فنآوری زیستی در کشاورزی/ جلد هفدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
DOI: 10.22084/ab.2018.16618.1381

بررسی همراهی گونه‌های ویروسی مختلف با بیماری موزائیک انجیر در ایران

Study on the Association of Different Virus Species with Fig Mosaic Disease in Iran

اطهر علی شیری[1*]، فرشاد رخشنده رو[2]، غلامرضا صالحی جوزانی[3] و مسعود شمس بخش[4]

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۸

چکیده

بیماری موزائیک انجیر مهم‌ترین بیماری خسارت زا در انجیر است و چندین ویروس از خانواده‌های مختلف با ژنوم از نوع آر.ان.ای (RNA) و دی.ان.ای (DNA) در آن نقش دارند. در این تحقیق حضور مهم‌ترین ویروس‌های با ژنوم آر.ان.ای دخیل در بیماری شامل *Fig mosaic virus* (FMV)، *Fig latent virus-1* (FLV-1)، *Fig cryptic virus* (FCV)، *Fig fleck-associated virus* (FFKaV)، *Fig leaf mottle associated virus-1* (FLMaV-1)، *Fig leaf mottle associated virus-2* (FLMaV-2)، *Fig leaf mottle associated virus-3* (FLMaV-3) و *Fig mild mottle associated virus* (FMMaV) در انجیرکاری‌های مختلف کشور موردبررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری‌ها از ۱۴ استان انجام شد و شامل ۶۱۱ نمونه برگی دارای علائم موزائیکی بود. پس از استخراج آر.ان.ای دو رشته‌ای با ستون سلولزی، سی.دی.ان.ای (cDNA) با استفاده از آغازگر تصادفی ساخته شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای هرکدام از این ویروس‌ها با آغازگر اختصاصی مربوط به هر ویروس انجام گرفت. درنهایت بعد از مشخص شدن مناطق آلوده، آلودگی‌های مخلوط بین خانواده‌های مختلف ویروسی موردبررسی و FMV مشخص شد. نتایج حاکی از وجود آلودگی در تمام استان‌های موردمطالعه بود و هم‌چنین بیش از نیمی از نمونه‌های جمع‌آوری شده حداقل به یکی از ویروس‌ها آلوده بودند. بعضی از ویروس‌ها مانند FMV نیز در بعضی از مناطق مثل استان فارس ردیابی نشد. بیش‌ترین میزان آلودگی مربوط به FMV و FFKaV با ۳۴/۷ و ۱۴/۲ درصد و کم‌ترین مربوط به FMMaV با ۴/۴ درصد آلودگی بود. بیش‌ترین میزان آلودگی مخلوط مربوط به حضور FMV با اعضاء خانواده *Closteroviridae* بود.

واژه‌های کلیدی: بیماری موزائیک انجیر، ویروس موزائیک انجیر، آلودگی مشترک، ویروس‌های آر.ان.ای‌دار

۱ و ۲. دانشجوی دکتری و استادیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. استاد پژوهش، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران
۴. دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
*: نویسنده مسوول Email: alishiria@yahoo.com

مقدمه

انجیر با نام علمی *Ficus carica* L. گیاهی از تیره توت (*Moraceae*) بوده و به جنس *Ficus* تعلق دارد *واتسون و دالویتز* (Watson and Dallwitz, 2004). این گیاه ارزش غذایی و داروئی بالایی داشته و به‌صورت دیم و آبی در تمام نقاط جهان قابل‌کشت است. براساس آمارنامه *فائو* (FAO, 2014)، ایران با تولید سالانه بیش از ۷۲۰۰۰ تن انجیر رتبه پنجم را از لحاظ میزان تولید بعد از کشورهای ترکیه، مصر، الجزایر و مراکش به خود اختصاص داده است. از لحاظ اقتصادی، صادرات میوه‌های خشک و تازه انجیر یکی از مهم‌ترین صادرات کشور را شامل می‌شود به‌طوری‌که بر اساس آمارنامه جهاد کشاورزی در سال ۱۳۹۳ میوه انجیر به‌صورت تازه یا خشک کرده به ۳۵ کشور آسیایی و اروپایی صادر شده و فروشی در حدود ۸۵ میلیارد تومان (۳۲ میلیون دلار) داشته است. این گیاه علاوه بر این‌که در باغات و به‌صورت تجاری کشت می‌شود در فضای سبز هم‌چنین در منازل نیز کشت داده می‌شود و به‌صورت زینتی نیز وجود دارد. از لحاظ باغبانی انجیر به دو رقم بر و خوراکی تقسیم‌بندی می‌شود و بیماری موزائیک انجیر در هر دو دیده شده است. از بین بیماری‌های انجیر، بیماری موزائیک انجیر مهم‌ترین بیماری ویروسی انجیر است که چندین گونه از ویروس‌های مختلف با ژنوم‌های متفاوت در آن نقش دارند. علائم بیماری به‌صورت ایجاد نقوش موزائیکی و ابلقی در سطح برگ و میوه و گاهی مواقع در سطح شاخه می‌باشد. هم‌چنین پیچیدگی و چین‌خوردن برگ از دیگر علائم شایع این بیماری است. کاهش محصول یکی از مهم‌ترین پیامدهای این بیماری است. به‌طوری‌که می‌توان گفت در هر سال نسبت به سال قبل از آن پنج درصد کاهش محصول ایجاد می‌شود (مشاهدات محلی و برآورد از کشاورزان) و به تناسب آن کاهش کمیت و کیفیت میوه را در پی دارد. به این صورت که علائم لکه‌ای و سوختگی روی میوه ایجاد می‌کند و موجب کاهش اندازه میوه انجیر از حالت طبیعی خودش می‌شود. علاوه‌بر این موجب ریزش پیش از موعد میوه‌ها نیز می‌شود. به‌مرور زمان و با افزایش آلودگی به مرحله‌ای می‌رسد که گل‌آذین‌ها ریزش کرده و میوه‌ای تشکیل نمی‌شود و عملکرد درخت بسیار کاهش می‌یابد. غیر از *Fig mosaic virus* که به‌عنوان عامل اصلی فرض شده برای این بیماری می‌باشد، ویروس‌های آر.ان.ای دار دیگری ازجمله *Fig leaf mottle associated virus-1*، *Fig leaf mottle associated virus-2*، *Fig mild mottle associated virus*، *Fig cryptic virus*، *Fig latent virus-1* و *Fig fleck-associated virus* از این بیماری گزارش شده است. در ایران نیز تحقیقات زیادی بر روی این ویروس‌ها انجام شده و از استان‌های متفاوتی و البته به تعداد محدود بعضی از این عوامل گزارش شده است. از ویروس‌های با پیکره رشته‌ای می‌توان به FLV-1 اشاره کرد. ساختار و سازماندهی ژنوم این ویروس با اعضای جنس *Trichovirus* از خانواده *Betaflexiviridae* مشابهت دارد. ژنوم ویروس از نوع آر.ان.ای تک‌رشته‌ای مثبت با اندازه تقریبی ۸۰۰۰ نوکلئوتید می‌باشد *گتونی* و همکاران (Gattoni *et al*., 2009). از ایران این ویروس برای اولین بار توسط *شاه‌میرزایی* و همکاران (Shahmirzaie *et al*., 2012) از تهران، گلستان، مازندران، سمنان و لرستان گزارش شد. کلسترووویروس‌ها از دیگر ویروس‌های رشته‌ای می‌باشند که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفتند. ویروس‌هایی که در این خانواده قرار دارند دارای ژنوم آر.ان.ای تک رشته‌ای بوده و در انجیر گونه‌های FLMaV-1، FLMaV-2، FLMaV-3 و FMMaV را شامل می‌شوند. FLMaV-1 به‌عنوان یک عضو آزمایشی در جنس *Closterovirus* بوده و اولین بار از ایتالیا گزارش شد *البیانو* و همکاران (Elbeaino *et al*., 2006). این ویروس در ایران از استان‌های تهران، گلستان، مازندران و لرستان ردیابی شده است *شاه‌میرزایی* و همکاران (2012). FLMaV-2 نیز اولین بار از الجزایر گزارش شده است و به‌عنوان یک عضو آزمایشی در جنس *Ampelovirus* قرار گرفته است *البیانو* و همکاران (Elbeaino *et al*., 2007). این گونه ویروسی در ایران از استان‌های خراسان رضوی و مازندران ردیابی شده است *دانش‌آموز* و همکاران (Danesh-Amuz *et al*., 2013). FLMaV-3 سومین عضو از خانواده کلسترووویروس‌ها می‌باشد که به‌تازگی شناسایی شده و بسیاری از ویژگی‌های ژنومی آن هنوز مشخص نشده است. این ویروس اولین بار از ترکیه گزارش شده است *زانتاکیس* و همکاران (Tzanetakis *et al*., 2010) و در ایران در سال ۲۰۱۴ از مازندران ردیابی شده است *نوروزیان* و همکاران (Norozian *et al*., 2014). اما چهارمین ویروس رشته‌ای از خانواده *Closteroviridae*، گونه FMMaV می‌باشد که متعلق به جنس *Closterovirus* است. این ویروس در سال ۲۰۱۰ از کشور ایتالیا معرفی شد *البیانو* و همکاران (Elbeaino *et al*., 2010) و بعد از آن از مناطق مختلفی در دنیا گزارش شده است *بایود* و همکاران (Bayoudh *et al*., 2017). این ویروس از هفت عدد چارچوب خوانش باز تشکیل شده و در سال ۲۰۱۸ این ویروس برای نخستین بار از کشور و از استان مازندران گزارش گردید *علی‌شیری* و همکاران (Alishiri *et al*., 2018). از مهم‌ترین ویروس‌های ایزومتریک دخیل در بیماری

