نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸، ص. ۳۹۶-۳۸۷

Journal of Plant Protection
Vol. 33, No.4, Winter 2019, P. 387-396

بررسی وضعیت کلکسیون ملی ارقام تجاری، بومی و وارداتی سیب از نظر آلودگی به ویروس لکه سبزرد سیب

طیبه کشاورز[۱*]- حسن حاج نجاری[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۸

چکیده

کلکسیون ملی ارقام تجاری بومی و وارداتی سیب مستقر در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمال‌شهر از اهمیت خاصی برای برنامه‌های سالم‌سازی با هدف تأمین هسته‌های اولیه و پیش‌تکثیر جهت تولید نهال سالم برخوردار است. تاکنون مطالعه متمرکزی در زمینه غربالگری درختان سیب موجود در این کلکسیون از نظر آلودگی به بیماری‌های ویروسی صورت نگرفته است. ویروس لکه سبزرد سیب (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) ویروس مهمی است که باعث ایجاد آلودگی درختان میوه در سراسر جهان می‌شود. جهت ارزیابی وقوع و میزان شیوع این ویروس در کلکسیون سیب کمال‌شهر از مجموع ۵۰ رقم سیب جدید، امیدبخش، بومی پرمحصول و ارقام وارداتی سازگار بر روی پایه‌های بذری، نمونه‌برداری انجام شد و به روش الایزای مستقیم با آنتی‌بادی اختصاصی ACLSV ارزیابی گردید و جهت تأیید نتایج الیزا، تعدادی از این ارقام با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به روش نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) و جفت آغازگر تکثیرکننده بخشی از پروتئین پوششی ACLSV مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج الیزا نشان داد که تعداد ۳۹ رقم از ۵۰ رقم مورد بررسی، به این ویروس آلوده بوده و در آزمون RT-PCR نیز از ۱۸ رقم مورد بررسی تنها پنج رقم، آلوده به ویروس تشخیص داده شد. تعدادی از ارقام شامل مکینتاش، ردرم بیوتی، استارکینگ، اردبیل ۱، نایان ارنگه، خورسیجان، رداسپور کوپر، یلو ترنسپارنت ۱، IR6-1 و اردبیل ۲، در هر دو آزمون الیزا و RT-PCR عاری از ویروس تشخیص داده شدند. بنابراین این ارقام پس از بررسی از نظر آلودگی به سه ویروس مهم دیگر شامل ویروس ساقه گودی سیب (*Apple stem pitting virus*, ASPV)، ویروس ساقه شیاری سیب (*Apple stem grooving virus*, ASGV) و ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (*Tomato ring spot virus*, ToRSV) می‌توانند در برنامه تولید مواد تکثیری سالم و گواهی‌شده مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: الیزا، کلکسیون ارقام سیب، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ویروس لکه سبزرد سیب

مقدمه

سیب (*Malus×domestica* Borkh) یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی کشور بوده که با سطحی معادل ۲۵۰ هزار هکتار و تولید ۲/۹ میلیون تن (۳) ایران را در رتبه ششم جهانی قرار داده است (۱۰).کلکسیون ملی ارقام تجاری بومی و وارداتی سیب مستقر در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمال‌شهر در برگیرنده ۸۵ رقم سیب بر روی پایه‌های بذری از تنوع ژنتیکی بسیار بالایی برخوردار است. وجود ارقام جدید زودرس مانند "گل‌بهار" باویژگی مقاوم به سرمای بهاره و "شربتی" با عادت رشد افراشته به ترتیب با عملکرد ۱۶۸ و ۱۴۰ کیلوگرم در هر درخت در شرایط کلکسیون (۱۱ و ۱۲)، ارقام "نوردرن اسپای" حامل ژن تحمل به پوسیدگی طوقه (۱۶) و "گلدن اسموتی" متحمل به زنگار (۹)، رقم کاملا خودسازگار IRI6 و نیز رقم پایه مربایی گزینش شده به عنوان والد پایه بذری حامل ژن‌های مهم صفت خودسازگاری و صفت پاکوتاهی (۱۳) و ده‌ها رقم وارداتی سازگار، نمونه‌های بارزی از اهمیت این کلکسیون در کشور ما می‌باشد (۱۴). بیمارگرهای مختلفی از جمله ویروس‌ها، درختان میوه دانه‌دار و از جمله سیب را تحت تأثیر قرار داده و اثر مخربی در باغات بر جا می‌گذارند. ویروس‌های بیماری‌زای درختان میوه به دلیل انتشارشان از طریق اندام‌های تکثیری حائز اهمیت می‌باشند. ویروس‌ها در درختان میوه دارای علائم متنوعی بوده و در عین‌حال برخی از آن‌ها که نهفته هستند، بدون این که علائم مشخصی ایجاد کنند منجر به زوال عمومی درخت، کاهش قدرت درخت و میزان باروری می‌شوند. در آن

۱- استادیار، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: ta_keshavarz@yahoo.com)
۲- دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی
DOI: 10.22067/jpp.v33i3.76550

