آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۶۴، شماره‌های ۱ و ۲، بهمن ۱۳۷۵

بررسی امکان وجود اسید ریبونوکلئیک های وابسته (اقماری) در جدایه های ایرانی ویروس موزائیک خیار *

Possible Presesnce of Satellite RNA in the
Iranian Isolates of Cucumber Mosaic Cucumovirus

یزدان فضلعلی[۱]، علی آهون‌منش[۲]، محمدرضا حاجی‌مراد[۳] و علیرضا کریمی[۳]
دانشکده کشاورزی تربیت مدرس[۱]، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان[۲]، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی[۳]

چکیده

سی وپنج جدایه ویروس موزائیک خیار (CMV) از چندین گونه گیاهی (عمدتا گوجه فرنگی) از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری و از نظر وجود اسید ریبونوکلئیک های وابسته (Satellite RNAs) مورد بررسی قرار گرفتند. این جدایه ها حداقل دو بار متوالی روی گیاه تنباکو رقم هاوانا (*Nicotiana tabacum* cv. Havana) مایه زنی برگشتی شدند. نمونه های آلوده همراه با گیاه سالم (شاهد منفی) عصاره گیری و بر روی غشاء نایلونی نقطه گذاری و به ایتالیا و امریکا ارسال گردیدند. سایر مراحل هیبریداسیون پس از نقطه گذاری نژاد CMV-S (شاهد مثبت واجد اسید ریبونوکلئیک وابسته) و با استفاده از اسید ریبونوکلئیک مکمل نشاندار شده انجام گرفت. نتایج بدست آمده حاکی از فقدان هر گونه اسید ریبونوکلئیک وابسته در جدایه های مزبور بود. عدم وجود اسید ریبونوکلئیک وابسته در جدایه‌های طبیعی مورد آزمایش ایران (که بررسی منابع موجود حاکی از نادر بودن اسید ریبونوکلئیک وابسته در جدایه های طبیعی نیز این موضوع را تائید می‌نماید) نشان دهندهٔ مطلوب بودن شرایط طبیعی مزارع ایران برای این ویروس و نامساعد بودن این شرایط برای همانندسازی و تکثیر اسید ریبونوکلئیک‌های وابسته ویروس موزائیک خیار میباشد.

مقدمه

براساس تعریف، اسید ریبونوکلئیک وابسته (Satellite RNA) نوعی اسید ریبونوکلئیک است که برای تکثیر و قرار گرفتن در داخل پیکره ویروس نیازمند ویروس همراه (کمکی)

* این مقاله بصورت قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول استخراج شده است.

(Helper virus) بوده و از لحاظ توالی نوکلئوتیدی شباهت قابل توجهی با ژنوم ویروس کمکی ندارد.

تعریف فوق، اسید ریبونوکلئیک وابسته را از سایر اسید ریبونوکلئیک‌های غیر ژنومی متمایز میسازد (Liu & cooper, 1994; Murant & Mayo 1982; Franck, 1985; Palukaitis *et al*, 1992 Roossinck *et al*, 1992). اسید ریبونوکلئیک های وابسته در بیش از سی ویروس گیاهی متعلق به دوازده گروه ویروسی گزارش شده اند (Liu & cooper, 1994).

ویروس موزائیک خیار (Cucumber Mosaic Cucumovirus) که دارای ژنوم سه قسمتی است، علاوه بر اسید ریبونوکلئیک های ژنومی و اسید ریبونوکلیئک زیر ژنومی (Subgenomic RNA) ممکن است اسید ریبونوکلیئک های اضافی دیگری از قبیل اسید ریبونوکلئیک‌های وابسته و یا RNA-4a, RNA-6, RNA-5 نیز به همراه داشته باشد (Palukaitis *et al*, 1992).

در سال ۱۹۷۲ میلادی در ناحیه آلزاس (Alsace) فرانسه نوعی بیماری تحت عنوان نکروز کشنده در گوجه فرنگی به صورت فراگیر تظاهر نمود که عامل آن نژادی از CMV همراه با نوعی اسید ریبونوکلئیک وابسته تعیین گردید (Kaper & Collmer, 1986). از آن زمان تاکنون انواع مختلفی از اسید ریبونوکلئیک وابسته همراه با CMV گزارش گردیده است که به بیش از ۳۰ رسیده است (Liu & cooper, 1994).

در سال ۱۹۷۸ مشخص گردید که اسید ریبونوکلئیک های وابسته همراه با CMV برای همانندسازی و قرار گرفتن در داخل پیکره ویروس نیازمند به CMV بوده و روی بیماریزائی CMV اثر میگذارند و این تاثیر ممکن است با شدت یا کاهش همانندسازی CMV همراه باشد. (Palukaitis *et al*, 1992; Collmer & Howell, 1992; Liu & Cooper, 1994) اغلب اسید ریبونوکلئیک‌های وابسته گزارش شده از ویروس موزائیک خیار دارای ۳۳۲ تا ۳۴۲ نوکلئوتید هستند درحالیکه پنج اسید ریبونوکلئیک وابسته این ویروس که از ژاپن گزارش شده اند دارای ۳۶۹ تا ۳۸۶ نوکلئوتید بوده‌اند (Palukaitis *et al*, 1992; Liu & Cooper, 1994).

اکثر اسید ریبونوکلئیک های وابسته CMV در گیاهان خانواده بادنجانیان (Solanaceae) همانندسازی نموده و تکثیر میشوند، ولی همانندسازی آنها در گیاهان خانواده کدوئیان همراه با اکثر نژادهای CMV همواره ضعیف گزارش شده است (Roossink *et al*, 1992).

از آنجا که اسید ریبونوکلئیک های وابسته شناخته شده CMV بر روی علائم ناشی از این ویروس تاثیر دارند لذا در حفاظت- تقاطعی (Cross protection) گیاهان در برابر CMV از اسید ریبونوکلیئک های وابسته کاهش دهنده علائم استفاده شده است (Liu & cooper, 1994; Roossink *et al*, 1992).

این تحقیق، نظر به اهمیت شناسائی و دستیابی به اسید ریبونوکلئیک‌های وابسته CMV و امکان بکارگیری آنها برای کنترل CMV در محصولات مختلف (بویژه گوجه فرنگی)، صورت

گرفته است.

مواد و روشها

۱- نمونه برداری

نمونه های گیاهی مشکوک به آلودگی CMV از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری و به گلخانه منتقل شدند و با استفاده از پودر کاربوراندوم و بافر عصاره‌گیری (بافرفسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/۲) روی گیاهان آزمون *N. rustica, N. glutinosa, Nicotiana tabacum* cv. Xanthi مایه‌کوبی شدند.

۲- سرولوژی

۱-۲- آزمون نشت دو طرفه در آگار

تعداد سی و پنج نمونه در آزمایش نشت دو طرفه در آگار که با آنتی سرم CMV-LC از بخش ویروس شناسی دانشگاه آدلاید استرالیا (آنتی سرمهای اهدائی دکتر محمدرضا حاجی‌مراد) واکنش مثبت دادند، انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲- همچنین کلیه جدایه‌های CMV در برابر آنتی سرمهای مربوط به CMV و ToMV توسط روش سرولوژیکی انتقال نقطه ای (Dot blot) بررسی شدند (Hibi & Saito, 1985).

۳- تفکیک نمونه های CMV از ویروسهای دیگر همراه با آن

برای جداکردن CMV از ویروس موزائیک گوجه فرنگی، نمونه ها، حداقل سه بار متوالی از *N. glutinosa* عبور داده شدند و برای تفکیک ویروسهای مخلوط احتمالی دیگر، نمونه ها با استفاده از باقلا (رقم های الجزایری و برکت) و ماش تک لکه گیری گردیده و مجدداً از طریق نشت دو طرفه در آگار بطور مکرر آزمایش شدند.

۴- بررسی اسید نوکلئیک های وابسته احتمالی

برای تکثیر اسید نوکلئیک های وابسته احتمالی کلیه جدایه ها لااقل دوبار متوالی از *N. tabacum* cv. Havana عبور داده شدند و سپس جهت بررسی وجود آنها از روش هیبریداسیون اسید ریبونوکلئیک بصورت انتقال نقطه ای استفاده شد که مراحل آن بشرح زیر بود:

۱-۴- از غشاء نایلونی (از شرکت Bochringer Bioproducts) در شرایط استریل چهار قطعه به ابعاد ۱۴×۷ سانتی متر بریده شد، دو قطعه از آنها بشکل ۳۶ خانه و دوقطعه بصورت ۳۲ خانه طراحی شدند.

۲-۴- استخراج به روش Gallitelli *et al*, 1991

در این روش از محلول ۵۰ میلی مولار هیدوروکسیدسدیم (NaOH) حاوی ۲/۵ میلی مول EDTA حاوی برم‌فنل‌بلو برای عصاره‌گیری استفاده شد. از گیاهان تنباکوی رقم هاوانا واجد علائم، ۰/۱ گرم برگ با افزودن ۳۰۰ میکرولیتر از محلول فوق عصاره گیری شد و ازبرگ گیاهان

سالم بعنوان شاهد استفاده گردید. از عصاره هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر بمدت ده دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس از هر نمونه ده میکرولیتر در روی بلاتهای مورد نظر (در دوتکرار) نقطه گذاری گردیدند.

۳-۴- استخراج به روش Palukaitis *et al*, 1985

در این روش از بافر عصاره گیری AMESS استفاده شد. برای تهیه این بافر، به محلول نیم مولار استات سدیم pH=۶/۷، ده میلی مول کلرور منیزیم، یک میلی مول کلروسدیم، ۲۰ درصد (حجم به حجم) اتانل و ۳ درصد (وزن به وزن) سدیم دو دسیل سولفات (SDS) و نیم گرم بروموفنل بلو اضافه گردید.

مقدار ۰/۲ گرم برگ تنباکوی هاوانای دارای علائم سیستمیک از هر نمونه در ۳۰۰ میکرولیتر از بافر ذکر شده عصاره گیری بعمل آمد. از برگ گیاه سالم نیز بعنوان شاهد بترتیب فوق عصاره گیری شد.

۲۰۰ میکرولیتر از عصاره هر نمونه برداشت و مدت ۳۰ ثانیه به هم زده شد و سپس بمدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. دو برابر حجم فاز مایع بالایی به هر یک از نمونه‌ها کلروفرم اضافه و مجددا ۳۰ ثانیه بهم زده شدند و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در ده هزار دور در دقیقه در دمای اطاق، سانتریفوژ شدند. سه فاز در لوله تشکیل گردید که از فاز بالایی هر نمونه (محتوی اسیدریبونوکلئیک) پنج میکرولیتر روی غشاء نایلونی نقطه گذاری گردید.

۴-۴- هیبرید کردن اسید ریبونوکلئیک

غشاهای نایلونی نقطه گذاری شده با اسید ریبونوکلئیک های استخراج شده از گیاهان آلوده برای دکتر گالیتلی در ایتالیا (۱) و دکتر روسینگ (۲) در امریکا ارسال و هیبریداسیون با پروب اسید ریبونوکلئیک های منفی (Minus sense RNA) توسط آنها و پروب DNA مکمل (Complementary DNA) انجام شد.

از CMV-S واجد اسید ریبونوکلئیک های وابسته (اقماری) بعنوان شاهد مثبت در بلات ها استفاده شد. بلات ها پس از هیبریداسیون با پروب دارای فسفر ۳۲ خشک و اتورادیوگرافی شده و نتایج به همراه فیلم‌های ظاهر شده از ایتالیا ونتایج مشابه از آمریکا دریافت گردید.

نتایج

۱- آزمون سرولوژیکی نشت دو طرفه آگار

در این آزمون ترکیبهای مختلف بافر ژل و بافر عصاره مورد مقایسه قرار گرفت که از بین آنها بهترین واکنش در ژل متشکل از ۰/۷۵ گرم آگارز و ۰/۸۵ گرم NaCl و بافرفسفات ۰/۰۱ مولار

Dr. D. Gallitelli, Dipartimento protezione Delle piante Dalle Malattie, University of Bari, Italy

Dr. M. T. Roossinck, Plant Biology Division, The Noble Foundation, Ardomoro, oklahoma 73402, U.S.A