دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال ششم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۹
صص ۵۹-۴۹

پراکنش ویروس وای سیب زمینی (*Potato Virus Y*) در شهرستان جهرم

کاوس ایازپور*[۱]، فرید ریاحی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲ تاریخ پذیرش:۹۶/۱۱/۱۸

چکیده

به منظور بررسی ویروس وای سیب زمینی از مزارع مختلف خانواده سیب‌زمینی از قبیل سیب زمینی، گوجه فرنگی، بادنجان و تنباکو در منطقه جهرم، طی فصول بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ تعداد ۳۵۰ نمونه گیاهی با علائم موزائیک و زردی برگ‌ها، لکه‌های نکروتیک روی رگبرگ‌ها و کوتولگی جمع‌آوری شد. بررسی آلودگی نمونه‌ها با آزمون سرولوژیکی الیزا و آزمون مولکولی RT-PCR انجام گردید. در بررسی نمونه‌های مشکوک با آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA با استفاده از آنتی سرم پلی کلونال ویروس وای سیب زمینی، تعداد ۶۰ نمونه که تنها از سیب زمینی بودند آلوده به ویروس تشخیص داده شدند. برای تشخیص ویروس در آزمون RT-PCR از جفت آغازگرهای P1 و P2 که ژنوم پوشش پروتئینی ویروس را تکثیر می‌کردند، استفاده شد. در نهایت دو نمونه مورد بررسی که در محدوده ۱۰۰۰ جفت بازی ایجاد باند کرده بودند ترادف‌یابی گردید. نتایج نشان داد که از بین گیاهان مورد بررسی، آلودگی فقط در سیب زمینی دیده می‌شود و گیاهان دیگر، عاری از آلودگی به PVY بودند. مقایسه توالی نوکلئوتیدی پوشش پروتئینی دو جدایه با ۱۹ توالی نوکلئوتیدی PVY موجود در بانک ژن جهانی نشان داد که یکی از جدایه‌های جهرم با بیشتر جدایه های اروپایی در گروه الف و جدایه دیگری با تعدادی معدود در گروه ب قرار می گیرند. بنابراین آلودگی به این ویروس فقط در گیاهان سیب زمینی در این منطقه مشاهده شد که احتمالا حاصل استفاده از غده های بذری آلوده می باشند. این اولین گزارش از حضور آشکار ویروس وای سیب زمینی و نژاد NTN آن در منطقه جهرم و استان فارس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیکی، الیزا، خانواده سیب زمینی، مگا ۶، نژاد NTN ، ویروس وای سیب زمینی، جهرم

[۱]- استادیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.
[۲]- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.
*- نویسنده مسئول مقاله: ayazpour@jia.ac.ir

مقدمه

سیب زمینی (*Solanum tubersum* L.) یک گیاه زراعی مهم در سراسر دنیا می‌باشد (Carputo *et al*., 2005). ویروس وای سیب زمینی (*Potato Virus Y*= PVY) گونه تیپ جنس پوتی‌ویروس (*Potyvirus*) در خانواده پوتی ویریده (Potyviridae) می‌باشد (Shukla and Ward, 1989). پیکره‌های ویروس وای سیب زمینی میله‌ای شکل هستند با حدود ۷۳۰ تا۷۴۰ نانومتر طول و ۱۱ تا ۱۲ نانومتر قطر (Shukla *et al*., 1994). ژنوم آن از یک آر. ان. ای تک رشته‌ای مثبت (SSRNA+) با طول حدود ۹/۷ کیلوباز تشکیل شده است (Boonham *et al*., 2002). در درون میزبان مناسب، RNA ژنومی ویروس وای سیب زمینی به یک پلی پروتئین بزرگ ترجمه می‌گردد سپس به ۱۰ پروتئین فعال شکسته می‌شود (Dougherty and Carrington, 1988).