دسته از ویروس‌هایی که علائم مشخصی ایجاد می‌کنند، علائم دسته از ویروس‌هایی که علائم مشخصی ایجاد می‌کنند، علائم برگی به صورت بدشکلی، پیچیدگی، لکه‌ای شدن، لوله‌ای شدن، ظهور نقاط بافت مرده و نقوش رنگی غیر معمول بروز نموده و کیفیت و کمیت میوه‌ها کاهش می‌یابد (۴). مطالعات نشان داده است که آلودگی درخت سیب به ویروس‌های نهفته[1] به طور چشمگیری عملکرد درخت را کاهش می‌دهد (۶). این گروه از ویروس‌ها در اغلب ارقام بدون علائم هستند اما ممکن است در برخی دیگر علائم ایجاد کنند. در بین این گروه از ویروس‌ها، ویروس لکه سبزرد سیب (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) یکی از ویروس‌های مهم در درختان سیب می‌باشد. این ویروس عضو تیپ جنس *Trichovirus* (۱۱) بوده، پیکره آن رشته‌ای خمش‌پذیر به ابعاد ۱۲ × ۷۲۰ نانومتر است و ژنوم آن از نوع ریبونوکلئیک اسید (RNA) تک لا به اندازه ۷۵۵۷ باز است (۵). این ویروس اولین بار توسط مینک و شای از آمریکا درگونه‌های جنس Malus گزارش شد (۲۰). اگر چه ویروس لکه سبزرد سیب در اغلب ارقام تجاری سیب فاقد علائم مشخصی می‌باشد با این‌حال بر روی درختان سیب پیوند شده بر روی پایه MarubaKaido موجب بیماری شدیدی می‌شود (۲۸ و ۲۹). این ویروس در برخی ارقام می‌تواند علائم مشخصی چون لکه برگی رنگ پریده، بدشکلی برگ، حلقه‌های رنگ پریده، نقوش خطی، کاهش اندازه برگ و کوتولگی ایجاد نماید (۱۸). این ویروس در برخی گونه‌های درختان میوه هسته‌دار بدون علائم بوده و یا ممکن است باعث شکاف چوب، بدشکلی شدید میوه، کاهش عملکرد و ناسازگاری پیوند و نکروز جوانه شود (۲۱). برخی جدایه‌های ویروس لکه سبزرد سیب باعث بیماری شدیدی در زردآلو و آلو شده و باعث ایجاد فرورفتگی، برجستگی و در نهایت بدشکلی میوه شده که اغلب با بیماری شارکا اشتباه گرفته می‌شود به همین دلیل به آن شارکای دروغین[2] نیز گفته می‌شود (۴). این ویروس دارای تنوع ژنتیکی بالایی بوده و برخی جدایه‌های آن از نظر بیماری‌زایی متمایز می‌شوند. این ویروس دارای انتقال مکانیکی بوده و از طریق پیوند قابل انتقال است ولی انتقال آن از طریق بذر و یا دانه گرده تاکنون گزارش نشده است (۳۰). خسارت اقتصادی ویروس لکه سبزرد سیب از یک طرف به واسطه گسترش وسیع جهانی آن در سیب و از سوی دیگر به‌دلیل ایجاد ناسازگاری پایه و پیوندک در برخی از اعضاء جنس *Prunus*، می‌باشد. در ایران این ویروس از باغات سیب استان‌های اصفهان، آذربایجان شرقی و غربی، تهران و فارس گزارش شده است (۲ و ۱۷). با توجه به نبود اطلاعات کاربردی لازم در خصوص میزان آلودگی ارقام تجاری سیب به ویروس مهمی چون لکه سبزرد سیب برای تولید هسته‌های اولیه با هدف احداث باغ مادری برای تولید انبوه نهال سالم و استاندارد، آلودگی ارقام تجاری سیب کلکسیون ملی ارقام سیب موجود در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمال‌شهر به ویروس مهمی چون لکه سبزرد بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در تابستان ۱۳۹۵ و بهار ۱۳۹۶ از ۵۰ رقم سیب و بر اساس شماره درخت در نقشه کاشت کلکسیون ارقام از گروه‌های رقمی مختلف موجود شامل دو رقم جدید گل بهار و شربتی، ارقام بومی پرمحصول و رایج مانند شیخ احمد، نایان ارنگه و سلطانی شبستر، ارقام والد بذری پاکوتاه چون مربایی، زینتی و آزایش، گروه بزرگی از ارقام وارداتی گزینش شده سازگار با شرایط آب و هوایی کشور مندرج در اطلس ارقام میوه کشور و ژنوتیپ‌های امید بخش نظیر IRI6، نمونه‌برداری صورت گرفت (جداول ۱ و ۲). با توجه به اینکه یک تا سه درخت از هر رقم در کلکسیون موجود می‌باشد نمونه‌های برگی به صورت تصادفی از شاخه‌های مختلف هر یک از سه درخت موجود جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده از یک درخت بعنوان یک نمونه تلقی شد.

