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 ایران
دوره ۱-۳۸، شماره ۲، ۱۳۸۶ (۴۰۵-۳۹۹)

تشخیص و ردیابی ویروس Yسیب زمینی به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس(RT-PCR)

سارا غلامی [۱] ، مینا کوهی حبیبی [۲*] ، علی اکبر بوشهری [۳] و محمد رضا نقوی [۴]
۱، ۲، ۳، ۴،دانشجوی سابق کارشناسی ارشد ، استادیار و دانشیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۲/۱۲/۲۷- تاریخ تصویب: ۸۵/۸/۱۷)

چکیده

ویروس Y سیب زمینی عضو بزرگترین خانواده ویروسی *Potyviridae* ، قادر به آلوده سازی دامنه وسیعی از خانواده های مختلف گیاهی است و از نظر اقتصادی نیز بسیارحائز اهمیت است . دراین تحقیق واکنش زنجیره ای پلی مراز معکوس(RT-PCR) برای تشخیص و ردیابی ویروس Y سیب زمینی درگیاهان جمع آوری شده از استان تهران استفاده گردید. گیاهان دارای علائم ویروسی از مزارع سیب زمینی جمع آوری شدند و با آزمون DAS-ELISA مورد ارزیابی قرار گرفتند. گیاهان آلوده درشرایط گلخانه به گیاهان محک مایه زنی شدند. تعدادی از این نمونه ها به صورت تصادفی انتخاب وپس از استخراج ار.ان.ای. کل گیاه با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی مبتنی بر توالی بازی غیر ترجمه شونده '۵ و ناحیه رمزکننده پروتئین P1 با روش هایRT-PCR و Immunocapture RT-PCR آزمایش شدند. درواکنش زنجیره ای پلیمراز کلیه استرینهای ویروس Y سیب زمینی قطعه ای به طول ۹۷٤bp تولید نمودند. روش مذکور درتشخیص و ردیابی ویروس مورد نظر از حساسیت قابل توجهی برخوردار بود. نگهداری نمونه های گیاهی به مدت ۵ ماه در دمای۲۰°C – تغییری درمیزان محصول PCR نداشت. با استفاده از روش RT-PCR پوتی ویروسها واسترینهایشان را می توان در مدت ۲ روز شناسایی کرد.

واژه های کلیدی : ویروس Yسیب زمینی، پوتی ویروس، پوشش پروتئینی، RT-PCR

مقدمه

ویروس Y سیب زمینی، ویروسی رشته ای وگونه تیپ جنس پوتی ویروس (*potyvirus*) از خانواده پوتی ویریده می باشد که از مهمترین ویروسهای سیب زمینی است و گسترش جهانی دارد (۳) . ویروس Y سیب زمینی دارای چهار نژاد است که از جهت ایجاد علائم روی گیاهان مختلف و از جهت پاسخ سرولوژیک به آنتی بادی های مونوکلونال متفاوت اند. نژاد N که درتوتون باعث ایجاد نکروز در رگبرگها می گردد، در سیب زمینی علائم خفیفی ایجاد می کند. از این گروه نژاد جدید PVY^{NTN} باعث لکه حلقوی نکروز در غده ها می شود که این نژاد در سالهای اخیر از اروپا گزارش شده است (۱۳) و برخلاف سایر نژادها درسیب زمینی رقم A6 موجب لکه موضعی نکروتیک نمی گردد. در سال ۲۰۰۰ وجود نژاد PVY^{NTN} و نظریه ای درمورد منشاء این نژاد ارائه شد. این نژاد در ۳۰ سال گذشته در اروپا انتشار داشته و از آمریکای شمالی نیز گزارش شده است که باعث لکه های حلقوی نکروزه (necrotic ringspot) درغده ها می شود (۱۳). نژاد C: درارقام حساس سیب زمینی ممکن است علائم موزاییک سیستمیک یا خطوط نقطه چین دربرگ ایجاد کند. در بعضی ارقام باعث نکروز شرشاخه و ایجاد زخمهای نکروتیک زیاد درسطح برگ می شود. نژاد O: درسیب زمینی باعث

* نویسنده مسئول: مینا کوهی حبیبی تلفن:۰۲۶۱-۲۲۳۸۵۲۹ E_mail:mkhabibi@ut.ac.ir

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

علائم چروکیدگی شدید حاشیه برگ روگوز و افتادگی برگها می شود.

