

## ردیابی و تعیین نژادهای ویروس وای سیب‌زمینی در مناطق عمده کشت محصولات تیره سولاناسه در استان گلستان

سیده آزاده سیدی کیلانی<sup>۱\*</sup>، سعید نصراله نژاد<sup>۲</sup>، فاطمه زینتی فخرآباد<sup>۳</sup> و مجید جعفری<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی زابل.

۴- استادیار گروه گیاهپزشکی مجتمع آموزش عالی سراوان.

\*مسئول مکاتبه [Azadehseyedii@yahoo.com](mailto:Azadehseyedii@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۴

### چکیده

ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y, PVY*) گونه شاخص جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* و یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده کشت محصولات سولاناسه در کشور می‌باشد. با توجه به اهمیت این ویروس در گیاهان تیره سولاناسه و نیز گستردگی تنوع کشت این محصولات در استان گلستان، شناسایی نوع نژادهای ویروس، تعیین دامنه‌ی میزبانی و تعیین میزبان‌های مختلف به منظور ارائه راهکارهای مدیریتی کنترل ویروس وای سیب‌زمینی از اهمیت برخوردار است. به منظور ردیابی، تعیین نژاد و دامنه‌ی میزبانی PVY در استان گلستان، تعداد ۳۸۰ نمونه از گیاهانی با علائم موزائیک، نکروز، پژمردگی، کوتولگی و ریزبرگی از مناطق مختلف گرگان، دلد، بندرگز و کردکوی در سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. آلودگی نمونه‌ها با آزمون الی‌ای مستقیم به وسیله آنتی‌سرم چند همسانه‌ای ویروس وای سیب‌زمینی ارزیابی شدند. سپس به منظور بررسی نژادهای مختلف ویروس، عصاره تعدادی از نمونه‌هایی که در آزمون الی‌ای مثبت ارزیابی شدند (۱۸۵ نمونه)، بر روی گیاه محک توتون رقم ساسون مایه‌زنی شدند. همچنین RNA ویروس از نمونه‌های گوجه‌فرنگی و بادمجان که در آزمون الی‌ای آلوده به PVY تشخیص داده شدند، استخراج و در آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی پوتی ویروس‌ها، Oligo1n و Oligo2n، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد سه نژاد  $PVY^C$ ،  $PVY^O$  و  $PVY^N$  در خانواده سولاناسه در استان گلستان وجود دارد و  $PVY^C$  نژاد غالب است. این اولین گزارش از وجود ویروس وای سیب‌زمینی بر روی میزبان‌های گوجه‌فرنگی و بادمجان با استفاده از روش‌های سرولوژیک و مولکولی در استان گلستان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: الی‌ای مستقیم، دامنه میزبانی، ویروس وای سیب‌زمینی، RT-PCR.

### مقدمه

گونه پیشنهادی بوده است (گاواند و همکاران ۲۰۱۱). اعضای این جنس دارای ویروس‌های با ذرات میله‌ای قابل انعطاف به طول ۶۸۰-۹۰۰ نانومتر و عرض ۱۱ نانومتر و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای‌اند که در حدود ۱۰Kb طول دارند و توسط حدوداً ۲۰۰۰ کپی از واحد

یکی از جنس‌های مهم خانواده *Potyviridae*، جنس *Potyvirus* می‌باشد که بیشترین تعداد و مهم‌ترین ویروس‌ها را در برمی‌گیرد (یان و همکاران ۲۰۰۲). این جنس تا سال ۱۳۹۱ دارای حداقل ۹۱ گونه قطعی و ۸۸

آذربایجان شرقی، اردبیل و خراسان به ترتیب ۳۲،۵۲،۳۸،۱۵ و ۵۷ درصد برآورد شده است (پوررحیم و همکاران ۱۳۸۱). اولین گزارش از وجود PVY در استان گلستان مربوط به توتون کاری‌های منطقه قرق و فاضل آباد استان گلستان بود که در تیرتاش بهشهر بر روی توتون مورد ارزیابی قرار گرفت (عابدی ۱۹۹۸). زینتی فخرآباد و نصراله نژاد (۱۳۹۰) پراکنش PVY را در مزارع سیبزمینی این استان به روش الیزا و به وسیله آنتی سرم پلی کلونال مورد بررسی قرار دادند و مشخص گردید که ۶۰٪ نمونه‌ها آلوده به ویروس فوق بودند.

با توجه به گسترده‌گی دامنه کشت محصولات مختلف تیره سولاناسه در استان گلستان و نبود اطلاعات دقیق در زمینه تعیین نژادها و دامنه میزبانی PVY در استان، تحقیق فوق جهت شناسایی ویروس، افتراق و تعیین فراوانی نژادهای این ویروس و همچنین رابطه بین دما و رطوبت با شدت بیماری در مناطق عمده کشت محصولات سولاناسه مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری و جمع‌آوری نمونه‌ها

برای تعیین فراوانی ویروس در این منطقه نمونه-برداری تصادفی (تعداد ۳۸۰ نمونه) در طول فصل زراعی از خرداد تا شهریور ماه سال ۱۳۹۳ از مزارع مختلف سیبزمینی، توتون، گوجه فرنگی، بادمجان و فلفل مناطق مختلف استان گلستان شامل گرگان، دلند، بندرگز (خطیرآباد، سرکلته، باغونکاره و ..) و کرکوی صورت گرفت. برای انتخاب نمونه‌های مشکوک به آلودگی، علائمی که در منابع مختلف برای ویروس Y سیبزمینی ذکر شده است مدنظر قرار گرفت که از جمله آنها می‌توان به علائم زردی، چین‌دار شدن حاشیه برگ و سطح برگ، لکه‌های نکروزه و افتادگی برگ، کوتولگی بوته، موزائیک و پیسک سطح برگ اشاره کرد. با توجه به هدف تحقیق، مبنی بر تعیین نژادهای ویروس Y سیبزمینی، غالباً

پوشش پروتئینی (CP) احاطه شده‌اند (دبکس و هاتینگا ۱۹۸۱). در انتهای سه ژنوم دارای دنباله پلی A و در انتهای پنج ژنوم به پروتئین VPg متصل است (دوگرتی و هیبرت ۱۹۸۰، کوینترو-فرر و کاراسو ۲۰۱۳). شته‌ی سبز هلو یکی از مهم‌ترین ناقلین ویروس وای سیبزمینی می‌باشد (کاناواکی و همکاران ۲۰۰۶). آلودگی استایلت شته باعث انتقال سریع این ویروس می‌شود (هام و همکاران، ۲۰۰۹). علائم مزمن بیماری توسط این ویروس در اکثر میزبان‌ها شامل موزائیک، ابلقی کلروتیک، چین خوردگی شدید و کوتولگی متوسط تا شدید و مرگ زود هنگام گیاه است (یان و همکاران ۲۰۰۲).

در طیف میزبانی ویروس Y سیبزمینی، محصولات مهمی مانند فلفل، سیبزمینی، تنباکو، گوجه‌فرنگی و همچنین گیاهانی با اهمیت کمتر مثل گونه‌هایی از علف-های هرز در تیره سولاناسه دیده می‌شود (کرلان و موری ۲۰۰۸). PVY در توتون و دیگر گیاهان زراعی انتشار جهانی دارد و از لحاظ اقتصادی یکی از مهم‌ترین ویروس‌های سیبزمینی است. این ویروس در طبیعت به صورت گروه‌های استرینی پیچیده‌ای وجود دارد (کاراسو و همکاران ۲۰۰۹). علائم ایجاد شده توسط ویروس Y سیبزمینی به شدت متغیر است و بر اساس نوع علائم و تست‌های سرولوژیک سه گروه از نژادهای آن  $PVY^O$ ،  $PVY^N$  و  $PVY^C$  مشخص شده‌اند. علائم PVY بسته به نژاد ویروس، رقم میزبان و شرایط آب و هوایی چه عفونت اولیه باشد (تلقیح توسط شته) و چه عفونت ثانویه باشد (بذر آلوده) فرق دارد (دراپر و همکاران ۲۰۰۲). عموماً سنجش‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی برای شناسایی PVY بکار می‌رود (گاواند و همکاران ۲۰۱۱، مالیک و همکاران ۲۰۱۲ و سینگ و همکاران ۲۰۱۳).

در زمینه پراکنش میزبانی و نوع علائم اختصاصی ایجاد شده این ویروس در کشور اطلاعات محدودی وجود دارد، اما فراوانی این ویروس در اصفهان،

یک تیمار به عنوان شاهد منفی که به جای عصاره ویروس از بافر فسفات برای مایه‌زنی رقم حساس استفاده شد، در نظر گرفته شد. ارزیابی بوته‌ها تا ۴-۵ هفته انجام گرفته و علائم طبق روش ویرر و همکاران (۲۰۰۱) و بر اساس شاخص علائم: گیاه سالم (صفر)، موزاییک خفیف (۱)، موزاییک (۳)، موزاییک شدید (۵)، یک تا دو برگ دارای رگبرگ‌های نکروتیک (۷)، سه تا پنج برگ دارای رگبرگ‌های نکروتیک (۹) و نکروز ساقه (۱۱) ثبت شدند.

#### آزمایش سرولوژیک با آنتی سرم مونوکلونال

به منظور بررسی میزان آلودگی به نژادهای مختلف PVY، تعداد ۲۱ عدد گیاه توتون رقم سامسون در شرایط گلخانه نگهداری شدند. در مرحله چهارم برگ با استفاده از نمونه ویروس جدا شده از گوجه‌فرنگی تلقیح صورت گرفت و پس از یک هفته علائم مشاهده شد. بیشترین علائم مشاهده شده در گیاه محک به ترتیب کلروز و نکروز بود. سپس گیاهان محک به منظور تعیین میزان جذب نوری در آزمون الایزا بررسی شدند. برای تعیین نژادهای مختلف ویروس از سه آنتی‌سرم مونوکلونال  $PVY^N$ ،  $PVY^C$  و  $PVY^O$  و هر آنتی‌سرم در هفت تکرار استفاده شد. اعداد بدست آمده از دستگاه قرائت کننده الایزا با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفت.

