جداسازی و تعیین خصوصیات مولکولی میتوویروس همراه با *Sclerotinia sclerotiorum* و بررسی تاثیر آن بر بیولوژی قارچ*

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *MITOVIRUS* ASSOCIATED WITH *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* AND ITS EFFECT ON FUNGAL BIOLOGY

مرضیه قباخلو[1**]، غلامحسین مصاحبی[2]، مینا کوهی حبیبی[3]، محمد جوان‌نیکخواه[3] و محمدرضا احمدی[4]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۲۸)

چکیده

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای گیاهی با دامنه میزبانی وسیع می‌باشد. به منظور ردیابی مایکوویروس-های آلوده‌کننده، جدایه Cea این قارچ از هرباریوم دانشگاه تهران تهیه گردید. جداسازی آر ان ای دولای از میسلیوم‌های لیوفلیزه‌شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی همراه با سلولز CF-11 انجام شد. در نهایت یک قطعه نوکلئیک اسید به اندازه ۲/۵ کیلوباز از این جدایه استخراج گردید. همسانه‌سازی و تعیین ترادف بخشی از این آر ان ای دولای، نشان داد شباهت قابل‌ملاحظه‌ای بین ترادف آمینو اسیدی بدست آمده با توالی پلی‌مرازی اعضای جنس *Mitovirus* وجود دارد بنابراین نام SsMV2/Cea برای این ویروس پیشنهاد شد. جدایه‌های *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus2/NZ1 از نیوزیلند و *Sclerotinia sclerotiorum* mitovirus2/KL1 از آمریکا به ترتیب با ۹۴٪ و ۸۷٪ مشابهت، نزدیک‌ترین به جدایه ایرانی بودند. تلاش برای حذف آر ان ای دولای از طریق تیمار سیکلوهگزیمید در سه غلظت ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر همراه با کشت نوک هیف ناموفق بود. انتقال افقی این میتوویروس از جدایه Cea از طریق هم‌دهانی به جدایه عاری از ویروس Lekh در تمامی تکرارها با موفقیت انجام شد. بررسی پتانسیل انتقال عمودی مایکوویروس در جدایه Cea نشان داد این میتوویروس طی تولید مثل جنسی و از طریق آسکوسپورها با نرخ ۵۵٪ منتقل گردید. مشاهدات ریخت‌شناسی و بیماری‌زایی روی دمبرگ کرفس و برگ سویا مشخص نمود آلودگی به میتوویروس منجر به کاهش رشد خطی میسلیوم و کاهش شدید ویرولانس قارچ *S. sclerotiorum* گردید.

کلیدواژه: *Sclerotinia sclerotiorum*، آر ان ای دولای، مایکویروس، میتوویروس، ویرولانس

---

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج، دانشگاه تهران و با راهنمایی دکتر غلامحسین مصاحبی

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Ghobakhloo@ut.ac.ir

۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۲- استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳- استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۴- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

مایکوویروس‌ها (ویروس‌های قارچی) در بسیاری از گونه‌های قارچی از جمله قارچ‌های بیمارگر گیاهی حضور دارند (Pearson *et al*. 2009). از زمان اولین گزارش مایکوویروس‌ها در قارچ خوراکی (Hollings 1962)، این ویروس‌ها درتمامی گروه‌های قارچی شناسایی شده‌اند (Ghabrial&Suzuki 2009). اکثر مایکوویروس‌های گزارش‌شده در میزبان‌شان علائم مشهودی ایجاد نمی‌کنند، با این وجود موارد مستندی از مایکوویروس‌هایی که کم آزاری را به میزبان خود القا می‌کنند وجود دارد. این دسته از ویروس‌ها به عنوان ابزاری در کنترل بیولوژیک قارچ‌های بیمارگر گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Pearson *et al*. 2009; Ghabrial & Suzuki 2009). از مشهورترین مثال‌ها در این مورد می‌توان به *Cryphonectria hypovirus* 1 مولد پدیده کم‌آزاری در *Cryphonectria parasitica* عامل سوختگی شاه بلوط اشاره نمود که به طور گسترده‌ای در اروپا جهت کنترل این بیماری به کار گرفته شده است (Nuss1992). همچنین مایکوویروس *Rosellinia necatrix megabirnavirus* 1 که قارچ *Rosellinia necatrix* را آلوده می‌کند، جهت کنترل بیماری پوسیدگی سفید ریشه به کار می‌رود.

قارچ *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشد. این قارچ بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی را در سراسر دنیا آلوده می‌کند (Boland&Hall 1994; Purdy 1979). میزان خسارت ناشی از *S. sclerotiorum* در محصولات حساس زراعی بسیار زیاد است و گاهی ۱۰۰ درصد محصول در اثر این بیماری از بین می‌رود. کنترل بیماری‌های ناشی از این بیمارگر ازطریق شیوه‌های زراعی ویا شیمیایی دشوار است. علاوه بر این، ارقام مقاوم در بسیاری از محصولات دردسترس نیست (Purdy 1979).

تاکنون مایکوویروس‌های مختلفی با ماهیت ژنومی آر ان ای تک‌لای (ssRNA)، آر ان ای دولای (dsRNA) و دی ان ای تک‌لای (ssDNA) از قارچ *S. sclerotiorum* جداسازی و شناسایی شده‌اند که به جنس‌های *Sclerodarnavirus*، *Mitovirus* و *Hypovirus* تعلق دارند (Xie *et al*. 2006; Liu *et al*. 2009; Yu *et al*. 2010; Xie *et al*. 2011). اغلب این ویروس‌ها موجب بروز فنوتیپ کم‌آزاری در *S. sclerotiorum* می‌شوند. اعضای جنس *Mitovirus* برای تکثیر وابسته به میتوکندری میزبان خود می باشند. میتوویروس‌ها از بیمارگرهای متعددی از جمله *Rhizoctonia solani* (Lakshman *et al*. 1998)، *Ophiostoma novo-ulmi* (Hong *et al*. 1999)، *Sclerotinia homoeocarpa* (Deng *et al*. 2003)، *Helicobasidium mompa* (Osaki *et al*. 2005)، *Chalara elegans* (Park*etal*.2006)، *Botryti cinerea* (Wu *et al*. 2007)، *S. sclerotiorum* (Xie&Ghabrial 2012; Khalifa&Pearson 2013)، و همچنین از قارچ‌های مایکوریز (Stielow *et al*. 2012) گزارش شده‌اند.

در این بررسی وجود میتوویروس در جدایه Cea از قارچ *S.sclerotiorum* مشخص شد و توانایی انتقال افقی، نرخ انتقال عمودی، نقش آن در ریخت‌شناسی و بیماری-زایی قارچ مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

تهیه جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum*

جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum* مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون قارچ شناسی دانشگاه تهران، کرج تهیه

گردید. جدایه Cea از کلم برگ و جدایه Lekh از کاهو در استان گلستان جمع‌آوری شده است و حضور مایکوویروس در این جدایه‌ها در تحقیق پیشین بررسی شده بود (Ghobakhloo 2012). اسکلروت‌ها روی محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA, Merck) کشت شدند. سپس در انکوباتور با شرایط تاریکی مداوم و در دمای۱±۲۱ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

به منظور تولید توده میسلیومی قارچ جهت استخراج آر ان ای دولای، پنج قرص میسلیومی هر یک به قطر پنج میلی متر از حاشیه پرگنه جوان حاصل از کشت سختینه روی محیط PDA برداشته شدند و به ظروف ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت مایع (potato (PDB dextrosebroth (عصاره۲۰۰ گرم سیب زمینی و ۱۸ گرم دکستروزدر یک لیتر)، انتقال داده شد. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. ظرف‌ها به مدت پنج روز درون شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای۱ ±۲۱ درجه سلسیوس نگهداری شدند، سپس توده‌های میسلیومی به کمک پمپ خلاء و کاغذ صافی قرار داده شده در قیف بوخنر از محیط کشت مایع جدا شده و دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند تا باقیمانده محیط کشت روی سطح میسلیوم‌ها شسته شود. میسلیوم-های شسته شده به لوله‌های شیشه‌ای درب دار انتقال یافت تا توسط دستگاه یخ-خشک کن (freeze-dryer) لیوفیلیز شوند. میسلیوم‌ها پس از ٤٨ ساعت از دستگاه خارج شدند. توده‌های میسلیومی تا زمان استخراج dsRNA در دمای ۲۱- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جداسازی آر ان ای دولای از بافت قارچی

جهت استخراج آر ان ای دولای ویروسی از روش *ریگلینگ و همکاران* (Rigling *et al.*2009) استفاده شد. اصول کلی روش‌های استخراج آر ان ای دولای ویروسی از قارچ بر پایه تهیه عصاره حاوی آر ان ای دولای و عبور آن از میان ستون کروماتوگرافی متشکل از پودر سلولز CF-11(Whatman) می‌باشد. ابتدا بافت پودر شده میسلیوم قارچ با بافر SDS، STE، فنول، کلروفرم و ایزوآمیل الکل به نسبت‌های ذکر شده در دستورالعمل موردنظر مخلوط گردید. پس از انجام سانتریفوژ، رونشین حاصل به کمک کلروفرم و ایزوآمیل الکل زلال سازی شده و پس از اضافه کردن اتانول مطلق (تا حجم نهایی ۱۵٪) از ستون کروماتوگرافی حاوی پودر سلولز عبور داده شد. در این مرحله آر ان ای دولای به سلولز متصل شده و سایر اسید-های نوکلئیک طی سه مرحله شستشو با بافر STE حاوی ۱۵٪ اتانول حذف می‌شوند. در مرحله بعدی، آر ان ای دولای به کمک دو مرحله شستشو با بافر STE فاقد اتانول از ستون استخراج می‌گردد. بعد از اضافه کردن استات سدیم و اتانول به محلول بدست‌آمده و سانتریفوژ کردن، رسوب حاصل از آن درون ۲۰ میکرولیتر آب مقطر فاقد RNase حل گردید و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. جهت اطمینان از اینکه نوکلئیک اسیدهای بدست‌آمده آر ان ای دولای هستند محصول حاصله تحت تیمار هضم آنزیمی DNase I (Fermentas) و RNase A (Fermentas) دو غلظت ۰/۳ و ۰/۰۳ مولار تمک NaCl قرارگرفت و نمونه‌ای از هر واکنش در ژل آگاروز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید. لازم به ذکر است که آر ان ای دولای در غلظت کم نمک NaCl تحت تیمار با RNase A، هضم می‌گردد اما به RNase A در غلظت زیاد نمک NaCl مقاوم است (Howitt *et al.* 2006).

توالی‌یابی، آنالیز توالی و فیلوژنی

قطعات آر ان ای دولای پس از جداسازی جهت توالی-

جدول ۱. درصد شباهت توالی آمینو اسیدی RdRp بین جدایه ایرانی بدست‌آمده در این تحقیق (SsMV/Cea) و ۱۳ جدایه نماینده از جنس میتوویروس.

Table 1. Percent amino acid sequence identity (RdRp) between SsMV/Cea and 13 members of the genus *Mitovirus*.

Mitovirus isolates	Acronym	Identity(RdRp)	GenBank accession no.
Cryphonectria cubensis Mitovirus 1a	CcMV1a	41%	AAR01970
Cryphonectria cubensis Mitovirus 2a	CcMV2a	35%	AAR01973
Cryphonectria cubensis Mitovirus 1c	CcMV1c	41%	AAR01972
Gremmeniella abietina mitochondrial RNA virus S2	GaRV-MS2	50%	YP_077184
Gremmeniella Mitovirus S1	GMV-S1	50%	AAN05635
Ophiostoma Mitovirus 5	OMV5	45%	NP_660180
Ophiostoma Mitovirus 6	OMV6	40%	NP_660181
Sclerotinia sclerotiorum Mitovirus 1/KL1	SsMV1/KL1	41%	AEX91878
Sclerotinia sclerotiorum Mitovirus 2/KL1	SsMV2/KL1	87%	AEX91879
Sclerotinia sclerotiorum Mitovirus 2/nz1	SsMV2/NZ1	94%	AGC24231
Sclerotinia sclerotiorum Mitovirus 3/nz1	SsMV3/NZ1	44%	AGC24232
Sclerotinia sclerotiorum Mitovirus 4/nz1	SsMV4/NZ1	40%	AGC24233
Thielaviopsis basicola Mitovirus	TbMV	46%	YP_002822229

یابی به موسسه DSMZ آلمان ارسال شدند. توالی تعیین شده در مورد جدایه SsMV/Cae با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul*et al.* 1997) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) با ۱۳ توالی پروتئین آر ان ای پلیمراز وابسته به آر ان ای (RdRp) جنس میتوویروس ثبت‌شده در بانک ژن (GenBank) مقایسه شد. در جدول شماره ۱، فهرست و مشخصات توالی‌های آمینواسیدی RdRp جدایه‌های خارجی جنس میتوویروس که برای مقایسه با توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین RdRp جدایه ایرانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند، ارائه شده است. هم‌ردیفی توالی‌ها (multiple sequence alignment)، با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL X, ver. 2.1 (Larkin *et al.* 2007) انجام گردید. آنالیز تبارزایی به کمک روش Neighbor Joining (NJ) و ۱۰۰۰ مرتبه bootstrap انجام شد و درخت تبارزایی با استفاده از نرم افزار Mega 5 رسم گردید. به عنوان عضو برون گروه (out group)، از توالی پروتئین RdRp دو ویروس ScNV-23s و ScNV-20s متعلق به جنس *Narnavirus* استفاده شد.

انتقال افقی مایکوویروس

به منظور بررسی انتقال افقی مایکوویروس از جدایه Cea به جدایه Lekh، از هر جدایه قارچی یک قرص میسلیومی روبروی هم به فاصله دو سانتی‌متری از دیواره و در یک سمت تشتک پتری حاوی PDA با فاصله ۱۵ میلی‌متری هم قرار داده شدند. پس از گذشت ۳۶ ساعت، از حاشیه بیرونی پرگنه جدایه Lekh، یک قرص میسلیومی کوچک برداشته و در یک تشتک پتری جدید PDA قرار داده شد و در دمای ۱±۲۱درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مداوم درون انکوباتور قرار داده شد (Zhang *et al.*

2006). بعد از تهیه میسلیوم از این پرگنه جدید (Lekh+V)، از هر سه تکرار، بصورت جداگانه استخراج آر ان ای دولای با استفاده از ستون سلولز طبق آنچه که در قبل ذکر شد انجام گرفت.

انتقال عمودی مایکوویروس

آزمون انتقال عمودی مایکوویروس جدایه Cea طی فرایند تولید مثل جنسی از طریق تولید آپوتسیوم و بر اساس روش *باغبانی* و *همکاران* (۱۳۸۳) انجام گرفت. بعد از تشکیل و بلوغ آپوتسیوم‌ها، سطح مقعر آن‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل شسته شد تا اسپورها در آب آزاد شوند و سپس سوسپانسیون حاصله در محیط آب-آگار دو درصد درون تشتک‌های پتری کشت داده شدند. پس از جوانه‌زنی اسپورها، نوک ریسه تازه روئیده قارچ به محیط کشت PDA منتقل شد و درون انکوباتور با دمای ۱±۲۱درجه سلسیوس قرار داده شد. جهت اطلاع از انتقال مایکوویروس به آسکوسپورها، از هر پرگنه تولیدشده از آسکوسپورها، پس از تهیه میسلیوم قارچی، استخراج آر ان ای دولای طبق آنچه که در قبل ذکر شد انجام گرفت.

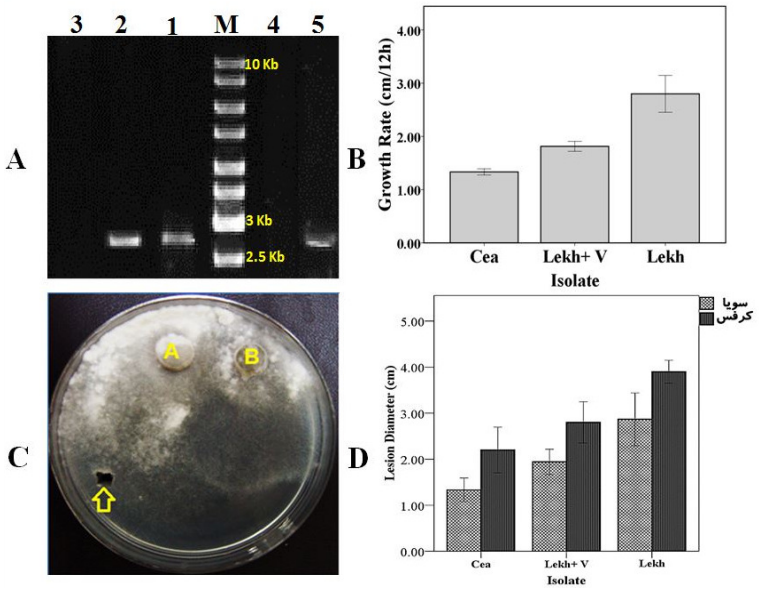
حذف مایکوویروس از قارچ

به منظور بررسی تاثیر مایکوویروس بر ریخت‌شناسی و بیماری‌زایی میزبان اقدام به حذف آر ان ای دولای از جدایه قارچی شد. برای حذف آر ان ای دولای از جدایه Cea از سیکلوهگزامید به عنوان ممانعت‌کننده از سنتز RNA و پروتئین همراه با روش نوک ریسه استفاده شد. در این آزمایش از سیکلوهگزیمید (Sigma) در سه غلظت ۳۰، ٤٠ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر در سه تکرار استفاده شد. از حاشیه پرگنه جدایه Cea رشدیافته در محیط‌های حاوی سیکلوهگزیمید، نوک ریسه برداشته شد و به محیط PDA فاقد سیکلوهگزیمید منتقل شد و تشتک‌های حاصل درون انکوباتور با دمای ۱±۲۱درجه سلسیوس قرار داده شدند (Zhou&Boland 1998). جدایه های حاصل به محیط کشت مایع PDB منتقل شدند و بعد از تهیه میسلیوم قارچی، استخراج به روش ذکر شده در قبل انجام گرفت.

آزمون بیماری‌زایی و ریخت شناسی

به منظور بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های Lekh +V، Cea و Lekh، گیاهان سویا[1] (رقم DPX) و کرفس[2] (واریته Dulce) انتخاب شدند. برای آماده‌سازی گیاهان مورد آزمایش، دمبرگ‌های کرفس در قطعاتی به طول ده سانتی‌متر و برگ‌های جداشده سویا در اتانول ۷۰٪ ضدعفونی سطحی شدند و بقایای الکل با آب مقطر استریل شستشو داده شد. قرص میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از دو جدایه موردنظر که از حاشیه در حال رشد پرگنه سه روزه جداسازی شده بود، روی سطح برگ بریده‌شده سویا و همچنین دمبرگ بریده‌شده کرفس قرار داده شد. برگ‌ها درون تشتک‌های پتری سترون قرار گرفتند. برای مطالعه اثر هر جدایه قارچی روی هر یک از گیاهان نامبرده سه تکرار در نظر گرفته شد. از هر یک از گیاهان نامبرده، سه قطعه گیاهی (برگ یا دمبرگ) به عنوان شاهد برای اثبات عدم اثر سوء قرص آگار به کار برده شد. روش قرار دادن قرص آگار مشابه با روش مایه‌زنی بود که شرح داده شد با این تفاوت که قرص آگار فاقد میسلیوم قارچ بود. گیاهان مایه‌زنی‌شده در انکوباتوری با دمای ۱±۲۱ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی نزدیک به ۱۰۰٪ نگهداری شدند (Zhang *et al*. 2009; Boland 2004).

[1] *Glycinemax*
[2] *Apium gravelones*



شکل ۱(A).: نقوش الکتروفـورزی آرانایـدولای مـرتبط بـا جدایـه‌هـای Cea (راهـک ۱)، Lekh + V (راهـک ۲)، Lekh (راهـک۳) وآرانایدولایمرتبط با جدایه Ceaدر تیمار با آنزیم RNase A در غلظت ۰/۳ مولارNaCl(راهک ٤) و غلظت ۰/۰۳ مولارNaCl(راهـک ٥) . M: مارکر ۱۰ کیلو جفت بازی. (C): کشت متقابل دو جدایه Cea(B) و Lekh(A). قرص میسلیومی (بـا فلـش نشـان داده شـده است) از حاشیه پرگنه جدایه Lekh برداشته شده و به محیط کشت جدید منتقل گردید. (B, D): بترتیب مقایسه قطر زخم و نرخ رشـد خطی سه جدایه Cea، Lekh + V و Lekh.

Fig. 1. (A): Agarose gel electrophoresis of dsRNA associated with isolate Cea(1), Lekh +V(2), Lekh(3) and RNase A (0.03 M NaCl) (4) and RNase A (0.3 M NaCl) (5) treatment of dsRNA extracted fromisolate Cea . M: 10 kbp marker. (C):Adualculture ofstrains Cea(B) and Lekh(A). A mycelial agar plug (arrow) was removed from the colony margin of strain Lekh and transferred to a fresh PDA plate containing. (B, D): Lesion diameter and growth rate comparisons between isolates Cea, Lekh + V and Lekh.

پس از گذشت ٦٠ ساعت از مایـه‌زنـی، علائـم ایجادشـده روی برگ‌ها و دمبرگ‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. طـول و عرض لکه‌های ایجادشده به عنوان مشاهدات بیمـاری‌زایـی اندازه‌گیری و ثبت شدند.

میزان رشد خطی میسـلیوم در جدایـه‌هـای Lekh + V، Cea و Lekh، در فاصله زمانی دوازده سـاعته روی محـیط کشت PDA، با انجام سه تکرار اندازه‌گیری شد.

نتایج

جداسازی و آنالیز داده‌های تـوالی‌یـابی آر ان ای دولای جدایه Cea قارچ *S. sclerotiorum*

الکتروفورز محصول اسـتخراج آر ان ای دولای جدایـه Cea در ژل آگاروز ۰/۸ درصـد سـبب تشـکیل یـک بانـد واضح با وزن تقریبی حدود ۲/۵ کیلـو جفـت بـاز گردیـد (شکل ۱). این میزان با اندازه تقریبی مورد انتظار در مـورد قطعات آر ان ای دولای اعضای جنس میتـوویروس (۲/۷-۲/۳ کیلو جفت باز) مطابقت داشـت (King *et al.* 2012). همچنین قطعه استخراج شده به تیمار آنزیمی بـا DNase I و RNase A در غلظـت زیـاد نمـک NaCl (۰/۳ مـولار) مقاومت نشان داد اما همین قطعه در اثـر تیمـار آنزیمـی بـا RNase A در غلظت کم نمک NaCl (۰/۰۳ مولار) حـذف گردید لذا ماهیت آر ان ای دولای این قطعه به اثبات رسید (شکل ۱).

مقایسه میزان یکنـواختی تـوالی آمینواسـیدی ژن RdRp

جدایه SsMV/Cea با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن حاکی از مشابهت ۹٤ درصدی با جدایه نیوزیلندی SsMV2/NZ1 و ۸۷ درصد مشابهت با جدایه آمریکایی SsMV2/KL1 بود (جدول ۱). از طرفی در درخت فیلوژنی رسم‌شده براساس روش Neighbour Joining این سه جدایه در یک خاندان مستقل و مونوفیلتیک با حمایت بالای (۱۰۰%) درجه اعتبارسنجی قرار گرفتند (شکل ۲).

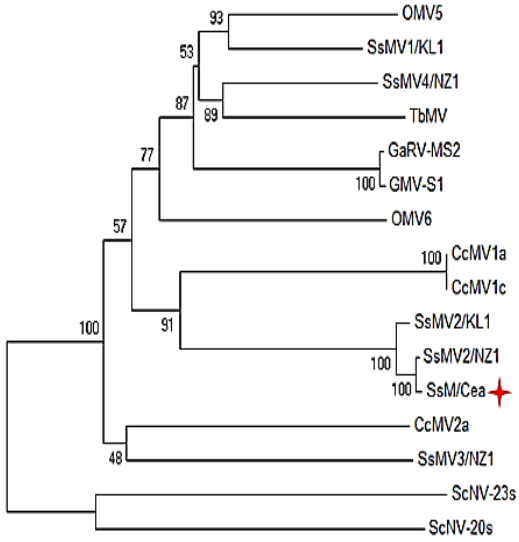
تلاش برای حذف مایکوویروس از هیف قارچی بوسیله تیمار سیکلوهگزیمید و نوک هیف در هیچکدام از تکرارها و غلظت‌های ذکرشده موفقیت‌آمیز نبود. افزایش غلظت سیکلوهگزیمید بیشتر از مقادیر ذکر شده نیز مانع از رشد پرگنه گردید.

انتقال عمودی مایکوویروس و تاثیر آن بر ریخت شناسی نتاج

نتایج حاصل از کشت تعداد ۱۰۰ آسکوسپور و استخراج آر ان ای دولای حاصل از اسپورزایی جنسی *S. Sclerotiorum* نشان داد که تنها ۵۵ درصد آسکوسپورها حاوی ویروس بودند. پرگنه حاصل از این آسکوسپورهای آلوده همانند جدایه آلوده مادری رشد کمتری داشتند و از قدرت بیماری‌زایی کمتری برخوردار بودند در حالی که پرگنه حاصل از آسکوسپورهای عاری از ویروس از نظر میزان رشد و قدرت بیماری‌زایی وضعیت طبیعی داشتند.

انتقال افقی میتوویروس و تاثیر آن بر بیماری‌زایی و ریخت شناسی جدایه گیرنده

در جریان انتقال افقی و تلاش برای انتقال ویروس از جدایه آلوده به جدایه عاری از ویروس، میتوویروس در تمام تکرارها طی کشت متقابل (شکل ۱) از جدایه Cea که



شکل۲. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش Neighbor joining مربوط به توالی آمینواسیدی ژن *RdRp* جدایه ایرانی بدست‌آمده در این تحقیق (SsMV/Cea)و ۱۳ جدایه نماینده از جنس *Mitovirus* از توالی آمینواسیدی ژن *RdRp* متعلق به دو *Narnaviruses*.ScNV-20s و ScNV-23s به عنوان عضو برون گروه استفاده شده است. اعداد روی شاخه‌ها درجه اعتبارسنجی را نشان می‌دهد.

Fig. 2. Neighbor joining phylogenetic tree based onamino acid sequences of the *RdRp* gene of Iranian isolate obtained in this study (SsMV / Cea) and 13 representative strains of the genus *Mitovirus*. RdRp amino sequences of two *Narnaviruses*.ScNV-20s and ScNV-23s were used as outgroup. Numbers next to branches represent bootstrap values based on 100 replicates.

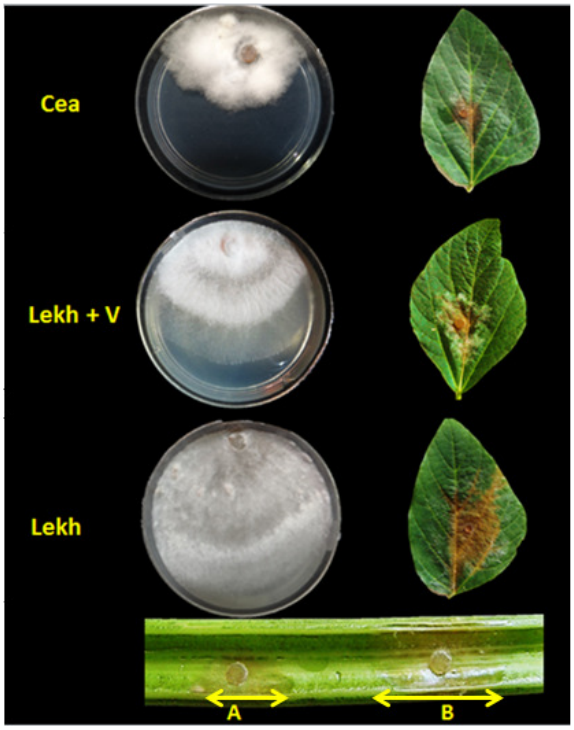
بصورت طبیعی آلوده بود به جدایه Lekh منتقل گردید و جدایه آلوده جدیدی به نام Lekh +V بدست آمد که حضور مایکوویروس در این جدایه نیز از طریق استخراج آر ان ای دولای بررسی و اثبات گردید. جدایه آلوده‌شده جدید رشد کمتری در محیط PDA نسبت به جدایه مادری داشت. میزان رشد خطی میسلوم جدایه Cea برابر با ۱/۳ (cm/12h) بود در حالی که در جدایه مادری این میزان

برابر ۲/۸ (cm/12h) بود. پس از انتقال مایکویروس، میزان رشد خطی میسلیوم در جدایه آلوده‌شده به ۱/۸ (cm/12h) رسید، که این مقدار به میزان رشد در جدایه Cea نزدیکتر است (شکل ۱).

نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی نشان داد اندازه لکه-های ایجادشده توسط جدایه Lekh +V نسبت به Lekh کاهش قابل‌توجهی داشته است. شکل (۱) و (۳) مقایسه قطر زخم حاصل از مایه‌زنی سه جدایه در برگ سویا و دمبرگ کرفس را نشان می‌دهد، که میانگین قطر زخم‌ها در برگ سویا توسط جدایه Cea و Lekh +V به ترتیب برابر ۱/۳۳ و ۱/۹٤ سانتی‌متر بود در حالی که در جدایه Lekh برابر با ۲/۸٦ بود. همچنین در دمبرگ کرفس این مقادیر در جدایه Cea، Lekh +V و Lekh به ترتیب برابر با ۲/۲، ۲/۸ و ۳/۹ سانتی متر بود.

بحث

آلودگی به میتوویروس‌ها اغلب با کاهش قدرت بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر گیاهی همراه می‌باشد مانند *B. cinerea* (Wu *et al*. 2007)، *C. parasitica* (Park *et al*. 2006)، *O. novo-ulmi* (Hong *et al*.1999)، *R. solani* (Lakshman *et al*. 1998)، *S. homoeocarpa* (Deng *et al*. 2003) و *S. sclerotiorum* (Xie&Ghabrial 2012). با این وجود میزان کم‌آزاری ناشی از آلودگی به میتوویروس‌ها متغیر می‌باشد. برای مثال *cubensismitovirus*1b *Cryphonectria* و *Cryphon-ectria cubensismitovirus* 2a تاثیر اندک و غیرقابل‌توجهی بر میزبان‌شان دارند در حالی که *B. cinerea* هنگامی که توسط *Botrytiscinerea-mitovirus*1(BcMV1) آلوده می‌شود به شدت توان



شکل ۳. ریخت شناسی پرگنه (چپ) و بیماری‌زایی در برگ-های سویا (راست) مربوط به جدایه‌های Cea، Lekh +V و Lekh. بیماری‌زایی جدایه Lekh +V (A) و Lekh (B) در دمبرگ کرفس.

Fig. 3.Colony morphology (left) and pathogenicity assays (right) of the Cea, Lekh+V and Lekh isolates based on their reaction on detached soybean leaves. Pathogenicity assay of theLekh+V (A) and Lekh (B) on celery.

بیماری‌زایی خود را از دست می‌دهد (Wu *et al*. 2007). نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که حضور میتوویروس در *S. sclerotiorum* سبب کاهش قابل توجه رشد پرگنه درشرایط آزمایشگاهی و قدرت بیماری‌زایی روی هر دو میزبان مختلف شد (شکل٤).

تیمار با سیکلوهگزیمید سبب ممانعت از سنتز RNA می‌گردد و روشی معمول برای حذف آلودگی‌های مایکوویروسی از نوع آر ان ای دولای و آر ان ای تک‌لای در قارچ‌ها می‌باشد. عدم‌موفقیت در حذف میتوویروس‌های مختلف با این تیمار در جنس *Sclerotinia* امری عادی

می‌باشد و تاکنون توسط محققین مختلفی گزارش شده است (Boland 1992; Zhou&Boland 1998; Xie&Ghabrial 2012; Khalifa&Pearson 2013) به طور کلی حذف میتوویروس‌ها از این جنس قارچی بنا به دلایل نامعلومی امکان پذیر نمی‌باشد به نحوی که تیمار دمایی، تیمار با کلرامفنیکل و همچنین تیمار همزمان این دو و سیکلوهگزیمید نیز قادر به حذف آر ان ای دولای نبوده است (Xie&Ghabrial 2012).

تنها یک ویروس از جنس *Mitovirus* در جدایه Cea یافت شد. آلودگی منفرد در قارچ‌ها به مایکوویروس‌ها بر خلاف آلودگی‌های همزمان به دو یا چند ویروس از فراوانی بسیار کمتری برخوردار است. از جمله این موارد معدود می‌توان به آلودگی منفرد *R. solani* (Tavantzis&Brandy 1988) و *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Baeza *et al.* 2009) اشاره کرد. با این وجود تاکنون هیچ موردی از آلودگی منفرد به هیچ جنس ویروسی در *S. sclerotiorum* گزارش نشده است و همواره حداقل دو مایکوویروس و یا بیشتر از جدایه‌های آلوده این قارچ گزارش شده است، این در حالی است که در اغلب این آلودگی‌های مخلوط حداقل دو ویروس از جنس *Mitovirus* حضور داشتند.

نتایج حاصل از آنالیز تبارزایی مربوط به توالی آمینو اسیدی RdRp نشان داد که SsMV/Cea دارای ۹٤ درصد مشابهت با SsMV2/NZ1 و ۸۷ درصد با SsMV2/KL1 می‌باشد. در درخت رسم شده بر اساس RdRp، این جدایه‌ها در یک خاندان مستقل و مونوفیلتیک با حمایت آنالیز درجه اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد قرار گرفتند. این نتایج ثابت می‌کند که میتوویروس استخراج شده از جدایه ایرانی Cea قارچ *S. sclerotiorum* متعلق به گونه SsMV2 می‌باشد.

مشخص شده است که اسپورزایی در *O. novo-ulmi* منجربه از دست رفتن قطعات مختلف آر ان ای دولای در نتاج می‌شود (Cole *etal.*1998) و پیشنهاد شده است که این امر می‌تواند ناشی از تجمع پروتئین‌های میزبان باشد که در نهایت سبب محدود شدن همانندسازی RNA می‌گردد (Buck 1996). احتمالا با مکانیسم مشابه، اسپورزایی جنسی *S. sclerotiorum* منجر به کاهش همانندسازی ویروس می‌شود و تنها ۵۵ درصد آسکوسپورها حاوی ویروس بودند. این مشاهدات با نتایج حاصل از نرخ انتقال عمودی میتوویروس SsMV3/NZ1 و SsMV4/NZ1 در جدایه شماره 16235 قارچ *S. sclerotiorum* از نیوزیلند مطابقت داشت.از طرفی این پدیده ممکن است سبب حذف آلودگی‌های همزمان مایکوویروسی در فرایند آسکوسپورزایی طی چندین نسل گردیده و به نوعی می‌تواند عدم‌وجود آلودگی همزمان به دو یا چند میتوویروس همزمان در جدایه ایرانی را تا حد زیادی توجیه نماید.

سپاسگزاری

این تحقیق در بخش بیماری شناسی، گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، انجام گرفته است که بدین وسیله تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (۱۵۸-۱۵۹) متن انگلیسی مراجعه شود.