

رد یابی و بررسی وقوع ویروس همراه با منقوطی انجیر (FFkaV) از باغ های انجیر استان های تهران، البرز، مرکزی و سمنان

غفار نوری آل اقا^{۱*}، فرشاد رخشنده رو^۲ و حمید رضا زمانی زاده^۳

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران. صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵-کد پستی: ۱۴۷۷۸۹۳۸۵. ۲ و ۳- استادیار و استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده

کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: غفار نوری آل آقا ghaffarnouri@yahoo.com

چکیده

به منظور ردیابی و بررسی وقوع عامل ویروسی FFkaV از باغات انجیر در استان های تهران، البرز، مرکزی و سمنان در طول فصول رشد سال های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ تعداد ۱۲۱ نمونه، از برگ های انجیر مشکوک به بیماری و دارای علائم کلروز- موزاییک، نکروز- موزاییک، بدشکلی و ریزش میوه بطور تصادفی جمع آوری شد. پس از انتقال به آزمایشگاه و استخراج (total-RNA)، با استفاده از آزمون RT-PCR و نیز آغازگرهای اختصاصی قطعه DNA ویروسی به طول ۲۷۰ نوکلئوتید برای نمونه های آلوده تکثیر گردید. نتایج RT-PCR بیانگر وقوع آلودگی در استان تهران ۸٪، استان البرز ۴۲٪، استان سمنان ۱۷٪ و استان مرکزی ۳۳٪ بود. به منظور اطمینان از حضور عامل ویروسی FFkaV قطعه DNA حاصل از تکثیر ژن RdRP ویروس در آزمون RT-PCR جهت تعیین توالی ارسال گردید. مقایسه توالی جدایه های ایرانی با جدایه های ویروس FFkaV از سایر نقاط جهان در بانک ژن جهانی (NCBI) میزان ۹۸-۹۲ درصد مشابهت نوکلئوتیدی و ۱۰۰-۹۸٪ مشابهت اسید آمینه ای را نشان داد. این اولین گزارش از حضور ویروس FFkaV از ایران می باشد.

مقدمه

انجیرها شامل تقریباً ۶۰ جنس و احتمالاً بیش از ۲۰۰۰ گونه از درختان چوبی، بوته ها و تاک ها هستند و به خانواده Moraceae و جنس *F. carica* L تعلق دارند. آنها در سرتاسر نواحی استوایی و گرمسیری وجود داشته و گونه های کمی از آنها در مناطق معتدل گسترش دارند. این گیاه از یک گونه به نام انجیر معمولی (*F. carica*) تشکیل شده است که انجیر تجاری را شامل می شود. ایران از لحاظ میزان تولید در مقام پنجم جهانی قرار دارد (FAO, ۲۰۱۰). از مهمترین عوامل ویروسی بیماریزا در انجیر بیماری موزاییک انجیر (FMD) می باشد که در اکثر موارد مجموعه ای از ویروسهای انجیر را شامل می شود. یکی از عوامل دخیل در کمپلکس موزاییک انجیر ویروس منقوطی FFkaV می باشد که باعث ضعیف شدن درختان، ریزش زود هنگام و کاهش محصول میشود (Elbeaino et al., ۲۰۱۱). در این پژوهش برای اولین بار در ایران نمونه های انجیر دارای عارضه موزاییک برای حضور ویروس FFkaV مورد بررسی قرار گرفته و برای نخستین بار در جهان پراکنش ویروس در درختان انجیر و نیز ساختار ژنتیکی جدایه های ردیابی شده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه برداری: در طی سال های زراعی ۹۱-۱۳۹۰ بازدید هایی از باغات و مناطق کشت انجیر در نواحی مختلفی از استان های تهران، البرز، سمنان و مرکزی صورت گرفت و تعداد ۱۲۱ نمونه برگگی از این مناطق جمع آوری شد. نمونه برداری ها با توجه به سطح زیر کشت گیاه در هر منطقه و به صورت تصادفی از ۸۰ باغ تجارتي و غير تجارتي و از ارقام مختلف شامل زرد، سبز و بنفش انجیر جوان که دارای علائم اختصاصی عارضه موزاییک انجیر بودند انجام پذیرفت.

