ردیابی و بررسی اثر ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها بر جوانه‌زنی دانه گرده آلوده در بادام

Detection and Investigation of *Prunus Necrotic ring Spot Virus* Effect on Germination of Infected Pollen Grain in aLmond

اعظم نیک‌بخت[۱]، بهروز شیران[۲*]، وحید روحی[۳]، سعداله هوشمند[۴] و قباد بابایی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۲

چکیده

ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها (Prunus necrotic ringspot virus, PNRSV)، یکی ازمخرب‌ترین ویروس‌های گیاهی است که می‌تواند باعث کاهش رشد و عملکرد در درختان میوه هسته‌دار شود. در این مطالعه شیوع این بیماری در درختان بادام با هدف شناسایی مطمئن این ویروس با دو روش RT-PCR و الایزا در باغ‌های بادام منطقه‌ی سامان در استان چهارمحال و بختیاری و تاثیر آن بر جوانه‌زنی دانه گرده بررسی شد. ۱۰۰ درخت از ارقام مامایی، ربیع و سفید انتخاب و نمونه‌هایی از آنها در سه ماه فروردین، تیر و مهر در سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸ جمع‌آوری گردید. پس از تایید آلودگی در نمونه‌ها با آزمون الایزا به روش مستقیم و روش RT-PCR، دانه-های گرده رقم سفید تحت شرایط آزمایشگاهی کشت شدند و درصد جوانه زنی دانه‌های گرده آلوده و سالم مقایسه شد. نتایج نشان داد تنها ۳۴ درصد دانه گرده درخت آلوده قادر به جوانه زنی هستند. همچنین مشخص گردید زمان نمونه‌برداری در ردیابی ویروس اهمیت داشته و بهترین زمان نمونه‌برداری برای آشکارسازی ویروس فروردین ماه تعیین شد. مقایسه دو روش RT-PCR و الایزا نشان داد که حساسیت RT-PCR در آشکارسازی بیماری لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها بیشتر از آزمون الایزا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس‌های هسته دارها، جوانه‌زنی دانه گرده، بادام

۱. کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۲ و ۴. استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۳. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۵. پژوهشگر بخش بیماری‌های گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی شهرکرد، شهرکرد

*: نویسنده مسوول Email: be_shiran@yahoo.com

مقدمه

ایران با تولید سالانه ۱۶۷۶۰۹ تن بادام مقام سوم جهان را به خود اختصاص داده است (آمار سازمان فائو، 2011).

استان چهارمحال و بختیاری با دارا بودن امکانات و شرایط زیستی مناسب از جمله آب کافی، اقلیم مناسب و زمین‌های مستعد، یکی از مناطق مهم برای پرورش درختان میوه، به ویژه بادام است *یزدانی* و همکاران (Yazdani *et al*., 2006). محدودیت‌های گوناگونی از جمله بیماری‌های ویروسی کشت بادام در استان را تحت تاثیر قرار می‌دهد که ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها از مهم‌ترین آنها می‌باشد.

ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها، از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای اقتصادی درتمام مناطق کشت درختان میوه بوده و دارای گسترش جهانی است. طبق گزارش *مینک* و *آچیل* (Mink and Aichele, 1984) خسارت این ویروس در آمریکا باعث کاهش ۲۲ درصدی عملکرد، کاهش رشد درخت، تغییر رنگ میوه، تأخیر در بلوغ و رسیدگی میوه می‌شود. بررسی *هلگورا* و همکاران (Heleguera *et al*., 2001) روی درختان بادام آلوده وجود علائمی مانند نکروز ناگهانی، نقاط بافت‌مرده و کلروزه روی برگ، موزائیک برگ، لکه‌حلقوی و نقش‌خطی را نشان می‌دهد. این ویروس می‌تواند سبب کاهش رشد ۱۲ تا ۳۳ درصدی *ماسارت* و همکاران (Massart *et al*., 2008)، کاهش عملکرد ۲۵ درصدی و همچنین تاثیر روی رسیدگی میوه در بسیاری از گونه‌های هسته‌دار شود *سانچز- ناوارو* و همکاران (Sanchez-Navarro *et al*., 2005).

ویروس لکه‌حلقوی بافت مرده هسته‌دارها متعلق به خانواده‌ی Bromviridae و جنس *Ilarvirus* است که از بیشتر گونه‌های درختان میوه هسته‌دار شناخته شده است. این ویروس دارای ماده ژنتیکی RNA تک رشته‌ای مثبت و ژنوم سه‌بخشی می‌باشد.RNA1 وRNA2 مسئول کد کردن دو زیر واحد پروتئینی آنزیم رپلیکاز بوده که در فرآیند رونویسی ویروس نقش دارند. RNA3 ویروس، حاوی دو ژن مسئول سنتز پروتئین حرکتی و پوششی ویروس می‌باشد *هاموند* (Hammond, 2003).

ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها بذرزاد است و می‌تواند از طریق دانه گرده و یا گیاه مادری به بذر منتقل شود. کارآیی انتقال PNRSV از طریق گرده بسیار متفاوت است. *کریزینسکی* و همکاران (Kryczynski *et al*., 1992) انتقال PNRSV در گیلاس از طریق بذر را در حدود ۸۸ درصد گزارش کردند درحالی‌که این عدد در بادام حدود ۹ درصد است *باربا* و همکاران (Barba *et al*., 1986). این ویروس می‌تواند هم درون دانه گرده و هم در سطح آن قرار گرفته و منتقل شود. *آماری* و همکاران (Amari *et al*., 2007) اثرات این ویروس را روی دانه گرده زردآلو کاهش درصد جوانه‌زنی دانه گرده تا ۲۷ درصد ذکر کرده‌اند. *آماری* و همکاران (Amari *et al*., 2009) انتقال PNRSV را از چرخه گامتوفیتی به اسپوروفیتیکی در درخت زردآلو و انتقال ویروس به گیاهچه‌ها،۱۰ درصد گزارش کرده‌اند. *گربر* و همکاران (Greber *et al*., 1992) نشان داده‌اند حشرات گرده‌افشان، مانند تریپس‌ها می‌توانند در انتقال دانه گرده آلوده به PNRSV به گیاهان دیگر نقش موثری داشته باشند.

تشخیص بیماری‌های ویروسی با روش‌های آزمایشگاهی گوناگونی ازجمله گیاهان محک، آزمون الایزا و یا روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام می‌شود که امروزه به‌طور وسیعی برای ردیابی ویروس‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. روش‌های سرولوژیک قادر به تفکیک ایزوله‌های مختلف ویروس نیستند *اشپیگل* و همکاران (Spiegel *et al*., 1996). همچنین کارآیی این روش‌ها به دلیل تغییر غلظت ویروس در بافت با تغییرات فصلی کاهش می‌یابد (*هلگورا* و همکاران، 2001) و نمونه‌برداری برای ردیابی ویروس با آزمون الایزا باید در زمان وجود غلظت بالای ویروس در بافت صورت گیرد *برتوزی* و همکاران (Bertozzi *et al*., 2002). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس یکی دیگر از روش‌های دقیق و نسبتاً ساده برای ردیابی غلظت‌های پایین ویروس است که در مقایسه با روش پیشین از حساسیت بالاتری برخورداراست. در مطالعه‌ای که *موری* و همکاران (Moury *et al*., 2001) انجام دادند، مشخص گردید روش RT-PCR می‌تواند در آشکارسازی ویروس در درختان چوبی در حال خواب هم سودمند باشد و نسبت به آزمون الایزا از حساسیت بالاتری برای ردیابی ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها، برخوردار بوده است. *مکوریا* و همکاران (Mekuria *et al*., 2003) حساسیت دو روش تشخیصی الایزا و RT-PCR برای تعیین ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها را در ۱۷۵ نمونه برگی از بادام‌های استرالیائی در سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۱ بررسی کردند و مشخص شد روش RT-PCR در مقایسه با آزمون الایزا از حساسیت بیشتری برای ردیابی PNRSV برخوردار است.

تحقیقات اندکی روی اثرات این ویروس بر دانه گرده و میزان جوانه‌زنی و زنده‌مانی آن و میزان انتقال ویروس از طریق دانه گرده به نسل بعد به ویژه در ارقام محلی صورت گرفته است. بررسی این موارد در مرحله اول نیازمند آشکارسازی مطمئن و دقیق ویروس می‌باشد. لذا در این مطالعه ضمن ارزیابی روش‌های مختلف ردیابی ویروس در درختان آلوده در

ارقام مامایی، ربیع و سفید، اثراین ویروس بر جوانه‌زنی دانه گرده نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد وروش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق تعداد ۱۰۰ نمونه از درختان بادام ۱۰-۱۲ ساله از ارقام مامایی، ربیع و سفید واقع در منطقه سامان استان چهارمحال و بختیاری بودند. از هر درخت در سه ماه فروردین، تیر و مهر درسال زراعی ۱۳۸۹- ۱۳۸۸ نمونه‌های برگی جمع‌آوری شد. نمونه‌های بساک فقط از رقم سفید و در ماه فروردین و از درختانی که در مطالعات قبلی وجود ویروس در آنها به اثبات رسیده بود، جمع‌آوری گردید. نمونه‌برداری از درختانی با علائم مشکوک به وجود ویروس، مانند نکروز و کلروز برگ، کوچک ماندن برگ‌ها و وجود لکه‌های غربالی روی برگ انجام شد. بدین منظور نمونه‌ها از چهار طرف هر درخت و به‌صورت تصادفی جمع‌آوری گردید. نمونه‌های برگی هر درخت، به‌صورت مجزا درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند و روی یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد انتقال یافتند و پس از انجماد در ازت مایع در دمای°C۸۰- تا زمان استخراج RNA نگه داری شدند.

ردیابی PNRSV با استفاده از آزمون الایزا

آلودگی به ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها با آزمون الیزا به روش مستقیم (DAS-ELISA) مطابق روش *کلارک* و *آدامز* (Clark and Adams., 1977) و با استفاده از آنتی‌بادی شرکت DSMZ (DSMZ, Germany) در سه ماه فروردین، تیر و مهر بررسی شد. نتیجه آزمون الایزا در فاصله ۳۰ تا ۶۰ دقیقه بعد از افزودن محلول سوبسترا به چاهک‌ها و با اندازه‌گیری میزان عددی جذب نوری در هر یک از چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر (Stat Fax 2100) تعیین شد. تمام آزمون‌های سرولوژیک با دو بار تکرار انجام شد. نمونه‌هایی که جذب چاهک آنها درطول موج ۴۰۵ نانومتر بیشتر از دو برابر میانگین جذب چاهک‌های شاهد (گیاه سالم) بود به عنوان نمونه مثبت و آلوده به ویروس در نظر گرفته شد.

ردیابی PNRSV با روش RT-PCR

RNA کل ژنومی از برگ‌های جوان بادام و بساک با روش کلرید لیتیم توصیف شده توسط *چانگ* و همکاران (Chang *et al.*, 1993) و کیت استخراج RNA (Simply Total RNA Extraction, Bionear)، استخراج شد.

در روش کلرید لیتیم، یک گرم از بافت منجمد در ازت مایع ساییده شد و سپس ۵ میلی‌لیتر از بافر استخراج با ترکیب (۲٪ CTAB، ۲٪ PVP، ۰/۱ M Tris-Hcl pH=8، EDTA ۰/۰۲۵ M pH=8، ۲M NaCl) به آن افزوده شد. پس از افزودن محلول ۱:۲۴ (کلروفرم:ایزوآمیل الکل) نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. لایه فوقانی به میکروتیوب جدید انتقال یافت و یک چهارم حجم آن، کلرید لیتیم ۱۰ مولار اضافه شد و به مدت ۱۰ تا ۱۴ ساعت در دمای °C۲۰- قرار گرفت. سپس نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب حاصل در ۲۰۰ میکرولیتر SSTE (۰/۰۱ M Tris-Hcl pH=8، ۰/۵٪ SDS، ۱M NaCl) حل شد و به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۳۰۰۰ بر دقیقه سانتریفوژ گردید. به لایه فوقانی ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص افزوده شد و بعد از آن که نمونه‌ها ۲ ساعت در دمای °C۲۰- قرار گرفتند، ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۴۰۰۰ دور سانتریفوژ گردیدند. رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC حل شد و در دمای°C۸۰- نگهداری شد. جهت حذف آلودگی DNA نمونه‌ها با آنزیم DNase I (Fermentas, EN0521) تیمار شدند. استخراج RNA برای بساک با روش کیت (Simply Total RNA Extraction, Bioner)، و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

Table 1: List of used primers

آغازگر Primer	توالی آغازگر(´۳-´۵) Sequence primer 5'-3'	اندازه قطعه Fragment length	دمای اتصال Annealing temperature	مرجع Reference
P1	5´-GAGCTCTGGTCCCACTCAGG-3´ 5´-TCACTCTAGATCTCAAGCAG-3´	785	57	Spigel *et al.* 2004
P2	5´-GAACCTCCTTCCGATTTAG-3´ 5´-GCTTCCCTAACGGGGCATCCAC-3´	357	60	Sanchez-Navarro *et al*. 2005
P3	5´-GATTGTTGGTTGTCTTTTC-3´ 5´-ATTGCAAATTCGGCAAAAC-3´	1002	52	Nicole Fiore *et al*. 2008
P4	5´-GGCCGTGTATTCCTCGTTTATGTA-3´ 5´- GGCAATAAAATAGGATTC. -3´	311	56	
P5	5´-CTTGAAGGACCAACCGAG-3´ 5´-ATCTGCTAACGCAGGTAAG-3´	351	54	Mekuria *et al*. 2003

ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Fermentas, K1622) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. مخلوط ساخت cDNA شامل ۱ میکروگرم RNA، ۱ میکرولیتر آغازگر تصادفی ۶ جفت بازی، ۱ میلی‌مولار مخلوط dNTPs، ۱×RT buffer، ۲۰ واحد RNase inhibitor، ۱۰۰ واحد آنزیم ترانسکریپتاز معکوس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵°C، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲°C و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در واکنش‌های ساخت cDNA با تغییر غلظت RNA کل از ۵۰۰ نانوگرم به یک میکروگرم و تغییر دمای مرحله واسرشت سازی RNA از دمای ۶۵°C به دمای ۷۵°C شرایط مناسب‌تری برای ساخت cDNA فراهم شد.در این پژوهش از پنج جفت آغازگر که بر اساس توالی ناحیه RNA3 ویروس طراحی شده بودند استفاده گردید (جدول یک).

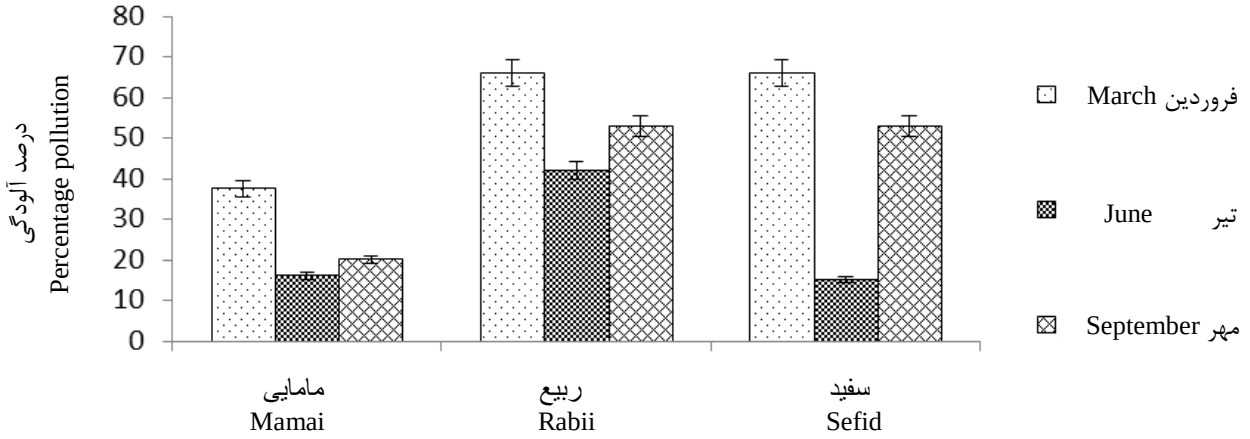
تکثیر قطعه مربوطه در یک واکنش PCR با حجم ۲۰µl شامل: ۱ میکرولیتر cDNA، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۵۰ میکرومولار مخلوط dNTPs، ۱× PCR buffer، ۲ میکرومولار آغازگر و ۱/۲۵ واحد آنزیم Dream Taq Fermentas, (EP0702)، انجام گردید. تکثیر در شرایط واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴°C درجه سانتی‌گراد برای۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو که بسته به نوع آن، زمان و دمای متفاوتی داشت و بسط آغازگر در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و به دنبال آن بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۲ درصد در بافر ۱x TBE در ولتاژ۷۰ ولت الکتروفورز گردید. رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت و با دستگاه ژل داک، ژل عکسبرداری شد. نشانگر DNA استاندارد ۱۰۰ bp ساخت شرکت Fermentas برای تعیین وزن مولکولی نمونه‌ها استفاده شد. قطعه DNA تکثیر شده با جفت آغازگر P1 از ژل آگارز استخراج شده و پس از خالص‌سازی برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. ترادف کامل ژن پروتئین پوششی ویروس در برخی از نمونه‌ها که به‌طور همزمان در مطالعه‌ای توام با بررسی حاضر با آغازگرهای مشابه P1 تکثیر شده بود در بانک ژن قرار گرفت. قابلیت انتقال ویروس در این نمونه‌ها از طریق پیوند در شرایط گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت. پیوندک‌هایی از برخی نمونه‌ها گرفته شده و در شرایط گلخانه به نهال‌های جوان بادام حاصل از بذر پیوند شد و سطح پیوند با پارافیلم پوشانده شد. گیاهان پیوند شده در دمای ۲۵°C به مدت ۶ ماه نگهداری شد و ظهور علایم ویروس به‌صورت نقاط بافت مرده و زردی خفیف مورد بررسی قرار گرفت. وجود ویروس در گیاهان فوق با آزمون الیزا مورد تایید قرار گرفت.

