

شناسایی مولکولی ویروس پیسک توت‌فرنگی (*Strawberry mottle virus*) از مزارع توت‌فرنگی

استان کردستان بر اساس منطقه 3'NCR

نسرین قادری زندان، محمد حاجی زاده[✉]

به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۸)

چکیده

در تابستان ۱۳۹۷، علائم ویروسی شامل پیسک، بدشکلی و سوختگی حاشیه برگ‌ها از مزارع توت‌فرنگی استان کردستان مشاهده و تعداد ۴۸ نمونه برگ‌گی جمع‌آوری شد. ابتدا برخی نمونه‌ها به گیاه محک *Fragaria vesca* با استفاده از شته توت‌فرنگی (*Chaetosiphon fragaefolii*) تلقیح و علائم مطابق با *Strawberry mottle virus* (SMoV) ظاهر شد. سپس، آن‌ها را با روش سلیکا استخراج و دی‌ان‌ا تمکمل آن‌ها با آغازگرهای تصادفی شش‌تایی ساخته شد. PCR با آغازگرهای اختصاصی SMoV- Sm2ncr1a و SMoV-Smdetncr4a انجام و قطعه‌ای به طول ۴۶۱ جفت باز در ۲۸ نمونه از ۴۸ نمونه فوق تکثیر گردید. به منظور اطمینان از نتیجه RT-PCR و بررسی مشخصات مولکولی، پنج جدایه بر اساس منطقه جغرافیایی، رقم میزبان و نوع علائم انتخاب و پس از الحاق به پلاسמיד pTG-19 در باکتری *Escherichia coli* انتقال و پلاسمیدهای نو ترکیب همسانه شده تعیین توالی شدند. میانگین فاصله ژنتیکی در بین جدایه‌های در این تحقیق در سطح نوکلئوتیدی 0.005 ± 0.002 و با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن 0.008 ± 0.008 بود. مقایسه دویه توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی به ترتیب میان جدایه K3 با جدایه NSper51 از کانادا (0.093 ± 0.015) و جدایه SQA یا AG با جدایه NB926 از کانادا (0.019 ± 0.017) وجود داشت. این اولین گزارش از شناسایی این ویروس در مزارع توت‌فرنگی استان کردستان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی ویروسی، تبارزایی، توت‌فرنگی، فاصله ژنتیکی

Molecular identification of *Strawberry mottle virus* in strawberry fields of Kurdistan Province based on the 3' NCR

N. GHADERI ZANDAN, M. HAJIZADEH[✉]

MSc. Graduated student and assistant professor in Plant Pathology (respectively), Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Abstract

In the summer of 2018, viral symptoms corresponded to *Strawberry mottle virus* (SMoV) in some strawberry fields were observed and 48 leaf samples/plants were collected from different fields from Kurdistan Province. In the preliminary test, some samples were inoculated to *Fragaria vesca* by strawberry aphid (*Chaetosiphon fragaefolii*) and SMoV-symptoms were observed after about two weeks. Then, total RNA of samples was extracted by silica-capture method and subjected to cDNA synthesis with random hexamer primers. RT-PCR was done by specific SMoV pair primer and amplified fragments were observed on 1.2% agarose gels. RT-PCR results were showed that 28 out of 48 samples were infected by SMoV. Based on the geographical origin, cultivar and symptoms, five isolates were selected, ligated to pTG-19 and transformed to *Escherichia coli*. Recombinant plasmids were sequenced and analyzed for molecular characterization and phylogenetic studies on SMoV 3' NCR. Mean genetic distance between the isolates from Iran was 0.005 ± 0.002 but between these isolates and the other isolates available in GenBank was 0.084 ± 0.008 . The highest and lowest genetic distance was found between K3 with NSper51 (0.093 ± 0.008) and SQA/AG with NB926 (0.019 ± 0.017) from Canada, respectively. This is the first report on occurrence of SMoV on strawberry in Kurdistan Province.

Keywords: Genetic distance, phylogeny, strawberry, viral infectio

مقدمه

توت‌فرنگی با نام علمی *Fragaria ananassa* گیاهی چند ساله از تیره Rosaceae و جنس *Fragaria* می‌باشد (Davis et al., 2007) و منشأ آن به سال ۱۷۵۰ از اروپا برمی‌گردد (Qin et al., 2007). طبق گزارش سازمان بین‌المللی خوارو بار و کشاورزی سازمان ملل متحد در سال ۲۰۱۶، ایران رتبه هجدهم را در میان ۷۶ کشور تولید کننده توت‌فرنگی در جهان دارا می‌باشد (FAO, 2016). براساس آمارنامه ۱۳۹۵، سطح زیر کشت این محصول در کشور ۴۹۸۶ هکتار برآورد شده است که استان کردستان با سطح زیر کشت ۲۹۱۶ هکتار و با تولید سالانه ۴۴۵۷۰ تن رتبه‌ی اول را در بین استان‌های تولید کننده این محصول دارا می‌باشد و به عنوان قطب تولید کننده توت‌فرنگی در کشور شناخته شده است. توسعه کشت محصول توت‌فرنگی در سال‌های اخیر به دلیل درآمدزایی آن مورد توجه کشاورزان قرار گرفته است ولی بیماری‌های ویروسی در توت‌فرنگی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده توسعه کشت این محصول به حساب می‌آیند (Converse, 2006; Martin and Tzanetakis, 1981) که با توجه به تکثیر رویشی توت‌فرنگی به سرعت می‌توانند در نسل‌های بعدی گسترش و شیوع یابند. تاکنون بیش از ۳۰ ویروس مختلف از سراسر جهان از روی محصول توت‌فرنگی گزارش شده است (Martin and Tzanetakis, 2006; Tzanetakis and Martin, 2013) که ویروس پیسک توت‌فرنگی (*Strawberry mottle virus* (SMoV)) یکی از شایع‌ترین ویروس‌های آلوده کننده توت‌فرنگی می‌باشد که انتشار جهانی دارد (Mellor et al., 1987; Martin and Spiegel, 1998; Chang et al., 2007; Ward et al., 2008). براساس آخرین گزارش تاکسونومی ویروس‌ها (Thompson et al., 2017)، این ویروس عضو نامعین (unassigned) در خانواده Secoviridae و راسته‌ی Picornavirales می‌باشد. پیکره‌های ویروس به صورت ایزومتریک به قطر ۲۸ نانومتر و ژنوم ویروس به صورت آر آن تک لای مثبت (+ssRNA) و دو قطعه‌ای می‌باشد. آر آن یک با ۷۳۰۶ نوکلئوتید دارای

