نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، ص. ۲۵۳-۲۵۰

Journal of Plant Protection
Vol. 28, No. 2, Summer 2014, P. 250-253

ردیابی و شناسایی ویروئیدهای مرکبات در برخی ارقام تجاری

لیلا ابراهیمی مقدم[۱*]- سید مهدی بنی هاشمیان[۲]- سید علی الهی نیا[۳]- سیده نجمه بنی هاشمیان[۴]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۱۰/۱۹
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۱۱/۷

چکیده

در این تحقیق، آلودگی ارقام پرتقال تامسون ناول، پرتقال خونی مورو، نارنگی پیج و پوملو وبر نسبت به ویروئیدهای مرکبات مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا گیاهان بالنگ اتراگ (*C. medica*) با اینوکولوم از منشا درختان مادری ارقام مذکور از طریق پیوند پوستک آلوده‌شده و در شرایط کنترل شده دمایی گلخانه نگهداری گردید. پس از آلوده سازی، استخراج RNA به روش SDS-Potassium acetate از بافت اتراگ انجام و RT-PCR با استفاده از صفر آغازگرهای اختصاصی ویروئیدهای Hop Stunt Viroid (HSVd)، Citrus Bent Leaf Viroid (CBLVd)، Citrus Bark Cracking Viroid (CBCVd) و Citrus Dwarfing Viroid (CDVd) انجام‌شد. ردیابی RNA ویروئیدهای مرکبات، با استفاده از سیستم الکتروفورز پی در پی در ژل پلی اکریل آمید (Sequential- PAGE) و هیبریداسیون با استفاده از کاوشگر اختصاصی ویروئید Citrus Exocortis Viroid (CEVd) با استفاده از DIG نشاندار شده انجام شد. نتایج، آلودگی دو رقم پرتقال نسبت به ویروئیدهای مورد بررسی را تایید کرد.

واژه‌های کلیدی: RT-PCR ، مرکبات، HSVd، CBLVd، CDVd ، CBCVd

مقدمه

ویروئیدها مولکول‌های RNA بیمارگر، فاقد پوشش پروتئینی، حلقوی تک رشته ای و کوچک با طول چند صد نوکلئوتید (۲۴۶ الی ۴۰۲ نوکلئوتید) و با ساختمان ثانویه متعدد هستند که هیچ پروتئینی را کد نمی کنند (۳). در حال حاضر ویروئیدها در دو خانواده Pospiviroidae و Avsunviroidae طبقه بندی می‌شوند (۱۰). تاکنون هفت ویروئید مهم در مرکبات گزارش شده است که می‌توان به ویروئید اگزوکورتیس مرکبات (*Citrus Exocortis Viroid*, CEVd)، ویروئید کوتولگی رازک (*Hop stunt viroid*, HSVd)، ویروئید تاخوردگی برگ مرکبات (*Citrus Bent Leaf Viroid*, CBLVd)، ویروئید کوتولگی مرکبات (*Citrus Dwarfing Viroid*, CDVd)، ویروئید شانکر پوستی مرکبات (*Citrus Bark Cracking Viroid*, CBCVd) اشاره نمود. بیماری اگزوکورتیس مرکبات اولین بار در سال ۱۹۴۸ توسط فاوست و کلاتز از کالیفرنیا گزارش شد (۶).

اولین بار زایلوپروز به عنوان بیماری که پایه‌های لیمو شیرین را در کشور فلسطین تحت تاثیر قرار می‌دهد، شناخته و توصیف شد. در سال ۱۹۵۰ یک بیماری با علایم مشابه زایلوپروز رقم orlando tangelo را آلوده کرد و تحت نام کاککسیا در فلوریدا توصیف شد و نشان داده شد که به وسیله پیوند قابل انتقال است (۹). علوی و رحیمیان (۴) درسال ۱۳۹۱ آلودگی توام ویروئید خمیدگی برگ، ویروئید کوتولگی مرکبات (قبلا ویروئید III مرکبات)، ویروئید ترک خوردگی پوست مرکبات (قبلا ویروئید IV مرکبات)، ویروئید۶ مرکبات (قبلا ویروئید OS) و ویروئید کوتولگی رازک را در نمونه‌های آلوده به بیماری‌های نقش حلقوی و پسورز مرکبات گزارش کردند. روحانی و همکاران (۵) نیز در سال ۱۳۹۰ وجود چند ویروئید مرکبات رادر درختان پرتقال آلوده به بیماری پوست صمغی گزارش کردند. علائم بیماری‌های ویروئیدی عمدتا در میزبان‌های حساس ظاهر می‌شوند و در اغلب میزبان‌ها با وجود آلودگی علائم خاصی بروز نمی‌دهند. برای تشخیص ویروئیدها از روش‌های مختلف مانند استفاده از گیاهان محک، الکتروفورز، RT-PCR و هیبریداسیون اسید نوکلئیک استفاده می‌شود (۱۳)، بهترین روش تشخیص ویروئیدهای مرکبات، ترکیب تکنیک های بیولوژیکی و مولکولی است. در این روش ویروئید در گیاه محک بالنگ اتراگ (*C. medica*) در دوره کوتاهی پس از آلوده سازی تکثیر شده و سپس با روش های مختلف مانند الکتروفورز،

۱- دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: ebrahimimoghaddam@stu.um.ac.ir)
۲- استادیار بخش گیاهپزشکی، موسسه تحقیقات مرکبات کشور
۳- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه گیلان
۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد ورامین، پیشوا

RT-PCR و هیبریداسیون اسیدنوکلئیک ردیابی می گردد (۱). روش بهینه سازی تشخیص ویروئیدهای مرکبات از طریق RT-PCR (۷) و هیبریداسیون (۱۱) در سال‌های اخیر گزارش شده‌است. با توجه به اینکه تنها راه انتقال ویروئیدها، پیوندک‌های آلوده و ابزارهای هرس است (۲)، لذا جهت مدیریت، پیشگیری و جلوگیری از انتشار آن‌ها، ارزیابی سلامت ارقام مرکبات نسبت به ویروئیدها به ویژه در منابع اولیه تامین پیوندک جهت تولید نهال مرکبات ضروری است (۱). بر این اساس در این تحقیق آلودگی چهار رقم از ارقام تجاری مرکبات شامل پرتقال تامسون ناول و خونی مورو، نارنگی پیج و پوملو وبر نسبت به بعضی ویروئیدهای مرکبات با روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعات گلخانه‌ای

تعداد ۲۸ نهال بذری راف لمون تهیه و پیوندک‌های گیاه اتراگ (Etrog citron) بر روی آن‌ها به روش اسکنه پیوند زده‌شد. بعد از رشد اتراگ پیوندک تهیه شده از ارقام پرتقال تامسون ناول (Thomson navel sweet orange)، پرتقال خونی مورو (Moro blood orange)، پوملو وبر (Webber Pomelo) و نارنگی پیج (Page mandarin) به روش پیوند پوست با چهار تکرار بر روی آن‌ها پیوند شد. شاهد مثبت از گیاه اتراگ آلوده به ویروئیدهای CEVd، HSVd، CBLVd، CDVd و CBCVd و برای کنترل منفی نهال‌های مایه‌زنی نشده استفاده شد. جهت تسریع در بروز علائم، گیاهان تلقیح شده در گلخانه با دمای ۴۰-۳۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون واکنش پلی‌مراز با رونوشت برداری معکوس (RT- PCR)

پس از آلوده سازی گیاهان محک، استخراج اسید نوکلئیک ویروئید به روشSDS- Potassium acetate (۷ و ۱۲) انجام گرفت. ۵۰۰ میلی گرم بافت برگ در پاکت‌های پلاستیکی به همراه ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (۰/۱ مولار Tris-HCl، ۰/۵ مولار mercaptoethanol، ۵۰ میلی مولار EDTA؛ pH ۸) عصاره گیری شد. عصاره استخراج شده با ۵۰ میکرولیتر SDS (۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد) و سپس۲۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم (۲۰ دقیقه در یخ) تیمار شد. رونشین به وسیله اتانول رسوب‌دهی و تغلیظ شده و در۴۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با استفاده از آغازگر اختصاصی ویروئیدهای HSVd، CBLVd، CDVd و CBCVd بر اساس روش توصیف شده توسط برناد و دوران ویلا (۸)، انجام شد و نتایج در ژل آگاروز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

