نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، ص. ۱۳۵-۱۳۲

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 1, Spring 2013, P. 132-135

مقاله کوتاه پژوهشی

ردیابی ویروس آبله آلو (PPV) در درختان میوه هسته‌دار استان خراسان رضوی

بهروز جعفرپور[1*] - محمدعلی سبک‌خیز[2]

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

چکیده

ویروس آبله آلو (*Plum pox virus*; PPV) عامل بیماری شارکا، متعلق به جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* است و از برخی نقاط ایران گزارش شده است. جهت بررسی وجود این ویروس در استان خراسان رضوی تعداد ۵۵۳ نمونه از باغات درختان میوه هسته‌دار در طی سالهای ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ جمع‌آوری شد و آلودگی ۱۲ نمونه با آزمون داس-الایزا به اثبات رسید. در آزمون RT-PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، باندی در حدود ۴۶۷bp در ۳ نمونه تکثیر گردید. قطعه باند جدایه‌ای از منطقه کدکن از روی ژل استخراج و تعیین توالی شد. پس از همردیف سازی در ClustalW2 و رسم درخت فیلوژنتیکی با MEGA 5.1 مشخص شد که جدایه ایرانی تعیین توالی شده بیشترین تشابه را در سطح نوکلئوتیدی (۹۸ درصد) با دو جدایه ژاپنی و درسطح آمینواسیدی (۹۶درصد) با دو جدایه ژاپنی و یک جدایه آمریکا داشته و کمترین تشابه را نیز با جدایه‌ای از اسلواکی دارد که در سطح نوکلئوتیدی ۹۵ درصد و در سطح آمینواسیدی نیز ۹۰ درصد می‌باشد.

واژه های کلیدی: ویروس آبله آلو (PPV)، DAS-ELISA، RT-PCR، استان خراسان رضوی، ایران

مقدمه

بیماری آبله آلو یا همان بیماری شارکا یک بیماری مهم ویروسی در گونه های مختلف جنس *Prunus* است که توسط ویروس آبله آلو (*Plum pox virus*: PPV) ایجاد می شود. این بیماری مهمترین بیماری در درختان میوه هسته دار در اروپا و نواحی مدیترانه ای می‌باشد و باعث کاهش محصول از طریق کاهش تولید میوه و همچنین ایجاد بدشکلی در میوه ها و ظهور علایم سیستمیک می‌شود. علایم این بیماری در بین سالهای ۱۹۱۵ تا ۱۹۱۷ در آلو و در بلغارستان مشاهده شد ولی ماهیت ویروسی بودن آن تا سال ۱۹۳۲ شرح داده نشد. در زردآلو اولین بار در کشور بلغارستان در سال ۱۹۳۴ و در هلو در مجارستان در اوایل دهه ۱۹۶۰ گزارش شد و از این تاریخ به بعد از بسیاری مناطق پرورش درختان هسته دار گزارش شده است (۲، ۴ و ۵). ویروس عامل بیماری متعلق به جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* می‌باشد و گونه های جنس *Prunus* را آلوده می‌کند. این ویروس دارای ذرات رشته ای به طول حدود ۷۵۰nm و عرض۱۵nm می‌باشد. ژنوم آن یک قطعه RNAی خطی تک رشته ای مثبت می‌باشد که یک پلی پروتئین را کد می کند و این پروتئین توسط پروتئازهای ویروسی به پروتئینهای مختلفی شکسته می شود و هر یک از این پروتئینها نقشهای متفاوتی را ایفا می‌کنند (۴ و ۵). برای مدتها تصور می‌شد که دامنه میزبانی این ویروس محدود به جنس *Prunus* است ولی بعدها مشخص شد که گونه های *Euonymus europea*، *Ligustrum vulgare* و *Juglans regia* نیز به طور طبیعی به این ویروس آلوده می شوند. گونه‌های مختلف جنس Prunus که به این ویروس آلوده می شود شامل زردآلو (*P. armeniaca*)، هلو (*P. persica*)، آلو (*P. domestica* , *P. salicina*) و بادام (*P. dulcis*) می‌باشد. ویروس آبله آلو از طریق پیوند و همچنین توسط چندین گونه شته مانند *Aphis spiracola* و *Myzus persicae* به روش ناپایا انتقال می یابد. انتقال با عصاره به گونه های گیاهان علفی نیز انجام می‌شود. این بیماری گسترش جهانی دارد و از اروپا، آفریقا، آسیا و آمریکا گزارش شده است. در زردآلو، هلو و آلو بسیار خسارت زا است زیرا باعث کاهش کیفیت میوه می شود. علایمی که این ویروس در آلو ایجاد می کند شامل لکه های کلروزه در برگها و میوه و رگبرگ روشنی می باشد (۴، ۵ و ۶).