این ویروس دارای نژادها، وارایانت‌ها و پاتوتیپ‌های مختلفی می‌باشد. بر اساس توالی ژنوم، نژادهای اصلی آن PVY^O، PVY^N و PVY^C می‌باشد (Moury *et al*., 2002). نژاد معمولی یا عمومی (PVY^O) موزائیک شدید یا خفیف ایجاد می‌کند و باعث ریزش برگ‌ها به‌صورت نواری بر روی گیاه سیب زمینی می‌گردد. نژاد PVY^N نکروز رگبرگی روی تنباکو ایجاد می‌کند (Chachulk *et al*., 1997) و باعث نکروز سیستمیک شدید روی دمبرگ و رگبرگ برگ‌های تنباکو می‌گردد (De Bokx and Huttinga, 1981). گروه دیگری از جدایه‌های PVY^N به وسیله تفاوت در خصوصیات بیماری‌زایی آنها بر روی سیب زمینی از لهستان گزارش گردیده و به‌نام PVY^{N-W} بر اساس شناسایی آن از روی رقم ویلگا (Wilga) سیب زمینی نامگذاری گردیده است (Chrazanowska, 1991). دیگر نژادهای ویروس وای سیب زمینی با محدودیت گسترش وجود دارند از جمله نژاد PVY^C که علائم فوق حساسیت بر روی تعداد زیادی از رقم‌های سیب زمینی ایجاد می‌کند و سبب موزاییک سیستمیک روی دیگر رقم‌ها می‌گردد (Jones, 1990). ویروس وای سیب زمینی توسط شته‌ها به روش ناپایا با کارایی بالایی منتقل می‌گردد و سبب اپیدمی در سیب زمینی، گوجه فرنگی، فلفل، تنباکو و دیگر گیاهان وابسته به سیب زمینی می‌شود (De Bokx and Huttinga, 1981). شته سبز هلو (*Myzus persicae*) یک ناقل موثر و مهم برای ویروس وای سیب زمینی می‌باشد. این ویروس همچین توسط شیره گیاهی و پیوند انتقال می‌یابد (Agrios, 2005). ویروس وای سیب زمینی موجب یک بیماری شدید به نام موزاییک یا روگوز موزاییک بر روی سیب زمینی می‌شود. تنوع علائم بستگی نژاد ویروس، نوع میزبان، شرایط آب و هوایی محل کاشت و همچنین آلودگی اولیه یا آلودگی ثانویه دارد (Drapar *et al*., 2002).

از آنجا که در شهرستان جهرم اطلاعات لازم در خصوص میزبان‌ها و پراکنش این ویروس وجود نداشت لذا این تحقیق صورت پذیرفت. هدف از این تحقیق، استفاده از ابزارهای شناسایی سرولوژیکی و مولکولی برای ردیابی ویروس وای سیب زمینی و تعیین پراکنش آن برای اولین بار در منطقه جهرم در جنوب استان فارس بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

به‌منظور بررسی ویروس وای سیب زمینی، طی سال‌های زراعی ۱۳۹۱ الی ۱۳۹۲ در فصول بهار و تابستان نمونه‌برداری از مزارع مختلف از قبیل سیب زمینی، بادنجان، تنباکو و گوجه فرنگی و همچنین، علف‌های هرز این مزارع از مناطق مختلف شهرستان جهرم شامل بخش خفر (روستاهای تادوان و فتح آباد، شهر خفر و خاوران) بخش کردیان (روستاهای گلدامچه، محمدیه و قطب آباد)، هکان از بخش مرکزی و سیمکان انجام گرفت. لازم به ذکر است که فقط در بخش خفر که آب و هوای معتدل‌تری نسبت به سایر بخش‌های شهرستان دارد، سیب زمینی کشت می‌شود.

نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان مشکوک به ویروس وای سیب زمینی با علائم موزاییک برگی، کوتولگی گیاه، زردی و پیچیدگی برگ‌ها، لکه‌های نکروتیک روی رگبرگ‌ها، کاهش رشد گیاه، ابلقی و کم رشدی صورت گرفت. نمونه های علف‌های هرز علائمی نداشتند. نمونه‌های جمع‌آوری شده در مزارع از هر گیاه در درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده و بعد از نام‌گذاری و یادداشت نوع محصول و مکان مزرعه و زمان جمع‌آوری به‌صورت خنک و تازه به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمون الیزا تا حداکثر یک هفته در یخچال و برای مدت-های طولانی‌تر و بررسی‌های مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در مجموع کل نمونه‌های جمع‌آوری شده برای بررسی ۳۵۰ نمونه بود.

