

مقایسه خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه ویروس رگه‌ای توتون (*Tobacco streak virus*) جدا شده از مزارع آفتابگردان ایران با جدایه‌های هندی و سودانی

ثمین‌السادات حسینی فرهنگی^{۱*}، استفان وینتر^۲، غلامحسین مصاحبی^۳،

مینا کوهی حبیبی^۴ و نورالدین هایلی^۵

۱، ۳، ۴، دانشجوی سابق دکتری و دانشیاران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲، رئیس موسسه ویروس شناسی DSMZ، برانشویگ، آلمان

۵، عضو هیات علمی گروه حفاظت گیاهان، دانشکده کشاورزی دانشگاه آدلاید استرالیا

(تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۰ - تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۲۰)

چکیده

ویروس رگه‌ای توتون (*Tobacco streak virus*) متعلق به جنس ایلاروویروس (*Ilarvirus*) بوده و به طیف وسیعی از گیاهان از جمله آفتابگردان (*Helianthus annuus*) که یکی از گیاهان دانه روغنی مهم در بسیاری از کشورها می‌باشد خسارت وارد می‌کند. در این تحقیق در سال ۲۰۰۸ دو جدایه آفتابگردان و یک جدایه باقلا به ترتیب جدا شده از مزارع ایران، هند و سودان، جمع‌آوری شد و برخی از خصوصیات مولکولی و بیولوژیکی آنها مورد مقایسه قرار گرفت. وزن مولکولی پروتئین پوششی سه جدایه با استفاده از روش SDS-PAGE، ۳۰/۹ کیلودالتون تعیین شد. آزمون وسترن بلات این نتایج را تأیید کرد. در شرایط آزمایشگاهی ویروس قادر به آلوده سازی در برخی گیاهان بود. دامنه میزبانی و میزان علائم ایجاد شده توسط این سه جدایه متفاوت بود. با استفاده از آزمون TAS-ELISA و آنتی‌بادی مونوکلونال TSV (AP-696 DSMZ) هیچ تنوع سرولوژیکی مشاهده نشد. برای هر جدایه یک قطعه ۷۴۷ نوکلئوتیدی با پرایمر اختصاصی ناحیه CP تکثیر شد. آنالیز توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه پروتئین پوششی این جدایه‌ها نشان داد که جدایه ایرانی و جدایه سودانی با هم در یک گروه قرار می‌گیرند و جدایه هندی با حدود ۹۱٪ تشابه در گروه جداگانه‌ای قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: ویروس رگه‌ای توتون، پروتئین پوششی، آفتابگردان، وسترن بلات،

RT-PCR و TAS-ELISA

مقدمه

شده است (Berglund, 2007). یکی از ویروس‌ها که خسارت زیادی به این محصول وارد می‌کند، ویروس رگه‌ای توتون (*Tobacco streak virus*) است. این ویروس متعلق به جنس ایلاروویروس و خانواده بروموویریده (*Bromoviridae*) است. ژنوم ویروس مانند

آفتابگردان (*Helianthus annuus*) از جمله گیاهان دانه روغنی مهم است. با افزایش سطح زیر کشت این گیاه، آفات و بیماری‌های بسیاری آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. تاکنون حدود ۳۰ بیماری از آفتابگردان گزارش

میزبان تکثیری مناسب، مورد بررسی قرار گرفتند. برای خالص سازی بیولوژیکی جدایه‌های فوق از گیاه سلمه تره (*Chenopodium quinoa*) با روش تک لکه استفاده شد. سپس جدایه ایران بر روی گیاه باقلا (*Vicia faba*) و جدایه سودان بر روی توتون (*Nicotiana benthamiana*) مایه‌زنی شدند و به عنوان منبع ویروس در گلخانه نگهداری شدند. جدایه هندی نیز بر روی *C. quinoa* تکثیر و نگهداری شد. برای مایه‌زنی از بافر فسفات ۰/۰۵ مولار pH 7 حاوی یک میلی‌مولار EDTA، پنج میلی‌مولار Na-DIECA، پنج میلی‌مولار تیوگلیکولیک اسید، ۰/۰۱ درصد پودر سیلیت و زغال فعال استفاده شد.

مقایسه دامنه میزبانی

به منظور مقایسه دامنه میزبانی جدایه‌های ایران، سودان و هند، ۲۷ گونه گیاهی متعلق به هفت خانواده مایه‌زنی مکانیکی شدند. گیاهان مایه‌زنی شده در گلخانه با شرایط °C ۲۵-۲۳ و دوره روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه روز نگهداری شدند.

آزمون داس الیزا (DAS-ELISA) و تاس الیزا (TAS-ELISA)

برای تشخیص ویروس TSV در میزبان‌های تکثیری از آزمون داس‌الیزا و آنتی‌بادی پلی کلونال TSV Clark & Adams (AS-906-DSMZ) بر اساس روش (1977) استفاده شد. برای مقایسه خصوصیات سرولوژیکی جدایه‌های مختلف ایران، سودان و هند، از یک آنتی‌بادی مونوکلونال تهیه شده در موسسه DSMZ آلمان برای ویروس TSV (AP-696 DSMZ) و بر طبق دستورالعمل معمول تاس‌الیزا استفاده گردید (Jordan, 1990).

ایمونوالکترون میکروسکوپی (IEM)

مشاهده پیکره های ویروس با دستگاه میکروسکوپ الکترونی مستقر در DSMZ و بر اساس روش دکوراسیون Milne & Luisoni (1977) انجام شد.

تعیین و مقایسه وزن مولکولی پروتئین پوششی سه

جدایه TSV

برای تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی (CP) از ژل پلی اکریل آمید حاوی سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) بر روی ژل جداکننده با غلظت ۱۵٪ و

سایر اعضای بروموویریده به صورت RNA مثبت، تک رشته‌ای و سه بخشی می‌باشد. ویروس TSV برای اولین بار توسط Dijkstra (1983) از آفتابگردان‌های هلند گزارش شد. در ایران برای اولین بار توسط Hosseini et al. (2006) از آفتابگردان جداسازی شد. در سالهای ۲۰۰۵-۲۰۰۶ در شمال سودان علایم ویروس بر روی گیاه باقلا (*Vicia faba*) مشاهده شد که خسارت زیادی به این محصول وارد کرد. نتایج تحقیقات انجام شده نشان داد که این علایم در اثر TSV ایجاد شده‌اند (Ali et al., 2008). در استرالیا ویروس برای اولین بار توسط Greber (1971) از روی توتون، توت فرنگی، گل کوبک شناسایی شد. Sharman et al. (2008) TSV را از روی آفتابگردان، پنبه، نخود، ماش و سپس در سال ۲۰۰۹، از روی علفهای هرز Parthenium در استرالیا جداسازی کردند. علایم TSV بر روی آفتابگردان عبارتند از: رگه‌های سیاه روی ساقه و دمبرگ، کوتولگی و کاهش رشد، کوتاه شدن فاصله بین گره‌ها، بدشکلی و لکه‌های زرد روی برگ و در نهایت مرگ گیاه. میزان خسارت بیماری در مناطق و مزارع مختلف، متنوع می‌باشد. میزان خسارت در مزارع آفتابگردان هند از سه تا ۱۰۰ درصد متغیر است (Rao et al., 2000). خسارت وارده بستگی به مرحله رشد گیاه و زمان آلودگی دارد. آلودگی در مراحل انتهایی رشد تنها باعث ایجاد علایم خفیف‌تر شده و تأثیر کمی بر روی رشد و میزان محصول دارد. در آزمایشگاه، ویروس به راحتی از طریق مکانیکی قابل انتقال است. آزمایشات نشان داده که دانه‌های گرده در انتقال این ویروس به گیاهان می‌توانند نقش داشته باشند که در این بین تریپس در انتقال دانه‌های گرده نقش عمده‌ای ایفا می‌کند (Greber et al., 1991).

مواد و روش‌ها

تکثیر جدایه‌های TSV در شرایط گلخانه

در سال ۲۰۰۸ یک جدایه ایرانی جمع‌آوری شده از استان تهران (43R)، یک جدایه هندی (In) جدا شده از روی آفتابگردان ایالت اندراپرادش و یک جدایه سودانی جدا شده از روی باقلا (S1)، که دو جدایه هندی و سودانی در مجموعه DSMZ آلمان موجود بودند، در شرایط گلخانه به منظور تهیه دامنه میزبانی و یافتن

One-Step Platinum^R Taq HiFi RT-PCR System (Invitrogen) انجام شد. جفت پرایمر TSV CP RNA3 (5'-TGA ATA CTT TGA TCC AAG G-3') express C-3' و 5'-AGG TAG CAG AG ATA TAA CAA ACT AGT CTT GAT TCA CCA GAA AT CTT CP برای تکثیر ناحیه مورد استفاده قرار گرفت. طراحی پرایمر با استفاده از برنامه Vector NTI Advance 10.01 software انجام شد. قبل از انجام آزمون PCR در ابتدا یک مرحله واسرشت در 50°C برای 5 دقیقه و سپس 95°C برای سه دقیقه صورت پذیرفت. واکنش PCR در 30 سیکل انجام شد (95°C در یک دقیقه، 60°C در یک دقیقه و 68°C در دو دقیقه) و در نهایت مرحله پایانی با دمای 68°C در 10 دقیقه پایان پذیرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز 1٪ بررسی شد و جهت تعیین توالی ابتدا محصول به دست آمده از روی ژل با استفاده از کیت High pure PCR product purification (محصول شرکت آلمانی رشه) جدا و قطعات استخراج شده، جهت الحاق به حامل پلاسمیدی pDrive بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده، در دمای اتاق و به مدت دو ساعت کلون گردید. به منظور غیرفعال نمودن آنزیم لیگاز، نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه در دمای 70 درجه سانتیگراد قرار گرفتند و پس از آن با استفاده از شوک الکتریکی به داخل سلول‌های مستعد *Escherichia coli* DH5α ترانسفورم شدند و پس از آن یک یا دو میلی‌لیتر محلول کشت LB-Amp به آن اضافه و به مدت یک ساعت در دمای 37°C قرار داده شد. سپس محلول فوق بر روی پلیت‌های حاوی LB-Amp-Xgal-IPTG (یک میلی‌لیتر آمپی سیلین 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب، یک میلی‌لیتر IPTG 47 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب و یک میلی‌لیتر X-Gal 40 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در DMF) کشت داده شد و در دمای 37°C و به مدت یک شب قرار گرفت تا کلونی‌های باکتری رشد کنند. پس از خالص‌سازی کلنی‌های سفید و کشت آنها در محیط مایع LB-Amp، جهت استخراج پلاسمید از کیت NucleoSpin Plasmid^R (ساخت شرکت آلمانی ماشری ناجل) استفاده شد. پس از آن به منظور هضم حامل‌های نوترکیب برای بررسی قطعات DNA الحاقی به حامل،

ژل متراکم کننده با غلظت 4٪ اکریل آمید استفاده شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت 150 ولت و شدت جریان متغیر به مدت یک تا دو ساعت تا رسیدن نمونه‌ها به انتهای ژل جداکننده ادامه یافت (Laemmli, 1970 & Sambrook, 2001). از آزمون وسترن بلات جهت تأیید باند پروتئین پوششی جدایه‌های فوق بر اساس روش (1979) Towbin et al. و (1989) Sambrook et al. استفاده گردید. ابتدا پروتئین‌ها به کمک الکتروفورز با ژل پلی اکریل آمید از هم جدا شد و سپس انتقال نمونه‌ها از ژل به غشا نیتروسولوزی در شدت جریان الکتریکی ثابت 300-400 میلی آمپر به مدت 1/5 تا 2 ساعت انجام گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به غشا نیتروسولوزی عمل بلاکینگ با محلول 2٪ شیر خشک در بافر شستشو به مدت یک شب در 4°C صورت گرفت. در مرحله بعد آنتی‌بادی پلی‌کلونال TSVAS-0906 DSMZ (1:500) رقیق شده در بافر شستشو به مدت دو ساعت و سپس آنتی بادی تهیه شده علیه سرم خرگوش متصل به آنزیم شرکت سیگما (Goat antirabbit IgG (AP conjugate sigma) رقیق شده در بافر شستشو به نسبت 1:30000 به مدت 45 دقیقه به غشا اضافه گردید. بعد از اتمام هر مرحله سه مرتبه شستشو با بافر شستشو صورت پذیرفت. در نهایت رنگ آمیزی درون 10 میلی‌لیتر بافر زمینه حاوی نیترو بلو تترازولیم (Nitro blue tetrazolium (NBT)) و 5-برمو-4-کلرو-3-ایندولیل فسفات (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)) در تاریکی انجام شد. برای مشاهده باندها غشا در آب مقطر شسته شد، بین دو کاغذ صافی خشک قرار گرفت.

آزمون RT-PCR و تعیین توالی نمونه‌ها

به منظور دستیابی به روش مناسب جهت استخراج RNA کل از برگ‌های آلوده به جدایه‌های ایرانی، سودانی و هندی از دو روش استفاده شد: استفاده از Qiagen, Hilden, RNeasy Plant Mini Kit (Germany) و استفاده از محلول Peq Gold RNA pure (PeQ lab company)TM. پس از استخراج RNA کل جدایه‌ها، به منظور کنترل کیفیت روی ژل آگارز 1٪ برده شد. واکنش RT-PCR یک مرحله‌ای در حجم نهایی 50 μl و با استفاده از کیت SuperscriptTM III

مایه‌زنی مکانیکی به راحتی منتقل شدند. دامنه میزبانی و شدت علائم جدایه‌های ایرانی، هندی و سودانی متفاوت بودند (جدول ۱).

بر اساس نتایج به دست آمده، دامنه میزبانی جدایه هندی تنها محدود به آفتابگردان و سلمه‌تره بود که روی گونه‌های سلمه‌تره *C. quinoa* و *C. foliosum* در ابتدا لکه‌های موضعی کلروتیک و سپس علائم سیستمیک شدید به صورت موزاییک و در نهایت تنها پس از سه تا پنج روز پژمردگی ایجاد شد. این ویروس در آفتابگردان نیز به صورت سیستمیک در آمد و باعث ایجاد علائم موزاییک شدید و پژمردگی بوته‌ها گردید (شکل ۱). این جدایه با جدایه هندی جدا شده از روی بادام‌زمینی توسط Reddy *et al.* (2002) که دامنه میزبانی بسیار وسیعی داشت و در اکثر محصولات علائم نکروزه سیستمیک ایجاد می‌کرد، کاملاً متفاوت بود. اما با نتایج Ravi *et al.* (2001) در مورد جدایه‌های این ویروس از

چهار میکرولیتر از حامل نوترکیب با آنزیم‌های برشی مناسب *XbaI* و *KpnI* و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده به مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷°C گذاشته شد و در نهایت نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شدند و همسانه‌های مفید انتخاب، برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت آلمانی MWG Biotech فرستاده شد.

بررسی فیلوژنتیکی

تحلیل ترادف نوکلئوتیدی، ترجمه ترادف به اسید آمینه و ترسیم درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی و سایر جدایه‌ها با نرم افزار DNAMAN version 4.02 انجام شد.

نتایج و بحث

انتقال مکانیکی و مقایسه دامنه میزبانی

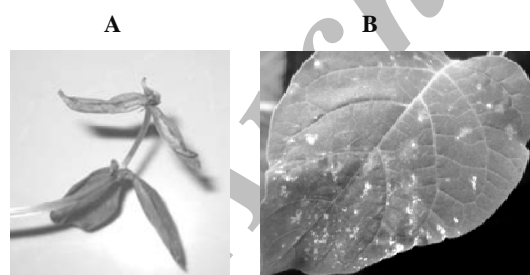
جدایه‌های مختلف TSV در آزمایشگاه به طریقه

جدول ۱- دامنه میزبانی جدایه‌های TSV

Family	Species	S1 (Local lesion/systemic)	In (Local lesion/systemic)	43R (Local lesion/systemic)
Aizoaceae	<i>Tetragonia tetragonoides</i> L.	CLL/M	-/-	-/-
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> L.	CLL/M	CLL/M;W	CLL/-
	<i>C. amaranticolor</i> L.	CLL/M	-/-	CLL/-
	<i>C. murale</i> L.	CLL/-	-/-	CLL/-
Coppositae	<i>C. foliosum</i> L.	CLL/M	CLL/M;W	CLL/-
	<i>Lactuca sativa</i> L.	-/-	-/-	-/-
Cucurbitaceae	<i>Helianthus annuus</i> L.	NLL/M	-/M;W	-/M
	<i>Cucumis melo</i> L.	CLL/-	-/-	-/-
Leguminosae	<i>Cucurbita pepo</i> Duch.	CLL/-	-/-	-/-
	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	-/-	-/-	-/-
	<i>Pisum sativum</i> L.	CLL/-	-/-	-/-
Solanaceae	<i>Vicia faba</i> L.	NLL/M; D	-/-	NLL/ DC
	<i>Datura metel</i> L.	NLL/M; D	-/-	NLL/-
	<i>Datura stramonium</i> L.	NLL;CLL/M; DC	-/-	NLL/-
	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	NLL/M;W	-/-	-/-
	<i>Nicotiana benthamiana</i> L.	-/M; DC	-/-	-/L
	<i>Nicotiana clevelandii</i> L.	NLL/M	-/-	-/-
	<i>Nicotiana debneyi</i> L.	NLL/M	-/-	-/L
	<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	NLL/M;R; DC	-/-	-/L
	<i>Nicotiana glauca</i> L.	NLL/M;W	-/-	NLL/L
	<i>Nicotiana glauca</i> L.	NLL/M; DC;W	-/-	-/-
	<i>Nicotiana occidentalis</i> L.	NLL/M; DC;W	-/-	-/L
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun L.	NLL/M;W	-/-	-/L
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi L.	NLL/M;R;W	-/-	-/L
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley L.	NLL/M;W	-/-	-/-	
<i>Physalis floridana</i> L.	NLL/M	-/-	NLL/-	
<i>Solanum demissum</i> L.	NLL/M	-/-	NLL/-	

CLL: لکه‌های موضعی کلروتیک، NLL: لکه‌های موضعی نکروتیک، M: موزاییک، DC: برگشت لبه‌ها به سمت پایین، W: پژمردگی، R: لکه حلقوی، L: آلودگی پنهان و - : عدم ایجاد آلودگی.

جمله برخی گونه های توتون، بدون ایجاد علائم مشخص در گیاه سیستمیک شد. خسارت این جدایه روی آفتابگردان بدون ایجاد لکه های موضعی به صورت علائم موزاییک مشاهده شد. این جدایه در باقلا ابتدا باعث لکه های موضعی و سپس پیچیدگی برگ ها گردید. علائم در گیاهان تاتوره، عروسک پشت پرده، سیب زمینی و گونه های سلمه تره محدود به لکه های موضعی خفیف در سطح برگ ها بود (شکل ۳). از نظر علائم ایجاد شده، نتایج به دست آمده در مورد جدایه ایرانی مشابه علائم ایجاد شده توسط جدایه آفتابگردان موجود در تحقیقات *Motamedi et al.* (2008) بود. تنها تفاوت موجود، ایجاد لکه های موضعی کلروتیک روی لوبیا چشم بلبلی توسط جدایه *Motamedi et al.* (2008) بود. اما با جدایه ایرانی به دست آمده از مزارع کاهو گزارش شده توسط *Abtahi Koochi Habibi &* (2008) متفاوت بود. جدایه کاهو دامنه میزبانی وسیع تری داشت. جدایه های آفتابگردان بر خلاف جدایه کاهو که در توتون *N. Clevelandii* علائم سیستمیک به صورت بد شکلی برگ و روشنی رگبرگ ظاهر کرد، بدون هیچ علائم مشخصی سیستمیک شدند و نیز بر خلاف جدایه کاهو که در کاهو و لوبیا، لکه موضعی ایجاد کرد، هیچ علائمی ایجاد نشد.

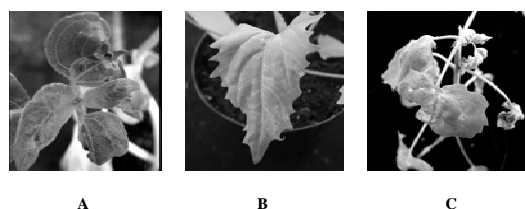


شکل ۳- لکه های موضعی و سیستمیک ناشی از مایه زنی جدایه ایرانی TSV بر روی تعدادی از گیاهان محک. (A) علائم پیچیدگی برگ ها روی باقلا، (B) لکه موضعی نکروزه روی تاتوره.

ایمونوالکترون میکروسکوپی

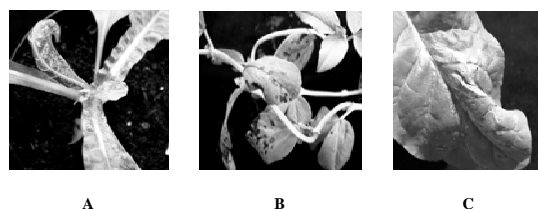
در بررسی میکروسکوپ الکترونی عصاره نمونه های آلوده، پیکره های ایزومتریک به قطر حدود ۳۵ نانومتر در رقت ۵۰۰ برابر آنتی بادی پلی کلونال TSV (AS-906) به خوبی واکنش نشان دادند و هاله تیره ای اطراف پیکره ها

آفتابگردان کاملاً مطابقت داشت.



شکل ۱- لکه های موضعی و سیستمیک ناشی از مایه زنی جدایه هندی ویروس TSV بر روی تعدادی از گیاهان محک. (A) علائم موزاییک و بد شکلی برگ ها در آفتابگردان، (B) لکه های موضعی کلروتیک روی *C. quinoa*، (C) لکه موضعی کلروتیک و روشنی رگبرگ ها در *C. foliosum*.

جدایه سودانی دامنه میزبانی وسیع تری نسبت به دو جدایه دیگر داشت. این جدایه در *Tetragonia tetragonoides* گونه های سلمه تره ابتدا لکه های موضعی کلروتیک و پس از حدود یک هفته علائم موزاییک ایجاد کرد. در گیاهان آفتابگردان، باقلا، تاتوره، گوجه فرنگی و گونه های مختلف توتون به جز *N. benthamiana* علائم موضعی به صورت نکروتیک و علائم سیستمیک که در برخی موارد منجر به مرگ بوته می شد، مشاهده گردید. در *N. benthamiana* بر خلاف سایر گونه های توتون، ویروس علائم موضعی ایجاد نکرد و تنها پس از سه روز باعث بروز علائم موزاییک و در نهایت پژمردگی بوته شد (شکل ۲). علائم ایجاد شده با نتایج *Ali et al.* (2008) مطابقت داشت.



شکل ۲- لکه های موضعی و علائم سیستمیک ناشی از مایه زنی جدایه سودانی TSV بر روی تعدادی از گیاهان محک. (A) لکه های موضعی نکروزه روی باقلا، (B) لکه های موضعی نکروزه روی *N. rustica*، (C) علائم موزاییک، بد شکلی و نکروزه روی *N. occidentalis*.

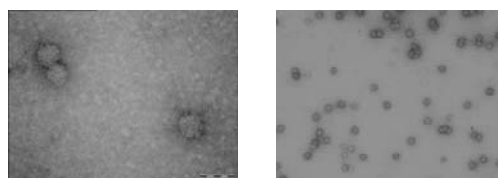
بر خلاف جدایه های هندی و سودانی، جدایه ایرانی علائم بسیار خفیفی ایجاد کرد و در بسیاری از گیاهان از

مقایسه وزن مولکولی پروتئین پوششی جدایه‌های

TSV

تفاوت وزن مولکولی پروتئین پوششی جدایه‌های TSV با انجام آزمون SDS-PAGE بررسی شد (شکل ۵-A) و با آزمون وسترن بلائینگ نتایج به دست آمده تأیید گردید (۵-B). به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی، خط رگرسیون بین لگاریتم وزن پروتئین پوششی و میزان حرکت نسبی (RF) آنها رسم شد (شکل ۶) و بر این اساس اندازه پروتئین پوششی جدایه‌های مذکور ۳۰/۹ کیلو دالتون برآورد شد. وزن مولکولی CP در جدایه ایرانی TSV گزارش شده توسط Motamedi *et al.* (2008)، کاملاً مطابق با نتایج به دست آمده بود. جدایه هندی جدا شده از بادام‌زمینی حدود ۲۸ کیلودالتون (Reddy *et al.*, 2002)، جدایه برزیلی سویا و جدایه سودانی باقلا حدود ۳۰ کیلودالتون (Ali *et al.*, 2008; Almedia *et al.*, 2005) بود که نتایج تقریباً مشابه بود.

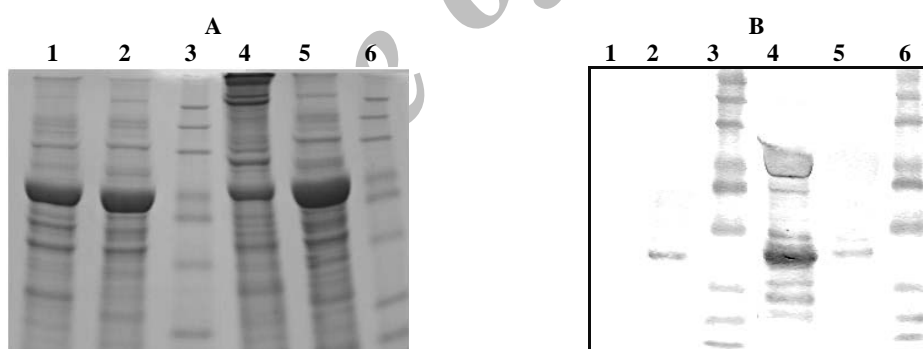
را فرا گرفت (شکل ۴). نتایج مطابق با نتایج Reddy *et al.* (2002) بود که قطر پیکره‌ها را ۲۵ تا ۳۵ نانومتر تشخیص دادند.



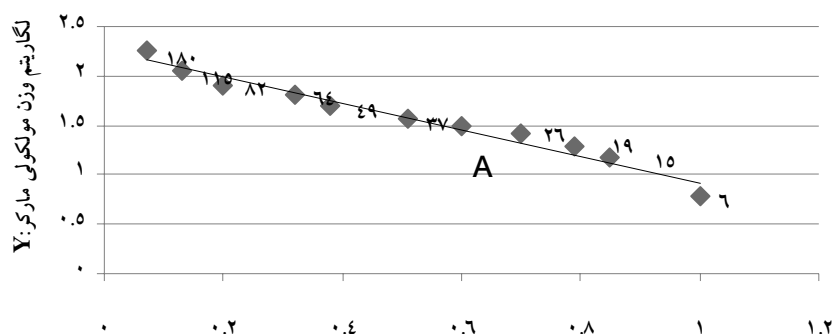
شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی پیکره‌های TSV با روش دکوراسیون

تنوع سرولوژیکی با استفاده از آزمون تاس الیزا

هر سه جدایه مورد بررسی با آنتی بادی مونو کلونال واکنش دادند و هیچ تنوعی بین جدایه‌ها دیده نشد که نشان‌دهنده عدم تفاوت کلی بین اپی‌توپهای مورد استفاده در تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال مورد بررسی TSV (DSMZ AS-0906) بود.



شکل ۵- SDS-PAGE-A و وسترن بلات. پروتئین‌های جدایه‌های TSV، ۱: نمونه سالم، ۲: جدایه سودانی S1، ۳: جدایه ایرانی 43R، ۴: جدایه هندی و ۵: جدایه سودانی (BenchMark™) و ۶: ماکرهای مولکولی



شکل ۶- منحنی خط رگرسیون وزن پروتئین پوششی.

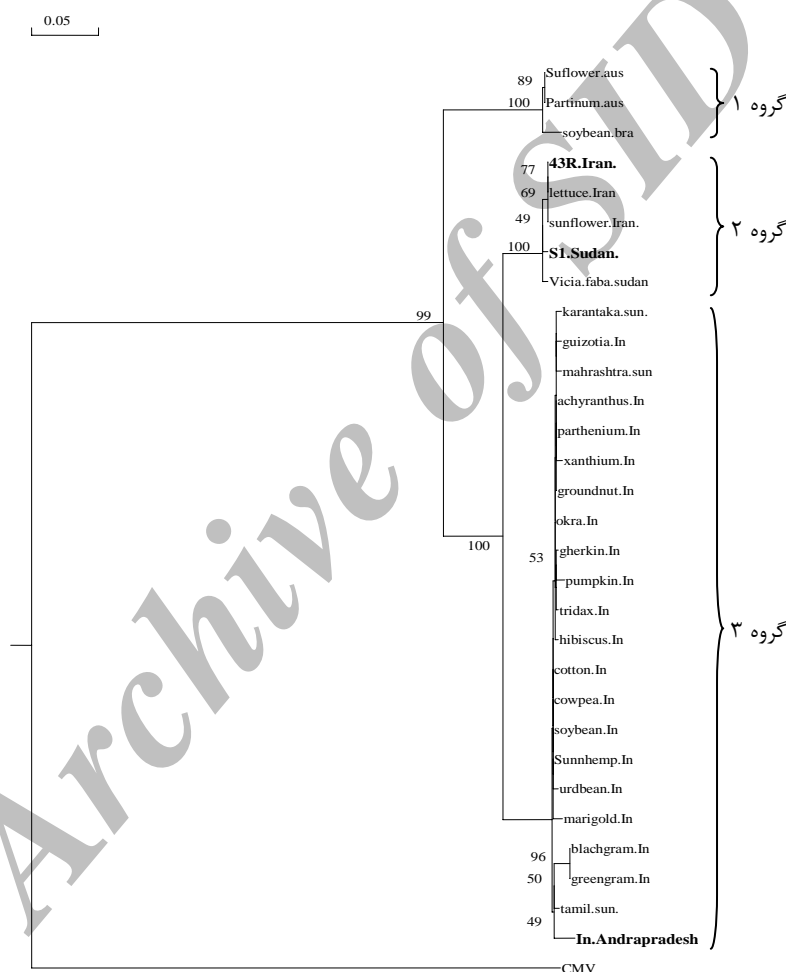
(A: نقطه نشان‌دهنده وزن پروتئین پوششی=۳۰/۹)

RF: فاصله مارکر از سر ژل / فاصله‌ای که رنگ طی کرده است.

توالی به شرکت MWG Biotech آلمان فرستاده شدند. نتایج حاصل از تعیین توالی جدایه‌های هند، ایران و سودان با هم و با جدایه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN version 4.02 بررسی و درخت فیلوژنی آنها ترسیم شد (شکل ۷). نتایج نشان داد که توالی CP جدایه‌های ایرانی و سودانی تنها در دو نوکلئوتید و دو اسید آمینه با هم تفاوت دارند.

تنوع مولکولی جدایه‌های TSV

RNA کل در جدایه‌ها با دو روش ذکر شده استخراج شد و پس از استخراج RNA کل از جدایه‌های ایرانی، هندی و سودانی، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی TSV CP RNA3 express قطع‌های به طول ۷۴۷ جفت باز تکثیر شد. ژن‌های تکثیر شده پس از همسانه‌سازی، الحاق در پلاسمید حامل pDrive، استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی، برای تعیین



شکل ۷- تحلیل فیلوژنتیکی ترادف اسید آمینه پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس رگه‌ای توتون با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN version 4.02. جدایه‌ها عبارتند از: Sunflower.Iran (جدایه آفتابگردان: ایران)، Lettuce.Iran (جدایه کاهوی، ایران)، Vicia.faba (AM933669: سودان)، Cotton.In (AF515824: هند)، Okra.In (AY501482: هند)، Tridax.In (AY501484: هند)، Mungbean.In (AF515823: هند)، Groundnut.In (AY510128: هند)، Soybean.In (DQ518916: هند)، hibiscus.In (AY501483: هند)، Sunnhemp.In (DQ058079: هند)، Urdbin.In (DQ225172: هند)، Cowpea.In (DQ058079: هند)، Maharashtra.sun (AF515825: هند)، Marigold.In (AY940157: هند)، Parthenerium.In (DQ864458: هند)، Guizotia.In (AY606075: هند)، Gherkin.In (EF159702: هند)، Pumpkin.In (EF159703: هند)، Xanthium.In (AY510131: هند)، Chili.In (AY590139: هند)، Karantaka.sun (EU085385: هند)، Tamil.sun (FJ749260: هند)، Greengram.In (EU871659: استرالیا)، Sunflower.aus (EU37481: استرالیا) و Soybean.bra (AY354406: برزیل). جدایه AF523352 ویروس CMV به عنوان outgroup در نظر گرفته شده است.

مناطق مختلف، متفاوت است. در هند خسارت سالانه این ویروس قابل توجه است و سبب اپیدمی‌های متعدد در بسیاری از نواحی آن کشور می‌شود. در این تحقیق با توجه به اهمیت آفتابگردان و شناسایی آن در مزارع ایران، یک جدایه ویروس از ایران با یک جدایه هندی و یک جدایه سودانی مورد مقایسه قرار گرفتند. در بررسی طیف میزبانی، جدایه هندی (TSV-In) محدودتر از دو جدایه دیگر بود و جدایه‌های سودانی (TSV-S1 & TSV-S2) طیف وسیع‌تری از بقیه جدایه‌ها داشت و بر روی تعداد بیشتری از گیاهان علایم متنوعی ایجاد کرد. جدایه ایرانی ملایم‌ترین جدایه‌ها بود و شدت علایم ایجاد شده در اثر این جدایه بسیار خفیف‌تر از جدایه‌های سودانی و هندی بود. وزن پروتئین پوششی در سه جدایه ۳۰/۹ کیلودالتون بود. آزمون وسترن بلات تأییدکننده نتایج حاصل از SDS-PAGE بود. بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌ها بر اساس توالی اسیدآمینه CP نشان داد که جدایه‌های ایرانی و سودانی در یک گروه و جدایه هندی با حدود ۹۱٪ تشابه در گروه جداگانه قرار می‌گیرد.

اما جدایه هندی ۷۲ نوکلئوتید و ۲۳ اسید آمینه با جدایه‌های دیگر تفاوت دارد. در بررسی فیلوژنتیکی جدایه Parthenerium و آفتابگردان استرالیا و جدایه سویای برزیل در گروه یک، جدایه ایرانی 43R، جدایه آفتابگردان Motamedi *et al.* (2008)، جدایه کاهوی Abtahi & Koochi Habibi (2008)، جدایه سودانی S1 و جدایه باقلای گزارش شده از سودان در گروه دو و جدایه‌های هندی پنبه، بامیه، Tridax، ختمی، ماش، بادام زمینی، سویا، لوبیا چشم بلبلی، Urdbin، کنف بنگالی، Guizotia، Parthenerium، گل همیشه بهار، خربزه، کدو، Xanthium، فلفل، Green gram و جدایه‌های آفتابگردان ایالات تاملیل، کارانتاکا، ماهاراشترا و اندراپرادش (In) در گروه سه قرار می‌گیرند. گروه دو و سه حدود ۹۱٪ (۹۰/۳-۹۰/۷)، گروه یک و دو ۸۴ تا ۸۵٪ و گروه یک و سه حدود ۸۲٪ با هم شباهت دارند. در هر گروه جدایه‌ها ۹۸-۱۰۰٪ با هم شباهت دارند.

نتیجه‌گیری کلی

در سال‌های اخیر ویروس TSV خسارت زیادی به محصول آفتابگردان وارد کرده، باعث مرگ بوته‌ها و کاهش محصول شده است. میزان خسارت در مزارع

REFERENCES

1. Abtahi, F. & Koochi Habibi, M. (2009). Host range and some characterization of TSV isolated from lettuce in Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7 (23), 4260-4264.
2. Ali, M. A., Winter, S. & Dafalla, G. A. (2008). Tobacco streak virus infecting faba bean reported for the first time. *The British Society for Plant Pathology*, 144.
3. Almedia, A. M. R., Sakai, J., Hanada, K., Olivera, T. G., Belintani, P., Kitajima, E. W., Souto, E. R., Novaes, T. G. & Nora, P. S. (2005). Biological and molecular characterization of an isolate of Tobacco streak virus obtained from soybeans in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 366-373.
4. Berguland, D. R. (2007). *Sunflower production*. Extension Publication. 120pp.
5. Clark, M. F. & Adams, S. A. N. (1977). Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
6. Dijkstra, J. (1983). Tobacco streak virus in sunflower (*Helianthus annuus*). *Netherland Journal of Plant Pathology*, 89, 153-169.
7. Greber, R. S. (1971). Some characteristics of Tobacco streak virus isolates from Queensland. *Queensland Journal of Agriculture and Animal Science*, 28, 105-114.
8. Greber, R. S., Klose, M. J., Teakle, D. S. & Milne, J. R. (1991). High incidence of Tobacco streak virus in tobacco and its transmission by Microcephalothrips abdominalis and pollen from *Ageratum houstonianum*. *Plant Disease*, 75, 450-452.
9. Hosseini, S., Mosahebi, G. & Koochi Habibi, M. (2006). Distribution of sunflower viruses of Iran. In: *Proceedings of the 10th International Plant Virus Epidemiology Symposium*, 15-19 Oct. Hyderabad, India, P. 2_98.
10. Jordan, R. L. (1990). Strategy and techniques for the production of monoclonal antibodies; monoclonal antibody applications for viruses. In *serological methods for the detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A Laboratory Manual*. APS press. 389pp.
11. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
12. Motamedi, M. (2008). *Characterization of TSV and TSWV isolated from sunflower*. M. Sc. dissertation, University of Tehran, Iran (In Farsi).

13. Milne, R. & Luisoni, E. (1977). Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *Methods in Virology*. Vol. 6. Academic Press, New York. 265-281.
14. Rao, R. D. V. J. P., Reddy, A. S., Reddy Thirumala-Devi, S. V., Rao, S. C., Kumar, V. M., Subramaniam, K., Reddy, T. Y., Nigam, S. N. & Reddy, D. V. R. (2003). The host range of *Tobacco streak virus* in India and transmission by thrips. *Annual Application Biology*, 142, 365-368.
15. Ravi, K. S., Buttegereitt, A. S., Kitkaru, A. S., Deshmukh, S., Lesemann, D. E. & Winter, S. (2001). Sunflower necrosis disease from India is caused by an *ilarvirus* related to *Tobacco streak virus*. *Plant Pathology*, 50, 800.
16. Reddy, A. S., Prasada Rao, R. D. V. J., Thirumala-Devi, K., Reddy, S. V., Mayo, M. A., Roberts, I., Satyanarayana, T., Subramaniam, K. & Reddy, D. V. R. (2002). Occurrence of *Tobacco streak virus* on peanut (*Arachis hypogaea*) in India. *Plant Disease*, 86, 173-178.
17. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
18. Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
19. Sharman, M., Thomas, J. E. & Persley, D. M. (2008). First report of *Tobacco streak virus* in sunflower, cotton, chickpea and mung bean in Australia. *Australas. Plant Disease*, 3, 27-29.
20. Sharman, M., Persley, D. M. & Thomas, J. E. (2009). Distribution in Australia and seed transmission of *Tobacco streak virus* in *Parthenium hysterophorus*. *Plant Disease*, 93, 708-712.
21. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: *Procedure and some Applications Academic Science*, 76, 4350-4354.

Archive of SID