نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، ص. ۱۵۸-۱۵۴

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 1, Spring 2015, P. 154-158

گزارش کوتاه پژوهشی

ردیابی ویروس‌های عامل موزاییک گوجه‌فرنگی در مزارع و گلخانه‌های شهرستان یزد و تعیین نژاد چند جدایه‌ی ویروس وای سیب‌زمینی از این میزبان

سید رضا میررحیمی[1*]- ثمین حسینی[2]- احمد حسینی[3]- سید علیرضا اسمعیل‌زاده حسینی[4]- الهام محمدی[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۰۴

چکیده

گوجه‌فرنگی یکی از سبزیجات مهم در ایران و بسیاری از کشورهاست. دراین پژوهش برای بررسی پراکندگی ویروس‌های عامل موزاییک در مزارع و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی شهرستان یزد، در سال زراعی ۹۱-۹۰، ۴۵۱ نمونهٔ برگی دارای علایم موزاییک از مناطق عمدهٔ کشت جمع‌آوری شد. برای شناسایی ویروس‌های مذکور از آزمون‌های DAS-ELISA و ACP-ELISA و آنتی‌بادی‌های چندهمسانهٔ اختصاصی *Potato virus Y* (PVY)، *Cucumber mosaic virus* (CMV)، *Tomato mosaic virus* (ToMV) و *Arabis mosaic virus* (ArMV) و آنتی بادی تک همسانه‌ای جنس پوتی‌ویروس استفاده شد. درصد آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده به ویروس‌های جنس پوتی‌ویروس، CMV، PVY، ArMV و ToMV به ترتیب ۳۵/۹ درصد، ۱۱/۳ درصد ، ۲۰/۶ درصد، ۲/۶ درصد و ۱۳/۵ درصد بود. بنابراین با توجه به نتایج، PVY ویروس غالب در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده است. جهت بررسی نوع نژاد جدایه‌های PVY جمع‌آوری شده، چهار جدایه از ویروس وای سیب‌زمینی انتخاب شد. پس از استخراج RNAی کل از جدایه‌های آلوده، با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی PVY (P1/P2) مربوط به ناحیهٔ پروتئازی P1، یک قطعهٔ ۸۳۷ جفت بازی تکثیر شد. برای شناسایی نژاد جدایه‌های مورد بررسی، در آزمون RFLP محصول PCR تحت تأثیر آنزیم برشی *HincII* قرار گرفت و سپس از جفت آغازگرهای اختصاصی نژادهای PVY استفاده شد. نتایج حاصل از واکنش نشان داد که هر چهار جدایهٔ مورد بررسی متعلق به نژاد NTN هستند.

