DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.2.12.8

ردیابی و تعیین خصوصیات بیولوژیکی و فیلوژنتیکی ویروس Y سیب زمینی (PVY) جدایه استان لرستان

فاطمه رحیمی[۱]، سید حسین وفائی[۱*] و سمیرا پاکباز[۲]

[۱] ایران، خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم آباد، گروه بیماری شناسی گیاهی

[۲] ایران، خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۷

چکیده

بیماری‌های ویروسی از جمله عوامل محدودکننده تولید سیب‌زمینی در جهان هستند. ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) گونه جنس *Potyvirus*از خانواده *Potyviridae* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های محصول سیب‌زمینی می‌باشد. به منظور ردیابی ویروس، تعداد ۱۳۵ نمونه از گیاهانی که علایم موزائیک، کوتولگی، موجی بودن حاشیه برگ، لکه‌های کلروتیک و تغییر شکل برگ را نشان می‌دادند، از مزارع سیب‌زمینی استان لرستان جمع‌آوری گردید. عصاره گیاهان مشکوک در مرحله چهار برگی روی گیاهان محک *Nicotiana glutinosa*، *N. occidentalis* و *N. debneyi* مایه‌زنی گردید. پس از حدود ده روز علایمی نظیر زردی موضعی، رگبرگ‌روشنی و موزائیک روی *N. occidentalis* و پیسه‌ای شدن و نکروز موضعی روی *N. glutinosa* مشاهده شد. از گیاهان محک دارای علایم، استخراج RNA کل صورت گرفت و با استفاده از آزمون RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی مربوط به بخشی از ناحیه ژنومی ژن CP و NIb ویروس PVY، باندی در محدوده bp ۱۱۱۵ تکثیر شد و آلودگی نمونه‌ها به ویروس PVY اثبات شد. بررسی‌های فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه ایرانی مورد مطالعه دارای ۹۹/۴۸-۹۸/۷۴ درصد همسانی ژنتیکی با دیگر توالی‌های ثبت شده در این ناحیه در NCBI بود. نتایج تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی نشان داد که جدایه‌های ویروس PVY در دو گروه قرار گرفتند و جدایه ردیابی شده از استان لرستان در گروه II و در کنار جدایه‌های مربوط به کشور آلمان که متعلق به نژاد Wilga بودند، قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی قطعه مورد نظر در NCBI به شماره دسترسی MT655949 ثبت گردید. این اولین گزارش از آلودگی مزارع سیب‌زمینی استان لرستان به ویروس PVY به کمک آزمایشات مولکولی می‌باشد.

واژه های کلیدی: پوشش پروتئینی، توالی‌یابی، خرم‌آباد، سیب‌زمینی، *Potyvirus*.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۶۶۳۴۴۲۷، پست الکترونیکی: vafaei_h1353@yahoo.com

مقدمه

بیماری‌های ویروسی از جمله عوامل محدودکننده تولید سیب‌زمینی در جهان می‌باشند. شیوع ویروس Y سیب-زمینی (PVY) *Potato virus Y*, در سراسر جهان برای تولید کارآمد سیب‌زمینی یک چالش مداوم است. تشخیص دقیق ویروس‌هایی مانند PVY به دلیل تنوع گسترده بیولوژیکی و ژنتیکی نژادهای آن که طیف وسیعی از علایم و بیماری‌ها را در ارقام مختلف سیب‌زمینی و گونه‌های خانواده بادنجانیان ایجاد می‌کند، ذاتاً چالش برانگیز است (۱۱). خانواده *Potyviridae* از مهم‌ترین ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی و یکی از بزرگ‌ترین آن‌ها است. در میان اعضاء این خانواده، ویروس PVY به‌عنوان گونه تیپ در جنس *Potyvirus*، یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی در جهان می‌باشد که روی کیفیت و بازده محصولات خانواده بادنجانیان مانند توتون، سیب‌زمینی،

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.2.12.8

گوجه‌فرنگی و فلفل مؤثر است (۱۵). در برخی موارد، با توجه به واریته ویروس، رقم سیب‌زمینی و شرایط آب و هوایی منطقه، این ویروس می‌تواند بین ۷۰-۴۰ درصد خسارت وارد نماید (۷). این موضوع در مزارع سیب‌زمینی در ایران نیز بررسی شده و PVY به عنوان مهم‌ترین عامل کاهش بازدهی در سیب‌زمینی شناخته شده است (۶). حداقل ۶۵ گونه شته (جنس‌های *Macrosiphum* و *Myzus*) به صورت ناپایا قادر به انتقال PVY هستند که در این میان شته *Myzus persicae* کاراترین آنها می‌باشد. همچنین انتقال این ویروس توسط غده‌های سیب‌زمینی و شیره گیاهی امکانپذیر است. غده‌های آلوده که به عنوان اندام رویشی برای کاشت استفاده می‌شوند به عنوان منبع اولیه آلودگی به شمار می‌آیند (۸ و ۲۰). ویروس PVY با ژنوم RNA تک‌رشته‌ای مثبت و خطی (ssRNA) و اندازه حدود ۱۰ کیلوباز تنها یک چارچوب خوانش باز (ORF) دارد و یک پلی پروتئین کد می‌کند که توسط سه پروتئاز ویروسی (P1، Pro-HC و NIa) به ده پروتئین با وظایف مختلف (P1، HC-Pro ، P3، 6K1، CI، 6K2، NIa، VPG، Nib وCP) شکسته می‌شود (۱۲). ژنوم PVY در انتهای '۵ خود دارای ساختمان VPg و یک دنباله پلی‌آدنین در انتهای '۳ می‌باشد(۹). ویروس PVY در طبیعت دارای چند واریته مشخص می‌باشد، به‌طوری که پنج واریته PVY^{O}، PVY^{C} ، PVY^{NTN} ، PVY^{N} و PVY^{Wilga} تاکنون در دنیا گزارش شده است (۱۰). علایم این ویروس برحسب واریته ویروس و رقم سیب‌زمینی کاملاً متفاوت می‌باشد. به طوری که علایم ضعیف تا نکروز برگی شدید و مرگ بوته‌های آلوده ممکن است دیده شود (۱۶). واریته PVY^{O} باعث ایجاد علایم موزاییک خفیف تا شدید و ریزش برگ‌ها در گیاه سیب‌زمینی و علایم موزاییک و ابلقی در برگ‌های توتون می شود. واریته PVY^{N} باعث ایجاد علایم نکروز رگبرگ در توتون، ابلقی خفیف و گاهی نکروز برگ‌ها در گیاه سیب‌زمینی می شود. واریته PVY^{C} باعث ایجاد علایم موزاییک و نکروز در برخی ارقام سیب‌زمینی می‌شود (۱۸، ۲۲ و ۲۳). نوترکیبی‌های زیادی بین دو گروه O و N در نتیجه حضور همزمان این دو در یک گیاه ظهور کرده است. دو واریته مهم PVY^{NTN} وPVY^{N-W} از نوترکیبی بین دو واریته O و N بوجود آمده‌اند (۱۹). Visser(2012) نشان داد که موقعیت و طول قطعه‌های نوترکیب و تنوع در محل ایجاد نوترکیبی باعث ایجاد واریته‌های مختلف از جمله زیرگروه‌های N: O، N-Wi و NTN شده است (۲۴). در طول دهه گذشته، روش‌های مبتنی بر PCR به دلیل حساسیت، اختصاصیت و ظرفیت آن‌ها برای انجام آزمایش‌هایی با بازدهی بالا، به طور معمول برای تشخیص PVY مورد استفاده قرار گرفته‌اند و با استفاده از روش‌های مولکولی بخش‌های مختلف ژنوم این ویروس ردیابی و تعیین ترادف شده است (۱۱). در حال حاضر تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل از جدایه-های مختلف این ویروس در دسترس می‌باشد (۱۴ و ۱۷). در ایران نیز با استفاده از روش‌های مولکولی این ویروس ردیابی و برخی بخش‌های ژنومی آن تعیین ترادف و در اختیار بانک اطلاعات ژن قرار گرفته است (۱۳). این مطالعه به منظور ردیابی مولکولی ویروس PVY در مزارع سیب-زمینی استان لرستان اجرا گردید.

مواد و روشها

نمونه‌برداری از مزارع سیب‌زمینی: به منظور ردیابی ویروس PVY طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۸ از مزارع سیب‌زمینی استان لرستان شامل شهرستان‌های خرم‌آباد (مرکز استان)، الشتر، دورود و بروجرد (شمال استان)، ۱۳۵ نمونه مشکوک به آلودگی ویروسی جمع‌آوری شد. شهرستان‌های نام‌برده به دلیل آب و هوای معتدل، مراکز کشت سیب‌زمینی در استان می‌باشند. نمونه‌برداری در مزارع از برگ‌های انتهایی و جوان بوته‌های موردنظر به‌ویژه از گیاهان دارای علایم نکروز، کوتولگی، موزائیک، موجی شدن حاشیه برگ، لکه‌های کلروتیک و تغییر شکل برگ جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها به تفکیک در داخل کیسه

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.2.12.8

پلاستیکی قرار گرفتند و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور نگهداری طولانی مدت، بخشی از نمونه‌ها پس از انجماد سریع در ازت مایع، به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

بررسی خصوصیات بیولوژیکی ویروس در گلخانه و استخراج RNA کل: باتوجه به ماهیت ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) که دارای قابلیت انتقال مکانیکی از طریق عصاره شیره گیاهی می‌باشد، به منظور بررسی علایم بیماری بر روی گیاهان محک و نیز برای حفظ ویروس در گیاهان تکثیری، بذر گیاهان محک اختصاصی ویروس PVY، شامل سه رقم توتون *Nicotiana occidentalis* ، *N.debneyi* و *N.glutinosa* (تهیه شده از گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد) در گلخانه کشت و بعد از رسیدن به سن دو تا چهار برگی، مایه‌زنی عصاره گیاه سیب‌زمینی مشکوک به آلودگی با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (KH_2PO_4 و K_2HPO_4) ۰/۱ مولار با pH:۷ روی همه گیاهان محک انجام شد (۳). مایه‌زنی‌ها در دو تکرار انجام پذیرفت. گیاهان تلقیح شده هر روز مورد بررسی قرار گرفته و علایم ایجاد شده از حدود یک هفته پس از مایه‌زنی ثبت شد. استخراج RNA از گیاهان محک دارای علایم ویروسی با استفاده از کیت غیرستونی Total RNA Isolation (شرکت دنازیست آسیا) طبق دستورالعمل انجام شد. بدین منظور، میزان ۵۰ میلی-گرم از بافت گیاهی خرد شده با ازت مایع به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و یک میلی‌لیتر بافر G1 به آن اضافه شد. در ادامه، موادی نظیر کلروفرم، ایزوپروپانول، بافر G2 و اتانول ۷۰٪، طی مراحل مختلف استخراج به میکروتیوب افزوده شدند و در مرحله نهایی به رسوب تشکیل شده، آب فاقد ریبونوکلئاز اضافه شد و سپس میکروتیوب در فریزر ۷۰- نگهداری شد.

سنتز رشته مکمل cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): فرایند سنتز cDNA با استفاده از آنزیم نسخه-برداری معکوس و طبق دستورالعمل کیت تجاری شرکت سیناکلون انجام شد. برای این منظور میزان ۵ میکروگرم از RNAکل استخراج شده به همراه ۱۰ پیکومولار آغازگر برگشت در حجم ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش برای مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس بلافاصله به مدت دو دقیقه روی یخ قرارداده شد. سپس به میزان دو میکرولیتر dNTP (۱۰mM)، چهار میکرولیتر 10X Buffer M-MuLV، ۲۰ واحد آنزیم Ribonuclease inhibitor و ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌بردار معکوس M-MuLV به مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه و برای مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داد شد. مخلوط واکنش برای توقف فعالیت آنزیم برای مدت پنج دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

جهت تکثیر cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از دو میکرولیتر از cDNA (۵۰ نانوگرم) و در حضور آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت مربوط به بخشی از ژن پروتئین پوششی (CP) و ژن NIb (PVYF: 5′CAACTCCAGATGGAACAATTG3′ و PVYR: 5′CCATTCATCACAGTTGGC3′) انجام پذیرفت (۱). جهت انجام این واکنش از کیت 2x PCRBio Taq Mix Red شرکت PCR Bio systems انگلیس استفاده شد. محلول پایه واکنش شامل همه مواد مورد نیاز برای تکثیر به جز cDNA و آغازگرهای اختصاصی بود. واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت ۱۰ پیکومول از هر آغازگر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برنامه PCR متشکل از یک چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به منظور واسرشت‌سازی اولیه و ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد و گسترش رشته جدید در ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و به علاوه یک چرخه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای گسترش نهایی بود. محصولات

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.2.12.8

تکثیر شده در واکنش RT-PCR، برای بررسی اندازه و کیفیت در ژل آگارز یک درصد و بافر TAE با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند و از نشانگر یک kb به عنوان استاندارد جهت تعیین اندازه قطعات تکثیر شده استفاده شد.

تعیین توالی نوکلئوتیدی و ترسیم درخت فیلوژنی: از بین قطعات تکثیرشده ویروس PVY جدایه‌های استان لرستان، یک جدایه انتخاب و جهت خالص‌سازی و نیز تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. ترادف توالی‌یابی شده قطعه مورد مطالعه در آغاز با برنامه Chromas, version 2.13 بازبینی شد و جهت تأیید به کمک ابزار Blastn با دیگر ترادف‌های ثبت شده از این ناحیه ژنومی در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. پس از تأیید صحت ویروس، به منظور مطالعه ناحیه ژنومی شامل بخشی از ژن CP و NIb ویروس PVY و تعیین جایگاه این جدایه ایرانی در مقایسه با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن، درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 و با دو روش Neighbor-Joining (NJ) و Maximum-Likelihood (ML) و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap رسم شد. به این منظور از توالی‌های ثبت شده مربوط به ناحیه ژنومی مورد مطالعه در بانک ژن که مربوط به میزبان‌های مختلف و مناطق جغرافیایی متفاوت بودند، جهت هم‌ردیف‌سازی استفاده شد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های ژنومی میان جدایه ایرانی با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن با استفاده از ابزار ClustalW در نرم‌افزار MEGA7 صورت گرفت. توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار (Open Reading Frame ORF finder Finder) به توالی‌های آمینواسیدی ترجمه شدند. همچنین جهت ثبت توالی موردنظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI و اختصاص شماره دسترسی از ابزار BankIt کمک گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایشات گلخانه‌ای: از بین ۱۳۵ نمونه گیاهی جمع‌آوری شده از مزارع سیب‌زمینی استان لرستان که علایم مشکوک به ویروس PVY را نشان می دادند (شکل ۱)، بیش از ۱۰۰ نمونه در مطالعات گلخانه‌ای مثبت ارزیابی شدند (جدول ۱).

شکل ۱- علایم مشکوک به ویروس PVY در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع سیب‌زمینی استان لرستان. الف) موزائیک و موجی شدن حاشیه بر، ب) موزائیک، زردی و تغییرشکل در برگ‌های جوان و کوتولگی.

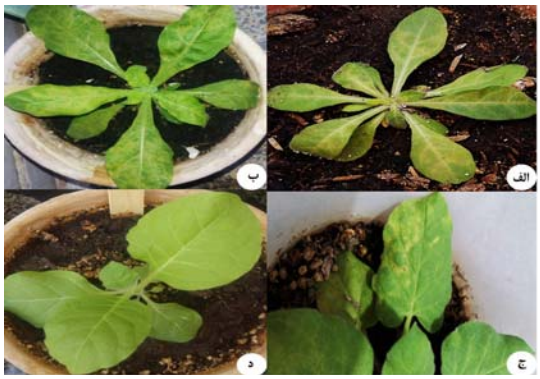
جدول ۱- تعداد و محل نمونه‌های سیب زمینی و میزان آلودگی آنها به PVY در استان لرستان در بهار و تابستان ۱۳۹۸

تعداد نمونه‌های آلوده	تعداد نمونه‌های مورد آزمایش	محصول	محل نمونه برداری
۳۳	۴۱	سیب‌زمینی	خرم آباد
۳۰	۳۹	سیب‌زمینی	بروجرد
۳۱	۴۰	سیب‌زمینی	الشتر
۱۱	۱۵	سیب‌زمینی	دورود

حدود یک هفته پس از مایه‌زنی مکانیکی ویروس PVY روی گیاهان محک *N.occidentalis* علایم موزائیک و رگبرگ‌روشنی ابتدا در برگ‌های مایه‌زنی شده و سپس به طور سیستمیک در کل گیاه ظاهر شد. همچنین با گذشت

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.2.12.8

زمان لکه‌های نکروتیک به صورت نقاط کوچک روی برگ‌ها پدیدار شد. علایم روی گیاه *N.glutinosa* بعد از حدود دو هفته به صورت موزائیک، لکه‌های نکروتیک و رگبرگ‌روشنی مشاهده شد. مایه‌زنی مکانیکی روی گیاه *N.debneyi* حتی پس از حدود یک ماه هیچ‌گونه علایمی ایجاد نکرد (شکل ۲).



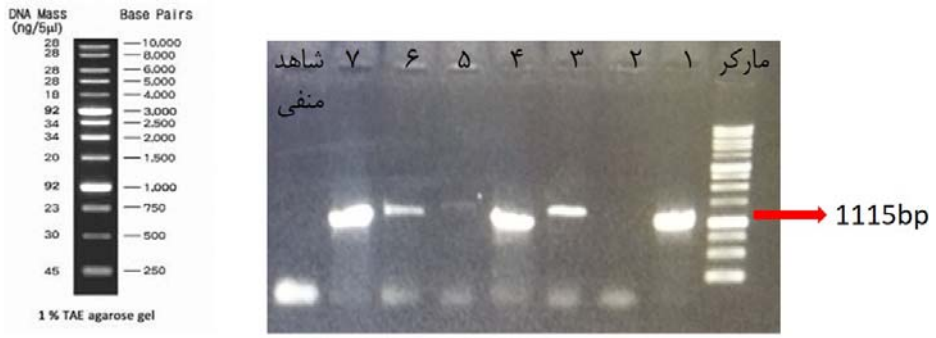
شکل ۲- علایم ایجاد شده روی گیاهان محک در گلخانه پس از مایه-زنی مکانیکی با ویروس PVY. الف) علایم سیستمیک رگبرگ روشنی و لکه‌های نکروتیک روی گیاه *N.occidentalis* سه هفته بعد از مایه-زنی. ب) علایم سیستمیک موزائیک و رگبرگ روشنی روی گیاه *N.occidentalis* دو هفته بعد از مایه‌زنی. ج) علایم موزائیک، نکروز، رگبرگ روشنی و تغییرشکل برگ روی گیاه *N.glutinosa* دو هفته بعد از مایه‌زنی. د) عدم ظهور علایم روی گیاه *N. debneyi* دو هفته بعد از مایه‌زنی.

علایم مزرعه‌ای و نتایج آزمایشات گلخانه‌ای در این پژوهش با نتایج به دست آمده از آزمایشات دیگر پژوهشگران روی این ویروس مطابقت دارد. قاسم زاده و همکاران (۱۳۹۱) نمونه‌هایی با علایم موزائیک، ابلقی، موجی شدن حاشیه برگ‌ها، کوتولگی، نکروز و مرگ گیاه را از مزارع سیب‌زمینی استان اردبیل گزارش نمودند. علایم ویروس PVY بر روی گیاه محک توتون بیشتر به‌صورت موزائیک و روشن شدن برگ‌ها بود (۵). در تحقیق گیلانی و همکاران (۱۳۹۵) در مزارع سیب‌زمینی علایم اولیه شامل نکروز، پیسک، زردی برگچه‌ها، ریزش برگ‌ها و در برخی موارد مرگ زودرس بوته‌های آلوده بود که به دلیل فاکتورهایی از قبیل واریته ویروس، رقم سیب‌زمینی، زمان آلودگی و شرایط محیطی بسیار متفاوت بود. نتایج حاصل از تلقیح ویروس روی گیاهان محک توتون نیز علایم کلروز و نکروز به‌صورت توأم بود (۶).

نتایج نسخه برداری معکوس، واکنش زنجیره ای پلیمراز و تعیین ترادف جدایه های ویروس: در واکنش RT-PCR، آغازگرهای اختصاصی قطعه‌ای به طول ۱۱۱۵ جفت باز از ناحیه ژنومی بخشی از ژن CP و NIb ویروس PVY را در نمونه‌های دارای علایم تکثیر نمودند(شکل ۳).

پس از توالی‌یابی قطعه تکثیر شده، هم‌ردیف‌سازی چندگانه (Multiple sequence alignment) توالی نوکلئوتیدی تعیین شده با استفاده از ابزار Blastn نشان داد که جدایه مورد بررسی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه مورد مطالعه کاملاً متعلق به ویروس PVY بوده و از قابلیت بررسی فیلوژنتیکی مناسبی با جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن برخوردار می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی قطعه موردنظر به شماره دسترسی MT655949 و با نام جدایه Lorestan در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید. جدایه مورد مطالعه به ترتیب دارای ۹۹/۴۸-۹۸/۷۴ و ۹۵/۴۴-۸۸/۸۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با دیگر توالی‌های ثبت شده در این ناحیه در NCBI بود. نتایج حاصل از مقایسه جدایه لرستان با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن، بالاترین درصد تشابه (۹۹/۴۸) در سطح نوکلئوتیدی بین جدایه لرستان و جدایه‌های ثبت شده از کشور آلمان (AM113988 وKY848023) را نشان داد. جهت تعیین روابط فیلوژنتیکی و مشخص نمودن منشاء تکاملی، درخت فیلوژنتیکی جدایه لرستان به همراه هفده جدایه دیگر از ویروس PVY موجود در بانک ژن از سایر نقاط دنیا (جدول ۲)، بر اساس تطابق ترادف نوکلئوتیدی با دو روش Neighbor–Joining و Maximum likelihood با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار رسم گردید.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.2.12.8



ب الف

شکل۳- الف) الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱٪ رنگ آمیزی شده با Safe Stain، از سمت راست، چاهک اول: مارکر 1kb، چاهک یک تا ۷ محصول PCR نمونه های آلوده به PVY سیب‌زمینی و تکثیر باند در محدوده bp ۱۱۱۵ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و چاهک آخر: شاهد منفی. ب) مارکر 1kb.

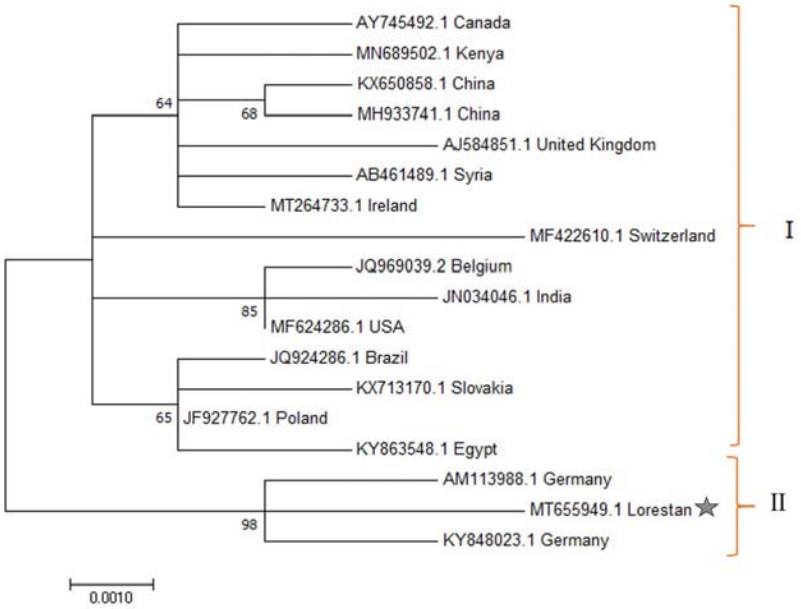
جدول ۲- ویژگی جدایه های PVY موجود در بانک اطلاعاتی ژن استفاده شده در تحلیل تبارزائی

Strain/Isolate	Accession number	Country	Host	Nucleotide identity (%)
Strain N-Wilga Isolate Pondo4-261-4	KY848023	Germany	Potato	99.48
Strain Wilga Isolate 261-4	AM113988	Germany	Potato	99.48
IUNG-14	JF927762	Poland	*Nicotiana tabacum cv.Samsun*	99.16
Isolate Oth15-41	MF624286	USA	Potato	99.06
Strain N-Wi	JQ924286	Brazil	Potato	99.06
Isolate P099	MT264733	Ireland	Potato	99.06
Isolate Bu3	AB461489	Syria	*Nicotiana tabacum cv. Samsun*	98.95
Isolate 18-1048	MN689502	Kenya	Potato	98.95
Isolate Xch-1	KX650858	China	*Nicotiana tabacum*	98.95
Isolate Harbin	MH933741	China	*Nicotiana tabacum*	98.95
Isolate SL16	KX713170	Slovakia	Tomato	98.95
Isolate Egypt11	KY863548	Egypt	Potato	98.95
Strain N Wi	JQ969039	Belgium	Potato	98.95
Isolate N:O-L56	AY745492	Canada	Potato	98.95
Strain N Isolate SASA.207	AJ584851	United Kingdom	Potato	98.85
Isolate Del-66	JN034046	India	Potato	98.85
Isolate CH	MF422610	Switzerland	Potato	98.74

نتایج نشان‌دهنده یکسان بودن توپولوژی دندروگرام رسم شده در هر دو روش NJ و ML بود. به همین دلیل تنها درخت فیلوژنتیکی رسم شده به روش NJ نمایش داده شد که بر اساس آن جدایه‌های مورد بررسی PVY در دو گروه اصلی (II وI) قرار می‌گیرند. گروه I با چهار زیرگروه شامل جدایه‌هایی از کشورهای کانادا، آمریکا، برزیل، کنیا، مصر، چین، سوریه و چندین کشور از اتحادیه اروپا نظیر انگلیس، سوئیس و لهستان می‌باشد. این گروه از نظر جغرافیایی یک گروه نامتجانس را تشکیل می‌دهد. همچنین جدایه‌های واقع در گروه I از میزبان‌های متفاوت مانند

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.2.12.8

سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و یا توتون جدا شده بودند. جدایه ردیابی شده از استان لرستان جدا شده از سیب‌زمینی در یک گروه مجزا (گروه II) و در کنار جدایه‌های مربوط به کشور آلمان (AM113988 و KY848023) جدا شده از میزبان سیب‌زمینی قرار گرفت که بیانگر رابطه ژنتیکی بالای این جدایه‌ها با یکدیگر می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر پایه مقایسه توالی بخشی از ناحیه ژن CP و NIb ویروس PVY به کمک نرم‌افزار Mega7 با روش Neighbor-Joining و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap.

با توجه به اینکه گروه I در برگیرنده جدایه‌هایی از سه میزبان سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و توتون می‌باشد، جدایی میزبانی با گروه‌بندی فیلوژنتیکی ایجاد شده همخوانی ندارد. همچنین هم‌گروه شدن برخی از جدایه‌ها از مناطق مختلف جهان با یکدیگر که انطباقی با قرابت جغرافیایی ندارند، نشان می‌دهد که انتشار گسترده و جهانی PVY نمی‌تواند تنها به وسیله ناقلین شته‌ای صورت گیرد و احتمال نقش صادرات و واردات این محصول در جهان از طریق بذر و غده تقویت می‌شود. در تحقیقی که توسط قاسم زاده و همکاران (۱۳۹۱) صورت گرفت از آغازگرهای عمومی جنس *Potyvirus* برای ردیابی استفاده شد و بخشی از منطقه ژنومی NIb به اندازه ۳۵۰ نوکلئوتید تعیین ترادف شد. نتایج بررسی آنها نشان داد که جدایه‌های استان اردبیل در بررسی تبارزایی در کنار جدایه‌هایی از آمریکا، کانادا، انگلیس، فرانسه و لهستان قرار گرفتند. در بیشتر گزارشات قبلی که بر اساس دیگر نواحی ژنومی ویروس PVY بود، جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های اروپایی هم‌گروه شدند که این شباهت را احتمالاً ناشی از انتقال بذر به داخل ایران از این مناطق می‌دانند (۳). بغدادی و همکاران (۱۳۹۴) با استفاده از آزمون RT-PCR و ترادف نوکلئوتیدی ژن CP و NIb، نژادهای ویروس PVY را در مزارع سیب‌زمینی استان گلستان ردیابی کردند. مقایسه نتایج ردیابی مولکولی نشان داد که بین جدایه‌های ایرانی و خارجی تفاوت ژنتیکی زیادی وجود داشت و ترسیم درخت فیلوژنی، جدایه‌های ایرانی را در کنار جدایه‌های برزیل قرار داد (۱).

حصول نتایج متفاوت در درخت‌های تبارزایی مربوط به جدایه های ایرانی ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) در این مطالعات نشان‌دهنده تفاوت جدایه‌ها در مناطق مختلف ایران است و احتمال افزایش وقوع نوترکیبی ژنتیکی در

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.2.12.8

بخش‌های مختلف ایران وجود دارد. نوترکیبی ژنتیکی نقش مهمی در تکامل ویروس‌ها دارد. احتمال دیگر برای تفاوت ژنتیکی جدایه‌های ایرانی می‌تواند ناشی از فشار انتخابی ارقام سیب‌زمینی کاشته شده در ایران باشد که به دلیل تفاوت این ارقام در کیفیت واکنش به ویروس، می‌توانند باعث ایجاد فشار انتخابی روی جمعیت ویروس، حذف برخی جدایه‌ها و تکامل و بقاء جدایه‌های دیگری شود (۲۱). در مطالعه حاضر نیز جدایه‌های گزارش شده از سایر نقاط ایران به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی و نیز عدم مطابقت کامل توالی مبتنی بر ناحیه ژنومی مورد مطالعه در جدایه لرستان با توالی دیگر جدایه‌های ایرانی، در ترسیم درخت فیلوژنتیکی و تجزیه و تحلیل همسانی و میزان شباهت استفاده نشدند.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از آغازگرهای اختصاصی و بررسی نواحی ژنومی توالی‌یابی شده، جدایه مورد بررسی متعلق به خانواده *Potyviridae*، جنس PVY و به احتمال زیاد نژاد Wilga می‌باشد. برای اطمینان بیشتر و قاطعیت در مورد نژاد ویروس باید نواحی بیشتری از ژنوم جدایه لرستان توالی‌یابی شود. در پژوهشی که در سال ۱۳۹۶ روی جدایه‌های استان خوزستان مربوط به ویروس PVY انجام شد، مشخص شد که جدایه‌های PVY ردیابی شده از کشتزارهای شلغم از نظر توالی ناحیه CP همسان جدایه-های کشورهای چین و سوریه متعلق به نژاد NTN و یا Wilgaمی‌باشند (۳). این اولین گزارش از ردیابی ویروس PVY در مزارع سیب‌زمینی استان لرستان بر اساس آزمایشات مولکولی و تعیین توالی نوکلئوتیدی مربوط به جدایه گزارش شده از این استان می‌باشد. ویروسهای گیاهی از عوامل محدود کننده در کشاورزی هستند و استفاده از ارقام مقاوم استراتژی مناسبی جهت مدیریت این عوامل می باشد. مقاومت وابسته به بیمارگر یکی از روشهای ایجاد ارقام مقاوم است که از بخشی از مواد ژنتیکی ویروس از جمله ژن CP و ژنهای دیگر استفاده می‌شود (۲ و ۴). جهت جلوگیری از خسارت ویروس، ردیابی ویروس از روی سایر میزبان‌های اقتصادی و علف-های هرز به عنوان منبع زمستان‌گذران و ردیابی و تعیین نژادهای ویروس پیشنهاد می‌شود.

منابع

۱- بغدادی، س. نصراله‌نژاد، س. نیشابوری، ف. بغدادی، م. ۱۳۹۴. تعیین نژادهای ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) با استفاده از آزمون اختصاصی RT-PCR در مزارع سیب‌زمینی استان گلستان. ژنتیک نوین ۱۰ (۳): ۴۲۹-۴۳۶.

۲- پاکباز، س. پژوهنده، م. عینی گندمانی، ا. سخندان، ن.۱۳۹۷. القای مقاومت به روش RNA Silencing نسبت به ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV). پژوهشهای سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران). ۳(۲):۱۵۰-۱۳۷.

۳- ذبیحی، ث. حسینی، س. حسینی، ا. ۱۳۹۶. بررسی سه جدایه ویروس Y سیب زمینی جداشده از استان خوزستان بر پایه ژن پروتیین پوششی. دو فصلنامه دانش گیاه پزشکی ایران، ۴۸ (۱): ۹۷-۱۰۷.

۴- رخشنده‌رو، ف. پالوکایتیس، پ. شمس‌بخشف م.۱۳۹۲. ناپایداری ساختارهای ساقه-حلقه در جلوگیری از بیان ژنهای مسئول مقاومت در برابر آلودگی‌های ویروسی در توتون‌های تراریخته. پژوهشهای سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران). ۲۶(۳):۴۱۵-۴۰۱.

۵- قاسم زاده، آ. سخندان بشیر، ن. خاک ور، ر.۱۳۹۱ ردیابی مولکولی ویروس Y سیب‌زمینی با استفاده از آغازگرهای عمومی در استان اردبیل. نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار، ۲۲(۲): ۷۸-۶۷.

۶- سیدی گیلانی، س. آ. نصراله‌نژاد، س. زینتی‌فخرآباد، ف. جعفری، م. ۱۳۹۵. ردیابی و تعیین نژادهای ویروس Y سیب‌زمینی در مناطق عمده کشت محصولات تیره سولاناسه در استان گلستان. پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی، ۵ (۲):۱۲-۱.

7- Beemster, A.B.R. and De Bokx J.A. 1987. Survey of properties and symptoms. In: De Boks J.A., and Van der Want J.P.H. (eds) Viruses of potato and seed potato production, 84-113, PUDOC, Wageningen The Netherlands. (https://phytopath.ca/wp/CPDS_Vol_67_No_2 (53). pdf) 25 March, 2017.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.2.12.8

8- Dietzgen, R.G., Mann, K.S. and Johnson, K.N. 2016. Plant virus–insect vector interactions: Current and potential future research directions. Viruses. 8:303.

9- Fanigliulo, A. Comes, S. Pacella, R. Harrach, B. Martin, D.P. and Crescenzi, A .2005. Characterisation of *Potato Virus Y* Nnp strain inducing veinal necrosis in pepper: a naturally occurring recombinant strain of PVY. Archives of Virology. 150: 709–720.

10 evidence that $PVYN^{W}$ and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^{O} and PVY^{N} isolates. Archives of Virology. 147: 363–378.

11- Glais, L. Chikh Ali, M. Karasev, A.V. Kutnjak, D. and Lacomme, C. 2017. Detection and Diagnosis of PVY. In: Lacomme, C. Glais, L. Bellstedt, D. Dupuis, B. Karasev A. V. and Jacquot, E. (eds) *Potato virus Y*: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58860-5_5.

12- Ha Cuong V. 2007. Detection and identification of Potyviruses and Geminiviruses in Vietnam. Ph.D. thesis. by Publication, Queensland University of Technology, Queensland.

13- Hosseini, A. Massumi, H. Heydarnejad, J. Hosseini Pour, A. and Varsani, A. 2011. Characterization of *Potato virus Y* isolates from Iran. Virus Genes. 42:128–140.

14- Hu, X. Nie, X. He, C. and Xiong, X. 2011. Differential pathogenicity of two different recombinant PVYNTN isolates in *Physalis florida* is likely determined by the coat protein gene. Virology Journal. 8:207.

15- Khelifa, M. 2019. Detection and Quantification of *Potato Virus Y* Genomes in Single Aphid Stylets. Plant Disease 103: 2315-2321.

16- Kogovšek, P. Gow, L. Pompe-Novak, L. Gruden, K. Foster, D. G. Boonham, N. and Ravnikar, M.2008.Single□step RT real□time PCR for sensitive detection and discrimination of *Potato Virus Y* isolates. Journal of Virological Methods149:1–11.

17- Lorenzen, J. Nolte, P. Martin, D. Pasche, J.S. and Gudmestad, N.C. 2008. NE-11 represents a new strain variant class of *Potato Virus Y*. Archives of Virology. 153(3):517-25.

18- Lorenzen, J.H. Piche, L.M. Gudmestad, N.C. Meacham, T. and Shiel, P. 2006. A multiplex PCR assay to characterize *Potato Virus Y* isolates and identify strain mixtures. Plant Disease 90: 935-94.

19- Nanayakkara, U.N. Singh, M. Pelletier, Y. and 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.

20- Pelletier, Y. Nie, X. Giguère, M.A. Nanayakkara, U. Maw, E. and Foottit, R. 2012. A new approach for the identification of aphid vectors (Hemiptera: Aphididae) of *Potato Virus Y***.** Journal of Economic Entomology. 105:1909-1914.https://doi.org/10.1603/EC12085.

21- Pourrahim, R. and Farzadfar, S. 2016. Population analysis of Iranian *Potato Virus Y* isolates using complete genome sequence. The Plant Pathology Journal. 32(1):33-46.

22- Rigotti, S. and Gugerli, P .2007. Rapid identification of potato virus Y strains by one – step triplex RT-PCR. Journal of Virological Methods. 140: 90-94.

23- Schubert, J. Fomitcheva, V. Wisniewska, J.S. 2007. Differentiation of *Potato Virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. Journal of Virological Methods. 140: 66-74.

24- 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.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.2.12.8

Detection and Determination of Biological and Phylogenetic Characteristics of *Potato Virus Y* (PVY) Isolate of Lorestan Province

Rahimi F.[1], Vafaei S.H.[1*] and Pakbaz S.[2]

[1] **Dept. of Plant Pathology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, I.R. of Iran.**

[2] **Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University. Khorramabad, I.R. of Iran.**

Abstract

Viral diseases are among the factors limiting potato production in the world. *Potato virus Y* (PVY; genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*) is one of the most important viruses infecting potato production. In order to detect the virus, plants with viral symptoms (135 samples) such as: mosaic, dwarf, wavy leaf margin, chlorotic spots and leaf malformation were collected from potato fields of different regions of Lorestan province. Infected plants extract was mechanically inoculated on indicator plants: *Nicotiana glutinosa*, *N. occidentalis* and *N. debneyi*. Ten days after inoculation, symptoms including local yellowing, vein clearing, mottling and mosaic on *N. occidentalis*, mottling and local necrotic on *N. glutinosa* were observed. Total RNA was extracted from positive indicator plants and cDNA synthesized with specific primers related to CP and NIb gene using RT-PCR. DNA fragments with the expected size of 1115 bp were obtained and PVY contamination was confirmed. Phylogenetic analysis showed that the studied isolate in this research had 98.74 to 99.48% genetic similarity with other recorded sequences in NCBI. The nucleotide sequence of PVY Lorestan isolate was aligned and compared with the related 17 isolates from NCBI. Results of phylogenetic analyses showed that PVY isolates were grouped in two clusters where the PVY Lorestan isolate was placed in cluster II with isolates from Germany which had belonged to Wilga strain. The determined nucleotide sequence in this study was implemented in NCBI with Accession No. MT655949. This is the first report of PVY contamination of potato fields in Lorestan province using the molecular tests.

Key words: Coat protein, Khorramabad, Potato, *Potyvirus*, Sequencing.