

تعیین دامنه میزبانی، خالص سازی فیزیکی شیمیایی و بررسی سرولوژیکی ویروس S سیب زمینی در شمال خراسان

محمد رضا حسین زاده* - بهروز جعفر پور - ماهرخ فلاحتی رستگار^۱

تاریخ دریافت: ۸۲/۳/۱۳

تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۸

چکیده

در بررسی که به منظور یافتن ویروس S سیب زمینی در مزارع سیب زمینی شمال خراسان صورت گرفت، تعدادی غده بطور انتخابی از چندین مزرعه سیب زمینی در اطراف بجنورد از بوته‌هایی که علائم موزائیک^۲، روگوز^۳، فرورفتگی رگبرگ‌ها، ریزبرگی و تموج حاشیه برگ‌ها را داشتند جمع‌آوری شد. هم‌چنین تعدادی غده نیز بطور تصادفی از مزارع سیب زمینی اطراف شهرهای مشهد، چناران، قوچان، فاروج و شیروان گردآوری گردید. غده‌های جمع‌آوری شده تا سپری شدن دوره خواب در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس در شرایط گلخانه کشت داده شدند. براساس واکنش گیاهان محک افتراقی، تعداد کمی از بوته‌های سیب زمینی به PVS آلودگی نشان داده و عصاره یکی از بوته‌های آلوده در مطالعات دامنه میزبانی گیاهان *Nicotiana debneyi* و *Domin 111 Lycopersicon esculentum L. cv. early urbana* را بطور سیستمیک آلوده نمود. این جدایه بر روی گیاهان *Chenopodium amaranticolor* Costa & Reyn و *C. quinoa* Wild و علائم موضعی کلروتیک ایجاد نمود ولی در *Datura stramonium L.*, *Nicotiana tabacum L. cv. xanthi*, *Petunia hybrida* Vilm, *Gompherena globosa L.* هیچ‌گونه علائمی ایجاد نکرد. ایزوله مورد نظر بعد از خالص‌سازی بیولوژیک روی *C. quinoa* در *N. debneyi* تکثیر داده شد و خالص‌سازی آن طبق روش پیشنهادی (Hammond & Laqwson, 1988) با مقداری تغییرات انجام گرفت. آنگاه در برابر آماده نسبتاً خالص ویروس، آنتی سرم تهیه گردید. از آزمون‌های نشئت دو طرفه در آگار^۴ و الیزا^۵ جهت تشخیص سرولوژیکی ویروس استفاده شد. بررسی میکروسکوپ الکترونی پیکره‌های رشته‌ای سالم ویروس به ابعاد ۶۲۱×۹۹ نانومتر را در آماده نسبتاً خالص نشان داد (۵۷۰۰×). جهت تعیین میزان آلودگی مزارع سیب زمینی اطراف بجنورد مجموعاً ۲۰۰ بوته بطور تصادفی نمونه‌برداری شده و از آزمون DAS-ELISA، جهت تشخیص ویروس استفاده شد. براساس نتایج این آزمون درصد آلودگی به PVS در منطقه بجنورد ۱۵/۵٪ تعیین گردید.

واژه‌های کلیدی: ویروس S سیب زمینی، خالص سازی، آنتی سرم، الیزا، میکروسکوپ الکترونی

مقدمه

انسان است. این محصول در جهان از نظر اهمیت در مقام پنجم و بعد از محصولات نظیر گندم، برنج، ذرت و جو قرار دارد. مبدأ سیب زمینی کوهستان‌های آند در آمریکای جنوبی است که در آنجا از دیرباز به عنوان یک محصول مهم غذایی مطرح بوده است (۲ و ۶). حدود ۳۰ بیماری ویروسی سیب زمینی شناسایی شده است (۲). ویروس S سیب زمینی یکی از متداولترین ویروس‌هایی است که سیب زمینی را

