraghi, A. R. and Rakhshandehroo, F. 2013b.** Report of a new *Begomovirus* on melon in Iran. New Disease Reports 28: 17.
- Yazdani-Khameneh, S., Hamed, A., Farahani, A. A., Hashemi, S., Golnaraghi, A. R. and Rakhshandehroo, F. 2013c.** *Tomato mosaic virus* on cucumber and potato in Iran. Journal of Plant Pathology 95: 665.
- Zheng, L., Wayper, P. J., Gibbs, A. J., Fourment, M., Rodoni B. C. and Gibbs, M. J. 2008.** Accumulating variation at conserved sites in *Potyvirus* genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. PLoS ONE 3 e1586.
- Zheng, L., Rodoni, B. C., Gibbs, M. J. and Gibbs, A. J. 2010.** A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant Pathology 59(2): 211-220
- Zhang, S. B., Du, Z. G., Wang, Z., Tang, Y. F., She, X. M., Lan, G. B. and He, Z. F. 2014.** First report of *Sweet potato leaf curl Georgia virus* infecting tall morning glory (*Ipomoea purpurea*) in China. Plant Disease 98: 1588-1588.