# مقایسه بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی پوتی ویروس‌های گیاهان تیره غلات در ایران*

# BIOLOGICAL, SEROLOGICAL AND MOLECULAR COMPARISONS OF POTYVIRUSES INFECTING POACEOUS PLANTS IN IRAN

محمود معصومی**، آوا زارع و کرامت‌اله ایزدپناه[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۹/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۲/۱۹)

## چکیده

تا کنون چندین پوتی ویرید آلوده کننده غلات از ایران گزارش شده‌اند. تنوع وسیع این ویروس‌ها از یک سو و تشابه برخی از آنها از سوی دیگر موجب شد که بازبینی دقیقی جهت تمایز و تشخیص آنها به عمل آید. بدین منظور ویروس موزائیک ایرانی قیاق (*Iranian Johnson grass mosaic virus*, IJMV) از قیاق شیراز و خوزستان، ویروس موزائیک مرغ (*Bermuda grass mosaic virus*, BgMV) از مرغ شیراز، ویروس موزائیک نیشکر (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) از نیشکر استان خوزستان، ویروس موزائیک جنوبی مرغ (*Bermuda grass southern mosaic virus*, BgSMV) از مرغ جیرفت و صفی آباد خوزستان و جدایه ایرانی ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) از ذرت دشت ناز ساری جمع‌آوری و از نظر خصوصیات سرولوژیک، دامنه میزبانی، ناقل و خصوصیات مولکولی مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند. برای آزمون‌های سرولوژیک از آنتی سرم و ایمونوگلوبولین‌های MDMV-G از آلمان و SCMV، BgMV، BgSMV، IJMV و MDMV-Ir از ایران استفاده شد. آزمون‌های متداول سرولوژیک مانند نشت دو طرفه در ژل آگاروز (AGD) و الیزا حاکی از این بود که جدایه‌های BgSMV با MDMV-G و MDMV-Ir رابطه سرولوژیک قوی دارند و با آزمون الیزا قابل تفکیک نیستند، ولی در AGD با تشکیل مهمیزک از یکدیگر متمایز می‌شوند. در الکتروفورز پروتئین و آزمون وسترن بلات باند پروتئینی این ویروس‌ها از هم متمایز شدند. به جز BgMV سایر ویروس‌ها با یکدیگر رابطه سرولوژیک دارند. ولی در AGD با تشکیل مهمیزک از یکدیگر متمایز می‌شوند. در مقایسه دامنه میزبانی، کلیه ویروس‌ها (جدایه‌ها) به جز BgMV قادر به آلوده‌سازی ارقام سورگوم و ذرت مورد آزمایش و رشدی بودند. BgSMV و MDMV-Ir از نظر آلوده‌سازی ارزن مرواریدی از SCMV، BgMV و IJMV متمایزهستند و IJMV و MDMV-Ir از نظر آلوده‌سازی قیاق (*Sorghum halepense*) با BgSMV، SCMV و BgMV تفاوت دارند. آزمون انتقال با شته‌های *Rhopalosiphum maidis*، *R. padi*، *Schizaphis graminum*، *Sipha elegans* و *Hysteroneura* sp. انجام گرفت. IJMV و MDMV-Ir از نظر انتقال با این شته‌ها قابل تفکیک نبودند. جدایه‌های BgSMV توسط *R. maidis* انتقال نیافتند. BgMV تنها با انتقال با شته‌های *Hysteroneura* sp. و *S. elegans* از بقیه جدایه‌ها متمایز شد. در مقایسه مولکولی ناحیه میانی ژن پروتئین پوششی این ویروس‌ها با تعدادی از پوتی ویروس‌های غلات در دنیا، جدایه‌های IJMV در یک گروه و در کنار ویروس موزائیک زآ (*Zea mosaic virus*, ZeMV)، جدایه‌های BgSMV در کنار جدایه‌های MDMV ولی در شاخه‌ای جداگانه، SCMV از ایران در کنار جدایه‌های آمریکا و استرالیا و MDMV از ایران در کنار MDMV از اروپا قرار گرفتند. به طور کلی صرف‌نظر از اعضای جنس *Tritimovirus* که از گندم و ویروس موزائیک علف دانه قناری نی مانند (*reed canary grass mosaic virus*, RCGMV) که از *Phalaris arundinacea* گزارش شده است، در ایران از روی گیاهان تیره غلات پنج ویروس *Potyviridae* تشخیص داده شده است. ۱) ویروس‌های IJMV و MDMV که قیاق و ذرت را آلوده می‌کند، ۲) ویروس BgSMV که روی مرغ در مناطق گرمسیری جنوب ایران گسترش دارد و آلودگی طبیعی ذرت به این ویروس نیز مشخص شده است، ۳) ویروس SCMV که تاکنون در ایران تنها از نیشکر گزارش شده است و ۴) ویروس BgMV که ویروسی کاملا متمایز است و در ایران تنها روی مرغ شناسایی شده است و در مناطق معتدل و خنک در ایران گسترش وسیعی دارد..

**واژه‌های کلیدی:** پوتی ویروس‌های غلات، ذرت، نیشکر، مرغ، قیاق، ویروس موزائیک ایرانی قیاق، ویروس موزائیک مرغ، ویروس موزائیک جنوبی مرغ، ویروس موزائیک نیشکر، ویروس موزائیک کوتولگی ذرت، ویروس موزائیک زآ، شته‌های غلات

---

*: بخشی از طرح تحقیقاتی مطالعه جامع اپیدمیولوژی و مدیریت بیماری‌های ویروسی ذرت در ایران، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز

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

۱. به ترتیب استادیار، کارشناس ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز

**مقدمه**

پوتی ویروس‌ها از گسترده‌ترین ویروس‌های غلات در دنیا به شمار می‌روند. این ویروس‌ها روی ذرت، سورگوم و نیشکر خسارت ایجاد می‌کنند. پوتی ویروس‌هایی که تا سال ۱۹۸۹ در غلات شناخته شده بودند شامل ویروس موزائیک نیشکر (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV)، ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV)، ویروس موزائیک سورگوم (*Sorghum mosaic virus*, SrMV) و ویروس موزائیک قیاق (*Johnson grass mosaic virus* , JGMV) بودند (Shukla *et al.* 1989). در سال ۲۰۰۰ ویروس موزائیک زآ (*Zea mosaic virus*, ZeMV) از اسرائیل (Seifers *et al.* 2000) و در سال ۲۰۰۳ ویروس موزائیک پنی‌ستوم (PenMV) (*Pennisetum mosaic virus*, Fan *et al.* 2003) به این گروه اضافه شدند.

IJMV اولین پوتی ویروسی بود که در ایران روی قیاق شناخته شد (Izadpanah 1983). در سال‌های بعد ویروس‌های رشته‌ای مشابهی از ذرت در فارس، تهران، کرج، مشهد، مازندران و قزوین (Afsharifar & Izadpanah 1991, Izadpanah & Kamran 1995, Masumi & Izadpanah 1995)، سورگوم در مشهد (Afsharifar & Izadpanah 1991)، نیشکر در خوزستان (Amiri & Izadpanah 1993 a,b)، رشدی از برازجان (Izadpanah 1986, Ghasemi & Izadpanah 1998, 2000) و قیاق و سایر علف‌های هرز از اکثر مناطق کشور (Masumi & Izadpanah 1995) گزارش شدند. منشاء اکثر این ویروس‌ها قیاق و علف‌های هرز دیگر است. علائم موزائیک در تعداد زیادی از علف‌های هرز تیره غلات در سراسر ایران مشاهده شده است. علائم موزائیک روی قیاق عمدتاً مربوط به آلودگی به IJMV است. در مرغ دو ویروس کاملاً متفاوت گزارش شده که علائم موزائیک ایجاد می‌کنند: یکی ویروس موزائیک جنوبی مرغ (Bermudagrass southern mosaic virus, BgSMV) (Zare *et al.* 2005) که محدود به مناطق جنوبی و گرمسیر ایران است و دیگری ویروس موزائیک مرغ (Bermudagrass mosaic virus, BgMV) که در مناطق معتدل و سردسیر ایران گسترش وسیع‌تری دارد (Masumi & Izadpanah 2000). BgMV براساس علائم شناسی، مورفولوژی و انتقال با پوتی ویروس‌ها تشابه دارد (Hosseini & Izadpzanah 2005, Masumi & Izadpanah 1998, 2000, 2002b,c). در سال ۲۰۰۱، معینی و *ایزدپناه* (Moini & Izadpanah 2001) ویروسی شبیه به ویروس موزائیک کوتولگی ذرت از ذرت در استان مازندران جدا ساختند. به دنبال آن *معصومی و همکاران*، ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) را از مازندران و اصفهان گزارش کردند (Masumi *et al.* 2004a).

BgSMV ابتدا در سال ۱۹۹۹ از گیاه رشدی (*Eleusine compressa*) از منطقه برازجان و سپس از مرغ در نواحی گرم جنوب ایران گزارش شد (Ghasemi & Izadpanah 1998, Masumi & Izadpanah 1998, Zare *et al.* 2005,). این ویروس با MDMV رابطه سرولوژیکی دارد (Masumi & Izadpanah 2000).

اکثر این ویروس‌ها به استثنای BgMV با هم رابطه سرولوژیکی دارند (Hosseini & Izadpanah 2005, Masumi & Izadpanah 2000). در تحقیقات اخیر مشخص شده است که BgMV یکی از استرین‌های Spartina mottle virus است که برای آن یک جنس

جدیدی به نام Sparmovirus در تیره پوتی ویریده پیشنهاد شده است (Hosseini *et al.* 2010). خصوصیات بیولوژیک متفاوت و رابطه سرولوژیکی پیچیده این ویروس‌ها رابطه تاکسونومیکی آنها را پیچیده‌تر کرده است. این تحقیق به منظور روشن شدن این رابطه و تعیین جایگاه تاکسونومیکی آنها انجام شده است. در این تحقیق پوتی ویروس‌های شناخته شده ایران از نظر دامنه میزبانی، انتقال، رابطه سرولوژیک و مولکولی مورد مقایسه قرار گرفته‌اند.

## روش بررسی

### منبع ویروس

IJMV از سطح شهر شیراز (IJMV-Sh) و اندیمشک خوزستان (IJMV-Kh) از روی قیاق آلوده، BgSMV از جیرفت (BgSMV-J) و صفی آباد خوزستان (BgSMV-Sf) از روی مرغ، MDMV از دشت نازی ساری از ذرت و قیاق، SCMV از مزارع نیشکر شرکت کشت و توسعه نیشکر و صنایع جانبی آن (واحد امیرکبیر) در خوزستان و BgMV از سطح شهر شیراز از روی مرغ جمع‌آوری گردیدند. کلیه ویروس‌ها به جز BgMV به سورگوم منتقل شدند و چندین نوبت از سورگوم به سورگوم انتقال داده شدند. BgMV به گیاه رشدی منتقل شد. سپس گیاهان به دست آمده با ELISA مورد بررسی قرار گرفتند. برای جدا سازی MDMV از IJMV که هر دو قیاق و ذرت را آلوده می‌کنند، از ارزن مرواریدی استفاده شد.

### منبع آنتی‌سرم و آزمون‌های سرولوژیک

آزمون‌های سرولوژیک با استفاده از آنتی‌سرم و ایمونوگلوبولین‌های BgMV، BgSMV، IJMV، MDMV و SCMV تهیه شده در مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی و نیز MDMV-G (اهدایی دکتر Huth از آلمان) انجام شد. برای جذب آنتی‌سرم‌ها، برگ گیاه سورگوم سالم در دو برابر بافر سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار، pH= ۷ عصاره‌گیری و با کلروفرم به نسبت ۳۰% تیمار و به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. آنتی‌سرم با مقدار هم حجم خود از عصاره گیاه سالم، طی سه نوبت تیمار شد.

برای تعیین رابطه سرولوژیک جدایه‌ها از آزمون‌های نشت دوطرفه در ژل آگاروز ۰/۷درصد حاوی ۰/۵ در صد SDS (سدیم دودسیل سولفات) (Ball 1990) و الیزا (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) طبق روش *کلارک و بارژوزف* (۱۹۸۴)، با اصلاحاتی (Masumi *et al.* 2000) استفاده شد. در آزمون‌های سرولوژیک برای درک بهتر رابطه این دو ویروس علاوه بر آنتی‌سرم و آنتی‌بادی‌های مذکور از آنتی‌سرم MDMV که با ویروس IJMV جذب شده بود نیز استفاده شد. هم‌چنین پروتئین پوششی جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون وسترن بلات مقایسه و ارتباط سرولوژیک بین جدایه‌ها بررسی گردید (Hibi & Saito 1985, Hammond 1990).

### مقایسه نقوش الکتروفورزی پروتئین پوششی

برای مقایسه نقوش الکتروفورزی پروتئین پوششی از الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید به روش *لیملی* (۱۹۷۰) و *ترنر و فوستر* (۱۹۸۹) استفاده شد. جدایه‌های مورد مقایسه پس از خالص سازی نسبی به روش minipurification (Lane 1978) با اضافه کردن بافر نمونه، در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد واسرشته شدند. نمونه‌ها در ژل آکریل آمید ۱۲% الکتروفورز شدند و نقوش تشکیل شده با مارکر پروتئین مقایسه و وزن

مولکولی آنها محاسبه گردید. پروتئین‌های پوششی ویروس موزائیک نوار کلروتیک قیاق (*Johnsongrass chlorotic stripe mosaic virus*, JCSMV) (۴۱ و ۸۲ کیلو دالتون)، ویروس X سیب زمینی (Potato X virus, PVX) (۳۰ کیلو دالتون)، ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (۱۷/۵ کیلو دالتون) و مارکر پروتئینی Premixed Protein Molecular Weight Marker با اندازه‌های ۹۷/۴، ۶۶/۲، ۳۹/۲، ۲۶/۶، ۲۱/۵ و ۱۴/۴ کیلو دالتون (Roche) به عنوان مارکر در نظر گرفته شدند.

## آزمون انتقال

به منظور مقایسه ناقلین پوتی ویروس‌های مورد مطالعه و امکان تمایز آنها توسط ناقلین، شته‌های *Rhopalosiphum padi*، *R. maidis*، *Schizaphis graminum* از گیاهان مختلف و *Sipha elegans* و *Hysteroneura* sp. از روی مرغ در سطح شهر شیراز جمع‌آوری و پس از تهیه همسانه‌های خالص در مجموعه‌های یک‌نواخت روی گیاهان جو، سورگوم و مرغ (بسته به نوع شته) در قفسه‌های جداگانه در گلدان نگهداری شدند.

برای یک‌نواخت بودن شرایط آزمایش در آزمون انتقال از دو رقم سورگوم اسپیدفید و شوگرگریز استفاده شد که تمام سویه‌ها روی آن علائم ایجاد می‌نمودند. در مورد BgMV، از گیاهان مرغ و سورگوم (رقم اسپیدفید) آلوده به عنوان منبع ویروس استفاده شد.

شته‌ها پس از ۲ تا ۴ ساعت گرسنگی، برای تغذیه گیرش به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه روی گیاهان آلوده قرار داده شدند. پس از آن تعداد پنج شته روی هر گیاهچه سورگوم در مرحله دوبرگی گذاشته و محصور شد. تعداد گیاهان موجود در هر گلدان ۱۰ بوته بود و هر آزمون انتقال با ۳ تکرار انجام گرفت. این گلدان‌ها پس از یک شب با حشره‌کش پریمور سم پاشی شده و برای ظهور علائم در گلخانه نگهداری گردیدند. این آزمون در صورت مشاهده علائم یک بار دیگر و در صورت عدم مشاهده علائم دو تا سه بار دیگر تکرار شد.

## دامنه میزبانی

به منظور مقایسه دامنه میزبانی و یافتن میزبان‌های افتراقی، جدایه‌های ویروس روی تعدادی از گیاهان تیره گرامینه به‌طور مکانیکی مایه‌زنی شدند. در این آزمایش از تعدادی از ارقام تجاری سورگوم استفاده شد (جدول ۳).

پس از ظهور علائم برای حصول اطمینان از انتقال مکانیکی و یا انتقال ویروس با شته و آلوده شدن گیاه از آزمون ELISA استفاده گردید. گیاهانی که علائم نشان ندادند نیز مورد آزمایش قرار گرفتند.

## مقایسه گونه‌ها و سویه‌های پوتی ویروس‌های غلات براساس ترادف ناحیه میانی ژن پروتئین پوششی

در این آزمون‌ها علاوه بر جدایه‌هایی که قبلاً مورد بررسی قرار گرفته بودند، جدایه‌های BgSMV از بوشهر، برازجان و اهواز و IJMV از اندیمشک، چغازنبیل و کرج نیز مورد مقایسه مولکولی قرار گرفتند. آلودگی تمام نمونه‌ها قبل از آزمون‌های مولکولی به روش‌های سرولوژیک تأیید شده بود.

بافت‌های آلوده به ویروس در سه حجم بافر سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار، pH= ۶/۵، همگن‌سازی و عصاره به دست آمده مستقیماً با کلروفرم به نسبت ۳۰ درصد، تیمار و سانتریفوژ شد و از فاز رویی برای تهیه cDNA استفاده

گردید. استخراج RNA با استفاده از کیت (Roche) mRNA Capture Kit طبق دستورالعمل سازنده انجام گرفت. از آر.ان.ای جذب شده به لوله برای واکنش ترانویسی معکوس (Reverse transcription, RT) با آنزیم Expand Reverse Transcriptase (Roche) استفاده گردید. واکنش RT در مخلوطی شامل ۰/۴ mM DTT، ۰/۴ mM مخلوط dNTP، ۲۰ U RNase inhibitor، ۰/۶ µM آغازگر RCF1 (5´-AGC TGG ACT CTT TTT TTT TTT TTT T-3´ French & Robertson 1993) و Expand RT 20U در ۱۰ میکرولیتر بافر ۵ برابر Expand RT تهیه گردید. مخلوط حاصل با افزودن آب به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و در دمای ۴۲°C به مدت یک ساعت نگهداری شد.

cDNA به دست آمده از واکنش RT با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (polymerase chain reaction, PCR) تکثیر شد. مخلوط واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر *Taq* DNA polymerase buffer (×۱۰)، $MgCl_2$ ۱/۵ mM، ۰/۲ mM مخلوط dNTP، ۰/۴ µM از هر کدام از آغازگرهای رفت (5´-ATG GTH TGG TGY ATH GAR AAY GG-3, Oligo 1n) و برگشت (5´-TGC TGC KGC YTT CAT YTG-3´, Oligo 2n) (Marie-Jeanne *et al.* 2000)، ۵ U آنزیم *Taq* DNA polymerase (Cinnagen, Iran) و ۳ میکرولیتر cDNA بود که با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر استریل حجم آن به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR شامل ۳۸ چرخه به شرح زیر بود: ۹۴° C به مدت ۳ دقیقه (چرخه یک)، ۹۴° C به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵° C به مدت یک دقیقه و ۷۲° C به مدت یک دقیقه (چرخه‌های دو تا شش)، ۹۴° C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵° C به مدت یک دقیقه و ۷۲° C به مدت یک دقیقه (چرخه‌های ۷ تا ۳۸). نهایتاً مخلوط واکنش به مدت ده دقیقه در دمای ۷۲° C نگهداری شد (Colinet & Kummert 1993).

محصول PCR به وسیله InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Lithuania) طبق دستورالعمل سازنده در پلاسمید pTZ57R/T وارد و در باکتری *E. coli* سویه DH5α همسانه‌سازی گردید. پلاسمیدها پس از استخراج (Holmes & Quigly 1981) به منظور تعیین ترادف به شرکت Macrogen (کره جنوبی) ارسال شدند و تعیین ترادف با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 انجام شد.

## آنالیز فیلوژنتیکی

پس از ادغام ترادف‌های حاصل از ۲ تا ۴ کلنی از قطعات مختلف، ترادف استنتاجی (Consensus sequence) با استفاده از نرم‌افزارهای DNAMAN و EditSeq (DNASTAR) به دست آمد. این ترادف‌ها با تعدادی از ترادف سایر ویروس‌های مرتبط شامل SCMV، MDMV، SrMV و JGMV موجود در GenBank مقایسه گردیدند(جدول ۵). همردیف‌سازی چندگانه (Multiple alignment) با برنامه‌های CLUSTAL X (Thompson *et al.* 1997) انجام شد.

درخت فیلوژنتیکی حاصل از همردیف‌سازی چندگانه به روش Neighbour joining، در برنامه Treeview1.6.6 (Page 1996) مشاهده و بررسی گردید. علاوه بر این درخت فیلوژنتیکی به روش Maximum Parsimony به وسیله برنامه MEGA3 نیز ترسیم گردید(Kumar *et al.* 2001) واختلاف ژنتیکی بین گروه‌ها نیز با این برنامه محاسبه شد. در این آنالیز ویروس موزائیک رگه‌ای گندم (*Wheat streak mosaic*

*virus*, WSMV) به عنوان outgroup به کار رفت.

## نتایج

### مقایسه جدایه‌ها با آزمون الیزا

با توجه به یکسان نبودن شرایط آزمایش در هر آزمون و نیز به منظور درک بهتر از واکنش جدایه‌ها نسبت به IgG و آنتی‌سرم‌های مختلف، میزان واکنش انجام شده با توجه به میزان جذب نور در ۴۱۰ نانومتر با شاخص صفر تا ۵ تعیین گردید. میزان واکنش نسبت به هر IgG برای گیاه سالم صفر و برای کنترل مثبت ۵ در نظر گرفته شد. واکنش‌های حد واسط با توجه به میزان اختلاف جذب نور در مورد گیاه سالم و کنترل مثبت با درجات ۴-۱ تعیین گردیدند. میانگین شاخص‌ها در تکرارهای مختلف این آزمون در جدول ۱ آمده است.

پس از جذب ایمونوگلوبولین‌های مورد آزمایش با عصاره گیاه سالم تقریباً هیچ یک از آنها با گیاه سالم واکنش نشان نداد.

ایمونوگلوبولین IJMV از شیراز با ویروس خودی (IJMV-Sh) و IJMV-Kh واکنش قوی، با SCMV واکنش خفیف و با MDMV و BgSMV-J و BgSMV-Sf واکنش بسیار خفیف نشان داد. این آنتی سرم با BgMV بدون واکنش بود.

آنتی‌سرم MDMV-G با تمام جدایه‌ها واکنش نشان داد. واکنش این آنتی‌سرم با MDMV-Ir، BgSMV-J و BgSMV-Sf بسیار قوی، با SCMV متوسط و با IJMV-Sh و IJMV-Kh ضعیف بود. واکنش BgMV با این آنتی‌سرم بسیار ضعیف بود.

آنتی بادی MDMV-Ir با ویروس خودی، BgSMV-Sf و BgSMV-J واکنش قوی، با IJMV-Sh و IJMV-Kh واکنش ضعیف و با SCMV واکنش بسیار ضعیف نشان داد.

پس از جذب این آنتی‌بادی با آموده خالص IJMV واکنش آن با IJMV-Sh و خوزستان IJMV-Kh تقریباً به صفر رسید ولی در میزان واکنش آن با سایر جدایه‌ها تغییری ایجاد نشد. آنتی‌بادی BgMV با هیچ یک از جدایه‌ها به جز ویروس خودی واکنش نشان نداد.

آنتی‌سرم SCMV با IJMV-Sh ، IJMV-Kh، MDMV ، BgSMV-J و BgSMV-Sf واکنش ضعیفی ایجاد کرد. آنتی‌سرم SCMV با BgMV فاقد واکنش بود.

به طور کلی با توجه به این آزمون، جدایه‌های IJMV-Sh و IJMV-Kh از نظر سرولوژیکی در یک گروه و MDMV، BgSMV-J و BgSMV-Sf در گروه دوم و SCMV و BgMV به طور مستقل هرکدام در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. اعضای دو گروه IJMV و MDMV با یکدیگر و با SCMV خصوصیات آنتی ژنیکی مشترکی دارند. ولی در هر حال دو جدایه اول به هم نزدیک‌تر هستند و به نظر می‌رسد که بین دو ویروس BgSMV و MDMV، MDMV به IJMV نزدیک تر باشد.

### مقایسه جدایه‌ها با آزمون AGD

جدایه‌های IJMV-Sh ، IJMV-Kh ،BgSMV-J و BgSMV-Sf در برابر آنتی سرم MDMV-Ir خط رسوب ایجاد کردند. واکنش آنها با تولید مهمیزک همراه بود (شکل ۱- A,B). BgMV و SCMV در برابر این آنتی‌سرم هیچ خط رسوبی ایجاد نکردند. جدایه IJMV-Kh در برابر آنتی‌سرم IJMV-Sh خط رسوب قوی ایجاد نمود (شکل۱- C). که با خط رسوب مربوط به IJMV-Sh پیوستگی داشت (شکل ۱-D). ویروس‌های SCMV و MDMV در برابر آنتی‌سرم این ویروس با تشکیل مهمیزک توسط IJMV خط رسوب ایجاد نمودند

**جدول۱. مقایسه میزان واکنش پوتی ویریدهای مختلف گیاهان تیره غلات در برابر آنتی سرم‌های مختلف در آزمون الیزا**

**Table 1. Comparison of reaction of cereal potyvirids against different antisera in ELISA**

| Antiserum or IgG ⇨ / Antigen ⇩ | IJMV | MDMV-G | MDMV-Ir | MDMV abs.IJMV | BgSMV | BgMV | SCMV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Healthy plant | 0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IJMV-Sh | 5 | 1-3 | 2-3 | 0-1 | 0-1 | 0 | 0-2 |
| IJMV-Kh | 5 | 1-3 | 2-3 | 0-1 | 0-1 | 0 | 0-2 |
| MDMV | 1 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 1-2 |
| BgSMV-J | 0 | 4-5 | 4-5 | 4-5 | 5 | 0-1 | 1 |
| BgSMV-Sf | 0-1 | 4-5 | 4-5 | 4-5 | 5 | 0-1 | 1 |
| SCMV | 1-2 | 0-3 | 0-1 | 0-1 | 0-1 | 0 | 5 |
| BgMV | 0 | 0-1 | 0 | 0 | 0-1 | 5 | 0 |
| Buffer (Blank) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*در این جدول میزان واکنش با شاخص ۵-۰ نشان داده شده است. شاخص ۵ برای کنترل مثبت هر آنتی سرم و صفر برای گیاه سالم منظور شده است. شاخص‌های ۴-۱ برای واکنش‌های حد واسط در نظر گرفته شد.

* The extent of reactions have been indicated by 0-5 indices. Number 5 was used for positive control of each antiserum and zero for healthy plant extracts. Numbers between 1 and 4 were used for intermediate reactions.

و دو جدایه BgSMV واکنش بسیار ضعیفی نشان دادند (شکل ۱- D,E). ویروس‌های MDMV و BgSMV-Sf در برابر آنتی‌سرم BgSMV خط رسوب قوی تولید نمودند. خط رسوب BgSMV-Sf با خط رسوب BgSMV-J پیوستگی داشت. خط رسوب این دو جدایه با خط رسوب MDMV مهمیزک ایجاد کرد (شکل ۱ - F-J). IJMV-Sh، IJMV-Kh و SCMV در مقابل این آنتی‌سرم خط رسوبی ضعیف‌تر همراه با تشکیل مهمیزک توسط ویروس خودی تولید نمودند (شکل۱- F-J). BgMV با هیچ کدام از آنتی‌سرم‌های مورد آزمایش واکنش نداشت و متقابلاً آنتی‌سرم BgMV نیز با هیچ کدام از جدایه‌ها به جز ویروس خودی واکنش نشان نداد (شکل ۱- K).

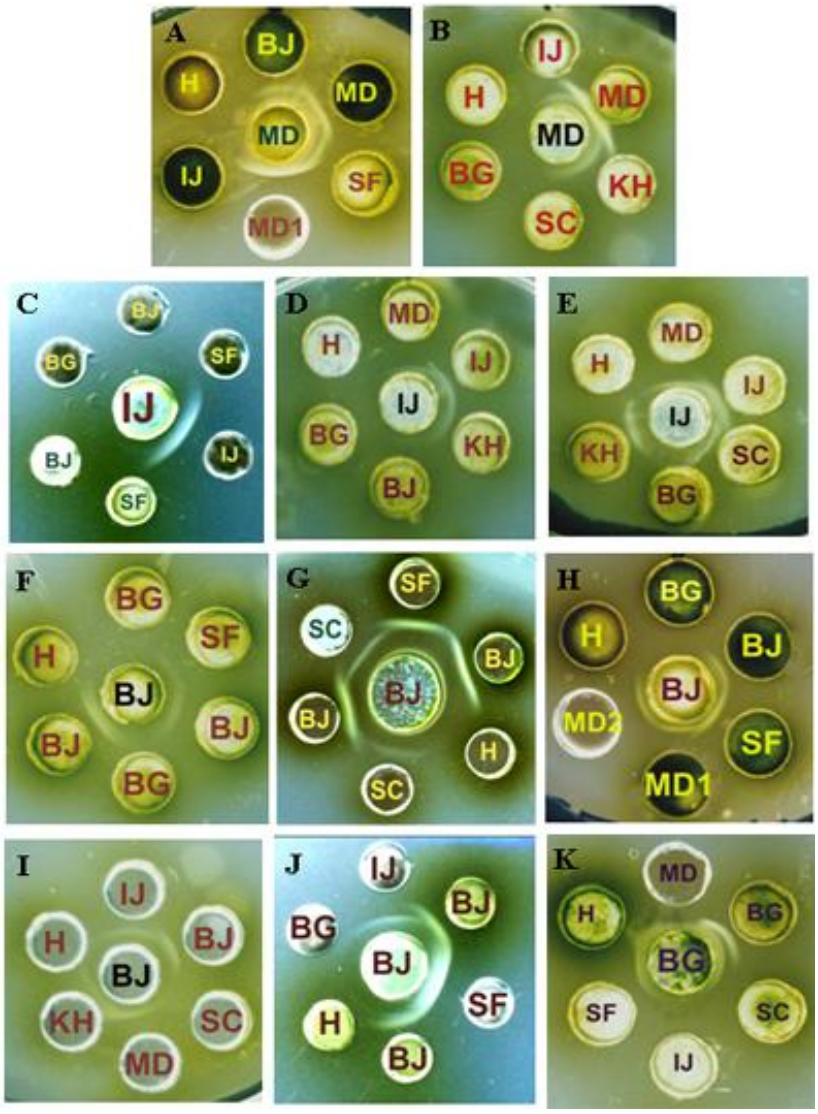
به طور کلی می‌توان گفت که ویروس‌های IJMV-Sh و IJMV-Kh از نظر سرولوژیکی و خصوصیات آنتی ژنی بسیار به هم نزدیک هستند. ویروس‌های BgSMV-J و BgSMV-Sf نیز از نظر سرولوژیکی و خصوصیات آنتی‌ژنی شبیه هستند و علیرغم ارتباط سرولوژیکی قوی که با MDMV دارند، خصوصیات آنتی‌ژنی متفاوتی دارند. از بین آنتی سرم‌های مورد بررسی BgSMV و IJMV با SCMV ارتباط سرولوژیک داشتند. ارتباط سرولوژیک IJMV، BgSMV و MDMV با این آزمون نیز تأیید گردید (شکل۱).

## مقایسه نقوش الکتروفورزی پروتئین پوششی

شکل ۲ نقوش الکتروفورزی پروتئین جدایه‌های مختلف را در ژل پلی آکریل آمید نشان می‌دهد. اندازه پروتئین پوششی برای جدایه‌های MDMV، BgSMV-J، BgSMV-Sf، BgMV، SCMV، IJMV-Kh و IJMV-Sh به ترتیب ۳۸/۰۷، ۳۹/۰۶، ۳۹/۰۱، ۴۳/۰۷، ۴۴/۱۶، ۴۴/۰۸ و ۴۰/۱ کیلو دالتون محاسبه شد.

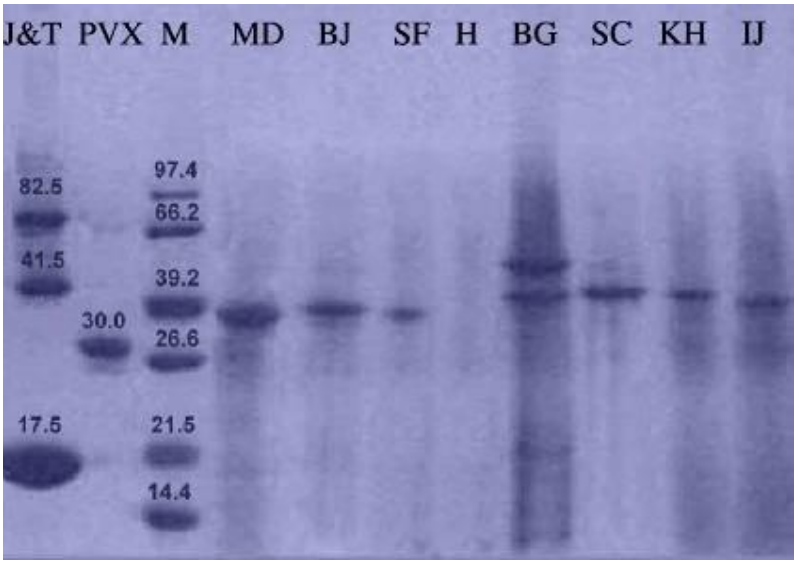
## وسترن بلات

ایمونوگلوبولین‌های MDMV-Ir و MDMV-Ir جذب شده با آموده خالص IJMV، تنها باند پروتئینی MDMV، BgSMV-J و BgSMV-Sf را تشخیص دادند




شکل ۱. واکنش پوتی ویریدهای غلات در برابر آنتی‌سرم‌های MDMV(A و B) و IJMV (C، D و E)، BgSMV (F-J) و BgMV (K) در آزمون AGD. در این شکل MDMV با MD، IJMV-Sh با IJ و IJMV-Kh با KH ، BgMV با BG، SCMV با SC، BgSMV-J با BJ، BgSMV-Sf با SF و گیاه سالم با H نشان داده شده است. حفره مرکزی حاوی آنتی‌سرم و حفره‌های اطراف حاوی عصاره گیاهان آلوده یا سالم (H)

**Fig. 1. Reaction of poaceous potyvirids (peripheral wells) against MDMV (A and B), IJMV (C, D and E), BgSMV (F-J) and BgMV (K) antisera (central wells) in agarose gel diffusion test. MD, MDMV; IJ, IJMV-Sh; KH, IJMV-KH; BJ, BgSMV-J; SF, BgSMV-SF; BG, BgMV; SC, SCMV and H, healthy plants sap.**




**شکل۲. نقوش الکتروفورزی پروتئین پوششی پوتی ویروس‌ها و جدایه‌های مختلف ایران. در این شکل MDMV با MD ، IJMV با IJ، BgMV با BG، SCMV با SC، IJMV-Kh با KH، BgSMV-J با BJ، BgSMV-Sf با SF، مارکر پروتئین با M پروتئین پوششی ویروس X سیب زمینی با PVX و مخلوط ویروس‌های موزائیک توتون و موزائیک نوار کلروتیک قیاق با J&T و گیاه سالم با H نشان داده شده است.**

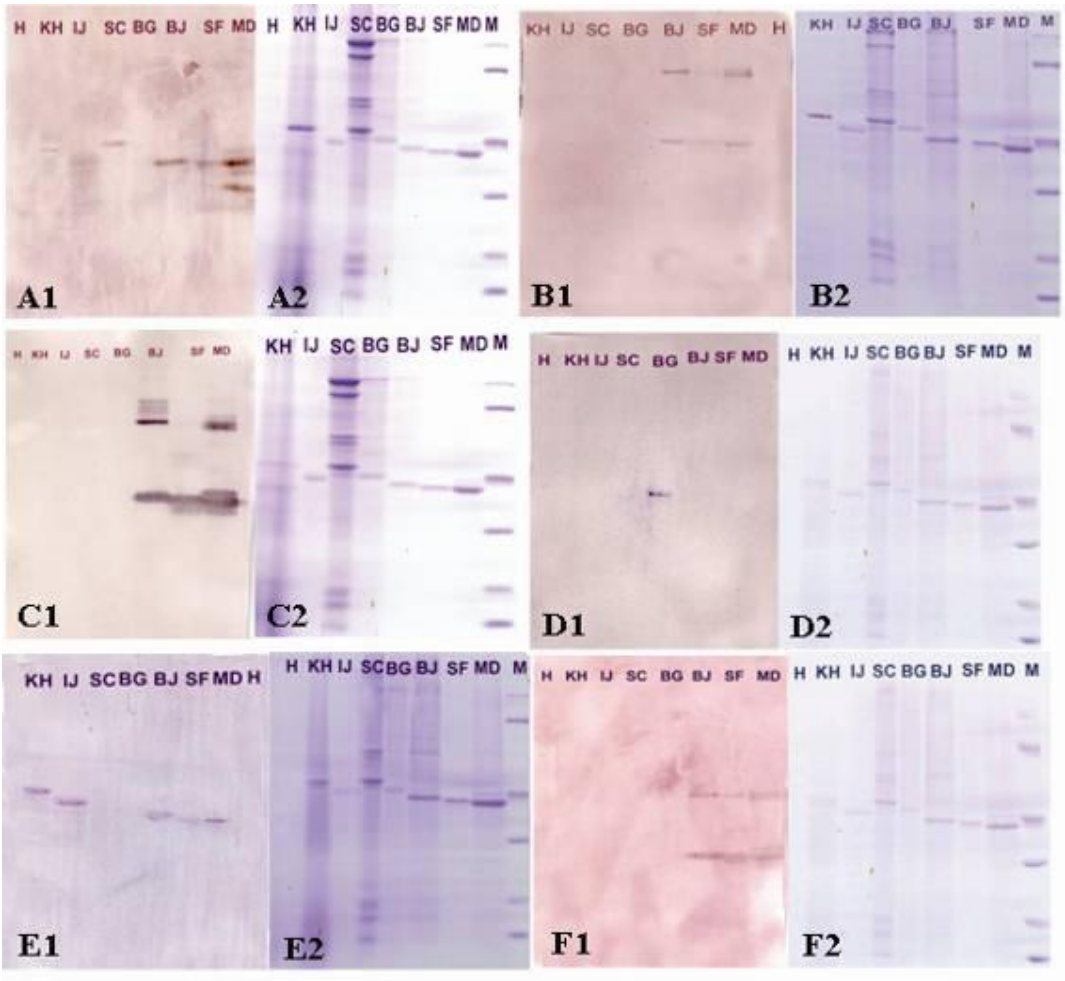
**Fig. 2. Electrophoretic pattern of coat protein of Iranian potyvirid isolates. MDMV (MD), IJMV (IJ), BgMV (BG), SCMV (SC), IJMV-Kh (KH), BgSMV-J (BJ), BgSMV (SF), protein weight marker (M), coat protein of potato virus X (PVX), mixture of coat proteins of tobacco mosaic virus and Johnson grass chlorotic stripe mosaic virus (J&T) and healthy plant (H).**

(شکل ۳-A, B) و هیچ کدام با گیاه سالم و یا جدایه‌های دیگر واکنشی نشان ندادند. آنتی‌سرم MDMV-G علاوه برجدایه‌های فوق با IJMV-Sh و IJMV-Kh و SCMV نیز واکنش خفیف نشان داد (شکل ۳- C). آنتی سرم IJMV-Sh با ویروس خودی و IJMV-Kh واکنش قوی نشان داد و با MDMV، BgSMV-Sf، BgSMV-J و SCMV باند خفیفی ایجاد نمود(شکل ۳- E ). باندهای پروتئینی BgSMV-J ، BgSMV-Sf و MDMV با ایمونوگلوبولین BgSMV-J واکنش مثبت دادند و جدایه‌های دیگر با این آنتی سرم واکنش نداشتند (شکل ۳-F). در این آزمون باندهای سنگینی از واکنش پروتئین جدایه‌های MDMV، BgSMV-J و BgSMV-Sf با آنتی بادی‌های MDMV-Ir و BgSMV-J مشاهده شد که در ژل الکتروفورز قابل رؤیت نبود. BgMV تنها با ویروس خودی واکنش نشان داد (شکل ۳- D ).

## آزمون‌های انتقال

براساس آزمایش‌های انجام شده، *Schizaphis graminum* توانست جدایه‌های IJMV-Kh و IJMV-Sh، MDMV، BgMV ، BgSMV-J و BgSMV-Sf را منتقل کند.

*Rhopalosiphum padi* تمام جدایه‌ها به جز BgMV را انتقال داد ولی *R. maidis* تنها MDMV، IJMV-Sh و IJMV-Kh را منتقل کرد و تلاش برای




**شکل ۳. نقش‌های الکتروفورزی ( سمت راست) و آزمون وسترن بلات (سمت چپ) پروتئین پوششی MDMV (MD)، IJMV-Sh (IJ)، IJMV-Kh(KH)، BgMV (BG)، SCMV (SC)، BgSMV-J (BJ) و BgSMV-SF (SF). M، ماکر پروتئین و H آموده گیاه سالم است. ایمونوگلوبولین‌های مورد استفاده مربوط به ویروس‌های MDMV-G (A1 و A2)، MDMV- Ir جذب شده با IJMV خالص شده (B1 و B2)، MDMV- Ir (C1 و C2)، BgMV (D1 و D2)، IJMV (E1 و E2) و BgSMV (F1 و F2) است. برای اسامی ویروس‌ها به متن مقاله رجوع شود.**

**Fig. 3. Electrophoresis (right) and Western blot (left) patterns of coat protein of MDMV (MD), IJMV-Sh (IJ), IJMV-Kh (KH), BgMV (BG), SCMV (SC), BgSMV-J (BJ), and BgSMV-Sf. M is protein marker and H is healthy plant material. Immunoglubolins used were those of MDMV-G (A1 and A2) and MDMV-Ir absorbed by purified IJMV (B1 and B2), MDMV-Ir (C1 and C2), BgMV (D1 and D2), IJMV (E1 and E2) and BgSMV (F1 and F2). See text for abbreviations.**

انتقال BgSMV-J و BgSMV-Sf به وسیله این شته ناموفق بود. *Sipha elegans* و *Hysteroneura* sp. تنها BgMV را انتقال دادند.

براین اساس BgMV با انتقال توسط دو شته *S. elgans* و *Hysteroneura* sp. از دیگر جدایه‌ها متمایز شد. IJMV و MDMV با شته‌های مورد آزمایش

قابل تفکیک نبودند. ولی BgSMV-J و BgSMV-Sf را به علت عدم انتقال توسط *R. maidis* می‌توان از MDMV متمایز دانست (جدول ۲).

**دامنه میزبانی**

با توجه به ظهور یا عدم ظهور علائم در گیاهان مایه‌زنی شده و نیز نتایج آزمون الیزا هیچ یک از جدایه‌های مورد آزمایش به گیاهان جو، گندم، یولاف و چاودار منتقل نشدند، اما تمام جدایه‌ها به رشدی منتقل شدند.

تمام سویه‌ها به جز BgMV در ارقام مختلف سورگوم علائم موزائیک یا نکروز قرمز ایجاد نمودند. BgMV تنها در ارقام اسپیدفید و شوگرگریز موزائیک و در ارقام کیمیا، جامبو و سپیده نقاط بافت مرده ایجاد نمود(شکل۴-A). نوارها و نکروز قرمز در گیاه سورگوم فقط توسط IJMV-Sh ، IJMV-Kh و SCMV ایجاد شد. نتایج مقایسه علائم ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف درگیاه سورگوم در جدول ۳ آمده است. به دلیل یکسان نبودن شرایط در مقایسه دامنه میزبانی جدایه‌های مختلف، مقایسه کمی توانایی آلوده‌سازی گیاهان مختلف توسط این جدایه‌ها دشوار و غیر قابل اطمینان می‌باشد. لذا از آوردن این اطلاعات خودداری شده است. ولی به طور کلی می‌توان گفت که تمام جدایه‌ها به جز BgMV گیاه سورگوم را با راندمان بالایی آلوده می‌کنند. BgMV تنها روی ارقام شوگر گریز و اسپید فید علائم موزائیک مشخصی ایجاد کرد. راندمان آلوده‌سازی گیاه رشدی توسط BgMV از سایر گیاهان بیشتر بود (شکل۴-B).

BgSMV-Sf و SCMV با عدم انتقال به قیاق از MDMV و IJMV متمایز می‌شوند. MDMV، BgSMV-J و BgSMV-Sf با انتقال به ارزن مرواریدی از جدایه‌های IJMV قابل تفکیک هستند (جدول ۴).

MDMV در این گیاه علائم موزائیک ایجاد کرد ولی IJMV هیچ‌گونه آلودگی ایجاد نکرد، آزمون ELISA نیز عدم انتقال ویروس را تأیید کرد.

**مقایسه ترادف نوکلئوتیدی قسمتی از ژن CP**

محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه میانی ژن CP با آغازگرهای Oligo1n و Oligo2n پس از تعیین ترادف یک قطعه bp ۳۲۷ بود (شکل ۵). اندازه این قطعه در تمام ویروس‌ها یا جدایه‌ها یکسان بود. مقایسه ترادف‌ها با سایر ترادف‌های موجود در بانک ژن به وسیله Blast Search، نشان داد که SCMV از ایران با سایر سویه‌های SCMV و MDMV مازندران، BgSMV سوا شده از مرغ‌های جیرفت، صفی‌آباد، بوشهر، برازجان و اهواز با سویه‌های MDMV موجود در Gen Bank شبیه است. IJMV از شیراز و ویروس مولد موزائیک در قیاق اندیمشک، چغازنبیل و کرج نیز با ZeMV بیشترین شباهت را نشان داد.

مقایسه چند ردیفی نوکلئیک اسید قطعه ۳۲۷bp ناحیه میانی CP برای جدایه‌های فوق به اضافه تعدادی از پوتی ویروس‌های غلات (جدول ۵) انجام شد و دندروگرام ترسیم گردید(شکل۶). در دندروگرام فوق پوتی-ویروس‌های غلات به ۵ شاخه مختلف تقسیم شدند. شاخه اول که شامل SCMV می‌باشد، خود به دو زیر شاخه تقسیم می‌شود. زیر شاخه اول شامل سویه‌های اروپایی مانند آلمان و اسپانیا و زیر شاخه دوم شامل جدایه‌های آمریکایی و استرالیایی است. جدایه ایرانی SCMV در کنار جدایه‌های آمریکایی و استرالیایی قرار گرفت. ZeMV همراه با جدایه‌های IJMV از شیراز، کرج، چغازنبیل و اندیمشک نیز در گروه دوم قرار می‌گیرند. که نشان دهنده قرابت زیاد این دو سویه است.

**جدول ۲. مقایسه چگونگی و میزان انتقال جدایه‌های پوتی ویروس‌های ایران توسط گونه‌های مختلف شته**

**Table 2. Comparison of transmission rates of potyvirid isolates by cereal aphids**

| | BgMV | IJMV-Sh | BgSMV-Sf | BgSMV-J | IJMV-Kh | MDMV-Ir |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ropalosiphum padi* | 0/3 | 2/10 | 2/10 | 2/10 | 2/10 | 3/10* |
| *R .maidis* | 0/3 | 2/10 | 0/10 | 0/10 | 3/10 | 2/10 |
| *Schizaphis graminum* | 2/3 | 5/10 | 6/10 | 7/10 | 6/10 | 5/10 |
| *Sipha elegans* | 3/3 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| *Hysteroneora* | 2/3 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |

**T** اعداد نشان دهنده میانگین تعداد بوته‌های آلوده از تعداد کل بوته سورگوم موجود در هر گلدان در تکرارهای مختلف بـه صـورت مـشاهده‌ای می‌باشد. آزمون الیزا نیز نتایج فوق را تأیید نمود. در هر گلدان ۱۰ بوته سورگوم کشت شده بود و هر آزمون انتقال در سه تکرار انجام گرفت. در صورت مشاهده علائم، آزمون انتقال یک بار دیگر و در صورت عدم مشاهده علائم ۲ تا ۴ بار دیگر تکرار گردید. چون برای انتقالBgMV از گیاه مرغ استفاده شده است برای مقایسه کل گلدان در نظر گرفته شد.