موزائیک انجیر می‌توان به FCV، FFKaV و FMV اشاره کرد. FCV دارای دو آر.ان.ای ژنومی و به‌صورت دو رشته ای بوده و در بررسی‌های تبارزایی با اعضای جنس *Alphacryptovirus* از خانواده *Partitiviridae* در یک دسته قرار گرفته‌اند *البیانو* و همکاران (Elbeaino *et al*., 2011b). این ویروس در ایران از استان‌های البرز، تهران و مرکزی گزارش شده است *نوری آل آقا* و *رخشنده‌رو* (Nouri Ale-Agha and Rakhshandehroo, 2014). از دیگر ویروس‌های ایزومتریک می‌توان به FFkaV اشاره کرد. ژنوم این ویروس دارای آر.ان.ای تک رشته‌ای مثبت بوده و در انتهای ′3 دارای توالی Poly A می‌باشد. در بررسی‌های تبارزایی بر مبنای ORF1، این گونه ویروسی با جنس *Maculavirus* از خانواده *Tymoviridae* در یک دسته طبقه‌بندی می‌شوند *البیانو* و همکاران (Elbeaino *et al*., 2011a). این ویروس در ایران از استان‌های البرز، تهران، مرکزی و سمنان گزارش شده است (*نوری آل آقا* و *رخشنده‌رو*، 2014). سومین ویروس از ویروس‌های ایزومتریک دخیل در بیماری که به‌عنوان مهم‌ترین عامل بیماری است، ویروس موزائیک انجیر می‌باشد. در طبقه‌بندی جدید، FMV به‌عنوان یک گونه مصوب *آدام* و *کاستن* (Adams and Carstens, 2012) در جنس جدیدی با نام *Emaravirus* قرار گرفته است *البیانو* و همکاران (Elbeaino *et al*., 2012) و این جنس از لحاظ تاکسونومیکی به خانواده *Fimoviridae* در راسته *Bunyavirales* تعلق دارد *آدام* و همکاران (Adams *et al*., 2017). FMV دارای شش قطعه آر.ان.ای ژنومی تک رشته‌ای منفی است و هرکدام از این قطعات دارای یک چارچوب خوانش باز (ORF) مجزا هستند که بر روی آر.ان.ای مکمل ویروسی قرار گرفته‌اند و تمام این قطعات نیز به‌طور کامل تعیین توالی شده‌اند *ایشیکاوا* و همکاران (Ishikawa *et al*., 2012). آلودگی به FMV نیز از چندین نقطه کشور گزارش شده است *شاه‌میرزایی* و همکاران؛ *علیمرادیان* و همکاران؛ *امیری مظهر* (Shahmirzaie *et al*., 2010; Alimoradian *et al*., 2016; Amiri Mazhar, 2012).

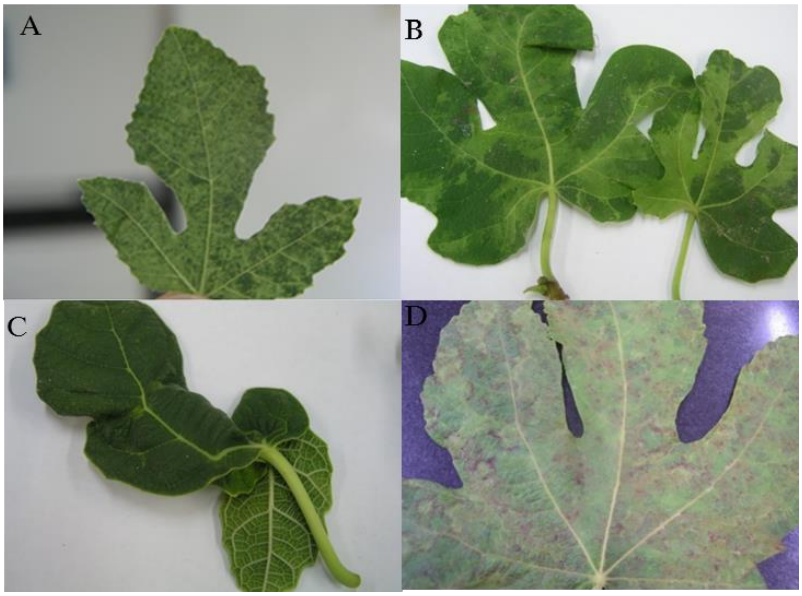
علاوه‌بر این ویروس‌ها، *Fig badnavirus-1* به‌عنوان تنها ویروس دارای ژنوم دی.ان.ای از انجیر از خانواده *Caulimoviridae* در سال ۲۰۱۰ از ایالات متحده گزارش شده است (*زانتاکیس* و همکاران، 2010). در ایران در سال ۲۰۱۴ این ویروس گزارش شده است که میزان آلودگی بالایی نیز داشته است *علیمرادیان* و همکاران (Alimoradian *et al*., 2014).

هدف از این تحقیق شناسایی عوامل ویروسی دخیل در بیماری موزائیک انجیر در مناطقی است که قبلاً از آن‌ها نمونه‌برداری انجام نشده و یا در صورت نمونه‌برداری، عوامل ویروسی اشاره شده از آنجا گزارش نشده است. هدف دیگر این تحقیق تعیین فراوانی عوامل ویروسی اشاره شده و هم‌چنین تعیین آلودگی‌های مشترک بین هر یک از عوامل مورد تحقیق با ویروس موزائیک انجیر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی فصول بهار و تابستان سال‌های زراعی ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ از ۱۴ استان کشور شامل فارس، گلستان، مازندران، خراسان رضوی، گیلان، مرکزی، تهران، کرمان، لرستان، قم، کرمانشاه، یزد، البرز و سمنان تعداد ۶۱۱ نمونه برگی دارای علائم بیماری انتخاب شد. تعداد نمونه‌های انتخاب شده از هر استان در جدول دو مشخص شده است. جهت ردیابی عوامل ویروسی از درختان انجیر آبی و دیم که علائم شاخص بیماری موزائیک را داشتند، نمونه‌برداری انجام شد. علائم متنوع و بیش‌تر شامل موزائیک‌های سبز پررنگ با حاشیه نکروز، موزائیک‌های سبزرد کوچک و بدشکلی برگ‌ها بود. علائم شاخص که در این تحقیق مشاهده شدند در شکل ۱ آورده شده است. نمونه‌برداری از درختان جوان و پاجوش‌ها و هم‌چنین از درختان انجیری که در فضاهای عمومی و پارک‌ها وجود داشتند، انجام شد.



شکل ۱: علائم بیماری موزائیک انجیر در نمونه‌های برگی جمع‌آوری شده. A) موزائیک خفیف B) موزائیک شدید C) تغییر شکل و جمع شدن برگ و D) نکروز شدید

Fig. 1: Fig mosaic disease symptoms in collected leaf samples. A) Mild mosaic B) Severe mosaic C) Leaf malformation and crinkling and D) Severe necrosis

استخراج آر.ان.ای دو رشته‌ای، ساخت سی.دی.ان.ای و انجام آزمون RT-PCR

استخراج آر.ان.ای دو رشته‌ای از سلول‌های گیاهی آلوده می‌تواند به‌عنوان روشی برای تشخیص ویروس‌های گیاهی دارای ژنوم چندبخشی به کار برده شود. در این تحقیق جهت تشخیص ویروسی بودن عوامل بیماری، استخراج آر.ان.ای دو رشته‌ای از برگ‌های انجیر انجام گرفت. این آزمون مطابق با روش *والورده* و همکاران با استفاده از دو مرحله کروماتوگرافی ستونی با استفاده از ستون Cellulose CF-11 ساخت شرکت سیگما صورت پذیرفت *والورده* و همکاران (Valverde *et al.*, 1990). برای ساخت سی.دی.ان.ای از آغازگرهای تصادفی شش جفت بازی شرکت فرمنتاس و به همراه آنزیم نسخه‌بردار معکوس MMuLV (Fermentas, Germany) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد.