آر آن ا پلیمراز، پروتئین قابل اتصال به NTP و پروتئاز می‌باشد و آر آن دو با ۵۶۱۹ نوکلئوتید احتمالاً شامل CP-L و CP-S و MP است که ژنوم در انتهای 5' دارای VPg و در انتهای 3' دارای دم پلی آ (poly-A tail) می‌باشد. SMoV توسط شته *Chaetosiphon* sp. و شته پنبه (*Aphis gossypii*) به روش نیمه پایا منتقل می‌شود (Frazier and Sylvester, 1960).

SMoV فقط در جنس *Fragaria* ایجاد علائم می‌کند که نشانه آن حالت ابلقی و بد شکلی است. سویه‌های زیادی از این ویروس شناسایی شده‌اند اما، سویه‌های شدید این ویروس می‌تواند عملکرد را تا ۳۰ درصد کاهش دهد و در آلودگی‌های مخلوط با سایر ویروس‌ها به ۸۰ درصد می‌رسد، هرچند ممکن است به تنهایی علائم شدید ایجاد نکند اما، در آلودگی توأم با سایر ویروس‌های توت‌فرنگی منجر به افزایش شدت علائم و بیماری شود (Thompson et al., 2002; Martin and Tzanetakis, 2006). آلودگی هم‌زمان SMoV و SMYEV در ایجاد عارضه زوال توت‌فرنگی در برخی ایالت‌های آمریکا گزارش شده است (Martin and Tzanetakis, 2013). به نظر می‌رسد که این ویروس از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده کننده توت‌فرنگی باشد و تمام ارقام توت‌فرنگی به این ویروس حساس هستند (Thompson and Jelkmann, 2003).

علی‌رغم کشت قابل توجه توت‌فرنگی در ایران، مطالعات بسیار کمی در زمینه بیماری‌های ویروسی این محصول مهم صورت گرفته است. طی تحقیقی، به منظور ردیابی ویروس‌های مهم توت‌فرنگی از جمله SMoV، *Strawberry vein banding virus* (SCV)، *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV)، *Strawberry crinkle virus* (SVBV)، *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV) روی ۱۵۰ نمونه از گیاهان توت‌فرنگی استان‌های کردستان، مازندران، گرگان، گیلان و تهران با استفاده از روش‌های الایزا، PCR و استخراج آر آن دورشته‌ای مطالعاتی را انجام دادند. نتایج حاصل از الیزا و PCR نشان از عدم ردیابی ویروس‌های نام برده داشت

در مجاورت گیاه جمع‌آوری شده از مزرعه که دارای علائم و حاوی چندین شته توت‌فرنگی (*Chaetosiphon fragaefolii*) روی برگ بود، قرار داده شد و ظهور علائم روی *F. vesca* به صورت روزانه بررسی شد.

استخراج آر ان اکل

استخراج آر ان اکل با استفاده از روش سلیکا (Foissac *et al.*, 2000) با تغییر مختصر انجام گرفت. به طور خلاصه، ۰/۱ گرم از بافت برگ در ازت مایع کاملاً پودر گردید و سپس یک میلی‌لیتر بافر استخراج (4.0 Guanidine thiocyanate (NaOAc (0.2 M), EDTA (25 mM), KOAc (1.0 M), PVP .M), 2-mercaptoethanol (1%)) (2.5% w/v) به آن اضافه شد. نمونه هموژنیزه شده به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (مدل Hettich Zentrifugen Mikro 22 R) شد. پس از انتقال روئین به میکروتیوب جدید و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر سارکوسیل ده درصد، به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۷۰ درجه سلسیوس، دو دقیقه روی یخ و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. ۳۰۰ میکرولیتر از فاز رویی در میکروتیوب جدید با ۳۰۰ میکرولیتر محلول سدیم یدید (۶M)، ۱۵۰ میکرولیتر اتانول خالص و ۲۵ میکرولیتر سوسپانسیون سلیکا مخلوط و بعد از مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، به مدت ۱ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. روئین حذف و پس از دو بار شستشو با ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50% ethanol) در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه به حالت سوسپانسیون درآمد. میکروتیوب به مدت ده دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس تیمار و سپس در بیشینه سرعت به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، روئین (آر ان اکل) به میکروتیوب جدید منتقل و از آن برای ساخت دی ان اکل مکمل استفاده شد.