سیب زمینی یکی از مهمترین گیاهان دو لپه‌ای در تغذیه

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، اساتید گروه پزشکی دانشکده

کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* - نویسنده مسئول

Email: mohhssz@yahoo.com

2 - Mosaic

3 - Rugose

4 - Double diffusion agar

5 - Enzyme-linked immunosorbent assay

عصاره گیاهی^۴ (LIV) در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد ۳-۴ روز می‌باشد. دامنه میزبانی PVS محدود می‌باشد و گونه‌های گیاهی حساس اساساً به گیاهان خانواده‌های Chenopodiaceae و Solanaceae تعلق دارند (۲۲) و سیب‌زمینی تنها میزبان طبیعی آن بشمار می‌رود (۲). این ویروس به روش مکانیکی با تماس برگ‌های گیاهان سالم و آلوده سیب‌زمینی در گلخانه و مزرعه، از طریق غده‌های آلوده، توسط لباس، دست‌ها و چاقوی آلوده منتقل می‌شود. هر چند، مهمترین روش انتقال آلودگی ویروس بوسیله غده‌های بذری است (۲، ۱۵ و ۱۶). نژاد Andean این ویروس (PVS-An) به کمک شته به طریق ناپایا منتقل می‌شود در حالیکه شته‌ها قادر به انتقال نژاد معمولی ویروس (Type-Strain) نمی‌باشد (۱۹). خوشبختانه بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی از طریق بذری حقیقی گیاه منتقل نمی‌شوند (۲). در ایران این ویروس از منطقه اصفهان توسط دانش و همکاران (۱۳۷۱) (۵) و از منطقه مشهد توسط جعفرپور (۱۳۶۸) (۳) گزارش شده است. در این مطالعه ضمن شناسایی مجدد ویروس، تعیین دامنه میزبانی ویروس، خالص‌سازی، تهیه آنتی‌سرم و بررسی‌های سرولوژیکی ویروس انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در اوایل خرداد ماه ۱۳۷۵ در چهار مزرعه از مزارع سیب‌زمینی واقع در اطراف بجنورد که در آنها ارقام دراگا و آلفا کاشته شده بود، تعداد چهل بوته که علائم بیماری ویروسی نظیر موزائیک، روگوز سطح برگ‌ها، فرورفتگی رگبرگ‌ها، ریزبرگی و تموج حاشیه برگ‌ها را نشان می‌دادند تعیین و علامت گذاری شدند. در هنگام برداشت دو غده از هر بوته در پاکت کاغذی قرار داده شد و پس از ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل و جهت سپری شدن

آلوده می‌کند و تقریباً تمام ارقام سیب‌زمینی موجود در دنیا را آلوده نموده است (۲، ۴ و ۶). PVS یکی از اعضاء گروه کارلاویروس (*Carlaviruses*) می‌باشد. علائم مزرعه‌ای این ویروس در سیب‌زمینی بستگی به ژنوتیپ میزبان، نژاد ویروس، مرحله رشد میزبان و شرایط محیطی دارد (۱۴). علائم ویروس S سیب‌زمینی روی اغلب ارقام بصورت نامشخص، بسیار خفیف و یا ناپیداست (۲ و ۵). در شرایط مناسب برای توسعه علائم بیماری برخی از ارقام حالت روگوز خفیف را نشان می‌دهند (۲ و ۱۴). ویروس S سیب‌زمینی تا اوایل سال‌های ۱۹۵۰ ویروس ناشناخته بود. علت این امر این است که این ویروس علائم بسیار خفیفی ایجاد می‌نماید. اولین بار PVS بوسیله روش‌های سرولوژیکی و در حین تلاش برای تهیه آنتی‌سرم ویروس A سیب‌زمینی (PVA) کشف شد و بنابراین کشف آن از روی علائم نبوده است (۱۴). این ویروس اولین بار توسط Rozendaal 1952 و De Bruyn ouboter 1952 توصیف گردید (۲۲). در حال حاضر این ویروس انتشار جهانی دارد (۱۴). پوشش پروتئینی ویروس مجموعاً شامل ۲۹۳ اسید آمینه با وزن مولکولی ۳۲-۳۴ کیلودالتون است (۱۱ و ۲۱). پیکره‌های ویروس S سیب‌زمینی میله‌ای نخ‌شکل یا بصورت رشته‌های راست تا حدی خمیده می‌باشد اندازه پیکره‌های ویروس ۱۳-۱۲×۶۶۰-۶۵۰ نانومتر ذکر گردیده است (۸، ۱۱ و ۱۴).

ماده ژنتیکی کارلاویروس‌ها متشکل از یک RNA تک رشته‌ای مثبت به طول ۷/۸-۷ کیلو باز است (۲۰). انتهای ۳' RNA ویروس پلی‌آدنیله (PolyA) می‌باشد و انتهای ۵' ژنوم ویروس فاقد^۱ Vpg است (۱۹). درجه حرارت بی‌اثر شدن^۲ TIP در مدت ۱۰ دقیقه ۶۰-۵۵ درجه سانتیگراد، آخرین حد رقت^۳ (DEP) بین ۰/۰۱ تا ۰/۰۰۱ و پایداری در

1 - Viral protein linked to genom
2 - Termal inactivation point.
3 -Dilution end point.

کشیده شد. از هر گیاه محک دو بوته برای این کار در نظر گرفته شد. پنج دقیقه پس از مایه زنی سطح برگ‌های مایه زنی شده این گیاهان بوسیله آب معمولی شستشو داده شد. آنگاه تاریخ مایه زنی و شماره بوته سیب زمینی برای هر گلدان ثبت و مشخص گردید. مایه زنی‌ها معمولاً در اوقات خنک روز، صبح یا نزدیک غروب آفتاب صورت می گرفت. بوته‌های مایه زنی شده هر روز مورد بررسی قرار گرفته و زمان ظهور و نوع علائم ثبت می گردید. جهت خالص سازی بیولوژیکی یکی از لکه‌های موضعی کلروٹیک ریز ظاهر شده روی برگ‌های سلمه *C. quinoa* Wild. با ۳ مرتبه مایه زنی متوالی استفاده گردید. جهت نگهداری جدا شده ویروس از گیاه *N. debneyi* که بطور سیستمیک به این ویروس آلوده می شود استفاده شد.

مطالعه دامنه میزبانی

به منظور بررسی دامنه میزبانی، جدا شده ویروس S سیب زمینی، پس از خالص سازی بیولوژیک، علاوه بر گیاهان محک افتراقی به گیاهان میزبان دیگری به همان روشی که شرح داده شد، مایه زنی گردید. بوته‌های مایه زنی شده هر روز مورد بررسی قرار گرفته و زمان ظهور علائم ثبت می گردید.

