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

سیده آزاده سیدی گیلانی*[۱]، سعید نصراله نژاد[۲]، فاطمه زینتی فخرآباد[۳] و مجید جعفری[۴]

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

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 مهم-ترین عوامل محدودکننده‌ی 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، دلند، بندرگز و کردکوی در سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. آلودگی نمونه‌ها با آزمون الایزای 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 الایزا مثبت ارزیابی شدند (۱۸۵ نمونه)، بر روی گیاه محک توتون رقم سامسون مایه‌زنی شدند. همچنین RNA ویروس از نمونه‌های گوجه‌فرنگی و بادمجان که در آزمون الایزا 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^N، PVY^C و PVY^O در خانواده سولاناسه در استان گلستان وجود داردو PVY^C نژاد غالب است. این اولین گزارش از وجود ویروس وای سیب‌زمینی برروی میزبان‌های گوجه‌فرنگی و بادمجان با استفاده از روش‌های سرولوژیک و مولکولی دراستان گلستان می باشد.

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

مقدمه

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 سال۱۳۹۱دارای حداقل ۹۱ گونه قطعی و ۸۸ گونه پیشنهادی بوده است (گاواند و همکاران ۲۰۱۱). اعضای این جنس دارای ویروس‌های با ذرات میله‌ای قابل انعطاف به طول ۹۰۰-۶۸۰ نانومتر و عرض ۱۱ نانومتر و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای‌اند که در حدود ۱۰Kb طول دارند و توسط حدودا ۲۰۰۰ کپی از واحد

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 درتوتون 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 پیچیده ای 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). عموما سنجش های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی برای شناسایی PVY بکار می-رود (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، آذربایجان شرقی، اردبیل و خراسان به ترتیب ۳۸،۱۵،۳۲،۵۲ و۵۷ 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 برروی توتون مورد ارزیابی قرار گرفت (عابدی ۱۹۹۸). زینتی فخرآباد و نصراله نژاد (۱۳۹۰) پراکنش PVY را در مزارع سیب‌زمینی این استان به روش الایزا و به وسیله آنتی سرم پلی کلونال مورد بررسی قرار دادند و مشخص گردید که۶۰٪ نمونه‌ها آلوده به ویروس فوق بودند.

با توجه به گستردگی 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، سرکلاته، باغوکناره 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، غالبا

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

آزمون الایزا

جهت بررسی وجود آلودگی‌های ویروسی در نمونه-ها، آزمون الایزا براساس روش توصیفی کلارک و آدامز (۱۹۷۷) بوسیله آنتی سرم پلی کلونال انجام گرفت. چاهک‌هایی که در آزمون الایزای مستقیم با آنتی‌سرم پلی‌کلونال 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 گوجه فرنگی 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 بلوک های 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 ۲:۱:۱ کاشته شد. سپس در مرحله چهار برگی، بوته‌ها به صورت مکانیکی توسط عصاره حاصل از نمونه‌هایی با میزان جذب بالای ویروس در میزبان‌های مختلف برروی 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 ۳-۲ برگچه از هر گیاه با پارچه ململ آغشته به سوسپانسیون، مایه‌زنی انجام شد. برای اطمینان ۴۸ ساعت بعد مجددا مایه‌زنی تکرار شد. در آزمایش فوق 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 تا۵-۴ هفته انجام گرفته و علائم طبق روش وریر 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 چهار برگی 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 آنتی سرم 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.

واکنش PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای DNA مکمل (cDNA) حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از آغازگر عمومی Oligo1n و Oligo2n (جدول۱) انجام گرفت. واکنش PCR با مخلوط کردن ۲/۵ میکرولیتر از بافر Taq DNA polymerase (10x)، ۱میکرولیتر 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.

جدول۱- نام، ترادف، دمای اتصال و اندازه قطعه تولید شده مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در آزمون **RT-PCR**

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

در دستگاه PCR پروفیل حرارتی به شکل زیر برنامه‌ریزی شد: ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بمدت یک دقیقه، اتصال بمدت یک دقیقه دردمای مناسب آغازگرها در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و بسط نهایی در دمای۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بمدت یک دقیقه و به علاوه یک چرخه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بمدت ۱۵ دقیقه جهت نشر قطعات ناتمام مورد استفاده قرارگرفت. در تمام برنامه‌های سیکل پایانی واکنش پس از مرحله گسترش نهایی در هشت درجه‌ی سانتی‌گراد با زمان نامحدود تنظیم گردیدکه برای حفظ محصول PCR است.

ارزیابی الکتروفورز

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 الایزا 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، درصورت عدم کنترل این بیماری، می‌توان افزایش آلودگی مزارع را طی سال‌های آینده پیش‌بینی کرد.

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

منطقه	تعداد کل نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های آلوده	درصد آلودگی

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

جدول ۳- درصد آلودگی به **PVY** در میزبان‌های مختلف.

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

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^C تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های آلوده به نژاد PVY^N دارد 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.

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، ** معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصد

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

میانگین جذب نوری در آزمون الایزا (**OD**)	آنتی‌سرم‌های مونوکلونال استفاده شده در آزمون الایزا
۲/۵۳۱۱[a]	نژاد PVY^C
۱/۴۰۲۳[b]	نژاد PVY^N
۰/۹۲۸۴[c]	نژاد PVY^O

الف: PVY^C -کلروز ب: PVY^N - نکروز

شکل۱- علائم نژادهای غالب **PVY** در استان روی توتون رقم سامسون

نتایج بدست آمده از تجزیه آماری داده‌ها در مورد شدت بیماری در مناطق مختلف نمونه‌برداری 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 دلند 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 دلند با میانگین رطوبت نسبی ۵۸ درصد طی ماه‌های نمونه‌برداری، در یک گروه، و در گروه دیگر بندرگز و کردکوی با میانگین رطوبت نسبی ۶۸ درصد قرار گرفتند (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 معنی‌داری نداشت. علت این امر یکسان بودن میانگین دما در نقاط مختلف طی ماه-های نمونه‌برداری می‌باشد. بدین ترتیب با توجه به اینکه گفته می‌شود خسارت ایجاد شده توسط برخی از ویروس-های گیاهی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری بیشتر است (شارما و میسرا ۲۰۱۱). تأثیر دما بر شدت آلودگی مزارع به PVY نیازمند بررسی بیشتر طی زمان طولانی می‌باشد.

جدول ۶- تجزیه واریانس شدت بیماری **PVY** در مناطق مختلف نمونه‌برداری

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

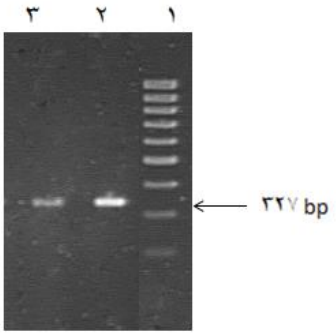
ضریب تغییرات= ۲۶/۹۵، ** معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصد

جدول۷- مقایسه میانگین جذب نوری در آزمون الایزا (**OD**) با توجه به مناطق مختلف و رطوبت نسبی در هر منطقه

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

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

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی پوتی ویروس‌ها (Oligon2 , Oligon1)، قطعه‌هایی به طول ۳۲۷ جفت باز تکثیر نمود (شکل ۲) که این امر نشان‌دهنده آلودگی نمونه‌های گوجه‌فرنگی و بادمجان است و این اولین گزارش از آلودگی گوجه‌فرنگی و بادمجان به ویروس PVY در استان گلستان می‌باشد.



شکل۲- الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱٪رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، راهک ۱: مارکرDNA ، راهک۲: محصول PCRاز 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

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 گونه های تیره سولاناسه را آلوده می‌کند که در این میان محصولاتی چون سیب‌زمینی، گوجه فرنگی، فلفل و توتون اهمیت بیشتری را دارا می باشند (موراوک و همکاران ۲۰۰۳). به علاوه بیش از ۶۰ گونه گیاهی مختلف دیگر از این تیره و تعدادی از گونه‌های گیاهی تیره‌های Chenopodiaceae، Amarantaceae، Comopaceae و Legominoseae نیز میزبان این ویروس می‌باشند (مرتضوی بک ۱۳۷۷).

از جمله روش هایی که در شناسایی نژادهای این ویروس به کار رفته‌اند روش‌های بیولوژیک با استفاده از گیاهان افتراقی، روش های سرولوژیکی مثل الایزا و روش‌های مولکولی مثل RT-PCR می باشد (گلایس 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^N برای اولین‌بار 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^c در روی توتون موزائیک سیستمیک یا پیسک تولید نموده و در روی سیب‌زمینی موزائیک سیستمیک و یا علائم خط و نقطه (دبوکس و هاتینگا ۱۹۸۱) و نیز نکروز سرشاخه و زخم های نکروتیک فراوان در سطح برگ ایجاد می‌کند (باودن ۱۹۶۳). نژاد PVY^O معمول‌ترین نژاد ویروس Y سیب‌زمینی است. این نژاد به راحتی توسط شته منتقل می شود و هم اکنون به طور وسیعی در سراسر جهان و ایران انتشار یافته است (گلایس و همکاران ۲۰۰۲، چاکولسکا و همکاران ۱۹۹۷). از نظر علائم در توتون از نژاد C غیرقابل تفکیک می باشد و مانند آن موزائیک و پیسک ایجاد می‌کند ولی در سیب-زمینی علائم ناشی ازبیماری بسته به نژاد ویروس، رقم سیب‌زمینی، زمان آلودگی و شرایط محیطی بسیار متفاوت است. علائم اولیه شامل نکروز، پیسک، زردی برگچه ها، ریزش برگ‌ها و در برخی موارد مرگ زودرس بوته‌های آلوده می‌باشد. گیاهانی که دارای آلودگی ثانویه می‌باشند، کوتوله مانده و برگ ها دارای حالت پیسک و پیچیدگی با حاشیه چین‌دار هستند (بلانکو و همکاران ۱۹۹۸).

اولین گزارش ازPVY در ایران در منطقه قرق و فاضل‌آباد استان گلستان بود که در تیرتاش بهشهر برروی توتون مورد ارزیابی قرار گرفت در این بررسی عکس العمل ارقام مختلف توتون به ویروس نشان داده شد. بر این اساس ارقام K326، Burley21 و374Coker علائم موزائیک، ارقام VAM، K326 و Tirtache۳۰ علائم نکروز و ارقام K326، Tirtache30، Burley21 و Coker374 هر دو علائم موزائیک و نکروز را نشان داده و حساس می باشند (عابدی ۱۹۹۸). طوسی (۱۳۸۸) بیان کرد میزان شیوع PVY در مناطقی با آب و هوای سرد ازجمله مناطق دماوند و فیروزکوه استان تهران کمتر می‌باشد. از طرفی پراکنش نژاد PVY^O که نژاد بسیار خطرناکی برای سیب‌زمینی است در استان‌های

زنجان، چهارمحال‌وبختیاری، همدان و تهران بیشتر بوده در حالی که نژاد PVY^N در استان اصفهان و چهارمحال-و بختیاری شیوع بیشتری دارد. در بررسی که معصومی و همکاران (۲۰۰۹) در شناسایی ویروس‌های گوجه‌فرنگی در استان‌های مرکزی ایران نشان دادند میزان پراکنش PVY، ۵ درصد است که این اولین گزارش از PVY روی گوجه‌فرنگی 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 درایران بود.در گیاهان آلوده به PVY رگبرگ و برگ نکروزه شده و در نهایت در بسیاری مواقع به همراه نکروز ساقه برگ‌ریزی و یا مرگ یکنواخت در گیاه اتفاق می افتد (سیموندس و هاریسون ۱۹۵۹) اما علائم ویژه ای معمولا برروی میوه‌ها مشاهده نمی‌شود. علائم برروی گیاه فلفل می‌تواند به استرین و واریته‌های آن بستگی داشته باشد در حالی که علائمی که برروی گیاهان محک هستند برای تشخیص و سنجش PVY روش مطمئنی به حساب می آیند بدین‌ترتیب 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 آسیب‌پذیرتربودند (زیتفر ۱۹۷۲). از طرفی علائم در فلفل با کاهش دما و بروز سرما تقویت می‌شوند (ون در پابلن و ناگایی ۱۹۷۳). در مطالعه‌ای که صادقی و همکاران (۲۰۰۸) در استان بوشهر برروی بادمجان انجام دادند مشخص شد علائم موزائیک روی بادمجان بدلیل وجود PVY بوده است. PVY^o برروی گیاه فوق تولید ماتل نمود و براساس اسید آمینه پوشش پروتئینی و ترتیب 3'- UTR مکان PVY-Eg در درون زیرگروه PVY^{NP} قرار گرفت. این اولین گزارش از تشخیص نژاد PVY^{NP} آلوده کننده بادمجان در ایران است.

منابع

پوررحیم ر، فرزادفر ش و گلنراقی ع، ۱۳۸۱. مبانی ویروس‌شناسی گیاهی (ترجمه). شرکت سامان پیشه‌گر. ۴۵۷صفحه.

جعفری م وولی زاده ج، ۱۳۹۰. رده‌بندی ویروس‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه سیستان وبلوچستان. ۲۸۹صفحه.

زینتی فخرآباد و نصرالله نژاد س،۱۳۹۰. گزارش شناسایی ویروس وای سیب‌زمینی از مزارع سیب‌زمینی استان گلستان. همایش ملی مدیریت کشاورزی. جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم. صفحه۱۲۵.

طوسی ن، ۱۳۸۸.شناسایی نژادهای ویروس وای سیب‌زمینی بروش مولکولی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه صنعتی اصفهان.

کریمی ع ر،۱۳۴۵. بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی در ایران. نشریه‌ی بیماری‌های گیاهی، جلد ۳. شماره ۲، صفحه-های۲۳تا۳۲.

مرتضوی‌بک ا، ۱۳۷۷. سیب‌زمینی و یافته‌های تحقیقاتی آن در استان اصفهان. سری نشریه‌های 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 immunosrobentassay 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. persicae*s.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^N 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.Dtection 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, Shaabanian 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 baced 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.Optimzation 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 potatotubers. 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, Bradsshaw J, Gebhardt C, Govers F, MackerronDKL, 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.) aestirpespre domin antesdel virus 'Y' de la papa en Buenos Aires, el N.O. argentino yen el centrosurdel Brasil. Revista de InvestigacionesAgropecuarias, INTA, Serie 5.

Yun WS, Jung HW, Oh MH, Hahm YI and Kim KH, 2002. Variation of *Potato virus Y* isolated from Potat, tobacco, pea and weed in Korea on the C- terminal region of coat protein gene and 3' non-translated region. Plant Pathology Journal 18: 137-13.

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,*[1] S Nasrollahnejad[2], FS Mostafavi neyshaburi[3]and M Jafari[4]

[1]MSc. Student, Department of Plant Pathology, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[3]PhD Student, Department of Plant Pathology, Zabol University of Agricultural Sciences.
[4]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 a peared 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^C 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.