انتقال این ویروس توسط غده های سیب زمینی و عصاره برگ (مایه زنی مکانیکی) امکان پذیراست. غده های آلوده که به عنوان اندام رویشی برای کاشت استفاده می شود به عنوان منبع اولیه آلودگی به شمار می آید. درطبیعت ویروس به طریقه ناپایا توسط شته ها از جمله *Myzus persica* منتقل می شود. مدت نیم قرن است که روشهای سرولوژیکی بطور گسترده وموفقیت آمیزی برای تشخیص ویروسهای مختلف و رابطه بین آنها مورد استفاده قرار می گیرد. اما این روشها در مورد پوتی ویروسها زیاد کارآمد نیستند (۴، ۸) . این مشکل به دلیل اپی توپهای غالب ویریونهای پوتی ویروسها است، که قسمتهای انتهایی متغیر آنها (مخصوصا در قسمت انتهایN) در بعضی گونه ها توالی تکرار شونده دارند. اگر چه انواع آنتی بادیهای مونوکلونال اختصاصی برای گروههای مختلف تولید شده اند که با بیش از ٪۹۰ از پوتی ویروسها واکنش نشان می دهند، ولی این امکان در مورد همه پوتی ویروسها وجود ندارد (۴) . درمورد گیاهانی که از اندامهای ذخیره ای آنها استفاده می شود (مانند سیب زمینی) ویروس می تواند درآنجا جمع شده وتا سالها باقی بماند. بعضی از اندام های گیاهی حاوی مقادیر ناچیزی از ویروس هستند که نمی تواند بوسیله تست الایزا یا سایر روشها مانند الکترون میکروسکوپی یا دورگه سازی شناسایی شود اما قادر به تولید گیاهان جدیدی هستند که حاوی مقادیر بالایی از ویروس باشد. لذا، نیاز به روشی است که دارای دقت، حساسیت و سرعت بالا باشد تا بتوان برای بدست آوردن مواد گیاهی عاری از ویروس حتی وجود یک پیکره ویروسی را در بافت شناسایی کرد. یکی از کارآمدترین روشها که اخیرا مورد استفاده قرار می گیرد واکنش زنجیره ای پلیمراز می باشد. این روش درسال ۱۹۸۵ توسط saiki وهمکارانش معرفی گردید (۸). PCR عبارت از تکثیر انتخابی یک ناحیه مورد نظر از یک ملکول DNA می باشد. هر ناحیه از ملکول DNA به شرطی که توالی های دو طرف آن ناحیه شناخته شده باشد قابل انتخاب است. بدین منظور دو الیگونو کلئوتید کوتاه به عنوان آغازگر، ناحیه ای را که بایست تکثیر شود تعیین حدود می نماید.

بیشتر ویروسهای گیاهی که از نظر اقتصادی مهم می باشند، دارای ژنوم از نوع آر. ان . ای هستند. جهت تکثیر و شناسایی آنها بوسیله PCR ، خالص سازی ویروس ضروری نبوده وتنها استفاده از عصاره گیاهی و استخراج توده ار. ان. ای لازم است تا از روی آن نسخه برداری معکوس صورت گرفته و دی. ان.ای مکمل ساخته شود. این عمل به کمک آنزیم نسخه بردار معکوس صورت می گیرد.

