نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، ص. ۱۱۵-۱۱۳

Journal of Plant Protection
Vol. 26, No. 1, Spring 2012, P. 113-115

## مقاله کوتاه پژوهشی

# بررسی ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) در استان خراسان رضوی

بهروز جعفرپور [۱*] - محمدعلی سبک‌خیز [۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۱۲

## چکیده

ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) عضو جنس *Begomovirus* و خانواده *Geminiviridae* می‌باشد. با توجه به مشاهده علایم مشکوک به وجود این ویروس در استان خراسان رضوی در تابستانهای ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ به ترتیب ۵۲۶ و ۲۵۳ نمونه بوته گوجه فرنگی مشکوک به آلودگی ویروس مذکور از مزارع مختلف استان جمع‌آوری شد و با آزمون سرولوژیکی تاس-الایزا (TAS-ELISA) مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام آزمون‌ها مشخص شد که تعداد ۱۱ نمونه در سال ۱۳۸۷ و ۲۵ نمونه در سال ۱۳۸۸آلوده به TYLCV بودند. پس از استخراج DNAی کل از نمونه های آلوده، آزمون PCR نیز آلودگی نمونه ها را در محدوده۵۷۰ bp اثبات کرد.

**واژه‌های کلیدی:** ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV)، خراسان رضوی، TAS-ELISA و PCR

## مقدمه

بیماری پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی یکی از خسارت‌زاترین بیماری‌های ویروسی گوجه‌فرنگی در برخی نقاط جهان است که عامل آن در جنس *Begomovirus* و خانواده ویروس‌های دوقلو (*Geminiviridae*) قرار دارد. خسارت این بیماری گاهی شامل کل محصول می‌شود. این ویروس دارای ژنوم DNA تک‌رشته‌ای با ذرات دوقلو می باشد و توسط سفیدبالک *Bemisia tabaci* به طریق گردشی غیرتکثیری انتقال می‌یابد. ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) در بسیاری از کشورهای مدیترانه‌ای، خاورمیانه، و آفریقایی از جمله قبرس، اسرائیل، ساحل عاج، اردن، لبنان، سنگال، مصر، و تونس انتشار گسترده‌ای دارد. این بیماری که پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی نیز نامیده می‌شود از اوایل دهۀ ۱۹۶۰ در اسرائیل و درۀ اردن مشاهده شد و در حال حاضر در بسیاری از کشورها دارای اهمیت اقتصادی است (۶). این ویروس در ایران نیز از استانهای جنوبی توسط حاجی‌مراد (۱۹۹۶) گزارش شده و در مزارع گوجه‌فرنگی سیستان و بلوچستان، کرمان، هرمزگان، فارس و خوزستان از گسترش نسبتا زیادی برخوردار است، هرچند دامنه میزبانی آن تنها محدود به گوجه‌فرنگی نیست (۲). خصوصیات مولکولی و موقعیت تاکسونومیکی برخی جدایه های ایرانی این ویروس مشخص شده است (۱، ۲ و ۳). عزیزی و همکاران (۴) این ویروس را در حشره ناقل پس از استخراج DNAی کل با روش PCR شناسایی کردند.

## مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) در استان خراسان رضوی در تابستان سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ از مزارع گوجه‌فرنگی شهرستان‌های نیشابور، تربت حیدریه، کاشمر، قوچان و حومه مشهد بازدید به‌عمل آمد. در سال ۱۳۸۷ تعداد ۵۲۶ نمونه و در سال ۱۳۸۸ تعداد ۲۵۳ نمونه جمع آوری شد. در هر مزرعه سعی می‌شد تا نمونه‌برداری از بوته‌هایی که علایم موزائیک، زردی، رنگ‌پریدگی، کوتولگی، پیچیدگی برگ و بدشکلی بوته را نشان می‌دادند، انجام شود. به‌منظور شناسایی ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) از روش سرولوژیکی TAS-ELISA[۳] استفاده گردید. در این روش از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای به عنوان آنتی‌بادی به دام اندازنده و از آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای به عنوان شناسنده استفاده شد[۴]. اصول کار با اندک تغییرات شبیه به روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷) بود (۵). در این روش پس از پوشش حفرات پلیت با IgG خالص، محلول بلوکینگ (Blocking) شامل شیر کم چربی در بافر PBST (به نسبت ۲ میلی‌لیتر شیر کم چربی +۹۸

۱ و ۲- استاد و کارشناس آموزشی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: Jafarpour226@yahoo.com )

3- Triple Antibody Sandwich ELISA
۴- معرفهای این آزمون از شرکت DSMZ آلمان خریداری شدند.