بررسی تأثیر ویروس بر جوانه‌زنی دانه گرده در شرایط *In vitro*

درختان بادام از رقم سفید که آلودگی آنها با دو روش الایزا و RT-PCR هم در این تحقیق و هم در مطالعات انجام شده قبلی مربوط به تنوع ژنتیکی ویروس به اثبات رسیده بود انتخاب شده و بساک آنها به منظور بررسی وجود ویروس با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌هایی که آلودگی آنها در بافت بساک نیز به تایید رسید انتخاب شده و از آنها در بررسی جوانه‌زنی دانه گرده در شرایط *In vitro* استفاده شد. جمع‌آوری دانه گرده از شاخه‌های اطراف هر درخت که شکوفه‌های آنها بسته بود انجام شد و شاخه‌ها روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. شاخه‌های بریده در آزمایشگاه در ظروف حاوی آب قرار داده شدند و پس از باز شدن گل‌ها بلافاصله گرده‌های هر نمونه در ۳ تکرار مطابق دستورالعمل *هیراتسوکا* و همکاران (Hiratsuka *et al*., 2007) به محیط‌کشت حاوی ۱۵٪ ساکارز، ۱۰۰ppm اسید بوریک و ۰/۶٪ آگار انتقال داده شدند. بلافاصله پتری‌دیش‌ها با پارافیلم درزبندی و در انکوباتور به مدت ۱۸ ساعت دمای ۲۰°C و شرایط نور معمولی قرار داده شد. دانه‌های گرده جوانه‌زده در نمونه‌های مربوط به سالم و آلوده با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش شدند.

نتیجه و بحث

ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها علایم متنوعی از جمله، لکه‌غربالی و نقاط بافت‌مرده در سطح برگ، لکه‌حلقوی و پیسه‌ای شدن برگ‌ها، ریز برگی و بدشکلی برگ، بدشکلی، دیررسی و ریزش میوه‌ها ایجاد می‌کند. علایم ایجاد شده توسط ویروس اغلب با علایم ایجاد شده توسط سایر عوامل مشابه بوده و با تغییر فصل و دمای محیط نیز تغییر می‌کند. ردیابی و تایید وجود ویروس در گیاه آلوده در اغلب موارد بر مبنای علایم ظاهری کافی نبوده و استفاده از روش‌های تشخیص آزمایشگاهی ضروری می‌باشد. بررسی نمونه‌های مختلف با روش الایزا نشان داد که ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها در درختان بادام در منطقه مورد مطالعه دارای تغییرات فصلی بوده و بیشترین غلظت ویروس مربوط به نمونه‌برداری فروردین ماه بود. بیشترین نمونه آلوده مربوط به نمونه‌برداری فروردین ماه و کمترین آن مربوط به تیر ماه بود. تعداد نمونه آلوده در نمونه‌برداری مهرماه بیشتر از نمونه برداری تیر ماه بوده ولی همچنان پایین‌تر از نمونه برداری فروردین ماه بود که نشان دهنده تغییر غلظت ویروس در بافت گیاه در ماه‌های مختلف سال بوده و احتمالاً مرتبط با دمای محیط می‌باشد (شکل ۱).

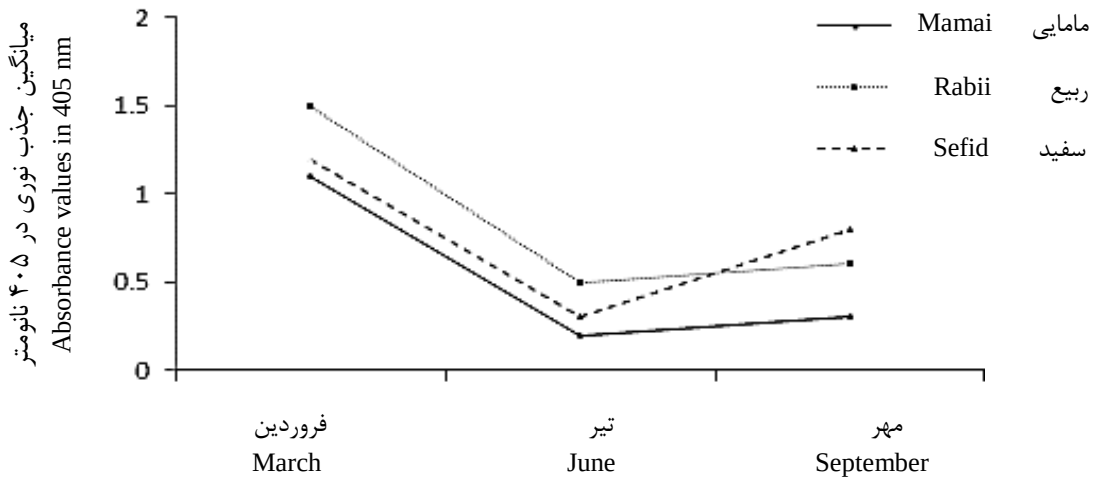


شکل ۱: ردیابی PNRSV با آزمون الایزا در سه ماه فروردین، تیر و مهر در ارقام مامایی، ربیع و سفید در منطقه سامان

