بررسی برخی خصوصیـات مولکولی جدایه‌های ایرانی ویروس برگ قاشقـی سیب‌زمینی

Partial molecular characterization of Iranian isolates of *Potato leafroll virus*

رضا پوررحیم[1*] و شیرین فرزادفر[1]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۲۸

چکیده

ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی (*Potato leafroll virus*-PLRV) عضو جنس *Polerovirus*، از مهم‌ترین ویروس‌های بیمارگر سیب‌زمینی است که از غالب مزارع سیب‌زمینی کشور گزارش شده است. در این پژوهش، خصوصیات مولکولی جدایه‌های ایرانی، با استفاده از ژن پروتئین پوششی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از مناطق مهم کشت سیب‌زمینی در استان‌های آذربایجان، اردبیل، اصفهان، خراسان و همدان بازدید و نمونه‌برداری به دو صورت تصادفی و انتخابی انجام شد. نمونه‌ها از نظر آلودگی به PLRV با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و به روش DAS-ELISA مورد آزمون قرار گرفتند. بر اساس نتایج آزمون الایزا این ویروس در تمام استان‌های مورد نظر با میانگین فراوانی آلودگی ۹/۶ درصد ردیابی گردید. بیش‌ترین و کم‌ترین درصد آلودگی به ترتیب در استان اصفهان (۲۳/۷ درصد) و استان اردبیل (۳/۹) تعیین شد. در این تحقیق تعداد ۱۰ جدایه ایرانی PLRV از پنج استان مورد بررسی انتخاب شده و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ناحیه ژنومی ORF0 این جدایه‌ها طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید. همردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن ORF0 مربوط به ۱۰ جدایه ایرانی PLRV به‌دست آمده در این تحقیق و ۲۳ توالی ORF0 دیگر جدایه‌های PLRV از سایر مناطق دنیا، نشان دهنده وجود ۹۴/۲ تا ۱۰۰ درصد همسانی در بین آن‌ها بود. این مقایسه نشان داد که در بین جدایه‌های ایرانی، دو جدایه Ar53 و Kh116 دارای بیش‌ترین درصد همسانی با جدایه‌ای از کشور هلند (Y07496) بودند. بر اساس مطالعات تبارزایی، جدایه‌های PLRV به سه گروه تقسیم شدند که جدایه‌های ایرانی به همراه برخی از جدایه‌های اروپایی در گروه یک (Group I) قرار گرفتند.

واژگان کلیدی: ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی، ایران، پراکنش، تعیین توالی، ORF0

۱- بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
نویسنده مسئول مکاتبات: pourrahim@yahoo.com

مقدمه

سیب‌زمینی از جمله محصولات مهم و استراتژیک کشور با تولیدی معادل پنج میلیون تن می‌باشد (بی‌نام، ۱۳۹۴). به دلیل تکثیر سیب‌زمینی از طریق کشت غده (ازدیاد رویشی)، در صورت ابتلا بوته‌های مادر به بیماری ویروسی، غده‌های حاصله نیز بیمار خواهند بود (Hooker, 1990). تاکنون در دنیا بیش از ۲۰ بیماری مهم ویروسی از سیب‌زمینی گزارش شده است (Hooker, 1990). ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی (PLRV) از مهم‌ترین ویروس‌های بیمارگر در سیب‌زمینی می‌باشد که هر ساله به طور متوسط ۱۰ تا ۱۵ درصد محصول سیب‌زمینی دنیا را از بین می‌برد. در برخی موارد به دلیل عدم کنترل ناقلین، خسارت تا ۹۰ درصد نیز گزارش شده است (Beamster and de Bokx, 1987). این ویروس به جنس *Luteovirus* از خانواده *Luteoviridae* تعلق دارد. ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی از اکثر مناطق سیب‌زمینی‌کاری دنیا گزارش شده است (Van Regenmortel *et al*., 2000). این ویروس توسط شته‌ها و به صورت پایا انتقال می‌یابد (Hooker, 1990). شته سبز هلو بالاترین راندمان را در انتقال اکثر جدایه‌های این ویروس دارد (Harrison, 1984). هر چند شته آلوده پس از تعویض جلد همچنان تا ۷ روز آلوده به ویروس باقی می‌ماند که این امر حاکی از عدم تکثیر ویروس در بدن شته است (Harrison, 1958; Mayo *et al*., 2000). غده‌های آلوده و شته‌ها مهم‌ترین راه‌های انتقال ویروس هستند (Hooker, 1990). علف‌های هرز مانند عروسک پشت پرده (*Physalis floridana*) و کیسه کشیش (*Capsella bursa-pastoris*) در صورت آلودگی به ویروس، قادرند در مناطق بدون زمستان سرد ویروس را به سال بعد منتقل نمایند (Mayo *et al*., 2000; Mayo and Ziegler-Graff, 1996). ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی دارای دامنه میزبانی بسیار محدودی بوده و میزبان‌های آن عمدتاً به چند گیاه از خانواده *Solanaceae* محدود می‌گردد. جدایه‌های این ویروس بر اساس خصوصیات بیولوژیکی و دامنه میزبانی، تعیین خصوصیات شده اند. همچنین جدایه‌های این ویروس از سیب‌زمینی، دارای تنوع سرولوژیکی مشخصی نبوده‌اند (Harrison, 1984).