آزمون ساندویچ دو طرفه الیزا[1]

جهت بررسی حضور ویروس وای سیب زمینی (PVY) در نمونه‌های جمع‌آوری شده و مشخص نمودن نمونه‌های آلوده و نیز تعیین پراکنش این ویروس در نمونه‌های مزارع سیب زمینی، گوجه فرنگی، بادنجان و نیز علف‌های هرز از آزمون سرولوژیک الیزای مستقیم استفاده شد. عصاره‌گیری از ۰/۵ گرم از بافت برگ و اضافه کردن ۵ میلی لیتر از بافر استخراج به آنها در هاون‌چینی کاملا استریل و له کردن آنها با دسته هاون صورت پذیرفت. آزمون سرولوژیکی الیزای مستقیم (DAS-ELISA) مطابق روش *کلارک و آدامز* (Clark and Adams, 1977) و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده کیت (Agdia,USA) انجام گرفت.

آزمون مولکولی نسخه برداری معکوس- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[2]

جهت انجام واکنش RT- PCR مراحل زیر انجام گرفت.

استخراج RNA کل (total RNA)

جهت بررسی‌های مولکولی و انجام آزمون RT-PCR، RNA کل از بافت‌های گیاهی توسط کیت تجاری خالص سازی RNA کل[3] (شرکت Jena Bioscience) انجام گردید.

[1] Double Antibody Sandwich – Enzyme Linked Immono Sorbent Assay (DAS-ELISA)
[2] Revers Transcriptas- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)
[3] Total RNA Purification Kit

ساخت DNA مکمل (cDNA Synthesis)

برای ساخت cDNA، از RNA کل و آغازگر اختصاصی معکوس (P_2) استفاده شد، سنتز cDNA مطابق پرتکل شرکت Thermo science صورت پذیرفت. به این صورت که ابتدا ۹ میکرولیتر RNA کل و یک میکرولیتر آغازگر اختصاصی معکوس در یک تیوب استریل مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار گرفت و سپس بلافاصله بر روی یخ منتقل شد. پس از آن ترکیبات زیر به آن اضافه شد: آنزیم نسخه بردار معکوس یک میکرولیتر، ۴ میکرولیتر 5X Reaction Buffer، ۲/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs و حجم کل با آب مقطر استریل دوبار تقطیر به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط فوق در دستگاه ترموسایکلر تحت شرایط دمایی زیر قرار گرفت: ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد و به منظور توقف واکنش ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

با هدف تأیید نتایج آزمون الیزا، از هر مزرعه به طور تصادفی یک یا دو نمونه مثبت آزمون الیزا انتخاب و واکنش زنجیره ای پلی مراز روی آن‌ها انجام گردید. به این منظور ۱۵ میکرولیتر از master mix تهیه شده از شرکت Bioneer کره‌جنوبی، ۳ میکرولیتر cDNA و ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها در حجم کل ۲۰ میکرولیتر مخلوط شده، واکنش در دستگاه ترموسایکلر مطابق برنامه دمایی بهینه سازی شده توسط *زینتی فخرآباد و همکاران* صورت پذیرفت (Zinati Fakhrabad *et al*., 2002). در برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ابتدا یک مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و گسترش به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و در انتها به منظور گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت.

نتایج حاصل پس از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱٪ توسط دستگاه ژل‌خوان (GEL DOC) (شرکت Biorad) مشاهده و تصویر برداری شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور توالی یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. آغازگرهای مورد استفاده عبارت بودند از: P_1= 3'CAACTCCAGATGGAACAATTG5' و P_2= 3'CCATTCATCACAGTTGGC5'.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

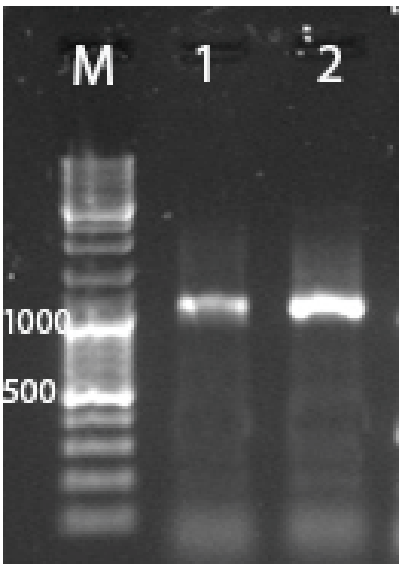
توالی های تکثیر شده ناحیه پوشش پروتئینی (CP) ویروس پس از توالی یابی توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی)، با استفاده از ابزار بلاست (BLAST) و با رویه blastn در پایگاه NCBI مشابهت یابی شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و با روش UPGMA درخت تکاملی برای نمونه‌های توالی یابی شده و چند توالی موجود در GenBank ترسیم گردید.

نتایج

بر اساس آزمون الیزا آلودگی به ویروس وای سیب زمینی تنها در بخش خفر و فقط در گیاهان سیب زمینی مشاهده شد. در دیگر مزارع نمونه برداری شده از جمله بادنجان، گوجه فرنگی، تنباکو و علفهای هرز مزارع سیب زمینی و دیگر مزارع هیچ نمونه مثبتی یافت نگردید. در مجموع ۳۵۰ نمونه شامل ۱۰۰ نمونه سیب زمینی، ۱۰۰ نمونه بادنجان، ۱۰۰ نمونه تنباکو و ۵۰ نمونه علف هرز جمع آوری و بررسی گردید که در آزمون الیزا ۶۰ نمونه سیب-زمینی آلوده تشخیص داده شد. برای شناسایی و تفاوت شناسی بین نژادهای ویروس وای سیب زمینی از تفاوت دامنه میزبانی و علائم شناسی آنها در مزرعه استفاده می‌شود (Moury *et al*., 2002). بر این اساس در زمان جمع-آوری نمونه‌ها به علائم ایجاد شده بسیار توجه شد. علی‌الخصوص به علائمی که نژادهای مهم ویروس وای سیب زمینی از قبیل O، C، N و NTN بر روی میزبان‌های مختلف ایجاد می‌کنند. بنابراین نمونه‌هایی که در آزمون الیزا مثبت شدند دارای علائم بسیار نزدیکی با نژاد NTN ویروس وای سیب زمینی، از قبیل موازئیک برگ‌ها، نکروز رگبرگی روی برگ‌ها، کاهش رشد گیاه و زردی گیاهان که در مزارع سیب زمینی مشهود بود داشتند.

نتایج آزمون RT-PCR و تشخیص مولکولی ویروس

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای P_1 و P_2 روی تعدادی از نمونه‌های مثبت آزمون الیزا انجام گردید. نتایج آزمون RT-PCR نیز آلودگی به ویروس وای سیب زمینی را در این نمونه‌ها به اثبات رسانید. مطابق شکل ۱، قطعه ژنومی به طول تقریبی ۱۰۰۰bp از ژن تولید پروتئین پوششی (CP) ویروس وای سیب زمینی که مورد انتظار بود، تکثیر گردید. بر پایه نتایج حاصل از توالی‌یابی ناحیه پوشش پروتئینی دو جدایه جهرم و مقایسه‌ی توالی این ناحیه با توالی‌های ثبت شده در سایت NCBI جدایه‌های جهرم بیشترین تشابه را در سطح ۹۹ درصد با PVY^{NTN} داشتند. توالی‌های به دست آمده در بانک ژن با رس شمار KM974183.1 و KM974182.1 ثبت گردیدند.



شکل ۱- نقوش الکتروفورزی حاصل از آزمون RT-PCR با استفاده از جفت آغازگرهای P1 و P2 روی جدایه های PVY جهرم در ژل آگاروز ۱٪. M= مارکر مولکولی DNA ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاس.

آنالیز و مقایسه فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروس وای سیب زمینی جهرم با سایر جدایه‌های دنیا

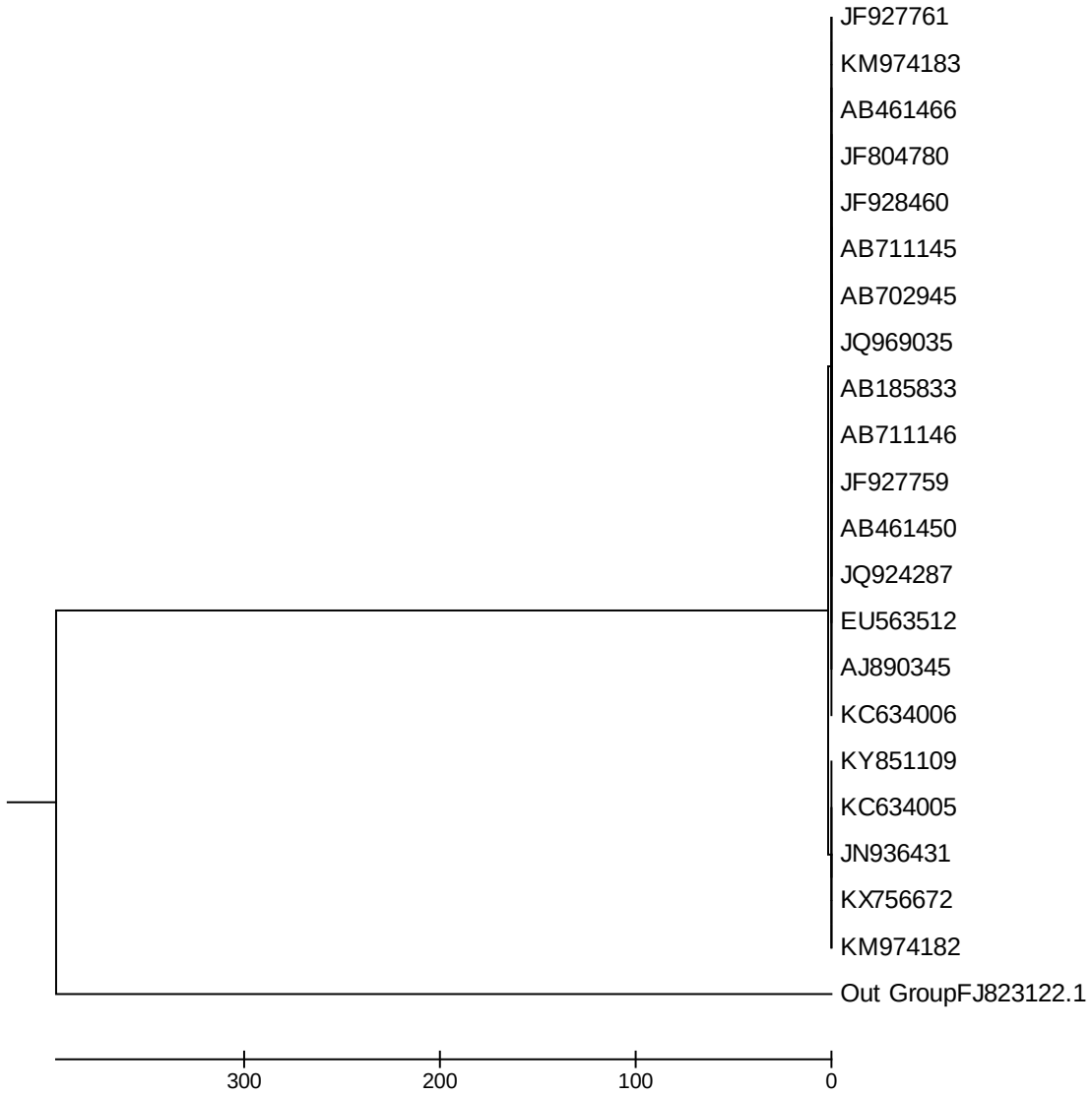
برای مقایسه فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروس وای سیب زمینی جهرم با سایر جدایه‌های دنیا، از توالی‌های ناحیه‌ی پروتیین پوششی ۱۹ جدایه PVY ثبت شده در بانک ژن جهانی استفاده گردید. اطلاعات مربوط به آنها از قبیل میزبان جمع‌آوری شده، منشاء آنها، رس شمار آنها در بانک ژن و نام جدایه در جدول ۱ بیان گردیده است.

جدول ۱- جزئیات جدایه¬های استفاده شده در این تحقیق جهت رسم درخت فیلوژنی

Accesion number	Isolate	Host	Source
KC634006	11627-10	Potato	England
AJ890345	Linda	Tobacco	Germany
KY851109	PVY-kashmir	Potato	Northern India
EU563512	PRI-509	Potato	Netherland
JQ924287	ALF-VI	Potato	Brazil
AB461450	PVY-27	Tobacco	Syria
JF927759	IUNG-11	Tobacco	Poland
AB711146	NTN-TK1	Potato	Japan
AB185833	PVY-12	Potato	Syria
JQ969035	GBVC	Potato	Belgium
KC634005	11439	Potato	U.K.
AB702945	EU-12JP	Potato	Japan
AB711145	NTN-GAM2	Potato	Japan
JN936431	PVYNTN24_1	Potato	South African
JF928460	PVY-AST	Tobacco	Brazil
JF804780	COV 8/30	Potato	Poland
KX756672	Capira	Potato	Colombia
AB461466	SYR-LL-A20	Nightshade	Syria
JF927761	IUNG-B	Tobacco	Hungary
FJ823122	WMV	watermelon	Out group

