

تشخیص سرولوژیکی و مولکولی و تعیین فراوانی ویروس A سیبزمینی در مزارع استان کرمان*

Serological and molecular detection and prevalence of *Potato virus A* (PVA) in Kerman province

جواد رضائی اولریایی، حسین معصومی**، جهانگیر حیدرنژاد، اکبر حسینی پور و

مهدی شعبانیان

گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

پذیرش ۱۳۸۶/۲/۲۶

دریافت ۱۳۸۴/۱۰/۱۰

چکیده

به منظور تعیین پراکنش ویروس A سیبزمینی (PVA)، از مناطق عمده سیبزمینی کاری استان کرمان بازدید و ۶۵۶ نمونه سیبزمینی دارای علائم ویروسی جمع آوری گردید. آلودگی نمونه‌ها با آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA با استفاده از یک آنتی سرم چند همسانه ای اختصاصی تعیین شد. نتایج حاصل بیانگر گسترش وسیع این ویروس (۹ تا ۶۲/۸ درصد) در مزارع مورد مطالعه بود. PVA روی توتون رقم سامسون تکثیر و بعد از جمع آوری برگ‌های توتون آلوده به ویروس، خالص سازی نسبی (partial purification) روی آن انجام شد. با تزریق آماده نسبتاً خالص به خرگوش، آنتی سرم چند همسانه‌ای تهیه شد. همچنین چند میزبان افتراقی جهت تفکیک PVA از ویروس Y سیبزمینی معرفی گردید. در آزمون ردیابی PVA با استفاده از روش RT-PCR، پس از بکار بردن آغازگرهای اختصاصی، محصول ۱۰۶۵ bp و نیز یک محصول فرعی به وزن حدود ۶۲۵ bp تکثیر شد.

* قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول ارائه شده به دانشگاه شهید باهنر کرمان

** مسئول مکاتبه

مقدمه

ویروس A سیب‌زمینی (*Potato virus A*) از خانواده *Potyviridae* ارقام مختلف سیب‌زمینی را آلوده می‌نماید و میزان خسارت آن تا ۴۰ درصد گزارش شده است (Bartel 1971). علائم این ویروس در بوته‌های سیب‌زمینی بسته به نوع رقم و شرایط آب و هوایی متفاوت می‌باشد، اما به طور کلی علائم به صورت موزائیک خفیف تا شدید در برگ‌ها، مشاهده می‌گردد. در بعضی شرایط نیز در اثر آلودگی، سطح برگ‌ها زبر و حاشیه آنها موج‌دار می‌شود (Puur and et al. 1994).

برای تفکیک PVA از سایر ویروس‌های آلوده کننده سیب‌زمینی، از میزان‌های افتراقی استفاده می‌شود. گونه‌های *Physalis floridana*، *P. angulata* و *P. pubescens* بعد از مایه‌زنی با عصاره سیب‌زمینی آلوده به PVA، لکه‌های موضعی نشان می‌دهند. لذا برای ردیابی PVA در آلودگی‌های توأم با *Potato virus Y* (PVY)، *Potato virus X* (PVX) و *Potato virus M* (PVM) میتوان از این گیاهان استفاده نمود. همچنین این گیاهان تا دوره گلدهی نسبت به PVA حساس بوده و جهت تشخیص PVA، بلافاصله بعد از برداشت غده‌ها بکار می‌روند (Singh 1982). علاوه بر این *Solanum demissum* SdA عموماً توسط PVA، PVY و سایر پوتی‌ویروس‌ها آلوده می‌شود، ولی فقط PVA روی این رقم زخم‌های موضعی ایجاد می‌کند. زخم‌های موضعی ایجاد شده روی این گیاه، به رنگ سیاه مایل به آبی است (Bartels 1971).

ویروس A سیب‌زمینی، با PVY (نژادهای PVY^o و PVY^N)، ویروس موزائیک بذرالبنگ (*Henbane mosaic virus*) و *Tobacco etch virus* (TEV) ارتباط سرولوژیکی دارد. در مقایسه با سایر پوتی‌ویروس‌ها، پروتئین پوششی TEV بالاترین درصد تشابه (۸۳ درصد) را با PVA نشان می‌دهد. ارتباط PVA با این ویروس‌ها، ثابت می‌کند که PVA عضوی از خانواده *Potyviridae* می‌باشد (Valkonen et al. 1995). تا کنون ۲۱ جدایه از این ویروس شناسایی شده است که براساس خصوصیات بیولوژیکی، مولکولی، قدرت بیماری‌زایی، توانایی ایجاد لکه‌های موضعی در سیب‌زمینی رقم King Edward، انتقال توسط شته‌ها و خصوصیات سرولوژیکی از

هم متمایز می شوند (Kekarainen *et al.* 1999, Rajamaki *et al.* 1998, Valkonen *et al.* 1995, Singh & McDonald 1981; Lee 1976).

سیب‌زمینی یکی از محصولات عمده در برخی از نقاط ایران با سطح زیر کشت ۱۹۵۰۰۰ هکتار و میزان تولید ۴۴۵۳۷۸۹ کیلوگرم میباشد (FAO 2005). سطح زیر کشت سیب‌زمینی در سال زراعی ۱۳۸۲-۱۳۸۳ در استان کرمان، ۴۲۰۰ هکتار و میزان تولید آن ۱۶۸۰۰۰ تن بوده که در این میان سهم ارقام آگریا (Agria) ۱۶۰۰، کوزیما (Cosima) ۱۱۰۰، آریندا (Arinda) ۳۵۰، دیامونت (Diamont) ۱۵۰، مارفونا (Marphona) ۱۵۰، مورن (Moren) ۱۰۰ و سایر ارقام ۷۵۰ هکتار می‌باشد (Anonymous, 2004). علی‌رغم اهمیت سطح زیر کشت وسیع سیب‌زمینی در ایران و اهمیت اقتصادی آن، ویروس PVA به طور دقیق شناسایی و توصیف نشده است و اطلاعاتی از پراکنش آن در مزارع در دست نیست. تنها اطلاعات محدودی در زمینه شناسایی این ویروس در مزارع و تشخیص آن با استفاده از گیاهان آزمون موجود می‌باشد (Karimi 1967, 1968; Rohani & Taleb-Zadeh 1974). در تحقیق حاضر ضمن تشخیص سرولوژیک و مولکولی ویروس PVA، دامنه میزبانی طبیعی و پراکندگی آن نیز در استان کرمان بررسی شده است.

روش بررسی

۱- نمونه‌برداری و تشخیص ویروس

برای تعیین پراکنش PVA، در طول سالهای زراعی ۱۳۸۱-۱۳۸۳ مناطق عمده سیب‌زمینی‌کاری استان کرمان (بردسیر، کرمان، جیرفت، بافت و جوپار) با سطح زیر کشت حدود ۴۲۰۰ هکتار مورد بازدید قرار گرفت. از بوته‌های سیب‌زمینی با علائم مشکوک به PVA شامل زردی و موزائیک خفیف نمونه‌برداری انجام و سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها با استفاده از آزمون double antibody sandwich-ELISA (DAS-ELISA) به روش کلارک و آدامز (Clark & Adams 1977) و با آنتی‌سرم‌های چند همسانه ای PVA، PVY، PVM، PVX و Potato Virus V (PVV) و Potato Leaf Roll Virus (PLRV) (تهیه شده از شرکت Bioreba) مورد بررسی قرار گرفتند. علی‌رغم ارتباط سرولوژیکی PVA، PVY و PVV هر کدام از آنتی

سرماهای مورد استفاده، بطور اختصاصی قادر به تشخیص ویروسی بود که آنتی‌سرم بر علیه آن تهیه شده بود. نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الیزا خوان مدل EL800 (Biotek Instrument) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) با استفاده از فرمول $\bar{x} + 3 SD$ آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. در این فرمول \bar{x} میانگین جذب و SD انحراف معیار استاندارد چاهک های برگ سالم است. بر این اساس نمونه‌های آلوده مشخص و درصد آلودگی مناطق مختلف تعیین گردید.

۲- شناسایی مولکولی ویروس با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)

ابتدا آر.ان.ای کل با استفاده از کیت (High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) از گیاهان توتون رقم سامسون که بطور مجزا با ویروس های PVA و PVY مایه‌زنی شده بودند استخراج شد. بطور مشابه همین عمل روی گیاه سالم توتون و گیاهان اسفناج و سلمه تره سفید که در آزمون های الیزا و TBIA واکنش مثبت نسبت به PVA نشان داده بودند نیز صورت گرفت. یک جفت آغازگر اختصاصی شامل PVA-F، به عنوان آغازگر مستقیم (5'-GCTCCATACATAGCTGAGTCAGC-3') و PVA-R، به عنوان آغازگر مکمل (5'-CTCAAACACTACTGTTGCGAGG-3') را که به ترتیب مکمل نوکلئوتیدهای ۸۴۲۳-۸۴۰۰ و ۹۴۶۴-۹۴۴۳ بودند از روی ترادف جدایه فنلاندی ویروس A سیب‌زمینی (Accession No. Z 21670) با استفاده از برنامه نرم افزاری Fast PCR (Version: 3.4.104) (Kalender 2005)، طراحی گردیدند. ساخت cDNA با استفاده از ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه برداری معکوس (M-MuLV) (ساخت کمپانی Fermentas) در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه صورت گرفت. آزمون PCR در حجم ۵۰ میکرولیتری شامل پنج میکرولیتر از cDNA، آغازگرها هر یک به غلظت یک میکرو مولار، ۲۰۰ میکرو مولار از هر یک از چهار داکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۱/۵ میلی مولار از $MgCl_2$ با ۵ واحد پلی مرز *Taq* (Fermentas) انجام گرفت. PCR بوسیله دستگاه ترموسایکلر Techne مدل TC312 (ساخت کشور انگلستان) و با استفاده از یک برنامه ۳۰ سیکلی شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دودقیقه انجام شد و

در نهایت یک دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه برای ساخت نهائی قطعه مورد نظر منظور گردید. محصول PCR مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس در ژل آگاروز ۱٪ حاوی ۵ μg/ml اتیدیوم بروماید در بافر TBE (Tris/borate/EDTA) الکتروفورز گردید و از باندهای تشکیل شده توسط دستگاه Gel documentation مدل Bio-Doc (Biometra, Germany) عکس برداری شد.

۳- تکثیر و خالص‌سازی ویروس

برای انجام خالص‌سازی، یک نمونه برگ سیب‌زمینی آلوده به PVA انتخاب گردید و با انجام آزمون DAS-ELISA از عدم آلودگی آن به سایر ویروس‌ها از جمله PLRV، PVX، (PVS) *Potato virus S* و (PVY) (تهیه شده از شرکت Bioreba) اطمینان حاصل گردید. سپس ۰/۱ گرم از بافت برگ آلوده به ویروس در یک حجم از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار، pH = ۷، عصاره‌گیری شد. عصاره فوق روی گیاه توتون رقم سامسون در شرایط گلخانه با شرایط دمائی ۲۵±۵°C و رطوبت ۸۰-۷۰ درصد مایه‌زنی شده و در مرحله بعد از برگ بوته‌های توتون آلوده برای خالص‌سازی استفاده گردید. ویروس PVA با حذف چرخه‌های میانگریزافترافی به روش هاشمی و ایزدپناه (Hashemi & Izadpanah 2002) خالص‌سازی شد.

۴- تهیه آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای

برای تهیه آنتی‌سرم علیه PVA، یک تزریق با امولسیون خالص شده ویروس و روغن ادجوانت کامل فروند (Freund's complete adjuvant) در ماهیچه پای خرگوش سفید نیوزلندی انجام گرفت. سه تزریق داخل جلدی دیگر به فاصله یک هفته از یکدیگر با امولسیون ویروس خالص شده و با روغن ناقص فروند (Freund's incomplete adjuvant) انجام گردید. ده روز پس از آخرین تزریق، خونگیری به عمل آمد و آنتی‌سرم جدا شد. برای تعیین عیار آنتی‌سرم، از آزمون الیزای غیرمستقیم (Indirect-ELISA) به روش لامل (Lommel et al. 1982) استفاده شد.

۵- تعیین میزبانهای افتراقی PVA و PVY

با توجه به اینکه آلودگی‌های مخلوط عمدتاً شامل دو ویروس PVA و PVY بود، لذا جهت تعیین میزبانهای افتراقی این دو ویروس، از بوته‌های آلوده جمع‌آوری شده از مزارع در مناطق مختلف مورد بررسی، تعدادی جدایه از این دو ویروس به صورت مجزا با مایه‌زنی بر روی توتون رقم سامسون تکثیر گردیدند. سپس جدایه‌های تکثیر شده، با استفاده از بافر فسفات

پتاسیم (۰/۰۱ مولار با pH=7) عصاره گیری شدند. پس از آن با استفاده از پودر خراش دهنده کاربوراندیم عصاره حاصل بر روی بوته‌های گونه‌های

Cucurbita pepo L., *Solanum nigrum* L., *Datura metel* L., *Medicago sativa* L., *Physalis floridana* Rybd., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Petunia violacea* Lindl., *Gomphrena globosa* L., *Chenopodium amaranticolor*, *Coste & Reyn*, *Capsicum annuum* L., *Chenopodium quinoa* Wild, *C. Murale* L., *Pisum sativum* L., *Brassica napus* L.

با حداقل ۲۰ تکرار مایه‌زنی شدند. این بوته‌ها جهت بروز علائم در گلخانه و در دمای $25 \pm 5^\circ\text{C}$ و رطوبت ۷۰-۸۰ درصد نگهداری شدند.

۶- شناسایی منابع طبیعی پایداری ویروس

برای شناسایی این منابع از علف‌های هرز مزارع سیب‌زمینی استان کرمان به صورت تصادفی نمونه برداری گردید (جدول ۳). این نمونه‌ها با آزمون‌های DAS-ELISA و (TBIA) Tissue blot immuno assay (Katul & Makkouk 1987, Clark & Adams 1977) بوسیله پادتن PVA تهیه شده از شرکت Bioreba و مایه‌زنی مکانیکی روی گیاهان محک مورد بررسی قرار گرفتند.

۷- شناسایی PVA با استفاده از سیب‌زمینی *Aquila* (دورگه A6)

از سیب‌زمینی دورگه A6 می‌توان جهت تمایز PVA و PVY استفاده نمود (Bartels 1971, Valkonen *et al.* 1995). بدین منظور از ریزگیاهچه‌های (Microplants) این نوع سیب‌زمینی ارسالی توسط دکتر کولین جفریز از نمایندگی انجمن کشاورزی اسکاتلند (SASA) استفاده شد. این ریزگیاهچه‌ها پس از تکثیر از طریق کشت بافت به لیوان‌های پلاستیکی کوچک حاوی پرلیت انتقال داده شدند و با محلول‌های غذایی کامل، تغذیه گردیدند.

۸- انتقال PVA توسط شته

از چهار گونه شته *Myzus persicae* (Sulzer) *Aphis gossypii* Glover و *A. fabae* Scopoli و *A. craccivora* Koch جهت انتقال این ویروس استفاده گردید. شته‌ها توسط گروه حشره‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران (آقای دکتر رسولیان) شناسایی شدند. این شته‌ها به ترتیب بر روی بوته‌های کلم (*Brassica olerifera* L.)، کدو مسمائی (*Cucurbita pepo* L. cv. Peto Seed)، باقلا (*Vicia faba* L.) و یونجه (*Medicago sativa* L. cv. Bami) تکثیر گردیدند. به منظور تهیه

کلنی‌های عاری از ویروس، شته‌های شناسایی شده در گروه‌های ۵ تایی بر روی میزبان‌های تکثیری سالم واقع در قفس‌های توری در گلخانه رها شدند. پس از انجام آزمون الیزا بر روی گیاهان میزبان و اطمینان از عدم آلودگی آنها تعداد ۱۰ شته سالم پس از یک دقیقه تغذیه گیرش (acquisition access period) بر روی گیاه توتون آلوده به PVA در ۳۰ تکرار بر روی بوته‌های سالم توتون رقم سامسون در مرحله چهار برگی رها شدند. بوته‌ها در گلخانه با دمای $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ و رطوبت ۷۰-۸۰ درصد نگهداری و پس از ۱۰-۱۴ روز بعد از ظهور علائم با آزمون الیزا ارزیابی شدند.

نتیجه

الف- تشخیص و علائم ویروس

از میان تمام ویروس‌های مورد مطالعه، ویروس غالب تمام مناطق سیب‌زمینی‌کاری استان کرمان براساس نمونه‌های علائم دار، PVA تشخیص داده شد. مناطق جیرفت و بردسیر (لاله‌زار)، بترتیب ۲۴/۴٪ و ۳۴/۶٪ آلودگی به این ویروس را نشان دادند، در حالیکه در منطقه بافت میزان آلودگی تنها ۹ در صد محاسبه گردید. در مجموع ۳۰/۸٪ از نمونه‌های جمع آوری شده از مزارع استان، به ویروس مذکور آلوده بودند (جدول ۱). در بوته‌هایی که فقط به PVA آلوده بودند، علائم زردی و موزائیک خفیف مشاهده شد (شکل ۱). در بوته‌هایی که آلودگی مرکب با سایر ویروس‌های سیب‌زمینی وجود داشت علائم متفاوت بود. به عنوان مثال در آلودگی‌های مخلوط شامل PVA و PVX، برگ‌ها بسیار کوچک و بدشکل و در حاشیه برگ‌ها، علائم سوختگی مشاهده می‌شد و بوته‌ها کوتوله بودند.

همچنین حدود ده در صد از نمونه‌ها به صورت مخلوط به جفت ویروس‌های PVX+PVS، PVY+PVX، PVY+PVA و PVA+PVX و PVA+PLRV آلودگی نشان دادند. به علاوه اینکه کمتر از یک در صد از نمونه‌ها نیز به ترکیبی از سه ویروس PVX+PVS+PVA و PVX+PVY+PVA یا به چهار ویروس PVA+PVX+PVS+PVY آلوده بودند.

جدول ۱- پراکنش ویروس‌های سیب‌زمینی در نمونه‌های حاوی علائم در مزارع سیب‌زمینی استان کرمان در طی سال‌های ۱۳۸۱-۱۳۸۳ با استفاده از آزمون DAS-ELISA

Table 1. Occurrence of potato viruses on symptomatic plant samples collected from fields in different regions of Kerman Province during 2002 to 2004 using DAS-ELISA test

Region	Fields surveyed ^c	DAS-ELISA ^a							Unknown
		PVA	PVX	PVY	PVM	PVV	PVS	PLRV	
Bardsir (Lalezar)	301	34.6 ^b	26.8	7.2	0.8	0.8	12.4	0	7
Jiroft	162	24.4	4.6	9.3	0	0	8.8	6.7	35.5
Baft (Soghan)	51	9	0	0	0	0	0	0	91
Joopar	77	23	5.8	0	0	0	0	0	65
Kerman	65	14	6	8	0	0	2	0	60.2

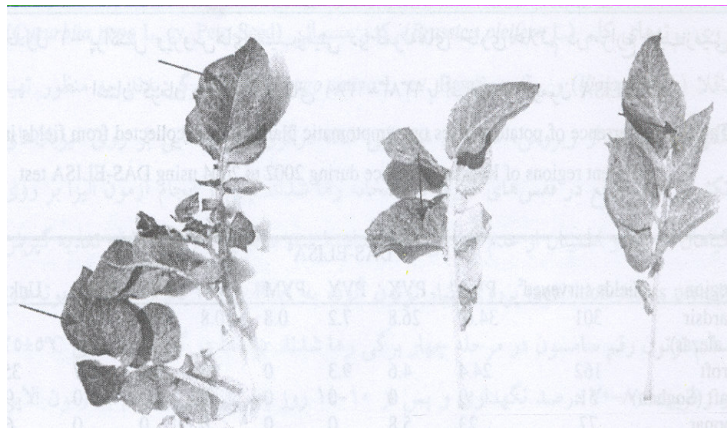
^aDouble antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. ^bpercent plants infected. PVA (*Potato virus A*), PVX (*Potato virus X*), PVY (*Potato virus Y*), PVM (*Potato virus M*), PVV (*Potato virus V*), PVS (*Potato virus S*) and PLRV (*Potato leaf roll virus*).^cNumber of fields surveyed.

ب- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

از نمونه‌های آلوده به PVA و PVY بعد از تکثیر بر روی گیاهان محک مناسب تعدادی با آزمون PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PVA مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که قطعه ای در حدود ۱۰۶۵ bp تکثیر شد. در حالی که در نمونه آلوده به PVY و نمونه سالم هیچ قطعه ای تکثیر نگردید. در این آزمون، محصولی فرعی به اندازه تقریبی ۶۲۵ bp نیز در نمونه آلوده به PVA تکثیر گردید ولی در نمونه‌های سالم، این قطعه تکثیر نشد (شکل ۲).

ب- خالص‌سازی و سرولوژی ویروس

نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر (A_{260}/A_{280}) آماده خالص ویروس، ۱/۷۵ تعیین شد که مبین آن است که آماده ویروس از درجه خلوص نسبتاً خوبی برخوردار است.



شکل ۱- علائم در سیب‌زمینی‌های ارقام آگریا و کوزیما آلوده به PVA.

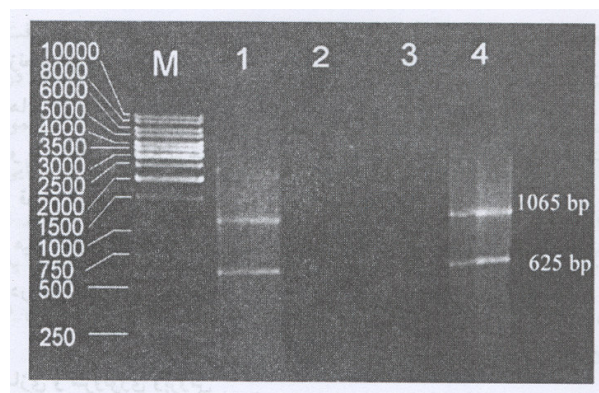
Fig 1: Symptoms of PVA on Agria & Cosima varieties of potato.

(A) علائم روشن شدن رگبرگ‌ها و زردی خفیف در سیب‌زمینی رقم آگریا آلوده به PVA

(B) علائم روشن شدن رگبرگ‌ها و موزائیک خفیف در سیب‌زمینی رقم کوزیما آلوده به PVA

A) Vein clearing & mild yellowing symptoms in PVA infected leaves of Agria variety.

B) Vein clearing & mild mosaic symptoms in PVA infected leaves of Cosima variety.



شکل ۲- نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱٪. M: نشانگر؛ راهک ۱ و ۴،

نمونه‌های آلوده به PVA؛ راهک ۲، نمونه منفی؛ راهک ۳، نمونه آلوده به PVY.

Fig. 2. Results of electrophoresis of PCR products in 1% agarose gel. Lane M, size marker (1 Kb ladder, Fermentas); lanes 1 & 4, PVA-infected samples; lane 2, negative control; lane 3, PVY-infected sample.

عیار آنتی‌سرم بدست آمده با آزمون الیزای غیرمستقیم اندازه‌گیری شد. در این آزمون بین عصاره تهیه شده از گیاه آلوده به PVA با رقت ۱:۲۸ و آنتی‌سرم تهیه شده علیه PVA با رقت ۱:۵۱۲ واکنش انجام گرفت.

ج- میزبانهای افتراقی PVY و PVA و علائم آنها

از بین گونه‌های گیاهی بررسی شده تنها گونه‌های *Petunia violacea* و *C. annuum*، *D. metel*، *P. floridana*، *S. nigrum* به عنوان میزبانهای افتراقی این دو ویروس مناسب تشخیص داده شدند. ویروس PVA در داتوره باعث ایجاد علائمی شامل روشن شدن رگبرگها به صورت خفیف گردید، در حالیکه ویروس PVY در همین گیاه سبب بروز علائمی به صورت رگبرگ روشنی شدید و ایجاد لکه‌های نکروتیک شد. در گیاه عروسک پشت پرده (*P. floridana*) ویروس PVA سبب ایجاد لکه‌های نکروزه و به دنبال آن موزائیک در برگها شد، اما واکنش این گیاه در مقابل PVY به صورت رگبرگ روشنی وید شکلی برگها تظاهر نمود. در مورد سایر میزبانهای افتراقی نیز علائم در جدول ۲ منعکس شده است.

چ- تعیین میزبانهای طبیعی ویروس

به منظور تعیین میزبانهای طبیعی ویروس، ۱۶۳ نمونه گیاهی مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۳). بر اساس نتایج آزمون الیزا در علفهای هرز تاج خروس، پنیرک، اویارسلام، سلمه‌قرمز، ترشک، آفتاب‌پرست، خرفه، گل‌جالیز، عروسک‌پشت‌پرده، تاتوره و پیچک‌صحرایی آلودگی به PVA تشخیص داده نشد. نتایج حاصل از مایع کوبی برگشتی در مورد این گیاهان بر روی *N. tabacum* L. cv. Samsun NN نیز منفی بود. اما نتایج حاصل از آزمون‌های DAS-ELISA و TBIA نشان داد که برخی از بوته‌های علف هرز سلمه‌تره‌سفید و گیاه اسفناج با علائم موزائیک خفیف همراه با رگبرگ روشنی به این ویروس آلوده هستند ولی نتایج حاصله از مایه‌زنی برگشتی و PCR در مورد آنها منفی بود.

ح- شناسایی PVA با استفاده از سیب‌زمینی *Aquila* (دورگه A6)

این ویروس براساس بروز علائم روی سیب‌زمینی دورگه A6 شناسائی شد. شرایط محیطی از جمله دما و نور، در بروز نوع علائم ایجاد شده در این گیاه مؤثر تشخیص داده شد، بطوریکه در دمای ۳۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۵۰۰ لوکس نور طبیعی، PVA در این گیاه

جدول ۲- میزبانهای افتراقی و علائم آنها جهت تفکیک دو ویروس PVA و PVY

Table 2. Differential hosts and symptoms of PVA and PVY

Plant species	علائم در برابر	
	PVA	PVY
<i>Datura metel</i> L.	MVC	SVC, NLL
<i>Solanum nigrum</i> L.	MM	SVC, S
<i>Capsicum annuum</i> L.	N	LI
<i>Petunia violacea</i> Lindl	N	LI
<i>Physalis floridana</i> Rybd.	NLL, M	VC, LD, S

LD = leaf distortion, LI= latent infection, M = mosaic, MM = mild mosaic, MVC = mild vein clearing, N = non-infected, NLL = necrotic local lesion, S = systemic, SVC = severe vein clearing, VC = vein clearing,

جدول ۳- واکنش علف‌های هرز موجود در مزارع سیب‌زمینی کرمان نسبت به PVA با استفاده

از آزمون DAS-ELISA

Table 3. Reaction of weed species against PVA collected from potato fields in Kerman Province using DAS-ELISA test

گونه و جنس (Genus, species)	نام فارسی (Persian name)	نسبت آلودگی به PVA	محل جمع آوری (Location)
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	تاج خروس	0/13 ^a	بردسیر، کرمان، جیرفت J, K, B
<i>Malva parviflora</i> L.	پنیرک	0/5	بافت و جوپار JO, BA
<i>Cyperus rotundus</i> L.	اویارسلام	0/18	بردسیر، کرمان K, B
<i>Chenopodium album</i> L.	سلمه‌تره سفید	3/7	بردسیر، کرمان و جیرفت J, K, B
<i>C. amaranticolor</i> Coste & Reynier	سلمه تره قرمز	0/14	بردسیر و بافت BA, B
<i>Spinacia oleracea</i> L.	اسفناج	2/8	بردسیر و بافت BA, B

Table 3. (continued)		جدول ۳- (ادامه)	
<i>Rumex</i> sp.	ترشک	0/20	بردسیر B
<i>Heliotropium</i> sp.	آفتاب پرست	0/18	جیرفت و بافت BA, J
<i>Portulaca oleracea</i> L.	خرفه	0/16	بردسیر و جوپار JO, B
<i>Orobanche aegyptiaca</i> Pers.	گل جالیز	0/5	بافت و کرمان BA, K
<i>Physalis floridana</i> (Rydb.)	عروسک پشت پرده	0/19	بردسیر، کرمان و بافت B, K, BA
<i>Datura stramonium</i> L.	تاتوره	0/8	بردسیر B
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	پیچک صحرائی	0/12	بردسیر، کرمان و بافت B, K, BA

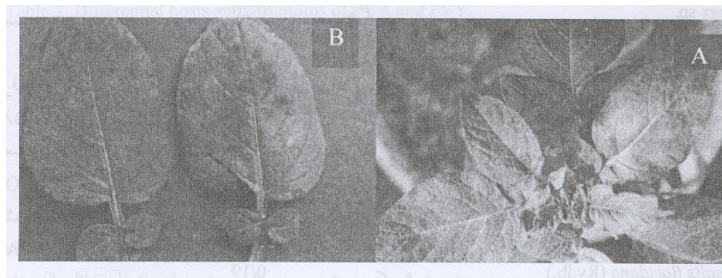
Number of infected plants / total number of weeds plant
علفهای هرز)

J=Jiroft, B=Bardsir, K=kerman, BA=Baft, JO=Joopare

سیستمیک گردید. آلودگی به وسیله آزمون الیزا نیز به اثبات رسید. در شرایط محیطی کنترل شده، با دمای ۲۲ درجه سانتی گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با ۳۰۳۰۰ لوکس نور تامین شده توسط لامپ های ۸۰۰ وات Plant star (ساخت کمپانی Osram)، بعد از گذشت ۶-۵ روز، تنها علائم لکه موضعی نکروتیک در برگ های این گیاه ظاهر گردید (شکل های ۳).

خ- انتقال PVA با شته

از میان شته های بررسی شده، شته سبزه لو و شته سیاه یونجه به ترتیب بیشترین (۳۳/۳) و کمترین درصد انتقال (۳/۳) را نشان دادند. میزان انتقال PVA توسط شته سیاه باقلا و شته پنبه نیز به ترتیب ۶/۶ و ۱۰ درصد تعیین شد.



شکل ۳- واکنش بوته سیب‌زمینی دورگه A6 بعد از مایه‌زنی با PVA.

Fig 3: Reaction of A6 hybrid plants after mechanical inoculation by PVA.

A: علائم رگبرگ روشنی در بوته سیب‌زمینی دورگه A6 مایه‌زنی با PVA در دمای ۳۰-۳۵ درجه

سانتی‌گراد، با ۱۲۵۰۰ لوکس نور طبیعی و ۱۰ روز پس از مایه‌زنی.

B: بروز لکه های موضعی نکروتیک بر روی سیب‌زمینی دورگه A6 مایه‌زنی با PVA در دمای ۲۲ تا

۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با ۳۰۳۰۰ لوکس نور، و پس

از ۵ روز از مایه‌زنی.

A: Vein clearing on A6 hybrid leaves at 30-35°C & 12500 lux, 10 days after mechanical inoculation of PVA.

B: Necrotic local lesion on A6 hybrid leaves at 22-25°C, 16h light-8h dark, & 30300 lux, 5-6 days after mechanical inoculation by PVA.

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که PVA در تمام مناطق کاشت سیب‌زمینی استان کرمان شیوع دارد. با توجه به نتایج بدست آمده بنظر می‌رسد بیشتر ارقام کشت شده در مناطق مختلف استان، به PVA حساس می‌باشند.

بیشتر ارقام سیب‌زمینی که در مناطق مختلف استان کشت می‌شدند، آگریا، دیامونت و کوزیما بودند که علائم آلودگی به PVA بیشتر روی رقم کوزیما و آلودگی مرکب، بیشتر روی رقم آگریا مشاهده شد. نمونه‌های حاوی علائم و نمونه‌های آلوده به PVA بیشتر در منطقه لاله زاربردسیر مشاهده گردیدند. علت احتمالی افزایش آلودگی نسبت به این ویروس و سایر

ویروس های ذکر شده آن است که بیشتر کشاورزان این منطقه از غده های تولید شده سال قبل خود به طور مکرر استفاده می نمایند. تعدادی ازبوتته های سیبزمینی دارای علائم شبه ویروسی نسبت به هیچ یک از آنتی سرم های مورد استفاده واکنشی نشان ندادند. دلیل آن شاید وجود سایر ویروس های آلوده کننده سیبزمینی، ویروئیدها و یا عوامل مربوط به کمبود مواد غذایی و غیره باشد.

با توجه به اینکه تا کنون اطلاعاتی در مورد میزبانهای ثانویه ویروس مذکور موجود نمی باشد، به همین دلیل در این مطالعه سعی گردید از کلیه گیاهان موجود در مزارع سیبزمینی استان کرمان به صورت تصادفی نمونه برداری گردد. در این بررسی از بین گونه های مختلف گیاهی تنها تعدادی از علف های هرز سلمه تره و گیاه اسفناج دارای علائم ویروسی با استفاده از آزمون های DAS-ELISA و TBIA نسبت به PVA واکنش مثبت نشان دادند. در حالیکه گیاهان سلمه تره و اسفناج بدون علائم نسبت به این ویروس واکنش نشان ندادند. تلاش جهت انتقال آلودگی PVA از نمونه های مثبت سلمه تره سفید و اسفناج به روش مایه زنی مکانیکی روی گیاهان محک مناسب و PCR موفقیت آمیز نبود. شاید بتوان دلیل آن را وجود یکسری مواد بازدارنده در این گونه از گیاهان ذکر نمود. با توجه به علائم موجود در بوته ها و واکنش مثبت عصاره این گیاهان در آزمون های الیزا و TBIA برای اظهار نظر قطعی لازم است مطالعات تکمیلی بیشتری در این خصوص انجام گیرد.

در این تحقیق، گیاه حساس به PVA و مصون به PVY تشخیص داده نشد. اما با توجه به اینکه در آلودگی های مخلوط غالباً دو ویروس PVA و PVY رد یابی شدند لذا تفکیک آنها بر اساس دامنه میزبانی و استفاده از گیاهان *S. nigrum*، *P. floridana*، *C. annuum*، *D. metel* و *P. violacea* مناسب می باشد.

Rajamaki و همکاران (1998) گیاه محک سیبزمینی دو رگه A6 را به دلیل ایجاد لکه های بافت مرده بر روی سطح برگها جهت تشخیص ویروس A مناسب دانسته اند. اما در این بررسی مشخص گردید مایه زنی های مکرر ویروس های A و Y روی گیاه محک سیبزمینی دو رگه A6 نیز در شرایط خاص دما و نور سبب می شود هر دو ویروس روی این گیاه لکه های بافت مرده مشابه ایجاد نمایند، بنابراین تشخیص نوع ویروس از روی این میزبان امکان پذیر نیست.

براساس گزارش Cerovska و همکاران (1998)، PVA در برگ‌ها، جوانه‌ها و غده‌های سیب‌زمینی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی درآزمون PCR شناسایی شده است. در این بررسی نیز به منظور تفکیک PVA از PVY از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و آغازگرهای اختصاصی استفاده گردید. در این آزمون از بوته‌های آلوده به PVA علاوه بر قطعه مورد نظر (۱۰۶۵ جفت باز)، قطعه دیگری به اندازه تقریبی ۶۲۵ جفت باز تکثیر شد که ممکن است مربوط به تشکیل لوپ در مرحله ساخت cDNA ویروس مورد نظر باشد. عدم تشکیل این قطعه DNA در بوته‌های سالم و بوته‌های آلوده به PVY بیانگر آن است که این قطعه مربوط به ژنوم گیاه نمی‌باشد و احتمالاً مربوط به ژنوم PVA است. با این وجود، ماهیت دقیق این قطعه DNA تنها بعد از تعیین ترادف آن مشخص خواهد گردد. عدم تشکیل محصول ۱۰۶۵ bp در نمونه منفی و نمونه آلوده به PVY را می‌توان به اختصاصی بودن آغازگرها نسبت داد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از آقای دکتر کولین جفریز (Colin Jeffries) از نمایندگی انجمن کشاورزی اسکاتلند (SASA) به دلیل ارسال میکروپلانتهای سیب‌زمینی رقم A6 صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (27-29). متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: جواد رضانی اول‌ریابی، حسین معصومی، جهانگیر حیدرنژاد، اکبر حسینی پور و مهدی شعبانیان، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان کد پستی ۷۶۱۶۹-۱۴۱۱۱

References

ANONYMOUS, 2004. Annual report on crop production in Kerman province, Iran.

Ministry of Agriculture, 40p, (in Farsi).

BARTELS, R. 1971. Potato Virus A. CMI/AAB. **Descriptions of Plant Viruses, No. 54.**

CEROVSKA, N., PETRZIK, K., MORAVEC, T. and MRAZ, I. 1998. Potato Virus A detection by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Acta Virol. 42:** 83-85.

* Corresponding author

- 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. Gen. Virol.** **34**: 475-483.
- FAO, 2005. The FAO STAT, core production data. <http://faostat.fao.org/site>.
- HASHEMI, M. and IZADPANA, K. 2002. Rapid purification of pulse legume potyviruses without using ultracentrifuge **Proc. 15th Iran. Plant Protec. Cong.**, Kermanshahe, Iran.
- KALENDAR, R. 2005. Fast PCR primer design and repeat sequence searching program with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. http://www.Biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fast_PCR.htm.
- KARIMI, A. 1967. Potato virus diseases in Iran. **Iran J. Plant Pathol.** **3**: 23.
- KARIMI, A. 1968. Important potato diseases in Iran. **Protec. 1th. Plant Protec. Cong. Iran.** Tehran, Iran, p 292-296.
- KATUL, L., and MAKKOUK, K. M. 1987. Occurrence and serological relatedness of five cucurbit potyviruses in Lebanon and Syria. **Phytopathol. Med.** **26**: 36-42.
- KEKARAINEN, T., MERITS, A., ORUETXEBARRIA, I., RAJAMAKI, M. L. and VALKONEN, J. P. T. 1999. Comparison of the complete sequence of five different isolates of Potato virus A (PVA), genus *Potyvirus*. **Arch. Virol.** **144**: 2355-2366.
- LEE, S. T. 1976. Relationships of strains of Potato Virus A in Taiwan. **J. Agric. China** **93**: 60-71.
- LOMMEL, S. A., MCCAIN, A. H. and MORRIS, T. J. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Phytopathology** **72**: 1018-1022.
- PUURAND, U., MAKINEN, K., PAULIN, L. and SAARMA, M. 1994. The nucleotide sequence of *Potato Virus A* genomic RNA and its sequence similarities with other potyviruses. **J. Gen. Virol.** **75**: 457-467.
- RAJAMAKI, M., MERITS, A., RABENSTEIN, F., ANDREJEVA, J., PAULIN, L., KEKARAINEN, T., KREUZE, J. F., FOSTER R. L. S. and VALKONEN, J. P. T. 1998. Biological, serological, and molecular differences among isolates of *Potato Virus A Potyvirus*. **Virology** **88**: 311-321.
- ROHANI, H. and TALEB-ZADEH, F. 1974. A preliminary study of the potato viruses on 25 different samples of the Persian native potatoes. **Protec. 5th. Plant Protec. Cong. Iran.** Tabriz, Iran, p. 64.
- SINGH, R. P. 1982. *Physalis floridana* as a local lesion host for post harvest indexing of

Potato Virus A. **Plant Dis.** **66:** 1051-1052.

SINGH, R. P. and McDONALD, J. G. 1981. Purification of *Potato Virus A* and its detection in potato by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Am. Potato J.** **58:** 181-189.

VALKONEN, J. P. T., PUURAND, U., SLACK, S. A., MAKINEN, K. and SAARMA, M. 1995. Three strain groups of potato A potyvirus based on hypersensitive response in potato, serological properties, and coat protein sequences. **Plant Dis.** **79:** 748-753.

Address of the authors: J. A. R. RAMAZANI, H. MASSUMI, J. HEYDARNEJAD, A. HOSSEINI- POUR and M. SHAABANIAN, Department of plant protection, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran