ویروس نوارک ایرانی گندم: تعیین ترادف بخشی از آر ان ای شماره ۱، رابطه سرولوژیکی با سایر تنوئی ویروس‌ها و شواهد آلودگی طبیعی در برنج

IRANIAN WHEAT STRIPE VIRUS: PARTIAL SEQUENCE OF RNA 1, SEROLOGICAL RELATION TO OTHER TENUIVIRUSES, AND EVIDENCE OF NATURAL OCCURRENCE IN RICE

جهانگیر حیدرنژاد[۱*]، ساره شهدائی[۱] و کرامت اله ایزدپناه[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۶/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۸)

چکیده

ویروس نوارک ایرانی گندم (**Iranian wheat stripe virus, IWSV**) یکی از اعضای غیر قطعی جنس تنوئی ویروس است. در این تحقیق چند ویژگی **IWSV** مورد مطالعه قرار گرفته است. به منظور روشن ساختن قطبیت قطعه اول ژنوم (**RNA 1**) و مقایسه انتهای ´۳ آن با سایر تنوئی ویروس‌ها، در حدود ۶۵۰ نوکلئوتید از انتهای ´۳ این قطعه تکثیر، همسانه سازی و سپس تعیین ترادف شد. مطالعه ترادف به دست آمده نشان داد که قطعه فوق مشابه با اکثر تنوئی ویروس‌ها، دارای قطبیت منفی بوده و از نظر ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ژن آر ان ا پلیمراز، بیشترین شباهت را با تنوئی ویروس‌های عامل برگ سفید برنج در قاره امریکا دارد. تا قبل از این مطالعه، گندم تنها میزبان طبیعی و شناخته شده **IWSV** بود. در این بررسی، برنج به عنوان یکی از میزبانان اقتصادی ویروس از منطق برنجکاری شمال شیراز شناسایی شد. به منظور مقایسه جدایه‌های گندم و برنج، ژن‌های پروتئین پوششی (**CP**) و پروتئین عمده غیر ساختمانی (**NS4**) جدایه برنج با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و بعد از همسانه سازی، با قسمت‌های مشابه در جدایه گندم مقایسه شدند. نتایج نشان داد که ژن‌های فوق در دو جدایه، از نظر ترادف نوکلئوتیدی و ترادف آمینو اسیدی به ترتیب ۹۹/۶ و ۱۰۰-۹۹/۰ درصد به هم شباهت دارند. مطالعات سرولوژیکی برای روشن ساختن ارتباط **IWSV** با پنج تنوئی ویروس دیگر با استفاده از آزمون‌های نشت دو طرفه در آگار، دیبا و/یا الایزای غیر مستقیم با کمک آنتی‌سرم‌های تولید شده بر علیه **CP** یا **NS4** نشان داد که **IWSV** از میان سایر تنوئی ویروس‌های مورد مطالعه، تنها با ویروس برگ سفید برنج (***Rice hoja blanca virus*, RHBV**) ارتباط سرولوژیکی دارد. این نتیجه همراه با نتایج حاصل از مقایسه‌های مربوط به ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی، یک بار دیگر شباهت **IWSV** را با تنوئی ویروس‌های عامل برگ سفید در قاره امریکا تأیید می‌کند. مایه‌زنی گندم با تزریق عصاره گیاه آلوده به بذرهائی که ۳۰ دقیقه در آب ۲۵°C خیس خورده بودند، موفقیت‌آمیز بود و ویروس با راندمان ۵/۲ در صد به گیاهچه‌های حاصل از این بذرها منتقل شد.

واژه‌های کلیدی: ویروس نوارک ایرانی گندم، تنوئی ویروس، آزمون نشت دو طرفه در آگار، دیبا، آزمون الایزا، تزریق جنین، انتقال ویروس

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jheydarnejad@mail.uk.ac.ir

۱. به ترتیب دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تنوئی ویروس‌ها گروه مشخصی از ویروس‌های گیاهی هستند که اعضای آنها در نقاط مختلف دنیا به مهم‌ترین گیاهان خانواده گندمیان (*Poaceae*) مانند گندم، برنج و ذرت حمله کرده و باعث ایجاد خسارت‌های زیادی می گردند (Falk and Tsai 1998). باوجودی‌که بیماری‌های ناشی از تنوئی ویروس‌ها از مدت‌ها پیش شناخته شده بودند ولی این ویروس‌ها تنها از سال ۱۹۸۱ به عنوان یک گروه مستقل معرفی (Gingery *et al.* 1981) و سپس در یک جنس به نام (*Tenuivirus*) قرار داده شدند (Toriyama 1995). جنس *Tenuivirus* شامل شش عضو قطعی به نام‌های ویروس نوارک برنج (*Rice stripe virus*, RSV)، ویروس نوارک ذرت (*Maize stripe virus*, MSpV)، ویروس برگ سفید برنج (RHBV)، ویروس برگ سفید دژگال (*Echinochloa hoja blanca virus*, EHBV)، ویروس برگ سفید یوروکلوآ (*Erochloa hoja blanca virus*, EHBV) و ویروس کوتولگی علفی برنج (*Rice grassy stunt virus*, RGSV) و چند عضو غیر قطعی است (Haenni *et al.* 2005). ژنوم این ویروس‌ها از ۶-۴ قطعه آر ان ا به صورت آمبی سنس (Ambisense) و یا با قطبیت منفی تشکیل شده است (Haenni *et al.* 2005; Heydarnejad *et al.* 2006). به استثنای RGSV که هر شش قطعه ژنوم آن آر ان ای آمبی سنس است (Toriyama *et al.* 1997; 1998)، قطعه شماره ۱ (RNA 1) ژنوم بقیه تنوئی ویروس‌ها و قطعه شماره ۵ (RNA 5) ژنوم EHBV و MSpV دارای قطبیت منفی هستند (Haenni *et al.* 2005; Huiet *et al.* 1993; de Miranda *et al.* 1996). به دلیل بزرگ بودن طول قطعه RNA 1، ترادف کامل این قطعه تنها در مورد RSV (Accession No D31879) و RGSV (Accession No AB009656) در دست است. در مورد سایر تنوئی ویروس‌ها مانند MSpV، RHBV و UHBV فقط حدود ۱۷۰۰-۱۴۰۰ نوکلئوتید از انتهای ´۳ این قطعه تعیین ترادف شده است (de Miranda *et al.* 2001; Mahmoud *et al.*, 2007). با استفاده از این اطلاعات مشخص شده است که یک چارچوب خوانش بزرگ روی این قطعه، آنزیم آر ان ا پلیمراز را رمزگذاری می‌کند (Toriyama *et al.* 1994; Toriyama *et al.* 1998).

قطعات ژنوم تنوئی ویروس‌ها بسته به گونه، قادر به رمزگذاری ۱۲-۷ پروتئین هستند که از میان آنها CP و NS4 (معادل NS6 در RGSV) بیشتر مورد توجه واقع شده‌اند. ژن‌های رمزگذاری CP و NS4 به ترتیب روی قطعات vcRNA 3 و vRNA 4 قرار گرفته‌اند. پروتئین NS4، پروتئینی است با وزن مولکولی بین ۲۳-۱۹ کیلو دالتون که به میزان زیادی در بافت گیاهان تجمع پیدا می‌کند (Falk and Tsai 1998). با وجودی‌که هنوز نقش دقیق این پروتئین مشخص نشده ولی همانند پروتئین پوششی از خاصیت ایمونوژنی بالائی بر خوردار بوده به همین دلیل از آنتی‌سرم‌های تولید شده بر علیه آن برای ردیابی ویروس و تعیین ارتباطات سرولوژیکی استفاده می‌شود (Toriyama 2000; Sharzei and Izadpanah, 1998; Morales and Niessen 1985; Gingery 1985; 1988; Hibino *et al.* 1985).

انتقال تنوئی ویروس‌ها توسط زنجرک‌های خانواده دلفاسیده (*Delphacidae*) با رابطه تکثیری صورت می‌گیرد (Falk and Tsai 1998). انتقال مکانیکی و انتقال به وسیله بذر توسط این ویروس‌ها گزارش نشده است. به همین دلیل، در مورد هر تنوئی ویروس، دسترسی به کلنی ناقل جهت پاره‌ای مطالعات، اجتناب‌ناپذیر به نظر می‌رسد.

Archive of SID

www.SID.ir

با این وجود، بر اساس روش ارائه شده توسط لوئی با تزریق بذر، تعدادی از ویروس‌هایی که برای انتقال وابسته به ناقل بودند، به گیاهان سالم انتقال داده شدند (Louie 1995).

یکی از اعضای غیر قطعی جنس تنوئی ویروس، ویروس نوارک ایرانی گندم است که از سال ۱۳۶۸ از مزارع گندم استان فارس گزارش شده است (Heydarnejad and Izadpanah 1992). ژنوم IWSV حاوی چهار قطعه آر ان ا است که سه قطعه کوچک‌تر آمبیسنس هستند و از وضعیت قطعه RNA 1 اطلاعی در دست نیست (Heydarnejad *et al.* 2006). همانند سایر تنوئی ویروس‌ها، IWSV نیز توسط یکی از زنجرک‌های خانواده *Delphacidae* به نام *Unkanodes tanasijevici* با رابطه تکثیری انتقال می‌یابد (Heydarnejad and Izadpanah 1992). در میان سایر تنوئی ویروس‌ها، IWSV بیشترین شباهت را از نظر ترادف ژنوم با ویروس‌های عامل برگ سفید مانند RHBV و EHBV دارد (Heydarnejad *et al.* 2006). هر سه ویروس عامل بیماری برگ سفید (RHBV، EHBV و UHBV) ارتباطات سرولوژیکی و مولکولی نزدیکی با یکدیگر دارند (Haenni *et al.* 2005; de Miranda *et al.* 2001; Falk *et al.* 1987). علاوه بر این، ارتباط سرولوژیکی IWSV با RHBV نیز با استفاده از آزمون نشت در آگار (Agar Gel Diffusion, AGD) به اثبات رسیده است (Heydarnejad and Izadpanah 1992) ولی از ارتباط سرولوژیکی IWSV با سایر تنوئی ویروس‌ها اطلاعی در دست نیست. باوجودی که گندم، تنها میزبان طبیعی شناخته شده IWSV است به نظر می رسد که این ویروس در طبیعت گسترش زیادی روی این محصول نداشته باشد (حیدرنژاد، مطالعات منتشر نشده). از طرف دیگر، اخیراً عملکرد برنج در استان فارس تحت تأثیر چند بیماری شبه ویروسی قرار گرفته است. به همین منظور مطالعه‌ای منظور شناسایی برنج به عنوان میزبان احتمالی IWSV در طبیعت و مقایسه جدایه‌های گندم و برنج صورت گرفت. هم‌چنین در این تحقیق چند ویژگی مبهم IWSV نظیر قطبیت RNA 1 و قابلیت انتقال ویروس از طریق تزریق جنین مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

منبع ویروس

بوته‌های گندم (*Triticum aestivum* L.) یا برنج (*Oryza sativa* L.) آلوده به ویروس به ترتیب از مزارع گندم باجگاه (۱۰ کیلومتری شمال شیراز) و مزارع برنج دشتک (۵۰ کیلومتری شمال شیراز) جمع‌آوری شدند. برای شناسایی آلودگی برنج، بازدیدهایی از مزارع انجام شد و ده بوته با علائم کوتولگی شدید و نواری شدن خفیف برگ، جمع‌آوری و در گلدان به گلخانه منتقل شدند. بررسی آلودگی نمونه‌های فوق به IWSV با آزمون نشت در آگار (AGD) صورت گرفت. در برخی از مراحل تحقیق، به دلیل سهولت استخراج عصاره از بافت گندم، ابتدا ویروس عامل بیماری از طریق ناقل اختصاصی ویروس یعنی زنجرک *Unkanodes tanasijeveci* از بوته‌های برنج به گیاهچه‌های گندم منتقل و از بافت برگ‌های گندم برای عصاره‌گیری استفاده شد.

استخراج آر ان ای کل (total RNA)

برای استخراج آر ان ای کل از بافت آلوده گندم دارای علائم مشخص بیماری (شکل ۱)، از کیت High Pure Viral RNA (Roche, Germany) بر اساس

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱. درجات مختلف نواری شدن برگ گندم در اثر آلودگی به ویروس نوارک ایرانی گندم (IWSV). آخرین برگ سمت راست، برگ سالم گندم را نشان می‌دهد.

Fig. 1. Different stages of striping on leaves of wheat infected by Iranian wheat stripe virus. The first leaf from right is the healthy sample.

دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد. برای این منظور ابتدا جدایه برنج IWSV توسط ناقل به گندم منتقل و سپس از بافت گندم برای استخراج استفاده گردید.

تکثیر ناحیه ´۳ قطعه RNA 1

به منظور تکثیر انتهای ´۳ قطعه RNA 1 ویروس نوارک ایرانی گندم مربوط به جدایه برنج، ابتدا با توجه به شباهت‌های ژنوم IWSV به ویروس‌های عامل برگ سفید (مانند RHBV و UHBV)، ناحیه ´۳ قطعه شماره ۱ ویروس‌های فوق به طول تقریبی ۱۴۰۰ نوکلئوتید با یکدیگر مقایسه و سه آغازگر مستقیم IWSV-1a، IWSV-1b و IWSV-1c طراحی گردیدند (جدول ۱). توضیح این‌که هنوز هیچ اطلاعی از قطعه شماره ۱ EHBV در دست نیست. از آغازگر IWSV-JHG1 نیز به عنوان آغازگر معکوس استفاده شد. این آغازگر قبلاً با کمک ترادف حفاظت شده دو انتهای قطعات مختلف ژنوم تنوئی ویروس‌ها طراحی گردیده بود (Heydarnejad *et al.* 2006).

تکثیر ژن‌های CP و NS4

برای تکثیر ژن‌های پروتئین پوششی و پروتئین عمده غیر ساختمانی جدایه برنج و مقایسه آنها با قطعات مشابه در جدایه گندم IWSV، به ترتیب از آغازگرهای مستقیم و معکوس IWSV3 و IWSV4 استفاده گردید. نام‌گذاری آغازگرها به دلیل قرار گرفتن این دو ژن به ترتیب روی قطعات RNA3 و RNA4 است. برای طراحی این آغازگرها از ترادف نوکلئوتیدی قطعات سوم و چهارم جدایه گندم این ویروس، موجود در بانک جهانی ژن (به ترتیب AY 312435 و AY 312436) استفاده شد. در جدول ۱ اسامی آغازگرها به همراه ترادف نوکلئوتیدی آنها آورده شده است. برای ساخت cDNA و استفاده از آن در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) از روش حیدرنژاد و همکاران (Heydarnejad *et al.* 2006) استفاده گردید و محصولات RT-PCR به دست آمده، در ژل آگاروز یک در صد الکتروفورز شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. فهرست آغازگرهای مورد استفاده به منظور تکثیر ژن‌های پروتئین پوششی، پروتئین عمده غیر ساختمانی و انتهای ´۳ قطعه RNA 1 ویروس نوارک ایرانی گندم.

Table 1. The list of primers used for amplification of coat protein and non-structural protein genes and the 3´ end of RNA 1 of Iranian wheat stripe virus.

Primer name	Length	Sequence (5′- 3′)	Target
IWSV3-F	24	TC**GGATCC**ATGTCGATGTCTGTTG[a]	RNA 3
IWSV3-R	26	TCT**GTCGAC**AACATCCTCGGGAGCGA[b]	RNA 3
IWSV4-F	25	GC**GGATCC**ATGGACTTTCTGAAAAC[a]	RNA 4
IWSV4-R	28	TGG**GTCGAC**CTTGTGCAGCATCTGCATC[b]	RNA 4
IWSV-JHG1	21	TCCGCGGCCGCACACAAAGTC	RNA 1
IWSV-1a	20	GCRACWCAAGCTAGCTCATC	RNA 1
IWSV-1b	20	CAGTTCCWKCAGCRCATGAT	RNA 1
IWSV-1c	21	AACCWRTTGASACTGGCTCAG	RNA 1

[a]ترادف GGATCC جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Bam*HI می باشد که در درون ترادف آغازگر قرار داده شده است.

[b]ترادف GTCGAC جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Sal*I می باشد که در درون ترادف آغازگر قرار داده شده است.

همسانه‌سازی و تعیین ترادف

همسانه‌سازی محصولات RT-PCR شامل انتهای ´۳ قطعه RNA 1 مربوط به جدایه برنج به طول تقریبی ۶۵۰ جفت باز و ژن‌های کامل CP و NS4 به ترتیب به طول ۹۲۵ و ۹۵۴ جفت باز با استفاده از کیت Ins T/A Clone ™ PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Lithuania) بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده انجام شد. قطعات فوق با استفاده از آنزیم لیگاز (T4 DNA ligase) درون پلاسمید pTZ57R/T قرار داده شدند. سپس پلاسمیدهای نو ترکیب به دست آمده برای انتقال به باکتری *E.coli*، نژاد XL-blue طبق روش شرکت سازنده کیت، مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از شناسایی باکتری‌های حاوی قطعات مورد نظر، پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شدند. به منظور اطمینان از عمل همسانه‌سازی، پلاسمیدهای فوق توسط آنزیم‌های برشی *Sal*I و *Bam*HI (در مورد ژن‌های CP و NS4) و آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Pst* I (در مورد انتهای ناحیه ´۳ قطعه RNA 1) بریده شدند و اندازه قطعات همسانه‌سازی شده کنترل شد. در نهایت پلاسمیدهای فوق از هر دو طرف تعیین ترادف شدند.

مقایسه ترادف‌های

ترادف ژن‌های CP و NS4 مربوط به جدایه برنج با ترادف‌های مشابه مربوط به جدایه گندم موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) با استفاده از نرم‌افزار (DNAMAN Version 7 Lynnon Corporation, Quebec, Canada) مقایسه گردیدند و میزان شباهت (Identity) ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی تعیین شد. به همین صورت ترادف انتهای ´۳ قطعه RNA 1 با ترادف‌های مشابه مربوط به سایر تنوئی

Archive of SID

www.SID.ir

ویروس‌ها موجود در بانک جهانی ژن مقایسه شد و میزان شباهت نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی بین آنها محاسبه شد.

مایه‌زنی بذر

ابتدا ۱۰ گرم بافت برگ تازه گندم آلوده به IWSV به قطعات کوچک خرد و عصاره آن با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات M 0.01 (pH=7) تهیه شد. به منظور حذف قطعات گیاهی، عصاره حاصل به مدت پنج دقیقه در g ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و از مایع رونشین برای تزریق استفاده شد. برای مایه‌زنی IWSV به بذر، سه تیمار زمانی مختلف شامل ۳۰ دقیقه، هشت ساعت و ۲۴ ساعت برای خیس کردن بذر در آب معمولی با دمای $25^{\circ}C$ انتخاب شد. هر تیمار شامل یک گروه ۱۰۰ عددی بذر بود. به هر بذر ۳۰-۲۰ میکرولیتر عصاره توسط سرنگ به قسمت انتهائی (در محل قرار گرفتن جنین) تزریق شد. بذرهای تزریق شده بلافاصله در گلدان کشت و تا ظهور علائم روی گیاهان حاصل، در گلخانه نگهداری شدند.

مطالعات سرولوژیکی

برای تعیین ارتباط سرولوژیکی IWSV با سایر تنوئی ویروس‌ها مانند RSV، RGSV، RHBV، EHBV و MSpV از آزمون‌های AGD، دیبا (dot immunobinding assay, DIBA) و الایزای غیر مستقیم (Indirect ELISA) براساس روش‌های ارائه شده به ترتیب توسط Ball (1990)، Hibi and Saito (1985) و Clark and Bar-Joseph (1984) استفاده شد. برای تعیین ارتباط سرولوژیکی IWSV با RSV و RGSV، از آنتی سرم‌های تولید شده بر علیه پروتئین پوششی دو ویروس آخر ارسالی توسط *دکتر اس. توری یاما* (S. Toriyama) از مؤسسه National Institute of Agro-Environmantal Sciences, Japan در آزمون‌های AGD و DIBA استفاده گردید. برای تعیین ارتباط سرولوژیکی IWSV با RHBV، EHBV، و MSpV از آنتی سرم‌های تولید شده بر علیه پروتئین غیر ساختمانی NS4 مربوط به سه ویروس آخر که توسط *دکتر برایس فاک* (Bryce Falk) دانشگاه کالیفرنیا، دیویس) از دانشگاه کالیفرنیا ارسال شده بود در آزمون‌های AGD و الایزای غیر مستقیم استفاده شد. آنتی ژن مورد استفاده برای تمامی آزمون‌ها، عصاره برگ‌های تازه آلوده به IWSV بود که به طور جداگانه برای هر آزمون بر اساس روش‌های ارائه شده فوق، استخراج شد. از آنتی‌سرم تولید شده بر علیه پروتئین پوششی IWSV نیز به عنوان شاهد در مطالعات سرولوژیکی استفاده شد (Heydarnejad and Izadpanah 1992).

نتایج و بحث

آلودگی طبیعی برنج به IWSV

تمامی ده نمونه برنج با علائم کوتولگی شدید و نوارهای سبز تیره به موازات رگبرگ اصلی که از مناطق برنجکاری دشتک واقع در استان فارس جمع‌آوری شده بودند، با استفاده از آزمون AGD آلوده به IWSV تشخیص داده شدند. در این منطقه در برخی از سال‌ها، عملکرد محصول برنج به شدت تحت تأثیر این ویروس و دو ویروس دیگر یعنی ویروس کوتولگی زرد جو (سروتیپ‌های PAV و MAV) و ویروس عامل بیماری کوتولگی گال سیاه برنج (Rice black-gall dwarf virus) قرار می‌گیرد (Yassaie *et al.* 2004). قبلاً، به رغم دامنه میزبانی وسیع IWSV در شرایط آزمایشگاهی، گندم تنها میزبان شناخته

Archive of SID

www.SID.ir

شده طبیعی این ویروس بود و به استثنای ذرت، تمامی غلات شامل جو، یولاف، چاودار، انواع ارزن و حتی برنج به عنوان میزبان‌های آزمایشگاهی ویروس معرفی شده بودند (Heydarnejad and Izadpanah 1992).

تجزیه و تحلیل ترادف انتهای ناحیه ´۳ قطعه RNA 1

از میان آغازگرهای مستقیم IWSV-1a، IWSV-1b و IWSV-1c که برای تکثیر انتهای ناحیه ´۳ قطعه RNA 1 ویروس نوارک ایرانی گندم (جدایه برنج) در آزمون RT-PCR، طراحی شده بودند، تنها استفاده از آغازگر IWSV-1a به همراه آغازگر معکوس IWSV-JHG1 منجر به تکثیر یک قطعه ۶۶۶ جفت بازی شد. این سه آغازگر با مقایسه انتهای ناحیه ´۳ قطعه RNA 1 مربوط به ویروس‌های RHBV و UHBV طراحی شده بودند. بررسی ترادف قطعه تکثیر شده نشان داد که انتهای ژن آنزیم آر ان ا پلیمراز در این ناحیه قرار دارد. مقایسه ترادف نوکلئوتیدی به دست آمده با ترادف‌های مشابه مربوط به RSV، RHBV، UHBV و MSpV موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه برنج IWSV بیشترین و کمترین شباهت ترادف نوکلئوتیدی را به ترتیب با UHBV (۶۷/۸ درصد) و MSpV (۴۹/۰ درصد) دارا می‌باشد (شکل ۲). هم‌چنین ترادف آمینو اسیدی حاصل از ترجمه قطعه فوق (مربوط به پروتئین آر ان ا پلیمراز) با قسمت‌های مشابه در RSV، RHBV، MSpV و UHBV مقایسه شد. در این مقایسه بیشترین و کمترین شباهت به ترتیب بین IWSV با RHBV (۷۹/۵ درصد شباهت) و MSpV (۳۷/۰ در صد) به دست آمد. این نتایج یک بار دیگر شباهت IWSV را با ویروس‌های عامل بیماری برگ سفید در قاره امریکا تأیید می‌کند. علاوه بر این، مشابه با سایر تنوئی ویروس‌ها (به غیر از RGSV) این قطعه در IWSV نیز دارای قطبیت منفی است. به دلیل تفاوت‌های عمیقی که بین RGSV و سایر تنوئی ویروس‌ها از جمله IWSV وجود دارد (Toriyama *et al.* 1997; 1998; Heydarnejad *et al.* 2006)، این ویروس از این مقایسه‌ها حذف گردیده است.

مقایسه جدایه‌های گندم و برنج

نتایج حاصل از آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی IWSV3-F/R و IWSV4-F/R برای تکثیر و سپس همسانه‌سازی ژن‌های CP و NS4 در جدایه برنج ویروس نوارک ایرانی گندم، به ترتیب منجر به تکثیر قطعاتی به اندازه‌های ۹۵۴ و ۵۲۵ جفت باز برای دو ژن فوق گردید (شکل ۳). بر اساس مطالعات قبلی نیز طول این دو ژن در جدایه گندم به همین میزان محاسبه شده بود (Heydarnejad *et al.* 2006). مقایسه ترادف‌های دو ژن فوق مربوط به جدایه برنج با ترادف‌های مشابه مربوط به جدایه گندم، موجود در بانک جهانی ژن، با استفاده از نرم افزار DNAMAN نشان داد که بین دو جدایه، درصد مشابهت ترادف نوکلئوتیدی برای هر دو ژن، یکسان و به میزان ۹۹/۶ درصد است. علاوه براین، میزان مشابهت ترادف آمینو اسیدی برای ژن‌های CP و NS4 بین جدایه‌های برنج و گندم نیز بترتیب ۹۹/۰ و ۱۰۰ درصد محاسبه شد. این نتایج منعکس کننده شباهت‌های نزدیک و یا یکسانی جدایه‌های گندم و برنج ویروس فوق است.

