مقاله کوتاه

فراوانی و تعیین ترادف سه جدایه ویروس وای سیب‌زمینی از مزارع توتون و مقایسه فیلوژنتیکی با سایر جدایه‌های دنیا*

SEQUENCING OF THREE ISOLATES AND PREVALENCE OF POTATO VIRUS Y IN TOBACCO FIELDS OF GOLESTAN PROVINCE, IRAN AND PHYLOGENETIC COMPARISON OF THE IRANIAN AND WORLD ISOLATES OF THE VIRUS

فاطمه زینتی فخرآباد**، سعید نصرالله نژاد، اسداله احمدی خواه و میثم تقی نسب[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳۱)

چکیده

برای تعیین فراوانی ویروس وای سیب‌زمینی (Potato virus Y, PVY) در تابستان ۱۳۸۹ تعداد ۱۸۲ نمونه دارای علایم از مزارع توتون استان گلستان جمع‌آوری و با آزمون DAS-ELISA با آنتی سرم چند همسانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۹۰ نمونه آلوده به PVY تشخیص داده شدند. آر ان ای سه جدایه ویروس با استفاده از کیت RNX-Plus استخراج و با یک جفت آغازگر اختصاصی PVY مربوط به ناحیه CP، در واکنش RT-PCR تکثیر شد. نمونه‌های آلوده به PVY پس از الکتروفورز در ژل آگاروز در محدوده ۱۰۰۰bp مورد انتظار، ایجاد باند نمودند. محصول PCR به‌طور مستقیم ترادف‌یابی شد و ترادف‌های به‌دست آمده به طول ۸۵۰ نوکلئوتید همراه با ۳۰ ترادف انتخاب شده از GenBank مقایسه شدند. همردیف‌سازی چندگانه و آنالیز فیلوژنتیک با ClustalX و BLAST در نرم‌افزار BioEdit انجام و درخت فیلوژنتیکی به روش maximum parsimony ترسیم گردید. آنالیز فیلوژنتیک نشان داد که جدایه‌های علی‌آباد و فاضل‌آباد از ایران همراه با جدایه‌های اسپانیا، ایتالیا و بوشهر در یک گروه و جدایه مینودشت همراه با جدایه‌های هلند، بریتانیا و تایوان در گروه دیگر قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی: توتون، ویروس وای سیب‌زمینی، DAS-ELISA، CP-UTR، آنالیز فیلوژنتیک

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zinati_fateme@yahoo.com

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد، دانشیار، استادیار و مربی بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

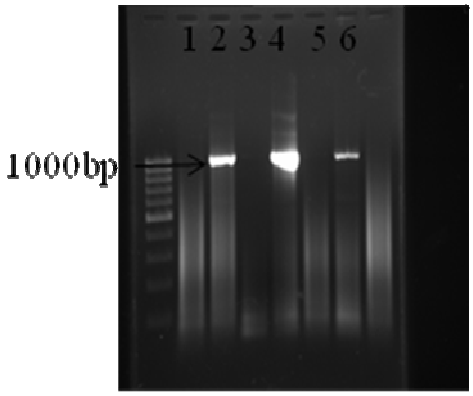
ویروس وای سیب‌زمینی (PVY) به جنس *Potyvirus* و دومین خانواده بزرگ ویروس‌های گیاهی یعنی *Potyviridae* تعلق دارد و دارای ژنوم آر ان ای تک لا به اندازه حدود ۱۰ کیلوباز است (Posada & Crandall 2001, Lewis 2007, Yun. 2002). PVY در طبیعت دارای چند نژاد مشخص است. به‌طورکلی سه نژاد برای این ویروس توصیف شده است که هرکدام علایم متفاوتی را ایجاد می‌نمایند (De Bokx & Huttinga 1981). نژاد N برای اولین‌بار در سال ۱۹۳۵ در یک بوته توتون که نزدیک بوته‌های سیب‌زمینی آزمایشی رشد کرده بود شناسایی شد و این نژاد نکروز رگبرگی شدید در توتون ایجاد می‌کرد (Smith & Dennis 1940). نژاد C،(PVY^C) در توتون موزائیک سیستمیک یا پیسک تولید می‌نماید (De Bokx & Huttinga 1981). نژاد O،(PVY^O) معمول‌ترین نژاد ویروس Y سیب‌زمینی است.

این نژاد به راحتی توسط شته منتقل می‌شود و هم‌اکنون به‌طور وسیعی در سراسر جهان و ایران انتشار یافته است (Glais *et al.* 2002). آلودگی به این ویروس موجب کاهش عملکرد توتون می‌گردد. میزان خسارت این ویروس در گیاه توتون تا ۸۳ درصد گزارش شده است که به عوامل متعددی از جمله رقم توتون، زمان وقوع آلودگی و سویه ویروس بستگی دارد. (Sievert 1978, Pourrahim *et al.* 2007). اولین گزارش از وجود PVY در توتون کاری‌های ایران مربوط به منطقه قرق و فاضل‌آباد استان گلستان بود که در تیرتاش بهشهر برروی توتون مورد ارزیابی قرار گرفت(Abebi 1998). هدف از تحقیق حاظر تعیین ویژگی‌های ژنتیکی جدایه‌های توتون PVY و نیز تعیین فراوانی آن در مزارع توتون استان گلستان بود.

روش بررسی

در تابستان ۱۳۸۹ نمونه‌برداری از مزارع توتون استان گلستان با علایم موزائیک، روشنی رگبرگ، نکروز و کلروز صورت گرفت و نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌های سرولوژیک و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت شناسایی و تعیین پراکنش ویروس از آزمون الایزا (DAS-ELISA)(Clark & Adams 1977) با استفاده از آنتی بادی چند همسانه‌ای اختصاصی این ویروس (DSMZ, Germany) استفاده گردید. بعد از شناسایی نمونه‌های آلوده به PVY، تعداد سه جدایه از استان گلستان که بیشترین غلظت ویروس را در آزمون الایزا دارا بودند انتخاب و از آنها در آزمون PCR استفاده شد. آر ان ای این نمونه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته بر روی کیت RNX-Plus (Cinagen) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. پس از انجام واکنش RT و ساخت cDNA، جهت تکثیر، واکنش PCR انجام شد. آغازگرهای 7861-CAA CTC CAG ATG GAA (CAA TTG-7882)P1 و P2 (8858-CCA TTC ATC ACA GTT GGC-8875) به‌ترتیب به‌عنوان پیش‌رو (P1) و پس‌رو (P2) طراحی و مورد استفاده قرار گرفتند.

آغازگرها براساس ترادف سویه O به‌عنوان مرجع طراحی شدند. پروفیل حرارتی PCR به شکل زیر برنامه‌ریزی شد: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه برای واسرشتگی اولیه، ۳۲ چرخه به‌شرح زیر: ۳۵ ثانیه در ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه، ۱/۵ دقیقه در ۷۲ درجه؛ و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه جهت سنتز قطعات ناتمام. در تمام برنامه‌ها سیکل پایانی واکنش پس از مرحله گسترش نهایی در ۸ درجه سانتی‌گراد با زمان نامحدود تنظیم گردید که برای حفظ محصول PCR بود. در نهایت محصول PCR



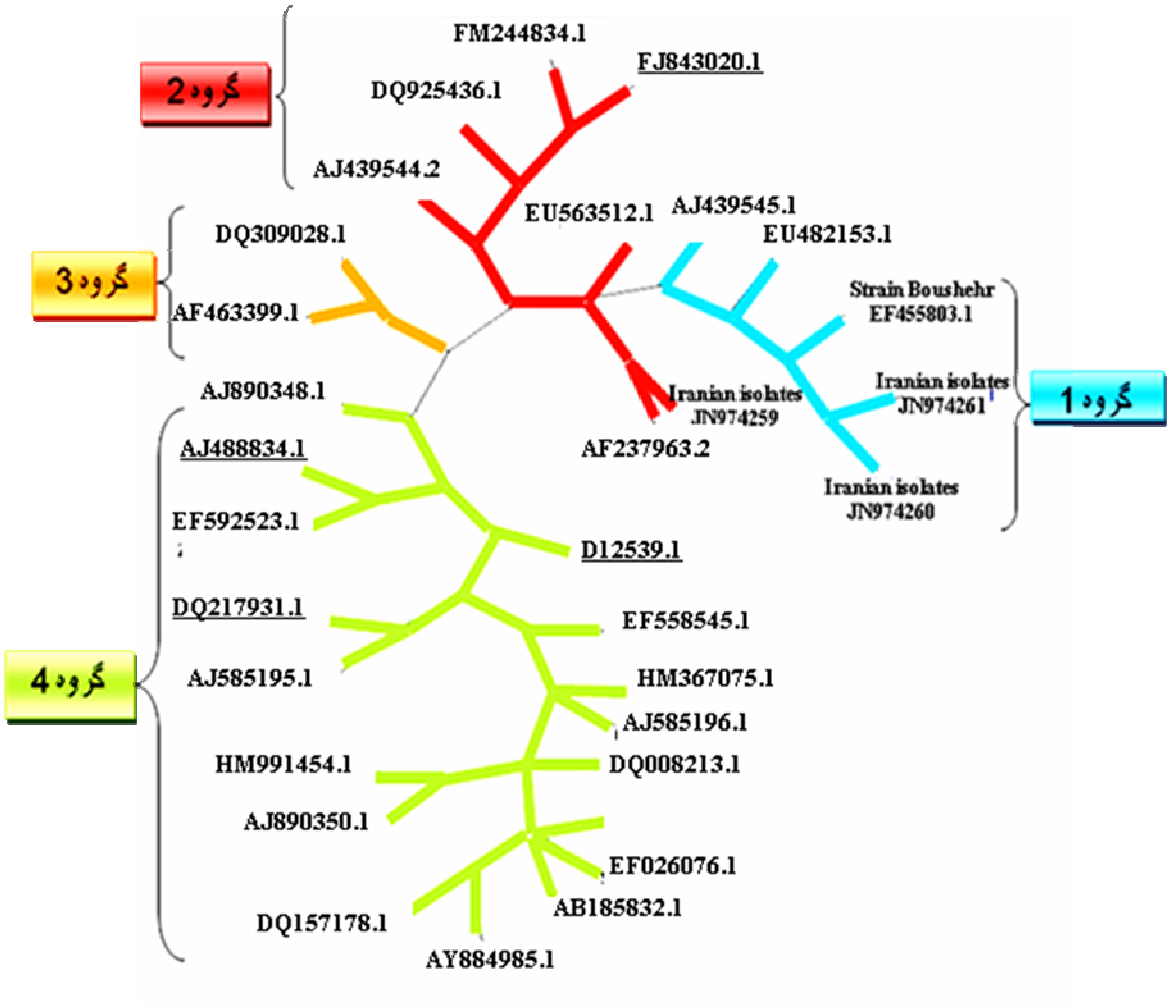
شکل ۱. نقش الکتروفورزی نتایج آزمون PCR جدایه‌های توتون PVY در ژل آگاروز ۱٪. سمت چپ: مارکر DNA. راهک‌های ۱ و ۳ و ۵، کنترل منفی با آب مقطر؛ راهک‌های ۲و ۴و ۶، جدایه‌های مینودشت(۲)، علی‌آباد(۴) و فاضل‌آباد(۶) آلوده به PVY.

Fig. 1. Electrophoresis pattern of PCR products of tobacco isolates of PVY on 1% agarose gel. Left to right(1) DNA marker; lanes 1, 3 and 5, distilled water as negative control, lanes 2, 4 and 6, PVY isolates from Minoodasht, Aliabad and Fazelabad, respectively.

برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. ترادف‌های به‌دست آمده با ۳۰ ترادف انتخاب شده از GenBank مقایسه گردیدند (داده‌ها ذکر نشده). همردیف‌سازی چندگانه (Multiple alignment) با برنامه Clustal X انجام و با استفاده از نرم‌افزار BioEdit درخت فیلوژنتیکی به روش maximum parsimony (MP) ترسیم شد (شکل ۲).

نتایج و بحث

از میان ۱۸۹ نمونه جمع‌آوری شده از سطح استان، ۹۰ نمونه آلوده به PVY بودند. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای PVY قادر به شناسایی این ویروس در عصاره گیاه آلوده بودند. با استفاده از این آغازگرها در آزمون PCR قطعه‌ای در حدود ۱۰۰۰ جفت باز به‌دست آمد (شکل ۱). اطلاعات مربوط به برخی از جدایه‌ها، منشاء و میزبان آنها و رس شمار GenBank در جدول ۱ ذکر شده است. این جدایه‌ها با ۳ جدایه تعیین ترادف شده آنالیز شدند. هم‌چنین براساس آنالیز فیلوژنتیکی مشخص شد گروه ۴ با بیشترین تعداد، طیف وسیعی از جدایه‌های اروپا و آمریکا و خاورمیانه را در برگرفته است. دو جدایه علی آباد و فاضل آباد و یک جدایه از بوشهر در گروه ۱ قرار می‌گیرند که در کنار جدایه‌های اروپایی اسپانیا و ایتالیا قرار گرفته و میزبان‌هایی غیر از سیب‌زمینی دارند. دو جدایه از میزبان توتون اما بدون ذکر نام کشور در بانک ژن در گروه ۳ قرار گرفتند. در گروه ۲، جدایه مینودشت با جدایه‌های هلند، بریتانیا و تایوان هم‌گروه شده است که بیانگر رابطه ژنتیکی بالا(۹۴٪ شباهت ژنتیکی) می‌باشد (شکل۲). روش بیشترین پارسیمونی معمول‌ترین روش برای بررسی و انعکاس روابط نیاکانی است که اجازه استفاده از تمامی اطلاعات شناخته شده تکاملی را در ایجاد درخت می‌دهد. در حقیقت روش بیشترین پارسیمونی بیانگر کمترین تعداد تغییرات تکاملی (یا به‌عبارتی کمترین تعداد جهش) برای ساخت درخت است. ابتدا همه توپولوژی‌های ممکنه براساس تغییرات تکاملی ترسیم شده و سپس به هرکدام از توپولوژی‌های ترسیم شده امتیاز داده می‌شود و در نهایت درختی انتخاب می‌شود که بیشترین



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش Maximum parsimony در نرم‌افزار (BioEdit(version 3.6a2.1، بـه‌دسـت آمـده از همردیف‌سازی ۸۵۰ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی ۳۰ جدایه PVY.

Fig. 2. Maximum parsimony tree obtained from alignment of a 850 nt of coat protein gene of the 30 isolates of PVY.

امتیاز و به‌عبارتی کمتـرین تغییـرات تکـاملی را دارا باشـد (Naghavi. 2010).

در ایران مطالعات متعددی در مورد این ویروس انجام شده است اما گزارشی از وضعیت نژادهای این ویروس بـه روش دقیق مولکولی در مزارع توتون ایران از جمله اسـتان گلستان که از قطب‌های اصلی کشت توتون در ایران اسـت صورت نگرفته است. شناسایی و تعیین پـراکنش PVY در استان گلستان در سال ۱۳۸۹ نشان داد که ایـن ویـروس در تمام مناطق کـشت توتـون وجـود دارد. و حـدود نیمـی از علایم ویروسی مانند موزائیک مربوط به آن است. هم‌چنین در مورد سه جدایه استان گلستان (مینودشت، علـی آبـاد و فاضل آباد) مشاهده شد که کمترین فاصله ژنتیکی بین ایـن

جدول۱. میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی میان جدایه‌های تعیین ترادف شده PVY در این تحقیق و یک جدایه هلندی

Table 1. The rate of nucleotide sequence similarity between PVY isolates sequenced the present research and one isolate from the Netherlands

Ac. number	Country	Host	Isolate/ strain	Minoodasht	Aliabad	Fazelabad
JN974259	Iran	Tobacco	Minoodasht	100	91.3	89.6
JN974260	Iran	Tobacco	Aliabad	91.3	100	98.5
JN974261	Iran	Tobacco	Fazelabad	93.7	98.5	100
EU563512.	Netherlands	S. tuberosum	C/Isolate PRI-509	93.7	93.4	92.9
EF455803.1	Iran	-	strain Bushehr	90.4	96.4	97.7

جدایه‌ها وجود دارد. مقایسه دقیق‌تر نتایج مولکولی حاکی از وجود تفاوت‌های ژنتیکی جدایه‌های ایرانی و خارجی ویروس Y سیب‌زمینی بود. این مقایسات، حتی تفاوت‌های ژنتیکی را در بین جدایه‌های ایرانی نیز نشان داد که بیانگر وقوع نوترکیبی بین جدایه‌های موجود، و ظهور نژادهای نوترکیب جدید از این ویروس باشد (اطلاعات ارایه نشده است). از طرفی نتایج به‌دست آمده از تحقیقات سایر محققین نشان می‌دهد که امکان تغییر ژنتیکی ویروس وای سیب‌زمینی در میزبان‌های مختلف بسیار شدید است (Fanigliulo *et al.* 2005). در تحقیق حاضر مشخص شد که جدایه‌های علی آباد و فاضل آباد براساس آنالیزهای فیلوژنیکی با استرین LYE84.2 (میزبان گوجه‌فرنگی) در یک گروه قرار گرفته‌اند و جدایه مینودشت با بیشترین تشابه به استرین PVY^{nnp} در کنار استرین SON41 (میزبان غیر سیب‌زمینی) در گروه جداگانه‌ای واقع شده‌اند.

در نتیجه می‌توان براساس علایم ایجاد شده بر روی میزبان توتون زراعی که شامل روشن شدن رگبرگ و موزائیک خفیف تا شدید بود (اطلاعات ارایه نشده) و آنالیزهای ناحیه CP ژنوم ویروس Y سیب‌زمینی، گروه‌های ۱، ۲ و ۳ را در گروهی با بیشترین تشابه به استرین PVY^{C} و گروه ۴ را که شامل بیشترین تعداد سویه و جدایه‌هایی با میزبان سیب‌زمینی و نوترکیبی‌های فراوان است را در گروه جداگانه‌ای قرار داد که شامل سویه‌های جدید و نوترکیب از جمله $PVY^{N:O}$ و $PVY^{N:W}$ می‌باشند (شکل۲).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (142-141) متن انگلیسی مراجعه شود.