

برهمکنش ویروس ایکس کاهو (Lettuce virus X) و ویروس پیسک سبزرده تمشک (Rubus chlorotic mottle sobemovirus) جدا شده از کاهو در دو گونه سلمه تره

نرگس صدر محمد بیگی^۱، مینا کوهی حبیبی^۲ و اکبر دیزجی^{۳*}
۱، ۲، ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۶ - تاریخ تصویب: ۹۱/۳/۳۰)

چکیده

آلودگی توام گیاهان با بیش از یک ویروس منجر به بروز انواع متفاوتی از برهمکنش بین ویروسهای آلوده کننده می گردد. برهمکنش دو ویروس بیمارگر کاهو، ویروس ایکس کاهو (Lettuce virus X, LeVX) و سوبموویروس پیسک سبزرده تمشک (Rubus chlorotic mottle sobemovirus, RuCMV) که به تازگی از ایران شناسایی شده اند، در بوته های دوگانه آلوده *Chenopodium murale* و *Chenopodium quinoa* مورد مطالعه قرار گرفت. مایه زنی گیاهان به روش مکانیکی و بصورت جداگانه با LeVX یا RuCMV و نیز توام با هر دو ویروس انجام شد. علائم بیماری در بوته های دوگانه آلوده *C. quinoa* به مراتب شدیدتر از بوته های تک آلوده این گیاه نمایان شد؛ همچنین بر اساس نتایج حاصل از آزمونهای الیزای کمی و وسترن بلات، سطح تجمع RuCMV در بوته های دوگانه آلوده این گیاه نسبت به بوته های تک آلوده افزایش یافت. بر اساس این نتایج برهمکنش RuCMV با LeVX در میزبان *C. quinoa* از نوع هم افزایی بود. آلودگی توام *C. murale* نیز منجر به تشدید علائم آلودگی در بوته های دوگانه آلوده نسبت به تک آلوده شد، درحالیکه افزایش قابل توجهی در سطح تجمع RuCMV در بوته های دوگانه آلوده نسبت به تک آلوده مشاهده نگردید. لذا برهمکنش RuCMV با LeVX در این میزبان از نوع هم افزایی نمی باشد. اما برخلاف RuCMV، سطح تجمع LeVX در بوته های دوگانه آلوده هر دو میزبان *C. quinoa* و *C. murale* نسبت به بوته های تک آلوده کاهش قابل ملاحظه ای یافت. این امر نشان می دهد که برهمکنش LeVX با RuCMV در بوته های دوگانه آلوده این دو گونه از نوع آنتاگونیستی می باشد.

واژه های کلیدی: LeVX، RuCMV، آلودگی توام، هم افزایی، آنتاگونیسم

مقدمه

جنس پوتی ویروس (*Potyvirus*) و یک ویروس غیر خویشاوند حاصل می شود. در اغلب این برهمکنش ها، سطح تجمع پوتی ویروس تغییری نمی کند درحالیکه سطح تجمع ویروس دوم (غیر پوتی ویروس) به طور قابل توجهی افزایش می یابد (Vance et al., 1995; Rochow & Ross, 1955; Pruss et al., 1997). نمونه بارز این نوع هم افزایی در آلودگی توام بوته های توتون

آلودگی توام گیاهان با جفت ویروسهای غیر خویشاوند، که منجر به تشدید علائم بیماری نسبت به آلودگی انفرادی آنها با هر یک از ویروسها می شود، پدیده هم افزایی (synergism) نامیده می شود (Damirdagh & Ross, 1967). برهمکنش هم افزایی یک جانبه غالباً به دنبال آلودگی گیاه با ویروسی از

این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. در این تحقیق تیمارهای آزمایشی شامل بوته های شاهد (مایه زنی شده با بافر)، بوته های تک مایه زنی شده با هر ویروس (LeVX یا RuCMV) و بوته های مایه زنی شده با هر دو ویروس بود (جدول ۲). مایه زنی مکانیکی بوته ها در مرحله چهار تا پنج برگی با هر ویروس (مایه زنی انفرادی) و با دو ویروس (مایه زنی دوگانه) و با استفاده از عصاره برگ آلوده به ویروس (های) مورد نظر در بافر فسفات (۰/۵ مولار، اسیدیته ۷) انجام شد. در مایه زنی دوگانه، مایه تلقیح برای هر ویروس جداگانه تهیه و بصورت همزمان روی برگ های متقابل مایه زنی شد.