ویروس آبله آلو (PPV) به همراه ویروس لکه حلقوی بافت مرده درختان هسته‌دار (*Prunus necrotic ring spot virus*;

۱و۲- استاد و مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: Jafarpour226@yahoo.com)

PNRSV) اولین بار توسط معینی و ایزدپناه (۱) در ایران از منطقه دشت مغان و از درختان گیلاس، هلو، سیب، توت سفید و گل‌محمدی گزارش شد. همچنین این ویروس توسط زمهریر و همکاران (۷) نیز در زردآلو و گیلاس‌های استان آذربایجان شرقی شناسایی شده است. این بررسی با هدف شناسایی و تعیین پراکنش ویروس آبله آلو در باغات درختان میوه هسته‌دار استان خراسان رضوی انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های آلوده و شناسایی ویروس با روش DAS-ELISA: طی بهار و تابستان سالهای ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ از تعداد ۵۵۳ درخت از باغات درختان میوه هسته دار (آلو، هلو، گیلاس و زردآلو) که برگهای آنها دارای علایم ابلقی، رنگ‌پریدگی و بدشکلی بود از برخی شهرهای استان (نیشابور، کدکن و تربت حیدریه) نمونه های برگی جمع‌آوری و جهت بررسی وجود ویروس، به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور شناسایی و ردیابی ویروس آبله آلو (PPV) از آزمون ساندویچ دو طرفه الایزا (DAS-ELISA) و آنتی‌بادیهای پلی کلونال ویروس (DSMZ –آلمان) مطابق روش شرح داده شده کلارک و آدامز (۳) استفاده شد و نتایج به‌صورت چشمی و همچنین با استفاده از دستگاه الایزاخوان ELISA Reader, Awareness, (Stat fax-2100) در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد.

استخراج RNAی کل، سنتز cDNA و انجام واکنش PCR: RNAی کل از گیاهانی که در آزمون DAS-ELISA آلودگی آنها به اثبات رسیده بود، با استفاده از کیت RNeasy plant mini kit (Qiagen, USA) استخراج شد. کیت AccuPower RT Pre Mix (Bioneer Inc. Korea) به همراه پرایمر اختصاصی برگشت (P4b) جهت ساخت رشته cDNAی ویروسی به‌کار رفت. واکنش PCR نیز با استفاده از کیت AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea) و غلظت DNAی ng ۲۰ و همچنین pmol ۱۰ از هر پرایمر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر Biometra *Tpersonal* (Germany) و با برنامه حرارتی یک چرخه ^{O}C ۹۴ به مدت ۴ دقیقه به عنوان واسرشته سازی آغازین و به دنبال آن ۴۰ چرخه متشکل از ^{O}C ۹۲ به مدت ۳۰ ثانیه، ^{O}C ۶۲ به مدت ۳۰ ثانیه، ^{O}C ۷۲ به مدت یک دقیقه وهمچنین ^{O}C۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه به عنوان تکمیل پلیمریزاسیون انجام گردید. پس از پایان واکنش PCR، محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی ۰/۰۱ درصد رنگ DNA green viewer الکتروفورز و نتایج با دستگاه UV ترانس‌لومیناتور مشاهده شد. در تمام واکنشهای RT-PCR، شاهد منفی (گیاهان سالم) نیز مورد استفاده قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی آغازگرها در زیر آمده است (۲). این آغازگرها قسمتی از انتهای ژن Nuclear inclusion b (NIb) و قسمتی از انتهای آمینی (N) ژن پروتئین پوششی را به اندازه ۴۶۷bp تکثیر می‌کنند.

P3D (5’ACATTGCGGAGACAGCACTG3’)
P4b (5’TGCCTTCAAACGTGGCACTG3’)

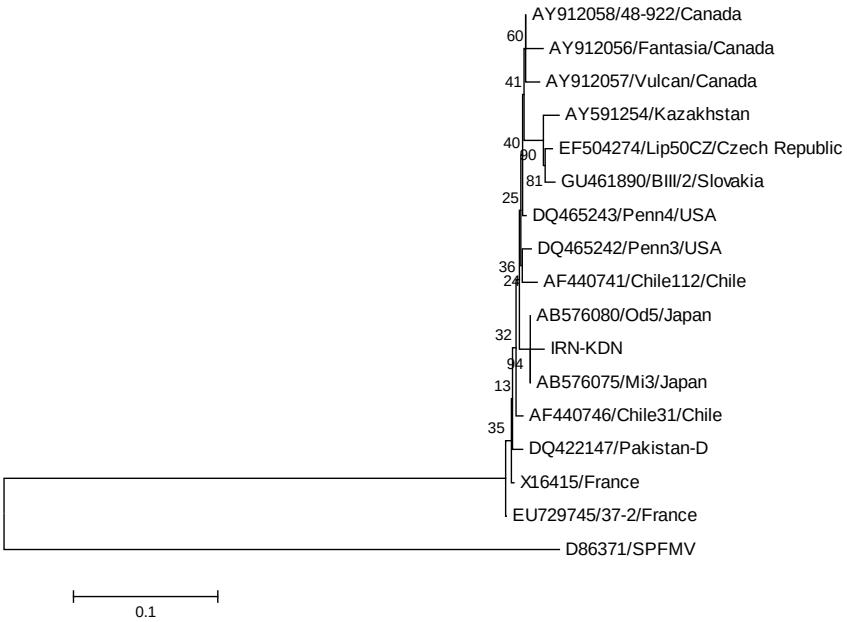
تعیین توالی نوکلئوتیدی فرآورده‌های PCR: جهت تعیین توالی محصولات PCR؛ یک نمونه از منطقه کدکن (PPV-KDN) برای تعیین توالی انتخاب شد و پس از جداسازی باند مورد نظر (۴۶۷bp) از روی ژل با استفاده از کیت AccuPrep®Gel Purification Kit (Bioneer Inc., Korea) به شرکت Bioneer (Korea) فرستاده شد. توالی نوکلئوتیدی بدست آمده با ۲۹ جدایه دیگر دنیا در نرم‌افزار MEGA 5.1 و همچنین در ClustalW2 همردیف سازی شد و جایگاه آن با رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-joining مشخص شد (جدول ۱ و شکل ۱).

نتایج و بحث

از بین ۵۵۳ نمونه جمع آوری شده تعداد ۱۲ نمونه در آزمون الایزا آلوده به ویروس آبله آلو بودند. در RT-PCR نیز تنها در ۳ نمونه، قطعه مورد نظر ژنوم ویروس به اندازه تقریبی bp ۴۶۷ تکثیر گردید. پس از همردیف سازی توالی جدایه مورد بررسی در ClustalW2 درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی تعیین شد که در جدول ۱ نتایج آن آمده است. همانطور که از این جدول بر می‌آید، جدایه ایرانی تعیین توالی شده بیشترین تشابه را در سطح نوکلئوتیدی (۹۸ درصد) با دو جدایه ژاپنی دارد که البته تشابه ۹۶درصدی نیز در سطح آمینواسیدی با همین دو جدایه ژاپنی و یک جدایه از آمریکا دارد. کمترین تشابه را نیز با جدایه‌هایی از اسلواکی و قزاقستان دارد که در سطح نوکلئوتیدی ۹۵ درصد و در سطح آمینواسیدی ۹۰ و ۹۱ درصد با این دو جدایه می‌باشد. در درخت فیلوژنتیکی رسم شده نیز جدایه مورد بررسی در بین دو جدایه ژاپنی قرار گرفت. لازم به ذکر است که در صورت نمونه برداریهای بیشتر از سایر نواحی میوه‌خیز استان احتمال می‌رود که مناطق بیشتری از استان آلوده به این ویروس باشد و لذا اتخاذ تمهیدات لازم جهت جلوگیری از انتشار این بیماری در استان خراسان رضوی که یکی از قطبهای تولید میوه‌های هسته‌دار کشور است از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

جدول ۱- نام جدایه‌های به‌کار رفته در مقایسه توالی نوکلئوتیدی جدایه مورد بررسی (PPV-KDN) با برخی جدایه‌های دنیا و مقایسه آنها در ClustalW2 در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدها

کشور جدا شده /نام جدایه/شماره پذیرش در NCBI	درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی (۴۵۳ نوکلئوتید)	درصد تشابه در سطح آمینواسید (۱۵۱ اسید آمینه)
DQ465243/Penn4/USA	97.0	96.0
AF440746/Chile31/Chile	97.0	94.0
AY912058/48-922/Canada	97.0	94.0
X16415/France	97.0	94.0
DQ465242/Penn3/USA	97.0	94.0
AF440741/Chile112/Chile	96.0	92.0
AY912057/Vulcan/Canada	96.0	94.0
AY912056/Fantasia/Canada	96.0	92.0
EF504274/Lip50CZ/Czech	96.0	92.0
GU461890/BIII/2/Slovakia	95.0	90.0
AY591254/Kazakhstan	95.0	91.0
AB576080/Od5/Japan	98.0	96.0
DQ422147/Pakistan-D	96.0	93.0
AB576075/Mi3/Japan	98.0	96.0
EU729745/37-2/France	96.0	94.0



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروس آبله آلو (PPV) بر اساس توالی نوکلئوتیدی قسمتی از انتهای ژن NIb و قسمتی از انتهای آمینی (N) ژن پروتئین پوششی با نرم افزار MEGA 5.1. Outgroup: Sweet Potato Feathery Mottle Virus (SPFMV)

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که هزینه‌های این تحقیق (طرح مصوب شماره ۱۰۶۹-ت؛ ۸۷/۷/۱۳) را فراهم نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- معینی ع. و ایزدپناه ک. ۱۳۷۹. شناسایی سرولوژیک ویروسهای عامل شارکا (PPV) و لکه‌حلقوی بافت مرده درختان هسته‌دار (PNRSV) در دشت مغان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. صفحه ۳۳۸.

2- Candresse T., Cambra M., Dallot S., Lanneau M., Asensio M., Gorris M.T., Revers F., Macquaire G., Olmos A., Boscia D., Quiot J.B., and Dunez J. 1998. Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. Phytopathology 88:198-204.

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- Damsteegt V.D., Scorza R., Stone A.L., Schneider W.L., Webb K., Demuth M., and Gil-dow F.E. 2007. Prunus host range of Plum pox virus (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. Plant Dis. 91: 18-23.

5- Glasa M. and Candresse T. 2005. Plum pox virus in Description of Plant Viruses online in: http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=410

6- James D. and Varga A. 2005. Nucleotide sequence analysis of Plum pox virus isolate W3174: evidence of a new strain. Virus Res. 110 (1-2): 143-150.

7- Zamharir Gaeb M., Sokhandan Bashir N., and Khakvar R. 2006. Plum pox virus (PPV) in Iran. EPPO/OEPP Bulletin, 36(2): 210.