برای انجام آزمون پی.سی.آر، از آغازگرهای اختصاصی مربوط به هشت گونه ویروسی موردبررسی استفاده شد. توالی آغازگرهای استفاده شده و هم‌چنین اندازه قطعات مورد انتظار در جدول ۱ آورده شده است. ساخت آغازگرها توسط شرکت MWG آلمان انجام شد. برای بهینه نمودن واکنش جهت بالا بردن راندمان تکثیر قطعه هدف و هم‌چنین کاهش تکثیر قطعات غیراختصاصی، شرایط دمایی و میزان مواد برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل غلظت آغازگرها، میزان کلرید منیزیم، دما و زمان هم‌جوشی و تعداد سیکل‌های واکنش بررسی و درنهایت شرایط زیر به‌عنوان بهترین گزینه انتخاب شد. برای انجام آزمون پی.سی.آر از ۲ میکرولیتر از سی.دی.ان.ای ساخته شده استفاده شد. برای یک واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر علاوه‌بر سی.دی.ان.ای، از ۲/۵ میکرولیتر از بافر پی.سی.آر 10X، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP mix از استوک ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از کلرید منیزیم از استوک ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از هرکدام از آغازگرهای پیش‌رو و معکوس از استوک ۱۰ پیکومول، ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم تک دی.ان.ای. پلی‌مراز (5 U/mL) شرکت فرمنتاس آلمان و ۱۶/۷ میکرولیتر آب‌مقطر استریل استفاده شد. برنامه‌ی دمایی استفاده شده برای آغازگرهای مختلف تقریباً مشابه بود ولی در دمای اتصال باهم متفاوت بودند. بهترین دمای اتصال هر آغازگر با استفاده از شیب دمایی در محدوده دمای ذوب هر آغازگر در پی.سی.آر به‌دست آمد (جدول ۱). برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از برنامه دمایی زیر استفاده شد. یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸-۴۸ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه و یک مرحله نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. برای مشاهده نتیجه واکنش، الکتروفورز محصولات پی.سی.آر در ژل آگارز ۱/۲ درصد و با بافر TBE انجام شد. رنگ مورداستفاده Safe stain

(محصول شرکت سیناکلون ایران) بود و محصول پی.سی.آر در زیر نور UV عکس‌برداری شد. در این آزمون برای اطمینان از عدم آلودگی واکنش‌گرها، در هر دور آزمایش از شاهد پوچ (بلانک) و شاهد منفی استفاده شد. بلانک، نمونه‌ای بود که فاقد دی.ان.ای بود و برای شاهد منفی از سی.دی.ان.ای ساخته شده از گیاه انجیر سالم جوان فاقد علائم که در گلخانه بهتمدت ۶ ماه تحت بررسی بود استفاده شد.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای استفاده شده برای ردیابی ویروس‌های مختلف عامل بیماری موزائیک انجیر در ایران
Table 1: Primer characteristics used for detecting of different viruses causing fig mosaic diseases in Iran

نام ویروس Virus name	توالی آغازگر Primer sequence 5′-3′	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)	ژن هدف Target gene	اندازه قطعه تکثیری (جفت باز) Amplicon size (bp)	منابع References
Fig leaf mottle associated virus-1 (FLMaV-1)	CGTGGCTGATGCAAAGTTTA GTTAACGCATGCTTCCATGA	54	HSP70	350	*البیانو* و همکاران، 2006 Elbeaino *et al*., 2006
Fig leaf mottle associated virus-2 (FLMaV-2)	GAACAGTGCCTATCAGTTTGATTTG TCCCACCTCCTGCGAAGCTAGAGAA	58	HSP70	360	*البیانو* و همکاران، 2007 Elbeaino *et al*., 2007
Fig leaf mottle associated virus-3 (FLMaV-3)	CTGTATCTGTCATTACCTCTTCGGG ATGCTTCCTCGGCTGC	52	HSP70	469	*زانتاکیس* و همکاران، 2010 Tzanetakis *et al*., 2010
Fig mosaic virus (FMV)	GGGTACATATGCGTCATTCTTG CGTTTGTCTTGGATCACAGCAA	54	GP	468	*والیا* و همکاران، 2009 Walia *et al*., 2009
Fig mild mottle associated virus (FMMaV)	AAGGGGAATCTACAAGGGTCG TATTACGCGCTTGAGGATTGC	48	HSP70	311	*البیانو* و همکاران، 2010 Elbeaino *et al*., 2010
Fig latent virus-1 (FLV-1)	CCATCTTCACCACACAAATGTCCAA TCTTCTTGGCCTCCATAAG	56	CP	389	*گتونی* و همکاران، 2009 Gattoni *et al*., 2009
Fig cryptic virus (FCV)	TTG GCC GAC TAC TCA AGT CA TGC GAG GTA GCA TGT GTA GC	50	CP	375	*البیانو* و همکاران، 2011b Elbeaino *et al*., 2011b
Fig fleck-associated virus (FFKaV)	TCA ATC CCA AGG AGG TGA AG ACA CGG TCA ATG AGG GAG TC	53	RdRp	270	*البیانو* و همکاران، 2011a Elbeaino *et al*., 2011a

همسانه‌سازی و تعیین توالی

برای این منظور تعدادی از محصولات پی.سی.آر حاوی باند مورد انتظار پس از الکتروفورز، با استفاده از کیت استخراج دی.ان.ای از ژل شرکت کیاژن (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) از ژل استخراج شدند. سپس قطعه‌های ژنتیکی هدف در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T وارد شده و پلاسمید نوترکیب به سلول‌های باکتری *E. coli* سویه DH5α منتقل شدند (*سمبروک و راسل* Sambrook and Russell, 2001). پس از غربالگری، پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت فرمنتاس از باکتری‌های نوترکیب مربوطه استخراج شدند و سپس با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Eco*RI، حضور قطعه موردنظر در پلاسمیدها تایید شد. از هرگونه‌ی ویروسی موردبررسی و فقط از استان مازندران، تعداد دو تکرار از پلاسمیدها برای تعیین توالی انتخاب شدند. خوانش‌ها به‌صورت رفت و برگشت و با استفاده از آغازگر عمومی M13 انجام شد و برای این امر نمونه‌ها به شرکت ماکروژن کره‌جنوبی ارسال شدند. توالی‌های حاصل از خوانش با کمک نرم‌افزار Editseq مورد ارزیابی قرار گرفتند و پس از اخذ توالی نهایی، توالی‌ها با موتور جستجوگر nBlast در پایگاه اطلاعاتی NCBI بررسی شدند.

نتایج

برای انجام آزمون RT-PCR ابتدا اقدام به استخراج آر.ان.ای دو رشته‌ای شد. ویروس‌های دارای ژنوم آر.ان.ای تک‌رشته‌ای تقریباً ۹۰ درصد ویروس‌های گیاهی شناخته شده را تشکیل می‌دهند. در طی تکثیر این ویروس‌ها در سلول‌های گیاهی، آر.ان.ای دو رشته‌ای به‌عنوان یک محصول واسطه‌ای تشکیل می‌شود که به آن فرم تکثیری (Replicative form: RF) گفته می‌شود که در زمان آلودگی سلول‌های گیاهی به ویروس‌های دارای ژنوم از نوع آر.ان.ای تک‌رشته‌ای به‌طور پیوسته در داخل سلول گیاه تشکیل می‌شوند. لذا در صورت مشاهده باند مربوط به آر.ان.ای دو رشته‌ای در ژل آگارز می‌توان در خصوص حضور آلودگی ویروسی بدون انجام پی.سی.آر در نمونه گیاهی استخراج شده با احتمال بسیار زیاد قضاوت نمود. در شکل ۲ نتیجه استخراج آر.ان.ای دو رشته‌ای و باندهای مربوطه مشخص شده است.

پس از استخراج آر.ان.ای و ساخت سی.دی.ان.ای، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تمام گونه‌های ویروسی موردبررسی انجام شد. نتایج حاصل از پی.سی.آر و باندهای حاصل از تکثیر گونه‌های موردبررسی ویروسی در شکل ۲ آورده شده است. با توجه به این شکل، باند موجود در چاهک‌های شاهد منفی، دایمر پرایمر می‌باشد که در محدوده زیر 100bp قرار گرفته است. اما باندهای اضافه‌ای که در چاهک‌های نمونه دیده می‌شود دلایل متنوعی دارد. احتمالاً عدم مناسب بودن پرایمر برای تکثیر قطعه هدف می‌تواند یکی از دلایل باشد و پرایمر طوری طراحی شده که غیر از قطعه هدف، احتمالاً به سایر نقاط نیز می‌چسبد. از دلایل دیگر می‌توان به عدم مناسب بودن برنامه دمایی PCR برای تکثیر قطعه هدف اشاره کرد. علاوه بر این دلایل جهش ژنتیکی در توالی هدف نیز می‌تواند منجر به ایجاد باند اضافه شود. اما چون فرایند کلونینگ انجام شد از قطعه موردنظر و درنتیجه ویروس هدف اطمینان حاصل شد.

نتایج نشان داد از مجموع ۶۱۱ نمونه حاوی علائم موزائیک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، ۳۴۲ نمونه حداقل به یکی از ویروس‌های موردبررسی آلوده‌اند. این تعداد که معادل ۵۵/۹ درصد از کل نمونه‌هاست نشان از آلودگی بالای این کمپلکس ویروسی در کشور دارد (جدول ۲). در بین استان‌های موردبررسی، بیش‌ترین میزان آلودگی را استان‌های گلستان، کرمانشاه و گیلان با محدوده آلودگی ۸۳ تا ۸۶ درصد به خود اختصاص دادند. در ادامه استان‌های مازندران و مرکزی قرار داشتند که محدوده آلودگی در آن‌ها بین ۷۵ تا ۸۰ درصد بود. سمنان، تهران و لرستان آلودگی بین ۶۰ تا ۷۰ درصد را نشان دادند. استان خراسان رضوی با ۵۴/۲ درصد در مرتبه بعدی قرار داشت. استان‌های البرز، یزد، کرمان و قم درصد آلودگی بین ۴۰ تا ۵۰ را نشان دادند. اما کم‌ترین میزان آلودگی مربوط به استان فارس با ۲۵/۶ درصد بود. در مجموع استان‌های شمالی و غربی کشور بیش‌ترین میزان آلودگی به کمپلکس ویروسی را نشان دادند. استان‌های مرکزی و خصوصاً جنوبی کشور آلودگی کم‌تری نسبت به بیماری با ویروس‌های موردبررسی داشتند.

