نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ص. ۱۵۸-۱۴۹

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 2, Summer 2013, P. 149-158

بررسی ویروس لکه زرد زنبق (IYSV) در پیاز و برخی از گیاهان زینتی بررسی ویروس لکه زرد زنبق (IYSV) در پیاز و برخی از گیاهان زینتی با استفاده از روش الایزا و RT-PCR در استان خراسان رضوی

ندا رفیع زاده[۱*]- بهروز جعفرپور[۲]- ماهرخ فلاحتی رستگار[۳]

تاریخ دریافت:۱۳۸۸/۱۱/۲۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۳/۹

چکیده

به منظور بررسی ویروس لکه زرد زنبق *Iris yellow spot viruse* در تابستان سال ۱۳۸۷ از مزارع پیازکاری و گلخانه‌های تولید گیاهان زینتی در استان خراسان رضوی نمونه‌برداری صورت گرفت. تعداد ۴۳۵ نمونه از مزارع پیاز و تعداد ۱۴۲ نمونه از گیاهان زینتی (رز، گلایول، زنبق، شمعدانی، داوودی بگونیا، اطلسی، و میخک) جمع‌آوری شد. گیاهانی که دارای علایم کلروز، نکروز و لکه‌های برگی بودند در شرایط خنک به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس به وسیله آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA مورد بررسی قرار گرفت و عصاره گیاهانی که مثبت ارزیابی شدند به ۴ گونه محک کاشته شده در گلخانه *Nicotiana rustica*, (بدشکلی برگ کلروز سیستمیک و نکروز) *N. benthamiana N clevelandii* ,*N.tabacum var. Samson* (کلروز سیستمیک و نکروز) مایه زنی گردید. سپس گیاهان مایه زنی شده به وسیله آزمون DAS-ELISA آزمایش شدند، عصاره گیاهان محک مثبت به ۴ رقم پیاز شامل زرد نیشابور، سفید نیشابور، قرمز درگز و قرمز درچه اصفهان مایه زنی گردید که علایمی شبیه به علایمی که در پیازهای آلوده در مزرعه مشاهده شده بود، در این گیاهان پدیدار شد. جهت بررسی مولکولی ویروس، استخراج RNA از گیاهان محک و پیازهای آلوده، از دو روش PEG$_{6000}$ و استفاده از کیت RNX™(plus) انجام شد و با استفاده از آغازگر اختصاصی مبنی بر ژن کد کننده پروتئین پوششی در واکنش RT-PCR قطعه‌ای در محدوده ۱۸۱ و ۱۳۹جفت باز تکثیر گردید. نتایج آزمون DAS-ELISA نشان داد که تمام مزارع پیاز به نسبت‌های مختلفی به این ویروس آلوده بوده و بیماری از شیوع بالایی برخوردار است. IYSV در ۱۰۷ نمونه پیاز ، ۷ نمونه گل داوودی و یک نمونه گل زنبق شناسایی شد. این اولین گزارش از وجود این ویروس در مزارع پیاز و گل داوودی در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس لکه زرد زنبق، DAS-ELISA ، RT-PCR

مقدمه

ویروس *Iris yellow spot virus* اولین بار در سال ۱۹۸۱در ساقه گل‌آذین‌های پیازهای جنوب برزیل ظاهر شد و دریافتند که این یک بیماری ویروسی است. این بیماری در برزیل تا سال ۱۹۹۴ گزارش نشد اما در آن سال در شمال شرق برزیل دوباره گزارش گردید. بیماری با علائم کلروتیک و نکروتیک بیضی شکل یا زخم‌های لوزی شکل روی ساقه مشخص می‌شود (۷ و ۱۳). کورتز و همکاران در هلند ویروسIYSV را بر روی *Iris holandica* در مزرعه و روی تره فرنگی در گلخانه گزارش کردند (۴ و ۵)، در همان زمان جرا و همکاران این ویروس را روی پیاز در اسرائیل گزارش دادند (۸). کریتزمن و همکاران (۱۰) این ویروس را بر روی (*Eustoma grandiflorum*) Lisianthus در اسرائیل گزارش نمود. تا به امروز IYSV بر روی گیاه پیاز در سال ۱۹۹۹ در هند، ۲۰۰۰ اسلوونی، ۲۰۰۲ کلرادو (آمریکا) ، ۲۰۰۳ استرالیا و ایتالیا، ۲۰۰۴ ژاپن، جورجیا، واشنگتن و نیومکزیکو (آمریکا)، ۲۰۰۵ شیلی، پرو، اسپانیا، تونس، و مرکز ارگون (آمریکا)، و در سال ۲۰۰۶ در ایرلند، گواتمالا، تگزاس و نیویورک (آمریکا) گزارش شده است (۷). مامفورد و همکاران (۱۴) این ویروس را بر روی*E.grandiflorum* گزارش گردند.

IYSV یکی از اعضای جنس *Tospovirus* خانواده *Bunyaviridae* می‌باشد. ویروس‌های این جنس دارای سه

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادان گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(* - نویسنده مسئول: Email: nedarafizadeh@gmail.com)

قطعه‌ی ویروسی ssRNA, ذرات ایزومتریک (گرد) با قطر nm ۱۲۰– ۸۰ که به وسیله یک غشای لیپیدی که شامل برجستگی‌های (زواید) گلیکوپروتئینی (که G1 و G2 نامیده می‌شوند) پوشیده شده است. قطعات RNA ژنومی اندازه‌های مختلفی دارد از این جهت RNA کوچک (S), RNA متوسط(M) و RNA بزرگ(L) نامیده می‌شوند (۱۸). ناقل این ویروس تریپس پیاز *Thrips tabaci* از راسته *Thysanoptera* خانواده *Thripidae* یکی از آفات کلیدی در بیشتر مناطق تولید پیاز در جهان می‌باشد (۱). انتقال ویروس از نوع پایای تکثیری است، وقتی تریپس یکبار ویروس را بدست می‌آورد می‌تواند آن را برای بقیه زندگی انتقال دهد (۵).

