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

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

مائده لطفی پور، سید علی اکبر بهجت نیا**، علیرضا افشاریفر و کرامت‌اله ایزدپناه[۱]

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

چکیده

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

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

---

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

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

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

عامل زردی در غلات عمدتاً ویروس‌های کوتولگی زرد جو و غلات تشخیص داده شده و مشخص گردیده است که BYDV-PAV از این گروه ویروس غالب در ایران است (Izadpanah *et al.* 2003). طحان در سال ۲۰۰۵ به کمک PCR وجود ویروس کوتولگی گندم (WDV)را در استان خراسان رضوی نشان داد. در ادامه مطالعات با استفاده از روش هیبریداسیون نقطه ای و آزمون PCR با آغازگر های اختصاصی WDV، وجود این ویروس در مزارع گندم و جو قطعی گردید (Behjatnia *et al.* 2011).

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

www.SID.ir

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

ویروس کوتولگی گندم دارای دو سویه گندم و جو می‌باشد (Köklü *et al*. 2007). با همسانه‌سازی و تعیین ترادف ژنوم کامل یک جدایه WDV در استان خراسان و با مقایسه ترادف این ویروس با ترادف‌های موجود در بانک ژن مشخص شد که این ویروس یک جدایه جو از WDV است و نام آن جدایه ایرانی سویه جو ویروس کوتولگی گندم Wheat dwarf virus-Barley [IRAN-Barley] با کوتاهه WDV-Bar[IR:Bar] انتخاب شد. آنالیزهای فیلوژنتیک انجام شده نشان داد که WDV-Bar[IR:Bar] بیشترین شباهت (به میزان ۹۷/۱ درصد) را با سویه جو ویروس کوتولگی گندم (WDV-B) از آلمان دارد در حالی که با سویه گندم ویروس کوتولگی گندم (WDV-W) حداکثر دارای ۸۶/۳ درصد شباهت است. تفاوت دیگر سویه‌های گندم و جو WDV مربوط به وجود و یا حذف یک قطعه ۱۲ نوکلئوتیدی در نزدیکی موقعیت نوکلئوتید۱۴۰۰ ژنوم ویروس واقع در انتهای آمینی پروتئین همراه با همانندسازی (Rep) می‌باشد (Behjatnia *et al*. 2011). اگرچه *بهجت‌نیا و همکاران* تا حدودی مناطق انتشار WDV را در استان‌های مختلف ایران گزارش نمودند ولی در مورد پراکنش سویه‌های گندم و جو این ویروس در ایران تا کنون پژوهش جامعی صورت نگرفته است. در تحقیق حاضر ضمن بررسی مناطق گسترش WDV، از اختلاف وجود و یا عدم وجود یک قطعه ۱۲ نوکلئوتیدی به ترتیب در ژنوم سویه‌های گندم و جو WDV استفاده شد و با طراحی آغازگرهای اختصاصی در سطح گونه و سویه و استفاده از آنها در آزمون PCR به بررسی پراکنش سویه‌های گندم و جو WDV در مزارع آلوده مناطق مختلف کشور پرداخته شد. هم‌چنین چون تاکنون هیچ اطلاعی در مورد ناقل WDV در ایران در دسترس نبود، در این تحقیق نسبت به شناسایی ناقل WDV نیز اقدام شد.

روش بررسی

منبع ویروس

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

تشخیص WDV

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

استخراج دی ان ای از گیاه، تکثیر و تعیین ترادف قطعاتی از ژنوم WDV

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

Archive of SID

www.SID.ir

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

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

آزمون PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل قالب دی ان ای استخراج شده از بافت برگ، آغازگرها (هر کدام به غلظت یک میکرومولار)، ۲۰۰ میکرومولار از هر یک از چهار دِاُکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات و ۰/۵ واحد آنزیم *Taq* دی ان اِ پلی مراز در بافر مخصوص آنزیم انجام شد. PCR پس از یک مرحله ۴ دقیقه‌ای واسرشتن اولیه در دمای ۹۴°C، شامل یک برنامه ۳۵ چرخه‌ای از مراحل واسرشتن، اتصال و سنتز به ترتیب در دمای ۹۴°C، ۵۵°C یا ۵۸°C بسته به مورد و ۷۲°C هر کدام به مدت یک دقیقه بود. پس از آخرین چرخه، مخلوط PCR به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲°C نگه‌داری شد. قطعات تکثیر شده با الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. باند DNA مورد نظر از ژل بریده شد و DNA با استفاده از کیت Qiaquick gel extraction kit (QIAGEN, Germany) از ژل استخراج و جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت Tech Dragon کشور هنگ‌کنگ ارسال شد.

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

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

منبع حشره ناقل WDV و شرایط تکثیر در گلخانه

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

زنجرک‌های جمع‌آوری شده به گلخانه و اتاقک

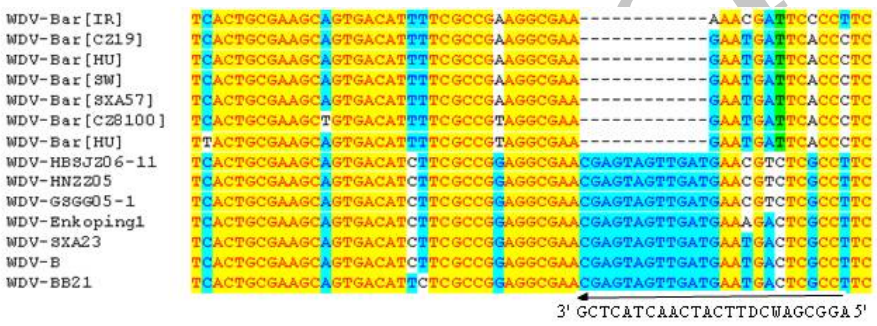
www.SID.ir

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

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

Primers آغازگر	Nucleotide position[a] موقعیت	Annealing Temperature (ºC) دمای اتصال	Sequence (5' to 3') ترادف (۵′ – ۳′)
WDVIR1887[V]	1887- 1907	55	CTTACGGAGTAGAGATGTTC
WDVIR328[C]	308-328	55	AACAGAGTGTAAGCAAGCCA
WDVChina1130[V]	1130-1155	58	CTACGGCGTTTGATGTTGATAGTG
WDVChina1430[C]	1405-1430	58	AGGCGAGWCDTTCATCAACTACTCG

[a] Nucleotide position of WDV-IR and WDV-China primers as in the GenBank database under accession number FJ620684 and EF536881, respectively
[V] virion-sense strand primer
[C] complementary-sense strand primer



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

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

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

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

www.SID.ir

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

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

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

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

روش انتقال

بعد از تکثیر کلنی زنجرک‌ها از یک زنجرک بارور، تعداد ۱۰۰-۵۰ عدد زنجرک توسط اسپیراتور به گیاهانی که آلودگی آنها به WDV از طریق آزمون PCR و یا الیزا به اثبات شده بود منتقل شدند. برای افزایش راندمان انتقال، تیلرها و پنجه‌های گیاهان گندم و جو از ساقه اصلی جدا شدند تا ساقه اصلی که توسط آزمایش‌های مولکولی آلودگی آن به ویروس اثبات شده بود مستقیماً مورد تغذیه زنجرک‌ها قرار گیرد. بعد از ۷۲ ساعت تغذیه، زنجرک‌ها، به گیاهچه‌های سالم گندم و جو در مرحله ۲ برگی انتقال داده شدند و به آنها اجازه داده شد تا به مدت ۵ روز از این گیاهان تغذیه نمایند. سپس زنجرک‌ها از روی گیاهان برداشته و گیاهان با سم کنفیدور سم‌پاشی شدند. بعد از

www.SID.ir

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

استخراج دی ان ای ویروس از بدن حشره با استفاده از محلول CTAB

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

نتایج و بحث

خصوصیات فنوتیپی گیاهان آلوده به بیماری زردی و کوتولگی

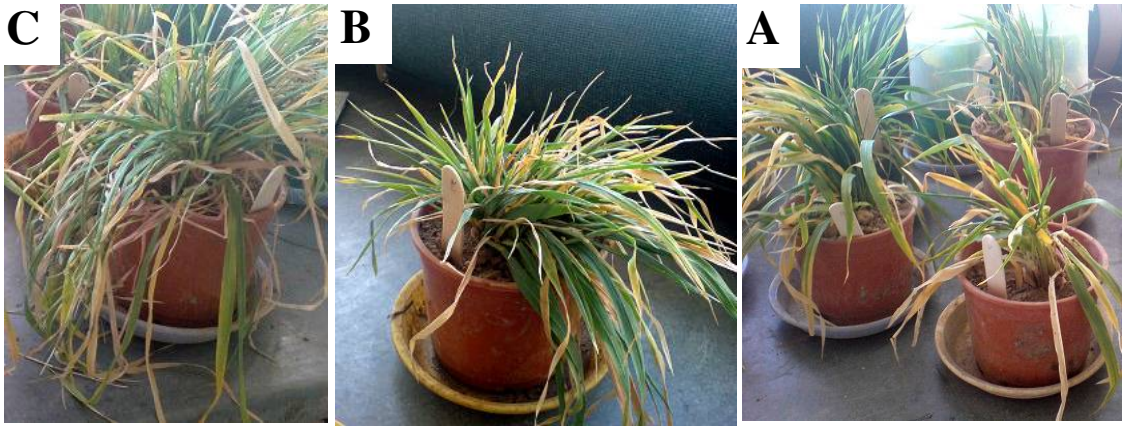
از علائم بارز گیاهان آلوده به ویروس کوتولگی گندم، زردی و کوتولگی است. در سال های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ از مزارع گندم و جو مناطق و شهرستان‌های مختلف استان‌های فارس شامل باجگاه، مرودشت، سعادت شهر، زرقان، بوانات، سیوند، سده، دشتک و اقلید و چهارمحال و بختیاری شامل شهرکرد، گزک، قره و بلداجی بازدید به عمل آمد و تعدادی گیاه با علائم زردی و کوتولگی (شکل 2A) به گلدان منتقل و برای انجام آزمایش‌های سرولوژیکی و مولکولی بعدی در گلخانه نگه‌داری شدند. اگرچه علائم اصلی مشاهده شده در مزارعی که در پائیز کشت شده بودند کوتولگی شدید و بی نظمی در تشکیل انشعابات فرعی بود (شکل C 2 و 2B)، اما در بعضی از نمونه‌های آلوده گندم و جو که در بهار کشت شده بودند تنها علائم زردی و موزائیک بدون کوتولگی دیده شد. در این گیاهان ابتدا تغییر رنگ به صورت سبزردی در برگ‌ها، سپس نوارهای زرد در پهنک برگ و در نهایت نکروز دیده شد. برگ ها به تدریج از نوک و حاشیه شروع به زرد شدن می‌کردند. حالت نکروز در برگ‌های مسن، کل برگ را فرا گرفته و برگ خشک می‌شد. در نمونه‌های گندم شهرکرد علائم کاهش رشد به صورت کوتولگی همراه با افزایش پنجه‌زنی و کوتاه ماندن پنجه‌ها (حالت چمنی شدن) و نواری شدن برگ‌ها مشاهده شد. هم‌چنین در بعضی از نمونه‌های غلات خودرو که در پائیز جمع‌آوری شده بودند و بعدا" آلودگی آنها به ویروس کوتولگی گندم محرز شد تنها علائم کوتولگی بدون زردی و موزائیک دیده شد.

شناسایی و تفکیک سویه‌های WDV در بوته‌های گندم و جو مبتلا به زردی و کوتولگی در ایران

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

Archive of SID

www.SID.ir



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

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

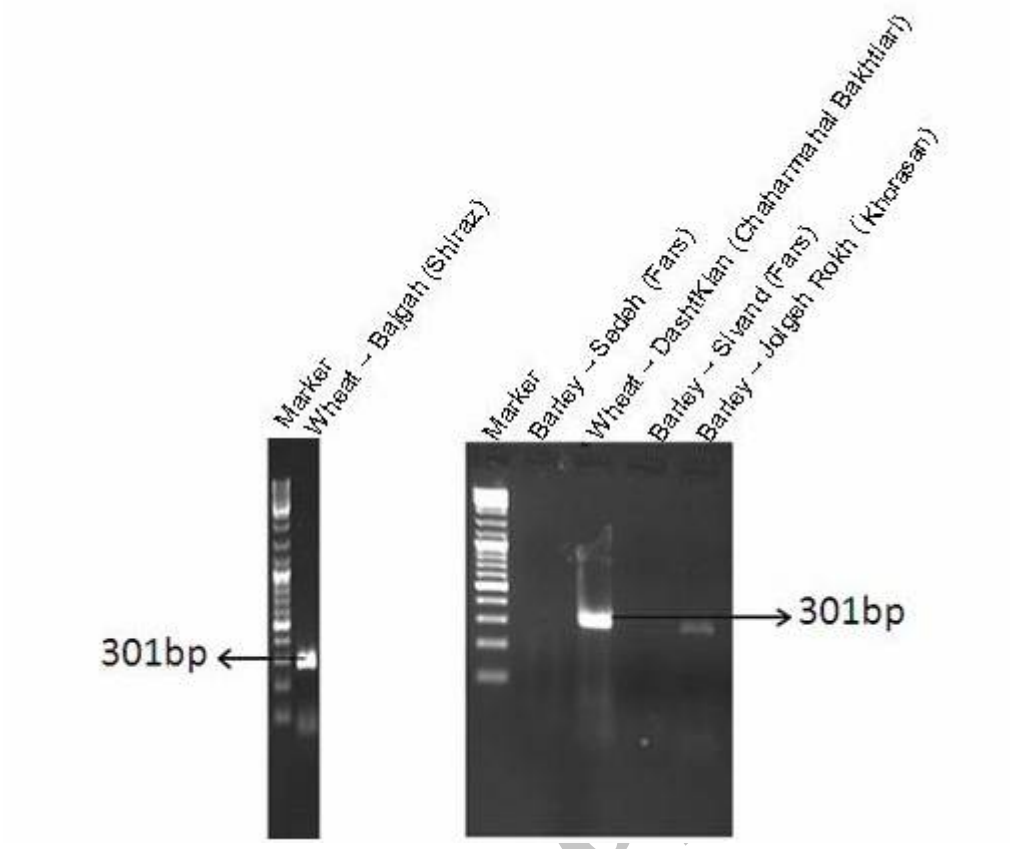
استان یزد با ٪۲۴/۴ آلودگی (۱۱ نمونه مثبت از ۴۵ نمونه مورد آزمایش) کمترین میزان آلودگی را در بین ۳ استان بررسی شده نشان دادند. درصد آلودگی نمونه‌های استان چهارمحال و بختیاری ٪ ۷۱/۲ (۴۷ نمونه مثبت از ۶۶ نمونه مورد آزمایش) تعیین شد.

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

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

این بررسی نشان داد که WDV دارای پراکندگی وسیعی در مزارع گندم و جو در استان‌های مختلف ایران است و کمتر مزرعه‌ای می‌توان پیدا نمود که به بیماری

www.SID.ir



شکل ۳. نقوش الکتروفورزی محصول PCR تکثیر شده با جفت آغازگر اختصاصی $p1430^{C}/p1130^{V}$. در بالای هر راهک بـه ترتیـب نـوع میزبان و منطقه نمونه‌برداری شده نشان داده شده است. (نشانگر:DNA ladder mix, Fermentas).

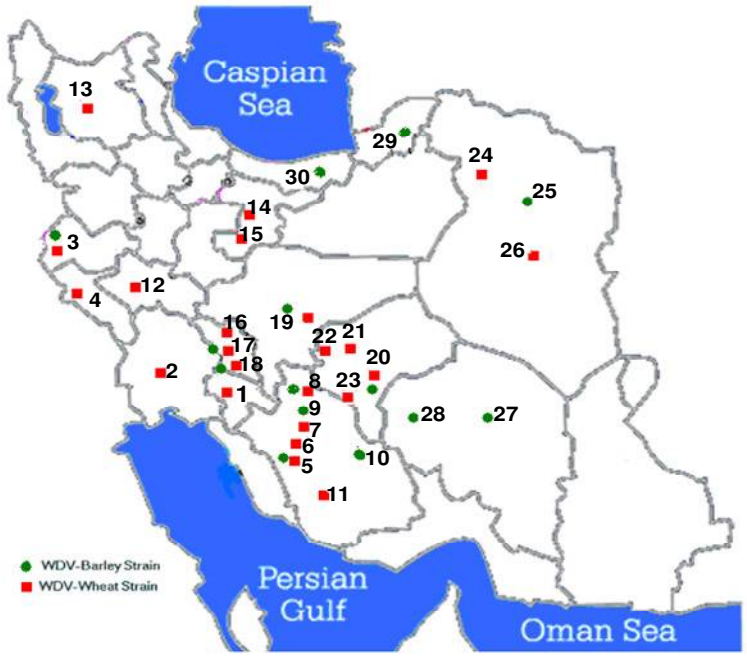
Fig. 3. Electrophoresis pattern of PCR products amplified from WDV-infected plants from different regions as indicated at the top of each lane. M= DNA ladder mix (Fermntas).

زردی و کوتولگی آلوده باشد و حاوی این ویروس نباشـد. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که WDV همـراه بـا BYDVs و CYDVs از عوامل اصلی ایجاد کننده بیماری های زردی و کوتولگی در مزارع غلات ایـران مـی‌باشـد. ایـن‌کـه کـدام ویروس در هر منطقه غالب اسـت نیـاز بـه بررسـی بیـشتر همراه با آنالیزهای آماری دارد.

این بررسی هم‌چنین نشان داد که از تمـام نمونـه‌هـای گندم که به طور طبیعی به WDV آلـوده بودنـد تنهـا سـویه گندم این ویروس جدا شد. به عبارت دیگـر WDV-B بـه طور طبیعی قادر بـه آلـوده کـردن گنـدم نبـوده اسـت. امـا نمونه‌های جـو عـلاوه بـر WDV-B بـه طـور طبیعـی بـه WDV-W نیز آلوده بودند. گزارش‌های دیگری نیـز وجـود دارد که نشان می‌دهد که این سویه‌ها از لحاظ دامنه میزبانی در خانواده Poaceae با یکدیگر هم پوشانی دارنـد. عـلاوه بر جو، غلاتی چون triticale و علـف‌هـای هـرزی چـون *Avena fatua* و *Apera spica-venti* به عنوان میزبـان‌هـای هر دو سویه گزارش شـده‌انـد (Mehner *et al*. 2003). در جمهوری چک علف هرز *Apera spica-venti* نقش مهمی را در اپیدمیولوژی ویروس کوتولگی گندم ایفا کرده اسـت (Vacke and Cibulka 1999). آلودگی طبیعی جو، یولاف،

www.SID.ir

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



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

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

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

یک مورد که اخیراً گزارش شده تا کنون هیچ انتقال طبیعی از WDV-B به گندم و یا گونه‌های دیگر جنس *Triticum* صورت نگرفته است (Tobias *et al*. 2011)، اگرچه گزارش‌هایی در زمینه آلوده شدن گندم توسط WDV-B تحت شرایط آزمایشگاهی وجود دارد(Schubert *et al*. 2007). در این مطالعه مشخص شد از مجموع نمونه‌های جو آلوده به WDV حدود ۷۸٪ آلوده به WDV-B و ۲۲٪ آلوده به WDV-W می‌باشد که حاکی از ترجیح میزبانی سویه

www.SID.ir

WDV-B به گیاه جو است. لذا می توان به منظور کنترل در مناطقی که سویه گندم ویروس غالب است توصیه به

جدول ۳. نوع و تعداد گیاهان مورد بررسی و آلوده به WDV از استان‌ها ی مختلف ایران و اختصاصاً به سویه‌های گندم و جو WDV براساس نتیجه آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در تکثیر باندهای ۱۱۷۵ (از هر دو سویه) و ۳۰۱ جفت بازی (تنها از سویه گندم)

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

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

بررسی تنوع مولکولی جدایه‌های گندم و جو سویه گندمWDV

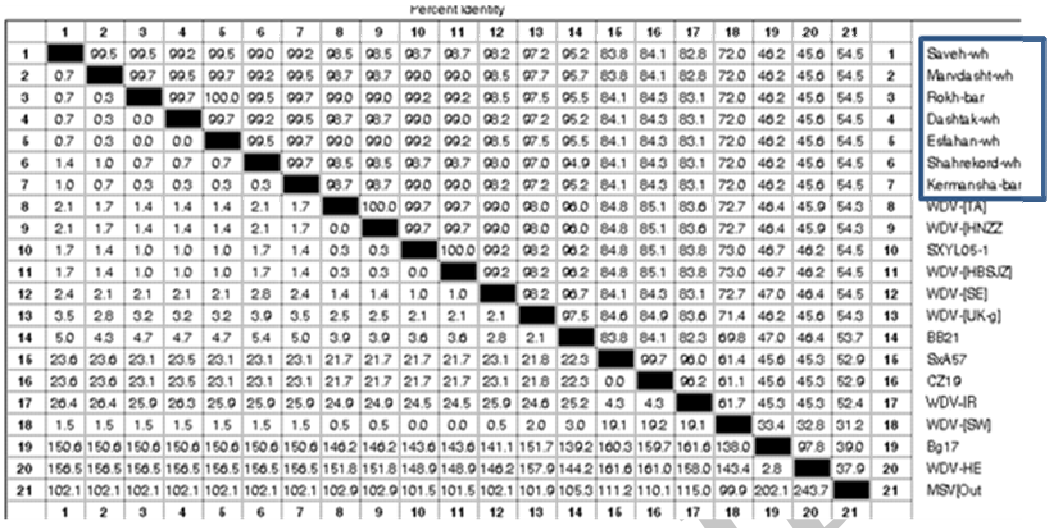
به منظور بررسی تنوع مولکولی جدایه‌های گندم و جو سویه گندم WDV، ترادف نوکلئوتیدی بخش اعظم قطعه ۳۰۱ جفت بازی (شامل ناحیه بین ژنی کوچک و قسمت انتهای امینی ژن Rep) از نمونه‌های گندم و جو استان‌های فارس، کرمانشاه، خراسان، تهران، اصفهان و چهار محال و بختیاری که در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی WDVChina1130^{V} و WDVChina1430^{C} تکثیر شده بود تعیین شد. چون از محصول PCR برای تعیین ترادف استفاده شد و تعدادی از نوکلئوتیدهای اولیه قطعه در تعیین ترادف خوانده نشدند، اندازه دقیق قطعه تعیین ترادف شده برای همه جدایه‌ها ۲۹۰ جفت باز در نظر گرفته شد. مقایسه ترادف نوکلئوتیدی این ناحیه در بین جدایه‌های ایرانی و با جدایه‌های گندم و جو WDV-W در بانک ژن (جدول ۲) نشان داد جدایه‌های ایرانی WDV-W با یکدیگر در سطح نوکلئوتیدی ۱۰۰-۹۹ ٪ و با جدایه‌های WDV-W موجود در بانک ژن ۹۹/۷-۹۴/۹ ٪ شباهت دارند (شکل ۵). بنابراین با وجود متنوع بودن ناحیه بین ژنی در اعضای جنس ماسترویروس، تنوع قابل توجهی در این ناحیه از ژنوم در مورد جدایه‌های سویه گندم ویروس کوتولگی گندم مشاهده نشد. در حالی که میزان شباهت ترادف نوکلئوتیدی این ناحیه از ژنوم جدایه‌ها ی WDV-W با ناحیه مشابه ژنوم یک جدایه ایرانی WDV-B که از یک مزرعه جو در منطقه جلگه رخ استان خراسان رضوی جدا شده (Behjatnia *et al.* 2011) و با رس شمار (WDV- Bar[IR]) FJ620684 در بانک ژن ثبت شده است ۸۳/۱-۸۲/۸ ٪ می‌باشد (شکل ۵) که نشانه اختلاف زیاد در ناحیه متغیر بین ژنی کوچک در بین سویه‌های گندم و جو WDV است. تعیین جایگاه تاکسونومیکی جدایه‌های گندم و جو سویه گندم ویروس کوتولگی گندم از ایران و مقایسه آن با جدایه ایرانی سویه جو ویروس کوتولگی گندم (WDV- Bar[IR]) نیازمند تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل چندین جدایه گندم و جو از مناطق مختلف ایران است.

انتقال WDV با زنجرک *Psammotettix alienus*

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

www.SID.ir

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



شکل ۵ . جدول درصد تشابه (محور افقی) و درصد واگرایی (محور عمودی) نوکلئوتید ی یک قطعه۲۹۰ جفت بازی حاوی قسمت انتهایی ناحیه بین ژنی کوچک و بخشی از ژن Rep جدایه‌های مورد استفاده WDV در ا ین مطالعه (۷ جدایه گندم و جو سو یه گندم WDV از ۶ استان کشور در کادر مشخص شده‌اند). مشخصات جدا یه‌ها در جدول ۲ قید شده است.

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

جو در مرحله یک برگی انتقال داده شدند. در این مرحله از ۱۱ گلدان که هر کدام حاوی ۳ الی ۴ گیاهچه گندم یا جو بودند استفاده شد. پس از گذشت یک هفته زنجرک‌ها از روی گیاهچه‌های یک برگی گندم و جو برداشته و هر کلنی به صورت مجزا در یک گلدان دیگر نگه‌داری شد تا در صورت اطمینان از انتقال ویروس برای شناسایی گونه زنجرک اقدام شود. وجود ویروس در گیاهان مایه زنی شده با زنجرک‌ها بعد از گذشت ۳ الی ۴ هفته از زمان مایه زنی به محض ظهور علائم بیماری کوتولگی یا زردی (شکل ۶) با آزمون های الیزا و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی WDV ردیابی شد. نتایج نشان داد که از ۱۱ گلدان، گیاهان موجود در ۷ گلدان علائم کوتولگی، زردی و موزائیک را نشان دادند (شکل ۶) که از این هفت گلدان هر ۳ یا ۴ بوته گندم یا جو موجود در آنها آلوده بودند. آزمون الیزا نیز آلودگی گیاهان ۷ گلدان را تأیید کرد. منتهی در آزمون PCR فقط از گیاهان موجود در ۵ گلدان (از ۷ گلدان) باند مورد نظر تکثیر شد. انتقال WDV از طریق تعیین ترادف قطعه‌ای از ژنوم ویروس در نمونه‌های گیاهی آلوده به ویروس که با زنجرک‌ها مایه زنی شده بودند نیز تأیید شد. وجود ویروس در بدن حشره‌های ناقل با تکثیر یک قطعه ۱۱۷۵ جفت بازی از ژنوم ویروس با جفت آغازگر $p1887^{v}$ / $p328^{c}$ (جدول ۱) در آزمون PCR ، ردیابی گردید (شکل ۷). کلنی هایی که ویروس را منتقل کردند برای تشخیص گونه مورد بررسی قرار گرفتند.

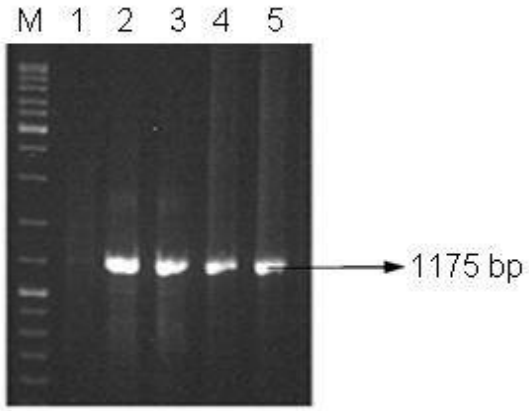
شناسایی گونه در حشرات این جنس تنها بر مبنای شکل اندام تناسلی جنس نر می‌باشد. بدین ترتیب که aedeagus در حشره نر در گونه *P. alienus* دارای

Archive of SID
www.SID.ir

فرورفتگی است در حالی کـه در گونـه *P. striatus* کـاملا گرد و بدون فرورفتگی اسـت (Greene 1971). بـه منظـور

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

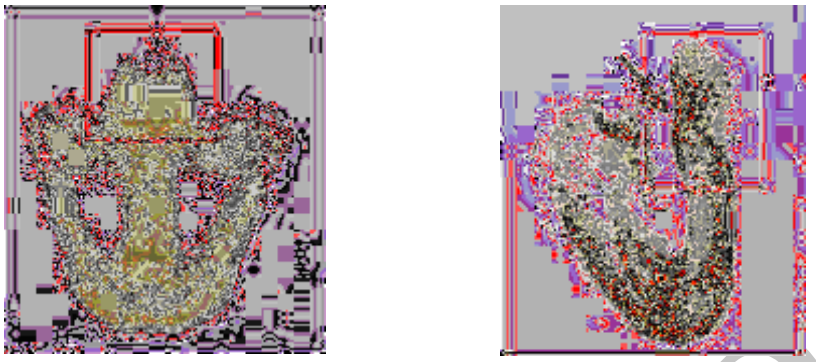
Fig. 6. Severe stunting and, yellowing symptoms in barley plants 45 days post-inoculation with viruliferous (WDV-B) *Psammotettix alienus* leafhoppers.



شکل ۷ . نقوش الکتروفورزی محصول PCR (قطعه ۱۱۷۵ جفت بازی) تکثیر شده از بدن ۵ حشره ناقل به طـور جداگانـه بـا اسـتفاده از جفت آغازگر $p1887^{v}$ / $p328^{c}$ ویروس کوتولگی گندم (جدول ۱) و دی ان ای استخراج شده از بدن هر حشره ناقـل بـه‌عنـوان الگو (راهک های ۵-۱).

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

www.SID.ir



B A

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

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

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

از آنجایی که اکثر نمونه‌های گندم و جو مورد بررسی در این مطالعه با علائم زردی و کوتولگی به ویروس کوتولگی گندم آلوده بودند لذا می‌بایست نمونه‌های بیشتر با علائم ذکر شده بررسی شود و آنالیزهای آماری در مورد وقوع ویروس‌های کوتولگی گندم و کوتولگی زرد جو انجام شود و مشخص گردد که در هر منطقه کدام ویروس غالب است. در بعضی از نمونه‌های آلوده به WDV آلودگی مخلوط به خصوص آلودگی دو ویروس WDV و BYDV دیده شد. با یافتن ناقل ویروس کوتولگی گندم می‌توان بر هم کنش این دو ویروس را در گلخانه بررسی کرد. با ساخت همسانه عفونت‌زای ویروس کوتولگی گندم می‌توان رقم های مختلف گندم و جو را از لحاظ عملکرد دانه، بیوماس اندام هوائی، وزن دانه‌ها و دیگر فاکتورهای مهم در عملکرد دانه بررسی کرد. علاوه بر این از طریق همسانه عفونت زا می‌توان فهمید که چه ژن هایی می توانند اختصاصیت میزبان را توسط دو استرین تعیین کنند. تعیین راندمان انتقال ویروس توسط زنجرک‌های پوره و بالغ و مطالعات در زمینه روشن شدن اپیدمیولوژی ویروس کوتولگی گندم نیز می‌بایست انجام شود.

منابع

Archive of SID

www.SID.ir

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

Archive of SID

www.SID.ir

Iran. J. Plant Path., Vol. 49, No. 1, 2013: 7-9

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

M. Lotfipour, S.A.A. Behjatnia, A. Afsharifar and K. Izadpanah[1]**

(Received : 07.04.2012; Accepted : 18.07.2012)

Abstract

Barley yellow dwarf viruses (BYDVs), Cereal yellow dwarf virus (CYDV) and Wheat dwarf virus (WDV) are the causes of dwarfing and yellowing in small grain cereal crops in Iran. WDV consists of at least two strains each adapted to wheat (WDV-W) or barley (WDV-B). In this research, the distribution and genetic variation of WDV-B and WDV-W isolates in Iran were investigated. Infected barley and wheat plants showing dwarfing and yellowing symptoms were collected from cereal fields of Chahar Mahal and Bakhtiari, Fars, and Yazd provinces during 2009-2010 and from other provinces in 2004-226 growing seasons. These samples were subjected to DNA extraction, PCR, and sequencing, using specific WDV primers at species and strain levels. Results showed that WDV was detected in 155 of 270 samples. WDV-W and WDV-B accounted for 55% and 45% of WDV positive samples, respectively. While WDV-B was only isolated from naturally infected barley plants, isolates of WDV-W was isolated from both wheat and barley. The results of this study indicated that in addition to BYDVs, WDV is a major component of yellows complex in cereal fields in Iran. WDV was transmitted from wheat and barley infected plants to healthy plants using leafhoppers collected from cereal fields and reared on plants in the greenhouse. Morphological characteristics especially those of male genitalia indicated that *Psammotettix alienus* is the WDV vector in Iran.

Keywords: Barley,Geminivirus, *Mastrevirus*, *Psammotettix alienus*, Wheat, Wheat dwarf virus.

See Persian text for figures and tables (Pages ۱۷-۳۱).

*: A Part of MSc. Thesis of the First Author Submitted to the College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

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

1. MSc. Student, Assoc. Prof.s and Prof. of Plant Virol. Res. Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir

References

BEHJATNIA, S. A. A., AFSHARIFAR, A., TAHAN, V., AMID MOTLAGH, M., EINI GANDOMANI, M., NIAZI, A. and IZADPANAH, K. 2011. Widespread occurrence and molecular characterization of *wheat dwarf virus* in Iran. **Aust. Plant Pathol.** 40: 12-19.

BRIDDON, R. W., PINNER, M. S., STANLEY, J. and MARKHAM, P. G. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **J. Virol.** 177: 85-94.

BOOM, R., SOL, C. J. A., SALIMANS, M. M. M., JANSEN, C. L., WERTHEIMUAN DILLEN, P. M. E. and VAN DER NOORDAA, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.** 28**:** 495-503.

CONVERSE, R. H. and MARTIN, R. P. 1990. ELISA methods for plant viruses. Pp.179-196, *In*: R. Hampton, E. Ball and S. De Boer(Eds.), **Erological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, A Laboratory Manual**, APS Press.,USA.

EKZAYEZ, M. A. and KUMARI, S. G. 2011. First report of *wheat dwarf virus* and its vector (*Psammotettix provincialis*) affecting wheat and barley crops in Syria. **ICARDA** 95: 76.

GABRIELE, D., URCUQUI-INCHIMA, S., MILNER, M. and ROSAURA, G. 1999. The strategies of plant virus gene expression: Models of economy. **Plant Sci.** 148**:** 77-88.

Greene, J. F. 1971. A revision of the nearctic species of the genus *Psammotettix* (Homoptera: Cicadellidae). **Smithson. Contrib. Zool.** 74**:**1-41

IZADPANAH, K., AFSHARIFAR, A. and MASUMI, M. 2003. **Viral Disease of wheat in Iran**. The second workshop of wheat. 13-14 May 2003**.** Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. 115 pp.

KÖKLÜ, G., RAMSELL, J. N. and KVARNHEDEN **A**. 2007. The complete genome sequence for a Turkish isolate of wheat dwarf virus from barley confirms the presence of two distinct WDV strains. **Virus Genes** 34: 359-366.

LEMMETTY, A. and HUUSELA-VEISTOLA, E. 2005. First report of wheat dwarf virus in winter wheat in Finland. **Plant Dis.** 89: 912-918.

MACKENZIE, D. J., MCLEAN, M. A., MUKERJI, S. and GREEN, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription polymerase chain reaction. **Plant Dis.** 81: 222-226.

NAHID, N., AMIN, I., MANSOOR, S., RYBICKI, E. P. and BRIDDON, R. W. 2008. Two dicot-infecting Mastreviruses occur in Pakistan. **Arch. Virol.** 153: 1441-1451.

MAXINER, M., RUEL, M, DAIR, X. and BOUDON- PADIEU, E. 1995. Diversity of grape vine yellows in Germany. **Vitis** 34: 235-236.

MEHNER, S., MANURUNG, B., GRUNTZIG, M., HABEKUSS, A., WITSACK, W. and FUCHS, E. 2003. Investigation into the ecology of the Wheat dwarf virus in Saxony-Anhalt, Germany. **J. Plant Dis. Protec.** 110**:** 313-323.

Nielson, M. W. 1968. The leafhopper vectors of phytopathogenic viruses (Homoptera, Cicadellidae). Taxonomy, biology and virus transmission. **US Dept. Agric. Technol. Bull.** 1382-1386.

SCHUBERT, J., HABEKUB, A., KAZMAIER, K. and JESKE, H. 2007. Surveying cereal-infecting geminivirus in Germany-Diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. **Virus Res.** 127**:** 61-70.

TAHAN, V. 2005. **Genetic diversity of Barley yellow dwarf virus in northern provinces of Iran**. MSc. Thesis , Submitted to Shiraz University, Shiraz, Iran, 129 pp.

TOBIAS, I., SHEVCHENKO, O., KISS, B., BYSOV, A. and PALKOVICS, L. 2011. Comparison of the nucleotide sequences of wheat dwarf virus isolates from Hungary and Ukraine. **Pol. J. Microbiol.** 60: 125-131.

VACKE, J. and CIBULKA, R. 1999. Silky bent grass (*Apera spica-venti* (L.) Beauv)- a new host and reservoir of wheat dwarf virus. **Plant Protec. Sci.** 35: 47-50.

Archive of SID

www.SID.ir

WANG, X., WU, B. and GUANGHE, Z. 2007. Occurrence and epidemics of *Psammoettix striatus* of *wheat dwarf virus* in China. Plant viruses: Exploiting Agricultural and Natural Ecosystems. **11th International Plant Virus Epidemiology Symposium and 3rd Workshop of the Plant Virus Ecology Network.** Poster # Ep3.

ZILINISKY, F. J. 1983. Common diseases of small grain cereals, a guide to identification. **CIMMYT, Mexico.** 141 pp.

Archive of SID

www.SID.ir