کارایی روش‌های سرولوژیک برای تشخیص آلودگیهای ساده و مرکب ویروس‌های مهم سیب‌زمینی در سیستم تولید بذر

Efficiency of serological techniques for detecting single & multiple infections of major potato viruses in the seed production system

داوود امامی‌میبدی، جواد مظفری*، نادعلی بابائیان و حشمت‌اله رحیمیان

بخش ژنتیک و ذخائر توارثی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، مجتمع آموزش عالی علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشگاه مازندران

دریافت ۱۳۸۵/۸/۱ پذیرش ۱۳۸۶/۱۰/۲۶

چکیده

تشخیص آسان، سریع و دقیق ویروس‌های گیاهی با استفاده از حداقل مواد گیاهی، یکی از ارکان اصلی فرآیند تولید هسته‌های اولیه عاری از ویروس در سیستم تولید بذر سیب‌زمینی می‌باشد. دراین تحقیق کارایی دو روش الایزای ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA) و الایزا بر روی غشای نیتروسلولزی (NCM-ELISA) برای تشخیص آلودگی‌های ساده و مرکب چهار ویروس مهم سیب‌زمینی PVS، PVA، PVY و PLRV در ۱۵۰ نمونه مشکوک به آلودگی‌های ویروسی بررسی و مقایسه گردید. از ۱۰۵ نمونه که با استفاده از روش DAS-ELISA آلوده به ویروس تشخیص داده شدند، ۱۴نمونه به PLRV، ۵۶ نمونه به PVY، ۶۱ نمونه به PVA و ۳۸ نمونه به PVS آلوده بودند در حالیکه با استفاده از روش NCM-ELISA، تعداد تشخیص‌های گیاهان آلوده به‌این ویروس‌ها به ترتیب ۸، ۴۵، ۵۹ و ۳۴ بود. از مجموع گیاهان آلوده ٪ ۴۶ دارای آلودگی ساده به یک ویروس و ٪ ۵۴ دارای آلودگی مرکب بودند که ٪ ۸۸ ازآلودگی‌های مرکب مربوط به ترکیب دو ویروس بود. در تشخیص آلودگی‌های

* مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

ویروسی بافت‌های سبز گیاه، روش DAS-ELISA توانست تعداد نمونه آلوده[۶] بیشتری را شناسایی کند. روش DAS-ELISA توانست حداقل با۰/۲ گرم بافت گیاهی با رقت عصاره ۱۰۰: ۱ و روش NCM-ELISA حداقل با ۰/۰۵ گرم بافت گیاهی با رقت عصاره ۱۰: ۱ چهار ویروس فوق را شناسایی کند. در تولید ژرم پلاسم عاری از ویروس، روش NCM-ELISA در تشخیص آلودگیهای ویروسی ازگیاهان درون شیشه‌ای و روش DAS-ELISA در تشخیص آلودگی‌های ویروسی از گیاهان گلخانه‌ای و مزرعه‌ای مناسب تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: DAS-ELISA، NCM-ELISA، تشخیص، ژرم پلاسم عاری از ویروس، ویروس‌های سیب‌زمینی

انواع مختلف سیب‌زمینی میزبان تعداد زیادی از ویروس‌ها هستند. حداقل ۳۷ ویروس سیب‌زمینی زراعی را آلوده می‌کنند (Beemster & de Bokx 1987, Salazar 1996, Jeffries 1998). آلودگی به برخی ازاین ویروسها مانند ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی (Potato leafroll virus) و ویروسهای Y، S و A سیب‌زمینی (به ترتیب Potato Virus Y، Potato Virus S و Potato Virus A) در سرتاسر جهان دیده می‌شود در حالیکه سایر ویروس‌های آلوده کننده هر یک در برخی از مناطق جغرافیایی حائز اهمیت می‌باشد (Brunt 2001). تهیه و کاشت بذور سالم موثرترین روش مدیریت بیماریهای ویروسی سیب‌زمینی محسوب می‌گردد. استفاده از بذور سالم سیب‌زمینی حداقل باعث ٪۳۰ و گاهی تا ٪۳۰۰ افزایش محصول می‌شود (Murashige 1980). تشخیص آسان، سریع و دقیق ویروس‌های گیاهی با استفاده از حداقل مواد گیاهی و در تعداد نمونه زیاد، یکی از ارکان اصلی فرآیند تولید هسته‌های اولیه بذری عاری از ویروس و پیش نیاز اولیه در سیستم تولید بذر سالم سیب‌زمینی می‌باشد. چندین روش برای شناسایی ویروس‌ها وجود دارند (Singh 1999). روش‌های معمول تشخیص ویروسها مانند نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) و روش‌های تلفیق سرولوژی و الکترون میکروسکوپی بسیار حساس و برای تشخیص ویروس‌ها مفیدند ولی بعلت نیازاین روش‌ها به امکانات و تخصص بالا و هزینه زیاد، برای آزمایش تعداد زیادی نمونه در سیستم تولید و گواهی بذر روش مناسبی بشمار نمی‌روند. *بارکر* و همکاران (Barker *et al* 1993) حساسیت دو تکنیک الایزا

Archive of SID

www.SID.ir

(enzyme- linked immunosorbent assay, ELISA) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) را برای تشخیص PVY در غده‌های سیب‌زمینی پس از برداشت و بعد از ۲۰ هفته انبار داری در ۱۰ درجه سانتی‌گراد مقایسه نمودند. برخلاف انتظار ELISA با آنتی‌بادی یک همسانه‌ای توانست در نصف غده‌های انبار شده PVY را تشخیص دهد. اما PCR دراین خصوص نا موفق بود. دراین تحقیق کارایی دو روش الایزای ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (Clark & Adams 1977) و الایزا بر روی غشای نیترو سلولزی برای تشخیص ویروس‌های مهم سیب‌زمینی ازگیاهان مزرعه‌ای، گلخانه‌ای و درون شیشه‌ای، مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

ابتدا ۱۵۰نمونه گیاهی مشکوک به آلودگی‌های ویروسی از ارقام سیب‌زمینی شامل همسانه (کلون) ۶۹، کنبک، آراکی، سانته، المپیا، بانابا، بورن، آگریا، میلوا، دزیره، لیدی روزتا، کنکورد و مارفونا از مزارع تحقیقاتی اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و ایستگاه تحقیقاتی تجرک همدان و اردبیل براساس علائم ظاهری مانند موزائیک، چروکیدگی و نکروز برگ، افتادن برگهای پایینی، لوله شدن برگ‌ها و مضرس بودن حاشیه برگ‌ها جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده برای تعیین میزان آلودگی به ویروس‌های مهم سیب‌زمینی کشور شامل PLRV, PVY, PVS و PVA مورد آزمون قرار گرفتند. برای‌این کار از دو روش DAS-ELISA و NCM-ELISA استفاده شد. نمونه‌گیری از برگ‌های جوان صورت گرفت و برای هر دو روش در یک نوبت عصاره تهیه شد. برای‌این منظور بافت هر نمونه در چهار حجم بافر عصاره‌گیری همگن سازی شده و عصاره استخراج گردید آزمون هر نمونه حداقل در دو تکرار انجام شد و در صورت مشاهده اختلاف فاحش بین تکرارها آزمون مجدد صورت گرفت. آنتی‌سرم‌های مورد استفاده دراین تحقیق چند همسانه‌ای بوده و از مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی (International Potato Center, CIP) تهیه شدند. آزمون DAS-ELISA برای هر ویروس بر مبنای روش *کلارک و آدامز* (Clark & Adams 1977) انجام شد. هر آزمون شامل نمونه‌های گیاهی مورد آزمون به همراه شاهدهای مثبت هر چهار ویروس، شاهدهای منفی گیاه سالم و بافر PBS بود. پادتن و پادتن متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز ویژه PVA، PVY، PVS و PLRV به نسبت

Archive of SID

www.SID.ir

۱:۳۰۰ به ترتیب در بافر پوششی (coating)، pH = ۹/۶ و در بافر آنتی‌بادی نشان دار (conjugate)، pH = ۷/۴ ، مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله آخر نیتروفنیل فسفات به نسبت ۱:۱۰۰۰ به بافر سوبسترا، pH = ۹/۸ اضافه گردیده و استفاده شد. حد آلودگی طبق فرمول $R= \overline{X} +2SD$ محاسبه شد. مراحل آزمون NCM-ELISA طبق روش مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی انجام شد (Priou 2001). از پادتن ویژه سروتیپ‌ها به نسبت ۱:۳۰۰ در بافر آنتی‌بادی و از پادتن ضد خرگوش نشاندار به نسبت ۱:۳۰۰در بافر آنتی‌بادی نشان دار استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی از محلول‌های نیتروبلوتترازولیوم در محلول ۷۰٪ دای متیل فرمامید (Dimethylformamide nitro-blue tetrazolium, DMF/NBT) و قرص ۵- برومو- ۴-کلرو-۳ ایندولیل فسفات، نمک تولوئیدن در محلول ۱۰۰٪ دای متیل فرمامید (Toluidine salt of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, DMF/BCIP) استفاده شد. برای بررسی کارایی‌این دو روش در گیاهان درون شیشه‌ای از پنج نمونه گیاهچه سه هفته‌ای آلوده که بر روی محیط کشت MS (Murashige & Skoog 1962) رشد داده شده بودند استفاده شد.

نتایج وبحث

براساس نتایج DAS-ELISA از میان ۱۵۰ نمونه مشکوک به آلودگی ویروسی سیب‌زمینی بیشترین نمونه آلوده (۶۱ نمونه) مربوط به ویروس PVA بود و ویروس‌های PVY، PVS و PLRV (به ترتیب با ۵۶، ۳۸ و۱۴ نمونه) در درجات بعدی قرار داشتند. از نظر شدت جذب نور (OD) نیز که معمولاً نشان دهنده غلظت ویروس در گیاه می‌باشد، PVA بالاتر بود و بعد از آن به ترتیب ویروسهای PVY ، PVS و PLRV قرار داشتند (جدول۱). بین میزان جذب نور PVA و PVY رابطه مستقیمی مشاهده شد، بدین معنی که در مواقعی که جذب نور PVA بالا بود در صورت وجود PVY ، میزان جذب آن نیز بالا بود. معمولاً ویروس‌هایی که دارای غلظت اولیه بیشتری باشند بعد از هر نسل شیوع بیشتری می‌یابند (Salazar 1996). بیشترین آلودگی در رقم همسانه ۶۹ از مزرعه تحقیقاتی اصلاح ونهال بذز کرج دیده شد و بعد از آن رقم لیدی روزتا از مزارع همدان دارای بیشترین آلودگی بود و در درجات بعدی ارقام بانابا، المپیا، دزیره و آگریا قرار داشتند. کمترین آلودگی در رقم سانته از مزارع اصلاح و نهال بذر

Archive of SID

www.SID.ir

کرج وجود داشت (جدول۱).

جدول ۱- میانگین جذب نور در آزمون الایزای نمونه‌های مشکوک به آلودگی‌های ویروسی در ارقام مختلف سیب‌زمینی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف

Table 1. Mean optical densities (OD) of potato samples suspected for virus infection in various potato cultivars collected from different regions

ارقام Cultivars	محل جمع آوری Place of collection	تعدادگیاهان Number of plants	تعداد گیاهان آلوده به ویروسهای بررسی شده و شدت آلودگی Number of plants infected with tested viruses and their optical densities in ELISA				
			PLRV		PVY		S
			تعداد Number	میزان جذب نور OD	تعداد Number	میزان جذب نور OD	تعداد Number
Clone 69	Karaj	15	2	0.310	7	0.580	5
Aracy	karaj	10	2	0.265	6	0.435	2
Sante	Karaj	4					1
Olimpia	Karaj	13	1	0.365	6	0.530	2
Banaba	Karaj	14			7	0.560	4
Boren	Karaj	8	2	0.290	2	0.440	2
Kenebek	Karaj	4					1
Agria	Karaj	18	1	0.360	7	0.460	4
Milva	Karaj	7	1	0.310	2	0.350	2
Desire	Hamedan	16	1	0.300	5	0.530	5
Lady Roseta	Hamedan	11	1	0.420	6	0.570	1
Konkord	Hamedan	8	1	0.290	1	0.410	3
Marfona	Hamedan	5	1	0.320	1	0.380	3
Kenebek	Hamedan	7			2	0.360	1
Kenebek	Ardebil	10	1	0.370	4	0.390	2
N. Control			1	0.066	1	0.072	1

در مجموع از گیاهان مورد بررسی براساس آزمون DAS-ELISA ٪ ۳۲/۶(۴۹ مورد) به یک نوع ویروس، ٪۳۲/۶(۴۹ مورد) به دو نوع ویروس، ٪۴ (۶ مورد) به سه نوع ویروس و ٪۰/۶۶(یک مورد) به ۴ نوع ویروس آلودگی نشان دادند (جدول ۲)، در حالیکه ٪۳۰ (۴۵ مورد) ازاین گیاهان، آلودگی به ویروسهای مورد بررسی نشان ندادند. بطور کلی ٪۴۶ از گیاهان آلوده مورد بررسی دارای آلودگی ساده به یک ویروس و ٪۵۴ آنها دارای آلودگیهای مرکب ویروسی بودند که ٪۸۸ از آلودگیهای مرکب، حاصل از دو ویروس بود.

Archive of SID

www.SID.ir

براساس آزمون NCM-ELISA از ۱۵۰ نمونه مورد بررسی ۸ نمونه به PLRV ، ۴۵ نمونه به PVY ، ۵۹ نمونه به PVA و۳۴ نمونه به PVS آلوده بودند. در مجموع ۵۱ مورد آلودگی حاصل از یک نوع ویروس، ۴۰مورد آلودگی حاصل از دو نوع ویروس، ۵ مورد آلودگی حاصل از سه نوع ویروس بودند (جدول۲).

در تشخیص آلودگیهای ویروسی از بافتهای سبز گیاه، روش DAS-ELISA توانست تعداد نمونه آلوده بیشتری را (۱۰۵ نمونه) در مقایسه با NCM-ELISA (۹۶ نمونه) شناسایی کند و ازاین نظر دارای کارایی بیشتری بود. بیشترین تعداد آلودگی مرکب مربوط به ترکیب ویروسی PVA وPVY بود. در بررسیهای قبلی آلودگیهای ویروسی از مزارع سیب‌زمینی کرج، همدان، فیروزکوه و تبریز نیز نتایج مشابهی به دست آمده است (Pazhohandeh 2001). نتایج نشان داد که هیچ آلودگی حاصل از ویروس PLRV به تنهایی دیده نشد و تمام آلودگیهای‌این ویروس بصورت مرکب بود. بیشترین ترکیب ویروسی PLRV همراه با ویروس PVA بود و کمترین ترکیب ویروسی PLRV همراه با PVS بود. گرچه خسارت ویروسهای PLRV وPVY در هر بوته به تنهایی بیشتر از ویروس PVA می‌باشد ولی به دلیل شیوع گسترده PVA در مناطق مورد بررسی‌این تحقیق پیشنهاد می‌گردد که میزان انتشار و خسارت این ویروس در سطح کشور مورد بررسی قرار گیرد تا بر اساس آن بتوان اهمیت ویروس‌های سیب‌زمینی را در برنامه‌های تولید بذر مشخص نمود.

برای تعیین میزان تکرار پذیری هر یک ازاین دو روش تعداد ۱۰ نمونه گلخانه‌ای آلوده به ویروس‌های PVA وPVY مورد آزمایش‌های NCM-ELISA , DAS-ELISA در سه تکرار قرار گرفتند. در روش DAS-ELISA در هر سه تکرار دقیقاً نتایج مشابهی بدست آمد و تمامی نمونه‌ها به ویروس‌های مورد آزمایش آلودگی نشان دادند ولی در روش NCM-ELISA نتایج در هر تکرار متفاوت بود. در تکرار اول ۸ نمونه به PVA و ۶ نمونه به PVY، در تکرار دوم ۷ نمونه به PVA و ۶ نمونه به PVY و در تکرار سوم ۸ نمونه به PVA و ۷ نمونه به PVY آلودگی نشان دادند. بنابراین روش NCM-ELISA نه تنها تعداد نمونه کمتری را تشخیص داده، بلکه تکرار پذیری کمتری نیز نسبت به روش DAS-ELISA داشت.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- تعداد گیاهان دارای آلودگی‌های ساده و مرکب در نمونه‌های مشکوک مورد آزمون به روش DAS-ELISA و NCM-ELISA

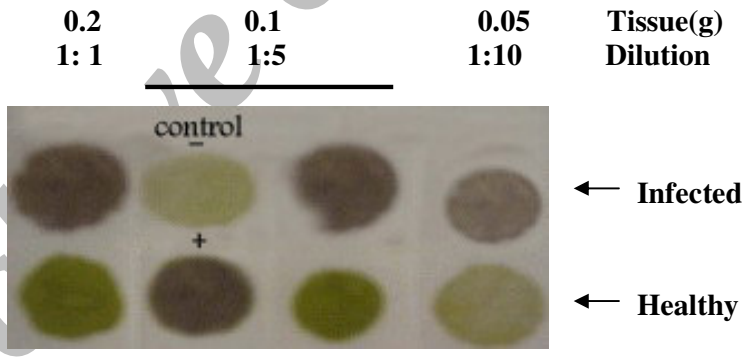
Table 2. Number of potato plants with single and multiple infections as tested by DAS-ELISA and NCM-ELISA

تعداد گیاهان آلوده Number of plants infected		ویروس virus	نوع آلودگی Type of infection
NCM-ELISA	DAS-ELISA		
21	17	PVA	آلودگی ساده Single infection
17	21	PVY	
13	11	PVS	
18	17	PVA , PVY	آلودگی مرکب دو گانه Double infection
13	15	PVA , PVS	
4	8	PVY , PVS	
2	5	PLRV , PVA	
3	4	PLRV , PVY	
0	0	PLRV , PVS	
1	3	PLRV, PVY , PVA	آلودگی مرکب سه گانه Triple infection
2	1	PLRV , PVS ,PVA	
2	2	PVS, PVY, PVA	
0	1	PLRV,PVS,PVY,PVA	آلودگی مرکب چهار گانه Quadruple infection
96	105		جمع Total

Archive of SID

www.SID.ir

کشت درون شیشه‌ای گیاهان سیب‌زمینی یکی از اجزا و مراحل مهم تولید بذر سالم سیب‌زمینی به شمار میرود. به دلیل وجود محدودیت میزان بافت در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای، امکان تشخیص ویروسها با مقادیر کم بافت گیاهی با استفاده از روش NCM-ELISA مورد بررسی قرار گرفت. روش NCM-ELISA برای تشخیص ویروسها با استفاده از حداقل مواد گیاهی از گیاهان درون شیشه‌ای از کارایی خوبی برخوردار بود، به طوریکه‌این روش توانست ویروس PVY رادر ۰/۰۵ گرم بافت گیاهی با رقت عصاره ۱۰ : ۱ شناسایی کند (شکل۱). این روش بویژه برای تشخیص ویروسها از گیاهان درون شیشه‌ای که معمولاً کمتر از ۰/۱ گرم وزن دارند و در برداشت نمونه نبایستی به گیاه آسیب برسد مناسب می‌باشد در حالی که DAS-ELISA این قابلیت را ندارد.این در حالی است که در مراحل گلخانه‌ای و مزرعه‌ای در سیستم نولید بذر سیب‌زمینی که با تعداد نمونه گیاهی زیادی روبرو هستیم روش DAS-ELISA به علت حساسیت بالا و تکرار پذیر بودن آن از یک طرف و عدم محدودیت بافت گیاهی از طرف دیگر روش بسیار ساده، ارزان قیمت و کار آمدی می‌باشد.



شکل ۱- تشخیص ویروس PVY سیب‌زمینی با استفاده از مقادیر حداقل بافت گیاهچه‌های درون شیشه‌ای در روش NCM-ELISA.

Fig 1. Diagnosis of Potato Virus Y with minimum plant tissue of *in vitro* plantlets using NCM-ELISA technique.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب بخشی از پروژه ملی حفاظت و ارزیابی دخایر توارثی گیاهان سبزی و صیفی به شماره ۸۳۱۰-۲۵ موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر انجام گردیده است. نگارندگان همچنین از کمکهای آقایان دکتر مجید هاشمی، مهندس داوود علیپور و مهندس رحیم احمدوند صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (125-124) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: داوود امامی‌میبدی، جواد مظفری، نادعلی بابائیان و حشمت‌اله رحیمیان بخش ژنتیک و ذخائر توارثی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، مجتمع آموزش عالی علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشگاه مازندران

Archive of SID

www.SID.ir