IYSV باعث ایجاد زخم هایی به شکل لوزی با یک مرکز سبز و با دو هاله زرد روی ساقه می‌شود، همچنین ساقه باریک می‌شود و یا زخم‌های دوکی شکل روی ساقه به تعداد زیاد در بخش وسط و پایین ساقه ایجاد و در نهایت باعث خشک شدن آن می‌شود. این ویروس همچنین باعث کاهش اندازه ی پیاز به ویژه در واریته‌های قرمز و سفید می‌شود، IYSV ساقه را ضعیف می‌کند و باعث می‌شود بذرهای سر ساقه بریزد و ساقه واژگون شود (۱۳). گزارش خسارت اقتصادی ایجاد شده توسط IYSV روی پیاز شامل بیشترین خسارت در اسرائیل و برزیل و پایین‌ترین خسارت در هلند است (۱۹). بیماری‌شبیه به لکه برگی کلادوسپوریومی (Cladosporium leaf spot) می‌باشد (۶). مهم‌ترین گیاهان محک این ویروس شامل *Nicotiana benthamiana* و *N.rustica* با علائم سیستمیک هستند (۲). این ویروس بذرزاد نیست و با بذر انتقال نمی‌یابد (۷ و ۱۱). قطبی و همکاران (۹) در ایران این ویروس را روی*Plargonium hortorum*، *Rosa* sp.، *Cycas* sp.و *Scindapsus* sp. گزارش دادند.

مواد و روش ها

نمونه‌برداری از بین بوته‌هایی که دارای علائم مشکوک بودند، از نیمه تیر ماه تا پایان مهر ماه سال ۱۳۸۷ از مزارع پیاز استان خراسان رضوی شامل شهرستان‌های مشهد، نیشابور، قوچان، تربت حیدریه و گلخانه‌های مشهد انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد و بلافاصله مورد آزمون قرار گرفت.

آزمون DAS-ELISA

بعد از انتقال به آزمایشگاه برای بررسی مثبت بودن وجود ویروس در نمونه‌ها از هر نمونه مقداری از ساقه آلوده حدود ۵ سانتی متر را انتخاب و آزمون سرولوژیکی-Double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) با استفاده از آنتی سرم تهیه شده از شرکت DSMZ با توجه به روش کلارک و آدامز (۳) انجام شد. پس از ۳۰ دقیقه تا ۱ ساعت می‌توان نتیجه آزمون را با استفاده از دستگاه الایزا خوان[1] به وسیله اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر ارزیابی کرد تغییر رنگ حفرات به رنگ زرد نشانهٔ آلوده بودن نمونه گیاهی داخل حفره مورد نظر می‌باشد.

تلقیح مکانیکی

گونه‌های *Nicotiana benthamiana*و *N.rustica* و*Nicotiana tabacum var samson* و *Nicotiana clevelandii* در گلخانه کاشته شد. گیاهان آلودهٔ جمع‌آوری شده از مزرعه که در ازت مایع منجمد شده و در فریزر ۲۷– درجه سانتی گراد نگهداری شده بودند همراه با بافر فسفات پتاسیم روی یخ عصاره‌گیری شدند سپس عصاره آلوده با انگشت روی برگ‌های گیاهان در مرحله ۴ تا ۶ برگی که قبلاً به آن‌ها پودر کاربراندوم پاشیده شده بود، مایه زنی شدند. بافر فسفات پتاسیم(M ۰/۰۱ با ۷ PH همراه با ۰/۲٪ سدیم سولفیت و۲– مرکاپتواتانولِ M ۰/۰۱) مطابق با روش ماندال و همکاران (۱۲) تهیه گردید. همچنین برای مشاهده انتقال ویروس به پیاز بذر چهار نوع پیاز به نام‌های زرد نیشابور، قرمز درچه اصفهان، قرمز درگز و سفید نیشابور در شرایط گلخانه کاشته شدند. سپس در مرحله ۳ تا ۴ برگی، گیاهان توسط عصاره استخراج شده از گیاهان گیاهانی آلوده‌ی مایه زنی گردید. گیاهان محک و پیاز در شرایط گلخانه‌ای زیر پلاستیک برای جلوگیری از ورود حشرات نگهداری گردیدند و پس از دو هفته برای مشاهده علایم بیماری مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA

به منظور مقایسه‌ی دو روش استخراج و همچنین دقت بیشتر از دو روش استخراج RNA شامل: ۱) روش رسوب با PEG6000 این روش بر اساس روش اشمیتز انجام شد (۱۷) و ۲) استخراج با استفاده از محلول RNX™ (plus) تهیه شده از شرکت سیناژن مطابق دستور العمل شرکت سازنده استفاده گردید.

در روش اول یک عدد میکروتیوب سایز ۱/۵ برداشته ابتدا آن را وزن کرده و آنقدر در آن از بافت گیاهی پودر شده می‌ریزیم به طوری که وزن میکروتیوب همراه با بافت گیاه ۱/۱۴ گرم شود و سپس سایر مراحل مطابق با روش اشمیتز انجام شد (۱۷).

در روش دوم مقدار ۰/۱ تا ۰/۰۵ گرم از بافت گیاهی را در هاون سرد کوبیدیم تا به خوبی پودر شود و سپس سایر مراحل مطابق با دستور العمل شرکت سازنده محلول RNX™ (plus) انجام شد.

