

شناسایی مولکولی ستلایت آران‌ای غیر نکروز و ویروس موزاییک خیار Cucumber mosaic virus

داود کولیوند^{۱*}، نعمت سخندان بشیر^۲ و جواد مظفری^۳
۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، ۳، دانشیار،
موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج
(تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۲ - تاریخ تصویب: ۹۱/۷/۱۱)

چکیده

ستلایت آران‌ای در برخی جدایه‌های ویروس موزاییک خیار، *Cucumber mosaic virus* (CMV) سبب کاهش یا تشدید علائم این ویروس می‌شود. جهت بررسی وجود ستلایت آران‌ای، نمونه‌های آلوده گیاهی مشکوک به CMV از میزبان‌های مختلف جمع‌آوری شدند. ابتدا با استفاده از روش‌های سرولوژیک مانند DAS-ELISA و دیبا CMV ردیابی شد. به منظور بررسی بیشتر علائم و اثر احتمالی ستلایت آران‌ای بر روی علائم، آزمون تک لکه گیری با استفاده از گیاهان میزبان لکه موضعی انجام شد و سپس تک لکه‌ها جداگانه بر روی میزبان تکثیری مایه‌زنی شدند. گروه‌بندی علائم حاکی از ایجاد کلروز برخی از جدایه‌ها روی توتون بود که از اثرات بارز ستلایت آران‌ای روی علائم می‌باشد. با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی منطبق بر منطقه رمز کننده پروتئین پوششی، CMV ردیابی شد که قطعه‌ای به طول ۶۷۵ جفت باز تکثیر شد. ردیابی ستلایت آران‌ای با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی CMV Sat-F و CMV Sat-R انجام شد که در واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) قطعه‌ی مورد نظر به طول حدود ۳۶۰ جفت باز در یکی از جدایه‌ها تکثیر یافت. مایه زنی‌های متعدد روی توتون و گوجه‌فرنگی نشان داد که وجود ستلایت آران‌ای موجب کاهش علائم CMV روی میزبان می‌شود که از خصوصیات بارز اثر non-necrogenic Satellite RNA بر روی علائم می‌باشد. این اولین گزارش ستلایت آران‌ای CMV از ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ستلایت آران‌ای، RT-PCR، Non-necrogenic

مقدمه

ژنوم ویروس موزاییک خیار (CMV) از سه قطعه آران‌ای تک رشته‌ای با قطبیت مثبت (RNA1, RNA2, RNA3) و دو آران‌ای زیرژنومی (RNA4, RNA4A) تشکیل شده است (Fauquet et al., 2005). بررسی‌های انجام شده نشان داد که همراه با ویروس آلوده کننده یک آران‌ای کوچک نیز همراه است که به احتمال زیاد سبب نکروز شدید روی گوجه فرنگی می‌شود. این

آران‌ای کوچک همرا با CMV را CARNAS5 (CMV associated RNA 5) نامیدند. با وجود این، بیشتر ستلایت آران‌ای‌ها باعث کاهش علائم در میزبان می‌شوند. البته تشدید یا کاهش علائم بستگی به ترکیب میزبان، ستلایت آران‌ای و ویروس کمک کننده دارد (Escriu et al., 2003; Liao et al., 2007; Du et al., 2007). اغلب جدایه‌های ستلایت آران‌ای CMV ردیابی شده در حدود ۳۳۲ تا ۳۴۲ نوکلئوتید داشته‌اند اما برخی از جدایه‌های ردیابی شده ژنوم بزرگتر و در حدود ۳۸۶ تا ۴۰۶ نوکلئوتید دارند. اغلب جدایه‌هایی که دارای

1. Sub genomic RNA

است یک گام اولیه در جهت مدیریت این بیماری و کاهش خسارات ناشی از این ویروس باشد. همچنین، با توجه به بررسی تبارزایی و خصوصیت ستلایت آران‌ای می‌توان به سیر تحول و تکامل جدایه های CMV پی برد و جدایه های ایرانی را با سایر جدایه ها مورد مقایسه قرار داد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

به منظور ردیابی و شناسایی ستلایت آران‌ای CMV ابتدا نمونه های گیاهی مشکوک به CMV بر اساس علائم توصیف شده در توصیف نامه ویروس (موزاییک بر روی برگ و میوه، پیسک، تاول‌های برجسته بر روی میوه، بدشکلی میوه، کوتولگی بوته، و نیز سایر علائم بیماری از جمله نخی شدن در برگ گوجه‌فرنگی، باریک شدن، بد شکلی برگ و کلروز) جمع آوری شدند. نمونه برداری در طی فصل‌های بهار، تابستان و پاییز دو سال زراعی از برخی محصولات مختلف و گیاهان میزبان این ویروس از شمال غرب کشور شامل استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل انجام شد. نمونه‌ها بر روی یخ به آزمایشگاه ویروس‌شناسی و مهندسی ژنتیک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز منتقل شدند. نمونه ها در کیسه های پلاستیکی تا انجام مراحل بعدی داخل یخچال نگهداری شدند و قسمتی از نمونه‌ها بر روی کلرید کلسیم خشک و در فریزر نگهداری شدند.