ژنوم ویروس PLRV که ۳۰ درصد وزن کل پیکره را شامل می‌شود، از یک آر.ان.ای تک رشته‌ای به طول ۵۹۸۷ نوکلئوتید تشکیل شده است (Mayo *et al*., 1989). علاوه بر ژنوم اصلی، یک آر.ان.ای زیر ژنومی در بافت‌های آلوده یافت می‌شود که دارای ۲۳۰۰ نوکلئوتید و وزن مولکولی ۱۰۶*۱ دالتون بوده و پروتئین پوششی ویروس را کد می‌کند (Murphy *et al*., 1995). ژنوم این ویروس از شش قاب خواندنی باز (open reading frame- ORF) تشکیل شده است که با شماره‌های صفر تا پنج مشخص می‌شوند (Miller *et al*., 1997; Keese *et al*., 1990). پروتئین‌های حاصل از ترجمه این ORF ها نیز تحت نام P0 تا P5 نامیده می‌شوند. پروتئین P0 برای همانندسازی ویروس لازم بوده (Sadowy *et al*., 2001a) و پروتئین P1 یک پلی‌پروتئین با خاصیت پروتئیناز می‌باشد که با برش خود پروتئین VPg را به‌وجود می‌آورد (Sadowy *et al*., 2001b; van der Wilk *et al*., 1997). پروتئین P2 دارای نقش آنزیم آر.ان.ای پلیمراز می‌باشد. پروتئین‌های P3 تا P5 به ترتیب شامل پروتئین پوششی، پروتئین حرکتی و پروتئین پیوسته خوانی می‌باشند. دو محصول پروتئینی P6 و P7 نیز شناسایی شده‌اند که هنوز نقش دقیق این پروتئین‌ها شناخته نشده است (Ashoub *et al*., 1998). مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه کوبایی PLRV با ژن مشابه در ویروس‌های زردی غربی چغندرقند (*Beet western yellows virus*)، پیچیدگی برگ چغندرقند (*Been leafroll virus*)، کوتولگی زردی چغندرقند (*Barley yellow dwarf virus*) و موزائیک توته‌ایی نخودفرنگی (*Pea enation mosaic virus*) به ترتیب نشان‌دهنده ۶۵، ۵۷، ۴۵ و ۳۴ مشابهت توالی بوده است (Lopez *et al*., 1994). اطلاعات به دست آمده نشان می‌دهد که بهترین ناحیه برای مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های PLRV ناحیه ORF0 این ویروس است و بر همین اساس جدایه‌های PLRV را به سه گروه تقسیم شده‌اند (Guyader and Ducray, 2002).

تاکنون این ویروس از غالب استان‌های مهم کشور مانند اصفهان، خراسان و خوزستان گزارش شده (Danesh *et al*., 1992; Jafarpour, 1995; Khakvar *et al*., 2000; Pourrahim *et al*., 2007) و علائم آلودگی به این ویروس در سایر مناطق کشت سیب‌زمینی نیز مشاهده شده است (مشاهدات شخصی). از جمله راهکارهای مهم

مدیریت و کاهش خسارت این ویروس، تهیه و استفاده از ارقام متحمل یا مقاوم می‌باشد (Randall, 1990). تهیه و انتخاب ارقام مقاوم در صورتی می‌تواند موفق باشد که اطلاعات دقیقی از خصوصیات مولکولی جدایه‌های غالب PLRV در کشور در دسترس باشد. از این‌رو با توجه به اهمیت سیب‌زمینی، در این پژوهش، خصوصیات مولکولی جدایه‌های ایرانی ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی با استفاده از توالی ژن ORF0 مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

از مناطق مهم کشت سیب‌زمینی در استان‌های آذربایجان، اردبیل، اصفهان، خراسان و همدان بازدید و نمونه‌برداری انجام گردید. نمونه‌برداری به دو صورت تصادفی و انتخابی انجام شد. از هر بوته حداقل سه برگ به عنوان یک نمونه واحد جمع‌آوری گردید (جدول ۳). در روش انتخابی از بوته‌های دارای علائم مشکوک از جمله سبز زردی، بدشکلی و قاشقی شدن برگ، نمونه‌ها تهیه شدند. در نمونه‌برداری تصادفی طی حرکت در مسیر W شکل، از هر مزرعه حدود ۲۰ تا ۴۰ نمونه به‌طور تصادفی انتخاب شدند. نمونه‌ها در کیسه‌های نایلونی جداگانه قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند.