ساخت دی ان اکل مکمل و انجام RT-PCR

برای ساخت دی ان اکل مکمل از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی و در واکنشی با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده

(Fatahi *et al.*, 2005). در مطالعه دیگر، هفت ویروس از جمله SMoV را در چهار درصد از گیاهان دارای علائم و دو درصد از گیاهان بی علائم از استان‌های گیلان و مازندران با روش الیزا ردیابی نمودند و از ۵ نمونه مورد مطالعه در RT-PCR تنها از دو نمونه قطعه مورد انتظار تکثیر شد (Nasirinia *et al.*, 2016). تحقیق حاضر به منظور سبب شناسی علائم پیسک و بدشکلی ایجاد شده در برخی مزارع استان کردستان در سال ۱۳۹۷ انجام گرفت. با توجه به اهمیت اقتصادی این ویروس (Martin and Tzanetakis, 2006)، انتقال آن از طریق ناقل (Richardson, 1972) و عدم وجود رقم مقاوم توت‌فرنگی در برابر آن (Thompson *et al.*, 2003)، شناسایی آن از اهمیت قابل توجهی برخوردار است.

روش بررسی

نمونه برداری

در بازدید از مزارع توت‌فرنگی استان کردستان در تابستان ۱۳۹۷، علائم ویروسی شامل عدم تقارن برگ‌ها، کاهش رشد، سوختگی حاشیه برگ و به ویژه پیسک مشاهده شدند و برای بررسی عامل ایجاد آن، ۹۷ نمونه برگ جمع‌آوری شدند. پس از ارزیابی‌های اولیه از نظر تیپ علائم، رقم توت‌فرنگی و منطقه نمونه‌برداری تعداد ۴۸ نمونه (۲۳ نمونه از مزارع مختلف اطراف سنندج، ۱۲ نمونه از مزارع اطراف کامیاران، ۹ نمونه از مزارع اطراف مریوان و ۲ نمونه از هرکدام از مزارع اطراف شهرستان‌های بانه و سقز) انتخاب شدند و برای بررسی عامل آن با روش مولکولی آر تی-پی سی آر بررسی شدند.

مایه‌زنی برخی نمونه‌ها به *Fragaria vesca* از طریق شته ناقل

از آنجایی که *F. vesca* به‌عنوان گیاه محک برای ردیابی انواع ویروس‌های توت‌فرنگی شناخته شده است (Martin and Tzanetakis, 2006)، برای ارزیابی اولیه از این روش استفاده شد. ابتدا عدم حضور SMoV در گیاه محک *F. vesca* با روش RT-PCR بررسی شد و سپس گیاه محک در یک فضای بسته

DH5 α که با استفاده از روش کلرید کلسیم مستعد شده بودند، منتقل شد. برای انتقال از روش شوک حرارتی (Froger and Hall, 2007) استفاده گردید و برای غربال‌گری سلول‌های نو ترکیب از محیط کشت جامد انتخابی حاوی 30 μ l از X-Gal (50 mg/ml) و آمپی‌سیلین (100 μ g/ml) استفاده شد. چند کلونی سفید رشد کرده روی تشتک پتری، در 3 میلی‌لیتر از محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین (100 μ g/ml) به مدت یک شب رشد داده شدند و از باکتری‌های کشت شده برای استخراج حامل استفاده گردید. استخراج حامل با کیت Expresprep™ Plasmid SV (GeneAll, South Korea) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای اطمینان از وجود قطعه‌ی مورد نظر در پلاسمید از هضم آنزیمی با آنزیم *Bam*HI استفاده شد و تعیین توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های این ویروس توسط شرکت ماکروژن (کره‌جنوبی) با استفاده از آغازگر عمومی T7 promoter که توالی‌های آن‌ها در پایین دست طرف محل اتصال دی‌ان‌ا خارجی در حامل pTG-19 وجود دارد، از یک طرف انجام گرفت.

آنالیز توالی‌های به دست آمده

توالی‌های به دست آمده در نرم افزار BioEdit (Hall, 1999) وارد و پس از حذف توالی آغازگرها در دو طرف توالی ویروس، با تمام 13 توالی موجود در ژن‌بانک مربوط به ناحیه 3'NCR این ویروس مقایسه شد (جدول 1). آنالیز تنوع ژنتیکی و تخمین برخی پارامترهای ژنتیکی مانند تعداد هاپلوتیپ (H)، تنوع هاپلوتیپ (Hd)، تعداد جایگاه‌های افتراقی (S)، تعداد کل جهش‌ها (η) و افتراق ژنتیکی (F_{ST}) با استفاده از نرم‌افزار DnaSP (Rozas, 2009) V. 5.10.05 محاسبه گردید.

نتیجه و بحث

نتایج حاصل از تلقیح گیاه محک *F. vesca*

در انتقال عصاره گیاه دارای علائم به گیاه محک *F. vesca* علائم موزاییک شدید و پیسک بعد از حدود دو هفته مشاهده شد (شکل 1). برای این انتقال از شته

شد. دو میکرولیتر از محلول 0/2 μ g/ μ l این آغازگر با سه میکرولیتر از آب دیونیزه و پنج میکرولیتر آر ان ا از هر کدام از اسید نوکلئیک کل نمونه‌ها مخلوط و به مدت 90 ثانیه در دمای جوش قرار داده شد و سپس میکروتیوب بلافاصله به یخ منتقل و پس از 2 دقیقه، 5/7 μ l آب دیونیزه، 2 بافر 5x واکنش آرتی، 0/8 μ l مخلوط (10mM) dNTPs، 0/5 μ l RNasin (200U) آنزیم نسخه بردار معکوس (GeneAll, South Korea) به آن اضافه شد. میکروتیوب به مدت 10 دقیقه در 25 $^{\circ}$ C درجه سلسیوس نگهداری شدند و سپس در ترموسایکلر مدل BioRad، برنامه ساخت دی ان ا مکمل شامل یک چرخه دمای 42 $^{\circ}$ C به مدت یک ساعت برای فعالیت آنزیم نسخه بردار معکوس و یک چرخه در درجه حرارت 85 درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه برای غیر فعال کردن این آنزیم اجرا شد.

