شناسایی و ردیابی جدایه‌های ایرانی ویروس برگ بادبزنی مو با استفاده از پیوند سبز و آرتی-پی‌سی‌آر*

IDENTIFICATION AND DETECTION OF IRANIAN ISOLATES OF *Grapevine fanleaf virus* USING GREEN-GRAFTING AND RT-PCR

شاهین نوری‌نژاد زرقانی[۱]، مسعود شمس بخش[۱**]، نعمت سخندان بشیر[۲] و مقصود پژوهنده[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳۱)

چکیده

ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus* (GFLV)) از مخرب‌ترین ویروس‌های مو در سراسر جهان می‌باشد. بهترین روش کنترل خسارت این ویروس جلوگیری از انتشار قلمه‌های آلوده و نیز استفاده از اندام تکثیری عاری از ویروس برای احداث تاکستان‌های جدید می‌باشد، بنابراین ردیابی دقیق این ویروس از اهمیت بالایی در کنترل آن برخوردار است. به منظور معرفی یک روش حساس در ارزیابی پایه‌های مادری، طی سال ۱۳۸۷ از گیاهان موی تاکستان‌های مناطق مختلف کشور نمونه‌برداری انجام و آلودگی آنها به GFLV با استفاده از DAS-ELISA بررسی شد. سپس آلودگی ۱۴ نمونهٔ الیزا مثبت با استفاده از آرتی-پی‌سی‌آر و با به‌کارگیری آغازگرهای موجود در منابع و طراحی شده در این پژوهش بررسی شد. نتایج نشان داد که اکثر آغازگرهای موجود در منابع قادر به ردیابی در تمامی نمونه‌های بررسی شده نبودند. درحالی‌که آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش ویروس را در همهٔ نمونه‌ها ردیابی کردند. کارایی آغازگرهای طراحی شده روی ۳۵ نمونهٔ الیزا مثبت جمع‌آوری شده از سایر استان‌ها در سال بعد (۱۳۸۸) بررسی و تأیید شد. هم‌چنین در این پژوهش برای اولین‌بار روش پیوند سبز برای بررسی آلودگی به GFLV انجام و آلودگی ویروسی را تأیید کرد. نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب پیوند سبز و آرتی-پی‌سی‌آر با آغازگرهای معرفی شده در این بررسی روشی دقیق برای ردیابی GFLV است.

واژه‌های کلیدی: کنترل، الیزا، طراحی آغازگر

*: بخشی از رسالهٔ دکتری نگارنده اول ارایه شده به دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق دکتری و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳. استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آذربایجان، تبریز

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) متعلق به جنس *Nepovirus* و خانوادهٔ *Secoviridae* (Sanfaçon *et al.* 2009) در اغلب مناطق کشت مو (*Vitis vinifera*)، به‌عنوان یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های مو مطرح است (Raski *et al.* 1983 , Martelli & Savino 1988). ژنوم این ویروس از دو قطعه آرانای خطی تک‌لا (RNA1 و RNA2) با قطبیت مثبت (ssRNA+) تشکیل شده که هرکدام در انتهاهای '۳ و '۵ خود به‌ترتیب دارای دنباله پلی آدنوزینی (poly A) و وی‌پی‌جی (virus- protein-genome linked, VPg) می‌باشند. در میانگریزسازی در شیب چگالی، ویروس دارای سه لایه می‌باشد؛ لایه سنگین حاوی پیکره‌های دارای هر دو مولکول آرانای،لایه میانی حاوی پیکره‌های دارای آرانای شماره ۲ و سبک‌ترین لایه دارای پیکره‌های بدون آرانای می‌باشد(King *et al*. 2011).