بر اساس درخت تکاملی ترسیم گردیده، جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه جداگانه قرار گرفته‌اند (شکل۲). گروه یک شامل جدایه‌های JF927761 جداشده از تنباکو در لهستان، KM974183 جداشده از سیب زمینی در خفر جهرم، AB461466 جداشده از تاجریزی در سوریه، JF804780 جداشده از سیب زمینی در لهستان، JF928460 جداشده از تنباکو در برزیل، AB711145 جداشده از سیب زمینی در ژاپن، AB702945 جداشده از سیب زمینی در ژاپن، JQ969035 جداشده از سیب زمینی در بلژیک، AB185833 جداشده از سیب زمینی در سوریه، AB711146 جداشده از سیب زمینی در ژاپن، JF927759 جداشده از تنباکو در لهستان، AB461450 جداشده از تنباکو در سوریه، JQ924287 جداشده از سیب زمینی در برزیل، EU563512 جداشده از سیب زمینی در هلند، AJ890345 جداشده از تنباکو در آلمان و KC634006 جداشده از سیب زمینی در انگلستان می‌باشد.

گروه دوم شامل جدایه‌های KY851109 جدا شده از سیب زمینی در شمال هند، KC634005 جدا شده از سیب زمینی در انگلستان، JN936431 جداشده از سیب زمینی از آفریقای جنوبی، KX756672 جداشده از سیب زمینی در کلمبیا و KM974182 جداشده از سیب زمینی در خفر جهرم هستند.



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش UPGMA در نرم‌افزار MEGA6 به دست آمده از همردیف سازی ژن پروتئین پوششی ۱۹جدایه PVY و دو جدایه جهرم.

بحث

در این تحقیق، از مزارع مختلف در منطقه جهرم که دارای علائم ظاهری و مشکوک به ویروس وای سیب زمینی بودند و نیز از گیاهانی که علائم ظاهری مشکوک به این ویروس را نداشتند نمونه‌هایی جمع‌آوری و با استفاده از آزمون سرولوژیکی الیزا مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌هایی که دارای علائم ظاهری مشکوک به ویروس وای سیب زمینی در مزرعه بودند، در آزمون الیزا نیز نتیجه مثبت داشتند. استفاده ار آزمون سرولوژیکی الیزا یک روش معمول و پراستفاده برای شناسایی ویروس‌های گیاهی می‌باشد. آزمون مولکولی RT-PCR با داشتن پروتکل پایه (برنامه دمایی) و توالی‌های آغازگرهای مناسب، می‌تواند روشی سریع برای شناسایی ویروس‌ها باشد (Peiman and

Xie, 2006). بر این اساس برای رسیدن به توالی ویروسی از روش RT-PCR برای شناسایی دقیق‌تر ویروس وای سیب زمینی و نژاد آن استفاده شد.

این ویروس از سه طریق می‌تواند منتقل گردد از قبیل غدد بذری آلوده به ویروس، انتقال تماسی گیاه با گیاه که در آزمایشگاه بررسی شده و انتقال از طریق شته‌ها که در مزرعه به اثبات رسیده است (De Bokx *et al*., 1987). در مزارع سیب زمینی در بیشتر مناطق و فصول مهم‌ترین و واضح‌ترین ناقل شته‌ای برای ویروس وای سیب زمینی، شته سبز هلو (*Myzus persicae*) می‌باشد (Kostiw, 1975; Sigvald, 1984). با بررسی انجام گرفته مشخص شد که کشاورزان از غدد بذری مناسب و عاری از ویروس استفاده نکرده اند و چندین کشاورز هم ازغده‌های باقی‌مانده از کشت قبل استفاده کرده بودند. لذا می‌توان نتیجه گیری کرد که در بین آنها غده آلوده وجود داشته است.

در میزبان‌های دیگر موجود در منطقه از جمله بادنجان، گوجه‌فرنگی، فلفل و تنباکو آلودگی به این ویروس مشاهده نشد. بر اساس مشاهدات انجام گرفته در طی نمونه برداری در محدوده این مزارع سیب زمینی کشت نشده بود. لذا به دلیل فاصله زیاد ویروس به میزبانهای دیگر سرایت نکرده بود. در موارد دیگری نیز ویروس فقط از مزارع سیب زمینی جدا گردیده است. به عنوان مثال *قاسم زاده و همکاران* با بررسی نمونه‌های مختلف از روی مزارع مختلف خانواده سولاناسه به بررسی و شناسایی ویروس وای سیب زمینی در اردبیل پرداختند که فقط از روی سیب زمینی توانستند ویروس را جدا کنند (Ghasemzadeh *et al*., 2012).

به منظور بررسی ویروس وای سیب زمینی و نژادهای آن از توالی ژنوم پوشش پروتئینی ویروس در آزمون مولکولی RT-PCR استفاده شد. بکارگیری توالی ژنوم پوشش پروتئینی برای بررسی ویروس وای سیب زمینی قبلا انجام گرفته است (Christian and Bellstedt, 2009). در ایران هم برای بررسی ویروس وای سیب زمینی از توالی پوشش پروتئینی ویروس وای سیب زمینی استفاده شده است (Hosseini *et al*., 2011). در آفریقای جنوبی (Christian and Bellstedt, 2009) و در شهرهای کرمان و اصفهان ایران (Hosseini *et al*., 2011) بعد از توالی‌یابی ویروس نژاد NTN ویروس وای سیب زمینی را در مزارع سیب زمینی تشخیص دادند. نتایج آنها با نتایج بدست آمده در این تحقیق با استفاده از آزمون RT-PCR و جفت آغازگرهای P1 و P2 ناحیه پوشش پروتئینی ویروس وای سیب زمینی با اندازه باند ۱۰۰۰bp تطبیق داشت.

آنالیز فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ناحیه پوشش پروتئینی جدایه به‌دست آمده از منطقه جهرم با توالی‌های ناحیه پوشش پروتئینی ۱۹ جدایه نژاد NTN ویروس وای سیب زمینی از مناطق مختلف دنیا که در بانک ژن جهانی ثبت شده بود و به‌وسیله Clustal W و نرم‌افزار MEGA6 انجام گرفت.

با بررسی درخت ترسیم شده، نتیجه گرفته شد که جدایه‌های مورد بررسی به دو گروه اصلی تقسیم می‌شدند. طبق این بررسی هر یک از جدایه های جهرم در یکی از این دو گروه قرار می‌گرفتند. KM974183 با بیشتر جدایه-های اروپایی در گروه الف قرار گرفته و KM974182 با تعداد معدودی جدایه از هند و افریقا در کنار هم در گروه ب قرار می گیرند. لذا می توان نتیجه گیری کرد که بعضی جدایه های ایرانی دارای سیر تکاملی متفاوت و بعضی مشابه با جدایه های اروپایی دارند. برای بیان این تفاوت و تشابه می‌توان بیان کرد که نوترکیبی RNA عامل اصلی و مهم در تکامل ویروس‌ها می‌باشد (Strauss and Strauss, 1988). این پدیده در ویروس‌های گیاهی زیادی مشاهده

شده است (Simon and Bujarski, 1994) و ظهور آشکاری در ویروس وای سیب زمینی دارد (Revers *et al*., 1996). از طرفی نتایج بدست آمده از تحقیقات سایر محققین نشان داده که ممکن است تغییر ژنتیکی ویروس وای سیب زمینی در میزبان‌های مختلف شدید باشد (Fanigliulo *et al*., 2005).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که ویروس وای سیب زمینی نه در دیگر میزبان‌های این ویروس و نه در علفهای هرز مزارع آلوده وجود نداشت. لذا احتمالا علت اصلی حضور این ویروس در این شهرستان غده های بذری آلوده سیب زمینی می‌باشد. از آنجا که این ویروس در دیگر میزبانها مشاهده نشد به نظر می رسد که ویروس وای سیب زمینی در شهرستان جهرم میزبان زمستانگذران ندارد و فقط با غدد بذری آلوده وارد مزرعه می گردد. از آنجا که طبق مشاهدات مزارع سیب زمینی در این شهرستان پراکنده بوده و کشت این محصول رایج نیست، بنابراین منطقه‌ای جدا و ایزوله محسوب می‌گردد که برای تولید غدد بذری عاری از بیماری توصیه می‌گردد. همچنین با توجه به این نتایج استفاده از غدد عاری از ویروس در شهرستان جهرم می‌تواند بیماری را به خوبی کنترل نماید. این اولین مورد از گزارش نژاد NTN این ویروس از استان فارس می باشد.

