بررسی رابطه دگرپادی بین ویروس‌های موزائیک کوتولگی ذرت و موزائیک جنوبی مرغ *

CROSS PROTECTION BETWEEN MAIZE DWARF MOSAIC VIRUS AND BERMUDA GRASS SOUTHERN MOSAIC VIRUS

عاطفه ذاکری[۱]، محمود معصومی[۲]**، سعید نصرا... نژاد[۱]، طاهره قهرمانی[۳] و کرامت اله ایزدپناه[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳۱)

چکیده

دو ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) و موزائیک جنوبی مرغ (Bermuda grass southern mosaic virus, BgSMV) به رغم تفاوت مشخص نود نوکلئوتیدی در ژن پروتئین پوششی، از لحاظ سرولوژیکی و مولکولی شباهت زیادی به‌هم دارند. در این تحقیق رابطه دگرپادی این دو ویروس مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در قالب ۵ تیمار در ۵ تکرار (هر تکرار شامل یک گلدان با ده بوته) طراحی شد. تیمارها شامل مایه‌زنی مکانیکی هر یک از ویروس‌ها به گیاه پس از استقرار ویروس دیگر، مایه‌زنی توأم و مایه‌زنی دو ویروس به‌طور جداگانه بودند. دو هفته بعد از مایه‌زنی، برای استخراج آرانای ویروس با استفاده از mRNA Capture Kit از تیمارها نمونه‌برداری شد. از آرانای ویروس به روش ترانویسی معکوس cDNA تهیه و با جفت آغازگرهای MD3F/MD1R و BgSMF90/ BgSMR90b در آزمون PCR تکثیر شد. نتایج آزمون PCR نشان داد که مایه‌زنی هر کدام از دو ویروس از تکثیر ویروس دیگر جلوگیری می‌کند. براساس این آزمون و اطلاعات بیولوژیکی و مولکولی قبلی می‌توان نتیجه گرفت که دو ویروس با هم رابطه دگرپادی دارند و بنابراین ممکن است به‌رغم تفاوت‌های بیولوژیکی و مولکولی، رابطه بسیار نزدیک با هم داشته باشند و یا سویه‌های یک ویروس محسوب شوند. در این بررسی رابطه دگرپادی ویروس موزائیک ایرانی قیاق (Iranian Johnson grass mosaic virus, IJMV) با دو ویروس BgSMV و MDMV به‌عنوان شاهد نیز مطالعه شد که بین آنها هیچ رابطه دگرپادی دیده نشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزائیک کوتولگی ذرت، ویروس موزائیک جنوبی مرغ، ویروس موزائیک ایرانی قیاق، دگرپادی

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

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

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. استادیار مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز و سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس

۳. همکار پژوهشی و استاد مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مقدمه

پوتی ویروس‌ها از تیره *Potyviridae*، بزرگ‌ترین و از لحاظ اقتصادی مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی هستند (Shukla *et al*. 1994, Fauquet & Mayo 1999, Fauquet *et al*. 2005). ویژگی‌های سرولوژیکی و بیولوژیکی مثل دامنه میزبانی، دگرپادی و علایم‌شناسی از معیارهای مهم برای تمایز بین گونه‌ها و جدایه‌های پوتی‌ویروس‌ها بوده است (Shukla *et al*. 1994) و اخیراً نیز ویژگی‌های مولکولی برای تعیین رابطه جدایه‌ها و ویروس‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Adams *et al*. 2005). پوتی ویروس‌هایی که گیاهان تیره گندمیان را آلوده می‌کنند، زیرگروه مشخصی را تشکیل می‌دهند (Gibbs and Ohshima 2010). در ایران علاوه بر ویروس موزائیک نیشکر (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) سه ویروس IJMV، MDMV، و BgSMV گیاهان مختلف این تیره را آلوده می‌کنند (Masumi *et al*. 2011).

ویروس MDMV اولین‌بار در سال ۱۹۶۳به‌عنوان سویه‌ای از SCMV، از جنوب ایالت اوهایو گزارش شد (Williams & Alexander 1965). *شوکلا و همکاران* در سال ۱۹۸۹ آن را به‌عنوان یک عضو مستقل در گروه پوتی ویروس مورد تأئید قرار دادند. قیاق منبع طبیعی MDMV و ذرت و سورگوم از میزبان‌های طبیعی آن می‌باشند (Ford & Tosic 1972, Toler 1985). در ایران MDMV تاکنون از اصفهان و به‌صورت گسترده از شمال ایران (مازندران و گلستان) گزارش شده است (Moini and Izadpanah 2001, Masumi *et al*. 2004). BgSMV در ابتدا روی مرغ (*Cynodon dactylon* L.) در منطقه جیرفت مشاهده گردید و سپس وجود آن در تمام مناطق جنوبی کشور مانند استان‌های بوشهر، کرمان، خوزستان و جنوب فارس مورد تأئید قرار گرفت (Farahbakhsh 2009, Masumi & Izadpanah 1998, 2000, 2002a,b, c). این ویروس علاوه بر مرغ به‌طور طبیعی رشدی (*Eleusine compressa*) و ذرت را نیز آلوده می‌کند (Masumi *et al*. 2011, Ghasemi & Izadpanah 1998). براساس مطالعات مولکولی این ویروس به‌ترتیب با MDMV، ویروس موزائیک سورگوم (Sorghum mosaic virus, SrMV) و SCMV بیشترین قرابت را دارد (Masumi & Izadpanah 2002a). نتایج حاصل از مقایسه سرولوژیکی، مولکولی، دامنه میزبانی و نوع ناقل نشان داد که MDMV و BgSMV شباهت زیادی به هم دارند ولی BgSMV به‌دلیل داشتن یک قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی بیشتر از MDMV در ناحیه ٥َ ژن CP، عدم انتقال با شته *Rhopalosiphum maidis* و آلوده نکردن قیاق با MDMV متفاوت می‌باشد (Zare *et al*. 2005).

IJMV اولین‌بار در سال ۱۳۶۱ توسط ایزدپناه در قیاق از شیراز به‌عنوان سویه‌ای از SCMV گزارش شد (Afsharifar & Izadpanah 1991). لکن تحقیقات بعدی نشان داد که بیشترین قرابت را با ویروس موزائیک زآ (Zea mosaic virus, ZeMV) از اسرائیل دارد هرچند میزان تشابه آنها کمتر از حد تمایز بین گونه‌ها است (Masumi *et al*. 2001). قیاق منبع اصلی این ویروس و ذرت و سورگوم میزبان های زراعی آن می‌باشند (Zare *et al*. 2005). این ویروس در اکثر مناطق ایران وجود دارد و بومی این کشور می‌باشد (Masumi *et al*. 2011) و همانند MDMV توسط شته های *Rhopalosiphum maidis*، *R. padi* و *Schizaphis graminum* به سورگوم منتقل می‌شود. اما برخلاف MDMV در گیاه ارزن مرواریدی تکثیر نمی‌یابد

(Zare *et al.* 2004). یکی از روش‌های تعیین رابطه میان ویروس‌ها و به‌ویژه تفکیک سویه و گونه ویروس‌های نزدیک به‌هم، مطالعه دگرپادی میان آنهاست. این مطالعات همراه با مطالعات سرولوژیکی و مولکولی اساس گروه‌بندی کنونی پوتی ویروس‌های گیاهان تیره گندم را تشکیل می‌دهند (Mathews 1991, Shukla *et al.* 1989, Tosic *et al.* 1990). هدف از مطالعه حاضر، تعیین رابطه دگرپادی میانMDMV و BgSMV است که به‌رغم تفاوت ۹۰ نوکلئوتیدی در ژن پروتئین پوششی (Coat protein, CP)، از لحاظ مولکولی شباهت نزدیکی دارند (Masumi *et al.* 2011). در عین حال رابطه دگرپادی میان این دو ویروس با رابطه دگرپادی آنها با IJMV نیز مورد مقایسه قرار گرفته است.

روش بررسی

منبع ویروس‌های مورد آزمایش

MDMV و IJMV از نمونه‌های ذرت و قیاق جمع‌آوری شده از مزارع ذرت شهرستان گرگان براساس آزمون سرولوژیک الیزای غیرمستقیم با آنتی سرم‌های MDMV-Ir (Zare *et al.* 2004) و IJMV موجود در مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی دانشگاه شیراز، تشخیص داده شدند. منبع BgSMV مرغ آلوده از منطقه برازجان بود (Masumi & Izadpanah 2000). این ویروس در گیاه سورگوم رقم پیام تکثیر و از آن در آزمون دگرپادی استفاده شد. جدایه‌های ویروسی به روش مکانیکی با استفاده از بافر فسفات ۰/۰۵ مولار، pH۷ به گیاه سورگوم مایه‌زنی و در دمای ثابت ۲۵°C و دوره نوری ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب قرار داده شدند.

آزمون دگرپادی

رابطه دگرپادی در بین سه ویروس به‌طور دو بدو مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی بررسی رابطه دو ویروسMDMV و BgSMV با ۵ تکرار (۵ گلدان ۱۰ بوته‌ای سورگوم رقم پیام) به شرح زیر انجام شد:

۱. ابتدا مایه‌زنی MDMV به سورگوم و بعد از بروز علائم موزائیک، مایه‌زنی BgSMV (MDMV/BgSMV) ۲. ابتدا مایه‌زنی BgSMV به سورگوم و بعد از بروز علایم موزائیک، مایه‌زنی MDMV (BgSMV/MDMV) ۳. مایه‌زنی توأم دو ویروس با غلظت مساوی ۴. مایه‌زنی MDMV به تنهایی ۵. مایه‌زنی BgSMV به تنهایی

تیمارهای آزمایشی مربوط به آزمون دگرپادی MDMV–IJMV و BgSMV –IJMV نیز همانند تیمارهای آزمون دگرپادی BgSMV–MDMV تنظیم شد. به‌دلیل اینکه اطمینان حاصل شود که دو ویروس با هم در گیاه در شرایط دگر پادی قرار داشته باشند، در تمام آزمون‌های دگرپادی ویروس دوم تنها به گیاهانی مایه‌زنی شد که علایم داده بودند. بنابراین گیاهان آلوده که در جدول ۲ قید شده است مربوط به ویروس اول خواهد بود و آلودگی ویروس دوم از نظر تعداد گیاهان آلوده تغییری ایجاد نخواهد کرد.

درمایه‌زنی توأم دو ویروس، برای تهیه مایه تلقیح از دو ویروس با غلظت مساوی، ویروس‌ها به روش *معصومی و همکاران* (۲۰۰۰) خالص‌سازی شدند (Masumi *et al.* 2000) و میزان جذب آنها در ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت مساوی از هرکدام تهیه شد. دو هفته بعد از مایه‌زنی، بوته‌های سورگوم برای تعیین وضعیت آلودگی مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد گیاهان آلوده با علایم موزائیک شمارش و نسبت به کل گیاهان که ۵۰ بوته در

جدول ۱. جفت آغازگرهای MDMV و BgSMV مورد استفاده در واکنش RT-PCR

Table 1. MDMV and BgSMV primers used in RT-PCR

Primer	Direction	Nucleotide No.	Sequence	Annealing temperature (˚C)
MD3F	Forward	25	5'-GATGAGTTRAAYGTYTATGCACGAC-3'	58
MD1R	Reverse	24	5'-RTGCATRATTTGTCTGAAAGTTGG-3'	
BgSMF90	Forward	21	5'-ACGAAAGCAAGAGGCTGAAAC-3'	55
BgSMR90b	Reverse	20	5'-CCACTGGGCTTCTCAGCAGC-3'	

جدول ۲. تعداد و میانگین نمونه‌های آلوده گیاهی در بررسی آزمون دگرپادی بین ویروس‌های MDMV، BgSMV و IJMV و نوع آزمون تشخیصی برای ردیابی ویروس

Table2. Number and percent of infected plants in cross protection tests among MDMV, BgSMV and IJMV and type of test for detection of viruses

Test No.	Protective virus	Challenge virus	Inoculation interval (days)	Mean infection %	No. tested plants/test	Infected sample (A/B)	ELISA value
	MDMV	BgSMV	6*	74ab**	10/PCR	10/0	−
I	BgSMV	MDMV	9	42c	10/PCR	10/0	−
	MDMV	BgSMV	+	42c	10/PCR	10/10	−
	MDMV	IJMV	6	80ab	6/E	6/6	0.302: 0.345¤
II	IJMV	MDMV	6	80ab	6/E	6/6	0.440: 0.310¤
	IJMV	MDMV	+	68abc	6/E	6/6	0.336: 0.335¤
	BgSMV	IJMV	9	42c	6/E	6/6	0.215: 0.450¤¤
III	IJMV	BgSMV	6	88a	6/E	6/6	0.421: 0.243¤¤
	IJMV	BgSMV	+	56bc	6/E	6/6	0.463: 0.153¤¤
	IJMV	−	−	84a	6/E	6/-	0.409 §
	MDMV	−	−	78ab	6/E And 10/PCR	6/- and10:0	0.315§
	BgSMV	−	−	44c	6/E and 10/PCR	6/- and10:0	0.204§

PCR : آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز E: آزمون الیزای غیرمستقیم **A**: تعداد نمونه‌های آلوده به ویروس اول B: تعداد نمونه‌های آلوده به ویروس دوم * فاصله زمانی بین مایه‌زنی دو ویروس **: اعداد میانگین پنج تکرار می‌باشد. اعداد با حروف مشابه در آزمون دانکن در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار ندارند. ¤: در تیمارهای آزمون II دگرپادی، میزان جذب دو ویروس در آزمون الیزا در سطح ۱٪ با هم اختلاف معنی‌دار ندارند. ¤¤: در تیمارهای آزمون III دگرپادی، میزان جذب دو ویروس در آزمون الیزا در سطح ۱٪ با هم اختلاف معنی‌دار دارند. §: میزان جذب سه ویروس در مایه‌زنی انفرادی به سورگوم در آزمون الیزا در سطح ۱٪ با هم اختلاف معنی‌دار دارند. + : مایه‌زنی همزمان − : عدم مایه‌زنی

PCR: Polymerase chain reaction E: Indirect ELISA A: No. of plants infected by protective virus B: No. of plants infected by challenge virus *: Interval between inoculations of protective and challenge viruses **: Average of five replications. Means with the same letters are not significantly different at 1% level. ¤ : The ELISA values of two (protective and challenge) viruses in test No. II, are not significantly different at 1% level. ¤¤ : The ELISA values of two (protective and challenge) viruses in test No. III, are significantly different at 1% level. § : The ELISA values of sorghum plants singly inoculated with each virus, are significantly different at 1% level. +: Simultaneous inoculation - : No inoculation

هر تیمار بود، به‌دست آمد و مقایسه آماری بین تیمارها با ۵ تکرار با آزمون دانکن انجام شد (جدول ۲). از هر یک از تیمارهای گروه‌های MDMV- IJMV و BgSMV-IJMV، ۶ نمونه برداشت و با آزمون الیزای غیرمستقیم ارزیابی شدند. در تیمارهای MDMV با BgSMV به‌دلیل هم‌پوشانی آنتی‌سرم‌های آنها، برای تمایز از آزمون RT-PCR استفاده شد. بدین منظور از تیمارهای ۱، ۲ و ۳، هر یک ۱۰ نمونه و از تیمارهای شاهد ۴ و ۵، هر یک دو نمونه مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج ویروس، جداسازی RNA و واکنش RT-PCR

پس از عصاره‌گیری نمونه‌ها در ۳ حجم بافر سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار، pH= ۶/۵، با کلروفرم به نسبت ۳۰ درصد تیمار و سانتریفوژ شدند و از رونشین به‌دست آمده برای تهیه cDNA استفاده گردید. استخراج RNA با استفاده از کیت mRNA Capture (Roche) طبق دستورالعمل سازنده و واکنش ترانویسی معکوس (reverse transcription, RT) با آنزیم MmLV (Moloney murine leukemia virus) (Fermentas) با استفاده از آغاز گر N1T (5′-GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T)17- 3′) (Ha *et al*. 2007) انجام شد. cDNA حاصل از واکنش RT با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با جفت آغازگرهای MD3F/MD1R یا BgSMF90/BgSMR90b تکثیر شد (جدول ۱). مخلوط مورد استفاده در واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر *Taq* DNA polymerase buffer (۱۰×)، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۲میلی‌مول مخلوط dNTPs، ۰/۴ میکرومول از هرکدام ازآغازگرهای رفت و برگشت (جدول ۱)، ۵ واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (Cinagen, Iran) و ۳ میکرولیتر cDNA بود و در نهایت حجم مخلوط با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR متشکل از یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه به منظور واسرشته‌سازی اولیه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، تافتن (annealing) به‌مدت ۱ دقیقه در دمای مناسب برای هر جفت آغازگر (جدول ۱) و سنتز در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، به‌علاوه یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه برای امتداد رشته‌ها (extension) بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندورف و یا مدل iCycler شرکت Bio Rad انجام شد. محصول PCR درژل ۱٪ آگاروز الکتروفورز شد.

نتیجه و بحث

در کلیه تیمارها پس از بروز علایم گیاهان آلوده شمارش شدند (جدول ۲). برای اطمینان از آلودگی به هر کدام از ویروس‌ها در تیمارهای آزمون دگرپادی بین IJMV و دو ویروس دیگر، به‌دلیل امکان تمایز سرولوژیکی آنها از یکدیگر، از آزمون الیزای غیرمستقیم استفاده شد. ولی به‌دلیل همپوشانی آنتی سرم‌های BgSMV و MDMV استفاده از این روش امکان‌پذیر نبود. لذا تمایز آنها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در آزمون RT-PCR انجام شدکه برای این کار دو نمونه در هر تکرار از گیاهان با علایم موزائیک (جمعاً ۱۰ بوته در هر تیمار) با این روش مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

۱. آزمون دگرپادی MDMV-BgSMV

در تیمارهای مایه‌زنی انفرادی با MDMV با ۷۸٪ بوته

آلوده و متوالی MDMV /BgSMV با ۷۴٪ بوته آلوده، میزان آلودگی نسبت به تیمارهای متقابل آنها یعنی مایه‌زنی متوالی BgSMV/MDMV با ۴۲٪ بوته آلوده و مایه‌زنی جداگانه به BgSMV با ۴۴٪ بوته، آلودگی بیشتر بود (جدول۲). بررسی آماری تعداد بوته‌های آلوده در تیمارهای این گروه نشان داد که بین تیمارها از نظر آلودگی سورگوم به این دو ویروس تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. در این بررسی میانگین بوته‌های آلوده در تیمارهای مایه‌زنی متوالی با هم و هم‌چنین تیمارهای مایه‌زنی جداگانه به MDMV یا BgSMV با هم تفاوت معنی‌داری داشتند. دو تیمار آلودگی جداگانه به MDMV و متوالی MDMV/BgSMV با هم که ابتدا MDMV مایه‌زنی شده به‌ترتیب با ۷۸٪ و ۷۴٪ آلودگی و هم‌چنین دو تیمار مایه‌زنی BgSMV به تنهایی و مایه‌زنی متوالی BgSMV/MDMV که ابتدا BgSMV مایه‌زنی شده به‌ترتیب با ۴۴٪ و ۴۲٪ آلودگی، تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۲).

۲. آزمون دگرپادی IJMV-MDMV

با توجه به تفاوت سرولوژیکی IJMV و MDMV، برای شناسایی آنها از آزمون الیزای غیرمستقیم استفاده شد. در بررسی تیمارها مشخص شد که تعداد بوته‌های دارای علایم موزائیک ۱۴ روز بعد از مایه‌زنی (جدول۲) در تمامی تیمارها در دامنه عددی مشابهی می‌باشند و هم‌چنین مقایسه میانگین تیمارهای این گروه با آزمون دانکن نشان داد که در سطح یک درصد، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند و می‌توان گفت تعداد بوته‌های آلوده هر دو ویروس در هر تیمار تقریباً یکسان می‌باشد. شش نمونه از تیمارهای مایه‌زنی متوالی و توأم برای تشخیص نوع ویروس و سنجش کمی آنها، با آزمون الیزای غیرمستقیم ارزیابی شدند (جدول ۲). این تیمارها با هر دو آنتی سرم MDMV-Ir و IJMV واکنش نشان دادند. بر این اساس مشخص شد که هر دو ویروس در هر دو تیمار وجود دارند و به عبارتی دو ویروس با هم در گیاه تکثیر می‌یابند و رابطه دگرپادی بین آنها وجود ندارد. در آزمون دگرپادی بین IJMV-MDMV، میزان جذب در آزمون الیزا نشان داد که در مایه‌زنی توام، تفاوت معنی‌داری بین میزان جذب IJMVو MDMV (به‌ترتیب ۰/۳۳۶ و ۰/۳۳۵) وجود ندارد ولی در دو حالت دیگر میزان جذب IJMV بیشتر از MDMV بود (جدول ۲). نوع علایم ایجاد شده به غیر از تیمار توأم که نکروز همراه با موزائیک ایجاد می‌کرد، در بقیه تیمارها موزائیک معمولی بود و با تیمارهای شاهد که در آنها ویروس‌ها به‌طور انفرادی مایه‌زنی شده بودند، هیچ تفاوتی نداشت. براساس علایم نکروز همراه با موزائیک ایجاد شده در مایه‌زنی توام دو ویروس به نظر می‌رسد که ایندو اثر هم‌افزایی (Synergism) برهمدیگر داشته باشند.

۳. آزمون دگرپادی IJMV-BgSMV

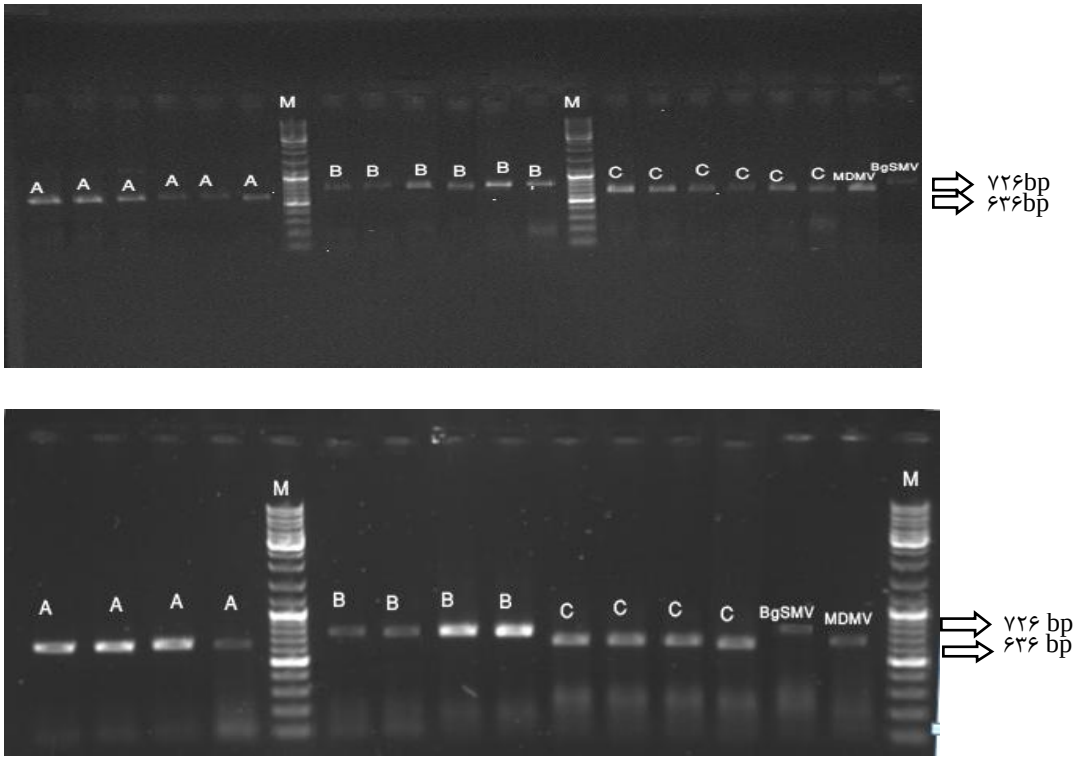
علایم ایجاد شده در تمامی تیمارهای این گروه با تیمارهای شاهد که ویروس‌ها به‌طور جداگانه مایه‌زنی شده بودند، هیچ تفاوتی نداشتند و همه داری علایم موزائیک در برگ‌ها بودند. درصد بوته‌های آلوده در تیمار مایه‌زنی شده با IJMV با ۸۴٪ بوته آلوده، بیشتر ازتیمار مایه‌زنی شده با BgSMV با ۴۴٪ بوته آلوده بود. هم‌چنین در تیمار مایه‌زنی متوالی BgSMV / IJMV با ۸۸٪ بوته آلوده نسبت به تیمار عکس آن (۴۲٪ بوته آلوده) آلودگی بیشتری وجود داشت (جدول ۲). بررسی آماری میانگین تعداد بوته‌های آلوده نشان داد که تیمارهای مایه‌زنی متوالی و توأم این گروه با هم تفاوت معنی‌داری دارند. هم‌چنین بین تیمارهای مایه‌زنی جداگانه به IJMV و BgSMV تفاوت

معنی‌داری وجود دارد. بین تیمارهای آلودگی جداگانه به IJMV با ۸۴٪ آلودگی و مایه‌زنی متوالی BgSMV / IJMV با ۸۸٪ آلودگی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. بر این اساس مشخص شد که آلوده‌سازی بوته‌ها توسط IJMV بیشتر از BgSMV می‌باشد.

این دو ویروس نیز همانند گروه قبلی با آنتی سرم‌های خودی قابل تشخیص هستند (Masumi *et al*. 2011) در نتیجه آزمون الیزا آسان‌ترین روش برای تمایز دو ویروس بود. میزان جذب در آزمون الیزا با آنتی سرم BgSMV در سطح یک درصد به‌طور معنی‌داری در هر سه تیمار نسبت به IJMV کمتر بود (جدول ۲). حتی در تیماری که BgSMV اول مایه‌زنی شده بود (با میزان جذب ۰/۲۱۵) میزان جذب کمتری نسبت به IJMV با میزان جذب ۰/۴۵۰ داشت. در آزمون توأم این اختلاف بیشتر بود که دلیل بر رقابت دو ویروس در این میزبان نیز می‌تواند باشد. بهر حال نشان‌دهنده این است که BgSMV کمتر از IJMV در سورگوم تکثیر پیدا می‌کند. از بررسی شش نمونه گیاهی از هر تیمار با آزمون الیزای غیرمستقیم مشخص شد که در تیمار مایه‌زنی متوالی BgSMV /IJMV (با ۸۸٪ بوته آلوده)، نسبت به مایه‌زنی عکس آن (BgSMV/IJMV با ۴۲٪ بوته آلوده) همه نمونه‌ها، با هر دو آنتی سرم واکنش مثبت نشان دادند (جدول ۲). این نتایج نشان‌دهنده این است که هر دو ویروس در تیمارهای متوالی و توأم با هم تکثیر می‌یابند و هیچ رابطه دگرپادی بین آنها وجود ندارد.

بین میانگین درصد بوته‌های آلوده در تیمار مایه‌زنی جداگانه با BgSMV، مایه‌زنی توأم و مایه‌زنی متوالی BgSMV/IJMV، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در تیمارهای مایه‌زنی جداگانه MDMV یا IJMV، با مایه‌زنی متوالی IJMV/MDMV و تیمار متوالی برعکس آن (MDMV/IJMV) تفاوت معنی‌داری از لحاظ درصد بوته‌های آلوده وجود نداشت. بررسی آماری نشان داد که تعداد بوته‌های آلوده در تیمارهایی که ابتدا MDMV یا IJMV مایه‌زنی شده‌اند شبیه به هم بوده و بیشتر از تیمارهایی است که ابتدا BgSMV مایه‌زنی شده است. این مسأله نشان‌دهنده سازگاری بیشتر MDMV و IJMV با سورگوم نسبت به BgSMV است. نتایج آزمون آماری نشان داد که میانگین جذب نوری الیزا برای IJMV با میزان ۰/۴۰۹ بیشترین و BgSMV با میانگین ۰/۲۰۴ کمترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند. MDMV با میانگین ۰/۳۱۵ بعد از IJMV بیشترین میزان جذب را داشته است.

به‌دلیل هم‌پوشانی آنتی سرم‌های MDMV و BgSMV، الیزای غیرمستقیم قادر به تشخیص آنها در تیمارها نبود، بنابراین از آزمون PCR برای تمایز و تشخیص آنها استفاده شد. بدین منظور ده نمونه از هر تیمار با آغازگرهای اختصاصی در آزمون RT-PCR بررسی شدند. ویروس MDMV با جفت آغازگر MD3F/MD1R در آزمون PCR قطعه‌ای به طول bp ۶۳۶ و BgSMV به‌دلیل داشتن bp ۹۰ بیشتر نسبت به MDMV قطعه‌ای سنگین‌تر و به طول bp ۷۲۶ را تکثیر می‌کند (شکل ۱) که با این آغازگر دو ویروس از هم تشخیص داده می‌شوند. تیمار توأم نیز با جفت آغازگرهای MD3F/MD1R قطعه bp ۶۳۶ و با BgSMF90/BgSMR90b قطعه bp ۱۳۲ را تکثیر می‌کند که به‌ترتیب نشانگر قطعات حاصل از تکثیر MDMV و BgSMV هستند (شکل‌های ۱ و ۲). نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که از هر ده نمونه گیاهی مورد بررسی در تیمارهای متوالی، در همه نمونه‌ها ویروسی که اول به گیاه مایه‌زنی می‌شود از تکثیر ویروس



شکل ۱. نقوش الکتروفورزی محصول PCR، MDMV و BgSMV با استفاده از جفت آغازگر MD3F/MD1R، در آزمون دگر پادی

Fig. l. Electrophoresis pattern of PCR products of MDMV and BgSMV using MD3f/MD1r primer pair in cross protection trials.

A) مایه‌زنی متوالی MDMV و سپس BgSMV بعد از بروز علایم موزائیک و قطعه حاصله از تکثیر MDMV

B) مایه‌زنی متوالی BgSMV سپس MDMV بعد از بروز علایم موزائیک و قطعه حاصله از تکثیر BgSMV

C) مایه‌زنی توأم دو ویروس و قطعه حاصله از تکثیر MDMV

MDMV و BgSMV، قطعات حاصله از ویروس خالص

M نشانگر GenRuler^{TM}100 bp DNA Ladder (Fermentas)

A. MDMV- infected plants challenge inoculated by BgSMV

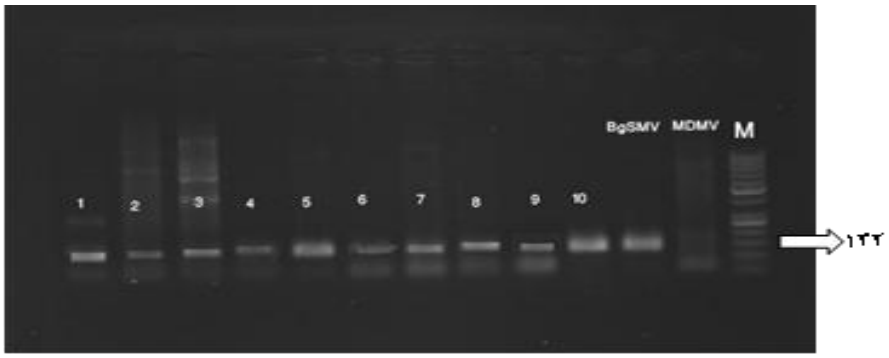
B. BgSMV- infected plants challenge inoculated by MDMV

C. Plants simultaneously inoculated by MDMV and BgSMV and patterns resulted from amplification of MDMV

MDMV and BgSMV: represent PCR products using each purified virus as template

M, Gene Ruler^{TM} 100bp DNA Ladder (Fermentas)

دوم جلوگیری می‌کند. به این صورت که در تیمارهای متوالی MDMV/BgSMV، قطعه حاصل از تکثیر با جفت آغازگر MD3F/MD1R به اندازه ۶۳۶ bp ویروس MDMV و هم‌چنین در تیمار متوالی عکس آن (BgSMV/MDMV)، قطعه حاصله از تکثیر با همین جفت آغازگر به طول ۷۲۶ bp، ویروس BgSMV می‌باشد. در مایه‌زنی توأم نیز همه ده نمونه گیاهی به هر دو ویروس آلوده بودند. یعنی قطعه‌ای که با جفت آغازگر MD3F/MD1R تکثیر می‌شود، مربوط به ویروس MDMV بود و ویروس BgSMV احتمالاً به‌دلیل غلظت پایین در گیاه، با این آغازگر در این تیمار تشخیص داده نشد. برای تأیید وجود این ویروس از جفت آغازگر BgSMF90/BgSMRb استفاده شد که تنها این ویروس را تکثیر می‌کند و MDMV تکثیر نمی‌یابد. قطعه



شکل ۲. نقوش الکتروفورز محصول PCR ویروس‌های MDMV و BgSMV با جفت آغازگر BgSMF90/BgSMR90b در تیمار آلودگی توأم دو ویروس در آزمون دگر پادی.

Fig. 2. Electrophoresis pattern of PCR products from sorghum co-infected with BgSMV and MDMV using primer pair BgSMF90/BgSMR90.

راهک‌های ۱ تا ۱۰ از ده نمونه تصادفی از تیمار توأم

BgSMV و MDMV، قطعات تکثیر شده از دو ویروس خالص با جفت آغازگر BgSMF90/BgSMR90b

M: مارکر GenRuler^{TM}50 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lanes 1 to 10, random sampling from 50 plants co-inoculated by both viruses.
BgSMV and MDMV represent PCR products with BgSMVF90/BgSMR90b primer pair and purified BgSMV or MDMV template.
M; Gene Ruler^{TM} 50bp plus DNA Ladder (Fermentas)

۱۳۲ نوکلئوتیدی که از تکثیر این جفت آغازگر حاصل شد مربوط به BgSMV بود. در تیمارهایی که MDMV و IJMV ابتدا و یا به‌طور انفرادی مایه‌زنی شده بودند علایم موزائیک بعد از ۶ روز و یا زودتر و در مواردی که BgSMV ابتدا و یا به‌طور انفرادی مایه‌زنی شده بود علایم ۹ روز بعد ظاهر شد. بر این اساس می‌توان گفت دوره کمون دو ویروس MDMV و IJMV در گیاه سورگوم کوتاه‌تر از BgSMV است.

به‌طورکلی نتایج این بررسی نشان می‌دهد که MDMV و BgSMV با هم رابطه دگرپادی دارند و براساس بررسی‌های مولکولی و بیولوژیکی پیشین (Zare *et al.* 2004, Masumi *et al.* 2011) به نظر می‌رسد که این دو ویروس دو سویه یک ویروس یا دو ویروس با رابطه نزدیک به هم باشند که بین آنها دگرپادی عمل می‌کند. نتایج حاصل از این آزمون با نتایج آزمون دگرپادی بین گونه‌های زیرگروه SCMV مطابقت دارد (Krstic *et al.* 1995). براساس مطالعات آنها مشخص شد که ویروس‌های SCMV، MDMV، JGMV و SrMV نیز با هم رابطه دگرپادی نداشته و هر کدام ویروسی مستقل هستند. این آزمون می تواند به‌عنوان یک روش تأئیدی در تشخیص و تمایز گونه و سویه ویروس‌ها و تعیین رابطه تاکسونومیکی آنها به‌کار رود.

مقایسه توالی اسیدهای آمینه نشان می‌دهد که انتهای آمینی CP در ویروس‌های جنس *Potyvirus* متفاوت و در مقابل بخش میانی و انتهای کربوکسیلی آن خیلی حفاظت شده است (Shukla & Ward 1989, Ward & Shukla 1991). تاکنون دخالت بخش انتهای آمینی CP در انتقال با شته (Atreya *et al.* 1990)، حرکت در مسافت طولانی (Dolja *et al.* 1994) و هم‌چنین تأثیر در دامنه میزبانی پوتی ویروس‌ها (Xiao *et al.* 1993)

مشخص شده است. احتمال دخالت این بخش نیز در وقوع پدیده دگر پادی پیشنهاد شده است (Matthews 1991, Sherwood & Fulton 1982, Shukla *et al.* 1991). *کرستیک و همکاران* (۱۹۹۵) به این نتیجه رسیدند که میزان تشابه پائین در ترادف اسیدهای آمینه انتهای آمینی CP می‌تواند دلیل بر نبودن رابطه دگرپادی در بین سویه‌های SCMV باشد. دو ویروس MDMV و BgSMV نیز در ناحیه ۵′ ژن CP تنها به اندازه ۹۰ نوکلئوتید تفاوت دارند (Farahbakhsh *et al.* in press, Zare *et al.* 2005) و این بررسی نیز نشان داد که رابطه دگرپادی بین آنها وجود دارد. بر این اساس می‌توان گفت که به استثنای وجود قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی در BgSMV تفاوت نوکلئوتیدی در سایر نواحی ژن CP به‌رغم تفاوت فیلوژنتیک بین دو ویروس (Farahbakhsh *et al.* in press, Zare *et al.* 2005)، در رابطه دگرپادی دو ویروس تأثیر قابل ملاحظه نگذاشته است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (119- 117) متن انگلیسی مراجعه شود.