نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، ص. ۴۰۱-۳۹۹

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 3, Fall 2013, P. 399-401

مقاله کوتاه پژوهشی

شناسایی سرولوژیکی و ملکولی ویروس کوتولگی زرد پیاز و تعیین پراکنش آن در استان های خراسان رضوی و شمالی

مجید شاهی بجستانی[1*]- بهروز جعفرپور[2]- محسن مهرور[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۲۳
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۳/۹

چکیده

به منظور شناسایی ویروس کوتولگی زرد پیاز در بهار و تابستان ۱۳۸۹ از مناطق عمده پیاز کاری استان خراسان نمونه برداری صورت گرفت. بدین منظور نمونه برداری تصادفی از مزارع حومه شهرستان های مشهد، چناران، قوچان، تربت حیدریه، نیشابور، بردسکن، گناباد، فریمان، فاروج، شیروان، بجنورد و آش خانه به عمل آمد. نمونه های برگی با علائم موزائیک، زردی، رگوز و پیچیدگی همراه با کوتولگی غده های پیاز جمع آوری شدند. آلودگی نمونه های فوق با استفاده از آزمون سرولوژیک DAS-ELISA و آغاز گرهای طراحی شده برای تکثیر ژن پروتئین پوششی (CP) در واکنش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور استخراج RNA از نمونه های آلوده با استفاده از کیت آماده(plus)RNX™ انجام شد و به دنبال آن آزمون RT-PCR جهت ساختن cDNA و سپس آزمون PCR انجام گردید. الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ ٪، قطعه تکثیر شده ۲۹۱bp مربوط به ژن کامل CP را در تمام نمونه های مورد آزمایش نشان داد. قطعه تکثیر شده جهت توالی یابی ارسال و تائید شد. همچنین آلودگی با روش سرولوژیک تائید گردید. همچنین صحت بیماری زایی ویروس نیز در شرایط گلخانه بر روی سه گونه از گیاه سلمه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که مزارع حومه چناران، گناباد و نیشابور به این ویروس آلوده می باشند و در مزارع سایر شهرستان ها آلودگی با درصد بسیار ضعیف مشاهده می شود یا هیچ آلودگی مشاهده نگردید.

واژه های کلیدی: ویروس کوتولگی زرد پیاز، شناسایی، دامنه میزبانی، DAS-ELISA، RT_PCR

مقدمه

ویروس کوتولگی زرد پیاز اولین بار در سال ۱۹۲۹ توسط ملهوس و همکاران گزارش شد (۷). میزبان اصلی آن پیاز می باشد اما می‌تواند به گونه های دیگری از خانواده *Alliaceae* و *Chenopodiaceae* حمله کرده و آنها را آلوده سازد (۲). این بیماری در سال ۱۹۹۸ توسط شهرآئین و همکاران از ایران گزارش شد (۹) و در بیشتر کشورهای دنیا که کشت پیاز و موسیر دارند گزارش شده است (۶).

ویروس کوتولگی زرد پیاز یکی از اعضای خانواده پتی ویریده[4] و جنس پتی ویروس[5] و دارای ذرات رشته ای خمش پذیر به طول ۷۲۳- ۷۷۲nm می باشد و ژنوم آن شامل یک مولکول منفرد RNA خطی مثبت (ssRNA+) است (۴). در آلودگی به این ویروس برگها رفته رفته زرد می شود و حالت بد شکلی و تمایل به سمت پایین در آنها است. جوانه های گیاه کوچکتر شده و بذر گیاه از کیفیت خوبی برخوردار نخواهد بود.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها: به این منظور در تابستان و پاییز ۱۳۸۹ نمونه برداری از مزارع پیاز استان های خراسان رضوی و شمالی انجام شد. نمونه برداری با روش های انتخابی و تصادفی (جهت تعیین پراکنش) انجام شد.

شناسایی و تعیین پراکنش ویروس کوتولگی زرد پیاز (ویروس کوتولگی زرد پیاز)

جهت ردیابی ویروس و تعیین پراکنش در نمونه های جمع آوری

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: majid.shahi.1364@gmail.com)

4- Potyviridae
5- potyvirus

شده از آزمون DAS-ELISA استفاده شد.

