جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد پانزدهم، شماره اول، فروردین ـ اردیبهشت ۱۳۸۷
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

شناسایی و پراکنش ویروید غده دوکی سیب‌زمینی در استان‌های خراسان رضوی و شمالی

آرزو یازرلو[1*]، بهروز جعفرپور[2] و ماهرخ فلاحتی‌رستگار[3]
[1]دانش‌آموخته کارشناس‌ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، [2]استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،
[3]استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱/۱۸

چکیده

بیماری ویرویدی غده دوکی سیب‌زمینی یکی از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی است. این ویرویید در بسیاری از کشورها به‌خصوص کشورهایی که صادرکننده بذر سیب‌زمینی هستند و باید محصول گواهی شده و عاری از بیماری تولید نمایند، یک بیمارگر خطرناک و حائز اهمیت اقتصادی محسوب می‌شود. به‌منظور شناسایی ویرویید غده دوکی سیب‌زمینی در تابستان و پاییز ۱۳۸۳ از مزارع سیب‌زمینی استان‌های خراسان رضوی و شمالی بازدید به عمل آمد، و از غده‌های دارای علائم دوکی شدن و بد شکلی، ۲۵۰ نمونه جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در سردخانه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از طی دوره خواب و جوانه‌زنی، در شرایط گلخانه کشت داده شد. از برگ سیب‌زمینی‌های مذکور جهت استخراج RNA با روش رسوب با PEG_{6000} استفاده گردید. پس از استخراج، RNA به‌دست آمده برروی ژل پلی‌آکریلامید در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد الکتروفورز شد و به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید و باند RNA اختصاصی ویرویید (۳۵۹ نوکلئوتید) در مقایسه با شاهد مثبت مشاهده گردید. در روش دیگر نمونه‌های دارای ویرویید برروی ژل پلی‌آکریلامید برگشتی در دو دمای ۱۵ و٤٠ درجه سانتی‌گراد الکتروفورز شدند که باند ویرویدی پس از رنگ‌آمیزی مشاهده گردید. RNA استخراج شده از نمونه‌های آلوده به گیاهان سالم سیب‌زمینی رقم اگریا و گوجه‌فرنگی رقم Mobile در گلخانه مایه‌زنی گردید و با استفاده از آزمون ژل پلی‌اکریلامید برگشتی آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده اثبات گردید. علائم ایجاد شده در ارقام مذکور شامل کوتولگی خفیف و پیچیدگی مختصر در برگ‌ها بود. این اولین گزارش از وجود بیماری ویرویدی در استان‌های خراسان رضوی و شمالی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، PSTVd، الکتروفورززل اکریلامید واسرشتی، الکتروفورز ژل اکریلامید برگشتی

*- مسئول مکاتبه: yazarlou771@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

ویروییدها قادر به ایجاد آلودگی در گستره وسیعی از میزبان‌های گیاهی بوده و قادر به ایجاد بیماری در گیاهان تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای می‌باشند (تابلر و تساگریس، ۲۰۰٤)، ولی علائم مشخصی که متفاوت با علایم بیماری‌های ویروسی باشد، ایجاد نمی‌کنند. علایم بیماری‌های ویروییدی معمولاً شامل کوتولگی، پیسه‌ای شدن، پیچیدگی برگ‌ها و نکروز است (هول، ۲۰۰۲). گیاهان آلوده کوچک‌تر و برگ‌ها نیز باریک‌تر و نوک‌تیزتر از برگ‌های معمولی است، غده‌های آلوده کشیده، باریک، دارای پوست صاف و حاوی چشم‌های فراوان می‌باشند. بیماری به راحتی به‌وسیله تماس با گیاهان آلوده، وسایل کاشت و داشت و همچنین از طریق بذر و دانه گرده منتقل می‌شود (حدیدی و همکاران، ۲۰۰۳).