جهت انجام واکنش PCR از مخلوط مواد PCR (Master Mix (Ampliqon, Denmark) و آغازگرهای اختصاصی ویروس SMOV شامل 5' TAAGCGACCACTGTGACAAAG 3' Smdetncr4a و 3' ATTCGGTTCACGTCCTAGTGTCAC 5' Sm2ncr1b (Thompson and Jelkmann, 2003) چرخه‌های حرارتی برای تکثیر قطعه‌ای از این ویروس شامل 94 درجه سلسیوس به مدت 2 دقیقه (یک سیکل)، 94 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه، 52 درجه سلسیوس به مدت 45 ثانیه و 72 درجه سلسیوس به مدت 1 دقیقه (32 سیکل) و 72 درجه سلسیوس به مدت 7 دقیقه (یک سیکل) اجرا شد. سپس، محصول PCR در ژل آگارز 1/2 درصد الکتروفورز شد.

همسانه‌سازی قطعات تکثیر شده

قطعات تکثیری مورد نظر با استفاده از کیت خالص‌سازی دی ان ا از ژل (پیشگامان انتقال ژن، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل آگاروز خالص‌سازی گردید و دی ان ا خالص شده با استفاده از آنزیم T₄DNA Ligase به حامل pGEM-T-easy که دارای آویزه‌های تیمینی است، متصل شد. واکنش فوق به مدت 3 ساعت در دمای اتاق انجام و سپس در سلول‌های باکتریایی *Escherichia coli* سوبه

نتایج حاصل از RT-PCR

در بررسی ۴۸ نمونه با آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SMoV، قطعه‌ای به طول تقریبی ۴۶۱ جفت باز در ۲۸ نمونه تکثیر شد در حالی که در شاهد منفی (بدون دی ان ا مکمل در مراحل اولیه و از نمونه سالم در مراحل بعدی که عدم آلودگی آن به SMoV محرز شده بود) هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۲).

توت‌فرنگی (*C. fragaefolii*) استفاده شد که در پشت برگ نمونه‌ها از مزارع محل نمونه‌برداری جمع‌آوری شده بودند. علائم ایجاد شده روی گیاه محک شامل پیسک، کوچک شدن و بدشکل شدن برگ‌ها بودند که با علائم SMoV روی این گیاه مطابقت داشت (Martin and Tzanetakis, 2006; Ward et al., 2008). برای اطمینان از آلودگی *F. vesca* به SMoV، RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی این ویروس (Thompson and Jelkmann, 2003) انجام شد که نتایج حاکی از تکثیر قطعه مورد نظر (حدود ۴۶۱ جفت‌باز) بود (شکل ۲).

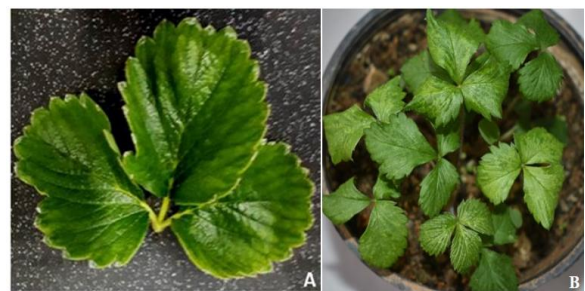
جدول ۱- رس‌شماره‌ها، منشأ، نام و میزبان جدایه‌های ویروس پیسک توت‌فرنگی (SMoV) مورد استفاده در این تحقیق.

Table 1. Accession numbers, origin, name and host of Strawberry mottle virus (SMoV) isolates analyzed in this study.

Origin	Accession number	Isolate name	Host	Position
Canada	KU200453	NB926	<i>Fragaria ananassa</i>	RNA1
Canada	KU200454	NB926	<i>F. ananassa</i>	RNA2
Canada	KU200456	NSper3	<i>F. ananassa</i>	RNA1
Canada	KU200457	NSper3	<i>F. ananassa</i>	RNA2
Canada	KU200458	NSper17	<i>F. ananassa</i>	RNA1
Canada	KU200459	NSper17	<i>F. ananassa</i>	RNA2
Canada	KU200460	NSper51	<i>F. ananassa</i>	RNA1
Canada	KU200461	NSper51	<i>F. ananassa</i>	RNA2
China	KU177218	Ontario	<i>F. ananassa</i>	RNA1
China	KU177219	Ontario	<i>F. ananassa</i>	RNA2
Germany	AJ311875	1134	<i>F. ananassa</i>	RNA1
Germany	AJ311876	1134	<i>F. ananassa</i>	RNA2
South Korea	MG418837	MH	<i>F. ananassa</i>	-