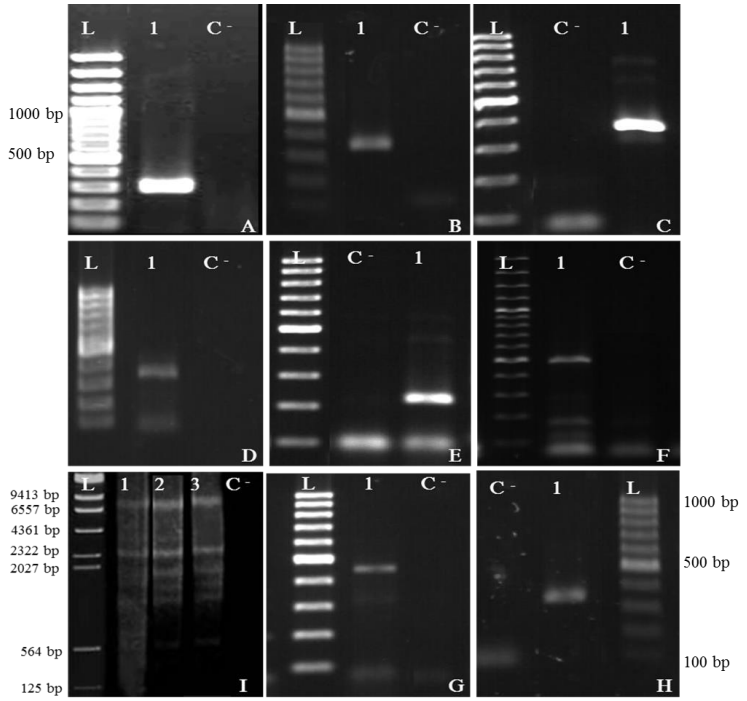
در بین هشت گونه ویروس موردبررسی، ویروس موزائیک انجیر با ۳۴/۷ درصد بیش‌ترین میزان آلودگی را در بین تمام ویروس‌های موردبررسی داشت. این درصد معادل ۲۱۲ نمونه از ۶۱۱ نمونه می‌باشد. در ادامه ویروس‌های FFKaV، FLV-1 و FCV قرار داشتند که از آلودگی بالای ۱۰ درصد در بین نمونه‌ها برخوردار بودند و این درصد آلودگی به‌ترتیب ۱۴/۲، ۱۳/۸ و ۱۲/۳ بود که معادل تعداد ۸۶، ۸۴ و ۷۵ نمونه از کل نمونه‌ها می‌باشد. اما کم‌ترین میزان آلودگی در بین ویروس‌های خانواده کلوستروویروس دیده شد. به این صورت که ویروس‌های FLMaV-1، FLMaV-2، FLMaV-3 و FMMaV به‌ترتیب با درصد آلودگی ۹/۵، ۵/۹، ۵/۶ و ۴/۴ که معادل ۵۸، ۳۶، ۳۴ و ۲۷ نمونه از ۶۱۱ نمونه موردبررسی است، کم‌ترین میزان پراکنش را در نمونه‌های انجیر داشتند.

درمجموع آلودگی به FMV در استان مازندران نسبت به سایر استان‌ها بیش‌تر و معادل ۶۴/۹ درصد بود. در ادامه استان کرمانشاه با ۶۰، گیلان با ۵۵/۵، مرکزی با ۵۳/۳ و گلستان با ۵۲ درصد قرار داشتند. استان‌های لرستان، سمنان، تهران، خراسان رضوی و یزد به‌ترتیب با ۴۷/۹، ۴۱/۶، ۳۸/۵، ۳۱/۴ و ۳۰ درصد در رتبه‌های بعدی از آلودگی قرار داشتند. استان‌هایی که درصد آلودگی آن‌ها کم‌تر از ۳۰ درصد بود شامل قم و البرز بودند که به‌ترتیب آلودگی معادل ۲۹/۶ و ۲۸/۵ درصد را داشتند. استان کرمان با ۱۶/۶ درصد کم‌ترین میزان آلودگی در بین استان‌های نمونه‌برداری شده را داشت. در این میان فقط نمونه‌های جمع شده از استان فارس بودند که هیچ‌گونه آلودگی به FMV را نشان ندادند. ویروسی که بعد از FMV از بیش‌ترین درصد آلودگی برخوردار بود FFKaV بود. بیش‌ترین آلودگی به این ویروس ۲۶/۶ درصد بود که در استان مرکزی دیده شد. در ادامه استان کرمانشاه با ۲۴/۴ درصد قرار داشت. استان‌های لرستان و تهران با درصد آلودگی یکسان معادل ۲۲/۹ در رتبه بعدی قرار داشتند. اما استان‌های شمالی کشور شامل گیلان، مازندران، سمنان و گلستان درصد آلودگی نزدیک به هم و به‌ترتیب با ۲۲/۲، ۲۱، ۲۰/۸ و ۱۹ در ادامه این

استان‌ها قرار داشتند. استان قم با ۱۴/۸ و البرز با ۱۴/۲ درصد در رتبه‌های بعدی ازلحاظ آلودگی به FFKaV قرار داشتند. خراسان رضوی با ۵/۷ درصد، کم‌ترین میزان آلودگی به FFKaV را نشان داد. در استان‌های جنوبی کشور شامل کرمان، فارس و یزد هیچ‌گونه آلودگی به این ویروس در نمونه‌های موردبررسی ردیابی نشد. ویروس FLV-1 رتبه سوم را ازلحاظ آلودگی به مجموعه ویروس‌های موردبررسی داشت. برخلاف دو ویروس FMV و FFKaV، تمام استان‌های نمونه‌برداری شده، آلودگی به FLV-1 را نشان دادند. بیش‌ترین میزان آلودگی در استان گلستان و سمنان به‌ترتیب با ۳۳/۳ و ۲۹/۱ درصد دیده شد. بعد از آن استان‌های مرکزی، تهران و مازندران به‌ترتیب با ۲۰، ۱۸/۷ و ۱۷/۵ درصد قرار داشتند. استان‌های لرستان و گیلان با ۱۶/۶ درصد، آلودگی یکسانی را نشان دادند. استان‌های کرمانشاه، خراسان رضوی، قم و البرز با ۱۳/۳، ۱۱/۴، ۱۱/۱ و ۹/۵ درصد در رتبه‌های بعدی آلودگی قرار داشتند. استان‌های جنوبی کشور ازجمله کرمان، یزد و فارس با درصدهای آلودگی ۷/۱، ۶/۶ و ۴/۲ کم‌ترین میزان آلودگی به FLV-1 در بین تمام استان‌های نمونه‌برداری شده نشان دادند. FCV ازلحاظ میزان آلودگی بعد از FLV-1 قرار داشت. ازلحاظ بیش‌ترین میزان آلودگی به FCV، استان سمنان با ۲۳/۳ درصد در رتبه نخست قرار داشت. استان‌های تهران با ۲۰/۸، مازندران با ۱۹/۲، البرز با ۱۹، لرستان با ۱۸/۷ و قم با ۱۸/۵ درصد در رتبه‌های بعدی از آلودگی قرار داشتند. استان‌های کرمانشاه، گلستان، گیلان و سمنان به‌ترتیب ۱۵/۵، ۱۴/۲، ۱۱/۱ و ۸/۳ درصد آلودگی را نشان دادند. استان‌های کرمان و فارس با ۴/۷ و ۲/۵ درصد، کم‌ترین میزان آلودگی به FCV را نشان دادند. در استان خراسان رضوی نیز آلودگی به این ویروس ردیابی نشد. از ویروس‌های خانواده کلوستروویروس، FLMaV-1 نسبت به سایر ویروس‌های این خانواده از آلودگی بیش‌تری برخوردار بود. آلودگی به FLMaV-1 در استان مازندران از سایر استان‌ها بیش‌تر و معادل ۱۷/۵ درصد بود. بعد از مازندران، استان‌های البرز و کرمانشاه با ۱۴/۲ و ۱۳/۳ درصد آلودگی قرار داشتند. کرمان، تهران و گیلان درصد آلودگی نزدیک به همی را نشان دادند که به‌ترتیب ۱۱/۹، ۱۱/۴ و ۱۱/۱ بود. استان‌های لرستان، یزد و گلستان با درصد آلودگی ۱۰/۴، ۱۰ و ۹/۵ در رتبه‌های بعدی آلودگی قرار داشتند. استان‌های فارس و مرکزی با ۷/۶ و ۶/۶ درصد به‌ترتیب کم‌ترین میزان آلودگی به FLMaV-1 را شامل شدند. اما این ویروس در استان‌های خراسان رضوی، قم و سمنان ردیابی نشد. دومین ویروس از خانواده کلوستروویروس، FLMaV-2 بود که بعد از FLMaV-1 از بیش‌ترین میزان آلودگی در این خانواده ویروسی برخوردار بود. استان مازندران با ۱۲/۲ درصد بیش‌ترین میزان آلودگی به FLMaV-2 را نشان داد. سپس استان‌های خراسان رضوی با ۱۱/۴ و کرمانشاه با ۱۱/۱ درصد قرار داشتند. استان‌های گلستان و لرستان با ۹/۵ و ۸/۳ درصد در رتبه‌های بعدی آلودگی به FLMaV-2 قرار داشتند. میزان آلودگی استان‌های گیلان، فارس و کرمان به‌ترتیب ۵/۵، ۵/۱ و ۴/۷ درصد بود. اما استان‌های یزد و مرکزی با میزان آلودگی ۳/۳ درصد و تهران با ۳/۱ درصد از آلودگی کم‌تری نسبت به سایر استان‌ها برخوردار بودند. از استان‌های سمنان، قم و البرز FLMaV-2 ردیابی نشد. سومین ویروس از خانواده بزرگ کلوستروویروس، FLMaV-3 می‌باشد که بیش‌ترین آلودگی به این ویروس در استان سمنان با ۱۲/۵ درصد مشاهده شد. در ادامه استان مرکزی، مازندران و فارس به‌ترتیب با ۱۰، ۸/۷ و ۸/۵ درصد آلودگی قرار داشتند. استان‌های کرمان با ۷/۱ درصد و یزد با ۶/۶ درصد در رتبه‌های بعدی از آلودگی به این ویروس قرار داشتند. آلودگی استان‌های شمالی گیلان و گلستان به‌ترتیب ۵/۵ و ۴/۷ درصد و استان قم ۳/۷ درصد برآورد شد. کم‌ترین آلودگی مربوط به استان‌های خراسان رضوی، کرمانشاه، لرستان و تهران بود که آلودگی دو استان اول به‌ترتیب با ۲/۸ و ۲/۲ و آلودگی دو استان لرستان و تهران ۲ درصد بود. در استان البرز آلودگی به FLMaV-3 دیده نشد. آخرین گروه از ویروس‌های خانواده کلوستروویروس، FMMaV بود که درمجموع تمام ویروس‌ها، از آلودگی خیلی کمتری برخوردار بود. بیش‌ترین آلودگی مربوط به این ویروس در استان گلستان با ۹/۵ درصد دیده شد. بعد از گلستان، استان‌های کرمانشاه، مازندران و سمنان به‌ترتیب با ۸/۸، ۸/۷ و ۸/۳ درصد آلودگی قرار داشتند. استان‌های مرکزی، تهران، لرستان، گیلان و البرز به‌ترتیب با ۶/۶، ۶/۲، ۶/۲، ۵/۵ و ۴/۷ درصد در رتبه‌های بعدی آلودگی قرار داشتند. کم‌ترین میزان آلودگی به FMMaV مربوط به استان خراسان رضوی با ۲/۸ درصد بود. این ویروس از استان‌های جنوبی کشور مثل فارس، کرمان و یزد و هم‌چنین از استان قم ردیابی نشد.

در استان‌های موردبررسی وضعیت آلودگی به ویروس‌ها متفاوت بود. در استان گلستان که بیش‌ترین درصد آلودگی به کمپلکس ویروس‌ها وجود داشت، آلودگی به FMV از بقیه ویروس‌ها بیش‌تر بود و این آلودگی معادل ۵۲ درصد بود. بعد از آن FLV-1 با ۳۳/۳ درصد بیش‌ترین میزان آلودگی را به خود اختصاص داد. در ادامه ویروس‌های FFKaV و FCV به‌ترتیب با ۱۹ و ۱۴/۲ درصد آلودگی قرار داشتند. آلودگی به ویروس‌های FLMaV-1، FLMaV-2 و FMMaV یکسان و معادل ۹/۵

درصد بود. کم‌ترین آلودگی مربوط به FLMaV-3 با ۴/۷ درصد بود. در استان کرمانشاه به‌عنوان دومین استان آلوده نیز همانند گلستان آلودگی به تمام ویروس‌های موردبررسی دیده شد. بیش‌ترین آلودگی مربوط به FMV و با ۶۰ درصد آلودگی دیده شد. FFKaV با ۲۴/۴ درصد آلودگی رتبه دوم را در این استان به خود اختصاص داد. سپس FCV با ۱۵/۵ درصد آلودگی قرار داشت. آلودگی به ویروس‌های FLV-1 و FLMaV-1 یکسان و معادل ۱۳/۳ درصد بود. بعد از آن ویروس‌های FLMaV-2 و FMMaV به‌ترتیب با ۱۱/۱ و ۸/۸ درصد آلودگی قرار داشتند. کم‌ترین آلودگی نیز مربوط به FLMaV-3 و با ۲/۲ درصد ارزیابی شد. سومین استان از لحاظ آلودگی استان گیلان بود. بیش‌ترین آلودگی به ویروس‌های موردبررسی در این استان متعلق به FMV و با ۵۵/۵ درصد بود. بعد از آن FFKaV با ۲۲/۲ درصد و FLV-1 با ۱۶/۶ درصد آلودگی قرار داشتند. اما FCV و FLMaV-1 که از دو خانواده ویروسی متفاوت هستند آلودگی یکسان و معادل ۱۱/۱ درصد داشتند. هم‌چنین هر سه عضو از خانواده کلوستروویروس که شامل FLMaV-2، FLMaV-3 و FMMaV می‌باشند، هرکدام با یک نمونه آلوده، درصد آلودگی مشابه ۵/۵ را نشان دادند. مازندران که یکی دیگر از استان‌های شمالی کشور می‌باشد در رتبه چهارم آلودگی به کمپلکس ویروسی قرار داشت.



شکل ۲: قطعات تکثیر شده ژنوم توسط پی.سی.آر مربوط به ویروس‌های A: *Fig leaf mottle associated virus-1* با اندازه تقریبی ۳۵۰ جفت باز، B: *Fig leaf mottle associated virus-2* با اندازه تقریبی ۳۶۰ جفت باز، C: *Fig cryptic virus* با اندازه تقریبی ۳۷۰ جفت باز، D: *Fig mild mottle associated virus* با اندازه تقریبی ۳۰۰ جفت باز، E: *Fig fleck-associated virus* با اندازه تقریبی ۲۷۰ جفت باز، F: *Fig leaf mottle associated virus-3* با اندازه تقریبی ۴۶۰ جفت باز، G: *Fig mosaic virus* با اندازه تقریبی ۴۶۰ جفت باز، H: *Fig latent virus-1* با اندازه تقریبی ۳۸۰ جفت باز و I: الگوی باندهای آر.ان.ای دو رشته‌ای استخراج شده از برگ انجیرهای علائم‌دار ۱، ۲ و ۳ استان‌های مازندران، کرمان و تهران. C-: برگ انجیر بدون علائم. ۱: نمونه مثبت از هر ویروس از استان مازندران. مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاس (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas) برای تمام واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. برای آر.ان.ای دو رشته‌ای وزن باندهای مربوطه در کنار شکل گذاشته شده است

Fig. 2: Amplified genome fragments by PCR related to the: A: *Fig leaf mottle associated virus-1*, with the size about 350bp; B: *Fig leaf mottle associated virus-2* with the size about 360bp; C: *Fig cryptic virus* with the size about 370bp; D: *Fig mild mottle associated virus* with the size about 300bp; E: *Fig fleck-associated virus* with the size about 270bp; F: *Fig leaf mottle associated virus-3* with the size about 460bp; G: *Fig mosaic virus* with the size about 460bp; H: *Fig latent virus-1* with the size about 380bp and I: dsRNA pattern isolated from the symptomatic fig leaves 1, 2 and 3 from Mazandaran, Kerman and Tehran provinces. C: asymptomatic fig leaves. 1: positive control of each virus from Mazandaran province. 100bp molecular marker Fermentas, Inc (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas) used for all the PCR. For dsRNA given molecular weight for each of the defined bands are indicated beside the figure

جدول ۲: نام استان‌های مورد نمونه‌برداری و میزان نمونه‌های جمع‌آوری شده و درصد آلودگی به هرکدام از ویروس‌ها عامل علائم موزائیک انجیر در ایران

Table 2: Name of the surveyed provinces, number of the collected samples and infection rates of the samples with viruses causing mosaic symptoms in Iran

