Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤١، ١٣٨٤

استفاده از روشهای تشخیص سریع سرولوژیکی و مولکولی در تفکیک ویروسهای عامل کوتولگی زرد جو *

Use of rapid serological and molecular methods in differentiating barley yellow dwarf viruses

مینا راستگو، بهنام خطابی و کرامت‌اله ایزدپناه**

بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

دریافت ٨٣/٣/١٠ پذیرش ٨٣/١١/١٤

چکیده

تشخیص سریع و دقیق ویروسهای کوتولگی زرد جو (BYDVs) وکوتولگی زرد غلات (CYDV) به منظور مدیریت بیماری حائز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق روش‌های سرولوژیکی و مولکولی برای تشخیص سریع این گروه از ویروسها مورد بررسی قرار گرفتند. در بین روشهای سرولوژیکی Cocktail-ELISA, Indirect- ELISA, DAS-ELISA و TPIA که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، روش TPIA بدلیل صرفه‌جوئی در امکانات، قابلیت استفاده در سطح مزرعه به طور وسیع و روش Cocktail-ELISA بدلیل صرفه‌جوئی در وقت کارائی بالائی داشتند و به خوبی قادر به تفکیک و تمایز سروتیپ‌ها بودند. در تشخیص مولکولی از آغازگرهای عمومی تیره لوتئوویریده استفاده شد که با آموده خالص PAV و RPV به ترتیب قطعاتی به اندازه ١٢٠٠ و ٤٠٠ جفت باز تکثیر کردند. بعلاوه سروتیپ های PAV و RPV به صورت کاملا اختصاصی با آغازگرهای اختصاصی خود واکنش نشان دادند و به

* تحقیقات مربوط به این مقاله بکمک اعتبارات قطب علمی ویروس‌شناسی انجام گرفته است.

** مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

ترتیب قطعاتی به اندازه ۷۰۰ و ۸۰۰ جفت باز از آنها تکثیر شد. تحت شرایط این آزمایش‌ها، روش معمول RT-PCR، برای تشخیص این سروتیپ ها در عصاره خام گیاه کارایی نداشت اما در صورت به دام اندازی این ویروسها با پادتن اختصاصی (IC-RT-PCR) قطعه‌های مورد انتظار تکثیر یافتند.

واژه‌های کلیدی: BYDV-PAV، CYDV-RPV، روشهای تشخیص سریع سرولوژیکی و مولکولی، RT-PCR، IC-RT-PCR، Cocktail-ELISA

مقدمه

شباهت علائم لوتئوویروسهای غلات با علائم ناشی از سایر عوامل زنده و غیرزنده، محدود بودن این ویروسها به بافت آبکشی و غلظت بسیار پائین ویروس در گیاه، تشخیص آنها را اغلب با اشکال روبرو می‌کند. روش‌های مبتنی برویژگیهای بیولوژیکی ویروس از جمله اختصاصیت انتقال با شته، اولین روش‌هایی هستند که در تشخیص و تفکیک لوتئووسروسها به کار رفته اند. این روشها با توجه به اینکه ردیابی و تشخیص ویروس در آنها براساس بروز علائم استوار است، چندان قابل اعتماد نمی‌باشند (D´Arcy 1999). روش‌های معمول سرولوژیکی از قبیل نشت در آگار، رسوب در قطرات ریزو تلفیق سرولوژی و الکترون میکروسکوپی، به علت غلظت بسیار کم این ویروسها در گیاه فاقد کارایی برای تشخیص و تفکیک آنها می‌باشند. با ورود روش ایمنی سنجی آنزیمی (enzyme– linked immunosorbent assay, ELISA) (الیزا) که سرعت و حساسیتی بمراتب بیشتر از روش‌های سرولوژیکی صرف دارند در صحنه مطالعات ویروس‌شناسی (Clark and Adams 1977)، تحولی در ردیابی و تشخیص لوتئوویروس‌ها بوجود آمد. با وجود این برای افزایش سرعت و حساسیت روش، کاهش مقدار مواد مورد استفاده و مناسب کردن روش برای موارد خاص، تمهیدات بسیار متنوعی در روش اولیه الیزا به عمل آمده است (D´ Arcy *et al* .1992، Huth 1999، Torrance 1987، Henry and Francki 1992). روش ایمنی سنجی اثر بافت (tissue print immunoassay, TPIA) که در آن برای تهیه نمونه کافی است

www.SID.ir

Archive of SID

مقطعی از بافت به منظور گذاردن اثر، روی غشاء نیتروسلولز یا نایلون فشار داده شود، از نظر سهولت کار و صرفه جویی در مواد دارای مزیت قابل توجهی است (Huth 1999).

از سوی دیگر تحول بزرگی که با ابداع روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (پی سی آر) (polymerase chain reaction, PCR) بوجود آمد، تشخیص و ردیابی لوتئوویروسها را نیز در برگرفت (Robertson *et al*. 1991) بطوری که امروزه این روش به تنهایی یا در ترکیب با سایر روش‌ها از جمله ایمنی‌سنجی (Immunocapture RT-PCR, IC-RT-PCR) اغلب بصورت روزمره درآمده است.

در ایران روش‌های معمول الیزا به دلایل ذکر شده در بالا برای شناسایی و تفکیک ویروسهای مولد کوتولگی زرد در غلات در موارد زیادی ناموفق بوده است (مطالعات منتشر نشده). هدف از تحقیق حاضر بررسی کاربرد RT-PCR، TPIA، IC-RT-PCR و Cocktail ELISA در ردیابی و شناسایی ویروس‌های مولد کوتولگی زرد در غلات در شرایط ایران است.