آزمایشات سرم شناسی

نمونه‌ها با استفاده از آزمون الایزای مستقیم (۸) و با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس لکه سبزرد سیب (تهیه شده از شرکت Bioreba، سویس) بررسی شد و پس از اندازه‌گیری میزان جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه Dynatech MR-700 Plate Reader(Dynatech Laboratories, USA)، با استفاده از فرمول R= $\bar{x}$ +3 SD (که در آن $\bar{x}$ میانگین جذب نمونه منفی SD انحراف معیار چاهک‌ها و R سطح آلودگی می‌باشد) نمونه‌های آلوده تشخیص داده شد. نمونه‌هایی که میزان جذب نوری چاهک مربوطه در ۴۰۵ نانومتر برابر یا بیشتر از R بود، به عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته شدند.

در این تحقیق از نمونه‌های آلوده به ویروس‌های مورد بررسی به عنوان کنترل مثبت و نمونه‌های سالم به عنوان کنترل منفی، تهیه شده از شرکت Bioreba، استفاده گردید.

استخراج ریبونوکلئیک اسید کل و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به روش نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

ریبونوکلئیک اسید کل به روش توصیف شده توسط چانگ و همکاران (۷) با کمی تغییرات استخراج شد.

1- Latent viruses
2- Pseudopox

برای ساختن رشته مکمل cDNA(DNA) مقدار پنج میکرولیتر از ریبونوکلئیک اسیداستخراج شده از بافت آلوده با ۲۰ پیکومول در میکرولیتر آغازگر معکوس و آنزیم رونوشت‌برداری برگردان (MMuLV 100u/µ) (سیناکلون) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. جهت تکثیر بخشی از پروتئین پوششی ACLSV به طول ۳۵۸ جفت باز، از آغازگرهای ACLSV-F و ACLSV-R (ACLSV-F: TTCATGGAAAGACAGGGGCAA و ACLSV-R: AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA) معرفی شده توسط Nemchinov استفاده شد (۲۲).

واکنش PCR، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر از محصول cDNA و آنزیم Taq DNA polymerase (5u/µ سیناکلون)، انجام شد. برنامه حرارتی واکنش PCR شامل ۱ مرحله ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل۳۰ ثانیه دردمای ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود و در پایان در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس محصول PCR در ژل آگاروز ٪۱ و در بافر TBE (۱۰/۸ گرم تریس، ۵/۵ گرم بوریک اسید، ۰/۷۳ گرم EDTA در یک لیتر آب مقطر، اسیدیته۸/۳) الکتروفورز و قطعات نوکلئیک اسید بوسیله محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ درصد رنگ‌آمیزی و بوسیله دستگاه UV-illuminator مدل Imaco ساخت هلند عکس‌برداری شد.

نتایج و بحث

با توجه به اهمیت کلکسیون ملی ارقام تجاری بومی و وارداتی سیب ایستگاه تحقیقات باغبانی کمال‌شهر در تأمین هسته‌های اولیه تکثیری برای احداث باغات مادری سیب و اهمیت آن در برنامه‌های اصلاحی، غربالگری این ارقام بسیار ضروری می‌باشد. هر چند ارقام موجود تحت غربالگری گروه مهمی از بیمارگرها و تنش‌های محیطی قرار گرفته‌اند اما تاکنون در زمینه غربالگری ارقام موجود در کلکسیون از نظر آلودگی به بیماری‌های ویروسی از جمله ویروس لکه سبزرد سیب مطالعه‌ای صورت نگرفته است. در این تحقیق مجموعا تعداد ۵۰ رقم و ۱۲۶ درخت در آزمون الیزا مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه‌برداری اول (تابستان سال ۱۳۹۵) تعداد ۳۳ رقم و مجموعا ۹۹ درخت (از هر رقم سه درخت) آزمایش شد. در نمونه‌برداری دوم در فصل بهار ۱۳۹۶ تعداد ۴۱ رقم و مجموعا ۶۷ درخت (از هر رقم یک تا سه درخت) آزمایش شد که از این بین تعداد ۲۴ تا از ارقام تست شده در هر دو سال مشترک بود. آنالیز نمونه‌های بررسی شده توسط آزمون الیزا طی تابستان ۹۵ نشان دهنده آلودگی ۵۹ درخت از مجموع ۹۹ درخت نمونه‌برداری شده به ACLSV بود (جدول ۱). آنالیز نمونه‌های بررسی شده توسط الیزا طی فصل بهار ۹۶ نیز نشان دهنده آلودگی ۴۴ درخت از مجموع ۶۷ درخت نمونه‌برداری شده بود (جدول ۲). در این بین تعدادی از نمونه‌ها مشکوک به آلودگی به ACLSV بودند. نمونه‌هایی که طی تکرارهای مختلف واکنش متفاوتی نشان داده یا میزان جذب پایینی در آزمون الیزا نشان دادند به عنوان مشکوک قلمداد شدند. پس از استخراج ریبونوکلئیک اسید ویروس و انجام آزمون RT-PCR، از تعدادی از نمونه‌ها قطعه‌ای به طول مورد انتظار ۳۵۸ جفت باز مربوط به بخشی از پروتئین پوششی تکثیر شد شکل ۱ نقش الکتروفورزی محصول PCR برخی ارقام را در ژل آگاروز نشان می‌دهد. آنالیز برخی ارقام بررسی شده در آزمون RT-PR (شامل برخی نمونه‌های دارای واکنش مثبت در آزمون الیزا، نمونه‌های دارای واکنش منفی در آزمون الیزا و برخی نمونه‌های مشکوک) نشان‌دهنده آلودگی پنج نمونه از مجموع ۱۸ نمونه مورد بررسی بود (جدول ۳). هر چند در تمامی ارقام مورد بررسی نتایج آزمون RT-PCR تأیید کننده نتایج آزمون الیزا بود اما آلودگی رقم کوپر اسپور۳ به ویروس که در آزمون الیزا در طی هر دو فصل تابستان ۹۵ و بهار ۹۶ تایید شده بود، در آزمون RT-PCR تأیید نشد. هر چند آزمون RT-PCR دارای حساسیت بالاتری نسبت به آزمون الیزا می‌باشد و در مطالعات صورت گرفته قبلی، در مقایسه با آزمون الیزا، در آزمون PCR تعداد نمونه آلوده بیشتری تشخیص داده شده است (۱۹ و ۱۵)، بنابراین عدم آلودگی رقم کوپر اسپور۳ در آزمون RT-PCR در این تحقیق می‌تواند ناشی از وجود مواد بازدارنده PCR در RNA استخراج شده باشد.

در خلال بازدید ظاهری درختان، در برخی از ارقام نمونه‌برداری شده ضعف درخت مشاهده می‌شد. اغلب ارقام سیب آلوده به ACLSV فاقد علائم مشخص بودند. نتایج مشابهی توسط سایرین بدست آمده است (۱۵ و ۲۷).

نتایج بدست آمده نشان دهنده درصد بالای آلودگی ارقام سیب موجود در کلکسیون قدیمی سیب مستقر در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمال‌شهر به ACLSV می‌باشد. در مطالعات پیشین نیز بررسی باغات سیب نشان‌دهنده درصد بالای آلودگی به این ویروس نسبت به سایر ویروس‌ها بوده است (۱۷).در مطالعات صورت گرفته در کلکسیون ارقام سیب در جمهوری چک، رومانی، آلبانی و بوسنی و هرزگوین نیز نتایج مشابهی مبنی بر درصد بالای آلودگی به این ویروس گزارش شده است (۲۱، ۲۵ و ۱۵). با توجه به این‌که مبادلات ژرم‌پلاسم عامل اصلی انتقال ویروس‌های جدید به کشورهای مختلف می‌باشند لذا یکی از مهمترین استراتژی‌ها جهت کنترل ویروس‌های درختان میوه ممانعت از ورود ژرم پلاسم آلوده به ویروس به داخل کشور است.

جدول ۱- نتایج آزمون الیزا ارقام سیب کلکسیون کمال‌شهر با استفاده از آنتی سرم ویروس لکه سبزرد سیب (تابستان ۱۳۹۵)

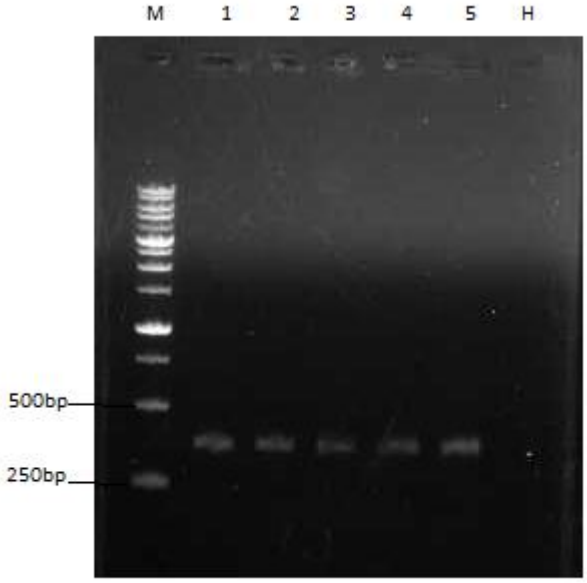
Table 1- ELISA results of apple variety of Kamalshahr collectionwith ACLSV-specific antiserum (Summer 2016)

رقم Cultivar	شماره درخت Tree No		
	درخت ۱ Tree 1	درخت ۲ Tree 2	درخت ۳ Tree 3
گلبهار (GolBahar)			+
شیخ احمد (Sheikh Ahmad)	+	+	
امپایرآل رد (Empire all Red)		+	+
رد رم بیوتی (Red Rome Beauty)	+		
گلوکناپفل (Glockenapfel)		+	
نوردرن اسپای (Northern Spy)	+	+	
رد اسپور کوپر (Red Spur Cooper)	+		+
گرانی اسمیت (Granny Smith)	+	+	
مشهد (Mashad)	+	+	
سلطانی شبستر (Sultani-e Shabestar)	+	+	
اردبیل۲ (Ardebil2)	+		
گلدن اسموتی (Golden Smoothee)	+	+	
رد اسپور (Red Spur)	+		
قرمز رضاییه (Ghermez-e Rezayeh)	+		+
مربایی (Morabbaei)	+		+
آی آر آی ۶ (IRI6)		+	
خورسیجان (Khorsijan)	+	+	
زنوز مرند (Zonuz-e Marand)	+	+	
اخلمد مشهد (Akhlemad-e Mashad)	+		+
اورلئان (Orlean)	+		+
شیشه ای تبریز (Shishey-e Tabriz)	+		+
پاییزه مشهد (Payezeh Mashad)	+	+	
گراونشتاین (Gravenstein)		+	+
یلوترانسپارنت (Yellow Transparent)			+
اردبیل ۱ (Ardebil-e1)	+	+	
گلدن دلیشز (Golden Delicious)	+		+
کوپر اسپور (Cooper Spur)	+		+
عسلی (Assali)	+	+	
شربتی (Sharbati)		+	+
زینتی (Zinati)	+	+	
شفیعی (Shafii)	+	+	
آزایش (Azayesh)	+	+	
گلشاهی (Golshahi)	+	+	

جدول ۲- نتایج آزمون الیزا ارقام سیب کلکسیون کمال‌شهر با استفاده از آنتی سرم ویروس لکه سبزرد سیب (بهار ۱۳۹۶)

Table 2- ELISA results of apple variety of Kamalshahr collectionwith ACLSV-specific antiserum (Spring 2017)

نام رقم Cultivar name	شماره درخت Tree No.	ACLSV	نام رقم Cultivar name	شماره درخت Tree No.	ACLSV
گلاب کهنز (Golab-e Kohanz)	1	+	اورلئان (Orlean)	1	+
شربتی (Sharbati)	3	+	پرایم گلد ۱ (Prim Gold1)	2	+
اسکارلت ویلسون (Scarlett Wilson)	3	+	شیشه ای تبریز (Shishey-e Tabriz1)	3	+
جاناتان (Jonathan)	2	+	نوردرن اسپای (Northern Spy)	1	+
گلدن اسپور (Golden Spur)	1	+	گانی بیوتی (Ganny Beauty)	1	+
گانی بیوتی (Ganny Beauty)	3	–	سلطانی شبستر (Sultani-e shabestar)	2	+
کوپر اسپور (Cooper Spur)	1	+	پاییزه مشهد (Payezeh Mashad)	3	–
گلشاهی (Golshahi)	2	+	سلطانی شبستر (Sultani-e shabestar)	3	+
گلدن اسپور (Golden Spur)	2	–	اسکارلت ویلسون (Scarlett Wilson)	2	+
اخلمد مشهد (Akhlemad-e Mashad)	3	+	جاناتان ۲ (Jonathan2)	1	+
کوپر اسپور (Cooper Spur)	3	+	جاناتان ۲ (Jonathan2)	2	+
اخلمد مشهد (Akhlemad-e Mashad)	2	–	شربتی (Sharbati)	1	+
استارکینگ (Starking)	1	–	گلدن دلیشز (Golden Delicious)	3	+
استارکینگ (Starking)	2	–	شیشه‌ای تبریز (Shishey-e Tabriz)	1	+
استارکینگ (Starking)	3	– م	اورلئان (Orlean)	3	+
مربایی (Morabbaei)	2	+	اردبیل ۱ (Ardebil-e1)	1	+
مکینتاش (McIntosh)	2	–	گلبهار (GolBahar)	3	+
مکینتاش (McIntosh)	1	–	رد اسپور کوپر (Red Spur Cooper)	3	+
نایان ارنگه (Nayan-e Arangheh)	2	م	فوجی (Fuji)	3	+
گلوکناپفل (Glockenapfel)	2	+	گلدن اسموتی (Golden Smoothee)	2	+
رد اسپور کوپر (Red Spur Cooper)	2	م	سلطانی شبستر (Sultani-e Shabestar)	1	+
خورسیجان (Khorsijan)	1	–	مربایی (Morabbaei)	1	+
گلبهار (GolBahar)	2	+	مشهد نوری (Mashad-e Nouri)	3	+
مشهد نوری (Mashad-e Nouri)	2	+	مشهد نوری (Mashad-e Nouri)	1	+
یلو اسپور (Yellow Spur)	2	–	یلو ترنسپرنت (Yellow Transparent)	2	-
گلوکناپفل (Glockenapfel) IR6-2	1	– -	گانی بیوتی (Ganny Beauty)	3	+
			نوردرن اسپای (Northern Spy)	3	-
اردبیل ۱ (Ardebil-e1)	2	–	رد روم بیوتی (Red Rome Beauty)	2	-
واین سپ (Winesap)	2	+	گلبهار (GolBahar)	1	-
ردروم بیوتی (Red Rome Beauty)	3	–	شیخ احمد (Sheikh Ahmad)	3	+
شیخ احمد (Sheikh Ahmad)	1	+	یلو اسپور (Yellow Spur)	1	+
نایان ارنگه (Nayan-e Arangheh)	3	+	جاناتان (Jonathan)	3	+
اردبیل ۲ (Ardebil-e2)	1	+	اورلئان (Orlean)	2	+
گلدن اسموتی (Golden Smoothee)	3	+			



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

M: نشانگر اندازه (1kp DNA ladder, Fermentas) 1: اسکارلت ویلسون۲، 2: سلطانی شبستر، 3: اورلئان ۱، 4: مشهد نوری، 5: اردبیل ۱-۱ و H: کنترل منفی.

Figure 1- Agarose gel electrophoresis pattern of RT-PCR products Lanes

M-: molecular marker (1kb DNA ladder, Fermentas), 1: Skarletwilson, 2: Soltanishabestar, 3: Orlean, 4: Mashhad noori, 5: Ardabil and H: Healthy plant.

جدول ۳- نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به طریق نسخه‌برداری معکوس با استفاده از آر. ان ای استخراج شده از برخی ارقام موجود در کلکسیون سیب کمال‌شهر و جفت آغازگر اختصاصی ویروس لکه سبزرد سیب

Table 3- RT-PCR results of total RNA extracts of some apple variety of Kamalshahr collection with ACLSV-specific primers

نام رقم Cultivar name	نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز RT-PC Rresult
پاییزه مشهد ۳(Payezeh Mashad3)	neg
اردبیل ۱-۲ (Ardebil-e1-2)	neg
نایان ارنگه ۲ (Nayan-e Arangheh2)	neg
خورسیجان ۱ (Khorsijan1)	neg
رداسپور کوپر ۲ (Red Spur Cooper2)	neg
کوپر اسپور ۳ (Cooper Spur3)	neg
یلو ترنسپرنت۱ (Yellow Transparent1)	neg
استارکینگ ۲ (Starking2)	neg
استارکینگ ۱ (Starking1)	neg
اردبیل۱-۱ (Ardebil-e1-1)	pos
سلطانی شبستر۲ (Sultani-e Shabestar2)	pos
اسکارلت ویلسون۲ (Scarlett Wilson2)	pos
مشهد نوری (Mashad-e Nouri)	pos
اورلئان ۱ (Orlean1)	pos
اردبیل۲-۲ (Ardebil-e2-2)	neg
IR6-1	neg
ردروم بیوتی ۳ (Red Rome Beauty3)	neg
مکینتاش ۱ (McIntosh1)	neg

Neg= negative عدم آلودگی

Pos=positive آلوده

اندام‌های تکثیری رویشی آلوده عامل اصلی انتقال و گسترش ویروس‌های درختان میوه می‌باشند (۲۶). با توجه به این که ویروس‌های مهم درختان سیب فاقد ناقل طبیعی شناخته شده‌ای می‌باشند لذا تولید اندام‌های تکثیری عاری از ویروس در احداث باغات جدید اصلی‌ترین روش مؤثر کنترل ویروس‌ها در این گروه از محصولات می‌باشد (۲۴). در این بررسی تعدادی از ارقام شامل مکینتاش ۱، ردروم بیوتی ۳، استارکینگ ۱، ۲ و ۳، اردبیل ۱-۲، نایان ارنگه ۲، خورسیجان ۱، رداسپورکوپر ۲، یلو ترنسپرنت ۱، IR6-1 و اردبیل۲-۲ هم در آزمون الیزا و هم در آزمون RT-PCR عاری از ویروس تشخیص داده شدند لذا این ارقام پس از بررسی از نظر آلودگی به سه ویروس مهم دیگر شامل ASPV، ASGV و ToRSV می‌توانند در برنامه تولید مواد تکثیری گواهی‌شده جهت احداث باغات جدید مورد توجه قرار گیرند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی سازمان تحقیقات کشاورزی آقای دکتر زارع که هزینه‌های این تحقیق در قالب پروژه مصوب مشترک بین دو مؤسسه تحقیقات باغبانی و گیاه‌پزشکی را فراهم نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1- Adams M.J., Candresse T., Hammond J., Kreuze J.F., Martelli G.P., Namba S., Pearson M.N., Ryu K.H., Saldarelli P., and Yoshikawa N. 2012. Family Betaflexiviridae. pp. 920–941. In: King AMQ, Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., (eds). Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. London: Elsevier Academic Press.
2- Alemzadeh E., Katsiani A.T., Efthimiou K., and Katis N.I. 2016. Occurence of Apple chlorotic leaf spot virus in apple and quince in southern if Iran. Journal of Plant Pathology 98(1): 171-185.
3- Anonymous. 2015. Office of Statistics and Information Technology, Ministry of Agricultural Jihad. Agricultural Statistics of the Year 1394-. (In Persian)
4- Barba M., Ilardi V., and Pasquini G. 2015. Control of pome and stone fruit virus diseases. Advanced in Virus Research 91: 47–61.
5- Brunt A.A., Crabtree K., Dalwitz M.I., Gibbs A.J., and Watson L. (eds). 1996. Plant viruses online: Viruses of plant: description and lists from the VIDE database. CAB International. Available at http://biology.anu.edu.au/ Groups/MES/vide.
6- Campbell A.I. 1990. The effects of viruses on the growth, yield and quality of three apple cultivars on healthy and infected clones of four rootstocks. Acta Horticulture 114: 114-117.
7- Chang S., Puryear J., and Chairney J. 1993. Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter 11: 113-116.
8- Clark M.F., and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosurbent assay for detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-458.
9- Eccher T., and Hajnajari H. 2006. Fluctuations of endogenous gibberellin A4 and A7 content in apple fruits with different sensitivity to russet. Acta Horticulturae 727: 537-544.
10- Hajnajari H. 2012. New early apple 'Gol Bahar', tolerant to spring cold with high flesh firmness, good storability and high yielding. Center of Agriculture Information & informative technology. Tehran.pp.20. (In Persian)
11- Hajnajari H. 2012. New early apple 'Sharbati' with upright growth habit and high yielding. Center of Agriculture Information & informative technology. Tehran.pp.20. (In Persian)
12- Hajnajari H., and Moradi M. 2014. The survey self-compatibility rate, pomology and inbreeding pressure in some of selected apples and fully self-compatible genotype IRI6. Iranian Horticulture Science 45(2): 163-174. (In Persian)
13- Hajnajari H. 2018. Atlas of Iranian Fruit Tree Cultivars. Nahre Amuzeh Keshavarzi (Agriculture Education publication).pp. 234. (In Persian)
14- Hassan M., Myrta A., and Polak J. 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by onetube pentaplex RT-PCR. Journal of Virological Methods 133: 124–129.
15- Janick J., Cummins J.N., Brown S.K., and Hemmat M. 1996. Apples. pp. 1- 77. In: Fruit Breeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits. Wiley, New York.
16- Keshavarz T., and Shams-Bakhsh M. 2015. Incidence and distribution of Apple chlorotic leaf spot virus in the main fruit growing areas of Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection 48: 306-312.
17- Lister R.M. 1970. Apple chlorotic leaf spot virus. CMI/AAB Description of plant viruses. No. 30.
18- Menzel W., Zahn V., and Maiss E. 2003. Multiplex RT-PCR ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. Journal of Virological Methods 110: 153–157.

19- Mink G.I., and Shay J.R. 1959. Preliminary evaluation of some Russian apple varieties as indicators for apple viruses. Plant Disease 254: 13–17.
20- Myrta A., Matic S., Malinowski T., Pasquini G., and Candresse T. 2011. Apple chlorotic leafspot virus in stone fruits. p. 85–90. In A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, and W. Jelkmann (eds.), Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. APS Press, St Paul, Minnesota, USA.
21- Nemchinov L., Hadidi A., Foster J.A., Candresse T., and Verderevskaya T. 1995. Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, ICRT-PCR, or multiplex IC-RT-PCR. Acta Horticulturae 386: 51-62.
22- Nemeth M. 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia diseases of fruit trees. Academic publisher, Dordrecht, The Netherlands.
23- Paunovic S., and Jevremovic D. 2004. Apple stem pitting virus detection from dormant pome fruits by RT-PCR. Acta Horticulturae 657: 45–49.
24- Popescu S., Constantin G., and Mazilu C.R. 2004. Apple viral diseases diagnosed in the germplasm collection at ICDP Maracineni-Romania. Acta Horticulturae 657: 51–54.
25- Pupola N., Morocko-Bicevska I., Kale A., and Zeltins A. 2011. Occurrence and diversity of pome fruit viruses in apple and pear orchards in Latvia. Journal of Phytopathology 159: 597-605.
26- Sutic D.D., Ford R.G., and Tosic M.T. 1998. Handbook of plant virus diseases. CRC Press. Boca Raton, USA. pp533.
27- Yaegashi H., Yoshikawa N., and Candresse T. 2011. Apple chlorotic leaf spot virus in pome fruits. p. 17–22. In A. Hadidi M., Barba T., Candresse and W. Jelkmann (eds.) Virus and virus-likediseases of pome and stone fruits. APS Press, St Paul, Minnesota,USA.
28- Yanase H. 1974. Studies on apple latent viruses in Japan. Bulletin of the Fruit Tree Research Station, series C1:47–109.
29- Yoshikawa N. 2001. Apple chlorotic leaf spot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 386 No. 30.

Journal of Plant Protection
Vol. 33, No.4, Winter 2019, P. 387-396

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸، ص. ۳۹۶-۳۸۷

Status of the *Apple chlorotic leaf spot virus* Infection in Native and Imported Apple Tree Cultivars in the National Collection of Kamalshahr Horticulture Research Station

T. Keshavarz[1*]- H. Hajnajari[2]

Received: 24-12-2018
Accepted: 30-07-2019

Introduction: Pome fruits are affected by many viruses that cause diseases with adverse effects in orchards worldwide. *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) is one of the most widespread and economically important latent viruses that naturally affect many *Prunus* species, apples (*Malus domestica* Borkh.), pears (*Pyrus communis* L.) and the other rosaceous species. ACLSV infection rates of up to 80–100% in many commercial apple cultivars with yield losses of the order of 30–40% have been reported. In most commercial apple cultivars, the infection generally is latent, but insensitive cultivars, such as apple trees grown on Marubakaido (*Malus prunifolia* cv. Ringo) rootstocks, malformation and reduction in leaf size and chlorotic rings or line patterns are common. The severity of symptoms induced by ACLSV depends largely on the plant species and virus strains. Some virus isolates induce a severe disease in apricot and plum characterized by depressions and protuberances that deform the fruit, often confused with the "sharka" disease due to *Plum pox virus* (PPV), and named for this reason as "pseudopox." ACLSV is a filamentous virus, 680–780 nm long and 12 nm in width as the type species of the genus Trichovirus in the family Betaflexiviridae. ACLSV contains a single-stranded, positive-sense RNA about 7.5–8 kb in size, with a polyadenylated 3" terminus and a cap at its5"-end, and also contain multiple copies of a single coat protein (CP) of 21–24 kDa. The economic importance of ACLSV is largely due to its worldwide distribution and its capacity to induce severe graft incompatibilities in some Prunus combinations, causing major problems in nurseries. In apple trees, ACLSV frequently is detected in coinfection with *Apple stem grooving virus* and *Apple stem pitting virus*. ACLSV is mainly transmitted by grafting. No natural virus vectors are known for this virus and are not known to be seed or pollen transmitted. The older National Apple Collection of Native and Imported apple cultivars in Kamalshahr Horticulture Research Station located in Karaj includes 85 cultivars and promising genotypes on seed stocks benefit a high genetic variability. Though the cultivars were screened for more biotic and abiotic factors, but no screening has been achieved yet for virus diseases, while this valuable germplasm comprises a wide range of newly released cultivars or in releasing procedure, high yield natives and those imported selected as adapt to Iranian climate, so a great need of healthy primary nucleus to establish mother orchards for certified plant material. As this valuable germplasm is very important in providing healthy primary nucleus to establish mother orchards for certified plant material so the aim of this research was an evaluation of native and imported apple tree cultivars of this Collection to ACLSV infection.

Material and Methods: To assess the occurrence and the prevalence of this virus in the collection, a total of fifty accessions were collected. The sample collection was carried out in summer (2016) and spring (2017). The collecting method consisted of sampling leaves homogeneously distributed around the canopy of the plant. All samples were screened for the presence of ACLSV by DAS-ELISA using the ACLSV specific polyclonal antibody using commercial kits purchased from Bioreba Company, Switzerland. To confirm ELISA results some cultivars were subjected to reverse transcription-polymerase chain reaction. Total RNA was isolated from some apple cultivars using CTAB RNA extraction method and was used as a template for RT-PCR. Specific oligonucleotide primers corresponding to a region of the ACLSV genome that encodes part of the CP, were used in RT-PCR. The amplified PCR products were analyzed in 1% agarose gel stained by ethidium-bromide and visualized under UV light after electrophoresis.

1- Research Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: ta_keshavarz@yahoo.com)
2- Research Associate Professor, Temperate Fruit Research Center, Horticulture Science Research Institute, Agriculture Research Education Extension Organization

Result and Discussion: The ELISA results showed that 39 out of 50 cultivars were infected by ACLSV. RT-PCR on total RNA from the ELISA positive samples resulted in the amplification of an expected 358 bp DNA fragment. In RT-PCR out of 18 tested cultivars, five were infected. Some cultivars including Makintash, Red Rome Beauty, Starking, Ardebil1, Nayan Arangeh, Khorsijan, Red spur cooper, Yellow transparent 1, IR6-1 and Ardebil2 recognized ACLSV free in ELISA and RT-PCR, so could be used in the production and employment of virus-free propagating material program after infection testing to the other three important viruses Apple stem pitting virus, Apple stem grooving virus and Tomato ringspot virus. The results showed a high rate of ACLSV infection of native and imported apple cultivars in the older National Apple Collection in Kamalshahr Horticulture Research Station. Previous studies, in apple gardens and nurseries of Iran, have shown a high percentage of ACLSV infection too. Similar results have also been obtained on the percentage of infection with this virus in the Czech Republic, Romania, Albania, and Bosnia and Herzegovina. As germplasm exchanges are the main source of transmission of new viruses to countries, one of the most important strategies to control viruses in fruit trees is to prevent the introduction of virus-infected germplasm into the country.

Keywords: Apple germplasm collection, *Apple chlorotic leaf spot virus*, ELISA, RT-PCR, Virus