تشخیص سرولوژیکی و خالص سازی ویروس موزاییک شلغم TuMV از گیاه کلزا

شیرین قربانی [۱*]، نوح شهرائین [۲]، حمیرا دهقانیار [۱،۲]، اکرم سهندی [۲،۱] و رضا پوررحیم [۲]

[۱] تهران، دانشگاه الزهراء، دانشکدهٔ علوم، گروه زیست شناسی

[۲] تهران، موسسهٔ تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، بخش تحقیقات ویروسهای گیاهی

تاریخ دریافت: ۸٤/۹/۵ تاریخ پذیرش: ۸۵/٤/۲۷

چکیده

برگ گیاه زراعی کلزای دارای علائم موزائیک (*Brassica napus* L.) از منطقه خاوه ورامین جمع آوری و در گلخانه روی گیاه شلغم تثبیت گردید. با استفاده از آزمون ساندویچ دوطرفه الیزا (DAS-ELISA) آلودگی به ویروس موزائیک شلغم (*Turnip Mosaic Virus*) در نمونه ها مشخص شد. مایه‌زنی مکانیکی جدایه های TuMV از منطقه ورامین موجب بروز لکه‌های زخم موضعی نکروتیک در توتون رقم وایت بارلی (*Nicotiana tabacum* L cv. White Burley) ، سلمه تره قرمز (*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn) ، موزائیک سیستمیک در اطلسی (*Petunia hybridia* Vilm) ، توتون گلوتینوزا(*Nicotiana glutinosa* L.) ، کدو (*Brassica pepo* L.)، شلغم (*Brassica rapa* L.) و آهار(*Zinnia elegans* L.) گردید. نمونه خالص ویروس در شیب چگالی سوکروز استحصال شد. نتیجه طیف‌سنجی آموده خالص‌سازی‌شده جدایه ورامین با استفاده از نسبت جذب طول موج‌های $\frac{A\ 26(}{A\ 28(}$ برابر با۱/٤۰ می باشد. با تزریق آموده خالص‌شدهٔ ویروس به خرگوش آنتی‌سرم تهیه شد. در بررسی عصاره خام گیاهان آلوده و آموده خالص ویروس، با میکروسکوپ الکترونی پیکره‌های رشته‌ای خمش پذیر رؤیت گردید. جدایه ایرانی ویروس موزائیک شلغم بروش ناپایا و بوسیله شته (*Brevicoryne brassicae L.*) منتقل شد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، ویروس موزائیک شلغم، سرولوژی، خالص‌سازی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۱۲ -۲٦٤۲۵۱۱، پست الکترونیکی: shiringhorbani@yahoo.com

مقدمه

دانه‌های روغنی پس از غلات دومین ذخایر غذایی جهان را تشکیل می‌دهند. گیاه روغنی کلزا پس از سویا و پنبه سومین منبع تولید روغن‌نباتی جهان به شمار می‌رود (۱۷). بنابرگزارش سازمان خواربار جهانی(۳ و ۱۱) سطح زیر کشت کلزا در ایران ۱۷۲٤۰هکتار با تولید۱۷۰۱۰ تن (عملکرد متوسط ۹۸۷ کیلو در هکتار برآورده شده‌است) که معادل ٦۷ درصد تولید متوسط جهانی می‌باشد. با توجه به مصارف خوراکی و صنعتی این محصول و افزایش سطح زیر کشت آن در ایران و نقش مهمی که این محصول می‌تواند در کاهش میزان وابستگی به خارج از کشور در زمینه واردات روغن گیاهی داشته‌باشد، افزایش میزان عملکرد این محصول مورد توجه قرارگرفته‌است.

بیماریهای ویروسی کلزا در کاهش کیفیت و کمیت محصول اهمیت ویژه‌ای دارند و چندین ویروس مختلف می‌توانند گیاه کلزا را آلوده سازند که ویروس موزائیک شلغم *Turnip Mosaic Virus* یکی از شایع‌ترین این عوامل می‌باشد که انتشاری جهانی دارد(٦، ۱۳ ، ۲۲ و ۲٤).

Archive of SID

www.SID.ir

TuMV ویروسی است متعلق به *Potyviridae* و مهم‌ترین و پراکنده‌ترین ویروس آلوده کننده محصولات تیره چلیپائیان (Cruciferae) می‌باشد (۱۹،۲۰ و ۲۷). ویروس موزائیک شلغم در سال ۱۹۷۰ توسط Tomlinson گزارش و توصیف شد (۲٤). علائم آلودگی به این ویروس در گیاه کلزا شامل توقف رشد، عدم تشکیل گل و یا تولید غلافهای پژمرده و چروکیده می‌باشد که در مواردی می‌تواند منجر به انهدام کامل محصول گردد (۲٦و۲۳). در ایران نخستین بار ایزدپناه در ۱۳٦۱ این ویروس را از استان فارس گزارش نمود(۱). در ۱۳٦۲ بهار و همکاران TuMV را از گیاه شب‌بو در اصفهان گزارش نمودند (۲). در ۱۳۸۱ شهرآیین و همکاران آلودگی ویروس موزاییک شلغم را در گیاه کلزا در شیراز، ساری و ورامین گزارش کردند (۲۱). در تحقیق حاضر خصوصیات سرولوژیکی, دامنه میزبانی، چگونگی انتقال و مورفولوژی ویروس TuMV جداشده از گیاه کلزا در ورامین بررسی شد. همچنین آموده خالص ویروس جدایه مزبور تعیین و علیه آن آنتی‌سرم تهیه گردید.

مواد و روشها

منبع ویروس: در بهار سال ۱۳۸۲ نمونه‌های کلزا دارای علایم موزاییک از مزرعه‌ای در منطقه خاوه ورامین جمع‌آوری و به آزمایشگاه مؤسسه تحقیقات و آفات بیماری‌های گیاهی منتقل گردید. نمونه‌های مشکوک به آلودگی ویروس در گلخانه روی گیاه شلغم تثبیت شد. علایم روی شلغم شامل چروک‌شدن برگ‌ها و موزاییک بود. این گیاه بعنوان منبع ویروس TuMV در طول تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون سرولوژیکی: تشخیص ویروس عامل آلودگی نمونه‌های بیمار به‌روش ساندویچ دوطرفه الیزا (Double Antibody Sandwich DAS-ELISA) مطابق روش توصیفی توسط(۷و۱۵) با استفاده از آنتی‌سرم TuMV تهیه‌شده از شرکت DSMZ (برانشوایک–آلمان) انجام گرفت. نمونه‌های آلوده همچنین از نظر آلودگی به ویروسهای موزاییک گل‌کلم (*Cauliflower mosaic virus*,CaMV) , ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus*,CMV)، ویروس موزاییک زرد شلغم (*Turnip yellow mosaicvirus*,TYMV)، ویروس موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic v*irus,BCMV)، و ویروس زرد غربی چغندرقند(*Beet western yellow virus*,BWYV)و ویروس موزائیک تربچه (*Radish mosaic virus*,RaMV) با آنتی‌سرمهای تهیه‌شده از شرکت DSMZ (برانشوایک– آلمان) در آزمون سرولوژیکی الیزا بروش مستقیم مورد بررسی قرارگرفت.

عصاره‌گیری از برگهای جوان با افزودن ۵حجم بافر نمونه PBS، 4/7=pH حاوی ۲ درصد پلی وینیل پیرولیدون انجام شد (14) در هر حفره بشقابک میکروپلیت الیزا– ۱۰۰میکرولیتر عصاره ریخته شد. میزان تغییر ایجادشده در ماده زمینه ٤– نیتروفنیل فسفات در طول موج ٤۰۵ نانومتر بوسیله دستگاه ELISA reader مدل Lab System Multiscom 334(ساخت فنلاند) اندازه‌گیری و با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) و با درنظرگرفتن فرمول $\overline{X}$ SD۳+ آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین شد در این فرمول $\overline{X}$ میانگین جذب و SD انحراف استاندارد مقادیر جذب چاهکهای سالم است. برگهای جوانی که آلودگی به TuMV را در آزمون الیزا نشان دادند بعنوان کنترل مثبت (شاهد آلوده) در سایر آزمونها مورد استفاده قرارگرفتند.

تعیین دامنه میزبانی: برای مطالعه دامنه میزبانی ویروس TuMV جدایه ورامین، عصاره برگ کلزاهای آلوده در بافر ۰/۱ مولار فسفات پتاسیم حاوی ۰/۰۵ درصد EDTA، pH برابر ۷/۵ به نسبت یک گرم برگ در ۵ میلی‌لیتر بافر، به روش معمولی به تعدادی از گیاهان زراعی و غیرزراعی از خانواده‌های چلیپائیان (Cruciperae)، پروانه‌آسا (Legominosae)، اسفناج (Chenopodiaceae)، بادمجان

Archive of SID

www.SID.ir

(Solanaceae)، کمپوزیته (Compositae) و کدو (Cucurbitaceae) بطریق مکانیکی مایه‌زنی شد. از هرگونه ۲۰-۱۰ بوته در سه گلدان از مرحله ٦-۲ برگی مورد تلقیح قرارگرفت و پس از یک هفته تا یک ماه علائم آنها بررسی شد. برخی از این گیاهان با آزمون ELISA با آنتی‌سرم TuMV مورد سنجش قرارگرفتند.

خالص‌سازی: برای خالص‌سازی جدایه ورامین TuMV از برگهای گیاه آلوده توتون گلوتینوزا ۳-۲ هفته پس از مایه‌زنی استفاده شد. خلوص بیولوژیکی این جدایه قبلاً روی میزبانهای سلمه‌تره و توتون وایت بارلی انجام شده‌بود.

در خالص‌سازی از دو روش مختلف استفاده شد:

نخست روش Tomlinson (۲۵) با اندکی تغییرات بکارگرفته شد. برگ های توتون آلوده سه هفته پس از مایه‌زنی در بافر بورات ۰/۵ مولار حاوی ۰/۱ درصد تیوگلیک‌اسید، pH=۷/۵ به نسبت یک‌گرم برگ و ۱/۵میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری شد. شفاف‌نمودن عصاره با افزودن ان-بوتانول (n-butanol) به میزان ۸/۵ درصد حجم و میانگریز در ۸۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۳۰ دقیقه در گران JA-14 دستگاه J2-Mc Beckman (USA) انجام شد. رونشین حاصل مجدداً در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و سپس رونشین حاصله بمدت یک ساعت در ۳۰۰۰۰ دور در دقیقه با گردان (روتور) T-30 دستگاه Spinco L2 50B (USA) میانگریز شده و با حذف رونشین رسوب بدست‌آمده در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر بورات ۰/۰۵مولار pH=۷/۵ روی یخ حل و ۲ ساعت ساکن ماند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور با دستگاه Eppendorf centifuge,5415X میانگریز شد.