روش بررسی

منبع ویروسها و آنتی سرمها

از بوته‌های گندم آلوده به سروتیپ PAV ویروس کوتولگی زرد جو (BYDV-PAV) و یا سروتیپ RPV ویروس کوتولگی زرد غلات (CYDV-RPV) که قبلا" وجود آنها بروش ELISA و TPIA ثابت شده بود در آزمایشهای مقایسه‌ای استفاده شد. همچنین برخی از آزمایشها با استفاده از بوته‌های گندم یا جو مبتلا به زردی که مستقیما" از مزارع فارس (ایج استهبان) جمع‌آوری شده بود، انجام گرفت. آنتی سرمهای مورد استفاده در این تحقیق شامل آنتی سرمهای PAV، MAV و RPV تهیه شده از شرکت Bioreba (سوئیس) و آنتی سرمهای ویژه PAV و RPV تهیه شده در محل (منتشر نشده) بود. ایمونوگلوبولین‌ها طبق روش *کلارک و آدامز* (Clarok and Adams 1977) خالص‌سازی و در غلظت ۱ mg/ml آماده شدند.

آزمون Direct-ELISA

بافت گیاهان به نسبت ۱ به ۵ (وزن به حجم) در بافر نمونه (۰/۲ گرم KCl، ۰/۲ گرم NaN_3، ۱/٤٤ گرم Na_2HPO_4، ۰/۲ گرم NaH_2PO_4، ۸ گرم NaCl، ۰/۵ درصد Tween-20 و ۲

www.SID.ir

Archive of SID

درصد PVP در یک لیتر آب مقطر، pH = ۷/٤) عصاره‌گیری و سپس با کلروفرم بـه میـزان ۳۰ درصد حجم عصاره تیمار شده و در چاهک‌های میکروپلیـت ریختـه شـدند. پـادتن و پـادتن متصل به آنزیم (آلکالین فسفاتاز) ویژه سروتیپ‌های PAV و RPV به نسـبت ۱:۱۰۰۰ در بـافر نمونـــه مـــورد اســـتفاده قـــرار گرفتنـــد. بقیـــه مراحـــل مطـــابق روش *کـــلارک و آدامـــز* (Clark and Adams 1977) انجام شد.

آزمون Indirect-ELISA

بافت گیاهان با بافر ۰/۱ مولار سیترات آمونیوم، pH = ٦/٥، عصاره‌گیـری و عصـاره ماننـد روش الیزای مستقیم با کلروفرم تیمار شد. پادتن ویژه سروتیپ‌ها به نسـبت ۱:۱۰۰۰ و پـادتن ضد خرگوش به نسبت ۲۵۰۰: ۱ در بافر نمونه مورد استفاده قرار گرفتند. بقیه مراحـل مطـابق روش *کانورس و مارتین* (Converse and Martin 1990) انجام گرفت.

آزمون Cocktail-ELISA

این آزمون مانند الیزای مستقیم انجام گرفت با این تفاوت که بلافاصله بعد از اضافه کـردن آنتی‌ژن، پادتن متصل به آنزیم به داخل چاهک اضافه و با نوک میکروپیپت به خـوبی مخلـوط شد. بقیه مراحل مطابق روش *دیکسترا و دیاگر* (Dijkstra and deJager 1998) انجام شد.

آزمون Tissue Print Immunoassay (TPIA)

این آزمون با انجام تغییراتی در روش *هوت* (Huth, 1999) به صورت زیر انجام شد: بعد از خط‌کشی غشاء نیتروسلولزی به مربع‌های کوچک ۱ سانتیمتر مربعی، بافـت آلـوده و سـالم بـا اسکالپل تمیز برش داده شد و سطح بریده به طور مختصر به غشاء فشار داده شد. بعد از تکان دادن غشاء به مدت ٤ ساعت در بافر بازداشتن (blocking buffer)، آنتی‌بادی متصل به آنزیم در بافر بازداشتن به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ رقیق و به آن اضافه و به مدت یک شب در دمای ٤ ºC بهم زده شد. سپس غشاء با بافر شستشو سه بار، هر بار به مدت ۲۰ دقیقه شستشو شد. رنگ‌آمیزی با حل کردن قرص آماده رنگ حاوی نیتروبلوتترازولیوم (nitro- blue tetrazolium, NBT) و ٥-برومو-٤-کلرو-۳-ایندولیل فسفات پارا-تولوئیدین (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt, BCIP) در ۲/٥ میلی لیتر آب مقطر انجام شد. در مواردی که قرص آماده وجـود نداشت ۰/۳۳ میلی‌گرم NBT و ۰/۱۷ میلی‌گرم BCIP به ازای هر میلی‌لیتر در آب مقطر حل و با

www.SID.ir

Archive of SID

مخلوط کن کاملا بهم زده شد (محلول رنگ دقیقا" قبل از استفاده تهیه شد). در مواردی بـرای رنگ‌آمیزی، یک عدد قرص Fast Red (Sigma) در ۲ میلی لیتر محلول تریس ۰/۲ مولار با پـی اچ ۷/۸ حاوی ۲ mM کلرید منیزیوم حل شد و بر روی غشاء قرار گرفت. پس از ظهور رنگ، غشاء در آب مقطر شستشو و برای بررسی دقیقتر از میکروسکوپ استریو استفاده شد.

