

بررسی پاره‌ای از خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی ویروس رگه‌ای توتون *Tobacco streak virus* جدا شده از آفتابگردان

مرضیه معتمدی^{۱*} - مینا کوهی حبیبی^۲ - غلامحسین مصاحبی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۶/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۴

چکیده

ویروس رگه‌ای توتون (*Tobacco streak virus* - TSV) یکی از ویروس‌های آلوده کننده آفتابگردان می‌باشد. طی دو سال زراعی ۸۶-۸۷، از مزارع آفتابگردان استان‌های آذربایجان غربی، اصفهان، تهران، قم، مرکزی و همدان تعداد ۵۲۰ نمونه جمع آوری شد. گیاهان آلوده نمونه برداری شده دارای علائم مختلف شامل: پیچیدگی و بد شکلی برگه‌ها، وجود لکه‌های کلروزه و نکروزه در برگ و توقف رشد در بوته بود علاوه بر آن تعدادی از نمونه‌ها بدون علائم بودند. برای شناسایی ویروس از آزمون DAS-ELISA استفاده شد. به منظور تعیین دامنه میزبانی ویروس جدایه اصفهان ویروس بر روی ۱۳ گونه گیاهی از ۵ خانواده (*Chenopodiaceae*, *Solanaceae*, *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Papilionaceae*) در مرحله حساس گیاه مایه زنی شد. علائم روی سلمه تره (*Chenopodium amaranticolor*، *C. quinoa*) و لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) به صورت لکه‌های کرویتیک موضعی، روی داتوره (*Datura stramonium*)، آفتابگردان (*Helianthus annuus*)، گل تکمه‌ای (*Gompherna globosa*) و باقلا (*Vicia faba*) به صورت پیچیدگی و بد شکلی در برگه‌ها و در نهایت کوتولگی عمومی در بوته و در گیاه توتون (*Nicotiana benthamiana*) بدون علائم ظاهری بود. این ایزوله روی باقلا تکثیر و خالص سازی شد. در آزمون SDS-PAGE وزن پروتئین پوششی ویروس ۳۰/۹ کیلو دالتون تعیین گردید. با استفاده از آنتی سرم اختصاصی ویروس در آزمون وسترن بلات این باند به عنوان پروتئین پوششی ویروس تایید شد. با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی که توسط Bath و همکاران طراحی شده بود، در آزمون RT-PCR و IC-RT-PCR قطعه‌ای به طول ۷۷ جفت باز تکثیر شد.

واژه‌های کلیدی: ویروس، رگه‌ای توتون، ایزوله، RT-PCR، IC-RT-PCR، وسترن بلات

مقدمه

محصول تاکنون تحقیق علمی دقیق در مورد ویروس‌های عامل بیماری در آفتابگردان در ایران صورت نگرفته است و تنها تحقیق صورت گرفته گزارش حسینی و همکاران (۷) معرفی چند ویروس از جمله ویروس رگه‌ای توتون از آفتابگردان می‌باشد. لذا بررسی پاره‌ای از خصوصیات مولکولی و بیولوژیکی ویروس رگه‌ای توتون بعنوان هدف این تحقیق در نظر گرفته شد. این ویروس گونه جنس ایلاویروس (*Illarvirus*) و از تیره برمویریده (*Bromoviridae*) می‌باشد، که اولین بار jahnsون از ویسکانسین آمریکا از روی توتون گزارش شد (۵). اولین گزارش این ویروس از آفتابگردان در سال ۱۹۸۳ توسط دیجکستر از (۶) هند بود، که علائم کرور و نکروز در برگه‌های آفتابگردان ایجاد می‌کرد. ویروس با انجام آزمون سرولوژیکی و تعیین دامنه میزبانی و با توجه به نوع علائم تولید شده بعنوان یک ایزوله از TSV شناسایی شد.

آفتابگردان همانند سایر گیاهان زراعی در برابر آلودگی‌های ویروسی حساس می‌باشد. آلودگی‌های ویروسی بطور قابل ملاحظه‌ای کیفیت و کمیت محصول را کاهش می‌دهند. ویروس‌های گیاهی به صورت منفرد یا به همراه یکدیگر گیاه آفتابگردان را آلوده می‌کنند که از جمله این ویروسها ویروس رگه‌ای توتون می‌باشد. سطح زیر کشت آفتابگردان در ایران تا سال ۱۳۸۷، ۲۵۰۰۰ هکتار بوده و میزان تولید سالانه آن بطور متوسط ۲۲۰۰۰ تن می‌باشد. علیرغم اهمیت این

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم باغبانی و گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(*)- نویسنده مسئول: (Email: marzie.moatamedi@gmail.com)

با توجه به هدف تحقیق، در نمونه برداری از هر مزرعه سعی شد نمونه‌هایی با علائم متنوع جمع آوری شوند. برای این منظور غالباً سطح وسیعی از هر مزرعه مورد کاوش قرار گرفت. جهت تعیین نمونه‌های آلوده به TSV بررسی ۵۲۰ نمونه جمع آوری شده از موز سرولوژیکی الیزا انجام شد (۴). سپس نمونه‌های مثبت در آزمون الیزا جهت تکثیر بر روی تعدادی از گیاهان محک شامل (*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Vigna unguiculata*, *Helianthus annuus*, *Datura stramonium*, *Vicia faba*, *Gompherna globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *Calandula marigold*, *Phaseolus vulgaris*) مایه زنی شدند. جهت خالص سازی بیولوژیک ویروس از لکه‌های موضعی کلروتیک حاصل از مایه زنی ویروس بر روی گیاهان محک خانواده *Chenopodiaceae* استفاده گردید که پس از ظهور لکه‌ها توسط اسکالپل استریل اقدام به لکه‌گیری نموده و تک لکه‌ها روی لام زبر به کمک قطراتی از بافر عصاره‌گیری شده و روی سلیمه مایه زنی شد این عمل سه بار تکرار و در نهایت به منظور تکثیر و نگهداری ویروس بر روی گیاه باقلا مایه زنی شد.

خالص سازی فیزیکی و تعیین وزن مولکولی پروتئین

پوششی ویروس

به منظور خالص سازی فیزیکی ویروس TSV از روش Minipurification با یکسری تغییرات استفاده گردید. جهت تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس از الکتروفورز عمودی پروتئین در ژل پلی آکریل آمید حاوی دو دسیل سولفات (SDS- PAEG) به روش سمبروک و پروتکل کارگاه عملی مشترک DSMZ و دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران در سال ۲۰۰۳ استفاده شد. بعد از الکتروفورز عمودی به منظور ردیابی پروتئین پوششی در بین صدها پروتئین دیگر از روش وسترن بلات استفاده شد. در این آزمون پس از تفکیک شدن پروتئین‌ها روی ژل به کمک الکتروفورز، باندهای پروتئینی تفکیک شده به غشای نیتروسولوزی انتقال یافته و سپس پروتئین مورد نظر بوسیله آنتی بادی اختصاصی ردیابی می‌شود (۱۴).

استخراج rRNA

استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNeasy plant Mini (Kit Qiagen, Germany) انجام شد. این امر به منظور بالا رفتن کیفیت RNA استخراج شده انجام گرفت. ابتدا مقدار ۰/۱ گرم از بافت گیاهی تهیه گردید و سپس به وسیله ازت مایع خرد شده و مطابق دستور العمل موجود در کیت مراحل استخراج انجام گردید. در مرحله نهایی RNA کل استخراج شده در آب مقطر استریل حل و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. RNA استخراج شده در آزمون نسخه برداری معکوس - واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به کار برده شد.

مجدداً در سال ۲۰۰۱، راوی و همکاران (۱۲) این ویروس را از آفتابگردان گزارش کردند. در سال ۲۰۰۳، شیرشیکر (۱۷) تأثیر تاریخ کشت‌های متفاوت را در شیوع بیماری نکروز آفتابگردان بررسی نمود و نشان داد که کشت آفتابگردان در ماه‌های تیر و مرداد بیشترین شیوع بیماری را موجب می‌گردد و تغییر در تاریخ کشت می‌تواند در کنترل بیماری مؤثر باشد. پراسادراو و همکاران (۱۱) دامنه میزبانی و انتقال ویروس TSV را در هند مورد بررسی قرار دادند، نتایج تحقیق نشان داد که آفتابگردان و بادام زمینی و گل همیشه بهار از منابع مهم آلودگی به شمار می‌روند. در سال ۲۰۱۰ و مانا و همکاران (۱۸) روی دامنه میزبانی و انتقال با بذر در گیاهان لگومینه تحقیق نمودند. همچنین در سال ۲۰۱۱ شارمن و همکاران (۱۶) در استرالیا برای اولین بار ویروس را از آفتابگردان پنبه و نخود گزارش کردند. سه گونه تریپس *Frankliniella schultzei*، *Megalurothrips usitatus* و *Scirtothrips dorsalis* با انتقال گرده‌های آلوده بعنوان ناقلین این ویروس عمل می‌کنند (۱۱).

به نظر می‌رسد نقش ناقلی تریپس‌ها حمل‌گردها از گیاه آلوده به گیاه سالم می‌باشد که هنگام تغذیه تریپس از گیاه سالم، ویروس به درون اندام گیاهی نفوذ می‌کند (۱۴). گرده‌های آلوده انتقال ویروس به وسیله تریپس را تسهیل می‌کنند بدین ترتیب که تریپس‌ها با تغذیه و حرکت بر روی گرده‌های آلوده ویروس را دریافت و به گیاهان سالم منتقل می‌کنند (۶). این ویروس تنها در تعدادی از گیاهان توسط بذر منتقل می‌شود، بطوریکه میزان انتقال با بذر را از ۱٪ در لوبیا چشم بلبلی تا ۹۰ درصد در سویا گزارش کرده اند (۳ و ۹). این ویروس در سال ۱۳۸۵ برای اولین بار از آفتابگردان توسط حسینی و همکاران گزارش شد (۷). به منظور کنترل ویروس، استفاده از حشره‌کشها برای کنترل تریپس‌ها و از بین بردن علفهای هرز و منابع آلودگی برای کاهش بیماری مناسب بوده ولی در کنترل ویروس به نحو مطلوب مؤثر نبوده اند. یافتن منابع ژنتیکی مقاومت نسبت به ویروس و انتقال آن به کولتوارهای تجاری و همچنین استفاده از توالی‌های اسید نوکلئیک TSV شامل ژن پروتئین پوششی ویروس به وسیله انتقال ژنتیکی به ژنوم گیاهی (تهیه گیاه ترانس ژنیک) در گسترش گیاهان مقاوم به ویروس مفید هستند (۱۰).

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و نگهداری ویروس

طی نمونه برداریهای انجام شده در ماه‌های خرداد، تیر، مرداد و شهریور سال ۸۶ و ماه‌های اردیبهشت، خرداد، تیر و مرداد سال ۸۷ در مجموع ۵۲۰ نمونه بصورت تصادفی (هم دارای علائم آلودگی به ویروس و هم بدون علائم) از مزارع آفتابگردان استان‌های آذربایجان غربی، اصفهان، تهران، قم، مرکزی و همدان جمع آوری شد.

انجام میشود. در ابتدا مشابه آزمون الیزا، آنتی بادی (TSV IgG) به نسبت ۱ به ۵۰۰ در بافر پوششی رقیق می‌شود، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون ویال‌های ۰/۲ میلی لیتری ریخته و به مدت ۳-۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور نگهداری شد. سپس ویال‌ها به آرامی توسط بافر شستشو (PBST) سه بار و هر بار ۵ دقیقه شستشو داده شد. پس از خشک شدن کامل ۱۰۰ میکرولیتر عصاره نمونه گیاهی به هر لوله اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس ویال‌ها همانند مراحل قبل شسته و پس از خشک شدن کامل، واکنش RT-PCR مانند آنچه گفته شد، در داخل ویال‌ها انجام می‌گرفت، با این تفاوت که دیگر RNA افزوده نشد.

آماده سازی محصول واکنش PCR جهت تعیین ترادف

نوکلئوتیدی بخش تکثیر شده RNA3 ویروس TSV

به منظور تعیین ترادف نوکلئوتیدی بخش تکثیر شده RNA3 ویروس TSV و مقایسه آن با ترادف همان ناحیه از ژنوم سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن، میزان ۳۰ میکرولیتر از محصول PCR به دست آمده پس از خالص سازی با استفاده از کیت Purification جهت تعیین ترادف به مؤسسه DSMZ آلمان ارسال گردید. پس از تعیین ترادف با استفاده از برنامه‌های نرم افزاری Blast، DNA MAN و Clustal W مورد مقایسه قرار گرفت و درصد تشابه آنها تعیین گردید.

نتایج

نمونه برداری

طی بازدیدی که از مزارع آفتابگردان استانهای آذربایجان غربی، اصفهان، تهران، قم، مرکزی و همدان در طی دو فصل زراعی ۸۷-۸۶ انجام گرفت. علائم آلودگی به صورت کلروز و نکروز برگ، بدشکلی در رگبرگ‌ها و برگ‌ها و کوتولگی عمومی بوته در مزارع آفتابگردان دیده شد (شکل ۱).

نتایج بدست آمده از آزمایشات فوق حاکی از وجود میزان بالای آلودگی مزارع آفتابگردان به ویروس رگه‌ای توتون می‌باشد. از تعداد ۵۲۰ نمونه جمع آوری شده با استفاده از روشهای TAS-ELISA، DAS-ELISA تعداد ۱۲۴ نمونه آلوده TSV تشخیص داده شدند (جدول ۳). این نتایج همچنین نشان داد که استان آذربایجان غربی با ۵۶/۳۶ درصد آلودگی، استان همدان با ۳۱/۳۰ درصد آلودگی، استان تهران با ۲۶/۴۲ درصد آلودگی، استان قم با ۱۴/۵۴ درصد آلودگی، استان اصفهان با ۸/۸ درصد آلودگی و استان مرکزی بدون آلودگی، بترتیب بیشترین و کمترین میزان آلودگی به TSV را دارا بوده اند (نمودار ۱).

آزمون نسخه برداری معکوس - واکنش زنجیره‌ای پلیمرز RT-PCR

برای انجام آزمون RT-PCR جهت شناسایی TSV از یک جفت آغازگر ۲۰ بازی که تکثیر یک قطعه ۷۱۷ جفت بازی که بخشی از توالی کد کننده پروتئین پوششی را بر عهده دارد، استفاده شد (۲). برای ساخت cDNA (دی.ان.ای مکمل) از مخلوط زیر استفاده گردید (جدول ۱):

جدول ۱- مقادیر و غلظت مواد مصرفی جهت واکنش RT برای ویروس TSV

ماده مصرفی	مقدار ماده (μL)	غلظت
آب مقطر دوبار تقطیر عاری از RNase	۸/۵	
بافر RT-5X	۴	
dNTPs	۱/۵	
DTT	۱	
آغاز گر (Down یا Reverse)	۱	۵ Pmol
RNase inhibitor	۰/۵	۲۰ u/μl
آنزیم M-Mul-V	۰/۵	۲۰۰ u/μl
کل RNA	۳(۵۷ng/μl)	
جمع کل	۲۰	

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز پس از ساخته شدن cDNA ویروس رگه‌ای توتون با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نسبت‌های مشخص مواد جهت تکثیر انجام گرفت (جدول ۲).

جدول ۲- مقادیر و غلظت مواد مصرفی جهت واکنش PCR برای ویروس TSV

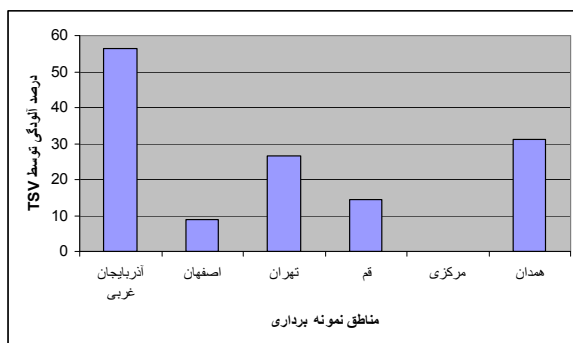
ماده مصرفی	مقدار ماده (μL)	غلظت
آب مقطر دوبار تقطیر عاری از RNase	۱۰/۲	
بافر PCR 10x	۲	
dNTPs	۱	
کلرور منیزیم (MgCl ₂)	۰/۸	
آغاز گر (Down یا Reverse)	۰/۳	۱/۵ Pmol
آغاز گر (UP یا Forward)	۰/۴	۲ Pmol
آنزیم Tag DNA Polymerase	۰/۳	۱/۵ u/μl
cDNA	۵ (۵۳ng/μl)	
جمع کل	۲۰	

آزمون RT-PCR Immunocapture- (IC-RT-PCR) جهت شناسایی TSV

روش حساس و بسیار دقیق به منظور تشخیص ویروسهای دارای RNA می‌باشد. این روش جهت انجام واکنش RT-PCR بدون نیاز به استخراج RNA کل انجام می‌گیرد که تلفیقی از روش سرولولژی و RT-PCR بوده و در نهایت جهت تکثیر cDNA، واکنش PCR

جدول ۳- تعداد نمونه ها و محلهای جمع آوری آنها و میزان آلودگی به TSV

مناطق نمونه برداری	تعداد نمونه کل	تعداد نمونه آلوده به TSV
استان آذربایجان غربی	۵۵	۳۱
استان اصفهان	۱۳۵	۱۲
استان تهران	۱۳۰	۳۷
استان قم	۵۵	۸
استان مرکزی	۳۰	۰
استان همدان	۱۱۵	۳۶
جمع کل	۵۲۰	۱۲۴



نمودار ۱- درصد آلودگی مزارع آفتابگردان به TSV در استانهای مختلف

شد (شکل ۵).

لکه‌های کلروتیک دو هفته پس از مایه زنی در سطح برگها لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) ظاهر شد (شکل ۶).
توتون (*N. benthamiana*) در این گیاه آلودگی پنهان رخ داد یعنی گیاه آلوده فاقد علائم ظاهری بود.

الکتروفورز پروتئینها SDS-PAGE و وسترن بلات

باند پوشش پروتئینی TSV در الکتروفورز پروتئینها به روش SDS-PAGE در ژل پلی اکریل آمید دارای وزنی برابر با ۳۰ کیلو دالتون بود که در آزمون وسترن بلات به عنوان پروتئین پوششی ویروس تایید شد (شکل‌های ۷، ۸ و ۹).

استخراج RNA کل

استخراج RNA کل بوته‌های آلوده به TSV با استفاده از کیت RNeasy (شرکت کیاژن) انجام شد. در ارزیابی RNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز افقی، باندهای اسید نوکلئیک بر روی ژل آگارز به خوبی مشخص بودند. در نتیجه این RNAهای استخراج شده برای انجام آزمون RT-PCR مناسب تشخیص داده شدند.

آزمون DAS-ELISA

نمونه‌های آلوده به TSV با آنتی سرم چند همسانه‌ای TSV (تهیه شده در موسسه DSMZ آلمان) تست شدند. نمونه‌هایی که جذبشان توسط دستگاه ELISA- Reader از دو برابر میانگین جذب نمونه‌های منفی بیشتر بود مثبت در نظر گرفته شدند.

دامنه میزبانی TSV

جهت بررسی طیف میزبانی ویروس بر روی ۱۳ گونه گیاهی برده شد که علائم و نوع واکنش در محکها: سلمه (*Chenopodium quinoa*) علائم به صورت لکه‌های کلروتیک سیستمک در برگها مشاهده گردید (شکل ۲ سمت راست).
سلمه قرمز (*C. amaranticolor*) لکه‌های موضعی کلروتیک در سطح برگها مشاهده شد (شکل ۲ سمت چپ).
ویروس در باقلا (*Vicia faba*) لکه‌های کلروتیک، پیچیدگی برگها و در نهایت زردی و پژمردگی بوته را به همراه داشت (شکل ۳).
آفتابگردان (*Helianthus annuus*) قاشقی شدن برگها به سمت پایین، تورم رگبرگی (شکل ۴).
در گل تکمه‌ای (*G. globosa*) سه هفته پس از مایه زنی بدشکلی برگ و جمع شدن لبه برگها در قسمت بالای برگ مشاهده

پوشش پروتئینی محصول PCR ایزوله TSV اصفهان با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن، نشان دهنده ۹۹٪ تشابه بود. با توجه به مقایسه انجام شده در Blastn بالاترین شباهت را با جدایه باقلا که ۹۹ درصد بود و کمترین شباهت را با جدایه ۱۹۷۴ آفتابگردان داشت که ۸۲ درصد بود. در مقایسه ترادف آمینواسیدی آن با استفاده از برنامه Blastx نیز بالاترین شباهت را با TSV (CAP71888.1) داشت که ۹۹ درصد بود و کمترین شباهت را با ویروس *Lilac ring mottle virus* داشت که ۲۳ درصد بود (شکل ۱۱).

آزمون RT-PCR

در این آزمون با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی TSV قطعه‌ای به طول ۷۱۷ جفت باز تکثیر شد. گیاهان آلوده به TSV با استفاده از آزمون IC-RT-PCR و از همان آغازگرهای مورد استفاده در RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون هم قطعه‌ای به طول ۷۱۷ جفت باز تکثیر گردید. بر روی ژل آگارز ۱٪ باندهای ۷۱۷ جفت بازی مشاهده گردید (شکل ۱۰).

تعیین ترادف نوکلئوتیدی قطعه تکثیر شده از پوشش

پروتئینی TSV

نتایج حاصل از مقایسه ترادف نوکلئوتیدی قطعه تکثیر شده از



شکل ۱- علائم بدشکلی برگها و روشنی رگبرگ در بوته‌های آلوده آفتابگردان در مزرعه



شکل ۲- شکل سمت راست لکه‌های کلروتیک در برگ *C. quinoa* و شکل سمت چپ لکه‌های موضعی کلروتیک در برگ *C. amaranticolor*



شکل ۳- باقلا (*Vicia faba*) لکه‌های کلروتیک، پیچیدگی برگها و در نهایت زردی و پژمردگی بوته



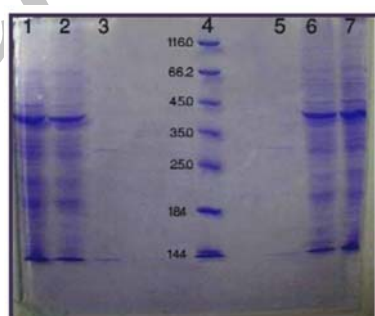
شکل ۴- قاشقی شدن برگها به سمت پایین، تورم رگبرگی در آفتابگردان



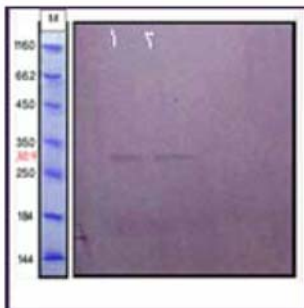
شکل ۵- گل تکمه‌ای (*G. globosa*) بدشکلی برگ و جمع شدن لبه برگها در قسمت بالای برگ سمت چپ: برگ سالم



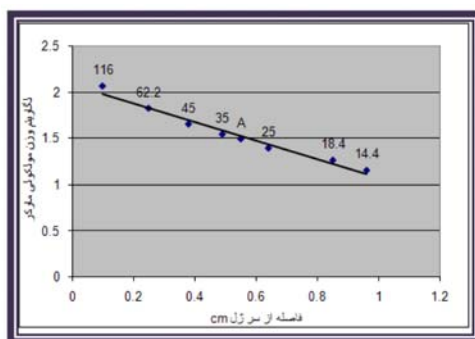
شکل ۶- لکه‌های کلروتیک در برگهای لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*)



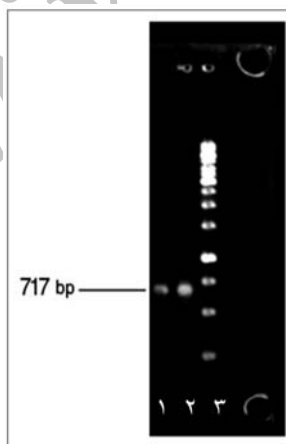
شکل ۷- آزمون SDS-PAGE عصاره گیاهان آلوده و سوسپانسیون خالص TSV
۱ و ۷ عصاره گیاه سالم، ۲ و ۶ عصاره گیاه آلوده به TSV،
۳ و ۵ ویروس خالص TSV و ۴ نشانگر وزن مولکولی پروتئینی



شکل ۸- نتیجه آزمون وسترن بلات TSV
 (۱) عصاره گیاه آلوده به ویروس
 (۲) ویروس خالص TSV M: مارکر مربوط به مرحله SDS-PAGE آن است.



شکل ۹- خط رگرسیون بر اساس فاصله باند از سر ژل و لگاریتم وزن مولکولی پروتئین‌های مارکر
 A: وزن مولکولی پروتئین پوششی TSV 30/9 KD



شکل ۱۰- آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی TSV قطعه تکثیر شده مربوط به ناحیه‌ای از توالی کد کننده پروتئین پوششی ویروس می‌باشد.

- (۱) باقلا آلوده به TSV
- (۲) آفتابگردان آلوده به TSV
- (۳) نشانگر اندازه DNA (1Kbp)

>TSV_f

ATGAATACTTTGATCCAAGGTCCAGACCATCCATCCAACGCCATGTCTTCTCGTACTAACAACCGCTCA
 AACACAGCAGATGCCCAACTTGTGTTGACGAGTTGGAAGCTTTGCGGAGGAATTGTCCCGCCATACTC
 CCGGAACATTGTGTCGCGACGTCAGCGGCGTAATGCCGCTAGGGCTGCTGCGTATCGAAACGCGAATGC
 CCGTTTACCAGTACCAATTCCAGTGGTGCCGGTTTCCC GCCCTCAAGCGAAGGCGTCTGTTGAGGTTGCCCA
 ATAATCAAGTTTGGGTGACTCGCAAAGCGAGTGAATGGTGTGCAAAGACCGTTGATACCAAGTGTAT
 CCCCTTCAAAAACATAGTCGAGGGGATTCCCGAAAATCAATGATGAGACGAAGTTTTCCTGCTCTTAATTG
 GTTTTGTGCGCCGCTCTGATGGGACGTTTGGGATGGTTGATGGAGTAACAGGCGATGTTATTCCTGACCCA
 CCGTCTGTTGGACGTTGGGTTTCAAGAAGAATACTTACCGCAGCCGAGATTTTGATCTCGGTGGTAAAC
 TTCTCAACCAACTAGACGACAGAGCTGTCGCTGTTGCCTCGACGAAAGACGTCGAGATGCCAAGAGGGT
 TCAGCTGGCAGGTTATTGGATTGCCATTTCCAAACCAGTCCCTTGATGCCACCAGAAGATTTTCTGGTGA
 ATCAAGA

شکل ۱۱- ترادف نوکلئوتیدی بخشی از توالی کد کننده پوشش پروتئینی مربوط به TSV جدا شده از گیاه آفتابگردان

پاساژهای میزبانی باعث بروز پدیده نوترکیبی کاذب (pesudorecombinant) شده که باعث تغییر واکنش میزبان در برابر ویروس جدید می‌شود.

براساس گزارش پراساداراو و همکاران (۱۱) در سال ۲۰۰۳ علف هرز *Parthenium hysterophorus* به عنوان یک منبع آلودگی برای TSV می‌باشد.

نتایج بدست آمده نشان داد که باقلا میزبان تکثیر مناسبی برای ویروس می‌باشد. وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس رگه‌ای توتون با استفاده از SDS-PAGE با رسم منحنی رگرسیون ۳۰/۹ کیلو دالتون مشخص شد که با نتایج حاصل از Ali Lister و Gabriel و همکاران مطابقت داشت (۱ و ۸). آزمون وسترن بلات این باند را به عنوان پروتئین پوششی ویروس تأیید کرد.

آزمون‌های RT-PCR و IC-RT-PCR که با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی TSV که به ترتیب توسط بهات و همکاران (۲) طراحی شده بودند، انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد که آزمون‌های RT-PCR و IC-RT-PCR روش‌های مولکولی دقیق و مناسبی در ردیابی ویروسها می‌باشند و آزمون IC-RT-PCR از اختصاصیت بیشتری برخوردار است.

طول قطعات تکثیر شده برای TSV، ۷۱۷ جفت باز بود که با نتایج گزارش شده توسط بهات و همکاران (۲) مطابقت داشت و در مقایسه ترادف نوکلئوتیدی به دست آمده از TSV با جدایه‌های موجود در بانک ژن شباهت بالایی (۹۹-۸۲ درصد) وجود داشت. بالاترین شباهت (۹۹ درصد) موجود بین جدایه فوق با جدایه *Faba bean* (AM933669.1) بانک ژن و کمترین شباهت (۸۲ درصد) را با جدایه (EU375481.1) ۱۹۷۴ آفتابگردان از بانک ژن داشت. با توجه به شباهت بالای ترادف نوکلئوتیدی این جدایه با سایر جدایه‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت چشمگیری بین این جدایه با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن در ناحیه کد کننده پوشش پروتئینی وجود ندارد.

با توجه به اهمیت آفتابگردان و نقش مهمی که در بخش گیاهان

بحث و پیشنهادها

در نمونه برداری‌هایی که جهت شناسایی ویروس رگه‌ای توتون (TSV) از آفتابگردان طی سالهای ۸۷-۱۳۸۶ انجام گرفت با انجام آزمون‌های مختلف سرولوژیکی و آزمون RT-PCR میزان آلودگی و پراکنش این ویروس در مزارع آفتابگردان مشخص شد. ردی و همکاران (۱۳) نشان دادند که TSV در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتیگراد در شرایط گلخانه ایجاد نکروز شدید می‌کند. همچنین شیرشیکار (۱۷) در سال ۲۰۰۳ بیان کرد که تاریخ کاشت در شیوع ویروس TSV مؤثر است به طوری که اگر آفتابگردان در ماه‌های مرداد و شهریور کاشته شود بیشترین آلودگی به TSV خواهد داشت. همینطور که از نتایج بدست آمده برمی‌آید شیوع TSV در آذربایجان غربی بوده است. در حالی که استان قم که یک منطقه گرمسیر است و کشت آفتابگردان در منطقه در ماه‌های خرداد و تیر انجام می‌شود کمترین آلودگی به ویروس را داشته است. در استان مرکزی هیچ گونه آلودگی نسبت به هر دو ویروس دیده نشد، پیشنهاد می‌شود که برای روشن شدن علت عدم آلودگی، عواملی نظیر شرایط آب و هوایی، جمعیت ناقلین، رقم کاشته شده و گیاهان کاشته شده در مزارع مجاور مورد ارزیابی قرار گیرد. تریپس‌های ناقل با انتقال گرده‌های آلوده در انتشار ویروس‌ها نقش مؤثری دارند. شرایط دمایی در پراکنش تریپس‌ها بسیار مؤثر می‌باشد و احتمالاً در مناطقی که جمعیت تریپس‌ها بالاست این ویروس شیوع بیشتری دارد.

در بررسی‌های بیولوژیکی که بخشی از آن مربوط به طیف میزبانی ویروس می‌باشد از تعدادی گیاه محک استفاده شد و با انجام آزمون‌های سرولوژیکی مختلف و آزمون RT-PCR مشخص گردید که نتایج حاصل از دامنه میزبانی TSV با نتایج به دست آمده توسط پراساداراو و همکاران (۱۱) در سال ۲۰۰۳ مطابقت دارد. اما دیجکسترا (۶) در سال ۱۹۸۳ دامنه میزبانی وسیع تری را برای TSV بیان کرده است لذا نوع جدایه ویروس و نوع گیاه محک نقش مؤثری در دامنه میزبانی دارند. یاروود (۱۹) در سال ۱۹۷۹ گزارش کرد

کاشت گیاهان هیبرید بعنوان مثال Poc-64A43 که این هیبرید طی تحقیقات انجام شده توسط Shirshikar کمترین واکنش را به بیماری داشته است برای بررسی اینکه آیا این هیبرید در شرایط آب و هوایی ما می‌تواند در کاهش TSV سودمند باشد.

با توجه به متفاوت بودن ارقام کاشته شده در مناطق نمونه برداری ارزیابی مقاومت در مورد رقم‌های کاشته شده در قم با رقم‌های کاشته شده در آذربایجان نمونه برداری مجدد از استان‌های مرکزی و قم که آلودگی کمتری به ویروس داشته و ارزیابی شرایط آب و هوایی، جمعیت ناقلین و گیاهان کاشته شده در مزارع مجاور.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب سپاس و تشکر خود را از پروفسور استفان وینتر به جهت کمک‌های علمی و ارسال آنتی سرم و تعیین مترادف نوکلوتیدی ابراز می‌دارند.

صنعتی دارد، لزوم پیشگیری از بروز بیماری بصورت اپیدمیک در مزارع عمده کشت آفتابگردان کشور بسیار حائز اهمیت می‌باشد لذا توصیه می‌شود پیشنهادات و اقدامات ذیل انجام گیرد:

با توجه به وجود علف‌های هرز که به عنوان منبع آلودگی برای این ویروس عمل می‌کنند حذف علف‌های هرز موجب کاهش آلودگی و انتشار ویروس در مزارع آفتابگردان خواهد شد.

تنظیم تاریخ کاشت با توجه به تحقیقات انجام شده بیماری TSV در فصل تابستان شیوع بیشتری دارد، لذا پیشنهاد می‌گردد بررسی جامعی در مورد تنظیم تاریخ کشت جهت کنترل بیماری در شرایط آب و هوایی ایران به عمل آید. کنترل تریپس‌های ناقل سبب جلوگیری از انتشار ویروس خواهد شد.

بررسی و تحقیق جهت یافتن ژنوتیپ‌هایی از آفتابگردان به ویژه آنهایی که مقاوم به تریپس بوده یا به شکلی تریپس به علت وجود موانع فیزیکی مانند کرکدار بودن قادر به تغذیه از آن نباشد که در نهایت این امر منجر به کاهش آلودگی توسط ویروس خواهد شد.

منابع

- 1- Ali M.A., Winter S. and Dafalla G.A. 2008. *Tobacco streak virus* infecting Faba bean (*Vicia faba*) reported for the Frist time. *New Disease Reports*. 17:97.
- 2- Bhat A.L., Jain R.K., Kumar A., Ramiah M. and Varma A. 2002. Serological and coat protien sequence studies suggest that necrosis disease on sunflower in India is caused by a strain of *Tobacco streak ilarvirus*. *Archives of Virology*, 147:651-658.
- 3- Brunt A. A. 1968. *Tobacco streak virus* in dahlias. *Plant pathol.*, 17: 119 – 122.
- 4- Clark M.F., and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplatemethod of enzyme- linked immunosorbant assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34:475-483.
- 5- D'Arcy C.J. and Domier L.L. 2005. Family *Bromoviridae*. Virus taxonomy. Eight report of taxonomy of the international committee on the taxonomy of viruses. Academic press, NY,USA., Pp. 1162.
- 6- Dijkstra J. 1983. *Tobacco streak virus* in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant pathol*, 89: 153-169.
- 7- Ghabrial S.A. and Lister R.M. 1974. Chemical and physicochemical properties of two strains of *Tobacco streak virus*. *Virology*, 57: 1 – 10.
- 8- Hosseini S., Mosahebi G. and Koochi Habibi M. 2007. Distribution of sunflower viruses in four provinces of Iran. 10th International plant virus epidemiology symposium, Controlling epidemics of emerging and established *Plant Virus Disease*, P.127.
- 9- Kasier W.J., Wyatt S.D. and Pesho G.R. 1982. Natural host and vectors of *Tobacco streak virus* in Eastern Washington. *Phytopathology*, 72:1508-1512.
- 10- Mathews R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirolgy*, 17: 1-119.
- 11- Prasada Rao R.D.V.J., Reddy A.R., Reddy S.V., Thirumala Devi K., Chander Rao S., Manojkumar V., Subramaniam K., Yellamanda Reedy T., Nigam S.N., and Reedy D.V.R. 2003. The host range of *Tobacco streak virus* in India and transmission by thrips. *Ann. Appl. Biol*, 142: 365-368.
- 12- Ravi K.S., Buttgerreit A., Kitkaru A.S., Deshmukh S., Lesemann D.E. and Winter S. 2001. Sunflower necrosis disease from India is caused by an *ilarvirus* related to *Tobacco streak virus*. *New deisease reports*, 3:1-2.
- 13- Reddy A.S., Prasada Rao R.D.V.J., Thirumala Devi K., Reddy S.V., Mayo M.A. and Roberts I. 2001. Occurrence of *Tobacco streak virus* on peanut (*Arachis hypogaea*) in India. *Plant Dis*, 86. 173-178.
- 14- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- 15- Sdoodee R. and Teakle D.S.1987. Transmission of *Tobacco streak virus* by *Thrips tabaci*: a new method of plant virus transmission. *Plant pathology*,36:377-380.
- 16- Sharman M., Thomas J.E. and Persley D.M. 2011. First report of Tobacco streak virus in sunflower , cotton , chickpea and mung bean in Australia. *Plant Dis. Notes*. 3: 27-29
- 17- Shirshikar S.P. 2003. Influence of different sowing dates on the incidence of Sunflower necrosis disease. *Helia*, 26:109-116.

- 18- Vemana K. and Jain R.K. 2010. New Experimental Hosts of Tobacco streak virus and Absence of True Seed Transmission in Leguminous Hosts. *Indian Journal of Virology*. 21:117-127.
- 19- Yarwood C.E. 1979. Host passage effect with plant viruses. *Adv.virus Res*, 25:169-190.

Archive of SID