رونشین شیری‌رنگ حاصل با میکرو پیپت خارج و بعنوان آموده ویروس نسبتاً خالص در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

در روش خالص‌سازی TuMV با روش Choi, و همکاران(۷) برگهای توتون گلرتینوزا آلوده سه‌هفته پس از مایه‌زنی در بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار حاوی Na EDTA یک‌صدم مولار و تیوگلیکولیک اسید ۰/۱ درصد به نسبت یک گرم برگ در ۱/۲ میلی‌لیتر بافر همگن‌سازی شد و سپس عصاره از دو لایه ململ عبور داده‌شد و بمدت ۱۰دقیقه در ٤۸۰۰ دور در دقیقه میانگریز شد. به‌منظور زلال‌سازی به رونشین حاصله ۱درصد تریتون X-1001- (Triton X-100) و ٤ درصد PEG و NaCl یک‌دهم مولار اضافه و بمدت ۳ ساعت روی Shaker قرارداده شد، و سپس به مدت ۱۵دقیقه در ۷۵۰۰ دور در دقیقه میانگریز گردید. رسوب حاصله در بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار حاوی $MgCl_2$ با pH=۷/۵ تعلیق داده(سوسپانسیون) و بمدت ۱۰دقیقه در ۷۵۰۰ دور در دقیقه میانگریز شد. رونشین بدست‌آمده بمدت ۹۰ دقیقه در ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه با گردان T30 دستگاه Spinco L2 50B میانگریز گردید.

رسوب حاصله در ۲-۱ میلی‌لیتر از بافر قبلی تعلیق داده‌شد و ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه با Eppendorf Centrifuge 5415C میانگریز شد. رونشین حاصل‌شده روی ستون شیب سوکروز ۱۰تا٤۰ درصد برده‌شد و سپس بمدت ۲ ساعت در ۲٤۵۰۰ دور در دقیقه با گردان SW 25.1 دستگاه Spinco L2 50B میانگریز شد و باند ویروسی مشاهده شده در ستون سوکروز با سرنگ کشید و در بافر فسفات پتاسیم یک‌صدم مولار با pH=۷ بمدت ۹۰ دقیقه در ۲٦۰۰۰دور با گردان Type 9D دستگاه Optima- LE- 80K میانگریز شد. رسوب حاصله در یک‌میلی‌لیتر بافرفسفات پتاسیم یک‌صدم مولار pH=۷ حل گشت و بدین‌ترتیب آموده خالص ویروسی بدست آمد. میزان جذب نور آموده در طول موج ۲٦۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت ویروس تعیین گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

الکترون میکروسکوپی: بمنظور بررسی مورفولوژی پیکره‌های ویروس در عصاره خام انساج آلوده و در آموده خالص ویروس از پولکهای مسی و نیکلی دارای پوشش فرموار و غبار کربن استفاده شد. رنگ‌آمیزی منفی پیکره‌ها با محلول یک‌درصد اورانیل‌استات انجام شد. برای مشاهده نمونه‌ها از میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن Zeis EM 900 بخش پاتولوژی بیمارستان بقیه‌الله اعظم تهران استفاده شد.

تهیه آنتی‌سرم و سرولوژی: برای تهیه آنتی‌سرم ۰/۵ میلی‌لیتر از آموده ویروس خالص همراه حجم مساوی از روغن تقویت‌کننده (Freund`s incomplete adjuvant) بصورت سه تزریق عضلانی در عضله ران خرگوش و یک تزریق زیرجلدی به فواصل یک‌هفته صورت گرفت. ده‌روز پس از آخرین تزریق عمل خون‌گیری از رگ کناری لاله گوش خرگوش به میزان کم انجام شد و پس از سرولوژی بروش نشت دوطرفه در ژل آگارز و مشاهده رسوب، خون‌گیری اصلی به میزان ۲۵ میلی‌لیتر از رگ کناری لاله گوش انجام شد و سرم آن جدا گردید و بمدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه میان‌گریز شد و آنتی‌سرم حاصله در حالت یخ‌زده خشک گردید(۱۰). بمنظور نشان‌دادن واکنش بین پیکره‌های ویروس در عصاره خام و همچنین آموده خالص ویروس و آنتی‌سرم تهیه شده علیه جدایهTuMV از ورامین، آزمون نشت دو طرفه در ژل آگارز حاویSDS (٤ و ۱۸) ایمنی‌سنجی نقطه‌ای(DIBA= Dot Immuno Binding Assay) طبق روش (۵)، ایمنی‌سنجی بافتی (TIBA=Tissue Immuno Binding Assay) با روش Makkouk & Comeau1994))(١٦)، و روش تلفیق سرولوژی و میکروسکوپ الکترونی(IEM=Immuno Electron Microscopy) با تکنیکهای بدام‌اندازی و دکوراسیون انجام گرفت(۱۷).

در تکنیک به‌دام‌اندازی با روش leaf-dip پولک‌ها با آنتی‌سرم TuMV در رقت ۱/۱۰۰۰ تیمار گردید. در روش دکوراسیون برای هاله‌زنی پیکره‌ها از رقت۱/۵۰۰ آنتی‌بادی استفاده شد.

خالص‌سازی گاماگلوبولین و تعیین تیتر آن: آنتی‌سرم حاصل بهمراه سولفات آمونیوم اشباع بمدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه میان‌گریز گردید. رسوب حاصل در بافر۱/۲× PBS حل و سه‌بار (بمدت یک‌ساعت، یک شب و دو ساعت) دیالیز گردید. برای تصفیه گاماگلوبولین از ستون کروماتوگرافی حاوی ۳ گرم سلولز(DEAE, Diethylamino ethyl cellulose) در ۲۰ میلی‌لیتر بافر ۱/۲× PBS استفاده شد(۸) میزان جذب استاندارد در OD=۱/٤ تنظیم گردید. تعیین تیتر گاماگلوبولین با استفاده از آزمون الیزای غیرمستقیم (۹) با تغییراتی انجام شد.

بررسی انتقال: بمنظور بررسی امکان انتقال بیماری با شته، از گونه شته *(Brevicoryne brassicae L.)*، جمع‌آوری شده از کلم زینتی و شلغم در تهران و ورامین استفاده شد. شته‌های سالم روی میزبان‌های اطلسی، توتون گلوتینوزا و کلزای عاری از ویروس تکثیر شدند و پس از ۲ساعت تیمار گرسنگی اجازه تغذیه از برگهای اطلسی و توتون گلوتینوزا آلوده به TuMV بمدت ۳-۲ دقیقه داده شد و بهمین مدت روی گیاه سالم قرارداده شدند. متعاقباً گیاهان سم‌پاشی و در گلخانه نگهداری شدند. این گیاهان پس از بروز علائم آلودگی و با انجام آزمون الیزا مورد سنجش قرارگرفتند(۱۵).

نتایج

آزمون الیزا و دامنه میزبانی: نمونه کلزا جمع‌آوری شده از ورامین دارای علائم موزائیک سیستمیک، اختلال در رشد و تشکیل غلاف بذری با آنتی‌سرم اختصاصی TuMV تهیه‌شده از DSMZ آلمان در آزمون الیزا واکنش مثبت نشان داد.

نتایج حاصل از بررسی دامنه میزبانی ویروس TuMV جدایه ورامین در جدول (۱) آمده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ – نتایج مایه زنی مکانیکی جهت تعیین دامنه میزبانی TuMV در شرایط گلخانه

گیاه میزبان	زمان ظهور علائم(روز)	علائم موضعی	علائم سیستمیک	آزمون الیزا
Chenopodium murale Coste & Reyn	۱۰–۷	LCS	–	+
C.amaranticolor L.	۱۰–۵	LCS	–	+
Datura stramonium L.		–	–	–
Nicotiana glotinosa L.	۱۰–۷	LNS	SM	+
N.tabacum L.cv. White Barly	۹–۵	LNS	–	+
N. tabacum L. cv. Rustica	۱۰–۷	LCS	–	+
N. tabacum L.cv. Samsun	۷–۵	LNS	–	+
Petunia hybrida Vilm	۱۲–۷	–	SM	+
Zinnia elegans L.	۱۰–۷	–	SM	+
Capsicum annuum L.		–	–	–
Lycopersicon esculentum L.		–	–	–
Lectuca sativa L.		–	–	–
Pisum sativum L.		–	–	–
Phascolus vulgaris L.		–	–	–
Vigna unguiculata L.		–	–	–
Cucurbita pepo L.	۱۰–۷	LCD	SCD	–
Cucumis sativus L.		–	–	–
Brassica rapa L.	۱۵–۱۰	–	SM	+
B. napus L.	۱۵–۱۰	LNS	VN	+
Cucumis melo L.		–	–	–
B. oleracea L.var.capitata		–	–	–
B. oleracea L. var.sabuda		–	–	–
B. oleracea L. var. gongylodes		–	–	–
B. oleracea L. subsp.italica	۱۰–۷	LNS	–	+
Raphanus sativus L.		–	–	–

توضیح علائم: LCS: Local Chlorotic Spots, LNS: Local Necrotic Spots, SM: Systemic Mosaic, LCD: Local Chlorotic Dotting, SCD: Systemic Chlorotic Dotting, VN: Veinal Necrotic

۱۳ گونه از تیره‌های مختلف گیاهی در شرایط گلخانه به این جدایه آلوده شدند. در شرایط گلخانه تنها گیاهان اطلسی، کدو، آهار، توتون گلوتینوزا و شلغم بطور سیستمیک علائم آلودگی را ظاهر ساختند. در برخی از گیاهان محک علائم بصورت زخمهای موضعی کلروتیک و نکروتیک ظاهر گشت. در کلزا ۱۵–۱۰ روز پس از مایه‌زنی لکه‌های حلقوی سیاه نکروتیک موضعی در برگها ظاهر شد که منجر به نکروز برگ گردید. یک‌ماه پس از مایه‌زنی در

Archive of SID

www.SID.ir

برگهای جوان علائم نکروز رگبرگی قابل مشاهده بود که در نتیجه آن برگها خشک شده و فرو ریختند. در میان چهار رقم کلزای مورد بررسی در گلخانه، در رقم آپشن (Option) علائم بسیار زودتر ظاهر گشت(۷– ۵ روز پس از مایه‌زنی) و در رقم پی .اف. (PF) کندی رشد کاملاً محسوس بود (اشکال۱۱–۱). گیاهان دارای علائم آلودگی به TuMV بصورت زخمهای موضعی یا سیستمیک در آزمون الیزا با آنتی‌سرم TuMV واکنش مثبت داشتند و با آنتی‌سرمهای BWYV, CaMV, TCV TYMV,CMV وRaMV واکنشی نشان ندادند.

شکل ۱– زخم موضعی در سلمه تره قرمز

شکل ۲– موزاییک سیستمیک و چروک شدگی در شلغم

شکل ۳– موزاییک در برگ کدو

شکل ٤– شکستگی رنگ در گلبرگهای اطلسی

شکل ٥– موزاییک سیستمیک ، بدشکلی برگ و کوتولگی در اطلسی

شکل ٦– موزاییک سیستمیک در برگ آهار

شکل ۷– لکه های حلقوی تیرهٔ نکروتیک در برگ کلزا

شکل ۸– موزاییک سیستمیک در توتون گلوتینوزا

خالص‌سازی: طیف جذبی آموده‌های ویروسی خالص‌شده بین طول‌موجهای ۲۲۰ تا ۳۰۰ نانومتر نشان داد که حداکثر میزان جذب آموده نیمه خالص در طول موج ۲۵۹ نانومتر و حداقل میزان جذب در طول موج ۲۳۸نانومتر می‌باشد. $\frac{A\ 260}{A\ 280}$ برای آموده نیمه‌خالص ۱/٦۸ بدست آمد. آموده ویروس خالص حداکثر جذب را در ۲۵۹نانومتر و حداقل میزان جذب را در ۲٤٦نانومتر داشت $\frac{A\ 260}{A\ 280}$ برای آموده ویروس خالص ۱/٤۱ بود. غلظت آموده ویروس در نمونه نیمه‌خالص ۰/٦ میلی‌گرم ویروس در میلی‌لیتر و در آموده ویروس خالص ۰/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می باشد.

www.SID.ir

در مطالعه آموده خالص با میکروسکپ الکترونی، پیکره‌های ویروسی رشته‌ای طویل و خمش‌پذیر با طول تقریبی ۷۰۰ نانومتر مشاهده گردید (شکل ۱۲) همچنین در آزمون الیزای مستقیم آموده ویروسی خالص با IgG تهیه‌شده از DSMZ (برانشوایک- آلمان) واکنش مثبت داشت.

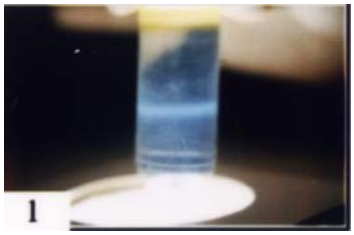
نتایج سرولوژی: عیارسنجی IgG تهیه‌شده در روش الیزای غیرمستقیم، براساس واکنش عصاره توتون با رقتهای مختلف از IgG تهیه‌شده علیه TuMV جدایه ورامین، رقت مناسب آنتی‌بادی را ۱/۳۰۰۰ و آخرین حد رقت IgG را ۱/۱۵۰۰۰نشان داد.

در آزمون الیزای مستقیم با کاربرد عصاره توتون آموده با رقتهای مختلف از IgG و آنتی‌بادی متصل به آنزیم(IgG-E) رقت مناسب ۱/٦۰۰ تعیین گردید.

در آزمونهای ایمنی‌سنجی نقطه‌ای و ایمنی‌سنجی بافتی با کاربرد نمونه‌های آلوده به TuMV لکه‌های بنفش در مقایسه با کنترل سالم بخوبی مشهود بود (شکل۱۳-۱۵). نتایج بررسیهای انجام‌شده برروی تعدادی از گیاهان محک در روش سرولوژیکی دیبا و ایمنی‌سنجی بافتی با نتایج آزمونهای الیزا مطابقت داشت.

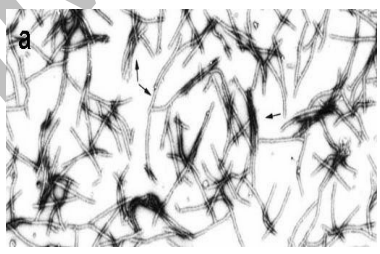
شکل ۹- آزمون ایمنی سنجی نقطه ای

شکل ۱۰- آزمون ایمنی سنجی بافتی

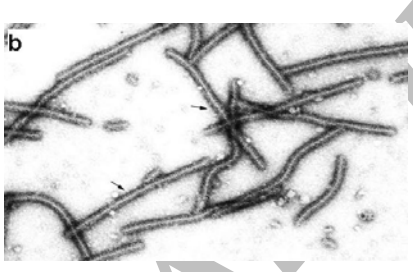


شکل ۱۱- باند ویروسی در شیب سوکروز

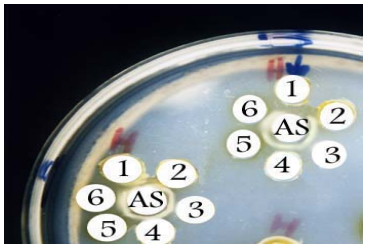
شکل ۱۲- تصویر الکترون میکروسکپی پیکره های ویروس در آموده خالص



شکل ۱۳- تصویر ایمونوالکترون میکروسکپی پیکره های ویروس در عصارهٔ خام توتون گلوتینوزا پس از به دام اندازی به وسیلهٔ آنتی بادی تهیه شده علیه ویروس



شکل ١٤- تصویر ایمونوالکترون میکروسکپی پیکره های ویروس در عصارهٔ خام توتون گلوتینوزا پس از آرایش با آنتی بادی تهیه شده علیه ویروس



شکل ۱۵- آزمون نشت دو طرفه در ژل آگارز : As آنتی سرم بدست آمده بر علیه ویروس . ۱ عصاره گیاه سالم از توتون گلوتینوزا . ۲ عصاره شلغم آلوده . ۳ عصاره توتون گلوتینوزای آلوده .4 عصاره کدوی آلوده . 5 آموده ویروس نیمه خالص . 6 آموده ویروس خالص

Archive of SID
www.SID.ir

در آزمون تلفیق سرولوژی و میکروسکوپ الکترونی با کاربرد تکنیک به‌دام‌اندازی پیکره‌های ویروس TuMV به وضوح با آنتی‌بادی تهیه‌شده علیه این جدایه واکنش نشان دادند.

در ISEM به روش دکوراسیون نیز هاله برجامانده دراطراف پیکره‌های ویروس تیمارشده با آنتی‌سرم تهیه‌شده علیه TuMV نشان‌دهنده واکنش اختصاصی بین ویروس و آنتی‌سرم می‌باشد در آزمون انتشار دوطرفه در ژل آگارز، تشکیل خط رسوبی بین آنتی‌سرم تهیه‌شده و جدایه TuMV ورامین به‌خوبی مشهود بود.

انتقال: شته (*Bracicoryne brassicae* L.) در شرایط گلخانه TuMV جدایه ورامین را به گیاهان اطلسی و توتون گلوتینوزا بطریق ناپایا منتقل نمود. انتقال آلودگی ویروس با شته فوق براساس علائم مشاهده شده در میزبانها و نتایج آزمون الیزای مستقیم به اثبات رسید.

بحث

براساس نتایج آزمونهای سرولوژیکی، بیولوژیکی و مورفولوژیکی ویروس عامل بیماری در کلزا در ورامین ویروس موزائیک زرد شلغم می‌باشد. مقایسه علائم ایجاد شده جدایه ایرانی TuMV در گیاهان محک مورد بررسی با علائم بدست آمده توسط سایر محققین بیانگر وجود شباهت زیاد این جدایه با جدایه ایتالیایی ITAI ، یکی از هشت جدایه معرفی شده توسط Stavlone و همکاران در سال ۱۹۹۸، می‌باشد(۲۳).

ایجاد علائم موزاییک سیستمیک در شلغم، توتون گلوتینوزا، اطلسی، آهار، کدو و علائم زخم موضعی در سلمه‌تره، توتون روستیکا و وایت‌بارلی و عدم ایجاد علائم آلودگی در فلفل، خیار، کاهو، گوجه‌فرنگی، لوبیا، نخودفرنگی، تاتوره، گل کلم، کلم و تربچه مؤید شباهت بیولوژیکی جدایه ورامین و جدایه ITAI می‌باشد. جدایه گزارش‌شده از گیاه *Trigidia pavonia*از نظر ایجاد علائم روی توتون گلوتینوزا، وایت‌بارلی و اطلسی با جدایه ایرانی TuMVمطابقت دارد (۱٦) ولی این جدایه روی کلم، گل‌کلم (کلزا برخلاف جدایه ورامین موزائیک سیستمیک ایجاد می‌کند. همچنین جدایه مراکشی TuMV با ایجاد موزاییک در نخودفرنگی و عدم ایجاد لکه موضعی در سلمه‌تره و کلزا و علائم سیستمیک در توتون گلوتینوزا با جدایه ایرانی تفاوت دارد (۱۲). برای انتساب جدایه ایرانی به ITAI pathotype ویروس موزاییک شلغم، مشابهت بیولوژیکی کافی نمی‌باشد و انجام آزمایشات سرولوژیک، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و روشهای بررسی مولکولی ویروس ضروری می‌باشد.

واکنش سرولوژیکی مثبت TuMV جدایه ورامین با آنتی‌سرم TuMV و عدم واکنش آن با آنتی‌سرمهای ویروس‌های مهم خانواده براسیکا مثل ویروس موزاییک کلم، ویروس زرد شلغم، ویروس زرد غربی چغندرقند، ویروس چروکیدگی شلغم، ویروس موزاییک تربچه و ویروس موزاییک خیار در آزمونهای گوناگون سرولوژیک وجود آلودگی به TuMV را در گیاهان کلزای زراعی ورامین به اثبات رسانید.

در تحقیق حاضر ویروس موزاییک شلغم به دو روش خالص گردید، با استفاده از روش Tomlinson(۲۲) میزان جذب آموده ویروسی در طول موج ۲٦۰ نانومتر برابر با ۱/۵۷۱ و $\frac{A\ 260}{A\ 280}$ برابر با ۱/٦۸ و ۱۵میلی‌گرم ویروس نیمه‌خالص در ازای ۱۰۰گرم بافت حاصل شد. با روش خالص‌سازی فراتر TuMV توسط Choi و همکاران (۷) میزان جذب آموده ویروسی حاصل در طول موج ۲٦۰نانومتر برابر ۰/۵٤۸ و $\frac{A\ 260}{A\ 280}$ برابر با ۱/٤۱ ، و ۳/۳٦ میلی‌گرم ویروس خالص در ازاء ۱۰۰گرم بافت آلوده بدست آمد. غلظت محصول نهایی در مقایسه با نتایج به دست‌آمده قبلی در مورد خالص‌سازی این ویروس قابل قبول می باشد. کاربرد NaEDTA در غلظت ۰/۰۱ مولار و Triton-X-100 بجای کلروفورم و ان- بوتانل و نیز افزودن PEG٪۳٦ و NaCl 1/0 مولار و همچنین کاربرد

Archive of SID

www.SID.ir

بافر تعلیق بجای بافر بورات پیشنهادی روش تاملینسون میزان تجمع (Aggregation) ویروسها را به حداقل رسانده، در نتیجه میزان ویروس بدست آمده افزایش یافت. هردو آموده ویروس از نظر عفونت‌زایی فعال بودند و مایه‌زنی مکانیکی روی گیاهان محک این مطلب را ثابت نمود.

آنتی‌سرم بدست‌آمده حاصل از تزریق آموده خالص ویروسی به خرگوش نیوزیلندی در آزمون کشت دو طرفه در آگار با آنتی‌ژن همولوگ خط رسوبی واضح تشکیل داد. چنین واکنش مشابهی در آزمون این آنتی‌سرم با جدایه رفرانس مشاهده شد. این امر نشان می‌دهد که سویه ایرانیTuMV با جدایه رفرانس قرابت سرولوژیک نزدیک دارد. آنتی‌بادی جداشده از آنتی‌سرم(IgC) دارای تیتر مناسبی بود و تا رقت ۱/۱۰۰۰۰ در آزمون الیزای مستقیم واکنش مثبت نشان داد ولی رقت مناسب برای استفاده از آن دراین آزمون ۱/۳۰۰۰ پیشنهاد می‌گردد. با استفاده از اتصال آنزیم آلکالین فسفاتاز به آنتی‌بادی (IgG-E) رقت مناسب برای استفاده در آزمون الیزا ۱/٦۰۰ توصیه می‌شود. با توجه به تیتر آنتی‌سرمهای بدست‌آمده نتیجه می‌گردد که این ویروس ایمیونوژن خوبی می‌باشد.

انتقال ویروس TuMV با شته *Brevicoryne brassicae* L).) به روش ناپایا مطابق اطلاعات موجود در این زمینه است (۱۵).

وجود ویروس TuMV در گیاه کلزا در ایران، اول بار در سال ۱۳۸۲ توسط شهرآئین و همکاران گزارش شده است. کلزا در اثر آلودگی با TuMV یا موزاییک سیستمیک نشان می‌دهد یا لکه‌های موضعی نکروتیک تیره روی برگهای آن پدید می‌آید که ممکن است منجر به نکروز برگی شود و یا هیچ علائمی در آن ظاهر نمی‌گردد. ظهور این واکنشها بستگی به ویرولانس نژاد ویروس و حساسیت یا مقاومت میزبان دارد (۲٦). در اثر مایه‌زنیTuMV روی چهار رقم کلزا: PF, Hyola 308, Hyola401 و Option در گلخانه سرعت ظهور و تعداد لکه‌های نکروتیک موضعی ازهمه بیشتر بود و برگها پس از چند روز زرد و خشک شده و فرو افتادند. تمام ارقام به‌غیر از PF گل دادند ودر آنها غلاف بذر تشکیل‌شد ولی تعداد دانه‌ها نسبت به گیاه سالم کمتر بود. کندی رشد در رقمPF آلوده کاملاً محسوس بود. این ارقام از کلزاهای اصلاح‌شده تیپ بهاره‌اند که کشت آنها در ایران رایج است. ظاهراً رقم PF به علت عدم گل‌دهی در آلودگی به TuMV خسارت بیشتری را متحمل می‌شود.

اهمیت شناسایی ویروس TuMVعلاوه‌بر تأثیر آن در کاهش کمیت و کیفیت محصول کلزا در این است که می‌تواند به‌عنوان کانون آلودگی برای سایر محصولات کشاورزی عمل نماید. به‌کارگیری ارقام مقاوم کلزا مؤثرترین راه کنترل این بیماری ویروسی شناخته شده‌است که از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی ارزشمند می‌باشد. برای انجام مطالعات دقیق‌تر در زمینه شناسائی چگونگی مقاومت در گیاهان کلزا بررسی فراتر سویه‌های ویروس TuMV در جهت معرفی ارقام مقاوم کلزا راهگشا خواهد بود.

منابع

۱- ایزدپناه، ک. ۱۳٦۱. لیست مشروح بیماریهای ویروسی و شبه ویروسی گیاهان در استان فارس. دانشگاه شیراز. ۱۸۸ صفحه.

۲- بهار، م. دانش، د. دهقان، م. ۱۳٦٤. ویروس موزاییک شلغم در گیاه شب بو. نشریه بیماریهای گیاهی. ۲۱. صفحات ۳۳-۳۹

۳- وزارت کشاورزی، اداره کل آمار و اطلاعات کشاورزی. ۱۳۸۰. آمار نامه کشاورزی.

4-Ball,E.M., 1990 Agar double diffusion plates (ouchterlony):Viruses.pp:111-120.In:Serologycal Methods for detection and Identification of Viral and Bacterial PlantPathology Manual. r. ampton, E.Ball and S.DeBoer ,eds).APS.Press.

Archive of SID
www.SID.ir

5- Banttari,E.E., & P.H.Goodwin, 1985. Detection of potato viruses X and Y by enzyme – linked immuno sorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot – ELISA). Plant Disease 69: 202 – 205

6- Brunt, A. A., 1976. Turnip Mosaic Virus , the cause of mosaic disease of Tigridia pavonia (Iridaceae) Journal of horticulture science, 51: 99-104.

7- Choi, J. K., M. Takanori, & S. Wakimoto. 1977. An improved method for purification of Turnip Mosaic Virus . Annals of Phytopathology Society of Japan., 43: 440-448.