در حدود ٤۰ سال عامل بیماری یک ویروس گیاهی تصور می‌شد، بعدها مشخص شد که عامل بیماری دارای ضریب رسوب پایینی بوده و به تیمار با ریبونوکلئازها حساس، اما نسبت به تیمار با داکسی ریبونوکلئازها، فنل، کلروفرم، بوتانل نرمال و اتانل غیرحساس می‌باشد. به‌علت داشتن این ویژگی‌ها عامل بیماری غده دوکی سیب‌زمینی را یک مولکول آزاد و کوچک RNA دانستند. زمانی‌که پارامترهای فیزیکی- شیمیایی این بیمارگر روشن شد، نام ویروئید برای تفکیک این RNAهای آلوده کننده، کوچک، فاقد پوشش پروتئین از ویروس‌ها پیشنهاد شد (سینگ و همکاران، ۱۹۹۹). PSTVd[1] ویروییدی با وزن مولکولی بین ۱۲۵۰۰۰- ۱۰۰۰۰۰ دالتون می‌باشد. RNA ویرویید، حلقوی و فاقد پوشش پروتئینی می‌باشد (هوکر، ۱۹۸۱). اولین توالی ویروئید تعیین شده، توالی PSTVd، نژاد حدواسط (PSTVd-DI) است. ویرویید یک RNA تک‌رشته، حلقوی و دارای پیوندهای کوالانتی شامل ۳۵۹ نوکلئوتید است (گروس و همکاران، ۱۹۷۸). این RNA به‌عنوان رشته مثبت در نظر گرفته می‌شود. برای این ویرویید یک مدل ساختاری میله‌ای شکل واحد با چندین بخش منظم مارپیچی دورشته‌ای و حلقه‌های داخلی کوچک پیشنهاد شده است (گورا- سوچاکا، ۲۰۰٤). این ساختار ثانویه بعدها برای اغلب اعضای Pospiviroidae پیشنهاد شد. آنالیز توالی اعضاء گروه PSTVd حضور ۵ ناحیه ساختاری را نشان می‌دهد. این ۵ ناحیه ابتدا فقط برای گروه PSTVd فرض می‌شد، ولی به زودی به تمام ویروییدهای خانواده Pospiviroidae عمومیت داده شد. ناحیه C شامل بخش حفاظت شده مرکزی (CCR)[2] است و دارای حدود ۹۵ نوکلئوتید می‌باشد، وجود ساختارهای ثانویه اختصاصی در ناحیه CCR در مدل فرض شده برای همانندسازی ویروئید قطعی است (بومستارک و همکاران، ۱۹۹۷).

ناحیه[3] P در ارتباط با بیان علایم می‌باشد و در تمام ویروئیدهای خانواده PSTVd حضور دارد. ناحیه V[4] بیشترین تغییرپذیری را در بین ویروییدهای وابسته نزدیک نشان می‌دهد. تنها بستگی مهم توالی بین ویروئیدها در ناحیه V، حضور مارپیچ الیگوپورین ـ الیگوپیریمیدین می‌باشد که معمولاً دارای حداقل ۳ جفت G:C است (گورا- سوچاکا، ۲۰۰٤).

نواحی TL, TR[5] در بین ویروییدها قابل تعویض هستند و مهمترین توالی همولوژی در بین ویروییدها را شامل می‌شوند. بنابراین، نقش آنها در ترتیب مجدد RNA در طول مدت تکامل و بسط ویرویید پیشنهاد شده است. این نواحی ممکن است در حرکت ویروئید در گیاهان نقش داشته باشند (مانیتاکی و همکاران، ۲۰۰۳).

مولکول‌های RNA تک‌رشته‌ای ویروییدها پتانسیل بالای تحمل تنوع زیاد در شکل‌پذیری ساختار و تغییرات آن را دارا هستند. در حقیقت، در مدت واسرشت شدن حرارتی، چندین تغییر ساختاری از شکل میله‌ای مانند تا شکل حلقوی تک‌رشته‌ای مشاهده می‌شود (گورا- سوچاکا، ۲۰۰٤).

