

## شناسایی و ردیابی جدایه‌های ایرانی ویروس برگ بادبزنی مو با استفاده از پیوند سبز و آرتی-پی‌سی‌آر\*

### IDENTIFICATION AND DETECTION OF IRANIAN ISOLATES OF *Grapevine fanleaf virus* USING GREEN-GRAFTING AND RT-PCR

شاهین نوری‌نژاد زرقانی<sup>۱</sup>، مسعود شمس بخش<sup>۱\*</sup>، نعمت سخندان بشیر<sup>۲</sup> و مقصود پژوهنده<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳۱)

#### چکیده

ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus (GFLV)*) از مخرب‌ترین ویروس‌های مو در سراسر جهان می‌باشد. بهترین روش کنترل خسارت این ویروس جلوگیری از انتشار قلمه‌های آلوده و نیز استفاده از اندام تکثیری عاری از ویروس برای احداث تاکستان‌های جدید می‌باشد، بنابراین ردیابی دقیق این ویروس از اهمیت بالایی در کنترل آن برخوردار است. به منظور معرفی یک روش حساس در ارزیابی پایه‌های مادری، طی سال ۱۳۸۷ از گیاهان موی تاکستان‌های مناطق مختلف کشور نمونه‌برداری انجام و آلودگی آنها به GFLV با استفاده از DAS-ELISA بررسی شد. سپس آلودگی ۱۴ نمونه الیزا مثبت با استفاده از آرتی-پی‌سی‌آر و با به‌کارگیری آغازگرهای موجود در منابع و طراحی شده در این پژوهش بررسی شد. نتایج نشان داد که اکثر آغازگرهای موجود در منابع قادر به ردیابی در تمامی نمونه‌های بررسی شده نبودند. درحالی‌که آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش ویروس را در همه نمونه‌ها ردیابی کردند. کارایی آغازگرهای طراحی شده روی ۳۵ نمونه الیزا مثبت جمع‌آوری شده از سایر استان‌ها در سال بعد (۱۳۸۸) بررسی و تأیید شد. هم‌چنین در این پژوهش برای اولین بار روش پیوند سبز برای بررسی آلودگی به GFLV انجام و آلودگی ویروسی را تأیید کرد. نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب پیوند سبز و آرتی-پی‌سی‌آر با آغازگرهای معرفی شده در این بررسی روشی دقیق برای ردیابی GFLV است.

واژه‌های کلیدی: کنترل، الیزا، طراحی آغازگر

\*: بخشی از رساله دکتری نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

\*\* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق دکتری و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران  
۲. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز  
۳. استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آذربایجان، تبریز

## مقدمه

جدایه‌ها در اثر تنوع ژنومی ویروس، گاه با اشکال مواجه بوده است (Martelli & Savino 1988, Rowhani et al. 1993). در حال حاضر روش‌های متعددی برای استخراج موفق و با کیفیت بالای آران‌ای از مو بهینه‌سازی شده است (Rowhani et al. 1993, Buzkan & Walker 2004, Daldoul et al. 2009, Osman et al. 2011). به دلیل اهمیت این ویروس در مناطق کشت مو لزوم ردیابی دقیق آن بهینه‌سازی روش آر تی- پی سی آر برای ردیابی جدایه‌های آمریکایی ویروس (Rowhani et al. 1993)، آر تی- پی سی آر کمی (Cepin et al. 2010) و استفاده از ریزآرایه‌ها (Osman et al. 2011) انجام گرفته است. از آنجایی که ردیابی GFLV حتی در نمونه‌های الیزا مثبت از طریق آر تی- پی سی آر در برخی جدایه‌های ایرانی به ویژه جدایه‌های آذربایجان شرقی با مشکل مواجه است (Bashir et al. 2011) و از طرف دیگر ردیابی کمترین میزان آلودگی ویروسی در گیاهان مادری و اندام‌های تکثیری به منظور جلوگیری از انتشار آنها و احداث باغ‌های جدید امری اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف ارزیابی روشی مناسب برای نمونه‌سازی (Indexing) و معرفی آغازگرهایی با کارایی بالا برای ردیابی جدایه‌های مختلف این ویروس توسط آر تی- پی سی آر در تاکستان‌های آلوده ایران انجام شد.

## روش بررسی

## ۱- جمع‌آوری جدایه‌های ویروس

نمونه‌های مشکوک به آلودگی طی دو سال متوالی در اواسط بهار و طی تابستان سال ۱۳۸۷ از تاکستان‌های بناب، حومه تبریز و روستای شیر امین و طی بهار و تابستان سال ۱۳۸۸ از تاکستان‌های واقع در حسین آباد زهرا (استان

ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) متعلق به جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* (Sanfaçon et al. 2009) در اغلب مناطق کشت مو (*Vitis vinifera*)، به‌عنوان یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های مو مطرح است (Raski et al. 1983, Martelli & Savino 1988). ژنوم این ویروس از دو قطعه آران‌ای خطی تک‌لا (RNA1 و RNA2) با قطبیت مثبت (+ssRNA) تشکیل شده که هرکدام در انتهای ۳' و ۵' خود به ترتیب دارای دنباله پلی آدنوزینی (poly A) و وی پی جی (virus- protein-genome linked, VPg) می‌باشند. در میانگریزسازی در شیب چگالی، ویروس دارای سه لایه می‌باشد؛ لایه سنگین حاوی پیکره‌های دارای هر دو مولکول آران‌ای، لایه میانی حاوی پیکره‌های دارای آران‌ای شماره ۲ و سبک‌ترین لایه دارای پیکره‌های بدون آران‌ای می‌باشد (King et al. 2011).

برای شناسایی ویروس‌های مو اغلب از آزمون الیزا استفاده می‌شود اما به دلیل غلظت کم ویروس برگ‌باد بزنی مو در گیاهان آلوده طی ماه‌های گرم سال (به‌ویژه در تابستان) الیزا حساسیت کافی برای ردیابی ویروس را ندارد (Martelli 1993). هم‌چنین عدم پراکنش یکسان ویروس در بخش‌های مختلف گیاه و نیز آلودگی پنهان در وارسته‌های متحمل یا در سویه‌های ملایم ویروس (Hewitt et al. 1962) ردیابی این ویروس در تمامی فصل رویشی با مشکل مواجه می‌شود (Walter & Etienne 1987, Buzkan & Walker 2004). از اینرو روش‌های مبتنی بر ژنوم برای شناسایی و ردیابی این ویروس به کار گرفته می‌شود. ردیابی ویروس از طریق آر تی- پی سی آر نیز به دلیل وجود مواد بازدارنده و عدم انطباق ترادف آغازگرها با توالی ژنوم ویروس در برخی

ng ۱۰۰-۵۰ از آر‌ان‌ای کل استخراج شده با آغازگرهای پیش سو و پس سو در غلظت‌های پیشنهادی و دستورالعمل شرکت سازنده مخلوط و انجام شد. در روش دوم ۵۰۰ ng از آر‌ان‌ای کل با یکی از آغازگرهای Oligo d(T)<sub>16</sub>، Random Hexamer Primer و یا از آغازگرهای اختصاصی پس سو (جدول ۱) مخلوط و برای مرحله سنتز cDNA طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده به کار برده شد. ۲/۵ میکرولیتر از محصول این واکنش به عنوان الگو در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس مورد استفاده قرار گرفت. از دو جفت آغازگر Actin 7/actin 2 و GAPDH (m)F/GAPDH (m)R (برای تکثیر ژن‌های خانه‌داری Actin و Glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase) طی دو روش اشاره شده برای آر‌تی-پی‌سی‌آر با هدف کنترل صحت مراحل انجام واکنش‌ها استفاده شد. از آر‌ان‌ای کل استخراجی به عنوان الگو در واکنش‌های آر‌تی-پی‌سی‌آر استفاده شد. ترادف آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش براساس ترادف آر‌ان‌ای شماره ۲ جدایه‌های ایرانی ویروس برگ بادبزی مو (رس شماره‌های JQ071374 تا JQ071377) سنتز شدند. تجزیه و تحلیل آغازگرها نیز توسط نرم‌افزار Oligo نسخه 7.24 انجام شد.

برای هر جفت آغازگر شیب دمایی به فواصل ۲ درجه‌ای از ۱۰- تا ۱۰+ درجه سلسیوس از دمای اتصال آغازگرها و مدت زمان مرحله ساخت براساس ۱ دقیقه به‌ازای هر ۱۰۰۰ bp محاسبه شد. در صورت لزوم، روش‌های مختلف پی‌سی‌آر مانند touchdown و hot start و نیز در مرحله پی‌سی‌آر از دو چرخه دمایی مختلف استفاده شد، بدین ترتیب که در ۵ چرخه اول از دمای ۴۰°C و در ۳۰ چرخه بعدی از شیب دمایی

قزوین)، ارومیه، زنجان، حومه تهران و لاهرود (استان اردبیل) براساس علایم توصیف شده توسط مارتلی و ساوینو (Martelli & Savino 1988) جمع‌آوری شدند.

## ۲- ردیابی GFLV در نمونه‌های مشکوک

برای ردیابی GFLV در نمونه‌های مشکوک، آزمون سرولوژیکی به روش داس-الیزا (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) و با استفاده از کیت تشخیص اختصاصی GFLV تهیه شده توسط شرکت بیوربیا (BIOREBA, Switzerland) انجام شد. برای بررسی نتایج آزمون الیزا، بعد از افزودن ماده زمینه‌ای ۴-نیتروفیل فسفات، هر ۱۵ دقیقه یکبار به مدت یک ساعت میزان تغییر رنگ چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ nm و با استفاده از دستگاه الیزا خوان (ELISA plate reader) اندازه‌گیری شد. چاهک‌هایی که میانگین جذب نوری آنها بیش از دو برابر میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل منفی (گیاه عاری از آلودگی) بود، مثبت تلقی شدند (Dijkstra & de Jager 1998).

## ۳- استخراج آر‌ان‌ای کل، آر‌تی-پی‌سی‌آر و تعیین ترادف نوکلئوتیدی

استخراج آر‌ان‌ای کل (total RNA) از نمونه‌ها مطابق روش مک کنزی و همکاران (MacKenzie et al. 1997) انجام شد. آر‌تی-پی‌سی‌آر به دو روش تک مرحله‌ای با استفاده از SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (Invitrogen, Germany) و دو مرحله‌ای (شامل یک مرحله سنتز cDNA و مرحله دیگر انجام پی‌سی‌آر) با استفاده از RevertAid™ Reverse Transcriptase (Fermentas, Lithuania) انجام شد. در روش اول





متصل و محل پیوند با پارافیلیم پوشانیده شد. شاخه‌های پیوندی به شیشه‌هایی به قطر ۱۰ cm حاوی پرلیت انتقال داده شدند. این گیاهان در اتاقک رشد در دمای  $18 \pm 0.5$  درجه سلسیوس، تناوب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت اشباع نگهداری شدند. آبیاری پیوندک‌ها با محلول غذایی Huglin and Julliard medium توصیف شده توسط مارتلی و همکاران (Martelli et al. 1993) و به صورت سه روز در میان انجام شد. بررسی علایم در برگ مربوط به پایه (رقم قره داش) تا سه هفته پس از پیوند بررسی شد.

## نتایج

### ۱- الیزا

ارزیابی ۵۶ نمونه جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۷ توسط آزمون الیزا حاکی از آلودگی ۲۷ نمونه به GFLV بود. از این میان ۱۴ نمونه به طور تصادفی برای مقایسه کارایی آغازگرهای موجود در منابع و طراحی شده در این پژوهش در آزمون آر تی- پی سی آر انتخاب شدند. از ۱۲۶ نمونه جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۸ در مجموع ۵۸ نمونه آلوده به GFLV تشخیص داده شدند که ۳۵ نمونه از ۵۸ نمونه به تصادف انتخاب و برای ارزیابی کارایی آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند.

### ۲- واکنش آر تی- پی سی آر

واکنش‌های آر تی- پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های Actin و 3- Glycerinaldehyde phosphatedehydrogenase منجر به تکثیر قطعه‌های مورد انتظار به ترتیب به اندازه ۲۰۰bp و ۱۰۰ bp شدند. نتایج واکنش‌های آر تی- پی سی آر با آغازگرهای معرفی شده در منابع در جدول ۲ آورده شده است. از بین جفت

$48-54^{\circ}\text{C}$  به عنوان دمای اتصال استفاده شد. برای بهتر شدن واکنش‌های آر تی- پی سی آر دو مرحله‌ای یکی از ترکیبات ۵٪ DMSO، ۲٪ بتا مرکاپتواتانول یا غلظت یک مولار KCl استفاده شد (McPherson & Møller 2006). محصولات آر تی- پی سی آر مطابق معمول در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز و پس از خالص‌سازی از ژل با استفاده از کیت NucleoSpin® Extract II (شرکت MN، آلمان)، برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی به یکی از شرکت‌های Macrogen (کره جنوبی) و 4Base Lab (آلمان) ارسال شدند.

### ۴- پیوند سبز

قلمه‌های مو رقم قره‌داش از کلکسیون موه‌های عاری از ویروس دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. آلودگی قلمه‌های مو رقم قره‌داش به عنوان گیرنده (recipient) و نمونه‌های مو استفاده شده به عنوان دهنده (donor) با استفاده از آزمون الیزا با آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه GFLV، *Grapevine virus Arabis mosaic virus* (ArMV) و *Grapevine leaf roll virus1 and A* (GVA) 3 (GLRV1 and GLRV3) مطابق روش پیشنهادی شرکت سازنده (BIOREBA, Switzerland) و آر تی- پی سی آر برای ردیابی *Grapevine yellow speckle viroids* با استفاده از آغازگرهای توصیه شده توسط حاجی زاده و همکاران (Hajizadeh et al. 2011) بررسی شدند و نمونه‌هایی با آلودگی مخلوط حذف و مورد استفاده قرار نگرفتند. برای دهنده از بخش‌های سبز و جوان گیاهان آلوده به GFLV (الیزا مثبت) که فاقد علایم بودند استفاده شد. برای تهیه دهنده و گیرنده ۳-۵ cm بالاتر و پایین‌تر از محل گرهی که حاوی یک برگ بود بریده شد. سپس پایه و پیوندک با استفاده از پیوند اسکنه به عمق ۲ cm به هم

جدول ۲. نتایج واکنش‌های آر تی- پی‌سی‌آر انجام شده بر روی ۱۴ نمونه استان آذربایجان شرقی با استفاده از آغازگرهای موجود در منابع. ترادف آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

**Table 2. The result of RT-PCR reactions on 14 grapevine samples collected in East- Azerbaijan using previously published primers. Sequences of the primers are presented in table 1.**

تعداد واکنش‌های مثبت		اندازه دی‌ان‌ای مورد انتظار برحسب جفت باز Expected DNA size(bp)	جفت آغازگرهای مورد استفاده Primer pairs
No. of positive reactions			
آر تی- پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای	آر تی- پی‌سی‌آر یک مرحله‌ای		
Two Step RT-PCR	One Step RT-PCR		
0	0	856	5'NC/G0
0	14	2128	5'NC/M4
0	0	3660	5'NC/3'NC
6	6	1489	M0/M4
0	0	648	M0/G1
5	5	854	M2/M4
7	7	1623	G2/3'NC
14	14	1665	GFLV-2048/3'NC
0	0	1700	G2/Oligo(dT)
0	0	1750	GFLV2048/oligo(dT)
1	1	3020	M0/3'NC
4	4	1226	GFLV-433V/3'NC
0	0	1300	GFLV-433V/oligo(dT)
9	9	1560	GFLV2081/GFLV3559
3	3	404	GFLVA3300/3'NC
0	0	~100	G3/Oligo(dT)

تأثیری در نتایج حاصل از این واکنش‌ها نداشت و منجر به سنتز قطعه مورد انتظار یا حذف قطعه‌های دی‌ان‌ای غیراختصاصی نشد. از طرف دیگر، از بین آغازگرهای طراحی شده براساس توالی آر ان‌ای شماره ۲ جدایه‌های ایرانی GFLV جفت آغازگرهای GFLV-2A-s/G2-5R، GFLV-2A-s/G2-5R، G-1390s/G2-1570as، G2-670s/G2-1570as، 511as، GFLV-CP2-s/GFLV3559R، GFLV-CP2-s/G3150as، G2B.EcoRI.s/G2B.BamHI.as، G2AHP.EcoRI.s/G2B.BamHI.as و G2C.MfeI.s/G2C.BamHI.as کارایی داشتند و توانستند قطعات مورد انتظار را در تمامی آر تی- پی‌سی‌آرهای انجام شده روی ۱۴ نمونه اشاره شده در جدول ۲ و نیز ۳۵ نمونه جمع‌آوری شده از سایر استان‌ها

آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های مقدماتی آر تی- پی‌سی‌آر تنها زمانی که جفت آغازگرهای GFLV-2048/3'NC و 5'NC/M4 مورد استفاده قرار گرفتند در تمامی واکنش‌ها قطعات دی‌ان‌ای مورد انتظار (به ترتیب در حدود ۱۶۰۰ و ۲۲۰۰ جفت باز) تکثیر یافتند. جفت آغازگر GFLV-2048/3'NC در هر دو روش آر تی- پی‌سی‌آر ولی جفت آغازگر 5'NC/M4 فقط در آر تی- پی‌سی‌آر دو مرحله‌ای کارایی داشت. در سایر واکنش‌های انجام یافته، قطعه‌ای تکثیر نیافت و دی‌ان‌ای مورد نظر تنها در برخی از جدایه‌ها تکثیر شد (جدول ۲). روش‌های Hotstart و Touchdown نیز استفاده از دماهای مختلف برای اتصال آغازگر

جدول ۳. نتایج واکنش‌های RT-PCR انجام شده بر روی ۴۹ نمونه الیزا مثبت برای GFLV با استفاده از آغازگرهای معرفی شده در منابع و طراحی شده در این تحقیق ترادف آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

**Table 3. The results of RT-PCR reactions on 49 GFLV-ELISA positive grapevine samples using GFLV published primers and the primers designed in this study. Sequences of the primers are presented in Table 1.**

اندازه دی‌ان‌ای مورد		منبع	جفت آغازگرهای مورد استفاده
تعداد واکنش‌های مثبت (کل)	انتظار برحسب جفت باز	Reference	Primer pairs
No. of positive reactions (Total)	Expected DNA size(bp)		
سال ۱۳۸۸	سال ۱۳۸۷		
35(35)	14(14)	This study	G2AHP-EcoRI-s/G2-5R-511as
35(35)	14(14)	This study	G2-670s/G2-1570as
35(35)	14(14)	This study	G-1390s/G2-1570as
35(35)	14(14)	This study	GFLV-CP2-s/G3150as
35(35)	14(14)	This study	GFLV-CP2-s/GFLV3559R
35(35)	14(14)	This study	G2AHP.EcoRI.s/G2B.BamHI.as
35(35)	14(14)	This study	G2B.EcoRI.s/G2B.BamHI.as
35(35)	14(14)	This study	G2C.MfeI.s/G2C.BamHI.as
35(35)	14(14)	This study/Wetzel et al., 2001	GFLV-2048/3'NC
19(35)	7(14)	Wetzel et al., 2001	G2/3'NC

منتقل شد. حضور ویروس در گیرنده توسط آزمون الیزا و آر تی - پی سی آر با آغازگرهای GFLV-CP2-s/G3150as نیز تأیید شد. از سوی دیگر با اینکه پیوندک از بخش‌هایی از گیاه آلوده به GFLV تهیه شده بود که علائم بیماری در آنها دیده نمی‌شد، علائم توصیف شده توسط مارتلی و ساوینو (Martelli & Savino 1988) برای GFLV در برگ متصل به گیرنده (رقم قره داش) دیده شد (شکل ۱).

#### بحث

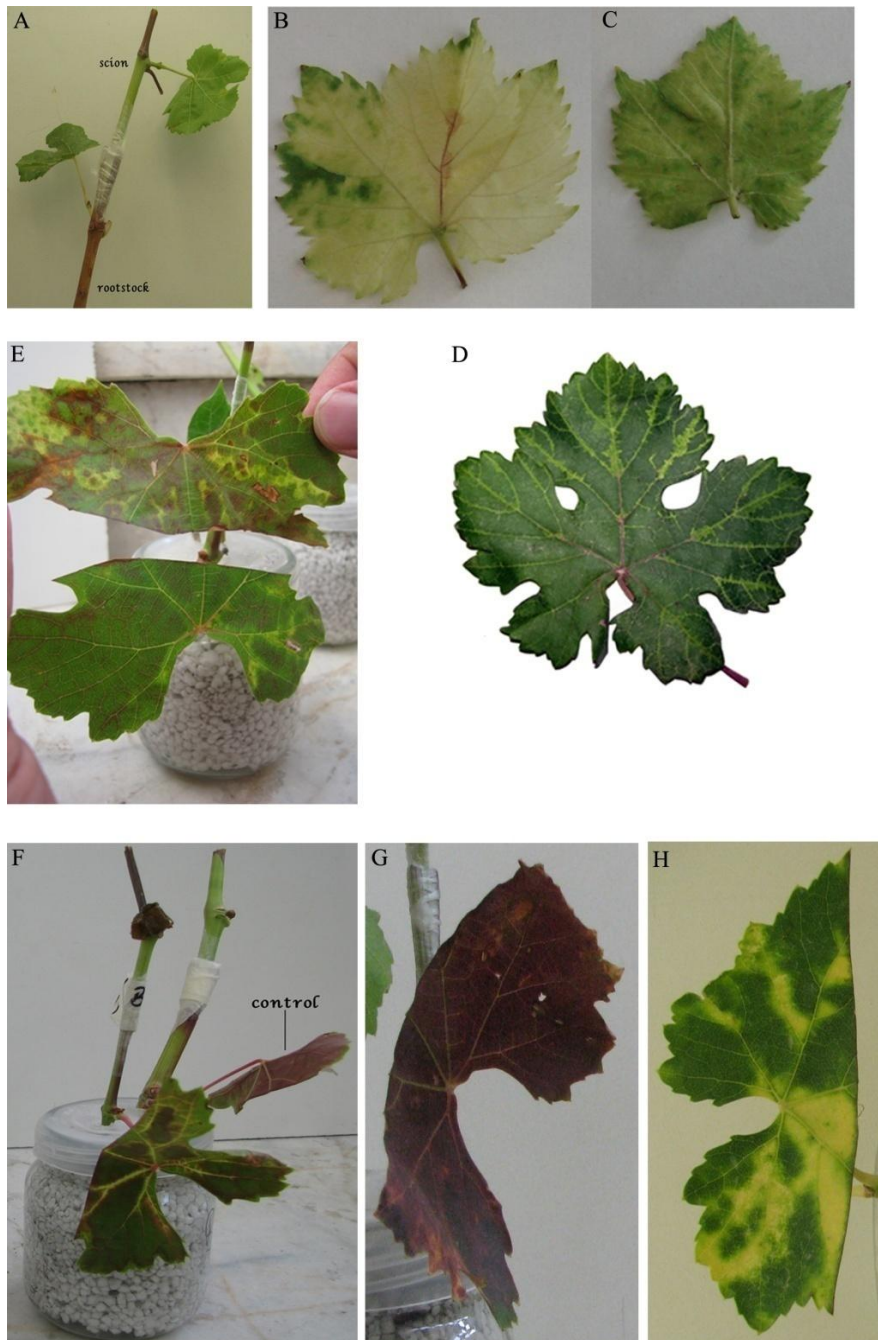
جلوگیری از انتشار ویروس و نیز استفاده از قلمه‌های سالم برای احداث باغ جدید از روش‌های مؤثر در کنترل خسارت ویروس برگ بادبزی می‌باشند. بدیهی است که فراهم بودن یک روش مطمئن و دقیق برای ردیابی

در سال ۱۳۸۸ تکثیر کنند (جدول ۳). جفت آغازگرهای 5'NC/GFLV-784R، GFLV-2A-s/GFLV-1855R، G-1390s/GFLV-1855R و m433V/G-1350as همراه با سنتز قطعه‌های دی‌ان‌ای غیر اختصاصی بود و کارایی مناسبی نداشتند.

#### ۴- پیوند سبز

گرچه در بیش از ۷۰ درصد پیوندهای انجام شده پس از گذشت ۱۰ تا ۱۴ روز برگ مربوط به دهنده (گیاه آلوده) خشکیده شد، در همه ۱۴ نمونه پیوند شده اولین علائم GFLV پس از گذشت ۱۷ روز از پیوند زدن در برگ مربوط به گیرنده (رقم قره داش) مشاهده و در صد در صد از پیوندهای انجام شده آلودگی از گیاه دهنده به گیرنده





شکل ۱. علائم روی برگ‌های مو قبل و بعد از پیوند سبز. A) نحوه اتصال پیوندک به پایه از طریق پیوند اسکنه؛ B و C) علائم موزائیک زرد به ترتیب بر روی برگ‌های جمع‌آوری شده از تاکستان‌ها؛ D) علائم رگ‌نواری بر روی برگ‌های جمع‌آوری شده از تاکستان‌ها؛ E) مقایسه ایجاد موزائیک زرد (برگ بالایی) و رگ‌نواری (برگ پایینی) پس از ۱۷ روز از پیوند زدن روی پایه (رقم قره داش)؛ F و H) علائم رگ‌نواری و موزائیک زردی روی پایه (رقم قره داش) ۲۰ روز پس از پیوند زدن؛ G) شاهد سالم

**Fig. 1. Symptoms on grapevine leaves before and after green-grafting. A: assembled scion and rootstock in cleft-grafting; B and C: yellow mosaic symptoms on old and young leaves collected from vineyards, respectively; D: vein banding symptom on the leaves collected from vineyards; E: comparison of development of yellow mosaic (upper leaf) and vein banding (lower leaf) at 17 days post grafting (dpg) on rootstock of the variety Gerey-Dash; F and H: vein banding and yellow mosaic symptoms on the rootstock variety Gerey-Dash 20 dpg, respectively. G: healthy control.**

ترادف جدایه‌های ایرانی همخوانی دارند (جدول ۲). بنابراین این نتایج نیز عدم کارایی سایر آغازگرها به دلیل ناهمخوان بودن ترادف جدایه‌های ایرانی را تأیید می‌کند. آنجا که مدت زمان لازم برای تکثیر قطعات بزرگ‌تر نسبت به قطعات کوچک‌تر طولانی‌تر است (واکنش آر تی- پی‌سی‌آر با استفاده از جفت آغازگر 5'NC/M4 که دی‌ان‌ای به طول ۲۲۰۰ bp را سنتز می‌کنند حدود شش ساعت به طول می‌انجامد) و برای ردیابی ویروس مناسب نیست (Kennedy & Oswald 2011). از سوی دیگر برای ردیابی همزمان چند ویروس طی آزمون‌هایی نظیر real time PCR و multiplex PCR نیز آغازگرهای کوچک‌تر مناسب‌تر هستند (MacKay 2007)، از اینرو آغازگرهایی برای تکثیر بخش‌های کوچک‌تر ژنوم ویروس طراحی شدند. از میان آغازگرهای طراحی شده آغازگرهای GFLV-1855، GFLV-7804 و m433V علاوه بر دی‌ان‌ای مورد انتظار تعداد زیادی قطعات دی‌ان‌ای‌های غیراختصاصی تکثیر کردند که می‌تواند به دلیل اتصال این آغازگرها به ژنوم گیاه میزبان باشد. از اینرو این آغازگرها مناسب تشخیص داده نشدند. تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار oligo پیشنهاد کرد که عدم کارایی آغازگرهای پیش‌سو در ترکیب با آغازگر<sub>16</sub>(dT) می‌تواند به دلیل اختلاف زیاد دمای اتصال بین این آغازگرها باشد، چراکه دمای اتصال آغازگر<sub>16</sub>(dT) حدود ۳۲ °C است که در این دما ساختارهای داخلی موجود در برخی از آغازگرهای پیش‌سو هنوز پایدارند. بنابراین براساس این نتایج توصیه می‌شود از الیگونوکلئوتیدی با تعداد T بیشتری استفاده شود.

آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش توانستند الگوی خود را در جدایه‌های ایرانی مورد هدف قرار دهند.

ویروس لازمه دست‌یابی به این مهم است. از طرف دیگر نشان داده شده است که کارایی آر تی- پی‌سی‌آر نسبت به الیزا و سایر روش‌های سرولوژیکی در ردیابی ویروس برگ بادبزی مو بیشتر است (Liebenberg et al. 2009, Wetzel et al. 2002). بنابراین با معرفی آغازگرهای اختصاصی دقت روش آر تی- پی‌سی‌آر را می‌توان افزایش داد. طی این تحقیق کارایی آغازگرهای معرفی شده در منابع با آغازگرهای طراحی شده براساس ترادف آر ان‌ای شماره ۲ جدایه‌های ایرانی GFLV با یکدیگر مقایسه شد. از ۱۰ آغازگر موجود در منابع تنها جفت آغازگرهای 5'NC/M4 و GFLV-2048/3'NC توانستند ویروس را در تمام ۱۴ نمونه بررسی شده ردیابی کنند (جدول ۲). عدم کارایی سایر آغازگرها نمی‌توانست به دلیل حضور مواد بازدارنده یا شرایط نامناسب واکنش‌ها باشد. زیرا که تکثیر بخشی از ژن‌های خانه‌داری (House-keeping genes) حاکی از عدم حضور مواد بازدارنده در واکنش‌ها بود و استفاده از روش‌های مختلف برای آر تی- پی‌سی‌آر و شیب دمایی برای مرحله اتصال، احتمال وجود شرایط نامناسب را نیز برطرف کرد.

به‌علاوه تمامی ۱۸ آغازگر طراحی شده در این پژوهش ویروس را در تمامی ۱۴ نمونه مورد بررسی تأیید کرد. از این رو عدم کارایی اغلب این آغازگرها احتمالاً به دلیل عدم اتصال این آغازگرها به رشته قالب بود. این احتمال با هم‌ردیف‌سازی ترادف آغازگرهای موجود در منابع با ترادف آر ان‌ای شماره ۲ جدایه‌های ایرانی تأیید شد (جدول ۱، نوکلئوتیدهایی با اتصال ناجور با قلم سیاه و کشیدن خط زیر آنها مشخص شده‌اند). هم‌چنین نتایج زیرهم‌چینی نشان داد که ترادف جفت آغازگرهای 5'NC/M4 و GFLV2048/3'NC که قابلیت ردیابی تمامی جدایه‌های بررسی شده ایرانی را داشتند، کاملاً با

به‌ویژه GFLV مقایسه شوند تا گیاه مناسب‌تر مشخص شود. روش پیوند سبز بر روی پایه‌های LN33 و Cabernet sauvignon قبلاً برای ردیابی ویروس *Grapevine leaf roll associated virus 3* به‌طور موفق به‌کار برده شده است (Pathirana & McKenzie 2005). از آنجا که قلمه سبز و نمونه‌های گیاهی پیوند زده شده در شیشه‌هایی با قطر کم نگهداری می‌شوند، فضای بسیار کمتری در مقایسه با گلدان‌ها نیاز دارند. به‌علاوه از مزایای دیگر این روش قابلیت کاربرد آنها در تمام طول فصل رویشی گیاه است (Pathirana & McKenzie 2005). نتایج این پژوهش نشان داد روش قلمه سبز با رقم قره‌دانش به‌عنوان یک روش مناسب برای ردیابی GFLV می‌باشد. این روش در ترکیب با آرتی-پی‌سی‌آر با آغازگرهای معرفی شده در این بررسی روشی دقیق و قابل اعتماد برای ردیابی جدایه‌های این ویروس را فراهم می‌کند.

### منابع

جهت ملاحظه به صفحات (127-129) متن انگلیسی مراجعه شود.

این آغازگرها برای بخش‌های مختلف آران‌ای شماره ۲ طراحی شدند تا برحسب نیاز و به‌عنوان جایگزین‌های متعدد در ترکیب با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای سایر ویروس‌های مو با هدف ردیابی همزمان مورد استفاده قرار گیرند.

طی این پژوهش پیوند سبز برای اولین بار در دنیا برای ردیابی Nepovirus ها به‌کار برده شد و رقم قره‌دانش نیز به‌عنوان یک رقم برای نموده‌سازی (Indexing) در ردیابی GFLV مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌کارگیری روش پیوند سبز با استفاده از رقم قره‌دانش به‌عنوان پایه برای ردیابی GFLV در نمونه‌های جمع‌آوری شده بسیار کارآمد بود زیرا از ۱۴ نمونه مورد استفاده برای پیوند سبز همگی باعث ایجاد علائم ویروسی در گیاه پایه شدند، حتی اگر پیوندک فاقد علائم ماکروسکوپی بود. حداقل و حداکثر مدت زمان لازم برای مشاهده علائم آلودگی به ویروس در رقم قره‌دانش به‌ترتیب حدود ۱۰ و ۱۷ روز بود. درحالی‌که مدت زمان لازم برای گونه *Vitis rupestris* که به‌عنوان پایه مناسب برای نموده‌سازی GFLV معرفی شده است حدود سه تا چهار هفته (۲۱ تا ۲۸ روز) پس از پیوند می‌باشد (Martelli 1993). بنابراین توصیه می‌شود این دو گیاه با هم طی یک آزمایش برای ردیابی ویروس‌های مو