واژه‌های کلیدی: گوجه‌فرنگی، پوتی‌ویروس، DAS-ELISA، ACP-ELISA، RT-PCR

مقدمه

گیاه گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicum esculentum* Mill. یکی از گیاهان دولپه در تیره‌ی سیب‌زمینی است. بیماری‌های ویروسی باعث ایجاد خسارت‌های کمی و کیفی در گیاه گوجه‌فرنگی می‌شوند. ویروس‌های *Potato virus Y* (PVY)، *Cucumber mosaic virus* (CMV)، *Tomato mosaic virus* (ToMV) و *Arabis mosaic virus* (ArMV) از مهم‌ترین عوامل ایجاد کنندهٔ موزاییک گوجه‌فرنگی در ایران بوده و خسارات عمده‌ای به این محصول وارد می‌آورند (۱). ویروس PVY عضو تیپ جنس *Potyvirus* در خانوادهٔ *Potyviridae* است و گسترش جهانی وسیعی دارد. این ویروس اولین‌بار در دنیا توسط اسمیت (۱۱) در سال ۱۹۳۱ از کشور انگلستان و در ایران توسط کریمی (۸) درسال ۱۹۶۷ از روی سیب‌زمینی گزارش شده است. پیکره‌ی ویروس وای سیب‌زمینی رشته‌ای به طول ۷۴۰ نانومتر و عرض ۱۱ نانومتر می‌باشد (۹). ژنوم PVY مانند سایر اعضای تیرهٔ پوتی‌ویریده، از یک قطعه RNA تک رشته با قطبیت مثبت تشکیل شده و دارای حدود ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید و تنها یک چارچوب خوانش باز (ORF) است (۳). این ویروس دارای دامنه میزبانی وسیعی می‌باشد و به‌طور طبیعی بیش از نه خانوادهٔ گیاهی از جمله تیره‌های سیب‌زمینی، کاسنی، حبوبات، اسفناج، برخی از علف‌های هرز و گیاهان زینتی را آلوده می‌کند (۶ و ۷). در حالت کلی نژادهای PVY به سه نژاد O، N و C تقسیم‌بندی می‌شود. نوترکیب‌های زیادی بین دو نژاد O و N در اثر حضور هم‌زمان این دو در یک گیاه ظهور کرده است. به نژادهایی که از نوترکیبی بین O و N حاصل شده‌اند اصطلاحاً نژادهای N:O نیز می‌گویند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به NTN و N-Wilga اشاره کرد. ناحیهٔ $3'$ نژاد NTN شبیه به نژاد O و ناحیهٔ $5'$ شبیه به نژاد N است (۱۰).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و ردیابی ویروس‌های عامل موزاییک از گلخانه‌ها و مزارع گوجه‌فرنگی

برای ردیابی ویروس‌های عامل موزاییک گوجه‌فرنگی در سال

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشارزی، دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان
(*- نویسنده مسئول: Email: seyedreza251@yahoo.com)
۴- مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد
۵- کارشناس ارشد اداره حفظ نباتات تهران

زراعی ۹۰- ۹۱، ۱۶۱ و ۲۹۰ نمونه دارای علایم موزاییک به ترتیب از گلخانه و مزارع مناطق عمدهٔ کشت گوجه‌فرنگی شهرستان یزد جمع-آوری شد. برای بررسی نمونه‌های آلوده به جنس پوتی‌ویروس از آزمون antigen-coated plate ELISA (ACP-ELISA) و آنتی-سرم اختصاصی پوتی‌ویروس‌ها (AS-0573) و برای تشخیص PVY، CMV، ToMV و ArMV از آزمون double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) و آنتی‌بادی چند همسانه‌ای ویروس‌های مذکور (به ترتیب AS-0041، AS-0137، AS-0008 و AS-475) تهیه شده در موسسه DSMZ آلمان بر اساس دستورالعمل کلارک و آدامز استفاده شد (۴). نتایج حدود نیم ساعت بعد از آخرین مرحله آزمون توسط دستگاه الیزا خوان ساخت کشور آمریکا (BioTek®, Elx 808) با طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. نمونه‌هایی که میزان جذب‌شان بیش‌تر از دو برابر میانگین جذب نمونه‌های سالم بود به عنوان نمونه‌های آلوده به ویروس در نظر گرفته شدند.

خالص‌سازی بیولوژیکی و تکثیر چهار جدایهٔ PVY

برای تعیین نژاد، چهار جدایهٔ PVY با نام‌های T5، T2 (جمع-آوری شده از مزرعه)، G1 و G2 (جمع‌آوری شده از گلخانه) انتخاب و برای خالص‌سازی بیولوژیکی، به صورت مکانیکی روی گیاهان باقلا مایه‌زنی شدند و سپس لکه‌های موضعی برای تکثیر روی بوته‌های گوجه‌فرنگی منتقل شدند. برای مایه‌زنی از بافر فسفات ۰/۰۵ مولار، pH 7 و پودر کاربوراندوم استفاده شد. بوته‌های آلوده به جدایه‌های تکثیر شده به عنوان منبع ویروس در شرایط گلخانه‌ای مناسب با دمای ۲۵ تا ۳۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج RNAی کل و واکنش RT-PCR

RNAی کل با استفاده از کیت Rneasy Plant Mini Kit (ساخت شرکت کیاژن، آلمان) براساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. اندازه‌گیری کیفی و کمی آمودهٔ RNAی کل استخراج شده، به ترتیب با روش‌های الکتروفورز افقی در ژل آگارز (یک درصد) و اندازه‌گیری میزان جذب آموده در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ (Termo 2000®, USA) انجام شد و آموده‌های RNAی کل مناسب برای آزمون RT-PCR مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام این آزمون از چندین جفت آغازگر اختصاصی PVY استفاده شد (۲) (جدول ۱). جفت آغازگرهای P1/P2 که ناحیهٔ P1 را تکثیر می‌کنند، قادر به تفکیک نژادهای مختلف نیستند. چهار جفت آغازگر دیگر با تکثیر ناحیه‌ای از پروتئین پوششی قادر به تفکیک نژادهای مختلف PVY هستند.

در این پژوهش از محصولات شرکت Vivantis استفاده گردید. ساخت cDNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، به‌مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, C1000™) انجام گرفت. مواد مورد استفاده در این مرحله عبارت بودند از: یک میکرولیتر آغازگر معکوس (۱۰ پیکومول/میکرولیتر)، سه میکرولیتر آمودهٔ RNAی کل، چهار میکرولیتر بافر MuMLV 5X و یک میکرولیتر آنزیم MuMLV-RT (۲۰۰ واحد/ میکرولیتر)، نیم میکرولیتر آنزیم RNase inhibiror (۴۰ واحد/ میکرولیتر) و ۲/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مول/میکرولیتر). cDNA با واکنش PCR بر طبق دستورالعمل شرکت سازندهٔ مواد تکثیر شد. مواد مورد استفاده برای انجام PCR عبارت بودند از: ۲/۵ میکرولیتر PCR 10X buffer، نیم میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مول/میکرولیتر)، نیم میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مول/ میکرولیتر)، نیم میکرولیتر آغازگر معکوس و پیشرو (۱۰ پیکومول/ میکرولیتر)، نیم میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (۵ واحد/ میکرولیتر) و ۲/۵ میکرولیتر cDNA در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر.

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر	نوع	دمای اتصال (درجه سلسیوس)	اندازه قطعه تکثیری (جفت باز)	موقعیت روی ژنوم
P_1	5-TTCCAAAGTGTCCTTTGAG-3	معکوس			۹۱۶-۹۳۷
P_2	5-CTTCATCAAACAAACTCTTT-3	پیشرو	۵۵	۸۳۷	۱۰۱-۱۲۰
OR	5-TGTACTGATGCCACCGTCGAAC-3	معکوس		۶۰۹	۹۲۷۴-۹۲۹۵
OF	5-TCTGGRACACATACWGTRCCR-3	مستقیم	۵۸		۸۶۸۷-۸۷۱۰
NR	5-CCTTCATTTGAATGTGTGCCTCT-3	معکوس			۹۲۱۴-۹۲۳۶
NF	5-TCTGGAACTCAYACTGTGCCAC-3	مستقیم	۵۸	۵۴۹	۸۶۸۷-۸۷۱۰
OR	5-TGTACTGATGCCACCGTCGAAC-3	معکوس			۹۲۷۴-۹۲۹۵
CF	5-TCTGGAACWCATACTGTACCAA-3	مستقیم	۵۸	۶۰۹	۸۶۸۷-۸۷۰۸
OR	5-TGTACTGATGCCACCGTCGAAC-3	معکوس			۹۲۷۴-۹۲۹۵
NF	5-TCTGGAACTCAYACTGTGCCAC-3	مستقیم	۵۸	۶۰۹	۸۶۸۷-۸۷۱۰

آزمون PCR-RFLP

قطعهٔ P1 دارای یک مکان برشی برای آنزیم *HincII* (*Hind II*) در نژادهای N و NTN است. به این منظور یک میکرولیتر آنزیم برشی *Hinc II* محصول شرکت فرمنتاز (#ER0491) و ۱۹ میکرولیتر بافر آنزیم (1X Thermo scientific Tango buffer) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده بر روی ۲۰ میکرولیتر محصول حاصل از PCR توسط آغازگرهای P_1/P_2 ریخته شد. میکروتیوب‌های حاوی آنزیم، سه ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس و سپس برای غیرفعال کردن آنزیم برشی، سه دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس گذاشته شدند. نمونهٔ حاصل روی ژل آگارز یک درصد برده شد.

نتایج و بحث

ردیابی ویروس‌های عامل موزاییک گوجه‌فرنگی در مزارع و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی شهرستان یزد

در این پژوهش از مجموع ۴۵۱ نمونهٔ گوجه‌فرنگی جمع‌آوری شده به ترتیب ۳۵/۹ درصد، ۱۱/۳ درصد، ۲۰/۶ درصد، ۲/۶ درصد و ۱۳/۵ درصد به ویروس‌های جنس پوتی‌ویروس، CMV، PVY، ArMV و ToMV و تعدادی نیز به دو ویروس آلوده بودند (جدول ۲). با توجه به آمار ارائه شده در این پژوهش بیش‌ترین میزان آلودگی به ویروس‌های مورد مطالعه در نمونه‌های جمع‌آوری شدهٔ دارای علائم موزاییک در مزارع و گلخانه‌های شهرستان یزد، مربوط به PVY بوده است.

درصد آلودگی به سه ویروس (CMV، PVY و ToMV) در مزرعه بیش‌تر از گلخانه بوده است. بر اساس مشاهدات، میزان فعالیت و تعداد شته‌های ناقل در مزرعه بسیار بیش‌تر از گلخانه‌های شهرستان یزد بود. در گلخانه‌های نمونه‌برداری شده فاصلهٔ کشت بین بوته‌های بیش‌تر از مزرعه بود و گیاهان تماس کم‌تری با هم داشتند که این عوامل دلیل احتمالی افزایش پراکندگی این سه ویروس در مزارع گوجه‌فرنگی نسبت به گلخانه‌هاست.

تکثیر جدایه‌های PVY در گلخانه

حدود ۱۳ تا ۱۵ روز پس از مایه‌زنی چهار جدایهٔ انتخابی PVY بر روی بوته‌های گوجه‌فرنگی، علائم سیستمیک ظاهرگشت. علائم اولیه به‌صورت موزاییک بر روی برگ مایه‌زنی شده بودکه پس از گذشت زمان، علائم به‌صورت چین و چروک و بدشکلی در کل گیاه دیده شد.

واکنش RT-PCR با آغازگر P1/P2

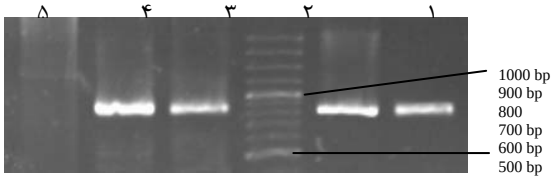
در هر چهار جدایه‌ی مورد بررسی با استفاده از جفت آغازگر P1/P2 قطعه‌ی ۸۳۷ جفت بازی مربوط به ناحیهٔ ژن پروتئاز P1 تکثیر شد (شکل۱).

آزمون RFLP

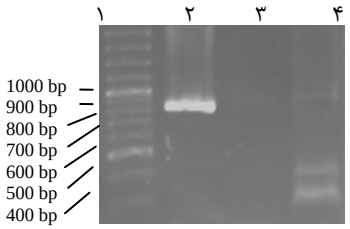
در آزمون هضم آنزیمی قطعه‌ی P1 در هر چهار جدایه دو قطعهٔ حدودا ۴۰۰ جفت بازی ایجاد شد (شکل ۲). بنابراین بر اساس این نتیجه این جدایه‌ها متعلق به گروه N و یا NTN است.

جدول ۲- پراکنش ویروس‌های عامل موزاییک در مزارع و گلخانه‌های شهرستان یزد

محل	تعداد نمونه‌های آلوده به تنها یک ویروس					تعداد نمونه‌های آلوده به دو ویروس		
نمونه برداری	پوتی ویروس	CMV	PVY	ArMV	ToMV	ToMV+PVY	ToMV+CMV	PVY+CMV
گلخانه	۶۵	۱۵	۳۱	۱۰	۲۱	۲	۱	۰
مزرعه	۹۷	۳۶	۶۲	۲	۴۰	۶	۳	۴
مجموع	۱۶۲	۵۱	۹۳	۱۲	۶۱	۸	۴	۴



شکل ۱- نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر با آغازگر P1/P2: راهک۱) نمونهٔ T5، ۲) نمونهٔ T2، ۳) نشانگر یک کیلوبازی فرمنتاز (O' Gene Ruller ^{TM} ladder)، ٤) نمونهٔ G1، ٥) نمونهٔ G2 و ٦) نمونهٔ کنترل منفی



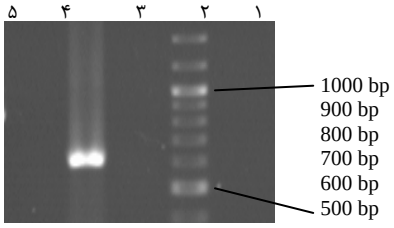
شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول هضم آنزیمی جدایهٔ T5: راهک ۱) نشانگر یک کیلوبازی فرمنتاز (O' Gene Ruller ^{TM})، ۲) محصول PCR حاوی ژن P1 ۳) کنترل منفی و ٤) محصول PCR هضم شده با آنزیم برشی *HincII*

واکنش RT-PCR با جفت آغازگرهای اختصاصی نژادهای PVY

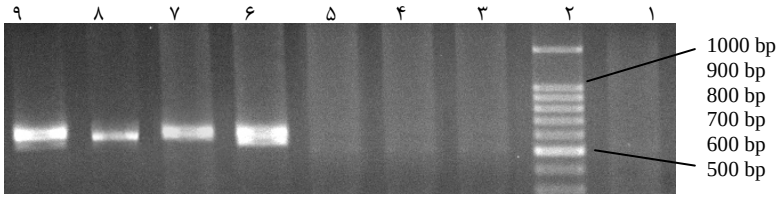
جدایه‌های مورد بررسی با جفت آغازگر اختصاصی نژاد C (CF/OR) و N (NF/NR) هیچ واکنشی ندادند، بنابراین هیچ یک از جدایه‌های مورد بررسی متعلق به نژاد C و N نیستند. اما هر چهار جدایه با آغازگر اختصاصی O (OF/OR) واکنش داده و قطعات ۶۰۹ نوکلئوتیدی تکثیر شد (۲). از آن‌جا که جدایه‌های نوترکیب گروه N:O مانند NTN و Wilga به علت مشابهت توالی ^{3}/ به گروه O نیز با این آغازگر واکنش می‌دهند، برای بررسی بیش‌تر جدایه‌های مذکور از یک جفت آغازگرهای NF و OR اختصاصی نژادی NTN استفاده شد (۵). با توجه به تکثیر این ناحیه در هر چهار جدایه با آغازگر اختصاصی NTN و ایجاد یک قطعهٔ ۶۰۹ نوکلئوتیدی، این جدایه متعلق به نژاد NTN است (شکل ۳ و ۴).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش با روش‌های سرولوژیکی آلودگی گوجه‌فرنگی در مزارع و گلخانه‌ها به CMV، PVY، ArMV و ToMV به اثبات رسید که بر اساس نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های علایم‌دار، آلودگی به PVY (۲۰/۶ درصد) بیش‌تر از بقیه بود. نتایج آزمون RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی PVY آلودگی به این ویروس را تایید نمود. برای تعیین سویهٔ چهار جدایهٔ انتخابی T5، T2، G2 و G1 این ویروس در یک آزمون RFLP با برش توسط آنزیم *HincII* در محصول حاصل از تکثیر ناحیهٔ P1 با جفت آغازگر P1/P2 دو قطعه‌ی حدود ۴۰۰ جفت بازی ایجاد شد. برش در این ناحیه نشان دهندهٔ متعلق بودن این جدایه‌ها به نژاد N و یا NTN است.



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR واکنش جدایهٔ T5 با آغازگرهای NF/NR/OF/ OR/ CF: راهک ۱) کنترل منفی، ۲) نشانگر یک کیلوبازی فرمنتاز (O' Gene Ruller ^{TM} ladder)، ۳) جفت آغازگر اختصاصی نژاد N، ٤) جفت آغازگر اختصاصی نژاد O و ۵) جفت آغازگر اختصاصی نژاد C



شکل ٤- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با جفت آغازگر اختصاصی نژاد C راهک ۱) T5، ۳) T2، ٤) G2 و ۵) G1 و جفت آغازگر اختصاصی نژاد NTN راهک ٦) T5، ۷) T2، ۸) G2 و ۹) G1 و ۲) نشانگر ۱۰۰ جفت بازی کیاژن (Gel pilot, 100bp plus)

جدایه‌های مورد بررسی با آغازگرهای اختصاصی نژادهای O و NTN (OF/OR و NF/OR) واکنش نشان دادند. واکنش با جفت آغازگر OF/OR به دلیل شباهت انتهای ۳′ چارچوب ژنی CP جدایه‌های نوترکیب NTN با نژاد O است. بنابراین با توجه به تمام نتایج به دست آمده، هر چهار جدایهٔ T5، T2، G1 و G2 مورد بررسی متعلق به جنس PVY نژاد NTN هستند.

منابع

۱- معصومی ح.، حیدر نژاد ج. و حسینی پور ا. ۱۳۸۸. ارزیابی آلودگی طبیعی ارقام مختلف گوجه‌فرنگی نسبت به ویروس‌های مزارع وگلخانه‌ها در مناطق جنوب شرقی ومرکزی ایران. فصلنامه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی ۱: ۴۶۷-۴۷۳.

2- Boonham N.K., Walsh M., Hims S., Preston J. and Barker I. 2002. Biological and sequence comparisons of *Potato virus Y* isolates associated with potato tuber necrotic ring spot disease. Plant Pathology, 51:117-126.

3- Chung B.Y.W., Miller W.A., Atkins J.F., and Firth A.E. 2008. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105:5897-5902.

4- Clark M.F., and Adams A.M. 1977. Characteristics of the micro plate method of enzyme- linked Immuno sorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34:475-483.

5- Glais L., Tribodet M., and Kerlan C. 2002. Genomic variability in *Potato virus Y*: evidence that $PVY^{NW}$and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^{O} and PVY^{N} isolates. Archives of Virology, 147:363-378.

6- Gulya T., Shiel P., Freeman T., Jordan R., Isakeit T., and Berger P. 2002. Host range and characterization of *Sunflower mosaic virus*. Phytopathology, 92:694-702.

7- Jones R., Kumar S., and Mackie A. 2003. *Potato virus Y*. Western Australia Department of Agriculture, 1443-7783.

8- Karimi A.K. 1967. *Potato virus* diseases. Plant Disease, 3:23-32.

9- Shukla D., Frcnkel M., and Ward C. 1994. Structure and function of the *Potyvirus* genome with special reference to the coat protein coding region. Canadian Journal of Plant Pathology, 13:178-191.

10- Singh R.P., Valkonen J.P., Gary S.M., Boonham N., Jones R.A., Kerlan C., and Schubert J. 2008. Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strain infecting potato. Archives of Virology, 153:1-13.

11- Smith K.M. 1931. Composite nature of certain potato viruses of the mosaic group as revealed by the use of plant indicator. Proceeding of Royal Society Biological Sciences, 109:251-267.