آزمون RT-PCR

جهت شناسائی ویروس‌ها از آغازگرهای اختصاصی BYDV-PAV و CYDV-RPV طراحی شده توسط Miller و همکاران (ترادف این آغازگرها توسـط پروفسـور میلـر از دانشـگاه آیـوا ارسال شد) و آغازگرهای عمومی طراحی شده بـرای تیـره لوتئوویریـده توسـط *روبرتسـون* و همکـاران (Robertson *et al.* 1991) اسـتفاده گردیـد. تـرادف آغازگرهـای BYDV-PAV بترتیـب ´CTGCCTCAACATCGGAT-3´ و PAV-1[1]: 5´-AATAGGTAGACTCCTCAACA-3´ PAV-2[2]: 5´-GTT CTTAGA TCC AAT GGC AAT-3´ و آغازگرهای CYDV-RPV بترتیب 5´- RPV-1: GTC و ´AGA-3´ RPV-2: 5´- CAG CTA TCTGAA ACCAGT بود.

استخراج آر. ان. ای ویروس

برای آزمون معمول RT-PCR، آر. ان. ای کل (total RNA) گیاه آلوده بـه ویـروس و گیـاه سالم طبق روش *روبرتسون* و همکاران (Robertson *et al.* 1991) به صورت زیر استخراج شد: ابتدا ۰/۵ گرم بافت تازه برگ با ازت مایع به صورت پودر درآورده و با ٤ میلی لیتر بافرگلیسین (M ۰/۱ با پی اچ ۹/۵ حاوی ۰/۱ مولار NaCl) عصاره‌گیری گردید. در مرحله بعد هـم حجـم عصاره، فنول اشباع به آن اضافه و کاملا" مخلوط و در rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شد. به بخش بالائی یک حجم مخلوط فنول- کلروفرم اضافه، مخلوط و ماننـد قبل سانتریفوژ گردید. ۰/۱ حجم استات سدیم M ۳ و ۲/۵ حجم اتانول مطلق به مـایع روئـی اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ºC ۲۰- نگهداری شد. پـس از سـانتریفوژ کـردن در rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه، رسوب حاصل با اتانول ۷۰٪ شستشو و پس از خشک شدن الکـل در ۱۰۰ میکرولیتر آب تیمار شده باDEPC حل شد.

Immunocapture RT-PCR

بـــرای تهیـــه آر. ان. ای ویـــروس بـــرای اســـتفاده در Immunocapture RT-PCR (IC-RT- PCR) با انجام تغییراتی روش *وزیری* و همکاران (Waziri *et al.* 2002) بـا اسـتفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

پادتن‌های چند همسانه‌ای BYDV-PAV و CYDV-RPV به صورت زیر عمل شد: آنتی‌بادی‌های چند همسانه‌ای با رقت ۱ به ۱۰۰۰ در بافر پوششی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به داخل لوله اپندورف ۰/۵ میلی‌لیتری اضافه و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ ° C قرار داده شدند. یکبار شستشو با بافر شستشو (PBS-T) و سه بار شستشو با PBS-T+۲٪ BSA انجام شد. بافت مورد نظر در بافر نمونه (PBS-T+PVP ۲٪) به نسبت ۱ به ۵ عصاره‌گیری و بعد از سانتریفوژ کردن به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm، مایع روئی به میزان µl ۱۰۰ به لوله‌ها اضافه و یک شب در دمای ٤ ° C قرار گرفت. در آخر سه بار شستشو با بافر شستشو (PBS-T) و یک بار شستشو با آب تیمار شده با DEPC انجام شد.

سنتز cDNA از آر. ان. ای ویروس (مرحله RT)

برای سنتز cDNA، مقدار ۲ میکرولیتر اسیدنوکلئیک استخراج شده با ۲ میکرولیتر آغازگر معکوس (۱۰ µ M) و ۸/۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC مخلوط و در دمای ۹۵ ° C به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ٤۰ ° C قرار گرفت و بعد از قرار دادن روی یخ به ٦/۲۵ میکرولیتر آن آمیزه RT شامل ۲/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ mM)، ۵ میکرولیتر بافر RT × ۵، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MMLV (۲۵ u /µl)، ۰/۵ میکرولیتر RNase inhibitor (۵۰u /µl) و ۱۰/۲۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC اضافه و به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ٤۲ ° C قرار داده شد (Waziri *et al*. 2002).

استفاده از کیت بهینه سازی PCR (PCR Optimization Kit)

برای اطمینان از درست بودن ترادف طراحی شده از PCR Optimization Kit (Roche) استفاده شد. نیم میکرولیتر بافرهای ۱ تا ۱٦ همراه با مواد واکنش PCR طبق دستورالعمل سازنده برای تکثیر بکار برده شد. شرایط تکثیر و مقدار مواد تشکیل دهنده آمیزه PCR برای واکنش ۲۵ میکرولیتری به شرح زیر بود: ۰/۷۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی سروتیپ‌ها و یا آغازگرهای عمومی تیره Luteoviridae (۱۰ µM)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR × ۱۰، ۰/۷۵میکرولیتر کلرید منیزیوم ۰/۰۵ مولار، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ m M)، ۰/۲۵میکرولیتر محلول پلیمراز تک (Taq DNA polymerase) با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر، ۱٦/۵ میکرولیتر آب تیمار شده باDEPC و ۳ میکرولیتر دی.ان.ای قالب (الگو).

www.SID.ir

Archive of SID

برنامه دمائی دستگاه PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی شامل ۳ دقیقه در دمای ۹۴° C، سپس ۳۵ سیکل با برنامه ٦٠ ثانیه در ۹٤ ° C، ٦٠ ثانیه در ٦٢ ° C و ۹۰ ثانیه در ۷۲ ° C و یک سیکل انتهائی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ ° C و نگهداری در دمای ۸° C در نظر گرفته شد. واکنش PCR در دستگاه Thermocycler 53330 ساخت شرکت اپندورف انجام شد. بعد از اتمام PCR، ۸ میکرولیتر از هر نمونه همراه با ۳ میکرولیتر بافر رنگ (loading buffer) (۱۰ میلی مولار "کرزول رد" حاوی ۱۰ درصد سوکروز) در ژل آگاروز ۱٪ در ۱۰۰ ولت به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد. رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و رنگبری با آب مقطر صورت پذیرفت. ژل پس از آن بر روی صفحه UV transilluminator بررسی شد و با دستگاه gel documentation از آن عکسبرداری و با کمک مارکرهای مخصوص وزن مولکولی قطعه تکثیر شده تخمین زده شد.

نتیجه

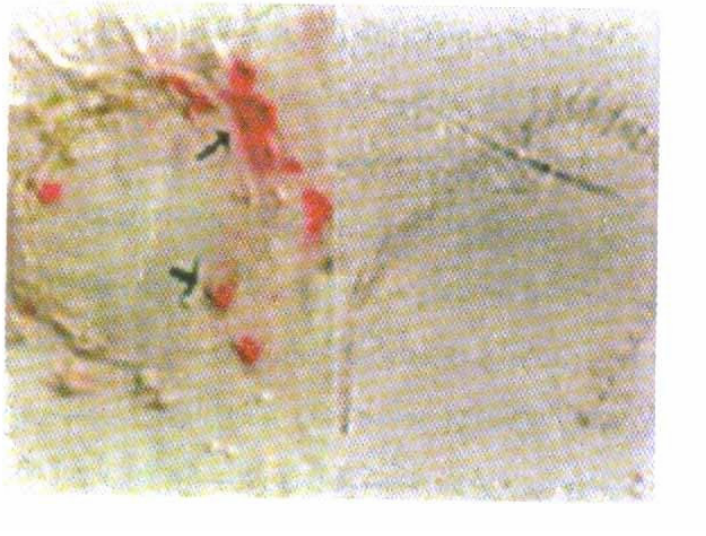
آزمونهای سرولوژیکی

در آزمون TPIA آنتی سرمهای تهیه شده علیه BYDV-PAV و CYDV-RPV تا رقت ۱ به ۱۵۰۰ بخوبی گیاه سالم را از گیاه آلوده تفکیک کردند و هیچ گونه واکنش زمینه‌ای با گیاه سالم مشاهده نشد. در روش رنگ‌آمیزی با Fast Red، بافت آبکشی گیاه آلوده به صورت نقاط قرمز رنگ در مقایسه با آوند آبکشی گیاه سالم به آسانی قابل مشاهده بود (شکل ۱). در روش استفاده از رنگ NBT-BCIP، بافت آبکشی گیاه آلوده به رنگ ارغوانی درآمد و در این مورد نیز بافت آبکشی گیاه سالم بدون واکنش بود (شکل ۲).

روشهای مستقیم و غیر مستقیم الیزا و روش cocktail-ELISA هر سه قادر به شناسائی و تفکیک سروتیپ های مورد بررسی بودند. در بین روشهای ذکر شده cocktail-ELISA نسبت به بقیه روشها بهتر بود. در این آزمون با توجه به اینکه نمونه گیاهی و پادتن متصل به آنزیم با هم اضافه شدند، یک مرحله از آزمون حذف و در مدت زمان انجام آن صرفه جوئی شد.

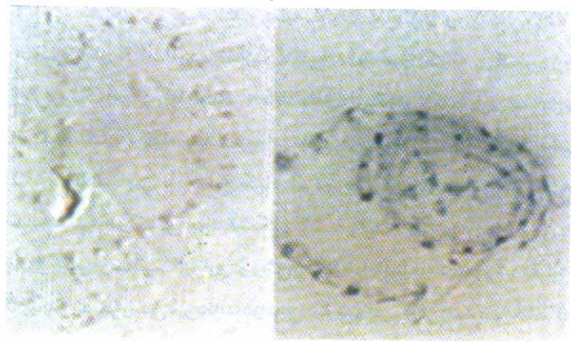
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- نتایج مربوط به TPIA، رنگ‌آمیزی با Fast Red : سمت راست گیاه سالم و سمت چپ گیاه آلوده به BYDV-PAV، پیکانها محل آوند آبکشی رنگ گرفته در نمونه‌های آلوده را نشان میدهند.

Fig. 1. Results of TPIA, staining with Fast Red; Right healthy plant; Left: BYDV-PAV infected palnt. Arrows show stained phoelm tissue in infected samples.



شکل ۲- نتایج مربوط به TPIA، رنگ‌آمیزی با NBT-BCIP: سمت چپ گیاه سالم و سمت راست گیاه آلوده به CYDV-RPV.