تعیین نرخ آلودگی انفرادی و دوگانه با روشهای -DAS- RT-PCR و ELISA

نرخ آلودگی در بوته های تک/ دوگانه مایه زنی شده با استفاده از آزمون سرولوژیکی ساندویچ دوطرفه الایزا (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) (Clark & Adams, 1977) با بکارگیری آنتی بادی چندهمسانه ای (DSMZ AS-0904) LeVX و (DSMZ AS-0913) RuCMV به رقت توصیه شده (۱۰۰۰ برابر) تعیین گردید. بافتهای برگی تازه متعلق به بوته های تک یا دوگانه مایه زنی شده، ۱۴ روز پس از مایه زنی (dpi) در بافر استخراج الایزا (PBST) محتوی ۲٪ PVP (پلی وینیل پیرولیدین)) به نسبت ۱:۱۰ عصاره گیری و در DAS-ELISA بکار گرفته شد. جذب هر چاهک بوسیله دستگاه ELISA-reader (Beckman AD 340, USA) در ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. نمونه هایی مثبت تلقی گردید که مقدار جذب آنها بیشتر از سه برابر جذب شاهد منفی باشد. نرخ آلودگی (تعداد بوته های آلوده/تعداد بوته های مایه زنی شده) براساس داده های الایزا تعیین گردید.

علاوه بر روش فوق، نرخ آلودگی دوگانه در بوته های دوگانه مایه زنی شده با LeVX + RuCMV، از طریق واکنش نسخه برداری معکوس زنجیره پلیمرز (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) تعیین، سپس با نتایج سرولوژیک مقایسه گردید. ۱۴ روز پس از مایه زنی، RNA کل با استفاده از RNeasy plant minikit (Qiagen, Germany) از برگهای بوته های دوگانه مایه زنی شده و بوته های شاهد استخراج

با ویروس های وای و ایکس سیب زمینی *Potato virus X, PVX و Y, PVY* شناخته شده است (Goodman & Ross, 1974). در هم افزایی دوجانبه تجمع هر دو ویروس در بوته های دوگانه آلوده افزایش می یابد که در این خصوص می توان به آلودگی توام گیاه ذرت با ویروس پیسک سبزرذ ذرت (*Maize chlorotic mottle virus, MCMV*) و ویروس موزائیک رگه ای گندم (*Wheat streak mosaic virus, WSMV*) اشاره کرد (Scheets, 1998). در هم افزایی نوع سوم، نظیر آلودگی همزمان بوته های توتون با ویروس های موزائیک خیار و توتون (*Cucumber mosaic virus, CMV*) و (*Tobacco mosaic virus, TMV*)، علائم بیماری در گیاهان دوگانه آلوده شدیدتر می شود درحالیکه سطح تجمع ویروسها در این گیاهان نسبت به گیاهان تک آلوده افزایش نمی یابد (Garrces-Orejuela & Pound, 1957).

اخیرا ویروس ایکس کاهو (*Lettuce virus X, LeVX*)، متعلق به *Potexvirus* به عنوان ویروس جدید بیمارگر کاهو از ایران گزارش گردیده است (Dizdaji et al., 2008). تحقیقات روی سوبموویروس بیمارگر کاهو در ایران نیز نشان داد که بر اساس یکسانی بالای توالی نوکلئوتیدی این ویروس با گونه جدید ویروس پیسک سبزرذ تمشک (*Rubus chlorotic mottle virus, RuCMV*) (McGavin & MacFarlane, 2009)، ویروس مورد مطالعه جدایه ای از RuCMV می باشد (Koochi-Habibi et al., 2009). بررسی های اولیه نشان داد که هر دو ویروس بوته های *Chenopodium murale* و *Chenopodium quinoa* را بطور سیستمیک آلوده می سازند؛ لذا در این پژوهش، برهمکنش آنها در هر دو گیاه محک مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

گیاهان، ویروس ها و مایه زنی ها

گیاهان محک *C. quinoa* و *C. murale* در شرایط دمایی تحت کنترل گلخانه (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) پرورش یافتند. جدایه های LeVX و RuCMV پس از خالص سازی بیولوژیکی در بوته های *C. quinoa*، در میزبان *C. murale* تکثیر و به عنوان منابع ویروسی در

واکنش های با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت.

