# ردیابی همزمان تعدادی از عوامل بیماری زای ویروسی و ویروئیدی در برنامه های گواهی نهال در کشور با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه

**مسعود نادرپور*[۱]، لیلا صادقی [۲]، راحله شهبازی[۳]**

۱-استادیار ، معاونت تحقیقات و فناوری بذر و نهال، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج. ۲- کارشناس ارشد، معاونت شناسایی و ثبت ارقام گیاهی، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج. ۳- کارشناس ارشد، معاونت تحقیقات و فناوری بذر و نهال، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج.

*نویسنده مسئول: m.naderpour@spcri.ir

## چکیده

روش های مولکولی مبتنی بر RT-PCR علیرغم داشتن برخی معایب اجتناب ناپذیر ولی قابل رفع، به دلیل حساسیت بالا در ردیابی عوامل بیماری زای گیاهی بویژه ویروس ها و ویروئیدها کماکان به عنوان یکی از پرطرفدارترین روش ها در برنامه های گواهی نهال مورد استفاده قرار می گیرند. هزینه نسبتا بالای این روش ها، تعداد زیاد نمونه ها در واحد زمان، زمان محدود برای گواهی از نظر آلودگی به چندین عامل بیماری و لزوم کنترل همزمان درستی آزمون، باعث شده تا روش های مبتنی بر RT-PCR چندگانه برای رفع این موانع توسعه داده شوند. در این مطالعه، این روش ها برای عوامل بیماری زای مهم مرکبات (ویروس های عامل بیماری های تریستزا و کاچکسیا) و زیتون (ویروس های موزائیک خیار، موزائیک اربیس و پیچیدگی برگ گیلاس) همراه با تکثیر ژن کنترل داخلی (*Nad5*) برای برنامه های گواهی نهال مرکبات و زیتون بهینه سازی شد.

**کلمات کلیدی**: گواهی نهال، ویروس و ویروئید، Multiplex RT-PCR

## مقدمه

در میان روش های مختلف ردیابی آلودگی های ویروسی و ویروئیدی در مواد تکثیری درختان باغی (سرولوژیک، بیولوژیک و مولکولی مبتنی بر اسید نوکلئیک)، روش مولکولی مبتنی برRNA به دلایل زیادی از جمله بالا بودن دقت، سرعت، حساسیت، تکرار پذیری و امکان کنترل مراحل چندگانه واکنش ها همواره به عنوان روش های متداول در برنامه های کنترل و گواهی نهال مورد استفاده قرار گرفته اند (Bernard & Duran-Vila, 2006; Faggioli et al., 2005; Garnsey et al., 2002). هر چند که روش های سرولوژیک و بویژه بیولوژیک در ترکیب با این روش ها، آزمون هایی مهم و مناسب برای ردیابی آلودگی ها در تعداد محدود نمونه ها در طبقات بالای نهال (هسته های اولیه، پیش تکثیر و باغات مادری) محسوب می شوند، ولی تعداد زیاد و غیر قابل مقایسه نمونه ها در نهالستانها در سطح یک کشور، باعث شده تا برای گواهی نهال بویژه روش های بیولوژیک به دلیل طولانی مدت بودن زمان آزمونها (ماهها تا چندین سال) چندان قابل استفاده نبوده (Calavan, 1968; Malfitano et al., 2005; Albanese et al., 2012) و نیاز به روش های سریعتر مانند روش های مولکولی مبتنی بر اسید نوکلئیک بیشتر شود. با توجه به استانداردهای ملی/منطقه ای و بین المللی ممکن است ردیابی تعداد زیادی عامل بیماری در نمونه (ها) وجود داشته باشد. از طرف دیگر، هزینه نسبتا بالای این روش ها با عث می شود تا اقشار خاصی از جامعه کشاورزی با درآمدهای بالا توان پرداخت هزینه ها را داشته باشند. جلوگیری از نتایج دروغین مثبت/منفی و نیز کنترل مراحل مختلف واکنش ها بویژه واکنش های مبتنی برRNA نیز مزید بر علت می باشد. امروزه آزمون های مبتنی بر واکنش زنجیره ای چندگانه برای برآوردن نیاز های فوق الذکر به فراوانی در برنامه های کنترل و گواهی نهال مورد استفاده قرار می گیرند (Almeyda-Leon et al., 2007; Ito et al., 2002; Hassan et al., 2006; Grieco et al., 2000; Menzel et al., 2002, Sanchez_Navarro et al., 2005; Bernard & Duran-Vila, 2006; Grieco et al., 2000). این نوع واکنش های چندگانه امکان ردیابی چندین عامل بیماری را در یک واکنش فراهم نموده و بنابراین به تعداد عوامل بهینه سازی شده در یک واکنش، هزینه ها نیز با همان تصاعد کاهش پیدا میکنند. بعلاوه، بهینه سازی تکثیر

قطعه ای از ژنوم میزبان به عنوان کنترل داخلی به همراه عوامل بیماری زا، امکان کنترل مراحل مختلف واکنش را در هنگام تکثیر قطعات ژنومی عوامل بیماری زا فرا هم می آورد (Menzel et al., 2002; Sanchez-Navarro et al., 2005; Naderpour et al., 2013, 2014, 2015a, b). به دلایل اشاره شده، برای بررسی همزمان عوامل ویروسی مندرج در استانداردهای ملی سلامت زیتون *Arabis mosaic Nepo virus* (ArMV), *Cherry leafroll Nepovirus* (CLRV), *Cucumber mosaic Cucumovirus* (CMV) و دو بیماری ویروسی و ویروئیدی فوق العاده مهم در گواهی مرکبات (*Citrus tristeza Closterovirus* (CTV) و *Hop stunt viroid* (HSVd)) در تحقیق حاضر بهینه سازی شد.

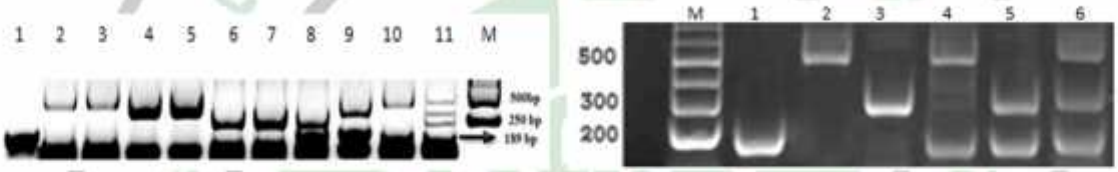
## مواد و روش‌ها

نمونه های آلوده به ویروس های CTV، ArMV، CMV و CLRV از باغات آلوده مرکبات، زیتون، دانه داران و هسته داران نواحی مختلف کشور جمع آوری گردید. آلودگی نمونه ها به ویروس های مورد نظر با استفاده از آزمون سرولوژیکی الایزا و آنتی بادی های تهیه شده از شرکت های Agdia وBioreba ،آمریکا و سوئیس (به ترتیب) بر اساس پروتکل های توصیه شده بررسی شد. استخراج RNA ژنومی کل نمونه ها با استفاده از کیت استخراج RNA (Gene All, South Korea) انجام شد. تهیه CDNA ویروس ها با استفاده از آنزیم M-MuLV (Sina gene, Iran) و آغازگر هگزامر تصادفی در دمای ۴۲ °C و در ویروئید HSVd با استفاده از آغازگر اختصاصی معکوس (Bernard & Duran-Vila, 2006) و آنزیم Reverse Transcriptase H⁻ (Thermo Scientific, USA) در دمای ۵۵ °C انجام و واکنش های زنجیره ای پلیمراز (PCR) یک گانه، دو گانه و چند گانه برای ویروس ها و ویروئید فوق و نیز ژن کنترل داخلی (*Nad5*) با استفاده از آغازگر های توصیه شده در منابع علمی یا طراحی شده توسط نگارندگان (Naderpour et al., 2013, 2014, 2015a, b) انجام شد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شده و در زیر نور UV بررسی شد. به منظور بررسی بیشتر صحت واکنشهای RT-PCR، قطعات ژنومی تکثیر شده پس از جداسازی از ژل و خالص سازی با استفاده از کیت مربوط شرکت Vivantis (South Korea) به طور مستقیم یا پس از همسانه سازی در ناقل PTZ9 (Sina Gene, Iran) ، در شرکت Macrogene (South Korea) توالی یابی شدند.

## نتایج و بحث

آزمون های سرولوژیکی مبتنی بر الایزا با آنتی بادی های اختصاصی ویروس های CTV، ArMV، CMV و CLRV ، آلودگی نمونه ها را به ویروس های مذکور تایید نمود. با توجه به چالش های موجود در ردیابی ویروس های دارای ژنوم RNA و نیز ویروئیدها، لزوم کنترل مراحل مختلف واکنش های RT-PCR (استخراج RNA، تهیه cDNA و واکنش نهایی PCR) با تکثیر cDNA مربوط به RNA حداقل یکی از ژن های اندمیک گیاه ضروری می باشد (Menzel et al., 2002; Sanchez-Navarro et al., 2005; Naderpour et al., 2013, 2014, 2015a, b). این مهم بویژه در RNA استخراج شده از برخی از گیاهان از جمله دانه داران، هسته داران و مرکبات به دلیل حضور بالای پلی ساکاریدها و پلی فنولیک ها و در همه گیاهان به دلیل حضور ریبونوکلئازهای اندمیک بسیار ضروری است (Gibb and Padovan, 1994; Singh et al., 2002). در تحقیق حاضر ابتدا تکثیر موفق قطعات ژنومی مربوط به ژن های پوشش پروتئینی ویروس های ArMV (427 bp) ، CTV (504 bp) و CLRV (331 bp) ، ژن 2a ویروس CMV (513 bp) و کل ژنوم ویروئید HSVd (174 bp) با آغازگر های مربوط انجام شد (شکل های۱ الف و ب). ترادف ژنومی قطعات مذکور تعلق آنها را به نواحی ژنومی مرتبط از ویروس های فوق الذکر به اثبات رسانده و همخوانی یافته ها را با ترادف های ژنومی مورد استفاده در طراحی آغازگرها (ArMV, CLRV) و نیز با نتایج محققین دیگر (Bernard & Duran-Vila, 2006, Grieco et al., 2000; Menzel et al., 2002; Sanchez-Navarro et al., 2005) به اثبات رساند. در واکنش های RT-PCR دوگانه و چندگانه، دماهای اتصال برای آغازگرهای اختصاصی CTV، HSVd و *Nad5* به ترتیب ۵۸، ۶۰ و ۶۲ درجه سلسیوس بود که با کمی تغییرات در عناصر شیمیایی و بیوشیمیایی واکنش، قطعات ژنومی مربوطه به طور موفقیت آمیزی با هم در یک واکنش تکثیر شدند (شکل ۱ الف). در مورد ویروس های زیتون، علیرغم دماهای بهینه ۶۲ °C (برای تکثیر قطعات ژنومی

ویروس های ArMV و CLRV و ژن کنترل داخلی (*Nad5*) و $57\ ^{\circ}C$ (برای ویروس CMV)، با کمی تغییرات در مخلوط واکنش، تکثیر قطعات ژنومی ویروس های مذکور و کنترل داخلی در دمای $60\ ^{\circ}C$ بهینه سازی شد (شکل ۱ ب). کارآیی واکنش های RT-PCR چندگانه در این تحقیق، به طور موفقیت آمیزی برای برنامه های گواهی نهال های مرکبات و زیتون کشور در موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال مورد استفاده قرار گرفته است. واکنش های RT-PCR چندگانه قبلا در تحقیقات سایر محققین برای گروههای مختلف عوامل بیماری زا در زیتون (Grieco et al., 2000; Faggioli et al., 2005) ، مرکبات (Almeyda-Leon et al., 2007; Ito et al., 2002)، دانه داران (Hassan et al., 2006) و هسته دارن (Sanchez-Navarro et al., 2005) مورد استفاده قرار گرفته است، اما واکنش های توسعه داده شده در تحقیق حاضر که نتیجه چندین پروژه تحقیقاتی (Naderpour et al., 2013; 2014; 2015a; 2015b) می باشد، از جنبه های مختلف از گزارشات فوق بارزتر می باشد: ردیابی همزمان ویروس CTV و ویروئید HSVd در برنامه های گواهی نهال مرکبات انجام نشده و از طرف دیگر استفاده از تکثیر قطعه ژنومی کوچک مربوط به ژن کنترل داخلی (*Nad5*) به طور همزمان در برنامه های ردیابی عوامل بیماری زای مرکبات و زیتون گزارش نشده است. مضافا اینکه آغازگر های جدید طراحی شده در این تحقیق برای ویروس های ArMV و CLRV در نوع خود بی نظیر و یونیورسال بوده و برای ردیابی طیف وسیعی از ایزوله های این ویروس ها در دانه داران، هسته داران و زیتون به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است (Naderpour et al., 2013; 2014; 2015a; 2015b).




(ب) (الف)

شکل ۱: توسعه واکنش های RT-PCR یک گانه، دو گانه و چندگانه برای برنامه های کنترل و گواهی نهال در مرکبات (الف) و زیتون (ب). در شکل الف شماره های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب تکثیر قطعات ژنومی مربوط به ژن کنترل داخلی (*Nad5*)، ویروس CTV و ویروئید HSVd، شماره ۴ و ۵ به ترتیب تکثیر همزمان قطعات ژنومی ویروس CTV و ویروئید HSVd به همراه قطعه ژنومی مربوط به ژن کنترل داخلی (*Nad5*) و شماره ۶ تکثیر همزمان سه قطعه را نشان می دهد. در شکل (ب) شماره های ۱، ۲ و ۳، ۴ و ۵، ۶ و ۷ به ترتیب تکثیر قطعات ژنومی مربوط به ژن کنترل داخلی، ویروس های CMV، ArMV و CLRV، در شکل های ۸، ۹ و ۱۰ تکثیر قطات ژنومی این ویروس ها به همراه کنترل داخلی و در شماره ۱۱ تکثیر همزمان هر چهار فاکتور نشان داده شده است. M نشانگر مولکولی kb 1 بوده و نتایج روی ژل آگارز ۱/۵٪ نشان داده شده اند.

## منابع


1. Albanese, G., Saponari, M., Faggioli, F. 2012. Phytosanitary Certification. p.107-128. In: Olive Germplasm-The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy. Rijeka, Croatia: InTech Press.
2. Almeyda-Leon, I. H., Rocha-Pena, M. A., Iracheta-Cardenas, M. M., Orona-Castro, F., and Kahlke, C. J. 2007. A simple method for the multiple detection of citrus viroids. Agrociencia. 41: 87-93.
3. Calavan, E. C. 1968. Exocortis: Indexing procedures for 15 citrus diseases. Agricultura Handbook no. 33. ARS, USDA, p. 23-34.
4. Faggiloi, F., Ferretti, L., Albanese, G., Sciarroni, R., Pasquini, G., Lumia, V., and Barba, M. 2005. Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. Journal of Plant Pathology. 87: 49-55.
5. Garnsey, S. M., Zies, D. L., Irey, M., Sieburth, P. J., Semancik, J. S., Levy, L., and Hilf, M. E. 2002. Practical field detection of citrus viroids in Florida by RT-PCR. 15th IOCV Conference. 219-229.
6. Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V., Martelli, G. P. 2000. Molecular detection of olive viruses. EPPO Bulletin. 30: 469-473.
7. Hassan, M., Myrta, A., and Polak, J. 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. Journal of Virological Methods. 133: 124-129.

8. Ito, T., Ieki, H., and Ozaki, K. 2002. Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods. 106: 235-239.
9. Malfitano, M., Barone, M., Duran-Vila, N., and Alioto, D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania, southern Italy. Journal of Plant Pathology. 87: 115-121.
10. Menzel, W., Jelkmann, W., and Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of planty mRNA as internal control. Journal of Virological Methods. 99: 81-92.
11. Naderpour, M., and Shahbazi, R. 2015a. Investigation of pome fruit orchards in Western Azarbaijan and Khorasan Razavi provinces to introduce healthier orchards for stone fruit propagation industries. Final Report, Center for Agriculture Information and Scientific Documentation, Areo, Ministry of Agriculture, Iran, no. 47282, pp. 69.
12. Naderpour,M., and Sadeghi, L. 2015b. Investigation of stone fruit orchards in Western Azarbaijan and Khorasan Razavi provinces to introduce healthier orchards for stone fruit propagation industries. Final Report, Center for Agriculture Information and Scientific Documentation, Areo, Ministry of Agriculture, Iran, no. 47168, pp. 69.
13. Naderpour, M., Shahbazi, R., and Kavand, A. 2014. Investigation of health status of olive saplings of Giahe Salem Company concerning on viral diseases in regard to olive national health standards. Final Report, Center for Agriculture Information and Scientific Documentation, Areo, Ministry of Agriculture, Iran, no. 45669, pp. 54.
14. Naderpour, M., and Shabazi, R. 2013. Investigation of health status of quince genotypes of Fajr Esfahan Company in regard to virus infection on the basis of national health standards. Final Report, Center for Agriculture Information and Scientific Documentation, Areo, Ministry of Agriculture, Iran, 45671, pp. 46.
15. Sanchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., Herranz, M. C., Minafra, A., Myrta, A., and Pallas, V. 2005. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. European Journal of Plant Pathology. 111: 77-84.
16. Singh, R. P., Nie, X., Singh, M., Coffin, R., and Duplessis, P. 2002. Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. Journal of Virological Methods. 99: 123-131.
17. Gibb, K., and Padovan, 1994. A. A DNA extraction method that allows reliable PCR amplification of MLO DNA from difficult plant host species. PCR Methods and Applications. 4: 56-58.

## Application of multiplex RT-PCR assays for simultaneous detection of virus and viroid agents in certification schemes of plant propagating materials

**M. Naderpour[1*], L. Sadeghi[2], R. Shahbazi[3]**

1-Assistant professor of molecular plant virology, Seed and Plant Research and Technology Deputy, Seed and Plant Certification Research Institute, Agricultural Research, Extension and Education Organization, Karaj. 2-M. Sc. of plant pathology, Plant Variety Registration Deputy, Seed and Plant Certification Research Institute, Agricultural Research, Extension and Education Organization, Karaj. 3- M. Sc. of agricultural entomology, Seed and Plant Research and Technology Deputy, Seed and Plant Certification Research Institute, Agricultural Research, Extension and Education Organization, Karaj

*Corresponding author: m.naderpour@spcri.ir

### Abstract

In spite of several inevitable but circumventable disadvantages, simplex RT-PCRs as reliable assays are commonly used in certification schemes for molecular detection of plant pathogens including viruses and viroids. Multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant internal control have been developed and used widely in certification schemes due to the following constraints: 1) relatively high costs of simplex assays, 2) necessities for testing high numbers of samples in limited time, 3) presence of several pathogens in national/international health standards and more importantly, 4) evaluation of the accuracy of the assay. In the present study, two multiplex RT-PCR assays for certification purposes of citrus and olive saplings for simultaneous detection of (tristeza and chachexia causal agents) and (*Arabis mosaic*-, *Cucumber mosaic*- and *Cherry leafroll- virus*), respectively, together with amplification of a plant internal gene (*Nad*5) for certification purposes.

**Key words**: Key Words: Plant Certification, Virus, Viroid, Multiplex RT-PCR