ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰
صفحه ۲۶-۱۷

ردیابی همزمان چند ویروس مهم در سیب‌زمینی به کمک Multiplex RT-PCR و مقایسه آن با آزمون سرولوژیکی اِلایزا

بهار یونسی[۱]، مسعود شمس‌بخش*[۲]، ناصر صفایی[۳]، فاطمه خلقتی‌بنا[۴]

۱،۲و۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیاران گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۴- مربی پژوهشی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۸)

چکیده

ویروس‌های Y (PVY)، X (PVX)، S (PVS) و پیچیدگی برگ (PLRV) سیب‌زمینی از مهم‌ترین ویروس‌های بیمارگر این گیاه به شمار می‌روند و به طور جدی سبب کاهش میزان و کیفیت محصول سیب‌زمینی می‌شوند. وقوع ویروس‌های یاد شده از اغلب مناطق اصلی کشت سیب‌زمینی در ایران نیز گزارش شده است. از این رو معرفی یک شیوه دقیق، سریع و ارزان برای ردیابی ویروس‌های یاد شده در مزارع تولید غده‌های بذری می‌تواند نقش مهمی در کنترل انتشار و خسارت آنها داشته باشد. در این پژوهش، روش Multiplex RT-PCR برای ردیابی همزمان ویروس های *Y*، *X*، *S*، پیچیدگی برگ سیب‌زمینی و ژن *18S rRNA* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. سپس حساسیت این روش با آزمون سرولوژیکی اِلایزا که شیوه‌ای رایج برای ردیابی ویروس‌های سیب‌زمینی است، مقایسه گردید. ابتدا، RNA ی کل از برگ سیب‌زمینی آلوده به ویروس استخراج و سپس DNA مکمل برای ویروس‌های یاد شده و ژن *18S rRNA* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی معکوس به صورت جداگانه ساخته شد و واکنش RT-PCR برای هر کدام از ویروس‌ها و ژن *18S rRNA* انجام گرفت. سپس واکنش Multiplex RT-PCR با استفاده از پنج جفت آغازگر انجام شد. در نهایت، پنج قطعه متفاوت (۱۴۵-۳۴۲ جفت باز) که اختصاصی ویروس‌ها و کنترل داخلی بودند به طور همزمان تکثیر شد و بر اساس وزن مولکولی آنها تشخیص داده شدند. همچنین حساسیت روش بهینه سازی شده Multiplex RT-PCR و Duplex RT-PCR در این مطالعه با روش تجاری DAS-ELISA در ردیابی ویروس‌های سیب‌زمینی مقایسه گردید. نتایج نشان داد که حساسیت Multiplex RT-PCR صد برابر بیشتر از آزمون اِلایزا در ردیابی ویروس‌های Y، S و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی و حساسیت Duplex RT-PCR هزار برابر بیشتر از آزمون اِلایزا در ردیابی ویروس Y سیب‌زمینی بود.

واژه‌های کلیدی

**پیچیدگی برگ سیب‌زمینی،
کنترل داخلی،
ویروس‌های Y، X و S،**

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.3.1]

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از محصولات زراعی مهم ایران و جهان می‌باشد. ایران با سطح زیر کشت ۱۶۳ هزار هکتار و تولید سالانه ۴/۲ میلیون تن در سال مقام سوم را در آسیا و مقام دوازدهم را در دنیا به خود اختصاص داده است (۶). بیشترین سطح زیر کشت این محصول در استان‌های اردبیل، اصفهان، همدان، آذربایجان شرقی، فارس و خراسان قرار دارد (۷). سیب‌زمینی گیاهی حساس به آفات و بیماری‌هاست و هر ساله مقداری از این محصول توسط آفات و بیماری‌ها از بین می‌رود و از این میان بیماری‌های ویروسی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش محصول به شمار می‌روند. بیماری‌های ویروسی به طور متوسط تا ۵۰ درصد باعث کاهش محصول سیب‌زمینی می‌شوند (۹). تا به حال ۳۵ ویروس آلوده کننده سیب‌زمینی از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است (۲۸). ویروس Y سیب‌زمینی (*Potato virus Y*, PVY)، ویروس X سیب‌زمینی (*Potato virus X*, PVX)، ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی (*Potato leafroll virus*, PLRV)، ویروس M سیب‌زمینی (*Potato virus M*, PVM) و ویروس S سیب‌زمینی (*Potato virus S*, PVS) از مهم ترین ویروس‌های خسارت‌زای سیب‌زمینی به شمار می‌روند (۹). میزان آلودگی به ویروس های Y، S و A سیب‌زمینی در استان کرمان به ترتیب تا ۱۰/۸، ۰/۸۳ و ۱۵/۸ درصد تعیین شده است (۲). ویروس Y سیب‌زمینی شایعترین ویروس مزارع سیب‌زمینی در استان‌های خراسان، گیلان و مازندران می‌باشد (۵). بعلاوه این ویروس از استان‌های اصفهان و همدان نیز گزارش شده است (۴). همچنین ویروس X سیب‌زمینی از استان‌های خراسان و اردبیل گزارش شده است (۳). در استان خوزستان آلودگی نمونه‌های جمع آوری شده به ویروس‌های Y، S، X، M، پیچیدگی برگ سیب‌زمینی و ویروس موزاییک یونجه (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) به ترتیب ۷۴، ۶۸، ۴۴، ۲۲، ۲۵ و ۱۱/۵ درصد گزارش شده است (۱). اخیراً میزان آلودگی مزارع یازده استان شامل اردبیل، آذربایجان، اصفهان، تهران، چهارمحال بختیاری،خراسان، خوزستان، زنجان، کرمان، لرستان و همدان به ویروس‌های S، Y، A، X، M و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی به ترتیب ۳۵/۹، ۳۴/۴، ۲۷، ۲۰/۸، ۹، ۱۳/۹ درصد تعیین شده است (۲۵). بر خلاف اکثر عوامل بیماری‌زا، تعدادی از ویروس‌های سیب‌زمینی می‌توانند بدون ایجاد هر گونه علایمی در گیاه باعث خسارت شوند؛ در این حالت خسارت به صورت کاهش محسوس میزان تولید و قدرت انبارداری محصول می‌باشد (۹).

