بررسی ویروس موزاییک یونجه در مناطق شمالی و مرکزی استان خراسان

اعظم زین الدینی، بهروز جعفرپور و ماهرخ فلاحتی رستگار[۱]

چکیده

بررسی پراکنش آلودگی ویروس موزاییک(Alfalfa mosaic virus ,ALMV) با استفاده از آزمون DAS-ELISA نشان داد که مزارع یونجه،سیب زمینی وگوجه فرنگی شهرستان‌های چناران، قوچان، شیروان، مشهد، نیشابور و تربت حیدریه همگی به این ویروس آلوده می‌باشند. با توجه به آزمون کای مربع بین این مناطق از لحاظ میزان آلودگی اختلافی مشاهده نگردید. میانگین کل آلودگی در این مناطق ۵۳ درصد به دست آمد.جدایه جمع آوری شده از مزرعه یونجه مشهد در Nicotiana tabacum L.cv.Samsun تکثیر و از آن برای خالص سازی،تعیین دامنه میزبانی و برخی مطالعات دیگر استفاده شد. مایه زنی مکانیکی این جدایه از ویروس موجب بروز لکه های موضعی در Phaseolus vulgaris cv.Red kidney ، Vigna unguiculata، C.amaranticolor، Chenopodium quinoa و علائم سیستمیک رگبرگ روشنی و موزائیک در Cicer arietinum، Ocimum basilicum، N.tabacum cv.Samsun، Nicotiana glutinosa و Lycopersicon esculentum گردید.در مورد Cucumis sativus علائمی ظاهر نشد. خالص سازی ویروس ALMV با استفاده از روش ارائه شده توسط کایزر و روبرتسون انجام شد.

راندمان خالص سازی ویروس ۱۱/۰۵ میلی گرم ویروس به ازای هر ۱۰۰ گرم بافت آلوده بود. ویروس خالص شده در برابر جدایه آمریکایی ALMV باند رسوبی تشکیل داد. با انجام الکتروفورز SDS-PAGE و Western blot وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس ۲۴ کیلو دالتون تعیین گردید. از این لحاظ جدایه مورد بررسی با سایر جدایه‌های گزارش شده تفاوت بارزی نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: *ویروس موزاییک یونجه (AMV)، آزمون ساندویچ دو طرفه الیزا(DAS-ELISA)*

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادان گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.2.13.8]

مقدمه

ویروس موزائیک یونجه (*Alfalfa mosaic virus*, ALMV) نخستین بار در سال ۱۹۳۱ از روی یونجه در ایالات متحده آمریکا گزارش شد (۸). این ویروس تنها عضو جنس *Alfamovirus* از تیره Bromviridae می‌باشد(۸). هم‌چنین در سال ۱۹۵۸ برای اولین بار طبیعت چند پیکره‌ای ویروس مشاهده و سه پیکره تشخیص داده شد که این پیکره‌ها(Bottom(B) ، Middle(M) و TOP(T) نام گرفتند (۸). رنگ‌آمیزی منفی ویروس و استفاده از میکروسکوپ الکترونی نیز ذرات میله‌ای کوتاه با انتهای گرد تا کروی کوچک را نشان داد. عرض همه پیکره‌ها ۱۸ نانومتر بود(۱۳). ژنوم این ویروس از نوع RNA تک لای مثبت می‌باشد. پیکرهای این ویروس دارای پروتئین پوششی یکسانی می‌باشند به طوری که در ژل الکتروفورز به صورت یک باند ظاهر می‌گردد. وزن مولکولی پروتئین پوششی استرین ۴۲۵ این ویروس ۲۴۲۸۰ دالتون گزارش گردیده است. ALMV توسط حداقل ۱۴ گونه شته به خصوص شته سبز هلو (*Myzus persicae*) به صورت ناپایا انتقال می یابد. علاوه بر این روش انتقال روش‌های دیگری همچون انتقال مکانیکی، انتقال توسط حداقل ۵ گونه سس و بذر نیز گزارش شده است (۸ و۱۵). ویروس موزائیک یونجه، یکی از ویروس‌هایی است که دامنهٔ میزبانی فوق العاده وسیعی دارد و بیشتر گونه‌های میزبان آن در یکی از ۴ خانواده، Solanaceae، Fabaceae، Amaranthaceae و Asteraceae قرار می‌گیرند (۸ و۹). کاهش محصول، در اثر آلودگی به این ویروس در سیب زمینی ۲۰ درصد، در نخود ۹۶-۷۲ درصد، در ریحان ۳۸ درصد و در یونجه ۱۸ درصد گزارش شده است (۷). ویروس علاوه بر خسارت کمی، بر روی کیفیت ترکیبات گیاهی نیز اثر سوء دارد (۱۰و۱۳). با توجه به سهولت انتقال ویروس و وجود دامنه میزبانی بسیارگسترده، احتمال بروز اپیدمی این ویروس همواره وجود دارد به طوری که در سال ۱۹۹۸ این ویروس اپیدمی بزرگی را در مزارع گوجه فرنگی جنوب ایتالیا ایجاد کرد (۱۶). بررسی خصوصیات سرولوژیکی، تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی جدایه مورد بررسی و مقایسه آن با سایر جدایه‌ها و تعیین میزان آلودگی و پراکندگی ویروس در مناطق شمالی و مرکزی خراسان از اهداف این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها

منبع ویروس

در تابستان ۱۳۸۰، بوته‌های یونجه که علائم ویروس را به صورت موزائیک و بد شکلی نشان می‌دادند از مزرعه یونجه اطراف مشهد جمع آوری شدند. آزمون ساندویچ دو طرفه الیزا (DAS-ELISA) با استفاده از گاماگلوبولین‌های اختصاصی ارسالی از مؤسسه ویروس شناسی DSMZ آلمان و آزمون نشت دو طرفه در آگار بروش بال (Ball,1974) با استفاده از آنتی سرم جدایه آمریکایی ALMV (ارسالی از Dr. Ana. Mondjana, University of Madison) آلودگی این بوته‌ها را به ALMV تأیید نمود. آزمون‌های DAS-ELISA با استفاده از گاماگلوبولین‌های اختصاصی تجارتی (Bioreba) عدم آلودگی این نمونه ها را به ویروسهای موزاییک خیار (CMV)،X سیب زمینی (PVX)، Y سیب زمینی (PVY) و موزاییک زرد لوبیا (BYMV) ثابت کرد. برای نگه‌داری و تکثیر ویروس بوته‌هایی که وجودALMV در آنها ثابت شده بود برای عصاره‌گیری و تلقیح به گیاهان تکثیری(*Nicotiana glutinosa* و *Nicotiana tabacum* l.cv.Samsun) داخل گلخانه به کار رفتند. در بررسی‌های گلخانه‌ای و خالص سازی ویروس از این گیاهان به عنوان منبع ویروس استفاده شد. دامنه میزبانی برای تعیین دامنه میزبانی، ۱۵ گونه گیاه از ۵ خانواده Solanaceae, Fabaceae, Amarantaceae,Chenopodiaceae و Cucurbitaceae درمرحلهٔ ۵-۴ برگی با عصارهٔ یونجه آلوده به ALMV مایه زنی شدند(جدول۱). در مورد گیاهانی که علائمی را بروز ندادند از روش مایه زنی برگشتی بر روی *Chenopodium quinoa* استفاده گردید. نمونه‌های آلوده به ویروس در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با (pH = ۷)

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.2.13.8]

جدول ۱. گیاهان محک ویروس موزائیک یونجه و سن مایه زنی آنها

علائم	گیاهان آزمون
لکه کلروتیک موضعی-آلودگی سیستمیک	*Chenopodium quinoa*
موزائیک- لکه کلروتیک موضعی-آلودگی سیستمیک	*C.amaranticolor*
لکه نکروزه موضعی	*Gomphrena globosa*
بدون آلودگی	*Cucumis sativus*
موزائیک	*Ocimum basilicum*
لکه نکروزه موضعی	*Phaseolus vulgaris*.cv Red kidney
موزائیک- زردی- پژمردگی	*Cicer arietinum*
موزائیک	*Medicago sativa*
موزائیک	*Lens esculenta* Moench
لکه سبزرد موضعی - موزائیک	*Vigna unguiculata*
موزائیک- بدشکلی برگ- آلودگی سیستمیک	*Nicotiana glutinosa*
موزائیک	*Solanum tuberosum*
موزائیک	*Solanum nigrum*
موزائیک- شفاف شدن رگبرگ‌ها- آلودگی سیستمیک	*N.tabacum*. cv Samsun
موزائیک	*Lycopersicon esculentum*

عصاره‌گیری شدند. عصارهٔ صاف شده بر روی سطح برگ گیاهان آزمون که از قبل مختصری پودر کاربوراندوم ۶۰۰ مش بر روی آنها پاشیده شده بود به آرامی کشیده شد و بوته‌های مایه زنی شده برای مشاهده علائم و تاریخ ظهور علائم، هر روز مورد بررسی قرار گرفتند.

خالص سازی

برای خالص سازی ویروس موزائیک یونجه روش ارائه شده توسط روبرتسون و کیسر با تغییرات جزئی استفاده شد(۱۱). ده روز پس از مایه‌زنی گیاهچه‌های *Nicotiana tabacum* L.cv. Samsun NN ، ۱۰۰ گرم از برگ‌هایی که علائم سیستمیک نشان می‌دادند جمع آوری و در یک مخلوط‌کن با فسفات بافر ۰/۱ مولار (pH=7.5) حاوی یک درصد۲- مرکاپتوانانول هموژنیزه گردید. سپس عصاره از پارچه ململ دو لایه عبور داده شد. عصارهٔ صاف شده برای ۱۰ دقیقه با حجم مساوی از مخلوط سرد n - بوتانل و کلروفرم توسط شیکر کاملاً مخلوط گردید.امولسیون حاصل به مدت ده دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در گردان JA-14 دستگاه سانتریفوژ بکمن (Beckman-J2-M1)با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. فاز مایع رویی برداشته شد و در دمای ۴ درجه سانتی گرادبه مدت ۱۶ ساعت نگه‌داری گردید. مجدداً نمونه برای ۱۰ دقیقه در گردانJA-14 با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از این مرحله، دو مرحله سانتریفوژ کردن افتراقی برای تغلیظ ویروس انجام شد. اولین مرحله شامل سانتریفوژ کردن در گردان۴۰ اولترا سانتریفوژ بکمن با سرعت۳۵۰۰۰ دور دردقیقه به مدت ۱۲۰ دقیقه بود. رسوب حاصل در فسفات بافر ۰/۰۱ مولار (pH = ۷/۵) که حاوی ۰/۰۰۱ مولار اتیلن دی آمین ترا استات بود، به مدت ۶۰ دقیقه مجدداً به حالت سوسپانسیون درآمد. سپس محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در گردان JA-14 با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.2.13.8]

سانتریفوژ گردید. پس از بردا شت فاز رویی، ته نشین لوله‌ها حذف شد. مرحلهٔ دوم سانتریفوژ کردن افتراقی مشابه مرحله اول آن انجام گردید و بعد از ۱۲۰ دقیقه سانتریفوژ کردن درگردان۴۰ با سرعت ۳۵۰۰۰ دور در دقیقه، فاز رویی حذف و رسوب حاصل در ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار (pH=۷/۵) حل شد. ویروس خالص شده برای مطالعات بعدی به صورت منجمد شده برای مدت زمان طولانی و با اضافه کردن نگهدارنده‌هایی مانند سدیم آزید برای مدت کوتاه در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

اسپکتروفتومتری و تعیین غلظت ویروس

طیف جذبی آموده خالص شده ویروس در فاصلهٔ طول موج ۳۵۰-۲۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu,UV-160A,JAPAN) بررسی گردید. به منظور تعیین غلظت ویروس میزان جذب نورتوسط آموده خالص شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و از ضریب جذب برابر ۵/۱ استفاده شد(۱۱).

تهیه آنتی سرم و تعیین عیار آنتی سرم تولیدی

برای تولید آنتی سرم از خرگوش سفید نیوزلندی ۷ ماهه با وزن ۲/۵ کیلوگرم استفاده شد. ابتدا ۲ میلی گرم از آموده خالص شده ویروس به طور وریدی، داخل رگ حاشیه‌ای گوش حیوان تزریق گردید و سه روز بعد از اولین تزریق ۳ میلی‌گرم از آموده خالص شده ویروس با حجم مساوی از روغن Freund`s complete adjuvant) FCA ) مخلوط و به صورت عضلانی به حیوان تزریق شد. سه تزریق عضلانی دیگر به فواصل یک هفته انجام‌گرفت. در تزریقات بعدی روغن FICA ( Freund`s in complete adjuvant) به کار رفت. ۸ روز پس از آخرین تزریق خون‌گیری به عمل آمد و سرم جدا شده به مدت ده دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید به آنتی سرم تولیدی میزان خیلی کمی نگهدارنده مانند آزید سدیم اضافه و سپس در آمپول‌های دو میلی لیتری به صورت پودر درآورده شد. تعیین عیار آنتی سرم تولیدی با استفاده از آزمون رسوب در قطرات ریز به روش بال (Ball,1974) انجام شد و برای بررسی واکنش بین آنتی سرم تولیدی در برابر عصاره گیاه آلوده و سالم از آزمون نشت دوطرفه در آگار به روش بال استفاده گردید(۲ و ۱۴).

تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس

برای تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس از تانک الکتروفورزعمودی مدل VEU-7303 ساخت شرکت پویا پژوهش و ژل پلی آکریل آمید حاوی سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE)استفاد شد. ژل مورد استفاد دارای یک قسمت متراکم کننده در بالا با غلظت ۴ درصد و یک قسمت جدا کننده با غلظت ۱۲ درصد در پایین بود. برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت الکتروفورز، یک حجم از آموده خالص شده ویروس و استاندارد وزن مولکولی را با یک حجم بافر نمونه مخلوط و به مدت سه دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد. پروتئین‌های استاندارد وزن مولکولی مورد استفاده (SIGMA M-4038)، میوزین با وزن مولکولی ۲۰۵ کیلو دالتون، بتاگالاکتوزیداز با وزن مولکولی ۱۱۶ کیلو دالتون، فسفوریلاز-ب- با وزن مولکولی ۹۷ کیلو دالتون، فروکتوز-۶- فسفات کیناز با وزن مولکول ۸۴ کیلو دالتون،آلبومین سرم گاوی با وزن مولکولی ۶۶ کیلو دالتون، گلوتامیک دهیدروژناز با وزن مولکولی ۵۵کیلو دالتون، آلبومین سفیده تخم مرغ باوزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون، گلیسر آلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز با وزن مولکولی ۳۶ کیلو دالتون، کربنیک آنهیدراز با وزن مولکولی ۲۹ کیلو دالتون، تریپسینوژن پانکراس گاوی با وزن مولکولی ۲۴ کیلو دالتون و بازدارنده تریپسین با وزن مولکولی ۲۰ کیلو دالتون بودند. عمل الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت و شدت جریان متغیر انجام گردید. برای رنگ آمیزی ژل از محلول ۰/۱ درصد کوماسی بلو در محلول حاوی متانول، آب مقطر و اسید استیک به نسبت حجمی ۱:۵:۵ به مدت یک شب استفاده شد و سپس در همان محلول (بدون کوماسی بلو) رنگ‌بری ژل انجام گردید(۱۸).

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.2.13.8]

آزمون وسترن بلات

بعد از اتمام الکتروفورز به منظور مشخص نمودن باندهای مربوط به پروتئین پوششی ویروس از آزمون و سترن بلات استفاده گردید. این آزمون با استفاده از دستگاه Tank electro blotting ساخت شرکت پویا پژوهش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ولتاژ ثابت ۴۵ ولت به مدت یک شب به روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. بعد از انتقال پروتئین‌ها، کاغذ نیترو سلولزی با استفاده از رنگ پونسو S (Ponceau S) رنگ‌آمیزی شد. بعد از قرمز رنگ شدن باندهای پروتئینی، خط سیر مربوط به چاهک استاندارد وزن مولکولی توسط قیچی از کاغذ نیترو سلولزی جدا گردید و بقیه کاغذ نیترو سلولزی در محلول پوشاننده (شیر خشک بدون چربی ۵ درصد) به مدت دو ساعت بر روی شیکر قرار داده شد و سپس به مدت دو ساعت در رقت ۱:۱۰۰ آنتی سرم تهیه شده قرار گرفت. بعد از چهار بار شستشو کاغذ نیترو سلولزی با بافرشوینده شامل 0.1M Tris-HCL . 1.5g Na_2HPO_4، 1g KH_2PO_4، 8g NaCl و 1gKCL به مدت ۲۰ دقیقه همراه با تکان دادن مداوم در رقت ۱:۳۰۰ از آنتی بادی ضد خرگوشی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. قبل از رنگ‌آمیزی، کاغذ نیترو سلولزی به مدت ۱۰ دقیقه در بافر شوینده قرار گرفته و سپس به محلول رنگ‌آمیزی حاوی نفتول فسفات و نمک فست رد (FAST RED) در بافر 1M Tris-HCL (pH=8) و 1M $mgCl_2$ منتقل شد. پس از مشاهده باندها غشا را با آب مقطر شستشو داده تا واکنش متوقف گردد(۶ و۱۹).

شناسایی و پراکندگی ویروس موزائیک یونجه

به منظور شناسایی و تعیین پراکنش ویروس موزائیک یونجه در طول بهار و تابستان از مزارع یونجه، سیب زمینی و گوجه فرنگی، مناطق شمالی و مرکزی استان خراسان به طور کاملاً تصادفی نمونه برداری صورت گرفت(جدول ۲).

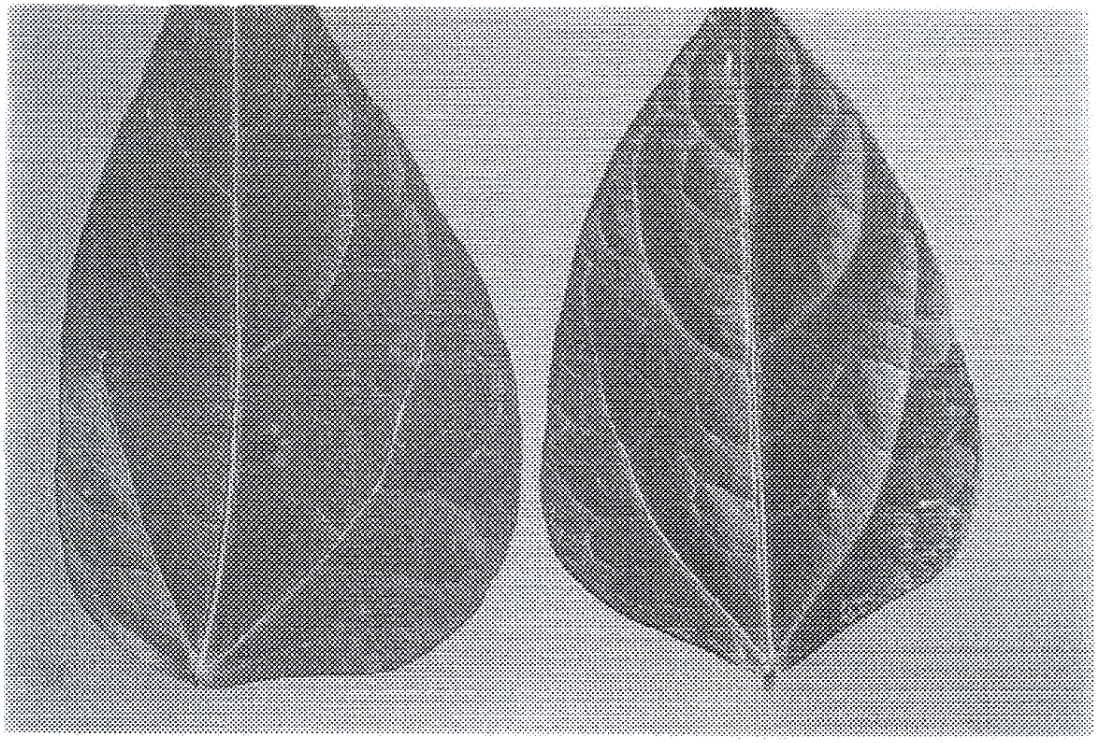
برای شناسایی ویروس از آزمون ساندویچ دو طرفه الیزا طبق روش کلارک و آدامز استفاده شد. رقت های IgG،۱:۱۰۰۰ و ۱:۵۰۰ ایمونوگلوبولین متصل به آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. شاهد مثبت ارسالی از موسسه DSMZ آلمان به نسبت ۱:۴ (حجمی:وزنی) در بافر استخراج عصاره گیری شد.

نتایج و بحث

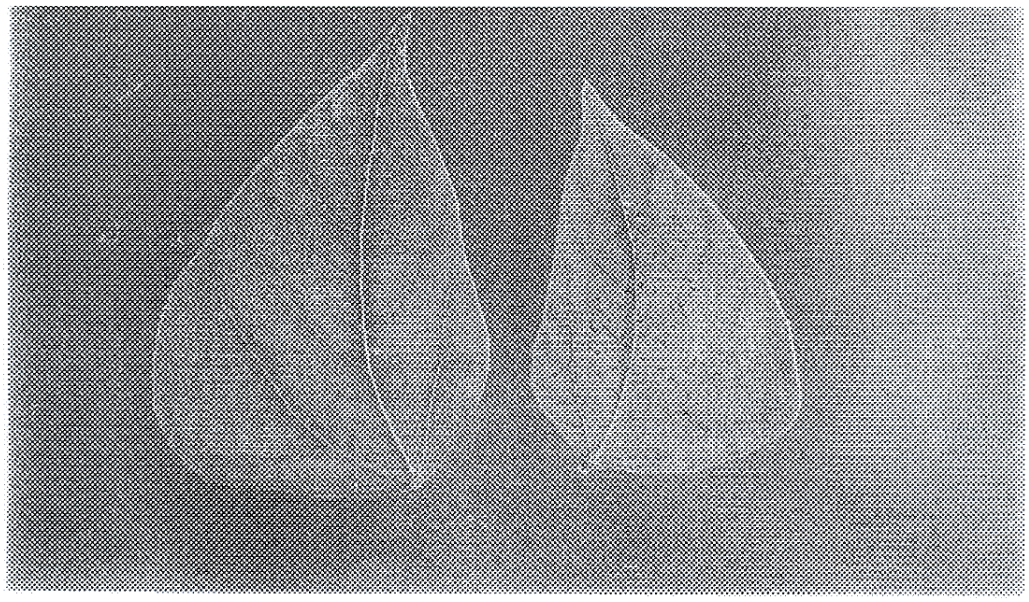
علائم حاصل از بررسی دامنه میزبانی در جدول ۱ درج گردیده است. براساس این نتایج علائم ایجاد شده در گیاهان لوبیا شامل لکه‌های موضعی نکروتیک بر روی برگ‌های مایه‌زنی شده و بدون آلودگی سیستمیک بود. جدایه مورد بررسی از این لحاظ با استرین‌هایی که ایجاد آلودگی سیستمیک بر روی گیاهان لوبیا می‌کنند تفاوت داشت (۸، ۲۰ و ۲۱). گیاهان لوبیا چشم بلبلی مایه‌زنی شده ایجاد لکه‌های موضعی بدون آلودگی سیستمیک نمودند که با نتایج گزارش شده در مورد جدایه این ویروس در مناطق کرج، ورامین، دماوند و همدان بر روی سیب زمینی یکسان بود ولی با نتایج کیسر در مورد لوبیا چشم بلبلی از ایران اختلاف داشت (۱و۱۲). نژادهای این ویروس علائم متفاوتی را بر روی توتون ایجاد می‌کنند(۱۵و۱۷). آلودگی سیستمیک، بدشکلی برگ‌ها و شفاف شدن رگبرگ‌ها علائم ایجاد شده توسط این جدایه بر روی برگ‌های اینوکوله شده *Nicotiana glutinosa* و *N.tabacum*.cv Samsun بود. در گیاهان ریحان، نخود ایرانی، گوجه فرنگی، یونجه، عدس، فلفل و سیب زمینی علائم موزائیک ایجاد گردید و در خیار هیچ گونه علائمی مشاهده نشد(شکل‌های ۱،۲و۳). از لحاظ خصوصیات سرولوژیکی این جدایه با جدایه آمریکایی رابطه نزدیکی دارد به طوری که در آزمون نشت دو طرفه در ژل آگاروز در برابر آنتی‌سرم جدایه آمریکایی (ارسالی از Dr.Ana.Mondjana) تولید رسوب نمود. این نتیجه با گزارش بانکرافت که نشان داده بود، استرین‌های ALMV علی رغم اختلاف از نظر بیماری‌زایی و منشأ جغرافیایی دارای ارتباطات سرولوژیکی نزدیکی با یکدیگر می‌باشند، مطابق بود(۳). بررسی طیف جذبی آلوده ویروس خالص شده بین طول موج‌های ۲۰۰

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.2.13.8]



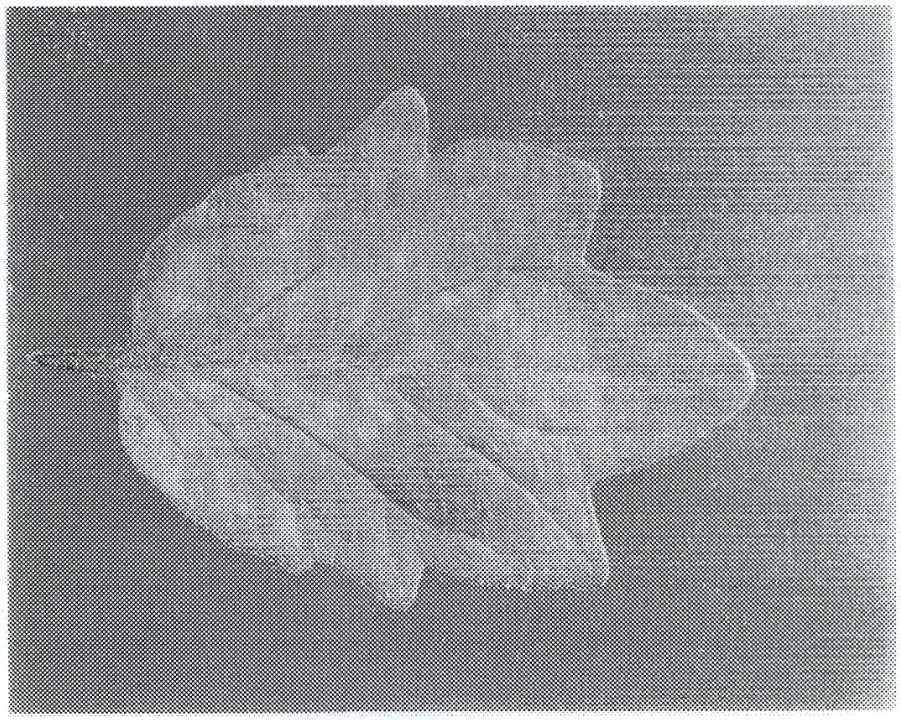
شکل۱. لکه‌های موضعی سبز رنگ بر روی برگ‌های *Vigna unguiculata* مایه زنی شده باALMV



شکل۲. لکه‌های موضعی نکروتیک حاصل از مایه زنی عصاره آلوده بر روی برگ *Phaselus vulgaris* L. cv. Redkidney، برگ سمت چپ شاهد

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.2.13.8]



شکل۳. علائم موزائیک بر روی *Lycopersicon esculentum* مایه‌زنی شده با ویروس

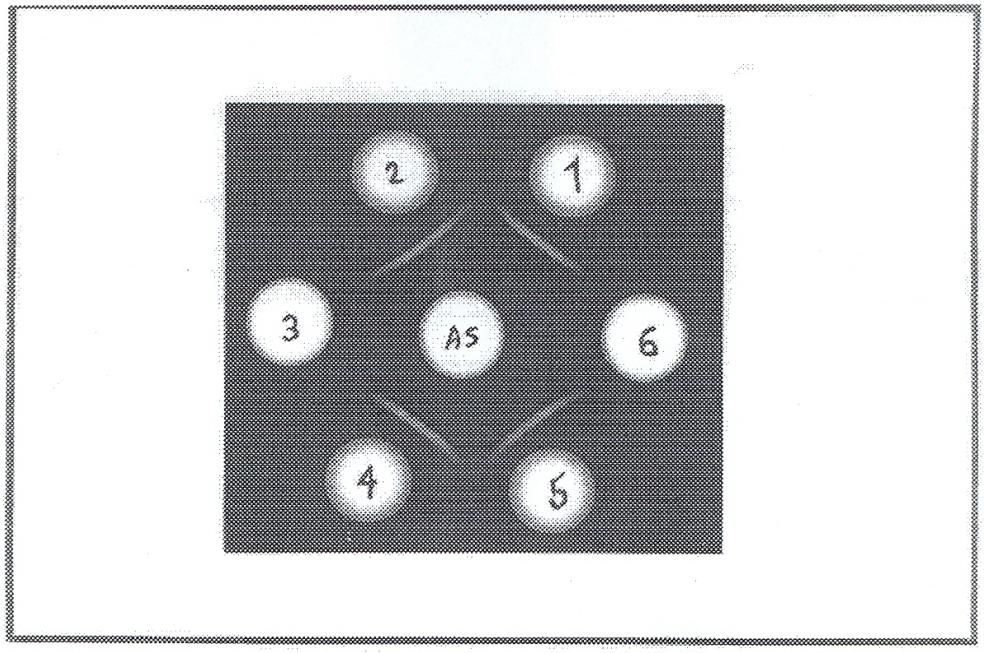
جدول ۲. مناطق نمونه برداری، تعداد نمونه‌های جمع آوری شده و تعداد نمونه‌های آلوده

محل نمونه برداری	تعداد نمونه‌های جمع آوری شده	تعداد نمونه‌های آلوده
چناران	۱۰۰	۴۳
قوچان	۷۳	۳۶
شیروان	۴۳	۲۷
مشهد	۴۹	۳۲
نیشابور	۶۱	۲۹
تربت حیدریه	۶۳	۳۵

تا ۳۵۰ نانومتر نشان دهنده خاصیت نوکلئوپروتئینی آموده بود. با اندازه‌گیری میزان جذب نور در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر نسبت ۲۶۰/۲۸۰ A برای ویروس ۱/۴۵ تعیین شد. این نتیجه به نتایج گزارش شده توسط هیول، بوس وجاسپارز هم‌چنین بسول و گیبس نزدیک بود (۴، ۵ و ۷). بازده عمل خالص سازی ویروس به ازای ۱۰۰ گرم بافت آلوده توتون با استفاده از روش روبرتسون و کیسر، ۱۱/۰۵ میلی گرم براورد گردید. آموده خالص شده ویروس در آزمون نشت دو طرفه در ژل آگاروز در مقابل آنتی سرم تولیدی باند رسوبی تشکیل داد (شکل ۴). با توجه به نتایج آزمون رسوب در قطرات ریز،عیار آنتی سرم تولیدی ۱/۱۰۲۴ و ۱/۲۵۶ به ترتیب در برابر رقت های ۱/۲ و ۱/۸ از ویروس خالص شده به دست آمد که با توجه به نتایج بانکرافت، بوس و جاسپارز و بسول و گیبس که عیار آنتی سرم ویروس را بین ۱/۵۱۲ تا ۱/۱۰۲۴ گزارش داده بودند، آنتی سرم تهیه شده دارای عیار قابل قبولی بود. از آنتی سرم تولیدی در آزمون نشت دو طرفه در ژل آگاروز و وسترن بلات استفاده گردید. با توجه

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.2.13.8]

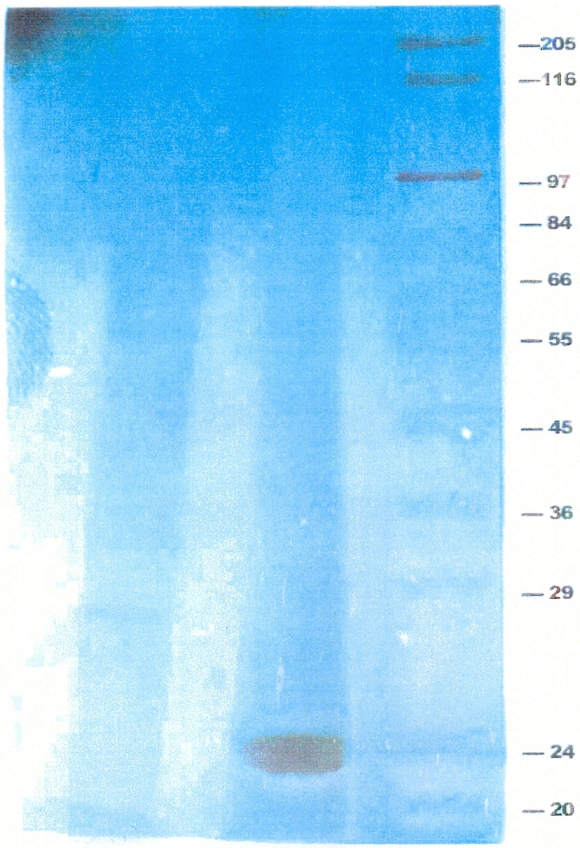


شکل۴. نتایج آزمون نشت دو طرفه در آگار، چاهک‌های شماره۱ و ۲ حاوی عصاره گیاه آلوده، چاهک‌های شماره ۴ و ۵ حاوی آموده خالص شده ویروس و چاهک‌های ۳ و ۶ به ترتیب حاوی بافر رقیق کننده و عصاره گیاه سالم

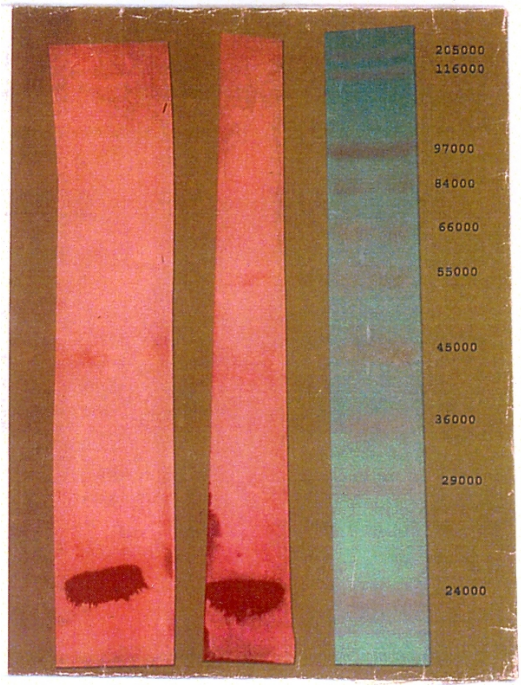
به میزان حرکت نسبی پروتئین‌های استاندارد وزن مولکولی و لگاریتم وزن مولکولی آنها و رسم نمودار ،وزن مولکولی باند مربوط به آموده خالص شده این جدایه از ویروس ۲۴ کیلو دالتون به دست آمد(شکل ۵). نتیجه به دست آمده از الکتروفورز پروتئین پوششی جدایه مورد بررسی با نتایج گزارش شده سایر محققان تفاوت بارزی نشان نداد. در آزمون western blot ماهیت ویروسی بودن باند ۲۴ کیلو دالتونی با استفاده از آنتی سرم اختصاصیALMV تأیید گردید(شکل ۶). بررسی پراکنش ویروس موزائیک یونجه با استفاده از آزمون DAS-ELISA نشان داد که مزارع یونجه، سیب زمینی و گوجه فرنگی در مناطق شمالی و مرکزی خراسان به این ویروس آلوده می‌باشند و میانگین کل درصد آلودگی در مناطق مورد بررسی ۵۳ درصد مشخص گردید. اندازه‌گیری میزان جذب نور ماورای بنفش در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا خوان (ELISA READER,Lab system Multiskan MS,ORIGINAL) برای هر یک از حفرات پلیت انجام شد. سه برابر میزان جذب طیف نوری توسط حفره مربوط به گیاه سالم به علاوه انحراف معیار آنها به عنوان واکنش مثبت نمونه گیاهی آلوده تلقی گردید. با توجه به آزمون کای مربع بین مناطق مورد بررسی از لحاظ میزان آلودگی اختلاف معنی‌داری دیده نشد که این نتیجه با توجه به شرایط آب و هوایی تقریباً یکسان، وجود ناقلین ویروس و کاشت میزبان‌های این ویروس در سرتاسر سال در کلیه مناطق نمونه برداری شده منطقی به نظر می رسد. با در نظر گرفتن دامنه میزبانی گسترده ویروس و اثر قابل توجه آن بر روی کمّیت و کیفیت محصولات، تحقیق و بررسی بیشتر و شناسایی کولتیوارهای مقاوم و یا کولتیوارهایی با درجه حساسیت پایین نسبت به ALMV در میان ارقام یونجه داخلی و سایر میزبان‌های این ویروس ضروری به نظر می‌رسد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.2.13.8]



شکل۵. نقش الکتروفورزی پروتئین جدایه مورد بررسیALMV در ژل پلی اکریل آمدی جاوی به ترتیب ستون اول مربوط به پروتئین‌های استاندارد، ستون دوم مربوط به آموده خالص شده ویروس و ستون سوم مربوط به آموده گیاه سالم



شکل۶. نتیجه آزمونwESTERN BLOT و مقایسه نوار مربوط به باند پروتئین پوششی ویروس با نوارحاوی باندهای استاندارد وزن مولکولی

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.2.13.8]

سپاسگزاری

از دکتر جواشیمیر هاماچر، دکتر آنـا مونـدجانا، دکتـر عبدالرضـا وارسته، دکتر حسین معصومی و مسئولین محتـرم سـرم سـازی رازی مشهد به خاطر همکاری‌های علمی و صمیمانه در اجـرای این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. معصومی شهر بابک، ح.، غ. مصاحبی محمدی. ۱۳۷۰. بررسی ایزوله‌های ویروس موزائیـک یونجـه روی سـیب زمینـی در منـاطق کرج، ورامین، دماوند و همدان.دهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ۱۷۷ صفحه.

2. Ball, E. M. 1974. serological Tests for the Identification of Plant Viruses.The American Phytopathological Society. Plant Virology Committee, St. Paul,Minnesota, U.S.A. 31PP.
3. Bancroft, J. B., E. L. Moorhead, J. Tuite and H. P. Liu. 1960. The Antigenic characteristics and relationship among of *Alfalfa mosaic* virus .Phytopathol. 50:34-39.
4. Bos, L. E. and M. J. Jaspars. 1971. *Alfalfa mosaic virus*CMI/AAB.Description of plant viruses , NO.46
5. Boswell, K. F. and A. J. Gibbs. 1983. Viruses of Legumes. Description and keys from VIDE. CAB International Pub., London.
6. Dunn, M. J. 1998. Electroblotting of Proteins from Polyacrylamid Gel. *In*: Methods in Molecular Biology, Protein Purification Protocols. 59:363-370.
7. .Hull, R., M. W. Ress and M. N. Short. 1969. Studies on *Alfalfa mosaic virus* Virology 37: 404-415.
8. Hull, R. 1969. *Alfalfa mosaic virus* Adv. Virus Res. 15:365-433.
9. Jaspars,E. M. J. and L. Bos. 1980. *Alfalfa mosaic virus.* Description of plant viruses. NO. 229 CMI.Kew, Surrey, England.
10. Jones, R. A. C. and D. G. Ferris. 2001. Virus infection stimulates phyto-Oestrogen production in pausture legume plant growing in grazed swards. Ann. Appl. Biol. 138: 171-179.
11. Kaiser, W. J. and D. G. Robertson. 1976. Notes on East African plant virus disease. II *Alfalfa mosaic virus* E. Afr. Agric. For. J. 42:47-54.
12. Kaiser, W. J. 1979. Natural infection of cow pea and mungbean by *Alfalfa mosaic virus* in Iran. Plant Dis. Rep. 63:414-418.
13. Mathews, R. E. F. 1991. Plant Virology. 3rd ed., Academic Press. London and NewYork.
14. Moorhead, B. E. 1961. Microprecipitintest. *In*: Serologic Tests For the Identification of Plant Viruses. APS Press. U.S.A.
15. Pathipanawat, W., K. Sivasithamparam and R. A. C. Jones. 1995. Studies on seed and pollen transmission of *Alfalfa mosaic,cucumber mosaic and bean yellow mosaic viruses* in cultivars and accession of annual medicago species. (Abstract). Aust. J. Agric. Res. 46:153-165.
16. Parrella, G., H. Laterrot and G. Marchoux. 1998. Screening lycopersicon accession for resistance to *Alfalfa mosaic virus* . J. of Genet. and Breed. 51:75-78.
17. Silbert, G. and H. E. Heggestad. 1965. A strain *of Alfalfa mosaic virus* occuring naturally on field tobacco. Phytopathol. 55: 1108-1113.
18. Swank, R. T. and K. D. Munkres. 1971. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamid gels with sodium dodecyl sulfate. Anal. Biochem. 39:462-477.
19. Towbin, H., T. Staehelin and G. Gordan. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some application. Proc. Acad. Sci. 79: 4350-4354.
20. Zaumeyer, W. J. 1963. Two new strains of *Alfalfa mosaic virus* systemically infectious to bea n.Phytopathol. 53: 444-449.
21. Zaumeyer, W. J. 1960. Vein necrosis, another systemic infectious strains of *Alfalfa mosaic virus* in bean. Phytopathol. 50: 220-231.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.2.13.8]