آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۵، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۶

بررسی وضعیت سه ویروس مو در تاکستان‌های شمال شرق ایران*

Study on the Status of Three Grapevine Viruses in North-Eastern Vineyards of Iran

مریم ابراهیم قمی[۱]، مسعود شمس بخش[۱] و رضا پوررحیم[۲]**
۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، تهران
۲- مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران
(تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۴، تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۸۵)

چکیده

تاکستان‌های شمال شرق کشور (استان‌های خراسان شمالی، خراسان رضوی، سمنان، گلستان) برای ردیابی ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV)، ویروس همراه با پیچیدگی برگ مو شماره سه (*Grapevine leafroll associated virus* 3, GLRaV-3) و ویروس ای مو (*Grapevine virus A*, GVA) بررسی شدند. اکثر نمونه‌هایی که به صورت تصادفی جمع‌آوری شدند، فاقد علائم بیماری بودند. ولی در تعداد بسیار کمی از آن‌ها علائم زیگزاکی شدن ساقه، موزائیک، کوتاهی فاصله میان‌گره، دوقلو شدن جوانه و کوتولگی مشاهده شد. آلودگی نمونه‌ها با روش سرولوژیکی DAS-ELISA تعیین شد. نتایج حاصل از بررسی ۵۸۸ نمونه با استفاده از آزمون الایز نشان داد که دست کم ۷۸ درختچه مو به یک ویروس آلوده بودند و ویروس‌های GFLV و GLRaV-3 به ترتیب با حداقل ۷ و ۶/۶ درصد آلودگی بالاترین میزان و ویروس GVA با دست کم ۳ درصد آلودگی پس از آن‌ها قرار گرفت. با استفاده از آزمون RT-PCR و بکارگیری آغازگرهای اختصاصی، بخشی از ژن پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو به طول حدود ۳۲۱ جفت باز تکثیر شد. همچنین در تعدادی از

---

* قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، که به دانشگاه تربیت مدرس ارائه شده است.

** Corresponding author: Shamsbakhsh@yahoo.com

نمونه‌های آلوده به GFLV علاوه بر قطعه مذکور، قطعه‌ای در حدود ۱۵۰ جفت باز نیز همانندسازی شد. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر آن است که با توجه به وجود آلودگی سه ویروس مذکور در اغلب مناطق مورد تحقیق، استفاده از روش دقیق و حساس RT-PCR برای تشخیص پایه‌های مادری عاری از آلودگی ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: ویروس برگ بادبزنی مو، ویروس همراه با پیچیدگی برگ مو شماره سه، ویروس ای مو، شمال شرق ایران، الایزا و واکنش نسخه‌برداری معکوس- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

کشور ایران، یکی از سرزمین‌های اولیه کشت انگور به شمار می‌رود. به طوری که قدمت آن به بیش از چهار هزار سال پیش می‌رسد (Pearson & Goheen, 1988). همچنین اعتقاد بر این است که مبدأ و زادگاه انگور در آسیای صغیر، حد فاصل دریای سیاه و دریای خزر می‌باشد (Vuittenez, 1970; Martelli, 1999). سطح زیر کشت انگور در ایران با احتساب درختان پراکنده مو حدود ۳۰٦ هزار هکتار بوده و تولید سالیانه آن حدود ۲۵۰۰ هزار تن است (Anonymous, 2004).

از میان عوامل بیمارگر متعددی که مو را تحت تأثیر قرار می‌دهند، برخی از ویروس‌ها بسیار مخرب هستند و بیماری‌های ناشی از آن‌ها می‌توانند به طور جدی تاکستان‌های سراسر جهان را تهدید کنند (Walter & Martelli, 1996). تا کنون بیش از ۴۴ ویروس مختلف از تاکستان‌های سراسر دنیا شناسائی و گزارش شده است که از بین آن‌ها ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV)، ویروس همراه با پیچیدگی برگ مو شماره سه (*Grapevine leafroll-associated virus*, GLRaV-3) و ویروس ای مو (*Grapevine virus A*, GVA) باعث کاهش عملکرد از لحاظ کمی و کیفی می‌شوند. در بیشتر موارد، این ویروس‌ها بدون اینکه علائم خاصی را در گیاه ایجاد کنند یا توجه چندانی را به خود جلب نمایند، خسارت عمده‌ای به درختچه‌های مو وارد می‌سازند (Rowhani *et al*., 1993; Martelli, 1993).

اولین گزارش از وجود ویروس در تاکستان‌های ایران مربوط به ویروس برگ بادبزنی مو

(GFLV) است که بر اساس علائم مشاهده شده در تاکستان‌های آذربایجان گزارش شد (Vuittenez, 1970). سپس Izadpanah (1983) علایم این بیماری را از تاکستان‌های استان‌های فارس و کهکیلویه و بویراحمد گزارش کرد. Parvizi (1989) نیز بر اساس مشاهده علائم بیماری و انتقال مکانیکی عامل آن به دو گونه از سلمه تره (*Chenopodium quinoa* Wild. و *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn.)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) و گل تکمه‌ائی (*Gomphrena globosa* L.)، این ویروس را از ارومیه گزارش کرد. در سال ۲۰۰۳ ویروس برگ بادبزنی مو از گیاه مرغ به عنوان اولین میزبان تک‌لپه‌ائی از ایران گزارش شد (Izadpanah *et al*., 2003). پراکنش این ویروس در استان‌های فارس، کهکیلویه و بویر احمد و آذربایجان غربی با استفاده از آزمون PCR بررسی شد (Zaki-aghl & Izadpanah, 2003). ویروس GVA بر اساس روش RT-PCR از تاکستان‌های فارس و خوزستان (Habili *et al*., 2003) و وجود ویروس GLRaV-3 با روش سرولوژیکی الایزا از استان‌های قزوین، زنجان، آذربایجان شرقی و غربی (Rakhshandehrou *et al*., 2004) گزارش شدند.

هدف از انجام این تحقیق بررسی وضعیت آلودگی تاکستان‌های شمال شرق کشور (خراسان شمالی، خراسان رضوی، گلستان و سمنان) به ویروس‌های GVA، LRaV-3 و GFLV با استفاده از روش سرولوژیکی الایزا می‌باشد. بعلاوه به منظور بررسی مقدماتی روش RT-PCR برای تشخیص دقیق‌تر ویروس GFLV، از این روش برای ارزیابی آلودگی قلمه‌هایی که توسط آزمون الایزا آلودگی آن‌ها ابتدا بررسی شده بود، استفاده شد.

روش بررسی

۱- نمونه‌برداری: در فصل زمستان و اوایل فصل بهار سال‌های ۸۳-۱۳۸۲ مجموعاً تعداد ۵۸۸ نمونه به طور کاملاً تصادفی و به صورت حرکت زیگزاگی از تاکستان‌های استان‌های خراسان شمالی (بجنورد)، خراسان رضوی (کاشمر و قوچان)، سمنان (شاهرود) و تاک‌های پراکنده استان گلستان (منطقه گرگان- کردکوی) برای تشخیص ویروس‌های GFLV، GLRaV-3 و GVA جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها تا زمان بررسی در سردخانه

(چهار درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. همچنین برای تولید ریشه و برگ تعدادی از قلمه‌ها در گلدان کاشته و در شرایط گلخانه نگهداری شدند.

۲- آزمون الایزا: برای بررسی آلودگی نمونه‌ها به سه ویروس GVA، GLRaV-3 و GFLV قلمه‌های در حال خواب نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، برگ‌های جمع‌آوری شده از تاکستان‌ها، دمبرگ و برگ‌های تازه جوانه زده از قلمه‌های مستقر در گلخانه استفاده شدند. تعیین آلودگی با استفاده از آنتی‌سرم‌های تهیه شده از شرکت بیوربا (Bioreba-Swiss) علیه سه ویروس مذکور و با روش ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی- الایزا (double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay, DAS- ELISA) مطابق با روش Clark & Adams (1977) انجام گرفت.

