مجله دانش گياهپزشكي ايران
دوره ۴۰، شماره ۱، ۱۳۸۸ (۵۳-۴۳)

شناسايي پوتي ويروس غالب در مزارع ذرت استان تهران و بررسي پاره‌اي از خصوصيات آن

محمدرضا محمدي[1]*، مينا كوهي حبيبي[2] و غلامحسين مصاحبي محمدي[3]
۱، مربي، دانشكده كشاورزي، دانشگاه آزاد اسلامي واحد ورامين
۲، ۳، استاديار و دانشيار، پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران
(تاريخ دريافت: ۸۴/۱۱/۲۹- تاريخ تصويب: ۸۷/۳/۸)

چكيده

طي فصل زراعي سال ۱۳۸۲ تعداد ۲۳۱ نمونه برگي از ذرت‌هاي آلوده به ويروس و داراي علايم موزائيك و در مواردي علايم موزائيك همراه با كوتولگي، از مزارع ذرت مناطق مختلف استان تهران جمع‌آوري گرديد. با استفاده از آنتي‌سرم‌هاي پلي‌كلونال چهار پوتي‌ويروس **MDMV**، **SCMV**، **SrMV** و **JGMV** بر روي نمونه‌ها آزمون‌هاي سرولوژيكي **DAS-ELISA**، **DIBA** و **TPIA** انجام گرديد. در پايان، تمامي نمونه‌ها با آنتي‌سرم ويروس موزائيك نيشكر(**SCMV**) واكنش قوي بروز دادند و واكنشي با آنتي‌سرم سه پوتي ويروس ديگر مشاهده نگرديد. نمونه‌ها در بافر فسفات پتاسيم ۰/۱ مولار (**pH** ۷) حاوي ۲ درصد پلي‌وينيل پايروليدون (**PVP**) عصاره‌گيري و جدايه‌ها در گلخانه بر روي ذرت شيرين رقم ۴۰۳ پارس و سورگوم دانه‌اي رقم كيميا مايه‌زني و تكثير گرديدند. در آزمون‌هاي سرولوژيكي مجدد بر روي گياهان مايه‌زني شده نيز تنها حضور**SCMV** در آنها محرز گرديد. در مطالعه دامنه ميزباني، جدايه‌هاي منتخب**SCMV** به روي ***Avena sativa***، ***Panicum miliaceum***، ***Pennisetum americanum***، ***Triticum aestivum***، ***Hordeum vulgare*** و ***Setaria italica*** منتقل نشدند. خالص‌سازي ويروس به روش **Minipurification** بر روي ۲ گرم از بافت گياهي آلوده انجام و غلظت ويروس خالص و نسبت **A260/280** براي آن به ترتيب **mg/ml** ۱۱/۴۵ و ۱/۲ محاسبه شد. در بررسي الكترون ميكروسكوپي به روش تلفيق سرولوژي و الكترون ميكروسكوپي (**ISEM**) و دكوراسيون با آنتي‌سرم **SCMV**، پيكره‌هاي رشته‌اي قابل‌انعطاف **SCMV** در نمونه‌ها مشاهده و عكس‌برداري انجام شد. با انجام آزمون‌هاي **SDS-PAGE** و **Western blotting** بر روي نمونه‌هاي گياهي آلوده و سوسپانسيون‌هاي ويروس خالص، وزن مولكولي پروتئين پوششي **SCMV** در حدود **KDa** ۳۸-۳۷ بود. آزمون **RT-PCR** با استفاده از جفت پرايمر **SCMVF3** و **SCMV R3** انجام گرفت و قطعات تكثير يافته در حدود **bp** ۹۰۰ بودند كه تاييدي مضاعف بر حضور ويروس**SCMV** در نمونه‌ها بدست آمد. بر اساس تحقيق حاضر ويروس موزائيك نيشكر پوتي‌ويروس شايع و غالب و عامل اصلي موزائيك و موزائيك كوتولگي در مزارع ذرت استان تهران مي باشد.

واژه‌هاي كليدي: پوتي ويروس، ذرت، ويروس موزائيك نيشكر، الايزا، استان تهران.

* نويسنده مسئول: محمدرضا محمدي تلفن: ۰۲۹۱-۴۲۲۰۶۵۰ E-mail: m_rmohammadi@yahoo.com

مقدمه

گیاه ذرت با نام علمي *Zea mays* L. گیاهي تك لپه‌اي، يك پايه و يكساله از خانواده غلات يا گرامينه[1] مي‌باشد كه در كنار گندم و برنج سه محصول غله بسيار مهم جهان را تشكيل مي‌دهد و بعنوان يك محصول استراتژيك سطح زير كشت و توليد آن در جهان و در ايران رو به گسترش است (Mirhadi, 2001). افزايش توليد و سطح زيركشت ذرت در بسياري از نقاط جهان توأم با پيدايش بيماريهاي ويروسي جديد و يا طغيان بيماريهاي ويروسي كم اهميت در اين محصول بوده است و لذا امروزه در برنامه‌هاي توسعه كشت ذرت در جهان ويروس‌ها بيش از پيش اهميت پيدا كرده‌اند (Izadpanah, 1985). از ميان ويروس‌هاي بيماريزا در ذرت گونه‌هاي جنس *Potyvirus* از اهميت ويژه‌اي برخوردارند. بر اساس نتايج آخرين تحقيقات، چهار گونه ويروس از جنس *Potyvirus* روي ذرت بيماريزا هستند كه عبارتند از: ويروس موزائيك كوتولگي ذرت (*Maize Dwarf Mosaic Virus*: MDMV)، ويروس موزائيك نيشكر (*Sugarcane Mosaic Virus*: SCMV)، ويروس موزائيك سورگوم (*Sorghum Mosaic Virus*: SrMV) و ويروس موزائيك قياق (JGMV: *Johnsongrass Mosaic Virus*). اين پوتي ويروس‌ها كه به پوتي ويروس‌هاي غلات[2] مشهورند و بيماري موزائيك و خسارت محصول را در ذرت، سورگوم، نيشكر و ديگر گياهان خانواده غلات يا گرامينه سبب مي‌شوند، در يك زير گروه بنام زير گروه SCMV[3] از جنس *Potyvirus* جاي داده شده‌اند (Shukla *et al.*, 1989). از ميان اين چهار پوتي ويروس، SCMV و MDMV در سرتاسر دنيا شايع مي باشند در حاليكه JGMV از استراليا و ايالات متحده و SrMV از ايالات متحده و اخيرا از چين گزارش شده است (Shukla *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2002;). در سال‌هاي اخير گونه جديد و متفاوتي نيز با نام ZeMV (*Zea Mosaic Virus*) در اسراييل مطالعه و به اين زير گروه اضافه شده است (Seifers *et al.*, 2000).

در ايران نيز تا كنون ويروس‌هاي متعددي از روي ذرت گزارش شده‌اند كه رابدو ويروس موزائيك ايراني ذرت و فيجي ويروس كوتولگي زبر ذرت مهمترين آنها بوده، خسارت‌هاي آنها از برخي مناطق گزارش شده است (Afsharifar, 1991; Moini & Izadpanah, 2001). از آغاز دهه ۱۳۶۰ گزارش‌هايي نيز از مشاهده پيكره‌هاي رشته‌اي پوتي ويروسي در روي ذرت از مناطق مختلف ايران وجود داشت (Izadpanah, 1982; Izadpanah, 1985; Afsharifar, 1991; Izadpanah & Kamran, 1995; Masumi & Izadpanah, 1995) و اين ويروس رشته‌اي عمدتاً استريني از SCMV با نام SCMV-MS (Maize Shiraz) تشخيص داده شده بود كه در سال‌هاي اخير با توجه به برخي تفاوت‌ها با ديگر جدايه‌هايSCMV از نقاط ديگر دنيا از جمله به علت توانايي آن در آلوده سازي گياه قياق همچنين به دليل برخي تفاوتهاي سرولوژيكي و تفاوت در توالي ژنوم، ويروس شايع در ايران به عنوان گونه جديد با نام (IJMV) *Iranian Johnsongrass Mosaic Virus* معرفي شده است (Masumi & Izadpanah, 2001; Masumi *et al.*, 2001). برخي محققين نيز توانسته‌اند اقدام به شناسايي و جداسازي MDMV از ذرت در برخي مناطق ايران از جمله در مازندران و خوزستان نمايند (Moini & Izadpanah, 2001; Zare *et al.*, 2004a; Zare *et al.*, 2004b). مسلما آگاهي از وجود اين پوتي ويروس‌ها و شناسايي دقيق و قطعي آنها با تكنيك‌هاي جديد و نيز آگاهي از ميزان پراكنش و گستردگي آنها و خسارت‌ها و خطرات احتمالي آنها و همچنين معرفي روش‌هاي شناسايي سريع، كارآمد و موثر يك ضرورت مهم است تا در برنامه هاي اصلاح و توليد ارقام مقاوم و يا حتي پيش‌بيني هر گونه روش كنترل و پيشگيري ديگري در جهت مقابله با خطر احتمالي طغيان اين ويروس‌ها در آينده، كه با توجه به نوپا بودن كشت و زراعت ذرت (كه از دهه ۱۳٦۰ كشت و توليد آن رو به توسعه نهاده است) در ايران وقوع آن چندان دور از انتظار نيست، مورد استفاده قرار گيرد. تحقيق حاضر نيز با اين نوع نگرش و در جهت رسيدن به اين اهداف و با بررسي جامع در محدوده مزارع استان تهران بعنوان يكي از استان‌هاي پيشرو و مطرح در عرصه كشت و توليد ذرت انجام گرديده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداري

طي فصل زراعي سال۱۳۸۲ تعداد ۲۳۱ نمونه برگي از ذرت‌هاي مشكوك به آلودگي ويروسي و داراي علايم

1. Poaceae
2. Poaceous potyviruses
3. SCMV subgroup

موزائيك از مزارع مناطق مختلف غرب و جنوب استان تهران (مناطق زير كشت ذرت) در محدوده شهرستان‌هاي تهران، ورامين، كرج، ساوجبلاغ، مشگين‌دشت، محمدشهر، هشتگرد، شهريار و اسلامشهر جمع‌آوري شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمايشگاه در دماي ۴°C در يخچال نگهداري شدند و براي نگهداري طولاني مدت نمونه‌ها، مقداري از نمونه‌ها در دستگاه فريز درايِر[1] رطوبت‌گيري شده و در فريزر ۲۰°C- نگهداري شدند.

مايه‌زني و تكثير منابع ويروس در گلخانه

در اين مطالعه ذرت شيرين رقم ۴۰۳ پارس و سورگوم دانه‌اي رقم كيميا بعنوان ميزبان‌هاي تكثيري و نگهدارنده[2] مناسب انتخاب شدند. بذور ذرت شيرين و سورگوم در مخلوط خاك حاوي خاك رس معمولي، كود دامي و ماسه به نسبت ۳: ۲: ۱ و پس از استريل سازي با بخار آب در دستگاه اتوكلاو، كاشته شدند و پس از رشد در مرحله ۲ تا ۳ برگي مايه‌زني شدند. نمونه‌ها به نسبت ۱:۱۰ (W/V) در بافر فسفات پتاسيم ۰/۱ مولار (pH ۷) حاوي ۲ درصد (W/V) از ماده پلي وينيل پايروليدون[3](PVP) عصاره‌گيري شده و عصاره بافت‌هاي آلوده بر روي برگ‌هاي كاربوراندوم پاشي شده ذرت و سورگوم ماليده شد. مايه‌زني‌ها غالباً در هنگام عصر و غروب آفتاب و در شرايط دمايي خنك و به دور از نور مستقيم آفتاب انجام گرديد.

آزمون‌هاي سرولوژيكي

نمونه‌هاي مزرعه‌اي پس از انتقال به آزمايشگاه و نيز گياهان موجود در گلخانه دو هفته پس از مايه‌زني از نظر آلودگي به هر يك از چهار پوتي ويروس مورد مطالعه (SCMV،MDMV ،SrMV وJGMV) با انجام آزمون‌هاي سرولوژيكي DAS-ELISA، DIBA و TPIA مورد بررسي قرار گرفتند. براي انجام آزمون‌هاي سرولوژيكي از آنتي‌سرم‌هاي پلي كلونال چهار پوتي ويروس مورد مطالعه، اهدا شده توسط دكتر استفان وينتر از بخش ويروس‌شناسي گياهي مؤسسه DSMZ آلمان استفاده گرديد.

آزمون الايزا[4]

آزمون الايزا بر اساس دستورالعمل معمول Clark & Adams (1976) و با استفاده از آنتي‌سرم‌هاي پلي كلونال چهار پوتي ويروس مورد مطالعه و به صورت الايزاي مستقيم يا ساندويچ دوطرفه آنتي‌بادي[5] (DAS-ELISA) انجام و در آخرين مرحله الايزا و در فاصله ۱۵ تا ۶۰ دقيقه بعد از افزودن محلول سوبسترا به چاهك‌ها، مشاهده و تفسير نتيجه آزمون با مشاهده تغيير رنگ چاهك‌ها از روشن به زرد و مقايسه آنها با ميزان تغيير رنگ در چاهك‌هاي مربوط به شاهدها (چاهك‌هاي مثبت، منفي و بافر) و يا با اندازه‌گيري و ثبت ميزان عددي جذب نوري چاهك‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر (در دستگاه الايزا ريدر[6] مدل Statefax–2100 ساخت شركت Awareness Technology آمريكا) و مقايسه آنها با اعداد مربوط به چاهك‌هاي شاهد و با استفاده از رابطه $R \geq X+3sd$ (X:ميانگين جذب نمونه‌هاي سالم، sd: انحراف معيار، R: جذب نمونه مثبت)يا $\geq 2X$ انجام شد.

آزمون **TPIA** [7]

براي انجام اين آزمون از روش توصيفي Sambrook *et al.* (1989) و Dijkstra & deJager (1998) استفاده گرديد. براي انجام آزمون مقطعي از نمونه‌هاي آلوده تهيه شده و پس از تماس دادن با غشاء نيتروسلولز[8]، غشاء به مدت ۱ تا ۵ دقيقه در داخل محلول بلاكينگ (حاوي ۱ درصد پلي وينيل الكل) قرار داده و بعد به مدت ۵ دقيقه در ۱۰ ميلي‌ليتر بافر شستشو يا PBST شستشو شد. سپس كاغذ نيتروسلولز به مدت ۲ ساعت در ۵ ميلي‌ليتر بافر مزدوج كه آنتي‌بادي مزدوج يا آلكالين فسفاتازدار (IgG-AP) در آن رقيق شده بود در دماي اتاق و روي دستگاه شيكر با دور حركت ملايم قرار داده شد. پس از دوبار شستشوي غشاء در بافر PBST در نهايت محلول سوبستراي Fast red يا NBT/BCIP بر روي غشاء نيتروسلولز اضافه و به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقيقه در محيط تاريك قرار داده شد تا واكنش رنگ‌آميزي انجام گردد.

آزمون **DIBA** [9]

براي انجام اين آزمون نيز از روش توصيفي Sambrook *et al.* (1998) و Dijkstra & de Jager (1998) با اندكي تغييرات استفاده گرديد. ابتدا عصاره‌هاي نمونه‌هاي آلوده در بافر عصاره‌گيري تهيه و پس از تماس دادن عصاره‌ها با

1. Freeze-drier
2. Propagation & maintenance hosts
3. Polyvinyl pyrrolidon
4. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

5. Double Antibody Sandwich - ELISA
6. ELISA-reader
7. Tissue Print Immunobinding Assay
8. Nitrocellulose membrane
9. Dot Immunobinding Assay

غشاء نیتروسلولز، غشاء به مدت ۱ تا ۵ دقیقه درون محلول بلاکینگ قرار داده شد. غشاء پس از شستشو با PBST به درون ۵ تا۱۰ میلي‌لیتر بافر کانجوگیت که آنتي‌بادي آلکالین فسفاتاز دار (IgG-AP) در آن رقیق شده بود منتقل و به مدت ۲ ساعت در دماي اتاق و روي شیکر قرار داده شد. پس از آن به ترتیب ۲ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBST و بافر AP شستشو داده شد و نهایتاً براي مشاهده نتیجه آزمون، محلول سوبستراي Fast red یا NBT/BCIP به روي غشاء اضافه شد.

الکتروفورزعمودي ژل پلي اکریلامید[1] (**SDS-PAGE**)

این آزمون بر اساس دستورالعمل Sambrook *et al.* (1998) و با استفاده از ژل متمایز کننده ۱۵ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد انجام شد. عصاره نمونه‌ها در بافر عصاره‌گیري (بافر ۵۰ میلي‌مولار Tris-HCl، ۵ میلي‌مولار Boric acid، ۵ درصد گلیسرول و ۱/۵ درصد PVP) تهیه شده و سپس عصاره‌ها و آموده‌هاي ویروس خالص با حجم مساوي از بافر دو بارلملي (۰/۰۲ مولار Tris-HCl و ۲ میلي‌مولار EDTA حاوي ۲ درصد SDS، ۲۰ درصد گلیسین و ۰/۰۵ درصد برموفنل بلو) مخلوط و نمونه‌هاي آماده شده به همراه مارکر پروتئیني (مارکر استاندارد وزن مولکولي) به مدت ۵ دقیقه در آب در حال جوش حرارت داده و بلافاصله به روي یخ منتقل شدند. مقدار ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در چاهك‌هاي ژل ریخته و جریان الکتریسیته با ولتاژ ثابت ۱۰۰ به مدت ۳ تا ۴ ساعت برقرار شد. پس از آن ژل به مدت یك شب در محلول رنگ‌آمیزي کومازي بلو (۵۰ درصد متانول، ۱۰ درصد اسید استیك، ۰/۳۵ درصد کومازي بریلیانت بلو و۴۰ درصد آب مقطر) قرار داده شده سپس در محلول رنگبري (۲۵ درصد متانول، ۱۰ درصد استیك اسید و ٦۵ درصد آب مقطر) رنگ‌زدایي شد.

آزمون وسترن بلات[2] (**EBIA**)

این آزمون نیز به روش توصیفي Sambrook *et al.* (1998) و Dijkstra & de Jager (1998) انجام گردید. عصاره‌هاي گیاهي و یا آموده‌هاي ویروس خالص ابتدا بر روي ژل SDS-PAGE دو طرفه الکتروفورز شده سپس یکي از ژل‌ها رنگ‌آمیزي و رنگبري شد تا از تفکیك مطلوب باندهاي پروتئیني در هر دو ژل اطمینان حاصل شود. ژل دوم بعد از قرار دادن غشاء نیتروسلولزي بر روي آن به تانك وسترن حاوي بافر انتقال یا بافر وسترن بلات (شامل ٤٨ میلي‌مولار Tris-base، ۳۹ میلي‌مولار Glycine، ۰/۰۳۷۵ درصد SDS و ۲۰ درصد متانول در آب مقطر) منتقل و جریان الکتریسیته ثابت۳۵۰ میلي آمپر به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت برقرار گردید. پس از قطع جریان و خارج نمودن ژل و غشاء بر روي ژل عملیات رنگ‌آمیزي و رنگ بري صورت گرفت تا از انتقال کامل پروتئین‌ها به روي غشاء اطمینان حاصل شود. غشاء نیتروسلولز پس از آنکه به مدت یك شب در محلول بلاکینگ (۲ درصد شیر خشك بدون چربي در PBST) و در دماي ٤ °C در یخچال قرار داده شد، در بافر PBST شستشو و به مدت دو ساعت در۱۰ میلي‌لیتر بافر PBST حاوي آنتي‌بادي اختصاصي ویروس (IgG) و روي شیکر قرار داده شد. پس از سه بار شستشو در PBST غشاء به مدت یك ساعت در۱۰ میلي‌لیتر PBST حاوي آنتي‌بادي گوت آنتي ربیت[3] متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (GAR-AP) قرار داده شد. غشاء مجدداً با PBST شستشو و ۱۰ میلي‌لیتر بافر سوبسترا یا بافر آلکالین فسفاتاز (AP- buffer) به آن اضافه گردید و جهت رنگ‌آمیزي از دو ماده رنگي NBT (۲۲ میکرولیتر) و BCIP (١٦ میکرولیتر) استفاده شد. پس از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه با ظهور باندها، غشاء به داخل آب مقطر منتقل شد.

آزمون **RT-PCR**[4]

آزمون RT- PCR (واکنش زنجیره‌اي پلیمراز به روش نسخه برداري معکوس) با استفاده از پرایمرهاي اختصاصي طراحي شده توسط Yang & Mirkov (1997) ولي با روشي تقریباً متفاوت از روش آنها صورت گرفت. دو پرایمر مستقیم SCMV F3 و معکوسSCMV R3 که بر اساس توالي‌هاي حفاظت شده‌اي در انتهاي٣′ ژنوم SCMV و در منطقه کدکننده پروتئین پوششي (CP) توسط Yang & Mirkov (1997) طراحي شده‌اند، بطور کاملاً اختصاصي فقط قادر به تشخیص استرین‌هاي SCMV مي‌باشند.

SCMVF3:5′ TTCTCACCAAGCTGGAA - 3′

SCMVR3:5′AGCTGTGTGTCTCTCTGTATTCTC - 3′

1. Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis
2. Electroblot Immunoassay or Western Blotting
3. Goat anti-rabbit
4. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

واكنش‌هاي RT-PCR در دستگاه ترموسايكلر Palmcycler مدلGP001 (ساخت كمپاني Corbett Reaserch استراليا) انجام گرفت. قبل از انجام آزمون، Total RNA گياهي استخراج و در مخلوط واكنش وارد شد. براي استخراج Total RNA گياهي از دو بافر RNAWIZ (محصول Antibion) و بافر Trireagent (محصول Sigma) و همچنين از كيت RNeasy Plant Mini Kit (محصولQIAGEN) عينا براساس دستورالعمل كمپاني هاي توليد كننده استفاده شد.

در مرحله ساخت cDNA يا نسخه برداري معكوس (RT) حجم نهايي مخلوط واكنش،۲۰ ميكروليتر در نظر گرفته و اجزاء مخلوط به ترتيب جدول ۱ مخلوط شدند. مخلوط واكنش بدون افزودن آنزيم RT، درون تيوب‌هاي ۰/۲ ميلي‌ليتري استريل و RNase-free تهيه و به مدت ۲ دقيقه در دماي ۷۲°C در دستگاه ترموسايكلر قرار گرفت. پس از كاهش دما به ٤۲°C، آنزيم RT به مخلوط واكنش اضافه و جهت ساخت cDNA، دماي ٤۲ °C به مدت ٤٥ تا ٦۰ دقيقه در نظر گرفته شد.

جدول ۱- اجزاء مخلوط واكنشRT

ماده	غلظت	مقدار
آب ديونيزه و استريل	-	٦µl
5X First strand buffer	-	٤µl
DTT	۱۰۰mM (۰/۱M)	۲µl
dNTP mix	۱۰mM (each)	۱µl
total RNA	-	٥µl
Reverse primer (SCMV R3)	۱۰۰pmole /µl	۱µl
RNase inhibitor enzyme	٤۰ u/ µl	۰/٥µl
MMLV reverse transcriptase(RT)	۲۰۰u /µl	۰/٥µl

در مرحله تكثير يا واكنش زنجيره‌اي پليمراز[1] حجم نهايي مخلوط واكنش ٥۰ ميكروليتر در نظر گرفته و اجزاء آن به شرح جدول ۲ وارد مخلوط گرديد. مخلوط واكنش بدون اضافه كردن آنزيم Taq، درون تيوب‌هاي ۰/۲ ميلي‌ليتري استريل و RNase Free تهيه و پس از انتقال به دستگاه ترموسايكلر و برقراري دماي ۹٤°C به مدت ۲ دقيقه، آنزيم Taq اضافه گرديد. سپس ۳٥ سيكل۴ دقيقه‌اي شامل ۱ دقيقه دماي ۹٤°C، ۱/٥ دقيقه دماي ٥٥°C و ۱/٥ دقيقه دماي ۷۲°C در دستگاه منظور گرديد. در پايان نيز يك مرحله بسط نهايي[2] طولاني (دماي ۷۲°C) به مدت ۱۰ دقيقه براي تكميل پليمريزاسيون و سنتز كامل رشته‌ها اعمال شد.

جدول ۲- اجزاء مخلوط واكنشPCR

ماده	غلظت	مقدار
آب ديونيزه و استريل	-	۳٤/٥ µl
10X First Strand Buffer	-	٥µl
MgCl2	٥۰mM	۲µl
dNTP mix	۱۰mM (each)	۱µl
Forward primer(SCMV F3)	۱۰۰pmole /µl	۱µl
Reverse primer(SCMV R3)	۱۰۰pmole /µl	۱µl
cDNA	-	٥µl
Taq-polymerase	٥ u/µl	۰/٥µl

محصول نهايي آزمونRT-PCR با الكتروفورز افقي ژل آگارز ۱ درصد در بافر 0/5X TBE (۱۰/۷٥ گرم تريس بازي، ٥/٥ گرم اسيدبوريك و ۰/۹۳ گرم EDTA در يك ليتر آب مقطر و pH ۸) مورد مشاهده قرار گرفت.

خالص‌سازي ويروس

براي خالص‌سازي ويروس از روش Minipurification شرح داده شده توسط Jensen *et al.* (1986) با اندكي تغييرات استفاده شد. ۲ گرم از بافت برگي تازه در ۱٥ ميلي‌ليتر از بافر خالص سازي (سيترات سديم ۰/۱ مولار با pH ٦/٥ و حاوي ۰/۲٥ درصد مركاپتواتانول، ۰/۱ درصد Na-DIECA و ۱ درصد PVP) عصاره‌گيري و پس از آنكه از پارچه ململ چند لايه عبور داده شد، به مدت ۲۰ دقيقه در دستگاه سانتريفوژ Beckman مدل J-21B (ساخت آمريكا) با سرعت rpm ۱۰۰۰۰ سانتريفوژ شد. مايه رويي سبز كم رنگ[3] دوباره از پارچه ململ چند لايه عبور داده شده و با ٤ ميلي‌ليتر از محلول ۳۳ درصد Triton X-100 در آب مقطر (V/V) به خوبي مخلوط شد. عصاره آماده شده بر روي بالشتكي از پنج ميلي‌ليتر از محلول۲۰ درصد سوكروز (W/V) در بافرسيترات سديم ۰/۱مولار (٦/٥ pH) و به مدت ۲ تا ۳ ساعت با سرعت rpm ۲٤۰۰۰ در دستگاه

1. Polymerase chain reaction

2. Final extension
3. Supernatant

سانتریفوژ Beckman مدل Spinco L50 سانتریفوژ شد. رسوب شیري رنگ بدست آمده در پایان سانتریفوژ در ۳۰۰ میکرولیتر از بافر سیترات سدیم ۰/۱ مولار (pH ٦/٥) حل و در فریزر ۲۰°C- نگهداري شد.

میزان جذب ماوراء بنفش (UV) سوسپانسیون ویروس خالص در طول موج هاي ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومترLKB مدل4050 ساخت شرکت Biochrom انگلستان اندازه گیري و نسبت A260/280 و غلظت ویروس در سوسپانسیون با استفاده از فرمول (درجه رقت× C =A260/EC) محاسبه شد.

الکترون میکروسکوپي

تعدادي از نمونه‌هاي مزرعه‌اي و گلخانه‌اي آلوده به ویرس براي تهیه عکس‌هاي میکروسکوپ الکتروني به موسسه DSMZ آلمان ارسال شد و عکس‌هاي میکروسکوپ الکتروني در بخش ویروس‌شناسي گیاهي آن موسسه، توسط دکتر استفان وینتر و همکاران با استفاده از میکروسکوپ الکتروني زایس مدل ۹۰۶ تهیه شد.

بررسي دامنه میزباني

چهار جدایه ویروس از مناطق مختلف استان بعنوان ایزوله‌هاي تیپ براي بررسي محدود دامنه میزباني ویروس غالب در استان تهران انتخاب گردید. به این منظور عصاره برگهاي آلوده به ایزوله‌هاي مذکور در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH ۷) استخراج و به طریقه مکانیکي به روي این گیاهان مایه‌زني شد: *Panicum miliaceum*، *Pennisetum americanum*، *Avena sativa*، *Hordeum vulgare*، *Setaria italica*، *Triticum aestivum*. در طول مدت ۲۰ روز بعد از مایه‌زني گیاهان مایه‌زني شده از نظر ظهور علایم و نیز با انجام آزمون‌هاي سرولوژیکي مورد بررسي قرار گرفتند.

نتایج

نمونه‌برداري

شایع‌ترین علایم ویروسي که در مزارع ذرت استان تهران طي نمونه‌برداري‌هاي سال ۱۳۸۲ مشاهده شد، علایم موزائیك سیستمیك بود که در مواردي بصورت نوارهایي[1] در یك یا دو طرف رگبرگ میاني برگ‌ها و در حال تبدیل شدن به موزائیك سیستمیك بود. در مواردي نیز علایم موزائیك توأم با علایم کوتولگي بوته‌هاي ذرت[2] مشاهده گردید. رقم مورد کاشت در تمامي مزارع ذرت سینگل کراس ۷۰٤ بود و به جز چند مورد که میزان آلودگي بالا بود، اکثراً میزان آلودگي پایین بود. در مزارع ذرت عمدتاً حاشیه مزارع کانون اصلي آلودگي بود و به تدریج به سمت مرکز مزرعه از فراواني نمونه‌هاي آلوده کاسته مي‌شد.

نگهداري نمونه‌ها در آزمایشگاه و گلخانه

نمونه‌هاي مزرعه‌اي تا فاصله زماني حداکثر۳ تا ٤ هفته در دماي ٤°C در یخچال قابل نگهداري بودند و در این مدت، از کارایي مناسبي در مایه‌زني و آزمون‌هاي سرولوژیکي برخوردار بودند. قرار دادن نمونه‌ها در فریزر معمولي و یا فریزر ۲۰°C- باعث کاهش شدید و حذف کارایي آنها براي مایه‌زني و آزمون‌هاي سرولوژیکي مي‌گردید. انجام مایه‌زني‌ها در هواي خنك و به دور از نور مستقیم آفتاب و نیز حفظ مصنوعي این شرایط (با پوشاندن سقف شیشه اي بوسیله حصیر) موجب تسریع در ظهور علایم مي‌شد. ظهور علایم بصورت نقاط کلروتیك و روشن پراکنده و یا پیوسته و سرتاسري در قاعده برگ‌هاي تازه تشکیل شده بود که به تدریج طي یك تا دو روز بعد به موزائیك و پیسک[3] سراسري (سیستمیك) تبدیل مي‌شد (شکل۱).

آزمون‌هاي سرولوژیکي

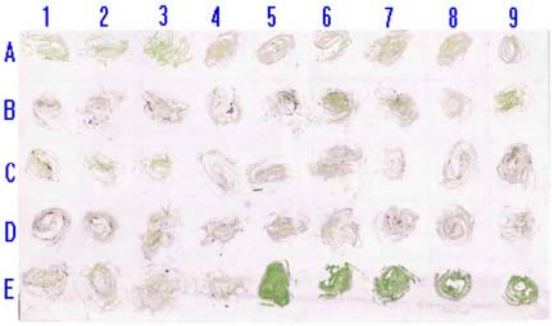
با بررسي نمونه‌هاي جمع‌آوري شده در سال ۱۳۸۲ از طریق آزمون‌هاي ELISA، TPIA و DIBA و با استفاده از آنتي‌سرم‌هاي پلي‌کلونال ٤ پوتي ویروس موزائیك نیشکر (SCMV)، موزائیك کوتولگي ذرت (MDMV)، موزائیك قیاق (JGMV) و موزائیك سورگوم (SrMV)، تمام نمونه‌هاي جمع‌آوري شده تنها با آنتي‌سرم ویروس SCMV واکنش نشان دادند و در هیچ یك از نمونه‌ها، ۳ پوتي ویروس دیگر شناسایي نشدند. نتایج آزمایشات سرولوژیکي بر روي نمونه‌هاي مایه‌زني شده موجود در گلخانه نیز تنها وجود SCMV را نشان داد (شکل ۲ و۳).

1. Stripe

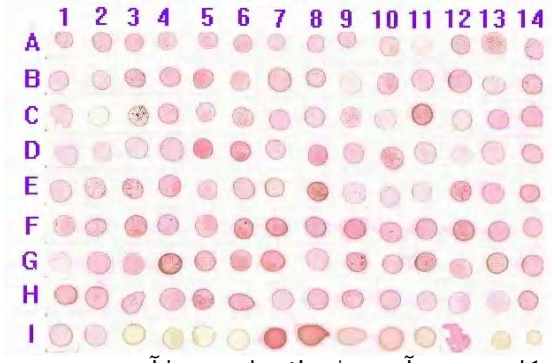
2. Dwarf mosaic

3. Mottling

شكل ۱- توسعه علايم موزائيك سيستميك و نوارهاي موزائيكي بر روي ذرت شيرين رقم ٤٠٣ پارس به دنبال مايه‌زني با ايزوله‌هاي مزرعه‌اي SCMV



شكل۲- نتيجه آزمون تيشوبلات يا TPIA با آنتي‌سرم SCMV (رنگ‌آميزي با محلول سوبستراي NBT/BCIP) (E5 تا E9: شاهدهای منفی D1 وD2 : شاهد های مثبت)



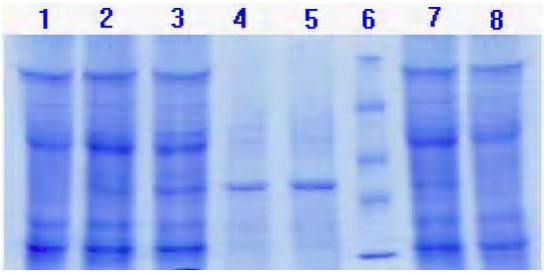
شكل ۳- نتيجه آزمون دات بلات يا DIBA با آنتي‌سرم SCMV (رنگ‌آميزي با محلول سوبستراي Fast Red) I3 تا I6: شاهدهاي منفي (عصاره‌هاي گياه سالم) I7 وI8: شاهدهاي مثبت I12: ويروس خالص

الكتروفورز ژل پلي‌اكريل‌آميد

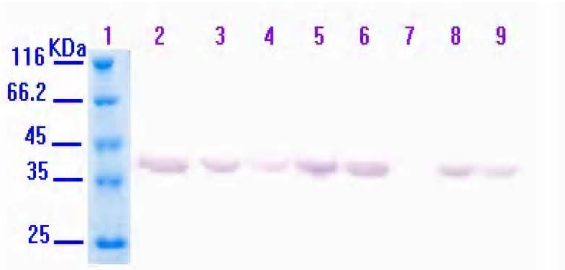
الكتروفورز ژل پلي‌اكريل‌آميد SDS-PAGE عصاره گياهان آلوده و مقايسه باندهاي پروتئيني آنها با باندهاي پروتئيني نمونه گياه سالم، وجود يك باند اضافي قوي را در موقعيت KD_a ۳۸-۳۷ نشان داد. با انجام SDS-PAGE بر روي آموده‌هاي ويروس خالص نيز تنها يك باند، آنهم در موقعيت KD_a ۳۸-۳۷ مشاهده شد (شكل٤).

وسترن بلات

انجام آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتي‌سرم SCMV و ظهور باندهاي قوي در روي غشاء نيتروسلولز در موقعيت KD_a ۳۸-۳۷، وجود SCMV را در نمونه‌هاي آلوده تأييد كرد و بدين ترتيب وزن مولكولي پروتئين پوششي ويروس نيز اندازه‌گيري شد. انجام SDS-PAGE و وسترن بلات بر روي جدايه‌هاي مختلف SCMV از مناطق مختلف استان تهران، اختلافي را در وزن مولكولي پروتئين پوششي آنها نشان نداد (شكل۵).



شكل ۴- نتيجه آزمون SDS-PAGE (۱ و ۸: عصاره‌هاي گياه سالم ۲، ۳ و ۷: عصاره‌هاي گياه آلوده به SCMV ٤ و ۵: ويروس خالص (SCMV) ٦: ماركر استاندارد پروتئيني (محصول Fermentas)) از بالا به پايين: ۱۱۶-۶۶/۲- ۴۵-۳۵-۲۵ كيلو دالتون

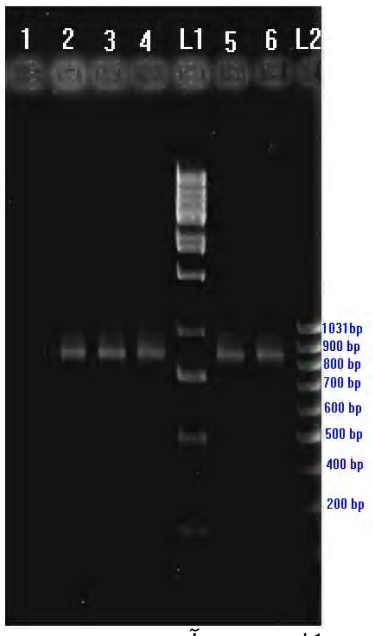


شكل۵- نتيجه آزمون وسترن بلات يا EBIA با آنتي‌سرم SCMV (۱: ماركر استاندارد پروتئيني از ژل مربوط به وسترن بلات، ۵ و ٦: ويروس خالص، ۲، ۳، ٤، ۸ و ۹: عصاره‌هاي گياهي آلوده به ويروس، ۷: عصاره گياه سالم)

آزمون **RT-PCR**

آزمون RT-PCR با استفاده از جفت پرايمر SCMV F3 و SCMV R3 كه اختصاصي SCMV و استرين‌هاي آن هستند، وجود SCMV را در نمونه‌هاي آلوده تاييد كرد. در

ارزيابي محصول آزمون RT-PCR از طريق الكتروفورز افقي ژل آگارز ۱ درصد باند مربوط به قطعه تكثير شده نزديك به ۹۰۰ bp ظاهر شد (شكل٦). ولي در برخي موارد باندها و قطعات غير اختصاصي نيز مشاهده گشت.



شكل ٦- نتيجه آزمون RT-PCR

۱: شاهد منفي (گياه سالم)، ۲، ۳، ٤، 5: نمونه‌هاي آلوده به ويروس ٦: سوسپانسيون ويروس خالص

L1: لدر ۱Kb با فواصل ۲۵۰ bp (باندهاي مورد نظر مابين باند ۷۵۰ و ۱۰۰۰ ظاهر شده‌اند)

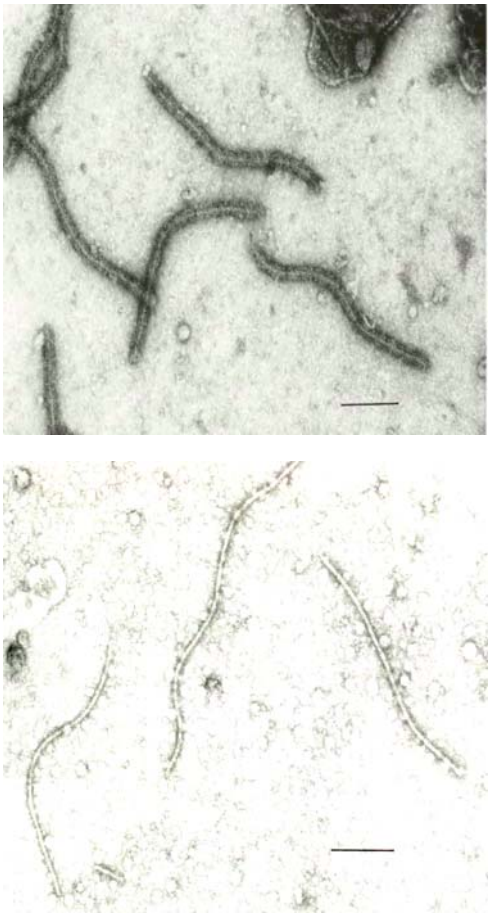
L2: لدر ۱Kb با فواصل ۱۰۰ bp

خالص سازي **SCMV**

رسوب بدست آمده در پايان خالص‌سازي شيري رنگ و عاري از رنگ‌دانه‌هاي سبز و ناخالصي‌هاي گياهي بود و الكتروفورز سوسپانسيون ويروس خالص بدست آمده در ژل پلي‌اكريل‌آميد، غلظت بالاي ويروس و عاري بودن از پروتئين‌هاي گياهي را نشان داد (شكل۸). نسبت ۲٦۰/۲۸۰ براي آموده‌هاي ويروس خالص در حدود ۱/۲ بود و غلظت ويروس در سوسپانسيون نيز با استفاده از فرمول ۱۱/٤5 ميلي گرم بر ميلي‌ليتر محاسبه شد.

الكترون ميكروسكوپي

عكس‌هاي ميكروسكوپ الكتروني تهيه شده به روش ISEM و دكوراسيون با آنتي‌سرم SCMV، حضور پيكره‌هاي رشته‌اي انعطاف‌پذير ويروس را در نمونه‌هاي آلوده نشان داد (شكل۷).



شكل۷- عكسهاي ميكروسكوپ الكتروني تهيه شده از نمونه‌هاي آلوده به SCMV ارسال شده به موسسه DSMZ آلمان

بررسي دامنه ميزباني **SCMV**

در مايه‌زني ۴ جدايه SCMV غالب در استان تهران بعنوان جدايه‌هاي تيپ به روي *Panicum miliaceum*، *Setaria italica*، *Pennisetum americanum*، *Avena Sativa*، *Hordeum Vulgare*، *Triticum Sativum* مايه‌زني در دو تكرار انجام گرديد ولي هيچگونه علايمي بر روي گياهان مايه‌زني شده تا ۲۰ روز بعد مشاهده نگرديد و نمونه‌هاي مايه‌زني شده، در آزمون‌هاي سرولوژيكي با آنتي‌سرم SCMV فاقد واكنش بودند.

بحث

طي فصل زراعي سال ۱۳۸۲ مزارع ذرت استان تهران از نظر آلودگي به چهار پوتي ويروس‌SCMV، DMV، SrMV و JGMV (موسوم به پوتي ويروس‌هاي غلات) مورد بررسي قرار گرفتند. شايع‌ترين علايم ويروسي كه در بازديدها مشاهده گرديد علايم موزائيك و پيسك بود و در

مواردي نيز علايم موزائيك سيستميك توام با كوتولگي مشاهده شد بطوريكه بوته‌هاي آلوده در مقايسه با بوته‌هاي ديگر تا يك سوم كوتاه‌تر بودند.

با انجام آزمون‌هاي سرولوژيكي DAS-ELISA، TPIA و DIBA با استفاده از آنتي‌سرم‌هاي پلي كلونال چهار پوتي ويروس مورد نظر، در تمامي نمونه‌ها تنها حضور پوتي ويروسSCMV محرز و سه پوتي ويروس ديگر شناسايي نشدند. لذا SCMV بعنوان پوتي ويروس شايع و غالب در روي ذرت و عامل اصلي موزائيك و موزائيك همراه با كوتولگي ذرت در استان تهران شناسايي شد. با توجه به اينكه دو پوتي ويروس SrMV و JGMV در سطح دنيا از پراكنش جغرافيايي محدودي برخوردار بوده، از كشورهاي معدودي گزارش شده‌اند و همچنين ذرت بعنوان ميزبان طبيعي اصلي براي آنها مطرح نيست (Brunt *et al.*, 1997; Dragoljob *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002) احتمال عدم شناسايي آنها در اين تحقيق دور از انتظار نبود.

همچنانكه قبلاً نيز محققين ديگري نظير Afsharifar (1991)، Moini & Izadpanah (2001) و Masumi & Izadpanah (2001) در مطالعات سرولوژيكي بر روي نمونه‌هاي ذرت مناطق ديگري از ايران، هيچگونه واكنشي را با آنتي‌سرم اين دو ويروس مشاهده نكرده‌اند. فراواني SCMV و MDMV هم كه دو پوتي ويروس اصلي ذرت هستند در مناطق مختلف دنيا متغير است و با اينكه در برخي كشورها مانند آمريكا و اكثر كشورهاي اروپايي و مديترانه ايMDMV پوتي ويروس غالب ذرت است، در مناطقي نيز مانند يوگسلاوي (Krstic & Tosic, 1995) آلمان (Kuntze *et al.*, 1995; Oertel *et al.*, 1999) و چين (Chen *et al.*, 2002) SCMV بعنوان پوتي ويروس اصلي و غالب ذرت شناسايي شده و MDMV در درجه دوم اهميت قرار دارد. در ايران نيز به جز Moini & Izadpanah (2001) و Zare *et al.* (2005) كه ايزوله‌هايي را كه با آنتي‌سرم MDMV واكنش داشته از ذرت‌هاي دشت ناز ساري و خوزستان گزارش كرده‌اند، ساير محققين در آزمايشات سرولوژيكي خود بر روي ايزوله‌هاي پوتي ويروسي جدا شده از ذرت و قياق مناطق مختلف، هيچگونه واكنشي با آنتي‌سرم MDMV مشاهده نكرده اند و تنها واكنش نمونه‌ها با آنتي‌سرم SCMV مشاهده شده است (Izadpanah, 1982; Izadpanah, 1985; Afsharifar, 1991; Izadpanah & Kamran, 1995; Masumi & Izadpanah, 1995; Masumi & Izadpanah, 2001). در تحقيق حاضر نيز عدم واكنش نمونه‌ها با آنتي‌سرم MDMV به قدري قاطع بود كه حضور اين ويروس را در مزارع استان فعلاً منتفي نشان مي‌دهد. لذا به نظر مي‌رسد پوتي ويروس غالب در ذرت و قياق مناطق مختلف كشور با MDMV كاملاً متفاوت است.

در مزارع ذرت عمدتاً حاشيه مزارع كانون آلودگي بود و به تدريج به سمت مركز مزرعه از فراواني نمونه‌هاي آلوده و علايم‌دار كاسته مي‌شد. دليل اين امر مي‌تواند تراكم قياق‌هاي آلوده به ويروس در حاشيه مزارع باشد كه نقش مهمي را در اپيدميولوژي بيماريهاي ويروسي در ذرت ايفا مي‌كند. با توجه به اينكه در مطالعه‌اي در حاشيه اين تحقيق، SCMV بعنوان پوتي ويروس غالب در روي قياق‌هاي نمونه‌برداري شده از مناطق مختلف استان و حاشيه مزارع ذرت شناسايي شد (مطالعات چاپ نشده)، اين احتمال قريب به يقين مطرح است كه منشاء پوتي ويروس شايع روي ذرت‌هاي مناطق مختلف استان، قياق‌هاي آلوده اين مناطق مي‌باشد. قبلاً نيز Izadpanah (1987) و Afsharifar (1991) به اين مسأله اشاره نموده ولي با اين استدلال كه قياق به SCMV حساس نيست در معرفي SCMV بعنوان پوتي ويروس غالب روي قياق هاي مناطق مورد مطالعه ترديد داشته اند. امروزه در منابع مهم علمي از قياق بعنوان ميزباني براي SCMV و يا لااقل برخي استرين‌هاي آن نام برده مي‌شود (Brunt *et al.*, 1997) و ممكن است SCMV شايع در استان تهران (و ديگر مناطق كشور) استرين متفاوت و خاصي از ويروس باشد كه روي قياق نيز بيماريزا مي‌باشد.

در بررسي الكتروفورتيك پروتئين‌هاي نمونه‌هاي گياهي آلوده و آموده هاي ويروس خالص از طريق SDS-PAGE وجود باند ويروسي در موقعيت ۳۸-۳۷ كيلودالتون مشخص شد كه انجام آزمون وسترن بلات (با استفاده از آنتي‌سرم SCMV) آنرا تاييد نمود. وزن مولكولي حدود ۳۸-۳۷ KDa مشاهده شده با گزارش محققين ديگري كه متوسط وزن مولكولي ۳۷ KDa را براي جدايه‌ها و استرين‌هاي مجموعه SCMV ذكر كرده‌اند، مطابقت دارد (Jensen *et al.*, 1986). قبلاً نيز Moini & Izadpanah (2001) وزن مولكولي ايزوله پوتي ويروسي جدا شده از روي ذرت در مازندران را ۳۷ KDa ذكر كرده‌اند و Masumi & Izadpanah (2001) براي SCMV-MS (ويروس موزائيك نيشكر- ايزوله ذرت شيراز) كه از بسياري از مناطق كشور گزارش شده و اخيراً با نام جديد IJMV (ويروس موزائيك ايراني قياق) آنرا معرفي كرده‌اند، وزن مولكولي ۳۷/۵ را گزارش كرده‌اند. لذا به نظر

مي‌رسد که پوتي ويروس‌هاي شايع در روي ذرت‌هاي مناطق مختلف ايران از نظر وزن مولکولي پروتئين پوششي تفاوت عمده‌اي نشان نمي‌دهند.

آزمون RT-PCR با جفت پرايمر اختصاصيSCMV F3 و SCMV R3 طراحي شده توسط Yang & Mirkov (1997) ولي با روشي متفاوت از روش آنها انجام شد. نتيجه آزمون تکثير قطعه اي با اندازه ۹۰۰bp بود که به اندازه مورد انتظار بود. اما در مواردي نتيجه آزمون مطلوب نبود و به جاي باندهاي مورد انتظار باندهاي غير اختصاصي به اندازه‌هاي کوچك‌تر يا بزرگتر تکثير مي‌شدند. اخيراً Alegria *et al.* (2003) نيز به اين مشکل اشاره کرده و براي حل اين مشکل و دستيابي به نتيجه مطلوب، به جاي پرايمر SCMV F3، پرايمر SCMV F4 را طراحي و توصيه کرده‌اند. البته ممکن است پوتي ويروس شايع شناسايي شده در استان، از نظر توالي ژنوم بويژه در ناحيه ′۳ داراي تفاوت‌هايي با ايزوله‌هاي کشورهاي ديگر داشته باشد و لازم به نظر مي‌رسد که با تعيين توالي ژنوم پوتي ويروس‌هاي شايع ايران، پرايمرهاي اختصاصي طراحي شوند. همچنان که در مورد ويروس SCMV-MS، Masumi & Izadpanah (2001) نشان داده‌اند که اين ويروس تشابه توالي بسيار کمي با ديگر ايزوله‌هايSCMV دارد و اقدام به تعيين توالي قسمتي از ژنوم آن و طراحي پرايمرهاي اختصاصي براي آن نموده‌اند.

الکترون ميکروسکوپي نمونه‌هاي آلوده به روش ISEM و دکوراسيون با آنتي‌سرم SCMV پيکره‌هاي رشته‌اي انعطاف‌پذير ويروس را نشان داد و تأييدي مضاعف بر نتايج آزمون‌هاي سرولوژيکي بود.

در بررسي دامنه ميزباني محدودي که با استفاده از ٤ ايزوله منتخب SCMV انجام شد ايزوله‌ها به روي *Panicum miliaceum*، *Setaria italica*، *Pennisetum americanum*، *Hordeum vulgare*، *Triticum aesativum* و *Avena sativa* منتقل نشدند. چهار گياه اول بعنوان ميزبان‌هاي حساس براي ويروس موزائيك نيشکر در منابع مختلف ذکر شده‌اند اما دو گياه اخير غيرحساس به ويروس گزارش شده‌اند (Brunt *et al.*, 1997; Dragoljob *et al.*, 1999). از اينرو ايزوله‌هاي استان از نظر دامنه ميزباني متفاوت از SCMV توصيف شده در منابع به نظر مي رسند. ارقام سورگوم رايج و نيز ذرت شيرين رقم ٤٠٣ پارس بسيار حساس به ايزوله‌هاي SCMV استان بودند.

در مجموع آنچه اين مطالعه نشان مي‌دهد آن است که ويروس موزائيك نيشکر (SCMV) پوتي ويروس غالب در مزارع ذرت استان تهران مي باشد، ولي مطالعات بيشتري لازم است تا خصوصيات بيشتري از ويروس مورد مطالعه قرار گيرد و رابطه ويروس با ايزوله‌هاي پوتي ويروسي گزارش‌شده از روي ذرت در کشورهاي ديگر مورد بررسي و مقايسه قرار گيرد. با توجه به پيشرفت چشمگير تکنيك‌هاي مولکولي تعيين توالي و بررسي ژنوم ويروس‌ها در سال‌هاي اخير و همچنين نياز مبرمي که امروزه بويژه به بررسي‌هاي ژنوميك در شناسايي و بررسي روابط پوتي ويروس‌ها وجود دارد، مسلماً مهمترين نياز در حال حاضر تعيين توالي ژنوم ويروس و يا حتي الامکان بخش‌هايي از آن، از جمله ناحيه پروتئين پوششي است تا موقعيت تاکسونوميکي و رابطه فيلوژنتيك آن با ايزوله‌هاي مناطق مختلف جهان مشخص گردد. اين اطلاعات براي برنامه‌هاي توليد ارقام مقاوم از طريق روش‌هاي سنتي اصلاح و روش‌هاي نوين بيوتکنولوژي نيز در آينده مورد نياز خواهند بود.

سپاسگزاري

اين پژوهش مستخرج از طرح شماره ۷۱۸/۳/٦۱۸ مي‌باشد که با حمايت مالي معاونت پژوهشي دانشگاه تهران انجام شده است و بدينوسيله سپاسگزاري مي‌گردد. از دکتر استفان وينتر از موسسه DSMZ آلمان به خاطر ارسال آنتي‌سرم‌هاي مورد استفاده و انجام الکترون ميکروسکوپي بر روي نمونه‌ها و همچنين از کارشناسان بخش ذرت و گياهان علوفه‌اي موسسه تحقيقات اصلاح و تهيه نهال و بذر به جهت همکاري در تامين بذور ذرت و سورگوم مورد نياز سپاسگزاري مي‌گردد.

REFERENCES

1. Afsharifar, A. (1991). *Purification and characterization of a filamentous virus causing mosaic on maize in Shiraz and its comparison to similar viruses in maize, sorghum and johnsongrass in some regions of Iran.* MSc. Thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran. (In Farsi)
2. Alegria, O. M., Royer, M., Bousalem, M., Chatenet, M., Peterschmitt, M., Girard, J. C. & Rott, P. (2003). Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six sugarcane mosaic virus isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. *Archives of Virology*, 148, 357- 372.

3. Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. & Watson, L. (1997). *Viruses of plants*. Descriptions and lists from the VIDE Database. CAB International. 1484 pp.
4. Chen, J., Chen, J. & Adams, M. J. (2002). Characterisation of potyviruses from sugarcane and maize in China. *Archives of Virology*, 147, 1237-1246.
5. Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
6. Dijkstra, J. & de Jager, C. P. (1998). *Practical plant virology protocols and exercises*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 459 pp.
7. Dragoljob, D., Sutic, D., Ford, R. E. & Tosic, M. (1999). Handbook of plant virus diseases. CRC Press, Boca Raton. 553 pp.
8. Izadpanah, K. (1983). Difference in the etiology of maize mosaic in Shiraz and Karaj. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 18, 7-11. (In Farsi)
9. Izadpanah, K. (1985). Maize viruses and maize production programs in Iran. *Proceedings of the 8th Iranian Plant Protection Congress*, Isfahan University of Industry, p 109. (In Farsi)
10. Izadpanah, K. & Kamran, R. (1995). Isolation of an isolate of sugarcane mosaic virus from maize in Sepidan region of Fars. *Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress*, 2-7 Sep., Karaj Junior College of Agriculture, p 94. (In Farsi)
11. Jensen, S. G., Long-Davidson, B. & Seip, L. (1986). Size variation among proteins induced by sugarcane mosaic viruses in plant tissue. *Phytopathology*, 76, 528-532.
12. Krstic, B. & Tosic, M. (1995). Sugarcane mosaic virus an important pathogen on maize in Yugoslavia. *Zeitschrift-fur-Pflanzenkrankheiten-und-Pflanzenschutz*, 102, 34-39.
13. Kuntze, L., Fuchs, E., Gruntzig, M., Schulz, B., Henning, U., Hohmann, F. & Melchinger, A. E. (1995). Evaluation of maize inbred lines for resistance to sugarcane mosaic virus (SCMV) and maize dwarf mosaic virus (MDMV). *Agronomie*, 15, 463-467.
14. Masumi, M. & Izadpanah, K. (1995). Natural infection of johnsongrass and some other graminea plants with an isolate of sugarcane mosaic virus. *Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress*, 2-7 Sep., Karaj Junior College of Agriculture, p 73. (In Farsi)
15. Masumi, M. & Izadpanah, K. (2002). Geographical distribution and serological and physicochemical properties of Iranian johnsongrass mosaic virus. *Proceedings of the First Iranian Congress on Virology*, Tehran, p 325.(In Farsi)
16. Masumi, M., Izadpanah, K. & Behjatnia, A.A. (2002). Taxonomical position of Iranian Johnsongrass mosaic virus. *Proceedings of the First Iranian Congress on Virology*, Tehran, p 136. (In Farsi)
17. Mirhadi, M.J. (2001). *Maize*. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREO) Publishing, Karaj. (In Farsi)
18. Moini, A. A. & Izadpanah, K. (2001). Identification and purification of a MDMV-like pootyvirus of maize in Mazandaran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 37, 147-159. (In Farsi)
19. Oertel, U., Fuchs, E. & Hohmann, F. (1999). Differentiation of isolates of sugarcane mosaic potyvirus (SCMV) on the basis of molecular, serological and biological investigations. *Zeitschrift-fur-Pflanzenkrankheiten-und-Pflanzenschutz*, 106, 304-313.
20. Sambrook, J., Fristch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring harbor laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
21. Seifers, D. L., Salomon, R., Marie-Jeanne, V., Alliot, B., Signoret, P., Haber, S., Ens, A., Loboda, W., She, Y. M. & Standing, K. G. (2000). Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel. *Phytopathology*, 90, 505-513.
22. Shukla, D. D., Tosic,M., Jilka, J., Ford, R. E., Toler , R.W. & Langham, M.A.C. (1989). Taxonomy of potyviruses infecting maize, sorghum and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. *Phytopathology*, 79, 223-229.
23. Yang, Z. N. & Mirkov, T. E. (1997). Sequence and relationships of sugarcane mosaic and sorghum mosaic virus strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination. *Phytopathology*, 87, 932 – 939.
24. Zare, A., Masumi, M., Hayati, J. & Izadpanah, K. (2005). A survey on biological and serological properties of MDMV in Iran. *Proceedings of the16th Iranian Plant Protection Congress*, 29 Aug.- 2 Sep., University of Tabriz, Tabriz, Iran, p 110.(In Farsi)
25. Zare, A., Masumi, M., Hayati, J. & Izadpanah, K. (2005). Serological comparison and electrophoretic protein pattern of coat proteins of viruses causing mosaic on maize in Khouzestan province. *Proceedings of the16th Iranian Plant Protection Congress*, 29 Aug.- 2 Sep., University of Tabriz, Tabriz, Iran, p110. (In Farsi).