استان Province	کل نمونه‌ها Total samples	نمونه‌های آلوده/ درصد Infected samples/ percentage	درصد آلودگی/ نمونه‌های آلوده Infected samples/infected percentage							
			FMV	FFKaV	FLV-1	FCV	FLMaV-1	FLMaV-2	FLMaV-3	FMMaV
فارس Fars	117	30 25.6%	0	0	5 4.2%	3 2.5%	9 7.6%	6 5.1%	10 8.5%	0
گلستان Golestan	21	18 85.7%	11 52%	4 19%	7 33.3%	3 14.2%	2 9.5%	2 9.5%	1 4.7%	2 9.5%
مازندران Mazandaran	57	44 77.1%	37 64.9%	12 21%	10 17.5%	11 19.2%	10 17.5%	7 12.2%	5 8.7%	5 8.7%
خراسان رضوی Khorasan razavi	35	19 54.2%	11 31.4%	2 5.7%	4 11.4%	0	0	4 11.4%	1 2.8%	1 2.8%
گیلان Guilan	18	15 83.3%	10 55.5%	4 22.2%	3 16.6%	2 11.1%	2 11.1%	1 5.5%	1 5.5%	1 5.5%
مرکزی Markazi	30	23 76.6%	16 53.3%	8 26.6%	6 20%	7 23.3%	2 6.6%	1 3.3%	3 10%	2 6.6%
تهران Tehran	96	58 60.4%	37 38.5%	22 22.9%	18 18.7%	20 20.8%	11 11.4%	3 3.1%	2 2%	6 6.2%
کرمان Kerman	42	18 42.8%	7 16.6%	0	3 7.1%	2 4.7%	5 11.9%	2 4.7%	3 7.1%	0
لرستان Lorestan	48	29 60.4%	23 47.9%	11 22.9%	8 16.6%	9 18.7%	5 10.4%	4 8.3%	1 2%	3 6.2%
قم Qom	27	11 40.7%	8 29.6%	4 14.8%	3 11.1%	5 18.5%	0	0	1 3.7%	0
کرمانشاه Kermanshah	45	38 84.4%	27 60%	11 24.4%	6 13.3%	7 15.5%	6 13.3%	5 11.1%	1 2.2%	4 8.8%
یزد Yazd	30	13 43.3%	9 30%	0	2 6.6%	0	3 10%	1 3.3%	2 6.6%	0
البرز alborz	21	10 47.6%	6 28.5%	3 14.2%	2 9.5%	4 19%	3 14.2%	0	0	1 4.7%
سمنان Semnan	24	16 66.6%	10 41.6%	5 20.8%	7 29.1%	2 8.3%	0	0	3 12.5%	2 8.3%
درصد کل Total (%)	611	342 55.9%	212 34.7%	86 14.2%	84 13.8%	75 12.3%	58 9.5%	36 5.9%	34 5.6%	27 4.4%

در این استان شمالی همانند دو استان شمالی دیگر یعنی گیلان و گلستان، درصد آلودگی به FMV بالا و معادل ۶۴/۹ درصد بود و آلودگی به FMV در این استان، از سایر استان‌های موردبررسی بیش‌تر بود. بعد از FMV، ویروس‌های FFKaV با ۲۱ درصد و FCV با ۱۹/۲ درصد رتبه‌های بعدی آلودگی را در استان مازندران داشتند. FLMaV-1 و FLV-1 نیز درصد آلودگی مشابه ۱۷/۵ را نشان دادند. FLMaV-2 با ۱۲/۲ درصد و FLMaV-3 و FMMaV با آلودگی مشابه ۸/۷ درصد از کم‌ترین میزان آلودگی در این استان برخوردار بودند. استان مرکزی پنجمین استان از لحاظ میزان آلودگی به کمپلکس ویروسی موردبررسی بود. آلودگی به FMV در این استان ۵۳/۳ درصد بود و ویروس‌های FFKaV، FCV و FLV-1 به‌ترتیب با درصدهای آلودگی ۲۶/۶، ۲۳/۳ و ۲۰ در رتبه‌های بعدی آلودگی قرار داشتند. از خانواده کلوستروویروس غیر از FLMaV-3 که ۱۰ درصد آلودگی را نشان داد، سه عضو دیگر این خانواده آلودگی کم‌تری داشتند. FLMaV-1 و FMMaV آلودگی مشابه ۶/۶ درصد و FLMaV-2 با ۳/۳ درصد کم‌ترین میزان آلودگی در این استان را داشت. ششمین استان ازلحاظ میزان کل آلودگی، استان سمنان بود. در این استان برخلاف ۵ استان قبلی، آلودگی به تمام ویروس‌های موردبررسی دیده نشد. به‌عبارت‌دیگر FLMaV-1 و FLMaV-2 در این استان ردیابی نشد. بیش‌ترین میزان آلودگی در این استان متعلق به FMV و با ۴۱/۶ درصد بود. در ادامه ویروس‌های FLV-1، FFKaV و FLMaV-3 به‌ترتیب با ۲۹/۱، ۲۰/۸ و ۱۲/۵ درصد قرار داشتند. درصد آلودگی به FMMaV و FCV یکسان و معادل ۸/۳ در استان سمنان بود. رده هفتم ازلحاظ بیش‌ترین میزان آلودگی

متعلق به استان‌های لرستان و تهران می‌باشد که هر دو آلودگی معادل ۶۰/۴ درصد داشتند. اما آلودگی به FMV در استان لرستان نسبت به تهران از درصد بیش‌تری برخوردار بود و این آلودگی معادل ۴۷/۹ درصد بود. FFKaV با آلودگی ۲۲/۹ درصد بعد از FMV از میزان آلودگی بیش‌تری در این استان برخوردار بود. FCV با ۱۸/۷ درصد، FLV-1 با ۱۶/۶ درصد، FLMaV-1 با ۱۰/۴ درصد، FLMaV-2 با ۸/۳ درصد و FMMaV با ۶/۲ درصد در رتبه‌های بعدی از آلودگی قرار داشتند. کم‌ترین میزان آلودگی مربوط به FLMaV-3 بود که دو درصد آلودگی نشان داد. استان تهران نیز وضعیتی مشابه لرستان داشت. به این صورت که FMV با ۳۸/۵ درصد، بیش‌ترین میزان آلودگی را به خود اختصاص داد. در ادامه FFKaV با ۲۲/۹ درصد، FCV با ۲۰/۸ درصد و FLV-1 با ۱۸/۷ درصد آلودگی قرار داشتند. ویروس‌های خانواده کلوستروویروس از آلودگی کم‌تری در این استان به نسبت سایر ویروس‌ها برخوردار بودند. به این ترتیب که FLMaV-1 با ۱۱/۴ درصد، FMMaV با ۶/۲ درصد و FLMaV-2 با ۳/۱ درصد در رتبه‌های بعدی آلودگی قرار گرفتند. کم‌ترین میزان آلودگی نیز مربوط به FLMaV-3 بود که دو درصد آلودگی نشان داد. در رده هشتم استان‌ها ازلحاظ میزان بیماری، استان خراسان رضوی قرار گرفت. در این استان آلودگی به FMV از سایر ویروس‌ها بیش‌تر و معادل ۳۱/۴ درصد بود. بعد از FMV، ویروس‌های FLV-1 و FLMaV-2 با آلودگی مشابه ۱۱/۴ درصد و FFKaV با ۵/۷ قرار گرفتند. کم‌ترین میزان آلودگی نیز متعلق به FMMaV و FLMaV-3 با درصد آلودگی یکسان ۲/۸ بود. آلودگی به ویروس‌های FCV و FLMaV-1 در این استان ردیابی نشد. اما استان‌هایی که آلودگی به کمپلکس ویروسی در آن‌ها کم‌تر از ۵۰ درصد بود شامل البرز، یزد، کرمان، قم و فارس می‌باشند. استان البرز رده نهم را ازلحاظ میزان آلودگی به کمپلکس ویروسی موردبررسی به خود اختصاص داد. آلودگی به FMV در این استان معادل ۲۸/۵ درصد بود و FCV با ۱۹ درصد رده دوم آلودگی را در این استان داشت. ویروس‌های FLMaV-1 و FFKaV با آلودگی مشابه ۱۴/۲ درصد و نیز FLV-1 با ۹/۵ درصد در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. کم‌ترین میزان آلودگی مربوط به FMMaV با ۴/۷ درصد بود. در استان البرز آلودگی به FLMaV-2 و FLMaV-3 دیده نشد. استان یزد رتبه دهم را ازلحاظ میزان بیماری به خود اختصاص داد. در این استان آلودگی به FMV معادل ۳۰ درصد برآورد شد و FLMaV-1 با ۱۰ درصد در رتبه بعد از FMV قرار داشت. FLV-1 و FLMaV-3 با آلودگی با درصد مشابه ۶/۶ در رده‌های بعدی قرار گرفتند. کم‌ترین میزان آلودگی نیز مربوط به FLMaV-2 با ۳/۳ درصد بود. در استان یزد آلودگی به سه ویروس FFKaV، FCV و FMMaV دیده نشد. استان کرمان که یکی از استان‌های جنوبی کشور است رتبه یازدهم را ازلحاظ میزان آلودگی به کمپلکس ویروسی به خود اختصاص داد. در این استان میزان آلودگی به FMV معادل ۱۶/۶ درصد بود و FLMaV-1 با ۱۱/۹ درصد رتبه بعدی را شامل شد. ویروس‌های FLV-1 و FLMaV-3 با آلودگی مشابه ۷/۱ درصد و نیز FCV و FLMaV-2 با ۴/۷ درصد در رتبه‌های بعدی آلودگی قرار داشتند. آلودگی به FFKaV و FMMaV در این استان دیده نشد. استان قم با داشتن درصد آلودگی ۴۰/۷، رتبه دوازدهم را در بین استان‌های نمونه‌برداری شده ازلحاظ میزان آلودگی به کمپلکس ویروسی به خود اختصاص داد. میزان آلودگی به FMV در این استان معادل ۲۹/۶ درصد بود و سپس FCV با ۱۸/۵ درصد و FFKaV با ۱۴/۸ درصد در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. آلودگی به FLV-1 در این استان ۱۱/۱ درصد بود و کم‌ترین آلودگی مربوط به FLMaV-3 با ۳/۷ درصد دیده شد. در این استان آلودگی به ویروس‌های FLMaV-1، FLMaV-2 و FMMaV ردیابی نشد. اما استانی که کم‌ترین میزان آلودگی به مجموعه ویروس‌های موردبررسی را نشان داد استان فارس بود که آلودگی معادل ۲۵/۶ درصد داشت و برخلاف سایر استان‌های موردبررسی، در استان فارس آلودگی به FMV ردیابی نشد. البته در این استان بیش‌تر نمونه‌برداری‌ها از انجیرهای دیم انجام شد و درمجموع سطح زیادی از انجیرکاری‌ها در استان فارس، به انجیر دیم اختصاص دارد. بیش‌ترین آلودگی ویروسی در این استان متعلق به FLMaV-3 با ۸/۵ درصد بود و بعد از آن FLMaV-1 با ۷/۶ درصد و FLMaV-2 با ۵/۱ درصد در رتبه‌های بعدی آلودگی قرار داشتند. آلودگی به ویروس‌های خانواده کلوستروویروس در این استان از سایر ویروس‌های موردبررسی بیش‌تر بود. در ادامه نیز FLV-1 با ۴/۲ درصد و FCV با ۲/۵ درصد قرار داشتند. البته علاوه‌بر FMV، ویروس‌های FMMaV و FFKaV نیز در این استان در نمونه‌های موردبررسی یافت نشدند.

در یافته‌های این تحقیق، آلودگی مخلوط بین نمونه‌های موردبررسی نیز وجود داشت. آلودگی مشترک در مقام مقایسه FMV به‌عنوان مهم‌ترین عامل بیماری و هم‌چنین سایر خانواده‌های ویروسی انجام شد. بیش‌ترین میزان آلودگی مشترک بین FMV با خانواده کلوستروویروس (مجموع هر چهار گونه ویروسی FMMaV، FLMaV-1، FLMaV-2 و FLMaV-3) دیده شد. این میزان معادل ۱۱/۷ درصد بود و این

آلودگی در اکثر مناطق موردبررسی دیده شد. آلودگی مشترک بین FMV و FFKaV از خانواده *Tymoviridae* معادل ۱۰/۴ درصد بود. هم‌چنین آلودگی مشترک بین FMV و FCV از خانواده *Partitiviridae* معادل ۸/۵ درصد بود. کم‌ترین آلودگی مشترک بین FMV و FLV-1 از خانواده *Betaflexiviridae* دیده شد که این میزان معادل ۷/۶ درصد بود.

در ادامه از هر کدام از جدایه‌های ویروسی یک نمونه تعیین توالی شد. هدف از تعیین توالی اطمینان از صحت باندهای دیده شده بر روی ژل بود. چرا که این احتمال وجود داشت که پرایمرها به مناطق غیراختصاصی چسبیده و علی‌رغم تشکیل باند بر روی ژل، این باند مربوط به ویروس نبوده و مثلاً بخشی از ژنوم گیاه یا ساتلایت‌ها را تکثیر کرده باشد. لذا برای اطمینان از وجود ویروس‌های مذکور تعیین توالی انجام شد. هم‌چنین از آنجایی‌که استان‌های شمالی و غربی کشور تقریبا تمام ویروس‌های موردبررسی را داشتند و چون وزن باندهای تکثیری برای اکثر ویروس‌ها به هم نزدیک بود لذا تصمیم بر این شد که نمونه‌هایی که قرار است تعیین توالی شوند از یک استان باشد تا به این صورت از عدم اشتباه و اطمینان از صحت ویروس‌ها یقین حاصل شود و چون استان مازندران در مقاله‌های پیشین توسط سایر افرادی که کار شده به‌عنوان یکی از استان‌های بسیار آلوده دیده شده و در این تحقیق نیز حضور ویروس‌ها در این استان تقریباً از درصد بالایی برخوردار بود، لذا این استان به‌عنوان نماینده برای تعیین توالی یک جدایه از هر ویروس انتخاب شد. کد دسترسی نمونه‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: کد دسترسی ویروس‌های عامل ایجاد علائم موزائیک در درختان انجیر ایران

Table 3: Accession number of viruses causing fig mosaic symptoms in Iran

نام ویروس Virus name	شماره دسترسی Accession number	نام ویروس Virus name	شماره دسترسی Accession number
FMV	MG520496	FLMaV-1	MG407556
FCV	MG407554	FLMaV-2	MG407558
FFKaV	MG407555	FLMaV-3	MG407557
FLV-1	MG407553	FMMaV	MG242131

بحث

نمونه‌های موردبررسی همگی دارای علائم موزائیک و یا علائمی بودند که مربوط به بیماری موزائیک انجیر می‌باشند، اما در این بین نمونه‌هایی بودند که هیچ‌کدام از هشت ویروس موردبررسی در آن‌ها ردیابی نشد. این احتمال وجود دارد که ویروس‌های دیگر ازجمله بادناویروس‌ها و سایر ویروس‌های کم‌تر تحقیق شده مانند پوتی‌ویروس‌ها یا ویروس‌های ناشناخته دیگری در کمپلکس بیماری موزائیک انجیر نقش داشته باشند. هم‌چنین در این تحقیق ارتباطی بین علائم بیماری و یک ویروس خاص مشاهده نشد. به این معنا که هیچ‌کدام از ویروس‌های موردبررسی، در نمونه‌ها علائم خاص یکسانی را نشان ندادند و ارتباطی بین علائم موجود روی برگ‌ها و ویروس‌های موجود در برگ‌ها دیده نشد. در ارتباط با گیاهان محک نیز تاکنون غیر از بادناویروس‌های آلوده‌کننده انجیر *لنی* و همکاران (Laney *et al*., 2012)، برای سایر ویروس‌های بررسی شده در این تحقیق، میزبان محک علفی گلخانه‌ای گزارش نشده است و اثبات ارتباط بیماری‌زایی و میزان خسارت هر یک از ویروس‌ها مستلزم ایندکس نمودن پایه‌های سالم درخت انجیر برای اثبات بیماری‌زایی و هم‌چنین شناخت اتیولوژی هرکدام از ویروس‌های موردبررسی با بیماری موزائیک انجیر می‌باشد.

گزارشاتی هم قبلاً از این بیماری و ویروس‌هایی که در آن نقش دارند، در کشور وجود دارد. اما از زمان اولین گزارش رسمی از عوامل دخیل در این بیماری تاکنون، درصد حضور این عوامل در انجیرکاری‌های کشور گسترش داشته است. این نتایج نشان‌دهنده این است که FMD هم‌چنان به‌عنوان مهم‌ترین عامل در تولید انجیر در ایران نقش ایفا می‌کند. در سال ۲۰۱۰، FMV از استان‌های تهران و لرستان گزارش شد و درصد آلودگی FMV درمجموع مناطق نمونه‌برداری شده ۸/۶ بود (*شاه‌میرزایی* و همکاران، 2012). با گذشت زمان درصد آلودگی به این ویروس در سال‌های بعد افزایش داشت، به‌طوری‌که در سال ۲۰۱۲ آلودگی به FMV معادل ۱۴ درصد *دانش‌آموز* و همکاران (Danesh-Amuz *et al*., 2014) و در سال ۲۰۱۴ این درصد به ۲۴/۶ افزایش یافت (*علیمرادیان* و همکاران، 2016) و تا زمان این تحقیق به ۳۴/۷ درصد رسید. FFKaV نیز وضعیتی شبیه FMV در روند روبه افزایش خود داشت. در گزارشی که در سال ۲۰۱۴ از این ویروس داده شد درصد آلودگی معادل ۸/۶ بود (*نوری آل آقا* و *رخشنده‌رو*، 2014) و در این تحقیق به

۱۴/۲ درصد رسیده است و نشان‌دهنده روند رو به گسترش این ویروس در کشور می‌باشد. این ویروس از خانواده *Tymoviridae* بوده و برای این خانواده ویروسی ناقل‌های بیولوژیکی وجود دارد *وانگ* و همکاران (Wang *et al*., 2012)، لذا احتمال حضور ناقل فعال می‌تواند یکی از دلایل پراکندگی زیاد این ویروس در کشور باشد. اما تاکنون بر روی این گونه خاص و احتمال انتقال با ناقل تحقیقی صورت نگرفته است. FLV-1 که ویروسی رشته‌ای است، در سال ۲۰۱۰ آلودگی معادل ۱۴/۵ درصد داشت که این میزان آلودگی با روش DIBA به‌دست آمد *شاه‌میرزایی* و همکاران (2012). در تحقیق حاضر آلودگی به این ویروس معادل ۱۳/۸ درصد بود که با روش‌های مولکولی اثبات شد. احتمالاً افزایش مناطق نمونه‌برداری، تعداد نمونه‌ها و روش‌های به‌کار رفته در تشخیص در دقیق‌تر نشان دادن درصد آلودگی تأثیر دارد. بررسی وضعیت FCV نیز همانند ویروس‌های دیگر، روند رو به افزایشی حضور این ویروس را نشان داد. با توجه به گزارشی که در سال ۲۰۱۴ داده شد میزان آلودگی به این ویروس معادل ۴/۵ درصد بود (*نوری آل اقا* و *رخشنده‌رو*، 2014) و در طی این تحقیق این میزان آلودگی به ۱۲/۳ درصد رسیده است. مشابه سایر اعضای خانواده *Partitiviridae*، ناقل‌های بیولوژیکی فعال برای FCV شناخته نشده *گابریل* و همکاران (Ghabrial *et al*., 2008) و می‌توان گفت تنها راه پراکندگی‌شان از طریق اندام‌های تکثیری آلوده است. لذا در مقایسه با FMV و FFKaV از درصد پراکندگی کم‌تری برخوردارند. ویروس‌های خانواده کلوستروویروس نیز وضعیتی مشابه سایر ویروس‌های دخیل در بیماری موزائیک انجیر داشتند. به این صورت که بعد از اولین گزارش از هر ویروس در کشور، روند حضور آن‌ها رو به افزایش بوده و در طی سال‌های بعد، مناطق بیش‌تری را آلوده کرده‌اند. به‌خصوص این‌که در طی سال‌های اولیه بررسی حضور بیماری در کشور، بسیاری از این ویروس‌ها ردیابی نشدند و یا در صورت حضور، تعداد آن‌ها بسیار محدود و از پراکنش کمی برخوردار بودند. اما باگذشت چند سال، اکثر مناطقی که قبلاً عاری از ویروس بودند، ویروس‌های موردبررسی در آن‌ها ردیابی شدند. این حالت خصوصاً در مورد FMMaV به‌وضوح دیده شد. به‌طوری‌که در گزارشاتی که در سال ۲۰۱۲ تاکنون بود، گزارشی از حضور این ویروس دیده نشد تا این‌که در این تحقیق با نمونه‌برداری‌های بیش‌تر و افزایش مناطق موردبررسی، FMMaV در ۱۰ استان کشور ردیابی شد. هرچند که درصد آلودگی به این ویروس در مناطق مختلف کم بود و تعداد نمونه‌های آلوده پایین بود، اما نتایج نشان از حضور و گسترش این ویروس در انجیرکاری‌های کشور دارد. ویروس‌های خانواده کلوستروویروس دخیل در بیماری موزائیک انجیر که به‌عنوان ویروس‌های همراه مطرح هستند درصورتی‌که بتوان آن‌ها را خالص کرد و اصول کخ برای آن‌ها پیاده نمود شاید هرکدام بتوانند به‌عنوان یک ویروس مستقل در بیماری در آینده مطرح شوند. تفاوت در نرخ آلودگی در ویروس‌های بررسی شده در این تحقیق می‌تواند در اثر پراکنش غیریکنواخت منابع اینوکولوم و یا تفاوت در شرایط اقلیمی مناطق رشد انجیر باشد. هرچند که آلودگی مشترک بین این عوامل و تفاوت در نرخ آلودگی به این ویروس‌ها در سایر گزارشات قبلی از کشور ترکیه نیز وجود دارد *الچای* و همکاران (Elci *et al*., 2012). در مجموع این بیماری ویروسی سابقه ۵۰ ساله در ایران دارد و در ابتدا علائم بیماری کم بوده و گستردگی کمی داشته و خطری را متوجه درختان انجیر نمی‌کرد. اما در طی این سال‌ها به دلایل مختلف ازجمله واردات قلمه‌های آلوده، خشک‌سالی، وجود ناقلین بیماری و هم‌چنین عدم شناخت کافی و درست از بیماری، عارضه موزائیک انجیر گسترش یافته و به شکل اپیدمی درآمده و در تمامی استان‌های کشور این بیماری دیده می‌شود.

نرخ آلودگی به ویروس‌های موردبررسی در ایران نسبت به کشورهای حوزه دریای مدیترانه کم‌تر می‌باشد. به‌عنوان مثال نرخ آلودگی به ویروس‌های FFKaV و FCV به‌ترتیب در حدود ۱۵ تا ۲۴ و ۱۳/۷ تا ۲۰ می‌باشد (*البیانو* و همکاران، 2011). هم‌چنین نرخ آلودگی به ویروس‌های خانواده کلوستروویروس در کشورهای حوزه دریای مدیترانه بسیار بیشتر از ایران می‌باشد. به‌طوری‌که این نرخ برای ویروس‌های FLMaV-1، FLMaV-2 و FMMaV به‌ترتیب معادل ۳۵، ۱۸/۵ و ۱۳/۳ درصد می‌باشد (*البیانو* و همکاران، 2007, 2012). با توجه به این‌که کشورهای همسایه خصوصاً ترکیه که یکی از کشورهایی است که در امر تولید و صادرات انجیر بسیار فعال است و مرز مشترک با ایران دارد و در آن کشور نیز بسیاری از ویروس‌های بحث شده در این تحقیق، وجود داشته و اکثراً از درصد آلودگی بالایی نیز برخوردار هستند (*الچای* و همکاران، 2012)، و با توجه به این‌که استان‌های غربی و شمالی کشور به‌مراتب از سایر استان‌های نمونه‌برداری شده دیگر از درصد آلودگی بالاتری برخوردار بودند و با توجه به این نکته که FMV را به‌عنوان عامل اصلی بیماری موزائیک انجیر می‌شناسند و فقط FMV قابلیت انتقال با کنه *Aceria ficus* را از گیاه آلوده به سالم دارد و این انتقال به‌صورت نیمه‌پایا انجام می‌شود و این قابلیت انتقال حتی بعد از پوست‌اندازی نیز حفظ می‌شود

کاگلاین و همکاران (Caglayan *et al.*, 2010)، لذا این احتمال وجود دارد که بیماری از کشورهای همسایه مثل ترکیه و روسیه و با قلمه‌های آلوده و یا ناقل به ایران وارد شده باشد و سپس در کشور و در استان‌های مختلف پراکنده شده باشد. اما با توجه به این‌که درصدهای آلودگی در تمام ویروس‌ها در مناطق شمالی و غربی کشور بیش‌تر از مناطق جنوبی کشور بود احتمالاً حضور پوشش سبز و دمای معتدل رطوبتی در شمال و غرب کشور شرایط را برای فعالیت ناقلین احتمالی مساعدتر کرده و در پراکنش ویروس‌های احتمالی نقش داشته است. این احتمال نیز وجود دارد که به سبب شرایط مساعد آب و هوایی شمال کشور، حضور میزبان‌های واسط و ثانویه احتمالی توانسته به پراکنش بیماری کمک کند.

نکته مهم دیگر این‌که اکثر انجیرهای موجود در مناطق جنوبی کشور قدمت بالایی داشته و بومی همین مناطق بوده و به‌صورت پیوندی یا قلمه‌ای نیستند و هم‌چنین سطح زیرکشت وسیعی از انجیرهای این مناطق به‌صورت دیم می‌باشد. به‌عنوان مثال در استان فارس ۹۶ درصد از سطح زیرکشت انجیر به‌صورت دیم است و لذا این عوامل می‌تواند در سازگاری انجیرهای این مناطق با شرایط محیطی نقش داشته باشد. شاید این علت مهم‌ترین عامل در مقاومت پایه‌های انجیر این مناطق به نسبت انجیرهای شمال و غرب کشور باشد. چون مسلماً درصد مقاومت در پایه‌های مختلف انجیر از هم متفاوت است. از طرفی در این مناطق خصوصاً به دلیل شرایط آب‌وهوایی گرم و نبود رطوبت شرایط برای حضور ویروس سخت می باشد. در شمال و غرب کشور عموماً انجیرکاری‌ها به‌صورت آبی بوده و نیز رطوبت زیاد این مناطق نیز دلیلی بر گسترش ویروس‌ها و بیماری می‌باشد. انجیرهای این مناطق عموماً بومی خود منطقه نبوده و قدمت زیادی ندارند و احتمالاً بیماری همراه با پایه‌های آلوده یا اندام‌های رویشی آلوده که برای تکثیر استفاده می‌شود به این مناطق آورده شده‌اند.

خشکی مناطق جنوبی کشور از لحاظ آب‌وهوایی و هم‌چنین رعایت بهتر اصول قرنطینه‌ای و زراعی احتمالاً در کاهش پراکندگی ویروس‌ها در جنوب کشور مؤثر می‌باشد. این بیماری می‌تواند از طریق انسان و به‌واسطه وسایلی که برای تکثیر یا قلمه‌زنی و هرس درختان استفاده می‌شود نیز گسترش یابد. بنابراین علاوه‌بر رعایت اصول قرنطینه‌ای و کنترل ناقلین احتمالی، رعایت بهداشت زراعی محصولات می‌تواند در جلوگیری از گسترش بیماری نقش داشته باشد. هم‌چنین باید سایر عوامل ویروسی جدید که در بیماری موزائیک نقش دارند به‌تنهایی موردارزیابی قرار گیرند و شدت بیماری و میزان خسارت و نیز کارآیی انتقال با سایر ناقل‌ها به‌طور اختصاصی برای هرکدام از ویروس‌ها بررسی شود. هم‌چنین با تعیین توالی مناطق بیش‌تری از ژنوم یا تعیین طول کامل ژنوم این ویروس‌ها در تعداد بیش‌تر و مناطق نمونه‌برداری بیش‌تر، پی به زمان حضور آن‌ها در کشور و این‌که آیا بومی هستند یا خیر و هم‌چنین پی به شرایط ژنومی آن‌ها و احیاناً تنوع موجود برای ارزیابی‌های مقاومتی برد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۲-۱۳ متن انگلیسی مراجعه شود.