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

۲-۱- 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:

۴-۱- 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.

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

در این روش از محلول ۵۰ میلی مولار هیدورکسیدسدیم (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 برومونفنل 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

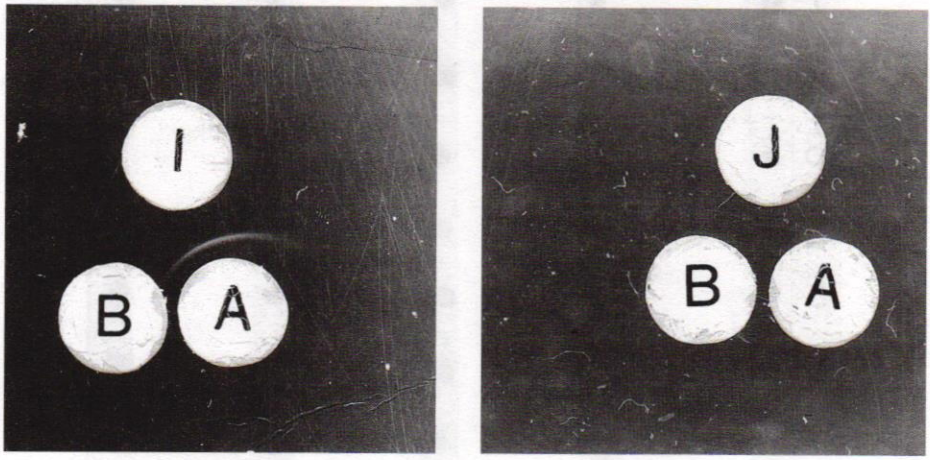
۱- آزمون سرولوژیکی نشت دو طرفه آگار

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

(pH=۷/۲) همراه با بافرفسفات ۰/۵ مولار (pH=۷/۱) بعنوان بافر عصاره گیری حاصل شد. آزمایشات متعددی با آنتی سرمهای CMV و ToMV و AMV بعمل آمد، که تمام جدایه‌ها فقط در مقابل آنتی‌سرم CMV-LC واکنش مثبت (خط رسوبی) نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱- نمونه‌ای از واکنش سی و پنج جدایه CMV در آزمون نشت دوطرفه در آگار

I- عصاره آلوده به یکی از جدایه‌های CMV

J- عصاره گیاه سالم

A- آنتی‌سرم CMV

B- آنتی‌سرم ToMV

Fig. 1. Reaction of a sample of the 35 isolates of CMV

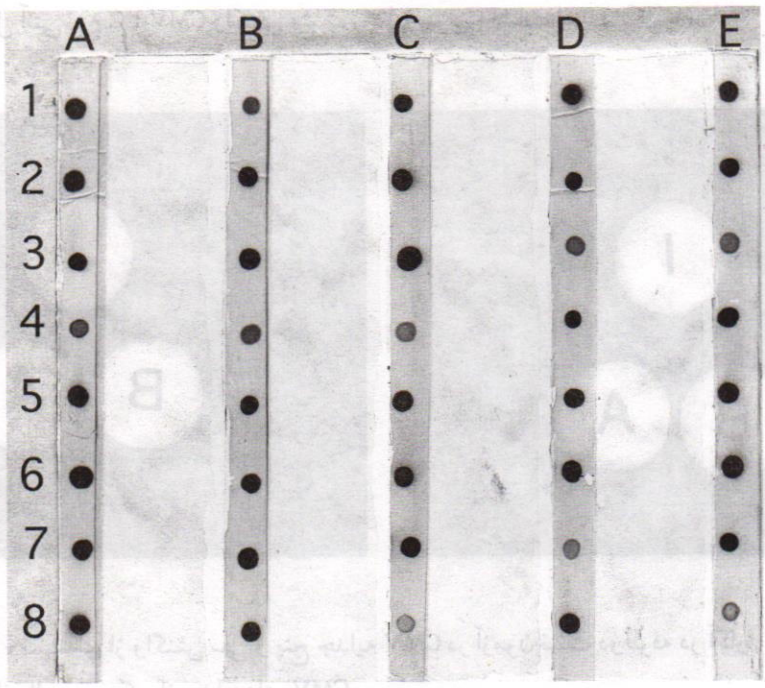
In Agar double diffusion test.

I. CMV infected plant extract.

J. Non infected plant extract.

A. CMV Antiserum.

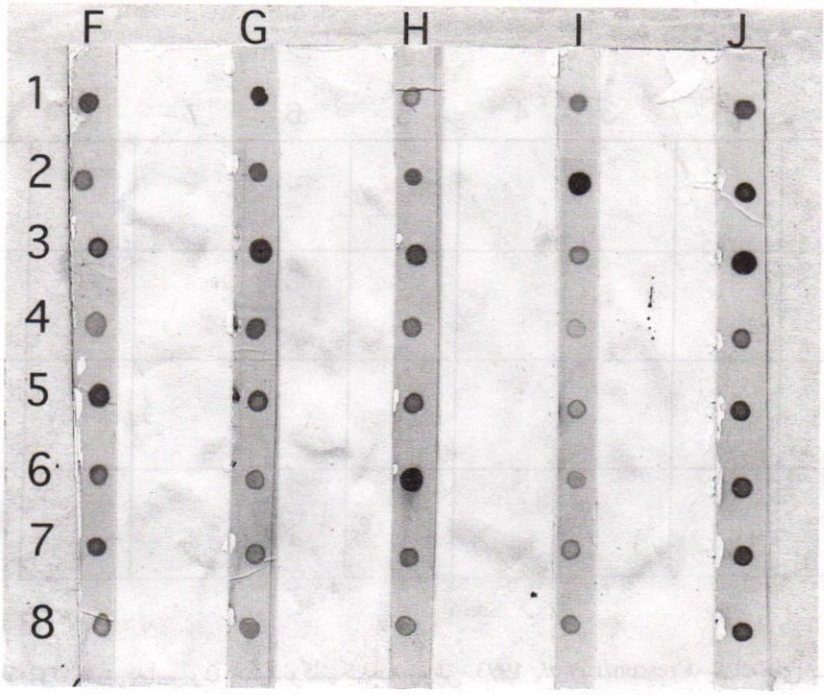
B. ToMV Antiserum.



شکل ۱-۲ آزمون سرلوژیکی بلات نقطه‌ای، CMV و آنتی بادی تولید شده علیه گاماگلوبولین آنتی سرم خرگوش بر روی غشای نیتروسلولوزی نقطه گذاری شده. نقاط تیره واکنش مثبت و نقاط بیرنگ واکنش منفی نمونه‌های C4، C8، D7، و E8، شاهد منفی.

Fig. 2-1. Dot-blot assay-CMV Antiserum. C4,C8,D7,E8 are negative control, the other dark blots are positive.

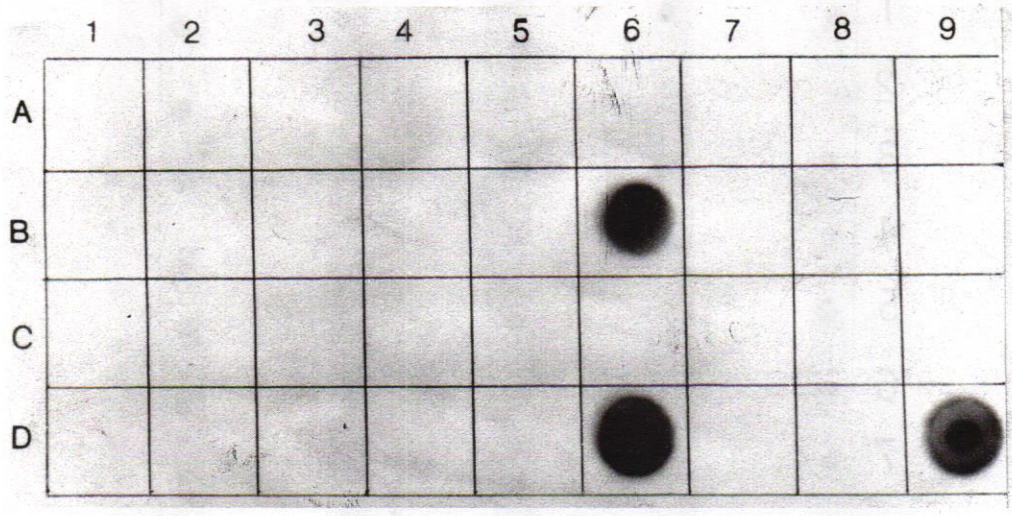
Blots	Samples	Blots	Samples	Blots	Samples	Blots	Samples	Blots	Samples
A1	CMV-LN	B1	CMV-LD5	C1	CMV-LD4	D1	CMV-LK3	E1	CMV-U2
A2	CMV-LK1	B2	CMV-L1	C2	CMV-LH2	D2	CMV-LD1	E2	CMV-PH
A3	CMV-LK2	B3	CMV-LA2	C3	CMV-LS1	D3	CMV-PT	E3	TOMV+
A4	CMV-PH	B4	CMV-LT6	C4	*N.t.* Glutinosa	D4	CMV-SP	E4	CMV-LA1
A5	CMV-LT2	B5	CMV-LD3	C5	CMV-LJ	D5	CMV+	E5	CMV-U3
A6	CMV-LT4	B6	CMV-LT8	C6	CMV-LF3	D6	CMV-SN	E6	CMV-LF4
A7	CMV-TN	B7	CMV-LS2	C7	CMV+	D7	*N.t.* Xanthi	E7	CMV-LD2
A8	CMV-LC	B8	CMV-LT5	C8	*N.t.* Havana	D8	CMV-LT7	E8	*N.rustica*



شکل ۲-۲ آزمون سرلوژیکی بلات نقطه‌ای، پس از اضافه کردن آنتی سرم ToMV و آنتی بادی تولید شده علیه گاماگلوبولین خرگوش بر روی غشای نیتروسلولوزی نقطه گذاری شده. نقاط تیره واکنش مثبت و نقاط بیرنگ واکنش منفی.

Fig. 2-2. Dot-blot assay-ToMV Antiserum, dark blots are positive, coulorless blots are negative.

Blots	Samples	Blots	Samples	Blots	Samples	Blots	Samples	Blots	Samples
F1	CMV-LN	G1	CMV-LD5	H1	CMV-LD4	I1	CMV-LK3	J1	CMV-U2
F2	CMV-LK1	G2	CMV-L1	H2	CMV-LH2	I2	CMV-LD1	J2	CMV-PH
F3	CMV-LK2	G3	CMV-LA2	H3	CMV-LS1	I3	CMV-PT	J3	TOMV+
F4	CMV-PH	G4	CMV-LT6	H4	*N.t.* Glutinosa	I4	CMV-SP	J4	CMV-LA1
F5	CMV-LT2	G5	CMV-LD3	H5	CMV-LJ	I5	CMV+	J5	CMV-U3
F6	CMV-LT4	G6	CMV-LT8	H6	CMV-LF3	I6	CMV-SN	J6	CMV-LF4
F7	CMV-TN	G7	CMV-LS2	H7	CMV+	I7	*N.t.* Xanthi	J7	CMV-LD2
F8	CMV-LC	G8	CMV-LT5	H8	*N.t.* Havana	I8	CMV-LT7	J8	*N.rustica*



شکل ۳ آزمون هیبریداسیون اسیدنوکلئیک به روش Crescenzi *et al.* 1993. خانه‌های با نقاط تیره، نشانگر واکنش پروب RNA منفی- CMV-S حاوی Sat.RNA خانه‌های بی‌رنگ حاوی عصاره گیاهان سالم (عصاره گیری به روش Gallitelli, 1991) و آلوده به جدایه‌های ایرانی CMV که نشاندهندهٔ واکنش منفی هستند.

Fig. 3. Ribo-Nucleic Acid Hybridization test (Crescenzi *et al.* 1993) only B6-D6 and D9 are positive and all Iranian isolates. are sat. RNA negative.

Blots	Samples	Blots	Samples	Blots	Samples	Blots	Samples
A1	CMV-LT2	B1	CMV-IJ	C1	CMV-LD3	D1	CMV-LT8
A2	CMV-LT4	B2	CMV-LK2	C2	CMV-LS1	D2	CMV-SN
A3	CMV-LT5	B3	CMV-L1	C3	CMV-LD4	D3	CMV-LH1
A4	CMV-LT6	B4	CMV-U2	C4	CMV-LD5	D4	CMV-LH2
A5	CMV-ST	B5	CMV-U3	C5	CMV-LS2	D5	عصاره گیاهان سالم
A6	CMV-LT7	B6	Sat.RNA+	C6	CMV-PT	D6	Sat.RNA+
A7	CMV-PH	B7	CMV-LC	C7	CMV-LA2	D7	CMV.SP
A8	CMV-LK1	B8	CMV-LD1	C8	CMV-SU	D8	CMV-LA1
A9	CMV-LN	B9	CMV-LD2	C9	CMV-LK3	D9	Sat.RNA+

۲- نتایج آزمون سرولوژیکی انتقال نقطه ای

کلیه جدایه ها در برابرآنتی سرمهای مربوط به CMV و ToMV با این روش برای اطمینان بیشتر آزمایش شدند، از نظر CMV همگی مثبت بودند (شکل ۱-۲) و حتی بعضی از جدایه ها که در آزمون نشت دوطرفه در آگار با آنتی سرم ToMV پاسخ نداده بودند نیز واکنش مثبت نشان دادند (شکل ۲-۲). کلیه جدایه ها پس از خالص سازی بیولوژیکی بطور مکرر در آزمون نشت دو طرفه آگار فقط در برابر آنتی سرم مربوط به CMV واکنش مثبت نشان دادند.لذا با اطمینان برای موضوع اصلی بررسی بکار گرفته شدند.

۳- هیبریداسیون در بلات نقطه ای

همانطور که در شکل ۳ ملاحظه میشود فقط شاهدهای مثبت با پروب RNA منفی مورد استفاده، واکنش نشان دادند و کلیه جدایه‌های ایران مورد آزمایش، فاقد اسیدریبونوکلئیک وابسته بودند.

بحث

با توجه به اینکه طبق نتایج حاصله جدایه های مورد مطالعه دراین آزمون که از نقاط مختلف ایران تحت شرایط طبیعی جمع‌آوری شده‌اند فاقد اسیدریبونوکلئیک وابسته هستند و از آنجا که اسیدریبونوکلئیک های وابسته به ندرت در طبیعت پیدا میشوند (Kearney *et al*. 1990) عدم وجود آنها در این جدایه ها امری غیرطبیعی نیست. لذا باید از بین جدایه های جمع‌آوری شده ازنقاط مختلف ایران تعداد بیشتری انتخاب و به منظورهای کاربردی مورد بررسی های بعدی قرار گیرند. ضمنا با وجود اینکه طی مراحل مختلف کلیه جدایه ها خالص سازی بیولوژیکی شده بودند و در روش نشت دو طرفه در آگار فقط نسبت به CMV واکنش مثبت نشان دادند ولی بعضا در سرولوژی انتقال نقطه ای به میزان کم، اختلاط با ToMV وجود داشت که یکبار دیگر مزیت و دقت روش اخیر مشخص می‌گردد.

سپاسگزاری

از آقایان دکتر گالیتلی و دکتر روسنیک که با موافقت قبلی اجازه داده اند غشاءهای نقطه گذاری شده به منظور بررسی احتمالی وجود اسید ریبونوکلئیک های وابسته جدایه های ایرانی CMV به آزمایشگاه آنها ارسال گردد کمال امتنان را دارند.

نشانی نگارندگان: مهندس یزدان فضلعلی، دانشکده کشاورزی تربیت مدرس تهران، دکتر علی آهون‌منش، دانشگاه کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، دکتر محمدرضا حاجی‌مراد و مهندس علیرضا کریمی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۱۴۵۴ تهران.