روش‌های مورد استفاده در تشخیص ویروس‌ها شامل سنجش بیولوژیکی، میکروسکوپ الکترونی، روش‌های سرولوژیکی، هیبریداسیون اسید نوکلئیک و روش‌های مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز[1] می‌باشد (۱۷). تمام روش‌های گفته شده در یک زمان فقط قادر به ردیابی یک ویروس هستند (۱۵). اخیراً پژوهشگران با استفاده از روش ریز آرایه[2] موفق به ردیابی همزمان چندین ویروس شده‌اند (۱۱) اما به دلیل هزینه بالا، نیاز به تجهیزات پیچیده و تخصص، استفاده از این روش برای تشخیص ویروس‌های گیاهی معمول نمی‌باشد.

با توجه به آلودگی گسترده مزارع سیب‌زمینی ایران به ویروس‌ها، تولید غده‌های بذری در کشور و ضرورت استفاده از بذر سالم، ردیابی سریع و همزمان ویروس‌های سیب‌زمینی در مزارع غده‌های بذری ضروری می‌باشد. از این رو هدف از انجام این تحقیق بهینه سازی روش Multiplex RT-PCR برای تشخیص همزمان چند ویروس رایج (PVX, PVY, PLRV, PVS) مزارع سیب‌زمینی ایران می‌باشد. به علاوه در این تحقیق حساسیت، سرعت و دقت روش‌های Multiplex-PCR و Duplex RT-PCR با روش متداول ELISA در ردیابی ویروس‌های سیب‌زمینی مقایسه می‌شود.

مواد و روش‌ها

منابع ویروس‌ها

به منظور شکستن خواب بذور، غده‌های سیب‌زمینی جمع‌آوری شده از مزارع تولید غده مادری به مدت دو هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار گرفتند. سپس جوانه‌های غده‌ها برای آلودگی ویروسی بررسی و غده‌های آلوده در گلدان‌های حاوی

[1] Polymerase Chain Reaction
[2] Microarray

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.3.1]

خاک ضدعفونی شده، پیت و پرلیت به نسبت مساوی کشت و در گلخانه با شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از سبز شدن غده‌ها به منظور تأیید آلودگی گیاهان، نمونه‌های برگی گیاهان مجدداً با استفاده از آزمون اِلایزا بررسی و گیاهان آلوده برای انجام تحقیقات در گلخانه با شرایط یاد شده نگهداری شدند.

آزمون اِلایزا

آزمون داس الایزا[3] طبق روش کلارک و آدامز (۱۳) و با استفاده از چهار آنتی بادی پلی کلونال علیه PVY, PVX, PLRV, PVS (خریداری شده از شرکت بیوربا، سویس) انجام گردید. به منظور ارزیابی نتایج اِلایزا ازدستگاه اِلایزا خوان (Anthos 2020، ایتالیا) و از طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد. برای تعیین حد آلودگی (R) از فرمول R=X+3SD استفاده شد. X میانگین جذب چاهک‌های شاهد منفی می‌باشد. SD مجموع انحراف معیارهای چاهک‌های منفی است. نمونه‌های با جذب برابر یا بیشتر از R به عنوان نمونه‌های آلوده شناخته شدند. نمونه‌های با جذب کمتر از این میزان به عنوان نمونه‌های عاری از ویروس در نظر گرفته شدند.

استخراج RNA

استخراج RNA از گیاهان آلوده با استفاده از بافر RNX-plus (شرکت سیناژن، ایران) و طبق دستور شرکت تولید کننده انجام شد. رسوب RNA به دست آمده در ۳۰ میکرولیتر آب تیمار شده با Diethlpyrocarbonate (DEPC) (شرکت سیناژن، ایران) حل شد. محلول حاصل تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش نسخه برداری معکوس[4]

ابتدا نه میکرولیتر از RNA استخراج شده با غلظت ۸ میکروگرم بر میکرولیتر و دو میکرولیتر از آغازگر معکوس با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر مخلوط شد. آنگاه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس چهار میکرولیتر از بافر واکنش نسخه برداری معکوس با پنج برابر غلظت، دو میکرولیتر از dNTPs (مخلوط هر چهار نوکلئوتید) با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم بازدارنده ریبونوکلئاز با غلظت ۴۰ واحد بر میکرولیتر و ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم M-MuLV RT با غلظت ۲۰۰ واحد بر میکرولیتر اضافه شد و سپس حجم آن با آب تیمار شده با DEPC به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. آنگاه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس واکنش در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) انجام گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای معرفی شده توسط یو و همکاران (۱۵) انجام گرفت. توالی آغازگرهای پیشرو و معکوس و اندازه قطعه مورد انتظار برای ویروس‌های Y، X، S و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی و ژن کنترل داخلی *18S rRNA* در جدول یک آمده است. برای هر واکنش، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با ده برابر غلظت (شامل ۵۰۰ میلی مولار KCl و Tris-HCl با اسیدیته ۸/۴)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase (پنج واحد در میکرولیتر)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی و معکوس (۱۰ میکرومولار)، دو میکرولیتر محصول واکنش نسخه برداری معکوس و ۱۷ میکرولیتر آب دیونیزه استفاده شد. تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر (Termocycler ep Gradient، اپندروف، آلمان) برای هر کدام از ویروس‌ها و ژن کنترل داخلی به طور جداگانه انجام گرفت. برنامه دمایی شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه برای واسرشته سازی اولیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۷/۴ درجه سانتی‌گراد برای ویروس‌های S، پیچیدگی برگ سیب‌زمینی و کنترل داخلی و دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای ویروس‌های X و Y سیب‌زمینی به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه بود. در نهایت برای بسط نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه اعمال گردید.

بهینه سازی واکنش Multiplex RT-PCR

مخلوط هر چهار ویروس مورد بررسی با استخراج RNA کامل از برگ‌های دو گیاه سیب‌زمینی آلوده با وزن مساوی که هر کدام به

[3] Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA
[4] Reverse transcription

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.3.1]

دو ویروس آلوده بودند به دست آمد. روش تهیه مخلوط واکنش Multiplex RT-PCR مشابه روش استفاده شده برای واکنش نسخه برداری معکوس و زنجیره‌ای پلیمراز برای یک ویروس بود با این تفاوت که جفت آغازگرهای اختصاصی مربوط به هر چهار ویروس و کنترل داخلی (PVXF/PVXR, PVYF/PVYR, PLRVF/PLRVR, 18S rRNAF/18S rRNAR, PVSF/PVSR) وارد مخلوط واکنش گردید. دمای اتصال اعمال شده برای هر پنج جفت آغازگر ۵۸ درجه سانتی‌گراد استفاده شد و ۳۰ چرخه دمایی اعمال شد. بهینه کردن واکنش Multiplex با تغییراتی در غلظت $MgCl_2$، آغازگرها، زمان گسترش، تغییر تعداد چرخه‌های واکنش و دمای اتصال آغازگرها انجام گرفت. محصولات RT-PCR در ژل آگارز سه درصد در بافر TBE با غلظت یک برابر (شامل ۱/۰۸ گرم تریس، ۰/۵ گرم اسید بوریک، ۰/۰۳۷ گرم Na_2EDTA، در یک لیتر آب دیونیزه و اسیدیته ۸/۳) و در ولتاژ ثابت ۸۵ به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شدند. پس از رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید، از ژل‌ها عکس تهیه شد. به منظور برآورد جرم مولکولی، قطعات DNAی تولید شده از نشانگر با جرم مولکولی (GeneRuler^{TM}100bp DNA ladder, Fermentas) استفاده شد.

مقایسه حساسیت آزمون اِلایزا با روش‌های Multiplex RT-PCR و Duplex RT-PCR

حساسیت و دقت آزمون سرولوژیکی اِلایزا و روش‌های Duplex RT-PCR و Multiplex RT-PCR برای ردیابی غلظت‌های مختلف ویروس‌های X، Y، S سیب‌زمینی و PLRV بررسی شد. نمونه‌برداری از ساقه و برگ دو گیاه که در مجموع به هر چهار ویروس آلوده بودند، انجام گرفت. نمونه با ازت مایع به صورت پودر درآمد. سپس ۰/۱ گرم از نمونه برای استخراج RNA کل و یک گرم برای استخراج عصاره مورد نیاز در آزمون اِلایزا استفاده شد.

آر ان ای کل نمونه یاد شده با استفاده از بافر RNX-plus (سیناژن) استخراج شد و غلظت‌های مختلف (serial dilution) آن تا رقت 10^{-10} تهیه شد. غلظت‌های آماده شده از RNA کل که حاوی RNA ویروس‌های یاد شده و کنترل داخلی بود وارد واکنش Multiplex RT و Duplex RT شدند. پس از تهیه و ساخت cDNA های مورد نظر، واکنش PCR انجام شد.

یک گرم از نمونه یاد شده برای استخراج عصاره گیاهی با استفاده از بافر استخراج اِلایزا عصاره گیری و غلظت‌های مختلف آن تا رقت 10^{-10} تهیه شد. سری رقت‌های عصاره گیاه آلوده برای سه ویروس به صورت جداگانه با چهار تکرار و عصاره گیاه سالم با سه تکرار در هر بشقابک ریخته شد. آزمون اِلایزا طبق روش شرح داده شده، انجام گرفت. همه‌ی آزمایش‌ها حداقل دو بار تکرار شدند.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ویروس‌های Y، S، X و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی و اندازه قطعه مورد انتظار.

نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه قطعات مورد انتظار (جفت باز)
PVXF	5′ AACTGGCAAGCACAAGGTTTCA 3′	۱۴۵
PVXR	5′ CAGTTTGGGCAGCATTCATTTC 3′	
PVYF	5′ ATACTCGRGCAACTCAATCACA 3′	۱۶۶
PVYR	5′ CCATCCATCATAACCCAAACTC 3′	
PVSF	5′ ACCRGATCCGACAAGCTCAGG 3′	۳۴۲
PVSR	5′ GCCATTTGCTCRGTGTTCG 3′	
PLRVF	5′ CCACTCCAACTCCCCAGAAG 3′	۲۰۸
PLRVR	5′ TACATAGGGACGGCTTGCAT 3′	
18S rRNAF	5′ GAGAAACGGCTACCACATCCA 3′	۲۵۵
18S rRNAR	5′ CGTGCCATCCCAAAGTCCAAC 3′	

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.3.1]

نتایج

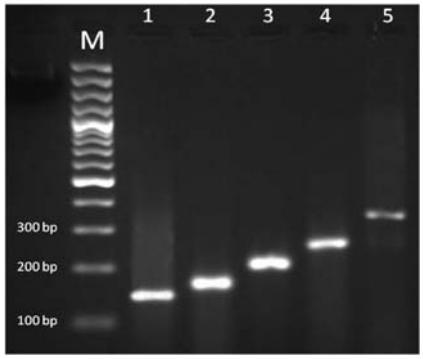
برای تعیین دمای اتصال مطلوب برای جفت آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، واکنش PCR در دماهای ۵۲، ۵۳/۵، ۵۵/۵، ۵۷/۴، ۶۰ و ۶۱/۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. نتایج بررسی‌ها در مورد جفت آغازگرهای PVXF/PVXR و PVYF/PVYR نشان داد که تنها یک باند در هر دمای اتصال مشاهده شد. باندهای غیر اختصاصی در مورد جفت آغازگرهای PLRVF/PLRVR، PVSF/PVSR و 18SF/18SR در دماهای ۵۲، ۵۳/۵، ۵۵/۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، در دماهای ۵۷/۴ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد این باندهای اضافی تکثیر نشدند. در دمای ۶۱/۵ درجه سانتی‌گراد شدت باندهای تکثیر شده مربوط به هر پنج جفت آغازگر بسیار ضعیف بود. بنابراین، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه اتصال آغازگرها در واکنش Multiplex-RT-PCR برای استفاده انتخاب شد. برای تعیین غلظت مناسب $MgCl_2$، غلظت‌های ۰/۴، ۰/۶، ۱ و ۱/۵ میلی مولار بررسی شدند. باندهای به دست آمده از غلظت ۱/۵ میلی مولار قابل قبول بودند اما شدت باندهای مربوط به غلظت‌های ۱ و ۰/۶ میلی مولارکم و در غلظت ۰/۴ میلی مولار باندی تشکیل نشد. باندهای به دست آمده از محصولات PCR در ژل آگارز سه درصد و بافر TBE تفکیک شدند. قطعات، با اندازه مورد انتظار؛ ویروس X سیب‌زمینی (۱۴۵ جفت باز)، ویروس Y سیب‌زمینی (۱۶۶ جفت باز)، ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی (۲۰۸ جفت باز)، ویروس S سیب‌زمینی (۳۴۲ جفت باز) و 18S rRNA (۲۵۵ جفت باز) تکثیر شدند (شکل ۱).

واکنش نسخه‌برداری معکوس برای مخلوط چهار ویروس به همراه کنترل داخلی انجام گرفت. محصول نسخه‌برداری معکوس چهار ویروس به همراه کنترل داخلی به عنوان الگوی DNA برای بهینه‌سازی واکنش‌های Multiplex PCR به کار رفت. برنامه دمایی شامل یک چرخه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و به دنبال آن ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه بود. در نهایت دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه برای بسط نهایی اعمال گردید. محصول به دست آمده از برنامه دمایی و چرخه‌های یاد شده مقایسه شدند. باندهای به دست آمده از برنامه‌های با ۲۰ و ۲۵ چرخه قابل قبول بودند اما باندهای تکثیر شده در برنامه‌های با ۳۰ و ۳۵ چرخه شدت بیشتری داشتند. بنابراین برنامه دمایی با ۳۰ چرخه انتخاب شد. غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ پیکومول از آغازگرها در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. در مورد آغازگرهای مربوط به ویروس‌ها بهترین باند از غلظت ۱۰ میکروگرم بر ماکرولیتر به دست آمد و در مورد کنترل داخلی هر دو غلظت ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر مناسب بودند اما به دلیل شدت بسیار بالای باند به دست آمده از غلظت ۱۰ میکروگرم و عدم هماهنگی آن با باندهای ویروسی تکثیر شده در Multiplex PCR غلظت ۵ میکروگرم انتخاب شد. محصولات مرحله نسخه‌برداری معکوس تکثیر یافته در واکنش Multiplex PCR روی ژل آگارز ۳ درصد و بافر TBE تفکیک شدند (شکل ۲).