بررسی و مشاهدات گلخانه‌ای

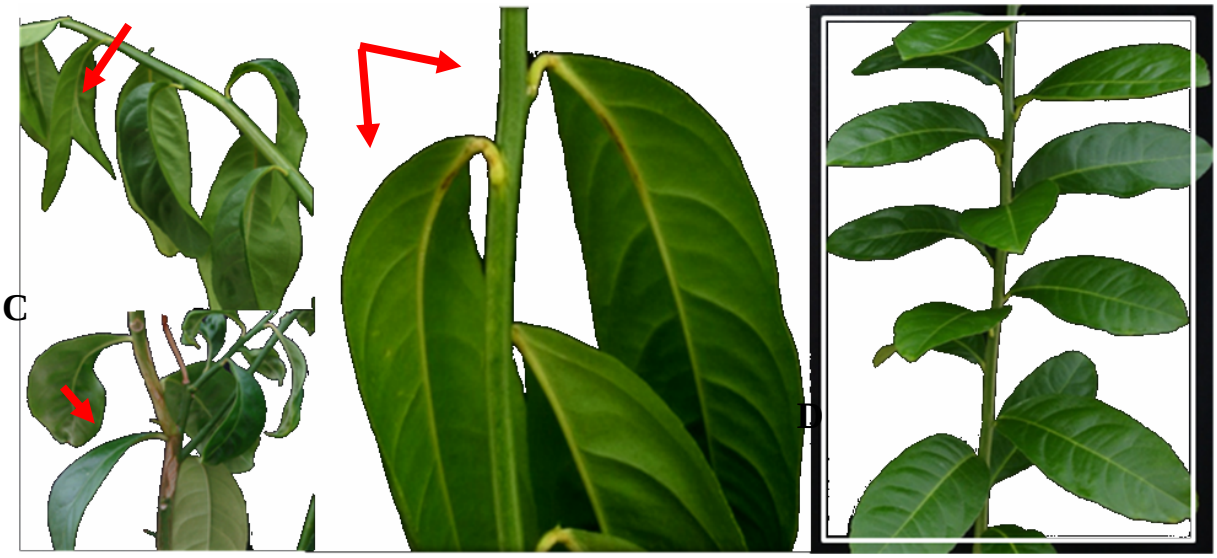
مایه‌زنی گیاهان اتراگ با پیوندک حاصل از ارقام پرتقال تامسون ناول، پرتقال خونی مورو، نارنگی پیج، نارنگی پوملو وکنترل مثبت از طریق پیوند انجام و پس از گذشت سه ماه علایم در شاهد مثبت و گیاهان مایه‌زنی شده با پیوندک با دو رقم تجاری پرتقال تامسون ناول و خونی مورو ظاهر شد. علایم شامل پیچیدگی برگ‌ها از ناحیه رگبرگ اصلی به سمت پایین[1]، روخمشی برگ‌ها، رگبرگ نواری[2] و ایجاد شکاف در روی ساقه از علائم گیاهان آلوده بوده است (شکل ۱). علایم در بالنگ اتراگ با افزایش دمای گلخانه تشدید شد.

ردیابی ویروئیدهای HSVd، CDVd، CBLVd، CBCVd به کمک روش RT- PCR

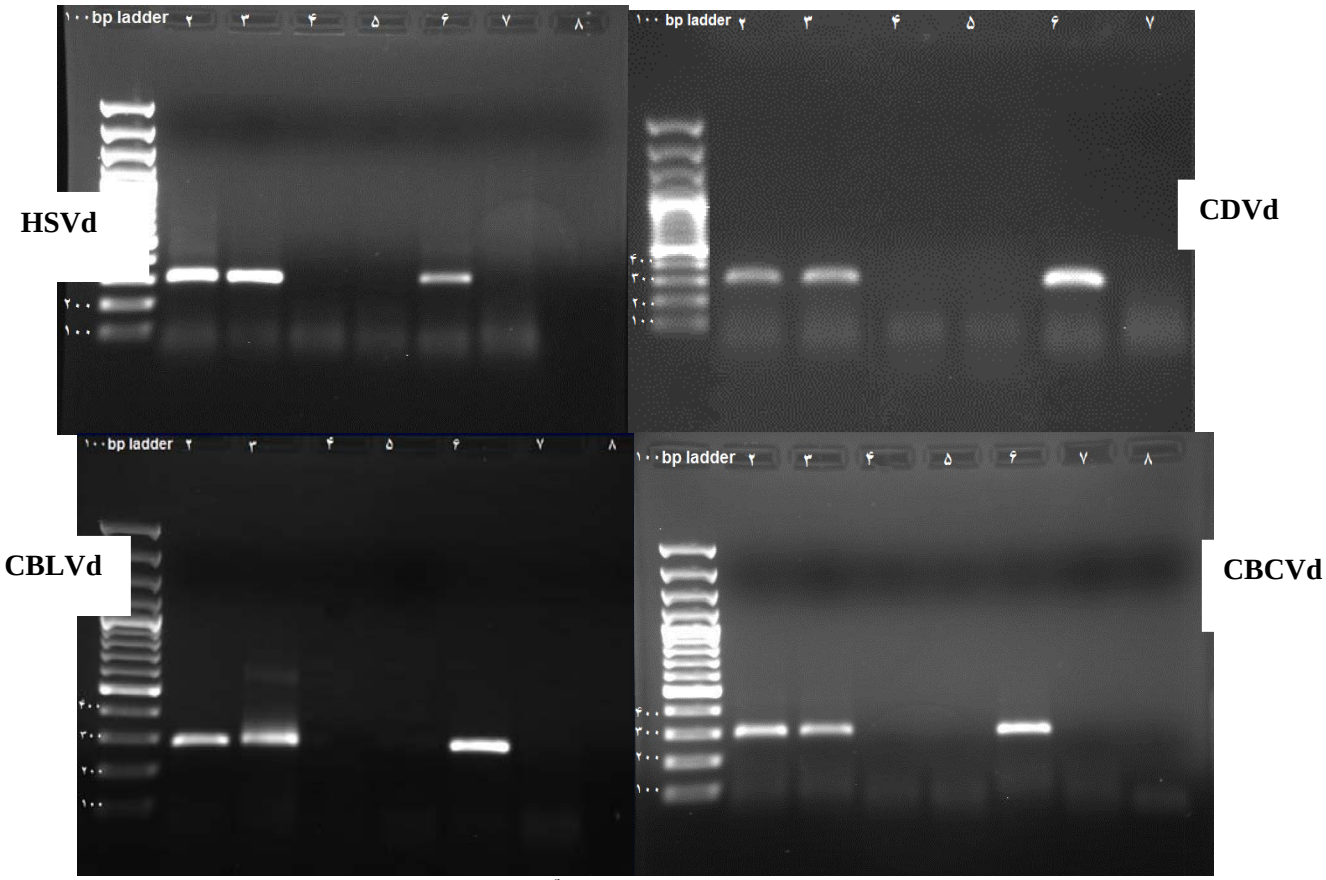
ویروئیدهای HSVd، CBLVd، CDVd و CBCVd در نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) مورد بررسی و آزمون قرار گرفت. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروئید کوتولگی رازک (HSVd)، ویروئید رو خمشی برگ مرکبات (CBLVd)، ویروئید کوتولگی مرکبات (CDVd) و ویروئید شانکر پوستی مرکبات (CBCVd) در نمونه‌های مورد بررسی (اتراگ پیوند شده به تامسون ناول، خونی مورو، نارنگی پیج و پوملو وبر) تکثیر گردیدند. نتایج حاصل از بررسی محصول واکنش PCR در ژل آگارز ۱٪ تکثیر قطعه‌ای به طول حدود ۳۰۰ باز بود (شکل ۳) و نشان داد که ارقام تامسون ناول و خونی مورو بر خلاف نارنگی پیج و پوملو به چهار ویروئید HSVd، CBLVd، CDVd و CBCVd آلودگی داشتند.

در این مطالعه به منظور انجام RT- PCR از روش استخراج SDS- Potassium acetate (۷ و ۱۲) انجام شد. سیستم RT-PCR که برای تشخیص CEVd بکار برده شد ناکارامد بود به همین دلیل شناسایی این ویروئید میسر نشد. ممکن است این عدم موفقیت به دلیل حضور ممانعت کننده‌ها، سنتز ناکارامد cDNA در طول مناسب برای واکنش PCR یا عدم اتصال آغازگرها به رشته الگو به علت تنوع در ژنوم باشد. امروزه دسترسی به آنزیم‌های نسخه برداری معکوس که در درجه حرارت های بالا مانند ۶۵ درجه سانتی گراد فعال هستند، ممکن است محلول مناسبی را جهت تشخیص بعضی از ویروئیدها از جمله CEVd فراهم می‌کند (۸).

1- epinasty
2- Vein banding



شکل ۱- علایم پیچیدگی برگ (A)، رگبرگ نواری و قهوه ای شدن دمبرگ (B) و شکافته شدن ساقه (C) در گیاهان اتراگ پیوند شده به ارقام تامسون ناول و خونی مورو در مقایسه با نهال سالم (D).



شکل ۲- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش RT- PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر ژنوم ویروئید HSVd، CDVd، CBCVd، CBLVd در ژل آگارز ۱ ٪. ستون ۱: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Fermentase)، ستون ۲: اتراگ مایه زنی شده با پیوندک رقم تامسون ناول، ستون ۳: اتراگ مایه زنی شده با پیوندک رقم خونی مورو، ستون ۴: اتراگ مایه زنی شده با پیوندک رقم نارنگی پیچ، ستون ۵: اتراگ مایه زنی شده با پیوندک رقم پوملو، ستون ۶: اتراگ مایه زنی شده با پیوندک اتراگ آلوده به ویروئیدهای مرکبات (کنترل مثبت) ستون ۷: کنترل منفی، ستون ۸: کنترل PCR.

نتایج این بررسی‌ها نشان داد که ارقام تامسون ناول و خونی مورو برخلاف نارنگی پیج و پوملو آلودگی توام به ویروئیدهای HSVd، CBLVd، CBCVd و CDVd داشتند.

در ایران مدت زمان زیادی از نارنج به عنوان پایه مرکبات استفاده می‌شد، اما به دلیل وجود بیماری تریستزا و بروز سرما و یخبندان شدید در بعضی سال‌ها و خسارت شدید به باغات، بعضی از باغداران به پایه‌های مقاوم دیگر از جمله پونسیروس که به سرمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد مقاوم و بیماری تریستزا در آن مخفی (Latent) است، روی آوردند. پونسیروس ظاهرا مزایای زیادی داشت اما بیماری ویروئیدی از جمله اگزوکورتیس که در پایه نارنج مخفی بود، کاشت پونسیروس در زمین‌های آلوده به اگزوکوتیس یا استفاده از پیوندک‌های آلوده باعث شد تا این بیماری ویروئیدی در این پایه تظاهر نماید و خسارت شدیدی را به باغداران تحمیل کند. در حال حاضر نیز به دلیل خسارت سرمای زمستان در سال‌های اخیر استفاده از پونسیروس یا سیترنج به عنوان پایه در حال افزایش است. به دلیل ضعف قرنطینه و سیستم گواهی پیوندک و نهال مرکبات در کشور، مواد گیاهی آلوده به ویروئیدها همچنان توسط تولیدکنندگان نهال عرضه می‌شود. لذا اهمیت تولید نهال‌های عاری از بیماری‌های ویروئیدی و صدور گواهی پیوندک و نهال افزایش می‌یابد.

منابع

۱-ابراهیمی مقدم ل. ۱۳۹۱. ردیابی و شناسایی ویروئیدهای اگزوکورتیس و کاککسیا در برخی ارقام مرکبات. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان. ۹۳ صفحه.

۲- ابراهیمی مقدم ل.، بنی هاشمیان س.م.، الهی نیا س.ع.، ترویجی م. و بنی هاشمیان س.ن. ۱۳۹۱. بررسی خصوصیات مولکولی دو جدایه ویروئید کوتولگی رازک جدا شده از دو رقم تجاری پرتقال تامسون ناول روغنی و خونی مورو. بیستمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ۷-۴ شهریور. شیراز. صفحه ۷۸۹.

۳- جعفر پور ب. و سبک خیز م.ع. ۱۳۸۶. ویروئیدها (کوچکترین عوامل بیماریزای گیاهی). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد ، ۳۰۶ صفحه.

۴- علوی س.م. و رحیمیان ح. ۱۳۹۱. همراهی توام چند ویروئید مرکبات باعلایم بیماریهای پسورز و نقش حلقوی در مرکبات استان مازندران. بیماری‌های گیاهی، جلد۴۸، شماره ۳: ۴۳۹-۴۴۰.

۵- روحانی ن.، علوی س.م. و رحیمیان ح. ۱۳۹۰. وجود چند ویروئید در درختان پرتقال آلوده به بیماری پوست صمغی. بیماری‌های گیاهی، جلد۴۷، شماره۲: ۱۸۹.

۶- منتظری م. ۱۳۶۹. بررسی ویروئید اگزوکورتیس مرکبات در مازندران .پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی، دانشکده کشاورزی کرج، دانشگاه تهران.

7- Astruc N., Marcos J.F., Macquaire G., Cavdresse T., and Pallas V. 1996. Studies of diagnosis of Hop stunt viroid in fruit trees: Detection by molecular hybridization and relationship with specific maladies affecting peach and pear trees. *European Journal of Plant Pathology*. 102: 837- 846.

8- Bernad L. and Duran-Vila N. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes* 20:105-113.

9- Bové J.M. 1995. Virus And Virus- like Diseases of Citrus in The Near East Region. FAO publication. 518 pp.

10- Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S. (Eds). 2003. Viroids. CSRO Publishing, Collingwood, Australia. 370 pp.

11- Murcia N., Serra P., Olmos A., and Duran- Vila N. 2009. A novel hybridization approach of detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*. 23: 25-102.

12-Pallas V., Sanchez- Navarro J.A., Mas P., Canizares M.C., Aparicio F., and Marcos J.F. 1998. Moleculr diagnostic techniques and their possible further use in stone fruit certification schemes. Options Mediterraneennes, Ser. B. 19: 191-207.

13- Roistacher C.N. 1991. Graft-transmissible disease of citrus. Hand book for detection and diagnosis. FAO publication. 286 pp.