#### استخراج RNA ویروس

بعد از شناسایی نمونه‌های آلوده به PVY، تعداد دو نمونه از گوجه‌فرنگی و بادمجان که بیشترین غلظت ویروس را در آزمون الایزا دارا بودند انتخاب و از آن‌ها جهت استخراج RNA استفاده شد. RNA این نمونه‌ها با استفاده از کیت mRNA capture (Roche) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و پس از انجام واکنش RT و ساخت cDNA، جهت تکثیر، واکنش PCR انجام شد.

سطح نسبتاً وسیعی از هر مزرعه مورد کاوش قرار گرفت و نمونه‌های مشکوک به آزمایشگاه منتقل شدند.

#### آزمون الایزا

جهت بررسی وجود آلودگی‌های ویروسی در نمونه‌ها، آزمون الایزا براساس روش توصیفی کلارک و آدامز (۱۹۷۷) بوسیله آنتی سرم پلی کلونال انجام گرفت. چاهک‌هایی که در آزمون الایزای مستقیم با آنتی‌سرم پلی کلونال مثبت بودند و میزان جذب بالایی داشتند، برای آزمون سرولوژیک با آنتی‌سرم مونوکلونال به منظور تعیین نژاد ویروس Y سیب‌زمینی انتخاب شدند. همچنین نمونه‌هایی از گوجه‌فرنگی و بادمجان که در این آزمون واکنش مثبت نشان دادند برای انجام آزمون PCR انتخاب شدند.

#### مطالعات گلخانه‌ای

در این تحقیق به منظور تعیین علائم روی گیاهان محک توتون *Nicotiana tabacum cv. Samsun* آزمایشی در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تیمار و هفت تکرار در شرایط گلخانه با دمای ۲۵-۱۶ درجه‌ی سانتیگراد انجام شد. بدین ترتیب که در هر تکرار دو بوته در داخل گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک، ماسه و پیت موس به نسبت‌های ۱:۱:۲ کاشته شد. سپس در مرحله چهارم برگ، بوته‌ها به صورت مکانیکی توسط عصاره حاصل از نمونه‌هایی با میزان جذب بالای ویروس در میزبان‌های مختلف بر روی گیاهان توتون مایه‌زنی شدند. بوته‌ها پس از مایه‌زنی در گلخانه نگهداری شدند. برای تهیه زادمایه، عصاره برگ‌های میزبان‌های آلوده به ویروس فوق، در هاون چینی در بافر فسفات تهیه و سوسپانسیونی به نسبت وزنی/حجمی ۱:۱ تهیه شد. برگ‌های کلون‌های آزمایشی با پودر کربوراندوم mesh ۶۰۰ جهت ایجاد خراش، گردپاشی شد و با مالش دادن ۲-۳ برگچه از هر گیاه با پارچه مملو آغشته به سوسپانسیون، مایه‌زنی انجام شد. برای اطمینان ۴۸ ساعت بعد مجدداً مایه‌زنی تکرار شد. در آزمایش فوق

کردن ۲/۵ میکرولیتر از بافر Taq DNA polymerase (10x)، ۱ میکرولیتر از  $MgCl_2$  (50mM)، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP (10mM)، از هر جفت آغازگر (Forward, Reverse) هرکدام به مقدار یک میکرولیتر، Taq DNA polymerase (Cinagene) با غلظت ۲۵۰ واحد به مقدار ۰/۵ میکرولیتر و cDNA به مقدار دو میکرولیتر تهیه شد.

### واکنش PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای DNA مکمل (cDNA) حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از آغازگر عمومی Oligo1n و Oligo2n (جدول ۱) انجام گرفت. واکنش PCR با مخلوط

جدول ۱- نام، ترادف، دمای اتصال و اندازه قطعه تولید شده مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در آزمون RT-PCR

نام آغازگر	توالی از ۵ به ۳	جهت	اندازه محصول تکثیر شده PCR	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	منبع
(Oligon2 و Oligon1)	5'-ATGGTTTGGTGCATTGAGAATGG-3'	Forward	۳۲۷	۵۵	Marie-Jeanne et al. 2002
عمومی	5'-CAGATGAAGGCCGAGCA-3'	Reverse			

محصول حاصل از RT-PCR در ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE با استفاده از الکتروفورز تفکیک گردید.

### نتایج و بحث

از بین ۳۸۰ نمونه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان گلستان، ۱۸۵ نمونه در آزمون الیزا آلودگی به PVY را نشان دادند. این موضوع بیانگر پراکنش وسیع این ویروس به ویژه در گرگان و دلند می‌باشد (جدول ۲). همچنین از بین میزبان‌های مختلف، سیب‌زمینی، توتون و گوجه‌فرنگی بیشترین میزان آلودگی را داشتند (جدول ۳). با توجه به کشت وسیع محصولات سولاناسه در استان گلستان و در مجاورت یکدیگر، و نیز میزان قابل توجه آلودگی به این ویروس در علف‌های هرز تیره سولاناسه، در صورت عدم کنترل این بیماری، می‌توان افزایش آلودگی مزارع را طی سال‌های آینده پیش‌بینی کرد.

در دستگاه PCR پروفیل حرارتی به شکل زیر برنامه‌ریزی شد: ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه، ۲۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بمدت یک دقیقه، اتصال بمدت یک دقیقه در دمای مناسب آغازگرها در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بمدت یک دقیقه و به علاوه یک چرخه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بمدت ۱۵ دقیقه جهت نشر قطعات ناتمام مورد استفاده قرار گرفت. در تمام برنامه‌های سیکل پایانی واکنش پس از مرحله گسترش نهایی در هشت درجه‌ی سانتی‌گراد با زمان نامحدود تنظیم گردید که برای حفظ محصول PCR است.

### ارزیابی الکتروفورز

جدول ۲- مناطق نمونه‌برداری و درصد آلودگی گیاهان خانواده سولاناسه به PVY در هر منطقه.

منطقه	تعداد کل نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های آلوده	درصد آلودگی
-------	-------------------	-----------------------	-------------

۶۰	۷۲	۱۲۰	گرگان
۵۴	۵۴	۱۰۰	دلند
۴۲	۳۶	۸۵	بندرگز
۳۰	۲۳	۷۵	کردکوی
۴۸	۱۸۵	۳۸۰	کل

جدول ۳- درصد آلودگی به PVY در میزبان‌های مختلف.

درصد آلودگی	تعداد نمونه آلوده	تعداد کل نمونه‌ها	نوع میزبان
۵۵	۵۵	۱۰۰	سیب زمینی
۵۲	۳۱	۶۰	توتون
۵۰	۳۵	۷۰	گوجه فرنگی
۴۸	۲۴	۵۰	فلفل
۴۵	۲۲	۵۰	بادمجان
۴۰	۱۰	۲۵	عروسک پشت پرده
۳۲	۸	۲۵	تاجریزی

و بر اساس میانگین جذب نوری در تیمارهای مختلف (نژادهای مختلف) در سه گروه متفاوت قرار می‌گیرند (جدول شماره ۵). نتایج حاصل از تلقیح روی گیاهان محک نشان می‌دهد که از بین ۲۱ عدد گیاه محک، تعداد ۹ عدد علائم کلروز و نکروز به صورت توأم، ۷ عدد علائم کلروز و پنج عدد علائم نکروز نشان دادند (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس، علائم مشاهده شده را تأیید می‌کند.

طبق نتایج بدست آمده از تحلیل آماری داده‌ها در مورد آزمایشات مونوکلونال می‌توان گفت نژادهای غالب در استان به ترتیب، نژادهای C و N می‌باشند. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمون الایزا در جدول ۴

آمده است. آنالیز نتایج حاصل از آزمون تست افتراقی نشان می‌دهد که تعداد نمونه‌های آلوده به نژاد PVY<sup>C</sup> تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های آلوده به نژاد PVY<sup>N</sup> دارد

جدول ۴- تجزیه واریانس میزان جذب نوری در آزمون الایزا با استفاده از آنتی‌سرم‌های مونوکلونال

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۲	۴/۷۵**

تکرار	۶	۰/۱۵۲
خطا	۱۲	۰/۰۳۸
کل	۲۰	

ضریب تغییرات = ۱۲، \*\* معنی دار در سطح آماری ۱ درصد

جدول ۵- مقایسه میانگین جذب نوری در آزمون الایزا (OD) با استفاده از آنتی سرم‌های مونوکلونال

میانگین جذب نوری در آزمون الایزا (OD)	آنتی سرم‌های مونوکلونال استفاده شده در آزمون الایزا
۲/۵۳۱۱ <sup>a</sup>	نژاد PVY <sup>C</sup>
۱/۴۰۲۳ <sup>b</sup>	نژاد PVY <sup>N</sup>
۰/۹۲۸۴ <sup>c</sup>	نژاد PVY <sup>O</sup>



ب: PVY<sup>N</sup> - نکروز



الف: PVY<sup>C</sup> - کلروز

شکل ۱- علائم نژادهای غالب PVY در استان روی توتون رقم سامسون

(جدول ۷). طبق نتایج بدست آمده می‌توان گفت شدت بیماری با میزان رطوبت نسبی نسبت عکس دارد و افزایش رطوبت نسبی باعث کاهش آلودگی به PVY می‌شود. اما میزان شدت بیماری با دما ارتباط معنی داری نداشت. علت این امر یکسان بودن میانگین دما در نقاط مختلف طی ماه-های نمونه برداری می‌باشد. بدین ترتیب با توجه به اینکه گفته می‌شود خسارت ایجاد شده توسط برخی از ویروس-های گیاهی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری بیشتر است (شارما و میسرا ۲۰۱۱). تأثیر دما بر شدت آلودگی مزارع به PVY نیازمند بررسی بیشتر طی زمان طولانی می‌باشد.

نتایج بدست آمده از تجزیه آماری داده‌ها در مورد شدت بیماری در مناطق مختلف نمونه برداری در جدول ۶ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که شدت بیماری در مناطق مختلف استان گلستان با یکدیگر تفاوت معنی داری دارد. به این ترتیب مناطق مختلف در چهار گروه آماری، از نظر شدت بیماری قرار گرفتند. در این رابطه گرگان و دلد به ترتیب بیشترین شدت آلودگی را نشان دادند. همچنین از نظر رابطه شدت بیماری با دما و رطوبت، مناطق به دو گروه آماری تقسیم شد. دو منطقه گرگان و دلد با میانگین رطوبت نسبی ۵۸ درصد طی ماه‌های نمونه برداری، در یک گروه، و در گروه دیگر بندرگز و کردکوی با میانگین رطوبت نسبی ۶۸ درصد قرار گرفتند

جدول ۶- تجزیه واریانس شدت بیماری PVY در مناطق مختلف نمونه برداری

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۶۱۵۸۸**
تکرار	۹	۱۵۷۷۰
خطا	۲۷	۱۰۱۶۴۸
کل	۳۹	

ضریب تغییرات = ۲۶/۹۵، \*\* معنی دار در سطح آماری ۱ درصد

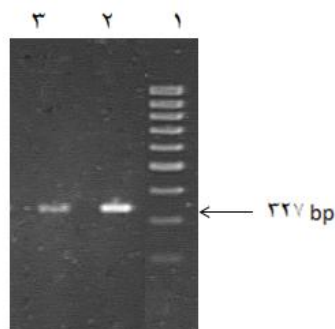
جدول ۷- مقایسه میانگین جذب نوری در آزمون الیزا (OD) با توجه به مناطق مختلف و رطوبت نسبی در هر منطقه

تیمار (مناطق نمونه برداری)	میانگین رطوبت نسبی (درصد)	میانگین جذب نوری در الیزا (OD)	میانگین جذب نوری با توجه به مقادیر مختلف رطوبت نسبی
گرگان	۵۸/۲	۳۲۵ <sup>a</sup>	۲۸۹ <sup>a</sup>
دلند	۵۸/۸	۲۵۴ <sup>ab</sup>	۲۸۹/۲ <sup>a</sup>
بندر گز	۶۷/۷	۱۸۶ <sup>bc</sup>	۱۶۶ <sup>b</sup>
کردکوی	۶۸	۱۴۶ <sup>c</sup>	۱۶۶/۸ <sup>b</sup>

میانگین‌ها با حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی داری ندارند.

آلودگی نمونه‌های گوجه‌فرنگی و بادمجان است و این اولین گزارش از آلودگی گوجه‌فرنگی و بادمجان به ویروس PVY در استان گلستان می‌باشد.

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی پوتی ویروس‌ها (Oligon1 , Oligon2)، قطعه‌هایی به طول ۲۲۷ جفت باز تکثیر نمود (شکل ۲) که این امر نشان‌دهنده



شکل ۲- الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱٪/رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، راهک ۱: مارکر DNA، راهک ۲:

محصول PCR از نمونه‌های آلوده به PVY بادمجان و راهک ۳: محصول PCR از نمونه‌های آلوده به PVY گوجه‌فرنگی و تکثیر باند

در محدوده bp ۳۲۷ با استفاده از پرایمرهای عمومی پوتی ویروس‌ها

یا علائم خط و نقطه (دبوکس و هاتینگا ۱۹۸۱) و نیز نکروز سرشاخه و زخم‌های نکروتیک فراوان در سطح برگ ایجاد می‌کند (باودن ۱۹۶۳). نژاد PVY<sup>O</sup> معمول‌ترین نژاد ویروس Y سیب‌زمینی است. این نژاد به راحتی توسط شته منتقل می‌شود و هم اکنون به طور وسیعی در سراسر جهان و ایران انتشار یافته است (گلیس و همکاران ۲۰۰۲، چاکولسکا و همکاران ۱۹۹۷). از نظر علائم در توتون از نژاد C غیرقابل تفکیک می‌باشد و مانند آن موزائیک و پیسک ایجاد می‌کند ولی در سیب‌زمینی علائم ناشی از بیماری بسته به نژاد ویروس، رقم سیب‌زمینی، زمان آلودگی و شرایط محیطی بسیار متفاوت است. علائم اولیه شامل نکروز، پیسک، زردی برگچه‌ها، ریزش برگ‌ها و در برخی موارد مرگ زودرس بوته‌های آلوده می‌باشد. گیاهانی که دارای آلودگی ثانویه می‌باشند، کوتوله مانده و برگ‌ها دارای حالت پیسک و پیچیدگی با حاشیه چین‌دار هستند (بلانکو و همکاران ۱۹۹۸).

اولین گزارش از PVY در ایران در منطقه قرق و فاضل‌آباد استان گلستان بود که در تیرتاش بهشهر بر روی توتون مورد ارزیابی قرار گرفت در این بررسی عکس العمل ارقام مختلف توتون به ویروس نشان داده شد. بر این اساس ارقام K326، Burley21 و Coker374 علائم موزائیک، ارقام VAM، K326 و Tirtache30 علائم نکروز و ارقام K326، Tirtache30 و Burley21 و Coker374 هر دو علائم موزائیک و نکروز را نشان داده و حساس می‌باشند (عابدی ۱۹۹۸). طوسی (۱۳۸۸) بیان کرد میزان شیوع PVY در مناطقی با آب و هوای سرد از جمله مناطق دماوند و فیروزکوه استان تهران کمتر می‌باشد. از طرفی پراکنش نژاد PVY<sup>O</sup> که نژاد بسیار خطرناکی برای سیب‌زمینی است در استان‌های

ویروس Y سیب‌زمینی اولین بار روی سیب‌زمینی در سال ۱۹۳۱ شناخته شد (اسمیت ۱۹۳۱). کریمی (۱۳۴۵) ویروس Y سیب‌زمینی را همراه با چند ویروس دیگر از روی علائم شناسایی و گزارش نمود. این ویروس بسیاری از گونه‌های تیره سولاناسه را آلوده می‌کند که در این میان محصولاتی چون سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل و توتون اهمیت بیشتری را دارا می‌باشند (موراوک و همکاران ۲۰۰۳). به علاوه بیش از ۶۰ گونه گیاهی مختلف دیگر از این تیره و تعدادی از گونه‌های گیاهی تیره‌های Chenopodiaceae، Amarantaceae، Leguminosae و Comopaceae نیز میزبان این ویروس می‌باشند (مرتضوی بک ۱۳۷۷).

از جمله روش‌هایی که در شناسایی نژادهای این ویروس به کار رفته‌اند روش‌های بیولوژیک با استفاده از گیاهان افتراقی، روش‌های سرولوژیکی مثل الیزا و روش‌های مولکولی مثل RT-PCR می‌باشد (گلیس و همکاران ۲۰۰۲). به طور کلی سه نژاد برای این ویروس توصیف شده است که هرکدام علائم متفاوتی را ایجاد می‌نمایند (دبوکس و هاتینگا ۱۹۸۱). نژاد PVY<sup>N</sup> برای اولین بار در سال ۱۹۳۵ در یک گیاه توتون که نزدیک بوته‌های سیب‌زمینی آزمایشی رشد کرده بود، شناسایی شد که نکروز رگبرگی شدید در توتون ایجاد می‌کرد (اسمیت و دنیس ۱۹۴۰). این نژاد قادر به تولید علائم مشخصی در سیب‌زمینی نبوده و فقط گاهی در اواخر فصل باعث پیسک (mottle) خفیف در برگ‌ها می‌گردد، در حالی که در توتون نکروز رگبرگی ایجاد می‌کند و سبب خسارت شدیدی شده و حتی گاهی تا صد درصد محصول را از بین می‌برد (بونهام و همکاران ۲۰۰۲). نژاد PVY<sup>C</sup> در روی توتون موزائیک سیستمیک یا پیسک تولید نموده و در روی سیب‌زمینی موزائیک سیستمیک و



گیاهان محک هستند برای تشخیص و سنجش PVY روش مطمئنی به حساب می آید بدین ترتیب راه تشخیص PVY از دیگر ویروس روش کاربردی شناسایی شده است (دبوکس و هاتینگ ۱۹۸۱). شدت علائم به سن گیاه بستگی دارد که در این میان گیاهان جوان بسیار حساس و آسیب پذیرتر بودند (زیتفر ۱۹۷۲). از طرفی علائم در فلفل با کاهش دما و بروز سرما تقویت می شوند (ون در پابلن و ناگایی ۱۹۷۳). در مطالعه ای که صادقی و همکاران (۲۰۰۸) در استان بوشهر بر روی بادمجان انجام دادند مشخص شد علائم موزائیک روی بادمجان بدلیل وجود PVY<sup>NP</sup> بوده است. PVY<sup>o</sup> بر روی گیاه فوق تولید مائل نمود و براساس اسید آمینه پوشش پروتئینی و ترتیب 3'-UTR مکان PVY-Eg در درون زیرگروه PVY<sup>NP</sup> قرار گرفت. این اولین گزارش از تشخیص نژاد PVY<sup>NP</sup> آلوده کننده بادمجان در ایران است.

زنجان، چهارمحال و بختیاری، همدان و تهران بیشتر بوده در حالی که نژاد PVY<sup>N</sup> در استان اصفهان و چهارمحال- و بختیاری شیوع بیشتری دارد. در بررسی که معصومی و همکاران (۲۰۰۹) در شناسایی ویروس های گوجه فرنگی در استان های مرکزی ایران نشان دادند میزان پراکنش PVY ۵ درصد است که این اولین گزارش از PVY روی گوجه فرنگی در ایران بود. مصطفایی و همکاران (۲۰۰۶) PVY را از مزارع فلفل استان تهران با علائم زردی و نکروز رگبرگی بوسیله آزمون (DAS-ELISA) جداسازی کردند که این اولین گزارش از PVY در مزارع فلفل در ایران بود. در گیاهان آلوده به PVY رگبرگ و برگ نکروزه شده و در نهایت در بسیاری مواقع به همراه نکروز ساقه برگ ریزی و یا مرگ یکنواخت در گیاه اتفاق می افتد (سیموندس و هاریسون ۱۹۵۹) اما علائم ویژه ای معمولاً بر روی میوه ها مشاهده نمی شود. علائم بر روی گیاه فلفل می تواند به استرین و واریته های آن بستگی داشته باشد در حالی که علائمی که بر روی

#### منابع

- پوررحیم ر، فرزادفرش و گلنراقی ع، ۱۳۸۱. مبانی ویروس شناسی گیاهی (ترجمه). شرکت سامان پیشه گر. ۴۵۷ صفحه.
- جعفری م و ولی زاده ج، ۱۳۹۰. رده بندی ویروس های گیاهی. انتشارات دانشگاه سیستان و بلوچستان. ۲۸۹ صفحه.
- زینتی فخرآباد و نصرالله نژاد س، ۱۳۹۰. گزارش شناسایی ویروس وای سیب زمینی از مزارع سیب زمینی استان گلستان. همایش ملی مدیریت کشاورزی. جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم. صفحه ۱۲۵.
- طوسی ن، ۱۳۸۸. شناسایی نژادهای ویروس وای سیب زمینی بروش مولکولی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه صنعتی اصفهان.
- کریمی ع ر، ۱۳۴۵. بیماری های ویروسی سیب زمینی در ایران. نشریه ی بیماری های گیاهی، جلد ۳. شماره ۲، صفحه- های ۲۳ تا ۳۲.
- مرتضوی بک ا، ۱۳۷۷. سیب زمینی و یافته های تحقیقاتی آن در استان اصفهان. سری نشریه های ترویجی تحقیقی، کتاب دوم، سازمان ترویج و تحقیق اصفهان.

Abedi H, 1998. Appearance of PVY in tobacco fields of Iran (Regions of Mazandaran and Gorgan). Coresta, Brighton Congress. Page 24.

Bawden FC, 1963. The viruses causing top necrosis (acronecrosis) of the potato. Annals of Applied Biology 23: 487-497.

- Blanco-Urgoiti, B, Sanchez F, Perez d, Roman Dopazo J and Ponz F, 1998. *Potato virus Y* group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic straine. *Journal General Virology* 79: 2037-2042.
- Boonham N, Walsh K, Hims M, Preston S, North J and Barker I, 2002. Biological and sequence comparisons of *Potato virus Y* isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. *Plant Pathology Journal* 51: 7-126.
- Chachulska AM, Fakhfakh H, Robaglia C, Granier F, Zagorski W and Vilaine F, 1997. Synthesis of full-length potyvirus cDNA copies suitable for the analysis of genome polymorphism. *Journal Virology Methods* 67: 89-197.
- Clark MF and Adams AN, 1977.Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Dougherty WG and Hiebert E, 1980. Translation of virus RNA in a rabbit reliculocyte lysate: cell free translation strategy and a genetics map of the potyviral genome. *Virology Journal* 104: 183-194.
- De Bokx JA and Huttinga H, 1981. *Potato Virus Y*, CMI/AAB descriptions of plant viruses, N. 242.
- Draper MD, Pasche JS and Gudmestad NC, 2002.Factors influencing PVY development and disease.expression in three potato cultivars. *Journal of Potato Research* 79: 155-165.
- Gawande SJ, Shukla A, Chimote VP, Kaushal N, Kaundal P, Garg ID and Chimote K.P, 2011. Development of PCR-based techniques for the detection of immobilized *Potato Virus Y* Virions. *Journal Plant Pathology* 93: 127-132.
- Glais L, Kerlan C and Robaglia C, 2002.Variability and evolution of *potato virus Y*, the type species of the potyvirus genus. Pp. 225-251 In: An J and Dijkstra J, (ed.s) *Plant Viruses as Molecular Pathogens*. New York and London: Oxford Press.
- Hamm PB, Hane DC, Pavek MJ, Leroux LD, Gieck SL and David NL, 2009. Potato Cultivars Differ in Current Season *Potato Virus Y* (PVY) Infection. *Am. Journal Potato Research* 87: 19–26.
- Hosseini A, Massumi, H, Heydarnejad, J, Hosseini Pour A, and Varsani A, 2011.Characterisation of *Potato virus Y* isolates from Iran. *Virus Genes* 42: 128–140.
- Kanavaki OM, Margaritopoulos JT, KatisNI, SkourasP and Tsitsipis JA, 2006. Transmission of *Potato virus Y* in tobacco plants by *Myzus persicae nicotianae* and *M. persicaes*.str. *Plant Disease Journal* 90: 777-782.
- Karasev A, Nikolaeva OV, Hu X, Sielaff Z, Lorenzen JH, Whitworth J, Lorenzen JH and Gray SM, 2009. Serological Properties of Ordinary and Necrotic Isolates of *Potato virus Y*: A Case Study of PVY<sup>N</sup> Misidentification. *Am. Journal Potato Research* 87: 1–9.
- Kerlan C and Moury B, 2008.*Encyclopedia of Virology*. Third Edition, Academic Press. USA. Pp. 287-296.
- Mallik I, Anderson NR and Gudmestad NC, 2012.Detection and Differentiation of *Potato virus Y* strain from using Immunocapture Multiplex RT- PCR. *Journal Potato Research* 89: 184-191.
- Marei-Jeanne V, Loos R, Peyre J, Alliot B and Signoret P, 2000.Differentiation of poaceae potyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis. *Journal Phytopathology* 148: 141-151.
- Massumi H, Shaabani M, Hosseini Pour A, Hydarnejad J and Rahimian H, 2009.Incidence of Viruses Infecting Tomato and Their Natural Hosts in the Southeast and Central Regions of Iran. *Plant Disease Journal* 93: 67-72.

- Moravec T, Cerovska N and Boonham N, 2003. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of potato virus y (PVYNTN) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. *Journal Virology Method* 109: 63-68.
- Mostafae S, Mosahebi G and Habibi MK, 2006. *Potato virus Y* isolated from pepper fields in Tehran Province. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 3: 1335-1340.
- Quintero-Ferrer A and Karasev AV, 2013. First Report of Recombinant *Potato virus Y* Strains in Potato in Jalisco, Mexico. *The American Phytopathological Society* 97: 430.
- Rolland, M, Lacroix C, Blanchard A, Baldwin T, Kerlan C and Jacquot E, 2008. *Potato virus Y* (PVY): From its discovery to the latest outbreaks. *Virology Journal* 12: 261-273.
- Sadeghi MS, Behjatnia SAA, Masumi M, and Izadpanah K, 2008. Characterisation of a strain of *Potato virus Y* causing eggplant mosaic in southern Iran. *Australasian Plant Pathology* 37: 79-86.
- Sharma K and Misra RS, 2011. Molecular approaches towards analyzing the viruses infecting maize (*Zea mays* L.). *Journal of General and Molecular Virology* 3: 1-17.
- Simmonds NW and Harrison E, 1959. The genetics of reaction to Pepper Vein-banding Virus. *Genetics* 44: 1281-1289.
- Singh M, Singh RP, Fageria MS, Nie X, Coffin R and Hawkins G, 2013. Optimization of a Real- Time RT-PCR assay and its comparison with ELISA, conventional RT-PCR and the grow-out test for large scale diagnosis of *Potato virus Y* in dormant potato tubers. *Journal Potato Research* 90: 43-50.
- Smith KM and Dennis RWG, 1940. Some notes on a suspected variant of *Solanum virus 2* (*Potato virus Y*). *Annals of Applied Biology* 27: 65-70
- Smith P, 1931. *potato virus Y*. Description of viruses No: 242.
- Valkonen JPT, 2007. Potato viruses: economical losses and biotechnological potential. Pp. 619-641 In: Vreugdenhil D, Bradshaw J, Gebhardt C, Govers F, Mackerron DKL, Taylor MA and Ross HA (eds.) *Potato Biology and Biotechnology*. Elsevier Publication, Amsterdam.
- Verrier JL, Marchand V, Cailleteau B and Delon R. 2001. Chemical change and cigarette smoke mutagenicity increase associated with CMV and PVY infection in burley tobacco. CORESTA Joint Meeting of the Agronomy and Phytopathology Groups. Cape Town, South Africa. p1.
- Vonderpablen A and Nagal H, 1973. Resistencia del pimiento (*Capsicum* spp.) a estirpes dominantes antes del virus 'Y' de la papa en Buenos Aires, el N.O. argentino y en el centro-sur del Brasil. *Revista de Investigaciones Agropecuarias, INTA, Serie* 5.
- Yun WS, Jung HW, Oh MH, Hahm YI and Kim KH, 2002. Variation of *Potato virus Y* isolated from Potato, tobacco, pea and weed in Korea on the C-terminal region of coat protein gene and 3' non-translated region. *Plant Pathology Journal* 18: 137-143.
- Zitfer TA, 1972. Naturally occurring pepper virus strains in South Florida. *Plant Disease Reporter* 56: 586-590.

## Detection and Identification of *Potato virus Y* Strains in the Main Growing Regions of Solanaceous Plants in Golestan Province

SA Seiedy Gilani,\*<sup>1</sup> S Nasrollahnejad<sup>2</sup>, FS Mostafavi neyshaburi<sup>3</sup> and M Jafari<sup>4</sup>

<sup>1</sup>MSc. Student, Department of Plant Pathology, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>3</sup>PhD Student, Department of Plant Pathology, Zabol University of Agricultural Sciences.

<sup>4</sup>Assistant Professor, of Department of Plant Pathology, Higher Education Complex of Saravan.

\*Corresponding author: Azadehseyedii@yahoo.com

### Abstract

*Potato virus Y* (PVY) is the type species of the genus Potyvirus from the family Potyviridae and is one of the most important limiting factors of the solanaceous crop production in the country. Due to the harmful effect of the virus in the solanaceous family and variation of these crops cultivation in Golestan province, identification of the virus strains and host range studies are necessary to provide management solution for the control of PVY. A total of 380 symptomatic samples showing mosaic, necrosis, wilting, dwarfing and tiny leaves were collected from different growing areas in Gorgan, Daland, Bandargaz and Kordkoy in 2014. Infection of samples was investigated by DAS-ELISA test using polyclonal antiserum raised against PVY. To determine the virus strains, extracted sap of several ELISA positive samples (185 samples) were inoculated on the indicator plant. *Nicotiana tabacum* cv. *samsun*. Also RNA from a number of tomato and eggplants samples that appeared to have PVY infection in ELISA, extracted and were investigated in RT-PCR by the potyvirus general primers oligo1n and oligo2n. The results showed that all three strains of PVY were in this province and PVY<sup>C</sup> strains is the predominant in this host family. This is the first report of PVY on hosts of tomato and eggplant using serological and molecular assays in Golestan province.

**Keyword:** Direct ELISA, Host range, *Potato virus Y* and RT-PCR.