خالص سازی فیزیکی شیمیایی ویروس

خالص سازی جدایه ویروس S سیب زمینی براساس روش لاوسون و هاموند با تغییراتی چند صورت گرفت. چهار هفته پس از مایه زنی گیاهچه‌های *N. debneyi*، ۱۲۵ گرم از برگ‌هایی که علائم سیستمیک نشان می دادند جمع آوری و بعد از حذف رگبرگ اصلی در مخلوط کن با چهار حجم بافر عصاره گیری (بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار، pH ۸/۲، حاوی ۰/۵ درصد سولفیت سدیم) به مدت ۵ دقیقه کاملاً خرد و هموژنیزه گردید. سپس عصاره حاصل از پارچه ملامل

دوره خواب در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا اوایل بهمن ماه نگهداری گردید. هم چنین در اوایل پائیز از مزارع سیب زمینی برداشت شده اطراف شهرهای مشهد، چناران، قوچان، فاروج و شیروان نیز تعدادی غده بطور تصادفی جمع آوری و پس از ثبت مشخصات در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در اوایل بهمن ماه تعدادی از این غده‌ها در شرایط گلخانه داخل گلدان‌های پلاستیکی با دهانه‌ای به قطر ۲۰ سانتیمتر محتوی خاک زراعی معمولی کاشته شدند.

به منظور جداسازی ایزوله ویروس، گیاهان محک افتراقی این ویروس در شرایط گلخانه به صورت خزانه در خاک مخلوط شده از خاک زراعی معمولی - خاک برگ پوسیده - ماسه و کود پوسیده دامی به نسبت‌های ۱:۳:۱:۱ کاشته شد. کلیه گیاهان مورد آزمایش در گلخانه در زمستان در دمای متوسط 15 ± 5 درجه سانتیگراد و در تابستان در دمای 20 ± 8 درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

گیاهان محک افتراقی مورد استفاده شامل *Datura stramonium* L. *Ch. quinoa* Wild, *N. debneyi* Domin و *Ch. amaranticolor* Costa & Reyn بودند. بذور این گیاهان بطور جداگانه در گلدان‌هایی به قطر ۲۰ سانتیمتر کشت شدند. از آنجا که ویروس S سیب زمینی به راحتی به روش مکانیکی قابل انتقال است، بعد از گذشت یک ماه از کشت غده‌های آلوده به PVS، زمانی که طول بوته‌های سیب زمینی به ۱۵-۱۰ سانتیمتر رسید از عصاره برگ‌های آلوده برای مایه زنی استفاده گردید. برای این منظور ۴-۵ برگ آلوده از بوته‌ها جمع آوری شد و پس از توزین به نسبت ۱:۴ با بافر مایه زنی (بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار، pH ۸/۲، حاوی ۰/۵ درصد سولفیت سدیم) بطور جداگانه درون هاون چینی عصاره گیری گردید. عصاره‌های صاف شده بطور جداگانه به کمک انگشت اشاره به آرامی روی سطح برگ گیاهان محک در مرحله ۴-۵ برگگی که قبلاً با مختصری پودر کاربوراندوم ۳۰۰ مش پوشیده شده بود،

سانتریفوژ گردید. در این مرحله ۱۰۰ میکرولیتر از آماده نسبتاً خالص ویروس برداشته شد و پس از رقیق‌سازی (۱:۱۰) با بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۸ بر روی سطح برگ‌های گیاهچه‌های *Ch. quinoa* جهت بررسی قدرت عفونت‌زایی^۲ مایه‌زنی شد. ضمناً گیاهچه‌های دیگری از همین گیاه به عنوان شاهد با بافر تنها مایه‌زنی گردید.

به منظور خارج کردن ساکارز باقیمانده سوسپانسیون بدست آمده داخل لوله‌های دیالیز که قبلاً آماده شده بود، ریخته شد و در حضور بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۸ به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد به کمک همزن مغناطیسی دیالیز گردید.

جهت اسپکتروفتومتری و تعیین غلظت ویروس از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu, uv- 160A, Japan) استفاده شد و میزان جذب در طول موج‌های ۲۲۰-۳۴۰ نانومتر تعیین گردید. بدین ترتیب با تعیین میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر، و در نظر گرفتن میزان دقیق رقیق‌سازی آماده و ضریب خاموشی EC=3 (مربوط به ویروس) غلظت ویروس در آماده محاسبه گردید.

تهیه آنتی‌سرم

به منظور انجام آزمون‌های سرولوژیکی در ابتدا آنتی‌سرم ویروس تهیه گردید. برای این منظور ۰/۵ میلی‌لیتر آماده خالص ویروس با ۰/۵ میلی‌لیتر روغن^۳ F.C.A (Sigma Chemical Co.) به مدت ۲-۳ دقیقه خوب مخلوط شد تا به صورت امولسیون در آید، سپس امولسیون حاصل با سرنگ ۵ میلی‌لیتر در ماهیچه پای خرگوش نیوزیلندی^۴ ۳ ماهه تزریق گردید. در مجموع ۳ تزریق به فاصله یک هفته از هم انجام شد. در تزریق‌های دوم و سوم از روغن^۴ F.I.A استفاده شد.

دو لایه عبور داده شد و عصاره صاف شده داخل لوله‌های سانتریفوژ به طور مساوی تقسیم و توزین گردید. عصاره صاف شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. فاز مایع رویی^۱ داخل استوانه مدرج جمع‌آوری شد و پس از تعیین حجم، دو درصد تریتون X-100 (V:V) به آن اضافه گردید. آنگاه سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه توسط همزن مغناطیسی به هم زده شد و بعد از طی این مدت به آن چهار درصد پلی‌اتیلن گلیکول (با وزن مولکولی ۶۰۰۰) و ۰/۵۶ درصد NaCl (V:W) افزوده شد. سپس به مدت یک ساعت بروی شیکر قرار داده شد تا مواد افزوده شده حل شود. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (گردان JA-14) سانتریفوژ شد، آن گاه مایع رویی حذف و رسوب حاصل در مقدار کافی بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۸ به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد به هم زده شد تا کاملاً در بافر حل گردد. رسوب حل شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه (گردان JA-14) سانتریفوژ گردید و پس از برداشت محصول رویی رسوب باقیمانده حذف شد. آنگاه محلول رویی بر روی ۵ میلی‌لیتر ساکارز ۲۵ درصد تهیه شده در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار به میزان ۲ میلی‌لیتر برای هر لوله اضافه گردید و سپس به مدت ۲/۵ ساعت در ۳۶۰۰۰ دور دقیقه (گردان Beckman L5-508 Ultra Centrifuge, type 40) سانتریفوژ گردید. پس از حذف محلول رویی رسوب حاصل در مقدار کافی بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۸ حل گردید. رسوب حل شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه (گردان JA-17) سانتریفوژ و پس از حذف رسوب حاصله، به مایع رویی سه دور سانتریفوژ افتراقی داده شد. در آخرین دور سانتریفوژ افتراقی رسوب حاصله در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۸ حل و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه (گردان JA-17)

2 - Infectivity test

3 - Freund's complete adjuvant

4 - Freund's incomplete adjuvant

1 - Supernatant

۴، ۱۳، ۱۷)

آزمون الیزا طبق روش Clark & Adams (۹) انجام گردید. ایمونو گلوبولین G (IgG)، ایمونو گلوبولین G متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (کونژوگه) و شاهد مثبت ویروس از منبع خارجی تأمین گردیدند. این آزمون به روش DAS-ELISA انجام شد (۹). نتایج این آزمون بر اساس تغییر رنگ حفرات از بیرنگ تا زرد مایل به نارنجی به طور چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین عیار آنتی سرم

جهت تعیین عیار آنتی سرم از آزمون نشت دو طرفه در آگار با الگوی خطی استفاده گردید. این الگو متشکل از شش جفت چاهک موازی به قطر ۷ میلی‌متر با فاصله ۳ میلی‌متر از هم بود. الگوی مورد نظر در دو عدد پتری یکبار مصرف تهیه گردید و مجموعاً ۱۲ جفت چاهک در نظر گرفته شد. از رقت‌های $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{1024}$ آنتی سرم داخل سرم فیزیولوژیک و سوسپانسیون نسبتاً خالص ویروس با غلظت $2/5 \text{ mg/ml}$ به عنوان آنتی ژن استفاده گردید.

تهیه عکس میکروسکوپ الکترونی از پیکره‌های ویروس

برای این منظور از سوسپانسیون نسبتاً خالص ویروس استفاده شد. پولک مشبک (گرید) پوشش داده شده با کربن و ۰/۳۵ فرموار مورد استفاده قرار گرفت. آموده نسبتاً خالص ویروس با اورانیل استات یک درصد رنگ آمیزی و سپس با میکروسکوپ الکترونی نوع TEM (Philips 301, Netherlands) و با بزرگ‌نمایی $57,000 \times$ در بخش ویروس‌شناسی مؤسسه بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی توسط آقای دکتر شهرآئین عکس میکروسکوپ الکترونی تهیه شد.

دو هفته بعد از آخرین تزریق از قلب حیوان خونگیری به عمل آمد. خون گرفته شده به مدت ۶۰ - ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد سپس بوسیله یک میله شیشه‌ای باریک لخته حاصل از دیواره لوله جدا و برای یک شب در یخچال نگهداری شد. آنگاه سرم رویی به آرامی برداشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از این مرحله ۰/۰۲ درصد آزید سدیم به آن اضافه شده و آنتی سرم تهیه شده در لوله‌های اپندروف به فریزر انتقال یافت. لازم به ذکر است که یک هفته قبل از شروع تزریقات از رگ پای خرگوش مقداری خون گرفته شد و سرم آن به طریق فوق جدا شد تا از آن به عنوان سرم نرمال در آزمایشات سرولوژیکی استفاده شود (۳، ۷، ۱۱ و ۲۳).

جهت انجام آزمایش‌های سرولوژیکی ابتدا آنتی سرم مورد استفاده با عصاره گیاه سالم *N. debneyi* به منظور جذب آنتی سرم‌های میزبانی و ارتقاء خلوص آن تیمار گردید.

آزمون‌های سرولوژیکی

از آزمایش‌های سرولوژیکی نشت دو طرفه در آگار و الیزا برای شناسایی ویروس استفاده گردید. جهت انجام آزمون نشت دو طرفه در آگار مقادیر ۰/۸ گرم آگارز، ۰/۲ گرم نترات سدیم و ۰/۸ گرم NaCl با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۱۰۰ درجه سانتیگراد کم کم مخلوط و به کمک حرارت کاملاً حل گردید و پس از اضافه کردن آزید سدیم به میزان ۰/۲ گرمای در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتیگراد، ژل مذاب به داخل پترهای یکبار مصرف به قطر ۷/۵ سانتی‌متر به میزان ۱۲ میلی‌لیتر به ازاء هر پتری ریخته شد. از الگوی دایره‌ای متشکل از ۶ چاهک کناری و یک چاهک مرکزی به قطر ۷ میلی‌لیتر استفاده گردید. بعد از افزودن آنتی ژن به چاهک‌های کناری و آنتی سرم به چاهک‌های مرکزی و قرار دادن آنها در محفظه مرطوب بعد از ۷۲-۱۶ ساعت ارزیابی نتایج با توجه به واکنش‌های انجام شده صورت گرفت (۱)،

نتایج و بحث

بررسی اتیولوژیکی بیماری: برای شناسایی ویروس S سیب‌زمینی در مرحله اول از نوع علائم و واکنش گیاهان محک افتراقی ویروس استفاده گردید. واکنش گیاهان محک افتراقی پس از مایه‌زنی به وسیله عصاره یکی از بوته‌های سیب‌زمینی دارای علائم ویروس کشت شده در گلخانه به شرح زیر می‌باشد:

- سلمه قرمز *Ch. amaranticolor*: ۱۲ روز بعد از مایه زنی لکه‌های موضعی کلروتیک به قطر یک میلی‌متر ظاهر گردید (شکل ۱)

- سلمه تره *Ch. quinoa*: ۵ روز بعد از مایه‌زنی لکه‌های موضعی کلروتیک به قطر ۲-۳ میلی‌متر ظاهر گردید (شکل ۲)

- توتون *N. debneyi*: ۱۲ روز پس از مایه‌زنی ابتدا علائم روشن رگبرگها و سپس بعد از ۲-۳ روز علائم تورم

سطح برگها و موزائیک ابلقی ظاهر گردید (شکل ۳)
- تاتوره *D. stramonium*: هیچگونه علائمی ظاهر نشد. با تلقیح برگشتی عصاره برگ تاتوره بر روی سلمه تره و سلمه قرمز نیز هیچگونه علائمی بروز نکرد. عدم آلودگی تاتوره مؤید وجود ویروس S سیب‌زمینی در عصاره برگ سیب‌زمینی آلوده بود. با بررسی نوع علائم ظاهر شده در این چهار میزبان افتراقی، بوته سیب‌زمینی آلوده به PVS تشخیص داده شد.

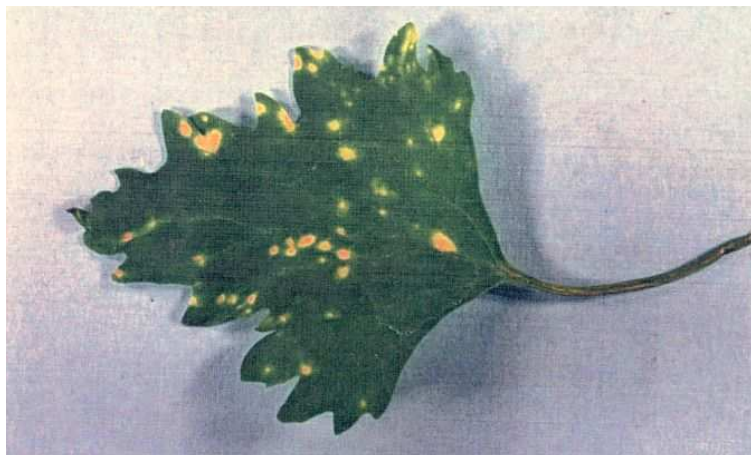
مطالعه دامنه میزبانی

نوع واکنش سایر میزبانهای این ویروس به شرح زیر مشاهده گردید:

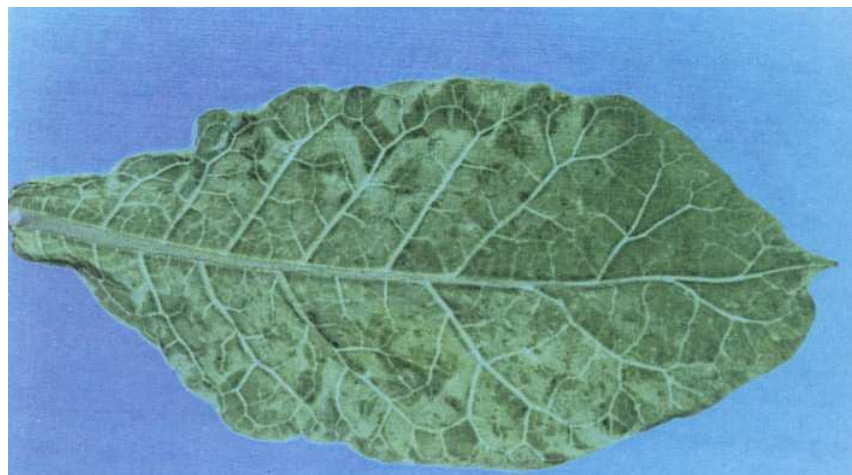
- توتون *N. tabacum L. cv. Xanthi*: هیچگونه علائمی ظاهر نشد.



(شکل ۱) لکه‌های موضعی کلروتیک روی برگهای *Ch. amaranticolor* مایه‌زنی شده با جدا شده بجنورد



(شکل ۲) لکه‌های موضعی کلروتیک روی برگ‌های *Ch. quinoa* مایه زنی شده با جدا شده بجنورد



(شکل ۳) علائم موزائیک ابلقی و روشن شدن رگبرگ‌های *Nicotiana debneyi* مایه زنی شده با جدا شده بجنورد

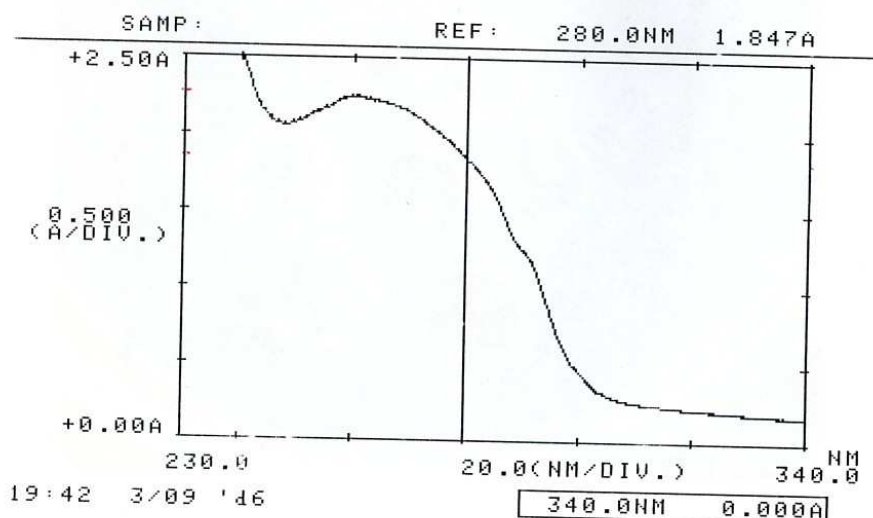
عوامل مختلفی نظیر رقم میزبان، تیپ بیماریزای عامل بیماری، شرایط محیطی و نژاد ویروس در بروز علائم دخیل هستند. نوع واکنش گیاهان در مطالعات دامنه میزبانی با نتایج تحقیقات محققان مختلف مطابقت دارد (۲۲ و ۱۰).

خالص‌سازی فیزیکی - شیمیایی ویروس بعد از انجام آخرین دور ساترینفوژ افتراقی، سوسپانسیون کدروی از ویروس نسبتاً خالص بدست آمد. نتیجه مایه‌زنی آماده نسبتاً خالص شده PVS روی *C. quinoa* بیانگر حفظ قدرت آلودگی عامل بیماری تا آخرین مرحله خالص‌سازی فیزیکی بود زیرا پس از ۵ روز لکه‌های موضعی کلروتیک به تعداد زیاد در سطح برگ‌های بوته‌های ماه زنی شده ظاهر گردید. بر روی

- گل تکمه‌ای *Gompherena globosa* L.: هیچگونه علائمی ظاهر نشد.
- گوجه‌فرنگی *Lycopersicon esculentum* L. cv. Early arbana III: ۱۴ روز پس از مایه‌زنی علائم موزائیک ابلقی ظاهر گردید.
- لویسا *Phaseolus vulgaris* L. var. red kidney: هیچگونه علائمی ظاهر نشد.
- اطلسی *Petunia hybrida* Vilm.: هیچگونه علائمی ظاهر نشد.
- فلفل *Capsicum frutescens* L.: هیچگونه علائمی ظاهر نشد.

نسبتاً خالص PVS در طول موج های ۲۳۰-۳۴۰ نانومتر نشان داد که حداقل میزان جذب در طول موج ۲۴۸ نانومتر و حداکثر آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرار گرفته است (شکل ۴).

بوته شاهد که تنها با بافر، مایه زنی شده بود هیچگونه علائمی مشاهده نشد. غلظت ویروس در آماده پس از ۱۰ برابر رقیق سازی در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۸، $7/48 \text{ mg/ml}$ تعیین شد (EC=۳) هم چنین نسبت $\frac{A260}{A280}$ برای این ویروس ۱/۲۱ محاسبه گردید. مطالعه طیف جذبی آماده



(شکل ۴) منحنی مربوط به طیف جذبی سوسپانسیون ویروس بین طول موج های ۲۳۰ - ۳۴۰ نانومتر

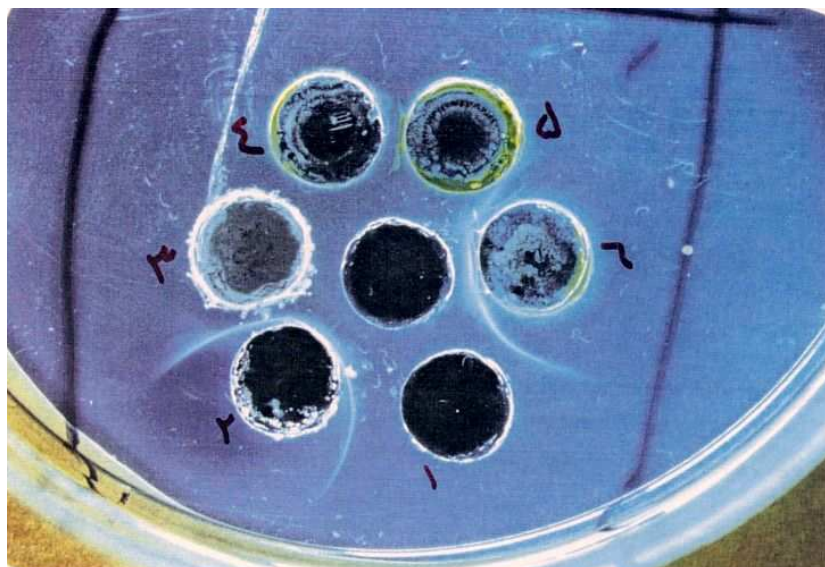
نمونه (۱۵/۵٪) به PVS آلودگی داشتند. این ویروس نسبت به سایر ویروسهای سیب زمینی شیوع کمتری دارد و یکی از دلایل آن عدم انتقال آن با شته می باشد.

تهیه عکس میکروسکوپ الکترونی از پیکره های ویروس

عکس میکروسکوپ الکترونی پیکره های سالم ویروس را به ابعاد 9×621 نانو متر نشان داد (شکل ۶). اندازه ابعاد ویروس با گزارشهای محققان مختلف (۱۴، ۱۷، ۲۲ و ۱۸) کاملاً مطابقت دارد. تعداد زیادی از پیکره های ویروس دچار شکستگی شده و اندازه آنها کمتر از ابعاد واقعی است.

سرولوژی

آنتی سرم تیمار نشده اولیه در آزمون نشت دو طرفه در آگار با عصاره گیاه آلوده *N. debneyi* و همچنین سوسپانسیون نسبتاً خالص ویروس واکنش مثبت نشان داد. در حالیکه با عصاره سالم گیاهان *C. quinoa*، *N. debneyi* هم چنین بافرهای عصاره گیری و رقیق سازی ویروس هیچگونه واکنشی نشان نداد. همین نتایج با آنتی سرم تیمار شده با عصاره گیاه سالم *N. debneyi* نیز بدست آمد. سرم نرمال با هیچکدام از نمونه ها واکنش نشان نداد (شکل ۵). نتایج آزمون الیزا بطور چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمون حفرات محتوی ویروس بعد از اضافه نمودن سوبستره آنزیم آلکالین فسفاتاز به رنگ زرد تغییر رنگ می دهند. با استفاده از این آزمون پراکنش ویروس در منطقه بجنورد تعیین گردید. از ۲۰۰ نمونه جمع آوری شده ۳۱



(شکل ۵) آزمون نشت دوطرفه در آگار:

۱- بافر رقیق سازی ۲- آموده نسبتا خالص ویروس ۳- بافر عصاره گیری
 ۴- عصاره گیاه سالم *N. debneyi* ۵- عصاره گیاه آلوده *N. debneyi*



شکل ۶. عکس میکروسکوپ الکترونی از پیکره‌های ویروس (بزرگنمایی ۵۷۰۰۰x)

تشکر و قدردانی:

نگارندگان از پروفیسور Sven Erik Albrechtsen از مؤسسه بیماری‌شناسی بذر کشورهای در حال توسعه، کپنهاگ، دانمارک، دکتر نورالدین هابیلی از مؤسسه CSIRO آدلاید، استرالیای جنوبی، دکتر S.M.Paul

Khurana از مرکز تحقیقات سیب زمینی، شیملا، هندوستان بخاطر ارسال بروز گیاهان محک صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.
 هم‌چنین از جناب آقای دکتر نوح شهرآئین، بخش ویروس‌شناسی مؤسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی

بخاطر تهیه عکس میکروسکوپ الکترونی از پیکره‌های ویروس سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- ۱-جعفرپور، ب. ۱۳۷۰. روشهای تشخیص ویروسهای گیاهی. تألیف هیل. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۲۰۷ص.
- ۲-جعفرپور، ب. ۱۳۷۰. بیماریهای سیبزمینی، تألیف ریچ، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ص ۲۸۳.
- ۳-جعفرپور، ب. ۱۳۶۸. شناسایی ویروسهای S و X سیبزمینی در مشهد. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. ص ۱۶۶.
- ۴-حسینی مهربان، ا. ۱۳۷۶. بررسی ویروس موزائیک کاهو و تعیین پراکنش آن در منطقه مشهد، پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۸۶.
- ۵-دانش، د. سلیمانیان، ص. فیلسوف، ف. و دهقان، م. ۱۳۷۱. فراوانی چهار ویروس بیماریزای سیبزمینی در مزرعه آزمایشی فریدن اصفهان، بیماری‌های گیاهی، جلد بیست و هشتم. ۱-۹ ص.
- ۶-رضایی، ع. و سلطانی، ا. ۱۳۷۵. زراعت سیبزمینی، تألیف بوکا، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۱۷۹ص
- ۷-طیبی، د. ۱۳۷۶. شناسایی آلرژنهای موجود در گرده زعفران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ص ۱۲۰.
8. Brandes, J., Wetter, C., Bagnall, R.H., and Larson, R.H. 1959. Size and shape of the particles of Potato virus S, Potato virus M. and Carnation latent virus. *Phytopathology* 49: 443-446 P.
9. Clark, M.F., and Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme – linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. G. Virol.* 34: 475- 483 P.
10. De Bokx, J. A. 1970. Reactions of various plant species to inoculation with potato virus S. *Neth. J. Pl. Path.* 76: 70-78 P.
11. Foster, G.D. and Mills, P. R. 1990. Evidence for the role of subgenomic RNA in the production of Potato virus S coat protein during in vitro translation. *J. G. virol.* 71: 1247 – 1249 p.
12. Franc, G.D., and Bantari, E.E. 1984. The transmission of Potato virus S by The cutting knife and retention time of infectious PVS on common surfaces. *American Potato Journal* 61: 253 – 260P.
13. Hampton, R., Ball, E., and Deboer, S. 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens.
14. A laboratory Manual. The APS Press. 389 PP.
15. Hooker, W. J. 1983. Compendium of Potato diseases. The APS press 125 PP.
16. Khalil, E. 1982. Detection and spread of potato virus S. (Abstract). *DAI- B 42/ 108, P.3052.*
17. Khurana, S.M.P. 1985. Potato viruses and virus – like diseases, detection, diagnosis, identification and Characterization. 189- 221p. In: B.M. Gupta, B.P. Singh, H.N. Verma, and K.M. Strivastava (Eds). *Perspectives in Plant virology. Vol. I. Print House (India).*
18. Kiratiya- angul, K., Waimala, P., and Deema, N. 1992. Purification and antiserum production of potato virus S (PVS) *SAPPRAD 1:246-248 P*
19. Mackenzie, D.j., Tremaine, J.H., and Stace- Smith, R. 1989. Organization and interviral homologies of the 3- terminal portion of potato virus S. RNA. *J. G. Virol.* 70:1053-1063 p.
20. Monis, J. and Dezoeten, G.A. 1990. Characterization and translation studies of potato virus S RNA. *Phytopathology* 80: 441- 445 p.
21. Monis, J., and De Zoeten, G. A. 1990. Molecular cloning and physical mapping of potato virus S complementary DNA. *Phytopathology* 80: 446 – 450 P.
22. Morelli, J.K., and Vayda, M.E. 1996. Mechanical wounding of Potato tubers induce replication of potato virus. s. (Abstract). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 33- 47 P.
23. Wetter, C. 1971. Potato viruses. *S.C.M.I/ A.A.B Descriptions of plant viruses* 241 – 243 P.

24. Wright, N.S. 1981. A Strategy for PVX and PVS control on seed farms. (Abs). American Potato Journal 58: 525 P.

Host- range studies ,physicochemical purification and serology of potato virus S (PVS) in Northern Khorasan Province.

H.R.Hosseinzadeh*-B.Jafarpour-M.Falahati Rastegar¹

Abstract

During a survey for detection of PVS in potato fields in Northern Khorasan province, some tubers from the plants which have been already marked and showing mosaic, rugosity, undulation on leaf margins, little leaf and slightly vein deepening, were collected in Bodjunrd region, Also, some tubers from potato fields of Mashhad, Chenaran, Ghoochan, Faruj and Shirvan regions were randomly collected. These tubers maintained in 4⁰C until their dormancy broken, and then grown at greenhouse conditions. On the base of reaction of differential hosts a few plants have been infected with PVS. In host range studies infected sap from one of potato plants, infected *Nicotiana debneyi* Domin. and *Lycopersicon esculentum* L.cv. early urbana 111 Systematically, It also developed chlorotic local lesions on *Chenopodium amaranticolor* Costa & Reyn. And *C. quinoa* Wild as well, but *Datura stramonium* L., *Phaseolus vulgaris* L. var. red kidney. and *Capsicum frutescens* L. did not show any symptoms in this study. The virus indentified as PVS on the basis of differential host reactions. The isolate was propagated on *N. debneyi* and purification was carried out according to Hammond & Lawson procedure (1988) with some modification. The antiserum was provided against partially purified virus. Serological tests including double diffusion in agar and ELISA were performed. Electron microscopy showed intact filamentus particle of virus measuring 629 nm (57000x). To determine infection percent of PVS in Bodjnord region, 200 plants were randomly collected and ELISA tests have been used. The results showed the infection rate of 15.5 percent in Bodjnurd region.

Key words: potato Virus S , purification, Antiserum ELISA, Electron microscopy.

* - Corresponding author Email: mohhssz@yahoo.com

1- Contribution from College of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad