ردیابی و تعیین استرین ویروس وای سیب‌زمینی به روش تاس الایزا و آرتی‌پی سی آر از مزارع فلفل استان گلستان

اکرم آق ملایی[۱*]، سعید نصراله نژاد[۲] و فروه سادات مصطفوی نیشابوری[۳]

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

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

۳- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی دانشگاه زابل.

*مسئول مکاتبه aghamolaiakram@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۳

چکیده

ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*, PVY) یکی از ویروس‌های مخرب گیاهان تیره‌ی سولاناسه می‌باشد که در استان گلستان از سیب‌زمینی و توتون گزارش شده است، اما در خصوص وجود آن در مزارع فلفل استان تاکنون بررسی صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت فلفل به عنوان یکی از میزبان‌های مهم PVY و کشت محصولات تیره-ی سولاناسه در مجاورت یکدیگر، آگاهی از وجود این ویروس در فلفل، حائز اهمیت می‌باشد. در این بررسی تعداد ۸۰ نمونه‌ی برگی با علائم موزائیک، پیسک، کوتولگی و بدشکلی از مزارع فلفل استان جمع‌آوری گردید و آلودگی آن‌ها با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال PVY در آزمون سرولوژیکی TAS-ELISA بررسی شد. از مجموع ۸۰ نمونه‌ی فلفل، ۱۰ نمونه از دو منطقه گرگان ودلند واکنش مثبت نشان دادند که عصاره‌ی دو نمونه‌ی آلوده از این دو منطقه به روش مکانیکی به گیاه محک توتون رقم سامسون مایه‌زنی شد. پس از دو هفته علائم موزائیک، نکروز وکلروز در نمونه‌های تلقیح شده ظاهر گردید. آلودگی گیاهان محک به PVY با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال PVY^{C}،PVY^{O} و PVY^{N} در آزمون الایزا مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج بدست آمده، نمونه‌ی دلند با آنتی‌بادی مونوکلونال ویژه استرین C و نمونه‌ی گرگان با استرین N وO عکس‌العمل نشان دادند. نتایج حاصل از آزمون-RT PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی ژن پروتئین پوششی PVY، آلودگی نمونه‌ها به PVY را اثبات نمود. این اولین گزارش از آلودگی مزارع فلفل استان گلستان به PVY می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس وای سیب‌زمینی، فلفل، گیاه محک، TAS-ELISA، RT-RCR.

مقدمه

ویروس وای سیب‌زمینی گونه شاخص جنس پوتی-ویروس[۱] از خانواده پوتی ویریده[۲] می‌باشد که یکی از مخرب‌ترین عوامل بیماریزا در گیاهان تیره‌ی سولاناسه از جمله سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، توتون و فلفل درسرتاسر جهان است. همچنین این ویروس به گیاهان غیر از تیره‌ی سولاناسه از جمله علف‌های هرز خسارت وارد می‌کند (مصطفایی و همکاران ۲۰۰۸، انصاری‌دزفولی و همکاران ۱۳۹۲). فلفل از میزبان‌های مهم این ویروس است و آلودگی به آن موجب بروز علائم موزائیک، پیسک و بدشکلی در برگ‌ها ومیوه‌ها و جلوگیری از رشد مطلوب گیاه می‌شود. در صورت همراه بودن سایر آلودگی‌های ویروسی با این ویروس، گیاه فلفل دچار نکروز و کوتولگی می‌گردد (مهی و ون رگن مورتر ۲۰۰۸، پوررحیم و فرزادفر ۱۳۹۱). پیکره‌ی ویروس به شکل میله‌ای خمش‌پذیر به ابعاد ۷۳۰*۱۱ نانومتر است. ژنوم آن از آرانای تک‌لا با قطبیت مثبت

[1]Potyvirus
[2]Potyvaridae

به اندازه ۹.۷ کیلوباز تشکیل شده است (اسمیت ۱۹۳۱) که دارای Vpg در انتهای '۵، polyA در انتهای '۳ و یک چهارچوب خوانش (ORF[1]) می‌باشد (ریچمن و همکاران ۱۹۹۲). این ویروس حداقل با ۲۵ گونه شته به روش ناپایا و همچنین با روش مکانیکی منتقل می-شود(اسمیت ۱۹۳۱).

ردیابی PVY به کمک روش‌های مختلف از جمله سرولوژیکی و مولکولی صورت می‌گیرد. با استفاده از روش‌های مولکولی بخش‌های مختلف ژنوم این ویروس ردیابی و تعیین ترادف شده است (بوخریس و همکاران ۲۰۰۷، لورنزن و همکاران ۲۰۰۸). ویروس وای سیب‌زمینی معمولا بر اساس آزمون‌های بیولوژیکی شامل ایجاد علائم موضعی وسیستمیک بر روی *Nicotiana tabacum* cv.*Xanthi* و *Solanum tubrosum* و همچنین آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی به استرین‌های PVY^{O}،PVY^{N} و PVY^{C} و استرین نوترکیب PVY^{NTN} تقسیم می‌گردد (سمز و همکاران ۲۰۰۲، موراوک و همکاران ۲۰۰۳، تریبودت و همکاران ۲۰۰۵، رولاند و همکاران ۲۰۰۸، مجدآبادی فراهانی و همکاران ۱۳۸۹). استرین غالب سرتاسر جهان PVY^{O} است که باعث آلودگی سیستمیک با علائم پیسک یا موزائیک در توتون و موزائیک خفیف تا شدید و ریزش برگ در ارقام سیب‌زمینی می‌شود (دبکس و هاتینگا ۱۹۸۱، برانت ۲۰۰۱). استرین PVY^{N} باعث علائم نکروز، رگبرگ توتون، ابلقی خفیف و گاهی نکروز برگ‌ها در گیاه سیب‌زمینی می‌شود و استرین لکه نواری منقوط PVY^{C} علائم موزائیک، موجدار شدن و نکروز در برخی ارقام سیب‌زمینی ایجاد می‌کند (نای و سینگ ۲۰۰۲، موراوک و همکاران ۲۰۰۳، تریبودت و همکاران ۲۰۰۵، لورنزن و همکاران ۲۰۰۶، ریگوتی و گوگرلی ۲۰۰۷، اسکوبرت همکاران ۲۰۰۷).

این ویروس در ایران با استفاده از روش‌های مولکولی ردیابی شده است و بخش‌های ژنومی P1 وCP چندین جدایه پس از تعیین ترادف،در بانک ژن ثبت گردیده است (حسینی و همکاران ۲۰۱۱). قاسم‌زاده و همکاران (۱۳۹۱) ویروس وای سیب‌زمینی را از گیاهان تیره‌ی سولاناسه مزارع استان‌های آذربایجان شرقی و اردبیل با استفاده از آغازگرهای عمومی (یونیورسال) جنس پوتی‌ویروس گزارش کردند و ترادف نوکلئوتیدی بخشی از منطقه ژنومی NIb جدایه‌ای از این ویروس با سایر جدایه‌های جهان از لحاظ فیلوژنتیکی بررسی شد. در استان گلستان PVY با استفاده ازروش‌های سرولوژیکی ومولکولی درمزارع توتون ردیابی شد و ترادف ناحیه CP سه جدایه ازاین ویروس تعیین گردید (زینتی فخر آباد و همکاران ۱۳۹۱). سپس ترادف‌های بدست آمده با ترادف‌های مشابه PVY موجود در بانک ژن، مورد مقایسه فیلوژنتیکی قرار گرفت که بر اساس تست مولکولی جدایه‌ی علی‌آباد و فاضل‌آباد با جدایه-هایی از ایتالیا، اسپانیا، بوشهر و جدایه‌ی مینودشت با جدایه‌هایی از هلند، بریتانیا و تایوان در یک گروه کنار هم قرار گرفتند و بیشترین شباهت جدایه‌های PVY توتون استان گلستان به استرین بوشهر بود (زینتی-فخرآباد و همکاران ۲۰۱۲). پورحیم و فرزادفر (۱۳۹۱) آلودگی ویروس وای سیب‌زمینی در گیاه فلفل (*Capsicum annuum*) را با استفاده از واکنش زنجیره-ای پلیمراز در مزارع فلفل منطقه‌ی جیرفت کرمان گزارش نمودند. اولین گزارش از آلودگی PVY در مزارع فلفل ایران از استان تهران بود (مصطفایی و همکاران ۲۰۱۲). در بررسی ویژگی‌های بیولوژی و مولکولی جدایهPVY از فلفل در استان تهران و همچنین مقایسه‌ی آن با دیگر جدایه‌ها مشخص گردید که بین جدایه PVY فلفل با سایر جدایه‌ها از نظر دامنه میزبانی تفاوت‌هایی وجود دارد که بر اساس آن این جدایه‌ها از هم قابل تفکیک هستند (مصطفایی و همکاران ۲۰۰۸). باسره و همکاران (۱۳۹۱) از مزارع فلفل استان هرمزگان آلودگی به PVY را گزارش کردند. در ارومیه سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، بادمجان، فلفل، توتون

[1]Open Reading Frame

و علف هرز پیچک به عنوان میزبان‌های طبیعی این ویروس شناسایی شدند (راستگو و طوسی ۱۳۹۱). در مطالعاتی توسط پورشریفی و همکاران (۱۳۹۱) طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ تعداد ۱۵۲۸ نمونه‌ی برگی دارای علائم شبه ویروسی از گیاهان توتون، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل و عروسک‌پشت‌پرده استان‌های البرز، فارس، قزوین، آذربایجان‌غربی، تهران و گیلان جمع‌آوری و برای تشخیص آلودگی PVY به روش DAS-ELISA مورد آزمایش قرار گرفتند که هیچ آلودگی در نمونه‌های فلفل دارای علائم مشاهده نشد اما آلودگی بقیه میزبان‌ها به این ویروس اثبات گردید.

با توجه به اهمیت PVY و وجود آن در برخی مزارع سیب‌زمینی و توتون استان گلستان و کشت محصولات سولاناسه در مجاورت یکدیگر، در این تحقیق ردیابی سرولوژیکی و مولکولی ویروس وای‌سیب‌زمینی در مناطق عمده‌ی کشت فلفل استان و نیز تعیین استرین آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری وجمع‌آوری نمونه‌ها

در تابستان سال ۱۳۹۳ به منظور ردیابی ویروس وای سیب‌زمینی از مناطق عمده‌ی کشت فلفل استان گلستان تعداد ۸۰ نمونه برگی با علائم موزائیک، نکروز، رنگ پریدگی، پیسک، کوتولگی، برگ قاشقی و ریزبرگی جمع‌آوری و برای انجام آزمایش‌های سرولوژیک و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند.

آزمون الایزا

به منظور اطمینان از آلوده بودن نمونه‌های جمع-آوری شده به PVY از آزمون الایزای غیر مستقیم (TAS-ELISA[1]) با آنتی‌بادی اختصاصی PVY (مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی دانشگاه شیراز) با اصلاحاتی در روش کانورز و مارتین (۱۹۹۰) استفاده شد. در این روش از عصاره‌ی گیاه سالم فلفل به عنوان کنترل منفی و از عصاره‌ی گیاه فلفل آلوده به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و چاهک‌هایی که در آن تغییر رنگ ایجاد شد به عنوان نمونه آلوده تعیین گردید و علاوه بر این میزان جذب هر یک از چاهک‌ها توسط دستگاه قرائت‌کننده الایزا Biotec (مدل Elx800) در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. نمونه‌هایی که جذب آن‌ها بیش از سه برابر میانگین جذب نمونه‌های سالم بود، به عنوان نمونه‌های آلوده شناخته شدند.

مطالعات گلخانه‌ای

از نمونه‌هایی که در آزمون الایزا با آنتی‌بادی PVY واکنش مثبت نشان داده بودند در ۵ برابر حجم بافر فسفات ۰/۰۵ مولار، pH=۷، در هاون سترون عصاره-گیری شد. عصاره بدست آمده روی برگ گیاه محک توتون رقم سامسون *Nicotiana tabacum* cv.*samsun* که قبلا با کاربوراندوم گردپاشی شده بود، به صورت مکانیکی مایه‌زنی شد. ارزیابی بوته‌ها دو هفته پس از مایه‌زنی مکانیکی انجام گرفت و علائم ثبت گردید.

استخراج RNA کل گیاه

بعد از شناسایی نمونه‌های آلوده به PVY ، تعداد دو نمونه از دو منطقه (گرگان و دلند) استان گلستان که بیشترین غلظت ویروس را در آزمون الایزا دارا بودند انتخاب و از آن‌ها جهت استخراج RNA استفاده شد. آران‌ای این نمونه‌ها با استفاده از کیت mRNA kit Capture (Roche) طبق دستورالعمل شرکت سازنده در واکنش Reverse Transcription (RT) شامل دو میکرولیتر(10 mM) dNTPs، دو میکرولیتر(100 mM) DTT (Dithiotreitol)، ده میکرولیتر(5x) Mmulv RT buffer، سه میکرولیتر (10µM) Reverse Primer (N1T) و یک میکرولیتر آنزیم Mmulv Reverse Transcriptase (200 U/µl) (Fermentas) که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رسانده شد به cDNA تبدیل شد. مخلوط واکنش RT به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه‌ی

[1]Triple Antibody Sandwich-Enzyme-linked immunosorbent assay

سانتی‌گراد نگهداری و سپس در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

واکنشPCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برایDNA مکمل (cDNA) حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از دو جفت آغازگر عمومی (5'-Oligo1n ATGGTTTGGTGCATTGAGAATGG-3') و 5'-CAGATGAAGGCCGCCGCAGCA-) Oligo2n 3') (ماریه-جانه۲۰۰۰) وآغازگر اختصاصی مستقیم (5'-CAACTCCAGATGGAACAATTG-3') و معکوس (5'-CCATTCATCACAGTTGGC-3') (زینتی و همکاران ۱۳۹۱) انجام گرفت. این واکنش با مخلوط کردن ۲/۵میکرولیتر از بافر *Taq*DNA polymerase (10x)، یک میکرولیتر از ($Mgcl_2$(50mM، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP(10mM)، یک میکرولیتر از آغازگر مستقیم و یک میکرولیتر از آغازگرمعکوس، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم *Taq* DNA polymerase (Cinagen) و دو میکرولیتر ازcDNA تهیه شد.

پروفیل حرارتی PCR شامل ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹٤ درجه‌ی سانتی-گرادبه مدت یک دقیقه، اتصال به مدت یک دقیقه در دمای مناسب آغازگرها (در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی-گراد) و بسط در دمای۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و به علاوه یک چرخه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه جهت نشر قطعات ناتمام مورد استفاده قرارگرفت. در تمام برنامه‌ها سیکل پایانی واکنش برای حفظ محصول PCR، پس از مرحله گسترش نهایی در هشت درجه‌ی سانتی‌گراد با زمان نامحدود تنظیم گردید.

ارزیابی الکتروفورز

محصول نهایی حاصل از RT-PCR در ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE با استفاده از الکتروفورز تفکیک گردید و اندازه‌ی تقریبی قطعه تکثیر شده با استفاده از نشانگر ۱۰۰ جفت باز (100bp) تعیین گردید.

نتایج و بحث

طبق نتایج حاصل از آزمون الایزا (TAS-ELISA)، از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده تنها نمونه‌های مناطق گرگان و دلند با علائم موزائیک، بدشکلی برگ، ریزبرگی و کوتولگی با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال PVY واکنش مثبت نشان دادند (شکل۱).

(الف)

(ب)

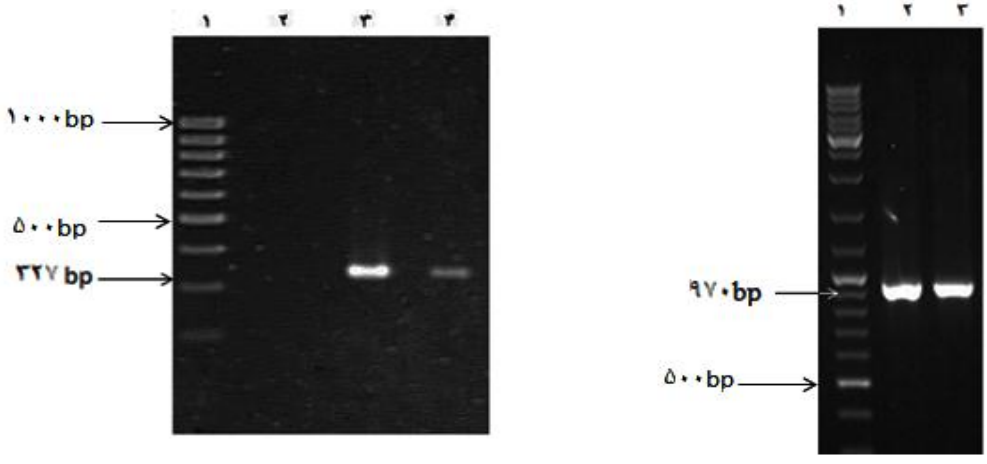
شکل۱- علائم ویروس وای‌سیب‌زمینی روی فلفل الف: موزائیک و ریزبرگی (دلند)، ب: کوتولگی بوته (گرگان).

عصاره‌ی نمونه‌های آلوده جدا شده از گرگان و دلند که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شدند به گیاه محک توتون رقم سامسون به روش مکانیکی مایه‌زنی شد. بعد از دو هفته علائم موزائیک و نکروز ظاهر شد (شکل۲). سپس آلودگی سیستمیک این گیاهان به PVY با استفاده از آزمون الایزا مورد تایید قرار گرفت که بر اساس علائم و آزمون الایزا نمونه جدا شده از منطقه دلند به آنتی‌بادی مونوکلونال ویژه استرین C و نمونه جدا شده از منطقه گرگان به استرین O و N عکس‌العمل نشان دادند.

(ب) (الف)

شکل۲- علائم جدایه‌های ویروس وای سیب‌زمینی روی توتون رقم سامسون. الف: جدایه ویروس وای سیب‌زمینی فلفل دلند (کلروز)، ب: جدایه ویروس وای سیب‌زمینی فلفل گرگان (نکروز).

واکنش PCR با استفاده از دو آغازگر عمومی و اختصاصی ژن پروتئین پوششی PVY ، به ترتیب قطعه‌هایی به طول حدود ۳۲۷ و ۹۲۷ جفت باز تکثیر نمود در حالی که هیچ قطعه‌ای از نمونه سالم و شاهد منفی تکثیر نشد (شکل۳).



(ب) (الف)

شکل۳- الف: الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، راهک۱: مارکر DNA، راهک۲: محصول PCR از نمونه آلوده دلند، راهک ۳ : محصول PCR از نمونه آلوده گرگان با اندازه تقریبی bp ۹۷۰. ب: الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱٪رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، راهک ۱: مارکر DNA ، راهک۲: شاهد منفی با آب مقطر راهک ۳ و ٤: محصول PCR از نمونه‌های آلوده به PVY و تکثیر باند در محدوده bp ۳۲۷ با استفاده از آغازگر عمومی پوتی ویروس‌ها.

ویروس وای سیب‌زمینی اولین‌بار در ایران توسط کریمی (۱۳٤٥) در مزارع سیب‌زمینی شناسایی شد. در استان گلستان نیز اولین‌بار این ویروس توسط زینتی فخرآباد و همکاران (۱۳۸۹) در مزارع توتون شناسایی شد. در طی این تحقیق این ویروس اولین‌باردر مزارع فلفل استان گلستان شناسایی گردید. در بررسی‌های انجام شده توسط پوررحیم و همکاران (۱۳۹۱)، مصطفایی و همکاران (۲۰۱۲) و ایزدپناه و همکاران (۱۳۸۹) نمونه‌های فلفل با علائم زردی، موزائیک، پیسک، بدشکلی برگ وکوتولگی بوته آلوده به PVY بودند علائم نمونه های مورد آزمایش در این تحقیق که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شدند با علائم ذکر شده در بررسی‌های فوق مطابقت داشت. پورشریفی و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی آلودگی PVY روی میزبان‌های دارای علائم توتون، سیب‌زمینی، گوجه-فرنگی، فلفل و عروسک‌پشت‌پرده دراستان‌های البرز، فارس، قزوین، آذربایجان‌غربی، تهران و گیلان به روش DAS-ELISA هیچ آلودگی را در نمونه‌های فلفل دارای علائم مشاهده نکردند، اما بقیه میزبان‌ها آلوده به PVY بودند. درحالیکه در تحقیق حاضر نمونه‌های فلفل دارای علائم در آزمون الایزا واکنش مثبت نشان دادند. همچنین بررسی دامنه‌ی میزبانی هر یک از این جدایه‌ها نشان داد که برخی از جدایه‌های PVY از روی سیب-زمینی، قادر به آلوده کردن فلفل نبودند.

زینتی فخرآباد و همکاران (۱۳۹۱) با استفاده از گیاهان محک و آنالیز فیلوژنتیکی ناحیه CP ژنوم PVY از سه جدایه علی‌آباد، فاضل‌آباد و مینودشت در مزارع توتون استان گلستان بیان کردند که این سه جدایه بیشترین تشابه را با استرین PVY^{C} دارد. جدایه PVY^{nnp} با علائم نکروز رگبرگ در فلفل، بر اساس منطقه‌ی 3′-UTR ژنوم و توالی CP شناسایی شد (داکوینو و همکاران ۱۹۹٥) و همچنین عکس‌العمل این جدایه در آزمون الایزا با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال فقط با استرینC مثبت بود ولی با دو استرین دیگر عکس‌العمل نشان نداد (فانیگلیولو ۲۰۰٥). جدایه JVW-186 طبق آنالیز مناطق ژنومی پروتئین P1/HC-Pro در ناحیه ٥′ و CP ۹۱.۸٪ به جدایه PRI-509 (استرین**C**) شباهت دارد (مودلی و همکاران ۲۰۱٤). در بررسی انجام شده در این تحقیق نیز جدایه PVY دلند بر روی گیاه محک ایجاد علائم کلروز و نکروز رگبرگ نمود که با استفاده از آنتی-بادی‌های مونوکلونال و RT-PCR به استرین C واکنش مثبت نشان داد.

باسره و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی وضعیت آلودگی مزارع سیب‌زمینی به PVY ، نمونه‌هایی را که با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال واکنش مثبت نشان دادند با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال استرین N به روش TAS-ELISA مورد بررسی قرار دادند، سپس آلودگی دو نمونه با واکنش مثبت با آنتی‌بادی PVY^{N} را به کمک واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی تایید کردند. معرف‌زاده و همکاران (۱۳۸٥) در بررسی آلودگی مزارع توتون استان گلستان و مازندران به PVY با استفاده از روش‌های سرولوژیکی و به کمک آنتی‌بادی پلی‌کلونال و مایه‌زنی به گیاهان محک عروسک پشت‌پرده و توتون (ارقام سامسون، بارلی و وایت) با کمک آنتی‌بادی استرین N و به روش تاس الایزا و همچنین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (IC-RT-PCR) با آغازگرهای اختصاصی، استرین N ویروس را شناسایی نمودند. مصطفایی و همکاران (۲۰۱۲) استرینO ویروس وای سیب‌زمینی را با روش DAS-ELISA با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال و گیاه محک توتون و همچنین IC-RT-PCR با کمک جفت آغازگرهای اختصاصی 0-8687F و 0-9995R از مزارع فلفل تهران شناسایی کردند اما آنالیز فیلوژنتیکی این جدایه نشان داد که بیشترین شباهت را با جدایه-های AJ439545 (گوجه‌فرنگی) و SONY41 (فلفل) از گروه PVY^{NP} (استرین C) دارد که این اولین گزارش از آلودگی PVY از مزارع فلفل ایران بود. در شناسایی

تنوع استرین‌های PVY آلوده‌کننده سیب‌زمینی، گوجه-فرنگی و فلفل در جنوب آفریقا با استفاده از آزمون DAS-ELISA و همچنین RT-PCR با استفاده از آنتی-بادی اختصاصی استرین‌ها و آغازگرهای اختصاصی دریافتند که تمام نمونه‌های فلفل و گوجه‌فرنگی آلوده به استرینO بودند ولی نمونه‌های سیب‌زمینی آلوده به استرین $WilgaPVY^N$، pvy^{NTN} و PVY^O بودند (آیبابا و همکاران ۲۰۱۱). در این بررسی **جدایه** PVY فلفل گرگان نیز بر روی گیاه محک ایجاد علائم موزاییک و نکروز نمود که با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به روش TAS-ELISA مورد بررسی قرار گرفت و آلودگی نمونه با واکنش مثبت با آنتی‌بادی PVY^N و PVY^O مطابق بررسی‌های فوق به کمک واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی تایید شد.

با استفاده از روش مولکولی به کمک آغازگرهای اختصاصی علاوه بر خانواده، تشخیص اختصاصی ویروس، استرین و زیرگونه نیز امکان‌پذیر است (غلامی و همکاران ۲۰۰۷). در ایران ردیابی مولکولی این ویروس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی منطبق بر مناطق ژنومی PI ، CP و $3'$ UTR از گیاهان خانواده سولاناسه صورت گرفته است (مجدآبادی و همکاران ۱۳۸۹، غلامی و همکاران ۲۰۰۷، صادقی و همکاران ۲۰۰۸، مصطفایی و همکاران ۲۰۰۸، حسینی و همکاران ۲۰۱۱). شناسایی توالی ژنوم CP بعنوان یک معیار مفید برای رده‌بندی تاکسونومی استرین‌های PVY در نظر گرفته می‌شود (لایو و همکاران ۱۹۹۹). ناحیه CP ژنوم PVY معمولا برای مطالعه فیلوژنی و گروه‌بندی استرین‌ها استفاده می‌شود و دارای بیشترین تنوع و سازگاری میزبانی می‌باشد (کوویس و همکاران ۲۰۱۲) علاوه بر این ردیابی PVY در خانواده سولاناسه با استفاده از آغازگرهای عمومی منطبق بر ناحیه NIb نیز صورت گرفته است (قاسم-زاده و همکاران ۱۳۹۱). حسینی و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی مناطق ژنومی P1، CP و $3'$ UTR بیان نمودند که ۳ استرین مهم PVY (PVY^O، PVY^{NTN} و PVY^N W) در ایران وجود دارد. در این بررسی مطابق با تحقیقات فوق به منظور ردیابی ویروس وای‌سیب‌زمینی از مزارع فلفل استان گلستان وتعیین استرین آن علاوه بر روش سرولوژیکی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از روش بیولوژیکی به همراه روش مولکولی با استفاده از آغازگرهای عمومی پوتی-ویروس‌ها و اختصاصی منطبق با ناحیه CP ژنوم، آلودگی نمونه‌ها به PVY را تایید نمود. همچنین تکثیر باند ۹۷۰ جفت باز مورد انتظار با آغازگرهای اختصاصی مشابه مورد استفاده در تحقیقات زینتی فخرآباد و همکاران (۱۳۹۱) آلودگی نمونه‌ها به PVY تایید شد.

حسینی و همکاران (۱۳۸۵) استرین‌های مختلف N، C، N و NTN ویروس وای سیب‌زمینی را از مزارع سیب‌زمینی استان‌های کرمان و فارس با روش الایزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال شناسایی کردند و با روش مولکولی با کمک جفت آغازگرهای اختصاصی هر یک از استرین‌ها را تفکیک نمودند. زیانزو و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از آزمون الایزا و RT-PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی، دو استرین PVY^0 و PVY^{NTN} را از ۱۴ نمونه شامل میزبان‌های سیب‌زمینی، توتون، عروسک پشت‌پرده در کانادا گزارش کردند. بر اساس نتایج سرولوژیک و مولکولی بدست آمده در این تحقیق نیز استرین‌های C، N و O ویروس وای سیب‌زمینی در مزارع فلفل وجود دارد که برای اولین‌بار از این مزارع در استان گلستان گزارش می‌شود.

با توجه به علائم مشکوک به ویروس وای سیب-زمینی در مزارع فلفل استان گلستان، ردیابی و شناسایی PVY با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال PVY مورد بررسی قرار گرفت. تلقیح عصاره آلوده از دو جدایه گرگان و دلند به ترتیب ایجاد علائم نکروز و کلروز بر روی گیاه محک نمود. با استفاده از آنتی-

بـــادی‌هـــای مونوکلونـــال PVY^C،PVY^O وPVY^N در آزمون الایزا، جدایه‌ی دلنـد بـا آنتـی‌بـادی مونوکلونـال ویـــژه اســـترین C و جدایـــه گرگـــان بـــا آنتـــی‌بـــادی مونوکلونال ویـژه اسـترین N و O عکس‌العمـل نشـان دادنـــد. در نهایـــت آزمـــون RT-PCR بـــا اســـتفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی ژن پروتئین پوششی PVY و تکثیر قطعه‌هایی به ترتیب به طول حـدود ۳۲۷ و ۹۲۷ جفت باز، آلـودگی نمونـه‌هـا بـه PVY را اثبـات نمود.

منابع

انصاری دزفولی آ، معصومی ح و هاشمی ه، ۱۳۹۲. انتقال و بیان ژن‌های پروتئین پوششـی ویـروس‌هـای Y نـژاد نکروتیـک (PVY^N) و ویـروس S سـیب‌زمینـی در سـیب‌زمینـی رقـم آگریـا (Solanum tubersum var Agria). فناوری زیستی در کشاورزی، جلد ۱۲.صفحه‌های ۳۵ تا ٤٥.

ایزد پناه ک، اشکان م، بنی هاشمی ض، رحیمیان ح و میناسیان و، ۱۳۸۹. بیماری شناسی گیـاهی (اگریـوس، جـرج ان).آییژ.

باسره س، پوررحیم ر، ملکی م و فرزادفر ش، ۱۳۹۱. گزارش آلـودگی ویـروس وای سـیب‌زمینـی در مـزارع فلفـل استان گلستان. صفحه ۸٤۳، خلاصه مقالات بیستمین کنگره گیاهپزشکی ایران، شیراز.

پوررحیم ر و فرزادفر ش، ۱۳۹۱.ردیابی آلودگی ویروس وای‌سیب‌زمینی در گیاه *Capsicum annuum* با اسـتفاده از واکنش زنجیره‌ای‌پلیمراز. صفحه ١٤٦، دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران، تهران.

پورشریفی پ، دیزجی ا و کوهی‌حبیبی م، ۱۳۹۱. بررسـی تفـاوت‌هـای بیولـوژیکی و ژنتیکـی جدایـه‌هـای مختلـف میزبانی ویروس وای سیب‌زمینی. صفحه ٨٢٤، خلاصه مقالات بیستمین کنگره گیاهپزشکی ایران، شیراز.

قاسم‌زاده آ، سخندان‌بشیر ن و خاکور ر، ۱۳۹۱. ردیابی مولکولی ویروس وای‌سیب‌زمینی با اسـتفاده از آغـازگر-های عمومی در استان اردبیل. نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار، جلد۲۲، شماره۲.صفحه‌های ٦٧ تا ٧٨.

حسینی ع، معصومی ح، حسینی‌پور ا، حیدرنژاد ج و شعبانیان م، ۱۳۸۵. شناسایی و تمایز نژادهـای N، C ، NTNو O ویروس وای‌سیب‌زمینی (PVY) با استفاده از روش‌های سرولوژی و مولکولی. صفحه ۲۳۰، خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تهران.

راسـتگو م و طوسـی ن، ۱۳۹۱. تعیـین میزبانـان طبیعـی ویـروس وای سـیب‌زمینـی در منطقـه ارومیـه و تعیـین خصوصیات مولکولی جدایه توتون. صفحه ٨٦٨، خلاصه مقالات بیستمین کنگره گیاهپزشکی ایران، شیراز.

زینتی فخرآباد ف، نصرالله نژاد س، احمدی‌خواه ا و تقی‌نسب م، ۱۳۸۹. ردیابی ویروس وای سیب‌زمینی با استفاده از روش‌های سرولوژیکی و گیاهان محک در مزارع توتون استان گلسـتان. صـفحه ۲۸، پنجمـین همـایش ملـی ایده‌های نو در کشاورزی،اصفهان.

زینتی فخرآباد ف، نصرالله نژاد س، احمدی‌خواه ا و تقی‌نسب م، ۱۳۹۱. فراوانی و تعیین ترادف سه جدایه ویروس وای سیب‌زمینی از مزارع توتون و مقایسه فیلوژنتیکی با سایر جدایه‌های دنیا. بیماری‌های گیاهی، جلد ٤٨، شماره ۳. صفحه‌های ٤١٧ تا ٤٢١.

مجدآبادی فراهانی س،جعفرپورب، فلاحتی رستگارم وسبک خیز م ع، ۱۳۸۹. ردیابیوشناساییژن‌اد PVY^{NTN} در مزارعسیب زمینیاستانخراسانرضوی.نشریهحفاظتعلومگیاهی،جلد ٢٤. صفحه های ۳۸۵تا ۳۹۰.

معرف‌زاده ن، خاطری ه، کوهی‌حبیبی م، مصاحبی‌محمدی غ ح، حمزه ن، غضنفری ک و حسینی ع، ۱۳۸۵. وضعیت آلودگی ارقام تجاری توتون به ویروس وای سیب‌زمینی و شناسایی سویه نکروتیک ویروس در مزارع توتون استان‌های مازندران و گلستان. صفحه ۲۲۵، خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تهران.

کریمی، ع ر، ١٣٤٥. بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی در ایران. نشریه‌ی بیماری‌های گیاهی، جلد ۳، شماره ۲. صفحه‌های ۲۳ تا ۳۲.

Boukhris S, Khamassy N, Glais L and Kerlan C, 2007. Occurrence in Tunisia of potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) caused by variant PVY^{NTN} of *potato virus Y*. New Disease Reports 15(5).

Brunt AA, 2001.Potyviruses. Pp. 77-86 In: Loebenstein G, Berger PHB, runt AA and Lawson RH,

(eds) Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. KluwerAcademic Publishers.

Converse RH and Martin RR, 1990. ELISA methods for plant viruses.Academic Press.

Cuevas JM, Delaunay A, Rupar M, Jacquot E and Santiago FE, 2012.Molecular evolution and phylogeography of potato virus Y based on the CP gene. Journal of General Virology 93: 2496–2501.

Daquino L, Dalmay T and Burgyan, J, 1995. Host range and sequence analysis of isolate of *potato virus Y* inducing veinal necrosis in pepper. Plant Disease 79(10): 1046-1050.

De Bokx JA and Huttinga H, 1981.*potatovirus Y*. Descriptions of plant viruses, No. 242.Commonw Mycol Inst/Assoc Appl Biol, Kew, England.

Fanigliulo A, Comes S, Pacella R, Harrach B, Martin DP and Crescenzi A, 2005. Characterisation of *potato virus Y* nnp strain indusing veinal necrosis in pepper, naturally ovvuring recombinant strain of PVY. Archives of virology 150(4): 709-720.

Gholami S, Koohi habibi M, Boushehri AA and Naghavi MR, 2007. Detection of *potato virus Y* byreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Iranian Journal of AgriculturalSciences 38: 399-405.

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.

Ibaba JD and Gubba A, 2011. Diversity of *potato virus Y* infection solanaceous vegetables in the province of Kwazula- natal in the Republic of south Africa. Crop Protection 30: 1404-1408.

Liave C, Martinz B, Dıaz-Ruız, JR and Lopez-Abella D, 1999. Serological analysis and coat protein sequence determination of *potato virus Y* (PVY) pepper pathotypes and differentiation from other PVY strains. European Journal of Plant Pathology 105**:** 847–857

Lorenzen JH, Piche LM, Gudmestad NC, 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.

Lorenzen, J, Nolte P, Martin D, Pasch, JS and Gudmestad NC. 2008. NE-11 represents a new strain variant class of *potato virus Y.* Archives of Virology 153: 517-525.

Mahy BWJ and Van-Regenmorted MHV, 2008.Encylopedia of Virology.Academic Press.

Moodley V, Ibaba JD, Naidoo R and Gubba A, 2014. Full-genome analyses of a *potato virus Y* (PVY) isolate infecting pepper (*Capsicum annuum L.*) in the Republic of South Africa. Virus Genes 49(3): 466-76.

Moravec T, Cerovska N and Boonham N, 2003. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of *potato virus Y* (PVY^{NTN}) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. Journal of Virological Methods 109:63-68.

Marei-Jeanne V, Loos R, Peyre J, Alliot B and Signoret P, 2000.Differentiation of poaceae potyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and analysis. Journal of Phytopathology 148: 141-151.

Mostafae S, Mosahebi,G, Koohi Habibi M and Ansari Desfouli E, 2008. Study of biological and molecular characterization of pepper-PVY isolated from pepper field and it's compersion with other PVY isolates. Iranian Journal of Virology 2: 31-34.

Mostafae S, Mosahebi G and Kuhi Habibi, M., 2012. The first report of PVY incidence in Iran pepper fields. Global Advanced Research Journal of Microbiology 2: 013-018.

Nie X and Singh RP, 2002.A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of *potato virus Y* by uniplex and multiplex RT-PCR. Journal of Virological Methods 104: 45-54.

Riechmann JL, Lain S and Garcia JA, 1992.Highlights andprospects of potyvirus molecular biology. Journal Genes Virological 73: 1–16.

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.

Rolland M, Glais L, Kerlan C and Jacquot E, 2008.A multiple single nucleotide polymorphisminterrogation assay for reliable *potato virus Y* group variant characterization. Journal of VirologicalMethods147: 108-117.

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(1): 79–86.

Schubert J, Fomitcheva V and Wisniewska JS, 2007. Differentiation of *potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. Journal of Virological Methods 140: 66-74.

Smith P, 1931. *Potato virus Y*. Description of viruses No: 242. CMI/AAB.

Szemes MM, Klerks J, Heuvel V and Schoen CD, 2002. Development of a multiplex amplidet RNA assay for simultaneous detection and typing of *potato virus Y* isolates. Jornal of Virological Methods 100: 83-96.

Tribodet M, Glais L, Kerlan C and Jacqot E, 2005. Characterization of *potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY^{N} isolates in infected Nicotiana tabacum cv.Xanthi. Journal of General Virology 86: 2101-2105.

Xianzhou N and Maturesh S, 2013. Response of potato, tabacco and Physalis floridana plants to mixed infection with PVY, PVY^{NTN} and PVY^{O} strains. Journal Plant Pathology 35(3): 390-401.

Zinati fakhrabad F, AhmadikhahA and Nasrollahnejad S, 2012.Identification and detection of Potato virus Y strains by molecular methods in tobacco fields of North Iran. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 3: 1422-1428.

Identification and Detection of *Potato Virus Y* Strains Using TAS-ELISA and RT-PCR from Pepper Fields in Golestan Province

A Aghamolai*[1],S Nasrollahnejad[2]and F S Mostafavi Neishaburi[3]

[1]MSc Student, Dept. of Plant Pathology Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources .
[2]Associate Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
[3]Ph.D. Student, Dept. of Plant Pathology, Zabol University.
Received:14 Mar 2015 Accepted:23 Jun 2016

Abstract

Potato virus Y (PVY) is one of the most damaging viruses of solanaceae family which has been reported from potato and tobacco growing areas in Golestan province; however, this virus has not been studied in pepper fields yet. Due to importance of pepper plants as one of the important hosts of PVY and also cultivation of solanaceous crops in close proximity to one another, the occurrence of PVY in pepper growing farms in Golestan province has been studied. A total of 80 pepper leaf samples showing symptomatic mosaic, mottle, dwarfing and deformation were collected. The PVY infection of the samples was investigated using PVY polyclonal antibody in TAS-ELIASA test. Among 80 pepper samples, 10 samples from each two regions of Daland and Gorgan had the infection. Two positive samples were inoculated on *Nicotiana tabacum* cv. *samsun* by mechanical method. Inoculated plants showed symptoms of necrosis and chlorosis in two weeks after infection, and infection of symptomatic plants was confirm by using monoclonal antiserum specific against PVY^N, PVY^O and PVY^C in ELISA test. Results of this study indicated that Daland sample was infected by PVY^C, whereas Gorgan sample was infected by PVY^N and PVY^O strains. Results of RT-PCR test using both general and specific primers covering a part of coding region of CP confirmed infection of samples to PVY. This is the first report of PVY infection of pepper plants in Golestan province.

Keywords: Indicator plant, Pepper, *Potato virus Y,* RT-RCR, TAS-ELISA.