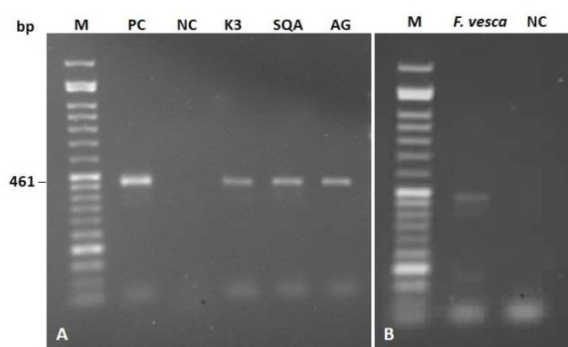
در کل، از تعداد ۴۸ نمونه بررسی شده ۲۸ نمونه آلوده به SMoV بودند (جدول ۲). این ویروس با روش سرولوژیک الیزا در استان‌های گیلان و مازندران با چهار درصد آلودگی در بین نمونه‌های دارای علائم و دو درصد آلودگی از نمونه‌های بدون علائم گزارش شده است (Nasirinia et al., 2016) و تحقیق حاضر اولین بررسی حضور این ویروس در مزارع توت‌فرنگی استان کردستان می‌باشد.

در این تحقیق از آغازگرهای طراحی شده بر اساس ناحیه غیر قابل ترجمه در منطقه ۳' (NCR) 3 این ویروس استفاده شد که این جفت آغازگر قادر به ردیابی تمام جدایه‌های این ویروس به دلیل حفاظت شدگی ژنوم در این قسمت بین جدایه‌ها هستند (Thompson and Jelkmann, 2003). ردیابی این ویروس با آغازگرهای طراحی شده بر اساس CP و RdRP،



شکل ۱- علائم پیچیدگی برگ روی گیاه توت‌فرنگی جمع‌آوری شده از منطقه توریور اطراف شهرستان سنندج (A) و بروز علائم پیسک شدید روی گیاه محک *Fragaria vesca* (B) پس از مایه‌زنی عصاره با شته توت‌فرنگی *Chaetosiphon fragaefolii*.

Fig. 1. Observed leaf deformation symptoms on a strawberry plant collected from Torivar near the Sanandaj city (A), induction of sever mottle symptoms on *Fragaria vesca* (B) following sap inoculation by *Chaetosiphon fragaefolii*.



شکل ۲- A: ژل آگاروز ۱/۲ درصد برای جداسازی قطعه ۴۶۱ جفت بازی تکثیر شده در PCR مربوط به جدایه‌های مختلف ویروس پیسک توت‌فرنگی از نمونه‌های طبیعی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان کردستان با استفاده از آغازگرهای Smdetncr4a و Smdetncr1b (Thompson and Jelkmann, 2003) و Smdetncr1b. راهک M: نشانگر وزن مولکولی، راهک PC: کنترل مثبت (نمونه SS2) که در مراحل اولیه آلودگی با SMoV محرز شده بود. راهک NC: کنترل منفی (گیاه سالم). **B:** ژل آگاروز ۱/۲٪ مربوط به تکثیر قطعه ۴۶۱ بازی در PCR از گیاه محک *Fragaria vesca* مایه‌زنی شده با یکی از جدایه‌های SMoV. **Fig. 2. A:** 1.2% agarose gel separation of a 461-bp polymerase chain reaction (PCR) product amplified from various isolates of *Strawberry mottle virus* (SMoV) collected from various regions of Kurdistan province using primers Smdetncr4a and Smdetncr1b. Lane 1, DNA 1kb DNA ladder; lane 2, Positive control; lane 3, Negative control (healthy *Fragaria ananassa*). **B:** 1.2% agarose gel separation of a 461-bp PCR product amplified from *Fragaria vesca* inoculated by one of the SMoV isolate.

جدول ۲- منطقه نمونه‌برداری، تعداد نمونه‌های تست شده در RT-PCR و تعداد (درصد) نمونه‌های توت‌فرنگی آلوده به ویروس پیسک توت‌فرنگی به همراه تعداد جدایه‌های توالی‌یابی شده منتخب از هر منطقه جغرافیایی.

Table 2. Sampling region, number of tested samples by RT-PCR, number (percentage) of strawberry samples infected by *Strawberry mottle virus* and number of sequenced isolates which were selected from each geographical region

Region	Number of tested samples	Infected samples (Percentage)	Number of sequenced samples
Arandan (Sanandaj)	16	4 (25%)	1
Mochesh (Kamyaran)	12	8 (33.33%)	1
Gazneh (Sanandaj)	5	4 (80%)	-
Marivan	9	8 (88.88%)	1
Saqez	2	1 (50%)	1
Baneh	2	2 (100%)	-
Torivar (Sanandaj)	2	1 (50%)	1
Total	48	28 (58.33%)	5

به دلیل تنوع زیاد ژنومی تنها در برخی جدایه‌ها موفقیت‌آمیز بوده است (Thompson and Jelkmann, 2003). همچنین، بیش از ۹۵ درصد تشابه نوکلئوتیدی بین آر آن یک و دو این ویروس در 3'NCR مشاهده شده است که با این جفت آغازگر این نواحی بر روی هر دو RNA قابل تکثیر است (Thompson and Jelkmann, 2003). در مطالعه Nasirinia *et al.*, (2016) از پنج نمونه آلوده به SMoV که توسط روش سرولوژیک الیزا ردیابی شده بودند، تنها دو نمونه توسط روش مولکولی RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی که براساس ژن CP طراحی شده بودند، واکنش مثبت نشان داد که می‌تواند ناشی از تنوع ژنومی در بین جدایه‌ها در این منطقه از ژنوم باشد. همچنین، در این تحقیق از روش سیلیکا برای استخراج آر آن از توت‌فرنگی استفاده شد که به دلیل غنی بودن ارقام مختلف توت‌فرنگی از متابولیت‌های ثانویه مانند تانن‌ها، پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها که باعث اختلال در فعالیت آنزیم Taq DNA polymerase می‌شوند (Porebski *et al.*, 1997)، روش مناسبی برای حذف این مواد بازدارنده می‌باشد (Sipahioglu *et al.*, 2007; Zacharzewska *et al.*, 2014).