ارزیابی آلودگی نمونه‌ها به PLRV

نمونه‌های جمع‌آوری شده از نظر آلودگی به PLRV با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و به روش آزمون الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند (Clark and Adams, 1977). آنتی‌بادی اختصاصی و نیز شاهد مثبت و منفی مورد نیاز برای آزمون الایزا از شرکت بیوربا سوئیس تهیه شده و طبق توصیه شرکت سازنده مورد استفاده قرارگرفت. بر اساس نتایج حاصله از آزمون الایزا، نمونه‌هایی که مقدار عددی جذب نوری چاهک آن‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر مساوی یا بیش‌تر از میانگین جذب نوری نمونه‌های شاهد سالم (منفی) بودند، به عنوان نمونه آلوده تلقی شده و برای مراحل بعدی کار انتخاب شدند.

تکثیر ناحیه ORF0

برای تکثیر ناحیه ORF0 از آغازگرها و روش توصیفی (Guyader and Ducray, 2002) استفاده گردید. برای این منظور ابتدا آر.ان.آی کل گیاه با استفاده از محلول تجاری RNXplus (شرکت سیناژن، ایران) و بر اساس روش توصیفی توسط شرکت سازنده محلول از نمونه‌های آلوده به ویروس استخراج گردید. به‌طور خلاصه ابتدا ۰/۱ گرم بافت برگ در یک میلی‌لیتر از محلول RNX^{TM}(Plus) در هاون استریل عصاره‌گیری شد. این عصاره به داخل میکروتیوب جدید انتقال یافته و به‌مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شد. پس از ۵ دقیقه قرارداشتن در دمای اتاق، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن افزوده شده و پس از ۱۵ ثانیه تکان شدید، ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. این محلول به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس در g ۱۲۰۰۰ میانگریز شد. رونشین به لوله جدیدی انتقال داده شده و هم حجم آن، ایزوپروپانول افزوده و ۱۵ دقیقه روی یخ رها شد. سپس ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس در g ۱۲۰۰۰ میانگریز شده و رونشین حذف شد. رسوب حاصله در یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درجه شستشو داده شده و مجدداً همانند مرحله قبل میانگریز گردید. رونشین حذف و رسوب در ۲۵ میکرولیتر آب عاری از RNase حل شد.

آزمون RT-PCR به‌صورت دو مرحله‌ای (two step) و طبق روش و برنامه توصیفی (Guyader and Ducray, 2002) با استفاده از دستگاه پی.سی.آر مدل Primus (شرکت MWG، آلمان) انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده و مشخصات آن‌ها در جدول شماره ۱ ارائه شده‌است. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۸۰ ولت ثابت الکتروفورز شده و ژل پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، در نور ماورابنفش و توسط دستگاه UV-ترانس‌ایلومینتور مدل Imago (هلند) مورد مشاهده قرارگرفت.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای اختصاصی PLRV مورد استفاده در این بررسی (Guyader and Ducray, 2002)

Table 1. PLRV specific primers used in this study (Guyader and Ducray, 2002)

آغازگر Primers	توالی نوکلئوتیدی Nucleotide sequence	ناحیه مربوطه در ژنوم Genome region	اندازه محصول Size
ORF0-S2 (up)	5'-GAAATTGCAGCTTTAG-3'	ژن ORF0 (آغازگر بالادست شامل نوکلئوتیدهای ۱۲۲ تا ۱۳۷ از ژنوم ویروس) ORF0 gene (Upstream primer contains nucleotides 122 to 137 of the virus genome)	934 bp
ORF0-AS (down)	5'-AGGCGTTCTCTCCACTGTAC-3'	ژن ORF0 (آغازگر پایین دست شامل نوکلئوتیدهای ۱۰۳۹ تا ۱۰۵۵ از ژنوم ویروس) ORF0 gene (Downstream primer contains nucleotides 1039 to 1055 of the virus genome)	

تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعه حاصله از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

قطعه دی.ان.ای حاصله از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از کیت استخراج محصول پی.سی.آر ساخت شرکت پرومگا و بر اساس روش توصیه شده توسط سازنده کیت از بقیه اجزا واکنش و ژل آگارز استخراج شد. جهت تعیین توالی قطعه تکثیر یافته، از سرویس تجاری تعیین توالی شرکت MWG آلمان استفاده شد. در مرحله بعد میزان شباهت نوکلئوتیدی ORF0 جدایه‌های ایرانی PLRV با ناحیه مربوطه در ۲۳ جدایه PLRV از دیگر مناطق جهان که اطلاعات آن‌ها در سایت NCBI ثبت شده است، با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL W (MegAlign 5:00, DNASTAR INC.) مقایسه شدند. مشخصات این جدایه‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. پس از هم ردیفی توالی‌ها توسط نرم‌افزار CLUSTAL W، درخت تبارزایی با استفاده از روش Neighbor Joining (NJ) موجود در نرم‌افزار MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) رسم گردید.

جدول ۲- فهرست جدایه‌های خارجی که توالی نوکلئوتیدی مربوط به ORF0 آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌است.

Table 2. The list of foreign isolates which their nucleotide sequences of ORF0 have been used in this study.

کشور منشأ جدایه	Country	شماره ثبت در بانک ژن Accession no.	کشور منشأ جدایه	Country	شماره ثبت در بانک ژن Accession no.
اسپانیا	Spain	AF453389	فرانسه	France	AF453405
فرانسه	France	AF453390	مصر	Egypt	AY138970
پرو	Peru	AF453392	تونس	Tunisia	AY645678
استرالیا	Australia	AF453395	تونس	Tunisia	AY645679
استرالیا	Australia	AF453396	تونس	Tunisia	AY645680
استرالیا	Australia	AF453397	تونس	Tunisia	AY645681
استرالیا	Australia	AF453398	تونس	Tunisia	AY645683
اسپانیا	Spain	AF453399	تونس	Tunisia	AY645684
لهستان	Poland	AF453401	استرالیا	Australia	D13953
انگلستان	England	AF453402	انگلستان	England	NC-001747
لهستان	Poland	AF453403	هلند	Netherland	Y07496
لهستان	Poland	AF453404			

نتایج

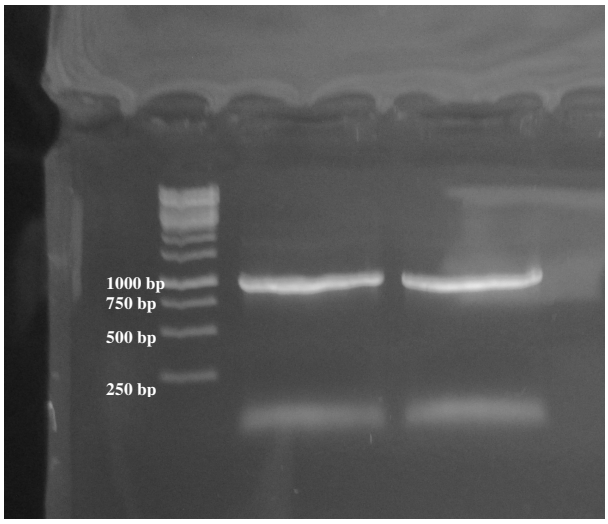
پراکنش و میزان آلودگی به PLRV

بر اساس مشاهدات انجام شده، نمونه‌های آلوده به PLRV، غالباً علائم پیچیدگی و قاشقی شدن برگ را نشان دادند. نتایج حاصله از آزمون الایزا در مورد نمونه‌های تصادفی مورد بررسی در جدول شماره ۳ ارائه شده است. بر

اساس این جدول، در استان‌های مورد بررسی، میانگین درصد فراوانی آلودگی به PLRV برابر با ۹/۶ درصد بود. در بین استان‌های مورد بررسی، بیش‌ترین درصد آلودگی به PLRV، در نمونه‌های تهیه شده از استان اصفهان با ۲۳/۷ درصد آلودگی مشاهده شد. همچنین در بین پنج استان مورد مطالعه، استان اردبیل با ۳/۹ درصد کم‌ترین آلودگی به ویروس PLRV را داشت (جدول۳).

خصوصیات ژنومی جدایه‌های ایرانی PLRV

در این تحقیق تعداد ۱۰ جدایه ایرانی PLRV از پنج استان مورد بررسی انتخاب و ناحیه ژن ORF0 این جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی توصیفی (جدول ۱) طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید. در نتیجه الکتروفورز محصول حاصل از آزمون پی.سی.آر روی ژل آگارز، یک باند به وزن حدود ۹۴۰ جفت نوکلئوتید مشاهده گردید (شکل ۱) که با اندازه مورد انتظار مطابقت داشت (Guyader and Ducray, 2002). در مورد هر یک از ۱۰ جدایه PLRV مورد بررسی، توالی نوکلئوتیدی قطعه‌ای به طول ۷۴۴ جفت‌باز تعیین شد. در مورد هر یک از این ۱۰ جدایه، توالی ناحیه مربوط به ORF0 در بانک ژن تحت شماره‌های EU450867 تا EU450876 به ثبت رسید. مشخصات این جدایه‌ها در جدول ۴ ارائه شده‌است. بر اساس نتایج حاصل از ابزار جستجوگر BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI، این توالی‌ها در مقایسه با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده در این پایگاه، بیش‌ترین مشابهت را با توالی‌های گزارش‌شده در مورد جدایه‌های PLRV از سایر مناطق دنیا داشتند که تایید کننده ماهیت PLRV جدایه‌های به‌دست آمده در این تحقیق است.



شکل ۱- تکثیر دی.ان.ای با طول مورد انتظار حدود ۹۴۰ جفت‌باز در جدایه PLRV-Is18. محصول واکنش پی.سی.آر در حجم بالا روی ژل آگارز یک درصد رانده شده و سپس قطعه دی.ان.ای جهت تعیین توالی از ژل استخراج گردید (ستون چپ: نشانگر وزن مولکولی یک کیلوبازی، فرمنتاس، لیتوانی).

Fig. 1. A DNA product with the expected size of about 940 bp was amplified in PLRV-Is18 isolate. A large volume of PCR product was run on the 1% agarose gel and then cleaned up for sequencing (Left column: 1 kbp DNA ladder, Fermenthas, Lithuania).

جدول ۳- مشخصات مناطق، تعداد نمونه‌های برگی سیب‌زمینی جمع‌آوری شده در سال زراعی ۱۳۸۸ و نتایج حاصله از آزمون الایزا برای ردیابی PLRV

Table 3. Regions, number of collected potato leaf samples in the growing season 2009 and ELISA results for detection of PLRV

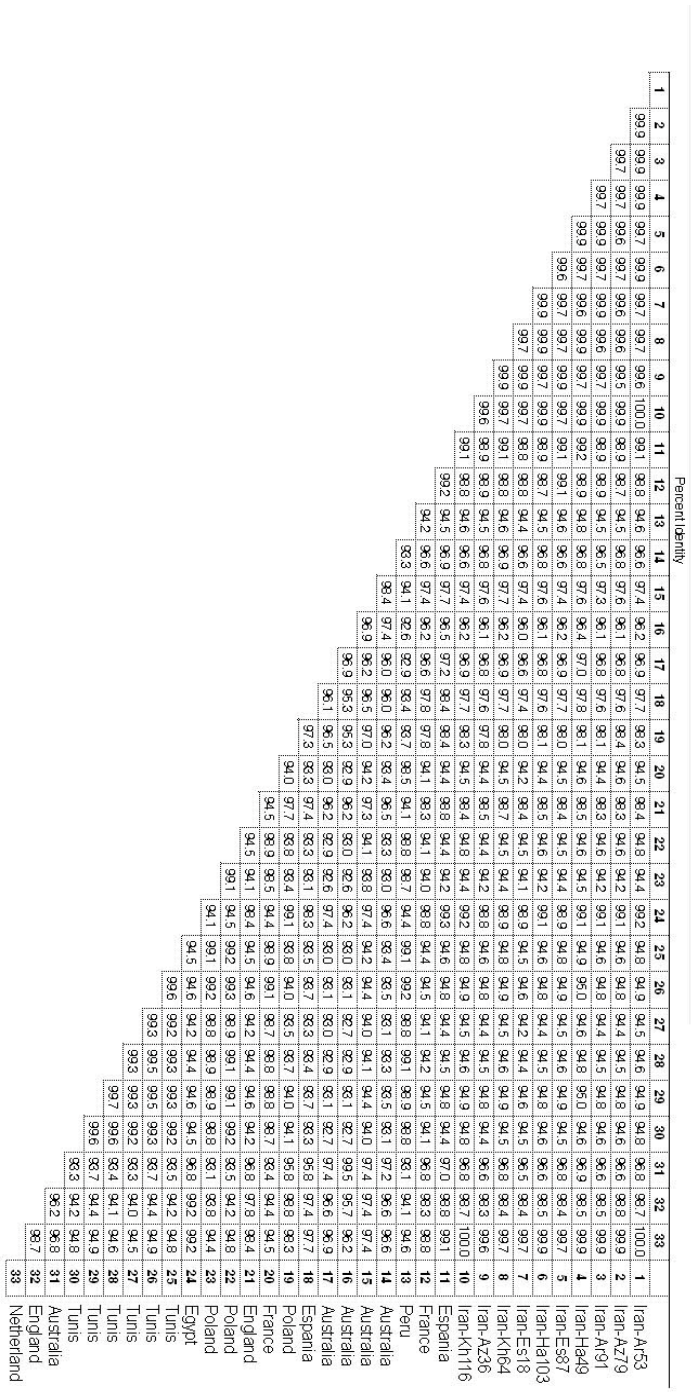
استان Province	منطقه Region	تعداد مزرعه Numbers of fields	تعداد نمونه تست شده Numbers of sample tested		تعداد نمونه آلوده Numbers of infected samples		درصد آلودگی بـر اسـاس نمونه‌های تصادفی Percent of infection based on the random samples	میانگین Average
			تصادفی Random	علائم‌دار Symptomatic	تصادفی Random	علائم‌دار Symptomatic		
آذربایجان‌شرقی East Azerbaijan	بستان‌آباد Bostan abad	5	108	39	8	28	7.4	7.3
	سراب Sarab	4	96	36	7	30	7.3	
اصفهان Isfahan	فریدن Faridan	3	85	31	19	23	22.4	23.7
	فلاورجان Falavarjan	3	97	51	24	41	24.7	
اردبیل Ardabil	اردبیل Ardabil	5	129	55	4	47	3.1	3.9
	خلخال Khalkhal	4	155	42	6	37	3.8	
	مشگین شهر Meshgin shahr	4	162	59	7	44	3/4	
همدان Hamadan	همدان Hamadan	5	157	62	6	49	3.8	4.8
	بهار Bahar	7	231	68	13	57	5.6	
	کبودرآهنگ Kabudarahang	3	117	47	5	36	3/4	
خراسان Khorasan	جلگه رخ Golgerokh	6	223	74	36	61	16.1	17.4
	نیشابور Nishaboor	4	152	59	29	38	19.1	
جمع Total		53	1712	623	164	491	9.6	

جدول ۴- مشخصات جدایه‌های ایرانی PLRV که توالی ژن ORF0 آن‌ها تعیین شده‌است.

Table 4. Iranian PLRV isolates and their ORF0 submitted to GenBank

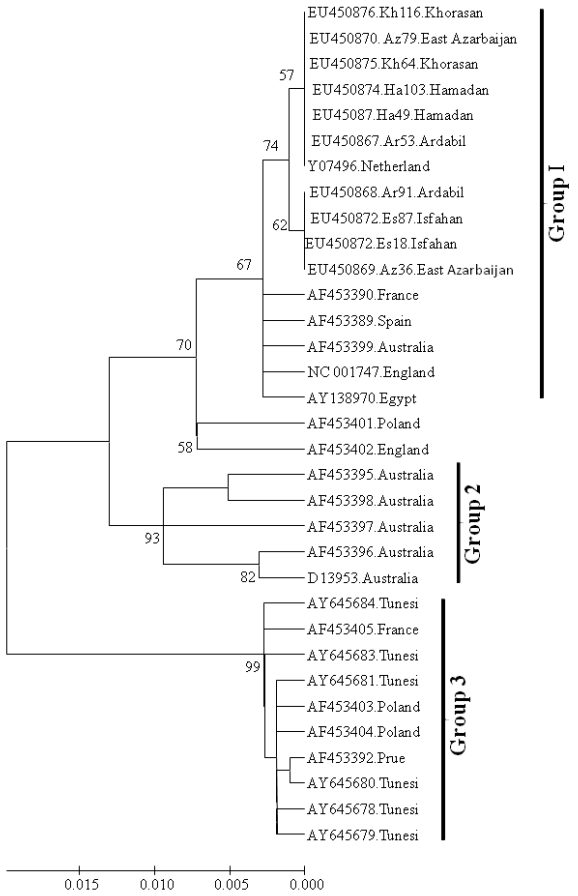
شماره ثبت در بانک ژن Accession no.	Province	استان	جدایه Isolate
EU450867	Ardabil	اردبیل	PLRV-Ar53
EU450868	Ardabil	اردبیل	PLRV-Ar91
EU450869	East Azerbaijan	آذربایجان‌شرقی	PLRV-Az36
EU450870	East Azerbaijan	آذربایجان‌شرقی	PLRV-Az79
EU450871	Isfahan	اصفهان	PLRV-Is18
EU450872	Isfahan	اصفهان	PLRV-Is87
EU450873	Hamadan	همدان	PLRV-Ha49
EU450874	Hamadan	همدان	PLRV-Ha103
EU450875	Khorasan	خراسان	PLRV-Kh64
EU450876	Khorasan	خراسان	PLRV-Kh116

آنالیز همردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن ORF0 مربوط به ۱۰ جدایه ایرانی PLRV مورد مطالعه و ۲۳ توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژن ORF0 گزارش شده در مورد جدایه‌های PLRV از سایر مناطق دنیا (جدول ۲)، نشان‌دهنده وجود ۹۴/۲ تا ۱۰۰ درصد همسانی در بین آن‌ها بود. این مقایسه نشان داد که در بین جدایه‌های ایرانی، دو جدایه Ar53 و Kh116 دارای بیش‌ترین درصد همسانی با جدایه از کشور هلند (Y07496) بودند. بر اساس همین نتایج، کم‌ترین درصد همسانی بین جدایه‌ای از اصفهان (Es18) و جدایه‌ای از لهستان (AF453404) مشاهده گردید. همچنین این نتایج نشان دهنده وجود ۹۹/۵ تا ۱۰۰ درصد همسانی در بین ۱۰ جدایه ایرانی PLRV مورد مطالعه بود. دو جدایه ایرانی Ar53 و Kh116 دارای ۱۰۰ درصد همسانی در ناحیه ژن ORF0 بودند (جدول ۵). با رسم درخت تبارزایی به روش Neighbor Joining-NJ، جدایه‌های PLRV به سه گروه تقسیم شدند که جدایه‌های ایرانی به همراه برخی از جدایه‌های اروپایی در گروه یک (Group I) قرار گرفتند (شکل ۲).



جدول ۵- درصد یکنواختی ژنتیکی حاصله از مقایسه توالی نوکلئوتیدی ORF0 مربوط به ۱۰ جدایه ایرانی PLRV با ناحیه مربوطه در ۲۳ جدایه خارجی PLRV.

Table 5. Nucleotide identity obtained from nucleotide sequence of PLRV OFR0 from 10 Iranian and 23 foreign isolates.



شکل ۲- درخت تبارزایی به روش Neighbor Joining-NJ که با استفاده از توالی ژن ORF0 مربوط به ۳۳ جدایه رسم شده است.

Fig. 2. Phylogenetic tree constructed using Neighbor Joining-NJ method with 33 ORF0 sequences of PLRV.

بحث

در این تحقیق پراکنش PLRV در پنج استان مهم کشت سیب‌زمینی کشور شامل آذربایجان‌شرقی، اردبیل، اصفهان، خراسان و همدان بررسی شد. نتایج حاصله نشان‌داد که این ویروس در مزارع سیب‌زمینی استان اصفهان با ۲۳/۷ درصد آلودگی، دارای بیش‌ترین شیوع در مقایسه با سایر استان‌ها می‌باشد. با توجه به این‌که به غیر از غده‌های بذری آلوده، مهم‌ترین روش انتقال PLRV، به وسیله شته‌ها می‌باشد، لذا می‌توان انتظار داشت که در استان اصفهان شرایط برای فعالیت شته‌های ناقل این ویروس مساعدتر باشد. از طرف دیگر، استان اردبیل با ۳/۹ درصد کم‌ترین آلودگی به PLRV را نشان‌داد (جدول۲). با توجه به این‌که مناطق کشت سیب‌زمینی در این استان در بین استان‌های مورد بررسی، دارای آب و هوای سردتر و دوره‌های یخبندان طولانی‌تر در زمستان می‌باشند، این وضعیت موجب شده‌است تا فعالیت شته‌های ناقل در این مناطق کم‌تر باشد. این نتایج همچنین مستعد بودن این مناطق را از نظر تولید سیب‌زمینی بذری سالم نشان می‌دهد.

در نمونه‌های دارای علائم که در واکنش الایزا با آنتی‌بادی اختصاصی PLRV دارای واکنش مثبت بودند، هر دو نوع علائم مشخص آلودگی اولیه و ثانویه به این ویروس قابل مشاهده بود. برخی از نمونه‌ها علائم آلودگی اولیه به

این ویروس را نشان می‌دادند. این علائم که ناشی از آلودگی گیاه سیب‌زمینی به دنبال انتقال ویروس توسط شته‌های ناقل به‌وجود می‌آید، شامل کاهش رنگ و لوله‌ای شدن برگ‌های جوان‌تر بود. برخی نمونه‌های دیگر دارای علائم آلودگی ثانویه به این ویروس بودند. در آلودگی ثانویه که به‌دنبال کشت غده سیب زمینی آلوده به این ویروس بوجود می‌آید، برگ‌های پایینی گیاه لوله شده و رنگ برگ‌های جوان‌تر روشن‌تر شده و حالت سبززردی نشان می‌دهند (Hooker, 1990). هر دو نوع این علائم در مزارع سیب‌زمینی استان‌های مورد بازدید قابل مشاهد بود. در مزارع مورد بازدید، شدت علائم لوله‌ای شدن برگ، در سیب‌زمینی رقم اگریا نسبت به رقم مارفونا کم‌تر مشاهده شد که احتمالاً می‌تواند مربوط به تحمل رقم اگریا نسبت به آلودگی با PLRV باشد. قضاوت دقیق‌تر در این خصوص نیاز به بررسی‌های بیش‌تر بر روی این دو رقم سیب‌زمینی دارد.

در این تحقیق ناحیه ORF0 مربوط به ۱۰ جدایه ایرانی PLRV تکثیر شده و تعیین توالی گردید. این ناحیه در تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های این ویروس مورد استفاده قرار گرفته است (Djilani *et al.*, 2005). نتایج حاصله از مقایسه توالی نوکلئوتیدی ORF0 این ۱۰ جدایه با ناحیه مربوطه در ۲۳ جدایه خارجی این ویروس، نشان‌دهنده گروه‌بندی این جدایه‌ها در سه گروه اصلی است (شکل ۲) که با نتایج قبلی مطابقت دارد (Guyader and Ducray, 2002). جدایه‌های ایرانی PLRV در گروه شماره ۱ قرار گرفته و دارای بیش‌ترین میزان همسانی نوکلئوتیدی با جدایه هلندی این ویروس و نیز جدایه‌های اروپایی می‌باشند. به نظر می‌رسد گروه‌بندی جدایه‌های PLRV بر اساس توالی ORF0 با توزیع جغرافیایی این جدایه‌ها همسویی چندانی ندارد. این موضوع می‌تواند ناشی از سهولت انتقال این ویروس از طریق غده‌های آلوده و انتشار آن در مناطق بزرگ جغرافیایی باشد. با توجه به اینکه در طول دهه‌های قبل، هر ساله حجم قابل توجهی از غده‌های سیب‌زمینی بذری، از هلند به ایران وارد شده‌است، می‌توان انتظار داشت که جدایه‌های هلندی این ویروس همراه با این غدها وارد کشور شده‌اند. این اطلاعات در تحقیقات مربوط به اصلاح و تهیه ارقام سیب‌زمینی متحمل به PLRV ارزشمند می‌باشد.

منابع References

بی‌نام، ۱۳۹۴. آمار نامه کشاورزی ایران، وزارت جهاد کشاورزی- معاونت برنامه ریزی و اقتصادی- دفتر آمار و فن‌آوری اطلاعات.

Ashoub, A., Rohde, W. and Prufer, D. 1998. In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. Nucleic Acids Research 26: 420-426.

Beamster, A. B. R. and De Bokx, J. A. 1987. Survey of properties and symptoms. Pp. 84-113. In: de Bokx, J. A. and van der Want, J. P. A. (eds.) Viruses of potatoes and seed potato production. Pudoc, Wageningen, the Netherlands.

Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate methods of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-483.

Djilani, F. K., Rouze-Jouan, J., Guyader, S., Marrakchi, M. and Fakhfakh, H. 2005. Biological and molecular characterization of Tunisian isolates of *Potato leafroll virus.* Journal of Plant Pathology 87: 91-99.

Danesh, D., Soleimanian, S., Filsouf, F. and Dehghan, M. 1992. Incidence of four potato viruses in the Isfahan region of Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 28: 1-3.

Guyader, S. and Ducray, D. G. 2002. Sequence analysis of *Potato leafroll virus* isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. Journal of General Virology 83: 1799-1807.

Harrison, B. D. 1958. Ability of single aphids to transmit both avirulent and virulent strains of *Potato leaf roll virus*. Virology 6: 278-286.

Harrison, B. D. 1984. *Potato leafroll virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, no. 291.

Hooker, W. J. 1990. Compendium of potato diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 125 pp.

Jafarpour, B. 1995. Study on *Potato leafroll virus* in Mashhad. Proceeding of the 12th Iranian plant protection congress, karaj, Iran, pp. 164.

Keese, P., Martin, R. R., Kawchuk, L. M., Waterhuose, P. M. and Gerlach, W. L. 1990. Nucleotide sequences of an Australian and Canadian isolate of *potato leafroll luteovirus* and their relationships with two European isolates. Journal of General Virology 71: 719-724.

Khakvar, R., Pourrahim, R. and Shamsbakhsh, M. 2000. Study on six potato viruses in Khuzestan province. Proceeding of the 14th Iranian plant protection congress, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, pp. 312.

Lopez, L., R. Muller, E. Balmori, G. de la Riva and Ramirez, N. *et al*., 1994. Molecular cloning and nucleotide sequence of the coat protein gene of a Cuban isolate of *Potato leafroll virus* and its expression in *Escherichia coli*. Virus Genes 9: 77-83.

Mayo, M. A. and Ziegler-Graff, V. 1996. Molecular Biology of Luteoviruses. Advances in Virus Research 46: 416-468.

Mayo, M. A., Robinson, D. J., Jolly, C. A. and Hyman, L. 1989. Nucleotide sequence of *potato leafroll luteovirus* RNA. Journal of General Virology 70: 1037-1051.

Mayo, M. A., Ryabov, E., Fraser, G. and Taliansky, M. 2000. Mechanical transmission of *Potato leafroll virus*. Journal of General Virology 81: 2791-2795.

Miller, W. A., Brown, C. M. and Wang, S. 1997. New punctuation for the genetic code: luteovirus gene expression. Seminar in Virology 8: 3-13.

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Martelli, G. P., Mayo, M. A. and Summers, M. D. 1995. Virus taxonomy. Sixth report of international committee on taxonomy of viruses. Springer Verlag, Wien, New York. 492 pp.

Pourrahim, R., Farzadfar, Sh., Golnaraghi, A. R. and Ahoonmanesh, A. 2007. Incidence and distribution of important viral pathogens in some Iranian potato fields. Plant Disease 91: 609-615**.**

Randall, H. 1990. Potato health management. APS press.

Sadowy, E., Juszczuk, M., David, C., Gronenborn, B. and Hulanicka, M. D. 2001a. Mutational analysis of the proteinase function of *Potato leafroll virus*. Journal of General Virology 82:1517-1527.

Sadowy, E., Maasen, A., Juszczuk, M., David, C., Zagorski-Ostoja, W., Gronenborn, B. and Hulanicka, M. D. 2001b. The ORF0 product of *Potato leafroll virus* is indispensable for virus accumulation. Journal of General Virology 82: 1529-1532.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Van der Wilk, F., Verbeek, M., Dullemans, A. M. and van den Heuvel, J. F. 1997. The genome-linked protein of *Potato leafroll virus* is located downstream of the putative proteinase domain of the ORF1 product. Virology 234: 300-303.

Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Esto, M. K., Lemon, S., Wicher, R. B., Mayo, M. A., Pringle, C. R. and Maniloff, J. 2000. Virus taxonomy, Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, New York and San Diego, USA, 3-16.