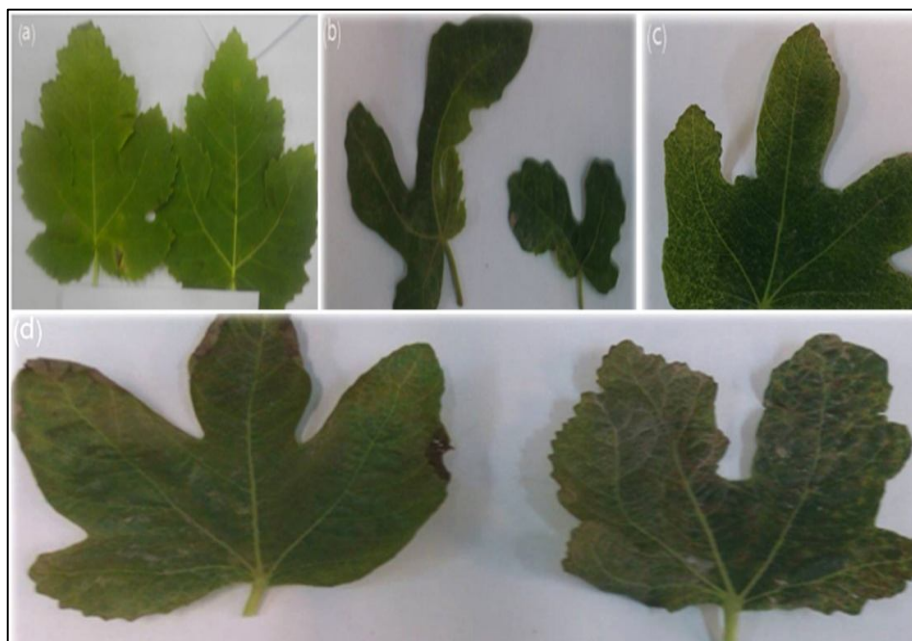
آزمون RT-PCR و تعیین توالی جدایه ها: این آزمون با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن آنزیم RdRP ویروس FFkaV انجام پذیرفت (جدول ۱). پس از سنتز cDNA با استفاده از کیت تجارتي شرکت فرمنتاس، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در دستگاه ترموسایکلر (Corrbet, AG, Germany) انجام شد. پس از بهینه سازی شرایط واکنش، دمای اتصال آغازگرها به توالی هدف 58°C تعیین شد. محصولات حاصل از تکثیر منطقه ژنتیکی بیان کننده آنزیم پلی (RdRp) ویروس توسط آزمون پی سی آر برای بررسی اندازه و کیفیت بر روی ژل آگاروز ۱٪ با شدت جریان ۲۵ میلی آمپر به مدت ۴۵ دقیقه تفکیک شدند. محصول پی سی آر نه جدایه از استان های البرز، تهران، سمنان و مرکزی پس از استخراج از ژل توسط کیت استخراج DNA از ژل (Fermentas, Germany)، بطور مستقیم برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. توالی های بدست آمده پس از دریافت کدهای دسترسی در GenBank ثبت و توسط موتور جستجوگر Blast برای بررسی میزان مشابهت توالی های نوکلئوتیدی و اسید آمینه مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

پس از بررسی های نهایی و تطبیق علائم با نتایج حاصل از آزمون RT-PCR در نهایت علائم لکه های نکروتیک - موزاییک، لکه حلقوی های پراکنده (منقوطی)، بدشکلی برگ، رگبرگ روشنی، پیچیدگی برگ و نکروز حاشیه برگاز علائم مرتبط با آلودگی های ویروسی FFkaV شناخته شد (شکل ۱). همچنین مشخص گردید که ویروس در مناطق مورد بررسی در ایران به میزان ۲۵٪ وقوع یافته است. میزان وقوع ویروس FFkaV در استان تهران ۸٪، استان البرز ۴۲٪، استان سمنان ۱۷٪ و استان مرکزی ۳۳٪ می باشد، که در استان البرز بیشتر از سایر استانها است. (جدول ۱).

جدول ۱- میزان وقوع عامل ویروسی FFkaV در مناطق مورد بررسی

| FFkaV | | | مناطق مختلف نمونه برداری |
|-----------|------------------|-----------------------|--------------------------|
| درصد نسبی | تعداد نمونه مثبت | تعداد نمونه بررسی شده | |
| ۸٪ | ۱ | ۴۴ | استان تهران |
| ۴۲٪ | ۵ | ۳۷ | استان البرز |
| ۱۷٪ | ۲ | ۲۰ | استان سمنان |
| ۳۳٪ | ۴ | ۲۰ | استان مرکزی |
| ۲۵٪ | ۱۲ | ۱۲۱ | جمع کل |