در مقایسه با تحقیق انجام گرفته در استان‌های گیلان و مازندران (Nasirinia *et al.*, 2016)، ردیابی ویروس در ۲۸ از ۴۸ نمونه در این تحقیق می‌تواند ناشی از به‌کارگیری روش RT-PCR با آغازگرهای طراحی شده بر اساس مناطق حفاظت شده، استفاده از روش سیلیکا برای حذف مواد بازدارنده، وجود شته‌های ناقل در منطقه که ناقل بودن آن‌ها در انتقال ویروس به *F. vesca* به اثبات رسید و روش سنتی تهیه نشا از نهالستان‌های بدون گواهی سلامت و ردوبدل نمودن نشاهای آلوده بین خود باغداران باشد.

بررسی توالی‌های به‌دست آمده از 3'NCR

پنج جدایه AG, SQA, k3, k9 و SS2 براساس منطقه جغرافیایی، رقم میزبان و نوع علائم انتخاب و تعیین توالی شدند. ترادف‌های حاصل در NCBI به ثبت رسیدند (جدول ۳).

چین و یک جدایه از کره جنوبی)، بیشترین میزان تنوع نوکلئوتیدی ($\pi=0.05$)، بیشترین تعداد جایگاه‌های افتراقی ($S=23$) جدایه‌های کانادا و کمترین میزان تنوع نوکلئوتیدی ($\pi=0.005$) برای جدایه‌های ایران به دست آمد (جدول ۴).

به منظور مقایسه بررسی روند میانگین تغییرات نوکلئوتیدی در ناحیه 3'NCR، داده‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در این تحقیق تحت نام جمعیت ایران با توالی‌های مربوط به جمعیت‌های کانادا و جهان (World) بررسی شد. جدایه‌های ایران روند تغییرات نوکلئوتیدی مشابهی را با جدایه‌های کانادا و جهان نشان ندادند (شکل ۳). در جدایه‌های کانادا و جهان بیشتر تغییرات نوکلئوتیدی در یک سوم انتهایی مطابق توالی تکثیر شده (موقعیت ۵۸۵۱ تا ۵۸۷۷ مربوط به آر آن ۱ و ۲ و موقعیت‌های ۶۵۴۰ تا ۶۵۶۶ مربوط به آر آن ۱ یک جدایه Ontario (با رس شمار KU177218) مشاهده شد که پس از آن تغییرات نوکلئوتیدی با شیب تند کاهش نشان داد در حالی که در جدایه‌های این تحقیق تغییرات نوکلئوتیدی در این منطقه ژنومی کاملاً برعکس بود. هر چند، توالی‌های بیشتر این ویروس

از بین نمونه‌های تعیین توالی شده، توالی نوکلئوتیدی دو جدایه AG و SQA کاملاً مشابه بودند و به عنوان یک هاپلوטיפ در نظر گرفته شدند. توالی‌هایی از یک ژن که حتی در یک نوکلئوتید باهم اختلاف داشته و منحصر به فرد باشند، به عنوان یک هاپلوטיפ در نظر گرفته می‌شوند (Gao et al., 2017). مقایسه دوجه دوی توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی به ترتیب میان جدایه K3 با جدایه NSper51 RNA1 از کانادا (0.015 ± 0.093) و جدایه SQA یا AG با جدایه NB926 RNA1 از کانادا (0.007 ± 0.19) وجود داشت.

میانگین فاصله ژنتیکی در بین جدایه‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق در سطح نوکلئوتیدی 0.002 ± 0.005 و با سایر جدایه‌های در دسترس در ژنبانک 0.008 ± 0.084 محاسبه شد. با توجه به میانگین فاصله ژنتیکی و تنوع هاپلوئیدی در بین جدایه‌ها (0.900)، جدایه‌های این تحقیق تنوع ژنتیکی کمی را نشان دادند. در مقایسه با جمعیت کانادا و جهان (۱۳ جدایه شامل هشت جدایه از کانادا، دو جدایه از آلمان، دو جدایه از

جدول ۳- مشخصات توالی‌های ویروس پیسک توت‌فرنگی تعیین توالی شده در این تحقیق همراه با رس شماره آن‌ها در GenBank.

Table 3. Characteristic of Strawberry mottle virus were sequenced in this study with their accession numbers.