میلی‌لیتر PBST) افزوده و پس از خارج کردن محلول بلوکینگ و ۳ مرتبه شستشوی پلیت، عصاره مورد آزمایش به هر چاهک اضافه شد و پس از انکوباسیون در حرارت ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شب و شستشوی پلیت، آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای (Mab) که در بافر کانژوگیت (PBST+%2PVP+%2 egg albomin) به نسبت ۱/۱۰۰۰ رقیق شده بود به هر چاهک اضافه و به مدت ۴-۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد، پس از شستشوی پلیت، آنتی‌بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز که در بافر کانژوگیت به نسبت ۱/۱۰۰۰ رقیق شده بود، اضافه گردید و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت و شستشو، محلول سوبسترا (پی‌نیتروفنیل‌فسفات) به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۳۰ تا ۶۰ دقیقه نتایج بر اساس مشاهده چشمی و تعیین میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر در دستگاه الیزاخوان (ELISA Reader, AWARNESS Tech. Inc., Stat fax-2100, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت.

DNAی نمونه‌های آلوده در آزمون الایزا با استفاده از کیت DNA Extraction Kit (DNP) شرکت سیناژن ایران و مطابق دستورالعمل موجود در کیت استخراج گردید و DNAی استخراجی در آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR 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 $95^{0}C$ به مدت ۴ دقیقه به عنوان واسرشته سازی آغازین و به دنبال آن ۳۵ چرخه متشکل از $95^{0}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $60^{0}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $72^{0}C$ به مدت ۳۰ ثانیه وهمچنین $72^{0}C$ به مدت ۵ دقیقه به عنوان تکمیل پلیمریزاسیون انجام گردید. پس از پایان واکنش PCR، محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد تهیه شده در بافر ۰/۵x TBE الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، نتایج با دستگاه UV ترانس لومیناتور مشاهده شد. در تمام واکنشهای PCR جهت شاهد منفی از گیاهان سالم گوجه‌فرنگی نیز DNA استخراج شد و مورد استفاده قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده به صورت زیر بود:

TY255 5'-GCT CGT AAG TTT CCT CAA CGG AC-3'

TY2463 5'-TGG TTC CCC ATT CTC GTG G-3'

## نتایج و بحث

پس از انجام آزمونها و پس از مشاهدات نهایی و مقایسه چاهک نمونه‌ها با شاهدهای مثبت و منفی و همچنین ثبت نتایج در طول موج ۴۰۵ nm مشخص گردید که در مجموع ۱۱ نمونه از تعداد ۵۲۶ نمونه جمع‌آوری شده سال ۱۳۸۷ و ۲۵ نمونه از تعداد ۲۵۳ نمونه سال ۱۳۸۸ آلوده به ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) بودند. نتایج این بررسی‌ها در جدول ۱ به تفصیل آمده است.

**جدول ۱- تعداد نمونه آلوده در مناطق نمونه‌برداری شده در سال ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸**

| مناطق نمونه‌برداری شده | ۱۳۸۷ | | ۱۳۸۸ | |
|---|---|---|---|---|
| | تعداد نمونه جمع‌آوری شده | تعداد نمونه آلوده | تعداد نمونه جمع‌آوری شده | تعداد نمونه آلوده |
| توس مشهد (حاجی‌آباد، اسفندان، زاک و جغنه) | ۵۷ | ۲ نمونه (اسفندان)<br>۳ نمونه (زاک) | ۳۳ | ----- |
| نیشابور (اسدآباد، قدمگاه، حاجی‌آباد، ؟، اسحاق آباد، دستجرد و عبیرآباد) | ۱۱۳ | ۲ نمونه (اسدآباد)<br>۱ نمونه (قدمگاه)<br>۱ نمونه (عبیرآباد) | ۹۰ | ۱۸ |
| تربت‌حیدریه (فرزق، کاریزک، صومعه، خورق و قوزان) | ۹۹ | ۱ نمونه (قوزان) | ۵۳ | ۷ |
| کاشمر (قوچپلنگ، ممرآباد و منان) | ۶۵ | ۱ نمونه (ممرآباد) | ۲۳ | ---- |
| قوچان (کلاته، علی‌آباد، نظرآباد، اسلام‌آباد و مقصودآباد) | ۱۰۲ | ---- | ۴۲ | ---- |
| حومه مشهد (خواجه‌ربیع، مشهدقلی و تخمرز) | ۹۰ | ---- | ۱۲ | ---- |
| کل نمونه‌ها | ۵۲۶ | ۱۱ نمونه آلوده | ۲۵۳ | ۲۵ |

همانطور که گفته شد تعداد نمونه های آلوده در سال ۱۳۸۷ نسبت به سال ۱۳۸۸ با توجه به بیشتر بودن تعداد نمونه های جمع آوری شده در این سال کمتر است که علت این امر را می توان مربوط به زمستان بسیار سرد سال ۱۳۸۶ دانست که ممکن است باعث کمتر فعال بودن ناقل این ویروس شده باشد. در سال ۱۳۸۷ زمستان ملایمی در منطقه وجود داشت که این خود می تواند باعث تراکم بیشتر جمعیت و فعالتر شدن ناقل ویروس و در نتیجه گسترش بیشتر ویروس در سال ۱۳۸۸ باشد.

آزمون PCR نیز پس از الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۲ درصد باندی را در محدوده ۵۷۰ bp که نشان از آلودگی به ویروس مورد نظر دارد، تکثیر کرد که البته در تمامی نمونه های مورد آزمون این باند مشاهده نشد. علت این مساله را با توجه به این که باند مورد نظر با سایر پرایمرهای اختصاصی و دژنره جمینی‌ویروس‌ها هم تکثیر نشد، می توان این طور بیان کرد: نوترکیبی بالایی که در ویروس‌های DNAدار (از جمله TYLCV) وجود دارد منجر به ایجاد نژادهای جدیدی از این ویروس می شود. لذا بررسی‌ها بایستی جامع‌تر و در منطقه جغرافیایی وسیعتر و لزوماً با صرف هزینه و وقت بیشتری انجام پذیرد تا اگر نژادهای جدیدی از این ویروس در منطقه وجود دارد مشخص شود.

به هر حال وجود ویروس TYLCV در منطقه حتی با درصد کم هم می تواند باعث شیوع گسترش بیماری در سال‌های آینده شود، لذا توجه و بررسی جامع‌تری در مورد این ویروس لازم است تا بتوان از میزان گسترش آن در منطقه آگاهی یافت.

## منابع


۱- بنانج ک.، خیرپور ا.، آهون منش ع. و بورن ب. ۱۳۷۹. کلون کردن وتعیین توالی جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی. چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. صفحه ۱۱۰.

۲- بهجت‌نیا ع.، ایزدپناه ک. باری درای ی. و رضاییان م. ع. (۱۳۸۳). خصوصیات مولکولی و موقعیت تاکسونومیکی جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV). مجله بیماریهای گیاهی، جلد ۴۰، شماره‌های ۱ و ۲. صفحات ۷۷ الی ۹۴.

۳- پاک نیت ع.، بهجت‌نیا ع.، خوارزمی س.، شهبازی م.، ایزدپناه، ک. ۱۳۸۹. خصوصیات مولکولی و ساخت همسانه عفونت زای یک سویه جدید ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی در جنوب ایران. مجله بیماریهای گیاهی، جلد ۴۶، شماره‌های ۴. صفحه ۳۲۱.

۴- عزیزی ع.، مظفری ج. و شمس بخش م. ۱۳۸۵. ردیابی مولکولی جدایه ایرانی ویروس TYLCV در حشره ناقل آن، سفیدبالک Bemisia tabaci. هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. صفحه ۱۸۹.

5- 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.

6- Czosnek H. 1999. Tomato yellow leaf curl virus-Israel, in: Description of Plant Viruses, online in: http://www.dpvweb.net/dpv/dpvnameidx:php

7- Davino S., Davino M. and Paolo Accotto G. 2008. A single-tube PCR assay for detecting viruses and their recombinants that cause tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. Journal of Virological Methods, 147, 93–98