**جدول ۳. مقایسه علائم ایجاد شده توسط پوتی‌ویروس‌های غلات در ایران، روی تعدادی از ارقام تجاری سورگوم**

**Table 3. Comparison of symptoms induced by cereal potyviruses in Iran on commercial sorghum varieties**

| | SCMV | BgMV | BgSMV-J | BgSMV-Sf | IJMV-Sh | IJMV-Kh | MDMV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Speed feed | M[i] | M خفیف | M | M | NS- M | NS- M | M |
| KFS1 | M | - | M | M | M | M | M |
| Kimia | M | NSp | M | M | M | M | M |
| Nectar | NS- M | - | M خفیف | M | M | SN- M | M |
| Jarooee | M | - | M | M | NS- M | NS-M | M |
| Jambo | NS- M | NSp | M | M | NS- M | NS- M | M |
| Peyam | NS- M | - | M خفیف | M | NS- M | NS- M | M |
| Sepideh | M | NSp | M | M | NS-M | M | M |
| Sugar graze | M | M خفیف | M | M | M | M | M |
| KGS8 | M | - | M | M | RS-M | M | M |

**ï** M= mosaic موزائیک

NS= necrotic stripe نوار نکروتیک

RS= red stripe نوار قرمز

NSp= necrotic spot نقاط نکروتیک

- =No Symptom بدون علائم

جدول ۴. مقایسه میزبانی پوتی ویروس‌های غلات در ایران

**Table 4. Comparative host range of Iranian potyvirids**

| Plants | | SCMV | BgMV | BgSMV-J | BgSMV-Sf | IJMV-Sh | IJMV-Kh | MDMV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Eleusine compressa* | رشدی | *M*[i] | M | M | M | M | M | M |
| *Sorghum halepense* | قیاق | - | - | - | - | M | M | M |
| *Pennisetum glaucum* | ارزن مرواریدی | - | - | M | M | - | - | M |
| *Panicum miliaceum* | ارزن خوشه ای | *M* | - | M خفیف | M خفیف | - | - | M |
| *Setaria italica* | ارزن دم روباهی | *M* | M خفیف | M | M | M | M | M |
| *Avena sativa* | یولاف | - | - | - | - | - | - | - |
| *Secale cereale* | چاودار | - | - | - | - | - | - | - |
| *Triticum aestivum* | گندم | - | - | - | - | - | - | - |
| *Hordeum vulgare* | جو | - | - | - | - | - | - | - |
| *Zea mays* | ذرت | M | - | M | M | M | M | M |

i M= mosaic موزائیک

NS= necrotic stripe نوار نکروتیک

RS= red stripe نوار قرمز

- = No Symptom بدون علائم

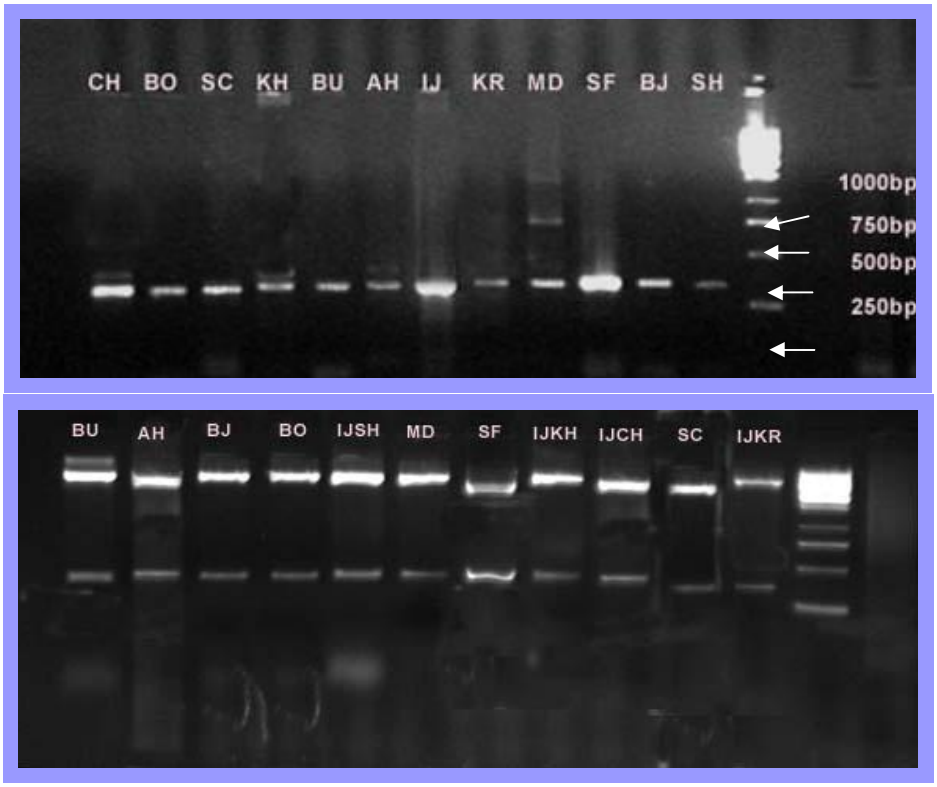
شکل ۴. علائم موزائیک ناشی از پوتی ویروس های غلات روی گیاه رشدی (A) و نوار نکروزه قرمز روی سورگوم (B).

**Fig. 4. Mosaic symptom on goose grass (A) and necrotic red stripes on sorghum (B) induced by potyviruses of poaceous**

جدول ۵. رس شمار (Accession No.) و منشا جدایه‌های مختلف پوتی‌ویروس‌های غلات در GenBank که مورد مقایسه قرار گرفته‌اند

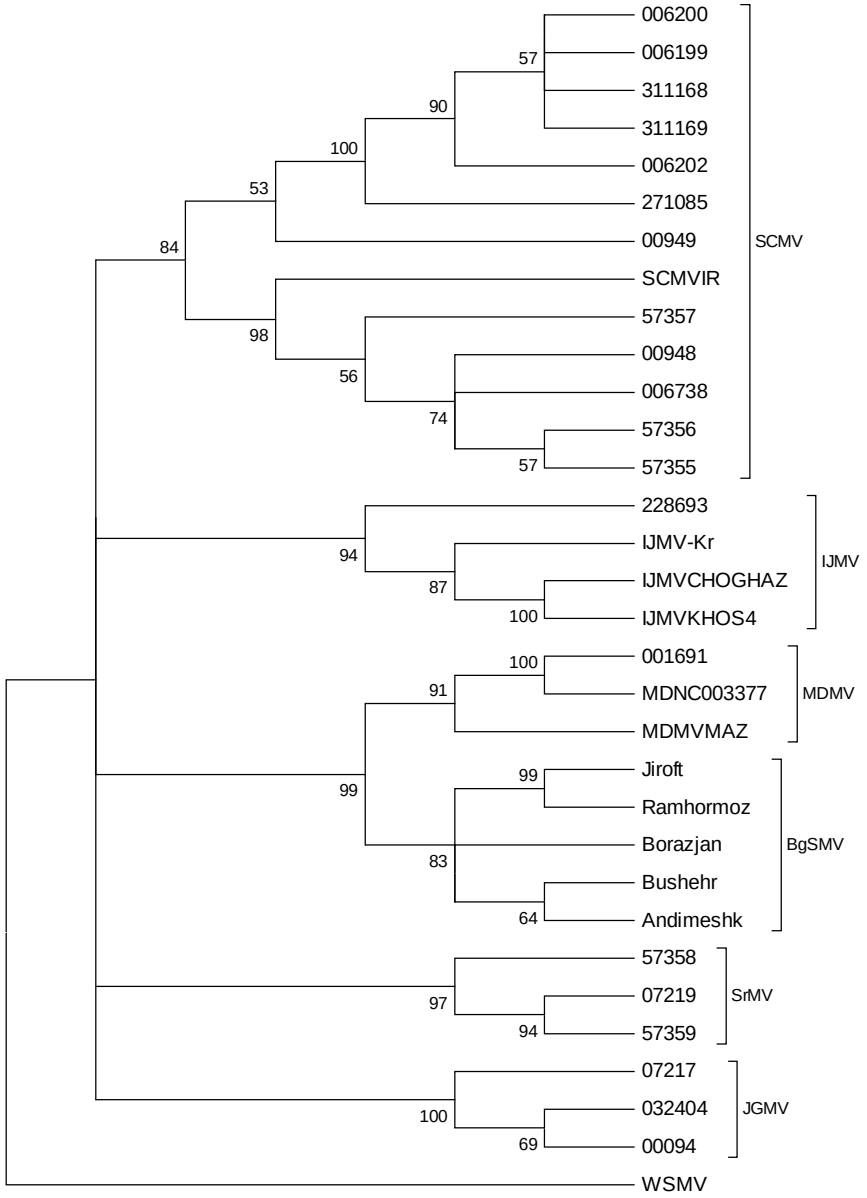
**Table 5. Origin and accession numbers of cereal potyviruses from GenBank used in comparisons**

| Virus | Strain | Origin | Acc.No. | Virus | Strain | Origin | Acc. No. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SCMV | L66 | Iran | DQ369960 | MDMV | B | Australia | D00949 |
| SCMV | Sa | South Africa | AF006738 | MDMV | A | USA | U07216 |
| SCMV | B | USA | U57355 | MDMV | - | Bulgaria | AJ001691 |
| SCMV | D | USA | U57356 | JGMV | | | D00094 |
| SCMV | E | USA | U57357 | JGMV | Krish | Australia | AF032404 |
| SCMV | G951 | Germany | AJ006199 | JGMV | MDO | USA | U07217 |
| SCMV | | Germany | AJ006200 | ZeMV | - | Israel | AF228693 |
| SCMV | G96 | Germany | AJ006202 | SrMV | H | USA | U57358 |
| SCMV | | China | AJ271085 | SrMV | I | USA | U57359 |
| SCMV | S15 | Spain | AJ311169 | SrMV | SCH | USA | U07219 |
| SCMV | | Spain | AJ311168 | WSMV | Sidney81 | USA | NC001886 |
| SCMV | SC | Australia | D00948 | | | | |




شکل۵. نتایج RT- PCR پوتی ویریدهای غلات با آغازگرهای Oligo1n و Oligo2n (A) و باندهای حاصل از تیمار پلاسمید با آنزیم‌های برشی EcoRI و PstI (B). در این شکل جدایه‌های BgSMV از مرغ جیرفت با BJ، از مرغ بوشهر با BU، از مرغ برازجان با BO، از مرغ اهواز با AH و از مرغ صفی‌آباد با SF، SCMV با SC، MDMV با MD و جدایه‌های IJMV از قیاق شیراز با SH یا IJSH از قیاق چغازنبیل با CH یا IJCH، از قیاق اندیمشک (خوزستان) با KH یا IJKH و از قیاق کرج با KR یا IJKR نشان داده شده است.

**Fig. 5. Electrophoretic pattern of PCR products of cereal potyvirids using potyviral specific primer pair Oligo1n and Oligo2n before (A) and after (B) treatment with EcoRI and PstI. BgSMV from Jiroft (BJ), Bushehr (BU), Borazjan (BO), Ahvaz (AH), and Safiabad (SF), SCMV (SC), MDMV (MD), IJMV from Shiraz (SH or IJSH), Choghazanbil (CH or IJCH), Karaj (KR or IJKR).**




شکل ۶. رابطه فیلوژنتیکی بین ترادف‌های پوتی ویروس‌های گیاهان تیره غلات. دندروگرام حاصل از آنـالیز **neighbor-joining** بـا برنامـه **MEGA3** بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه میانی ژن پروتئین پوششی. در این آنالیز از ویروس موزائیک رگه‌ای گندم (**WSMV**) به عنوان **outgroup** استفاده شده است. در سمت راست گونه‌های ویروس مربوط به هر گروه ترادف نشان داده شده است. شاخه‌های بـا **Bootstrapping** کمتر از ۵۰ حذف شده است.

**Fig. 6. Phylogenetic relationships among selected sequences of poaceous potyvirus species. Dendrogrom derived by neighbor-joining analysis using MEGA3 based on the nucleotide sequence of CP-UTR-region. Wheat streak mosaic virus (WSMV) was used as outgroup. Virus species related to each clade has been shown on the right. Bootstraping with value less than 50% is not valid. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed.**

براساس مقایسه چند ردیفی میزان شباهت (Similarity) پوتی ویروس‌های مختلف غلات و نیز میزان شباهت جدایه‌های ایرانی با آنها تعیین گردید. بر این اساس جدایه‌های BgSMV با یکدیگر بین ۹۳/۳% تا ۹۸/۲% و با سایر جدایه‌های MDMV ۹۱/۱% تا۹۳/۶% شباهت دارند. میزان شباهت این جدایه‌ها با جدایهMDMV از مازندران ۹۲/۷% تا ۹۳/۶% می‌باشد. میانگین شباهت گونه‌های مختلف در جدول ۶ مشاهده می‌شود. میزان شباهت جدایه‌های IJMV با یکدیگر بین ۸۹/۶% تا ۹۰/۸% و با ZeMV ۸۶/۶% تا ۹۰/۸% می‌باشد.SCMV با جدایه‌های اروپایی ۸۷/۹% تا ۹۰/۵ % با جدایه چینی ۸۸/۴% و با جدایه‌های آمریکایی و استرالیایی ۹۳/۶% تا ۹۵/۱% شباهت دارد. با توجه به نتایج به دست آمده براساس مقایسه ناحیه میانی (Core protein) از ژنCP ، پوتی‌ویروس‌های مختلف غلات از یکدیگر تفکیک می‌شوند.

اگر چه میانگین شباهت جدایه‌های MDMV و BgSMV بیشتر از ۹۰% است ولی بر اساس آنالیز فیلوژنتیک، این دو ویروس در دو گروه قرار می‌گیرند.

## بحث

پوتی ویروس‌های بسیاری در گیاهان تیره غلات از سراسر ایران گزارش شده‌اند. برخی از این ویروس‌ها خصوصیات متفاوتی نسبت به سایر پوتی ویروس‌های دنیا از خود نشان می‌دهند (Masumi & Izadpanah 1995, 1998, Afsharifar & Izadpanah 1991).

بر اساس آزمون‌های سرولوژیک انجام شده، جدایه‌های IJMV-Sh و IJMV-kh به عنوان یک ویروس، تشخیص داده شدند که با MDMV، BgSMV و SCMV ارتباط سرولوژیکی دارند. SCMV نیز علی‌رغم ارتباط سرولوژیک با بقیه ویروس‌ها کاملاً متمایز است (Afsharifar & Izadpanah 1991, Izadpanah *et al.* 2005, Masumi *et al.* 2001). BgSMV و MDMV دو ویروس بسیار نزدیک به هم هستند که با آزمون الیزا قابل تمایز نیستند ولی با آزمون AGD با تشکیل مهمیزک و در آزمون وسترن بلات بر اساس باندهای با اندازه‌های متفاوت متمایز می‌شوند.

BgMV در هیچ آزمون سرولوژیک رابطه‌ای با بقیه جدایه‌ها نداشت لذا یک ویروس کاملاً متمایز تشخیص داده شد. در مطالعات قبلی نیز این نتایج به دست آمده بود (Hosseini & Izadpanah 2005, Masumi & Izadpanah 2000). آزمون الیزا در تمایز این ویروس‌ها روش مناسبی نبود ولی AGD با واکنش یا عدم واکنش و یا با تشکیل مهمیزک توانست آنها را متمایز سازد.

آزمون وسترن بلات نیز نتایج آزمون‌های سرولوژیک دیگر را تأئید کرد. اگر چه هر دو ویروس BgSMV و MDMV با آنتی بادی یکدیگر و نیز با آنتی بادی IJMV واکنش داشتند ولی اندازه باندهای آنها متفاوت بودند. *مانوسوپولوس و همکاران* (Manoussopoulos *et al* 2000) استفاده از الکتروفورز و وسترن بلات را برای تفکیک پوتی‌ویروس‌های مختلف و نیز مطالعه ساختار و نحوه عملکرد آنها به ویژه زمانی که آلودگی مخلوط وجود دارد توصیه نموده‌اند. با استفاده از این روش می‌توان MDMV و BgSMV را با توجه به نحوه حرکت آنها در ژل از هم تمیز داد.

### مقایسه دامنه میزبانی

به جز BgMV که دامنه میزبانی محدودی دارد، بقیه سویه‌ها روی تمام ارقام سورگوم مورد مطالعه علائم ایجاد نمودند. گرچه علائم ایجاد شده روی سورگوم در اثر تلقیح سویه‌های مختلف متفاوت بود (موزائیک، نقاط

**جدول ۶. میانگین میزان شباهت نوکلئوتیدی بین گونه‌های مختلف پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس آنالیز فیلوژنتیک ناحیه میانی ژن CP.**

**Table 6. Average nucleotide similarity between cereal potyviruses based on phylogenetic analyses of core protein of CP gene.**

| | JGMV | SCMV | MDMV | BgSMV | SrMV |
|---|---|---|---|---|---|
| JGMV | | | | | |
| SCMV | 57.6 | | | | |
| MDMV | 49.3 | 73.8 | | | |
| BgSMV | 52.0 | 75.3 | 93.1 | | |
| SrMV | 58.5 | 76.7 | 74.0 | 77.6 | |
| IJMV | 47.1 | 71.2 | 66.2 | 67.4 | 68.9 |

نکروزه قرمز، نوارهای نکروزه قرمز)، بر اساس مشاهدات انجام شده، عوامل مختلف مانند غلظت ویروس، شرایط گلخانه و سن گیاه نیز در ظهور این علائم تأثیر داشت. بنابراین نمی‌توان از این تنوع برای تفکیک سویه‌ها استفاده کرد. به طور کلی IJMV از شیراز و خوزستان و SCMV در مقایسه با سایر سویه‌ها نوارهای نکروتیک قرمز بیشتری ایجاد نمودند. فقط BgMV در نحوه آلوده‌سازی سورگوم متفاوت از سایر جدایه‌ها عمل نمود.

بر اساس مطالعه دامنه میزبانی، SCMV از خوزستان و BgSMV-J و BgSMV-Sf با فقدان قابلیت انتقال به قیاق از IJMV و MDMV جدا می‌شوند. SCMV به ارزن مرواریدی منتقل نشد در حالی‌که این گیاه میزبان BgSMV-J و BgSMV-Sf بود. MDMV و IJMV نیز با انتقال MDMV به ارزن مرواریدی و عدم انتقال IJMV به گیاه مزبور از یکدیگر تفکیک می‌گردند. BgMV به قیاق و ارزن مرواریدی منتقل نشد. بر اساس این مطالعه با استفاده از گیاهان قیاق، ارزن مرواریدی و برخی از ارقام سورگوم و ذرت می‌توان این ویروس‌ها را از یکدیگر تفکیک نمود (جدول ۷).

## مقایسه سویه‌ها به وسیله ناقل

شته *S. graminum* توانست تمامی سویه‌ها را از گیاه آلوده به سالم منتقل کند. MDMV و IJMV از نظر نوع ناقل در سطح آزمون انجام شده از یکدیگر قابل تفکیک نبودند. BgMV با توانایی انتقال توسط شته‌های *S. elegans* و *Hysteroneura* sp. از سایر سویه‌ها متمایز است.

BgSMV-J و BgSMV-Sf با عدم انتقال توسط *R. maidis* از IJMV و MDMV تفکیک می‌شوند. علی‌رغم گزارش انتقال BgSMV از رشدی توسط *R. maidis* (Ghasemi & Izadpanah 1998)، تلاش‌های مکرر برای انتقال BgSMV-J و BgSMV-Sf از سورگوم به مرغ توسط این شته ناموفق بود.

آزمون الیزا نشان داد که غلظت BgMV در سورگوم پایین است و احتمالاً موفقیت آمیز نبودن انتقال به وسیله شته از سورگوم با پایین بودن غلظت ویروس در این گیاه می‌تواند مرتبط باشد. حتی زمانی که از گیاه مرغ به عنوان منبع ویروس استفاده شد، انتقال ویروس با شته به سورگوم صورت نگرفت. بنابراین در انتقال BgMV توسط این شته‌ها از گیاه مرغ به عنوان منبع و گیرنده ویروس استفاده شد. *S. graminum*، *Sipha elegans* و *Hysteroneura* sp این ویروس را از مرغ آلوده به مرغ سالم انتقال دادند.

## مقایسه ترادف نوکلئوتیدی

علی‌رغم این‌که ناحیه میانی CP ناحیه حفاظت شده‌ای است و در پوتی ویروس‌های مختلف تنوع کمی دارد

**جدول۷. تمایز میزبانی پوتی ویروس‌های غلات در ایران**

**Table 7. Host differentiation of cereal potyviruses in Iran**

| | قیاق<br>*Sorghum halepense* | ارزن مرواریدی<br>*Pennisetum glaucum* | سورگوم یا ذرت<br>*Zea mays* or *Sorghum bicolor* |
|---|---|---|---|
| SCMV | − | − | + |
| IJMV | + | − | + |
| MDMV | + | + | + |
| BgSMV | − | + | + |
| BgMV | − | − | −/+ |

Moghal & Francki 1976, 1981, Shukla & ) این ویروس منشاء غیر بومی داشته باشد و احتمالاً توسط بذر به ایران وارد شده است (Masumi *et al.* 2004a). چند جدایه مختلف موزائیک مرغ در شاخه‌ای جدا و در کنار سایر سویه‌های MDMV قرار می‌گیرد. میزان شباهت این جدایه‌ها و MDMV بیش از ۹۰% است. بر اساس نظریه *شوکلا و وارد* (Shukla & Ward 1998) و (۱۹۸۸) و *فرنکل و همکاران* (Frenkel *et al* 1989) سویه‌هایی با شباهت بیش از ۸۰% یک ویروس تلقی می‌شوند. لذا بر اساس مقایسه این ناحیه، این جدایه‌ها نیز MDMV محسوب می‌شوند. ولی مشاهده خصوصیات بیولوژیک متفاوت مانند عدم توانایی انتقال به قیاق و عدم انتقال با ***R. maidis*** در این موضوع تردید ایجاد می‌کند. این جدایه‌ها در مناطق گرمسیر ایران گسترش دارند و احتمالاً بومی ایران هستند.

جدایه‌های مختلف IJMV در کنار ZeMV اما در زیر شاخه‌ای جدا قرار می‌گیرند. با وجود فاصله جغرافیایی زیاد جدایه‌های ایرانی این جدایه‌ها در کنار یکدیگر و در یک زیر شاخه قرار می‌گیرند و این تصور را ایجاد می‌کنند که IJMV و ZeMV دو ویروس مختلف باشند. این ویروس در ایران گسترش وسیع داشته و احتمالاً منشا بومی دارد.

Ward 1988,1989 a,b, Ward & Shukla 1991). *ولی ماری جان و همکاران* (Marie Jeanne *et al* 2000) با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی این ناحیه تعدادی از پوتی‌ویروس‌های غلات را طبقه‌بندی نمودند. این ناحیه بین دو ناحیه بسیار حفاظت شده قرار دارد که *لانج ولد و همکاران* (Langeveld *et al* 1991) براساس آن، دو جفت آغازگر دژنره برای تکثیر قسمت میانی CP طراحی نمودند. از همین آغازگرها (Oligo1n وOligo2n) در تکثیر این قسمت از CP استفاده شد. برای گروه‌بندی جدایه‌های ایرانی از ترادف نوکلئوتیدی این ناحیه برای رسم دندروگرام استفاده گردید. در این دندروگرام سویه‌ها و جدایه‌های مورد بررسی در ۵ گروه قرار گرفتند. SCMV در کنار سویه‌های آمریکایی و استرالیایی اما در زیر شاخه‌ای جدا جای گرفت. احتمالاً این ویروس با قلمه‌های نیشکر سال‌ها پیش به ایران وارد شده و به طور مستقل تکامل یافته است(Masumi *et al.* 2006). MDMV و جدایه‌های مولد موزائیک در مرغ (BgSMV-J و BgSMV-Sf) در یک گروه قرار گرفتند. قرار گرفتن MDMV در کنار سویه‌های اروپایی و پراکنش محدود آن در ایران ( ساری و اصفهان) این باور را ایجاد می‌کند که

*معصومی و همکاران* (2001, 2004a) و *معصومی و ایزدپناه* (2002a) ناحیه آمینی پروتئین پوششی، IJMV، BgSMV و MDMV را مورد بررسی قرار داده و بر اساس ترادف آمینو اسیدی این ناحیه دندروگرام ترسیم نمودند. نتایج به دست آمده از دندروگرام در تحقیق حاضر، بر اساس ناحیه میانی CP با نتایج دندروگرام بر اساس ناحیه N-terminal مطابقت دارد. با توجه به کوچکی این قطعه و در نتیجه سهولت تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین ترادف آن، استفاده از این قطعه برای گروه‌بندی پوتی ویروس‌ها توصیه شده است (Marie-Jeanne *et al.* 2000). علی‌رغم این‌که در درخت فیلوژنتیک جدایه‌های مختلف ویروس‌ها کاملا مجزا شده‌اند، ولی به دلیل شباهت زیاد نوکلئوتیدی که نشان‌دهنده محافظت شدگی بالا در این ناحیه است، این ناحیه برای استفاده در تمایز گونه‌های نزدیک مناسب نیست (Mink *et al.*1994) و برای تمایز این گونه‌ها بهتر است از ترادف ژن CP یا ژنوم کامل استفاده شود. غیر از تشابه بین MDMV و BgSMV که بیش از ۹۰ درصد می‌باشد، در سایر موارد میانگین تشابه بین ویروس‌ها کمتر از ۷۷/۶ درصد به دست آمده است. در عین حال، این قرابت فیلوژنتیکی و تشابه نوکلئوتیدی با نتایج به دست آمده از سایر آزمون‌ها همخوانی دارد.

به طور کلی می‌توان پوتی‌ویروس‌هایی که تا کنون از ایران گزارش شده‌اند را در ۵ گروه قرار داد که از نظر خصوصیات بیولوژیک، سرولوژیک و مولکولی قابل تفکیک هستند. BgMV که از نظر سرولوژیک کاملاً با سایر سویه‌ها متفاوت بوده از نظر نوع ناقل و دامنه میزبانی نیز قابل تفکیک است. این ویروس در مناطق سردسیر و معتدل ایران روی مرغ گسترش دارد ولی تاکنون روی گیاهان زراعی تشخیص داده نشده است. در بررسی‌های گلخانه‌ای نیز به سختی روی برخی از ارقام سورگوم آلودگی ایجاد می‌کند ولی ذرت‌های مورد مطالعه به این ویروس آلوده نشدند. رشدی تنها گیاهی بود که به خوبی به این ویروس آلوده شد. طبق مطالعات انجام شده این ویروس با Spartina mottle virus که در اروپا گسترش وسیعی دارد، قرابت دارد و به همراه آن در جنس دیگری به نام Sparmovirus قرار می‌گیرند (Hosseini *et al.* 2010).

SCMV علی‌رغم رابطه سرولوژیکی که با بقیه پوتی‌ویروس‌ها دارد از نظر سرولوژیک از آنها متمایز است. با تعیین ترادف ژن CP نیز تفاوت آن با سایرین آشکار شد (Ghassemi *et al.* 2003, Masumi *et al.* 2004b, 2006).

IJMV از نظر سرولوژیکی با BgSMV، MDMV و SCMV ارتباط دارد ولی با روش‌های مختلف سرولوژیکی، دامنه میزبانی، نقوش الکتروفورزی و ترادف ناحیه میانی CP از آنها قابل تفکیک است. این ویروس از نظر آلوده نکردن ارزن مرواریدی با ZeMV مشابه است. جدایه‌های مختلف IJMV با ZeMV ۸۶/۶% تا ۹۰/۸% در ناحیه میانی CP شباهت نوکلئوتیدی دارند. IJMV در ایران روی قیاق گسترش وسیع دارد (Masumi & Izadpanah 2001).

BgSMV با وجود تشابهات سرولوژیک با MDMV نسبت به آن دارای یک قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی اضافه در ژن CP است (Zare *et al.* 2005) و به همین دلیل این دو ویروس در الکتروفورز پروتئین پوششی و وسترن بلات با تفاوت در اندازه باند متمایز می‌شوند. این دو ویروس از نظر آلوده‌سازی قیاق و انتقال با ***R. maidis*** نیز متفاوت‌اند. علی‌رغم حفاظت شدگی ناحیه میانی CP این دو ویروس در کنار یکدیگر اما در دو شاخه جداگانه قرار می‌گیرند.

از بین پوتی ویروس‌های گزارش شده از ایران IJMV مهم‌ترین عامل مولد موزائیک در ذرت در ایران است (Masumi & Izadpanah 1995, 2001, Izadpanah *et al.* 2005). MDMV تاکنون تنها در استان‌های گلستان، مازندران و اصفهان روی ذرت و قیاق (Masumi *et al.* 2004a) و BgSMV تاکنون تنها در مناطق جنوبی ایران شامل استان‌های بوشهر، خوزستان و کرمان روی مرغ یافت شده‌اند (Masumi & Izadpanah 2002a, b, c, Zare *et al.* 2005).

## منابع

جهت ملاحظه به صفحات (11-14) متن انگلیسی مراجعه شود.