گردید. RT-PCR با بکاربردن RNA کل استخراج شده و جفت آغازگر اختصاصی هر ویروس (جدول ۱) در

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در RT-PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر	موقعیت	دمای دورگه سازی	اندازه قطعه تکثیری	منبع
LeVX S2	5'-GAAACGCATGCGCCGCTTCC-3'	۲۷۱۷-۲۷۳۶	۵۷ °C	۵۰۰ bp	Dizadji et al., (2008)
LeVX C2	5'-TAGTCCCCGGGAGTCTGGGTAGGGTAGAG-3'	۴۷۷۶-۴۸۰۴			
RuCMV cps	5'- ATGAACCAAACGAAGAAGAA-3'	۳۱۶۰-۳۱۷۹	۴۷ °C	۷۲۵ bp	Koohi-Habibi et al., (2009)
RuCMV cpc	5'-TTATTTATTGAGCCTTGCGG-3'	۳۸۶۶-۳۸۸۵			

شاهد بود به عنوان نمونه آلوده به آن ویروس در نظر گرفته شد. در نهایت، میانگین مقادیر جذب چاهک های سه تایی مربوط به بوته های آلوده به عنوان سطح تجمع هر ویروس در بوته های تک یا دوگانه آلوده تعیین و با سطح تجمع همان ویروس در سایر تیمارها مقایسه شد. سطح پروتئین پوششی LeVX و RuCMV در بوته های تک و دوگانه آلوده، با آزمون وسترن بلات آماده های پروتئین کل محلول گیاهان تعیین گردید. پروتئین کل محلول از برگهای مشابه بوته های تک و دوگانه آلوده *C. murale* (۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه زنی) و *C. quinoa* (۱۴ و ۳۰ روز پس از مایه زنی) با استفاده از ۵ حجم بافر استخراج (۵۰ میلی مول تریس، ۵ میلی مول H_3BO_3 ، ۵٪ گلیسرول، ۱/۵٪ PVP، با اسیدیته ۸، حاوی ۰/۰۱ درصد بتا مرکاپتواتانول) استخراج گردید. غلظت آماده های پروتئین کل با استفاده از معرف برادفورد (۰/۰۱ درصد کوماسی بلو G-250، ۴/۷ اتانول و ۸/۵٪ اسید فسفریک) اندازه گیری شد (Bradford, 1976). پس از تهیه غلظتهای مختلف BSA (۲۵ تا ۴۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بافر استخراج پروتئین کل) و مخلوط کردن هر محلول با ۱۰ حجم از معرف برادفورد، میزان جذب هر یک در ۵۹۵ نانومتر تعیین و منحنی کالیبراسیون استاندارد بین غلظت BSA و میزان جذب نور ترسیم شد. پس از اندازه گیری میزان جذب مخلوط هر آماده پروتئین گیاهی- معرف برادفورد در ۵۹۵ نانومتر، غلظت پروتئین کل آن آماده با استفاده از منحنی کالیبراسیون تعیین گردید. سپس مقادیر یکسانی (۱۸ میکروگرم) از پروتئین کل هر نمونه با روش sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

به منظور کاهش مصرف مواد شیمیایی و صرفه جویی در زمان در مرحله PCR، امکان ردیابی هر دو ویروس در بوته های دوگانه آلوده در یک واکنش مشترک مورد بررسی قرار گرفت. لذا cDNA جداگانه سنتز شده LeVX و RuCMV مخلوط با جفت آغازگرهای هر دو ویروس در یک واکنش مشترک با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری قرار گرفتند. سپس PCR در دمای دورگه سازی ۴۸ درجه سانتیگراد انجام شد. PCR انفرادی برای هر ویروس به عنوان شاهد در واکنش های جداگانه با استفاده از cDNA و جفت آغازگر اختصاصی آن ویروس و دمای دورگه سازی مناسب آن واکنش صورت گرفت. بررسی سطح تجمع ویروسی در بوته های تک و دوگانه آلوده به روش الایزا کمی و آزمون وسترن بلات براساس نتایج حاصل از DAS-ELISA که با بکارگیری چندین رقت از آماده گیاهی تک آلوده به LeVX یا RuCMV در بافر استخراج الایزا (۱:۲۰، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰، ۱:۵۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۲۰۰۰) انجام گرفت، بهترین نتایج قابل مقایسه از رقت ۱۰ برابر به دست آمد. بنابراین، بررسی سطح تجمع هر ویروس در بوته های تک/دوگانه آلوده طی DAS-ELISA کمی (quantitative ELISA)، در فاصله زمانی ۱۴ روز پس از مایه زنی، با غلظت ۱:۱۰ بافت برگی (جداشده از برگهای دارای جایگاه مشابه در بوته ها) در بافر استخراج انجام شد. از هر نمونه گیاهی در سه چاهک از پلیت الایزا ریخته شده و پس از تعیین میزان جذب نور ۴۰۵ نانومتری توسط چاهک ها در پایان آزمون، در مواردی که میانگین مقدار جذب نور توسط چاهکهای سه تایی هر نمونه حداقل بیش از سه برابر مقادیر جذب تیمار

C. quinoa باعث تشدید علائم بیماری، کاهش رشد گیاه و میزان برگ زایی گردید. به طوری که بوته های دوگانه آلوده هر دو میزبان نسبت به بوته های تک آلوده با هر ویروس علائم شدیدتری نظیر، موزائیک شدید، پیچیدگی و بد شکلی برگ و در مورد *C. murale* کوتولگی نشان دادند. آلودگی انفرادی با RuCMV در هر دو میزبان علائم خفیف تری نسبت به بوته های دوگانه آلوده نشان دادند درحالی که گیاهان تک آلوده به LeVX هیچ علائم ویروسی واضحی در دو میزبان مورد بررسی نشان ندادند (شکل ۱). نرخ آلودگی به هر ویروس در بوته های دوگانه مایه زنی شده هر دو گیاه محک نسبت به بوته های تک مایه زنی شده کمتر بود به جز نرخ آلودگی به LeVX در *C. quinoa* که در تیمار دو گانه مایه زنی شده (۲۰/۶٪) بیشتر از نرخ آلودگی در بوته های تک مایه زنی شده (۱۴/۷٪) بود (جدول ۲).

(SDS-PAGE) electrophoresis در ژل پلی آکریل آمید تفکیک شد (Laemmli, 1970). سپس باندهای پروتئینی با استفاده از دستگاه وسترن بلات (Mini VE, Amersham Bioscience, UK) طی جریان الکتروسیسته ۳۶۰ میلی آمپر به مدت ۱۲۰ دقیقه به کاغذ نیتروسولوز انتقال یافتند. پروتئین پوششی هر ویروس از طریق تیمار با آنتی بادی چندهمسانه ای اختصاصی همولوگ (با غلظت ۱:۱۰۰۰) ردیابی و پس از تیمار غشاء با آنتی بادی ضد خرگوش نشاندار با آلکالین فسفاتاز تهیه شده از بز (با غلظت ۱:۱۰۰۰)، با استفاده از محلول NBT/BCIP قابل مشاهده گردید (Towbin *et al.*, 1979).

نتایج

تاثیر آلودگی دوگانه برعلائم بیماری و نرخ آلودگی آلودگی دوگانه با LeVX و RuCMV در *C. murale* و

جدول ۲- نرخ آلودگی انفرادی و دوگانه و مقایسه سطح تجمع ویروس ایکس کاهو (LeVX) و ویروس پیسک سبزد تمشک (RuCMV) به روش الیزای کمی در بوته های *C. murale* و *C. quinoa*. پس از مایه زنی انفرادی با هر ویروس و مایه زنی دوگانه با

هر دو ویروس

مایه تلقیح	ویروس مورد سنجش	<i>C. murale</i>				<i>C. quinoa</i>			
		نرخ آلودگی* انفرادی	نرخ آلودگی* دوگانه	غلظت ویروس**	غلظت نسبی (دوگانه/ انفرادی)	نرخ آلودگی* انفرادی	نرخ آلودگی* دوگانه	غلظت ویروس**	غلظت نسبی (دوگانه/ انفرادی)
LeVX	LeVX	24/34 (70.6)	-	0.656±0.3	-	5/34 (14.7)	-	0.804±0.04	-
	RuCMV	0/34 (0)	-	0	-	0/34 (0)	-	0	-
Mix	LeVX	16/34 (47)	6/34 (17.6)	0.496±0.44	0.756	7/34 (20.6)	4/34 (11.8)	0.508±0.16	0.631
	RuCMV	17/34 (50)	-	0.410±0.13	0.666	25/34 (73.5)	-	0.422±0.02	1.23
RuCMV	LeVX	0/34 (0)	-	0	-	0/34 (0)	-	0	-
	RuCMV	20/34 (59)	-	0.615±0.27	-	31/34 (91.2)	-	0.342±0.03	-
Virus-free	LeVX	0/34 (0)	-	0	-	0/34 (0)	-	0	-
	RuCMV	0/34 (0)	-	0	-	0/34 (0)	-	0	-

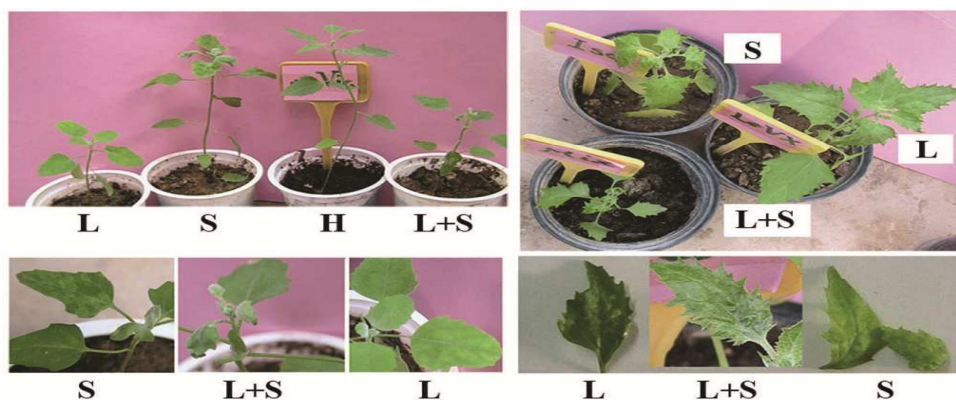
* تعداد بوته های آلوده شده/ تعداد بوته های مایه زنی شده، (= درصد آلودگی)

** میانگین جذب نور در ۴۰۵ نانومتر توسط چاهکهای سه تایی هر بونه (تک یا دوگانه آلوده) ± انحراف معیار

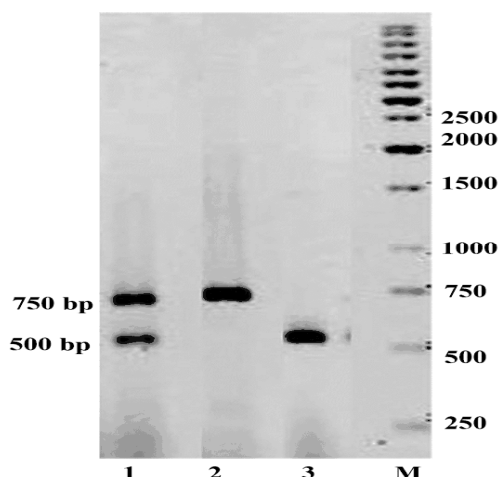
واکنش زنجیره ای پلی مراز (مشترک برای هر دو ویروس)، منجر به تکثیر دو قطعه DNA به اندازه ۵۰۰ و ۷۵۰ جفت باز (به ترتیب متعلق به LeVX و RuCMV) گردید که با قطعات DNA تکثیر شده طی واکنش های انفرادی انجام

براساس نتایج حاصل از DAS-ELISA که توسط RT-PCR نیز تایید گردید، نرخ آلودگی دوگانه به LeVX/RuCMV در بوته های *C. murale* (۱۷/۶٪) نسبت به *C. quinoa* (۱۱/۸٪) بیشتر بود. ردیابی آلودگی دوگانه و تعیین نرخ آن طی یک

شده PCR برای هر ویروس، مطابقت داشت (شکل ۲).



شکل ۱- علائم ایجاد شده توسط LeVX (L)، RuCMV (S)، و LeVX+RuCMV (L+S) در *C. quinoa* (سمت چپ) و *C. murale* (سمت راست). H (گیاه سالم را نشان می دهد).



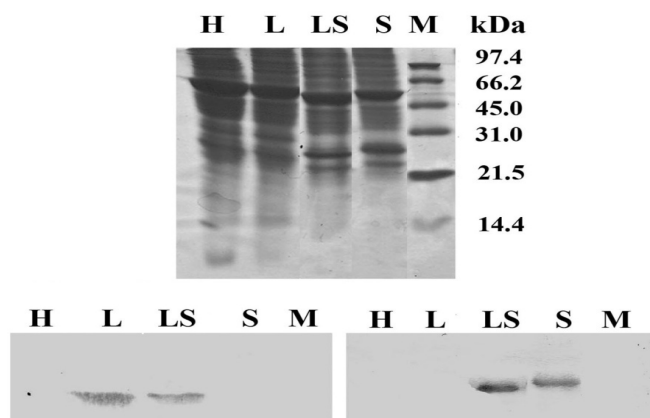
شکل ۲- تکثیر قطعه ای از ژنوم LeVX (۵۰۰ جفت بازی) و RuCMV (۷۵۰ جفت بازی) در یک واکنش مشترک زنجیره ای پلی مرز با استفاده از آر.ان.ا کل بوته های دوگانه آلوده *C. murale* (چاهک ۱) و جفت آغازگرهای اختصاصی LeVX+RuCMV. قطعات متناظر در واکنشهای انفرادی PCR بوته های تک آلوده به LeVX (چاهک ۲) و RuCMV (چاهک ۳) همانندسازی شدند. M، مارکر DNA.

های دوگانه آلوده *C. murale* نسبت به بوته های تک آلوده کاهش پیدا کرد؛ اما نتایج این دو روش در مورد تغییرات سطح تجمع پروتئین پوششی RuCMV با هم سازگاری نداشت. چنانچه در الیزای کمی سطح تجمع این ویروس در بوته های دوگانه آلوده نسبت به تک آلوده کاهش نشان داد ولی در آزمون وسترن بلات تفاوت واضحی بین بوته های دوگانه

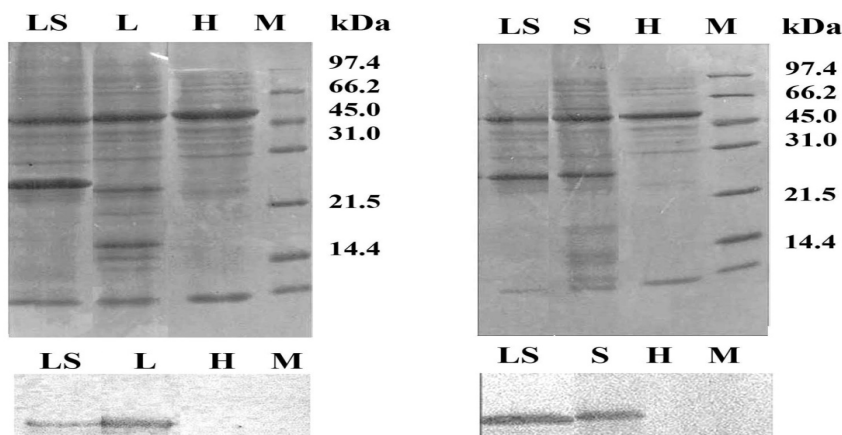
تأثیر آلودگی دوگانه بر سطح تجمع هر ویروس

نتایج آزمون الیزای کمی و وسترن بلات در بازه زمانی ۱۴ روز پس از مایه زنی، حاکی از افزایش سطح تجمع پروتئین پوششی RuCMV و کاهش در گیاهان دوگانه آلوده *C. quinoa* نسبت به بوته های تک آلوده با هر ویروس بود. بر اساس نتایج این دو آزمون در همین بازه زمانی، سطح تجمع پروتئین پوششی LeVX در بوته

آلوده و تک آلوده مشاهده نشد (جدول ۲؛ شکل ۳ و ۴).



شکل ۳- نقشه الکتروفورز (بالا) و آزمون وسترن بلات آلوده های پروتئین کل *C. murale* پس از تیمار با آنتی بادی چند همسانه ای LeVX (پایین چپ) و RuCMV (پایین راست) ۱۴ روز پس از مایه زنی. L، تک آلوده به LeVX؛ S، تک آلوده به RuCMV؛ LS، دوگانه آلوده به LeVX/RuCMV؛ H، شاهد (مایه زنی شده با بافر)؛ M، مارکر پروتئینی. این تصویر از چاهک های ناپیوسته متعلق به یک ژل و غشا تشکیل شده است.



شکل ۴- نقشه الکتروفورز (بالا) و آزمون وسترن بلات آلوده های پروتئین کل *C. quinoa* پس از تیمار با آنتی بادی چند همسانه ای LeVX (پایین چپ) و RuCMV (پایین راست) ۱۴ روز پس از مایه زنی. L، تک آلوده به LeVX؛ S، تک آلوده به RuCMV؛ LS، دوگانه آلوده به LeVX/RuCMV؛ H، شاهد (مایه زنی شده با بافر)؛ M، مارکر پروتئینی. این تصویر از چاهک های ناپیوسته متعلق به یک ژل و غشا تشکیل شده است.

در این پژوهش، علائم بیماری شدیدتری در بوته های دوگانه آلوده *C. murale* و *C. quinoa* نسبت به بوته های تک آلوده با هر ویروس مشاهده شد. بنابراین تشدید علائم بیماری در آلودگی دوگانه را می توان دلیلی بر پدیده هم افزایی در نظر گرفت. شبیه این نتایج

بحث

هم افزایی اغلب در آلودگیهای دوگانه با ویروس های غیر خویشاوند رخ می دهد که منجر به تشدید علائم بیماری نسبت به آلودگیهای انفرادی ویروسی می گردد (Walkey & Payne, 1990; Cho et al., 2000).

موزائیک سویا (*Soybean mosaic potyvirus*, SMV) در بوته های دوگانه آلوده سویا است. به طوری که هم افزایی AMV با SMV باعث افزایش سطح تجمع AMV و برهمکنش آنتاگونیستی SMV با AMV منجر به کاهش سطح تجمع SMV در آلودگی مخلوط گردید (Malapi-Nelson et al., 2009). مکانیسم های برهمکنش هم افزایی RuCMV با LeVX و نیز برهمکنش آنتاگونیستی LeVX با RuCMV نامشخص بوده و نیاز به بررسی دارد. البته قابل ذکر است که TGBp1 در پوتکس ویروس ها به عنوان یک بازدارنده خاموشی RNA، که نوعی مکانیسم دفاعی گیاهی علیه ویروسها به شمار می آید، می باشد (Voinnet et al., 2000). به نظر می رسد برهمکنش هم افزایی RuCMV با LeVX در گیاهان دوگانه آلوده *C. quinoa* به واسطه مکانیسمی مشابه قابل بیان باشد. با این که فعالیت بازدارندگی خاموشی RNA مربوط به پروتئین P1 سوبموویروسها نیز قبلا شناخته شده است، تاثیر آنتاگونیستی RuCMV بر LeVX قابل توجیه نمی باشد. تحقیق حاضر نشان داد که آلودگی مخلوط LeVX و RuCMV در گیاه می تواند منجر به تشدید بیماری و گاهی بروز هم افزایی شود. با توجه به وقوع آلودگی دوگانه بوته های کاهو به این دو ویروس در مزارع، که در طی بررسی های پیشین ردیابی شده است، مطالعه برهمکنش آنها در ارقام پرکشت کاهو در ایران توصیه می شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از زحمات آقای دکتر استفان وینتر (DSMZ, Germany) بخاطر کمک در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می نمایند.

در بررسی آلودگی دوگانه بوته های لوبیا چشم بلبلی با CMV و ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی (*Blackeye cowpea mosaic virus*, BLCMV) به دست آمد که منجر به افزایش شدت کوتولگی و تاوولی شدن برگها گردید (Wyatt et al., 1976). افزایش سطح تجمع RuCMV در بوته های دوگانه آلوده *C. quinoa*، بیانگر برهمکنش هم افزایی RuCMV با LeVX در این میزبان است درحالیکه سطح تجمع این ویروس در بوته های دوگانه *C. murale* هیچ افزایشی نشان نداد. بنابراین نتایج برهمکنش RuCMV با LeVX در بوته های دوگانه آلوده گونه های *Chenopodium*، برهمکنشی وابسته به میزبان می باشد. نظیر این پدیده در گونه های توتون دوگانه آلوده به PVX/پوتی ویروسها مشاهده شده است. هم افزایی ناشی از آلودگی دوگانه بوته های *N. tabacum* به PVX/پوتی ویروسها منجر به افزایش قابل توجه علائم بیماری و نیز افزایش سطح تجمع PVX در مقایسه با بوته های تک آلوده گردید. اما با وجود تشدید علائم، تجمع PVX در بوته های دوگانه آلوده *N. benthamiana* با PVX/پوتی ویروس افزایش نشان نداد (Gonzalez-Jara et al., 2004). برهمکنش های متفاوت RuCMV با LeVX در دو گونه از *Chenopodium* بیانگر تاثیر این دو ویروس بر بازدارنده های اختصاصی ضد ویروسی میزبان است. تغییرات سطح تجمع LeVX بصورت کاهش ۶۳-۷۵ درصدی در بوته های دوگانه آلوده نسبت به بوته های تک آلوده هر دو میزبان، حاکی از آن است که LeVX با RuCMV در هر دو گونه *Chenopodium* برهمکنش آنتاگونیستی دارد.

برهمکنش RuCMV/LeVX در بوته های دوگانه آلوده *C. quinoa*، شبیه به برهمکنش ویروس موزائیک یونجه (*Alfalfa mosaic alfamovirus*, AMV) و ویروس

REFERENCES

- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248- 254.
- Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977) Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475- 483.
- Cho, D. J., Kim, J. S., Choi, H. S., La Y. J. & Kim, K. S. (2000) Ultrastructural aspects of the mixed infections of *Watermelon mosaic potyvirus* isolated from pumpkin and *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus* from watermelon. *Plant Pathology Journal*, 16, 219- 221.
- Damirdagh, I. S. & Ross, A. F. (1967) A marked synergistic interaction of potato viruses X and Y in

- inoculated leaves of tobacco. *Virology*, 31, 296- 307.
5. Dizadji, A., Koochi-Habibi, M., Izadpanah, K., Dietrich, C., Mossahebi G. H. & Winter, S. 2008. Characterisation of Lettuce Virus X, a new potexvirus infecting lettuce in Iran. *Archives of Virology*, 153(10), 1867- 1875.
 6. Garrces-Orejuela, A. C. & Pound, G. S. (1957) The multiplication of *Tobacco mosaic virus* in the presence of *Cucumber mosaic virus* or *Tobacco ring spot virus* in tobacco. *Phytopathology*, 47, 232-239.
 7. Gonzales-Jara, P., Tenlado, F., Martinez-Garcia, B., Atencio, F. A., Barajas, D., Vargas, M. & Diaz-Ruiz, J. R. (2004) Host-dependent differences during synergistic infection by potyviruses with *Potato virus X*. *Molecular Plant Pathology*, 5, 29- 35.
 8. Goodman, R. M. & Ross A. F. (1974) Enhancement of *Potato virus X* synthesis in doubly infected tobacco occurs in doubly infected cells. *Virology*, 209, 268- 273.
 9. Koochi-Habibi, M., Abtahi, F. S., Winter, S. & Mosahebi, G. H. (2009) First report of a new sobemovirus from lettuce in Iran. *Proceeding of 61st International Symposium on Crop Protection*. Ghent University, Belgium, p. 284.
 10. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680- 685.
 11. Malapi-Nelson, M., Wen, R. H., Ownley, B. H. & Hajimorad, M. R. (2009) Co- infection of soybean with *Soybean mosaic virus* and *Alfalfa mosaic virus* results in disease synergism and alteration in accumulation level of both viruses. *Plant Diseases*, 93,1259-1264.
 12. McGavin, W. J. & MacFarlane, S. A. (2009) Rubus chlorotic mottle virus, a new sobemovirus infecting raspberry and bramble. *Virus Research*, 139, 10-13.
 13. Pio-Ribeiro, G., Wyatt, S. D. & Khun, C. W. (1987) Cowpea stunt: a disease caused by a synergistic interaction of two viruses. *Phytopathology*, 68, 1260 -1265.
 14. Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C. & Vance V. B. (1997) Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, 9, 859 -868.
 15. Rochow, W. F. & Ross, A. F. (1955) Virus multiplication in plant doubly infected by potato viruses X and Y. *Virology*, 1, 10 -27.
 16. Ross, R. E. F. (1974) Interaction of viruses in the host. *Acta Horticulture*, 36, 247 -260.
 17. Scheets, K. (1998) *Maize chlorotic mottle machlomovirus* and *Wheat streak mosaic rymovirus* concentrations increase in the synergistic disease corn lethal necrosis. *Virology*, 242, 28 -38.
 18. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76, 4350-4354.
 19. Vance, V. B., Berger, P. H., Carrington, J. C., Hunt, A. G. & Shi, X. M. (1995) 5' Proximal potyviral sequences mediate *Potato virus X*/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology*, 206, 583- 590.
 20. Voinnet, O., Lederer, C. & Baulcombe, D. C. (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 10, 157- 167.
 21. Voinnet, O., Pinto, Y. M. & Baulcombe, D. C. (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96, 14147- 14152.
 22. Walkey, D. G. A. & Payne C. J. (1990) The reaction of two lettuce cultivars to mixed infection by *Beet western yellows virus*. *Plant Pathology*, 39, 156-160.
 23. Wyatt, S. D., Pio-Ribeiro, G. & Khun, C. W. (1976) A cowpea disease caused by two viruses. *Proceeding of American Phytopathology Society*, 3, 344.