روش Immunocapture RT-PCR درسال ۱۹۹۳ توسط Nolasco و همکاران ابداع شد. او با ترکیب دو روش الایزا وRT-PCR این روش را برای تشخیص ویروسهای ار. ان. ای دار پاتوژن گیاهی بکار برد، که تلفیقی از خالص سازی ناقص پاتوژن بوسیله آنتی بادی های جذب شده به فاز جامد و واکنش نسخه برداری معکوس است. نسخه برداری معکوس از ار. ان.ای بطور مستقیم و بدون هیچگونه عملیات تخریب شیمیایی یا حرارتی پیکره های ویروسی انجام می شود. تمام این عملیات را می توان در یک میکروپلیت یا میکروتیوب انجام داد. Nolasco خود صحت این روش را برای ۱۰ ویروس مختلف و همچنین ویروسهای اقماری ار. ان.ای به اثبات رسانید. استفاده از این روش هنگامی که آنتی بادی اختصاصی ویروس دردست نبوده و یا سایر روشهای سرولوژیکی به سختی قابل استفاده هستند (مانند ار. ان.ای های اقماری یا ویروئیدها) امکان پذیر نیست.

تکنیک های اخیر بطور موفقیت آمیزی درمورد یکسری از پوتی ویروسها نیز قابل استفاده است. برای جدا سازی کلیه گونه های پوتی ویروسها از یک جفت آغازگر طراحی شده بر اساس ناحیه حفاظت شده ژن کد کننده NIb و پایانه '۳ ژنوم ویروس (poly dT) استفاده شده است. همچنین برای تشخیص PVY و تفکیک نژادهای آن از جفت آغازگرهای اختصاصی براساس نواحی غیرترجمه شونده '۵ و کد کننده پروتئین P1 استفاده گردید (۳).

مواد وروشها

جمع آوری نمونه های آلوده به ویروس: از مزارع انتخابی در استان تهران بصورت تصادفی بالغ بر ۴۰۰ نمونه مشکوک

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

به آلودگی ویروس جمع آوری و سریعا به آزمایشگاه منتقل گردید.

تعیین آلودگی نمونه ها به PVY : آزمایش الایزا به روش مستقیم ساندویچ دو طرفه الایزا مطابق روش کلارک و بارجوزف انجام گردید که مراحل آن به شرح زیر بود: ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی اختصاصی (IgG) ویروس Y سیب زمینی رقیق شده دربافر coating در هرچاهک پلیت الایزا ریخته ودردمای ۴°C به مدت یک شب یا در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۳ تا ۴ ساعت نگهداری شد. چاهکها بوسیله بافر(PBS-T) سه بار شستشو داده شد وسپس ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی درچاهکها (با نسبت ۱ به ۱۰ دربافر استخراج) ریخته و در دمای۴ °C به مدت یک شب نگهداری شدند. درمرحله بعد پس از شستشو با PBS-T ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی آنزیم دار اختصاصی ویروس درهرچاهک وارد و در انکوباتور ۳۷° C به مدت ۴ ساعت نگهداری شد. مجددا سه بار شستشو با PBS-T انجام شد. و در هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر سوبسترا حاوی ماده زمینه ۴ - نیتروفنیل فسفات به میزان ۱mg/m1 ریخته و در انکوباتور دمای ۳۷° C تا ظهور رنگ به مدت ۰/۵ تا ۲ ساعت نگهداری گردید. اندازه گیری میزان جذب نور با دستگاه ELISA READER (State Fax 2000) درطول موج۴۰۵nm انجام شد. پس از آخرین اندازه گیری برای ممانعت از توسعه واکنش به هرچاهک ۱۰ میکرولیتر محلول NaOH ۳ مولار اضافه گردید. آنتی بادی های اختصاصی ویروس وکنترل مثبت از موسسه تحقیقات سلولی وملکولی DSMZ آلمان تهیه شدند.

