

بررسی سه جدایه ویروس وای سیبزمینی جداشده از استان خوزستان بر پایه ژن پروتئین پوششی

سید سجاد ذیحی^۱، ثمین السادات حسینی^{۲*} و سید احمد حسینی^۲

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۷)

چکیده

ویروس وای سیبزمینی (*Potato virus Y*, PVY) یکی از ویروس‌های مهم زیانبار با دامنه میزبانی گسترده است. در این پژوهش با توجه به شناسایی ویروس وای سیبزمینی و جداسازی آن از کشتزارهای شلغم استان خوزستان در سال زراعی ۱۳۹۲، ویژگی‌های سه جدایه انتخابی از شهرستان‌های دزفول، شوشتر و شوش (7Tu، 9Tu، 10Tu) بررسی شد. در آزمون تعیین دامنه میزبانی، سه جدایه روی گیاهانی متعلق به سه خانواده Solanaceae، Chenopodiaceae و Amaranthaceae، به صورت مکانیکی مایه‌زنی شدند. هر سه جدایه روی سیبزمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل، تاتوره و گل تکمه‌ای نشانه‌های موضعی و فراگیر (سیستمیک) ایجاد کردند ولی روی بوته‌های سلمه‌تره، نشانه‌هایی مشاهده نشد. در آزمون SDS-PAGE، دو باند با اندازه حدود ۳۳ و ۳۱ کیلوالتونی در آموده خالص‌شده هر سه جدایه خالص‌سازی شده مشاهده شد. برای تعیین سویه جدایه‌های انتخابی از جفت آغازگرهای اختصاصی سویه PVY (CF/OR، NF/NR، OF/OR) و (PVNIBIP/PVY3TIM) که بر پایه ناحیه (CP) طراحی شده‌اند استفاده شد. در آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی سویه O (OR/OF) و سویه NTN (PVNIBIP و PVY3TIM) به ترتیب دو قطعه ۶۰۸ و ۱۲۰۰ جفت بازی در هر سه جدایه افزایش شد. در ادامه، ناحیه CP هر سه جدایه، افزایش، همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد. در نهایت با استفاده از مجموع نتایج به دست آمده از آزمون‌های زیستی (بیولوژیکی) و بررسی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی مشخص شد که جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu جداشده از کشتزارهای شلغم استان خوزستان بیشترین همسانی را با سویه‌های NTN و W ویروس PVY دارند. این نخستین گزارش از شناسایی ویروس وای سیبزمینی در کشتزارهای شلغم است.

واژه‌های کلیدی: پروتئین پوششی، شلغم، ویروس وای سیبزمینی، RT-PCR، SDS-PAGE.

The characterization of three isolates of *Potato virus Y* from khuzestan province according to the coat protein

Seyed Sajjad Zabih¹, Samin-o-Sadat Hosseini^{2*} and Seyed Ahmad Hosseini²

1, 2. Former M. Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran
(Received: Jun. 7, 2016 - Accepted: Feb. 25, 2017)

ABSTRACT

Potato virus Y is one of the most important damaging viruses with a broad host range. In this research due to detection and isolation of *Potato virus Y* in turnip fields of Khuzestan province during 2014 growing season, characteristics of three selected isolates (7Tu, 9Tu and 10Tu) from Dezful, Shushtar and Shush cities were investigated. To analyze the host range of the isolates, three selected isolates were mechanically inoculated on some members of Solanaceae, Chenopodiaceae, and Amaranthaceae. All three isolates induced local and systemic symptoms on the leaves of potato, tomato, pepper, datura, and gomphrena plants, but no symptoms were observed on *Chenopodium quinoa*. Analysis of the PVY partially purified preparations indicated that molecular weight of two protein bands obtained by SDS-PAGE was estimated to be about 33 and 31 KDa. To determine the strain of selective isolates the specific primer pairs CF/OR, NF/NR, OF/OR, and NF/OR were used. Using OF/OR and PVY3TIM/PVNIBIP primers, two fragments with 609 and 1200 bp length respectively were amplified. The CP region in the all three isolates was amplified, cloned and sequenced. The results of all aforementioned tests showed that 7Tu, 9Tu, and 10Tu isolates are probably a member of NTN or W strain groups. According to our knowledge, this is the first report on occurrence of PVY in turnip fields.

Keywords: Coat protein, turnip, *Potato virus Y*, RT-PCR, SDS-PAGE.

* Corresponding author E-mail: s.hosseini@vru.ac.ir

مقدمه

شلغم با نام علمی *Brassica napus* L. تیره Cruciferae (چلیپاسانان)، گیاهی است دو ساله که از راه بذر افزایش می‌یابد (Kuchacki et al., 2013). سطح زیر کشت شلغم در ایران بنا بر آمار سازمان جهاد کشاورزی خوزستان در سال ۱۳۸۷-۱۳۸۸، ۳۴۷۴ هکتار است که ۲/۶۶ درصد از سطح زیر کشت سبزی‌های غیر اصلی را به خود اختصاص می‌دهد (Kuchacki et al., 2013). سطح زیر کشت این محصول در استان خوزستان، یکی از مناطق مهم کشت سبزی‌ها بنا بر آمار سازمان جهاد کشاورزی خوزستان در سال ۱۳۸۹، ۳۰۰ هکتار است. بالاترین میزان کشت شلغم مربوط به شهرستان‌های دزفول، شوش و شوشتر است (Khuzestan agriculture jahad. <http://www.kaj.maj.ir>). بیماری‌های ویروسی باعث ایجاد آسیب‌های کمی و کیفی در گیاه شلغم می‌شوند. مهم‌ترین نشانه‌های ویروسی مشاهده‌شده روی این گیاه عبارت‌اند از: ایجاد لکه‌های بافت مرده، موزاییک ملایم تا شدید، ایجاد لکه‌های حلقوی روی برگ‌ها، کوتولگی، کاهش رشد و پژمردگی (Kachroo et al., 2000). تاکنون ویروس‌های اندکی به صورت طبیعی از کشتزارهای شلغم گزارش شده‌اند (Leisner et al., 1992). در نمونه‌برداری‌های انجام‌شده از کشتزارهای شلغم استان خوزستان در سال زراعی ۹۳-۹۴ گیاهانی با نشانه‌های موزاییک و بدشکلی مشاهده شد. بررسی‌های اولیه با الیزا نشان‌دهنده رابطه عامل بیماری با ویروس وای سیبزمینی (Potato virus Y, PVY) بود. با توجه به اینکه تاکنون این ویروس از شلغم گزارش نشده است، در این پژوهش سه جدایه انتخابی از مناطق عمده کشت شلغم در استان خوزستان بررسی شدند.

ویروس وای سیبزمینی (PVY) یکی از مهم‌ترین پوتی ویروس‌هایی است که گسترش جهانی گسترده‌ای دارد. این ویروس نخستین بار در جهان توسط اسمیت در سال ۱۹۳۱ از کشور انگلستان و در ایران توسط کریمی در سال ۱۳۴۶ از روی سیبزمینی گزارش شده است (Smith, 1931). ویروس وای سیبزمینی ژنگان (ژنوم) تک‌لا به اندازه حدود ۱۰ کیلو باز تنها یک چارچوب خوانش باز (ORF) دارد و یک پلی‌پروتئین کد می‌کند که

توسط سه پروتئاز ویروسی (P1, HC-Pro و NIa) به ده پروتئین عملگر (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa, VPG, NIB و CP) شکسته می‌شود (Ha, 2007). ژنگان پوتی ویروس‌ها توسط حدود ۲۰۰۰ مولکول زیرواحد پروتئین پوششی (CP) احاطه شده است. این پروتئین شناخته‌شده‌ترین ناحیه ژن در پوتی ویروس‌هاست و برای هدف‌های آرایه‌بندی (تاکسونومیک) و تعیین تنوع ژنتیکی به کار می‌رود. پروتئین پوششی از سه ناحیه N-terminal، مرکزی و C-terminal تشکیل شده است (Higgins et al., 1998; Fuji et al., 2003). پروتئین پوششی در افزایش، انتقال با شسته، ایجاد پوشش برای RNA ویروس، حرکت یاخته به یاخته و حرکت راه دور دخالت دارد (Urcuqui-Inchima et al., 2001). جدایه‌های PVY بر پایه دامنه میزبانی طبیعی به سویه‌های گوجه‌فرنگی، سیبزمینی، توتون و فلفل (Hull, 2002) و بر پایه دامنه میزبانی آزمایشگاهی و شته‌های ناقل ویروس به سه سویه N (Ordinary or Tobacco vein necrotic strain)، O (Common strain) و C (Stipple streak strain) تقسیم می‌شوند (Missiou et al., 2004). نوترکیبی‌های زیادی بین دو گروه O و N در نتیجه حضور همزمان این دو در یک گیاه ظهور کرده است. دو سویه مهم به دست آمده از نوترکیبی بین دو سویه O و N عبارت‌اند از PVY^{NTN} و PVY^{N-W} (Nanayakkara et al., 2012). Visser et al. (2012) نشان دادند که موقعیت و طول قطعه‌های نوترکیب و تنوع در محل ایجاد نوترکیبی باعث ایجاد سویه‌های مختلف از جمله زیر گروه‌های N:O، N:Wi، NTN شده است.

مواد و روش‌ها

انتخاب سه جدایه PVY و افزایش در شرایط گلخانه در سال ۱۳۹۲ نمونه‌هایی با نشانه‌های ویروسی از کشتزارهای شلغم سه شهرستان دزفول، شوش و شوشتر که با توجه به آمار جهاد کشاورزی استان خوزستان بالاترین سطح کشت این محصول را دارند، گردآوری و در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شد. برای تشخیص ویروس وای سیبزمینی در نمونه‌های گردآوری‌شده، از آزمون DAS-ELISA و پادتن (آنتی‌بادی) چند

استفاده شد (Jensen *et al.*, 1986). به منظور تعیین درجه خلوص ویروس در آماده‌های خالص‌شده، میزان جذب نوری آن در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ (BioTech, Epoch) اندازه‌گیری شد. در ادامه برای تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی آماده‌های خالص‌شده، الکتروفورز عمودی پروتئین در ژل پلی‌اکریل‌آمید حاوی سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) با ژل جداکننده با غلظت ۱۲ درصد و ژل متراکم‌کننده ۵ درصد به روش Laemmli (1970) انجام شد.

آزمون RT-PCR

برای استخراج RNA ویروسی از کیت ستون‌دار شرکت دنازیست (ایران) بر پایه دستورکار شرکت سازنده استفاده شد. پس از استخراج RNA ویروسی برای شناسایی اولیه PVY، ناحیه CP جداپه‌های انتخاب‌شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ناحیه (CPf/CPr) در واکنش RT-PCR افزایش شد. از آنجاکه این آغازگرها قابلیت جداسازی زیر سوپه NTN را ندارند از آغازگرهای NF/NR، OF/OR، CF/OR (طراحی‌شده بر پایه ناحیه CP) و PVY3TIM/PVNIBIP (طراحی‌شده بر پایه ناحیه CP) و انتهای کربوکسی ناحیه Nib) به ترتیب برای افزایش اختصاصی سوپه‌های N، O، C و NTN (جدول ۱) استفاده شد. واکنش RT-PCR برای تولید cDNA در دو مرحله در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. در آغاز ریزلوله (میکروتیوب)‌های حاوی ۲ میکرولیتر Reverse transcriptase Buffer (10X)، ۱ میکرولیتر dNTPs (10 mmol/μ lit)، ۱ میکرولیتر Reverse Primer (10 pmol/ul) و ۱۰ میکرولیتر آب دیونیزه سترون‌شده (استریل) را به مدت پنج دقیقه در ۶۵°C در دستگاه ترموسایکلر (T100 Bio-Rad) قرار داده و پس از آن بی‌درنگ روی یخ قرار داده شد. در مرحله دوم آنزیم‌های MuMLV Reverse transcriptase (RT) و RNase inhibitor (40 U/μl) هرکدام به میزان ۰/۵ میکرولیتر به ریزلوله‌ها اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲°C در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. واکنش PCR برای افزایش

همسانه‌ای PVY (AS-0137) تهیه‌شده از مؤسسه DSMZ آلمان با استفاده از روش Clark & Adams (1977) استفاده شد. نتایج پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه با دستگاه الیزاخوان (BioTek®, Elx 808) با طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. نمونه‌هایی که میزان جذبشان بیشتر از سه برابر میانگین جذب نمونه‌های منفی بود به‌عنوان نمونه آلوده به ویروس در نظر گرفته شد. برای بررسی ویژگی‌های ویروس وای سیب‌زمینی جداشده از کشتزارهای شلغم، چند جدایه PVY که در آزمون الیزا مثبت بودند، انتخاب و با بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار له روی برگ‌های بوته‌های سیب‌زمینی سالم در مرحله چهار تا پنج برگی مایه‌زنی شد. از بین جدایه‌های افزایش‌شده سه جدایه با نام‌های 7Tu (جداشده از شهرستان دزفول)، 9Tu (جداشده از شهرستان شوشتر) و 10Tu (جداشده از شهرستان شوش) که غلظت بالایی در بوته‌های مایه‌زنی شده داشتند، انتخاب شدند و بوته‌های آلوده به این جدایه‌ها به‌عنوان منبع ویروس در شرایط گلخانه‌ای مناسب با دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تعیین دامنه میزبانی سه جدایه انتخابی PVY

برای تعیین دامنه میزبانی، جدایه‌های PVY انتخابی به نسبت یک به ده در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۷ عصاره‌گیری و روی گیاهانی از تیره Solanaceae، Chenopodiaceae و Amaranthaceae به‌صورت مکانیکی مایه‌زنی و در شرایط مناسب گلخانه‌ای نگهداری شدند. برای هر گیاه، یک نمونه به‌عنوان شاهد تنها با بافر فسفات به‌صورت مکانیکی مایه‌زنی شد. این آزمون چهار مرتبه تکرار شد. این گیاهان به دلیل افتراقی بودن می‌توانند به جداسازی سوپه‌های ویروس وای سیب‌زمینی کمک کنند. برای اطمینان از افزایش ویروس از آزمون DAS-ELISA و پادتن اختصاصی PVY استفاده شد.

خالص‌سازی نسبی ویروس و تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی (CP) سه جدایه PVY با استفاده از SDS-PAGE برای خالص‌سازی PVY از روش minipurification

شامل واسرشت‌سازی یک دقیقه در دمای 94°C ، اتصال به مدت یک دقیقه در دمای 57°C ، بسط به مدت دو دقیقه در دمای 72°C و بسط نهایی به مدت ده دقیقه در دمای 72°C تنظیم شد. برای جفت آغازگرهای PVY3TIM/PVNIBIP واسرشت‌سازی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای 94°C و 35 چرخه شامل 30 ثانیه در دمای 94°C ، 30 ثانیه در دمای 62°C ، 90 ثانیه در دمای 72°C و به مدت پنج دقیقه در دمای 72°C بسط نهایی انجام شد.

cDNA در حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل: $5/5$ میکرولیتر آب دیونیزه سترون‌شده، $12/5$ میکرولیتر Master mix (1.5mM MgCl_2) ساخت شرکت ویراژن (AmpliqonII: TaqDNApol2X)، 1 میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت 10pmol/ul و 5 میکرولیتر از cDNA در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. برنامه گرمایی واکنش PCR برای آغازگرهای CPf/CPr، NF/NR، OF/OR و CF/OR به صورت: واسرشت‌سازی اولیه به مدت یک دقیقه در دمای 94°C و 30 چرخه

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده برای PVY در آزمون RT-PCR

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

Primer	Sequence	Fragment	References
CP for	5'-CATAAAGCTTGCAAATGACACAATCG-3'		
CP rev	5'-CATAAAGATCTTCACATGTTCTTGACT-3'	824bp	Folwarczna <i>et al.</i> , 2008
OF	5'-TCTGGRACACATACWGTRCCR-3'		
OR	5'-TGTAAGTATGATGCCACCGTCGAAC-3'	609bp	Boonham <i>et al.</i> , 2002
NF	5'-TCTGGAACCTCAYACTGTGCCAC-3'		
NR	5'-CCTTCATTTGAATGTGTGCCTCT-3'	549bp	Boonham <i>et al.</i> , 2002
CF	5'-TCTGGAACWCATACTGTACCAA-3'		
OR	5'-TGTAAGTATGATGCCACCGTCGAAC-3'	609bp	Boonham <i>et al.</i> , 2002
PVY3TIM	5'-GGGGCGGCCGCTCTCTGATTGAAGTTTACAG-3'		
PVNIBIP	5'-GGGGCGGCCGCGC(C/T)TTCAC(C/T)GAAATGATGGT-3'	1224bp	Ohshima <i>et al.</i> , 2000

محصول PCR در حامل در ژل آگارز 1% درصد انجام شد. محصولات PCR با آغازگرهای مورد بررسی و ناحیه همسانه‌سازی شده، برای تعیین توالی از شرکت دنایست به شرکت Macrogen کره جنوبی فرستاده شدند.

بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌های PVY بر پایه توالی پروتئین پوششی

ترادف CP به دست آمده سه جدایه مورد بررسی در آغاز با برنامه Chromas, version 2.13 بازبینی شد و سپس با استفاده از برنامه BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI با ترادف برخی از جدایه‌های PVY موجود در GenBank مقایسه شدند (جدول ۲). تجزیه و تحلیل ترادف نوکلئوتیدی، ترجمه این ترادف به ترادف اسید آمینه، مقایسه ژنگان جدایه مورد بررسی با دیگر جدایه‌های PVY ثبت شده در بانک ژن و هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی و اسید آمینه و بازسازی درخت تبارزایی (فیلوژنی) با نرم‌افزارهای VectorNTI (Invitrogen) Advance™ 11 و MEGA6.2.2 انجام شد. درخت تبارزایی با برنامه MEGA6.2.2 بر پایه روش

بررسی محصولات PCR، در ژل آگارز 1% درصد و بافر TBE (IX) پس از افزودن 2 میکرولیتر محلول Red safe (محصول شرکت Intron) برای رنگ‌آمیزی، با استفاده از دستگاه الکتروفورز (Bio-Rad, Mini-) با استفاده از دستگاه (sub® Cell GT uvidoc®) UV ترانسلومیناتور (Uvitec) مشاهده و عکس برداری شد.

همسانه‌سازی قطعات DNA ناحیه CP در حامل پلاسمیدی

همسانه‌سازی ناحیه CP با استفاده از کیت InsTaclone PCR Cloning Kit #K1214 محصول شرکت Thermo Scientific در حامل pTZ57R/T و باکتری *Escherichia coli* سویه DH5 α بر پایه دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. استخراج پلاسمید نو ترکیب از باکتری به روش Doly & Birnbiom (1979) انجام گرفت. الکتروفورز نمونه‌های همسانه‌سازی شده، پس از هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم برشی EcoRI و HindIII (محصول شرکت Fermentas)، برای اطمینان از الحاق

در تحلیل‌های تبارزایی از جدایه *Wheat streak mosaic* با Maximum Likelihood، ML ۱۰۰۰ تکرار رسم شد. *virus*, WSMV (GU724847) به‌عنوان برون گروه استفاده شد.

جدول ۲. نام و رس شمار جدایه‌های PVY انتخابی در این پژوهش
Table 2. Name of selected PVY isolates in this study and their accession number

Isolate	Accession No.	country	Strain	Source Host
HAM-KA	HM243477	Hamedan	W	Potato
KH-CH	HM243484	Chenaran/Khorasan	W	Potato
KER-SO	HM243483	Soghan/Kerman	W	Potato
AZA.TA.O.T	HM243472	Tabriz	W	Tomato
AZA.TA.O	HM243471	Tabriz	W	Potato
FA.OG	HM243474	Oghlid/Fars	W	Potato
KER-SA	HM243481	Sardo/Kerman	O	Potato
KER-KER	HM243475	Kerman	NTN	Potato
KER.JLNTN	HM243480	Jiroft	NTN	Potato
KER.JI	HM243482	Jiroft	NTN	Tomato
ESF-CH	HM243473	Isfahan	NTN	Potato
KER-LA	HM243478	Lalezar/Kerman	NTN	Potato
Boushehr	EF455803	Bushehr	C	Eggplant
SYR-NB-16	AB270705	Syria	NTN	Potato
D6	AB331515	Japan	NTN	-
NIB-NTN	AJ585342	Slovenia	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	Switzerland	N	-
Nnp	AF237963	Italy	C	Pepper
Son41	AJ439544	France	C	Nightshade
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
WSMV	GU724847		Out group	Out group

نتایج و بحث

بررسی دامنه میزبانی جدایه‌های مورد بررسی

بر پایه نتایج به‌دست‌آمده در مورد تعیین دامنه میزبانی، از میان گیاهان آزمون مورد آزمایش، جدایه‌های مورد بررسی PVY در گیاهان سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، تاتوره و فلفل افزایش شدند و نشانه‌های موضعی یا فراگیر (سیستمیک) به‌صورت موزاییک و سبزدی موضعی پس از هفت تا نه روز پس از مایه‌زنی یا موزاییک خفیف تا شدید و در برخی موارد بافت‌مردگی فراگیر پس از ۱۴ تا ۱۶ روز پس از مایه‌زنی در گیاهان محک ایجاد شد (جدول ۳)، که همسان نشانه‌های مشاهده شده توسط دیگر جدایه‌های گزارش شده برای PVY بود (Boonham)

(*et al.*, 2002). برخی نشانه‌های گزارش شده از جمله ایجاد بدشکلی برگ در سیب‌زمینی توسط دو جدایه 7Tu و 9Tu، ایجاد تیرگی رگبرگ در گوجه‌فرنگی توسط 9Tu و 10Tu و ایجاد نشانه‌های موزاییک در گل تکمه‌ای برخلاف نتایج به‌دست‌آمده در دیگر پژوهش‌ها (Hosseini *et al.*, 2012; Inoue-Nagata *et al.*, 2001) بود (شکل ۱). با توجه به پژوهش‌های گذشته، سویه‌های N و NTN که قادر به ایجاد نشانه‌های بافت‌مردگی روی سیب‌زمینی هستند، روی سلمه تره نشانه‌هایی ایجاد نمی‌کنند و همچنین در برگ‌های تاتوره و گوجه‌فرنگی به ترتیب باعث ایجاد نشانه‌های موزاییک-سبزدی و روشنی رگبرگ-موزاییک می‌شوند. درحالی‌که سویه‌های O و C

فلفل ایجاد کند (Singh *et al.*, 2008). در این پژوهش جدایه‌های یادشده روی فلفل دو هفته پس از مایه‌زنی نشانه‌های موزاییک ایجاد کردند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که احتمال دارد جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu از نظر دامنه میزبانی همسان با جدایه‌های سویه NTN باشند. با توجه به پژوهش‌های گذشته تنها با تکیه بر دامنه میزبانی نمی‌توان نوع سویه را تشخیص داد، اما این آزمون در کنار دیگر روش‌های مولکولی و سرولوژیک می‌تواند برای تعیین قطعی سویه PVY استفاده شود (Moury *et al.*, 2005). برای اطمینان از وجود ویروس PVY در میزبان‌های مختلف از روش داس الایزا و پادتن‌های اختصاصی PVY استفاده شد که تأییدکننده مشاهده‌های عینی بود.

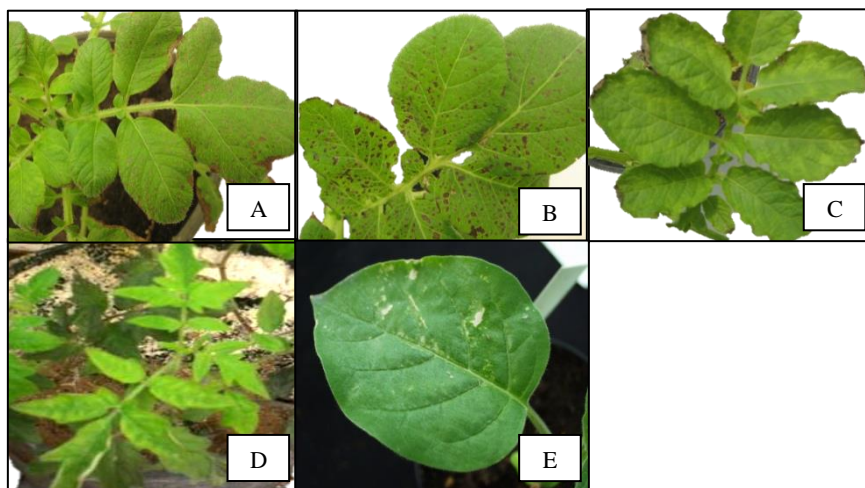
باعث ظهور درجه‌های مختلفی از نشانه‌های موزاییک در برگ‌های سیبزمینی و نشانه‌های لکه موضعی بافت مرده و سبزدرد در سلمه تره می‌شوند و در برگ‌های تاتوره و گوجه‌فرنگی به ترتیب نشانه‌های موزاییک و موزاییک-بدشکلی ایجاد می‌کنند (Fakhrabad *et al.*, 2012; Inoue-Nagata *et al.*, 2001; Hosseini *et al.*, 2012). در این آزمون در بیشتر گیاهان، سه جدایه انتخابی نشانه‌های همسانی ایجاد کردند. با توجه به ایجاد نشانه‌های بافت‌مردگی در سیبزمینی و دیگر نشانه‌های یادشده، به‌احتمال این سه جدایه متعلق به سویه N و یا NTN هستند. یکی از گیاهان جداسازی‌کننده سویه‌های NTN و N گیاه فلفل است که تنها سویه NTN می‌تواند نشانه‌های فراگیر روی

جدول ۳. نشانه‌های ایجادشده توسط جدایه‌های PVY روی گونه‌های گیاهی انتخابی

Table 3. Symptoms induced by PVY isolates on selected plant species

Indicator plants	Isolate		
	7Tu	9Tu	10Tu
Solanaceae			
<i>Solanum tuberosum</i> L.	N,M,Mf	N, M, Mf	N, M
<i>Lycopersicon scullentum</i> Mill.	Mf, M	VB, M	VB, M
<i>Capsicum annuum</i> L.	M	M	M
<i>Datura stramonium</i> L.	M, NLL	M, NLL	M, NLL
<i>Datura metel</i> L.	CLL, M	CLL, M	CLL, M
Chenopodiaceae			
<i>Chenopodium amaranticolor</i> L.	-	-	-
Amaranthaceae			
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Mf, M	Mf, M	Mf, M

CLL: لکه موضعی سبزدرد، M: موزاییک، Mf: بدشکلی شدن، NLL: لکه موضعی بافت مرده و N: بافت‌مردگی فراگیر، VB: تیرگی رگبرگ.
 CLL: chlorotic local lesion, M: mosaic, Mf: malformation, NLL: necrotic local lesion, N: necrosis, VB: vein banding.

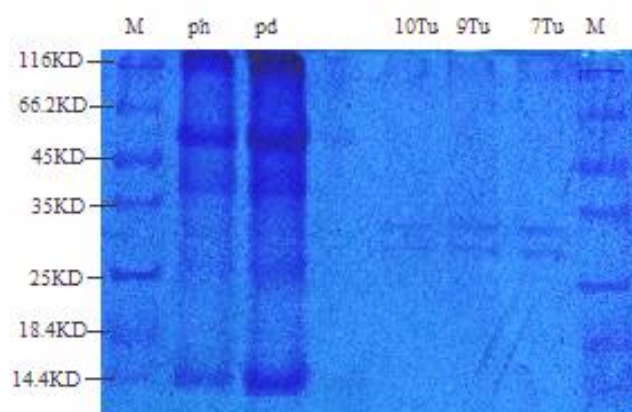


شکل ۱. نشانه‌های سه جدایه ایرانی 7Tu، 9Tu و 10Tu روی گیاهان مختلف: (A) ایجاد بافت‌مردگی و بدشکلی توسط جدایه 9Tu روی سیبزمینی، (B) ایجاد نشانه‌های بافت‌مردگی جدایه 10Tu روی سیبزمینی، (C) ایجاد نشانه‌های موزاییک توسط جدایه 7Tu روی سیبزمینی، (D) ایجاد نشانه‌های تیرگی رگبرگ توسط جدایه 9Tu روی گوجه‌فرنگی، (E) ایجاد نشانه‌های لکه موضعی بافت مرده روی تاتوره توسط جدایه 10Tu

Figure 1. Symptoms of three Iranian PVY isolates on plant species: A) necrosis and leaf distortion on potato caused by 9Tu isolate, B) leaf distortion on potato caused by 10Tu isolate, C) mosaic on tomato caused by 7Tu isolate, D) vein banding symptoms on tomato caused by 9Tu isolate, E) Necrotic local lesion on *Datura stramonium* L. caused by 10Tu isolate.

تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی با استفاده از روش SDS-PAGE

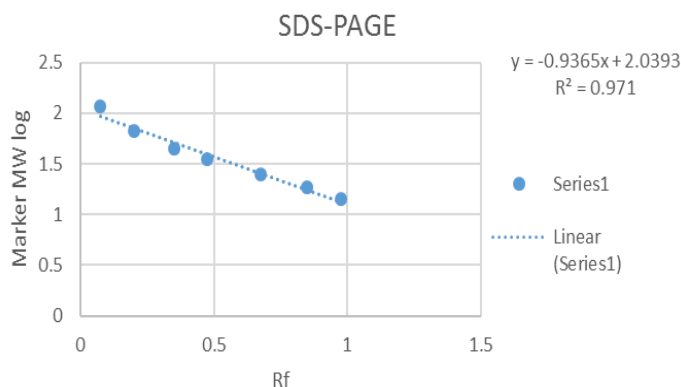
وزن پروتئین پوششی جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu با استفاده از مارکرهای پروتئینی و رسم منحنی خط رگرسیون (RF) در حدود ۳۳ و ۳۱ کیلوالتون برآورد شد (شکل‌های ۲ و ۳)، که با نتایج تحقیقات پیشین (Huttinga & Mosch, 1974; Moghal & Francki, 1976).



شکل ۲. لکتروفورز پروتئینی پارتیکل‌های جدایه‌های 10Tu، 9Tu و 7Tu در ژل پلی اکریل آمید

M: نشانگر پروتئینی (Thermo, 14.4kDa-116kDa)، ph: گیاه سالم، pd: گیاه آلوده

Figure 2. Electrophoresis of proteins from 10Tu, 9Tu and 7Tu particles in polyacrylamide gel
M: Molecular weight marker (Thermo, 14.4kDa-116kDa), ph: Healthy plant and pd: Infected plant



شکل ۳. خط رگرسیون وزن پروتئین پوششی (RF = حرکت نسبی باندها روی ژل)

Figure 3. Linear regression line related to coat protein weight (RF = relative movement of bands in gel)

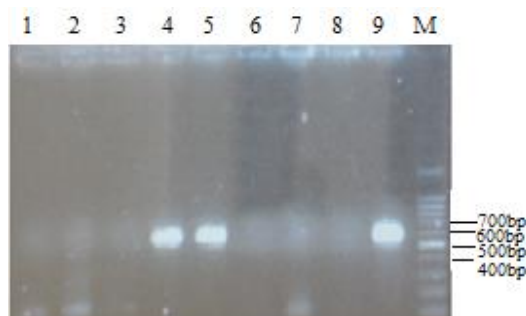
تعیین سویه جدایه‌های PVY با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

با بررسی واکنش جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu با آغازگرهای اختصاصی NF/NR، CF/OR و OF/OR، هر سه جدایه تنها قادر به افزایش ناحیه ۶۰۹ جفت‌بازی با جفت آغازگر OF/OR اختصاصی سویه O بودند (شکل ۴). بنابراین توالی ناحیه انتهایی ژن پروتئین پوششی این جدایه‌ها همسان توالی جدایه‌های سویه O است. با توجه به اینکه توالی انتهایی پروتئین پوششی زیرگروه‌های NTN و W در اثر نوترکیبی ژنگان از سویه O منشأ می‌گیرند (Visser, 2012; Karasev & Gray, 2013). برای بررسی بیشتر از جفت آغازگر

بوندند (شکل ۴). بنابراین توالی ناحیه انتهایی ژن پروتئین پوششی این جدایه‌ها همسان توالی جدایه‌های سویه O است. با توجه به اینکه توالی انتهایی پروتئین پوششی زیرگروه‌های NTN و W در اثر نوترکیبی ژنگان از سویه O منشأ می‌گیرند (Visser, 2012; Karasev & Gray, 2013). برای بررسی بیشتر از جفت آغازگر

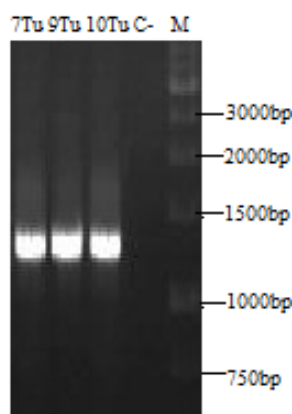
اختصاصی NTN، این جدایه‌ها احتمال دارد متعلق به سویه NTN و یا W باشند. برای تعیین دقیق سویه بایستی نواحی مختلف ژنگان توالی‌یابی و با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شود.

PVY3TIM/PVNIBIP اختصاصی سویه NTN نیز استفاده شد و یک قطعه ۱۱۲۴ جفت بازی از ناحیه انتهای ۳' سه جدایه افزایش شد (شکل ۵). با توجه به افزایش جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu با آغازگر



شکل ۴. نقوش الکتروفورزی محصولات PCR جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu با آغازگرهای NF/NR/OF/OR/CF: M: نشانگر DNA (Qiagen, 100bp DNA ladder)، 1، 2، 3 به ترتیب شامل نمونه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu با آغازگرهای اختصاصی NF/NR، 4، 5 و 9 به ترتیب شامل نمونه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu با آغازگرهای اختصاصی OF/OR و 6، 7 و 8 به ترتیب شامل نمونه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu با آغازگرهای اختصاصی CF/OR است

Figure 4. Electrophoresis pattern of PCR products of 10Tu, 9Tu and 7Tu isolates with NF/NR/OF/OR/CF primers. M: DNA ladder (Qiagen, 100bp), 1, 2, 3: related to amplification of 7Tu, 9Tu, 10Tu isolates with NF/NR primer pairs. 4, 5, 9: related to amplification of 7Tu, 9Tu and 10Tu isolates using OF/OR primer pairs. 6, 7, 8: related to amplification of 7Tu, 9Tu and 10Tu using CF/OR primer pairs.



شکل ۵. نقوش الکتروفورزی به‌دست‌آمده از واکنش PCR جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu با آغازگرهای PVY3TIM/PVNIBIP: M) نشانگر DNA (Fermantase, O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder)، C- کنترل منفی.

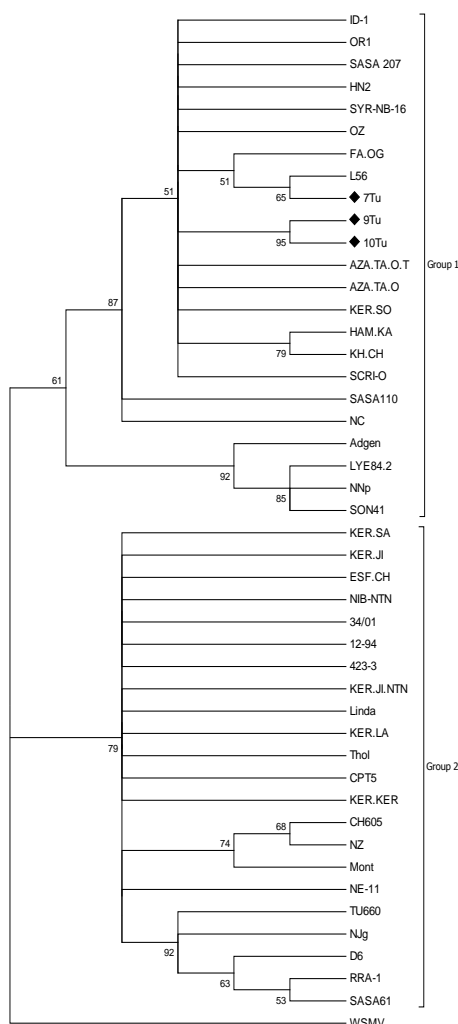
Figure 5. Electrophoresis pattern of PCR products of 10Tu, 9Tu and 7Tu isolates using PVY3TIM/PVNIBIP primer pairs. M: DNA ladder (Fermantase, O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder), C-: negative control.

داشت. سپس ترجمه توالی نوکلئوتیدی به توالی اسیدآمیننه با برنامه VectorNTI انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های 9Tu و 10Tu با یکدیگر به میزان ۱۰۰ درصد و با جدایه 7Tu ۹۹ درصد همسانی دارند. همانندی توالی نوکلئوتیدی ناحیه CP جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu با دیگر جدایه‌ها ۸۷ تا ۹۹ درصد است که بیشترین همانندی را با جدایه‌های HN2، JD1، L56،

بررسی توالی ناحیه CP

قطعه‌های افزایش‌شده از هر دو سو توالی‌یابی و آنگاه با گزینه Assemble برنامه VectorNTI ترادف پروتئین پوششی مونتاژ و تصحیح شد. ناحیه همپوشان با دیگر توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن توسط برنامه بلاست مقایسه شد که نتایج همسان انتظار نشان‌دهنده همانندی بالای این جدایه با دیگر جدایه‌های PVY ثبت‌شده

جداشده از ایران و دیگر نقاط جهان که در زیرگروه‌های جداگانه جای گرفتند، دیده می‌شوند. در گروه دوم جدایه‌های متعلق به سویه C و در گروه سوم جدایه‌های متعلق به سویه N و NA/NTN قرار دارند. در درخت تبارزایی رسم‌شده بر پایه توالی اسیدآمیننه نیز چنین تقسیم‌بندی مشاهده می‌شود (شکل ۶). اما به علت حفاظت‌شدگی زیاد، دو گروه اول و دوم در یک گروه با هم ادغام می‌شوند و جدایه‌های سویه C در کنار جدایه‌های O، W و چند جدایه NTN آسیایی قرار می‌گیرند.



شکل ۶. درخت تبارزایی رسم‌شده بر پایه مقایسه توالی اسیدآمیننه ناحیه CP جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu با برخی جدایه‌های PVY به روش ML.

Figure 6. Phylogenetic tree constructed based on amino acid sequences of coat protein region of 7Tu, 9Tu and 10Tu isolates in comparison with some of the PVY isolates using ML method.

OR1، OZ، SASA207، SCR1-O و SYR-NB-16 و کمترین همانندی را با جدایه‌های KER-KER و NE-11 دارند. توالی آمینواسیدی سه جدایه مورد بررسی ۱۰۰ درصد با هم همسانی دارد. درصد همانندی توالی آمینواسیدی ناحیه CP این جدایه‌ها با دیگر جدایه‌ها ۸۶ تا ۹۹ درصد است که بیشترین همانندی جدایه‌های 10Tu، 9Tu و 7Tu به ترتیب با جدایه‌های NC و SYR-NIB، OZ و SYR-NIB (۹۹ درصد) و کمترین همانندی 10Tu با KER-SA و KER-KER و دو جدایه دیگر با KER-KER و KER-SA مشاهده می‌شود. در پژوهش انجام‌شده توسط Hosseini *et al.* (2012) دو موتیف حفاظت‌شده GSTKKDAKQ (توالی ۹-۱۷) و PNLNKEKE (توالی ۲۴-۳۱) در همه جدایه‌های ایرانی انتخابی متعلق به سویه‌های NTN و N جداشده از سیب‌زمینی وجود داشت که در جدایه‌های متعلق به سویه O دیده نمی‌شد. جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu به‌جای این دو موتیف دارای موتیف‌هایی با توالی GSN(S)KKDARP و SNLNKGKD همسان با جدایه‌های ایرانی متعلق به سویه‌های O و W گزارش شده در پژوهش Hosseini *et al.* (2012) و برخی دیگر از جدایه‌های متعلق به سویه NTN مانند SYR-NB و HN2 هستند. بنابراین به نظر می‌رسد به علت رخداد نوترکیبی زیاد در ناحیه CP، این ناحیه نمی‌تواند برای جداسازی همه جدایه‌های متعلق به سویه NTN و O به‌کار رود. از این نظر جدایه‌های ایرانی جداشده از شلغم با جدایه‌های ایرانی جداشده از سیب‌زمینی متفاوت هستند.

بهترین مدل برای رسم درخت تبارزایی برای توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمیننه بنابر نتایج به‌دست‌آمده از برنامه MEGA6 به ترتیب مدل Hasegawa-Kishino-Yano و Jones-Taylor-Thornton تعیین شد. برای رسم درخت تبارزایی بر پایه توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمیننه ناحیه CP جدایه‌های PVY از روش ML استفاده شد. در درخت رسم شده بر پایه توالی نوکلئوتیدی ناحیه CP، جدایه‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. در گروه یک جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu در کنار دو جدایه آسیایی (جدایه‌های SYR-NB و HN2 به ترتیب از چین و سوریه) متعلق به سویه NTN، جدایه‌های سویه O و جدایه‌های سویه W

وای سیبزمینی ثابت شد و با استفاده از روش SDS-PAGE و مشاهده دو قطعه ۳۳ و ۳۱ کیلودالتونی از پروتئین پوششی ویروس، وجود ویروس PVY تأیید شد. در ادامه با استفاده از گیاهان آزمون و آغازگرهای اختصاصی، نوع سویه جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu جداسده از شهرستان‌های دزفول، شوشتر و شوش همسان سویه‌های NTN و W تعیین شد. در نهایت بررسی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی نواحی CP جدایه‌های 7Tu، 9Tu و 10Tu و مقایسه آن با دیگر جدایه‌های برداشت‌شده از بانک ژن نشان داد که هر سه جدایه از نظر توالی ناحیه CP همسان جدایه‌های متعلق به سویه NTN و W هستند. بنابر نتایج به‌دست‌آمده از آغازگرهای اختصاصی و بررسی نواحی مختلف هر سه جدایه مورد بررسی متعلق به خانواده پوتی‌ویریده، جنس PVY و گروه NTN و یا W هستند.

به نظر می‌رسد تنها با تکیه بر نتایج به‌دست‌آمده از یک ناحیه نمی‌توان با قطعیت سویه PVY را تعیین کرد. برای اطمینان بیشتر بایستی نواحی بیشتری از ژنگان توالی‌یابی شود. از نظر توالی CP شبیه به جدایه‌های سویه NTN و W هستند. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از بررسی نواحی مختلف به نظر می‌رسد هر سه جدایه انتخابی در این پژوهش متعلق به سویه NTN و یا W است.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش با روش DAS-ELISA و پادتن اختصاصی PVY، ویروس یادشده از کشتزارهای استان خوزستان که از مناطق مهم کشت شلغم است ردیابی و جداسازی شد. در آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جنس PVY حضور ویروس

REFERENCES

1. Amer, M., El-Hammady, M., Mazyad, H., Shalaby, A. & Abo-Elabbas, F. (2004). Cloning, expression and nucleotide sequence of Coat protein gene of an Egyptian isolate of *Potato Virus Y* strain NTN infecting Potato plants. *Egyptian Journal Virology*, 1, 39-50.
2. Bimboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids Research*, 7(6), 1513-1523.
3. Boonham, N., Walsh, K., Hims, M., Preston, S., North, J. & Barker, I. (2002). Biological and sequence comparisons of *Potato virus Y* isolates associated with Potato tuber necrotic ringspot disease. *Plant Pathology*, 51, 117-126.
4. Clark, M. F. & Adams, A. (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. Fakhrabad, F. Z., Nasrollanejad, S., Ahmadikhah, A. & Taghinasab, M. (2012). Sequencing of three isolates and prevalence of *Potato virus Y* in Tobacco fields of Golestan province, and phylogenetic comparison of the Iranian and world isolates of the virus. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 48.
6. 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.
7. Fuji, S., Inoue, M., Yamamoto, H., Furuya, H., Naito, H. & Matsumoto, T. (2003). Nucleotide sequences of the Coat protein gene of Potyvirus infecting *Ornithogalum thyrsoides*. *Archives of Virology*, 148, 613-621.
8. Ha, Cuong Viet. (2007). *Detection and identification of potyviruses and geminiviruses in Vietnam*. Ph.D. thesis by Publication, Queensland University of Technology, Queensland.
9. Higgins, C., Cassidy, B., Teycheney, P.-Y., Wongkaew, S. & Dietzgen, R. (1998). Sequences of the Coat protein gene of five *Peanut stripe virus* (PStV) strains from Thailand and their evolutionary relationship with other *Bean common mosaic virus* sequences. *Archives of Virology*, 143, 1655-1667.
10. Hosseini, S., Koochi Habibi, M., Mosahebi, G., Motamedi, M. & Winter, S. (2012). First report on the occurrence of *Tobacco streak virus* in Sunflower in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 94, 585-589.
11. Hull, R. (2002). Induction of disease 1: virus movement through the plant and effects on plant metabolism. *Matthew's plant Virology*, 4th edn, Academic Press, San Diego, 373-436.
12. Huttinga, H. & Mosch, W. (1974). Properties of viruses of the *Potyvirus* group. 2. Buoyant density, S value, particle morphology, and molecular weight of the Coat protein subunit of *Bean yellow mosaic virus*, *Pea mosaic virus*, *Lettuce mosaic virus*, and *Potato virus YN*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 80, 19-27.
13. Inoue-Nagata, A. K., Fonseca, M. e. N., Lobo, T. O., Ávila, A. C. & Monte, D. C. (2001). Analysis of the nucleotide sequence of the Coat protein and 3'-untranslated region of two Brazilian *Potato virus Y* isolates. *Fitopatologia Brasileira*, 26, 45-52.

14. Jensen, S. G., Long-Davidson, B. & Seip, L. (1986). Size variation among proteins induced by *Sugarcane mosaic viruses* in plant tissue. *Journal Series Paper*, 68583, 0722.
15. Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Dooner, H. K. & Klessig, D. F. (2000). Resistance to *Turnip crinkle virus* in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *The Plant Cell*, 12, 677-690.
16. Kuchacki, A. R., Nasirimahalati, M., Hassanzade Aval, F., Mansuri, H., Amiri, S. R., Zarghani, H. & Karimian, M. (2013). Assessment of biodiversity vegetables in ecosystems crop of Iran. *Journal of Applied Ecology*, 4(2), 1-11. (in Farsi)
17. Khuzestan Agriculture Jahad. (2010). *Turnip harvest from the fields of Khuzestan province*. Retrieved December 22, 2014, from <http://www.kaj.maj.ir/ravabetomome/news>.
18. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
19. Leisner, S. M., Turgeon, R. & Howell, S. H. (1992). Long distance movement of *Cauliflower mosaic virus* in infected Turnip plants. *Molecular. Plant-Microbe Interact*, 5, 41-47.
20. 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.
21. Moghal, S. & Francki, R. (1976). Towards a system for the identification and classification of Potyvirus: I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. *Virology*, 73, 350-362.
22. Moury, B., Palloix, A., Caranta, C., Gognalons, P., Souche, S., Selassie, K. G. & Marchoux, G. (2005). Serological, molecular, and pathotype diversity of *Pepper veinal mottle virus* and *Chili veinal mottle virus*. *Phytopathology*, 95, 227-232.
23. Nanayakkara, U. N., Singh, M., Pelletier, Y. & Nie, X. (2012). Investigation of *Potato virus Y* (PVY) strain status and variant population in Potatoes in New Brunswick, Canada. *American Journal of Potato Research*, 89, 232-239.
24. Ohshima, K., Sako, K., Hiraishi, C., Nakagawa, A., Matsuo, K., Ogawa, T., Shikata, E. & Sako, N. (2000). Potato tuber necrotic ringspot disease occurring in Japan: its association with *Potato virus Y* necrotic strain. *Plant Disease*, 84, 1109-1115.
25. Sabir, J. S. (2012). Identification of six *Potato virus Y* isolates from Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11, 9709-9715.
26. Singh, R. P., Valkonen, J. P., Gray, S. M., Boonham, N., Jones, R., Kerlan, C. & Schubert, J. (2008). Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting Potato. *Archives of Virology*, 153, 1-13.
27. Smith, K. M. (1931). Composite nature of certain Potato viruses of the mosaic group. *Nature*, 127, 702.
28. Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.-L. & Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74, 157-175.
29. Visser, J. C. (2012). *A study of the strain evolution and recombination of South African isolates of Potato virus Y*. Ph. D. thesis .Stellenbosch University, Stellenbosch.