مایه‌زنی بذر

مایه‌زنی در دمای آزمایشگاه (حدود ۲۵°C) روی بذرهائی صورت گرفت که تحت سه تیمار زمانی خیساندن، قبل از مایه‌زنی قرار گرفته بودند. نتایج به دست آمده نشان داد که

Archive of SID

www.SID.ir

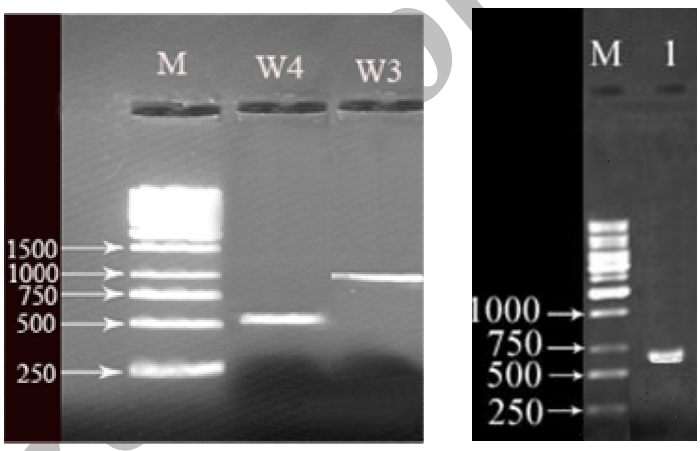
Amino acid homology (%)

*	IWSV	RHBV	UHBV	MSpV	RSV
IWSV	*	79.5	78.1	37.0	41.8
RHBV	66.4	*	88.4	36.3	39.7
UHBV	67.8	73.7	*	34.2	37.7
MSpV	49.0	49.7	48.5	*	65.8
RSV	49.2	53.0	51.8	64.9	*

Nucleotide homology (%)

شکل ۲. در صد تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی انتهای ´۳ قطعه شماره ۱ (RNA 1) ژنوم بین پنج تنوئی ویروس مختلف برای قطعه ۶۶۶ نوکلئوتیدی و ۱۴۶ آمینو اسیدی. کوتاهه‌ها عبارت‌اند از: ویروس نوارک ایرانی گندم (IWSV)، ویروس برگ سفید برنج (RHBV)، ویروس برگ سفید یوروکلوآ (UHBV)، ویروس نوارک ذرت (MSpV) و ویروس نوارک برنج (RSV)

Fig. 2. Percent nucleotide and amino acid sequence homology of the 3´ end of the RNA 1 in five tenuiviruses for 666 nucleotides and 146 amino acids. Abbreviations are: IWSV, Iranian wheat stripe virus; RHBV, *Rice hoja blanca virus*; UHBV, *Urochloa hoja blanca virus*; MSpV, *Maize stripe virus*; RSV, *Rice stripe virus*.



شکل ۳. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات RT-PCR مربوط به ژن های پروتئین پوششی (W4)، پروتئین غیرساختمانی (W3) و انتهای ´۳ قطعه RNA 1 (1) ویروس نوارک ایرانی گندم در ژل آگاروز یک درصد. M، شاخص اندازه دی ان ا

Fig. 3. Electrophoresis pattern of PCR products of NS4 gene (W4), CP gene (W3) and the 3´ end of RNA 1 (1) of Iranian wheat stripe virus. M, 1 kb DNA ladder (Fermentas, Lithuania).

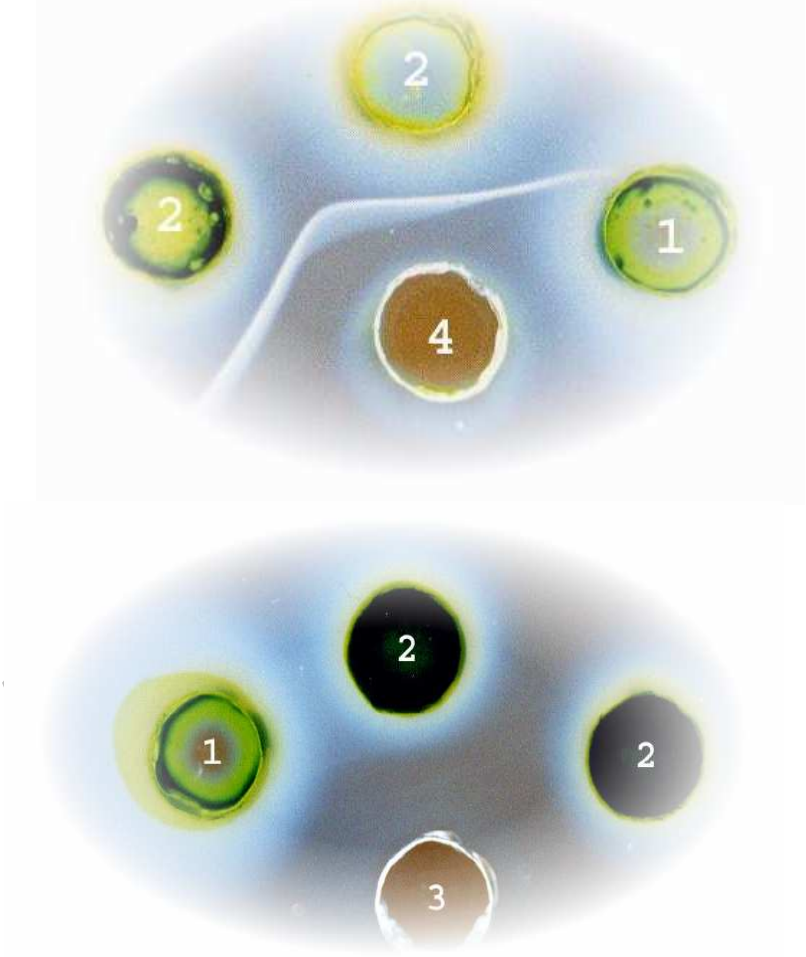
طولانی شدن مدت زمان خیساندن بذر اثر منفی در نتایج مایه‌زنی دارد به‌طوری که تیمارهای ۸ و ۲۴ ساعت منجر به انتقال ویروس نشد و تیمار خیساندن بذر به مدت ۳۰ دقیقه تنها تیماری بود که منجر به انتقال موفقیت آمیز ویروس از طریق تزریق به بذر گردید (جدول ۲). در این تیمار، ۵/۲ درصد از گیاهان حاصل از بذرهای مایه‌زنی شده، به ویروس آلوده بودند. گیاهان فوق دارای علائم مشخص IWSV بوده و علاوه بر این، در آزمایش الایزای

www.SID.ir

جدول ۲. اثر مدت زمان خیس کردن بذر در آب معمولی ۲۵°C، روی قابلیت انتقال ویروس نوارک ایرانی گندم از طریق مایه زنی بذر

Table 2. The effect of time of seed soaking in tap water at 25°C on the transmission of Iranian wheat stripe virus by seed injection.

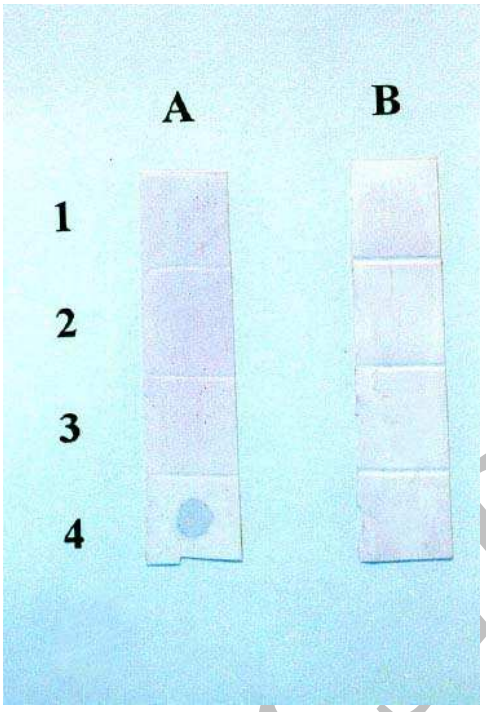
مدت زمان خیس نمودن بذر قبل از تزریق Time of the seed soaking before injection	تعداد بذر جوانه زده بعد از تزریق Number of germinated seeds after inoculation	تعداد گیاهچه‌های آلوده Number of infected seedlings
30 minutes	77/100	4/77
8 hours	69/100	0/69
24 hours	65/100	0/65



شکل ۴. آزمون نشت دو طرفه در آگار با استفاده از آنتی سرم تولید شده بر علیه پروتئین پوششی ویروس نوارک برنج (3) و ویروس نوارک ایرانی گندم (4). ۱، عصاره گندم سالم؛ ۲، عصاره گندم آلوده به ویروس نوارک ایرانی گندم

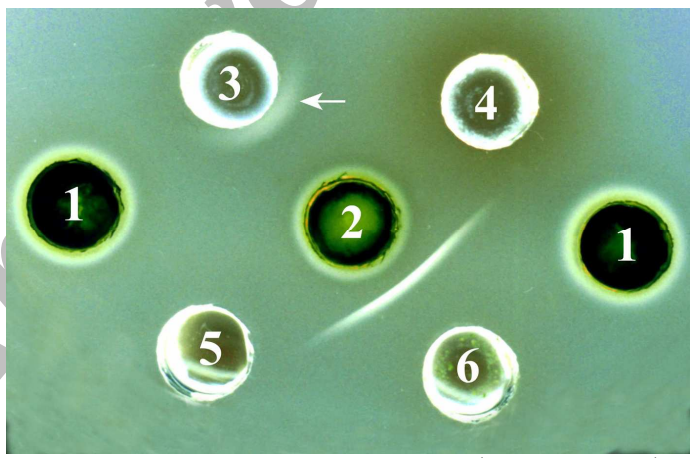
Fig. 4. Agar-gel diffusion test with antisera against CP of *Rice stripe virus* (3) and Iranian wheat stripe virus (IWSV) (4). 1, crude sap from healthy wheat; 2, crude sap from IWSV-infected wheat.

www.SID.ir



شکل ۵. آزمون دیبا با استفاده از آنتی سرم تولید شده بر علیه پروتئین های پوششی ویروس نوارک ایرانی گندم (A) و ویروس نوارک برنج (B). ، ۱، عصاره گندم سالم؛ ۲، عصاره ذرت سالم؛ ۳، عصاره برنج سالم؛ ۴، عصاره گندم آلوده به ویروس نوارک ایرانی گندم

Fig. 5. Dot immunobinding assay test with antisera raised against CP of Iranian wheat stripe virus (IWSV) (A) and Rice stripe virus (B). 1, crude sap from healthy wheat; 2, crude sap from healthy maize; 3, crude sap from healthy rice; 4, crude sap from IWSV-infected wheat.



شکل ۶. آزمون نشت دو طرفه در آگار با استفاده از آنتی سرم های تولید شده بر علیه پروتئین پوششی ویروس نوارک ایرانی گندم (6)، پروتئین عمده غیر ساختمانی ویروس برگ سفید برنج (3)، پروتئین عمده غیر ساختمانی ویروس برگ سفید اکینوکلوآ (4) و پروتئین عمده غیر ساختمانی ویروس نوارک ذرت (5). 1، عصاره گندم سالم؛ 2، عصاره گندم آلوده به ویروس نوارک ایرانی گندم. واکنش بین عصاره گندم آلوده به ویروس نوارک ایرانی گندم با آنتی سرم ویروس برگ سفید برنج با فلش نشان داده شده است.

Fig. 6. Agar-gel diffusion test with antisera against CP of Iranian wheat stripe virus (IWSV) (6), the main non-structural proteins of *Rice hoja blanca virus* (3), *Echinochloa hoja blanca virus* (4) and *Maize stripe virus* (5). 1, crude sap from healthy wheat; 2, crude sap from IWSV- infected wheat. Arrow shows reaction band between IWSV infected sap and RHBV-NS antiserum.

www.SID.ir

مستقیم با آنتی‌سرم تولید شده بر علیه پروتئین پوششی واکنش نشان دادند (Heydarnejad and Izadpanah 1992). در تحقیقات مشابه روی بذر ذرت، عواملی مانند نوع ویروس مورد مطالعه، درجه حرارت آب به منظور خیساندن بذر و مدت زمان خیساندن، در راندمان انتقال مؤثر بودند (Louie 1995). در مورد ویروس موزائیک نوار سبزرد قیاق، زمان بهینه خیساندن بذر ذرت، چهار ساعت تعیین گردید (Izadpanah *et al.* 2002). دو فاکتور دمای آب و مدت زمان خیس کردن بذر به دلیل تأثیری است که آنها در شروع بسیاری از فعالیت‌های حیاتی بذر مثل فعالیت‌های آنزیمی دارند. احتمالاً بهمین دلیل در تیمارهای ۸ و ۲۴ ساعت، عمل انتقال، موفقیت‌آمیز نبوده است. برای بالا بردن راندمان انتقال IWSV با استفاده از این روش، می‌بایست اثر دمای متفاوت آب و تیمارهای زمانی خیساندن بذر، بین ۳۰ دقیقه تا ۸ ساعت نیز مورد ارزیابی قرار گیرند.

ارتباطات سرولوژیکی

نتایج آزمایش‌های سرولوژیکی AGD و دیبا با استفاده از آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه پروتئین پوششی RSV و RGSV، نشان داد که IWSV هیچ‌گونه ارتباط سرولوژیکی با این دو ویروس ندارد (شکل‌های ۴ و ۵). تفاوت دو روش سرولوژیکی فوق، میزان حساسیت آنهاست. در حقیقت از آزمون حساس دیبا برای تأئید نتایج آزمون AGD استفاده شد. از طرف دیگر، برای تعیین ارتباط سرولوژیکی IWSV با RHBV، EHBV و MSpV از آنتی‌سرم‌های تولید شده بر علیه پروتئین غیر ساختمانی مربوط به سه ویروس آخر و عصاره گیاه آلوده به IWSV استفاده شد. نتایج به دست آمده یک بار دیگر ارتباط سرولوژیکی IWSV را با RHBV نشان داد (شکل ۶). قبلا نیز ارتباط سرولوژیکی این دو ویروس از طریق واکنش عصاره گندم آلوده به IWSV با آنتی‌سرم تولید شده بر علیه پروتئین پوششی RHBV به اثبات رسیده بود (Heydarnejad and Izadpanah 1992). علت تشکیل خط رسوب در نزدیکی حفره آنتی‌سرم، پائین بودن وزن مولکولی پروتئین غیر ساختمانی است. نکته قابل توجه، عدم ارتباط سرولوژیکی IWSV با EHBV است. سه ویروس IWSV، RHBV و EHBV از نقطه نظر ترادف قسمت‌های مختلف ژنوم دارای شباهت‌های بسیار نزدیکی هستند (Heydarnejad *et al.* 2006). از این گذشته، RHBV با IWSV و EHBV ارتباط سرولوژیکی دارد (Heydarnejad and Izadpanah, 1992; Falk *et al.* 1987). علاوه بر عدم ارتباط سرولوژیکی بین IWSV و EHBV، میزبان اصلی EHBV در طبیعت، علف هرز دژگال (*Echinochloa* sp.) است (Falk *et al.* 1987; Morales and Niessen 1985; Gingery 1988). تلاش برای انتقال IWSV از طریق ناقل اختصاصی آن به دژگال تاکنون نا موفق بوده است (حیدرنژاد، اطلاعات منتشر نشده).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (39-37) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir