

تاثیر دما بر شدت بیماری ناشی از ویروس‌های موزائیک کوتولگی ذرت و موزائیک جنوبی مرغ*

یاسر بی‌نیاز^۱، کرامت اله ایزدپناه^{۱*}، محمود معصومی^۲، حبیب‌اله حمزه زرقانی^۱، نرجس راه‌پیما
سروستانی^۳ و اسماعیل ابراهیمی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۱۰)

چکیده

پوتی‌ویروس‌های موزائیک جنوبی مرغ (Bermuda grass southern mosaic virus, BgSMV) و موزائیک کوتولگی ذرت (Maize dwarf mosaic virus, MDMV) با وجود شباهت‌هایی، به لحاظ پراکنش جغرافیایی و وجود قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی اضافی در ناحیه 5' ژن پروتئین پوششی BgSMV با هم اختلاف دارند. در این پژوهش تاثیر تغییر دما بر روی شدت بیماری ناشی از BgSMV و MDMV مورد بررسی قرار گرفت و قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی در ژن پروتئین پوششی BgSMV به کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیک بررسی و مقایسه شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور دما در سه سطح (۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد) و اینوکولوم در سه سطح (BgSMV، MDMV و بافر مایه‌زنی) و شش تکرار انجام گردید. شدت بیماری، دوره نهفتگی و شاخص‌های رشد شامل ارتفاع گیاه از سطح خاک و وزن گیاه در پایان روز سی‌ام پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد شدت بیماری ناشی از MDMV در دماهای مورد مطالعه، اختلاف معنی داری نداشت در حالی که شدت بیماری ناشی از BgSMV با افزایش دما روند صعودی داشت. همچنین با افزایش دما طول دوره نهفتگی MDMV کاهش یافت. براساس تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک در قسمت انتهای آمینی پروتئین پوششی BgSMV و MDMV یک ناحیه فعال در بیان ژن و تحمل به دمای بالا موسوم به coiled-coil region وجود دارد که در BgSMV به اندازه ۳۰ آمینواسید بلندتر از ناحیه مشابه در MDMV است.

کلیدواژه: بیوانفورماتیک، پروتئین پوششی، پوتی‌ویروس‌ها، مرغ، ذرت

* بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارائه‌شده در دانشگاه شیراز

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

۱. به ترتیب دانش آموخته، استاد، دانشیار بیماری شناسی گیاهی و دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۲. استادیار مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس
۳. دانش آموخته زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

Effect of temperature on disease severity of Maize dwarf mosaic and Bermuda grass southern mosaic viruses *

Y. Biniiaz¹, K. Izadpanah^{1**}, M. Masumi², H. Hamzeh-Zarghani¹, N. Rahpeyma-Sarvestani³, and E. Ebrahimi¹

(Received: 18.5.2016; Accepted: 31.7.2016)

Abstract

Bermudagrass southern mosaic virus (BgSMV) and Maize dwarf mosaic virus (MDMV) are closely related potyviruses varying in geographical distribution and the existence of an additional 90- nucleotide stretch in the 5' region of coat protein gene. In the present study, the effect of temperature on disease severity of both viruses was assessed. A factorial experiment was conducted laid out in a completely randomized design with two factors, temperature at three levels (25, 30 and 35°C) and inoculation at three levels (MDMV, BgSMV and buffer) each in six replications. *Eleusine compressa*, a common host of both viruses, was inoculated mechanically and disease severity, length of incubation period, plant height, and plant weight were measured 30 days post inoculation. Disease severity of MDMV was not significantly affected by temperature change but that of BgSMV increased with increasing temperature. Incubation period of MDMV inoculated plants decreased with increasing temperature. Bioinformatics analysis showed presence of a coiled-coil region in CP of both viruses. This region was longer in BgSMV extending into extra amino acids in amino terminal region. Extra amino acid stretch may contribute to the adaptation of this virus to higher temperatures.

Keywords: Bermuda grass, bioinformatics, coat protein, potyviruses

* A part of MSc thesis of the first author, submitted to Shiraz University.

** Corresponding Author, Email: izadpana@shirazu.ac.ir

1. Former M.Sc. Student, Prof., Associate Prof. of Plant Pathol. and Associate Prof. of Biotech. Research Center respectively, School of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

2. Assist.Prof. Plant Virology Research Center, School of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

3. Former M.Sc. Student of Agronomy and plant breeding, School of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

مقدمه

ناقل نشان داده است که MDMV و BgSMV بسیار به هم شبیه هستند با این حال در انتقال به کمک ناقلین و دامنه میزبانی، تفاوت‌هایی دارند و علاوه بر آن BgSMV در مقایسه با MDMV در ناحیه 5' بخش کد کننده پروتئین پوششی یک قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی اضافی دارد (Zare et al. 2011, Masumi et al. 2005). بر اساس نظر معصومی و همکاران (۲۰۱۱) وجود این قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی اضافی نسبت به MDMV موجب می شود که BgSMV در آزمون نشت در آگار با تشکیل مهمیزک تفاوت نشان دهد و دو ویروس در الکتروفورز پروتئین پوششی و وسترن بلات با تفاوت در اندازه باند متمایز - شوند (Masumi et al. 2011). این دو ویروس در دندروگرام‌ها کنار یکدیگر اما در دو شاخه جداگانه قرار می‌گیرند (Farahbakhsh et al. 2013; Zare et al. 2005). با توجه به تفاوت این دو ویروس، در پژوهش کنونی روند تولید و شدت بیماری هر کدام از ویروس‌ها در گیاه رشدی (*E. compressa*) در سه دمای مختلف بررسی و مورد مقایسه قرار گرفت. علاوه بر آن یک بررسی بیوانفورماتیکی نیز در مورد قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی اضافی در ژن پروتئین پوششی BgSMV و نقش احتمالی آن در محدودیت جغرافیایی ویروس انجام پذیرفت.

مواد و روش‌های بررسی

تکثیر و نگهداری ویروس‌ها در گلخانه

گیاهان مرغ آلوده به BgSMV در اواخر پاییز از سطح شهرستان بوشهر و نمونه‌های ذرت آلوده به MDMV از دشت ناز ساری جمع آوری گردیدند. به منظور تکثیر و نگهداری، MDMV با مایه زنی مکانیکی به قیاق و سپس به رشدی (*Eleusine compressa*) و BgSMV مستقیماً

ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (Maize dwarf mosaic virus, MDMV) به جنس *Potyvirus* تعلق دارد و یکی از گسترده ترین ویروس‌های آلوده کننده ذرت و سورگوم در سراسر جهان است (Ford et al. 1989) و در همه مناطقی که ذرت و سورگوم کشت می‌شود وجود دارد (Ford and Tosic 1972, Toler 1985). MDMV در ایران از اصفهان و بصورت گسترده از شمال ایران (مازندران و گلستان) گزارش شده است (Moini and Izadpanah 2001, Masumi et al. 2004).

ویروس موزائیک جنوبی مرغ (Bermuda grass southern mosaic virus, BgSMV) نخستین بار در سال ۱۹۹۹ از روی گیاه رشدی (*Eleusine compressa*) در منطقه برازجان و سپس از روی مرغ در مناطق جنوبی ایران شامل استان‌های بوشهر، خوزستان، کرمان و جنوب فارس گزارش شد (Masumi and Izadpanah 1998, 2000, 2002a, b, c, Zare et al. 2005, Masumi et al. 2011). این ویروس علاوه بر مرغ و رشدی ذرت را نیز آلوده می‌کند (Masumi et al. 2011, Ghasemi and Izadpanah 1998). مقایسه ترادف ناحیه میانی پروتئین پوششی (CP) که ناحیه حفاظت شده آن است نشان داد که BgSMV به ترتیب با MDMV، ویروس موزائیک سورگوم (SrMV) و ویروس موزائیک نیشکر (SCMV) بیشترین قرابت را دارد (Masumi et al. 2011; Masumi and Izadpanah, 2002a). BgSMV و MDMV به ترتیب در مناطق شمالی و نواحی گرمسیر جنوب ایران گسترش دارند (Farahbakhsh et al. 2013) و رابطه دگرپادی آن‌ها با یکدیگر گزارش شده است (Zakeri et al. 2012). نتایج حاصل از بررسی سرولوژیک، مولکولی، دامنه میزبانی و

جدول ۱. آغازگرهای MDMV و BgSMV مورد استفاده در این مطالعه در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Zakeri et al. 2012)

Table 1. Primers of MDMV and BgSMV used in RT-PCR in this study (Zakeri et al. 2012)

Virus	Primer	Orientation	Sequence (5'-3')
MDMV	PMDF3	Forward	GATGAGTTRAAAYGTYTATGCACGAC
	MDR1	Reverse	RTGCATRATTTGTCTGAAAGTTGG
BgSMV	BgSM90F	Forward	ACGAAAGCAAGAGGCTGAAAC
	BgSM90Rb	Reverse	CCACTGGGCTTCTCAGCAGC

سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، تافتن (annealing) به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد برای هر دو جفت آغازگر، تکمیل ترادف‌ها (extension) در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و یک چرخه نگهداری در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه برای تکمیل نهایی بود.

کاشت و مایه‌زنی گیاهان

بذر گیاه رشدی در گلدان‌های حاوی خاک برگ کشت شد. گلدان‌ها در اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، دوره نوری ۸:۱۶ (روز:شب) و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس قرار داده شدند. گیاهان قبل از رسیدن به مرحله مناسب برای مایه زنی (مرحله ۳ برگی) در گلدان نشاء شدند به گونه‌ای که هر گلدان حاوی ۵ بوته باشد و سپس گلدان‌ها به طور تصادفی انتخاب و به اتاق کشت با دماهای مختلف انتقال یافتند. دو روز بعد از استقرار گیاهان، مایه زنی مکانیکی آنها با عصاره گیاهی آلوده حاوی هر یک از ویروس‌ها تهیه شده در ۵ حجم بافر ۰/۰۱ مولار فسفات پتاسیم به طور جداگانه انجام شد. زمان مایه زنی به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد.

طرح آزمایش و آنالیز آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور دما در سه سطح (۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد) و اینوکولوم (مایه) در سه سطح (

به رشدی منتقل گردید. گیاهان آلوده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس در اتاق کشت نگهداری و هر ۲-۳ هفته به روش مکانیکی به گیاهان تازه انتقال داده می‌شدند.

استخراج RNA و واکنش RT-PCR

بررسی وجود هر یک از ویروس‌ها در گیاهان آلوده به روش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای BgSM90F و BgSM90Rb برای MDMV (جدول ۱) انجام پذیرفت (Zakeri et al 2012). استخراج RNA با استفاده از کیت mRNA Capture (Roche) طبق دستورالعمل سازنده و واکنش ترانویسی معکوس (reverse transcription, RT) با آنزیم Moloney murine leukemia virus (MMmLV) (Fermentas) و با استفاده از آغازگر oligo dT انجام شد. cDNA حاصل از واکنش RT در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر غلظت Taq DNA polymerase، ۰/۱ mM، MgCl₂ ۰/۷۵ mM، مخلوط dNTPs، ۰/۲ μM از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (Cinagen, Iran) و ۲/۵ میکرولیتر cDNA بود و در پایان حجم مخلوط با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر استریل به ۲۵ میکرو لیتر رسانده شد. برنامه PCR شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه و ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۴ درجه

یک شاخص مرکب از شدت بیماری است که میزان کل بیماری در طول دوره اپیدمی را نشان می‌دهد. محاسبه AUDPC با استفاده از تقریب ذوزنقه به کمک رابطه ۳ (Campbell and Madden 1990) انجام شد.

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{N-1} \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} (t_{i+1} - t_i) \quad (3)$$

در این رابطه y مقدار شدت بیماری، t زمان یادداشت برداری بر حسب روزهای پس از مایه زنی و N تعداد نوبت‌های یادداشت برداری را نشان می‌دهد. تجزیه واریانس اثر دما، ویروس، و اثر متقابل آنها بر AUDPC با PROC ANOVA و مقایسه میانگین شدت بیماری بین سطوح فاکتورها و اثر متقابل آنها با آزمون SCHEFFE انجام پذیرفت.

برای اندازه‌گیری دوره کمون، آنالیز بقا (survival analysis) با PROC life test انجام شد و مقایسه بین نمودارهای دوره‌ی کمون تیمارهای مختلف صورت پذیرفت. در پایان روز سی‌ام بعد از مایه زنی، ارتفاع گیاه از سطح خاک و وزن تر بوته بعد از بریدن از سطح خاک اندازه‌گیری و تجزیه واریانس داده‌ها با PROC ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با آزمون SCHEFFE انجام گردید. در این مطالعه تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS 9.1 (SAS Institute Inc. 1999) انجام شد و نمودارها با استفاده از برنامه Excel رسم گردیدند.

آزمون الیزا

به منظور تایید آلودگی و همچنین سنجش غلظت ویروس، آزمون سرولوژیک الیزای غیر مستقیم به روش کانورس و مارتین (Converse and Martin 1990) با آنتی‌بادی‌های MDMV-Ir (Zakeri et al. 2012) و BgSMV (Masumi et al. 2011) موجود در مرکز

BgSMV، MDMV و بافر مایه‌زنی) و ۶ تکرار انجام گردید. هر تکرار آزمایش شامل یک گلدان حاوی ۵ بوته بود. گلدان‌ها به طور کاملاً تصادفی در اتاق‌های کشت چیده شدند. همه ۲۷۰ گیاه در شرایط نوری ۱۶:۸ (روز:شب) و شدت نوری ۳۰۰۰ لوکس قرار داده شدند.

شدت بیماری، دوره کمون، ارتفاع گیاه از سطح خاک و وزن تر ساقه اندازه‌گیری شد. ظهور علائم با بازرسی چشمی به طور روزانه بعد از مایه زنی بررسی گردید. شدت بیماری براساس پیشرفت علائم روی برگ از روز هفتم بعد از مایه زنی به طور روزانه تا روز سی‌ام بررسی شد. پیشرفت علائم برای BgSMV در ۵ سطح شامل ۱= رنگ پریدگی برگ، ۲= موزائیک خفیف، ۳= موزائیک شدید و رگه‌های زرد رنگ ۴= موزائیک و رگبرگ روشنی و ۵= کوتولگی، و برای MDMV در ۴ سطح شامل ۱= موزائیک خفیف، ۲= موزائیک شدید و رگه‌های زرد رنگ ۳= موزائیک و رگبرگ روشنی و ۴= کوتولگی ثبت گردید. برای استاندارد سازی مقیاس ترتیبی شدت بیماری (شامل نمره‌دهی ۱ تا ۵ برای BgSMV و نمره‌دهی ۱ تا ۴ برای MDMV مطابق فوق) در مقیاس نسبی (۰-۱) به ترتیب از رابطه‌های ۱ و ۲ استفاده شد. در این رابطه‌ها DS_{BgSMV} و DS_{MDMV} به ترتیب شدت بیماری ناشی از BgSMV و MDMV، n_1 تا n_5 به ترتیب تعداد گیاهان در مقیاس ترتیبی ۱ تا ۵ است.

$$DS_{BgSMV} = \frac{1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5}{5 \times 5} \quad (1)$$

$$DS_{MDMV} = \frac{1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{5 \times 4} \quad (2)$$

سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری یا AUDPC با استفاده از داده‌های شدت بیماری محاسبه گردید. AUDPC (area under the disease p-rogress curve)

آمینواسیدی ویروس وجود دارد و بنابراین جستجوی عوامل تنظیمی بر اساس منبع گیاهی و ویروسی انجام گرفت.

نتایج

شدت بیماری

اثرات ساده دما، ویروس و برهمکنش دما-ویروس بر شدت بیماری ناشی از MDMV و BgSMV که بر اساس AUDPC اندازه گیری شد معنی دار بود (جدول ۲). تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد با افزایش دما شدت بیماری در گیاهان رشدی مایه زنی شده با BgSMV افزایش یافت در حالیکه شدت بیماری MDMV در دماهای آزمایش شده اختلاف معنی دار نداشت. علاوه بر این در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد شدت بیماری در گیاهان رشدی مایه زنی شده با MDMV بیشتر از شدت بیماری در گیاهان مایه-زنی شده با BgSMV بود (شکل ۱).

دوره نهفتگی

اولین نشانه‌های بیماری در گیاهان رشدی مایه زنی شده با هر دو ویروس به تدریج از روز هفتم بعد از مایه زنی مشاهده گردید. دوره ظهور علائم در گیاهان مایه زنی شده با BgSMV در دماهای مختلف تا روز چهاردهم ادامه داشت و بعد از آن تا پایان دوره نگهداری در اتاق کشت، هیچ گیاه جدیدی علائم بیماری را نشان نداد (شکل ۲). دوره ظهور علائم در گیاهان رشدی مایه زنی شده با MDMV در اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تا روز ۱۴ و در اتاق کشت با دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد تا روز ۱۰ بعد از مایه‌زنی ادامه داشت و بعد از آن علائم آلودگی، در هیچ گیاه جدیدی مشاهده نگردید (شکل ۳). نتایج حاصل از بازرسی چشمی و همچنین سنجش وجود

تحقیقات ویروس شناسی گیاهی دانشگاه شیراز بر روی گیاهان دارای علائم و بدون علائم انجام پذیرفت. میانگین شاخص جذب نور برای دو چاهک هر نمونه محاسبه و سپس به منظور سنجش اختلاف معنی داری اثر دماهای مختلف بر روی هر کدام از دو ویروس MDMV و BgSMV از نرم افزار آماری SAS 9.1 استفاده شد.

بررسی بیوانفورماتیکی توالی ۹۰ نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی در ویروس

در این تحقیق از توالی پروتئینی قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی BgSMV جدایه بهبهان (KC107758.1) به همراه توالی پروتئینی ژن CP مربوط به این ویروس (Farahbakhsh et al. 2013) و توالی پروتئین پوششی MDMV (NP_734152) موجود در بانک ژن نیز برای مقایسه توالی‌ها استفاده گردید.

وجود قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی BgSMV یا قطعات مشابه در سایر موجودات توسط گزینه جستجوی بلاست NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی ساختار دوم توالی‌های آمینواسیدی مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس‌های MDMV و BgSMV از Network Protein Sequence @analysis و روش GOR IV استفاده شد. سپس دامانه‌های (Domain) موجود در پروتئین ویروس‌های مذکور توسط سایت اطلاعاتی ELM (<http://elm.eu.org>) بررسی شد. این سایت این قابلیت را دارد که دامانه‌ها و موتیف‌های خطی موجود در توالی‌های آمینواسیدی را بر اساس اطلاعات الگوریتمی سایت SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) پیش‌بینی کند. با در نظر گرفتن اینکه ویروس در گیاه فعال می‌شود احتمال برهمکنش میان فاکتورهای تنظیمی گیاه با سایت‌های موجود در توالی

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده

Table 2. Analysis of Variance for measured traits

	Source of variation	Degree of freedom	Mean squares
Area under the curve of disease Progress (AUDPS)	Virus	1	638.75**
	Temperature	2	370.70**
	Virus X Temperature	3	140.73**
	Error	30	12.64
	Coefficient of variations		21.7
Plant height	Virus	2	20.6*
	Temperature	2	13.9**
	Virus X Temperature	4	7.3**
	Error	45	1.81
	Coefficient of variations		4.10
Plant weight	Virus	2	0.6567**
	Temperature	2	0.3058**
	Virus X Temperature	4	0.1324*
	Error	45	0.0521
	Coefficient of variations		13.58

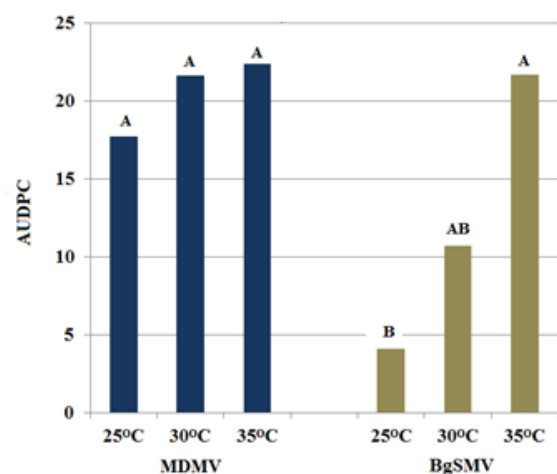
** و * به ترتیب معنی دارد در سطح احتمال ۱ و درصد ۵ درصد

**, * significant at 1% and 5% probability level, respectively

ویروس با آزمون الیزا ۳۰ روز بعد از مایه زنی در دماهای مختلف نشان داد که تنها ۲۰ درصد از گیاهان مایه‌زنی شده با BgSMV در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد آلوده شده بودند در حالی که میزان آلودگی به این ویروس در دمای ۳۰ و ۳۵ درجه به ترتیب ۴۵ و ۹۰ درصد ثبت گردید (شکل ۲). در مورد MDMV، ۳۰ روز بعد از مایه زنی در سه دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد به ترتیب ۸۵، ۹۰ و ۹۵ درصد از گیاهان آلوده شدند (شکل ۳).

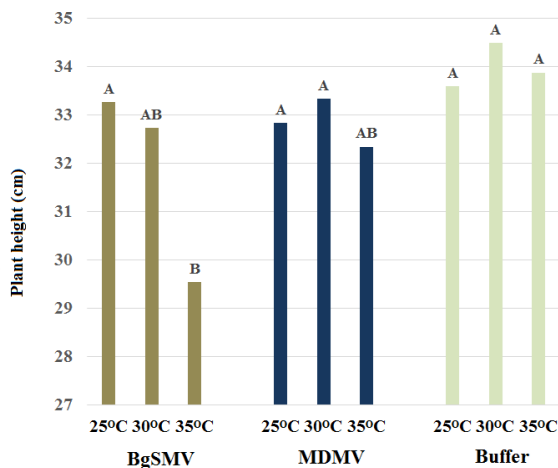
شاخص‌های رشد گیاه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده دما، ویروس و برهمکنش دما-ویروس بر ارتفاع گیاه همه در سطح احتمال ۱٪ معنی دار بودند (جدول ۲). میانگین ارتفاع گیاهان مایه زنی شده با MDMV و BgSMV کمتر از گیاهان مایه‌زنی شده با بافر بود. در گیاهان مایه‌زنی شده با BgSMV با افزایش دما میانگین ارتفاع گیاهان



شکل ۱. میانگین سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) گیاهان رشدی مایه‌زنی شده با MDMV و BgSMV در سه دما تا ۳۰ روز بعد از مایه زنی. تیمارهای دارای حروف مشترک در سطح یک درصد اختلاف معنی دار ندارند.

Fig 1. Average area under the disease progress curve (AUDPC) of plants after inoculation with MDMV and BgSMV at three temperatures. Treatments marked with the same letters are not significantly different at one percent significant level.

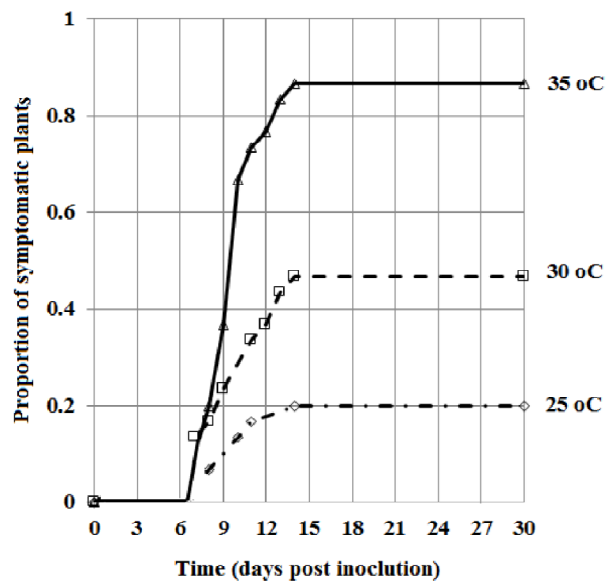


شکل ۴. میانگین ارتفاع گیاهان مایه زنی شده با BgSMV، MDMV و بافر در دماهای مختلف در روز سی‌ام بعد از مایه زنی. تیمارهای دارای حروف مشترک در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig 4. Average height of plants inoculated with BgSMV, MDMV and buffer at different temperatures at 30 days post inoculation. Treatments marked with the same letters are not significantly different at one percent level.

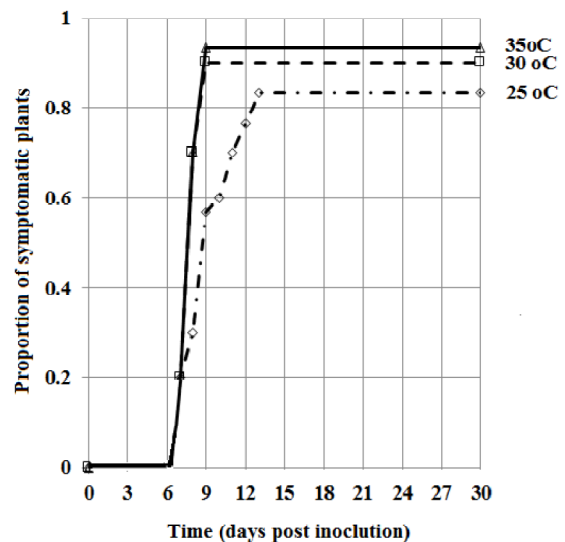
کاهش یافت. علاوه بر این میانگین ارتفاع گیاهان مایه زنی شده با BgSMV در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد کمتر از میانگین ارتفاع گیاهان مایه زنی شده با MDMV بود. این موضوع می‌تواند به دلیل شدت بیشتر آلودگی در BgSMV در دمای بالا باشد (شکل ۴).

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به وزن گیاه در پایان روز سی‌ام بعد از مایه زنی تاثیر معنی‌دار ویروس، دما و برهمکنش دما-ویروس را بر وزن گیاه نشان داد (جدول ۲). به طور کلی میانگین وزنی گیاهان مایه زنی شده با MDMV در دماهای مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت هر چند که میانگین وزنی گیاهان در این تیمار ویروسی نسبت به میانگین گیاهان مایه زنی شده با بافر در هر سه دما کمتر بود. کمترین میانگین وزنی مربوط به گیاهان مایه زنی شده با BgSMV بود که در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد



شکل ۲. نسبت گیاهان دارای علائم در دماها و زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با BgSMV

Fig 2. Proportion of symptomatic plants at different temperatures and times after inoculation with BgSMV



شکل ۳. نسبت گیاهان دارای علائم در دماها و زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با MDMV

Fig 3. Proportion of symptomatic plants at different temperatures and times after inoculation with MDMV

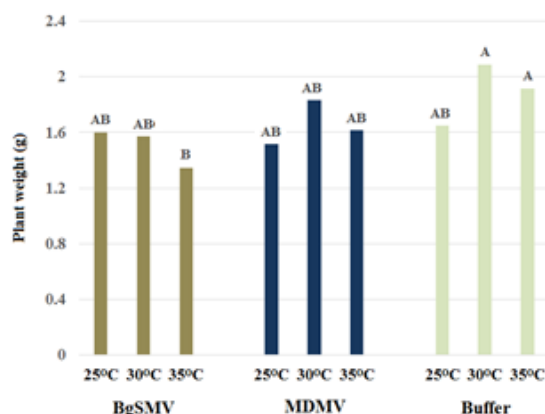
نوکلئوتید در ناحیه پروتئین پوششی ویروس موزائیک سورگوم (Sorghum mosaic virus, SrMV) وجود دارد.

بررسی دامانه‌های موجود در پروتئین پوششی

نتایج نشان داد در توالی آمینواسیدی پروتئین پوششی MDMV و BgSMV یک ناحیه مارپیچ به هم پیچیده (coiled-coil region) وجود دارد. در MDMV این ناحیه، آمینواسیدهای ۷ تا ۴۵ و در BgSMV آمینواسیدهای ۳ تا ۶۶ را شامل می‌شود. قطعه اضافی موجود در BgSMV آمینواسیدهای ۶۵-۳۶ از ناحیه پروتئین پوششی را اشغال می‌کند (شکل ۶).

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش دید روشنی از تاثیر دما بر روی شدت بیماری ناشی از BgSMV و MDMV ارائه می‌نماید. نتایج نشان داد شدت بیماری ناشی از ویروس موزائیک جنوبی مرغ با افزایش دما روند صعودی دارد و اثر این ویروس در کاهش شاخص‌های رشد گیاه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بیشتر از دماهای ۳۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد است. گیاهان مایه‌زنی شده با BgSMV در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، در مقایسه با بافر و MDMV اختلاف معنی داری از لحاظ کاهش شاخص‌های رشدی گیاه داشتند. نتایج نشان داد شدت بیماری MDMV در دماهای مورد مطالعه، اختلاف معنی داری نداشت در حالی که شدت بیماری ناشی از BgSMV با افزایش دما روند صعودی داشت. نتایج همچنین نشان داد با افزایش دما از ۲۵ به ۳۵ درجه سانتیگراد طول دوره نهفتگی و درصد گیاهان آلوده در هر دو ویروس به ترتیب کاهش و افزایش یافته است. شاید بتوان گفت BgSMV نسبت به دماهای پایین‌تر (مثلا ۲۵ درجه و پایین‌تر) حساس است به همین



شکل ۵. میانگین وزن گیاهان مایه زنی شده با BgSMV، MDMV و بافر در دماهای مختلف در روز سی‌ام بعد از مایه زنی. تیمارهای دارای حروف مشترک در سطح معنی داری یک درصد اختلاف معنی دار ندارند.

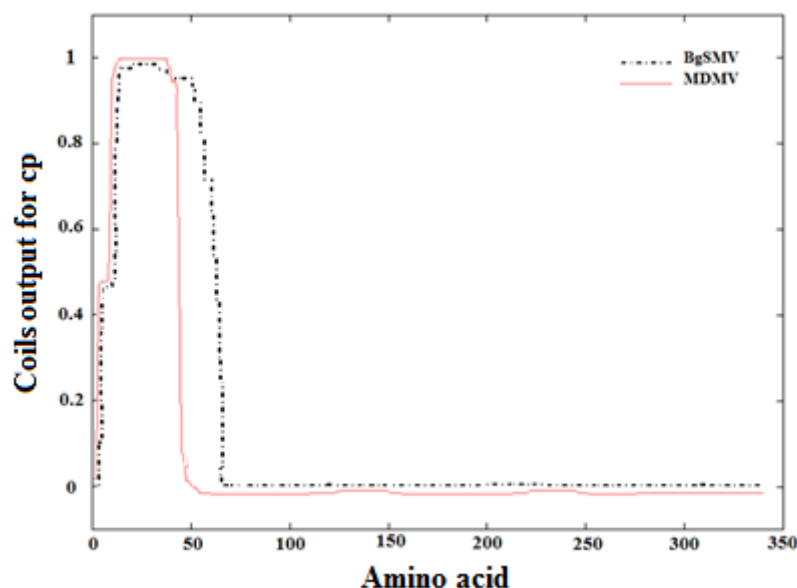
Fig 5. Average weight of plants inoculated with BgSMV, MDMV and buffer at different temperatures at 30 days post inoculation. Treatments marked with the same letters are not significantly different at one percent level.

نگهداری شده بودند. میانگین وزنی این تیمار از آزمایش اختلاف معنی داری با گیاهان مایه زنی شده با بافر و MDMV در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و همچنین تفاوت معنی داری با گیاهان مایه زنی شده با BgSMV در دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتیگراد نشان داد (شکل ۵).

آزمون الیزا در روز سی‌ام پس از مایه‌زنی در مورد هر دو ویروس آلودگی ۱۰۰ درصد گیاهان دارای علائم را تایید نمود در حالی که هیچکدام از گیاهان بدون علائم آلودگی نداشتند. در عین حال تفاوت معنی داری از لحاظ میانگین میزان جذب نور بین تیمارهای مختلف دما مشاهده نشد.

هم‌ردیف‌سازی قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی

هم‌ردیف‌سازی قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی موجود در BgSMV نشان داد که قطعه‌ای مشابه با آن به طول ۷۰



شکل ۶- موقعیت ماریپیج به هم پیچیده در توالی آمینواسیدی پروتئین پوششی MDMV و BgSMV

Fig 6. Location of coiled-coil region in the amino acid sequence of MDMV and BgSMV coat proteins.

دلیل در مناطق معتدل و خنک دیده نشده است در حالی که MDMV با کاهش دما از لحاظ شدت بیماری‌زایی تغییر بارزی نمی‌کند. این پژوهش با بهره‌گیری از ابزارهای بیوانفورماتیک و بررسی ساختار پروتئینی و جستجوی دامانه‌های ویژه توالی‌های پروتئینی نشان داد که در قسمت ابتدایی پروتئین پوششی BgSMV و MDMV ناحیه فعال در بیان ژن و تحمل به دمای بالا موسوم به ماریپیج به هم پیچیده (Gromihaa and Parry 2004, Mason and Arndt 2004, Rose and Meier 2004) وجود دارد ولی این ناحیه در BgSMV به اندازه ۳۰ آمینواسید از آنچه که در MDMV وجود دارد، بلندتر است.

ناحیه coiled coil یک ناحیه غنی از ماریپیج آلفا است. بسیاری از این گونه نواحی، در عملکردهای بیولوژیکی مانند تنظیم بیان ژن نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Rose and Meier 2004). در مطالعات مختلف برای این ناحیه نقش کلیدی در ایجاد مقاومت به دما (Gromihaa and Parry 2004, Mason and Arndt 2004, Rose and Meier 2004) وجود دارد ولی این ناحیه در BgSMV به اندازه ۳۰ آمینواسید از آنچه که در MDMV وجود دارد، بلندتر است.

ناحیه coil coiled در این دو ویروس مرتبط است. در این پژوهش اثر دما بر روی تجمع ویروس در گیاه میزبان در پایان روز سی‌ام بعد از مایه‌زنی با استفاده از آزمون الیزا مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آزمون الیزا نشان داد که بین BgSMV و MDMV و دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۵

ناحیه coiled coil یک ناحیه غنی از ماریپیج آلفا است. بسیاری از این گونه نواحی، در عملکردهای بیولوژیکی مانند تنظیم بیان ژن نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Rose and Meier 2004). در مطالعات مختلف برای این ناحیه نقش کلیدی در ایجاد مقاومت به دما (Gromihaa and Parry 2004, Mason and Arndt 2004, Rose and Meier 2004) وجود دارد ولی این ناحیه در BgSMV به اندازه ۳۰ آمینواسید از آنچه که در MDMV وجود دارد، بلندتر است.

جنوبی است می‌تواند ذرت و سورگوم نیز آلوده سازد (Zare et al. 2005, Masumi et al. 2011). لذا به نظر می‌رسد که محدودیت کنونی دامنه میزبانی این ویروس از یک طرف به دلیل حساس بودن آن به دماهای پایین و از طرف دیگر غیر متداول بودن کشت گیاهانی مانند ذرت و سورگوم در منطقه باشد. با توسعه کشت این قبیل گیاهان در مناطق جنوبی کشور و یا افزایش دمای محیط به دلیل گرمایش زمین در نقاط دیگر، ممکن است این ویروس در آینده اهمیت اقتصادی پیدا کند.

درجه سانتیگراد از لحاظ غلظت ویروس در روز سی‌ام اختلاف معنی داری وجود نداشت. در این مورد لازم است که از یک سو حد نهایی غلظت در تیمارهای مختلف به روش‌های دیگر مانند real-time PCR مورد تایید واقع شود و از سوی دیگر چگونگی تغییرات غلظت در زمان‌های مختلف مورد مطالعه قرار گیرد، و بالاخره ممکن است تفاوت در شدت علائم مربوط به اثر دما روی میزبان باشد تا روی ویروس.

مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که BgSMV علاوه بر رشدی که یکی از میزبانان طبیعی آن در مناطق

منابع

- Campbell, C. L. and Madden, I. V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons Inc., New York, USA. 532 pp.
- Converse, R. H. and Martin, R. R. 1990. ELISA methods for plant viruses. Pp. 179-196, In: Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant pathogens, A Laboratory Manual. (Hampton R. O., Ball, E. M., DeBoer, S. H., eds.). APS Press, USA.
- Farahbakhsh, F., Masumi, M., Afsharifar, A., Izadpanah, K. and Rahpeyma-Sarvestani, N. 2013. Phylogenetic analysis of Bermuda grass southern mosaic virus isolates in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 49: 61-75.
- Ford, R. E. and Tomic, M. 1972. New hosts of maize dwarf mosaic virus and sugarcane mosaic virus and a comparative host range study of viruses infecting corn. Journal of Phytopathology 75: 315-348.
- Ford, R. E., Tomic, M. and Shukla, D. D. 1989. Maize dwarf mosaic virus. AAB Descriptions of Plant Viruses 341:1-4.
- Ghasemi, S. and Izadpanah, K. 1998. Study of potyvirus causing mosaic in *Eleusine compressa* in Bushehr Province. Proc. 13th Iran. Plant. Protec. Cong. Vol. II. P. 311.
- Gromihaa, M. M. and Parry, A. D., 2004. Characteristic features of amino acid residues in coiled-coil protein structures. Biophysical Chemistry 111: 95- 103.
- Mason, J. M. and Arndt, K. M. 2004. Coiled-coil domains: stability, specificity, and biological implications. ChemBioChem 5:170 -176.
- Masumi, M. and Izadpanah, K. 1998. Bermudagrass mosaic in Iran. Proc. 13th Iran. Plant Protec. Cong. Vol. II. P. 314.
- Masumi, M. and Izadpanah, K. 2000. Transmission, purification and serology of Bermudagrass mosaic virus. Proc. 14th Iran. Plant. Protec. Cong., Isfahan Univ. Technol. Vol. II. P. 183.
- Masumi, M. and Izadpanah, K. 2002a. Nucleotide sequence of a part of CP region of "Jiroft" Bermudagrass virus. Proc. 15th Iran. Plant. Protec. Cong. Razi Univ. Kermanshah, Iran. P:31-32.
- Masumi, M. and Izadpanah, K. 2002b. Serological characteristics of potyviruses infecting Bermuda grass in Iran. Proc. 15th Iran. Plant. Protec. Cong. Razi Univ. Kermanshah, Iran. P: 192.
- Masumi, M. and Izadpanah, K. 2002c. Host range differentiation of the virus isolates causing mosaic in Bermuda grass. Proc 15th Iran. Plant Protec. Cong. Razi Univ. Kermanshah, Iran. Pp: 192-193.
- Masumi, M., Zare, A., and Izadpanah, K. 2004. Analysis of 5' region of coat protein gene confirms presence of Maize dwarf mosaic virus (MDMV) in widely separated locations in Iran. Proceeding of 2nd Iranian Congress

- on Virology 13-15 Feb.2004.Tehran.Pp:369-370.
- Masumi, M., Zare, A. and Izadpanah, K. 2011. Biological, serological and molecular comparisons of potyviruses infecting poaceous plants in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 47:11-14 (In Farsi with English summary).
- Moini, A. A. and Izadpanah, K. 2001. Identification and purification of a MDMV-like potyvirus of maize in Mazandaran. Iranian Journal of Plant Pathology 37: 147-159 (In Farsi with English summary).
- Rahpeyma Sarvestani, N. 2012. Functional genomics of maize dwarf mosaic virus, bermudagrass southern mosaic virus, wheat streak mosaic virus and their interaction with plant genome. MSc thesis, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Shiraz University, Iran.
- Rose, A. and Meier, I. 2004. ScaVolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins. Cellular and Molecular Life Sciences 61, 1996–2009.
- SAS. 1999. SAS Software, Version 8 of the SAS System for windows. 1999. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Toler, R. W. 1985. Maize dwarf mosaic, the most important virus disease of sorghum. Plant Disease 69: 1011-1015.
- Zakeri, A., Masumi, M., Nejad, S. N., Ghahramani, T. and Izadpanah, K. 2012. Cross protection between Maize dwarf mosaic virus and Bermuda grass southern mosaic virus. Iranian Journal of Plant Pathology 48: 51-60 (In Farsi with English summary).
- Zare, A., Masumi, M. and Izadpanah, K. 2005. Bermuda grass southern mosaic virus: A distinct potyvirus infecting several gramineous species in Iran. Parasitica 61: 105-110.