1- ELISA Reader

جدول۱ - ترادف آغازگرهای اختصاصی مربوط به ویروس

آغازگر	جهت	ترادف آغازگر(´۳-´۵)	موقعیت	اندازه قطعه(bp)
IYSV-F1	رفت	GAGATGTGGATGTGGTGATTG	پروتئین پوششی	۱۳۹
IYSV-R1	برگشت	GTCTTGTAAATGCCTGCTCTGT		
IYSV-F2	رفت	TAGGGTGAAACCGTCAGAAA	پروتئین پوششی	۱۸۱
IYSV-R2	برگشت	TGTCTTGTAAATGCCTGCTC		

الکتروفورز RNA استخراجی با استفاده از ژل آگاروز۱٪

به منظور ارزیابی کیفیت RNA، ۵µl از RNA استخراج شده به همراه ۱ µl بافر رنگ بر روی ژل آگاروز ۱٪ در ولتاژ ثابت ۸۵ ولت به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید. پس از اطمینان از غلظت مناسب RNA، میزان لازم برای انجام واکنش RT-PCR تعیین گردید.

آغازگرها

ازجفت آغازگر که منطق بر S-RNAیِ ویروس و منطقه‌ی رمز کننده پروتئین پوششی ویروس است استفاده شد (۲۰). آغازگرهای مورد نیاز، جهت سنتز به شرکت Bioneer سفارش داده شدند (جدول۱).

سنتز رشته مکمل (cDNA)

با استفاده از آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Reverse transcriptase)، RNA استخراجی را به cDNA تبدیل شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت‌های Accupower TMRT Premix شرکت Bioneer صورت گرفت. ۳ میکرولیتر از RNAیِ مورد نظر و ۱ میکرولیتر از پرایمر برگشت (Reverse) در یک میکروتیوب استریل ریخته شد. جهت مخلوط شدن مواد، میکروتیوب‌ها در دستگاه اسپین[1] قرار داده شدند. میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ $^{\circ}C$ اینکوبه شدند. مواد داخل میکروتیوب‌ها به میکروتیوب‌های مخصوص کیت Accupower RT Premix^{TM} منتقل شدند سپس به میزان ۱۶ µl از آب مقطر تزریقاتی داخل میکروتیوب‌ها اضافه شد تا حجم نهایی داخل میکروتیوب‌ها به ۲۰ µl برسد. میکروتیوب‌ها اسپین مختصری شدند. میکروتیوب‌ها در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شده و برنامه دستگاه به صورت زیر تنظیم شد.

۴۲ درجه سانتی‌گراد یک ساعت سنتز cDNA

۹۴ درجه سانتی‌گراد یک ساعت غیر فعال ساختن RNaseها

میکروتیوب‌ها را از دستگاه بیرون آورده و داخل فریزر نگهداری شدند.

1. Spine

تکثیر قطعه cDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)

برای تکثیر قطعه cDNA با توجه به اینکه نمونه‌های آزمون شده در آزمون PCR با استفاده از آغازگر bp۱۸۱ با استفاده از روش PCR دستی نتیجه مورد نظر حاصل نشد، از روش استفاده از کیت Accupower TMRT Premix شرکت Bioneer برای آن‌ها استفاده شد. همچنین در مورد آغازگر ۱۳۹ از روش PCR دستی استفاده شد. در روش کیت Accupower TMRT Premix هر کیت حاوی Tracking dye بوده و لذا نیازی به استفاده از بافر رنگLoadin buffer نمی‌باشد. در ضمن غلظت‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲ - محتویات کیتAccupower ^{TM}RT Premix

محتویات	واکنش۲۰ میکرولیتر	واکنش ۵۰ میکرولیتر
Taq DNA Polymerase	یک واحد	۲/۵ واحد
Tris- HCL(pH=9)	۱۰میلی مولار	۱۰ میلی مولار
KCL	۴۰میلی مولار	۴۰میلی مولار
$MgCL_2$	۱/۵ میلی مولار	۱/۵میلی مولار

از cDNA مورد نظر داخل میکروتیوب‌های PCR ریخته شد سپس ۱µl از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت از هر دو نوع آغازگر برای شناسایی ویروس به میکروتیوب‌ها اضافه گردید. ۱۳ µl آب مقطر تزریقاتی به میکروتیوب‌ها اضافه گردید تا حجم نهایی مواد به ۲۰ برسد. میکروتیوب‌ها اسپین مختصری شدند سپس میکروتیوب‌ها در داخل دستگاه ترموسایکلر، که قبلاً برنامه مورد نظر به آن داده شده بود قرار داده شدند. پس از پایان کار دستگاه میکروتیوب‌ها به داخل فریزر با دمای ۲۰- $^{\circ}C$ انتقال یافتند.

در روش دستی PCR ابتدا برای هر نمونه cDNA مواد شامل: ۱µl dntp، ۰/۳µl MgCL2، ۰/۵ µl *Taq* DNA Polymerase، ۲/۵ µl 10x Buffer، ۱ µl Forward Primer، ۱ µl Reverse Primer، ۱ µl cDNA، ۵ µl آب مقطر تزریقاتی ۱۳/۷µl را در یک میکروتیوب مخلوط کرده توجه شود که ماده Taq باید در آخر

اضافه شود میزان مساوی از آن را به میکروتیوب‌های جدید انتقال داده و میزان ۵ µl cDNA به هر کدام اضافه کرده و آن‌ها را نامگذاری نموده و حجم آن را برای هر نمونه به ۲۵ µl رسانده، خوب با سمپلر مخلوط می‌کنیم سپس آن را در دستگاه ترموسایکلر با برنامه تعیین شده قرار می‌دهیم.

در روش دستی ابتدا برای هر نمونه cDNA مواد شامل: *Taq* Polymerase ۰/۵ µl 10x Buffer، ۲/۵ µl MgCL2، ۰/۳ µl Dntp، ۱ µl Forward Primer، ۱ µl Reverse Primer، ۱ µl cDNA، ۵ µl و آب مقطر تزریقاتی ۱۳/۷ µl را در یک میکروتیوب مخلوط کرده توجه شود که ماده *Taq* باید در آخر اضافه شود میزان مساوی از آن را به میکروتیوب‌های جدید انتقال داده و میزان ۵ µl cDNA به هر کدام اضافه کرده و آن‌ها را نامگذاری نموده و حجم آن را برای هر نمونه به ۲۵ µl رسانده و خوب با سمپلر مخلوط می‌کنیم سپس آن را در دستگاه ترموسایکلر با برنامه PCR ۹۴،۳°C دقیقه، ۹۴°C ، ۳۰ ثانیه، ۶۱°C ، ۳۰ ثانیه، ۷۲°C ، ۲۰ ثانیه از مرحله دوم ۳۶ سیکل، ۷۲°C، ۳ دقیقه و ۴°C ۱۰، دقیقه تعیین شده قرار می‌دهیم. جهت مشاهده کیفیت محصولات PCR از الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۷٪ استفاده شد که قبلاً شرح داده شده است. به دلیل اینکه علاوه بر قطعه تکثیر شده در محدوده مورد نظر (۱۳۹ bp)، محصولات ناخواسته‌ی دیگری نیز در واکنش PCR تکثیر می‌شدند، از روش Touchdown-PCR برای تکثیر DNA الگو (cDNA) به منظور حذف این قطعات استفاده شد که مراحل آن در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- واکنش Touch-down PCR

تعداد چرخه ها	مرحله انجام شده	زمان	درجه حرارت(°C)
۱ چرخه	واسرشت سازی آغازین	۲ دقیقه	۹۴
	واسرشت سازی	۳۰ ثانیه	۹۴
۹ چرخه	اتصال	۳۰ ثانیه	۶۲
	بسط	۳۰ ثانیه	۷۲
	واسرشت سازی	۳۰ ثانیه	۹۴
۲۴چرخه	اتصال	۳۰ ثانیه	۶۰
	بسط	۳۰ ثانیه	۷۲
۱ چرخه	بسط نهایی	۳ دقیقه	۷۲

نتایج وبحث

علایم ویروس IYSV

در بازدید از مزارع استان خراسان رضوی و همچنین گیاهان پیاز کاشته شده در گلخانه تحقیقاتی علایم مشخص بیماری مشهود بود. علایم شامل لکه‌های نکروتیک کشیده و لوزی شکل در سطح برگ‌ها و ساقه‌های گل دهنده بود، که در آلودگی‌های شدید باعث افتادگی ساقه‌های گل دهنده می‌شد، همچنین علایم تغذیه‌ی تریپس‌ها به صورت نقره‌ای و سفید شدنِ برگ‌ها، بدشکلی و پیچیدگی برگ‌ها در مزارع دیده می‌شد (شکل‌های۱و۲).

شکل۱- نقاط نکروتیک در سطح برگ آلوده به IYSV همراه با علایم تغذیه تریپس در سطح مزرعه

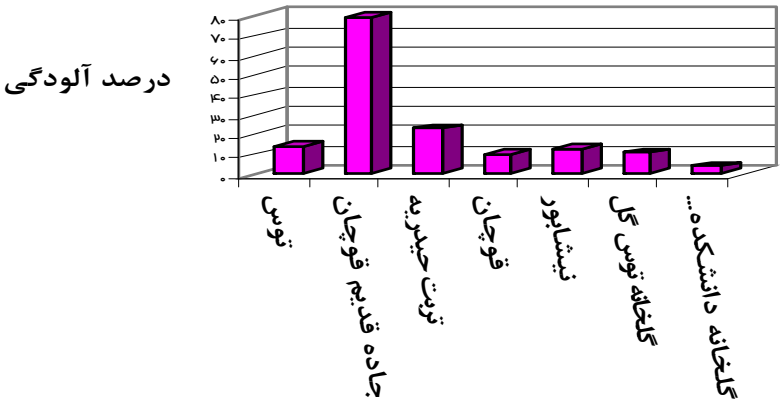
شکل۲ - لکه‌های نکروتیک لوزی و کشیده بر روی برگ‌های آلوده به IYSV در سطح مزرعه

همچنین آلودگی در گیاهان زنبق مانند پیاز به صورت لکه‌های نکروزه کشیده همراه با نکروز سر برگ‌ها مشاهده شد اما علایم تریپس مشاهده نگردید. در گیاه داوودی علایم به صورت نکروز شدید در برگ مشاهده شد به طوری که تقریباً کل سطح برگ تغییر رنگ داده بود.

نتایج آزمون ELISA و شناسایی گیاهان آلوده به ویروس در گیاهان زینتی و پیاز

نتایج آزمون الایزا که با استفاده از الایزا ریدر خوانده شده بود نشان داد که از مجموع ۴۳۵ نمونه از مزارع پیاز (شهرهای مشهد، قوچان، تربت حیدریه و نیشابور) و تعداد ۱۴۲ نمونه از گیاهان زینتی (رز، گلایول، زنبق، شمعدانی، داوودی، بگونیا، اطلسی و میخک) جمع‌آوری شده (جدول۲)، تمام مزارع پیاز به این ویروس به نسبت‌های مختلفی آلوده بوده و بیماری از شیوع ۲۴/۵۹ درصدی در بین گیاهان پیاز برخوردار است. IYSV در ۱۰۷ نمونه پیاز، ۷ نمونه گل داوودی و یک نمونه گل زنبق شناسایی شد. این اولین گزارش از وجود این ویروس در مزارع پیاز و گل داوودی در ایران می‌باشد (جدول۴ و۵) و (نمودار۱).

نتایج آزمون الایزا



نمودار۱- درصد آلودگی به وسیله ویروسIYSV در مناطق نمونه برداری شده در استان خراسان رضوی

جدول٤- درصد نمونه‌های آلوده به ویروسIYSV در مزارع و گلخانه‌های استان خراسان

محل جمع آوری	تعداد نمونه	تعداد نمونه مثبت الایزا	درصد آلودگی
توس	۵۷	۸	٪۱۴/۰۳
تربت حیدریه	۵۷	۱۳	٪۲۲/۸۰
جاده قدیم قوچان	۱۱۱	۸۸	٪۷۹/۲۷
قوچان	۱۰۴	۱۰	٪۹/۶۱
نیشابور	۱۰۶	۱۴	٪۱۳/۲۰
گلخانه در منطقه چناران	۵۷	۶	٪۱۰/۵۲
گلخانه دانشکده کشاورزی مشهد	۸۵	۲	٪۳/۵۰
جمع	۵۷۷	۱۴۱	٪۲۴/۴۳
نمونه پیاز	۴۳۵	۱۰۷	٪۲۴/۵۹
نمونه گلهای زینتی	۱۴۲	۸	٪۵/۶۳

**- گلخانه دانشکده کشاورزی مشهد

جدول ۵- گیاهان زینتی آزمایش شده توسط الایزا و درصد آلودگی به IYSV

گونه‌های گیاهی	تعداد کل	گلخانه ۱*	گلخانه۲**	درصد آلودگی
رز	۴۰	-	-	۰
گلایول	۱۳	-	-	۰
زنبق	۸	-	۱	۱۲/۵٪
شمعدانی	۱۶	-	-	۰
داوودی	۷	۶	۱	۱۰۰٪
بگونیا	۱۸	-	-	۰
میخک	۱۸	-	-	۰
اطلسی	۲۲	-	-	۰

*- گلخانه در منطقه چناران

شکل۳ – علایم ویروسIYSV بر روی گیاهان محک مایه زنی شده با ویروس از راست به چپ *Nicotiana benthamiana*، *Nicotiana* *N.rustica* و *Nicotiana tabacum* var. *samson* ،*clevelandii*

جدول ٦- میزان آلودگی گونه‌های گیاهی تلقیح شده بوسیله ویروس IYSV به عنوان گیاه محک در شرایط گلخانه

گونه گیاه محک	تعداد کلِ گیاه	تعداد گیاه آلوده	درصد آلودگی
Nicotiana tabacum var Samson	۱۵	۷	٪۴۶/۶
N.rustica	۱۰	۴	٪۴۰
Nicotiana benthamiana	۱۳	۶	۴۶/۱
Nicotiana clevelandii	۱۶	۱۰	٪۶۲/۵

به دلیل مقاومت گونه‌ی گیاه محک و خطای آزمایش و همچنین نژادهای مختلف ویروس ۵۰٪ گیاهان محک بیمار نشدند.

برای نمونه‌های پیاز به منظور بررسی وجود ویروس در غده و بذر پس از آزمون الایزا از گیاهان نمونه‌برداری شده تعدادی از گیاهان که نتایج مثبتی از وجود ویروس را نشان می‌دادند غده و بذر آن‌ها عصاره‌گیری شدند نتایج آزمون DAS-ELISA نشان داد که از تعداد ۳۰ غده ۱۱ غده آلوده بود درصد آلودگی غده۳۶/۶٪ بود و از تعداد ۵۰ بوته که بذر آن‌ها به تعداد زیاد عصاره‌گیری و آزمایش شد هیچ بوته‌ای دارای بذر آلوده نبود بنابراین نتایج نشان می‌داد که ویروس در بذر وجود نداشته است.

نتایج مایه‌زنی مکانیکی

علایم در گیاهان محک مایه‌زنی شده با برگ‌های آلوده به ویروس IYSV به صورت *Nicotiana tabacum var. Samson* دارای علایم کلروز همراه با نکروز سیستمیک، *N.rustica* دارای علایم تغییر شکل برگ‌ها، علایم سیستمیک کلروز و نکروزه، *Nicotiana benthamiana* دارای علایم کلروز همراه با نکروزه سیستمیک و *Nicotiana clevelandii* دارای علایم کلروز همراه با نکروزه سیستمیک ظاهر شد.

سه هفته پس از تلقیح ویروس به ۴ گونه گیاهان محک کاشته شده در گلخانه علایم بیماری مشاهده گردید و برای اطمینان از آلودگی گیاهان تلقیح شده آزمون الایزا روی گیاهان تلقیح شده به عمل آمد، میزان آلودگی در گیاهان محک کاشته شده در گلخانه در جدول زیر مشخص شده است (جدول۶). بیشترین میزان آلودگی در گیاه محک *Nicotiana clevelandii* دیده شد بنابراین این گونه‌ی گیاهی، گیاه محکِ مناسبی برای تکثیر و شناسایی ویروس IYSV برای انجام کارهای تحقیقاتی می‌باشد.

بررسی اثر IYSV روی چهار رقم پیازِ در شرایط گلخانه

برخی از گیاهان متعلق به چهار رقم پیاز شامل زرد نیشابور، قرمز درچه اصفهان، قرمز درگز و سفید نیشابور که دو هفته پس از تلقیح برای مشاهده علایم ویروس مورد بررسی قرار گرفتند. علایم تغییر شکل برگ و پیچیدگی، سفید شدگی، لکه‌های نکروز در طول برگ‌ها و نکروز و خشک شدگی نوک برگ‌ها را نشان دادند (شکل۴).

برای اطمینان از آلودگی به ویروس IYSV سه هفته پس از تلقیح، گیاهان برای آزمایش الایزا به آزمایشگاه انتقال داده شدند که نتایج آن در جدول ۴ قابل مشاهده است.

شکل٤- علایم IYSV بر روی پیاز تلقیح شده

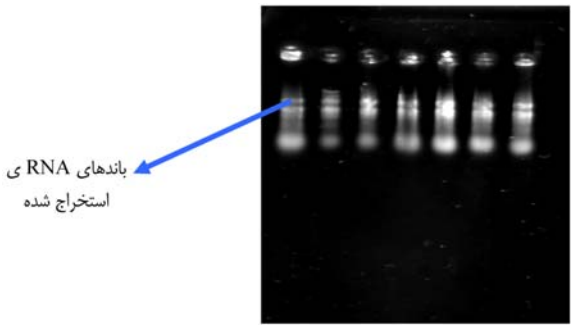
جدول۷- جدول آلودگی چهار رقم پیاز تلقیح شده توسط ویروسIYSV

نام رقم	تعداد کل گیاه	تعداد گیاهان آلوده	درصد آلودگی رقم
زرد نیشابور	۱۵	۷	٪۴۶/۶
قرمز درچه اصفهان	۱۲	۶	٪۵۰
قرمز درگز	۱۳	۳	٪۲۳
سفید نیشابور	۱۷	۱	٪۵/۸

باندهای RNA ی استخراج شده

ارزیابی کیفیت RNA از طریق الکتروفورز

الکتروفورز ژل آگاروز قابل اعتمادترین روش ارزیابی کیفیت RNA است و امکان ارزیابی سریع کیفیت RNA را به روش چشمی فراهم می‌کند. به منظور ارزیابی کیفیت، RNA استخراج شده بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید (شکل۵) که در مورد تمام نمونه‌های ارزیابی شده باندهای RNAی استخراج شده مشاهده شد که نشان دهنده‌ی صحت استخراج RNA در نمونه‌های مورد آزمایش بود.

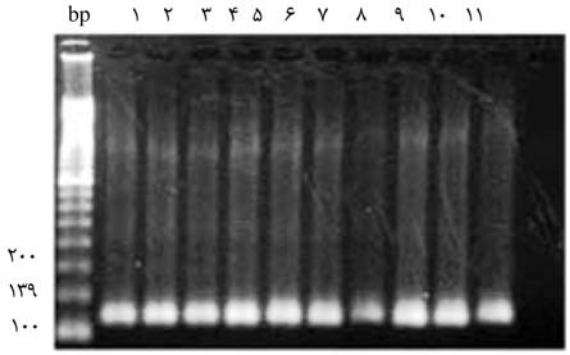


شکل۵- الکتروفورز محصول استخراج RNA

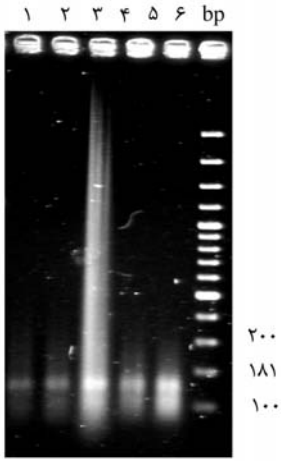
ارزیابی کیفیت محصول PCR و شناسایی ویروس

به منظور شناسایی و ردیابی ویروس IYSV پس از استخراج RNA کل گیاه، با استفاده از آغازگر اختصاصی برگشت، cDNA مربوط به ویروس سنتز و سپس از cDNA ساخته شده به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد و در نهایت محصول تکثیر شده PCR برای ارزیابی کیفیت در چاهک‌های ژل آگاروز تزریق گردید. به منظور ارزیابی کیفیت محصولات PCR از ژل آگاروز ۱/۷ ٪ همراه با Ladear ۱۰۰ جفت بازی در آخرین چاهک از سمت چپ استفاده شد که در مورد آغازگر bp ۱۸۱ باندهای مورد نظر مشاهده شد که نشان دهنده وجود ویروس در نمونه مورد نظر می‌باشد (شکل ۶). به دلیل اینکه علاوه بر قطعه تکثیر شده در محدوده مورد نظر (bp ۱۳۹)، محصولات ناخواسته‌ی دیگری نیز در واکنش PCR تکثیر می‌شدند، از روش Touchdown-PCR برای تکثیر DNA الگو (cDNA) به منظور حذف این قطعات استفاده شد. در این روش دمای اتصال به تدریج در طی سیکل‌های مختلف کاهش می‌یابد، به طوری که در سیکل اول دمای اتصال بیشتر از حد انتظار برای پرایمرهاست و در سیکل آخر پایین‌تر از این مقدار می‌باشد. معمولاً مقدار کاهش دمای چسبیدن یک درجه به ازای هر دو سیکل می‌باشد. این عمل باعث تحریک جفت شدن مطلوب پرایمرها به توالی‌های هدف شده، در نتیجه قبل از تولید محصولات ناخواسته، محصولات اصلی به فراوانی تولید شده و در محیط تجمع می‌یابند. در مورد آغازگر bp ۱۳۹ باندهای مورد نظر در این منطقه مشاهده شد که نشان دهنده وجود ویروس در نمونه مورد نظر می‌باشد (شکل۷).

نتایج آزمون RT-PCR انجام شده برای مناطق مختلف در جدول ۸ ذکر شده است. گیاهان پیاز آلوده شده به طور طبیعی و تلقیح شده در گلخانه علایم بیماری IYSV شامل ایجاد لکه‌های نکروتیک در سطح برگ و ایجاد لکه‌های لوزی کشیده در سطح برگ را نشان دادند که با علایم گزارش شده توسط موهان و ویلسون، مطابقت دارند (۱۳). همچنین در بوته‌های زنبق بیمار در گلخانه‌های تحت نمونه‌برداری علایم ویروس به صورت لکه‌های نکروز کشیده مشاهده شد در گل‌های داوودی علایم به صورت نکروز شدید مشاهده شد.



شکل٦- ارزیابی کیفیت محصولات PCR ویروس IYSV برروی ژل ۱/۷٪ مشاهده باند در منطقه bp۱۳۹ از سمت چپ چاهک اول مربوط به Ladear ، چاهک دوم شاهد مثبت، چاهک چهارم و ششم مربوط به گیاهان زنبق آلوده، چاهک سوم و پنجم و هفتم و یازدهم مربوط به گیاهان پیاز آلوده و چاهک هشتم نهم و دهم مربوط به گیاهان داوودی آلوده به ویروس می‌باشد.



شکل۷- ارزیابی کیفیت محصولات PCR ویروس IYSV برروی ژل ۱/۷٪ مشاهده باند در منطقه bp ۱۸۱ چاهک ۱و۲ مربوط به نمونه پیاز چاهک ۳ و ٤ مربوط به توتون ، چاهک ۵ مربوط به داوودی و چاهک ٦ مربوط به Ladear می‌باشد.

جدول۸ – درصد نمونه‌های آلوده به ویروسIYSV در مزارع و گلخانه‌های استان خراسان با استفاده از آزمون RT-PCR

محل جمع آوری	تعداد نمونه	تعداد نمونه مثبت در واکنش RT-PCR	درصد آلودگی
توس	۴۵	۷	٪۱۵/۵۵
تربت حیدریه	۴۵	۱۲	٪۲۶/۶۶
جاده قدیم قوچان	۵۰	۴۳	٪۸۶
قوچان	۵۰	۱۰	٪۲۰
نیشابور	۵۵	۱۵	٪۲۷/۲۷
گلخانه در منطقه چناران	۴۵	۸	٪۱۷/۷۷
گلخانه دانشکده کشاورزی مشهد	۳۰	۱	٪۳/۳۳
جمع	۳۲۰	۹۶	٪۳۰
نمونه پیاز	۲۴۵	۸۷	٪۳۵/۵۱
نمونه گلهای زینتی	۷۵	۹	٪۱۲

در مایه زنی مکانیکی، IYSV به برگ *N.rustica* لکه‌های کلروتیک که بعداً سیستمیک شدند و همچنین لکه‌های نکروزه مشاهده شد سپس تغییرشکل برگ‌ها مشاهده شد مانند آنچه پوزر و همکاران(۱۵) گزارش کرده بود. در *N.clevelandii* پس از سه هفته علایم کلروز سیستمیک همراه با نکروز مشاهده شد که با علایم گزارش شده توسط راوی و همکاران (۱۶) مطابقت دارد. در *N. benthamiana* و *N.tabacum var Samson* علایم کلروز و نکروز سیستمیک پس از سه هفته مشاهده شدند.

از میان گیاهان محک که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت گونه‌ی *Nicotiana clevelandii* با آلودگی ۶۲/۵ درصد بیشترین میزان الودگی را داشت بنابراین ویروس به راحتی در این گیاه محک تلقیح و تکثیر می‌شود و استفاده از این گونه برای استفاده در کارهای تحقیقاتی توصیه می‌شود. این در حالی است که چاتزیواسیلیو و همکاران (۲) دو گونه *N.rustica* و *N. benthamiana* مهم‌ترین گیاهان محک این ویروس معرفی کرده‌اند. که در این تحقیق علایم مشاهده شده روی*N.rustica* شامل تغییر شکل برگ‌ها، علایم سیستمیک کلروز و نکروزه گیاهان محک و علایم بیماری در *N. benthamian*شامل کلروز همراه با نکروزه سیستمیک در گلخانه بود. که این علایم در گیاهان محک به همراه نتایج حاصل از آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA و آزمون مولکولی RT-PCR، حضور ویروس (IYSV) را در اکثر مناطق پیازکاری وتعدادی از گلخانه‌های گل زینتی استان خراسان رضوی تأیید کرد و در نتیجه ویروس IYSV برای اولین بار در ایران بر روی پیاز و گل داوودی گزارش شد. تقریباً نیمی از گیاهان مایه زنی شده بیمار نشده‌اند که این به نظر می‌رسد به علت مقاومت گونه‌های مختلف گیاهان انتخاب شده در این آزمایش نسبت به ویروس بوده همچنین خطای آزمایش در هنگام مایه زنی در این امر دخیل بوده است. در بین مناطق نمونه برداری شده IYSV در منطقه جاده قدیم قوچان با ۷۹/۲۷ درصد بیشترین و

در منطقه قوچان با ۹/۶۱ درصد کمترین میزان آلودگی مشاهده شد. همچنین گلخانه‌های نمونه‌برداری شده به میزان کمی آلوده بودند و بیماری در گل‌های زینتی مثل زنبق و داوودی یافت شد. مقایسه ی جداول ۴و ۸ درصد آلودگی با استفاده از آزمون ELISA و RT-PCR نشان داد که آزمون PCR آزمون کارامدتری بوده و از حساسیت بیشتری برخوردار است.

از میان ۴ رقم پیاز آزمون شده برای این ویروس رقم قرمز درچه اصفهان با ۵۰ درصد آلودگی بیشترین آلودگی و سفید نیشابور با ۵/۸ درصد آلودگی کمترین میزان آلودگی به ویروس را داشت بنابر این کاشت رقم سفید نیشابور برای کاهش بیماری در مزارع و مقاومت به بیماری توصیه می‌شود. آزمون غده و بذر گیاهان بیمار نشان می‌دهد که بیماری به غده انتقال می‌یابد اما ویروس به بذر انتقال نمی‌یابد و همان طور که قبلاً توسط کریتزمن و همکاران (۱۱) گزارش شده است ویروس IYSV بذرزاد نمی‌باشد و با بذر انتقال نمی‌یابد.

تحقیقات بیشتر به منظور شناسایی ارقام مقاوم پیاز وگیاهان زینتی میزبان ویروس به ویروس و تریپس ناقل برای کنترل هرچه بهتر پیشنهاد می‌شود. همچنین انجام تحقیقات بیشتر برای شناسایی علف‌های‌هرز ناقل ویروس به عنوان منبعی برای ذخیره ویروس پیشنهاد می‌شود. همچنین انجام تحقیقات بیشتر برای شناسایی میزبان‌های دیگر ویروس در بین علف‌های‌هرز، گیاهان زینتی و محصولات زراعی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی که در تأمین هزینه این تحقیق اینجانب را یاری کردند تشکر می‌شود.

منابع

1- Alston D.G. and Drost D. 2008. Onion Thrips (Thrips tabaci). Utah Pests Fact Sheet. ENT-117-08PR. Logan, UT, 7 p.
2- Chatzivassiliou E.K., Livieratos I., Jenser G. and Katis N.I. 2000. Ornamental Plants and Thrips Populations Associated with *Tomato Spotted Wilt Virus* in Greece. Phytoparasitica, 28(3): 257-264.
3- Clark M.F. and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol, 34:475-483.
4- Cortez I., Livieratos I.C., Derks A., Peters D. and Kormelink R.1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. Phytopathology, 88:1276-1282.
5- Crowe F.J. and Pappu H.R. 2005.Iris yellow spot virus. Plant Dis, 89:105.
6- Evans K. and Frank E. 2009. Iris yellow spot virus in onions. Utah Pests Fact Sheet. PLP-010-PR. Logan, UT, 4 p.
7- Gent D.H., DuToit L.J., Fichtner S.F., Krishna Mohan S., Pappu H.R. and Schwartz H.F. 2006. Iris yellow spot virus:An Emerging Threat to Onion Bulb andSeed Production .Plant Disease, 90 (12): 1468_1480.
8- Gera A., Kritzman A., Cohen J. and Raccah B. 1998.Tospoviruses infecting bulb crops in Israel. Pages 86-87 in: Recent Progress in Tospovirus and Thrips Research. Peters, D. and Goldbach,R eds. Int. Sympos. Tospoviruses Thrips Floral Vegetable Crops 4th. Wagengingen,The Netherlands.
9- Ghotbi T., Shahraeen N. and Winter S.2005.Occurrence of Tospoviruses in Ornamental and Weed Species in Markazi and Tehran Provinces in Iran. Plant Dis, 89:425-429.
10- Kritzman A., Beckelman H., Alexandrov S., Cohen J., Lampel M., Zeidan M., Raccah B. and Gera A. 2000. Lisianthus leaf necrosis:A new disease of lisianthus caused by Iris yellow spot virus. Plant Dis, 84:1185-1189.
11- Kritzman A., Lampel M., Raccah B. and Gera A. 2001. Distribution and transmission of Iris yellow spot virus. Plant Dis, 85:838-842.
12- Mandal B., Pappu H.R. and Culbreath A.K. 2001.Factors affecting mechanical transmission of Tomato spotted wilt virus to peanut (Arachis hypogaea). Plant Dis, 85:1259-1263.
13- Mohan S.K. and Wilson D.O.Jr. 1989. Scape blight of onion. Pages 103-104 in: Proc.Natl. Onion Res. Conf., Boise, ID. University of Idaho, Moscow.
14- Mumford R.A., Glover R., Daly M., Nixon T., Harju V. and Skelton A. 2008. Iris yellow spot virus (IYSV) infecting Lisianthus (Eustoma grandiflorum) in the UK: first finding and detection by real-time PCR. Central Science Laboratory (CSL), Sand Hutton, York, YO41 1LZ, UK.

15- Pozzer L., Bezerra I.C., Kormelink R., Prins M., Peters D., Resende R. de O. and De Avila A.C. 1999. Characterization of a tospovirus isolate of iris yellow spot virus associated with adisease in onion fields in Brazil. Plant Dis, 83:345-350.
16- Ravi K.S., Kitkaru A.S. and Winter S. 2006. Iris yellow spot virus in onions:A new tospovirus record from India. Plant Pathol, 55:288.
17- Schmitz A. 2003. Untersuchungen zum Pathogenitatsmechanismus von viroid RNA. Thesis, Heinrich Heine Universitat Dusseldorf, Germany.
18- Silva M.S., Martins1 C.R.F., Bezerra I.C., Nagata T., De Avila A.C. and Resende R.O. 2001. Sequence diversity of NSM movement protein of tospoviruses.Arch. Virol, 146: 1267–1281.
19- Smith T.N., Wylie S.J., Coutts B.A. and Jones R.A.C. 2006.(b). Localized distribution of Iris yellow spot virus within leeks and its reliable large-scale detection. Plant Dis, 90:729-733.
20- Ward L.I., Perez-Egusquiza Z., Fletcher J.D., Ochoa-Corona F.M., Tang J.Z., Liefting L.W., Martin E.J., Quinn B.D., Pappu H.R. and Clover G.R.G. 2008. First report of Iris yellow spot virus on Allium cepa in New Zealand. Plant Pathology, 52:406.