برای شناسایی ویروس‌های مو اغلب از آزمون الیزا استفاده می‌شود اما به‌دلیل غلظت کم ویروس برگ‌باد بزنی مو در گیاهان آلوده طی ماه‌های گرم سال (به‌ویژه در تابستان) الیزا حساسیت کافی برای ردیابی ویروس را ندارد (Martelli 1993). هم‌چنین عدم پراکنش یکسان ویروس در بخش‌های مختلف گیاه و نیز آلودگی پنهان در واریته‌های متحمل یا در سویه‌های ملایم ویروس (Hewitt *et al.* 1962) ردیابی این ویروس در تمامی فصل رویشی با مشکل مواجه می‌شود (Walter & Buzkan & Walker 2004, Etienne 1987). از اینرو روش‌های مبتنی بر ژنوم برای شناسایی و ردیابی این ویروس به‌کار گرفته می‌شود. ردیابی ویروس از طریق آرتی- پی‌سی‌آر نیز به‌دلیل وجود مواد بازدارنده و عدم انطباق ترادف آغازگرها با توالی ژنوم ویروس در برخی جدایه‌ها در اثر تنوع ژنومی ویروس، گاه با اشکال مواجه بوده است (Martelli & Savino 1988, Rowhani *et al.* 1993). در حال حاضر روش‌های متعددی برای استخراج موفق و با کیفیت بالای آرانای از مو بهینه‌سازی شده است (Buzkan & , Rowhani *et al.* 1993 Osman *et al.* , Daldoul *et al.* 2009, Walker 2004 2011). به‌دلیل اهمیت این ویروس در مناطق کشت مو و لزوم ردیابی دقیق آن بهینه‌سازی روش آرتی- پی‌سی‌آر برای ردیابی جدایه‌های آمریکایی ویروس (Rowhani *et al.* 1993)، آرتی-پی‌سی‌آر کمّی (Cepin *et al.* 2010) و استفاده از ریزآرایه‌ها (Osman *et al.* 2011) انجام گرفته است. از آنجایی‌که ردیابی GFLV حتی در نمونه‌های الیزا مثبت از طریق آرتی- پی‌سی‌آر در برخی جدایه‌های ایرانی به‌ویژه جدایه‌های آذربایجان‌شرقی با مشکل مواجه است (Bashir *et al.* 2011) و از طرف دیگر ردیابی کمترین میزان آلودگی ویروسی در گیاهان مادری و اندام‌های تکثیری به منظور جلوگیری از انتشار آنها و احداث باغ‌های جدید امری اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین مطالعه حاضربا هدف ارایه روشی مناسب برای نموده‌سازی (Indexing) و معرفی آغازگرهایی با کارایی بالا برای ردیابی جدایه‌های مختلف این ویروس توسط آرتی- پی‌سی‌آر در تاکستان‌های آلوده ایران انجام شد.

روش بررسی

۱- جمع‌آوری جدایه‌های ویروس

نمونه‌های مشکوک به آلودگی طی دو سال متوالی در اواسط بهار و طی تابستان سال ۱۳۸۷ از تاکستان‌های بناب، حومهٔ تبریز و روستای شیر امین و طی بهار و تابستان سال ۱۳۸۸ از تاکستان‌های واقع در حسین آباد زهرا (استان

www.SID.ir

قزوین)، ارومیه، زنجان، حومه تهران و لاهرود (استان اردبیل) براساس علایم توصیف شده توسط *مارتلی و ساوینو*(Martelli & Savino 1988) جمع‌آوری شدند.

۲- ردیابی GFLV در نمونه‌های مشکوک

برای ردیابی GFLV در نمونه‌های مشکوک، آزمون سرولوژیکی به روش داس- الیزا (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbant assay, DAS-ELISA) و با استفاده از کیت تشخیص اختصاصی GFLV تهیه شده توسط شرکت *بیوریبا* (BIOREBA, Switzerland) انجام شد. برای بررسی نتایج آزمون الیزا، بعد از افزودن مادهٔ زمینه‌ای ۴- نیتروفنیل فسفات، هر ۱۵ دقیقه یک‌بار به‌مدت یک ساعت میزان تغییر رنگ چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ nm و با استفاده از دستگاه الیزا خوان (ELISA plate reader) اندازه‌گیری شد. چاهک‌هایی که میانگین جذب نوری آنها بیش از دو برابر میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل منفی (گیاه عاری از آلودگی) بود، مثبت تلقی شدند (Dijkstra & de Jager 1998).

۳- استخراج آرانای کل، آرتی-پی‌سی‌آر و تعیین ترادف نوکلئوتیدی

استخراج آرانای کل (total RNA) از نمونه‌ها مطابق روش *مک کنزی و همکاران* (MacKenzie *et al.* 1997) انجام شد. آرتی- پی‌سی‌آر به دو روش تک مرحله‌ای با استفاده از SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (Invitrogen, Germany) و دو مرحله‌ای (شامل یک مرحله سنتز cDNA و مرحله دیگر انجام پی‌سی‌آر) با استفاده از RevertAid™ Reverse Transcriptase (Fermentas, Lithuania) انجام شد. در روش اول ng ۱۰۰-۵۰ از آرانای کل استخراج شده با آغازگرهای پیش سو و پس‌سو در غلظت‌های پیشنهادی و دستورالعمل شرکت سازنده مخلوط و انجام شد. در روش دوم ng ۵۰۰ از آرانای کل با یکی از آغازگرهای $Oligo\ d(T)_{16}$، Random Hexamer Primer و یا از آغازگرهای اختصاصی پس‌سو (جدول ۱) مخلوط و برای مرحله سنتز cDNA طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده به‌کاربرده شد. ۲/۵ میکرولیتر از محصول این واکنش به‌عنوان الگو در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد استفاده قرار گرفت. از دو جفت آغازگر Actin 7/actin 2 و GAPDH (m)F/GAPDH (m)R (برای تکثیر ژن‌های خانه‌داری Actin و Glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase) طی دو روش اشاره شده برای آرتی- پی‌سی‌آر با هدف کنترل صحت مراحل انجام واکنش‌ها استفاده شد. از آرانای کل استخراجی به‌عنوان الگو در واکنش‌های آرتی- پی‌سی‌آر استفاده شد. ترادف آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش براساس ترادف آرانای شماره ۲ جدایه‌های ایرانی ویروس برگ بادبزنی مو (رس شماره‌های JQ071374 تا JQ071377) سنتز شدند. تجزیه و تحلیل آغازگرها نیز توسط نرم‌افزار Oligo نسخهٔ 7.24 انجام شد.

برای هر جفت آغازگر شیب دمایی به فواصل ۲ درجه‌ای از ۱۰- تا ۱۰+ درجه سلسیوس از دمای اتصال آغازگرها و مدت زمان مرحلهٔ ساخت براساس ۱ دقیقه به‌ازای هر ۱۰۰۰ bp محاسبه شد. در صورت لزوم، روش‌های مختلف پی‌سی‌آر مانند touchdown و hot start و نیز در مرحلهٔ پی‌سی‌آر از دو چرخه دمایی مختلف استفاده شد، بدین ترتیب که در ۵ چرخه اول از دمای ۴۰°C و در ۳۰ چرخه بعدی از شیب دمایی

Archive of SID

www.SID.ir

۴۸-۵۴ °C به‌عنوان دمای اتصال استفاده شد. برای بهترشدن واکنش‌های آرتی- پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای یکی از ترکیبات ۵٪ DMSO، ۲٪ بتا مرکاپتواتانول یا غلظت یک مولار KCl استفاده شد (McPherson & Møller 2006). محصولات آرتی- پی‌سی‌آر مطابق معمول در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز و پس از خالص‌سازی از ژل با استفاده از کیت NucleoSpin® Extract II (شرکت MN، آلمان)، برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی به یکی از شرکت‌های Macrogen (کره‌جنوبی) و 4Base Lab (آلمان) ارسال شدند.

۴- پیوند سبز

قلمه‌های مو رقم قره‌داش از کلکسیون موهای عاری از ویروس دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. آلودگی قلمه‌های مو رقم قره‌داش به‌عنوان گیرنده (recipient) و نمونه‌های مو استفاده شده به‌عنوان دهنده (donor) با استفاده از آزمون الیزا با آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه GFLV، *Arabis mosaic virus* (ArMV)، *Grapevine virus A* (GVA) و *Grapevine leaf roll virus1 and 3*(GLRV1 and GLRV3) مطابق روش پیشنهادی شرکت سازنده (BIOREBA, Switzerland) و آرتی- پی‌سی‌آر برای ردیابی *Grapevine yellow speckle viroids* با استفاده از آغازگرهای توصیه شده توسط *حاجی زاده و همکاران* (Hajizadeh *et al.* 2011) بررسی شدند و نمونه‌هایی با آلودگی مخلوط حذف و مورد استفاده قرار نگرفتند. برای دهنده از بخش‌های سبز و جوان گیاهان آلوده به GFLV (الیزا مثبت) که فاقد علایم بودند استفاده شد. برای تهیه دهنده و گیرنده cm ۵-۳ بالاتر و پایین‌تر از محل گرهی که حاوی یک برگ بود بریده شد. سپس پایه و پیوندک با استفاده از پیوند اسکنه به عمق cm ۲ به‌هم متصل و محل پیوند با پارافیلم پوشانیده شد. شاخه‌های پیوندی به شیشه‌هایی به قطر cm ۱۰ حاوی پرلیت انتقال داده شدند. این گیاهان در اتاقک رشد در دمای ۰/۵ ± ۱۸درجه سلسیوس، تناوب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت اشباع نگهداری شدند. آبیاری پیوندک‌ها با محلول غذایی Huglin and Julliard medium توصیف شده توسط *مارتلی* و همکاران (Martelli *et al.* 1993) و به‌صورت سه روز در میان انجام شد. بررسی علایم در برگ مربوط به پایه (رقم قره داش) تا سه هفته پس از پیوند بررسی شد.

نتایج

۱- الیزا

ارزیابی ۵۶ نمونه جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۷ توسط آزمون الیزا حاکی از آلودگی ۲۷ نمونه به GFLV بود. از این میان ۱۴ نمونه به‌طور تصادفی برای مقایسه کارآیی آغازگرهای موجود در منابع و طراحی شده در این پژوهش در آزمون آرتی- پی‌سی‌آر انتخاب شدند. از ۱۲۶ نمونهٔ جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۸ در مجموع ۵۸ نمونه آلوده به GFLV تشخیص داده شدند که ۳۵ نمونه از ۵۸ نمونه به تصادف انتخاب و برای ارزیابی کارایی آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند.

۲- واکنش آرتی- پی‌سی‌آر

واکنش‌های آرتی- پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های Actin و Glyceraldehyde 3- phosphatedehydrogenase منجر به تکثیر قطعه‌های مورد انتظار به‌ترتیب به اندازهٔ ۲۰۰bp و ۱۰۰ bp شدند. نتایج واکنش‌های آرتی- پی‌سی‌آر با آغازگرهای معرفی شده در منابع در جدول ۲ آورده شده است. از بین جفت

www.SID.ir

جدول ۲. نتایج واکنش‌های آرتی- پی‌سی‌آر انجام شده بر روی ۱۴ نمونهٔ استان آذربایجان شرقی با استفاده از آغازگرهای موجود در منابع. ترادف آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

Table 2. The result of RT-PCR reactions on 14 grapevine samples collected in East- Azerbaijan using previously published primers. Sequences of the primers are presented in table 1.

جفت آغازگرهای مورد استفاده Primer pairs	اندازه دی‌ان‌ای مورد انتظار برحسب جفت باز Expected DNA size(bp)	تعداد واکنش‌های مثبت No. of positive reactions	
		آرتی-پی‌سی‌آر یک مرحله‌ای One Step RT-PCR	آرتی-پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای Two Step RT-PCR
5'NC/G0	856	0	0
5'NC/M4	2128	14	0
5'NC/3'NC	3660	0	0
M0/M4	1489	6	6
M0/G1	648	0	0
M2/M4	854	5	5
G2/3'NC	1623	7	7
GFLV-2048/3'NC	1665	14	14
G2/Oligo(dT)	1700	0	0
GFLV2048/oligo(dT)	1750	0	0
M0/3'NC	3020	1	1
GFLV-433V/3'NC	1226	4	4
GFLV-433V/oligo(dT)	1300	0	0
GFLV2081/GFLV3559	1560	9	9
GFLVA3300/3'NC	404	3	3
G3/Oligo(dT)	~100	0	0

آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های مقدماتی آرتی- پی‌سی‌آر تنها زمانی که جفت آغازگرهای GFLV-2048/3'NC و 5'NC/M4 مورد استفاده قرار گرفتند در تمامی واکنش‌ها قطعات دی‌ان‌ای مورد انتظار (به‌ترتیب در حدود ۱۶۰۰ و ۲۲۰۰ جفت باز) تکثیر یافتند. جفت آغازگر GFLV-2048/3'NC در هر دو روش آرتی- پی‌سی‌آر ولی جفت آغازگر 5'NC/M4 فقط در آرتی- پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای کارایی داشت. در سایر واکنش‌های انجام یافته، قطعه‌ای تکثیر نیافت و یا دی‌ان‌ای مورد نظر تنها در برخی از جدایه‌ها تکثیر شد (جدول ۲). روش‌های Hotstart و Touchdown و نیز استفاده از دماهای مختلف برای اتصال آغازگر تأثیری در نتایج حاصل از این واکنش‌ها نداشت و منجر به سنتز قطعه مورد انتظار یا حذف قطعه‌های دی‌ان‌ای غیراختصاصی نشد. از طرف دیگر، از بین آغازگرهای طراحی شده براساس توالی آران‌ای شماره ۲ جدایه‌های ایرانی GFLV جفت آغازگرهای GFLV-2A-s/G2-5R-511as، G-1390s/G2-1570as، G2-670s/G2-1570as، GFLV-CP2-s/G3150as، GFLV-CP2-s/GFLV3559R، G2B.EcoRI.s/G2B.BamHI.as، G2AHP.EcoRI.s/G2B.BamHI.as و G2C.MfeI.s/G2C.BamHI.as کارایی داشتند و توانستند قطعات مورد انتظار را در تمامی آرتی- پی‌سی‌آرهای انجام شده روی ۱۴ نمونه اشاره شده در جدول ۲ و نیز ۳۵ نمونهٔ جمع‌آوری شده از سایر استان‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳. نتایج واکنش‌های RT-PCR انجام شده بر روی ۴۹ نمونهٔ الیزا مثبت برای GFLV با استفاده از آغازگرهای معرفی شده در منابع و طراحی شده در این تحقیق ترادف آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

Table 3. The results of RT-PCR reactions on 49 GFLV-ELISA positive grapevine samples using GFLV published primers and the primers designed in this study. Sequences of the primers are presented in Table 1.

جفت آغازگرهای مورد استفاده Primer pairs	منبع Reference	اندازه دی‌ان‌ای مورد انتظار برحسب جفت باز Expected DNA size(bp)	تعداد واکنش‌های مثبت (کل) No. of positive reactions (Total)	
			سال ۱۳۸۷	سال ۱۳۸۸
G2AHP-EcoRI-s/G2-5R-511as	This study	330 to 345	14(14)	35(35)
G2-670s/G2-1570as	This study	900	14(14)	35(35)
G-1390s/G2-1570as	This study	180	14(14)	35(35)
GFLV-CP2-s/G3150as	This study	248	14(14)	35(35)
GFLV-CP2-s/GFLV3559R	This study	162	14(14)	35(35)
G2AHP.EcoRI.s/G2B.BamHI.as	This study	1785	14(14)	35(35)
G2B.EcoRI.s/G2B.BamHI.as	This study	990	14(14)	35(35)
G2C.MfeI.s/G2C.BamHI.as	This study	1566	14(14)	35(35)
GFLV-2048/3'NC	This study/Wetzel et al., 2001	1665	14(14)	35(35)
G2/3'NC	Wetzel et al., 2001	1623	7(14)	19(35)

در سال ۱۳۸۸ تکثیر کنند (جدول ۳). جفت آغازگرهای GFLV-2A-s/GFLV-1855R، 5'NC/GFLV-784R و G-1390s/GFLV-1855R و m433V/G-1350as همراه با سنتز قطعه‌های دی‌ان‌ای غیر اختصاصی بود و کارایی مناسبی نداشتند.

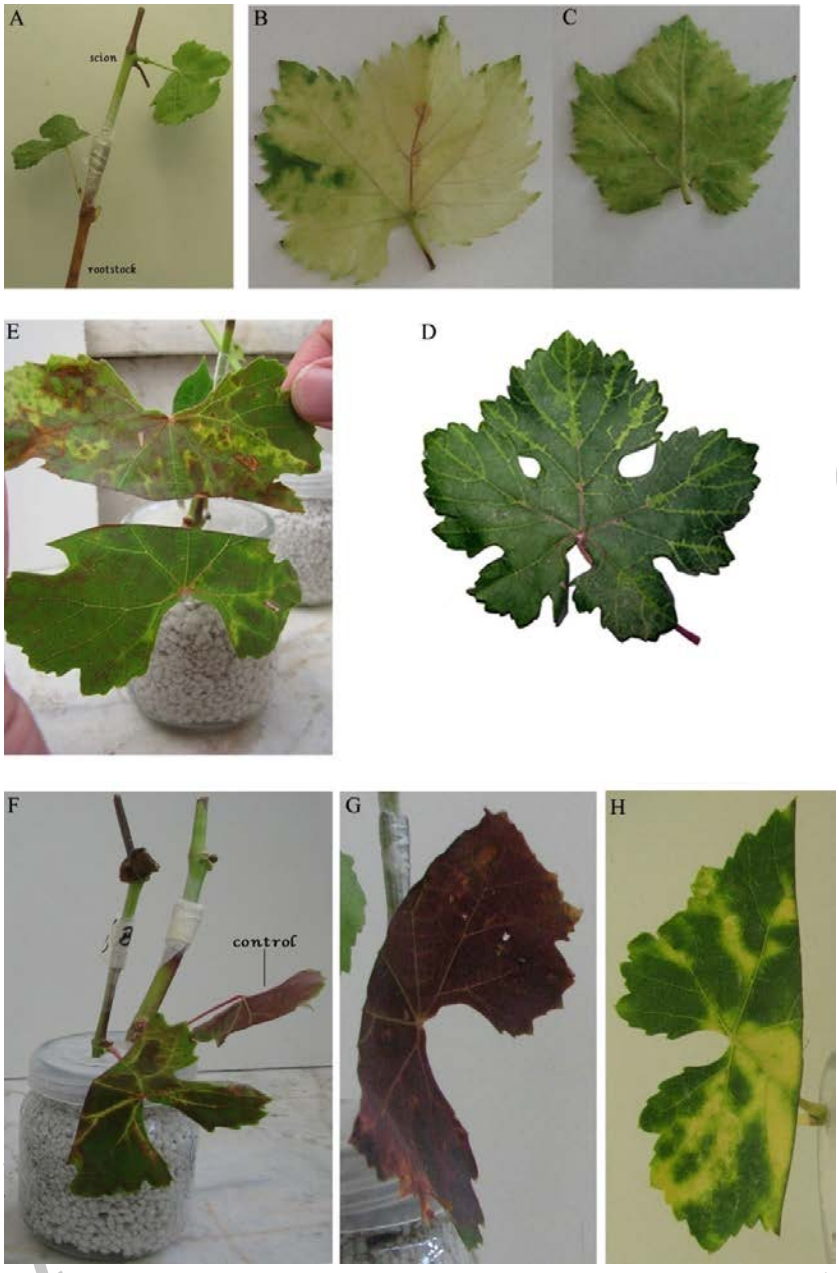
۴- پیوند سبز

گرچه در بیش از ۷۰ درصد پیوندهای انجام شده پس از گذشت ۱۰ تا ۱۴ روز برگ مربوط به دهنده (گیاه آلوده) خشکیده شد، در همه ۱۴ نمونهٔ پیوند شده اولین علایم GFLV پس از گذشت ۱۷ روز از پیوند زدن در برگ مربوط به گیرنده (رقم قره داش) مشاهده و در صد در صد از پیوندهای انجام شده آلودگی از گیاه دهنده به گیرنده منتقل شد. حضور ویروس در گیرنده توسط آزمون الیزا و آرتی- پی‌سی‌آر با آغازگرهای GFLV-CP2-s/G3150as نیز تأیید شد. از سویی دیگر با اینکه پیوندک از بخش‌هایی از گیاه آلوده به GFLV تهیه شده بود که علایم بیماری در آنها دیده نمی‌شد، علایم توصیف شده توسط *مارتلی و ساوینو* (Martelli & Savino 1988) برای GFLV در برگ متصل به گیرنده (رقم قره داش) دیده شد (شکل ۱).

بحث

جلوگیری از انتشار ویروس و نیز استفاده از قلمه‌های سالم برای احداث باغ جدید از روش‌های مؤثر در کنترل خسارت ویروس برگ بادبزنی مو هستند. بدیهی است که فراهم بودن یک روش مطمئن و دقیق برای ردیابی

www.SID.ir



شکل ۱. علایم روی برگ‌های مو قبل و بعد از پیوند سبز. A) نحوه اتصال پیوندک به پایه از طریق پیوند اسکنه؛ B و C) علایم موزائیک زرد به‌ترتیب بر روی برگ‌های جمع‌آوری شده از تاکستان‌ها؛ D) علایم رگ‌نواری بر روی برگ‌های جمع‌آوری شده از تاکستان‌ها؛ E) مقایسه ایجاد موزائیک زرد (برگ بالایی) و رگ‌نواری (برگ پایینی) پس از ۱۷ روز از پیوند زدن روی پایه (رقم قره داش)؛ F و H) علایم رگ نواری و موزائیک زردی روی پایه (رقم قره داش) ۲۰ روز پس از پیوند زدن؛ G) شاهد سالم

Fig. 1. Symptoms on grapevine leaves before and after green-grafting. A: assembled scion and rootstock in cleft-grafting; B and C: yellow mosaic symptoms on old and young leaves collected from vineyards, respectively; D: vein banding symptom on the leaves collected from vineyards; E: comparison of development of yellow mosaic (upper leaf) and vein banding (lower leaf) at 17 days post grafting (dpg) on rootstock of the variety Gerey-Dash; F and H: vein banding and yellow mosaic symptoms on the rootstock variety Gerey-Dash 20 dpg, respectively. G: healthy control.

www.SID.ir

ویروس لازمهٔ دست‌یابی به این مهم است. از طرف دیگر نشان داده شده است که کارایی آرتی- پی‌سی‌آر نسبت به الیزا و سایر روش‌های سرولوژیکی در ردیابی ویروس برگ بادبزنی مو بیشتر است (Liebenberg *et al*. 2009, Wetzel *et al*. 2002). بنابراین با معرفی آغازگرهای اختصاصی دقت روش آرتی- پی‌سی‌آر را می‌توان افزایش داد. طی این تحقیق کارآیی آغازگرهای معرفی شده در منابع با آغازگرهای طراحی شده براساس ترادف آران‌ای شماره ۲ جدایه‌های ایرانی GFLV با یکدیگر مقایسه شد. از ۱۰ آغازگر موجود در منابع تنها جفت آغازگرهای 5'NC/M4 و GFLV-2048/3'NC توانستند ویروس را در تمام ۱۴ نمونهٔ بررسی شده ردیابی کنند (جدول ۲). عدم کارایی سایر آغازگرها نمی‌توانست به دلیل حضور مواد بازدارنده یا شرایط نامناسب واکنش‌ها باشد. زیرا که تکثیر بخشی از ژن‌های خانه‌داری (House-keeping genes) حاکی از عدم حضور مواد بازدارنده در واکنش‌ها بود و استفاده از روش‌های مختلف برای آرتی-پی‌سی‌ار و شیب دمایی برای مرحلهٔ اتصال، احتمال وجود شرایط نامناسب را نیز برطرف کرد.

به‌علاوه تمامی ۱۸ آغازگر طراحی شده در این پژوهش ویروس را در تمامی ۱۴ نمونهٔ مورد بررسی تأیید کرد. از این رو عدم کارآیی اغلب این آغازگرها احتمالاً به‌دلیل عدم اتصال این آغازگرها به رشته قالب بود. این احتمال با همردیف‌سازی ترادف آغازگرهای موجود در منابع با ترادف آران‌ای شماره ۲ جدایه‌های ایرانی تأیید شد (جدول ۱، نوکلئوتیدهایی با اتصال ناجور با قلم سیاه و کشیدن خط زیر آنها مشخص شده‌اند). هم‌چنین نتایج زیرهم‌چینی نشان داد که ترادف جفت آغازگرهای 5'NC/M4 و GFLV2048/3'NC که قابلیت ردیابی تمامی جدایه‌های بررسی شده ایرانی را داشتند، کاملاً با ترادف جدایه‌های ایرانی همخوانی دارند (جدول ۲). بنابراین این نتایج نیز عدم کارایی سایر آغازگرها به دلیل ناهمخوان بودن ترادف جدایه‌های ایرانی را تأیید می‌کند. از آنجا که مدت زمان لازم برای تکثیر قطعات بزرگ‌تر نسبت به قطعات کوچک‌تر طولانی‌تر است (واکنش آرتی- پی‌سی‌آر با استفاده از جفت آغازگر 5'NC/M4 که دی‌ان‌ای به طول bp ۲۲۰۰ را سنتز می‌کنند حدود شش ساعت به‌طول می‌انجامد) و برای ردیابی ویروس مناسب نیست (Kennedy & Oswald 2011). از سوی دیگر برای ردیابی همزمان چند ویروس طی آزمون‌هایی نظیر real time PCR و multiplex PCR نیز آغازگرهای کوچک‌تر مناسب‌تر هستند (MacKay 2007)، ازاینرو آغازگرهایی برای تکثیر بخش‌های کوچک‌تر ژنوم ویروس طراحی شدند. از میان آغازگرهای طراحی شده آغازگرهای GFLV-1855، GFLV-7804 و m433V علاوه بر دی‌ان‌ای مورد انتظار تعداد زیادی قطعات دی‌ان‌ای‌های غیراختصاصی تکثیر کردند که می‌تواند به دلیل اتصال این آغازگرها به ژنوم گیاه میزبان باشد. ازاینرو این آغازگرها مناسب تشخیص داده نشدند. تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار oligo پیشنهاد کرد که عدم کارایی آغازگرهای پیش‌سو در ترکیب با آغازگر oligo $(dT)_{16}$ می‌تواند به دلیل اختلاف زیاد دمای اتصال بین این آغازگرها باشد، چراکه دمای اتصال آغازگر oligo $(dT)_{16}$ حدود ۳۲ ºC است که در این دما ساختارهای داخلی موجود در برخی از آغازگرهای پیش‌سو هنوز پایدارند. بنابراین براساس این نتایج توصیه می‌شود از الیگونوکلئوتیدی با تعداد T بیشتری استفاده شود.

آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش توانستند الگوی خود را در جدایه‌های ایرانی مورد هدف قرار دهند.

www.SID.ir

این آغازگرها برای بخش‌های مختلف آرانای شماره ۲ طراحی شدند تا برحسب نیاز و به‌عنوان جایگزین‌های متعدد در ترکیب با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای سایر ویروس‌های مو با هدف ردیابی همزمان مورد استفاده قرار گیرند.

طی این پژوهش پیوند سبز برای اولین‌بار در دنیا برای ردیابی Nepovirus ها به‌کار برده شد و رقم قره‌داش نیز به‌عنوان یک رقم برای نموده‌سازی (Indexing) در ردیابی GFLV مورد ازریابی قرار گرفت. به‌کارگیری روش پیوند سبز با استفاده از رقم قره‌داش به‌عنوان پایه برای ردیابی GFLV در نمونه‌های جمع‌آوری شده بسیار کارآمد بود زیرا از ۱۴ نمونهٔ مورد استفاده برای پیوند سبز همگی باعث ایجاد علایم ویروسی در گیاه پایه شدند، حتی اگر پیوندک فاقد علایم ماکروسکوپی بود. حداقل و حداکثر مدت زمان لازم برای مشاهدهٔ علایم آلودگی به ویروس در رقم قره‌داش به‌ترتیب حدود ۱۰ و ۱۷ روز بود. درحالی‌که مدت زمان لازم برای گونهٔ *Vitis rupestris* که به‌عنوان پایهٔ مناسب برای نموده‌سازی GFLV معرفی شده است حدود سه تا چهار هفته (۲۱ تا ۲۸ روز) پس از پیوند می‌باشد (Martelli 1993). بنابراین توصیه می‌شود این دو گیاه با هم طی یک آزمایش برای ردیابی ویروس‌های مو به‌ویژه GFLV مقایسه شوند تا گیاه مناسب‌تر مشخص شود. روش پیوند سبز بر روی پایه‌های LN33 و Cabernet sauvignon قبلاً برای ردیابی ویروس *Grapevine leaf roll associated virus* 3 به‌طور موفق به‌کار برده شده است (Pathirana & McKenzie 2005). از آنجا که قلمه سبز و نمونه‌های گیاهی پیوند زده شده در شیشه‌هایی با قطر کم نگهداری می‌شوند، فضای بسیار کمتری در مقایسه با گلدان‌ها نیاز دارند. به‌علاوه از مزایای دیگر این روش قابلیت کاربرد آنها در تمام طول فصل رویشی گیاه است (Pathirana & McKenzie 2005). نتایج این پژوهش نشان داد روش قلمه سبز با رقم قره‌داش به‌عنوان یک روش مناسب برای ردیابی GFLV می‌باشد. این روش در ترکیب با آرتی-پی‌سی‌آر با آغازگرهای معرفی شده در این بررسی روشی دقیق و قابل اعتماد برای ردیابی جدایه‌های این ویروس را فراهم می‌کند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (129- 127) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir