

بررسی ویژگی‌های مولکولی یک جدایه ویروس وای سیب‌زمینی جدا شده از محصول گوجه‌فرنگی از شهرستان یزد بر پایه توالی قسمت‌هایی از ژنوم

سید رضا میرحیمی^۱، ثمین حسینی^{۲*}، احمد حسینی^۲ و سید علیرضا اسمعیل زاده حسینی^۳

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

۳. مربی پژوهشی بخش تحقیقات گیاه پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، یزد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۲۸)

چکیده

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) یکی از محصولات مهم در ایران و بسیاری از کشورها است. بر پایه یک بررسی انجام شده در سال ۱۳۹۲ ویروس وای سیب‌زمینی به عنوان ویروس غالب آلوده‌کننده گوجه‌فرنگی در شهرستان یزد معرفی شده بود. در این پژوهش قسمت‌هایی از ژنوم یک جدایه انتخابی از این ویروس با نام جدایه T5 افزونش و توالی‌یابی شد. پس از استخراج RNA کل از نمونه T5، با استفاده از آزمون RT-PCR نواحی مختلف CP، NIb و P1 به کمک جفت آغازگرهای CPf/CPr، M4T/Sprimer و P1/P2 افزونش و به ترتیب سه قطعه به طول ۸۲۴، ۱۷۰۰ و ۸۳۷ جفت بازی توالی‌یابی شد. نتایج به دست آمده از بررسی و مقایسه توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی نواحی P1، CP و NIb با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن، نشان داد که جدایه T5 متعلق به سویه NTN است.

واژه‌های کلیدی: ژن P1 و پروتئین پوششی، گوجه‌فرنگی، PVY، RT-PCR.

Molecular characterization of a *Potato virus Y* isolate from tomato crop in Yazd (Iran) based on sequencing of partial genome

Seyed Reza Mirrahimi¹, Samin Hosseini^{2*}, Ahmad Hosseini² and Seyyed Alireza Esmailzadeh Hosseini³

1, 2. Former M. Sc. Student and Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

3. Instructor, Plant Protection Research Department, Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yazd, Iran

(Received: Jan. 31, 2016 - Accepted: Oct. 19, 2016)

ABSTRACT

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is one of the most important crops in Iran and throughout the world. In the previous survey conducted in 2013, PVY was introduced as the dominant virus in Yazd (Iran). In the present study, the partial genome sequence of a selected isolate called T5 was determined and analyzed. Following total RNA extraction of the T5 isolates, three fragments with 824, 1700 and 837 bp lengths were amplified using CPf/CPr, M4T/Sprimer and P1/P2 primer pairs respectively in RT-PCR. According to the nucleotide and amino acid sequences comparison of the CP, NIb and P1 regions of the isolate with the other PVY isolates in the Genebank, T5 is a member of NTN strain.

Keywords: Coat protein, P1 gene, RT-PCR, PVY, tomato.

مقدمه

گیاه گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicon esculentum* Mill. یکی از گیاهان دولپه‌ای از تیره Solanaceae است که به‌صورت گسترده‌ای در ایران کشت می‌شود (Anonymous, 2014). گیاه گوجه‌فرنگی مانند دیگر گیاهان تحت تأثیر برخی آفتها و بیماری‌های گیاهی قرار دارد. ویروس‌ها از مهم‌ترین عامل‌های بیماری‌زا در گوجه‌فرنگی هستند. بیماری‌های ویروسی باعث ایجاد آسیب‌های کمی و کیفی در این گیاه می‌شوند (Hull, 2002). در بین ویروس‌های گزارش‌شده، ویروس *Potato virus Y* (PVY) یکی از ویروس‌هایی است که اهمیت اقتصادی فراوانی دارد. این ویروس در خانواده *Potyviridae* و جنس *Potyvirus* قرار دارد و از راه شته و به صورت ناپایا منتقل می‌شود (Danci et al., 2009). ویروس وای سیب‌زمینی دامنه میزبانی گسترده‌ای داشته و به‌طور طبیعی بیش از نه خانواده گیاهی شامل خانواده‌های Fabaceae, Asteraceae, Solanaceae, Chenopodiaceae و برخی از علف‌های هرز و گیاهان زینتی را آلوده می‌کند (Jones, 2003).

ژنوم PVY مانند دیگر اعضای جنس پوتی‌ویروس، از یک قطعه RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت با اندازه حدود ۹/۷ کیلوباز تشکیل شده است (Chung et al., 2008). در انتهای ۳' ژنوم این ویروس یک دنباله پلی آدنین و در انتهای ۵' پروتئین ویروسی متصل به ژنوم (VPg) قرار دارد (Shukla et al., 1994). ژنوم ویروس وای سیب‌زمینی تنها یک چارچوب خوانش باز دارد. حاصل ترجمه این چارچوب خوانش، یک پروتئین مرکب بزرگ شامل ۳۰۰۰-۲۰۰۰ اسید آمینه بوده که توسط آنزیم‌های پروتئاز کد شده توسط ویروس به ده پروتئین کوچک‌تر تبدیل می‌شود (P1, HC-Pro, PIPO, VPg, NIa-Pro, Nib and CP) (Chung et al., 2008).

ویروس وای سیب‌زمینی سویه‌های متفاوتی دارد. در حالت کلی سه سویه عمومی بر پایه ایجاد نشانه‌های مختلف روی گیاهان محک برای این ویروس معرفی شده است که عبارتند از: PVY^O (Ordinary Stipple streak) (or Common strain) PVY^C (Stipple streak) (or Common strain) PVY^N (Tobacco vein necrotic strain) (De Bokx & Huttinga, 1981; Missiou et al., 2004).

نو ترکیبی در ویروس وای سیب‌زمینی یک فرآیند بسیار شایع بوده که باعث ظهور سویه‌های جدیدی شده است. با توجه به این پژوهش‌ها در اثر نو ترکیبی در برخی از نقاط ژنوم، سویه‌های نو ترکیبی از جمله زیرگروه‌های NTN (a) و NTN (b) و N:O و N:Wi ایجاد شده است (Visser & Bellstedt, 2009). سویه NTN اگر چه به‌عنوان زیرگروه سویه N طبقه‌بندی می‌شود، اما نواحی CI، P3، و قسمت انتهایی CP آن از سویه O منشأ گرفته است (Singh et al., 2008).

در ایران ویروس وای سیب‌زمینی از کشتزارهای گوجه‌فرنگی شهرهای جیرفت، کهنوج، زرنند (استان کرمان)، میناب، حاجی‌آباد (استان هرمزگان)، خاش، ایران‌شهر (استان سیستان و بلوچستان)، یزد (استان یزد) و برازجان (استان بوشهر) (Massumi et al., 2008) ردیابی و گزارش شده است. در این سال‌ها در مورد تعیین سویه‌های PVY موجود در کشور، بررسی‌های زیادی انجام شده است. سویه‌های مختلف N، O و C از محصولات سیب‌زمینی از استان‌های خوزستان (Khakvar et al., 2000)، خراسان، گیلان و مازندران (Maghsoudi et al., 2004)، اصفهان، همدان، تهران و زنجان (Toosi et al., 2004)، سویه O از کشتزارهای گوجه‌فرنگی استان خراسان (Jafari et al., 2010)، سویه‌های نو ترکیب W و NTN از کشتزارهای گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی استان‌های کرمان، فارس، خراسان، همدان، آذربایجان شرقی و اصفهان (Hosseini et al., 2010) شناسایی شدند. در پژوهش انجام‌شده در شهرستان یزد (Mirrahimi et al., 2015)، ویروس وای سیب‌زمینی در ۲۰/۶ درصد از نمونه‌های گوجه‌فرنگی تشخیص داده شد. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی چندین جدایه با آغازگرهای اختصاصی PVY نشان داد که همه جدایه‌های گردآوری‌شده متعلق به سویه NTN هستند. با توجه به نبود توالی نوکلئوتیدی ویروس وای سیب‌زمینی جدا شده از گوجه‌فرنگی‌های این شهرستان در بانک ژن، در این پژوهش نواحی مختلف CP، P1 و Nib یک جدایه انتخابی به منظور مقایسه توالی نوکلئوتیدی و

شد. برای شناسایی PVY در آغاز ساخت cDNA با استفاده از ۱ میکرولیتر RNA کل، ۱ میکرولیتر MuMLV reverse transcriptase (200 U/μl)، ۰/۵ میکرولیتر RNA inhibitor (40 U/μl)، ساخت شرکت Vivantis، ۲/۵ میکرولیتر dNTPs (10 mmol/μl) و ۱ میکرولیتر آغازگر reverse (10 pmol/ul) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده بر پایه توالی‌های حفظ‌شده نواحی CP، P1 و N1b که پیشتر توسط Hema *et al.* (2002)، Folwarczna *et al.* (2008) و Chen *et al.* (2001) طراحی شده بود (جدول ۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با Taq DNA polymerase (5 U/μl)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر MgCl₂ (50 mmol/μl)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10 mmol/μl)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای forward و reverse (10 pmol/μl) (ساخت شرکت Macrogen) و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, C-1000) بنا بر دستورکار شرکت سازنده انجام گرفت. برنامه PCR متشکل از یک چرخه ۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه به منظور واسرشت سازی اولیه و سی چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال به مدت یک دقیقه در دمای ۵۴-۵۶ درجه سلسیوس (جدول ۱)، ساخت (سنتز) در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و افزون بر یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه برای امتداد نهایی رشته‌ها بود. کیفیت قطعه‌های افزونش شده در ژل آگارز ۱ درصد (در بافر TAE) بررسی و محصولات PCR برای توالی‌یابی دوطرفه به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

اسید آمینه آن با دیگر توالی‌های انتخاب‌شده از بانک ژن به منظور تعیین سویه آن مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

افزونش جدایه PVY

از بین جدایه‌های بررسی‌شده در پژوهش انجام‌شده (Mirrahimi *et al.*, 2015)، یک جدایه که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به‌عنوان سویه NTN شناسایی شده بود با عنوان جدایه T5 انتخاب و روی برگ‌های گیاه باقلا مایه‌زنی شد. پس از ظهور لکه‌های موضعی، آن‌ها را با تیغ اسکالپل جداگانه بریده و در یک قطره بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار له کرده، سپس روی برگ‌های سیب‌زمینی در مرحله چهار تا پنج برگگی مایه‌زنی شد. بوته‌های آلوده به این جدایه به عنوان منبع ویروس در شرایط گلخانه‌ای مناسب با دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای اطمینان از افزونش ویروس از آزمون DAS-ELISA و آنتی بادی اختصاصی ویروس وای سیب‌زمینی (DSMZ, AS-0137, Germany) با روش کلارک و آدامز (Clark & Adams, 1977) استفاده شد. نتایج با دستگاه الیزا ریدر (Biotek, ELX805) در طول موج ۴۰۵ نانومتر بررسی شدند. نمونه‌هایی که جذب آن‌ها از سه برابر جذب نمونه‌های سالم بیشتر باشد، مثبت در نظر گرفته شد.

