شناسایی ویروسهای گیاهی:

ویروس‌های گیاهی خسارت زیادی به محصولات کشاورزی وارد می‌کنند. ویروسها دومین گروه مهم بیمارگرهای گیاهی بعد از قارچ ها به شمار می‌روند. بنابراین شناسایی ویروس های گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار است. شناسایی سریع و دقیق ویروسهای گیاهی نخستین مرحله مهم در جهت کنترل آنها به شمار می‌آید. مدیریت بیماریهای ویروسی به طور مؤثری قبل از آلودگی امکان پذیر می باشد. تشخیص آسان، سریع و دقیق ویروس‌های گیاهی با استفاده از حداقل مواد گیاهی، یکی از ارکان اصلی فرآیند تولید گیاهان عاری از ویروس و مدیریت مؤثر بیماریهای ویروسی می‌باشد. عدم دسترسی به روش های کنترلی موفق بر علیه این بیماری ها سبب شده تا جلوگیری از بروز و گسترش بیماری از جمله مهمترین اقدامات در کنترل این بیماری ها محسوب شود. در نتیجه تمایل زیادی برای توسعه سیستم‌های جدید زیستی برای تشخیص در مراحل اولیه بیماری‌های گیاهی با حساسیت و اختصاصیت بالا به منظور کاهش خطر انتشار عوامل بیماریزا و همچنین جلوگیری از ورود بیماریهای گیاهی جدید به ویژه بیمارگرهای قرنطینه‌ای در مرزها وجود دارد. روش های مختلفی برای ردیابی ویروس های گیاهی وجود دارد که شامل روش‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی می‌باشد.

شناسایی بر پایه ی علائم ایجاد شده توسط ویروس در گیاه: در خیلی از موارد، علایم بیماری های ویروسی ممکن است با یکدیگر و یا با عوارض ناشی از عوامل محیطی و یا بیماری های ناشی از آفات (تغذیه حشرات) و بیمارگرهای دیگر مشابهت داشته باشد و تشخیص دهنده را به اشتباه بیندازد. علائم بیماری های ویروسی در مواقعی از بیماری های فیزیولوژیک، آلودگی سایر بیمارگرها و خسارت آفات قابل تمایز نیستند و از این رو شناسایی ویروس بر اساس علائم قابل اعتماد نیست. با توجه به این که ممکن است ویروس های مختلف علائم مشابه در گیاه ایجاد کنند و یا علائم مختلف در یک گیاه ایجاد شود، یا چند ویروس توأماً یک آلودگی ایجاد کنند و همچنین شرایط آب و هوایی مختلف می‌تواند باعث ایجاد علائم متفاوت توسط یک ویروس در یک گیاه مشابه شود. به جز ظهور علائم که بر اثر آلودگی به ویروس ایجاد می‌شود، تغییرات هیستولوژیکی (بافت شناسی) و سیتولوژیکی

مشخصی نیز ممکن است پیدا شود. این تغییرات در برخی از میزبان‌های گیاهی که به وسیله ویروس خاصی آلوده شده اند ممکن است در مراحل اولیه آلودگی با استفاده از تکنیک های رنگ آمیزی و یا به کارگیری میکروسکوپ نوری وسیله ارزشمندی در جهت تشخیص ویروس باشد.

تعیین خواص مرفولوژیکی ویروس: این روش نیز به علت شباهت شکلی و نزدیک بودن اندازه ویروس های مختلف بدون کمک واستفاده از سایر روش ها قطعی نمی باشد. از مهمترین وسایلی که برای تشخیص ویروس ها استفاده می شود میکروسکوپ الکترونی TEM می باشد.

تعیین خواص فیزیکوشیمیایی: در انتخاب روش یا روش هائی که در مطالعه ویروس بخصوص بکار می‌روند شناخت برخی از خصوصیات اصلی ویروس ارزشمند است. اندازه گیری درجه حرارت یا گرمای بی اثرشدن، پایداری در محیط آزمایشگاه و حد نهائی رقت نه تنها ممکن است در امر بررسی یک ویروس خاص راهنمای ما باشد، بلکه با مراجعه به خصوصیات گروههای ویروسی به شناسایی مقدماتی ویروس کمک می کنند. تعیین ضریب رسوب در سانتریوفیوژ، تعیین درصد پروتئین و اسید نوکلئیک، وزن مولکولی ویروس، تعداد پیکره های ویروس و تعداد قطعات اسید نوکلئیک و میزان مکمل سازی اسید نوکلئیک ویروس از خواص فیزیکوشیمیایی ویروس ها محسوب می شوند که به کمک آنها می توان نوع ویروس را تشخیص داد.

آزمونهای مربوط به انتقال ویروسهای گیاهی: برای تشخیص بیماری های ویروسی در گیاهان، محققین از گیاهان میزبان (گیاهان محک نظیر سلمه تره، باقلا، توتون، لوبیا چشم بلبلی، لوبیا، کدو و داتوره) برای انتقال ویروس از گیاه آلوده به گیاهان محک سالم استفاده می‌کنند. نحوه انتقال متفاوت ویروس‌های گیاهی هم می‌تواند در جهت شناسایی ویروس‌ها مفید باشد. شناخت اینکه علائم ایجاد شده بوسیله آلودگی های ویروسی می تواند از گیاهی به گیاه دیگر انتقال یابد، نه تنها از نقطه نظر آغاز و تولد علم ویروس شناسی گیاهی حائز اهمیت است بلکه خود پایه واساس یکی از ارزشمند ترین آزمونهای تشخیص ویروس هاست. هرچند به عنوان یک وسیله تشخیص ویروس، این آزمون فاقد ارزش کلینیکی و سهولت روش سرولوژی و تکنیک میکروسکوپ الکترونی است ولی این

روش هنوز به صورت یکی از اجزای ضروری در صحنه ویروس شناسی مدرن باقی مانده است. یکی از معایب بارز این روش مدت آزمایش است که ممکن است حدود چند هفته طول بکشد.

تعیین دامنه میزبانی ویروس: همچنین برای مطالعه ویروس‌هایی که انواع معدودی میزبان را آلوده می کنند، دامنه میزبانی ویروس می تواند به تعیین هویت نوع ویروس کمک کند ولی برای تشخیص قطعی گونه ویروسی باید توسط روش‌های دیگری مانند روشهای سرولوژیک و مولکولی تایید گردد. برای تعیین دامنه میزبانی ویروس و ایجاد علائم از مایه زنی مکانیکی استفاده می‌شود که البته ویروس باید به روش مکانیکی قابل انتقال باشد. برای سایر ویروسها باید از روشهای انتقال آنها مانند حشرات، پیوند زنی و ... استفاده شود.

خالص سازی بیولوژیک ویروس‌های گیاهی: جهت خالص سازی ویروس‌های گیاهی از گیاهان محک استفاده می‌شود. پس از مایه زنی مکانیکی این گیاهان و آغاز ظهور علائم لکه موضعی کلروتیک، به وسیله اسکالپل استریل اقدام به تک لکه گیری نموده و هر تک لکه در میان دو لام به کمک قطراتی از بافر عصاره گیری له شده و عصاره حاصل روی یک گیاه محک مانند سلمه جدید یا میزبان گیاهی سیستمیک مایه زنی می‌شود.

نحوه مایه زنی مکانیکی ویروس:

برای عصاره گیری از نمونه های برگی گیاه، از بافت گیاه و بافر به نسبت ۱ :۱۰ استفاده شد. پس از پاشیدن پودر کاربوراندوم روی برگ های گیاهان سالم، عصاره به آرامی روی برگها مالیده می‌شود. مایه زنی روی برگ های کوتیلدونی در اوایل صبح و یا در هنگام غروب در شرایط هوای خنک انجام می‌شود. بوته های مایه زنی شده هر روز از نظر ظهور یا عدم ظهور علائم مورد بازدید قرار می‌گیرند. گیاهان بعد از مایه زنی مکانیکی با ویروس توسط روش‌های سرولوژیک و مولکولی آزمایش می‌شوند تا آلودگی شان به ویروس محرز شود. برای تهیه بافر مایه زنی (بافر فسفات ۰/۱ مولار، (pH, 7، ابتدا ۸/۳ گرم KH_2PO_4 و ۶/۷ گرم K_2HPO_4 در ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و پس از تنظیم pH روی ۷، حجم نهایی با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. سپس Na_2SO_3 به نسبت ۰/۲

درصد (وزنی/حجمی) به محلول اضافه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. در هنگام استفاده از بافر برای مایه زنی ویروس موزائیک زرد لوبیا،(Polyvinylpyrrolidone) PVP به نسبت ۲ درصد (وزنی/حجمی) به بافر اضافه و به خوبی حل شد. در مورد مایه زنی گیاهان با ویروس موزائیک خیار به نسبت ۲ درصد EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) و DIECA (Diethyl dithio carbamate) به بافر مایه زنی اضافه شدند.

تست‌های سرولوژیکی:

واکنش‌های سرولوژیک به جفت شدن اختصاصی مولکولهای آنتی بادی و آنتی ژن بستگی دارند. روش‌های سرولوژیکی که کاربرد وسیعی درتشخیص بیماری های ویروسی گیاهی دارند، بر اساس واکنش بین آنتی ژن (نوکلئوپروتئین یا پروتئین ویروس) و آنتی بادی اختصاصی آنها می‌باشد. خصوصیت بارز واکنش سرولوژیک اختصاصیت واکنش بین ویروس (آنتی ژن) و آنتی سرم (آنتی بادی) آن است که بیانگر این حقیقت است که آنتی بادی ها فقط با آنتی ژنی که واکنش ایمنی ایجاد کرده واکنش نشان می دهند. بخاطر همین اختصاصیت، روش های سرولوژیکی از روش‌های بسیار متداول شناسایی ویروس و بیماری آن است. برای تهیه آنتی سرم، ویروس خالص را می توان به حیوانات مختلفی از جمله اسب، خرگوش، خوک، خوکچه هندی، موش، بز و مرغ تزریق کرد. تزریق به ۳ روش انجام می گیرد؛ داخل رگ، زیرجلدی و درون ماهیچه ای. معمولترین حیوان مورد استفاده جهت تهیه آنتی سرم برای ویروس های گیاهی، خرگوش‌ها هستند. الایزا یک روش سرولوژیک رایج است که معمولا برای شناسایی ویروسها استفاده می‌شود.

آزمون الایزا (ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay) برهم‌کنش بین آنتی ژن و آنتی بادی را مورد بررسی قرار می‌دهد. این تکنیک بر روی یک صفحه به نام Plate انجام می‌گیرد که برای تشخیص و اندازه‌گیری موادی مانند پپتیدها، پروتئین‌ها، آنتی بادی‌ها و هورمون‌ها استفاده می‌شود. معمولا الایزا در پلیت های ۹۶ چاهکی از جنس پلی استرین انجام می شود. مراحل کار به طور خلاصه به

این صورت که در کف پلیت، آنتی ژن یا آنتی بادی مکمل اضافه می‌شود. سپس نمونه به هر چاهک اضافه می شود. بعد از اضافه کردن نمونه شستشو انجام می شود تا آنتی ژن یا آنتی بادی هایی که متصل نشده اند از محیط خارج شوند. سپس آنتی بادی نشاندارشده با آنزیم اضافه می شود و مجددا شستشو انجام می شود. آخرین مرحله اضافه کردن سوبسترای آنزیم و دیدن رنگ تولید شده است. پلیت با دستگاه الایزا ریدر خوانده می شود. شدت رنگ تولید شده نشانگر غلظت ترکیب یا ویروس مورد نظر است. برای شناسایی آنتی بادی‌ها یا آنتی ژن‌های متصل شده، آنتی بادی‌های ثانویه‌ای که به یک آنزیم متصل هستند یا به عبارتی دیگر توسط یک آنزیم نشان دار شده‌اند، مانند پراکسیداز یا آلکالین فسفاتاز به هر چاهک اضافه می‌شوند. پس از یک دوره انکوباسیون، آنتی بادی‌های ثانویه که متصل نشده‌اند، با شستشو از بین می‌روند. هنگامی که یک سوبسترا مناسب به محیط اضافه می‌شود، آنزیم با آن واکنش می‌دهد تا یک محصول رنگی و قابل ردیابی تولید کند. این رنگ تولید شده به عنوان یک تابع از مقدار آنتی ژن یا آنتی بادی موجود در نمونه قابل اندازه‌گیری است. شدت تراکم رنگی / نوری در طول موجی مشخص اندازه‌گیری می‌شود. شدت رنگ، نشان دهنده میزان آنتی ژن یا آنتی بادی است.

تست‌های مولکولی: روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز ((Polymerase Chain Reaction (PCR) که یک روش ساده و کارآمد است، در سال ۱۹۸۴ توسط کری مولیس ابداع شد. در این روش مقادیر جزئی و کم DNA را به قدری افزایش می‌دهند که بتوان آنها را در آزمایشگاه مشاهده نمود. در این روش قطعه مناسبی از DNA بدون استفاده از سلولهای زنده تکثیر می‌شود. این روش قادر است تعداد نسخه اندکی از DNA هدف را تا سطحی که توسط ژل الکتروفورز قابل تشخیص باشد تکثیر نماید. پی سی آر روشی است که به واسطه آن می توان از یک رشته DNA الگو، تعداد زیادی رشته DNA به دست آورد به شرطی که دو انتهای رشته DNA که قصد تکثیرش را داریم، کاملا شناخته شده باشد. این روش که در دهه های اخیر مورد استقبال دانشمندان علوم زیستی قرار گرفته است، یک روش بسیار سریع و حساس است. دارای مزایای بسیار زیادی بود. از جمله مزایای آن می توان به بررسی کردن نمونه ها در یک روز، ارزان بودن آن، اختصاصی بودن و آسانی انجام شدن آن اشاره کرد. PCR

توانست یک انقلاب بسیار بزرگ در تشخیص بیماری ها، علوم جنایی، صنایع پزشکی و میکروبیولوژی باشد. همچنین این تکنیک توانست کمک بسیار بزرگی در رفع مشکلات مربوط به زیست مولکولی باشد که در آن نیازمند مقدار زیادی از DNA یکسان بودند. امروزه برای شناسایی ویروس از این روش استفاده می کنند. در این روش ابتدا DNA یا RNA ویروس را استخراج کرده و سپس با کمک دستگاه ترموسایکلر یا PCR در حضور آنزیم های مخصوصی از جمله آنزیم پلی مراز آنرا بیش از هزاران نسخه تکثیر می‌کنند و سپس با کمک الکتروفورز افقی در ژل آگارز باندهایی تشکیل می شود که با تعیین اندازه این باندها و مقایسه با باندهای گیاه سالم، شناسایی ویروس انجام می‌شود. مزیت این روش که با حجم کمی از نمونه می توان آزمایش را انجام داد و همچنین دارای دقت بسیار بالایی است.

روش مولکولی PCR شامل سه مرحله اصلی دناتوراسیون، اتصال پرایمر به ژنوم و مرحله پلیمریزاسیون یا سنتز قطعه هدف می باشد. در مرحله دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه DNA را با درجه ۹۴ سانتیگراد حرارت می دهند. در مرحله بسط، پرایمر در دمای ۳۰ تا ۶۵ درجه و به مدت ۳۰ ثانیه انجام می شود. مرحله سنتز هم توسط نوکلئوتیدها در دمای ۷۲ درجه، انجام می‌شود که منجر به تکثیر قطعه ژنومی هدف می‌گردد.