ردیابی ویروس موزاییک خیار

روش‌های سرولوژیک

به منظور شناسایی آران‌ای ماهوارای ابتدا با استفاده از آزمون‌های سرولوژیک از جمله الیزای مستقیم و DAS-ELISA (double-antibody sandwich ELISA) و روش دیبا (dot immunobinding assay) DIBA ویروس موزاییک خیار به عنوان ویروس کمکی ستلایت آران‌ای مورد ردیابی قرار گرفت. در آزمون‌های سرولوژیک جهت ردیابی ویروس از آنتی بادی چند همسانه‌ای و کانجـوگیت (DSMZ, Germany)

تعداد نوکلوتید بیشتری هستند، در شرق آسیا و ایتالیا ردیابی شده‌اند (Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003). ستلایت آران‌ای ویروس موزاییک خیار فاقد قاب خواندنی می‌باشد و برای همانندسازی، انتقال و بسته بندی کاملاً به ویروس کمکی نیازمند است. تا سال ۲۰۰۷ بیشتر از ۱۰۰ واریانت ستلایت آران‌ای CMV همراه با بیشتر از ۶۵ جدایه CMV به عنوان ویروس کمکی شناسایی شده بود (Liao et al., 2007). ستلایت آران‌ای CMV در توتون در مقایسه با سایر میزبان‌های این ویروس به مقدار زیادی تکثیر پیدا می‌کند. در برخی از میزبان‌ها ممکن است باعث کاهش علائم ناشی از ویروس کمک کننده شود. تصور می‌شود که کاهش علائم ناشی از برخی جدایه‌های CMV که دارای ستلایت آران‌ای هستند در اثر کاهش آران‌ای ویروس کمک کننده به دلیل وجود ستلایت آران‌ای در بافت آلوده میزبان می‌باشد (Palukaitis and Garcai-, 2003). از طرفی، ستلایت آران‌ای نکروز کننده با وجود آنکه باعث کاهش تجمع و مقدار آران‌ای ویروس کمکی در میزبان می‌شود، در گوجه فرنگی ایجاد نکروز می‌نماید. برخی از ستلایت آران‌ای‌های CMV باعث کلروز در گوجه فرنگی یا توتون (Simon et al., 2004) می‌شوند که از اثرات بارز این نوع ستلایت آران‌ای بر علائم ناشی از CMV می‌باشد و حتی ممکن است باعث بوجود آمدن علائم موزاییک نقش خطی در توتون شوند (Sato et al., 2000). کلروز ایجاد شده در برخی از میزبان‌ها بسیار شدید و متمایل به سفید است (Palukaitis and Roossinck, 1996). با توجه به اینکه در مطالعات قبلی پراکنش گسترده‌ی این ویروس از منطقه شمال‌غرب کشور گزارش شده است و این ویروس سالانه باعث خسارات فراوانی به محصولات کشاورزی به خصوص مزارع صیفی جات و گوجه فرنگی می‌شود شناسایی و مطالعات جزئی تر بر روی خصوصیات CMV از جمله خصوصیات ستلایت آران‌ای آن امر مهم و ضروری بنظر می‌رسد. از طرفی با توجه به تنوع زیاد نژادهای CMV و اثر ستلایت آران‌ای در تشدید و کاهش علائم ناشی از CMV، ردیابی آن در جدایه های موجود در ایران و شناسایی نژادهای متهاجم‌تر و احیاناً نژادهایی که ممکن است باعث کاهش علائم ویروس شود ممکن

طول حدود ۶۷۵ جفت باز در واکنش RT-PCR فراهم می‌ساخت. برای هر واکنش RT، ۰/۴ میکرولیتر از آغازگر معکوس (5 pmol/ml) با ۱/۱ میکرولیتر از آب استریل دیونیزه شده و ۱ میکرولیتر از آران‌ای استخراج شده به هر میکروتیوب اضافه شد و میکروتیوب‌ها در دمای ۷۰ درجه سلسیوس (°C) به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند و سپس، بلافاصله نمونه‌ها به روی یخ منتقل شدند تا سریعاً سرد گردند. آنگاه ۷/۵ میکرولیتر از ترکیب حاوی ۲ میکرولیتر بافر واکنش 5x، ۱ میلی مولار dNTP، ۴۰ واحد RNasin و ۲۰۰ واحد (۰/۵ میکرولیتر) آنزیم ترانسکریپتاز M-Mulv (Fermentas, Lithuania) به هر لوله اضافه شد و لوله‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس، لوله‌ها در ۴۲°C بمدت ۶۰ دقیقه در ترموسایکلر مدل CORBET RESEARCH CG1-960 قرار داده شدند. پس از انجام واکنش، آنزیم ترانس کریپتاز معکوس با قرار دادن لوله‌ها در ۷۰°C به مدت ۱۰ دقیقه غیرفعال شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه شد که حاوی ۲ میکرولیتر بافر PCR 10x، ۲ میلی مولار MgCl₂، ۲/۵ pmol آغازگر مستقیم و ۱/۲۵ واحد Taq DNA polymerase (Fermentas, Lithuania) بود.

سپس، ۵ میکرولیتر فرآورده حاصل از واکنش سنتز رشته cDNA به این ترکیب اضافه گردید. برنامه PCR شامل یک سیکل ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه و اسرشت سازی، ۳۵ سیکل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و اسرشت سازی، ۵۰°C به مدت ۴۵ ثانیه اتصال، ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه بسط و سیکل نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بسط نهایی اجرا شد. به منظور بررسی نتایج حاصل از واکنش RT-PCR، ۵ میکرولیتر فرآورده حاصل از هر واکنش PCR بر روی ژل آغاز ۱/۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید در بافر ۰/۵X TBE (Tris-base, Boric acid, EDTA) الکتروفورز گردید.

الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت و شدت جریان ۲۴ میلی آمپر به مدت حدود یک و نیم ساعت انجام شد و باندهای تکثیر یافته توسط دستگاه عکسبرداری از ژل (Biomerta, Qiagen, Tehran) و نور ماورابنفش بررسی شد.

اختصاصی CMV استفاده شد. در آزمون DAS-ELISA پس از تیمار چاهک‌ها با آنتی بادی چند همسانه‌ای رقیق شده در بافر پوششی مراحل دیگر مطابق (Clark and Adams, 1977) ادامه پیدا کرد. علاوه بر روش سرولوژیک ذکر شده، از آزمون دیبا با اندکی تغییرات نیز برای ردیابی اولیه CMV استفاده شد (Ball, 1990). آزمون لکه گذاری نقطه‌ای با استفاده از کاغذ نیتروسولوزی بریده شده در ابعاد مناسب انجام گرفت. بدین صورت که پس از غوطه‌ورسازی کاغذ در آب مقطر و خشک شدن آن، شیره گیاهی استخراج شده از نمونه‌های مشکوک و نمونه سالم (شاهد) گیاهی بر روی کاغذ بصورت لکه قرار داده شد. همچنین مسدود سازی با استفاده از بافر حائل حاوی ۲٪ BSA به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انجام شد. پس از شستشو با بافر حائل تیمار با آنتی بادی پوششی CMV (IgG-CMV) رقیق شده به نسبت ۱:۵۰۰ در بافر پوششی انجام گرفت. پس از جمع آوری آنتی بادی پوششی، شستشو مطابق مرحله قبل انجام گرفت و سپس کاندوگیت یونیورسال با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه شد و انکوباسیون مانند مرحله قبل به مدت دو ساعت انجام گرفت. در نهایت پس از شستشو، غشاء در بافر آلکالین فسفاتاز حاوی ۱۶/۵ میکرولیتر NBT و ۳۳ میکرولیتر BCIP قرار داده شد و تغییر رنگ لکه‌ها تا ۳۰ دقیقه پس از اضافه نمودن ثبت گردید.

RT-PCR

استخراج آران‌ای کل از ۲۰۰ میلی گرم بافت برگ‌های هموژنیزه شده در ۲ میلی لیتر بافر استخراج مطابق روش Rowhani et al. 1993 انجام گرفت و در نهایت آران‌ای استخراج شده در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. به منظور ردیابی موفق‌تر جدایه‌های بومی ویروس موزاییک خیار از منطقه مورد مطالعه از یک جفت آغازگر با نام های CMVCPF (مستقیم) و CMVCPR (معکوس) که بر اساس توالی جدایه‌ی بومی (AY871070) طراحی شده بودند استفاده شد.

توالی نوکلئوتیدی آغازگر مستقیم
5'AGTGGATCCATGGAAAATCTGAATCAAC
CAG3'
و معکوس
5'ACTTCGAATTC(GT)ACTGGGAGCAA(CT)
CC(AG)GAGTGGG3' بود که تکثیر قطعه ای به

مطالعات گلخانه‌ای

از گونه‌های میزبان لکه موضعی شامل *Chenopodium quinoa*, *C. Amaranticolor*, *Vigna radiata*, *V. unguiculata* برای خالص سازی بیولوژیک استفاده شد. همچنین سه گونه میزبان تکثیری شامل *Cucurbita pepo*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana rustica*، *tabacum* cv. Samsun، برای تکثیر جدایه‌ها استفاده شد. گونه‌های سلمه تره در مرحله چهار برگی، گونه‌های لوبیا چشم بلبلی و ماش پس از مرحله کوتیلدون و در مرحله دو برگی، کدو مسمایی در مرحله بروز کوتیلدون-ها و گونه‌های توتون در مرحله دو برگی کامل مایه زنی شدند. برای مایه‌زنی گیاهان از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۷/۴ به نسبت ۱ به ۵ (یک گرم بافت در ۵ میلی لیتر بافر) به هر نمونه اضافه و عصاره گیری بر روی یخ انجام گردید. عصاره حاصله بر روی سطح برگ گیاهان میزبان تکثیری مایه‌زنی شدند و پس از بروز علائم، نمونه‌های مایه زنی شده با آزمون الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی علائم CMV و اثر احتمالی ستلایت آران‌ای روی علائم ایجاد شده، نمونه‌های مثبت مطابق روش ذکر شده روی میزبان‌های لکه موضعی مایه‌زنی شدند و از تک لکه‌های ایجاد شده بر روی میزبان لکه موضعی بصورت جداگانه عصاره به دست آمد و عصاره‌ی به دست آمده مجدداً بر روی میزبان لکه موضعی مایه‌زنی شد. در نهایت به منظور تکثیر ویروس و بررسی علائم مربوط به جدایه‌ها و گروه‌بندی علائم، عصاره به دست آمده از تک لکه‌ها روی میزبان‌های تکثیری ذکر شده مایه زنی شدند.

تعیین زیرگروه جدایه‌های ویروس موزاییک خیار

برای تعیین زیرگروه جدایه‌های CMV از دو روش سرولوژیک و مولکولی استفاده شد. در روش سرولوژیک به منظور تعیین زیرگروه نمونه‌های مثبت آلوده به CMV در آزمون‌های ذکر شده، از آزمون الایزای غیرمستقیم (TAS-ELISA) (triple antibody sandwich) استفاده با آنتی بادی تک همسانه‌ای اختصاصی (DSMZ, Germany) زیرگروه I ویروس CMV استفاده شد. در این روش - چاهک هر تشتک ابتدا با استفاده از آنتی بادی پوششی تیمار شد و مراحل بعدی مطابق (Palukaitis, et al., 1992) ادامه پیدا کرد. در روش مولکولی قطعات تکثیرشده در RT-PCR با استفاده از

آنزیم *MspI* (Fermentas, Lithuania) مطابق

دستورالعمل شرکت سازنده برای تعیین زیرگروه CMV برش داده شدند. تقریباً ۱۰۰ نانوگرم از هر محصول PCR در ۲۰ میکرولیتر از بافر آنزیم برشی 1X محتوی 100 ng/ μ l bovine serum albumin (BSA) و ۵ واحد آنزیم برش داده شد. واکنش به مدت ۲ الی ۳ ساعت در دمای ۳۷°C انجام شد. سپس، محصول برش در ژل آگارز ۱/۸٪ مطابق روش ذکر شده الکتروفورز شد.

ردیابی ستلایت آران‌ای ویروس موزاییک خیار

به منظور استخراج آران‌ای کل جهت ردیابی ستلایت آران‌ای از نمونه‌های مثبت مایه‌زنی شده بر روی میزبان‌های تکثیری استخراج آران‌ای از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت آلوده با استفاده از فنول و کلروفرم بر اساس روش (Sokhandan Bashir et al., 2006) انجام گرفت. جهت انجام آر تی پی سی آر از یک جفت آغازگر اختصاصی ستلایت آران‌ای CMV با نام‌های CMV sat F (آغازگر مستقیم) و CMV sat R استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی آغازگر مستقیم 5' GACGAATTCGTTTTGTTGAT (AT)T(AG) GAGAATT3' و معکوس 5' GACAAGCTTGGGTCCTG(GT)AGACGAAT3' بود که توسط این آغازگرها انتظار می‌رفت قطعه‌ای به طول حدود ۳۶۰ جفت باز در واکنش پی سی آر تکثیر یابد. آزمون آر تی مطابق روش ذکر شده با استفاده از آغازگر معکوس ستلایت آران‌ای CMV در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه شد که حاوی ۲ میکرولیتر بافر PCR 10x، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ پیکومول آغازگر مستقیم و ۱/۲۵ واحد *Taq DNA polymerase* (Fermentas, Lithuania) بود. سپس، ۵ میکرولیتر فرآورده حاصل از واکنش سنتز رشته cDNA به این ترکیب اضافه گردید. برنامه PCR شامل یک سیکل ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، ۳۵ سیکل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۸°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و سیکل نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه اجرا شد. به منظور بررسی نتایج حاصل از واکنش RT-PCR، ۵ میکرولیتر فرآورده حاصل از هر واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید در بافر X TBE ۰/۵ الکتروفورز گردید. الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت

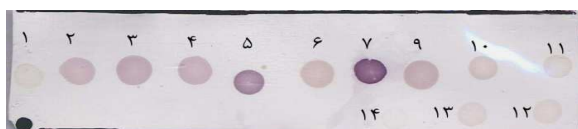
ردیابی ویروس موزاییک خیار

با استفاده از آزمون دیبا و DAS-ELISA تعداد ۸۲ نمونه مثبت آلوده به CMV از میزبان‌های مختلف شناسایی شد (شکل ۱). همانطور که ذکر شد در آزمون دیبا از کاغذ نیتروسلولوزی استفاده شد و تغییر رنگ محل قرار دادن شیره گیاهی بر روی کاغذ در مقایسه با نمونه شاهد مثبت و منفی آلودگی به ویروس موزاییک خیار را نشان می‌داد. نتایج در آزمون DAS-ELISA نیز بصورت تغییر رنگ چاهک‌های تشتک الایزا به رنگ زرد قابل مشاهده بود. همه نمونه‌های مثبت در آزمون دیبا در آزمون DAS-ELISA نیز مثبت بودند و علاوه بر نمونه‌های مثبت در هر دو آزمون تعدادی از نمونه‌ها نیز تنها با الایزا مورد ردیابی قرار گرفتند.

و شدت جریان ۲۴ میلی آمپر به مدت حدود یک و نیم ساعت انجام شد و نوارهای تکثیر یافته توسط دستگاه عکسبرداری از ژل (Biomerta, Qiagen) و نور ماورابنفش بررسی شد.

نتایج و بحث

عمده‌ترین علائم در نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل موزاییک شدید، موزاییک معمولی، پیسک، پیچیدگی برگ، تاول‌های برجسته روی برگ و میوه، کوتولگی بوته، کوتاه شدن فاصله میان گره‌ها و بد شکلی میوه بود. در این تحقیق سعی شد از میزبان‌های مختلف ویروس موزاییک خیار مخصوصاً گوجه‌فرنگی نمونه برداری انجام گیرد زیرا بطور طبیعی ستلایت آران‌ای در میزبان گوجه‌فرنگی و توتون تکثیر زیادی دارد.

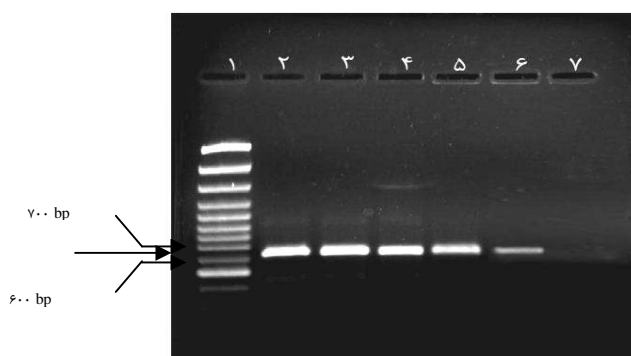


شکل شماره ۱ بخشی از نتایج آزمون دیبا

۱: کنترل منفی، ۲: کنترل مثبت، ۳ تا ۱۴: نمونه‌های دارای علائم مشکوک به CMV

این آزمون در ۳۹ نمونه، قطعه‌ی مورد انتظار تکثیر یافت (شکل ۲).

یک قطعه مورد انتظار به طول ۶۷۵ جفت باز مربوط به ژن پروتئین پوششی CMV در آر‌تی‌پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد. با استفاده از



شکل شماره ۲ - الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد ژ

۱: مارکر DNA 100bp Ladder Plus ، ۲ تا ۵: قطعات دی-ان‌ای افزایش یافته در RT-PCR با آغازگرهای منطبق بر منطقه رمز کننده پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار.
۶: شاهد مثبت ۷: شاهد منفی

پس از مایه‌زنی قابل مشاهده بودند (شکل ۳). علائم ایجاد شده روی میزبانان لکه موضعی با گذشت ۲۰ تا ۳۰ روز نیز سیستمیک نشدند. علائم نسبتاً شدید روی

مطالعات گلخانه‌ای

لکه‌های موضعی بر روی برگ‌های *C. quinoa* و *C. amaranticolor* حدود ۵ تا ۱۰ روز

روی برگ گوجه‌فرنگی شدند. به منظور بررسی علائم، گروه‌بندی علائم صورت گرفت و نتایج نشان داد که هفت جدایه در گروه تولید کلروز روی برگ توتون قرار می‌گیرند که از علائم بارز ستلایت آران‌ای ویروس موزاییک خیار می‌باشند (شکل ۳).

C. pepo ۴ تا ۶ روز پس از مایه‌زنی لکه‌های ایجاد شده روی میزبان لکه موضعی قابل مشاهده بود. علائم روی گونه‌های توتون نسبتاً با تاخیر دیده شد (حدود ۱۲ تا ۲۰ روز پس از مایه‌زنی) و علائم روی *N. tabacum* cv. Samsun شدیدتر از علائم ایجاد شده روی *N. rustica* بود. برخی از جدایه‌ها نیز سبب ایجاد علائم بندکفشی

شکل شماره ۳- علائم جدایه CMV دارای ستلایت آران‌ای غیرنکروز کننده بر روی میزبان‌های لکه موضعی و تکثیری از چپ به راست (لکه های موضعی کلروزه بر روی سلمه تره *C. amaranticolor*، کلروز بر روی برگ توتون *N. tabacum* cv. Samsun، کلروز همراه با تاول در برگ *N. tabacum* موزاییک خفیف و تغییر شکل برگ بر روی برگ *L. esculentum* cv. Rutgers

تعیین زیرگروه جدایه‌های CMV

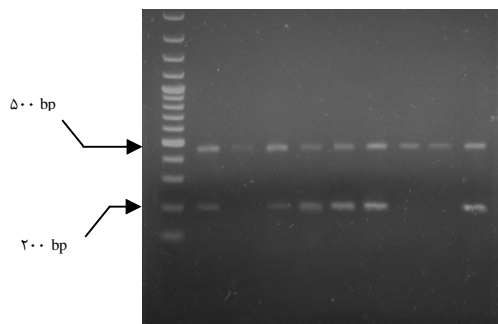
تعیین زیرگروه برخی جدایه‌های مثبت در آزمون‌های سرولوژیک توسط آزمون TAS-ELISA انجام شد. آزمون TAS-ELISA با استفاده از anti-CMV subgroup I به عنوان آنتی بادی ثانویه بر روی نمونه‌های مثبت انجام شد و همه نمونه‌ها در این آزمون در زیرگروه I قرار گرفتند. بدلیل غالبیت کلی زیرگروه I در CMV این آزمون با استفاده از آنتی بادی زیرگروه I یک انجام شد علاوه بر روش فوق بر روی برخی از نمونه‌های مثبت دیگر برش آنزیمی با استفاده از آنزیم *MspI* انجام شد که نتایج نشان داد جدایه‌های مورد بررسی با توجه به تولید دو باند ۴۵۰ و حدود ۲۲۰ جفت بازی در زیرگروه یک قرار می‌گیرند. نتایج الکتروفورز محمولات برش با آنزیم بر روی ژل آگارز ۱.۸٪ قابل مشاهده است (شکل ۴).

ردیابی ستلایت آران‌ای CMV با آرتی پی سی آر

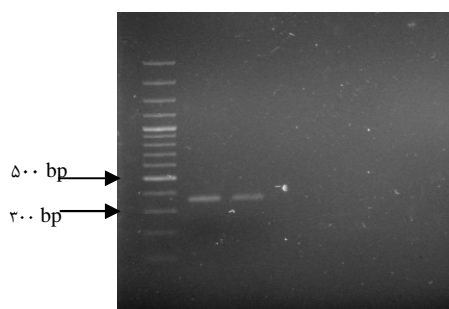
در این آزمون از نمونه‌هایی CMV استفاده شد که در آزمون‌های سرولوژیک و آزمون آرتی پی سی آر مثبت ارزیابی شده بودند. برای اطمینان بیشتر، از چند نمونه

منفی که در آزمون‌های ذکر شده منفی ارزیابی شده بودند نیز استفاده شد. قابل ذکر است که به منظور ردیابی ستلایت آران‌ای CMV از دو روش استخراج آران‌ای استفاده شد. در مرحله اول از روش روحانی و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شد و به منظور بهینه سازی استخراج ستلایت آران‌ای از روش فنول-کلروفورم استفاده گردید که در روش اخیر با توجه به نتایج، کیفیت و مقدار آران‌ای استخراج شده نسبت به روش قبلی بیشتر بود و در آران‌ای استخراج شده با این روش ستلایت ردیابی شد. در این آزمون از cDNA های سنتز شده ستلایت آران‌ای که در طی واکنش نسخه‌برداری معکوس سنتز شده بودند بعنوان الگو در PCR به منظور ردیابی قطعه‌ی حدود ۳۶۰ bp ستلایت آران‌ای CMV مورد استفاده قرار گرفتند. طی واکنش‌های متعدد انجام یافته، از جدایه‌هایی که بر روی توتون کلروز ایجاد کرد و علائم موزاییک خفیف و تغییر شکل برگ گوجه‌فرنگی را بوجود آورد قطعه‌ای در حدود ۳۶۰ bp سنتز شد (شکل ۵) که اندازه این قطعه با اندازه قطعه

مورد انتظار مطابقت داشت. در ضمن، چنین قطعه ای از شاهد سالم بدست نیامد.



شکل شماره ۴ - نقشه برشی *MspI* قطعات تکثیر یافته با آغازگرهای منطبق بر منطقه رمزکننده پروتئین پوششی CMV ژل آگارز ۱/۸ درصد. ۱: مارکر DNA 100bp Plus Ladder ۲ تا ۱۰: هضم قطعات دی‌ان‌ای تکثیر یافته با آغازگرهای منطبق بر منطقه رمزکننده پروتئین پوششی CMV توسط آنزیم *MspI*



شکل شماره ۵ - الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۸ درصد قطعات دی‌ان‌ای افزایش یافته در RT-PCR با آغازگرهای ردیابی کننده ستلایت آران‌ای ویروس موزاییک خیار
۱: مارکر DNA 100bp Ladder Plus ۲: شاهد بت (پلاسمید دارای ستلایت آران‌ای) ۳: قطعه دی‌ان‌ای تکثیر یافته در RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ستلایت آران‌ای

علائم ممکن است ناشی از فاکتورهای زیادی باشد که یکی از آنها آلودگی همزمان و مخلوط این ویروس با سایر ویروس‌ها می باشد که در برخی از موارد سبب

برخی از علائم ایجاد شده توسط CMV مانند موزاییک تقریباً در همه جدایه‌ها قابل مشاهده است (Sokhandan Bashir et al., 2008). تفاوت و گستردگی

کلروز بر روی توتون می‌شود. همچنین، بطور کلی تکثیر ستلایت آران‌ای در توتون و گوجه‌فرنگی بیشتر از تکثیر آن در سایر میزبانها می‌باشد. اکثر علائم ایجاد شده پس از مایه زنی روی توتون شامل انواع موزاییک خفیف تا شدید بود و فقط در یک مورد باریک شدن و تغییر شکل شدید برگ در توتون مشاهده شد. در نهایت با استفاده از روش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ستلایت آران‌ای در یکی از جدایه‌ها ستلایت آران‌ای ردیابی شد (شکل ۵).

از سایر عواملی که بر روی علائم ایجاد شده توسط CMV اثر دارد می‌توان به ژن 2b و ژن تولید کننده پوشش پروتئینی ویروس اشاره کرد که ژن 2b در سیستمیک شدن CMV و بازدارندگی دفاع میزبانی در جهت تشدید علائم ویروسی نقش ایفا می‌کند (Wang et al., 2002) و ژن کد کننده پروتئین پوششی در تشدید علائم و نیز در انتقال ویروس توسط ناقلین تأثیر دارد. جدایه‌ای از CMV که ستلایت آران‌ای با روش RT-PCR برای آن ردیابی شد علائم موزاییک زرد و تا حدودی نقش خطی روی *N. tabacum* cv. Samsun نشان داد (شکل ۳). تحقیقات سایرین نیز نشان داده که مایه‌زنی جدایه‌ای از ویروس موزاییک خیار که دارای ستلایت آران‌ای است باعث بوجود آمدن زردی و کلروز در گیاه توتون می‌شود (Sato et al., 2000). سایر جدایه‌های CMV فاقد ستلایت آران‌ای، تغییر شکل برگ و تاویل بر روی برگ توتون را موجب شدند.

از طرفی ستلایت آران‌ای اکثراً همراه با جدایه‌های زیرگروه II ویروس موزاییک خیار هستند و وجود آن در جدایه‌های زیر گروه I کم گزارش شده است. از زیر گروه I ستلایت آران‌ای همراه با Fny-CMV گزارش شده است (Sato et al., 2000). نتایج محققین قبلی در بررسی روابط فیلوژنتیکی (Sokhandan Bashir et al., 2006; Sokhandan Bashir et al., 2008) جدایه‌های CMV از شمالغرب نشان داده است که جدایه‌های ردیابی شده بصورت یک گروه مستقل در کنار گروهی قرار می‌گیرند که Fny-CMV نیز در آن گروه قرار دارد. این نتایج احتمال حضور ستلایت آران‌ای در تعداد دیگری از جدایه‌های شمالغرب کشور را بیشتر تقویت می‌کند.

تشدید علائم یا تضعیف علائم می‌شود (Sokhandan Bashir et al., 2006; Sokhandan Bashir et al., 2008). یکی از عوامل موثر دیگر بر روی علائم، وجود ستلایت آران‌ای همراه با CMV است که با توجه به اثر سه فاکتور میزبان، جدایه ویروس کمک کننده و نوع ستلایت آران‌ای علائم ایجاد شده متفاوت و متنوع است (Palukaitis and Garcia-Arenal 2003). ردیابی ویروس کمک کننده ستلایت آران‌ای CMV در ابتدا با روش دیبا صورت گرفت. این روش سرولوژیک به منظور ردیابی سریعتر و بیشتر ویروس کمک کننده انجام شد و آزمون الایزا برای تایید این آزمون انجام گرفت. محققین نشان داده‌اند که روشهای سرولوژیک بویژه الایزا از معمولترین آزمون‌هایی هستند که برای ردیابی و تشخیص جدایه‌های CMV به کار می‌رود (Yu et al., 2005). با توجه به رفتار متفاوت جدایه‌ها روی گیاهان میزبان تکثیری بخصوص *N. tabacum* و گوجه‌فرنگی و اثر احتمالی ستلایت آران‌ای بر علائم ایجاد شده توسط CMV گروه بندی علائم بر روی میزبانهای مختلف تکثیری این ویروس انجام شد. با توجه به اینکه ستلایت آران‌ای CMV باعث کلروز بر روی توتون می‌شود (Palukaitis and Garcia-Arenal 2003) هفت جدایه باعث بوجود آمدن کلروز بر روی توتون شدند که احتمالاً ناشی از اثر احتمالی ستلایت آران‌ای بود. بروز کلروز در اثر وجود ستلایت آران‌ای در روی توتون در منابع مختلف گزارش شده است (Palukaitis and Garcia-Arenal 1996; Roossinck, 1996; Simon et al. 2004; Montasser et al., 1991). میزبان‌های تکثیری ویروس برای چندین منظور مورد استفاده قرار گرفتند که در وهله اول جهت تکثیر جدایه جمع‌آوری شده بود و همچنین همراه با میزبان‌های لکه موضعی برای خالص سازی بیولوژیکی جدایه‌ها استفاده شدند. همچنین با توجه به اینکه یکی از فاکتورهای اساسی و مهم در اثر ستلایت آران‌ای بر روی علائم ویروس کمک کننده، نوع میزبان ویروس است از توتون و گوجه‌فرنگی استفاده گردید زیرا جدایه‌ای از CMV که دارای ستلایت آران‌ای نکروز کننده (necrogenic satellite RNA) است باعث بوجود آمدن نکروز در گوجه‌فرنگی می‌شود و جدایه‌ای که دارای ستلایت آران‌ای (non-necrogenic satellite RNA) است سبب علائم

نتیجه گیری کلی

مولکولی ردیابی شدند. همچنین ستلایت آران‌ای ویروس موزاییک خیار با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نیز ردیابی شد و با استفاده از مایه‌زنی‌های متعدد غیر نکروز کنندگی جدایه مورد نظر بررسی شد.

در این تحقیق جدایه‌های مختلف ویروس موزاییک خیار در برخی از مناطق استان‌های آذربایجان شرقی و غربی و اردبیل با استفاده از روش‌های سرولوژیک و

REFERENCES

1. Ball, E.M. 1990. Agar double diffusion, plates (Ouchterlony): viruses. Pp. 111-120, In: R. Hampton, E, Ball and S. DeBoer (Eds.), Serological Methods for Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, A Laboratory Manual. APS Press, Minnesota
2. Clark, M.F., and Adams, A.N. 1977. Characterization of the microplate methods of enzyme-linked Immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
3. Du, Q. Duan C. Zhong Z. Fang Y. Fang R. Xie Q. and Guo H. 2007. DCL4 target cucumber mosaic virus satellite RNA at novel secondary structures. *Journal of Virology*, 81(17), 9142-9151.
4. Escribe, F., Fraile, A., and Garcia-Arenal, F. 2003. The evolution of virulence in a plant virus. *Evolution*, 57, 755-765.
5. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff J., Desselberger, U., and Ball, L. A. 2005. *Virus taxonomy*. Academic Press, 1299pp.
6. Liao, Q., Zhu, L., Du, Z., Zeng, R., Feng, J., and Chen, J. 2007. Satellite RNA-mediated reduction of cucumber mosaic virus genomic RNAs accumulation in *Nicotiana tabacum*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39, 217-223.
7. Montasser, M. S., Tousignant, M. E., and Kaper, J. M. 1991. Satellite-mediate protection of tomato against cucumber mosaic virus: Greenhouse experiments and simulated epidemic condition in the field. *Plant Disease*, 75, 86-92.
8. Palukaitis, P., Garcia-Arenal, F. 2003. Cucumoviruses. *Advances Virus Research*, 62, 241-323.
9. Palukaitis P. and Roossinck M. J. 1996. Spontaneous change of benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotechnology*, 14, 1264-1268
10. Palukaitis, P., Roossinck, R. G. Dietzgen and R. I. B. Francki. 1992. Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, 41, 281-348
11. Rowhani, A., Chay, C., Golino, D. A., and Falk, W. 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83, 749-753.
12. Sato, H., Hase, S., Sugiyama, M., Karasawa, A., Suzuki, T., Takahashi, H. and Ehra, Y. 2000. A novel satellite RNA cucumber mosaic virus induces unique line-pattern mosaic symptoms in tobacco. *Journal of Phytopathology*, 148, 47-51.
13. Simon, A. E., Roossinck, M. J., Havelda, Z. 2004. Plant virus satellite and defective interfering RNAs: New paradigms for a new century. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 415-437.
14. Sokhandan bashir, N., Rasaei Kalhor, M., and Nourinejad zarghani, S. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes*. 32, 277-288
15. Sokhandan Bashir, N., Nematollahi S., and Torabi, E. 2008. Cucumber mosaic virus subgroup IA frequently occurs in the northwest Iran. *Acta Virologica*. 52, 237 - 242.
16. Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P., and Gal-On, A. 2002. Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology*, 92, 51-58.
17. Yu, C., Wu, j., and Zhou, X. 2005. Detection and subgrouping of cucumber mosaic virus isolated by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal of Virologica Methods*, 123, 155-161.