

شناسایی مولکولی و تعیین جایگاه تبارزایی ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی (*Strawberry crinkle virus*) از مزارع توت‌فرنگی استان کردستان بر اساس بخشی از ژن پلیمراز

محمد حاجی‌زاده^{*۱}

۱- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

*مسئول مکاتبه: m.hajizadeh@uok.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۲۰

چکیده

علایم چروکیدگی و بدفرم شدن برگ در تعدادی از بوته‌های توت‌فرنگی در مزارع توت‌فرنگی استان کردستان مشاهده گردید. با بررسی علایم این نمونه‌ها احتمال داده شد که این علایم مربوط به آلودگی نمونه‌ها به ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی (*Strawberry crinkle virus*, SCV) باشد و برای اطمینان با آزمون RT-PCR بررسی شدند. در کل، تعداد ۵۵ نمونه‌ی برگ (دارای علایم و بدون علایم) طی تابستان ۱۳۹۶ از مناطق مختلف استان کردستان جمع‌آوری و RNA کل با روش سیلیکا استخراج گردید و سپس cDNA آن‌ها با استفاده از آغازگرهای تصادفی شش‌تایی ساخته شد. PCR با آغازگرهای اختصاصی SCVdeta و SCVdetb انجام و قطعه‌ای به طول ۳۴۵ جفت باز از ژن پلیمراز SCV تکثیر گردید. نتایج RT-PCR نشان داد که ۵۰/۹ درصد از نمونه‌ها آلوده به ویروس SCV بودند. به منظور بررسی مشخصات مولکولی و تبارزایی این ویروس، هفت جدایه بر اساس منطقه‌ی جغرافیایی، رقم میزبان و نوع علایم انتخاب شده و تعیین توالی شدند. جدایه‌های SCV توالی‌یابی شده در این تحقیق به صورت یک زیرگروه مجزا در گروه تبارزایی اول قرار گرفتند. میانگین فاصله‌ی ژنتیکی در بین جدایه‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق در سطح نوکلئوتیدی 0.005 ± 0.031 و با سایر جدایه‌های موجود در ژن بانک 0.014 ± 0.069 بود. مقایسه‌ی دوجه دوی توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که بیشترین و کمترین تشابه نوکلئوتیدی به ترتیب میان جدایه SAR6 با جدایه 4MM از آرژانتین (۹۵/۱ درصد) و جدایه S26 با جدایه HB-A1 از هلند (۸۶/۵ درصد) وجود داشت. این اولین گزارش از شناسایی این ویروس در مزارع توت‌فرنگی استان کردستان و اولین گزارش از ردیابی مولکولی این ویروس در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آغازگرهای اختصاصی، استان کردستان، فاصله ژنتیکی، توت‌فرنگی.

مقدمه

۷۶ کشور تولیدکننده‌ی توت‌فرنگی در جهان دارا بوده است (فائو ۲۰۱۲). سطح زیرکشت این محصول در کشور ۴۷۵۴ هکتار برآورد شده که استان کردستان با سطح زیر کشت ۲۳۸۸ هکتار و تولید ۳۹۳۶۶ تن، رتبه اول را در بین استان‌های تولید کننده این محصول دارا می‌باشد و به عنوان قطب تولید کننده توت‌فرنگی در کشور شناخته شده است (آمارنامه جهاد کشاورزی، ۱۳۹۴).

شناسایی ویروس‌های توت‌فرنگی به سال ۱۹۳۰ برمی‌گردد و اخیراً بیش از ۳۰ گونه ویروس، عوامل شبه ویروسی شامل فیتوپلازما در توت‌فرنگی‌های آلوده‌ی سراسر جهان گزارش شده است (زانتاکیس و همکاران

گیاه توت‌فرنگی با نام علمی *Fragaria ananassa* Duchesne متعلق به تیره‌ی Rosaceae و جنس *Fragaria* می‌باشد. این گیاه هیبرید بین *F. virginiana* Duchesne از شمال آمریکا و *F. chiloensis* (L.) Duchesne از جنوب آمریکا می‌باشد و منشأ آن به سال ۱۷۵۰ از اروپا برمی‌گردد. توت‌فرنگی یکی از مهمترین میوه‌های تولید شده در سراسر جهان است (کین و همکاران ۲۰۰۷). طبق گزارش سازمان بین‌المللی خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAOSTAT) در سال ۲۰۱۲، ایران رتبه هیجدهم را در میان

منظور ردیابی ویروس‌های مهم توت‌فرنگی از جمله SCV، *Strawberry mild yellow*، *Strawberry mottle virus* (SMoV) *Strawberry vein banding virus*، *edge virus* (SMYEV) (SVBV) و *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV) بر روی ۱۵۰ نمونه از گیاهان توت‌فرنگی استان‌های کردستان، مازندران، گرگان، گیلان و تهران با استفاده از روش‌های الایزا، PCR و استخراج RNA دورشته‌ای مطالعاتی را انجام دادند. نتایج حاصل از الیزا و PCR نشان از عدم ردیابی ویروس‌های نام برده داشت. در مطالعه‌ی دیگر، نصیری‌نیا و همکاران (۱۳۹۵) هفت ویروس از جمله SCV را از مزارع توت‌فرنگی استان‌های گیلان و مازندران با درصد پایین (۱/۷٪) ردیابی نمودند. سازمان جهاد کشاورزی در سال ۱۳۸۹، دو ویروس SLRV و SVBV را برای کشت‌زارهای توت‌فرنگی کشور قرنطینه اعلام کرده است.

با توجه به شایع بودن اکثر ویروس‌های توت‌فرنگی در مزارع توت‌فرنگی جهان و محدود نبودن دامنه‌ی میزبانی اغلب آن‌ها به یک گیاه و نظر به این‌که استان کردستان از لحاظ میزان سطح زیرکشت و تولید توت‌فرنگی در ایران دارای مقام نخست می‌باشد، بررسی و ردیابی ویروس‌های این گیاه در استان ضروری می‌باشد. در این تحقیق، با توجه به مشاهده‌ی علایم چروکیدگی در بعضی از گیاهان، ردیابی و شناسایی مولکولی ویروس چروکیدگی توت-فرنگی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

منبع گیاهی

نمونه‌برداری از مزارع توت‌فرنگی استان کردستان در تابستان ۱۳۹۶ انجام گرفت. در بازدید از مزارع توت‌فرنگی علایم چروکیدگی برگ مشاهده شد که برخی از آنان دارای شته در پشت برگ نیز بودند که ممکن است ناقل ویروس باشند (شکل ۱). به علت اینکه ظهور علایم ناشی از SCV بستگی به استرین ویروس و رقم میزبان دارد و استرین‌های با توان بیماری‌زایی کم در تمامی ارقام بدون علایم

(۲۰۱۰). ویروس‌های آلوده‌کننده‌ی توت‌فرنگی در جنس‌ها و خانواده‌های مختلف ویروسی جای گرفته‌اند و ناقلین بیولوژیکی متفاوتی دارند (تامسون و همکاران ۲۰۰۳، پوستما و همکاران ۲۰۰۴، مارتین و همکاران ۲۰۰۴ و مویر و همکاران ۲۰۱۰). ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی (*Strawberry crinkle virus*, SCV) متعلق به جنس *Cytorhabdovirus*، خانواده *Rhabdoviridae* و راسته *Mononegavirales* است که دامنه‌ی میزبانی آن در طبیعت محدود به جنس *Fragaria* (وان رگنمورتل و همکاران ۲۰۰۰) و در شرایط آزمایشگاهی محدود به عروسک پشت‌پرده^۱ (ریچاردسون و سیلوستر ۱۹۸۸) و توتون (سیلوستر و همکاران ۱۹۸۷) می‌باشد. این ویروس با دو شته به نام‌های علمی *Chaetosiphon fragaefolii* و *Chaetosiphon jacobi* با روش پایای تکثیری منتقل (ریچاردسون و همکاران ۱۹۷۲) و سبب کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌گردد (زانتاکیس و همکاران ۲۰۰۳). ژنوم این ویروس به صورت RNA تکرشته‌ای منفی بوده و پنج پروتئین به نام‌های گلیکوپروتئین (G)، نوکلئوکپسید (N)، پروتئین ساختاری (NS)، ماتریکس (M) و پلیمراز (L) کد می‌کند (چوین و لیونه ۱۹۹۵، پوستوما ۲۰۰۰). تا سال ۲۰۰۲، ردیابی این ویروس بر اساس پیوند برگ گیاه مشکوک به آلودگی با این ویروس به توت‌فرنگی محک رقم UC-S بوده است و سپس ردیابی مولکولی این ویروس با PCR توسط آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس ناحیه‌ی مرکزی ژن پلیمراز که دارای بیشترین حفاظت‌شدگی بود، انجام شد (پوستوما و همکاران ۲۰۰۲). کلرکس و همکاران (۲۰۰۴) جدایه‌های این ویروس را بر اساس ناحیه‌ی مرکزی ژن پلیمراز در دو گروه قرار دادند که اساس تفکیک آنها بیشتر تفاوت جغرافیایی بود.

علیرغم کشت قابل توجه توت‌فرنگی در ایران، مطالعات بسیار کمی در زمینه‌ی بیماری‌های ویروسی این محصول مهم صورت گرفته است. فتاحی و همکاران (۲۰۰۴) به

^۱ - *Physalis*

ساخت DNA مکمل و انجام RT-PCR

برای ساخت cDNA، از آغازگرهای شش نوکلئوتیدی تصادفی (شرکت فرمنتاز، کشور لیتوانی) در واکنشی با حجم نهایی ده میکرولیتر توسط کیت سنتز cDNA ساخت شرکت GeneAll (کره جنوبی) مطابق دستورالعمل شرکت سازندهی آن استفاده شد. به منظور ردیابی این ویروس با PCR، در این تحقیق از آغازگرهای SCVdeta (5' CATTGGTGGCAGACCCATCA 3') به عنوان آغازگر مستقیم و SCVdetb (5' TTCAGGACCTATTTGATGACA 3') به عنوان آغازگر معکوس که قابلیت تکثیر ۳۴۵ جفت باز از ژن پلیمراز SCV را داشتند، استفاده شد (تامسون و همکاران ۲۰۰۳). واکنش PCR در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر محتوی ۶/۲۵ میکرولیتر از مخلوط PCR (GeneAll،) ۰/۲ پیکومول از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس، ۴/۷۵ میکرولیتر آب استریل دیونیزه و یک میکرولیتر cDNA انجام شد. همچنین در نمونه‌ی شاهد منفی به جای cDNA از آب استفاده شد. شرایط زمانی و دمایی PCR به صورت ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه برای شروع و سپس ۳۲ چرخه شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه بود. برای مشاهده و تفکیک قطعات تکثیر شده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد. برای شاهد منفی از آب دیونیزه استریل و برای شاهد مثبت از اولین نمونه‌ی آلوده به SCV در این تحقیق (F3) برای واکنش‌های بعدی استفاده شد.

تعیین توالی نوکلئوتیدی و بررسی توالی‌ها

ناحیه‌ی تکثیر شده از هفت نمونه به ماکروژن (کره جنوبی) ارسال و پس از خالص‌سازی، با روش اتومات

هستند (کرزال و همکاران ۱۹۸۸)، نمونه‌برداری از برخی گیاهان بدون علائم نیز انجام گرفت. از هر مزرعه توت-فرنگی یک و حداکثر دو نمونه جمع‌آوری شد.

استخراج RNA کل

استخراج RNA مطابق روش فویساک و همکاران (۲۰۰۰) با اندکی تغییرات انجام شد. بطور خلاصه، در یک میلی‌لیتر از بافر استخراج 4.0 M guanidine thiocyanate, 0.2 M NaOAc, 25 mM EDTA, 1.0 M KOAc, 2.5% w/v polyvinylpyrrolidone (PVP-40), 1% 2-mercaptoethanol، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ توت‌فرنگی هموژنیزه شد. سپس، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره در داخل تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و به آن ۱۰۰ میکرولیتر از سارکوسیل ده درصد در آب مقطر استریل اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از این مرحله، لوله‌ها به مدت دو دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند و سپس به مدت پنج دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شدند. مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از روئشین به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و ۳۰۰ میکرولیتر از محلول یدید سدیم، ۱۵۰ میکرولیتر از اتانول خالص و ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سیلیکا به آن اضافه و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. آنگاه، لوله‌ها به مدت یک دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفوژ شدند و فاز رویی حذف و ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 50% ethanol) به هر لوله اضافه و با ورتکس پلت به طور کامل حل شد. در مرحله‌ی بعد، لوله‌ها دوباره به مدت یک دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفوژ شدند، فاز رویی حذف و پلت پس از خشک شدن با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به حالت سوسپانسیون درآمد. سپس لوله‌ها در حداکثر سرعت به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ و فاز رویی حاوی RNA کل به لوله جدید منتقل گردید.

توالی شدند. ترادف‌های حاصل در پایگاه اطلاعاتی داده‌های نوکلئوتیدی (NCBI) به ثبت رسیدند (جدول ۱). پس از حذف توالی‌های مربوط به آغازگرها، تعداد ۳۰۴ نوکلئوتید از ژن پلیمراز برای بررسی توالی‌ها و تبارزایی ویروس مورد استفاده قرار گرفت. میانگین فاصله ژنتیکی در بین جدایه‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق در سطح نوکلئوتیدی 0.005 ± 0.031 و با سایر جدایه‌های در دسترس در ژن بانک 0.014 ± 0.069 محاسبه شد. کلیه جدایه‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق به عنوان هاپلوتیپ مجزا در نظر گرفته شدند. توالی‌هایی از یک ژن که حتی در یک نوکلئوتید باهم اختلاف داشته و منحصر به فرد باشند، به عنوان یک هاپلوتیپ در نظر گرفته می‌شوند (گاو و همکاران ۲۰۱۷). مقایسه‌ی دوبه دوی توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که جدایه SAR6 با جدایه‌های SS21 و SS23 بیشترین تشابه نوکلئوتیدی (۹۸/۷ درصد) را در بین جدایه‌های این تحقیق دارد و در بین جدایه‌های این تحقیق با سایر جدایه‌ها بیشترین تشابه نوکلئوتیدی بین جدایه SAR6 و جدایه 4MM از آرژانتین به میزان ۹۵/۱ درصد می‌باشد در حالی که، کمترین تشابه نوکلئوتیدی را جدایه S26 با جدایه HB-A1 از هلند به میزان ۸۶/۵ درصد نشان داد. در سطح آمینواسیدی، جدایه‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق به طور میانگین 0.014 ± 0.06 با یکدیگر و 0.013 ± 0.048 با سایر جدایه‌های در دسترس در ژن بانک فاصله ژنتیکی نشان دادند. بیشترین میزان تنوع نوکلئوتیدی ($\pi = 0.07$)، بیشترین تعداد جایگاه‌های افتراقی ($S=41$) و بیشترین تعداد جهش ($\eta = 42$) در جدایه‌های هلند و کمترین میزان تنوع نوکلئوتیدی ($\pi=0.031$) برای جدایه‌های ایران به دست آمد. همچنین، بیشترین تغییرات اسید آمینه‌ای ($d_N=0.025$) در جمعیت ایرانی (جدایه‌های این تحقیق) به دست آمد (جدول ۲).

سنگر توالی‌یابی شدند. داده‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در نرم افزار BioEdit (هال ۱۹۹۹) وارد و پس از حذف توالی آغازگرها در دو طرف توالی آن، ۳۰۴ نوکلئوتید بدست آمده توسط الگوریتم ClustalW در نرم افزار MEGA 6 (تامورا و همکاران ۲۰۱۳) هم‌ردیف شدند. درخت تبارزایی توالی‌های هم‌ردیف شده با بوت استرپ ۱۰۰۰ با روش نزدیکترین همسایه^۱ (NJ) با این نرم‌افزار ترسیم شد. در ترسیم درخت تبارزایی از ویروس زردی نکروتیک کاهو^۲ (LNYV) به عنوان فرد برون گروه استفاده شد. آنالیز تنوع ژنتیکی و تخمین برخی پارامترهای ژنتیکی مانند تعداد هاپلوتیپ (H)، تنوع هاپلوتیپ (Hd)، تعداد جایگاه‌های افتراقی (S)، تعداد کل جهش‌ها (η)، تنوع نوکلئوتیدی (π)، نسبت جانیشینی مترادف (d_S)، نسبت جانیشینی غیرمترادف (d_N)، فشار انتخاب (d_N/d_S) و افتراق ژنتیکی (F_{ST}) با استفاده از نرم‌افزار DnaSP v. 5.10.05 (روزاس ۲۰۰۹) محاسبه گردید.

نتایج

ردیابی SCV با آزمون RT-PCR

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ویروس، قطعه‌ای از ژن پلیمراز به طول تقریبی ۳۴۵ جفت باز در ۲۸ نمونه (۵۰/۹ درصد از نمونه‌ها) تکثیر گردید در حالی که، در شاهد منفی (نمونه سالم) هیچ قطعه‌ای تکثیر نگردید (شکل ۱). در کل، از تعداد ۲۸ نمونه آلوده تعداد ۱۷ نمونه دارای علائم و ۱۱ نمونه علائم خاصی را نشان ندادند.

بررسی توالی بخشی از ژن پلیمراز

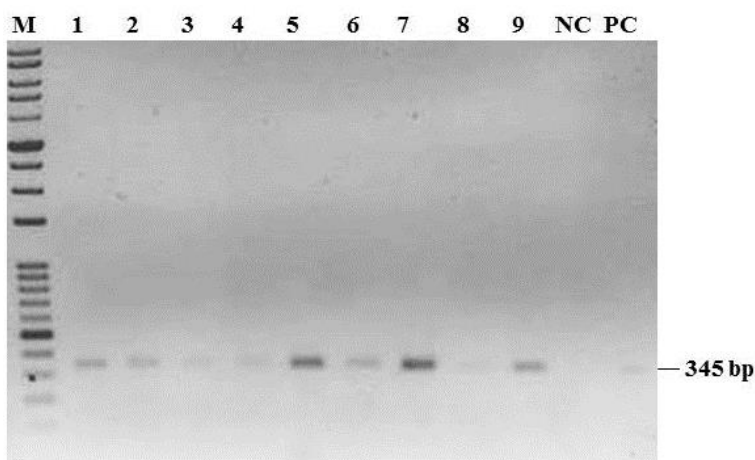
هفت جدایه F3، SAR6، SAR1، SS21، SS23، SS26 و SAR15 بر اساس منطقه‌ی جغرافیایی، رقم میزبان و نوع علائم انتخاب و محصولات PCR به صورت مستقیم تعیین

¹Neighbor Joining

²Lettuce necrotic yellow virus



شکل ۱- الف: نمونه SAR6 دارای علائم پیچیدگی که آلودگی آن به ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی با RT-PCR مشخص گردید. ب: پشت برگ نمونه SAR6 که تغذیه‌ی شته‌های توت‌فرنگی را روی برگ نشان می‌دهد.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات RT-PCR در ژل آگاروز ۱/۲٪. M: Ladder 1kb. چاهک‌های ۱-۹: نمونه‌های توت‌فرنگی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان کردستان. NC: شاهد منفی و PC: شاهد مثبت.

جدول ۱- میزبان، محل نمونه‌برداری، علائم و شماره دسترسی در ژن‌بانک جدایه‌های تعیین‌شده در این تحقیق.

کد نمونه	میزبان	علائم	محل نمونه‌برداری	طول قطعه	رس‌شمار
F3	<i>Fragaria ananassa</i> var. Paros	بدشکلی برگ	دیواندره	345	MG251306
SAr6	<i>F. ananassa</i> var. Paros	بدشکلی و چروکیدگی برگ	آره‌نان	345	MG251307
SAr1	<i>F. ananassa</i> var. Kurdistan	نامتقارن شدن برگ	آره‌نان	345	MG251308
SAr15	<i>F. ananassa</i> var. Ventana	نامتقارن شدن برگ	آره‌نان	345	MG251310
SS21	<i>F. ananassa</i> var. Queen Elisa	بدون علائم	سنندج	345	MG251311
SS23	<i>F. ananassa</i> var. Paros	بدون علائم	سو	345	MG251312
SS26	<i>F. ananassa</i> var. Paros	بدون علائم	نشور	345	MG251309

جدول ۲- نتایج تخمین پارامترهای جمعیتی براساس قسمتی از ژن پروتئین پلیمرز ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی.

مناطق جغرافیایی	N	H	Hd	S	η	π	d_N	d_S	d_N/d_S
ایران	۷	۷	۱/۰۰۰	۳۰	۳۱	۰/۰۳۱	۰/۰۲۵	۰/۰۵۱	۰/۴۹
شیلی	۵	۴	۰/۹۰۰	۲۴	۲۵	۰/۰۴۶	۰/۰۰۶	۰/۱۷۸	۰/۰۳۳
هلند	۶	۵	۰/۹۳۳	۴۱	۴۲	۰/۰۷	۰/۰۰۹	۰/۲۷۵	۰/۰۳۲
کل جدایه‌ها	۲۱	۱۸	۰/۹۸۶	۷۶	۹۱	۰/۰۷۸	۰/۰۱۸	۰/۲۸۴	۰/۰۶۳

N: تعداد نمونه، H: تعداد پلی‌مورفیسم، Hd: تنوع هاپلویدی، S: تعداد جایگاه‌های افتراقی، η : تعداد کل جهش‌ها، π : تنوع ژنتیکی، d_N : تنوع جهش‌هایی که منجر به تغییر اسید آمینه نشده‌اند، d_S : تنوع جهش‌هایی که منجر به تغییر اسید آمینه شده‌اند، d_N/d_S : نسبت جانیشینی‌های غیر مترادف به جانیشینی‌های مترادف. بیشترین مقدار در هر پارامتر به صورت برجسته نشان داده شده‌اند.

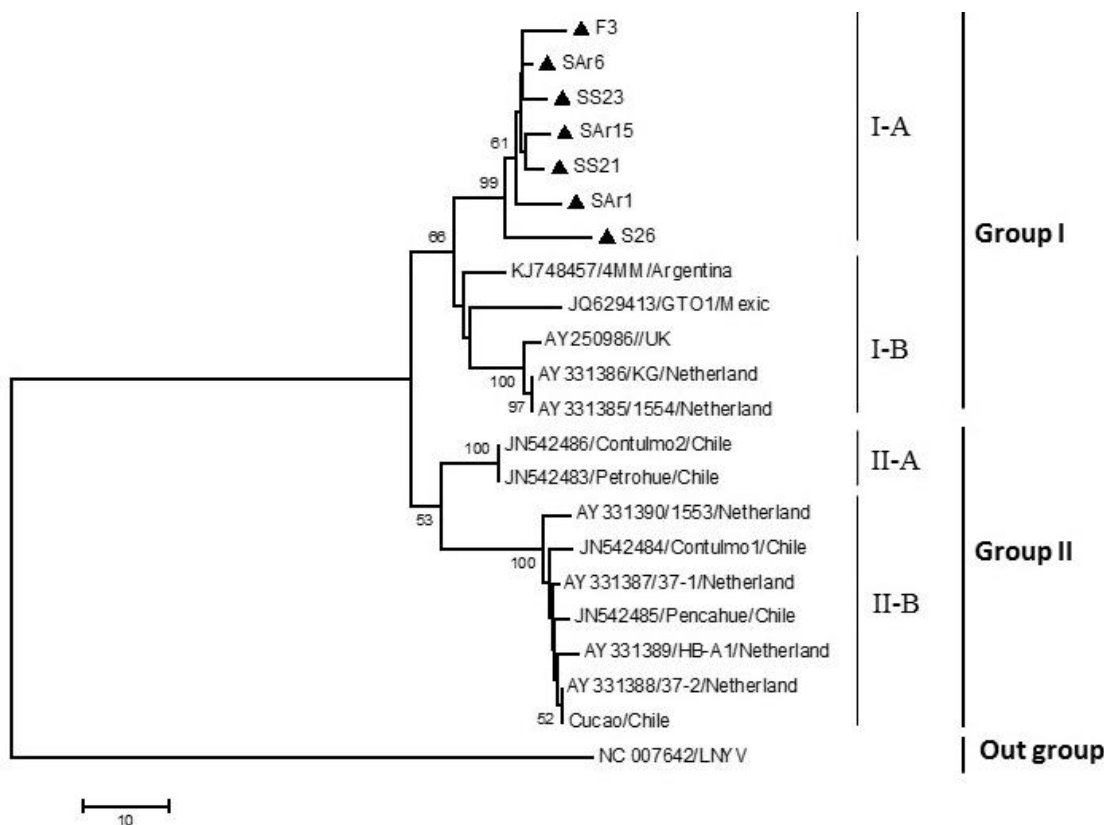
بررسی تبارزایی

در مطالعه‌ی تبارزایی، جدایه‌های SCV براساس ۳۰۴ نوکلئوتید از ژن پلیمرز در دو گروه و چهار زیرگروه تبارزایی قرار گرفتند. تمامی جدایه‌های این تحقیق در یک زیرگروه مستقل (I-A) به همراه یک جدایه از آرژانتین، یک جدایه از مکزیک، یک جدایه از انگلستان و دو جدایه از هلند (زیرگروه I-B) در گروه تبارزایی یک (I) و بقیه‌ی جدایه‌ها شامل پنج جدایه از شیلی و چهار جدایه از هلند در گروه دو (II) قرار گرفتند. درصد تشابه نوکلئوتیدی نیز این نتایج را تایید کرد. در درخت تبارزایی به دست آمده همخوانی بین منشا و گروه تبارزایی بجز در جدایه‌های ایرانی به دست نیامد (شکل ۳). در بین این دوگروه تبارزایی، بیشترین فاصله ژنتیکی در گروه یک $0/007 \pm 0/053$ و گروه دو $0/006 \pm 0/035$ بود. در بین این دو گروه، $0/015 \pm 0/109$ فاصله ژنتیکی به دست آمد.

بحث

در این تحقیق با استفاده از آزمون RT-PCR حضور ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی در استان کردستان مورد آزمون قرار گرفت و بخشی از توالی ژن پلیمرز در هفت جدایه ایرانی این ویروس بررسی شد. این ویروس در ایران تنها با روش سرولوژیک الیزا از استان‌های گیلان و

مازندران با درصد آلودگی ۱/۷٪ گزارش شده است (نصیری‌نیا و همکاران ۱۳۹۵) و تحقیق حاضر اولین بررسی مولکولی این ویروس در ایران و اولین گزارش از ردیابی آن در مزارع توت‌فرنگی استان کردستان می‌باشد. درصد آلودگی بالا در بین نمونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در مقایسه با مطالعه پیشین (نصیری‌نیا و همکاران ۱۳۹۵) می‌تواند ناشی از روش ردیابی مورد استفاده باشد. چوین و لیون (۱۹۹۵) از آنتی‌سرم تولید شده در موش بر علیه پروتئین‌های ماتریکس، فسفوپروتئین و نوکلئوپروتئین استفاده نمودند و این آنتی‌سرم‌ها تنها قادر به تفکیک گیاه آلوده از غیر آلوده در میزبان آزمایشی عروسک پشت‌پرده بودند و قادر به ردیابی ویروس از توت‌فرنگی نبودند. از آنجا که توت‌فرنگی حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی و پلی‌ساکاریدی می‌باشد (ابای و همکاران ۲۰۰۷) استخراج RNA نیز با مشکلاتی همراه است. برای غلبه بر این مشکل در این تحقیق از روش جذب سیلیکا (فویساک و همکاران ۲۰۰۰) استفاده شد که توانست RNA کل را از تمامی نمونه‌ها استخراج کند. برای اطمینان از استخراج RNA کل از تکثیر ژن اکتین استفاده شد که حاکی از تکثیر قطعه ۱۸۱ جفت‌بازی با آغازگرهای اختصاصی این ژن (منزل و همکاران ۲۰۰۲) بود.



شکل ۳- درخت تبارزایی ترسیم شده به روش NJ از هم‌دیف سازی ۳۰۴ نوکلئوتید از ژن پلیمراز ۲۱ جدایه SCV. مقدار بوت استرپ ۱۰۰۰ برای محاسبه روابط تبارزایی به کار رفته است. مقادیر بوت استرپ کمتر از ۶۰ روی گره‌ها نشان داده نشده است. جدایه‌های ردیابی شده در این تحقیق با علامت سیاه کنار آن نشان داده‌اند. ویروس زرد نکروتیک کاهو (LNYV) به عنوان فرد برون گروه در نظر گرفته شد.

منابع (مارتین و زانتاکیس ۲۰۰۶) مطابقت داشت (شکل ۱) درحالی‌که در بعضی از نمونه‌ها گیاه سالم به نظر می‌رسید. خسارت شدید این ویروس در آلودگی هم‌زمان با سایر ویروس‌های شته‌زاد توت‌فرنگی گزارش شده است (مارتین و زانتاکیس ۲۰۰۶) و در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفتند. نوع علائم و شدت آن نیز بر حسب رقم میزبان و سویه ویروس متفاوت است و رقم *F. vesca* به عنوان رقم معرف این ویروس شناخته شده است که در این رقم دفرمه شدن برگ، پیچیدگی و نامتقارن شدن برگ و لکه‌های کلروتیک مشاهده می‌شود (مارتین و زانتاکیس ۲۰۰۶). در استان کردستان ارقام مختلفی از این گیاه کشت می‌شوند که عمدتاً شامل پارس، کردستان، کوئین الیزا و ویتانا می‌باشد. نمونه‌برداری از تمامی این ارقام انجام

در این بررسی مشخص شد که مزارع توت‌فرنگی استان کردستان (۵۰/۹ درصد آلودگی بین نمونه‌ها) آلوده به این ویروس هستند هرچند، به دلیل توزیع غیریکنواخت ویروس در گیاه، حضور مواد با‌دارنده (تانن‌ها و ترکیبات فنلی) زیاد در توت‌فرنگی و نبود اختصاصیت کامل بین آغازگرها و جدایه‌ها یا مخلوطی از این روش‌ها، درصد آلودگی ممکن است بیشتر باشد. با توجه به اهمیت اقتصادی این ویروس (مارتین و زانتاکیس ۲۰۰۶)، انتقال آن توسط شته به روش پایای تکثیری (ریچاردسون و همکاران ۱۹۷۲) و عدم وجود رقم مقاوم توت‌فرنگی در برابر آن (تامسون و همکاران ۲۰۰۳)، شناسایی آن از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. در بعضی از نمونه‌ها علائم چروکیدگی روی برگ مطابق علائم توصیفی در

نشان داد که احتمالاً این ویروس طی یک رخداد به این منطقه وارد شده است. آنالیز افتراق ژنتیکی (F_{ST}) با نرم-افزار DnaSP v. 5.10.05 نشان داد که جمعیت ایرانی این ویروس از جمعیت‌های هلند و شیلی کاملاً مستقل هستند ($F_{ST} > 0.25$) و ممکن است این ویروس از کشور دیگری وارد شده باشد درحالی‌که میزان پارامتر F_{ST} برآورد شده برای دو جمعیت هلند و شیلی کمتر از ۰/۲۵ بود و نشان-دهنده‌ی مستقل نبودن جمعیت‌های آن‌ها و تبادل جریان ژنی در اثر انتقال مواد تکثیری آلوده می‌باشد.

کمترین میزان تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های این ویروس برای جمعیت ایران ($\pi = 0.03$) و سپس جمعیت شیلی ($\pi = 0.046$) به دست آمد. علت تنوع کم این ژن ویروس در جمعیت ایرانی ممکن است به دلیل منطقه جغرافیایی نسبتاً محدود برای نمونه‌برداری (یک استان)، منبع مشترک آلودگی به دلیل تکثیر غیر جنسی آن در برخی خزانه‌ها، گسترش سریع آن در منطقه به دلیل حضور احتمالی ناقل بوده باشد. از آنجایی‌که تمامی جدایه‌های این ویروس در این تحقیق در یک زیرگروه قرار گرفتند (شکل ۲)، نمی‌توان تنوع ژنتیکی کم این جدایه‌ها را به قدمت کم در این منطقه نسبت داد. نسبت‌های کم جانشینی مترادف به غیر مترادف (d_N/d_S) در همه جمعیت‌ها (جدول ۴) پیشنهاد می‌کند که انتخاب منفی، نقش عمده را در تکامل این ژن ویروسی بازی کرده‌اند. نکته‌ی قابل توجه اینکه میزان تنوع ژنتیکی این ویروس در جمعیت ایرانی از کمترین مقدار در مقایسه با سایر جمعیت‌ها برخوردار بود (جدول ۲) ولی جالب توجه اینکه بیشترین میزان d_N/d_S در جمعیت ایرانی مشاهده شد. علت این امر می‌تواند ناشی از جداسازی جدایه‌های این تحقیق از ارقام مختلف توت-فرنگی (جدول ۱) باشد که باعث سازگاری ویروس با رقم میزبان می‌شود که به عنوان فشار انتخاب ناشی از میزبان^۱ شناخته می‌شود (گارسیا-آرنا و همکاران ۲۰۰۳).

اطلاعات به دست آمده در این تحقیق به فهم ساختار مولکولی جمعیت‌های این ویروس و راهکارهای مقابله با

بررسی مولکولی آنها نشان داد که تمامی آنها، پتانسیل آلودگی به این ویروس را دارا می‌باشند و از این لحاظ تفاوتی در بین ارقام وجود نداشت.

در این تحقیق، این ویروس از گیاهان واجد و فاقد علایم ردیابی شد. ظهور علایم SCV بستگی به نوع استرین ویروس و رقم میزبان دارد (کرزال و همکاران ۱۹۸۸). برای مثال این ویروس هم از گیاهان دارای علایم و هم بدون علایم رقم پارس جدا شده است (جدول ۲) پس، ممکن است استرین‌های مختلفی از این ویروس در منطقه وجود داشته باشد یا این ویروس در آلودگی مخلوط با سایر ویروس‌های دیگر باشد. نشان داده شده است که آلودگی مخلوط در ویروس‌های شته‌زاد توت‌فرنگی منجر به تشدید علایم و خسارت بیشتر می‌شود (مارتین و زانتاکیس ۲۰۰۶، کرزال و همکاران ۱۹۸۸). بنابراین، تهیه‌ی قلمه از گیاهان به ظاهر سالم برای احداث باغ جدید بدون تست مولکولی این گیاهان کافی نبوده و ممکن است منجر به شروع آلودگی جدید گردد بنابراین، شناسایی گیاهان سالم با روش‌های حساس مولکولی مانند RT-PCR برای تهیه‌ی قلمه‌های عاری از ویروس پیشنهاد می‌شود. همچنین مشاهده شته‌های توت‌فرنگی در پشت برگ بعضی گیاهان (شکل ۲) که ممکن است ناقل این ویروس باشند، مدیریت این ویروس را با مشکل مواجه خواهد کرد که لازم است همزمان با کشت توت‌فرنگی گواهی شده، کنترل این ناقلین نیز مورد توجه قرار گیرد (مارتین و زانتاکیس ۲۰۰۶). آلودگی بیش از پنجاه درصدی نمونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق نشان می‌دهد که به احتمال زیاد ناقل این ویروس در گسترش بیماری نقش داشته است. همچنین، توت‌فرنگی به صورت غیرجنسی تکثیر می‌شود و این امر نیز در گسترش بیماری تاثیرگذار می‌باشد.

از لحاظ تبارزایی، مطابق با مطالعات پیشین (کلرکس و همکاران ۲۰۰۴)، جدایه‌های ویروس چروکیدگی توت‌فرنگی براساس ۳۰۴ نوکلئوتید از ژن پلیمراز در دو گروه تبارزایی قرار گرفتند که هفت جدایه تعیین توالی شده در این تحقیق در زیر گروه I-A قرار گرفتند (شکل ۳). قرار گرفتن جدایه‌های استان کردستان در یک زیرگروه مجزا

¹Host-associated selection

آن، غربال قلمه‌های سالم از آلوده جهت صدور گواهی سلامت و بررسی وضعیت کلی ویروس در ایران کمک شایانی خواهد کرد.

تشکر و قدردانی
نگارنده از دانشگاه کردستان بخاطر حمایت مالی این تحقیق در قالب طرح پژوهشی شماره ۴/۴۱۱۶۷ قدردانی می‌نماید.

منابع مورد استفاده

- بی‌نام، ۱۳۹۴. آمارنامه محصولات باغبانی سال ۱۳۹۴، نشر وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات، ۲۵۱ صفحه.
- فتاحی ف، ۱۳۸۳. شناسایی مولکولی ویروس‌های توت‌فرنگی ایران و حذف آن‌ها. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران.
- نصیری نیا ق، پوررحیم ر، الهی‌نیا س ع، روحی‌بخش ا و فرزادفر ش، ۱۳۹۵. وقوع بیماری‌های ویروسی مهم توت‌فرنگی در استان‌های گیلان و مازندران، مجله آفات و بیماری‌های گیاهی، جلد ۸۴، شماره یک صفحه‌های ۳۱ تا ۴۲.
- Abay K, Ekeberg D and Skrede G, 2007. Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4395–4406.
- FAO, 2012. FAOSTAT Database results from FAO website. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Foissac X, Savalle-Dumas P, Dulucq MJ, Gentit MJ and Candresse T, 2000. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulture* 550: 37-43.
- Hall TA, 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Gao R, Xu Y, Candresse T, He Z, Li S, Ma Y, Lu M, 2017. Further insight into genetic variation and haplotype diversity of *Cherry virus A* from China. *PLOS ONE* 12(10):e0186273
- García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM, 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology* 6: 225–232.
- Krczal H, 1988. Strawberry crinkle virus. Pp. 78-79 In: Smith IM, Dunez J, Lelliott RA, Phillips DH, Archer SA (eds.) *European handbook of plant diseases* Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Klerks MM, Lindner JL, Vařskova D, Spak J, Thompson JR, Jelkmann W and Schoen CD, 2004. Detection and tentative grouping of strawberry crinkle virus isolates. *European Journal of Plant Pathology* 110: 45–52.
- Martin RR and Tzanetakis IE, 2006. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Disease* 90: 384–396.
- Martin RR, Tzanetakis IE, Barnes JE and Elmhirst JF, 2004. First report of Strawberry latent ringspot virus in Strawberry in USA and Canada. *Plant Disease* 88: 575.
- Menzel W, Jelkmann W and Maiss E, 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99: 81-92.

- Moyer C, Whitaker VM and Peres NA, 2010. Viral Diseases of Strawberries. PP273. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. (<http://edis.ifas.ufl.edu/PP273>).
- Posthuma KI, Adams AN and Hong Y, 2000. *Strawberry crinkle virus*, a Cytorhabdovirus needing more attention from virologists. *Molecular Plant pathology* 1: 331-336.
- Posthuma KI, Adams AN, Hong Y and Kirby MJ, 2002. Detection of *Strawberry crinkle virus* in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. *Plant Pathology* 51: 266–274
- Postman JD, Tzanetakis IE and Martin RR, 2004. First report of *Strawberry latent ringspot virus* in a *Mentha* sp. from North America. *Plant Disease* 88: 907.
- Qin Y, Teixeira da Silva JA, Zhang L and Zhang S, 2007. Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. *Biotechnology Advances* 26: 219–232.
- Richardson J and Sylvester ES, 1988. Successful juice inoculation of the aphid–vectored strawberry crinkle virus. *California Agriculture* 42: 6–7.
- Richardson J, Frazier NW and Sylvester ES, 1972. Rhabdovirus particles associated with strawberry crinkle virus. *Phytopathology* 62: 491–492.
- Rozas J, 2009. DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. In *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series Vol. 537*, ed. D. Posada, 337-350. USA: NJ, Humana Press.
- Schoen, CD and Leone G, 1995. Towards molecular detection of aphid-borne strawberry viruses. *Acta Horticulturae* 385:55–63.
- Sylvester ES, Richardson J and Stenger DC, 1987. Use of injected *Macrosipum euphorbiae* aphids as surrogate vectors for transfer of strawberry crinkle virus to *Nicotiana* species. *Plant Disease* 71: 972–975.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution* 30: 2725-2729.
- Thompson JR, Wetzel S, Klerks MM, Vas̃kova D, Schoen CD, Pak JS and Jelkmann W, 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(2): 85-93.
- Tzanetakis IE, 2010. Emerging strawberry virus and virus-like diseases in the world. P. 427. 21st International conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops. Neustadt, Germany.
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, McGeoch DJ, Maniloff J, Mayo MA, Pringle CR, Wickner RB, 2000. *Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Plant Viruses*. New York, USA: Academic Press.

Molecular Detection and Phylogenetic Determinant of *Strawberry crinkle virus* in Strawberry Fields of Kurdistan Province Based on the Partial Polymerase- Gene Sequences

M Hajizadeh^{1*}

¹Assistant Professor, Department of Plant Protection Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj

*Corresponding author: m.hajizadeh@uok.ac.ir

Received: 27 October 2017

Accepted: 9 April 2018

Abstract

Leaf crinkle symptoms in some strawberry plants were observed in field, and therefore 55 leaf samples (symptomatic and asymptomatic) were collected from Kurdistan province and tested for infection with *Strawberry crinkle virus* (SCV) by RT-PCR. Total RNA was extracted by silica-capture method and subjected to cDNA synthesis with random hexamer primers. RT-PCR was done by specific SCV-primers and PCR products were observed on 1.2% agarose gels. RT-PCR results were showed that 51.9% of the samples were infected by SCV. Based on the geographical origin, cultivar and symptom, seven isolates were selected, sequenced and analyzed for molecular characterization and phylogenetic studies on SCV L-gene. Phylogenetic analysis showed that all the seven isolates from Kurdistan were placed in a distinct subgroup, phylogenetic group II. The average genetic distance between the isolates from Iran was 0.031 ± 0.005 but between these isolates and the other isolates, available in GenBank, was 0.069 ± 0.014 . Pairwise comparisons of the sequences showed that isolate SAr6 had the highest nucleotide similarity (95.1%) to isolate 4MM of Argentina whereas isolate SS26 had the lowest nucleotide identity with isolate HB-A1 of Netherlands. This is the first report on occurrence of SCV on strawberry in Kurdistan province and also the first report of molecular detection of SCV in Iran.

Keywords: Genetic distance, Kurdistan province, Specific primers, Strawberry.