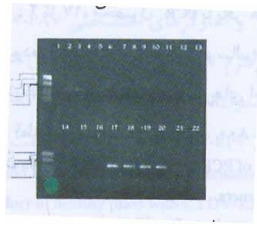
Fig. 2. Results of TPIA, staining with NBT-BCIP. Left, healthy plant. Right CYDV-RPV infected plant.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون RT-PCR

آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای BYDV-PAV و CYDV-RPV قادر بـه شناسـائی این ویروسها در آموده خالص‌ازی شده و عصاره گیاه آلوده بودند و کـاملا" اختصاصـی عمـل کردند. از ١٦ بافر مورد استفاده در کیت بهینه‌سازی، ٨ بافر برای تکثیر BYDV-PAVو دو بـافر بـرای تکثیـر CYDV-RPV نتیجـه بخـش بودنـد (شـکل‌هـای ٣و٤). اسـتفاده از آغازگرهـای اختصاصی BYDV-PAV باعث تکثیر قطعه‌ای از نوکلئیک اسید به اندازه ٧٠٠ جفت بـاز شـد (شکل‌های ٣و ٥). آغازگرهای عمومی تیره لوتئوویریده از این ویروس قطعه‌ای به اندازه ١٢٠٠ جفت باز تکثیر کردند (شکل ٨). در مورد CYDV-RPV با استفاده از آغازگرهـای اختصاصـی قطعه ای به اندازه ٨٠٠ جفت باز تکثیر شد (شـکل ٧). IC-RT-PCR روی عصـاره خـام گیـاه آلوده نیز همین نتایج را داد در حالی که این آغازگرها قادر به تشخیص ویروس در عصاره خام گیاه آلوده در روش معمول RT-PCR نبودند (شکل ٦).



شکل ٣- نتایج استفاده از کیت بهینه‌سازی PCR (PCR Optimization Kit) (با ١٦ بافر مختلف) برای بهینه کردن آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصـی BYDV-PAV در ژل آگـاروز ١٪: سـمت چـپ: مارکر DNA .

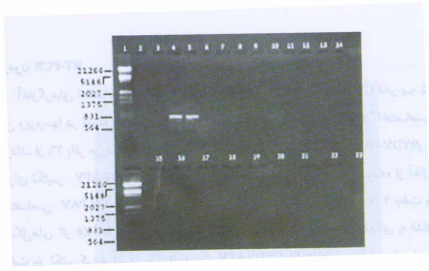
چاهک‌ها بترتیب ١ تا ٧، BYDV-PAV خالص‌سازی شده و ٨ تـا ١٣، کنتـرل گیـاه سـالم بـا استفاده از بافرهای شماره ١ تا ٧ کیت؛ ١٤ تا ٢٢، BYDV-PAV خالص‌سازی شده و بافرهای ٨ تا ١٦ کیت؛ قطعه‌ای به اندازه ٧٠٠ جفت باز با بافرهـای شـماره ٢، ٣، ٨، ١٢، ١٣، ١٤، ١٥، ١٦ تکثیر شده است.

Fig. 3. Gel electrophoresis pattern of PCR Optimization kit (with 16 different buffers) and BYDV-PAV specific primers:

Lanes: 1-7, purified BYDV-PAV and 8-13 healthy control preparation with kit buffers 1-7; 14-22, purified BYDV-PAV with kit buffers 8-16. Note amplification of a 700bp segment with buffers 2, 3, 8, 12, 13, 14, 15 and 16. Left lanes: DNA marker.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- نتایج استفاده از کیت بهینه‌سازی PCR (PCR Optimization kit) (با ١٦ بافر مختلف) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی CYDV-RPV و ویروس خالص‌سازی شده CYDV-RPV در ژل آگاروز ١٪:

چاهک‌ها بترتیب:١، مارکر; ٢ تا ١٧، محصول PCR با بافر های ١ تا ١٦ کیت؛ ١٨ تا ٢٢، محصول PCR بر روی آموده خالص‌سازی شده گیاه سالم؛ ٢٣، محصول PCR با ویروس خالص‌سازی شده BYDV-MAV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی CYDV-RPV. تنها با استفاده از بافرهای ٣ و ٤ قطعه‌ای اختصاصی با اندازه ٨٠٠ جفت باز تکثیر شده است.

Fig. 4. Gel electrophoresis pattern of PCR product using PCR Optimization kit (with 16 different buffers) and CYDV-RPV specific primers.

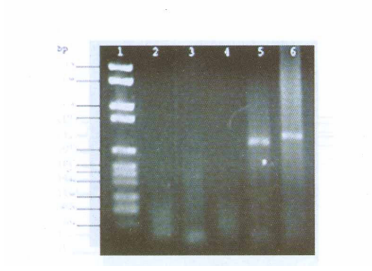
Lanes: 1, marker; 2-17, PCR product of purified virus and buffers 1-16 of the kit; 18-22, PCR product of purified prepparation of healty plant material; 23, PCR product of purified BYDV-MAV with CYDV-RPV specific primers. Only buffers 3 and 4 resulted in amplification of a specific 800bp segment.

بحث

جداسازی لوتئوویروسهای غلات بخاطر شباهتهای سرولوژیکی نزدیکشان یا یکدیگر دشوار می‌باشد. آنتی سرم های چند همسانه ای تهیه شده علیه یک لوتئوویروس ممکن است با سایر اعضاء گروه نیز واکنش نشان دهند. این واکنش در مورد سروتیپ‌های BYDV-PAV و BYDV-MAV که از لحاظ پروتئین پوششی ٧٣ درصد همولوژی دارند، بیشتر صادق است (Lister *et al*. 1985; Henry and Francki 1992). تهیه پادتن‌های یک همسانه‌ای و استفاده از TAS-ELISA و اخیرا" تشخیص با PCR تا حدود زیادی تفکیک ویروس‌های کوتولگی زرد جو و غلات را مقدور کرده است (Miller *et al*. 2002 a, b, D´Arcy *et al*. 1999). در تحقیق

www.SID.ir

Archive of SID



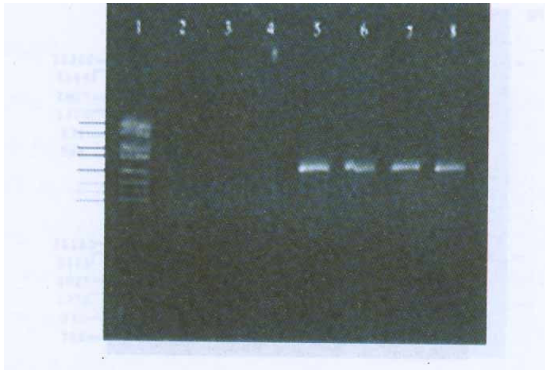
شکل ۵- تأئید هویت CYDV-RPV و BYDV-PAV با روش IC-RT-PCR در ژل آگاروز ۱٪
چاهک‌ها بترتیب:۱، مارکر؛ ۲، محصول PCR گیاه سالم با آنتی‌سرم CYDV-RPV و آغازگرهای اختصاصی CYDV-RPV ؛ ۳، محصول PCR گیاه آلوده به BYDV-PAV با آنتی‌سرم BYDV- PAV و آغازگرهای اختصاصی BYDV-PAV؛ ۵، محصول PCR گیاه آلوده به BYDV-PAV با آنتی‌سرم BYDV-PAV وآغازگرهای اختصاصی BYDV-PAV (حدود ۷۰۰ جفت باز)؛ ٦، محصولPCR از گیاه آلوده بهCYDV-RPV یاآنتی سرمCYDV-RPV و آغازگرهای اختصاصی CYDV -RPV (حدود ۸۰۰ جفت باز) .

Fig. 5. Confirmation of CYDV-RPV and BYDV-PAV identity by immunocapture RT-PCR.
Lanes: 1, Marker; 2, PCR product of healthy plant with CYDV-RPV antiserum and CYDV-RPV specific primers; 3, PCR product of BYDV-PAV infected plant with BYDV-PAV antiserum and CYDV-RPV specific primers; 4, PCR product of CYDV-RPV infected plant with CYDV-RPV antiserum and BYDV-PAV specific primers; 5, PCR product of BYDV-PAV infected palnt with BYDV-PAV antiserum and BYDV-PAV specific primers (a 700bp segment amplified); 6, PCR product of CYDV-RPV infected plant with CYDV-RPV antiserum and CYDV-RPV spectific primers (an 800bp segment amplified).

حاضر، TPIAدر رقتهای پایین آنتی سرم ویژه BYDV-PAV و CYDV-RPV بخوبی قادر به شناسایی گیاهان آلوده بود و هیچ گونه واکنشی با گیاه سالم نشان نداد. برای اطمینان از تشخیص صحیح TPIA، گیاهانی که در TPIA واکنش مثبت نشان داده بودند با IC-RT-PCR بررسی شدند. این دو روش تشخیصی نتایج یکدیگر را تایید کردند. در بررسی متقابل واکنش گیاه آلوده به سروتیپ BYDV-PAV با آنتی سرم ویژه CYDV-RPV و یا گیاه آلوده به سروتیپ CYDV-RPV با آنتی سرم ویژه BYDV-PAV واکنشی مشاهده نگردید. استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID



شکل٦- مقایسه روشهای مختلف PCRبا استفاده از آغازگرهای اختصاصی BYDV-PAV روی ژل آگاروز ۱٪

چاهک‌ها بترتیب ۱، ماکر؛ ۲، محصول IC-RT-PCR گیاه سالم با آنتی‌سرم BYDV-PAV؛ ۳، محصول RT-PCR با آموده خالص‌سازی شده گیاه سالم ٤، محصول PCR عصاره گیاه سالم با آنتی سرم BYDV-PAV به روش one tube IC-RT-PCR؛ ٥، محصول RT-PCR آر. ان. ای کل گیاه آلوده به BYDV-PAV؛ ٦، محصول PCR ویروس خالص شده BYDV-PAV با آنتی‌سرم BYDV-PAV به روش one tube IC-RT-PCR ۷، محصول IC-RT-PCR گیاه آلوده به BYDV-PAV با آنتی‌سرم BYDV-PAV ۸، محصول RT-PCR ویروس خالص شده BYDV-PAV.

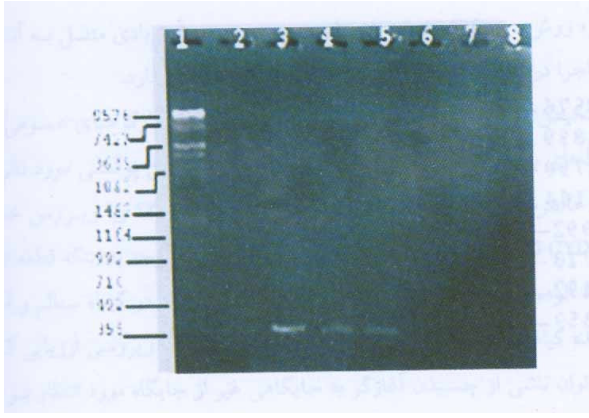
Fig. 6. Comparison of different PCR methods using BYDV-PAV specific primers.