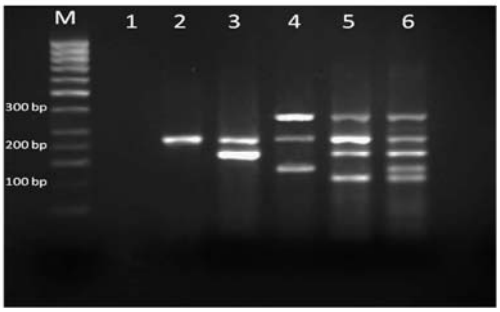
حساسیت واکنش Duplex RT-PCR و DAS-ELISA در ردیابی غلظت‌های مختلف PVY و کنترل داخلی مقایسه شد. به این منظور رقت‌های مختلف (serial dilution) از عصاره گیاهی استخراج شده آماده شد و در دو شیوه یاد شده وارد گردید. محصولات PCR در ژل آگارز سه درصد و بافر TBE تفکیک شدند. واکنش Duplex RT-PCR تا غلظت 10^{-7} قادر به ردیابی PVY بود (شکل ۳). برنامه دمایی مشابه دماهای لازم برای واکنش Multiplex PCR بود و فقط تعداد چرخه‌ها به ۲۰ چرخه کاهش یافت. آزمون اِلایزا تا رقت 10^{-4} قادر به ردیابی ویروس Y سیب‌زمینی بود.

حساسیت واکنش Multiplex RT-PCR و DAS-ELISA در ردیابی غلظت‌های مختلف ویروس‌های یاد شده و کنترل داخلی مقایسه شد. نتایج نشان داد که واکنش Multiplex RT-PCR قادر به ردیابی PVY، PLRV و PVS تا غلظت 10^{-6} بود (شکل ۴). برنامه دمایی بدون تغییر و فقط تعداد چرخه‌های PCR به ۲۰ چرخه کاهش یافت. آزمون اِلایزا قادر به ردیابی ویروس‌های Y، X و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی تا رقت 10^{-4} بود.

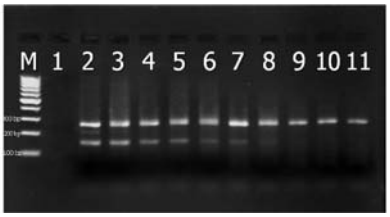
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.3.1]



شکل ۱- ردیابی چها ر ویروس و 18S rRNA از برگ‌های آلوده سیب‌زمینی به هر چهار ویروس توسط واکنش RT-PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی هر ویروس و 18S rRNA. M. نشانگر وزنی GeneRuler^{TM}100bp DNA ladder (Fermentas). راهک ۱) ویروس X سیب‌زمینی (PVX) به اندازه ۱۴۵ جفت باز. راهک ۲) ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) به اندازه ۱۶۶ جفت باز. راهک ۳) ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی (PLRV) به اندازه ۲۰۸ جفت باز. راهک ۴) کنترل داخلی (18S rRNA) به اندازه ۲۵۵ جفت باز. راهک ۵) ویروس S سیب‌زمینی (PVS) به اندازه ۳۴۲ جفت باز. محصولات PCR در ژل آگارز ۳ درصد تفکیک شد و ژل و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.



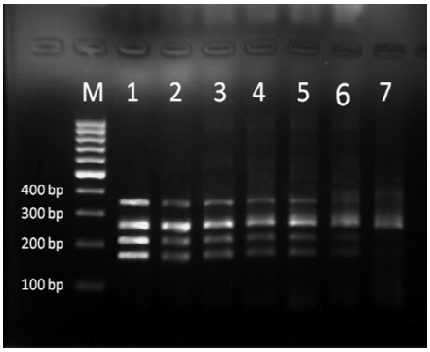
شکل ۲- ردیابی ترکیب‌های مختلف ویروس‌های مورد بررسی و کنترل داخلی توسط روش Multiplex RT-PCR. M . نشانگر وزنی Gene Ruler^{TM} 50bp DNA ladder (Fermentas). راهک ۱) کنترل منفی. راهک ۲) 18S rRNA. راهک ۳) 18S rRNA و ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی. راهک ۴) ویروس S سیب‌زمینی، 18S rRNA، و ویروس Y سیب‌زمینی. راهک ۵) ویروس S سیب‌زمینی، 18S rRNA، ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی و ویروس X سیب‌زمینی. راهک ۶) ویروس S سیب‌زمینی، 18S rRNA، ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی، ویروس Y سیب‌زمینی و ویروس X سیب‌زمینی. محصولات PCR در ژل آگارز ۳ درصد تفکیک شد و ژل و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.



شکل۳- حساسیت روش Duplex RT-PCR در ردیابی رقت‌های مکرر ویروس Y سیب‌زمینی به همراه کنترل داخلی 18S rRNA. M. نشانگر وزنی GeneRuler^{TM}100bp DNA ladder (Fermentas). راهک ۱) کنترل منفی. راهک ۲) رقت 10^{-1}. راهک ۳) رقت 10^{-2}. راهک ۴) رقت 10^{-3}. راهک ۵) رقت 10^{-4}. راهک ۶) رقت 10^{-5}. راهک ۷) رقت 10^{-6}. راهک ۸) رقت 10^{-7}. راهک ۹) رقت 10^{-8}. راهک ۱۰) رقت 10^{-9}. راهک ۱۱) رقت 10^{-10}. محصولات PCR در ژل آگارز ۳ درصد تفکیک شد و ژل و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.3.1]



شکل ۴- حساسیت روش Multiplex RT-PCR در ردیابی رقت‌های مکرر ویروس‌های Y، S و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی به همراه کنترل داخلی. M. نشانگر وزنی GeneRuler^{TM}100bp DNA ladder (Fermentas) راهک ۱) رقت 10^{-1}. راهک ۲) رقت 10^{-2}. راهک ۳) رقت 10^{-3}. راهک ۴) رقت 10^{-4}. راهک ۵) رقت 10^{-5}. راهک ۶) رقت 10^{-6}. راهک ۷) رقت 10^{-7}. محصولات PCR در ژل آگارز ۳ درصد تفکیک شد و ژل و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.

بحث

ردیابی همزمان ویروس‌های X، Y، S و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی همراه با 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی با استفاده از روش Multiplex-RT-PCR با انجام تغییراتی در غلظت $MgCl_2$، آغازگرها، زمان گسترش، تعداد چرخه‌ها و دمای اتصال آغازگرها با موفقیت انجام گرفت. دمای مناسب برای واسرشت سازی در مرحله نسخه برداری معکوس در این تحقیق ۹۴ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. در ابتدا بر اساس پیشنهاد شرکت تولید کننده آنزیم نسخه برداری معکوس (Fermentas, Lithuania) دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد مورد استفاده قرار گرفت که باندهای مورد نظر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر نشدند. به نظر می‌رسد عدم تکثیر DNA به دلیل ناتوانی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در گسستن ساختارهای ثانویه ایجاد شده در RNA باشد. با افزایش دما از ۷۲ به ۹۴ درجه سانتی‌گراد تکثیر باندهای ویروسی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت.

استفاده ازواکنش Multiplex RT-PCR در مقایسه با انجام چند واکنش RT-PCR بطور جداگانه برای ردیابی چند ویروس باعث صرفه جویی در وقت و هزینه می‌شود. این روش به شکل موفقیت آمیزی برای تشخیص ویروس‌ها به کار رفته است (۱۰، ۱۴، ۱۶،۲۰، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۹). در تحقیق حاضر، آغازگرهای اختصاصی ویروس‌ها برای ردیابی آنها استفاده شد. نتایج این تحقیق با نتایج یو و همکاران (۱۵) که از روش Multiplex-RT-PCR برای ردیابی همزمان ویروس‌های Y، X، S، A و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی استفاده نمود، مطابقت داشت.

یکی از عوامل مهم و حساس برای بالا بردن کارآیی سیستم Multiplex-RT-PCR جلوگیری از اتصال آغازگرها به همدیگر است. برای جلوگیری از این پدیده از روش Hot start PCR استفاده شده است (۱۵). به دلیل این که چند جفت آغازگر در یک واکنش به کار می‌روند، باید آغازگرها به گونه‌ای طراحی شوند که کمترین ساختار ثانویه بین آنها تشکیل شود و با یکدیگر کمترین احتمال اتصال را داشته باشند. عامل مهم دیگر در طراحی آغازگرها این است که قطعات کوتاه (۲۰۰-۵۰۰ جفت باز) و با اندازه‌هایی نزدیک بهم تکثیر شوند. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که قطعات کوتاه با کارآیی بالایی تکثیر می‌شوند (۲۴، ۲۷). همچنین محدوده اندازه قطعات از کوچک به بزرگ نباید از ۳۰۰ جفت باز تجاوز کند (۳۲). در تحقیق حاضر آغازگرهایی که برای تکثیر پنج قطعه DNA (ویروس‌ها و کنترل داخلی) مورد استفاده قرار گرفتند قطعاتی را از ۱۴۵ تا ۳۴۲ جفت باز تکثیر کردند.

یو و همکاران (۲۰۰۶) برای ردیابی همزمان ویروس های X، Y، S، A و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی همراه با کنترل داخلی 18S rRNA با استفاده از روش Multiplex-RT-PCR، ویروس‌ها را به طور جداگانه روی گیاه محک هر ویروس تکثیر نمودند. سپس عصاره‌های پنج گیاه محک با هم مخلوط و RNA کل از آن

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.3.1]

استخراج شد. به منظور معرفی این روش برای استفاده درسطح مزرعه، در تحقیق حاضر ردیابی RNA کل گیاه آلوده مستقیماً از گیاهان آلوده مزارع سیب‌زمینی بدون خالص سازی بیولوژیکی ویروس‌ها و با حفظ شرایط آلودگی طبیعی در مزرعه انجام گرفت.

در این تحقیق 18S rRNA، به عنوان کنترل داخلی واکنش RT-PCR استفاده شد. از آنجاییکه که DNAی ریبوزومی فاقد اینترون می‌باشد، طراحی آغازگری برای RNA ریبوزومی که DNA ریبوزومی را با اندازه یکسان تکثیر نکند، امکان پذیر نمی‌باشد (۱۵). بنابراین به هنگامی که از 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی در سیستم ردیابی ویروس‌ها استفاده می‌شود، برای جلوگیری از آلودگی RNA کل استخراج شده rDNA باید از نمونه حذف گردد (۲۱). استخراج RNA کل در این تحقیق با استفاده از بافر استخراج RNX-plus (سیناژن، ایران) صورت گرفت که به استناد شرکت سازنده DNA را حذف می‌کند.

حساسیت روش بهینه‌سازی شده Multiplex RT-PCR با روش متداول DAS-ELISA در ردیابی ویروس‌های Y، S و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی و Duplex RT-PCR در ردیابی ویروس Y سیب‌زمینی مقایسه شد. سیستم Multiplex RT-PCR ویروس‌های Y، S و پیچیدگی برگ سیب‌زمینی را تا رقت 10^{-6} و با حساسیتی در حدود صد برابر آزمون اِلایزا ردیابی کرد. سیستم Duplex RT-PCR ویروس Y سیب‌زمینی را تا رقت 10^{-7} با حساسیتی در حدود هزار برابر آزمون اِلایزا ردیابی کرد. نتایج مطالعات یو و همکاران (۲۰۰۶) برای مقایسه حساسیت ردیابی ویروس X سیب‌زمینی با دو روش Duplex RT-PCR و DAS-ELISA نشان داد، ویریون‌های خالص ویروس X سیب‌زمینی تا رقت 10^{-8} با روش Duplex RT-PCR ردیابی شدند که مشابه نتایج به دست آمده در این تحقیق در مورد ردیابی ویروس Y سیب‌زمینی می‌باشد. در مقایسه حساسیت دو روش Multiplex RT-PCR و Duplex RT-PCR، مشاهده شد که حساسیت روش Duplex RT-PCR بالاتر است، بنابراین با افزایش تعداد توالی‌هایی که در روش Multiplex RT-PCR ردیابی می‌شوند، حساسیت کاهش یافت.

برای تشخیص آلودگی ویروسی توسط روش DAS-ELISA، آلودگی ویروسی با غلظت بالا نیاز است و این روش قادر به ردیابی غلظت‌های خیلی پایین ویروس نمی‌باشد (۱۹). بعلاوه در شرایط غلظت پایین ویروس و اثرات بازدارنده‌ها مثل وجود مواد پلی ساکاریدی و یا ترکیبات فنولیک روش اِلایزا به خوبی قادر به ردیابی ویروس‌ها نمی‌باشد. بارکِر و همکاران در سال ۱۹۹۳ حساسیت دو روش اِلایزا و RT-PCR را در ردیابی ویروس Y سیب‌زمینی از غده‌های انبار شده پس از ۳ و ۲۰ هفته بررسی کردند(۸). روش مولکولی RT-PCR، پس از گذشت ۲۰ هفته از برداشت غده‌ها و با وجود غلظت کم ویروس قادر به ردیابی ویروس بود در حالی که روش سرولوژیکی اِلایزا قادر به ردیابی ویروس در غلظت کم نبود (۸). واروری در سال ۲۰۰۰ آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA و روش (Immunocapture Reverse transcription Polymerase Chain Reaction) IC-RT-PCR را در ردیابی ویریون‌های خالص ویروس Y سیب‌زمینی به کار برد. در این تحقیق روش DAS-ELISA پیکره‌های ویروس با غلظت ۱۰ نانو گرم بر میلی لیتر را ردیابی نمود. روش IC-RT-PCR حساسیتی هزار برابر DAS-ELISA در ردیابی ویروس یاد شده داشت (۳۰). در تحقیقی که برای عاری سازی گیاه داوودی از ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) انجام گرفت، پس از رشد گیاهان به دست آمده ازکشت مریستم، عاری از ویروس بودن این گیاهان توسط آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA و RT-PCR انجام گرفت. نتایج به دست آمده از آزمون اِلایزا نشان داد که ۸۴ درصد گیاهان عاری از ویروس بودند، درحالیکه روش RT-PCR نشان دادکه ۷۲ درصد گیاهان عاری از ویروس شده‌اند. بر این اساس گواهی گیاهان در مورد عاری از ویروس بودن، توسط روش مولکولی RT-PCR بسیار دقیق‌تر و قابل اعتمادتر است (۳۱). همچنین در آزمون اِلایزا امکان اعمال کنترل داخلی برای اجتناب از نتیجه منفی کاذب وجود ندارد (۲۶). تشخیص ویروس‌های سیب‌زمینی در مزارع گیاهان مادری که برای تولید غده‌های بذری استفاده می‌شوند، نیازمند روش دقیق‌تری است، از این رو، روش RT-PCR بسیار مناسب‌تر از اِلایزا می‌باشد. شیوه‌های مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.3.1]

بسیار اختصاصی و سریع هستند و قادر به ردیابی غلظت‌های پایین ویروس می‌باشند (۱۲، ۱۸، ۳۱). در روش Multiplex RT-PCR علاوه بر حساسیت بالا، به دلیل ردیابی همزمان چند ویروس سرعت بسیار بالاتر و هزینه بسیار کمتر امکان بررسی حجم بالایی نمونه را در کارهای تحقیقاتی و کنترل و گواهی بذر امکان پذیر می‌سازد.

نتایج این تحقیق نشان داد که روش بهینه‌سازی شده Multiplex RT-PCR همراه با استفاده از کنترل داخلی 18S rRNA روشی حساس، دقیق، سریع و قابل اعتماد در ردیابی همزمان ویروس‌های مهم سیب‌زمینی در مزارع تولید غده بذری می‌باشد و مراکز کنترل و گواهی بذر می‌توانند به طور مؤثری از آن استفاده کنند.

منابع

۱. خاک ور ر، شمس بخش م، پوررحیم ر.(۱۳۸۴) وضعیت شش ویروس مهم بیماریزا در مزارع سیب‌زمینی استان خوزستان، مجله آفات و بیماری های گیاهی ، (۷۳) ۳۶-۲۵ .

۲. رمضانی ج، معصومی ح، حسینی پور ر، شعبانیان م (۱۳۸۳) ویروس های سیب‌زمینی در استان کرمان . شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ص ۲۳۲

۳. فروتنی س، جعفرپور ب، فلاح رستگار م، بیک زاده ن. (۱۳۸۳) شناسایی گروه های نژادی ۱ و ۳ ویروس X سیب‌زمینی در استان خراسان و شهرستان اردبیل. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ص ۲۲۲ .

۴. طوسی ن، آهون منش ع، پوررحیم ر، بهار م. (۱۳۸۳) شناسایی نژادهای C و N ویروس Y سیب‌زمینی با استفاده از RT-PCR و RFLP. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ص ۲۲۴ .

۵. – مقصودی ر، جعفر پور ب، فلاح رستگار م. (۱۳۸۳) وقوع نژاد N ویروس وای سیب‌زمینی(PVYN) در استان خراسان و نژاد O این ویروس (PVYO) در استان‌های خراسان ، گیلان و مازندران. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ص ۲۲۳ .

6. Anonymous. (2007) FAO Home page in internet. Available on the: http://www.FAO.org.

7. Anonymous. (2004) Statistical survey of potato in 204-6. Available on the: http://dbagri.agri-jahad.org.

8. Barker H., Webster K. D. and Reavy B. (1993) Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. Potato Res. 36: 13-20.

9. Beemster A. B. R. and de Bokx J. A. (1987) Survey of properties and symptoms. Pages. 84-112 in : Viruses of potatoes and seed-potato production . J.A. de Bokx and J. P. H. van der Want, eds. Pudoc, Wageningen, the Netherlands. 259pp.

10. Bertolini E., Olmos A., Martinez M. C., Gorris M. T. and Cambra M. (2001) Single-step Multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. J. Virol. Methods. 96: 33 – 41.

11. Boonham N., Tomlinson J. and Mumford R. (2007) Microarrays for rapid identification of plant viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 45: 307–28.

12. Candresse T., Cambra M. Dallot S., Lanneau M., Asensio M., Gorris M. T., Revers F., Macquaire G., Olmos A., Boscia D., Quiot J. B., and Dunez J. (1998) Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of Plum pox potyvirus. Phytopathology. 88: 198-204.

13. Clark M. F. and Adams A. N. (1977) Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-83.

14. Corne J. M., Green S., Sanderson G., Caul E. O., and Johnston S. L. (1999) A multiplex RT-PCR for the detection of parainfluenza viruses 1-3 in clinical samples. J. Virol. Methods. 82: 9-18.

15. Du Z., Chen J., and Hiruki C. (2006) Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. Plant Dis. 90: 185-189.

16. Hauser S., Weber C., Vetter G., Stevens M., Beuve M. and Lemaire O. (2000) Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. J. Virol. Methods. 89: 11-21.

17. Hull R. (2002) Matthew's plant virology. 4th ed. Academic press. 1001 pp.

18. Matthews D. M., Riley K., and Dodds J. A. (1997) Comparison of detection methods for citrus tristeza virus in field trees during months of nonoptimal titer. Plant Dis. 81:525-529.

19. Menzel W., Zahn V. and Maiss E. (2003) Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. J. Virol. Methods. 110: 153-157.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.3.1]

with colourimetric detection for viruses of banana. J. Virol. Methods. 89: 75–88.

27. Singh R. P. and Singh M. (1998) Specific detection of potato virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. Plant Dis. 82: 230 – 234.

28. Slazar L. F. (1996) Potato viruses and their control. CIP. Peru. 214 pp.

29. Thompson J. R., Wetzel S., Klerbs M. M., Vaskova D., Schoen C. D., Spak J. and Jelkmann W. (2003) Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in Fragaria spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. J. Virol. Methods. 111: 85 – 93.

30. Varveri C. (2000) Potato Y potyvirus detection by immunological and molecular techniques in plants and aphids. Phytoparasitica. 28(2): 141-148.

31. Verma N., Ram R., Hallan V., Kumar K. and Zaidi A. A. (2004) Production of Cucumber mosaic virus-free chrysanthemums by meristem tip culture. Crop Protec. 23: 469–473.

32. Zangenberg G., Saiki R. K., and Reynolds R. (1999) Multiplex PCR: Optimization Guidelines. In: PCR Application: Protocols for Functional Genomics. M. A. Innis D. H. Gelfand and J. J. Sninsky eds. Academic Press, San Diego. 566pp.

20. Menzel W., Jelkmann W., and Maiss E. (2002) Detection of four apple viruses by Multiplex-RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. J. Virol. Methods. 99: 81-92.

21. Nassuth A., Pollari E., Helmeczy K., Stewart S. and Kofalvi S. A. (2000) Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. J. Virol. Methods. 90: 37-49.

22. Nie X. and Singh R. P. (2002) A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. J. Virol. Methods. 104: 41-54.

23. Nie X. and Singh R. P. (2000) Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common DNA primer in Multiplex-RT-PCR. J. Virol. Methods. 86: 179-185.

24. Nie X. and Singh R. P. (2001) A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. J. Virol. Methods. 91: 37-49.

25. Pourrahim R. and Farzadfar SH. (2007) Incidence and distribution of important viral pathogens in some Iranian potato fields. Plant Dis. 91: 609-615.

26. Sharman M., Thomas J. E. and Dietzgen R. G. (2000) Development of a multiplex immunocapture PCR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.3.1]