استخراج RNA کل، انجام آزمون RT-PCR و توالی‌یابی

برای استخراج RNA کل جدایه T5 از بافت برگگی گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس و کیت استخراج Qiagen, Hilden, Germany) RNeasy Plant Mini Kit و بر پایه دستورکار شرکت سازنده استفاده

جدول ۱. آغازگرهای الیگونوکلوئیدی به‌کاررفته برای ردیابی PVY در آزمون RT-PCR

Table 1. Oligonucleotide primers used for PVY detection in the RT-PCR tests

Primer	Sequence	Annealing Temp.	Amplicon size
Sprimer (Forward primer)	5'-GGX AAY AAY AGY GGX CAZ CC-3'	54°C	1700 bp
M4T (Reverse primer)	5'-GTT TTC CCA GTC ACGAC (T)15-3'		
P2 (Forward primer)	5'-CTTCATCAAACAACTCTTT-3'	55°C	837 bp
P1 (Reverse primer)	5'-TTCCAAAGTGTCTTTGAG-3'		
CPf (Forward primer)	5'-CATAAAGCTTGCAAATGACACAATCG-3'	56°C	800 bp
CPr (Reverse primer)	5'-CATAAAGATCTTCACATGTTCTTGACT-3'		

فاصله‌های ژنتیکی، درخت تبارزایی (فیلوژنتیکی) با استفاده از روش Maximum Likelihood (ML) و برنامه MEGA5.2.2 با میزان بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم شد. اسامی توالی‌های برداشت شده از بانک ژن و رس شمار آن‌ها در جدول ۲ آمده است.

هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی و بررسی رابطه‌های تبارزایی (فیلوژنی) ترجمه توالی نوکلئوتیدی به اسید آمینه و هم‌ردیف‌سازی چندگانه توسط برنامه Vector NTI Advance™ 11 (Invitrogen) انجام شد. برای بررسی

جدول ۲. جدایه‌های انتخابی PVY از بانک ژن به همراه رس شمار

Table 2. Sequences of selected PVY isolates from Genbank and their accession number

Isolate	Accession number	Origin	Strain	Host
HAM-KA	HM36865/HM243477	Iran	W	Potato
KH-CH	HM368663/HM243484	Iran	W	Potato
KER-SO	HM368662/HM243483	Iran	W	Potato
AZA.TA.O.T	HM368651/HM243472	Iran	W	Tomato
AZA.TA.O	HM368650/HM243471	Iran	W	Potato
FA.OG	HM368653/HM243474	Iran	W	Potato
KER-SA	HM368661/HM243481	Iran	O	Potato
KER-KER	HM368659/HM243475	Iran	NTN	Potato
KER.JI.NTN	HM3686589/HM243480	Iran	NTN	Potato
KER.JI	HM368657/HM243482	Iran	NTN	Tomato
ESF-CH	HM36852/HM243473	Iran	NTN	Potato
KER-LA	HM368660/HM243478	Iran	NTN	Potato
Boushehr	EF455803	Iran	C	Egg plant
SYR-NB-16	AB270705	Syria	NTN	Potato
D6	AB331515	Japan	NTN	-
NIB-NTN	AJ585342	Slovenia	NTN	Potato
12-94	AJ889866	Poland	NTN	Potato
34/01	AJ890342	Poland	NTN	Tobacco
Linda	AJ890345	Germany	NTN	Tobacco
NZ	AM268435	New Zealand	NTN	Potato
TU660	AY166866	Canada	NTN	-
423-3	AY884982	USA	NTN	-
RRA-1	AY884984	USA	NTN	-
HN2	GQ200836	China	NTN	Potato
Thol	M95491	Hungary	NTN	-
NJg	AY166867	Canada	N	-
Mont	AY884983	USA	N	-
NE-11	DQ157180	USA	N	-
CH605	X997895	Swiss	N	-
Nnp	AF237963	Italy	C	Pepper
Son41	AJ439544	France	C	<i>Solanum nigrum</i>
LYE84.2	AJ439545	Spain	C	Tomato
Adgen	AJ890348	France	C	Potato
SASA 110	AJ585195	England	O	Potato
SCRI-O	AJ585196	England	O	Potato
SASA 61	AJ585198	England	O	Potato
OZ	EF026074	USA	O	-
SASA 207	AJ584851	England	W	Potato
L56	AY745492	Canada	W	-
ID-1	DQ157178	USA	W	-
OR-1	DQ157179	USA	W	-
NC	DQ309028	USA	-	Tobacco

مشاهده شد. درستی این نتایج با آزمون الیزا تأیید شد (شکل ۱).

بررسی ویژگی‌های مولکولی

پس از استخراج RNA کل از نمونه‌ها، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PVY نواحی مختلف CP، Nib و

نتایج و بحث

افزودن جدایه PVY

جدایه T5 پس از سه روز در آغاز لکه‌های موضعی بافت مرده ایجاد کرد. لکه‌های موضعی به گیاه سیب‌زمینی منتقل شد. جدایه مورد نظر پس از ده روز در گیاه سیستمیک شد و نشانه‌های بافت مرده سیستمیک

بررسی توالی

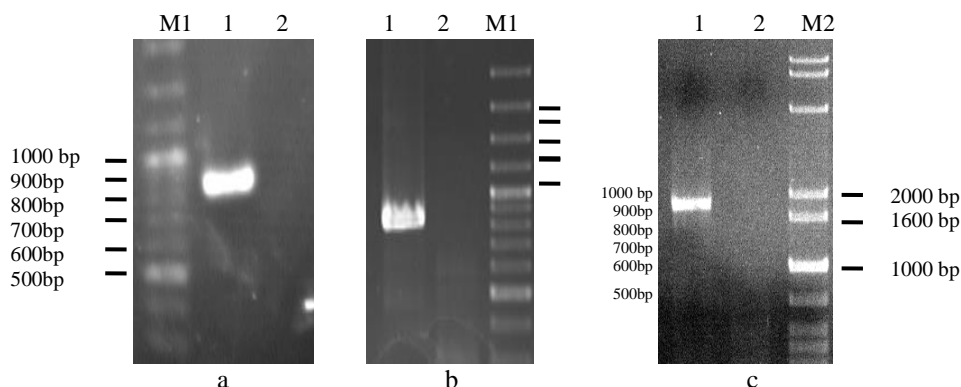
نواحی مختلف CP، Nib و P1 جدایه T5 توالی‌یابی شد و توالی نوکلئوتیدی آنها در بانک ژن NCBI با رس شماره‌های به ترتیب KF933391، KF933392 و KF933390 ثبت شد. اندازه توالی نواحی مختلف CP، P1 و Nib به ترتیب ۸۰۰، ۷۷۰ و ۶۰۱ جفت باز بود. بررسی توالی نوکلئوتیدی این نواحی در برنامه BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) و مقایسه آن با دیگر توالی‌های بانک ژن نیز نشان‌دهنده شباهت بالای این جدایه با دیگر جدایه‌های PVY ثبت شده است.

P1 افزونش شد. با جفت آغازگرهای M4T/Sprimer یک قطعه ۱۷۰۰ جفت بازی مربوط به ناحیه انتهای 3' ژنوم (شامل Nib، CP و 3' UTR)، با جفت آغازگر P1/P2 یک قطعه ۸۳۷ جفت بازی مربوط به ناحیه ژن پروتئاز P1 و با آغازگرهای CPf/CPPr یک قطعه حدود ۸۲۴ جفت بازی مربوط به ناحیه CP جدایه T5 افزونش شد (شکل ۲). افزونش قطعه‌های ژنومی جدایه T5 با هر سه جفت آغازگر به ترتیب در آغاز نشان‌دهنده عضویت این جدایه به خانواده پوتی‌ویریده و در ادامه تأیید نتایج به‌دست‌آمده از الیزا مبنی بر اثبات تعلق این جدایه به گونه PVY است.



شکل ۱. نشانه‌های جدایه T5: نشانه‌های بافت مردگی سیستمیک روی برگ‌های سیب‌زمینی (راست) و نشانه‌های لکه موضعی بافت مرده روی برگ‌های باقلا (چپ)

Figure 1. Symptoms of T5 isolate, systemic necrosis symptoms on potato leaves (right) and necrotic local lesion on faba bean leaves (left)



شکل ۲. الگوی الکتروفورز محصولات PCR جدایه T5 با آغازگرهای (a) P1/P2، (b) CPf/CPPr و (c) Sprimer/M4T روی ژل آگارز ۱ درصد (M1: O' Gene Ruller™, 1kb, Fermentase™، M2: Gel pilot, 1 kb plus ladder, Qiagen؛ 1: جدایه T5 و 2: گیاه سالم)

Figure 2. Electrophoresis pattern of PCR products of T5 isolate using: a) P1/P2; b) CPf/CPPr, and c) Sprimer/M4T primer pairs on 1% agarose gel (M1: O' Gene Ruller™, 1kb, Fermentase™., M2: Gel pilot, 1 kb plus ladder, Qiagen, 1: T5 isolate and 2: Negative control (Healthy plant)).

بررسی ناحیه P1

ناحیه P1 نخستین قسمت از پلی پروتئین کد شده توسط ژنوم ویروس است که توالی آن با کدون آغازین ATG آغاز شده و به پروتئین متیونین ترجمه می‌شود (Singh *et al.*, 2008). توالی P1 جدایه T5 نیز با ATG آغاز شده است. بر پایه هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی جدایه T5 با دیگر جدایه‌های گرفته شده از بانک ژن با برنامه VectorNTI، درصد شباهت توالی نوکلئوتیدی جدایه T5 با دیگر جدایه‌ها ۷۱ تا ۹۸ درصد است. این جدایه بیشترین همانندی را با جدایه‌های گروه NTN، N و W و کمترین همانندی را با گروه C و O دارد. درصد شباهت توالی آمینواسیدی در محدوده ۶۸ تا ۹۷ درصد قرار دارد. یک توالی حفظ‌شده که در پروتئین‌های دارای فعالیت پروتئازی از نوع سرین به صورت G-X-S-G (گلیسین، نامشخص، سرین و گلیسین) مشاهده می‌شود (Barret, 1986)، در جدایه T5 و دیگر جدایه‌های برداشت‌شده از بانک ژن در موقعیت ۲۳۳ تا ۲۳۶ به صورت گلیسین، آسپارائین، سرین و گلیسین (GDSG) وجود دارد. این ناحیه برای فعالیت پروتئازی ضروری است. به طور کلی ناحیه P1 برای همانندسازی و بقاء ویروس حیاتی نیست و به همین دلیل متغیر بودن زیاد آن تأثیری در فعالیت آن ندارد (Domier *et al.*, 1986).

بهترین مدل برای رسم درخت تبارزایی بر پایه توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بنا بر نتایج حاصل از برنامه MEGA5 به ترتیب مدل Tamura-Nei و Jones-Taylor-Thornton بود. در درخت تبارزایی رسم شده بر پایه توالی نوکلئوتیدی ناحیه P1، جدایه‌ها به‌طور کلی به دو گروه تقسیم می‌شود. گروه اول ترکیبی از جدایه‌های متعلق به سویه‌های NA-N، N/NTN، NTN و W است. جدایه T5 مورد بررسی که در کنار یک جدایه ایرانی گردآوری شده از استان کرمان، شهرستان جیرفت که متعلق به گروه NTN است، در گروه اول قرار دارد. در گروه دوم جدایه‌های C و جدایه‌های O در دو زیر گروه جداگانه قرار گرفته‌اند. در درخت تبارزایی رسم‌شده بر پایه توالی آمینواسیدی تقسیم‌بندی همسانی مشاهده شد با این

تفاوت که جدایه‌ها در سه گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول شامل جدایه‌های مربوط به NA-N/NTN، N، NTN و W هستند. در گروه دوم جدایه‌های متعلق به سویه C و در گروه سوم جدایه‌های متعلق به سویه O قرار دارند. علت این تقسیم‌بندی‌ها فرآیند نوترکیبی و منشأ یکسان ناحیه P1 در جدایه‌های گروه W، NTN و NA-N/NTN است که در همگی P1 از سویه N نشأت گرفته است. اما ناحیه P1 در جدایه‌های O و C متفاوت است (شکل ۳).

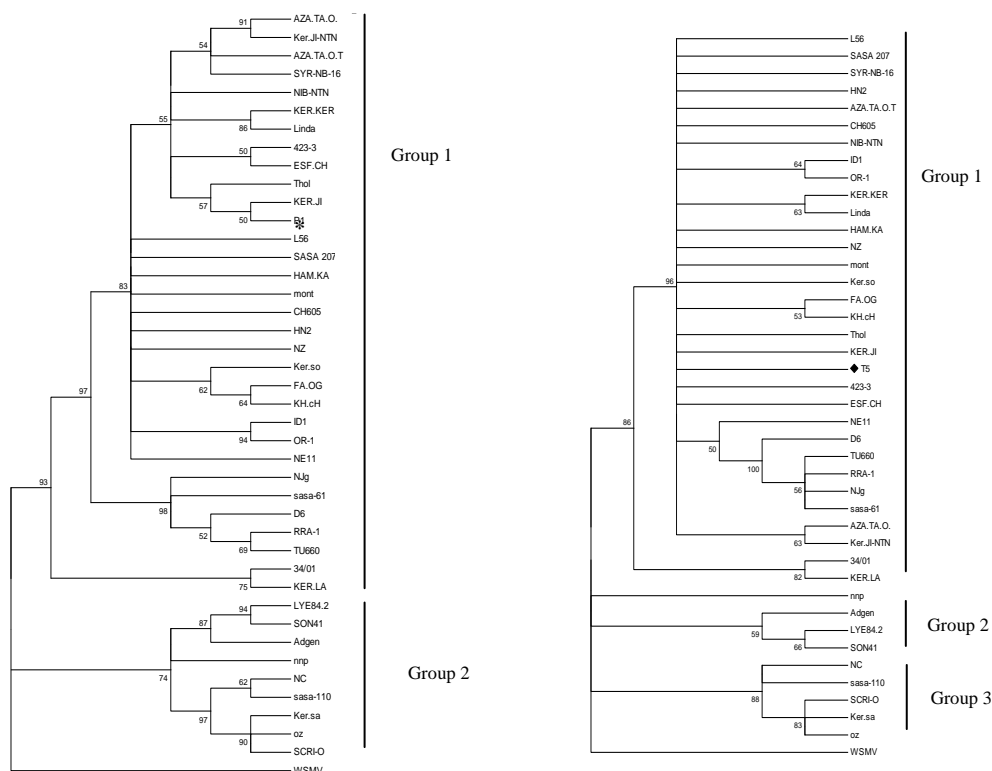
بررسی ناحیه N1b

بالترین میزان همانندی ناحیه N1b جدایه T5 با جدایه‌های گروه NTN (SYR-NIB-16, 34.01, Thole and 423.3) و کمترین میزان همانندی با جدایه‌های گروه C (Son41) دیده می‌شود. میزان همانندی بین توالی نوکلئوتیدی این جدایه با دیگر جدایه‌ها ۹۸-۸۲ درصد و همانندی توالی اسید آمینه ۹۷-۸۸ درصد است. ناحیه (موتیف) حفظ شده GDD (گلیسین، آسپارائین، آسپارائین) که در موقعیت ۳۵۵ قرار دارد، در بین همه جدایه‌ها حفظ شده است و نشان‌دهنده قرار گرفتن این پلیمرز در گروه RdRpI است (Koonin & Dolja, 1993). توالی ناحیه N1b تغییرپذیری و تنوع کمی دارد که نشان‌دهنده اهمیت و حیاتی بودن RdRp در همانندسازی ویروس است.

رسم درخت تبارزایی برای توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بر پایه نتایج به‌دست‌آمده از برنامه MEGA5 به ترتیب مدل Tamura 3 parameter و Jones-Taylor-Thornton بود. جدایه‌های بررسی شده در درخت تبارزایی رسم شده به روش ML و بر پایه توالی نوکلئوتیدی در چهار گروه اصلی قرار گرفتند: در گروه اول جدایه‌های N و NTN قرار دارند. T5 در کنار جدایه‌های NTN قرار گرفته است. Mont، CH605 و NZ متعلق به گروه N و NE-11 نیز یک جدایه نوترکیب در این گروه است. در گروه دوم جدایه‌های NA-N/NTN ثبت شده در بانک ژن قرار دارند. گروه سوم شامل جدایه‌های متعلق به گروه C است. که در این قسمت جدایه‌هایی که از سیب‌زمینی جدا نشده‌اند در کنار هم قرار گرفتند و Adgen که از سیب‌زمینی

Type A هستند. درخت رسم شده برپایه توالی آمینواسیدی نیز همین تقسیم‌بندی را نشان می‌دهد. با این تفاوت که جدایه‌های به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند و جدایه‌های NA-N/NTN در یک زیرگروه جداگانه و در گروه یک جای گرفتند (شکل ۴).

جدا شده است فاصله بیشتری از آنها دارد و در نهایت در گروه پنجم جدایه‌های گروه O و W قرار دارند. OZ و SCRI-O متعلق به گروه O و بقیه در گروه W قرار دارند. OR-1 و ID-1 که جدا شده‌اند متعلق به زیرگروه Type B سویه W و بقیه متعلق به زیرگروه



شکل ۳. رابطه‌های تبارزایی بین جدایه T5 و توالی‌های PVY بر پایه توالی نوکلئوتیدی (چپ) و توالی آمینو اسیدی (راست) ناحیه P1. میزان بوت استرپ در شکل آمده است. عدد بوت استرپ از کنار گره‌هایی که بوت استرپ کمتر از ۵۰ درصد دارند حذف شده است. تقسیم بندی گروه‌ها در سمت راست آمده است. یک جدایه (*Wheat streak virus mosaic* (accession No. GU724847) به عنوان outgroup در نظر گرفته شده است.

Figure 3. Phylogenetic relationships between T5 isolate and the selected PVY sequences based on P1 nucleotide (left) and amino acid (right) sequences. Bootstrap values are listed. Nodes with less than 50% bootstrap support have been collapsed. Group classifications are given to the right of vertical bars. A *Wheat streak mosaic virus* isolate (accession No. GU724847) was used as outgroup.

N در جریان تکامل با فرآیند نوترکیبی منشأ گرفته است (Uruqui-Inchima *et al.*, 2001). به همین علت بیشترین همانندی بین جدایه‌های NTN و N و کمترین همانندی با جدایه‌های O دیده می‌شود. پروتئین پوششی به سه ناحیه N-ترمینال (۳۰ آمینو اسید آغازین)، مرکزی (۲۱۸ آمینو اسید میانی) و C-ترمینال (۱۹ نوکلئوتید انتهایی) تقسیم می‌شود که ناحیه N-ترمینال تغییرپذیری بیشتری دارد. در این

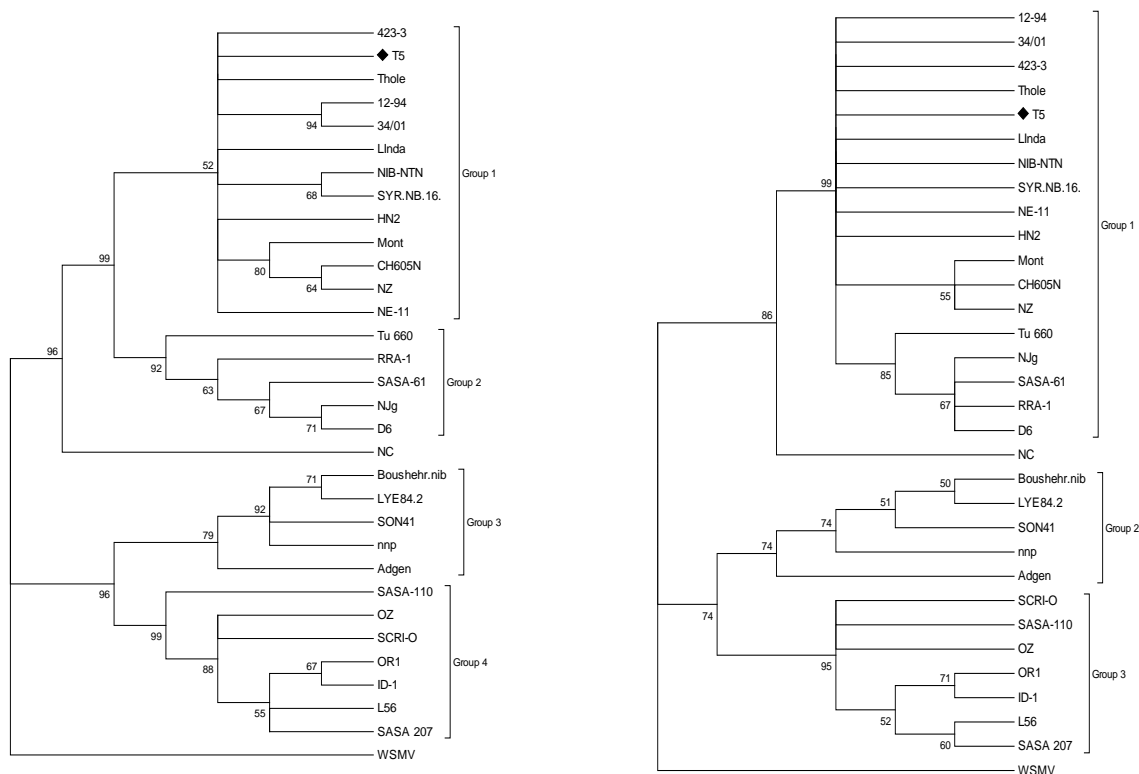
بررسی ناحیه CP

پروتئین پوششی یک پروتئین با چندین عملکرد است و در تجمع و گردایش ویروس، حرکت موضعی و فراگیر ویروس و انتقال با شته نقش دارد (Uruqui-Inchima *et al.*, 2001). میزان همانندی توالی نوکلئوتیدی ناحیه CP جدایه T5 با دیگر جدایه‌ها ۸۹ تا ۱۰۰ درصد و میزان همانندی توالی اسید آمینه ۸۸ تا ۱۰۰ درصد است. ناحیه CP در جدایه‌های NTN از

پایه توالی نوکلئوتیدی ناحیه CP، جدایه‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. در گروه یک جدایه T5 در کنار جدایه‌های متعلق به سویه NTN، در گروه دوم جدایه‌های متعلق به سویه N و NA-N/NTN، در گروه سوم سویه C و در گروه چهارم جدایه‌های متعلق به سویه O و W و شمار کمی از جدایه‌های NTN قرار دارند. در درخت تبارزایی رسم شده بر پایه توالی آمینواسیدی نیز چنین تقسیم بندی مشاهده می‌شود. اما به علت حفاظت‌شدگی زیاد دو گروه اول و دوم در یک گروه و گروه سوم و چهارم نیز با هم ادغام شدند. در گروه اول جدایه‌های متعلق به سویه‌های N، NTN و NA-N/NTN و در گروه دوم جدایه‌های متعلق به سویه‌های C، O و W قرار گرفته‌اند (شکل ۵).

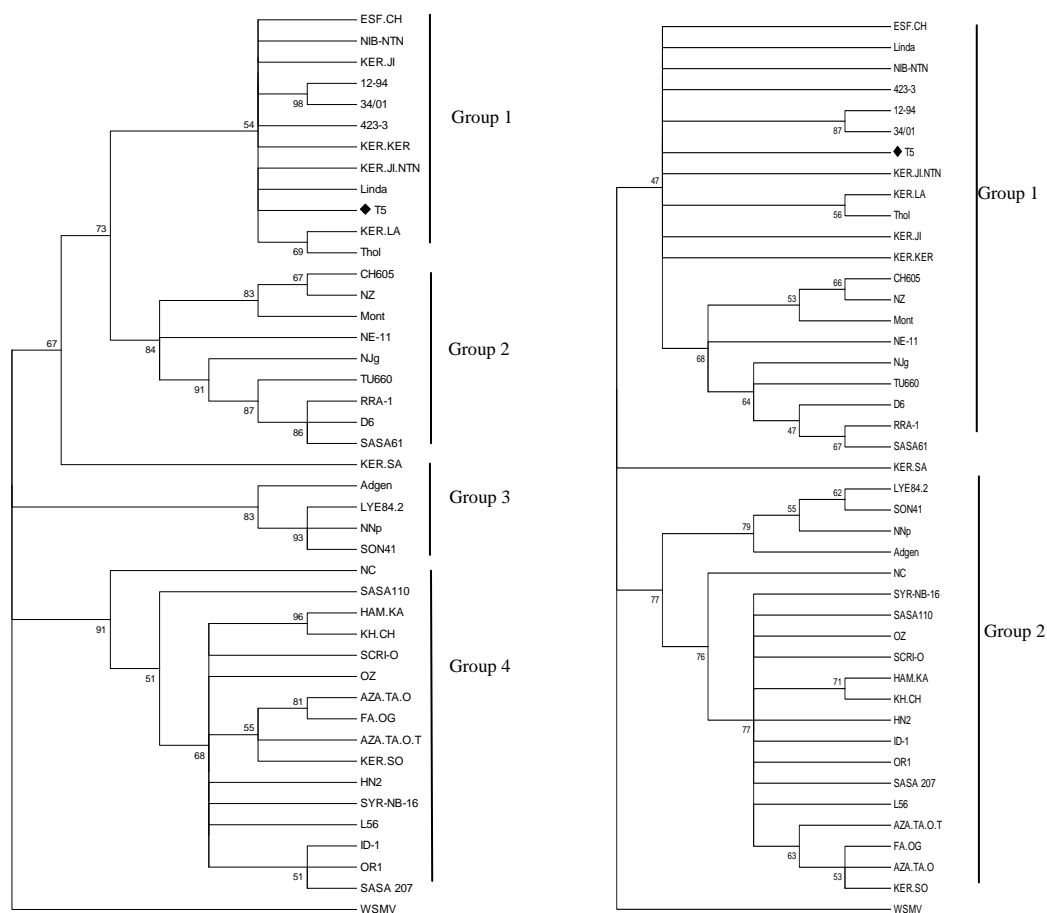
ناحیه یک توالی حفظ شده DAG (آسپارائین، آلانین، گلیسین) وجود دارد که با HC-pro برای انتقال با شته واکنش می‌دهد (Singh *et al.*, 2008)، در نتیجه برای انتقال ضروری است. در همه جدایه‌های مورد بررسی این ناحیه در موقعیت شش تا هشت مشاهده می‌شود. ناحیه مرکزی تنوع کمتری نشان می‌دهد، زیرا این ناحیه برای حرکت یاخته به یاخته ویروس ضروری است و در نتیجه جهش در آن در گسترش ویروس اثر دارد (Uruqui-Inchima *et al.*, 2001).

بهترین مدل برای رسم درخت تبارزایی برای توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بر پایه نتایج به دست آمده از برنامه MEGA5 به ترتیب مدل Tamura-Nei و Jones-Talor-Thornton بود. در درخت رسم شده بر



شکل ۴. رابطه‌های تبارزایی بین جدایه T5 و توالی‌های PVY بر پایه توالی نوکلئوتیدی (چپ) و توالی آمینواسیدی (راست) ناحیه Nib. میزان بوت استرپ در شکل آمده است. عدد بوت استرپ از کنار گره‌هایی که بوت استرپ کمتر از ۵۰ درصد دارند حذف شده است. تقسیم بندی گروه‌ها در سمت راست آمده است. یک جدایه *Wheat streak mosaic virus* (accession No. GU724847) به عنوان outgroup در نظر گرفته شده است.

Figure 4. Phylogenetic relationships between T5 isolate and the selected PVY sequences based on Nib nucleotide (left) and amino acid (right) sequences. Bootstrap values are listed. Nodes with less than 50% bootstrap support have been collapsed. Group classifications are given to the right of vertical bars. A *Wheat streak mosaic virus* isolate (Accession No. GU724847) was used as outgroup.



شکل ۵. رابطه‌های تبارزایی بین جدایه T5 و توالی‌های PVY بر پایه نوکلئوتیدی (چپ) و توالی آمینو اسیدی (راست) ناحیه CP. میزان بوت استرپ در شکل آمده است. عدد بوت استرپ از کنار گره‌هایی که بوت استرپ کمتر از ۵۰ درصد دارند حذف شده است. تقسیم بندی گروه‌ها در سمت راست آمده است. یک جدایه *Wheat streak mosaic virus* (accession No. GU724847) به عنوان outgroup در نظر گرفته شده است.

Figure 5. Phylogenetic relationships between T5 isolate and the selected PVY sequences based on CP nucleotide (left) and amino acid (right) sequences. Bootstrap values are listed. Nodes with less than 50% bootstrap support have been collapsed. Group classifications are given to the right of vertical bars. A *Wheat streak mosaic virus* isolate. (accession No. GU724847) was used as outgroup.

در این پژوهش چندین جدایه با آغازگرهای اختصاصی تشخیص‌دهنده سویه‌های PVY بررسی شدند که همگی متعلق به سویه NTN بودند. با توجه به نبود توالی نوکلئوتیدی این ویروس از کشتزارهای گوجه‌فرنگی شهرستان یزد در بانک ژن و به‌منظور تأیید نتایج به‌دست‌آمده از بررسی سویه در پژوهش پیشین، یک جدایه با نام T5 انتخاب و روی گیاه سیب‌زمینی افزون شد.

بررسی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی نواحی CP، NIB و P1 جدایه T5 و مقایسه آن با دیگر جدایه‌های برداشت شده از بانک ژن نشان داد که

نتیجه‌گیری کلی

گوجه‌فرنگی یکی از سبزی‌ها مهم در بسیاری از کشورها از جمله ایران است که امروزه سطح زیر کشت آن رو به افزایش است. ایران از نظر سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی در مقام هفتم جهان قرار دارد. گوجه‌فرنگی یکی از محصولات مهم استان یزد نیز به شمار می‌آید. در پژوهش انجام شده در سال ۱۳۹۲ (Mirrahimi et al., 2015) پراکنش این ویروس در نمونه‌های گردآوری شده از شهرستان یزد ۲۰/۶ درصد تعیین شد. حضور این ویروس با آزمون‌های RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PVY ثابت شد.

جدایه T5 از نظر توالی همسان جدایه‌های NTN و N است، از نظر توالی ناحیه CP همسان جدایه‌های NTN و از نظر توالی ناحیه P1 همسان جدایه‌های W و N می‌باشد. بنابراین با توجه به همه نتایج به دست آمده، جدایه T5 مورد بررسی متعلق به خانواده پوتی‌ویریده و جنس PVY سویه NTN است.

REFERENCES

1. Anonymous. (2014). *Agricultural statistics*, Ministry of Agriculture Jihad, 169p, from <http://www.maj.ir/>. (in Farsi)
2. Barret, A. J. (1986). *An introduction to the proteinases*; in *Proteinase inhibitors*, New York, Elsevier.
3. Chen, J. & Adams, M. J. (2001). A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology*, 146, 757-766.
4. Clark, M. F. & Adams, A. M. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked Immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
5. Chung, B. Y. W., Miller, W. A., Atkins, J. F. & Firth, A. E. (2008). An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 5897-5902.
6. Danci, O., Ziegler, A., Torrance, L., Gasemi, S. & Danci, M. (2009). *Potyviridae* family-short review. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 13, 410-420.
7. De Bokx, J. & Huttinga, H. (1981). *Potato virus Y*. CMI/AAB *Descriptions of Plant Viruses*. N. 242.
8. Domier, L. L., Franklin, K. M., Shahabuddin, M., Hellmann, G. M., Overmeyer, J. H., Hiremath, S. T., Siaw, M. F., Lomonosoff, G. P., Shaw, J. G. & Rhoads, R. E. (1986). The nucleotide sequence of *Tobacco vein mottling virus* RNA. *Nucleic Acids Research*, 14, 5417-5430.
9. Folwarczna, J., Plchova, H., Moravec, T., Hoffmeisterova, H., Dedic, N. & Cerovska, N. (2008). Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of *Potato virus Y*. *Folia Microbiologica*, 53 (5), 438-442.
10. Hema, M., Sreenivasulu, P. and Savithri, H. (2002). Taxonomic position of *Sugarcane streak mosaic virus* in the family *Potyviridae*. *Archives of Virology*, 147, 1997-2007.
11. Hosseini, A., Massumi, J., Heydarnejad, J., Hosseinipour, A. & varsani, A. (2010). Characterisation of *Potato virus Y* isolates from Iran. *Virus Genes*, 42, 128-140.
12. Jafari, M., Valizadeh, M., Valizadeh, G., Artyay, F. & Bigami, M. (2010). Detection of important viruses infecting cucurbits and tomato in fields and greenhouses of baluchstan. In: *Proceeding of 19th Iranian plant protection congress*, 1-3 Aug, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran, pp. 669. (in Farsi)
13. Jones, R., Kumar, S. & Mackie, A. (2003). *Potato virus Y*. Western Australia Department of Agriculture, 1443-7783.
14. Khakvar, R., Pourahim, R. & Shamsbakhsh, M. (2000). Occurrence of C strain *potato virus Y* in Khuzestan province. In: *Proceeding of 14th Iranian plant protection congress*, 5-8 Sep., Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, pp. 108-109. (in Farsi)
15. Koonin, E. V. & Dolja, V. V. (1993). Evolution and taxonomy of positive- strand RNA viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemical and Molecular Biology*, 28, 375-430.
16. Maghsoudi, R., Jafarpour, B. & Falahaty, M. (2004). Occurrence of N strain *potato virus Y* in Khorasan province and O strain *Potato Virus Y* in Khorasan and Gilan and Mazandaran Provinces. In: *Proceeding of 19th Iranian Plant Protection Congress*. 28-30 Aug., Tabriz University, Tabriz, Iran, pp. 223-224. (in Farsi)
17. Masoumi, H., Heidarnejad, G. & Hosseinipour, A. (2008). Evaluation of tomato varieties to natural infection with farms and greenhouses viruses in central and south east area in Iran. *Quarterly of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 16(1), 467-473. (in Farsi)
18. Mirrahimi, S. R., Hosseini, S., Hosseini, A., Esmailzadeh Hosseini, S. A. & Mohammadi, E. (2015). Occurrence and distribution of mosaic inducing viruses and detection of pvy strains from tomato fields and greenhouses of yazd. *Journal of Plant Protection*, 29(1), 154-158. (in Farsi)
19. Missiou, A., Kalantidis, K., Boutla, A., Tzortzakaki, S., Tabler, M. & Tsagris, M. (2004). Generation of transgenic potato plants highly resistant to *Potato virus Y* (PVY) through RNA silencing. *Molecular Breeding*, 14, 185-197.
20. Shukla, D. D., Ward, C. W. & Brunt, A. A. (1994). *The Potyviriidae*. Cab International.
21. Singh, R. P., Valkonen, J. P., Gary, S. M., Boonham, N., Jones, R. A., Kerlan, C. & Schubert, J. (2008). Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strain infecting potato. *Archives of Virology*, 153, 1-13.

22. Toosi, N., Ahunmanesh, A., Purrahim, R. & Bahar, M. (2004). Identification C and V Strains of *Potato Virus Y* using RT-PCR and RFLP. In: proceeding of 14th *Iranian Plant Protection Congress*. 28-30 Aug., Tabriz University, Tabriz, Iran, pp. 224-225. (in Farsi)
23. Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L. & Bernardi, F. (2001). *Potyvirus* proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74, 157.
24. Visser, J. C. & Bellstedt, D. U. (2009). An assessment of molecular variability and recombination patterns in South African isolates of *Potato virus Y*. *Archives of Virology*, 154, 1891-1900.