

شناسایی و تعیین پراکنش ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (ToRSV) در باغ های درختان میوه هسته دار استان های گلستان و فارس

مریم ستاری^۱، فرشاد رخشنده رو^{۲*} و جواد مظفری^۳
۱، دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات
دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ۳، دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۹ - تاریخ تصویب: ۹۱/۹/۲۹)

چکیده

ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی *Tomato ringspot virus* (ToRSV) متعلق به جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* می باشد. زوال ناشی از این عامل ویروسی یکی از عوامل تخریب درختان میوه در جهان محسوب می شود. در این تحقیق جهت بررسی درصد آلودگی ToRSV در باغات درختان میوه هسته دار هلو، آلو، گوجه و زردآلو در استان های فارس و گلستان در طی سال های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸، تعداد ۴۱۴ نمونه به صورت کاملاً تصادفی و بدون در نظر گرفتن علایم جمع آوری شد و به روش DAS-ELISA مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج آزمون DAS-ELISA آلودگی انواع درختان میوه هسته دار مورد بررسی به ToRSV آشکار گردید. نتایج نشان داد در سال های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ درختان میوه هسته دار در باغات استان فارس به ترتیب به میزان ۸/۵ و ۱۰/۲٪ و باغات استان گلستان به میزان ۳۰ و ۲۳/۱٪ به ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی آلوده می باشند. تعداد ۱۰۰ نمونه از نمونه های هلو، آلو، گوجه و زردآلو که واکنش ضعیفی در روش الایزا نشان داده بودند با آزمون *Dot immunobinding assay-DIBA* مورد بررسی مجدد قرار گرفته و در ۸۵ نمونه آلودگی مورد تایید قرار گرفت. خصوصیات بیولوژیکی جدایه های ردیابی شده با مایه زنی مکانیکی گیاهان محک و ویژگی های مورفولوژیک آن ها با مشاهده پیکره های ایزومتریکی با روش *Immunosorbent electron microscopy (ISEM)* مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد جدایه های موجود از لحاظ بیولوژیکی با سایر جدایه ها متفاوت نبوده و علایمی مانند لکه حلقوی نکروتیک، غربالی و موزاییک برگ، در درختان آلوده ایجاد می کنند. تعداد ۳۰ نمونه هلو، آلو، گوجه و زردآلو الایزا مثبت و آلوده توسط آزمون RT-PCR و جفت آغازگرهای اختصاصی برای حضور ToRSV مورد بررسی قرار گرفتند. در تعداد ۲۰ نمونه از انواع نمونه های مورد بررسی باند ۴۹۹ bp مورد انتظار حاصل از تکثیر منطقه ژنتیکی مربوط به بیان پروتئین پوششی ویروس تکثیر گردید. نتایج این بررسی بیانگر آلودگی گونه های مختلف درختان میوه هسته دار در برخی مناطق شمال و جنوب ایران به ToRSV می باشد.

واژه های کلیدی: RT-PCR، ISEM، DAS-ELISA، دامنه میزبانی

می باشند. جنس بزرگ *Prunus* شامل درختان هلو
(*Prunus persica* (L.) Batsch)، شلیل (*Prunus*)
Prunus persica (L.) Batsch var. *nucipersica* آلو (*Prunus*)
domestica L.)، گیلاس (*Prunus avium* L.)، زردآلو

مقدمه

درختان میوه هسته دار از خانواده Rosaceae، زیر
خانواده ی Prunoideae و جنس *Prunus* هستند که به
صورت درخت یا درختچه های خزان دار یا همیشه سبز

تکثیری و گونه های مختلفی از نماتد جنس *Xiphinema* منتقل می شود (Pinkerton et al., 2008). ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی در ایران از پراکندگی وسیعی برخوردار است. این ویروس از مزارع سویا در استان های گلستان، مازندران، خوزستان، اردبیل و لرستان (Golnaraghi et al., 2004)، تاکستان های شمال کشور (Rakhshanderoo et al., 2005)، گیاهان زینتی استان های مرکزی و تهران (Ghotbi & Shahraeen, 2009)، گوجه فرنگی کاری های استان های جنوب کشور (Massumi et al., 2009) و نیز باغات سیب (Moini, 2010) استان خراسان گزارش شده است. درختان میوه هسته دار از میزبان های اصلی ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی می باشند و ویروس مذکور از جمله عوامل مهم زوال درختان میوه هسته دار در جهان محسوب می شود و همواره در قرنطینه محصولات زراعی از درجه اول اهمیت بازرسی و کنترل برخوردار می باشد. بنابر این آگاهی از میزان آلودگی باغات کشور به این ویروس و تعیین میزان پراکنش آن در مناطق مختلف جهت اجرای برنامه مدیریت کنترل مناسب آن در سطح وسیع امری لازم و ضروری می باشد. با توجه به سابقه حضور ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی در محصولات مختلف زراعی، باغی و زینتی در ایران و روش انتقال آسان و دامنه میزبانی بالای این ویروس و همچنین با توجه به مشاهده علائم شبه ویروسی بر روی برگ درختان میوه هسته دار در برخی مناطق واقع در استان های شمالی و جنوبی کشور در این تحقیق کوشش به عمل آمد تا علاوه بر شناسایی و ردیابی ویروس از درختان میوه هسته دار مختلف درصد آلودگی درختان در باغات برخی شهرهای استان های گلستان و فارس به ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

نمونه برداری

در طی سال های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸، در مجموع تعداد ۱۴۸ نمونه برگی به صورت کاملا تصادفی و بدون در نظر گرفتن علائم از باغ های درختان میوه هسته دار شامل هلو، آلو، گوجه و زردآلو واقع در مناطق مختلف شهرهای کلاله و مینودشت (استان گلستان) و تعداد

(*Prunus armeniaca* L.) و بادام (*Prunus communis* L.) است. درختان میوه هسته دار از جمله محصولات باغی هستند که در سرتاسر جهان کشت می شوند و گروه مهمی از میوه های مناطق معتدله و از جمله ایران را تشکیل می دهند. در سال ۱۳۸۷ میزان تولید سالانه میوه های هسته دار در حدود ۲ میلیون تن و سطح زیر کشت این درختان در همین سال ۴۱۷۹۳۲/۹ هکتار برآورد شده است (Anonymous, 2010). با توجه به اهمیت کشت درختان میوه هسته دار، ویروس های درختان میوه از سال ها قبل مهمترین عوامل کاهش کیفیت محصول، ریزش زود هنگام و ایجاد زوال و مرگ سریع درختان بوده اند (Gumus et al., 2007). آلودگی مخلوط ویروس هایی مانند ویروس کوتولگی گوجه *Prune dwarf virus (PDV)*، ویروس آبله آلو *(PPV)*، ویروس بافت مرده لکه ای هسته داران *Plum pox virus*، ویروس *Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)* و ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی *Tomato ringspot virus (ToRSV)* که از جمله مهمترین ویروس های درختان میوه به حساب می آیند موجب مرگ درختان می شوند (Stace-Smith, 1984). ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (ToRSV) به راسته ی *Picornavirales* خانواده ی *Secoviridae*، زیر خانواده ی *Comovirinae* و جنس *Nepovirus* متعلق می باشد (Sanfacon et al., 2009). پیکره های ویروس ایزومتریکی گرد و قطری در حدود ۳۰ نانومتر دارند و به هنگام التراسانتریفوژ در شیب چگالی ساکارز تولید سه جزء رسوبی می کنند (Stace-Smith, 1996).

این نپوویروس در آمریکا شایع و دارای اهمیت اقتصادی است و احتمال دارد در آینده آثار تخریبی زیادی در نقاط دیگر خارج از قاره آمریکا داشته باشد. دامنه ی میزبانی طبیعی این ویروس بسیار وسیع می باشد و ۲۸۵ گونه از ۱۸۹ جنس و ۵۵ خانواده ی گیاهی از تک لپه ای ها و دو لپه ای ها را آلوده می سازد و مهمترین نشانه برگی ایجاد شده توسط این ویروس علائم لکه حلقوی است (EPPO, 2005). میزبان های اصلی ToRSV هسته داران، سیب، انگور، تمشک و توت فرنگی می باشند (EPPO, 1991). این ویروس از طریق مکانیکی، بذر، پیوند، دانه گرده، اندام های رویشی

شد. همچنین از نمونه های برگ درختان میوه هسته دار فاقد آلودگی نیز به عنوان شاهد سالم استفاده شد.

آزمون دیبا (Dot-immunobinding assay (DIBA

به دلیل حضور اکسیدانت های قوی در عصاره هسته داران و احتمال خطا در نتایج آزمون الایزای مستقیم به دلیل قابلیت کم شستشو و حذف آنزیم های اکسیداز از چاهک های تشتک الایزا در آزمون مذکور، نمونه هایی که واکنش رنگ زایی ضعیفی با آنتی بادی اختصاصی در آزمون DAS-ELISA داشتند، برای تأیید آلودگی توسط آزمون DIBA مورد بررسی مجدد قرار گرفتند. برای این منظور از تعداد ۱۰۰ نمونه گیاهی آلوده به ToRSV با واکنش ضعیف در آزمون DAS-ELISA استفاده شد. آزمون دیبا مطابق روش (Bantari & Goodwin, 1985) انجام شد و در آن از آنتی بادی چند همسانه ای ToRSV تهیه شده از شرکت Agdia آمریکا با رقت ۲۰۰ برابر و آنتی بادی ضد خرگوش (Goat Anti- (Sigma-Aldrich, Germany) Rabbit (GAR) با رقت ۱۰۰۰۰ برابر استفاده شد. جهت بلوکه نمودن غشاء نیتروسولولزی از محلول شیر خشک بدون چربی ۵٪ حل شده در بافر تریس (TBS) حاوی ۵۰ میلی مولار Tris-HCl و ۱۵۰ میلی مولار NaCl با pH ۷/۴ استفاده شد. همچنین برای ردیابی ویروس از مواد شیمیایی رنگزا Nitro blue tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich) و 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) استفاده شد. حضور لکه های بنفش رنگ در سطح غشاء به فاصله زمانی ۳۰ دقیقه از زمان افزوده شدن سوبسترا به منزله آلودگی به ویروس در نظر گرفته شد. در این آزمون از عصاره برگ های درختان میوه هسته دار سالم و آلوده به عنوان شاهد های منفی و مثبت استفاده شد.

استخراج RNA ، ساخت cDNA و واکنش زنجیره ای پلیمرز معکوس RT-PCR

برای تشخیص دقیق ویروس در نمونه های آلوده از آزمون RT-PCR برای تعداد ۳۰ نمونه از گیاهانی که توسط آزمون های سرولوژیک مثبت شناخته شده بودند استفاده شد. برای این منظور عصاره برگ درختان هلو، آلو، گوجه و زرد آلو آلوده به ویروس به صورت مکانیکی بر روی گیاه محک خیار در گلخانه مایه زنی

۲۶۶ نمونه برگ از مناطق مختلف شهرهای جهرم و شیراز (استان فارس) جمع آوری شد. نمونه برداری ها به صورت کاملا تصادفی و بدون در نظر گرفتن علائم و با حرکت در قطر باغ با فاصله ی هر ۱۰ متر، انجام پذیرفت. فاصله بین باغ های مورد نمونه برداری با توجه به سطح زیر کشت درختان میوه در هر منطقه تعیین گردید.

شناسایی و ردیابی ToRSV

به منظور ردیابی ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی در نمونه های جمع آوری شده از آزمون های سرولوژیکی مانند الایزا به روش ساندریچ دو طرفه آنتی بادی (DAS-ELISA)، دیبا (DIBA) و نیز الکترون میکروسکوپی با جذب سرولوژیک (ISEM) استفاده شد. همچنین نمونه هایی که توسط آزمون های سرولوژیک برای ToRSV آلوده تشخیص داده شدند توسط آزمون مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمرز معکوس (RT-PCR) مورد ردیابی قرار گرفتند.

الایزا به روش ساندریچ دو طرفه آنتی بادی (DAS-ELISA)

به منظور ردیابی ToRSV از آزمون الایزا به روش ساندریچ دو طرفه آنتی بادی (DAS-ELISA) مطابق روش (Clark & Adams, 1977) استفاده شد. در این آزمون از آنتی بادی های چند همسانه ای موجود در کیت تجاری شرکت آمریکایی Agdia با رقت ۲۰۰ برابر برای ردیابی ToRSV استفاده شد. برای انجام این آزمون عصاره گیری از نمونه های برگ جمع آوری شده با نسبت یک به پنج (یک گرم بافت برگ در پنج میلی لیتر بافر استخراج) در هاون چینی سرد انجام پذیرفت. برای این آزمون از بافر سوبسترا دارای ماده پارانیتروفنیل فسفات (Sanofi, French) استفاده شد و واکنش رنگ زایی نمونه های مثبت و حضور رنگ زرد با دستگاه الایزا خوان مدل ELX 800-Biotek در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه هایی که مقدار عددی جذب آن ها از ۳ برابر میانگین جذب چاهک های مربوط به شاهد سالم بیشتر بود به عنوان نمونه های مثبت و آلوده به ویروس در نظر گرفته شدند. برای هر بار انجام آزمون از نمونه های کنترل مثبت و منفی موجود در کیت تجاری استفاده

با شدت جریان ۲۵ میلی آمپر به مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز شدند. پس از پایان الکتروفورز، رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید و رنگبری آن با آب مقطر صورت گرفت. سپس ژل بر روی صفحه UV- transilluminator بررسی و با دستگاه Gel documentation از آن عکسبرداری شد.

بررسی خصوصیات بیولوژیکی و مورفولوژی پیکره ToRSV جدایه ها

آزمون Immunosorbent electron microscopy (ISEM)

به منظور مشاهده پیکره ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی، دو جدایه مربوط به میزبان های هلو و زردآلو جدا شده از شهرهای جهرم و مینودشت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد مشاهده قرار گرفتند. این تحقیق مطابق روش Milne (1993) انجام پذیرفت (Milne, 1993). برای این منظور از آنتی بادی چند همسانه ای ویروس با رقت ۲۰۰ برابر استفاده شد. شبکه های مسی ۳۰۰ مش پوشش داده شده با فرموار و کربن به مدت یک ساعت در ۱۰۰ میکرولیتر از IgG اختصاصی ToRSV با رقت ۲۰۰ برابر غوطه ور شدند. پس از شستشوی شبکه های مسی توسط بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶ مولار و خشک شدن، شبکه های مسی به مدت یک ساعت بر روی عصاره ی گیاهی قرار داده شدند. رنگ آمیزی منفی پیکره ها توسط محلول یورانیل استات ۲٪ انجام پذیرفت. مشاهده پیکره ها و عکسبرداری از نمونه ها توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل Philips EM-208 با میدان ولتاژ ۸۰ کیلوولت و بزرگنمایی ۱۰۰-۸۰ هزار برابر انجام پذیرفت.

بررسی دامنه میزبانی آزمایشگاهی ویروس

به منظور بررسی برخی خصوصیات بیولوژیکی مربوط به جدایه های ToRSV در این تحقیق از دامنه میزبانی آزمایشگاهی استفاده شد و عصاره برگ نمونه های آلوده به صورت مکانیکی بر روی برگ گیاهان محک در گلخانه مایه زنی شدند. برای مایه زنی از تعداد ۱۲ جدایه شاخص دارای نوع شاخص علایم ToRSV استفاده شد. ۱۲ نمونه مذکور از شهرهای جهرم، شیراز، مینودشت و کلاله و از میزبان های هلو، زردآلو، آلو و گوجه انتخاب شدند. برای این منظور عصاره هر ۱۲ نمونه در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۷/۱

شدند. ده روز پس از مایه زنی، آموده RNA کل از بافت برگ های جوان خیار با استفاده از بافر کلرید لیتیم LiCl مطابق روش (Channuntapipat et al., 2001) استخراج شد. فرایند ساخت DNA مکمل (cDNA) با استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس (M-MuLV) و مطابق دستورالعمل شرکت Fermentas آلمان و با آغازگر برگشتی (Reverse Primer) اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (ToRSV-D1) انجام پذیرفت. واکنش مولکولی PCR با استفاده از ۲μL از cDNA ساخته شده و در حضور جفت آغازگرهای اختصاصی از قبل طراحی شده توسط Rott و همکاران (۱۹۹۱) برای تکثیر قسمتی از منطقه ژنی مسئول بیان پروتئین پوششی ویروس باندازه ۴۹۹ جفت باز واقع در فاصله بین نوکلئوتیدهای ۴۷۳۲ تا ۵۲۳۱ از قطعه دوم RNA ژنومی ویروس انجام پذیرفت. از آغازگرهای رفتی (ToRSV-U1) و برگشتی (ToRSV-D1) با توالی های به ترتیب 5'-GGACGCGTTTGGTCGTTATGATTC-3' و 5'-CGAGCCCTGGAAAAACGCAATAA-3' برای این آزمون استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر و غلظت نهایی ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۲ میلی مولار کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰X (500 mM) KCl, Tris-HCl با اسیدیتتهی ۸/۴، ۰/۲ میلی مولار دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs)، ۲ میکرولیتر از cDNA و ۳ واحد آنزیم پلی مرز (Taq Polymerase) (سیناژن، ایران) در دستگاه ترموسایکلر (Ependorf, AG, Germany) انجام شد. واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهی سلسیوس به مدت چهار دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجهی سلسیوس، به مدت ۶۰ ثانیه؛ اتصال آغازگرها به رشتهی الگو در دمای ۵۴ درجهی سلسیوس، به مدت ۵۰ ثانیه؛ گسترش رشتهی جدید در دمای ۷۲ درجهی سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه انجام شده و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجهی سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR حاصل از تکثیر منطقه ژنتیکی مورد نظر برای بررسی اندازه و کیفیت بر روی آگاروز ۱٪

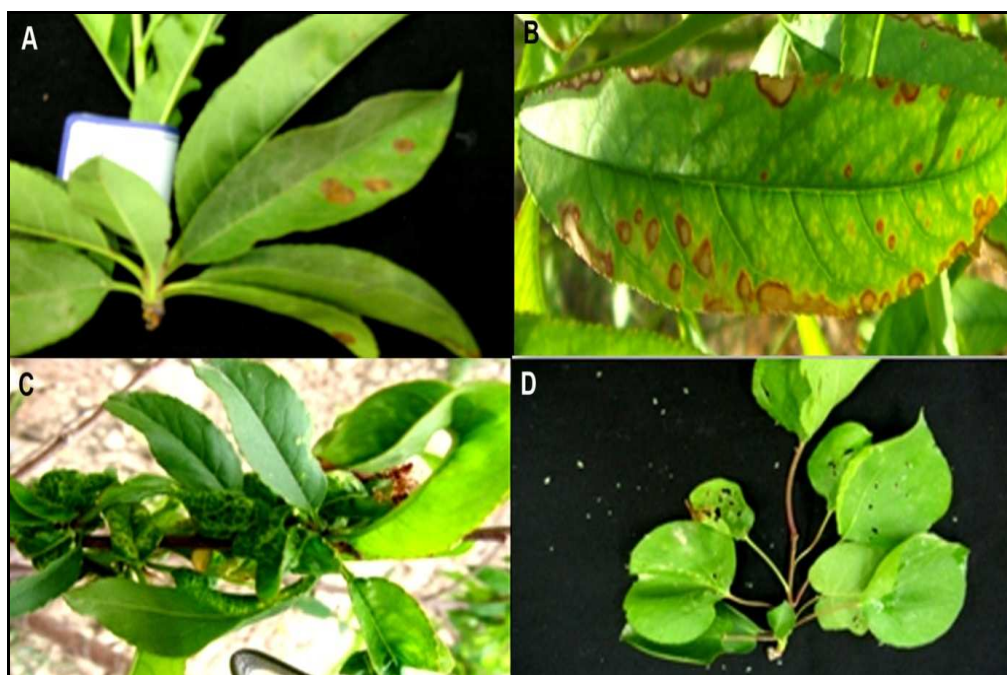
برای گیاهانی که علائم مشخصی را نشان ندادند مایه زنی برگشتی (Back Inoculation) انجام پذیرفت.

نتایج

شناسایی، ردیابی و تعیین درصد آلودگی ToRSV با استفاده از آزمون های DAS-ELISA و DIBA

پس از ردیابی ویروس توسط آزمون های سرولوژیکی و مولکولی در نمونه های دارای علائم مشخص شد علائمی مانند لکه حلقوی نکروتیک، موزاییک و بدشکلی برگ، لکه غربالی برگ ها و کلروز و نکروز بین رگبرگ ها با آلودگی به ToRSV مرتبط می باشند (شکل ۱).

دارای ۱۵٪ از ماده ۲- مرکاپتواتانول و ۰/۰۲٪ ماده sodium diethyldithiocarbamate استخراج و به صورت مکانیکی بر روی گیاهان محک سلمه تره (*Nicotiana glauca*)، توتون (*Nicotiana glauca*)، لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*)، خیار (*Cucumis sativus*)، گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) و فلفل (*Capsicum annuum*) در مرحله رشدی ۲-۴ برگی با دو تکرار در گلخانه مایه زنی شد. ۱۰ روز پس از مایه زنی، علائم ظاهر شده روی گیاهان مایه زنی شده یادداشت برداری شد. به منظور اطمینان از آلوده بودن گیاهان محک، آزمون الیزا هفت روز پس از مایه زنی انجام پذیرفت. همچنین



شکل ۱- بررسی علائم ایجاد شده در برگ های درختان میوه هسته دار مختلف در اثر ابتلا به ToRSV. (A) لکه های حلقوی نکروتیک در برگ گوجه. (B) نکروز حاشیه برگ و کلروز بین رگبرگی در برگ هلو. (C) موزاییک و بدشکلی برگ هلو. (D) غربالی در برگ زرد آلو.

برخوردار می باشد (جدول ۳). درختان میوه هسته دار مورد آزمون در استان گلستان در سال های ۸۷ و ۸۸ به ترتیب به میزان ۳۰ و ۲۳/۱٪ به ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی آلوده بودند در حالی که در استان فارس در این سال ها از درصد های آلودگی به ترتیب ۸/۵ و ۱۰/۲٪ برخوردار بودند (جدول ۱ و ۲). بنا بر این به نظر

نتایج آزمون DAS-ELISA نشان داد آلودگی به ToRSV در تمام گونه های درختان میوه هسته دار هلو، آلو، زرد آلو و گوجه در مناطق مورد تحقیق در این پژوهش وجود دارد (جدول ۱، ۲ و ۳). همچنین نتایج نشان داد ToRSV در باغات استان گلستان از درصد آلودگی بیشتری در مقایسه با باغات استان فارس

همچنین در مناطق مورد بررسی، آلودگی به ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی در درختان زردآلو در مقایسه با سایر درختان به میزان کمتری بوده است (جدول ۳).

می‌رسد در طول سال‌های مورد بررسی، ویروس در درختان هلو با ۱۷/۲٪ آلودگی نسبت به درختان آلو و گوجه با ۱۵/۲٪ از آلودگی بیشتری برخوردار بوده است.

جدول ۱- میزان پراکندگی ToRSV در باغات شهرهای مورد بررسی در سال ۱۳۸۷

استان شهر	هلو		آلو و گوجه		زردآلو		درصد کل آلودگی
	تعداد نمونه		درصد آلودگی		تعداد نمونه		
	مورد بررسی	آلوده	مورد بررسی	آلوده	مورد بررسی	آلوده	
فارس							
چهرم	۱۱	۲	۰	۰	۱۵	۱	۶/۶٪
شیراز	۱۰	۲	۰	۰	۱۰	۱	۱۰٪
گلستان							
کلانه	۱۰	۴	۱۰	۲	-	-	-
مینودشت	۱۰	۳	۱۰	۳	-	-	-
جمع	۴۱	۱۱	۴۴	۵	۲۵	۲	۸٪

جدول ۲- میزان پراکندگی ToRSV در باغات شهرهای مورد بررسی در سال ۱۳۸۸

استان شهر	هلو		آلو و گوجه		زردآلو		درصد کل آلودگی
	تعداد نمونه		تعداد نمونه		تعداد نمونه		
	مورد بررسی	آلوده	مورد بررسی	آلوده	مورد بررسی	آلوده	
فارس							
چهرم	۵۲	۶	۳۶	۴	۴۸	۵	۱۰/۴٪
شیراز	۳۰	۲	۱۵	۱	۱۵	۲	۱۳/۳٪
گلستان							
کلانه	۵۰	۹	۱۵	۵	۵	۱	۲۰٪
مینودشت	۱۳	۴	۱۵	۴	۱۰	۲	۲۰٪
جمع	۱۴۵	۲۱	۸۱	۱۴	۷۸	۱۰	۱۲/۸٪

جدول ۳- درصد آلودگی کل درختان میوه هسته دار در سال‌های ۸۷ و ۸۸ در استان‌های مورد بررسی

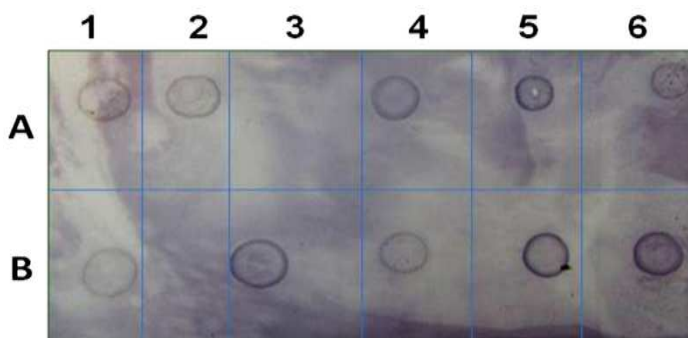
استان	هلو		آلو و گوجه		زردآلو		درصد کل آلودگی
	تعداد نمونه		تعداد نمونه		تعداد نمونه		
	مورد بررسی	آلوده	مورد بررسی	آلوده	مورد بررسی	آلوده	
فارس	۱۰۳	۱۲	۷۵	۵	۸۸	۹	۱۰/۲٪
گلستان	۸۳	۲۰	۵۰	۱۴	۱۵	۳	۲۰٪
جمع	۱۸۶	۳۲	۱۲۵	۱۹	۱۰۳	۱۲	۱۱/۶٪

ELISA واضح نبود و مشکوک به آلودگی بودند (جذب‌های پایین‌تر یا برابر با حد آلودگی داشتند) برای تأیید آلودگی با آزمون دیبا مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۸۵ نمونه واکنش رنگ زائی مناسبی را با سوبسترای رنگ‌زا نشان دادند و در مقایسه با شاهد سالم با دقت بالا آلوده تشخیص داده شدند (شکل ۲). در ردیابی

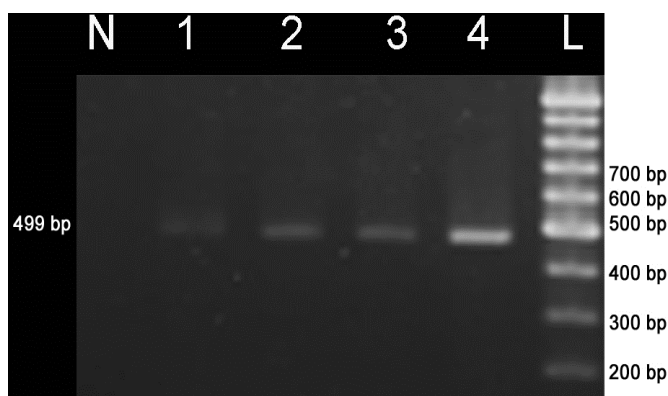
نتایج نشان داد ToRSV در سال ۸۷ با ۱۶/۳٪ آلودگی در درختان میوه هسته دار دارای علائم و بدون علائم نسبت به سال ۸۸ با ۱۴/۸٪ آلودگی از پراکندگی نسبتاً بیشتری برخوردار بوده است (جدول ۳). در این پژوهش تعداد ۱۰۰ نمونه از ۴۱۴ نمونه مربوط به درختانی که آلودگی شان به ویروس با آزمون DAS-

(شکل ۳) که در نمونه های کنترل منفی (نمونه برگ عاری از ویروس هلو) تکثیر نشد.

مولکولی ToRSV با استفاده از آزمون RT-PCR، در تعداد ۲۰ جدایه قطعه ای به طول تقریبی ۴۹۹bp از ژن پروتئین پوششی ویروس تکثیر گردید



شکل ۲- نتایج حاصل از آزمون DIBA برای ردیابی ToRSV از درختان میوه هسته دار موجود در مناطق مختلف. حلقه های بنفش رنگ بیانگر واکنش مثبت (نمونه آلوده) و بیرنگ بیانگر واکنش منفی (نمونه غیر آلوده) می باشد. (A 1, 2, 4, 5, 6): نمونه های آلو و گوجه آلوده جدا شده از شهرهای چهارم، شیراز، کلاله و مینودشت، B 1, 3, 4: نمونه های زردآلوی آلوده چهارم، شیراز و مینودشت، B 5, 6: نمونه های هلو آلوده فارس و کلاله، A 3: بافر، B 2: عصاره برگ هلو سالم).



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آموده آر. ان. ا. کل استخراج شده از نمونه های هلو (راهک ۱)، گوجه (راهک ۲)، زردآلو (راهک ۳) و آلو (راهک ۴) و جفت آغازگر U1/D1 برای ردیابی ToRSV. قطعه ۴۹۹ جفت بازی تکثیر شده از ژن پروتئین پوششی ویروس پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده می شود. L: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp شرکت فرمنتاس، N: نمونه کنترل منفی (گیاه عاری از ویروس).

گرفتند. از این طریق پیکره های کروی ToRSV با قطری حدود ۳۰ تا ۳۲ نانومتر مشابه ابعاد ذکر شده توسط محققان پیشین (Stace-Smith, 1996; Samuitiene et al., 2003) در عصاره های نمونه های آلوده مربوط به درختان هلو و زردآلو شهرهای چهارم و

بررسی دامنه میزبانی آزمایشگاهی و مشاهدات ایمینو الکترون میکروسکوپی با استفاده از آزمون میکروسکوپ الکترونی و تکنیک (ISEM) پیکره های ایزومتریک ویروس در عصاره برگ مربوط به نمونه های آلوده مشاهده و مورد عکاسی قرار

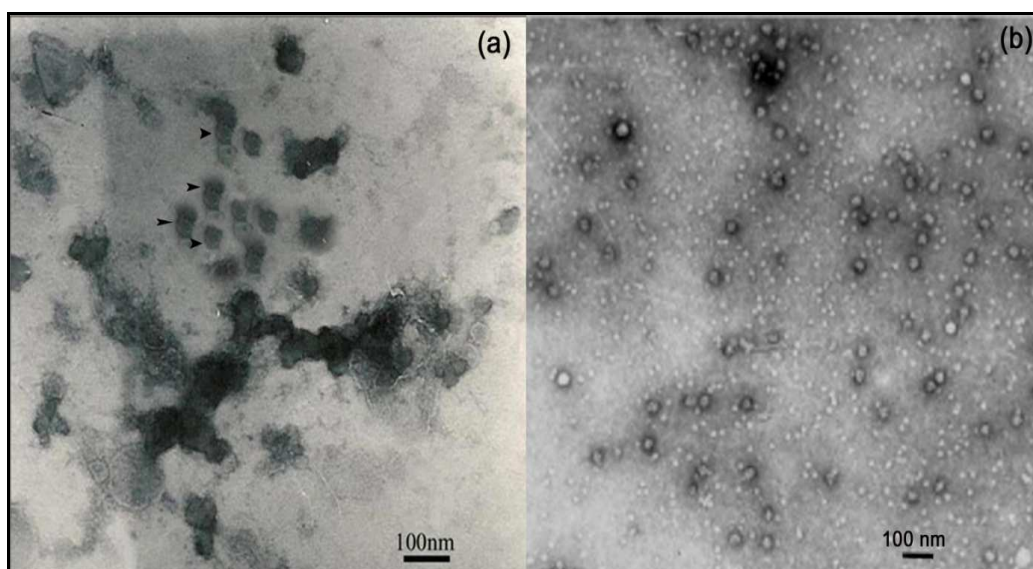
گیاه سلمه تره *C. amaranticolor* پس از مایه زنی با جدایه هلو مینودشت با لکه های کلروزه سیستمیک پاسخ داد (شکل ۵- g و h) در حالی که این گیاه در پاسخ به مایه زنی با عصاره سایر جدایه های هلو مربوط به مناطق مختلف مورد بررسی بدون علائم باقی ماند. بین جدایه های ویروس مربوط به میزبان های مختلف تفاوتی در دامنه میزبانی و نیز علائم در گیاه های محک مشاهده نشد.

مینودشت مشاهده شد. هیچ تفاوتی بین دو جدایه مذکور از لحاظ مورفولوژیکی وجود نداشت (شکل ۴). گیاهان محک سنجشی تا ۱۰ روز پس از مایه زنی مکانیکی توسط تمام جدایه های مربوط به میزبان ها و مناطق مختلف علائمی یکسان به مانند آنچه که در گذشته برای ToRSV گزارش شده بود را نمایان ساختند (EPPO, 2005) (جدول ۴ و شکل ۵). با این وجود بین جدایه های مربوط به مناطق مختلف در ایجاد علائم در برخی گیاه های محک تفاوت در علائم وجود داشت.

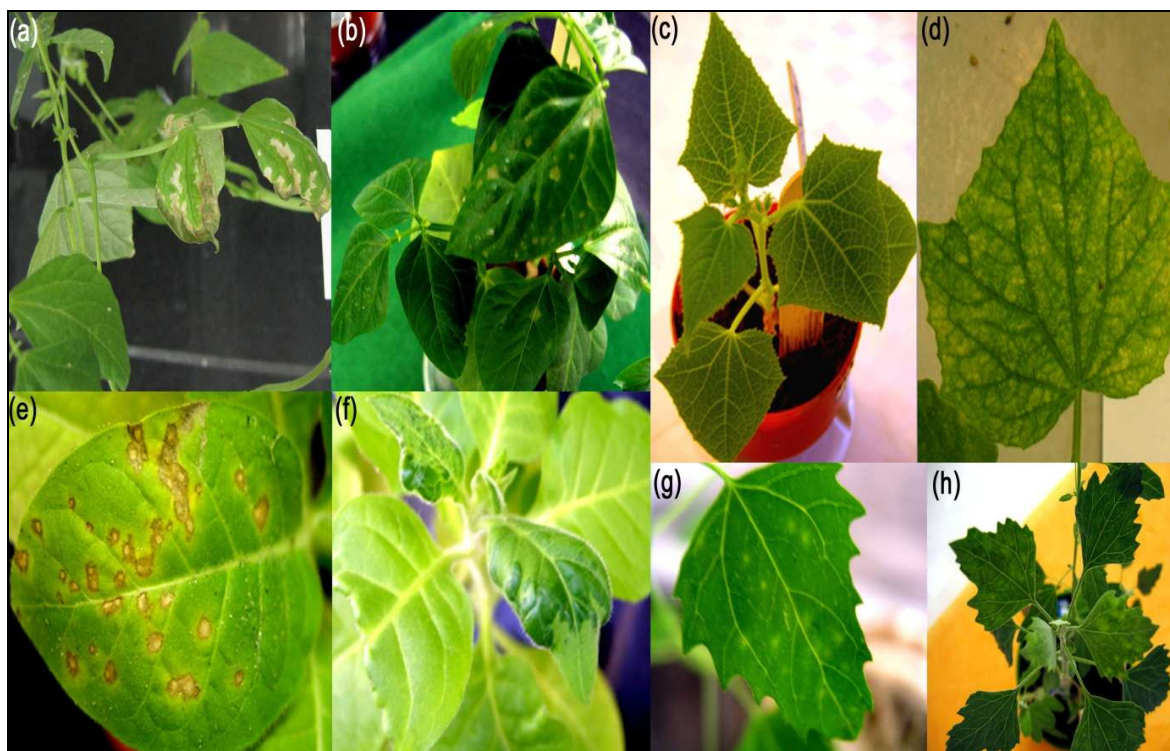
جدول ۴- بررسی دامنه میزبانی ToRSV جدا شده از درختان میوه هسته دار ایران

نام علمی گیاه محک	علائم	نتیجه آزمون EISA
<i>Vigna unguiculata</i>	SCL, Sn, Sc	+
<i>Cucumis sativus</i>	Vc, Mo	+
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	SL, CLL, LD	+
<i>esculentum Lycopersicum</i>	LD, Fl, Smo	+
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun	SNRS, Mo	+
<i>Capsicum annum</i>	CLL	+

SCL: Systemic chlorotic lesion; Sn: Systemic necrosis; Sc: Systemic chlorosis; SNR: Systemic necrotic ringspot; Vc: Vein clearing; SL: Symptomless; Mo: Mosaic; LD: Leaf deformation; Fl: Fleck; Smo: Systemic mottle; CLL: Chlorotic local lesion



شکل ۴- مقایسه پیکره های ایزومتریکی ToRSV با قطر حدود ۳۰-۳۲ نانومتر. (a) پیکره ها پس از تکثیر ویروس در گیاه محک خیار از عصاره برگ جداسازی شده و توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره EM-208 با استفاده از تکنیک ISEM مورد عکاسی قرار گرفته اند. مکان حضور پیکره ها در شکل با پیکان مشخص شده است (Bar. 100nm). (b) پیکره های ToRSV که توسط Samuitiene و همکاران (Samuitiene et al., 2003) بوسیله میکروسکوپ الکترونی با استفاده از تکنیک ISEM عکس برداری شده است (Bar. 100nm).



شکل ۵- علائم آلودگی به ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی در برخی از گیاه های محک مورد بررسی در این تحقیق. (a) نکروز سیستمیک در گیاه لوبیا (*Vigna unguiculata*، (b) زخم های کلروزه سیستمیک در گیاه لوبیا، (c) روشن شدن رگبرگ در خیار (*Cucumis sativus*، (d) موزاییک برگ خیار، (e) لکه های حلقوی نکروزه سیستمیک در برگ توتون رقم سامسون *Nicotiana glauca*، (f) موزاییک برگ توتون رقم سامسون، (g) زخم های موضعی کلروزه در سلمه تره *Chenopodium album*، (h) بدشکلی و زخم های موضعی کلروزه در برگ سلمه تره مایه زنی شده با جدایه هلو شهر مینودشت.

حلقوی گوجه فرنگی آلوده می باشند. با وجود آنکه به تازگی ویروس مذکور از درختان سیب استان خراسان گزارش شده است (Moini, 2010) ولی نتایج این پژوهش اولین گزارش از وقوع ToRSV در درختان میوه هسته دار در برخی مناطق شمالی و جنوبی ایران می باشد. در این بررسی مشخص شد درختان میوه هسته دار موجود در برخی مناطق استان های فارس و گلستان در مجموع به میزان ۱۵/۲٪ به ToRSV آلوده می باشند. این نتیجه با نتایج پژوهش های گذشته مطابقت دارد. نتایج حاصل از تعیین پراکنندگی این ویروس در کشورهای لبنان و شیلی مشخص ساخته است که ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی به ترتیب به میزان ۱۶٪ و ۱۵/۴٪ در درختان میوه هسته دار کشورهای مذکور پراکنده شده است (Herrera & Madariaga, 2002; Al-Nsour et al., 2010). نتایج حاصل از تعیین

بحث

ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی به صورت مستقل و یا همراه با سایر عوامل بیماریزای ویروسی به گستره وسیعی از گونه های *Prunus* شامل انواع هلو، آلو و گیلاس حمله می کند. زوال حاصل از آلودگی به ToRSV در درختان مبتلا همه ساله موجب کاهش کمیت و کیفیت میوه ها شده و خسارات هنگفتی را به تولید محصول در میوه کاری های موجود در سرتاسر جهان وارد می آورد (Gumus et al., 2007). در این تحقیق کوشش به عمل آمد تا با ردیابی این عامل ویروسی از درختان میوه هسته دار برای اولین بار در کشور، پراکنش آن در برخی از باغات میوه ایران مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این پژوهش نشان داد درختان میوه هسته دار هلو، آلو، گوجه و زردآلو در استان های فارس و گلستان با درصدهای مختلف به ویروس لکه

میزبان سلمه تره در مقایسه با سایر جدایه ها مربوط به مناطق دیگر مورد بررسی نشان می دهد (شکل ۵- g و h). تنوع علایم در گیاهان محک مرتبط با آلودگی ToRSV در گذشته توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Li *et al.*, 2011) و این امر می تواند به دلیل حضور نژادهای متفاوت این ویروس در مناطق مختلف می باشد. این احتمال وجود دارد نژادهای متفاوت ویروس در مناطق مختلف جغرافیایی ایران حضور داشته باشند و شرایط متفاوت جغرافیایی در تنوع ژنتیکی این ویروس نقش داشته باشد. با این وجود اثبات این مطلب نیازمند تعیین توالی ژنومی جدایه های مختلف ToRSV موجود در مناطق مختلف می باشد.

در این مطالعه، جهت تأیید نتایج بدست آمده از آزمون های سرولوژیکی از روش مولکولی RT-PCR استفاده شد. در برخی موارد مشاهده شد نمونه هایی که در آزمون الیزا جذب بالا داشتند واکنش های مثبت با آغازگرهای اختصاصی نداشتند و توسط آزمون پی سی آر قابل ردیابی نبودند. این امر می تواند به دلیل جهش ژنتیکی در منطقه ژنتیکی باشد که آغازگر برای آن طراحی شده است. بتازگی مشخص شد که جفت آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش (D1/U1) که مورد تأیید سازمان قرنطینه نباتی اتحادیه اروپا می باشد با وجود دقت بالا از قابلیت ردیابی تمامی نژادهای ToRSV برخوردار نیست (Li *et al.*, 2011).

تکثیر نشدن قطعه ژنتیکی مورد انتظار توسط آزمون پی سی آر در نمونه هایی که دارای جذب سرولوژیکی در آزمون های دیبا و الیزا بودند می تواند به دلیل وجود اکسیدانت های گیاهی باشد که به همراه نمونه در مراحل انجام آزمون پی سی آر وجود دارند و برای انجام آزمون مذکور بازدارنده می باشند و مانع عمل صحیح آنزیم پلیمرز در انجام این آزمون می شوند. از طرفی نپوویروس ها از جمله عوامل ویروسی با پیکره گرد ایزومتریکی می باشند. چنین ویروس هایی در مقایسه با ویروس های میله ای از ساختمان های ثانویه زیادی در سطح ژنوم خود برخوردار هستند (Wetzel *et al.*, 2004). حضور چنین ساختارهای ثانویه ای ممکن است مانع اتصال آغازگرهای اختصاصی به توالی هدف شوند (Abou-Ghanem *et al.*, 2005). از اینرو توصیه می شود

درصدهای آلودگی در دو سال متوالی نشان داد که درختان میوه هسته دار مناطق مورد نمونه برداری در باغات استان های فارس و گلستان در سال ۸۷ با ۱۶/۳٪ آلودگی به صورت جزئی و به میزان ۱/۵٪ بیشتر از سال ۸۸ (با ۱۴/۸٪ آلودگی) به ویروس آلوده شده اند (جداول ۳ و ۴). از آنجایی که نمونه برداری ها از باغات با پایه های بارور چندساله انجام پذیرفته است بنابراین امکان تغییر درصدهای آلودگی به دلیل استقرار درختان جدید و ورود منابع جدید آلودگی در باغات مورد نمونه برداری ناچیز به نظر می رسد. تغییر درصد های آلودگی در باغات مناطق مختلف می تواند به دلیل تاثیر شرایط محیطی بر رفتار ناقلین در دو سال متفاوت بوده باشد. گونه های نماتد متعلق به جنس *Xiphinema* به ویژه *X. americanum* مهمترین ناقلین ویروس در خاک باغات در جهان می باشند (Pinkerton *et al.*, 2008).

نتایج

نتایج تحقیقات گذشته نشان داد گونه های نماتد ناقل متعلق به جنس *Xiphinema* spp بسیار به شرایط محیطی به ویژه رطوبت و دمای خاک حساس می باشند و در شرایط تابستان از کمترین جمعیت در اطراف ریشه درختان برخوردارند و به کمترین میزان ویروس را در باغ انتقال می دهند (Taylor and Brown, 1997; Pinkerton *et al.*, 2008). نتایج این تحقیق نیز نشان داد ToRSV در استان گلستان در سال های ۸۷ و ۸۸ نسبت به استان فارس از درصد پراکنش بیشتری برخوردار بوده است (جداول ۳، ۴) که این امر می تواند به دلیل تاثیر مطلوب شرایط محیطی مناطق شمالی کشور در انتقال موثر ویروس توسط ناقل و یا در فرایند بیماریزایی ویروس در میزبان های موجود در باغات مورد بررسی بوده باشد. گونه های نماتد ناقل ToRSV در گذشته از ایران گزارش شده اند (Fadaei & Kheiri, 2003). با این وجود تا کنون هیچ تحقیقی در زمینه بررسی امکان انتقال ویروس با ناقلین بالقوه آن در ایران انجام پذیرفته است.

در بررسی دامنه میزبانی آزمایشگاهی جدایه ToRSV مربوط به میزبان هلو در شهر مینودشت استان گلستان مشخص شد این جدایه علایم متفاوتی را در

ELISA ویروس را از بافت برگ درختان میوه هسته دار ردیابی نماید. ToRSV از عوامل بیماریزای ویروسی مهم در درختان میوه هسته دار و دانه دار، زینتی و زراعی در آمریکا و آسیا محسوب می گردد و همواره از عوامل مهم و مطرح در فهرست بیماری‌گرهای آرایه شده توسط سازمان قرنطینه نباتی اتحادیه اروپا بوده است (EPPO, 2005). شناخت میزان آلودگی درختان هر منطقه و نیز تعیین میزان پراکنندگی آن در سطح باغات کشور جهت اجرای مدیریت مناسب کنترل بیماری امری لازم و ضروری می باشد. در پایان پیشنهاد می شود تا نژادهای ToRSV در درختان میوه هسته دار ایران تعیین توالی شوند و داده های ژنتیکی مربوط به ژنتیک جمعیت ویروس و پراکنندگی ژنتیکی جدایه های مختلف در ایران در جهت اجرای مدیریتی مناسب برای کنترل ToRSV به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از زحمات آقایان مهندس شهاب حاج منصور سرپرست آزمایشگاه های تخصصی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران به دلیل کمک در انجام آزمون های این پژوهش و مهندس پویا رحمانیان، کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی واحد علوم و تحقیقات به دلیل کمک در جمع آوری نمونه صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایند.

تا برای انجام بهتر آزمون پی سی آر از واکنش های شروع داغ (Hot Start) استفاده شود تا دماهای بالا اجازه باز شدن ساختارهای ثانویه در سطح ژنوم را بدهد. استفاده از واکنشگرهایی مانند دی متیلن سولفوکساید (DMSO) و یا دی تیو تریتول (DTT) می توانند به باز شدن ساختارهای ثانویه مذکور کمک نموده و با اتصال مناسب آغازگر به هدف عمل ردیابی آسان تر خواهد شد (Li *et al.*, 2011). از آنجایی که نژادهای مختلف ToRSV با سایر Nepovirus ها ارتباط سرولوژیکی نزدیکی ندارند، لذا استفاده از روش های ردیابی سرولوژیک می تواند به راحتی ویروس را در نمونه های آلوده تشخیص دهد (EPPO, 2005). با این وجود برخی از نژادهای ToRSV قابل ردیابی با روش های سرولوژیک نبوده و از اینرو نیاز هست تا برای ردیابی آنها از روش های مولکولی دقیق مانند Real-time PCR استفاده شود (Rowhani *et al.*, 1998). در این پژوهش نمونه هایی که آلودگی شان به ToRSV با آزمون DAS-ELISA واضح نبود و مشکوک به آلودگی بودند توسط آزمون دیبا با دقت بیشتری مورد ردیابی قرار گرفتند. نتایج بررسی های گذشته نشان داده بود که دقت روش آزمون DIBA برای ردیابی ToRSV از گیاهان محک که در گلخانه برای بررسی دامنه میزبانی و ارزیابی خصوصیات بیولوژیکی ویروس به کار می روند بسیار بیشتر است (Powel, 1987). نتایج این پژوهش نیز نشان میدهد که روش DIBA می تواند با دقت بیشتری نسبت به DAS-

REFERENCES

1. Al-Nsour, A., Mansour, A., Al-Banna, L., & Salem, N. (2010). Detection of tomato ringspot virus on stone fruit trees in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 6, 240- 247.
2. Abou-Ghanem, N., Sabanadzovic, H., & Sabanadzovic, S. (2005). Complete nucleotide sequence of the RNA-2 of grapevine deformation and grapevine anatolian ringspot viruses. *Virus Genes*, 30, 335-340.
3. Anonymous. (2010). Results of the acturaries of the horticultural crops for the year 2009. The office of chief information officer of Ministry of Agriculture.1: 95pp. Tehran. Iran. (In Farsi).
4. Banttari, E. E, & Goodwin, P. H. (1985). Detection of *Potato virus X* and *Y* by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-Elisa). *Plant Disease*, 69, 202-205.
5. Channuntapipat, C., Sedgley, M., & Collins, G. (2001). Sequences of the cDNA_s and genomic DNA_s encoding the S1 , S7 , S8 and Sf alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Theoretical Apply of Genetic*, 103, 1115-1122.
6. Clark, M. F., & Adams, A. N. (1977). Characterization of the microplate methods of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
7. EPPO. (1991). EPPO Standards: *Tomato ringspot nepovirus* in fruit tree and grapevine-inspection and

- test methods. *EPPO Bulletin*, 21, 245–250.
8. EPPO. (2005). Tomato ringspot nepovirus. *EPPO Bulletin*, 35, 313–318.
 9. Fadaei, A. A., & Kheiri, A. (2003). Three species of the *Xiphinema americanum* lineage (Nematoda : Longidoridae) from Iran. *Nematology*, 5, 453-461.
 10. Ghotbi, T., & Shahraeen, N. (2009). Natural incidence and infectivity level of three nepoviruses in ornamental crops in Iran. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1, 39–44
 11. Golnaraghi, A.R., Shahraeen, N., Pourrahim, R., Farzadfar, S. H., & Ghasemi, A. (2004). Occurrence and relative incidence of viruses infecting soybeans in Iran. *Plant Disease*, 88, 1069-1074.
 12. Gumus, M., Paylan, I.C., Matic, S., Myrta, A., Sipahioglu, H. M., & Erkan, S. (2007). Occurrence and distribution of stone fruit viruses and viroids in commercial plantings of *Prunus* species in western Anatolia, Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 89, 265-268.
 13. Herrera, G. M., & Madariaga, M. V. (2002). Incidence of Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV), Prune Dwarf Virus (PDV), Tomato Ringspot Virus (ToRSV) and Plum Pox Virus (PPV) in stone fruit nurseries in the Central Zone of Chile. *Agricultura Technica*, 62, 38-45.
 14. Li, R., Mock, R., Fuchs, M., Halbrecht, J., Howell, B., & Liue, Z. (2011). Characterization of the partial RNA1 and RNA2 3' untranslated region of tomato ringspot virus isolates from North America. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33, 94–99.
 15. Massumi, H., Shaabani, M., Hosseini Pour, A., Heydarnejad, J., & Rahimian, H. (2009). Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant Disease*, 93, 67-72.
 16. Milne, R. G. (1993). Electron microscopy of *in vitro* preparations. In: Matthews R.E.F. (ed.). *Diagnosis of plant virus diseases*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. PP. 215-251.
 17. Moini, A. A. (2010). Identification of Tomato ringspot virus (ToRSV) on apple in Iran. *Australian Plant Disease Note*, 5, 105–106.
 18. Pinkerton, J. N., Kraus, J., Martin, R. R., & Schreiner, R. P. (2008). Epidemiology of *Xiphinema americanum* and Tomato ringspot virus on red raspberry, *Rubus idaeus*. *Plant Disease*, 92, 364-371.
 19. Powell, C. A. (1987). Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay. *Phytopathology*, 77, 306-309.
 20. Rakhshandehroo, F., Pourrahim, R., Zamanizadeh, H., Rezaee, S., & Mohammadi, M. (2005). Incidence and Distribution of viruses Infecting Iranian vineyards. *Journal of Phytopathology*, 153, 480- 484.
 21. Rott, M. E., Tremaine, J. H., & Rochon, D. M. (1991). Comparison of the 5'- and 3'termini of tomato ringspot virus RNA 1 and RNA 2. *Virology*, 185, 468–472.
 22. Rowhani, A., Biardi, L., Routh, G., Daubert, S. D., & Golino, D. A. (1998). Development of a sensitive colorimetric-PCR assay for detection of viruses in woody plants. *Plant Disease*, 82, 880-884.
 23. Samuitiene, M., Zitikaite, I., Navalinskiene, M., & Valiunas, D. (2003). Identification of Tomato ringspot nepovirus by RT-PCR. *Biologija*, 4, 35-38.
 24. Sanfacon, H., Wellink, S., Le GALL, O., Karasev, A., Van-Der Vlugt, R. A. A., & Wetzel, T. (2009). Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*. *Archive of Virology*, 154, 899–907.
 25. Stace-Smith, R. (1984). *Tomato ringspot virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 290, No.18.
 26. Stace-Smith, R. (1996). Tomato ringspot nepovirus. In: *Viruses of Plants* (Eds Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L & Zurcher EJ), CAB International, Wallingford (GB). PP. 1309–1312.
 27. Taylor, C. E., & Brown, D. J. (1997). *Nematode vectors of plant viruses*. CAB International, Wallingford (GB). 296pp.
 28. Wetzel, T., Beck, A., Wegener, U., & Krczal, G. (2004). Complete nucleotide sequence of the RNA 1 of a grapevine isolate of *Arabis mosaic virus*. *Archive of Virology*, 149, 989–995.