مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد شانزدهم، شماره چهارم، ۱۳۸۸
www.gau.ac.ir/journals

ردیابی سرولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک رگه‌ای گندم (WSMV) در مزارع غلات استان گلستان

راضیه‌سادات خدیور[۱] و *سعید نصرا... نژاد[۲]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۲۵

چکیده

در سال‌های اخیر، علایم بیماری‌های ویروسی شامل موزاییک مخطط، بدشکل شدن پهنک برگ و لاغری خوشه در سطح وسیعی از مزارع غلات استان گلستان مشاهده شده‌اند. به‌منظور بررسی علل این عوارض، اقدام به ردیابی ویروس موزاییک مخطط گندم (WSMV) در میزبان‌های زراعی از جمله گندم و علف‌های هرز غالب مزارع شامل سوروف (*Echinochloa crus-galli*)، قیاق (*Sorghum halepense*)، دم‌روباهی (*Setaria glauca*)، علف خرچنگی (*Digitaria sanguinalis*) و جوموشی (*Bromus* spp) و دژگال (*Echinochloa colonum*)، که دارای علایم یاد شده بودند، گردید. در سال زراعی ۸۷-۱۳۸۶، تعداد ۷۰۰ نمونه از میزبان‌های مشکوک به بیماری تهیه گردید. نمونه‌های یاد شده با آزمون الایزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌سرم پلی‌کلونال ویروس WSMV و نیز تعدادی از نمونه‌های آلوده در آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی WSMV شامل RCF1، WSM1، WSMF10 و WSMF13 که از ناحیه ۵" ژنوم پوشش پروتئینی ویروس یاد شده تهیه شد، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از الایزای غیرمستقیم، برای اولین بار حضور این ویروس را برروی علف خرچنگی و دژگال تأیید کرد. واکنش‌های مثبت در آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی WSMV نیز در گندم، علف خرچنگی و دژگال بیانگر وجود ویروس یاد شده بود. براساس نتایج این تحقیق، گرچه در مواردی مزارع گندم و علف‌های هرز خودرو در مزارع و باغات اطراف،

* مسئول مکاتبه: snasrollanejad@yahoo.com

علایمی از قبیل موزاییک، رگه‌های نامنظم، به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای و کم رشدی از خود نشان می‌دادند، ولی در اغلب موارد وجود ویروس یاد شده در گندم منفی بود. تحقیق روی ردیابی ویروس در میزبان‌های اهلی از جمله گندم در این استان ادامه دارد.

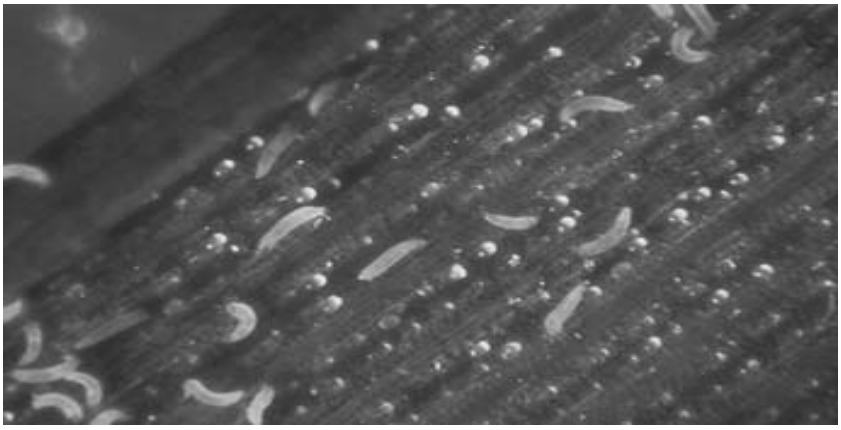
واژه‌های کلیدی: ویروس موزاییک رگه‌ای گندم، الایزا، RT-PCR، *Echinochloa colonum*.

مقدمه

از میان ویروس‌هایی که در گندم تولید علایم موزائیک می‌کنند، ویروس موزائیک رگه‌ای گندم[1] در سطح جهانی گسترده و شایع است (مارتین، ١٩٧٨). بیماری ناشی از WSMV اولین بار در سال ١٩٢٢ در ایالت نبراسکای آمریکا به‌عنوان موزائیک زرد معرفی و در سال ١٩٣٧ توسط مکینی توصیف شد (براک، ١٩٧١). از آن پس این بیماری در بسیاری از کشورهای گندم‌خیز جهان از جمله ایران گزارش شده است (معصومی و ایزدپناه، ٢٠٠١). در ایران این ویروس در بیشتر مناطق گندم‌کاری وجود دارد. گرچه خسارت آن در بسیاری از مناطق نامحسوس است، اما در شرایطی به‌طور صد درصد باعث نابودی کامل محصول گندم شده است (معصومی و ایزدپناه، ٢٠٠١). به‌رغم گزارش‌های اولیه مبنی بر عدم وجود WSMV در ایران، به‌نظر می‌رسد که این ویروس و ناقل آن در ایران از قدمت قابل‌توجهی برخوردار باشند، اما الگوی زراعی غالب در گذشته امکان و مجال طغیان ویروس را نمی‌داده است (معصومی و ایزدپناه، ٢٠٠١). با توجه به تغییر الگوهای زراعی در سال‌های اخیر به‌ویژه توسعه کشت ذرت به‌عنوان یک محصول تابستانه، برای تقویت منابع ویروس و ناقلین آن شرایط مناسب‌تری فراهم آمده است (معصومی و ایزدپناه، ٢٠٠١). به همین دلیل، در مزارع گندم به مراتب بیش از گذشته، شیوع بیماری و افزایش خسارت ناشی از این ویروس مشاهده می‌شود و امکان تشدید بیماری در آینده نیز وجود دارد. علایم ناشی از WSMV برحسب رقم گیاه، سویه ویروس، زمان آلودگی و شرایط محیطی متفاوت است. گیاهان آلوده معمولاً با کاهش رشد و موزائیک خطی و پیچیدگی و لوله‌ای شدن پهنک برگ همراه می‌باشند (برگر و همکاران، ١٩٨١). علایم موزاییک از خفیف تا شدید متغیر است و اغلب به‌صورت نوارها یا رگه‌های سبز زرد و نکروتیک در برگ‌ها ظاهر می‌شوند (معصومی و ایزدپناه، ١٩٩٤).

1. Wheat Streak Mosaic Virus (WSMV)

WSMV ویروسی است رشته‌ای با تقارن مارپیچی به طول حدود ۷۰۰ نانومتر و قطر ۱۵ نانومتر، با یک قطعه آر.ان.ای تک‌رشته‌ای مثبت و یک نوع پروتئین پوششی که با تولید اندامک‌های ویژه درون‌سلولی فرفره مانند در جنس Tritimovirus و خانواده Potyviridae قرار می‌گیرد و با کنه *Aceria tosichella* (شکل ۱) منتقل می‌شود (متیوس، ۱۹۹۱). چون این کنه موجب لوله‌ای شدن برگ‌ها و به دام افتادن نوک برگ در برگ‌های قبلی می‌شود، به آن کنه عامل لوله‌ای شدن برگ گندم نیز می‌گویند (برگر و همکاران، ۱۹۸۱). کنه، در تمام مراحل زندگی خود (به‌جز تخم) می‌تواند ویروس را انتقال دهد (شکل ۲). این ویروس به بافت زنده وابسته است اما دامنه میزبانی وسیعی دارد (برگر و همکاران، ۱۹۸۱).



شکل ۱- تغذیه کنه *A. tosichella* ناقل ویروس WSMV از سطح برگ گندم (کریستسین و ویلیس، ۱۹۹۳).

شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی کنه *A. tosichella* (کریستسین و ویلیس، ۱۹۹۳).

به‌غیر از گندم، گیاهان جو موشی (*Bromus danthinae*)، دژگال (*Echinochloa colonum*)، *Brachiaria eruciformis*، قیاق (*Sorghum halepense*)، مرغ (*Setaria viridis*)، چسبک (*S. verticillata*) و جو (*Hordeum vulgare*) به‌عنوان میزبان‌های طبیعی این ویروس شناخته شده‌اند (معصومی و ایزدپناه، ١٩٩٤). در سلول‌های آلوده به WSMV، رنگدانه‌های کلروفیل از بین می‌روند و علایم به‌صورت لکه‌های کلروتیک و سپس نکروتیک ظاهر می‌شوند (مارتین، ١٩٧٨؛ هانگر و شروود، ١٩٨٨). از آن‌جایی‌که ویروس‌های دیگری نیز وجود دارند که در گندم تولید موزاییک و کوتولگی می‌کنند، بنابراین تشخیص بیماری ناشی از WSMV صرفاً براساس علایم کار دشواری است.

وجود کنه ناقل در گیاهان مبتلا و انتقال ویروس با آن، به تشخیص بیماری کمک می‌کند. متاسفانه، یافتن کنه ناقل همیشه امکان‌پذیر نیست. ارقام متحمل به کنه ناقل نیز وجود دارند (یاسائی و همکاران، ٢٠٠٦). ظاهراً بین مقاومت به کنه و مقاومت به ویروس همبستگی وجود دارد، که از نقطه نظر کنترل بیماری مطلوب می‌باشد (معصومی و همکاران، ٢٠٠٦).

ویروس WSMV را می‌توان به کمک روش‌های الکترون میکروسکوپی، تلفیق سرولوژی و الکترون میکروسکوپی، آزمایش‌های سرولوژیکی به‌ویژه الایزا و استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] شناسایی نمود (متیوس، ١٩٩١). علایم موزاییک در گندم می‌تواند تابع غلظت ویروس در گیاه باشد ولی در جو، ذرت و چند گیاه دیگر موزاییک خفیف یا پیسه ظاهر می شود. علایم در علف‌های هرز دژگال، علف خرچنگی و قیاق نیز به‌صورت موزاییک خفیف و نقطه‌ای تا موزاییک شدید و نکروز متفاوت می‌باشد (الیس و همکاران، ٢٠٠٣؛ موری و همکاران، ١٩٩٨؛ معصومی و ایزدپناه، ١٩٩٤).

به‌رغم گستردگی سطح زیر کشت گندم در استان گلستان و اهمیت اقتصادی آن و نیز احتمال شیوع بیماری با توجه به دامنه میزبانی وسیع، ویروس یاد شده به‌طور دقیق و با استفاده از روش‌های سرولوژیکی و مولکولی در این استان شناسایی نشده است و از پراکنش بیماری در مزارع گندم استان اطلاعی در دست نیست. اهداف این تحقیق ١- ردیابی ویروس موزاییک رگه‌ای گندم به دو روش سرولوژیکی و مولکولی در استان گلستان، ٢- ردیابی ویروس در میزبان‌های زراعی و علف‌های هرز غالب مزارع غلات استان و ٣- تعیین مناطق آلوده و میزان آلودگی آنها در استان گلستان بوده است.

1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

مواد وروش‌ها

روش نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از مزارع گندم، ذرت، علف‌های هرز دارای علایم مشکوک به بیماری (موزاییک رگه‌ای، زردی و کوتولگی) به تعداد ۷۰۰ نمونه از ٦ شهرستان مهم استان گلستان (جدول ۲) در سال‌های ۱۳۸٦ و ۱۳۸۷ صورت گرفت. نمونه‌برداری از برگ‌های دوم و سوم (بعد از برگ پرچم) هر بوته انجام گرفت و نمونه‌های جمع‌آوری شده، به‌صورت جداگانه در کیسه‌های پلاستیکی و سپس در کلمن یخ قرار داده شدند و ظرف ٢٤ ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید.

تعیین آلودگی نمونه‌ها به WSMV: تشخیص نمونه‌های آلوده از نمونه‌های سالم به کمک آزمون الایزای غیرمستقیم[1] و با استفاده از آنتی‌بادی‌های چندهمسانه‌ای WSMV (یک کیت اهدایی از بخش ویروس‌شناسی دانشگاه شیراز و دو کیت خریداری شده از شرکت بیوربای سوئیس) صورت گرفت. عصاره‌گیری از برگ‌های دارای علایم با افزودن ۱۰ حجم بافرسیترات آمونیوم ۰/۱ مولار با pH=۷ انجام شد (کانورس و مارتین، ۱۹۹۰). در هر حفره میکروپلیت الایزا ۱۰۰ میکرولیتر عصاره ریخته شد. میزان تغییرات ایجاد شده در ماده زمینه ٤- نیتروفنل فسفات در طول‌موج ٤۰۵ نانومتر به‌وسیله دستگاه چاهک الایزا خوان مدل دیناتک ام- آر ۷۰۰[2] اندازه‌گیری گردید و با توجه به‌میزان جذب عصاره برگ سالم (شاهد منفی) آستانه جذب گیاهان آلوده با استفاده از فرمول X+۳SD تعیین شد. در این فرمول، X میانگین جذب و SD انحراف معیار چاهک‌های سالم می‌باشند. در مواردی، سه برابر میانگین جذب گیاه سالم به‌عنوان کنترل شاهد در نظر گرفته شد. بدین‌ترتیب، نمونه‌های بیمار مشخص شدند و درصد آلودگی نقاط مختلف تعیین گردید.

روش استخراج RNA ویروس: برای این منظور از روش ترایزول (ویلکینگ و بدر، ۲۰۰٤) به شرح زیر استفاده شد: ۵۰ میلی‌گرم از بافت برگی در نیتروژن مایع پودر شد و ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر ترایزول و ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه گردید. سپس، محتوای لوله، ورتکس شد تا کاملاً به‌صورت همگن درآید. فاز میانی به لوله جدید منتقل شد و حجم مساوی از ایزوپروپانل به آن اضافه گردید و سپس، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از این کار، محلول در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب، دو بار

1. Indirect ELISA
2. Micro Plate Reader (Dynatech MR-700)

با ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو و محلول حاصله در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، به محلول ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و ورتکس شد تا کاملاً به‌صورت همگن درآید. فاز بالایی به تیوب جدید منتقل شد و پس از اضافه کردن حجم مساوی از ایزوپروپانل، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محلول در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب دو بار با ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو شده و در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس در حجم کمی از آب DEPC[1] (۲۵ تا ۵۰ میکرولیتر) حل شد و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

بررسی کمیت و کیفیت ژنوم استخراج شده: برای تعیین غلظت ژنوم استخراج شده، تعیین جذب نوری در طول‌موج‌های ۲٦۰، ۲۷۰، ۲۸۰ و نسبت ۲٦۰/۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت و غلظت‌های مناسب برای PCR انتخاب شدند.

PCR به همراه نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR): از آن‌جایی‌که ژنوم ویروس یاد شده از نوع RNA می‌باشد، ابتدا RNA را با روش نسخه‌برداری معکوس، که در حالت طبیعی توسط ویروس‌های RNA دار، برای تبدیل RNA ژنومی به DNA در داخل سلول میزبان به‌کار می‌رود، تبدیل به DNA نموده و سپس، تکثیر PCR روی cDNAهای[2] (DNAهای مکمل) به‌دست آمده انجام گرفت.

جدول ۱- ترادف آغازگرهای مورد استفاده در واکنش RT-PCR برای تکثیر قطعه‌ای از ژن CP.

توالی آغازگرها	نام آغازگرها	جهت
5'-AGCTGGATCCTTTTTTTTTTTTT	RCF1	معکوس
5'-TGGATCCAGGCACGACTGAGTGCGG	WSM1*	جلو یا مستقیم
5'-TGGCARMGRAGCAAGGARCC	WSMF10*	جلو یا مستقیم
5'-GTGGDGARCARTACTGYGTGTAYG	WSMF13*	جلو یا مستقیم

* در این آغازگرها کدهای دژنره عبارتند از R (A/G)، Y (T/C)، M (A/C)، D (A/G/T).

1. Diethylpyrocarbonate
2. Complementry DNA

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1]: نمونه‌های گیاهان جمع‌آوری شده که در آزمون الایزای غیرمستقیم، آلوده تشخیص داده شدند، برای آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش RT-PCR[2] انجام شد.

اساس کلی تهیه دی.ان.ای مکمل[3] از آر.ان.ای ویروس، آزاد شدن آر.ان.ای از پوشش پروتئینی و نسخه‌برداری معکوس[4] می‌باشد. ترادف‌های آغازگرهای اختصاصی WSMV که مورد استفاده قرار گرفتند، در جدول (۱) ارایه شده‌اند. آغازگرهای اختصاصی و عمومی WSMV شامل RCF1، WSM1 (فرنچ و روبرتسون، ۱۹۹۳) و WSMF13 و WSMF10 بودند که براساس توالی‌های حفاظت شده در قسمتی از ژن پوشش پروتئینی جدایه‌های مختلف WSMV طراحی شده بودند (معصومی و همکاران، ۲۰۰٦). این آغازگرها به قسمتی از ژن پروتئین پوششی CP در RNA متصل شده‌اند. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد به‌مدت ٤٥ دقیقه در ۸۵ ولت، تعیین الکتروفورز شده و از باندهای تشکیل شده پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داکیومنتر[5]، عکس‌برداری شد و با کمک مارکرهای مخصوص وزن مولکولی قطعه تکثیر شده اندازه‌گیری گردید.

نتایج و بحث

تعیین درصد آلودگی مزارع به WSMV: براساس آزمون الایزا، از مجموع ۷۰۰ نمونه تصادفی مورد آزمایش قرار گرفته، فقط در تعدادی از نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان گنبدکاووس آلودگی به WSMV تشخیص داده شد که البته در نمونه‌های مورد آزمایش، علاوه‌بر گندم، علف‌های هرز گرامینه، از جمله دژگال، علف خرچنگی، قیاق، جوموشی، مرغ و چسبک نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. متوسط میزان جذب نور در آزمایش الایزا خوان نمونه‌های آلوده ۲/۹ برابر گیاه سالم برآورد شد. همچنین، نتایج این پژوهش نشان داد که آلودگی مزارع شهرستان گنبدکاووس حدود ۷/۱٤ درصد می‌باشد (جدول۲).

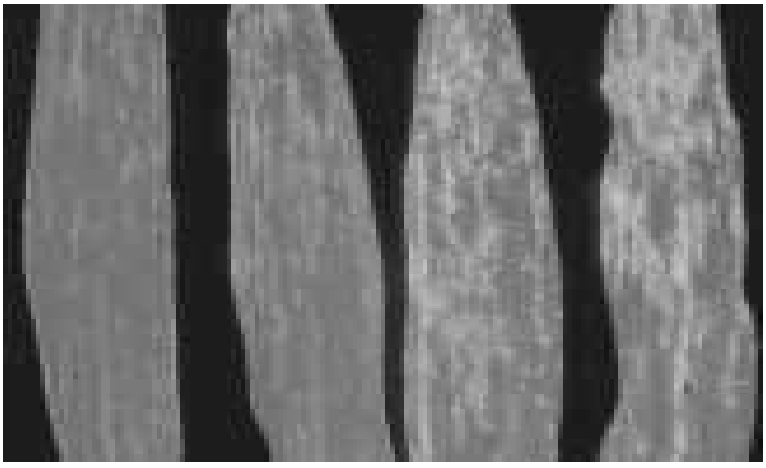
جدول ۲- تعداد گیاهان آزمایش شده از نقاط مختلف و درصد آلودگی به WSMV بر مبنای آزمون الایزا.

شهرستان	علی‌آباد	کردکوی	گرگان	آزادشهر	آق‌قلا	فاضل‌آباد	گنبدکاوس
تعداد کل نمونه‌های آزمایش شده	۸۵	۹٤	۱۲۰	۸۵	۱۰۰	۷۰	۱٤٤
درصد آلودگی به WSMV	-	-	-	-	-	-	۷/۱٤

1. Polymerase Chain Reaction
2. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
3. cDNA
4. Reverse Transcription
5. Gel Documenter

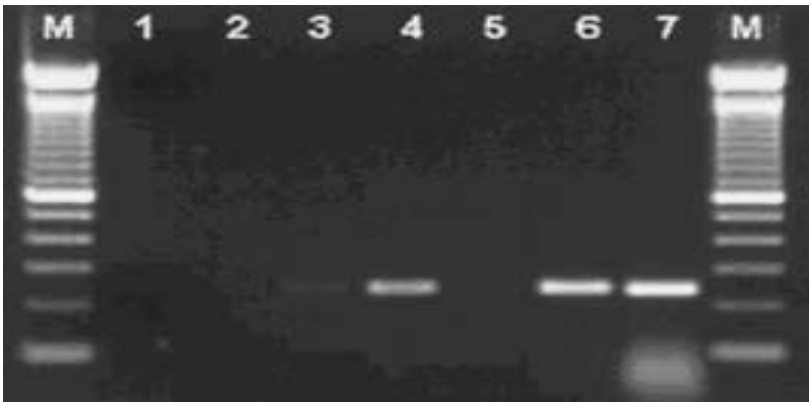
علایم WSMV روی گیاهان مختلف تا حدودی متفاوت است و حتی آلودگی بدون علایم نیز در بعضی از گیاهان گزارش شده است (فولاد و ایزدپناه، ١٩٨٦). در پژوهش حاضر با وجود فعالیت کنه روی برخی ارقام گندم، علایم بیماری روی گندم مشهود نبود، ولی روی علف‌های هرز مجاور مشاهده شد. طی بررسی‌های انجام شده مشخص گردید ارقامی از گندم در این استان کاشته می‌شوند که ظاهراً نسبت به کنه ناقل ویروس WSMV مقاوم هستند. البته، آزمایش‌های بیشتر در این زمینه در دست انجام می‌باشند (خدیور و نصرا...نژاد، منتشر نشده).

در سلول‌های آلوده به WSMV رنگدانه‌های کلروفیل از بین می‌روند و علایم به‌صورت لکه‌های کلروتیک و سپس نکروتیک ظاهر می‌شود (مارتین، ١٩٧٨؛ هانگر و شروود، ١٩٨٨)، (شکل ٣). این اثرات به سلول محدود نیستند و به‌صورت کاهش رشد شدید گیاه، کاهش تعداد پنجه‌های بوته، کاهش تعداد دانه در سنبله، کوچک و پوک شدن سنبله، چروک شدن دانه‌ها و کاهش وزن هزاردانه نیز دیده می‌شوند. علایم موزاییک در گندم می‌تواند تابع غلظت ویروس در گیاه باشد، ولی در جو، ذرت و چند گیاه دیگر، موزاییک خفیف یا پیسه ظاهر می‌شود. علایم در علف‌های هرز دژگال، علف خرچنگی و قیاق نیز به‌صورت موزاییک خفیف و نقطه‌ای تا موزاییک شدید و نکروز متفاوت بود و همچنین، در منطقه گنبدکاووس کاهش رشد شدید علف خرچنگی کاملاً مشهود بود. نتایج یاد شده با نتایج محققان قبلی (الیس و همکاران، ٢٠٠٣؛ موری و همکاران، ١٩٩٨، معصومی و ایزدپناه، ١٩٩٤) کاملاً مطابقت داشت.



شکل ٣- پهنک برگ گندم‌های آلوده به ویروس موزاییک رگه‌ای.

نتایج آزمایش‌های آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی نمونه‌های دارای علایم مشکوک به WSMV نشان دادند که به هنگام استفاده از آغازگرهای اختصاصی WSMV، قطعه‌ای در محدوده ۲۷۰ جفت باز، از نمونه‌های دارای علایم همانندسازی گردید، که از شاهد مثبت نیز همین باند به‌دست آمد، در حالی‌که از گیاهان غیرآلوده (بر مبنای ELISA) باندی حاصل نشد (شکل ٤).



شکل ٤- الکتروفورز محصول cDNA برروی ژل آگارز TBE ۱/۸ درصد.

M= نشانگر. شماره‌های ۱، ۲ و ۳ نمونه‌های گندم بدون آلودگی؛ شماره‌های ٤ و ٦ محصول PCR حاصل از بافت برگ دژگال آلوده به WSMV؛ شماره ۵ گیاه سالم (شاهد منفی) و شماره ۷ (شاهد مثبت) باند در محدوده ۲۷۰ جفت باز.

واکنش‌های مثبت آزمون‌های ELISA با آنتی‌سرم شرکت بیوربا[1] و RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی WSMV، بیانگر وجود ویروس یاد شده در برخی از نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان گلستان بودند. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش با نتایج سایر محققان (فرنچ و روبرتسون، ۱۹۹۳؛ مکنزی و همکاران، ۱۹۹۷) کاملاً مطابقت داشت.

نتایج آزمون سرولوژیکی، نشان داد ویروس موزاییک رگه‌ای در تعداد معدودی از مزارع گندم و نیز در علف‌های هرز دژگال و خرچنگی حاشیه مزارع گندم شهرستان گنبدکاووس وجود دارد. سلیمانی و همکاران (۲۰۰٦) گزارش نمودند علف هرز دژگال یکی از مهم‌ترین میزبان‌های تابستانی ویروس موزاییک رگه‌ای گندم است، به‌طوری‌که شیوع آن در بعضی از مزارع استان فارس به صد

1. Bioreba

درصد می‌رسد. همچنین این پژوهشگران به کمک آنالیز ترادف فیلوژنتیکی نشان دادند جدایه‌های گندم و دژگال در منطقه فسا در دو شاخه کاملاً مجزا قرار می‌گیرند. با توجه به نامساعد بودن شرایط آب و هوایی جهت تکمیل چرخه زندگی کنه ناقل WSMV (معصومی و ایزدپناه، ٢٠٠١)، این بیماری در منطقه از گسترش وسیعی برخوردار نیست. ایجاد علایم توسط این ویروس نیازمند میزبان‌های حساس‌تر و شرایط محیطی مساعدتر می‌باشد.

در استان گلستان در الگوهای زراعی سنتی، گندم در شرایط گرم و خشک برداشت می‌شود و از موقع برداشت گندم تا کشت مجدد آن در پاییز، میزبان‌های کمی برای ویروس و کنه ناقل آن در مزارع وجود دارند، همچنین، اگر گندم در پاییز زودتر کاشته شود برای آلودگی گندم فرصت کافی وجود خواهد داشت و برعکس در صورتی‌که کاشت با تاخیر انجام شود، فعالیت کنه و گسترش آن به‌دلیل کاهش دما، کمتر خواهد شد. بنابراین، تاریخ کاشت بر شیوع بیماری تأثیر عمده‌ای دارد (متیوس، ١٩٩١، معصومی وایزدپناه، ٢٠٠١). در استان گلستان، گندم اغلب در اواسط آذر کاشته می‌شود که هوا تقریباً سرد و شرایط برای فعالیت کنه ناقل کاملاً نامساعد می‌باشد و این موضوع شاید یکی از علت‌های عدم فعالیت گسترده ویروس مخطط گندم در این استان باشد.

در ایران، در بررسی‌هایی که روی ٩٠ ژنوتیپ گندم در گلخانه صورت گرفت، ٣ ژنوتیپ کاملاً مقاوم و ٧ ژنوتیپ با مقاومت‌های نسبی به‌دست آمدند که نویدبخش یافتن ارقام مقاوم قابل‌قبول بودند (معصومی و ایزدپناه، ٢٠٠١). ارقام متحمل به کنه ناقل نیز وجود دارند. ظاهراً بین مقاومت به کنه و مقاومت به ویروس همبستگی وجود دارد که این موضوع از نقطه نظر کنترل بیماری مطلوب می‌باشد (معصومی و همکاران، ٢٠٠٦). یاسائی و همکاران (٢٠٠٦) گزارش کردند به‌دلیل امکان هم تکاملی ویروس و میزبان در ایران، یافتن ژن‌های مقاومت در ارقام بومی گندم و علف‌های هرز گرامینه دور از انتظار نیست. همچنین معصومی و همکاران (٢٠٠٦) ثابت کردند بین جدایه‌های مختلف ویروس رگه‌ای گندم در ایران تنوع ژنتیکی وجود دارد، به‌طوری‌که جدایه‌های شمال‌غرب ایران در یک گروه و جدایه‌های سایر مناطق ایران از جمله شمال‌شرق در گروه دیگر قرار گرفتند. به‌نظر می‌رسد علت عدم حضور ویروس روی گندم در اکثر مناطق استان گلستان، وجود ارقام غیرحساس باشد که حتی بعد از مایه‌زنی مکانیکی این ویروس روی ارقام گندم، آلودگی ظاهر نشد. اگرچه تحقیقات بیشتر در این زمینه همچنان ادامه دارد.

منابع

1.Berger, P.H., Percich, J.A., and Ransom, J.K. 1981. Wheat streak mosaic virus in wild rice. Plant Disease, 65: 695-696.

2.Brakke, M.K. 1981. Wheat streak mosaic virus. CMI/AAB descriptions of plant Viruses, No. 48.

3.Christian, M.L., and Willis, W.G. 1993. Survival of wheat streak mosaic virus in grass hosts in Kansas from wheat harvest to fall wheat emergence. Plant Disease, 77: 239-242.

4.Ellis, M.H., Rebetzke, G.J., and Chu, P. 2003. First report of the wheat streak mosaic virus in Australia. New Disease Reports 7.

5.Foulad, P., and Izadpanah, K. 1986. Identification of wheat streak mosaic virus in Iran. Agric. Res. 5: 73-84.

6.French, R., and Robertson, N.L. 1993. An RT-PCR method for the detection of the wheat streak mosaic virus. J. Virological Methods, 49: 93-100.

7.Hunger, R.M., and Sherwood, J.L. 1988. Effect of fall and spring infection of wheat streak mosaic virus on winter wheat. Phytopathology, 78: 1503 (Abstract).

8.Mackenzie, D., Mclean, M.A., Mukeri, S., and Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Dis. 81: 222-225.

9.Martin, T.J. 1978. Procedures for evaluating wheat streak mosaic virus resistance. Plant Dis. Rep. 62: 1062-1066.

10.Massumi, M., and izadpanah. K. 1994. The status of wheat streak mosaic virus in Iran. Proceedings of the 12th Iranian plant Protection Congress. 2-7 September, 1995. Karaj, 55p.

11.Massumi, M., and Izadpanah, K. 2001. Wheat Streak Mosaic. Technical Bulletin No.1. Research Center of Botanic Virology, Faculty of Agriculture, University of Shiraz, 45p.

12.Masumi, M., Zare, M., Rastgar, M., and Izadpanah, K. 2006. Variation of Iranian isolates of wheat streak mosaic virus based on CP-UTR sequence analysis. Proceedings of 17th Iranian Plant Protection Congress, 2-5 September, Karaj, 36p.

13.Matthews, R.F. 1991. Plant Virology. Academic Press, New York, 835p.

14.Murray, T.D., Parry, D.W., and Cattlin, N.D. 1998. A Color Handbook of Diseases of Small Grain Cereal Crops. Manson Publishing London, UK, 195p.

15.Soleimani, M., Masumi, A., Afsharifar, A.R., and Izadpanah, K. 2006. Comparison of nucleotide sequence of 3-region of wheat and *Echinochloa colonum* isolates of wheat streak mosaic virus. Proceedings of 17th Iranian Plant Protection Congress, 2-5 September, 62p.

16.Wilkening, S., and Bader, A. 2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction: Methodical analysis and mathematical model. J. Biomol. Tech. 15: 107.

17.Yassaie, M., Masumi, M., Amini, A., and Izadpanah, K. 2006. Reaction of some Iranian native wheat lines to wheat streak mosaic virus under greenhouse conditions. Proceedings of 17th Iranian Plant Protection Congress, 2-5 September, Karaj, 45p.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 16(4), 2009
www.gau.ac.ir/journals

Serological and molecular detection of wheat streak mosaic virus (WSMV) in cereal fields of Golestan province, Northern Iran

R.S. Khadivar[1] and *S. Nasrolahnejad[2]

[1]Former M.Sc. Student, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

In recent years, symptoms of a viral disease including streak mosaic, leaf blade malformation, and thickness (scrawniness) of raceme have been observed in the vast areas of grain fields in Golestan province. In order to identify the causes of this disease, detection of wheat streak mosaic virus (WSMV) in cultivated hosts including wheat, dominant weeds of fields involving barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.), johnsongrass (*Sorghum halepense)*, *Setaria glauca*, *Digitaria sanguinalis*, *Bromus* spp., and *Echinochloa colonum* is done with mentioned symptoms. In the agricultural year of 2007, 700 samples of these hosts in the fields of the province, suspected of the disease, were prepared. These Samples were analyzed by indirect ELISA using WSMV polyclonal antiserum and a number of the infected samples were tested by PCR using WSMV specific primers involving RCF1, WSM1, WSMF10 and WSMF13 that were prepared from the 5' area of the virus's protein capsid. Results of indirect ELISA confirmed the presence of this virus in the *Digitaria sanguinalis* and *Echinochloa colonum*, for first time. Positive reactions in the RT-PCR test with WSMV specific primers also showed the presence of this virus in only two hosts, *Digitaria sanguinalis* and *Echinochloa colonum*. We have no information about the scope of the damage in the fields of the province. In this research although in some cases wheat fields and wild weed in the fields and neighboring gardens showed the symptoms including mosaic, leaf curl, dwarfing and decrease of the growth, but the presence of this virus has not been detected in most cases. Investigation to detect the virus in native hosts involving wheat is continued in this province.

Keywords: Wheat streak mosaic virus, ELISA, RT-PCR, *Echinochloa colonum*

* Corresponding Author; Email: snasrollanejad@yahoo.com