نتایج حاصل از تحقیق برروی این ویرویید در سایر استان‌ها، وجود این ویرویید را در استان‌های مازندران (رحیمیان، ۱۹۸۹) و تهران (اسماعیلی‌فر و همکاران، ۲۰۰۲) به

1- Potato Spindle Tuber Viroid

2- Conserved Central Reign
3- Pathogenic Reign
4- Variable Reign
5- The Terminal Reign (Left and Right)

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اثبات رسانده است. با توجه به سطح زیرکشت سیب‌زمینی، اهمیت این محصول در استان خراسان و این که تاکنون گزارشی از وجود ویروئید دوکی شدن غده سیب‌زمینی در استان ارائه نشده بود، ضرورت انجام پژوهشی جامع به منظور شناسایی و بررسی وضعیت این ویرویید و پراکندگی آن در استان خراسان و همچنین ارائه روش‌های پیشگیری براساس تعیین وضعیت آلودگی در نواحی مختلف استان کاملاً احساس می‌شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع و انبارها: در تابستان و پاییز ۱۳۸۳ غده‌های مورد آزمایش از مزارع مناطق مهم سیب‌زمینی کاری و انبارهای استان‌های خراسان رضوی و شمالی، شامل شهرهای چناران (۵۸ نمونه)، قوچان (۳۷ نمونه)، فریمان (۱۲ نمونه)، تربت‌جام (۱۳ نمونه)، تربیت‌حیدریه (۲٦ نمونه)، نیشابور (۷۹ نمونه)، فاروج (۲۰ نمونه) و مشهد (۱۵ نمونه) و در مجموع ۲۵۰ نمونه جمع‌آوری شد.

شرایط نگهداری و کاشت غده‌ها: به‌منظور سپری شدن دوره خواب غده‌ها و آمادگی آنها برای جوانه‌زنی، غده‌های جمع‌آوری شده در پاکت‌های کاغذی جداگانه قرار داده شدند و سپس در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در سردخانه به‌مدت ٤ هفته نگهداری شدند. پس از طی این مدت غده‌ها از سردخانه خارج گردیده و در محل تاریک و در حرارت ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد به‌منظور رویش جوانه‌ها قرار داده شدند. پس از ۳ تا ٤ هفته که غده‌ها جوانه زدند، در شرایط دمایی مناسب در گلخانه کشت شدند و از برگ‌های آنها به‌منظور استخراج RNA و تعیین میزان آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده استفاده گردید. از آنجایی‌که علایم ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی در دمای بالا بهتر مشاهده می‌شود، غده‌ها در گلخانه در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد کاشته و نگهداری شدند.

تعیین پراکنش ویرویید غده دوکی سیب‌زمینی: جهت تعیین پراکنش ویرویید، نمونه‌برداری از مزارع شهرستان‌های چناران، قوچان، فریمان، تربت‌جام، تربت‌حیدریه، نیشابور، فاروج و مشهد انجام گردید.

استخراج RNA: برای استخراج RNA از روش تغییر یافته شوماخر و همکاران (۱۹۸٦) استفاده گردید. به‌منظور استخراج ابتدا ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بافت تازه برگ سیب‌زمینی را با ازت مایع به‌صورت پودر در آورده و با ۲ حجم فنل و ۲ حجم بافر TNE (Tris/Hcl ۱۰۰ میلی‌مولار، NaCl ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۱۰ میلی‌مولار، SDS ۲ درصد و مرکاپتواتانول ۲ درصد) کاملاً مخلوط نموده و در دور ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شد. به مایع‌رویی یک حجم فنل و یک حجم کلروفرم اضافه نموده و عمل سانتریفوژ تکرار شد. به فاز رویی حاصل از این مرحله دو حجم کلروفرم اضافه نموده و دوباره میکروتیوب را تکان داده و پس از سانتریفوژ، مایع‌رویی به یک میکروتیوب سترون منتقل شد. سپس به‌منظور رسوب RNA از محلول ۵۰ درصد PEG_{6000} استفاده گردید. یکصد میکرولیتر فاز مایع رویی با ۱۵/۰۹ میکرولیتر PEG_{6000} ۵۰ درصد و ۱۰/٦۹ میکرولیتر Nacl ۵ مولار در حجم نهایی ۱۲۵/۷۸ میکرولیتر با وارونه کردن میکروتیوب کاملاً مخلوط شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و پس از آن به‌مدت ۱۰ دقیقه در یخ نگهداری شد. آنگاه میکروتیوب به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. فاز رویی که شامل RNAهای کوچک و PSTVd بود به میکروتیوب جدید منتقل شد. غلظت PEG_{6000} به ۱٦ درصد افزایش داده شد به‌طوری‌که غلظت NaCl در همان ۵۰۰ میلی‌مولار حفظ شد. این نسبت با اضافه کردن مقادیر ۳۹/۱۵ میکرولیتر PEG_{6000} ۵۰ درصد و ٤/٥٦ میکرولیتر Nacl ۵ مولار به فاز رویی به‌دست آمد. مواد فوق به‌طور کامل با وارونه کردن میکروتیوب به آرامی مخلوط گردید و سپس برای مدت ۱ ساعت در یخ قرار داده شد. پس از سانتریفوژ کردن به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور، رسوب حاصل با ۲۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور

۱۳٤۰۰ سانتریفوژ شد. این مرحله با حجم ۱۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰ درصد تکرار شد. رسوب حاصل در دمای اتاق به‌مدت یک شب و یا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه به‌منظور رهایی از فنل، خشک شد. رسوب در حجم کم بافر Tric-HCl ۵ میلی‌مولار (۱۵-۱۰ میکرولیتر) با pH ۸ حل شد.

روش‌های مورد استفاده در شناسایی PSTVd: به‌منظور شناسایی PSTVd در نمونه‌های جمع‌آوری شده، از RNA استخراجی توسط دو روش الکتروفورز گردید:

۱- الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید[1]

۲- الکتروفورز برگشتی ژل پلی‌اکریلامید[2]

الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید: این روش الکتروفورز در شرایط واسرشتی انجام شد که ژل باید در حرارت ۵۷ درجه سانتی‌گراد هدایت گردد. به این منظور تانک الکتروفورز عمودی درون بن‌ماری که دمای آن روی ۵۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد، قرار گرفت. به‌منظور رساندن حرارت به ژل از یک پمپ برای ایجاد جریان در لوله‌های پشت تانک الکتروفورز استفاده گردید. الکتروفورز تحت شرایط ولتاژ ثابت ۳۵ به ازای هر سانتی‌متر ژل و به‌مدت ٤/۵ تا ۵ ساعت انجام شد. نمونه‌ها در شرایط دمایی اتاق در چاهک‌ها تزریق و سپس ژل در بن‌ماری قرار داده شد. چند دقیقه به‌منظور اطمینان از هم دما شدن ژل با آب گرم صبر نموده و سپس ولتاژ مورد نظر اعمال شد. میزان مواد مصرفی در ژل اکریلامید واسرشتی ٦/۵ درصد به شرح زیر بوده است:

اوره ۱۳/٤٤ گرم، محلول اکریلامید- بیس‌اکریلامید ۳۰٪ **به میزان** ٦/۰۷ میلی‌لیتر، ۱/٤ میلی لیترTBE 10X، ۱۳۰ میکرولیتر APS، ۳۲ میکرولیتر TEMED، در حجم نهایی ۲۸ میلی‌لیتر می‌باشد. بافر بارگذاری در این روش شامل زایلن سیانول ۰/۰۲ درصد، بروموفنل بلو ۰/۰۲ درصد و EDTA ۵ میلی‌مولار بود.

1- Denaturing polyacrylamide-gel electrophoresis
2- Bidirectional gel or Return electrophoresis

الکتروفورز برگشتی ژل پلی‌اکریلامید: این روش الکتروفورز در دو دمای متفاوت و در دو جهت مخالف انجام شد. ابتدا ژل در درجه حرارت پایین ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این دما ژل تحت ولتاژ ثابت ۲۰۰ تا زمانی‌که زایلن سیانول[3] به نزدیک انتهای ژل برسد (۲ سانتی‌متری پایین ژل)، الکتروفورز گردید. سپس جریان متوقف شده و بن‌ماری روی درجه حرارت ٤۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید و پس از رسیدن دما به ٤۰ درجه سانتی‌گراد، ولتاژ در جهت مخالف وصل شده و الکتروفورز تا زمانی‌که رنگ زایلن سیانول به بالای ژل برسد، ادامه یافت. لودینگ بافر در این روش شامل ۵۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه، 80 µl 10x TBE، گلیسرول به حجم ۳۰۰ میکرولیتر، بروموفنل بلو[4] ۱ درصد به‌مقدار ۲۰ میکرولیتر و زایلن سیانول ۱ درصد به‌مقدار ۲۰ میکرولیتر بود. میزان مواد مصرفی در ژل: اوره ٦/۷۲ گرم، ٤/٦۷ میلی‌لیتر محلول اکریلامید ۳۰ درصد، ml 10x TBE ۱/۱۲، ۱۰۰ µl APS، ۳۲ µl TEMED، در حجم نهایی ۲۸ میلی‌لیتر بود.

آزمون‌های زیست‌سنجی[5] و بررسی گیاهان مایه‌زنی شده: به این منظور از دو روش استفاده گردید. مایه‌زنی به گیاهان سالم سیب‌زمینی رقم اگریا و گوجه‌فرنگی رقم Mobile در مرحله ۳-۵ برگی صورت گرفت. در روش اول با استفاده از دو بافر فسفات pH= ۷/۲ و بافر TE، pH= ۸ مایه‌زنی صورت گرفت. در این روش برگ‌های آلوده تازه و برگ‌های خشکانیده شده در سرما مورد استفاده قرار گرفت. عصاره برگ‌های مذکور با استفاده از هاون چینی درون یخ و همراه با بافر فسفات و یا بافر TE- گرفته شد. به این عصاره پودر کربوراندوم به‌منظور خراش سطح برگ‌ها و انتقال مکانیکی بهتر، اضافه گردید. سپس این عصاره با کمک انگشت اشاره روی برگ به آرامی و از ناحیه دمبرگ به طرف نوک برگ درحالی‌که دست دیگر در زیر برگ قرار داده شده بود، کشیده شد.

3- Xylencyanol
4- Bromphenolblue
5- Bioassay

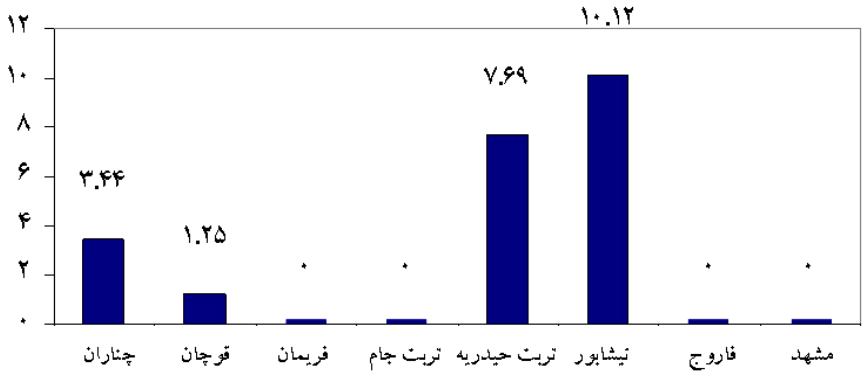
در روش دیگر از اسید نوکلئیک به‌دست آمده پس از استخراج به روش فنل- کلروفرم به‌منظور آلوده‌سازی برگ‌های جوان (در مرحله ۲ برگی) گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی استفاده گردید.

نتایج

نتایج این تحقیق، وجود ویرویید غده دوکی سیب‌زمینی را در استان‌های خراسان شمالی و رضوی مورد تأیید قرار می‌دهد. غده‌های آلوده که با روش‌های انجام شده در این تحقیق شناسایی شدند، متعلق به مناطق چناران، قوچان، تربت حیدریه و نیشابور بود. غده‌های جمع‌آوری شده از شهرستان نیشابور بیشترین آلودگی را به این ویرویید را به میزان ۱۰/۱۲ درصد نشان داد (شکل ۳). گیاهان آلوده حاصل از این غده‌ها، در گلخانه عموماً دارای علایم کوتولگی خفیف، پیچیدگی مختصر در برگ‌ها، به‌ویژه برگ‌های بالایی، کم شدن زاویه بین دمبرگ‌ها و ساقه و راست ایستادن برگ‌ها بود. علایم ایجاد شده در این گیاهان در شکل‌های ۱ و ۲ مشخص می‌باشند.

شکل ۱- علائم کوتولگی گیاه آلوده (۳) در مقایسه با گیاه سالم (۲) و همچنین علائم پیچیدگی حاشیه برگ‌ها به سمت داخل و زردی اطراف رگبرگ‌ها (۱).

شکل ۲- علائم کشیدگی و زیاد شدن چشم‌های سیب‌زمینی در غده آلوده.

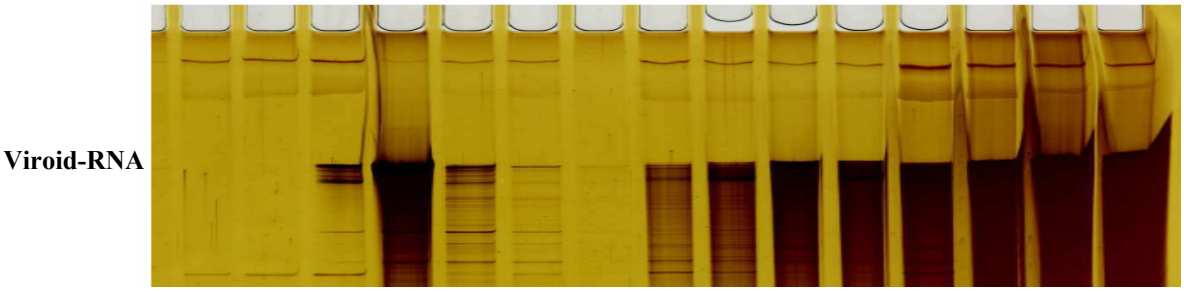


شکل ۳- درصد میزان آلودگی در مناطق نمونه‌برداری شده.

الکتروفورز واسرشتی ژل پلی‌اکریلامید: RNAهای حاصل با بافر بارگذاری مربوطه در ژل واسرشتی ٦/٥ درصد پلی‌اکریلامید تزریق شد. باند اختصاصی ویروییدی (۳۵۹ نوکلئوتید) در بالای ژل، نزدیک به چاهک‌ها تشکیل گردید. در شکل ٤ این باند به‌خوبی مشخص می‌باشد.

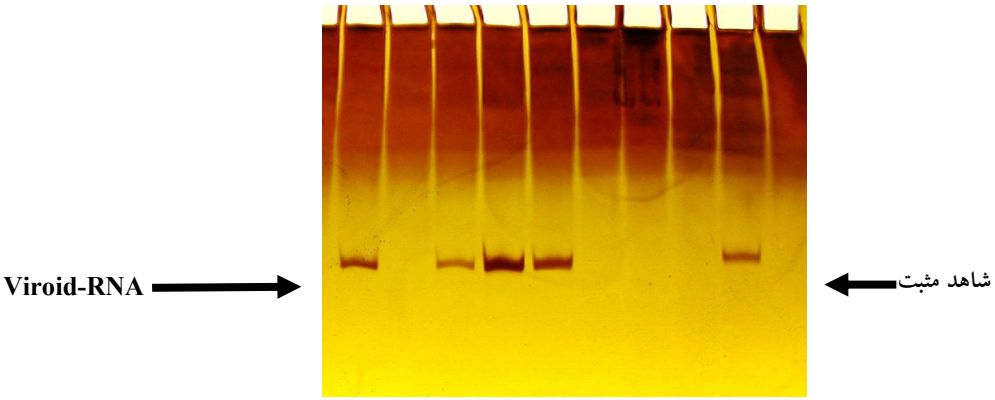
الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید برگشتی: در این آزمون، پس از تزریق RNA استخراجی نمونه‌ها به‌همراه لودینگ بافر مربوطه درون چاهک‌ها و هدایت نمونه‌ها در دو درجه حرارت متفاوت و در دو جهت حرکت الکتروفورزی مخالف، باند اختصاصی ویروییدی (۳۵۹ نوکلئوتید) در میانه ژل پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره مشاهده شد (شکل ٥). در این آزمون از شاهد مثبت ارسالی توسط دکتر اشمیت که به‌صورت PSTVd خالص استخراجی ارسال شده بود، استفاده گردید. باندهای اختصاصی ویروییدی در کنار باند ویروییدی حاصل از شاهد مثبت در شکل ٥ مشاهده می‌شود.

آزمون‌های زیست‌سنجی و بررسی گیاهان مایه‌زنی شده: به‌منظور اثبات بیماری‌زایی ویرویید استخراجی، مایه‌زنی به گیاهان سالم سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی با استفاده از دو روش انجام شد. در روش اول از ١٤ گیاه سالم مایه‌زنی شده، ٦ گیاه آلودگی را نشان دادند. در روش دوم از ١٢ گیاه مایه‌زنی شده، ٨ نمونه آلوده شدند. علائم ایجاد شده در شکل ٦ مشخص می‌باشد.



شکل ٤ - باندهای ویروییدی در ژل اکریلامید ٦/٥ درصد واسرشتی.

چاهک‌های ١-٤: شاهد مثبت، ٧: شاهد منفی، ٥،٦،٨ الی ١٥: نمونه‌های آلوده.



شکل ۵- باندهای ویروییدی در ژل آکریلامید برگشتی.

شکل ٦- کوچک ماندن گیاه مایه‌زنی شده (۲) در مقایسه با شاهد (۱) و علائم جمع‌شدگی و پیچ‌خوردگی برگ‌های گیاهان مایه‌زنی شده (۳).

بحث

با استفاده از نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های انجام شده در این تحقیق وجود ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی در استان‌های خراسان شمالی و رضوی قطعی گردید. این نتایج با تحقیق شوماخر و همکاران (۱۹۸٦) مطابقت کامل دارد. علایم ایجاد شده در غده‌های آلوده شامل بدشکلی، کوچک ماندن، کشیدگی و ایجاد چشم‌ها و ابروهای متعدد و مشخص می‌باشد. علایم قسمت‌های هوایی شامل کوتولگی مختصر، تنگ شدن زاویه ساقه‌ها، چین خوردگی حاشیه برگ‌ها و ایستاده قرار گرفتن آنهاست. در این پژوهش نشان داده شد که روش‌های الکتروفورز ژل دارای دقت و حساسیت بالا در شناسایی ویروییدها بوده و روش‌هایی کاملاً قابل اعتماد می‌باشند. استفاده از این روش‌ها در شناسایی ویرویید PSTVd مقرون‌به‌صرفه بوده و از سرعت بالایی نیز برخوردار می‌باشد. در این تحقیق از میان ۲۵۰ غده مورد آزمایش، ١٤ نمونه به ویروییدها آلوده بودند، که نیشابور با ۱۰/۱۲ درصد آلودگی، بالاترین میزان آلودگی در استان‌های خراسان شمالی و رضوی را نشان داد. نتایج آزمون‌های زیست‌سنجی و مایه‌زنی گیاهان سالم در دو روش که روش اول با استفاده از بافر فسفات و بافر TE و نیز با استفاده از برگ‌های خشک شده و برگ‌های تازه گیاهان آلوده و روش دوم با استفاده از RNA استخراج شده از گیاهان آلوده بود، نشان داد که در مقایسه با روش اول، روش اخیر از راندمان بالاتری برخوردار بوده و در ضمن به‌علت اینکه پس از استخراج RNA با استفاده از روش فنل و کلروفروم تنها ویروییدها قادر به آلوده‌سازی خواهد بود و سایر عوامل بیماری‌زا حذف می‌شوند، این روش در بررسی گیاهان مایه‌زنی شده کاملاً اختصاصی به‌شمار می‌آید. شناسایی بیماری با توجه به یکسان بودن علایم بیماری با سایر بیماری‌های ویروسی در قسمت‌های هوایی بسیار مشکل است و بهترین روش تشخیص، انجام آزمون‌های شناسایی از طریق الکتروفورز ژل اکریلامید و یا آزمون‌های مولکولی می‌باشد. بررسی‌های انجام شده در

سایر استان‌ها، وجود این ویرویید را در استان‌های مازندران (رحیمیان، ۱۹۸۹) و تهران (اسماعیلی‌فر و همکاران، ۲۰۰۲) به اثبات رسانده است. در این تحقیقات پس از عصاره‌گیری و استخراج و تغلیظ، اسید ریبونوکلئیک (RNA) به‌دست آمده روی ژل‌پلی‌آکریلامید الکتروفورز و سپس رنگ‌آمیزی گردید. در نمونه‌های آلوده یک RNA با وزن مولکولی کم که مشخصه ویرویید دوکی شدن غده سیب‌زمینی است، مشاهده گردید (رحیمیان، ۱۹۸۹؛ اسماعیلی‌فر و همکاران، ۲۰۰۲).

با توجه به میزان آلودگی نسبتاً بالای منطقه نیشابور و همچنین با توجه به تکثیر غده‌های حاصل از سال‌های قبل و عدم رعایت بهداشت زراعی در مناطق سیب‌زمینی کاری نیشابور، این مناطق را می‌توان به‌عنوان منبع مهمی در پایداری و انتشار ویرویید به سایر نواحی مجاور در نظر گرفت. بنابراین اعمال راه‌های مؤثر پیشگیری و قرنطینه این ویرویید در مناطق فوق به‌منظور جلوگیری از انتشار و گسترش آن بسیار ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

از دکتر اکسل اشمیت، به‌خاطر فرستادن نمونه‌های شاهد مثبت و راهنمایی‌های ارزنده در جهت انجام آزمایش کمال قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

1.Baumstark, T., Schrder, A.R.W., and Riesner, D. 1997. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. EMBOJ. 16: 599–610.
2.Esmaeeli Far, A., Abbasi, A., and Zarghami, R. 2002. Detection of potato spindle tuber viroid in Karaj. Proce. of the 15th Iranian Plant Protection congress. P: 196-197.
3.Gora-Sochacka, A. 2004. Viroids: unusual small pathogenic RNAs. Acta Biochimica Polonica. 51 (3): 587-607.
4.Gross, H.J., Domedey, H., Lossow, D., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., and Sanger, H.L. 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid.Nature.273:203-208.
5.Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., and Semancik, J.S. 2003. Viroids. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. PP: 49-54.
6.Hooker, W.J. 1981. Compendium of potato diseases. American Phytopathology Societ, St. Paul, Minnesota, USA.
7.Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology. Fourth Edition.Academic Press. PP: 1001.
8.Maniataki, E., Tabler, M., and Tsagris, M. 2003. Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with host protein VirP1. RNA. 9: 346–54.
9.Rahimian, H. 1989. Detection viroid-RNA in potato tubers in Iran. Proce. of the 9th Iranian Plant Protection congress. P: 215.
10.Schumacher, J., Meyer, N., Riesner, D., and Weidemann, H.L. 1986. Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by return-gel electrophoresis. Phytopathology. 115: 332-343.
11.Singh, R.P., Nie, X., and Singh, M. 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: an evolutionary link in the origin of pospiviroids. General Virology. 80: 2823-2828.
12.Tabler, M., and Tsagris, M. 2004. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. Trends in Plant Science. 9(7): 339-348.

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(1), Apr -May 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Identification and distribution of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in Razavi and Northern Khorasan Provinces.

***A. Yazarlou[1], B. Jafarpour[2] and M. Falahati Rastegar[3]**
[1]Former M.Sc. student, Dept. of Plant pathology, Ferdowsi University, Iran, [2]Prof., Dept. of Plant Pathology, Ferdowsi University, Iran, [3]Prof., Dept. of Plant pathology, Ferdowsi University, Iran

Abstract

Potato spindle tuber disease is one of the important diseases of potato. This viroid is an economically important pathogen especially in potato seed exporting countries, where they must produce certified and free PSTVd seeds. For detection of Potato spindle tuber viroid in summer and fall of 2004, a survey in farms of Razavi and Northern Khorasan provinces was carried out and 250 tubers were collected that showing spindle shape and malformation symptoms. Samples were stored in cold room at 4° C. The tubers were planted under greenhouse condition after passing their dormancy period and starting germination. The leaves of these potatoes were used for RNA extraction by PEG_{6000} precipitation method. After extraction, these RNA were loaded on the Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis at 60° C, and then stained by silver-staining manner. Specific viroid band in comparison with positive control was seen. In another procedure, viroid band has been revealed after loading RNA on Return Polyacrylamide Gel Electrophoresis at two temperatures, 15° C and 40° C, following silver staining procedure. The extracted RNA viroid was inoculated on healthy potatoes (Agria cultivar) and tomatoes (Mobile cultivar) in greenhouse. Infection of inoculated plants has been confirmed by Return Polyacrylamide Gel Electrophoresis test as well. The symptoms mentioned above appeared on these plants after inoculation. This is the first report of PSTVd in Razavi and Northern Khorasan Provinces.

Keywords: Potato; PSTVd; Denaturing polyacrylamide-gel electrophoresis; Return electrophoresis

*- Corresponding Author; Email: yazarlou771@yahoo.com