8- Clark,M.F. & A.N.Adams. 1977. Characterization of a micro plate method of enzyme – linked immono sorbent assay for detection of plant viruses. J. Gen. Virol 34: 475 – 483

9- Converse , R.H. & R. R. Martin. 1990. ELISA methods for plant viruses. Pp. 179 – 196. In : Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens , A laboratory manual. R. , Hampton , E. , Ball , ands . De Boer , eds. Aps press.

10- Digkstra, M. T.& P. C. Degagar. 1998. Practical plant virology protocol and exercises. Springer Verlag Publ. 459pp.

11- FAO, 1999. Center of documents and statistics, Ministry of Agriculture, Tehran, Iran

12- Fischer, W. V. & B. E. L. Lockhart. 1976. A Moroccan isolate of Turnip mosaic infection to garden pea and other legumes . Plant disease reporter, 60 (5): 398-401.

13- Gardner, A. & D. Kendrick. 1921. Tomato Mosaic . Purdue Univ. Agric. Exper. Stat. Bull, 261: 24pp

14- Hampton, R., E. Ball, & S.eds. Deboer. 1990. Serologycal Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. APS Press. 389pp.

15- Kennedy , T. S., M. F. Day, & V. F. Eastop. 1962. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. 114pp. London. Common Wealth Inst of Entomology .

16- Makkouk,K.M. & A.Comeau. 1994. Evaluation of various methods for the detection of barley yellow dwarf virus by the tissue – blot immunoassay and its use for virus detection in cereals inoculated at different growth stages. European journal of plant pathology. 100: 71 – 80

17- Milne,R.G. & D–E.lesemann 1984. mmunosorbent electron microscopy in plant virus studies. In : Maramorosch , k. and H . Koprowski (eds), Methods in Virology , Vol. III , pp: 85 – 101. Academic press Inc. , New york , USA.

18- Ouchterlony, O. & L. A. Nilsson. 1978. Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis In "Hand book of Experimental Immunology " (D. M. Weir, ed.) 3rd ed. Chapter 19 . Black Well, Oxford.

19- Shen, S. H. & Z. G. PU, 1965. A preliminary study of the two strains of Turnip Mosaic Virus on rape in Kiangsu province . Acta phytophytac S. N. 4 (1): 35.

20- Walsh,J.A.&J.A.Tomlinson. 1985. Virus infecting winter oilseed rape (Brassica napus ssp. Olifera).Ann.Appl.Biol.,107: 485-495.

21- Shahraeen,N., SH. Farzadfar, & B. Naseri. 2002. Report on incidence of Canola (*Brassica napus*) Viruses in Iran. VIII th International plant Virus Epide miology symposium , pp. 119. Aschersleben, Germany , May 12 – 17

22- Shattuck, V. I., B. Brolley, L. W. Stobbs & E. C. Loucheed. 1989. The effect of Turnip Mosaic Virus infection on the mineral content and storability of field grown rutabaga. Communication in soil science and plant analysis, 20: 581-592.

23- Stavlone, L., D. Alioto, A. Ragozzino & J. F. Laliberte. 1998. Variability among Turnip Mosaic Virus isolates . Phytopathology , 88: 1200-1204.

24- Tomlinson, J. A., 1970. Turnip Mosaic Virus CMI/AAF No8. Description of Plant Viruses.

25- Tomlinson, J. A., 1964. Purification and properties of Lettuce mosaic virus. Ann. Appl. Biol., 53: 95-102.

26- Tomlinson, J. A. & C. M. Ward. 1978. The reactions of swede (Brassica napus) to infection by Turnip Mosaic Virus . Ann. Appl. Biol.89: 61-69.

27- Ward, C. W. & D. D. Shulka. 1991. Taxonomy of Potyviruses. Current problems and some solutions. Inter Virology , 32: 269-296.

Archive of SID

www.SID.ir

Serological identification and Purification of *Turnip Mosaic Virus* (TuMV) in the oil – seed rape

Ghorbani Sh.[1], Shahraeen N.[2] Dehghanyar H.[1,2], Sahandi A.[1,2], and Poor Rahim R.[2]

[1] **Biology Dept., Faculty of Sciences, Alzahra Univbersity, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Plant Virus Diseases Research Dept., Plant pests and Diseases Research Institute, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Brassica napus (Canola) with mosaic symptoms from Varamin (Khaveh) ,was fixed on *B. rapa* in green house. The samples were collected and tested against TuMV by D.A.Sandwich ELISA using specific antibody (DSMZ, Braunschwieg , Germany). Mechanical inoculation of ELISA positive samples caused necrotic local lesions on *Nicotiana tabacum* L cv. White Burley and *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn , systemic mosaic on - *Petunia hybridia* Vilm , *Nicotiana glutinosa* L. , *Brassica p*epo L. , *Brassica rapa* L. , *Zinnia elegans* L. . Purified sample of virus revealed in the sucrose density gradient . Using spectrophotometery at wave lengths of 260 nm and 280 nm the purified virus Varamin of isolate had an absorbance ratio of 1.4. Antiserum was produced by injection of purified virus to New Zealand white rabbit. Electron micrographs of negatively stained row suspension of infected plants and purified virus preparations revealed flexuous , filamentous particles. Iranian isolate virus was transmitted from TuMV – infected plants to healthy plants by *Brevicorye brassica* in a non – persistant manner.

Key Words: colza, *Turnip Mosaic Virus*, serology, purification.

Archive of SID

www.SID.ir