

## مقاله کوتاه پژوهشی

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

بهروز جعفرپور<sup>۱\*</sup> - محمدعلی سبک‌خیز<sup>۲</sup>

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 علائم مشکوک به وجود این ویروس در استان خراسان رضوی در تابستانهای ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ به ترتیب ۵۲۶ و ۲۵۳ نمونه بوته گوجه‌فرنگی مشکوک به آلودگی ویروس مذکور از مزارع مختلف استان جمع‌آوری شد و با آزمون سرولوژیکی تاس-آی‌زا (TAS-ELISA) مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام آزمون‌ها مشخص شد که تعداد ۱۱ نمونه در سال ۱۳۸۷ و ۲۵ نمونه در سال ۱۳۸۸ آلوده به TYLCV بودند. پس از استخراج DNA کل از نمونه‌های آلوده، آزمون PCR نیز آلودگی نمونه‌ها را در محدوده ۵۷۰ bp اثبات کرد.

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

## مقدمه

ویروس مشخص شده است (۱، ۲ و ۳). عزیزی و همکاران (۴) این ویروس را در حشره ناقل پس از استخراج DNA کل با روش PCR شناسایی کردند.

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 می‌باشد و توسط سفیدبالک *Bemisia tabaci* به طریق گردشی غیر تکثیری انتقال می‌یابد. ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) در بسیاری از کشورهای مدیترانه‌ای، خاورمیانه، و آفریقای غربی 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 دهه ۱۹۶۰ در اسرائیل و دره اردن مشاهده شد و در حال حاضر در بسیاری از کشورهای 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 نسبتاً زیادی برخوردار است، هرچند دامنه میزبانی آن تنها محدود به گوجه‌فرنگی نیست (۲). خصوصیات مولکولی و موقعیت تاکسونومیک برخی جدایه‌های ایرانی این

## 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 به عمل آمد. در سال ۱۳۸۷ تعداد ۵۲۶ نمونه و در سال ۱۳۸۸ تعداد ۲۵۳ نمونه جمع‌آوری شد. در هر مزرعه سعی می‌شد تا نمونه‌برداری از بوته‌هایی که علائم 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<sup>۳</sup> استفاده گردید. در این روش از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای به عنوان آنتی‌بادی به دام اندازنده و از آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای به عنوان شناسنده استفاده شد. 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.

دستگاه ترموسایکلر (Biometra Tpersonal (Germany) و با برنامه حرارتی یک چرخه  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴ دقیقه به عنوان واسرشته سازی آغازین و به دنبال آن  $35^{\circ}\text{C}$  چرخه متشکل از  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه،  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه،  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۷۲ ثانیه و همچنین  $72^{\circ}\text{C}$  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 TBE ۰/۵x الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، نتایج با دستگاه UV ترانس لومیناتور مشاهده شد. در تمام واکنشهای PCR جهت شاهد منفی از گیاهان سالم گوجه فرنگی 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.

میلی لیتر (PBST) افزوده و پس از خارج کردن محلول بلوکینگ و مرتبه شستشوی پلیت، عصاره مورد آزمایش به هر چاهک اضافه شد و پس از انکوباسیون در حرارت  $4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد به مدت یک شب و شستشوی پلیت، آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای (Mab) که در بافر کانژوگیت (PBST+2%PVP+2% egg albumin) به نسبت ۱/۱۰۰۰ رقیق شده بود به هر چاهک اضافه و به مدت ۲-۴ ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت و شستشو، محلول سوبسترا (پی‌نیتروفنیل فسفات) 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, AWARENESS Tech, Inc., Stat fax-2100, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت.

DNA 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 ۲۰ ng و همچنین ۱۰ pmol از هر پرایمر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در

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

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

پرایمرهای اختصاصی و دژنره جیمینی ویروس‌ها هم تکثیر نشد، می‌توان این طور بیان کرد: نوترکیبی بالایی که در ویروس‌های DNA دار (از جمله TYLCV) وجود دارد منجر به ایجاد نژادهای جدیدی از این ویروس می‌شود. 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 می‌تواند 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.

همانطور که گفته شد تعداد نمونه‌های آلوده در سال ۱۳۸۷ نسبت به سال ۱۳۸۸ با توجه به بیشتر بودن تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده در این سال کمتر است که علت این امر را می‌توان 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 می‌تواند 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 نمونه‌های مورد آزمون این باند مشاهده نشد. علت این مساله را با توجه به این که باند مورد نظر با سایر

## منابع

- ۱- بناج ک، خیرپور ا، آهون منش ع. و بورن ب. ۱۳۷۹. کلون کردن و تعیین 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 تاکسونومیک 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