Lanes: 1, marker; 2, IC-RT-PCR product of healthy plant sap with BYDV-PAV antiserum; 3, RT-PCR result with purified preparation of healthy plant ; 4, RT-PCR with healthy plant sap and BYDV-PAV antiserum; 5, RT-PCR product using total RNA from infected plant; 6, PCR product with purified virus and BYDV-PAV antiserum in one tube IC-RT-PCR 7, IC-RT-PCR product of BYDV-PAV infected plant with BYDV-PAV antiserum; 8, RT-PCR product of purified BYDV-PAV.

الکل پلی وینیل (polyvinyl alcohol) در بافر بازداشتن (blocking buffer) زمان اجرای TPIA را به کمتر از یک ساعت کاهش داد و هیچگونه تفاوتی در نتایج مشاهده نگردید. هوت این روش را بصورت گسترده و با کارائی بالائی برای بسیاری از ویروسهای آوندی و غیر آوندی غلات بکار برده است(Huth 1999). استفاده از TPIA بعنوان روشی کارآمد، ارزان و حساس برای تشخیص و ردیابی حائز اهمیت می باشد. عدم نیاز به استخراج عصاره گیاه و قابلیت بالای اجرا در مزرعه، امکان نگهداری طولانی مدت کاغذ نیتروسلولز و یا نایلون تا چندین ماه پس از نقطه‌گذاری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، قابلیت لکه‌گذاری نمونه‌های خشک پس از ۱

www.SID.ir

Archive of SID



شـکل۷– مقایسـهٔ کـارائی روشـهای one-tube IC-RT-PCR، IC-RT-PCR و RT-PCR بـا اسـتفاده از آغازگرهای دژنره تیره Luteoviridae برای CYDV-RPV روی ژل آگاروز ۱٪:

چاهک‌ها بترتیب: ۱، مـاکر؛ ۲، محصـول PCR بـا آمـوده خـالص‌سـازی شـده CYDV-RPV و آنتی‌سرم CYDV-RPV به روش one tube IC-RT-PCR؛ ۳، محصول IC– RT-PCR گیاه آلـوده بـه CYDV-RPV با آنتی‌سرم CYDV-RPV (قطعـه ای بـه انـدازه ٤٠٠ جفـت بـاز تکثیـر شـد) ؛ ٤، محصول IC-RT- PCR آر. ان. ای کل گیاه آلوده به CYDV-RPV با آنتـی‌سـرم CYDV-RPV؛ ٥، محصـول RT-PCR بـا آمـوده خـالص شـده CYDV-RPV؛ ٦، محصـول PCR– RT بـا آمـوده خالص‌سازی شده گیاه سالم؛ ۷، محصول PCR گیاه سالم با آنتی‌سرم CYDV-RPV به روش one tube IC-RT-PCR؛ ۸، محصول IC–RT-PCR عصاره گیاه سالم با آنتی‌سرم CYDV-RPV.

Fig: 7. Comparison of one-tube RT-PCR, RT-PCR and IC-RT-PCR efficiency with degenerate primers of the family Luteoviridae in 1% agarose gel.

Lanes: 1, marker; 2, PCR product pf purified CYDV-RPV with CYDV-RPV antiserum using one tube IC-RT-PCR method (arrow shows, position of a weak 400 bp band); 3, IC-RT-PCR product of CYDV-RPV infected plant sap with CYDV-RPV antiserum; 4, IC-RT-PCR product from CYDV-RPV infected sap; 5, RT-PCR product of purified CYDV-RPV; 6, RT-PCR product of purified healthy plant preparation; 7, PCR product of healthy plant preparation with CYDV-RPV antiserum using one tube-IC-RT-PCR; 8, IC-RT-PCR product of healthy plant asp with CYDV-RPV antiserum.

تا ۲ ساعت خیسـاندن در آب، امکـان اسـتفاده از ایـن روش در منـاطق دورافتـاده، مـزارع و ایستگاههای قرنطینه، امکان بررسی تعدادبسیار زیادی نمونه بطور همزمان و کافی بودن رقت

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۸- نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR مربوط به سروتیپ BYDV-PAV با استفاده از آغازگر دژنره تیره Luteoviridae روی ژل آگاروز ۱٪

چاهک‌ها بترتیب ۱، مارکر؛ ۲، محصول RT-PCR با آموده خالص شده BYDV-PAV؛ ۳، محصول RT-PCR آر. ان. ای کل گیاه آلوده به BYDV-PAV؛ ٤، محصول RT-PCR آموده خالص شده گیاه سالم؛ ٥، محصول RT-PCR آر. ان. ای کل گیاه سالم؛ ٦، محصول RT-PCR عصاره گیاه آلوده؛ BYDV-PAV.

Fig. 7. Gel electrophoresis pattern of RT-PCR products of BYDV-PAV with degenerate Luteoviridae primers

Lanes: 1, Marker; 2, RT-PCR product of purified virus; 3, RT-PCR product using total RNA from infected plant; 4, RT-PCR result with purified preparation of healthy plant; 5, RT-PCR using total RNA from healthy plant; 6, RT-PCR product of BYDV- PAV infected plant sap.

پایین آنتی‌بادی متصل به آنزیم تهیه شده ویژه سروتیپ CYDV-RPV و BYDV-PAV (۱:۱۵۰۰) از مزایای این روش می‌باشد (Camara *et al.* 2000 a, b, Huth 1999). در مواردی روش immunoprinting از لحاظ حساسیت با روش IC-PCR قابل مقایسه بوده است (Camara *et al.* 2000 a). با توجه به مزایای بالا در بررسی و تحت نظر گرفتن این ویروس و نیز با توجه به گسترش سراسری این ویروس، استفاده از این روش توصیه می‌گردد. همچنین برای

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص روزمره روش Cocktail-ELISA به دلیل صرفه‌جویی در آنتی‌بادی متصل بـه آنـزیم و وقت و قابلیت اجرا در یک روز نسبت به روش DAS-ELISA برتری دارد.

در مورد تشخیص مولکولی با آزمون RT-PCR بـا اسـتفاده از آغازگرهـای عمـومی تیـرهٔ لوتئوویریده، قطعه‌ای به اندازهٔ ۵۰۰ bp مربوط به ژن کد کنندهٔ پروتئین پوششی مورد نظر بود ولی با ویروس خالص شده BYDV-PAV قطعه ای به اندازهٔ ۱۲۰۰ bp وبا ویـروس خـالص شده CYDV-RPV قطعه‌ای در حدود ٤٠٠ جفت باز تکثیر شد. با توجه به اینکه قطعه تکثیـر شده تنها در گیاه آلوده و ویروس خالص‌سازی شده مشـاهده شـد و در گیـاه سـالم و آمـوده خالص‌سازی شده گیاه سالم مشاهده نگردید، ماهیت قطعه تکثیر شده ویروسی ارزیابی گردید. این نتایج را می‌توان ناشی از چسبیدن آغازگر به جایگاهی غیر از جایگاه مورد انتظار بـر روی ژنوم دانست. احتمال وقوع این امر با توجـه بـه دژنـره (degenerate) بـودن آغـازگر، افـزایش می‌یابد. اما به طور کلی برای اثبات ماهیت قطعه تکثیر شده بایستی با تعیین ترادف نوکلئوتیدی آن و یا بررسی قطعه تکثیر شده با RFLP و مقایسه آن با نقوش الکتروفورزی الگوی CYDV-RPVو BYDV-PAV اطمینان حاصل کرد.

آغازگرهـای اختصاصـی BYDV-PAV و CYDV-RPV کـه بـرای جدایـه‌هـای آمریکـایی (ایلینوی) طراحی شده بودند بخوبی و به صورت کاملا" اختصاصی جدایه شیراز BYDV-PAV و جدایه ایج CYDV-RPV را با اندازه مورد نظر ۷۰۰ و ۸۰۰ جفت باز تکثیـر کردنـد. نتـایج واکنش متقابل ویروس خالص BYDV-PAV و آغـازگر CYDV-RPV و نیـز ویـروس خـالص CYDV- RPVو آغازگر BYDV-PAV نشان دهنده عملکـرد بسـیار اختصاصـی ایـن آغازگرهـا است. این آغازگرها تنها با ویروس خالص‌سازی شده بررسی شده بودند (مکاتبات شخصی با W.A. Miller.) در حالی کـه در ایـن تحقیـق ایـن آغازگرهـا بـه طـور گسـترده‌ای بـا روش IC-RT-PCR با بافت مزرعه و گلخانه به کار رفتند و قطعهٔ مورد نظر را تکثیر کردند.

IC-RT-PCR که در واقع تلفیقی از روش سرولوژیکی و مولکولی می‌باشـد، روش بسـیار کارآمـدی در تشـخیص و ردیـابی لوتئوویروسـهای غـلات اسـت (Gray *et al.* 2002). در مقایسه‌ای که بین RT-PCR (با آموده خالص‌سـازی شـده CYDV-RPV بـه عنـوان قالـب) و IC-RT-PCR (عصاره خام گیاه آلوده به عنوان قالب) صورت گرفت نتایج یکسانی به دسـت

www.SID.ir

Archive of SID

آمد. علی رغم حساسیت فوق العاده زیاد روشهای ردیابی مولکـولی، روش سـاده RT-PCRبـا آغازگرهای اختصاصی نتوانست وجود ویروس را در عصاره خام گیاهان آلوده تشخیص دهد. این در حالی بود کـه تغلـیظ عصـاره گیـاهی بـا خـالص‌سـازی و همچنـین تلفیـق PCR بـا ایمونولوژی (IC-RT-PCR) بدون تغلیظ عصاره، ویروس را به خوبی در عصاره گیاهان آلـوده ردیابی کردند. لذا به نظر می‌رسد عدم تشخیص ویروسها در روش سـاده RT-PCR بـه دلیـل پائین بودن غلظت قالب (template) یـا از دسـت رفـتن میـزان قابـل تـوجهی از آن در حـین آزمایش باشد. به طور کلی روش TPIA و IC-RT-PCR به خوبی قادر به تشـخیص و ردیـابی ویروس‌های کوتولگی زرد جو و غلات حتی در فصل تابسـتان کـه غلظـت ویـروس بشـدت کاهش می‌یابد، می‌باشند. به نظر می‌رسد این دو روش می‌توانند در تشخیص سریع و گسـترده این ویروسها در کشور مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (53-51) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: مینا راستگو، بهنام خطابی و کرامت‌اله ایزدپناه بخش گیاهپزشکی، دانشـکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

www.SID.ir