ردیابی مولکولی ویروس وای سیب‌زمینی با استفاده از آغازگرهای عمومی در استان اردبیل

آیسان قاسم زاده[1*]، نعمت سخندان بشیر[2] و رضا خاک ور[2]

تاریخ دریافت: 90/7/13 تاریخ پذیرش : 91/1/23

1- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه تبریز

2- به ترتیب دانشیار و استادیار، گروه گیاهپزشکی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تبریز

* مسئول مکاتبه : E-mail: aisangasemzadeh@yahoo.com

چکیده

ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*, PVY) مهم‌ترین ویروس آلوده‌کننده‌ی مزارع بادمجانیان در سراسر جهان می‌باشد. به منظور ردیابی پوتی‌ویروس‌ها در مزارع گیاهان خانواده‌ی بادمجانیان استان آذربایجان‌شرقی و اردبیل تعداد 112 نمونه‌ی گیاهی با علایم موزاییک، ابلقی و زردی جمع‌آوری و بعد از بررسی با آغازگرهای عمومی جنس پوتی‌ویروس، تعداد 23 نمونه آلوده تشخیص داده شدند. از بین نمونه‌های آلوده، نمونه‌هایی با علایم موزاییک و زردی به منظور ردیابی ویروس PVY همسانه‌سازی و تعیین ترادف گردیدند و در نهایت یکی از جدایه های مورد بررسی به عنوان PVY شناخته شد. برای تعیین جایگاه تاکسونومیک جدایه‌ی ایرانی، این جدایه با توالی‌های 165 جدایه-ی دیگر موجود در بانک اطلاعات ژنی همردیف‌سازی و مقایسه شدند. آنالیز فیلوژنتیک نشان داد که جدایه‌های مقایسه شده در 5 گروه قرار می‌گیرند و جدایه‌ی ایرانی همراه با جدایه‌های آمریکا، کانادا، انگلستان، چین، سوریه، فرانسه و لهستان در گروه یک قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، ویروس وای سیب‌زمینی، پوتی‌ویروس، آغازگرهای عمومی

Archive of SID

www.SID.ir

Molecular Detection of *Potato virus Y* using Universal Primers from Ardabil Province

A Ghasemzadeh[1*], N Sokhandanbashir[2] and R Khakvar[2]

Received: 5 October 2011 Accepted: 11 April 2012
[1] MSc Student, Dept of Plant Protection Faculty of Agriculture, the University of Tabriz, Iran
[2] Assoc Prof and Assist., Prof , Dept of Plant Protection Faculty of Agriculture, the University of Tabriz, Iran
*Corresponding Author: E-mail: aisangasemzadeh@yahoo.com

Abstract

Potato virus Y (PVY) is the most important virus that infects *Solanaceae* family worldwide. In order to detect potyviruses from *Solanaceae* in East Azarbaijan and Ardabil provinces, 112 samples with mosaic, mottling and yellowing symptoms were collected. Then, the samples were checked by Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with *Potyvirus* universal primers which ended up in detection of the virus from 23 samples. In order to identify PVY, some of these samples with mosaic and yellowing symptoms were selected for cloning and sequencing. Finaly one of them was recognized as PVY. For determination of taxonomic position of PVY isolate from Iran, the sequence data from Iranian PVY was aligned and compared with the related 165 isolates from GeneBank. Results of phylogenetic analyses showed that PVY isolates were grouped in 5 clusters wherein the Iranian PVY isolate was placed in cluster 1 together with isolates from America, Canada, Syria, France, England, China and Poland.

Keywords: Potato, *Potato virus Y*, *Potyvirus*, Universal primers

Archive of SID

مقدمه

بیماری‌های مختلفی گیاه سیب‌زمینی را آلوده می‌سازند که در این بین حداقل 37 گونه ویروس به صورت طبیعی موجب آلودگی می‌شوند(چتزیواسیلو 2008). در حال حاضر ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*, PVY) به عنوان مهم‌ترین ویروس آسیب‌رساننده به کشتزارهای سیب‌زمینی شناخته شده است(چتزیواسیلو 2008) این موضوع در مزارع سیب‌زمینی در ایران نیز بررسی شده و PVY مهم‌ترین عامل کاهش بازدهی در سیب‌زمینی شناخته شده است(حسینی و همکاران 2011). PVY عضو تیپ جنس پوتی‌ویروس (*Potyvirus*) و خانواده پوتی‌ویریده (*Potyviridae*) است. ژنوم یکپارچه‌ی این ویروس از آر.ان.ای تک رشته‌ای با قطبیت مثبت به طول 9/7 کیلو-باز تشکیل شده است (اسمیت 1931، هو و همکاران 2009 و حسینی و همکاران 2011). پیکره ویروس به شکل میله‌ای خمش‌پذیر به ابعاد 730× 11 نانومتر می‌باشد (اسمیت 1931). ویروس PVY به گیاهان خانواده‌ی بادمجانیان (*Solanaceae*) از جمله سیب‌زمینی، توتون، فلفل، گوجه‌فرنگی و همچنین به گیاهانی غیر از خانواده بادمجانیان از جمله علف‌های هرز خسارت وارد می‌کند (مصطفایی و همکاران 2008).

www.SID.ir

PVY در مزارع سیب‌زمینی طی دو مرحله اولیه و مراحل بعدی رشد علایم متفاوتی را نشان می‌دهد، اما تفکیک این علایم با توجه به این که تعداد ارقام سیب-زمینی زیاد می‌باشد و این موضوع موجب تنوع در علایم مشاهده شده می‌گردد، امکان پذیر نیست و از طرف دیگر به علت تفاوت شرایط آب و هوایی در مناطق مختلف، تفکیک علایم به طور دقیق میسر نیست. آلودگی غده‌ها طی مرحله‌ی دوم آلودگی اتفاق می‌افتد (اسمیت 1931 و هو و همکاران 2011). PVY حداقل با 25 گونه از شته‌ها و به روش ناپایا انتقال می‌یابد (اسمیت 1931). تاکنون پنج نژاد از PVY با نام‌های PVY^O، PVY^N، PVY^{NTN}، PVY^C و PVY^Z معرفی شده‌اند (حسینی و همکاران 2011). این طبقه‌بندی بر اساس تنوع علایم ایجاد شده و دامنه‌ی میزبانی صورت گرفته است. اما اخیرا برای طبقه‌بندی PVY آنالیز آر. اف.ال.پی[1] بر اساس منطقه‌ی پروتئین پوششی حاصل از آی.سی آر تی- پی سی آر[2] استفاده شده و بر این اساس جدایه های PVY به سه دسته‌ی بزرگ PVY^N ، PVY^O و PVY^{NP} تقسیم می‌شوند (مصطفایی و همکاران 2008). ردیابی PVY با کمک روش‌های مختلف از جمله روش-های سرولوژیکی و مولکولی صورت گرفته است و با استفاده از روش‌های مولکولی بخش‌های مختلف ژنوم این ویروس ردیابی و تعیین ترادف شده است (بوخریس و همکاران 2007، لورنزن و همکاران 2008). در حال حاضر تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل از جدایه های مختلف این ویروس در دسترس می‌باشد (هو و همکاران 2011). در ایران نیز با استفاده از روش‌های مولکولی این ویروس ردیابی، بخش‌های ژنومی P1 و CP تعیین ترادف و در اختیار بانک اطلاعات ژنی قرار گرفته است (حسینی و همکاران 2011).

طی این تحقیق ردیابی مولکولی ویروس وای سیب‌زمینی با استفاده از آغازگرهای عمومی (یونیورسال) ردیابی‌کننده جنس پوتی‌ویروس از گیاهان خانواده بادمجانیان مزارع استانهای آذربایجان‌شرقی و اردبیل مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت ترادف نوکلئوتیدی بخشی از منطقه ژنومی NIb جدایه‌ای از این ویروس با سایر جدایه‌های جهان از لحاظ فیلوژنتیکی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

منابع ویروسی و استخراج آر. ان .ای کل گیاهی

طی بهار و تابستان سال 1389 تعداد 112 نمونه گیاهی از مزارع گیاهان خانواده بادمجانیان استان آذربایجان‌شرقی و اردبیل با مشاهده‌ی علایم مشکوک به ویروس وای سیب‌زمینی از جمله موزاییک، ابلقی و زردی جمع‌آوری شدند (جدول 1). نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و بخشی از نمونه‌ها بر روی پودر کلریدکلسیم خشک و در فریزر 20- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج آر.ان.ای نمونه‌های گیاهی با استفاده از روش روحانی و همکاران انجام گرفت (روحانی و همکاران 1993). نمونه‌های جمع‌آوری شده به منظور بررسی‌های گلخانه‌ای بر روی گیاهان سلمه-تره و توتون مایه‌زنی شدند.

سنتز cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش سنتز رشته اول مکمل آر.ان.ای با آنزیم رونوشت‌بردار معکوس Moloney murine leukemia) virus reverse transcriptase ,Life Technologies Ltd) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. مخلوط واکنش رونوشت‌بردار معکوس (RT) در حجم نهایی 10 میکرولیتر با مخلوط کردن دو میکرولیتر بافر پنج برابرExpand RT، یک میکرولیتر از dNTP 10 mM مخلوط، 0/25 میکرولیتر از RNase inhibitor 40U ، یک میکرولیتر از 100pmol از آغازگر NIb3R ، یک میکرولیتر از آر.ان.ای استخراج شده و 100 U آنزیم نسخه‌بردار معکوس تهیه شد. پروفیل حرارتی متشکل از یک چرخه 42 درجه به مدت 60 دقیقه برای فعالیت بهینه آنزیم رونوشت بردار معکوس و آنگاه یک سیکل 70 درجه به

[1] RFLP
[2] IC-RT-PCR

Archive of SID

www.SID.ir

مدت 10 دقیقه برای غیرفعال‌سازی آنزیم فوق قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی دی.ان.ای مکمل (cDNA) حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس در حجم نهایی25 میکرولیتر انجام گرفت. مخلوط واکنش PCR شامل 2/5 میکرولیتر از *Taq* DNA polymerase buffer (10 x)، یک میکرولیتر از $MgCl_2$ 50 mM ، 0/5 میکرولیتر از dNTP 10mM، 1/25 میکرولیتر از آغازگر NIb2F (پیشرو) در غلظت نهایی 5 پیکومول با ترادف 5’ GTI TGY GTI GAY GAY TTY AAY AA 3’، 0/32 میکرولیتر NIb3R (پیرو) در غلظت نهایی پنج پیکومول با ترادف 5’TCI ACI ACI GTI GAI GGY TGN CC 3́، 1/25 U از آنزیم *Taq* DNA Polymerase Life Technologies Ltd) و دو میکرولیتر DNA بود. برنامه‌ی PCR قبلا شرح داده شده است (زنگ و همکاران 2010).

همسانه‌سازی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی

محصول PCR با اندازه قطعات مورد انتظار با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA شرکت فرمنتاس خالص‌سازی و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده در پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی شد. پلاسمیدها از کلنی‌های سفید مشاهده شده با روش لیز آلکالینی (سمبوروک و همکاران 1989) و کیت استخراج پلاسمید شرکت کیاژن استخراج شدند و سپس با استفاده از آنزیم‌های برشی حضور قطعه‌ی مورد انتظار در پلاسمیدهای نوترکیب تایید شد. پلاسمیدها به منظور تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (کره‌جنوبی) ارسال گردیدند. تعیین ترادف با استفاده از آغازگر عمومی M13F انجام شد.

جدول 1- تعداد و محل نمونه های گیاهان تیره بادمجانیان و میزان آلودگی آنها به پوتی‌ویروس‌ها در استان آذربایجان‌شرقی و اردبیل در تابستان 1389

تعداد نمونه های آلوده	تعداد نمونه های مورد آزمایش	محصول	محل نمونه برداری
1	1	گوجه فرنگی	تبریز(حکم آباد)
0	2	گوجه فرنگی	تبریز(خلعت پوشان)
1	2	فلفل	شبستر(شندآباد)
1	3	بادمجان	شبستر(شند آباد)
1	4	سیب زمینی	سراب
2	3	سیب زمینی	اردبیل(آقاباقر)
1	3	سیب زمینی	اردبیل(هیر)
1	2	سیب زمینی	اردبیل(کهرلان)
10	15	سیب زمینی	اردبیل(قره لر)
0	3	سیب زمینی	اردبیل(پیراقوم)
3	5	سیب زمینی	اردبیل(نیار)
2	2	سیب زمینی	اردبیل(ترپاخلی)

Archive of SID

www.SID.ir

آنالیز فیلوژنتیک

پس از تعیین ترادف قطعه‌ی مورد نظر، با استفاده از نرم‌افزار GeneDoc جدایه‌ی مورد نظر با سایر جدایه‌های PVY موجود در بانک اطلاعات ژنی که حاوی منطقه‌ی مورد نظر می‌باشند، همردیف‌سازی چندگانه شدند. فایل‌های همردیف‌سازی شده در نرم-افزار Treecon برای تجزیه فیلوژنی به روش فاصله‌ی ژنتیکی استفاده شدند. در این آنالیز از ترادف ویروس آ سیب‌زمینی (PVA) (GU144321) به عنوان ریشه خارجی[1] استفاده شد.

نتایج و بحث

ویروس PVY یکی از رایج‌ترین بیمارگرهای شناسایی شده از مزارع سیب‌زمینی و عضو تیپ جنس پوتی‌ویروس می‌باشد (لورنزن و همکاران 2006). این ویروس از مناطق مختلف ایران و از میزبان‌های گوناگون با روش‌های سرولوژیکی و مولکولی شناسایی شده است (مجدآبادی و همکاران 2011، غلامی و همکاران 2007، صادقی و همکاران 2008، مصطفایی و همکاران 2008 و حسینی و همکاران 2011). PVY که در بررسی‌های گذشته از استان اردبیل با آغازگرهای اختصاصی براساس منطقه‌ی ژنومی CP ردیابی شده بود (No. EF192318)، طی این بررسی با استفاده از آغازگرهای عمومی جنس پوتی‌ویروس ردیابی شده و بخشی از منطقه‌ی ژنومی NIb تعیین ترادف گردید.

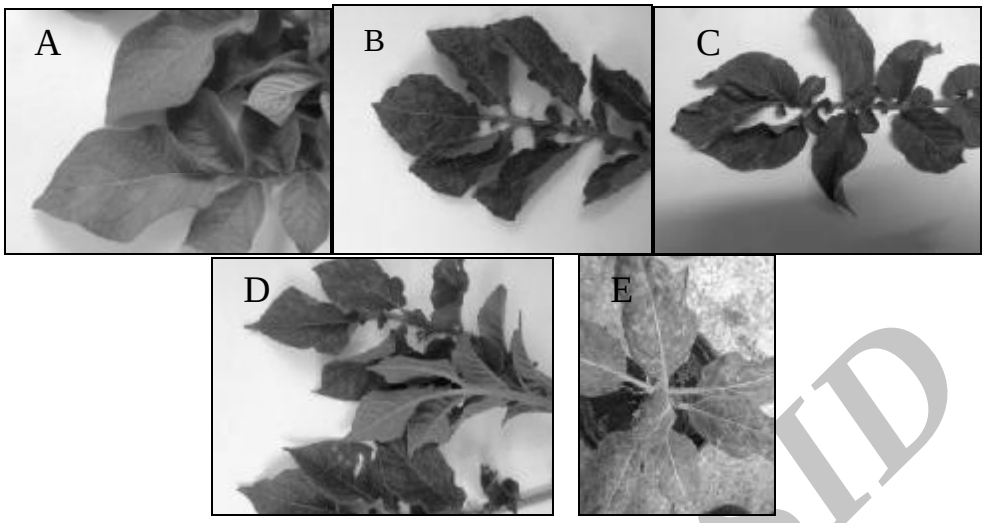
در بررسی‌های مزرعه‌ای سعی بر این شد که نمونه‌هایی با علایم موزاییک، ابلقی، موجی‌شدن حاشیه برگ‌ها، کوتولگی، نکروز، مرگ گیاه و حتی گیاهان فاقد علایم جمع‌آوری گردند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع سیب‌زمینی علایم متفاوتی را نشان می‌دادند که قابل تفکیک بودند (شکل 1. A، B، C و D). در مراحل بعدی این تحقیق که ویروس PVY از گیاه سیب‌زمینی ردیابی شد، به منظور بررسی‌های گلخانه‌ای جدایه‌ی ویروسی ردیابی شده بر روی گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* cv.Samsun) مایه‌زنی و علایم موزاییک و روشن شدن برگ‌ها مشاهده گردید (شکل 1. E).

از بین 112 نمونه‌ی گیاهی جمع‌آوری شده تعداد 45 نمونه از 12 منطقه‌ی مختلف انتخاب شدند که در نهایت 23 نمونه با استفاده از آغازگرهای عمومی جنس پوتی‌ویروس به عنوان گیاهان آلوده به پوتی-ویروس شناخته شدند و در مرحله‌ی بعدی پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی مشخص شد که ویروس آلوده-کننده‌ی گیاه سیب‌زمینی در یکی از مناطق استان اردبیل (روستای قره لر) ویروس وای سیب‌زمینی می‌باشد. جدایه‌ی Adb-pot187 به ویروس ردیابی شده اطلاق گردید. قطعه‌ی مورد انتظار تکثیر یافته با آغازگرهای عمومی، 350 نوکلئوتید بود (شکل 2). منطقه‌ی ژنومی تکثیر یافته شامل بخش کوچکی از مرکز ژن NIb می-باشد. ترادف حاصل از جدایه Adb-pot187 در بانک اطلاعات ژنی قرار داده شد (جدول 2). برای مقایسه‌ی جدایه‌ی Adb-pot187 با سایر جدایه‌ها اطلاعات موجود در بانک اطلاعات ژنی بررسی شدند. نتیجه‌ی این بررسی نشان داد که 165 جدایه از بین 1142 جدایه‌ی PVY حاوی منطقه‌ی ژنومی ترادف‌یابی شده از جدایه‌ی Adb-pot187 می‌باشد. با اینکه ترادف نوکلئوتیدی حدود 43 جدایه‌ی ایرانی نیز در بانک اطلاعات ژنی موجود می‌باشد اما تنها بخش‌های ژنی P1، CP و 3́UTR از آنها در دسترس است و تنها از یک جدایه‌ی ایرانی بخش انتهایی ژنوم NIb تعیین ترادف شده است که با منطقه‌ی ترادف شده‌ی جدایه‌ی Adb-pot187 همخوانی ندارد بنابراین درخت فیلوژنتیک حاصل از همردیف‌سازی با 165 جدایه از نقاط مختلف جهان با جدایه‌ی مورد نظر ترسیم گردید (شکل 3).

[1] Out group

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 1- مقایسه‌ی علایم نمونه‌ی آلوده به ویروس PVY با سایر نمونه‌های ردیابی شده با آغازگرهای NIb2F/NIb3R . A: کوتولگی گیاه و موزاییک در حاشیه‌ی برگ ها، **B**: زبری سطح برگ، موجی شدن حاشیه برگ و موزاییک شدید، **C**: روشن شدن برگ‌ها و موزاییک خفیف، **D**: موزاییک شدید و موجی‌شدن حاشیه برگ ها (این نمونه پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی به عنوان ویروس وای سیب‌زمینی شناخته شد)، **E**: علایم موزاییک و روشن‌شدن رگبرگ‌ها بر روی گیاه توتون (***Nicotiana tabacum* cv. Samsun**) مایه‌زنی شده با بافر فسفات پتاسیم 0/1 مولار در شرایط گلخانه‌ای.

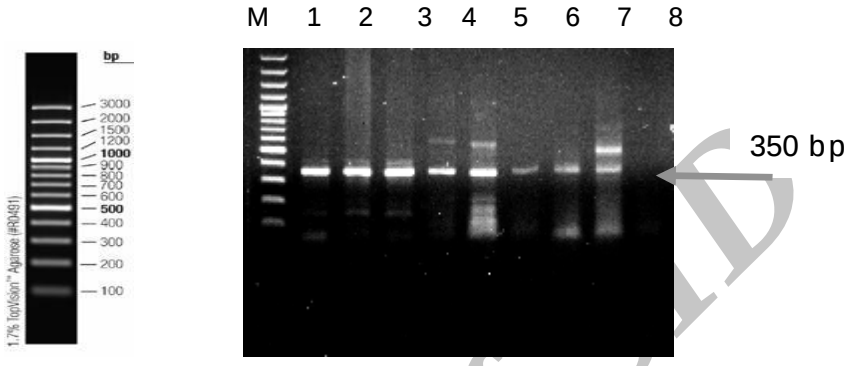
چنانچه مشاهده می‌شود کلیه‌ی جدایه‌های آنالیز شده در 5 گروه قرار گرفتند (شکل 3). در گروه یک جدایه‌ی ایرانی به همراه 26 جدایه از آمریکا، سه جدایه از کانادا، دو جدایه از سوریه، یک جدایه از فرانسه، سه جدایه از آلمان، سه جدایه از چین، سه جدایه از انگلستان و سه جدایه از لهستان قرار دارد. موقعیت جدایه‌ی ایرانی در بین سایر جدایه‌ها متمایز است و این بخاطر منشأ جغرافیایی متفاوت آن می‌باشد. در میان جدایه‌های گروه 1، جدایه‌ی ایرانی به 3 جدایه از کشور لهستان با رس شمارهای AF062999، EF558554 و AJ890349 نزدیک‌تر می‌باشد و بیش‌ترین تشابه نوکلئوتیدی در بین آنها 98 درصد است. جدایه‌های قرار گرفته در گروه 1 متعلق به نژادهای O، N:O و NW می‌باشند. بررسی نژادهای ویروس PVY بر پایه‌ی روش مولکولی بیش‌تر بر اساس مناطق ژنومی Hc/pro-P3، 6K2-NIa و 3́UTR-CP انجام می‌شود (پیچ و همکاران 2004)، به همین دلیل تعیین نژاد جدایه‌ی ایرانی براساس منطقه‌ی کوچکی از NIb امکان‌پذیر نمی‌باشد. اما با توجه به این موضوع که جدایه‌ی ایرانی در کنار جدایه‌هایی قرار دارد که نژاد O، NW یا N:O را دارند و از طرفی جدایه‌های نزدیک به آن متعلق به نژاد NW می‌باشند، احتمالا این جدایه از ایران متعلق به نژاد NW می‌باشد. حسینی و همکاران نیز در سال 2011 با بررسی مناطق ژنومی P1، CP و 3́UTR در 14 جدایه‌ی ایرانی بیان داشتند که تعیین نژاد PVY بر پایه‌ی تجزیه فیلوژنتیک هر یک از این مناطق امکان‌پذیر نیست و می‌بایستی مجموع این مناطق با سایر جدایه‌های موجود در بانک اطلاعات ژنی مقایسه گردد (حسینی و همکاران 2011).

در این بررسی آغازگرهای مورد استفاده بخشی از منطقه‌ی NIb را تکثیر دادند. این آغازگرها در بین سایر آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی اعضای جنس پوتی‌ویروس از بیش‌ترین کارایی ردیابی برخوردار می‌باشند (زنگ و همکاران 2008). از بین ترادف‌های موجود در بانک اطلاعات ژنی تنها 165 جدایه

Archive of SID

www.SID.ir

از ویروس PVY شامل بخش ژنومی NIb می‌باشند که در تعیین روابط فیلوژنتیک با جدایه‌ی ایرانی مورد استفاده قرار گرفتند. در دیگر بررسی‌های انجام گرفته در ایران به منظور ردیابی مولکولی این ویروس استفاده از آغازگرهای اختصاصی منطبق بر مناطق ژنومی P1، CP و 3́UTR از گیاهان خانواده‌ی بادمجانیان صورت گرفته است (مجدآبادی و همکاران 2011، غلامی و همکاران 2007، صادقی و همکاران 2008، مصطفایی و همکاران 2008 و حسینی و همکاران 2011).



شکل 2- نتایج آزمون RT-PCR در ژل آگارز 1/2 %. 1 ، 2 ، 5 ، 6 و 7: نمونه های آلوده به پوتی‌ویروس از گیاه سیب زمینی ، 3: نمونه‌ی آلوده به پوتی‌ویروس از گیاه بادمجان، 4: نمونه ی آلوده به پوتی‌ویروس از گیاه گوجه فرنگی، 8: نمونه آلوده به پوتی‌ویروس از گیاه فلفل،9 : شاهد منفی (نمونه ی آب)، M: مارکر 100 bp

جدول 2- رس شمار، میزبان ، منشأ (کشور) و جدایه‌ها یا استرین‌های PVY موجود در بانک اطلاعات ژنی

جدایه یا استرین	میزبان	کشور	رس شمار	جدایه یا استرین	میزبان	کشور	رس شمار
ID1269	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912882	CO1960	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912915
ID315	*Solanum tuberosum*	آمریا	HQ912881	CO2140	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912914
ID253	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912880	CO1827	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912912
ID331	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912879	CO286	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912911
ME27	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912878	CO1750	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912910
ME227	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912877	CO303	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912909
ME89-107	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912876	CO2374	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912908
ID243	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912895	CO2146	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912907
Del-66	potato	هند	JN034046	CO1898	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912906
N Nysa	*Solanum tuberosum*	لهستان	FJ666337	CO284	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912905
CO2081	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912913	CO289	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912904
ID883	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912894	CO2294	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912903
ME178	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912875	CO2352	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912902
ME131	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912874	CO2194	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912901
ME236-77	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912873	CO2272	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912900
ME162	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912872	CO2247	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912899
ME142	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912871	CO1801	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912898
ID14_2_14a	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912870	CO2122	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912897
ID155	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912869	LR	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912896

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه جدول 2

N3	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912868	ID281	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912893
ID20	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912867	ME120	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912892
A95	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912866	ME236-4	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912891
CW	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912865	ID1_5_62A	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912890
ICIA	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912864	ME200	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912889
N1	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912863	ID130	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912888
ID431	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912862	ID1010	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912887
PVY-12	potato	سوریه	AB185833	ID968	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912886
SYR-NB-16	potato	سوریه	AB270705	ID11_27_57 B	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912885
SYR-Wi-11	potato	سوریه	AB185832	ME286-58	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912884
RB	*Solanum tuberosum*	کانادا	HM367076	ID988	*Solanum tuberosum*	آمریکا	HQ912883
HN2	*Solanum tuberosum*	چین	GQ200836	FL	*Solanum tuberosum*	کانادا	HM367075
SYR-III-L4	-	سوریه	AB461454	PVY-Bu3	-	سوریه	AB461489
PRI-509	*Solanum tuberosum*	هلند	EU563512	PVY-27	-	سوریه	AB461450
WA-13 quan	-	چین	HM590407	SD1	-	چین	EU182576
Guiding-3	-	چین	HM590405	HC-2 quan	-	چین	HM590406
E30	*Nicotiana tabacum*	لهستان	HM991453	FrKV15	*Solanum tuberosum*	فرانسه	HM991454
Mb112	-	کانادا	AY745491	N:O-L56	-	کانادا	AY745492
N-Jg	-	کانادا	AY166867	Hungarian	-	مجارستان	M95491
PB312	-	آمریکا	EF026075	Tu 660	-	کانادا	AY166866
Alt	-	آمریکا	AY884985	PVY-Oz	-	آمریکا	EF026074
Mont	-	آمریکا	AY884983	RRA-1	-	آمریکا	AY884984
PVY	-	لهستان	AF062999	42 3-3	-	آمریکا	AY884982
ME56	-	آمریکا	FJ643478	ME173	-	آمریکا	FJ643479
SYR-II-SP8	-	سوریه	AB461486	ID269	-	آمریکا	FJ643477
PB209	-	آمریکا	EF026076	SYR-II-S	-	سوریه	AB461484
SYR-II-L1	-	سوریه	AB461480	SYR-II-L3	-	سوریه	AB461482
SYR-II-Be5	-	سوریه	AB461476	SYR-II-Bu5	-	سوریه	AB461478
SYR-II-Be3	-	سوریه	AB461472	SYR-II-Be4	-	سوریه	AB461474
SYR-III-A26/NTN	*Physalis sp*	سوریه	AB461468	SYR-II-A27	*Physalis sp*	سوریه	AB461470
SYR-II-4Z	-	سوریه	AB461462	SYR-II-A20	*Solanum nigrum*	سوریه	AB461466
SYR-III-2-4	-	سوریه	AB461458	SYR-III-2-5	-	سوریه	AB461460
SYR-II-DrH	-	سوریه	AB461453	SYR-I-15	-	سوریه	AB461456
SYR-II-2-8	-	سوریه	AB461451	SYR-II-Be1	-	سوریه	AB461452
NE-11	-	آمریکا	DQ157180	Chile3	*Capsicum baccatum*	شیلی	FJ214726
ID-1	-	آمریکا	DQ157178	OR-1	-	آمریکا	DQ157179
n/np	pepper	ایتالیا	AF237963	PN10A	-	آمریکا	DQ008213
MN	-	آمریکا	AF463399	Egypt	-	مصر	AF522296
N27-92	*Solanum tuberosum*	کانادا	PVU09508	Commonstra in	*Solanum tuberosum*	کانادا	PVU09509
HR1	-	آمریکا	FJ204166	Foggia	-	ایتالیا	EU482153
N4	-	آمریکا	FJ204164	L26	-	آمریکا	FJ204165
NTNON92	-	ژاپن	AB331519	SD5	-	چین	FJ560596

Archive of SID

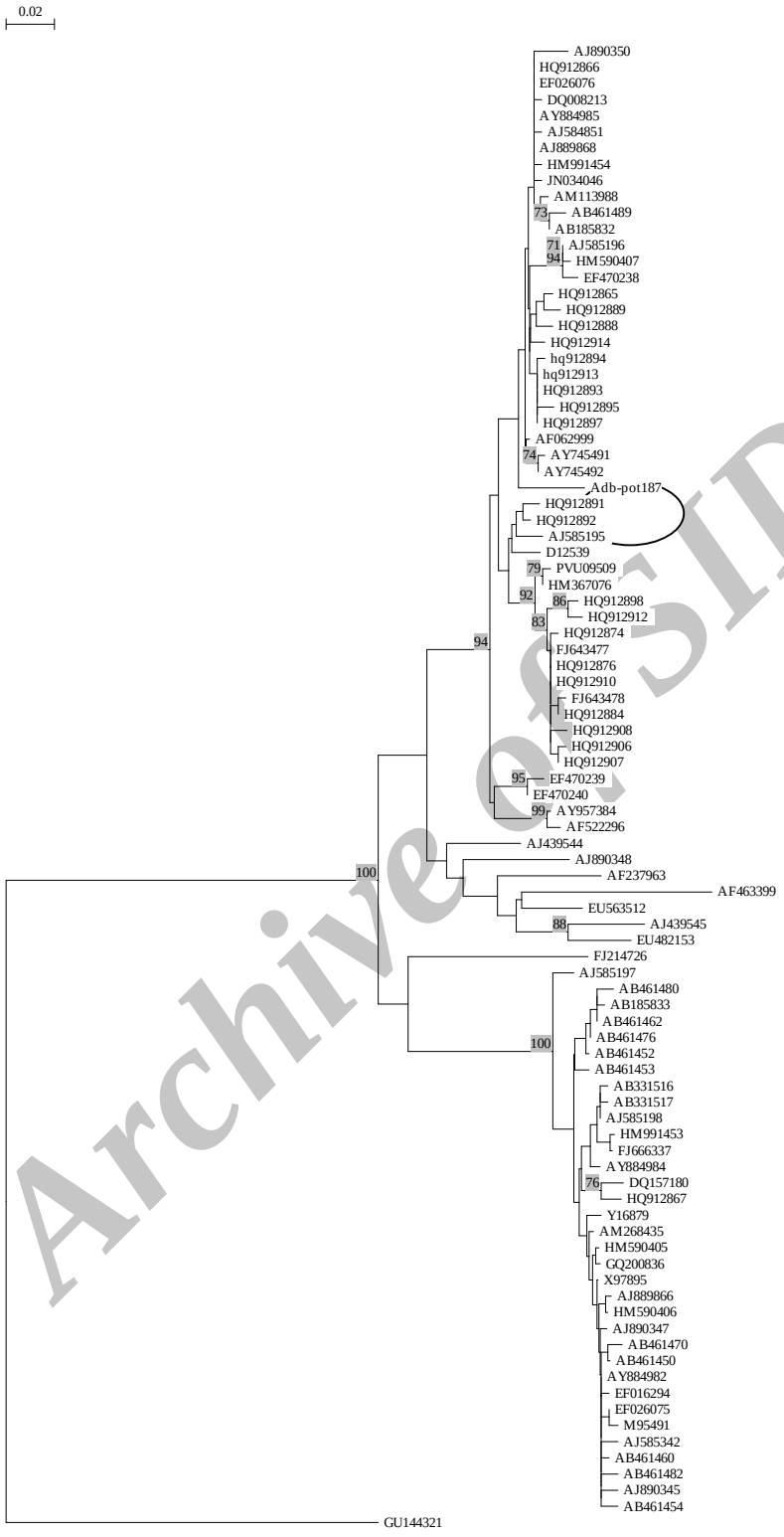
www.SID.ir

ادامه جدول 2

NTNHO90	-	ژاپن	AB331517	NTNNN99	-	ژاپن	AB331518
NTND6	-	ژاپن	AB331515	NTNOK105	-	ژاپن	AB331516
N	-	-	D00441	O	-	ژاپن	D12539
Wilga	-	لهستان	EF558545	-	-	-	NC_001616
SD3	tobacco	چین	EF470240	SD4	tobacco	چین	EF470241
SD1	tobacco	چین	EF470238	SD2	tobacco	چین	EF470239
4-261	*Solanum tuberosum*	آلمان	AM113988	New Zealand	*Solanum tuberosum*	نیوزلند	AM268435
LW	*Solanum tuberosum*	لهستان	AJ890349	5	*Solanum tuberosum*	آلمان	AJ890350
Satina	*Solanum tuberosum*	آلمان	AJ890347	Adgen	*Solanum tuberosum*	فرانسه	AJ890348
Linda	*Nicotiana tabacum*	آلمان	AJ890345	Nicola	*Nicotiana tabacum*	آلمان	AJ890346
Gr99	*Nicotiana tabacum*	لهستان	AJ890343	Ditta	*Nicotiana tabacum*	لهستان	AJ890344
Var156	-	آلمان	AJ889868	34/01	*Nicotiana tabacum*	لهستان	AJ890342
12-94	-	لهستان	AJ889866	156	-	آلمان	AJ889867
-	-	-	Y16879	v942490	-	انگلستان	EF016294
SON41	*Solanum nigrum*	فرانسه	AJ439544	605	-	سویس	X97895
N	tobacco	چین	AY957384	LYE84.2	*Lycopersicon esculentum*	اسپانیا	AJ439545
NIB-NTN	*Solanum tuberosum*	اسلونیا	AJ585342	O	potato	چین	AY953328
SCRI-N	*Solanum tuberosum*	انگلستان	AJ585197	SASA-61	*Solanum tuberosum*	انگلستان	AJ585198
SASA-110	*Solanum tuberosum*	انگلستان	AJ585195	SCRI-O	*Solanum tuberosum*	انگلستان	AJ585196
N	-	-	X12456	SASA 207	*Solanum tuberosum*	انگلستان	AJ584851
PVA-143	potato	انگلستان	GU144321	-	-	-	A08776
				Adb-pot187	*Solanum tuberosum*	ایران	JF707767

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 3- تجزیه فیلوژنتیکی به روش neighbor joining بدست آمده از همردیف‌سازی 350 نوکلئوتید از ژن پروتئین NIb از 165 جدایه‌ی PVY. جدایه های با فاصله ی ژنتیکی یکسان حذف شده اند و 92 جدایه در درخت فیلوژنتیک مشاهده می شود. تعداد 100 تکرار bootstrap برای حصول اطمینان از روابط فیلوژنتیک به کار رفته است. مقادیر bootstrap بیشتر از 70 روی گره‌ها نشان داده شده‌اند و ریشه‌های با ارقام کمتر از آن فشرده شده اند.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

در این تحقیق بخش دیگری از منطقه ژنومی ویروس وای سیب‌زمینی با استفاده از آغازگرهای عمومی از سیب‌زمینی مورد ردیابی و تعیین ترادف قرار گرفت. پس از آنکه ترادف نوکلئوتیدی قطعه تکثیر یافته تعیین و با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات ژنی مورد مقایسه قرار گرفت، تأیید شد که قطعهٔ مذکور متعلق به PVY بوده است. بررسی فیلوژنتیک نشان داد که جدایه-ی ایرانی با جدایه‌هایی از آمریکا، کانادا، انگلستان، چین، سوریه، فرانسه و لهستان در یک گروه قرار می‌گیرند.

منابع مورد استفاده

مجدآبادی فراهانی س، جعفرپور ب، فلاحتی رستگار م و سبک خیز م.ع. 2011. ردیابی و شناسایی نژاد PVY^{NTN} در مزارع سیب‌زمینی استان خراسان رضوی. نشریه حفاظت علوم گیاهی، جلد 24، صفحه های 385 تا390.

Boukhris Bouhachem 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.

Chatzivassiliou EK, Moschos E, Gazi S, Koutretsis P and Tsoukaki M, 2008. Infection of potato crops and seeds with *Potato virus y* and *Potato leafroll virus* in Greece. Journal of Plant Pathology 90: 253-261.

Gholami S, Koohi habibi M, Boushehri AA and Naghavi MR, 2007. Detection of *Potato virus y* by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Iranian journal of agricultural sciences 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.

Hu X, Karasev AV, Brown CJ and Lorenzen JH, 2009. Sequence characteristics of *Potato virus Y* recombinants. J Gen Virol 90: 3033-3041.

Hu X, Nie X, He Ch and Xiong X, 2011. Differential pathogenicity of two different recombinant PVY^{NTN} isolates in *Physalis florida* is likely determined by the coat protein gene. Virology Journal 8:207.

Lorenzen JH, Meacham T, Berger PH, Shiel PJ, Crosslin JM, 2006. Whole genome characterization of *Potato virus Y* isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. Arch Virol 151: 1055–1074.

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

Mostafae S, Mosahebi G, Koohi Habibi M and Ansari Dezfouli E, 2008. Study of biological and molecular characterization of pepper-PVY isolated from Tehran pepper fields and it's comparison with other PVY isolates. Iranian Journal of Virology, 2:4.

Archive of SID

www.SID.ir

Piche LM, Singh RP, Nie X and Gudmestad NC, 2004. Diversity among *Potato virus Y* isolates obtained from potatoes grown in the United States. Phytopathology 94: 1368-1375.

Rowhani A, Chay C, Golino DA and Falk BW, 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of *Grapevine fanleaf virus* in grapevine tissue. Phytopathology 83: 749-753.

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.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. Small-scale preparations of plasmid DNA. P. 25-32. In N.Y. Woodbury. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

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

Zheng L, Wayper PJ, Gibbs AJ, Fourment M, Rodoni BC and Gibbs MJ, 2008 b. Accumulating variation at conserved sites in *Potyvirus* genome is driven by species discovery and effects degenerate primer design. PLoS ONE, 3: e 1586.

Zheng L, Rodoni BC, Gibbs MJ and Gibbs AJ, 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant pathology 59: 211-220.

Archive of SID

www.SID.ir