Fig. 1: PNRSV detected by ELISA in different time in local cultivars of Mamai, Rabii and Sefid in Saman region

برتوزی و همکاران (2002) نیز در مطالعه‌ای مشابه، اثر زمان نمونه‌برداری را در آشکارسازی PNRSV در درخت بادام مورد بررسی قرار داده‌اند که نشان داده است آزمون الایزا در آشکارسازی ویروس در گلبرگ‌ها و برگ‌های جوان در اوایل بهار کارآییبیشتری نشان می‌دهد، زیرا غلظت ویروس در گیاه تابع دمای محیط بوده و دمای پایین‌تر فرودین باعث می‌شود غلظت ویروس در بالاترین حد ممکن قرار داشته و با کارآییبیشتری توسط آزمون الایزا قابل ردیابی می‌باشد.

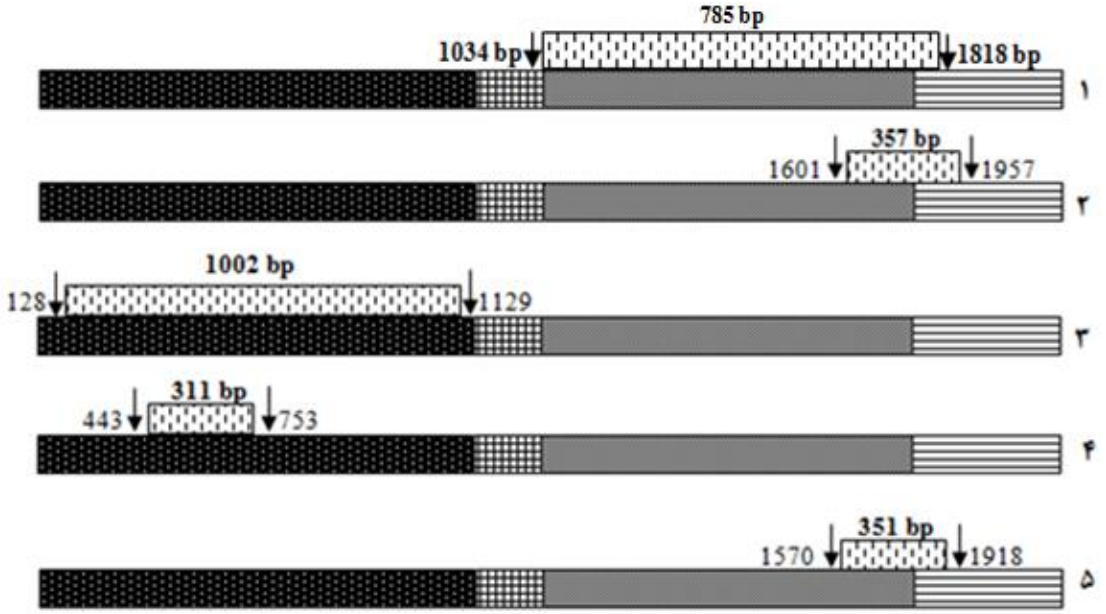
شدت جذب نوری در آزمون الایزا رابطه مستقیمی با شدت علایم در نمونه‌ها داشت، به گونه‌ای که در بین ارقام مامایی، ربیع و سفید، رقم ربیع با بیش‌ترین درصد آلودگی بالاترین جذب نوری را هم دارا بود و حساسیت بیشتری نسبت به سایر ارقام کشت شده نشان می‌داد که می‌تواند نشان دهنده تفاوت در علایم ویروس و میزان خسارت در گیاه آلوده بسته به ژنوتیپ میزبان باشد (شکل ۲).



شکل ۲: میانگین جذب نوری نمونه‌های برگ بادام آلوده به ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها در طول موج ۴۰۵ نانومتر در سه ماه فروردین، تیر و مهر

Fig. 2: ELISA absorbance values in 405nm for infected leaf sample of PNRSV in almond in different time sapling

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق بررسی هر پنج جفت آغازگر طراحی شده بر اساس توالی RNA3 روی نمونه‌های برگی، نشان داد جفت آغازگر P1 و P5 کارآییبهتری در تکثیر جدایه‌های ایرانی ویروس دارد. آغازگرهای P1 و P5 بر مبنای توالی ژن پروتئین پوششی ویروس و قسمتی از ناحیه غیر کد شونده 3'UTR طراحی شده بودند (شکل ۳). ناکارآمدی سایر آغازگرها می تواند به دلیل تنوع در جدایه‌های ایرانی ویروس نسبت به سایر جدایه‌های ویروس باشد زیرا آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق برمبنای ترادف جدایه‌های ویروس مربوط به سایر مناطق دنیا طراحی شده بودند و پیشنهاد می‌شود برای طرای آغازگر از ترادف نواحی حفاظت شده در ژنوم ویروس مانند توالی‌های 3'UTR و 5'UTR استفاده شود.



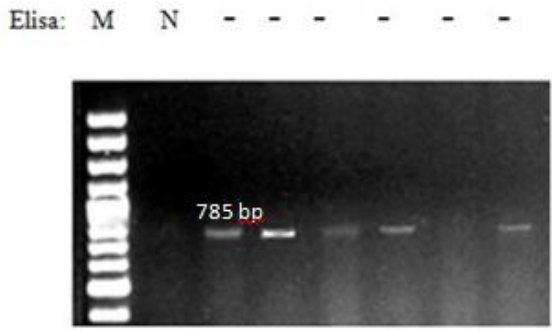
شکل۳: ترادف RNA3 ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها به همراه نواحی کد کننده پروتئین پوششی پروتئین حرکتی ، ترادف حفاظت شده ناحیه غیرکدشونده UTR ' ، قطعه تکثیر شده.۱،۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب محل قرار گرفتن آغازگرهای P4, P3, P2, P1 وP5 روی RNA3 ویروس لکه‌حلقوی بافت مرده هسته‌دارها

RNA3 sequences of PNRSVwith cp gene ,MP gene ,3' UTR , non coding and amplified region and 1,2,3,4 and 5 showed the position of primer standing on RNA3 PNRSV.

مطالعات قبل از جمله مطالعات *مکوریا* و همکاران (2003)، نشان داده است که روش RT-PCR برای آشکارسازی دقیق و مطمئن PNRSV دقت بیشتری نسبت به سایر روش‌ها دارد.

روش RT-PCR آلودگی به PNRSV را در تعداد بیشتری از نمونه‌ها نسبت به آزمون الایزا نشان داد و آلودگی به ویروس در برخی نمونه‌ها که با آزمون الایزا ردیابی نشده بود با استفاده از این روش قابل تشخیص بود. قطعات ژنی مربوط به ویروس که توسط آغازگرهای اختصاصی P1 و P5 تکثیر گردید پس از الکتروفورز روی ژل آگارز به ترتیب نواری با اندازه تقریبی ۷۸۵ و۳۵۱ جفت باز آشکار نمود. به منظور تایید نتایج RT-PCR باند ۷۸۵ جفت بازی مربوط به ویروس که در نمونه درختان بادام آلوده حاصل شده بود (شکل ۴) در پروژه‌ای مستقل تعیین ترادف شده و ترادف آن در بانک ژن (NCBI) با شماره دسترسی KJ573395 قرار داده شد.

در برخی نمونه‌ها اگرچه علایم ظاهری آلودگی به PNRSV به ویژه علائم لکه‌غربالی و پیچیدگی‌های خفیف برگی مشاهده شده بود اما پس از آزمون الایزا شواهدی مبنی بر آلودگی بدست نیامد. در تعدادی ازاین نمونه‌های مشکوک آلودگی توسط RT-PCR تایید گردید. علایم ظاهری در بعضی نمونه‌ها مشاهده نشد ولی آلودگی توسط آزمون‌های الایزا و RT-PCR تایید گردید. بروز علایم در میزبان‌های آلوده به این ویروس مرتبط با شرایط محیطی خاص از جمله درجه حرارت می باشد که نتایج مشابهی در تحقیقات *ماسارت* و همکاران (2008) نیز گزارش شده است. چنین نتایجی موید این است که ردیابی ویروس به ویژه در نهال یا پایه‌های مادری باید با استفاده از تکنیک‌های تشخیصی با دقت بالا همچون RT-PCR انجام شود. نتایج حاصل از مقایسه دو روش الایزا و RT-PCR نشان داد که روش RT-PCR در مقایسه با آزمون الایزا حساسیت بیشتری در ردیابی ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها دارد. مزیت این تکنیک نسبت به آزمون الایزا در ردیابی ویروس در غلظت‌های پایین و دقت تشخیصی بالای ویروس می‌باشد. عامل اصلی که کاربرد روش PCR را با مشکل روبرو می‌کند، آماده کردن اسیدهای نوکلئیک با کیفیت بالا است که در برابر مهارکننده‌های PCR مقاوم باشند، به خصوص در مورد درختانی مانند بادام که استخراج RNA کل از آنها به دلیل وجود مواد مهار کننده امری بسیار مشکل است و از بین بردن ناخالصی‌ها و مواد مهار کننده نیازمند استفاده از بافر مناسب و قوی، زمان و دقت زیاد است (Spiegel *et al* ., 2004).



شکل ۴: آشکارسازی PNRSV با آزمون RT-PCR و آغازگر اختصاصی P1 در نمونه‌های تست شده منفی با آزمون الایزا (M: سایز مارکر bp100، N: نمونه منفی، - : نمونه‌های منفی در آزمون الایزا).

Fig. 4: The detection of PNRSV was confirmed by using specific primer P1 in negative tested samples by ELISA (M is 100bp ladder, N: negative control for PNRSV, -: in negative tested sample by ELISA(M is 100bp ladder, N: negative control for PNRSV, -: in negative tested sample by ELISA)

اثرات ویروس بر جوانه‌زنی دانه گرده گرفته شده از درختان آلوده در مقایسه با دانه گرده درختان سالم بررسی شد. بررسی جوانه‌زنی دانه‌های گرده‌ی آلوده نشان داد که تنها ۳۴ درصد از دانه‌های گرده آلوده روی محیط کشت جوانه زدند در حالیکه این رقم برای دانه‌های گرده سالم ۵۶ درصد بود. مطالعات *آماری* و همکاران (2009) هم نتایج مشابهی نشان داده است که درصد جوانه‌زنی دانه گرده زردآلو را در دو حالت آلوده به PNRSV و سالم تحت شرایط آزمایشگاهی ۲۷٪ و ۶۴٪ گزارش کرده‌اند.

کیفیت دانه گرده بر اساس سرعت جوانه‌زنی آن تعیین می‌شود که به طور مستقیم روی تشکیل میوه اثر می‌گذارد. *بندیکوا* (Benedikova, 1986) همبستگی مثبتی بین سرعت جوانه‌زنی دانه گرده و تولید میوه در برخی ارقام زردآلو را نشان داده است که طبق مطالعات قبلی *مینک* (Mink, 1993) اثرات منفی

ویروس روی کیفیت دانه گرده نمی‌تواند یک عامل محدود کننده برای عدم انتقال آن به بذر باشد. PNRSV می‌تواند در مراحل اولیه گرده را آلوده کند و باعث کاهش بقاء گرده و سازگاری آن شده و همچنین جوانه‌زنی دانه گرده را کاهش داده و رشد آن را مختل کرده و بلوغ تخم را به تاخیر اندازد (Amari *et al.*, 2009). در این مطالعه مشخص شد ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌دارها می‌تواند درصد جوانه‌زنی دانه گرده در بادام را به ۳۴ درصد کاهش دهد. شیوع بالای ویروس در ارقام مورد بررسی در منطقه، اثرات این ویروس بر دانه‌ی گرده و انتقال این ویروس از طریق دانه گرده و همچنین پدیده خودناسازگاری در اکثر ارقام بادام اهمیت توجه به انتقال ویروس از طریق دانه گرده را نشان می‌دهد. انتقال با بذر یک مکانیسم عمومی در انتقال ویروس‌ها است و حدود ۲۰٪ ویروس‌های گیاهی از این طریق می‌توانند منتقل شوند (Hull, 2002). انتقال ویروس از طریق بذر نقش مهمی در انتشار ویروس به ویژه در برنامه‌های اصلاحی دارد و تبادل ژرم پلاسم‌ها و استفاده از بذر به عنوان پایه در این پروسه نقش ویژه‌ای دارد. برنامه‌های اصلاحی و توسعه باغات بایستی با در نظر گرفتن رعایت قوانین قرنطینه نباتی و جلوگیری از ورود نهال‌های آلوده به مناطق جدید توسعه باغات باشد. پیشنهاد می‌گردد برای احداث نهالستان‌ها از پایه های مادری عاری از ویروس استفاده شده و با توجه به درصد بالای آلودگی به ویروس و انتقال آن از طریق بذر توجه ویژه‌ای به پایه‌های مورد استفاده برای تولید نهال شده و استفاده از پایه‌های بذری با دقت بیشتری مورد نظر قرار گیرد که می‌تواند راهکار مناسبی برای کنترل این بیماری ویروسی فراهم آورده و مانع از شیوع بیشتر آن شود.

سپاسگزاری

این پژوهش باحمایت دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد و همکاری مرکز تحقیقات کشاورزی شهرکرد، انجام شده است که بدینوسیله سپاسگزاری می‌گردد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲۲-۲۳ متن انگلیسی مراجعه شود.