Sample code	Origin	Host	Symptoms	Accession numbers
K3	Abbasabad (Kamaryan)	<i>Fragaria ananassa</i> cv. Paros	MM, LD	MK303320
SS2	Saqgez	<i>F. ananassa</i> cv.. Paros	MN, Y	MK303321
K9	Mochesh (Kamaryan)	<i>F. ananassa</i> cv. Paros	LD	MK303322
SQA	Arandan (Sanandaj)	<i>F. ananassa</i> cv. Queen Elisa	D, MM	MK303323
AG	Torivar (Sanandaj)	<i>F. ananassa</i> cv. Kurdistan	NS	MK303324

MM, mild mottle; LD, leaf deformation; MN, marginal necrosis; Y, yellowing; NS, non-symptom

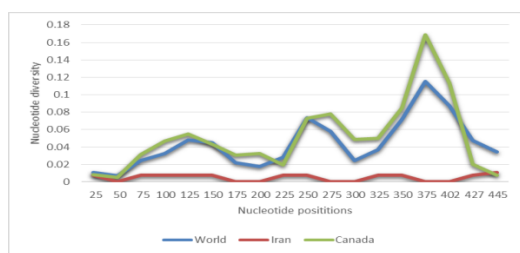
جدول ۴- نتایج تخمین پارامترهای ژنتیکی براساس قسمت 3'NCR ویروس پیسک توت‌فرنگی.

Table 4. Results of Genetic characteristic of Strawberry mottle virus based on the 3'NCR

Populations	N	H	Hd	K	S	η	π
Iran	5	4	0.900	2.40	6	6	0.005
Canada	8	8	1.000	23.07	56	66	0.050
World	13	13	1.000	18.73	65	76	0.050
Total	18	17	0.993	17.76	70	83	0.047

N: تعداد نمونه، H: تعداد پلی‌مورفیسم، Hd: تنوع هاپلوئیدی، S: تعداد جایگاه‌های افتراقی، η : تعداد کل جهش‌ها، π : تنوع ژنتیکی

N: Number of isolates, H: Number of polymorphism, Hd: Haploid diversity, S: Number of segregation site, η : Total mutations; π : Genetic diversity.



شکل ۳- میانگین تغییرات نوکلئوتیدی به ازای هر مکان در ۴۶۱ نوکلئوتید از منطقه غیر قابل ترجمه ویروس پیسک توت فرنگی.

Fig. 3. Mean pairwise number of nucleotide differences per site (nucleotide diversity, π) calculated on a sliding window 50 and step size 25 across the 3' NCR.

درصد بسیار بالای تشابه نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق که در برخی موارد بیش از ۲۵۰ کیلومتر با هم فاصله جغرافیایی داشتند، بیانگر گسترش ویروس از یک کانون اولیه آلودگی با مواد تکثیر آلوده است. هر چند انتقال ویروس از چند نمونه با شته‌هایی که همراه با نمونه‌های برگ جمع‌آوری شده بودند، حاکی از حضور ناقل ویروس در منطقه است ولی انتقال با ناقل در مسافت‌های طولانی امکان‌پذیر نیست.

در انتقال چند جدایه از SMoV به گیاه محک *F. vesca* علائم شدید پیسک، بدشکلی و کوتولگی مشاهده شد که با علائم ایجاد شده سویه شدید این ویروس روی *F. vesca* مطابقت داشت (Martin and Tzanetakis, 2006) لذا، مطالعات تکمیلی در ارتباط با کارایی گونه‌های مختلف شته ناقل (در صورت وجود) در انتقال SMoV و ارزیابی مقاومت و میزان خسارت ارقام مختلف کاشت شده در منطقه به این ویروس ضروری به نظر می‌رسد. نتایج این تحقیق در غربال قلمه‌های سالم از آلوده جهت صدور گواهی سلامت و بررسی وضعیت کلی ویروس در ایران کمک شایانی خواهد کرد.

Reference

CHANG L., Z. ZHANG, H. YANG, H. LI and H. DAI, 2007. Detection of strawberry RNA and DNA viruses by

از این منطقه و سایر استان‌های کشور که توت‌فرنگی در آنها کاشت می‌شود و تعیین توالی سایر مناطق ژنومی ویروس، می‌تواند درک بیشتری را از منشا و همه‌گیرشناسی این ویروس در ایران دهد. به نظر می‌رسد که جابجایی مواد تکثیر آلوده در بین باغداران بیشترین نقش را در گسترش این ویروس داشته است چون دو جدایه SQA از منطقه آرمان و AG از منطقه توربور استان کردستان بیش از ۳۰ کیلومتر فاصله دارند ولی صددرصد تشابه نوکلئوتیدی دارند و به عنوان یک هاپلوטיפ شناخته می‌شوند. این دو جدایه از دو رقم متفاوت جداسازی شده‌اند که این امر می‌تواند ناشی از انتشار آن توسط ناقل در سطح باغ باشد.

با توجه به اینکه بیش از نیمی از سطح زیرکشت و تولید توت‌فرنگی کشور در استان کردستان قرار دارد و این محصول به‌عنوان محصول استراتژیک و منبع درآمد اصلی برای خیلی از باغداران و روستائیان در استان شناخته شده است (Anonymous, 2016)، ردیابی دقیق ویروس‌های توت‌فرنگی به عنوان گام اول برای مدیریت آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. برای ردیابی این ویروس از روش RT-PCR استفاده شد که این روش به‌صورت روتین برای ردیابی ویروس‌های آلوده کننده توت‌فرنگی از جمله SMoV استفاده می‌شود (Thompson and Jelkmann, 2003; Chang *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2008). درصد بالای آلودگی ویروس چروکیدگی برگ توت‌فرنگی (حدود ۴۸ درصد) (Hajizadeh *et al.*, 2018) و نیز آلودگی بالا به ویروس پیسک توت‌فرنگی در این تحقیق حاکی از گسترش آلودگی‌های ویروسی در این استان می‌باشد و ضرورت مطالعه حضور سایر ویروس‌ها را به دلیل اثرات هم‌افزایی آن‌ها (Tzanetakis and Martin, 2006) را دوچندان می‌کند.

RT-PCR using total nucleic acid as a template. Journal of Phytopathology, 155: 431-436.

CONVERSE, R. H. 1981. Infection of cultivated strawberries by *Tomato ringspot virus*. Phytopathology, 71:1149-1152.

- DAVIS, T. M., B. DENOYES-ROTHAN and E. LERCETEAU-KOHLER, 2007. Strawberry. In: Genome mapping and molecular breeding in plants, Kole, C. (ed), Vol IV, Fruits and nuts.
- FAO, 2016. FAOSTAT Database results from FAO website. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FATAHI, F., 2005. Molecular identification of strawberry viruses from Iran and their elimination. MSc. thesis in plant pathology. Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University. (in Persian with English summary).
- FOISSAC, X., L. SAVALLE-DUMAS, P. GENTIT, M. J. DULUCQ and T. CANDRESSE, 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*, 357: 52-59.
- FRAZIER, N. W. and E. S. SYLVESTER, 1960. Half-lives of transmissibility of two aphid-borne viruses. *Virology*, 12: 233-244.
- FROGER, A. and J. Hall, 2007. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*, 6:253.
- GAO, R., Y. Xu, T. CANDRESSE, Z. HE, S. LI, Y. MA and M. LU, 2017. Further insight into genetic variation and haplotype diversity of *Cherry virus A* from China. *PLOS ONE*, 12(10):e0186273
- HAIJZADEH, M. 2018. Molecular detection and phylogenetic analyses of *Strawberry crinkle virus* in strawberry fields of Kurdistan province based on the partial polymerase- gene sequences. *Applied Research in Plant Pathology*, 7(2): 95- 105. (in Persian with English summary)
- HALL, T. A. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- 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.
- MARTIN, R. R. and I. E. TZANETAKIS, 2006. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Disease*, 90: 384-396.
- MARTIN, R.R. and S. SPIEGEL, 1998. "Strawberry Mottle Virus." In *Compendium of Strawberry Diseases*, edited by J. L. Maas, 66-67. 2nd ed. St. Paul: APS Press.
- MELLOR, F. C., H. KRCZAL, N. W. FRAZIER, T. J. MORRIS, E. S. SYLVESTER, J. RICHARDSON, R. H. CONVERSE, R. R. MARTIN, S. SPIEGEL and J. R. MCGREW, 1987. "Aphid-Borne Diseases." In *Virus Diseases of Small Fruits*, edited by R. H. Converse, 10-31. USDA Agricultural Handbook No. 631. U.S. Department of Agriculture-Agricultural Research Service. Washington, D.C. USDA.
- MICHAEL, G. and J. SAMBROOK, 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th edition, 1885 P.
- NASIRINIA, G. H., R. POURRAHIM, S. A. ELAHINIA, A. ROUHIBAKHSH and SH. FARZADFAR, 2016. Incidence of Strawberry important virus diseases in Guilan and Mazandaran Provinces. *Applied Entomology and Phytopathology*, 84(1): 31-42.
- POREBSKI, S., L. G. BAILEY and B. R. BAUM, 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 8-15.
- QIN, Y., J. A. TEIXEIRA DA SILVA, L. ZHANG and S. ZHANG, 2007. Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. *Biotechnology Advances*, 26: 219-232.
- RICHARDSON J., N. W. FRAZIER and E. S. SYLVESTER, 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.

- SIPAHIOGLU, H. M., M. OCAK and M. USTA, 2007. Comparison of Three Conventional Extraction Methods for the Detection of Plant Virus/Viroid RNAs from Heat Dried High-phenolic Host Leaves. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6: 102-107.
- THOMPSON J. R., S. WETZEL, M. M. KLERKS, D. VAS~KOVA, C. D. SCHOEN, J. S. PAK and W. JELKMANN, 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.
- THOMPSON, J. R. and W. JELKMANN, 2003. The detection and variation of strawberry mottle virus. *Plant Disease*, 87: 385-390.
- THOMPSON, J. R., I G. LEONE, J. L. LINDNER, W. JELKMANN and C. D. SCHOEN, 2002. Characterization and complete nucleotide sequence of *Strawberry mottle virus*: a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses. *Journal of General Virology*, 83: 229- 239.
- THOMPSON, J. R., I. DASGUPTA, M. FUCHS, T. IWANAMI, A. V. KARASEV, K. PETRZIK, H. SANFAÇON, I. TZANETAKIS, R. VAN DER VLUGT, T. WETZEL and N. YOSHIKAWA, 2017. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Secoviridae. *Journal of General Virology*, 98(4):529-531.
- TZANETAKIS, I. E. and R. MARTIN, 2006. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Disease*, 90(4):384-396.
- TZANETAKIS, I. E. and R. MARTIN, 2013. Expanding field of strawberry viruses which are important in North America. *International Journal of Fruit Science*, 13: 184-195.
- WARD, L. I., B. D. QUINN, J. TANG, T. WEI and G. R. G. CLOVER. 2008. *Strawberry mottle virus* detected on strawberry in New Zealand. 17: 3.
- ZACHARZEWSKA, B., A. PRZEWODOWSKA and K. TREDER, 2014. The adaptation of silica capture RT-PCR for the detection of Potato virus Y. *American Journal of Potato Research*. 91:525-531.