

## پراکندگی و برخی ویژگی‌های بیولوژیکی سویه‌های گندم و جو ویروس کوتولگی گندم در ایران\*

### DISTRIBUTION AND PARTIAL BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF WHEAT AND BARLEY STRAINS OF WHEAT DWARF VIRUS IN IRAN

مائده لطفی پور، سید علی اکبر بهجت نیا\*\*، علیرضا افشاریفر و کرامت‌اله ایزدپناه<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۲۸)

#### چکیده

بیماری‌های کوتولگی و زردی در غلات که توسط ویروس‌های گروه کوتولگی زرد جو (BYDV)، کوتولگی زرد غلات (CYDV) و ویروس کوتولگی گندم (WDV) ایجاد می‌شوند خسارت زیادی به این محصولات در ایران وارد می‌نمایند. حداقل دو سویه از WDV، سویه جو (WDV-B) و سویه گندم (WDV-W)، گزارش شده‌اند. در این مطالعه پراکنش سویه‌های WDV در مزارع غلات ایران مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از مزارع گندم و جو در سه استان چهارمحال و بختیاری، فارس و یزد طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۸۸ نمونه برداری انجام شد. در مورد این نمونه‌ها و نمونه‌های مربوط به سال‌های ۱۳۸۵-۱۳۸۴، از چند استان دیگر، مراحل استخراج دی‌ان‌ای ویروس، آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی در سطح سویه و تعیین ترادف انجام شد. بررسی‌ها نشان داد که این ویروس در تمام مناطق نمونه برداری شده وجود دارد. از ۲۷۰ نمونه با علائم کوتولگی و زردی ۱۵۵ نمونه به WDV آلوده بودند که از بین آنها ۸۵ نمونه (۵۵ درصد) آلوده به WDV-W و ۷۰ نمونه (۴۵ درصد) آلوده به WDV-B بودند. نتایج این بررسی نشان داد که در شرایط طبیعی WDV-W علاوه بر گندم، جو را نیز آلوده می‌کند اما WDV-B به طور طبیعی تنها از جو آلوده جدا می‌شود. بنابراین هر دو سویه WDV همراه با ویروس‌های گروه BYDV از عوامل اصلی ایجادکننده زردی و کوتولگی در مزارع غلات ایران هستند. با توجه به پراکنش وسیع WDV در مناطق مختلف کشور، انتقال آن توسط زنجیرک به گیاهان گندم و جو به اثبات رسید. شناسایی ناقل WDV با توجه به شکل اندام تناسلی جنس نر انجام شد و گونه *Psammotettix alienus* به عنوان ناقل WDV در ایران معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: جمینی ویروس، جو، زنجیرک *Psammotettix alienus*، گندم، ماستری ویروس، ویروس کوتولگی گندم

\*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

\*\* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: behjatni@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیاران و استاد مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

## مقدمه

گردید (Behjatnia et al. 2011).

ویروس کوتولگی گندم متعلق به جنس *Mastrevirus* از تیره *Geminiviridae* است. اعضای این جنس دارای ژنوم دی ان ای حلقوی تک لای یک بخشی هستند که حاوی ۴ چارچوب خوانش است. دو چارچوب خوانش V1 و V2 روی رشته ویریونی (virion-sense strand) قرار دارند که به ترتیب پروتئین‌های پوششی (coat protein, CP) و حرکتی (movement protein, MP) را کد می‌کنند (Bridson et al. 1990). دو چارچوب خوانش C1 و C2 روی رشته مکمل (complementary-sense strand) هستند که با تشکیل یک ترانوشت به هم چسبان (spliced transcript)، پروتئین همراه با همانندسازی (replication-associated protein, Rep) را کد می‌کنند (Gabriele et al. 1999). این ویروس‌ها عمدتاً گیاهان تک لپه متعلق به خانواده Poaceae را آلوده می‌کند و با زنجیرک‌های برگ (leafhoppers)، به صورت گردشی و غیر تکثیری منتقل می‌شوند. دو گونه *P. striatus* (Linnaeus) و *Psammotettix alienus* (Dahlbom) متعلق به خانواده Cicadellidae به عنوان ناقل WDV گزارش شده‌اند. در بیشتر گزارش‌ها گونه *P. alienus* به عنوان ناقل ویروس شناخته شده است. با وجود این در فنلاند هر دو گونه و در چین و روسیه گونه *P. striatus* به عنوان ناقل WDV معرفی شده‌اند (Wang et al. 2004; Lemmetty and Huusela-Veistola 2007). اخیراً یک گونه جدید از این جنس به نام *P. provincialis* به عنوان ناقل WDV در کشور سوریه گزارش شده است (Ekzayez and Kumari 2011). تشخیص دو گونه *P. striatus* و *P. alienus* از لحاظ مورفولوژیکی و شرایط اکولوژیکی ممکن نیست (Nielson 1968). تنها راه تفکیک این دو گونه آلت

کوتولگی شدید، زردی و موزائیک از علائم رایج در مزارع غلات می‌باشند. عوامل بیماری‌زای گوناگونی در ظهور و تشدید این علائم نقش دارند که در میان آنها، ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند (Zilinsky 1983). بیش از ۵۰ ویروس گیاهی مختلف می‌توانند گندم را آلوده کنند، با وجود این در هر منطقه تنها تعداد انگشت شماری از ویروس‌ها مسأله‌ساز می‌باشند. در ایران تا کنون ویروس‌های گروه کوتولگی زرد جو (Barley yellow dwarf viruses, BYDVs)، موزائیک رگه ای گندم (Wheat streak mosaic virus, WSMV)، کوتولگی زبر ذرت (Maize rough dwarf virus)، موزائیک ایرانی ذرت (Iranian maize mosaic virus)، نوارک ایرانی گندم (Iranian wheat stripe virus)، کوتولگی زرد غلات (Cereal yellow dwarf virus, CYDV-RPV)، موزائیک خاکزاد گندم (Wheat soil-borne mosaic virus)، ویروس کوتولگی گندم (Wheat dwarf virus, WDV) و موزائیک نوار زرد جو (Barley yellow striate mosaic virus) تشخیص و گزارش شده‌اند. از مهم‌ترین و گسترده‌ترین آنها در ایران، BYDVs، WSMV و WDV است (Behjatnia et al. 2011; Izadpanah et al. 2003).

عامل زردی در غلات عمدتاً ویروس‌های کوتولگی زرد جو و غلات تشخیص داده شده و مشخص گردیده است که BYDV-PAV از این گروه ویروس غالب در ایران است (Izadpanah et al. 2003). طحان در سال ۲۰۰۵ به کمک PCR وجود ویروس کوتولگی گندم (WDV) را در استان خراسان رضوی نشان داد. در ادامه مطالعات با استفاده از روش هیبریداسیون نقطه ای و آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی WDV، وجود این ویروس در مزارع گندم و جو قطعی

آزمون PCR به بررسی پراکنش سویه‌های گندم و جو WDV در مزارع آلوده مناطق مختلف کشور پرداخته شد. هم‌چنین چون تاکنون هیچ اطلاعی در مورد ناقل WDV در ایران در دسترس نبود، در این تحقیق نسبت به شناسایی ناقل WDV نیز اقدام شد.

## روش بررسی

### منبع ویروس

در طول سال‌های ۱۳۸۵-۱۳۸۴ و ۱۳۸۹-۱۳۸۸ از مزارع کشت گندم و جو مناطق مختلف کشور بازدید به عمل آمد و از گیاهان با علائم زردی و کوتولگی نمونه برداری و در فریزر نگهداری شد. نوع گیاه و محل جمع‌آوری گیاهان دارای علائم زردی و کوتولگی در بخش نتایج آورده شده است.

### تشخیص WDV

به منظور تشخیص مقدماتی WDV از آزمون Indirect-ELISA (Converse and Martin 1990) با آنتی سرم چند همسانه‌ای WDV شرکت DSMZ آلمان استفاده شد. بافت‌هایی که در این آزمون واکنش مثبت نشان دادند، به عنوان بافت آلوده در آزمون واکنش زنجیره ای پلی مرز (polymerase chain reaction, PCR) استفاده شد.

### استخراج دی ان ای از گیاه، تکثیر و تعیین ترادف

#### قطعاتی از ژنوم WDV

در این مرحله جهت استخراج دی ان ای ویروس از گیاه، از سیلیکا ماتریکس در ترکیبی از روش مکنزی و همکاران (Mackenzie et al. 1997) و روش بوم و همکاران (Boom et al. 1990) استفاده شد.

تناسلی جنس نر می‌باشد که در گونه *P. alienus* دارای فرورفتگی است در حالی که در گونه *P. striatus* کاملاً گسرد و بدون فرورفتگی است (Greene 1971).

ویروس کوتولگی گندم دارای دو سویه گندم و جو می‌باشد (Köklü et al. 2007). با همسانه‌سازی و تعیین ترادف ژنوم کامل یک جدایه WDV در استان خراسان و با مقایسه ترادف این ویروس با ترادف‌های موجود در بانک ژن مشخص شد که این ویروس یک جدایه جو از WDV است و نام آن جدایه ایرانی سویه جو ویروس کوتولگی گندم Wheat dwarf virus-Barley [IRAN-Barley] با کوتاهه WDV-Bar[IR:Bar] انتخاب شد. آنالیزهای فیلوژنتیک انجام شده نشان داد که WDV-Bar[IR:Bar] بیشترین شباهت (به میزان ۹۷/۱ درصد) را با سویه جو ویروس کوتولگی گندم (WDV-B) از آلمان دارد در حالی که با سویه گندم ویروس کوتولگی گندم (WDV-W) حداکثر دارای ۸۶/۳ درصد شباهت است. تفاوت دیگر سویه‌های گندم و جو WDV مربوط به وجود و یا حذف یک قطعه ۱۲ نوکلئوتیدی در نزدیکی موقعیت نوکلئوتید ۱۴۰۰ ژنوم ویروس واقع در انتهای آمینی پروتئین همراه با همانندسازی (Rep) می‌باشد (Behjatnia et al. 2011). اگرچه بهجت‌نیا و همکاران تا حدودی مناطق انتشار WDV را در استان‌های مختلف ایران گزارش نمودند ولی در مورد پراکنش سویه‌های گندم و جو این ویروس در ایران تا کنون پژوهش جامعی صورت نگرفته است. در تحقیق حاضر ضمن بررسی مناطق گسترش WDV، از اختلاف وجود و یا عدم وجود یک قطعه ۱۲ نوکلئوتیدی به ترتیب در ژنوم سویه‌های گندم و جو WDV استفاده شد و با طراحی آغازگرهای اختصاصی در سطح گونه و سویه و استفاده از آنها در

واسرشتن، اتصال و سنتز به ترتیب در دمای های  $94^{\circ}\text{C}$ ،  $55^{\circ}\text{C}$  یا  $58^{\circ}\text{C}$  بسته به مورد و  $72^{\circ}\text{C}$  هر کدام به مدت یک دقیقه بود. پس از آخرین چرخه، مخلوط PCR به مدت ۷ دقیقه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  نگه‌داری شد. قطعات تکثیر شده با الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. باند DNA مورد نظر از ژل بریده شد و DNA با استفاده از کیت Qiaquick gel extraction kit (QIAGEN, Germany) از ژل استخراج و جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت Tech Dragon کشور هنگ‌کنگ ارسال شد.

**مقایسه سویه‌های گندم و جو WDV در ایران با جدایه‌های WDV موجود در بانک ژن بر اساس ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژنوم و ویروس**

ترادف‌های به دست آمده از ناحیه بین ژنی کوچک (SIR) و قسمت انتهایی ۵' ژن Rep سویه‌های گندم و جو WDV در ایران با استفاده از روش Clustal W و از طریق هم‌ردیف‌سازی با برنامه MegAlign با یکدیگر و با ترادف‌های ناحیه مشابه جدایه‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. علامت اختصاری، رس‌شمار (Accession number) و سایر خصوصیات ویروس‌هایی که در این مقایسه مورد استفاده واقع شدند در جدول ۲ نشان داده شده است.

#### منبع حشره ناقل WDV و شرایط تکثیر در گلخانه

با استفاده از دستگاه مکنده دیوک (D-Vac) نسبت به جمع‌آوری زنجبرک‌های موجود در مزارع گندم و جو آلوده منطقه باجگاه، در استان فارس و شهرکرد در استان چهارمحال و بختیاری طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۸۸ اقدام شد. زنجبرک‌های جمع‌آوری شده به گلخانه و اتاقک

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژنوم WDV ابتدا از یک جفت آغازگر اختصاصی WDV به نام‌های WDVIR1887<sup>v</sup> و WDVIR328<sup>c</sup> (جدول ۱) جهت تکثیر قطعه‌ای به طول حدود ۱۲۰۰ جفت باز شامل ناحیه بین ژنی بزرگ و بخش‌هایی از انتهای ۵' ژن‌های Rep و MP استفاده شد. این آغازگرها در سطح سویه به طور غیر اختصاصی عمل نموده و قادر به تکثیر قطعه مورد نظر از هر دو سویه گندم (WDV-W) و جو (WDV-B) ویروس کوتولگی گندم می‌باشند.

جهت تفکیک WDV-W و WDV-B از یک آغازگر اختصاصی WDV-W به نام WDVChina1430<sup>c</sup> (جدول ۱) که از روی ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل یک جدایه WDV-W از کشور چین با رس‌شمار EF536881 طراحی شده بود استفاده شد. این آغازگر با استفاده از یک ترادف ۱۲ نوکلئوتیدی اختصاصی که در قسمت انتهایی امینی ژن Rep جدایه‌های WDV-W می‌باشد طراحی شد (شکل ۱). بر این اساس آغازگر ۲۵ نوکلئوتیدی WDVChina1430<sup>c</sup> که حاوی ترادف ۱۲ نوکلئوتیدی WDV-W در انتهای ۳' خود بود بسیار اختصاصی عمل کرد و همراه با آغازگر WDVChina1130<sup>v</sup> قادر به تکثیر قطعه‌ای حدود ۳۰۰ جفت باز از ناحیه بین ژنی کوچک (SIR) و قسمت انتهایی ۵' ژن Rep از جدایه‌های WDV-W بود (جدول ۲).

آزمون PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل قالب دی ان ای استخراج شده از بافت برگ، آغازگرها (هر کدام به غلظت یک میکرومولار)، ۲۰۰ میکرومولار از هر یک از چهار داکسی‌ریبونوکلئوتید تری فسفات و ۰/۵ واحد آنزیم Taq دی ان ای پلی‌مراز در بافر مخصوص آنزیم انجام شد. PCR پس از یک مرحله ۴ دقیقه‌ای واسرشتن اولیه در دمای  $94^{\circ}\text{C}$ ، شامل یک برنامه ۳۵ چرخه‌ای از مراحل

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعات ژنوم WDV

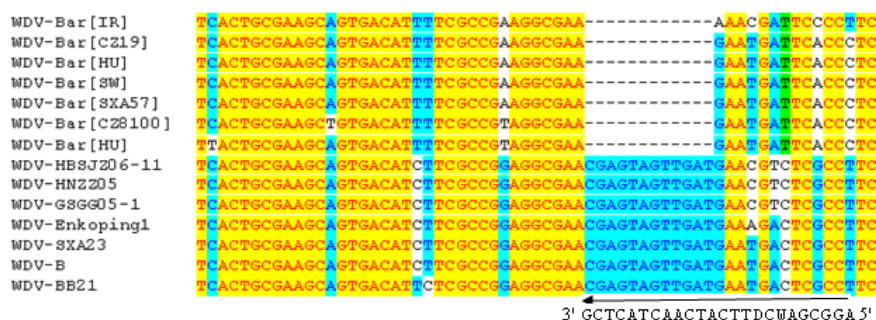
Table 1. Oligonucleotide primers used in PCR for amplification of WDV DNA fragments

Primers	Nucleotide position <sup>a</sup>	Annealing Temperature (°C)	Sequence (5' to 3')
آغازگر	موقعیت	دمای اتصال	ترادف (5' - 3')
WDVIR1887 <sup>V</sup>	1887-1907	55	CTTACGGAGTAGAGATGTTTC
WDVIR328 <sup>C</sup>	308-328	55	AACAGAGTGTAAGCAAGCCA
WDVChina1130 <sup>V</sup>	1130-1155	58	CTACGGCGTTTGTATGTTGATAGTG
WDVChina1430 <sup>C</sup>	1405-1430	58	AGGCGAGWCDTTCATCAACTACTCG

<sup>a</sup> Nucleotide position of WDV-IR and WDV-China primers as in the GenBank database under accession number FJ620684 and EF536881, respectively

<sup>V</sup> virion-sense strand primer

<sup>C</sup> complementary-sense strand primer



شکل ۱. هم‌ردیف سازی ترادف نوکلئوتیدی بخشی از انتهای آمینی پروتئین همراه با همانند سازی (Rep) جدایه ایران سویه جو ویروس کوتولگی گندم ایران (WDV-Bar[IR]) و مقایسه آن با ناحیه مشابه ژنوم سویه های جو و گندم ویروس کوتولگی گندم از سایر نقاط دنیا که ترادف آنها در بانک ژن موجود بود. خطوط فاصله به معنی نبود ۱۲ نوکلئوتید در جدایه‌های سویه جو WDV می‌باشد. موقعیت آغازگر WDVChina1430<sup>c</sup> با پیکان نمایش داده شده است. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۲ قید شده است.

Fig. 1. Nucleotide sequence alignment of the C-terminus of replication-associated protein (Rep) of the Iranian isolate of barley strain of WDV (WDV-Bar[IR]) with the same region of the wheat and barley strains of WDV sequences available in GenBank. The position of 12 conserved nucleotides (CGAGTAGTTGATG) in the wheat strains that are absent in the barley strains of WDV are marked with dashes (-). The position of WDVChina1430<sup>c</sup> oligonucleotide primer is shown by an arrow. See Table 2 for source of sequences.

گندم استفاده شد. بدین منظور گلدان‌هایی حاوی ۳-۵ گیاهچه جوان گندم و جو در مرحله ۲-۴ برگگی به کار برده شدند. زنجرها به دو حالت روی گیاهچه‌های جو و گندم قرار گرفتند. در حالت اول یک نر و یک ماده که از لحاظ مورفولوژی به هم شبیه بودند به صورت تصادفی روی گیاهچه‌های زیر سرپوش قرار گرفتند. در حالت دوم کلیه زنجرها نر و ماده جمع‌آوری شده بدون در نظر

مخصوص با رطوبت نسبی ۷۰-۴۰ درصد، دمای متوسط ۲۰ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. برای نگهداری زنجرها از گیاهچه‌های سالم گندم و جو در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک ضدعفونی شده، متشکل از دو قسمت خاک مزرعه و یک قسمت خاکبرگ استفاده گردید. برای ایجاد کلنی‌های اولیه زنجرها از گیاه جو و

جدول ۲. مشخصات ماستروویروس‌هایی که در مقایسه با جدایه‌های ایرانی WDV در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

Table 2. Mastreviruses used in this study in sequence comparisons with Iranian isolates of WDV

Virus	Abbreviation	Host	Country	Accession number
ویروس	کوتاهه	میزبان	نام کشور	رس شمار
<i>Wheat dwarf virus</i> -[Bg17]	Bg17	Barley	Bulgaria	AM989927
<i>Wheat dwarf virus</i> -[Tayuan]	WDV-[TA]	Wheat	China	DQ868525
<i>Wheat dwarf virus</i> -[SXYL05-1]	SXYL05-1	Wheat	China	EF536877
<i>Wheat dwarf virus</i> -[Henan zhengzhou]	[HNZZ05]	Wheat	China	EF536861
<i>Wheat dwarf virus</i> -[Hebei Shijiazhuang]	[HBSJZ06-11]	Wheat	China	EF536870
<i>Wheat dwarf virus</i> -[GSGG05-1]	GSGG05-1	Wheat	China	EF536859
<i>Wheat dwarf virus</i> -[Cz8100]	Cz8100	Wheat	Czech Republic	FJ546179
<i>Wheat dwarf virus</i> -[Cz19]	CZ19	Barley	Czech Republic	AM296019
<i>Wheat dwarf virus</i> -[SxA23]	SxA23	Wheat	Germany	AM296023
<i>Wheat dwarf virus</i> -[BB21]	BB21	<i>Secale cereale</i>	Germany	AM296021
<i>Wheat dwarf virus</i> -[SxA57]	SXA57	Barley	Germany	AM942044
<i>Wheat dwarf virus</i> -[B]	WDV-[B]	Psammodettix	Hungary	AM040732
<i>Wheat dwarf virus</i> -[HE]	WDV-[HE]	Barley	Hungary	FM999833
<i>Wheat dwarf virus</i> -[IRAN]	WDV-IR	Barley	Iran	FJ620684
	(WDV-Bar[IR])			
<i>Maize streak virus</i> -A[Kenya]	MSV-KE	Maize	Kenya	AF329885
<i>Wheat dwarf virus</i> -[Enkoping1]	WDV-[SE]	Wheat	Sweden	AJ311031
<i>Wheat dwarf virus</i> -[Sweden]	WDV-[SW]	Wheat	Sweden	X02869
<i>Wheat dwarf virus</i> -[Ukraine:Glevakha]	[UK-g]	Wheat	Ukraine	FN806783
<i>Wheat dwarf virus</i> -[HU-Pula]	WDV-[HU-P]	Wheat	Ukraine-Hungary	FN806786
<i>Wheat dwarf virus</i> -[HU-2Marton]	HU-M	Wheat	Ukraine-Hungary	FN806785

آلودگی آنها به WDV از طریق آزمون PCR و یا الیزا به اثبات شده بود منتقل شدند. برای افزایش راندمان انتقال، تیلرها و پنجه‌های گیاهان گندم و جو از ساقه اصلی جدا شدند تا ساقه اصلی که توسط آزمایش‌های مولکولی آلودگی آن به ویروس اثبات شده بود مستقیماً مورد تغذیه زنجرک‌ها قرار گیرد. بعد از ۷۲ ساعت تغذیه، زنجرک‌ها، به گیاهچه‌های سالم گندم و جو در مرحله ۲ برگگی انتقال داده شدند و به آنها اجازه داده شد تا به مدت ۵ روز از این گیاهان تغذیه نمایند. سپس زنجرک‌ها از روی گیاهان برداشته و گیاهان با سم کنفیدور سم‌پاشی شدند. بعد از

گرفتن تعداد آنها و تنها بر اساس شباهت‌های مورفولوژیکی در گلدان‌ها رها شدند. آبیاری گلدان‌ها یک روز در میان انجام گرفت. وضعیت زنجرک‌های ماده از لحاظ تورم و یا عدم تورم شکم مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشاهده تورم در شکم زنجرک‌های ماده به صورت انفرادی به گلدان مجزا منتقل شدند تا تولید مثل انجام گیرد.

#### روش انتقال

بعد از تکثیر کلنی زنجرک‌ها از یک زنجرک بارور، تعداد ۵۰-۱۰۰ عدد زنجرک توسط اسپراتور به گیاهانی که

اگرچه علائم اصلی مشاهده شده در مزارعی که در پائیز کشت شده بودند کوتولگی شدید و بی‌نظمی در تشکیل انشعابات فرعی بود (شکل C 2 و B 2)، اما در بعضی از نمونه‌های آلوده گندم و جو که در بهار کشت شده بودند تنها علائم زردی و موزائیک بدون کوتولگی دیده شد. در این گیاهان ابتدا تغییر رنگ به صورت سبزدی در برگ‌ها، سپس نوارهای زرد در پهنک برگ و در نهایت نکروز دیده شد. برگ‌ها به تدریج از نوک و حاشیه شروع به زرد شدن می‌کردند. حالت نکروز در برگ‌های مسن، کل برگ را فرا گرفته و برگ خشک می‌شد. در نمونه‌های گندم شهرکرد علائم کاهش رشد به صورت کوتولگی همراه با افزایش پنجه‌زنی و کوتاه ماندن پنجه‌ها (حالت چمنی شدن) و نواری شدن برگ‌ها مشاهده شد. هم‌چنین در بعضی از نمونه‌های غلات خودرو که در پائیز جمع‌آوری شده بودند و بعداً آلودگی آنها به ویروس کوتولگی گندم محرز شد تنها علائم کوتولگی بدون زردی و موزائیک دیده شد.

#### شناسایی و تفکیک سویه‌های WDV در بونه‌های گندم و

##### جو مبتلا به زردی و کوتولگی در ایران

برای شناسایی مقدماتی WDV در نمونه‌های جمع‌آوری شده و موجود مربوط به سه استان فارس، یزد و چهارمحال و بختیاری از آزمون الیزای غیرمستقیم (Indirect ELISA, Converse and Martin 1990) استفاده شد. آلودگی به WDV در بسیاری از مزارع گندم و جو استان‌های فارس، یزد و چهارمحال و بختیاری وجود داشت، به طوری که از مجموع ۲۰۶ نمونه مورد آزمایش ۱۴۰ (حدود ۶۸٪ نمونه‌ها) نمونه به آنتی سرم WDV واکنش مثبت نشان دادند. در این میان استان فارس با ۸۶/۳٪ آلودگی (۸۲ نمونه مثبت از ۹۵ نمونه مورد آزمایش) بیشترین میزان آلودگی و

گذشت سه الی چهار هفته، گیاهچه‌های مایه زنی شده از لحاظ وجود علائم کوتولگی و زردی مورد بررسی قرار گرفتند سپس برای اثبات آلودگی به WDV، این گیاهان ابتدا با آزمون الیزا بررسی شدند و در صورت مثبت بودن آزمون، استخراج دی‌ان‌ای از بافت گیاهی دارای علائم انجام و از آن برای PCR استفاده شد.

#### استخراج دی‌ان‌ای ویروس از بدن حشره با استفاده از

##### محلول CTAB

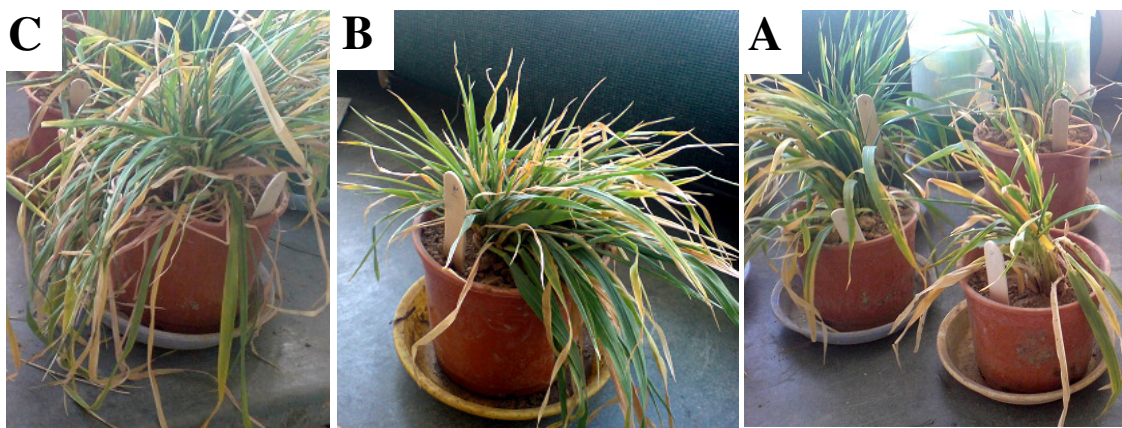
به منظور ردیابی ویروس در بدن زنجبرک، بعد از قرار دادن زنجبرک‌ها به مدت ۷۲ ساعت بر روی گیاهان آلوده به WDV، به صورت تصادفی تعداد ۶ عدد زنجبرک برداشته و استخراج دی‌ان‌ای ویروس از بدن آنها با استفاده از روش CTAB (Maxiner et al. 1995) انجام و از آن در آزمون PCR استفاده شد. دی‌ان‌ای تکثیر شده پس از خالص سازی از ژل جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت Tech Dragon کشور هنگ‌کنگ ارسال شد.

#### نتایج و بحث

##### خصوصیات فنوتیپی گیاهان آلوده به بیماری زردی و

##### کوتولگی

از علائم بارز گیاهان آلوده به ویروس کوتولگی گندم، زردی و کوتولگی است. در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ از مزارع گندم و جو مناطق و شهرستان‌های مختلف استان‌های فارس شامل باجگاه، مرودشت، سعادت شهر، زرقان، بوانات، سیوند، سده، دشتک و اقلید و چهارمحال و بختیاری شامل شهرکرد، گرک، قره و بلداجی بازدید به عمل آمد و تعدادی گیاه با علائم زردی و کوتولگی (شکل 2A) به گلدان منتقل و برای انجام آزمایش‌های سرولوژیکی و مولکولی بعدی در گلخانه نگهداری شدند.



شکل ۲. گیاهان جو دارای علائم کوتولگی و زردی (A و C)، و افزایش انشعابات فرعی و کوتاه ماندن انشعابات (B و C)، که از یک مزرعه در باجگاه شهرستان شیراز (A) و از یک مزرعه در منطقه سیوند شهرستان مرودشت (B و C) استان فارس جمع‌آوری و به گلدان‌های حاوی خاک منتقل شدند.

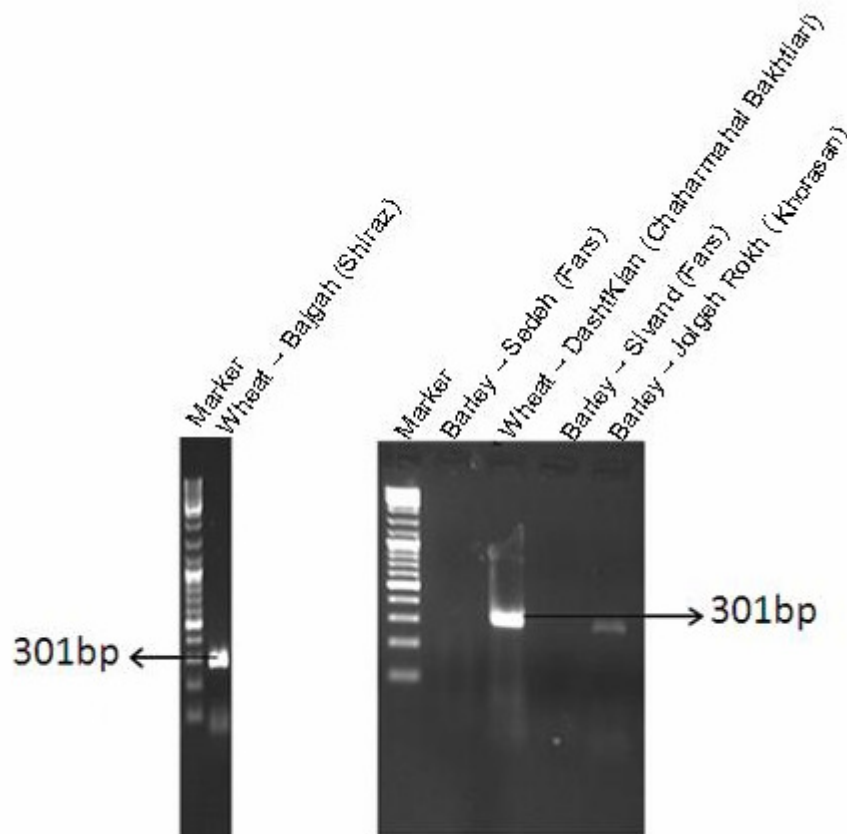
**Fig. 2. Yellowing and dwarfing symptoms (A and C) and proliferation of dwarfed tillers (B and C) in naturally infected barley plants collected in barley fields in, Bajgah (A) and Sivand (B and C) and transferred to the pots.**

در کل بر اساس نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌های آلوده به بیماری زردی و کوتولگی با آزمون PCR مشخص شد که از مجموع ۲۷۰ نمونه گندم و جو جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران (که حاوی ۱۴۰ نمونه آلوده به WDV بر اساس آزمون الیزا بود) [تعداد ۱۵۵ نمونه (حدود ۵۷٪) مبتلا به WDV بودند (جدول ۳)]. از کل نمونه‌های آلوده به WDV تعداد ۸۵ نمونه (حدود ۵۵٪) آلوده به WDV-W و مابقی یعنی ۷۰ نمونه (حدود ۴۵٪) آلوده به WDV-B بودند (جدول ۳)، میزان فراوانی دو سویه ویروس ممکن است مربوط به نوع و رقم گیاه باشد. جدول ۳ نوع و تعداد گیاهان مورد بررسی و آلوده به WDV از استان‌های مختلف ایران و شکل ۴ مناطق پراکنش WDV را به تفکیک نوع سویه گندم و جو در هر استان نشان می‌دهند. این بررسی نشان داد که WDV دارای پراکنندگی وسیعی در مزارع گندم و جو در استان‌های مختلف ایران است و کمتر مزرعه‌ای می‌توان پیدا نمود که به بیماری

استان یزد با ۲۴/۴٪ آلودگی (۱۱ نمونه مثبت از ۴۵ نمونه مورد آزمایش) کمترین میزان آلودگی را در بین ۳ استان بررسی شده نشان دادند. درصد آلودگی نمونه‌های استان چهارمحال و بختیاری ۷۱/۲٪ (۴۷ نمونه مثبت از ۶۶ نمونه مورد آزمایش) تعیین شد.

از آزمون PCR برای شناسایی و پراکنش سویه گندم ویروس کوتولگی گندم (WDV-W) و سویه جو ویروس مزبور (WDV-B) در نقاط مختلف ایران استفاده شد. ابتدا از جفت آغازگر  $WDVIR328^C / WDVIR1887^V$  (جدول ۱) که قطعه‌ای به اندازه ۱۱۷۵ جفت باز را از ژنوم هر دو سویه تکثیر می‌کند استفاده شد، سپس با استفاده از جفت آغازگر  $WDVChina1430^C$  و  $WDVChina1130^V$  (جدول ۱) که قطعه ۳۰۱ جفت بازی را فقط از ژنوم سویه گندم WDV تکثیر می‌کند و قادر به تکثیر قطعه‌ای از ژنوم سویه جو WDV نبود استفاده گردید نتایج این آزمون در شکل ۳ نشان داده شده است.





شکل ۳. نقوش الکتروفورزی محصول PCR تکثیر شده با جفت آغازگر اختصاصی  $p1430^C/p1130^V$  در بالای هر راهک به ترتیب نوع میزبان و منطقه نمونه برداری شده نشان داده شده است. (نشانگر: DNA ladder mix, Fermentas).

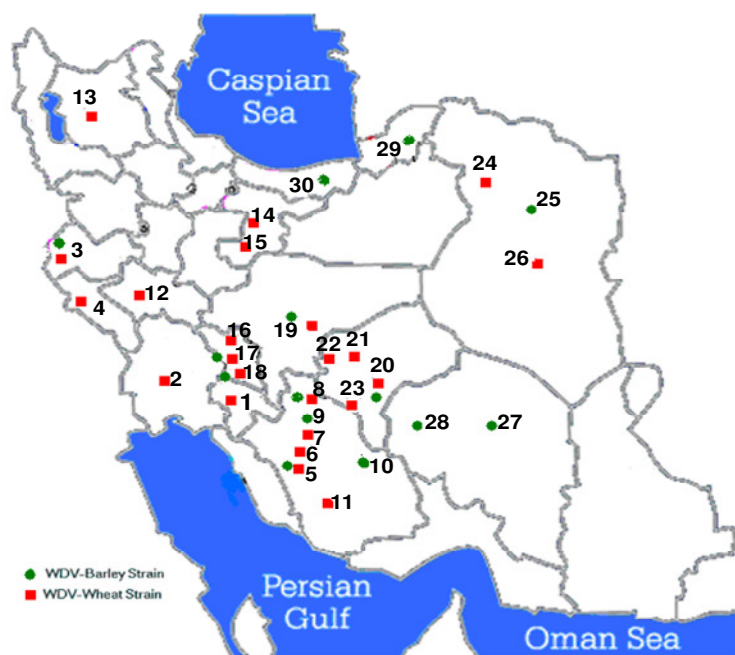
Fig. 3. Electrophoresis pattern of PCR products amplified from WDV-infected plants from different regions as indicated at the top of each lane. M= DNA ladder mix (Fermentas).

نمونه‌های جو علاوه بر WDV-B به طور طبیعی به WDV-W نیز آلوده بودند. گزارش‌های دیگری نیز وجود دارد که نشان می‌دهد که این سویه‌ها از لحاظ دامنه میزبانی در خانواده Poaceae با یکدیگر هم پوشانی دارند. علاوه بر جو، غلاتی چون triticale و علف‌های هرزی چون *Avena fatua* و *Apera spica-venti* به عنوان میزبان‌های هر دو سویه گزارش شده‌اند (Mehner et al. 2003). در جمهوری چک علف هرز *Apera spica-venti* نقش مهمی را در اپیدمیولوژی ویروس کوتولگی گندم ایفا کرده است (Vacke and Cibulka 1999). آلودگی طبیعی جو، یولاف،

زردی و کوتولگی آلوده باشد و حاوی این ویروس نباشد. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که WDV همراه با BYDVs و CYDVs از عوامل اصلی ایجاد کننده بیماری‌های زردی و کوتولگی در مزارع غلات ایران می‌باشد. این‌که کدام ویروس در هر منطقه غالب است نیاز به بررسی بیشتر همراه با آنالیزهای آماری دارد.

این بررسی هم‌چنین نشان داد که از تمام نمونه‌های گندم که به طور طبیعی به WDV آلوده بودند تنها سویه گندم این ویروس جدا شد. به عبارت دیگر WDV-B به طور طبیعی قادر به آلوده کردن گندم نبوده است. اما

ذرت و علف‌های هرز متنوعی به WDV-B گزارش شده است (Mehner *et al.* 2003)، اما به جزء



شکل ۴. مناطق پراکنش ویروس کوتولگی گندم به تفکیک نوع سویه گندم و جو در مناطق مورد بررسی. جدول زیر راهنمای اعداد به کار برده شده در نقشه است.

**Fig. 4. Distribution of WDV.barley and wheat strains in Iran. Numbers-indicate locations on the map as follow and corresponding number of each site on the map.**

فریمان Fariman	25	گازک Gazak	17	سیوند Sivand	9	یاسوج Yasouj	1
جلگه رخ Jolgeh Rokh	26	بداجی Boldaji	18	نیریز Neyriz	10	اهواز Ahwaz	2
کرمان Kerman	27	شهررضا Shahreza	19	فیروزآباد Firouzabad	11	کرمانشاه Kermanshah	3
رفسنجان Rafsanjan	28	یزد Yazd	20	لرستان Lorestan	12	ایلام Ilam	4
گرگان Gorgan	29	اردکان Ardekan	21	تبریز Tabriz	13	باجگاه Bajgah	5
کلاردشت Kelardasht	30	احمدآباد Ahmadabad	22	ساوه Saveh	14	زرقان Zarghan	6
		ابرکوه Abarkooh	23	کرج Karaj	15	مرودشت Marvdasht	7
		چناران Chenaran	24	شهرکرد Shahr-e-Kord	16	بوانات Bavanat	8

تحت شرایط آزمایشگاهی وجود دارد (Schubert *et al.* 2007). در این مطالعه مشخص شد از مجموع نمونه‌های جو آلوده به WDV حدود ۷۸٪ آلوده به WDV-B و ۲۲٪ آلوده به WDV-W می‌باشد که حاکی از ترجیح میزبانی سویه

یک مورد که اخیراً گزارش شده تا کنون هیچ انتقال طبیعی از WDV-B به گندم و یا گونه‌های دیگر جنس *Triticum* صورت نگرفته است (Tobias *et al.* 2011)، اگرچه گزارش‌هایی در زمینه آلوده شدن گندم توسط WDV-B

WDV-B به گیاه جو است. لذا می‌توان به منظور کنترل در مناطقی که سویه گندم ویروس غالب است توصیه به جدول ۳. نوع و تعداد گیاهان مورد بررسی و آلوده به WDV از استان‌های مختلف ایران و اختصاصاً به سویه‌های گندم و جو WDV براساس نتیجه آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در تکثیر باندهای ۱۱۷۵ (از هر دو سویه) و ۳۰۱ جفت بازی (تنها از سویه گندم)

**Table 3. Number of tested wheat and barley plants infected with WDV and wheat and barley strains of the virus (WDV-W and WDV-B, respectively) in different provinces of Iran based on PCR data**

Sampling region (province) محل نمونه‌برداری (استان)	Host میزبان	Number of samples تعداد نمونه	Number of plants infected with WDV تعداد گیاهان آلوده به WDV بر اساس تکثیر باند ۱۱۷۴ جفت بازی در آزمون PCR	Number of plants infected with WDV-W تعداد گیاهان آلوده به WDV-W بر اساس تکثیر باند ۳۰۱ جفت بازی در آزمون PCR	Number of plants infected with WDV-B تعداد گیاهان آلوده به WDV-B بر اساس عدم تکثیر باند ۳۰۱ جفت بازی در آزمون PCR
Kermanshah	Wheat	2	2	2	-
	barley	1	1	1	-
Fars	Wheat	50	37	37	-
	barley	70	46	5	41
Lorestan	Wheat	1	1	1	-
Yazd	Wheat	40	5	5	-
	barley	6	3	1	2
Tehran	Wheat	4	2	2	-
Khuzistan	Wheat	1	1	1	-
Ilam	Wheat	2	1	1	-
Khorasan	Wheat	8	6	6	-
	barley	3	3	1	2
Kerman	barley	2	2	-	2
Isfahan	Wheat	1	1	1	-
	barley	1	1	1	-
Kohgiluyeh and Boyer Ahmad	barley	3	3	1	2
Gorgan	Barley	1	1	-	1
Mazandaran	Wheat	2	-	-	-
	barley	2	2	-	2
East Azerbaijan	Wheat	4	1	1	-
Chaharmahal and Bakhtiari	Wheat	34	13	13	-
	barley	32	23	5	18
Total جمع		270	155	85	70

شده (Behjatnia et al. 2011) و بارس شمار FJ620684 (WDV- Bar[IR]) در بانک ژن ثبت شده است ۸۲/۸-۸۳/۱٪ می‌باشد (شکل ۵) که نشانه اختلاف زیاد در ناحیه متغیر بین ژنی کوچک در بین سویه‌های گندم و جو WDV است. تعیین جایگاه تاکسونومیکی جدایه‌های گندم و جو سویه گندم و ویروس کوتولگی گندم از ایران و مقایسه آن با جدایه ایرانی سویه جو ویروس کوتولگی گندم (WDV- Bar[IR]) نیازمند تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل چندین جدایه گندم و جو از مناطق مختلف ایران است.

#### انتقال WDV با زنجرک *Psammotettix alienus*

زنجرک‌های جنس *Psammotettix* جمع‌آوری شده از مزارع آلوده باجگاه، مرودشت و زرقان در استان فارس و شهرکرد در استان چهارمحال و بختیاری بر اساس مورفولوژی تفکیک شدند. کلنی‌های خالص حشره از هر دو استان از طریق تولید مثل زنجرک‌های ماده بارور به دست آمد. به طور میانگین تعداد زنجرک‌های به دست آمده از هر کلنی ۲۰ الی ۳۰ عدد بود. قبل از منتقل کردن هر کلنی به گیاهان آلوده، ابتدا آلودگی گیاهان به سویه گندم و جو WDV با آزمون الیزا و آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای غیر اختصاصی و اختصاصی ویروس در سطح سویه اثبات شد. در این مطالعه از گیاهان جو باجگاه آلوده به WDV-B و گیاهان گندم شهرکرد آلوده به WDV-W به عنوان منبع آلودگی استفاده شد. سپس کلنی زنجرک (حاوی ۲۰ الی ۳۰ عدد زنجرک بالغ و پوره) به دست آمده از باجگاه، مرودشت و زرقان روی گیاهان آلوده جمع‌آوری شده از باجگاه و کلنی زنجرک شهرکرد بر روی گیاه جمع‌آوری شده از شهرکرد ریخته شد.

کشت جو و به عکس در مناطقی که سویه جو ویروس غالب است توصیه به کشت گندم کرد.

#### بررسی تنوع مولکولی جدایه‌های گندم و جو سویه گندم WDV

به منظور بررسی تنوع مولکولی جدایه‌های گندم و جو سویه گندم WDV، ترادف نوکلئوتیدی بخش اعظم قطعه ۳۰۱ جفت بازی (شامل ناحیه بین ژنی کوچک و قسمت انتهایی آمینی ژن Rep) از نمونه‌های گندم و جو استان‌های فارس، کرمانشاه، خراسان، تهران، اصفهان و چهارمحال و بختیاری که در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی WDVChina1130<sup>v</sup> و WDVChina1430<sup>c</sup> تکثیر شده بود تعیین شد. چون از محصول PCR برای تعیین ترادف استفاده شد و تعدادی از نوکلئوتیدهای اولیه قطعه در تعیین ترادف خوانده نشدند، اندازه دقیق قطعه تعیین ترادف شده برای همه جدایه‌ها ۲۹۰ جفت باز در نظر گرفته شد. مقایسه ترادف نوکلئوتیدی این ناحیه در بین جدایه‌های ایرانی و با جدایه‌های گندم و جو WDV-W در بانک ژن (جدول ۲) نشان داد جدایه‌های ایرانی WDV-W با یکدیگر در سطح نوکلئوتیدی ۹۹-۱۰۰٪ و با جدایه‌های WDV-W موجود در بانک ژن ۹۴/۹-۹۹/۷٪ شباهت دارند (شکل ۵). بنابراین با وجود متنوع بودن ناحیه بین ژنی در اعضای جنس ماستروویروس، تنوع قابل توجهی در این ناحیه از ژنوم در مورد جدایه‌های سویه گندم ویروس کوتولگی گندم مشاهده نشد. در حالی که میزان شباهت ترادف نوکلئوتیدی این ناحیه از ژنوم جدایه‌های WDV-W با ناحیه مشابه ژنوم یک جدایه ایرانی WDV-B که از یک مزرعه جو در منطقه جلگه رخ استان خراسان رضوی جدا

زنجبرک‌ها به مدت ۷۲ ساعت از گیاهان آلوده تغذیه کردند. سپس زنجبرک‌های هر کلنی به گیاهچه‌های سالم گندم و

		Percent identity																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
1	█	100.0	99.5	99.5	99.2	99.5	99.0	99.2	98.5	98.5	98.7	98.7	98.2	97.2	95.2	83.8	84.1	82.8	72.0	46.2	45.6	54.5	1	Saveh-wh
2	0.7	█	100.0	99.7	99.5	99.7	99.2	99.5	98.7	98.7	99.0	99.0	98.5	97.7	95.7	83.8	84.1	82.8	72.0	46.2	45.6	54.5	2	Mandashi-wh
3	0.7	0.3	█	100.0	99.5	99.7	99.0	99.0	99.2	99.2	99.2	99.2	98.5	97.5	95.5	84.1	84.3	83.1	72.0	46.2	45.6	54.5	3	Rokh-bar
4	0.7	0.3	0.0	█	99.7	99.2	99.5	98.7	98.7	99.0	99.0	98.2	97.2	95.2	84.1	84.3	83.1	72.0	46.2	45.6	54.5	4	Dashtak-wh	
5	0.7	0.3	0.0	0.0	█	99.5	99.7	99.0	99.0	99.2	99.2	98.5	97.5	95.5	84.1	84.3	83.1	72.0	46.2	45.6	54.5	5	Eslahan-wh	
6	1.4	1.0	0.7	0.7	0.7	█	99.7	98.5	98.5	98.7	98.7	98.0	97.0	94.9	84.1	84.3	83.1	72.0	46.2	45.6	54.5	6	Shahkord-wh	
7	1.0	0.7	0.3	0.3	0.3	0.3	█	98.7	98.7	99.0	99.0	98.2	97.2	95.2	84.1	84.3	83.1	72.0	46.2	45.6	54.5	7	Kermansha-bar	
8	2.1	1.7	1.4	1.4	1.4	2.1	1.7	█	100.0	99.7	99.7	99.0	98.0	96.0	84.8	85.1	83.6	72.7	46.4	45.9	54.3	8	WDV-[TA]	
9	2.1	1.7	1.4	1.4	1.4	2.1	1.7	0.0	█	99.7	99.7	99.0	98.0	96.0	84.8	85.1	83.6	72.7	46.4	45.9	54.3	9	WDV-[HNZZ]	
10	1.7	1.4	1.0	1.0	1.0	1.7	1.4	0.3	0.3	█	100.0	99.2	98.2	96.2	84.8	85.1	83.8	73.0	46.7	46.2	54.5	10	SKYL05-1	
11	1.7	1.4	1.0	1.0	1.0	1.7	1.4	0.3	0.3	0.0	█	99.2	98.2	96.2	84.8	85.1	83.8	73.0	46.7	46.2	54.5	11	WDV-[HBS,QZ]	
12	2.4	2.1	2.1	2.1	2.1	2.8	2.4	1.4	1.4	1.0	1.0	█	98.2	96.7	84.1	84.3	83.1	72.7	47.0	46.4	54.5	12	WDV-[SE]	
13	3.5	2.8	3.2	3.2	3.2	3.9	3.5	2.5	2.5	2.1	2.1	2.1	█	97.5	84.6	84.9	83.6	71.4	46.2	45.6	54.3	13	WDV-[UKg]	
14	5.0	4.3	4.7	4.7	4.7	5.4	5.0	3.9	3.9	3.6	3.6	2.8	2.1	█	83.8	84.1	82.3	69.8	47.0	46.4	53.7	14	BB21	
15	23.6	23.6	23.1	23.5	23.1	23.1	23.1	21.7	21.7	21.7	21.7	21.7	21.7	22.3	█	99.7	99.0	91.4	45.6	45.3	52.9	15	SnA57	
16	23.6	23.6	23.1	23.5	23.1	23.1	23.1	21.7	21.7	21.7	21.7	23.1	21.8	22.3	0.0	█	99.2	91.1	45.6	45.3	52.9	16	CZ19	
17	26.4	26.4	25.9	26.3	25.9	25.9	24.9	24.9	24.5	24.5	25.9	24.6	25.2	4.3	4.3	█	91.7	45.3	45.3	52.4	17	WDV-[IR]		
18	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	0.5	0.5	0.0	0.0	0.5	2.0	3.0	19.1	19.2	19.1	█	53.4	32.8	31.2	18	WDV-[SM]	
19	150.6	150.6	150.6	150.6	150.6	150.6	150.6	146.2	146.2	143.6	143.6	141.1	151.7	139.2	160.3	159.7	161.6	138.0	█	97.8	39.0	19	Bg17	
20	156.5	156.5	156.5	156.5	156.5	156.5	156.5	151.8	151.8	148.9	148.9	146.2	157.9	144.2	161.6	161.0	158.0	143.4	2.8	█	37.9	20	MSV-HE	
21	102.1	102.1	102.1	102.1	102.1	102.1	102.1	102.9	102.9	101.5	101.5	102.1	101.9	105.3	111.2	110.1	115.0	99.9	202.1	243.7	█	21	MSV[Out]	

شکل ۵. جدول درصد تشابه (محور افقی) و درصد واگرایی (محور عمودی) نوکلئوتیدی یک قطعه ۲۹۰ جفت بازی حاوی قسمت انتهایی ناحیه بین ژنی کوچک و بخشی از ژن Rep جدایه‌های مورد استفاده WDV در این مطالعه (۷ جدایه گندم و جو سو به گندم WDV از ۶ استان کشور در کادر مشخص شده‌اند). مشخصات جدا یه‌ها در جدول ۲ قید شده است.

Fig. 5. Percent sequence identity and diversity of a 290 bp DNA fragment (comprising the end of the small intergenic region and part of the Rep gene) between selected WDV isolates used in this study (Iranian wheat and barley isolates of WDV from 6 provinces are boxed). See Table 2 for source of isolates.

در آنها آلوده بودند. آزمون الیزا نیز آلودگی گیاهان ۷ گلدان را تأیید کرد. منتهی در آزمون PCR فقط از گیاهان موجود در ۵ گلدان (از ۷ گلدان) باند مورد نظر تکثیر شد. انتقال WDV از طریق تعیین ترادف قطعه‌ای از ژنوم ویروس در نمونه‌های گیاهی آلوده به ویروس که با زنجبرک‌ها مایه زنی شده بودند نیز تأیید شد. وجود ویروس در بدن حشره‌های ناقل با تکثیر یک قطعه ۱۱۷۵ جفت بازی از ژنوم ویروس با جفت آغازگر p328<sup>c</sup> / p1887<sup>v</sup> (جدول ۱) در آزمون PCR، ردیابی گردید (شکل ۷). کلنی‌هایی که ویروس را منتقل کردند برای تشخیص گونه مورد بررسی قرار گرفتند.

شناسایی گونه در حشرات این جنس تنها بر مبنای شکل اندام تناسلی جنس نر می‌باشد. بدین ترتیب که aedeagus در حشره نر در گونه *P. alienus* دارای

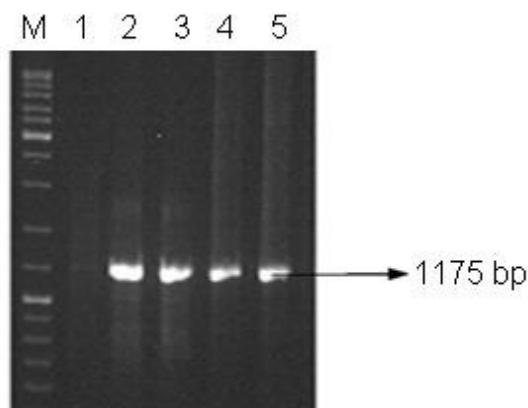
جو در مرحله یک برگگی انتقال داده شدند. در این مرحله از ۱۱ گلدان که هر کدام حاوی ۳ الی ۴ گیاهچه گندم یا جو بودند استفاده شد. پس از گذشت یک هفته زنجبرک‌ها از روی گیاهچه‌های یک برگگی گندم و جو برداشته و هر کلنی به صورت مجزا در یک گلدان دیگر نگهداری شد تا در صورت اطمینان از انتقال ویروس برای شناسایی گونه زنجبرک اقدام شود. وجود ویروس در گیاهان مایه زنی شده با زنجبرک‌ها بعد از گذشت ۳ الی ۴ هفته از زمان مایه زنی به محض ظهور علائم بیماری کوتولگی یا زردی (شکل ۶) با آزمون‌های الیزا و واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی WDV ردیابی شد. نتایج نشان داد که از ۱۱ گلدان، گیاهان موجود در ۷ گلدان علائم کوتولگی، زردی و موزائیک را نشان دادند (شکل ۶) که از این هفت گلدان هر ۳ یا ۴ بوته گندم یا جو موجود

فرورفتگی است در حالی که در گونه *P. striatus* کاملاً گرد و بدون فرورفتگی است (Greene 1971). به منظور



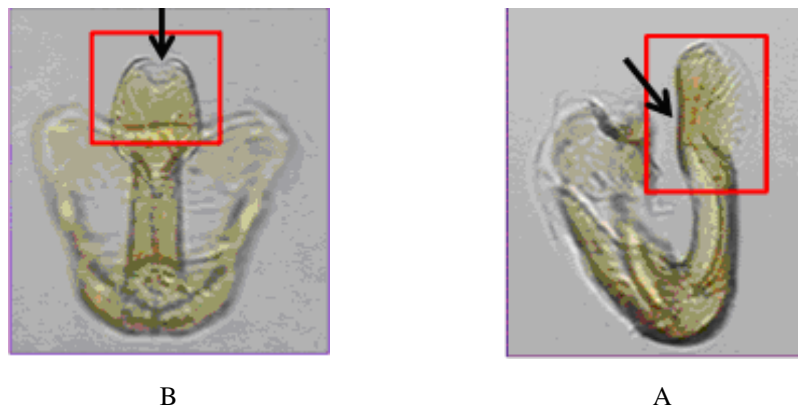
شکل ۶. گیاهان جو دارای علائم کوتولگی شدید و زردی، ۴۵ روز بعد از زمان مایه زنی با زنجبرک‌های *Psammotettix alienus* حاوی WDV-B از باجگاه.

Fig. 6. Severe stunting and, yellowing symptoms in barley plants 45 days post-inoculation with viruliferous (WDV-B) *Psammotettix alienus* leafhoppers.



شکل ۷. نقوش الکتروفورزی محصول PCR (قطعه ۱۱۷۵ جفت بازی) تکثیر شده از بدن ۵ حشره ناقل به طور جداگانه با استفاده از جفت آغازگر  $p1887^v / p328^c$  و ویروس کوتولگی گندم (جدول ۱) و دی ان ای استخراج شده از بدن هر حشره ناقل به‌عنوان الگو (راهک های ۱-۵).

Fig. 7. Electrophoresis pattern of PCR products amplified from five individually tested leafhoppers using specific WDV primer pair  $p1887^v / p328^c$  (Table 1) and the DNA extracted from each leafhopper (lanes 1-5). M= DNA ladder mix (Fermntas).



شکل ۸. اندام تناسلی جنس نر (A از نمای جانبی و B از نمای روبرو) در گونه *Psammotettix alienus* جمع‌آوری شده از مزارع باجگاه ( شیراز). حالت فرورفتگی aedeagus در داخل کادر دیده می‌شود.

**Fig. 8. The male insect genitalia (A, side view, B, full view) of *Psammotettix alienus* leafhoppers collected from Bajgah (Shiraz) fields. Differentiating part is boxed.**

انجام شود و مشخص گردد که در هر منطقه کدام ویروس غالب است. در بعضی از نمونه‌های آلوده به WDV آلودگی مخلوط به خصوص آلودگی دو ویروس WDV و BYDV دیده شد. با یافتن ناقل ویروس کوتولگی گندم می‌توان بر هم کنش این دو ویروس را در گلخانه بررسی کرد. با ساخت همسانه عفونت‌زای ویروس کوتولگی گندم می‌توان رقم‌های مختلف گندم و جو را از لحاظ عملکرد دانه، بیوماس اندام هوایی، وزن دانه‌ها و دیگر فاکتورهای مهم در عملکرد دانه بررسی کرد. علاوه بر این از طریق همسانه عفونت‌زا می‌توان فهمید که چه ژن‌هایی می‌توانند اختصاصیت میزبان را توسط دو استرین تعیین کنند. تعیین راندمان انتقال ویروس توسط زنجبرک‌های پوره و بالغ و مطالعات در زمینه روشن شدن اپیدمیولوژی ویروس کوتولگی گندم نیز می‌بایست انجام شود.

#### منابع

تعیین گونه کلنی خالص زنجبرک که ویروس را منتقل کرده بود چند عدد زنجبرک نر انتخاب و به مدت یک شبانه روز در محلول 10% KOH قرار داده شدند تا محتویات درون بدن حشره که کیتینی نیستند در این محلول حل شده و اندام تناسلی جنس نر زنجبرک بیرون آورده شود. سپس از اندام مزبور اسلاید میکروسکوپی تهیه شد. بر اساس وجود فرورفتگی و یا عدم فرورفتگی در آن گونه زنجبرک ناقل ویروس شناسایی شد. در تمام نمونه‌ها حالت فرورفتگی در aedeagus حشره نر دیده شد (شکل ۸). بدین ترتیب گونه زنجبرک ناقل سویه‌های گندم و جو WDV در ایران *Psammotettix alienus* (Linnaeus) معرفی شد.

از آنجایی که اکثر نمونه‌های گندم و جو مورد بررسی در این مطالعه با علائم زردی و کوتولگی به ویروس کوتولگی گندم آلوده بودند لذا می‌بایست نمونه‌های بیشتر با علائم ذکر شده بررسی شود و آنالیزهای آماری در مورد وقوع ویروس‌های کوتولگی گندم و کوتولگی زرد جو

جهت ملاحظه به صفحات (7-9) متن انگلیسی مراجعه شود.