References

1. Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Amsterdam: Elsevier Academic press. 922 p.
2. Boonham N, Walsh K, Hims M, Preston S, North J and Barker I. 2002. Biological and sequence comparisions of Potato Virus Y isolate associated with potato tuber necrotic ring spot disease. Plant Pathology 51: 117–126.
3. Carputo D, Aversana R and Frusciante L. 2005. Breeding potato for quality traits. Acta Horticulture 684: 55–64.
4. Chachulk AM, Chrzanowska M, Robaglia C and Zagorski W. 1997. Molecular analysis of Potato Virus Y Nib gene and engineering of virus resistance in tobacco and potato. Archives of Virology 141: 2259–2276.
5. Christian JV and Bellstedt VD. 2009. An assessment of molecular variability and recombination patterns in South African isolates of Potato Virus Y. Archieves of Virology 154: 1891–1900.
6. Chrzanowska M. 1991. New isolates of necrotic strain of Potato Virus YN found recently in Poland. Potato Research 34: 179–182.
7. Clark MF and Adams A. N. 1977. Characteristics of miroplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475–483.
8. De Bokx JA and Hottinga H. 1981. Potato virus Y. Descriptions of Plant Viruses. No. 242, CMI/AAB, Surrey, England.
9. De Bokx JA and van der Want JPH. 1987. Viruses of potatoes and seed-potato production. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc). 259 p.
10. Dougherty WG and Carrington JC. 1988. Expression and function of potyviral gene products. Annual Review of Phytopathology 26: 123–143.
11. Draper MD, Pasche J and Gudmestad N. 2002. Factors influencing PVY and disease expression in three potato cultivars. American Journal of Potato Research 79: 155–165.
12. Fanigliulo A, Comes S, Pacella R, Harrach B, Martin DP and Crescenzi A. 2005. Characterisation of Potato Virus Ynnp strain inducing veinal necrosis in pepper: a naturally occurring recombinant strain of PVY. Archives of Virology 150: 709–720.
13. Ghasemzadeh A, Sokhandanbashir N and Khakvar R. 2012. Molecular detection of Potato Virus Y using universal primers from Ardabil Province. Journal of sustainable Agriculture and Production Science 22: 67–74 (in Farsi).
14. Hosseini A, Massumi H and Heidarnejad J. 2011. Characterisation of Potato Virus Y isolates from Iran. Virus Genes 42: 128–140.
15. Jones RAC. 1990. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyvirus in potato cultivars. Annals of Applied Biology 117: 93–105.

16. Kostiw M. 1975. Investigation on the retention of potato viruses M and Y in two species of aphids (Myzus persicae Sulz. and Aphis nasturtii Kalt.). Potato Research 18: 637–640.
17. Moury B, Morel C, Johansen E and Jacquemond M. 2002. Evidence for diversifying selection in Potato Virus Y and in the coat protein of other potyviruses. Journal of General Virology 83: 2563–2575.
18. Peiman M and Xie C. 2006. Sensitive detection of potato viruses, PVX, PLRV and PVS, by RT-PCR in potato leaf and tuber. Australasian Plant Disease Notes 1: 41–46.
19. Revers F, LeGall O, Candresse T, Romancer ML and Dunaz J. 1996. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. Journal of General Virology 77: 1953–1965.
20. Shukla DD and Ward C. W. 1989. Identification and classification of potyviruses on basic of coat protein sequence data and serology. Archive of Virology 106: 171–200.
21. Shukla DD, Ward CW and Brunt AA. 1994. The potyviridae. Wallingford: CAB International. 516 p.
22. Sigvald R. 1984. The necrotic efficiency of some aphid species as vectors of Potato Virus Y. Potato Research 27: 285–290.
23. Simon AE and Bujarski JJ. 1994. RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. Annual Review of Phytopathology 32: 337–362.
24. Strauss JH and Strauss EG. 1988. Evolution of RNA viruses. Annual Review of Microbiology 42: 657–683.
25. Zinati Fakhrabad F, Nasrollanejad S, Ahmadikhah A and Taghinasab M. 2002. Sequencing of three isolates and prevalence of Potato Virus Y in tobacco fields of Golestan province, and phylogenetic comparison of the Iranian and world isolates of the virus. Iranian Journal of Plant Pathology 48: 417–421 (in Farsi).