ابتدا آنتی‌بادی‌ها در بافر پوششی (حاوی ۱/۵ گرم Na_2CO_3، ۲/۹۳ گرم NaHCO و ۰/۲ گرم NaN_3 در یک لیتر آب مقطر و pH = ۹/۶) به نسبت یک به هزار رقیق گردید. سپس در هر چاهک الایزا ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی اختصاصی هر ویروس ریخته شد. بشقابک‌ها به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. روز بعد بشقابک‌ها سه بار با بافر شستشو (حاوی ۸ گرم NaCl، ۰/۲ گرم KCl، ۰/۲ گرم KH_2PO_4، ۰/۲ گرم $NaHPO_4.12H_2O$، ۰/۲ گرم NaN_3 و ۰/۵ میلی‌لیتر Tween 20 در یک لیتر آب مقطر استریل و pH = ۷/۴) شسته شدند. در مرحله بلاکینگ هر یک از چاهک‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر BSA[1] سه درصد پر شدند و حداقل به مدت دو ساعت در دمای محیط نگهداری شدند. پس از پایان این مرحله بشقابک‌ها سه بار با بافر شستشو شسته شدند.

برگ جوان، دمبرگ یا تراشه‌های بافت پوست و کامبیوم به نسبت یک به ده در بافر عصاره‌گیری تریس- اسیدکلریدریک (شامل ۶۰ گرم تریس، ۸ گرم NaCl، ۲۰ گرمPVP، ۱۰ گرم PEG-6000، ۰/۲ گرم NaN_3 و ۰/۵ میلی‌لیتر Tween 20 در یک لیتر آب مقطر استریل، pH = ۷/۶) له گردیده و تا هنگام استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده از هر یک از نمونه‌ها به چاهک‌ها اضافه شد. بشقابک‌ها به مدت

۱- Bovine serum albumin

یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از پایان این مرحله بشقابک‌ها با بافر شستشو شسته شدند. سپس چاهک‌ها با آنتی‌بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (IgG-Conj., Bioreba-Swiss) که به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ در بافر کانجوگیت (۲۰ گرم PVP (MW 2400)، ۲ گرم BSA، ۰/۲ گرم $MgCl_2$ و ۰/۵ میلی‌لیتر Tween 20، در یک لیتر آب مقطر استریل و pH = ۴/۷) رقیق شده بودند، پوشش داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت نگهداری شد. سپس سه بار با بافر شستشو شسته شدند. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر بافر زمینه (۹۷ میلی‌لیتر دی‌اتانول آمین و ۰/۲ گرم نیتریت سدیم در یک لیتر آب مقطر استریل و pH = ۹/۶) حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پارا- نیتروفنیل فسفات اضافه شد. میزان تغییر رنگ ایجاد شده در چاهک‌ها سه ساعت پس از ریختن محلول زمینه به وسیله دستگاه ELISA Reader مدل Lab System Multiscan 340 (ساخت فنلاند) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۳- استخراج آر.ان.آ.: استخراج آر.ان.ا. به روش Dellaporta *et al.* (1983) و با اندکی تغییر (Rowhani *et al.*, 1993) به شرح ذیل انجام گرفت:

مقدار یک گرم بافت برگ تازه در پنج میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری (حاوی ۲۱/۷ گرم $K_2HPO_4.3H_2O$، ۱/٤ گرم KH_2PO_4، ۱۰۰ گرم سوکروز، ۱/۵ گرم BSA، ۲۰ گرم PVP و ۵/۳ گرم اسید آسکوربیک در یک لیتر آب مقطر استریل، pH = ٤/۷) عصاره‌گیری شد. پس از ۱۰ تا ۲۰ دقیقه مجدداً پنج میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری اضافه شد و بافت به طور کامل له گردید. عصاره حاصل به درون لوله‌های سانتریفیوژ خنک (دو درجه سانتی‌گراد) انتقال داده و به مدت سه تا چهار دقیقه در ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. رونشین به لوله تمیزی منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای دو درجه سانتی‌گراد در ۱۲۳۰۰rpm سانتریفیوژ شد. رونشین به طور کامل حذف و رسوب حاصل در دو میلی‌لیتر بافر TE (حاوی ۰/۱ میلی مولار EDTA، ۱۰ میلی‌مولار تریس ـ هیدروکریک اسید، pH = ۸ و ۰/۱ درصد 2-Mercaptoethanol تازه اضافه شده) حل گردید. سپس به محتویات لوله ۵۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد اضافه گردید و در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد. ۸۰۰ میکرولیتر از استات پتاسیم پنج مولار به محتویات لوله اضافه و کاملاً مخلوط گردید و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت یک

شب قرار گرفت. سپس محتویات لوله به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۲۳۰۰ سانتریفیوژ شد. رونشین به لوله اپندرف استریل ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و یک دهم حجم استات سدیم سه مولار با pH= ٥/٤ و یک حجم ایزوپروپانول بسیار سرد اضافه شد. محتویات لوله اپندرف به آرامی مخلوط شد. محلول حاصل حداقل دو ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای دو درجه سانتی‌گراد در rpm ۱۲۳۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از حذف رونشین، رسوب حاصل با اتانول ۸۰ درصد بسیار سرد شستشو داده شد. سپس لوله به طور وارونه روی کاغذ خشک‌کن تمیز در دمای اتاق، قرار گرفت. رسوب حاصل در ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. آموده حاصل تا هنگام استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۴- ساخت دی.ان.ای مکمل از آر.ان.ای ویروس (مرحله RT): آر.ان.ا. بدست آمده از مرحله قبل با کمک آغازگر اختصاصی برای ساخت دی.ان.ای مکمل با استفاده از کیت cDNA Synthesis مطابق با دستور شرکت سازنده Fermentas (لیتوانی) انجام گرفت.

ابتدا چهار میکرولیتر آر.ان.ا. با غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میکرولیتر با ۲۰ پیکومول از آغازگر معکوس مخلوط و سپس حجم به کمک آب مقطر عاری از RNase به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از سانتریفیوژ کردن کوتاه، لوله‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بلافاصله وارد یخ شدند. سپس مواد پایه شامل چهار میکرولیتر از بافر پنج برابر واکنش نسخه برداری معکوس (حاوی ۲۵۰ میلی‌مولار KCl، ۵۰ میلی‌مولار DTT، ۲۵۰ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۲۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl و pH = ۸/۳) و دو میکرولیتر مخلوط ۱۰ dNTPs میلی‌مولار و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم بازدارنده ریبونوکلئاز Fermentas (٤۰ واحد بر میکرولیتر) با آب مقطر استریل عاری از RNase حجم نهائی به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد. پس از یک سانتریفیوژ کردن کوتاه، محتویات لوله به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به محلول واکنش یک میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MULV (۲۰ واحد بر میکرولیتر) اضافه شد. پس از یک سانتریفیوژ کوتاه، واکنش در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ دقیقه انجام شد.

۵- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): پس از ساخت cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

مطابق روش Rowhani *et al.* (1993, 1995) انجام شد.

ترادف آغازگر معکوس (C(5`-CCAAAGTTGGTTTCCCAAGA-3` و آغازگر مستقیم V(5`-ACCGGATTGACGTGGGTGAT-3`) انتخاب گردیدند که به ترتیب به نوکلئوتیدهای ۱۰۸۳-۱۰٦٤ و ۷۸۱-۷٦۲ ژن پروتئین پوششی GFLV متصل می‌شوند.

مواد لازم برای هر واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با ده برابر غلظت (شامل ۲۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl و ۵۰ میلی‌مولار KCl با pH = ۸/۴)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلریدمنیزیوم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی (۲۰µM)، ۲/۵ میکرولیتر دی.ان.ای قالب، ۱۷/۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم پلیمراز تک (پنج واحد بر میکرولیتر) بود. تکثیر رشته دی.ان.ا. در دستگاه ترموسایکلر (مدل اپندورف، ساخت آلمان) با واسرشته سازی اولیه دی.ان.ا. در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای واسرشت سازی، ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای اتصال و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای گسترش و گسترش نهائی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

۶- ارزیابی محصول واکنش PCR: ده میکرولیتر از محصول واکنش PCR، نشانگر اندازه دی.ان.ا. (GeneRuler^{TM} 100 bp DNA Ladder Fermentas)، شاهد مثبت و شاهد منفی در ژل آگاروز یک درصد در بافر TBE (۹۰ میلی‌مولار تریس، ۹۰ میلی مولار اسید بوریک و ۲ میلی مولار EDTA) در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید از آن با دستگاه Gel documentation عکسبرداری شد.

نتیجه و بحث

تعیین آلودگی با روش الایزا: تعدادی از تاک‌های نمونه‌برداری شده دارای برخی از علائم شاخص بیماری برگ بادبزنی مو مانند علائم دوقلو شدن جوانه و زیگزاگی شدن ساقه، انشعابات غیر عادی، کوتاه شدن فاصله میان‌گره‌ها و بدشکلی برگ بودند و همچنین وجود دمبرگ بر روی شاخه که از علائم ویروس GVA ذکر شده است، مشاهده گردید.

بیشتر نمونه‌هایی که در آزمون الایزا نسبت به سه ویروس مورد مطالعه و نمونه‌هایی که در آزمون PCR نسبت به ویروس GFLV واکنش مثبت نشان دادند، فاقد علائم بیماری بودند. آلودگی‌های بدون علائم ویروسی مو قبلاً نیز گزارش شده است (Zaki-aghl & Izadpanah, 2003; Martelli, 1999). از طرف دیگر، بسیاری از نمونه‌ها که دارای انشعابات غیر عادی، علائم زیگزاگ شدن ساقه، کوتاه شدن فاصله میانگره‌ها و بدشکلی برگ بودند، فاقد واکنش مثبت نسبت به ویروس GFLV در آزمون الایزا بودند. بنابراین می‌توان انتظار داشت که آلودگی های ویروسی و شبه ویروسی دیگری نیز در تاکستان‌های این مناطق حضور داشته باشد که نیازمند بررسی‌های بیشتری در این زمینه است. هر چند اینگونه علائم در مو صرفاً نمی‌تواند ناشی از علائم ویروسی باشد (Bovey *et al*., 1980).

نتایج بررسی وضعیت آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده از تاکستان‌های استان‌های خراسان شمالی، خراسان رضوی، گلستان و سمنان نسبت به سه ویروس GFLV، GLRaV-3 و GVA به وسیله آزمون الایزا در جدول یک ارائه شده است. از ۵۸۸ نمونه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ۷۸ درختچه مو حداقل به یک ویروس، هفت نمونه حداقل به دو ویروس و دو درختچه مو به سه ویروس آلوده بودند.

نتایج بدست آمده از آزمون الایزا نشان داد که در نمونه‌های مورد بررسی، ویروس GFLV و GLRaV-3 به ترتیب با ۷ و ۶/۶ درصد دارای بیشترین میزان آلودگی و GVA با ۳ درصد آلودگی بعد از آن‌ها قرار دارد. در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده فراوانی ویروس GFLV در شهرستان قوچان ۱۲/۵ درصد، شاهرود با ۹/۵ درصد، گرگان – کردکوی ۸/۵ درصد، بجنورد حدود یک درصد، و کاشمر بدون آلودگی بود. همچنین فراوانی ویروس GLRaV-3 در این نمونه‌ها در گرگان – کردکوی و کاشمر۹/۵ درصد، قوچان ۷/۵ درصد، شاهرود شش درصد و بجنورد ۴/۳ درصد بود و همچنین فراوانی ویروس GVA در بجنورد شش درصد، شاهرود ۳/۲ درصد، قوچان ۲/۵ درصد، کاشمر دو درصد و گرگان – کردکوی بدون آلودگی بود.

آزمون تشخیص ویروس GFLV با روش RT-PCR: تعدادی از نمونه‌هایی که در آزمون الایزا دارای واکنش مثبت با آنتی‌بادی اختصاصی GFLV بودند و همچنین تعدادی نمونه که دارای واکنش منفی در آزمون الایزا بودند، با روش RT-PCR بررسی شدند.

جدول ۱- نتایج آزمون الایزا برای ویروس های GFLV، GLRaV-3 و GVA در مناطق مختلف نمونه‌برداری شده شمال شرق کشور

Table 1- Results of ELISA tests for GFLV, GLRaV-3 and GVA in North-Eastern vineyards of Iran

استان Province	ناحیه Region	تعداد نمونه‌های آزمایش شده Number of tested samples	تعداد نمونه‌های آلوده Number of positive samples		
			GVA	GLRaV-3	GFLV
خراسان شمالی North Khourasan	بجنورد Bojnord	117	7	5	1
خراسان رضوی Khourasan Rasavi	کاشمر Kashmar	53	1	5	0
	قوچان Ghouchan	40	1	3	5
سمنان Semnan	شاهرود Shahroude	284	9	17	27
گلستان Golestan	گرگان- کردکوی Gorgan-Kordkou	94	0	9	8

بر اساس روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس مربوط به ژن پروتئین پوششی (CP) ویروس برگ بادبزنی مو، یک قطعه دی.ان.ا. حدوداً به طول ۳۲۱ جفت باز در نمونه‌های آلوده به GFLV تکثیر گردید (شکل ۱). در حالیکه در نمونه‌های گیاه سالم هیچگونه باندی مشاهده نشد. تکثیر قطعه‌ای به طول ۳۲۱ جفت باز به وسیله آغازگرهای اختصاصی به وسیله ویروس GFLV با نتایج Rowhani *et al*., (1993) و Zaki-aghl & Izadpanah (2003) مطابقت دارد.

در این بررسی علاوه بر قطعه ۳۲۱ جفت بازی، یک قطعه دی.ان.ا. غیر منتظره حدوداً به طول ۱۵۰ جفت بازی به طور مکرر در برخی از نمونه‌ها تکثیر شد در حالیکه این قطعه در نمونه‌های سالم بر اساس نتایج الایزا مشاهده نشد (شکل ۱). براساس نتایج حاصل از جستجوی پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه Clustal W در پایگاه اطلاعاتی EBI (نتایج نشان داده نشده است) مشخص شد بخشی از آغازگرهای بکار رفته می‌توانند با ویروئیدهای لکه زرد مو [*Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) و *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2)] به علت مشابهت توالی، واکنش نشان دهند. بنابراین احتمال دارد که تکثیر قطعه حدود ۱۵۰ جفت بازی در برخی از نمونه‌ها در اثر آلودگی آن‌ها حداقل به یکی از ویروئیدهای یاد شده مو باشد.

ردیابی ویروس برگ بادبزنی مو در تاکستان‌های قدیمی شمال شرق کشور همراه با گزارش زکی‌عقل و ایزدپناه مبنی بر گسترش وسیع بیماری برگ بادبزنی مو در ایران، وجود آن در تاکستان‌های قدیمی و در تاک‌های خودرو منطقه سردشت (Zaki-aghl & Izadpanah, 2003) و همچنین وجود نماتد (*Xiphinema index*) ناقل آن در ایران (Mojtahedi *et al.*, 1980) و فرضیه Hewitt مبنی بر اینکه منشأ ویروس GFLV ایران باستان است (Hewitt *et al.*, 1970) را تقویت و تأیید می‌نماید.

همچنین در این بررسی مشخص شد که با گرمتر شدن هوا، آزمون الایزا قادر به تشخیص آلودگی تعداد زیادی از قلمه‌های مستقر شده در گلخانه نبود. در حالیکه قبل از شروع فصل گرما این قلمه‌ها واکنش مثبت قاطعی با آنتی‌بادی اختصاصی GFLV داشتند و آلوده بودن آن‌ها به کرات ثابت شده بود.

این نتایج با یافته‌های سایر محققین (Hewitt, 1950; Zaki-aghl & Izadpanah, 2003) مطابقت دارد. به نظر می رسد علت این امر کاهش شدید غلظت ویروس در اثر گرما باشد. بررسی همین نمونه‌ها با روش RT-PCR نشان دهنده آلودگی آن‌ها به GFLV بود. بنابراین به نظر می رسد برای تهیه قلمه‌های سالم و پایه‌های مادری عاری از آلودگی، روش الایزا چندان مطمئن نیست و استفاده از روش RT-PCR توصیه می‌گردد.

شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ویروس برگ بادبزنی مو روی ژل آگاروز یک درصد. چاهک ۱: نشانگر اندازه دی.ان.آ. چاهک ۲: گیاه سالم. چاهک ۹-۳: نمونه‌های شاهرود. چاهک ۱۶-۱۰: نمونه‌های قوچان.

Fig. 1- Agarose gel electerophoresis of polymerase chain reaction products of *Grapevine fanleaf virus.* Lane 1, DNA ladder; lane 2, healthy grapevine; lane 3-9, samples of Shahroud; lane 10-16, samples of Ghouchan.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۰۶۴-۸۱-۱۱-۱۰۷ مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی انجام شده است. نگارندگان از سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی و نیز گروه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس در تأمین اعتبارات مالی انجام این تحقیق تشکر می‌نمایند.

نشانی نگارندگان: مهندس مریم ابراهیم قمی و دکتر مسعود شمس‌بخش، گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛ دکتر رضا پوررحیم، بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵، ایران.