منبع ویروس: به منظور تهیه منبعی از ویروس مورد مطالعه تعدادی از نمونه های جمع آوری شده از مزارع سیب زمینی استان تهران که در آزمون الایزا آلودگی آنها به اثبات رسیده بود انتخاب و عصاره تعدادی از برگهای جوان آنها در۱۰ حجم بافر فسفات PH= ۷/۴ تهیه شد وبه تعدادی گیاه محک *N. tabacum, Nicotiana glutniosa* و *N. clevelandai* و مایه زنی گردید که درمطالعات مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج ار.ان.ای کل از بافت گیاهی: از هر نمونه گیاهی مقدار ۱۰۰ میلی گرم در یک پاکت پلاستیکی ضخیم قرار داده و در فلاسک حاوی ازت گذاشته سپس خرد شدند. پلاستیک حاوی نمونه ها از ازت مایع خارج و به ازای هر ۱۰۰mg بافت یک میلی لیتر محلول ترایزول افزوده وعصاره گیری شدند. عصاره نمونه های گیاهی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و سپس به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۴°C با سرعت ۱۳۰۰۰ دور دردقیقه سانتریفوژ شد. محلول رونشین را به لوله دیگری منتقل کرده وبا حجم مساوی کلروفرم مخلوط گردید. ۵ دقیقه دردمای اتاق قرار داده وسپس به مدت ۱۵ ثانیه (دمای ۴°C با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفوژ شد. مایع رویی را مجددا به لوله جدید انتقال داده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل و۲۰۰ میکرولیترسدیم استات ۳ مولار اضافه و پس از کمی به هم زدن به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۴ °C وبا سرعت ۱۰۰۰۰ دور دردقیقه سانتریفوژ شد. رسوب با اتانول ۷۰٪ شسته و پس از خشک شدن در۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل حل و در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید. باتوجه با توجه به اینکه ار. ان.ای همواره در معرض آنزیمهای هضم کننده (RNase) هستند لذا، در تمامی موارد باید شرایط استریل حفظ واز هرگونه آلودگی ممانعت شود.

واکنش زنجیره ای پلیمراز – رونویسی معکوس(RT- PCR)

با توجه به غلظت ار.ان.ای کل استخراج شده ، ۲ تا ۵ میکرولیتر از آن را به عنوان الگو برای هر نمونه در لوله ریخته و با مخلوط ذکر شده در جدول ۱ برای مرحله ساخت دی. ان. ای مکمل استفاده شد. برای این منظور از آغاز گرهای اختصاصی ویروس Y سیب زمینی که در شکل ۱ نشان داده شده است استفاده گردید. با استفاده از آغازگرها c و d که مربوط به انتهای '۵ غیر ترجمه شونده و پروتئین P1 ژنوم ویروس می باشند امکان تکثیر کلیه جدایه های PVY فراهم گردید. این جفت آغاز گر درسال ۱۹۹۶ توسط Glais و همکاران به ثبت رسید (۳).

در کلیه مراحل تهیه محلول ها، لوله ها و مواد روی یخ قرار داده شد. لوله های حاوی مخلوط یاد شده درجدول ۱ را برای ساخت دی.ان.ای مکمل در دستگاه ترموسیکلر(PCR) گذاشته و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. سپس در حالی که دما را به ۹۴°C

رسانده مخلوط دوم را که طبق جدول ۲ تهیه شده بود اضافه و دی.ان.ای مکمل با برنامه ای شامل :
یک چرخه ۹۵°C برای ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه ۹۴ °C برای ۱ دقیقه، ۵۳°C برای ۱/۵ دقیقه و ۷۲ °C برای ۲ دقیقه و چرخه آخر ۷۲ °C برای ۱۰ دقیقه همانند سازی گردید. ۱۰ میکرولیتر از محصولPCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و بقیه آن در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

primer	Sequence 5' -3'	Genomic location
c	AATTAAAACAACTCAATACA	1-21
d	TG(CT)GA(CTA) CCACGCACTATGAA	955-974

شکل ۱- توالی ومکان ژنومی آغازگرهای c وd.

جدول ۱- مواد و مقادیر ساخت دی. ان. ای مکمل

مواد	مقدار
آغاز گر(downstream primer 100pmol/μl)	۱میکرولیتر
ار. ان. ای	۳ میکرولیتر
بافر پنج بار واکنش(5x RT buffer)	۴ میکرولیتر
دی. تی. تی ۰/۱ مولار (0.1 MDTT)	۲ میکرولیتر
بازدارنده آنزیم ریبو نوکلئاز (RNase inhibitor 10u μl)	۰/۲۵ میکرولیتر
مخلوط دی اکسی ریبو نوکلئوتید تری فسفات (dNTP 25mM)	۱/۲۵ میکرولیتر
آنزیم MMLV-RT (200u/μl)	۰/۵ میکرولیتر
آب مقطر استریل	۸ میکرولیتر
کل	۲۰ میکرولیتر

Immunocapture RT-PCR

در این روش ابتدا چاهک میکروپلیت و یا میکروتیوب بوسیله آنتی بادی اختصاصی پوشش داده شد. سپس از روی قطعه ای از ژنوم پاتوژن بطور مستقیم RT-PCR انجام و محصول تکثیر یافته شناسایی می شود. تمام مراحل را می توان در یک لوله انجام داد برای انجام این آزمون نمونه های گیاهی آلوده به ویروس با استفاده از بافر فسفات با PBS-T عصاره گیری و پس از آن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رونشین به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در یک لوله مخصوص PCR یا چاهک میکروپلیت که قبلا بوسیله آنتی بادی اختصاصیPVY پوشانده (coat) شده است (مانند الایزا) ریخته وسپس به مدت ۳ تا ۴ ساعت در دمای ۳۷°C یا برای یک شب در دمای ۴°C نگهداری شد. پس از شستشوی لوله ها با PBS-T مقدار ۲۰ میکرولیتر از مخلوط شماره یک RT را بدون نیاز به ار.ان.ای الگو در لوله ها ریخته و به مدت ۴۰ دقیقه در۳۷ °C قرار داده شد. در این موقع دما را به ۹۵°C رسانده و مخلوط دوم را به میزان ۸۰ میکرولیتر به لوله اضافه کرده و برنامه واکنش زنجیره ای پلیمراز مطابق آزمون RT-PCR انجام شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR در روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و بقیه در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

جدول ۲- مواد و مقادیر واکنش

مواد	مقدار
آغاز گر(upstream primer 100pmol/μl)	۲ میکرولیتر
بافر ۱۰ بار واکنش(10x Rt buffer)	۱۰ میکرولیتر
آنزیم Taq دی. ان. ای پلیمراز (200u/μl)	۰/۵ میکرولیتر
MgCl2	۴ میکرولیتر
آب مقطر استریل	۶۳/۵ میکرولیتر
کل	۸۰ میکرولیتر

نتایج و بحث

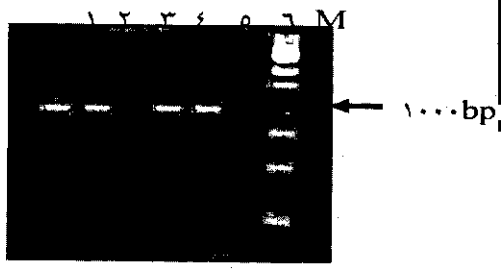
با استفاده از آزمون الایزا نمونه های جمع آوری شده مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج مربوط به آنها بوسیله دستگاه ELISA reader قرائت شد و با توجه به آنها از نمونه های آلوده عصاره گیری به عمل آمده و در گلخانه به گیاهان محک مایه زنی شدند. علائم آلودگی در روی گیاهان مختلفی از جمله توتون *Nicotiana tabacum* و *N. glotinosa* بررسی شده و به عنوان منبع آلودگی مورد استفاده قرار گرفتند.

آغازگرها وحساسیت آنها: آغازگرهای مورد استفاده (شکل ۱) مربوط به ناحیه انتهای '۵ و ژن کد کننده پروتئین P1 هستند. جفت پرایمر cوd قادر بود که تمام ایزوله های PVY که تا بحال شناسایی شده اند را جدا سازی کند (۳). برای تشخیص یک ویروس متعلق به یک خانواده یا یک گروه به پرایمری با دامنه اختصاص وسیع احتیاج است. اما برای تشخیص اختصاصی تراسترین یا

subtype آغازگر باید از نواحی اختصاصی تر ژنوم انتخاب شوند. در مورد پوتی ویروسها مشخص شده است که ژن پروتئین P1 بیشترین تنوع را نشان میدهد (۱۶). علاوه بر این برای اختصاصی تر کردن آغازگر باید توجه داشت که طول قطعه تکثیر شده روی میزان حساسیت تشخیص یک ویروس موثر است. یعنی محصولات تکثیری هرچه کوتاهتر باشند نسبت به قطعات بزرگتر اختصاصی تر وحساس ترخواهند بود (۱۲). بنابراین طول قطعه تکثیر شده نیز در هنگام طراحی آغاز گر بسیار اختصاصی، باید مد نظر قرار گیرد.

واکنش زنجیره ایی پلیمراز – رونویسی معکوس (RT- PCR)

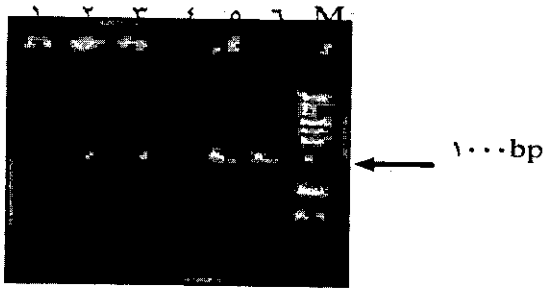
نمونه های تصادفی جمع آوری شده و نمونه های حاصل از گیاهان مایه کوبی شده گلخانه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی c وd آزمایش شدند. محصول واکنش RT-PCR یک قطعه به طول ۹۷۴ bp بود (شکل ۲). این روش برای جداسازی ویروسهای سیب زمینی دربرگ و غده قابل استفاده بود و در نتیجه می توان به عنوان یک روش سریع برای گواهی غده های بذری مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۲- تصویر الکتروفورزی محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس– ستون های ۱و ۴ و۵ نمونه های آلوده به PVY ، ستون ۲ نمونه کنترل مثبت. ستون ۳ نمونه از گیاه سالم. ستون ۶ آب.

Immunocapture RT-PCR

در این روش نیز محصول PCR قطعه ای به طول bp ۹۷۴ بود (شکل ۳). این روش هنگامی که برای یک ویروس آنتی بادی اختصاصی مونوکلونال وجود نداشته باشد بسیار کار آمد است. مخصوصا اینکه تمام این آزمایش دریک لوله قابل انجام است و مراحل آماده سازی نمونه ها و استخراج اسید نوکلئیک لازم نیست. میزان حساسیت این روش را نولاسکو و همکاران (۱۹۹۳) در مورد چندین ویروس مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که اقمارهای ویروسی نیز با استفاده از آنتی بادی های تهیه شده علیه پوشش پروتئینی ویروسهای کمکی آنها قابل شناسایی هستند (۷).



شکل ۳- تصویر الکتروفورزی محصول واکنش IC-RT-PCR . ستون های ۲ و۵ و۶ نمونه های آلوده به PVY . ستون ۳ نمونه کنترل مثبت . ستون ۴ نمونه گیاه سالم. ستون ۱ آب.

استفاده از PCR و آغازگرهای دجنریت کمک زیادی در تشخیص خانواده ها و گروه های ویروسی کرده است، چرا که تعداد زیادی از آنها از طریق روشهای سرولوژیکی و بیولوژیکی قابل تشخیص نیستند. علاوه برخانواده، تشخیص اختصاصی ویروسهای گیاهی، نژاد های آنها و یا زیرگونه ها بوسیله RT-PCR امکان پذیراست. با انتخاب صحیح آغازگر از توالی بازی آن قسمت از ژنوم که کمترین همولوژی را با سایر اعضای آن گروه ویروسی دارد و همچنین بالاترین تنوع را از خود نشان می دهد و کوتاهترین قطعه ممکن را تکثیر می کند تشخیص اختصاصی امکان پذیر می شود (۱۳ ، ۱۴).

معمولا گیاهانی که به روش غیر جنسی یا رویشی تکثیر می شوند به ویروسهای متعددی آلوده می شوند . برای مثال بیش از چندین ویروس که از طریق شته انتقال می یابند و قادرند به طور همزمان یک گیاه را آلوده کنند را می توان با روش RT-PCR تشخیص وتفکیک نمود (۱۳) . شناسایی نژادهای PVY به روش bioassay ممکن است تا چند ماه بطول انجامد اما با استفاده از RT-PCR ، پوتی ویروسها و نژادهایشان را می توان درکمتر از ۲ روز شناسایی کرد. با وجودیکه RT-PCR در بسیاری موارد حساستر ودقیق تر از الایزا و یا دور رگه سازی اسید نوکلئیک است اما کارایی و

مقبولیت آن بستگی به بعضی عوامل دیگر مانند تهیه نمونه های گیاهی، خارج کردن بازدارنده های PCR و انتخاب صحیح آغازگر دارد. بافت های گیاهی بسته به حضور عوامل بازدارنده، ضخامت دیواره سلولی، ترکیبات دیواره های سلولی، حضور پلی ساکاریدهایی مانند نشاسته و یا مواد اکسید کننده که می توانند کمیت و کیفیت نوکلئیک اسید های استخراج شده را تحت تاثیر قراردهند، متفاوت می باشند (۱۳). به همین دلیل برای استخراج نوکلئیک اسید علاوه بر نوع گیاه، بافت مورد استفاده و ویروس مورد مطالعه، روش استخراج نیز بایستی مد نظر قرار گیرد (۱۴،۱۳). روشی که در این مطالعه برای استخراج آر. ان. ای استفاده گردید از کارایی بالایی برخوردار بود و واکنشهای PCR با کمترین مشکل و غلظت قابل قبول محصولات مربوطه صورت گرفت، اگر چه گیاهان و بافت های مختلف تفاوت هایی از این نظر نشان دادند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از گروه محترم بیوتکنولوژی و گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران که امکانات انجام این تحقیق را فراهم نمودند نهایت تشکر ابراز می گردد.

REFERENCES

1. Clark, M.F., M. Bar- Joseph. 1984. Enzyme Link immunosorbent assays in plant virology in Maramorosch, K. and H. Koprowski (eds.) Methods in Virology 7: 51-85. New York Academic press.
2. Gibbs, A. and A. Mackenzie. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. Journal of Virological Methods 63:9-16.
3. Glais, L., C. Kerlan, M. Tribodet, V. Mariejeane Tordo, C. Robaglia and S. AstierManigacier. 1996. Molecular characterization of potato virus YN isolates by PCR –RFLP. European Journal of plant Pathology 102:655-662.
4. Jordan, R. and J. Hammond. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain, virus subgroup specific and potyvirus group common epitopes using monoclonal antibodies. Journal of general virology 72:25-36.
5. Nie, X. and R. Singh. 2002. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. Journal of Virological Methods 104:41-54.
6. Nie, X. and R. Singh. 2000. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiple RT-PCR. Journal of Virological Methods 86:179-185.
7. Nolasco, G. C. Blas, V. Torres and B. Ponz. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. Journal of Virological Methods 45: 201- 218.
8. Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of Beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354.
9. Shukla, D.D. and C. Ward. 1989 Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Archive of Virology 106: 171-200.
10. Shukla, D.D., N. Mckern, K.H. Gohgh, S.L. Tracy and S. Letho. 1988. Differentiation of potyviruses and their strains by high performance liquid chromatographic peptide profiling of coat proteins. Journal of General Virology 69:493-502.
11. Shukla, D.D., P.M. Strike, S.L. Trach, K.H. Gough and C. W. Ward. 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface–located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. Journal of General Virology 69:1497.

12. Singh, M. and R. Singh. 1996. Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. Journal of Virological Methods 60:47-57.
13. Singh, R. 1998. Reverse–transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. Journal of Virological Methods 74:125-138.
14. Singh, R. and J. Kurz.1996. Detection of stylet–born and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 59:189-196.
15. Singh, R., X. Nie and M. Singh. 2000. Duplex RT-PCR: reagent concentrations at reverse transcription stage affect the PCR performance. Journal of Virological Methods 86:121-129.
16. Tordo, V.M.J., A.M. Chachulsksa, H. Fakhfakh, M. LeRomacer , C. Robaglia, S. Astier-Manifacier. 1995. Sequence polymorphism in the 5' NTR and in the p1 coding region of potato virus Y genomic RNA. Journal of General Virology 776: 939-949.