بررسی دامنه میزبانی ویروس در شرایط گلخانه: جهت بررسی دامنه میزبانی ویروس در شرایط گلخانه، از روش مایه زنی ویروس به روش انتقال مکانیکی به سه گونه سلمه استفاده گردید.

آزمون الایزا: این آزمون مطابق روش کلارک و آدامز انجام شد (۳).

استخراج RNA: به منظور استخراج RNA کل از کیت RNX™(plus) (سینا ژن-کره جنوبی) مطابق با دستورالعمل کیت استفاده گردید.

واکنش RT-PCR: برای انجام این واکنش از آغاز گرهای اختصاصی کیاژن[1] از ایالات متحده آمریکا جهت تکثیر پروتئین پوششی (CP) ویروس، استفاده شد. توالی این آغازگرها به صورت زیر هستند (۶):

Forward:5' CGA-AGC-AAA-TTG-CCA-AGC-AGG 3'

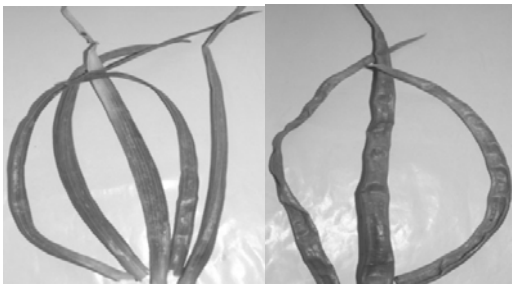
Reverse:5' CGA-TTA-GCT-GCC-CCT-CTA-AC 3'

سنتز cDNA از RNA ویروس (مرحله نسخه برداری معکوس): سنتز cDNA طبق روش موجود در کیت Accupower RT Premix™ (Bioneer- korea) انجام شد.

تکثیر با واکنش زنجیره ای پلیمراز: بدین منظور از دو روش معمول و استفاده از کیت آماده شرکت بایونیر کره جنوبی استفاده شد.

الکتروفورز افقی فراورده های PCR: جهت انجام الکتروفورز افقی از ژل اگارز۱/۵ و۱/۷ درصد و بافر 1x TBE (Tris Boric Acid EDTA) استفاده گردید.

توالی یابی: محصول PCR مربوط به قطعه تکثیر شده به طول ۲۹۱ bp برای توالی یابی ارسال شده و مورد تائید قرار گرفت.



(الف) (ب)

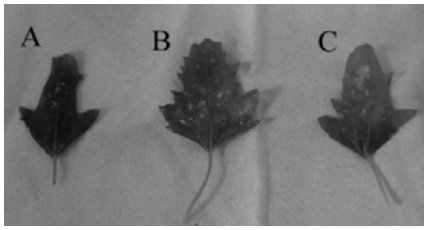
شکل۱- نمونه های مورد آزمایش با علائم ویروس کوتولگی زرد پیاز الف: رگه های زرد رنگ و کوتولگی ب: موج دار شدن،زردی و کوتولگی

1- Qiagene

نتایج و بحث

شناسایی و تعیین پراکنش ویروس کوتولگی زرد پیاز: نمونه‌های آلوده ای که با روش های انجام شده در این تحقیق شناسایی شدند متعلق به مناطق خزری گناباد، نوبهار چناران و اسحاق آباد نیشابور بودند.

واکنش گیاهان مورد بررسی در برابر مایه زنی ویروس کوتولگی زرد پیاز: ۱۴ تا ۱۶ روز پس از مایه زنی ویروس، علائم به صورت نقاط کلروتیک و نکروتیک بر روی برگ های گیاهان مایه زنی شده ظاهر شد (۸) (شکل۲).



شکل۲- علائم روی برگ های تلقیح شده توسط عصاره گیاه بیمار A: علائم نکروتیک ضعیف روی گونه *Ch. quinoa* B: علائم نکروتیک روی گونه *Ch. amaranticolor* C: علائم نکروتیک و کلروتیک روی گونه *Ch. Album*

آزمون الایزا

در آزمون DAS-ELISA نتایج مربوط به هر یک از پلیت ها بر اساس تغییر رنگ حفرات از بی رنگ تا زرد پر رنگ با شاهد مثبت و منفی مقایسه شد، همچنین با استفاده از دستگاه الایزا خوان (Stat Fax 2100)، میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانو متر برای هر یک از حفرات پلیت تعیین گردید و بدین ترتیب نتایج بررسی چشمی تغییر رنگ حفرات هر پلیت مورد تایید قرار گرفت.

آزمون RT-PCR

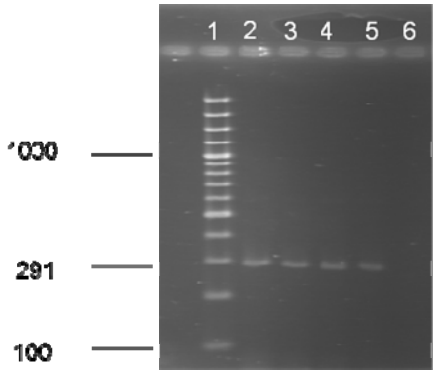
RNA استخراج شده از نمونه ها پس از سنتز cDNA و بسط نتایج آن توسط واکنش PCR، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تزریق شد. باند ویروس کوتولگی زرد پیاز با سایز ۲۹۱ bp در مقایسه با اندازه نشانگر مشاهده گردید. این باند در شکل ۳ مشاهده می شود.

نتیجه گیری

در این تحقیق از میان ۷۲۹ نمونه مورد آزمایش ۴۳ نمونه، آلوده به ویروس ویروس کوتولگی زرد پیاز بودند که منطقه نوبهار چناران با ۴۷/۰۵ درصد آلودگی بالاترین میزان آلودگی در استان خراسان رضوی را نشان داد.

سپاسگزاری

بـدین وسـیله از دکتـر نـوح شـهرآئین از موسسـه تحقیقـات کشاورزی(گیاه پزشکی) تهران بزرگ بـه خـاطر ارسـال معـرف هـای آزمون الایزا، شاهد مثبت ویروس و راهنمایی های بـی دریـغ ایشـان تشکر و قدردانی می شود.



شکل۳- نتایج الکتروفوزر محصول RT-PCR از ژن CP ویروس کوتولگی زرد پیاز در نمونه های مختلف در ژل آگارز ۱/۵ درصد. ۱- سایز مارکر ۱۰۰ bp ۲،۳و٤- نمونه های آلوده از مناطق دارای بیماری ٥- کنترل مثبت ٦- کنترل منفی

منابع

۱- آمار نامه کشاورزی سال زراعی ۸۸-۱۳۸۷. اداره کل آمار و اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی تهران. صفحات ۹۵-۹۴.

2- Canavelli A., Nome S.F., and Conci V.C. 1998. Effect of different viruses on yield of garlic(Allium sativum) 'Rosado Paraguayo'Fitopatologia-Brasileira., 23 (3): 354-358

3- Clark M.F., and Adams A.N. 1977.Characteristic of the microplate method enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses A.virology,34:475-483

4- Huttinga H. 1975. Netherland. Journal of Plant Pathology 81: 8

5- Baghalian K., Kim O.K., and Natzuaki K.T. 2010. Molecular variability and genetic structure of the population of Onion yellow dwarf virus infecting garlic in Iran/Virus Genes, 41:282–291.

6- L. bos, Geographical Distribution/Institute of psychopathological research, Wageningen, Netherlands. (www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=158)

7- Melhus I.E., Reddy C.S., Henderson W.J., and Vestal E. 1929. A new virus disease epidemic on onions. Phytopathology;19:73–7.

8-Sabry Y.M. Mahmoud, Sabah A. Abo El-Maaty; Aly M. El-Borollosy and Mamdouh H. Abdel-Ghaffar. 2007. Identification of *onion yellow dwarf potyvirus* as one of the major viruses infecting garlic in Egypt, American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci; 2(6): 746-755.

9-Shahraeen N., Bananej K., Ahoonmanesh A. and Lesemann D.E. 1998. Identification of three elongated viruses from Allium spp. (*Onion andgarlic*) in Tehran provinces. Iranian Journal of Plant Pathology 34, 117.