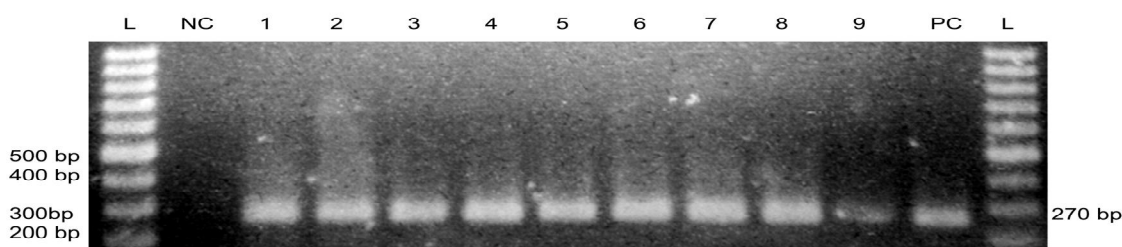
شکل ۱- علائم آلودگی ویروس FFkaV در باغات انجیر ایران. (a) Blotching (b) بدشکلی برگ، عدم تقارن برگ (c) لکه حلقوی (منقوسی) (d) موزاییک و نکروز حاشیه برگ ها

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای منطقه ژنتیکی از توالی ژنوم ویروس FFkaV مربوط به ژن های رمز کننده پلیمرز (RdRp) نمونه های آلوده به ویروس احتمالی مورد ردیابی قرار گرفتند. در تمامی موارد قطعاتی با اندازه های ۲۷۰ bp برای نمونه های آلوده به FFkaV توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد (شکل ۲). محصول PCR به صورت مستقیم برای توالی یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. ردیف یابی توالی های ژنتیکی جدایه های تعیین توالی شده ویروسی در بانک ژن NCBI با استفاده از موتور جستجوگر blast مورد بررسی قرار گرفت. و پس از شناسایی در بانک ژن NCBI ثبت گردید (جدول ۲). مقایسه توالی جدایه های ایرانی با جدایه های ویروس FFkaV از سایر نقاط جهان در بانک ژن جهانی (NCBI) میزان ۹۸-۹۲ درصد مشابهت نوکلئوتیدی و ۹۸-۱۰۰٪ مشابهت اسید آمینه ای را نشان داد.

جدول شماره ۲: کدهای ثبت شده ژن ویروس FFkaV ردیابی شده از ایران در بانک ژن جهانی NCBI

| کد دریافتی | رقم انجیر | منطقه جمع آوری شده |
|------------|-----------|--------------------|
| KC۳۳۱۹۹۲ | انجیر سبز | البرز |
| KC۳۳۱۹۹۳ | انجیر سبز | البرز |
| KC۳۳۱۹۹۴ | انجیر زرد | ساوه |
| KC۳۳۱۹۹۵ | انجیر زرد | البرز |

| | | |
|-------|--------------|----------|
| البرز | انجیر از میر | KC۳۳۱۹۹۶ |
| تهران | انجیر سبز | KC۳۳۱۹۹۷ |
| ساوه | انجیر زرد | KC۳۳۱۹۹۸ |
| ساوه | انجیر سبز | KC۳۳۱۹۹۹ |
| محلات | انجیر زرد | KC۳۳۲۰۰۰ |



شکل ۳- تکثیر منطقه ژنتیکی مربوط به بیان (RdRP) ویروس FFkaV توسط آغازگر های (Ebiano *et al.*, ۲۰۱۱). قطعه ۲۷۰ جفت بازی تکثیر شده از ژن RdRP ویروس پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد L: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp شرکت فرمنتاس، NC: نمونه کنترل منفی (گیاه عاری از ویروس)، ۱ و ۲ و ۳ و ۴: نمونه های استان مرکزی، ۵ و ۶ و ۷ و ۸: نمونه های استان البرز، ۹: نمونه استان تهران، PC: کنترل مثبت.

بحث

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان میدهد که میزان درصد وقوع بیماری ویروسی FFkaV در استان البرز نسبت به سایر استانهای مورد بررسی بیشتر بوده در حالی که استان تهران کمترین درصد وقوع را دارا می باشد. که دلایل این گستردگی می تواند احتمالا تحت تاثیر عوامل مختلفی نظیر شرایط محیطی، ارقام انجیر، حضور ناقلین احتمالی، نحوه تکثیر، باشد. همچنین در این تحقیق مشاهده گردید که وجود چند عامل ممکن است در شدت علایم بیماری نقش داشته باشد.

منابع

- ۱- حسین فقیه، م و جعفر ثابت سروستانی، ع. ۱۳۸۰. انجیر (کاشت-داشت-برداشت). انتشارات رهگشا. تهران. ۲۳۳ صفحه
- ۲- Elbeaino T., Digiario M and G.P. Martelli (۲۰۱۱a). The complete sequence of Fig fleck-associated virus, a novel Tymoviridae member infecting fig. *Virus Research* ۱۶۱: ۱۹۸-۲۰۲.