بررسی تنوع ژنتیکی ژن پروتئین پوششی ویروس S سیب‌زمینی در ایران

فاطمه طبسی نژاد*، بهروز جعفر پور، محمد زکی عقل[1]

[1] گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد Fatemeh_tabasinezhad@yahoo.com

چکیده

ویروس S سیب‌زمینی یکی از ویروسهای مهم سیب‌زمینی و دارای گسترش جهانی است. بمنظور شناسایی و تعیین تنوع ژنتیکی در جدایه‌های ایرانی ویروس، از مناطق عمده کشت سیب‌زمینی در ایران نمونه‌برداری انجام شد. شناسایی گیاهان آلوده با استفاده از آزمون الیزای مستقیم صورت گرفت. در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ترادف پروتئین پوششی ویروس S سیب‌زمینی تکثیر و پس از همسانه‌سازی تعیین ترادف انجام شد. نتایج تعیین توالی و آنالیزهای فیلوژنی نشان دهنده تنوع زیادی در جدایه های ایرانی ویروس بود به نحوی که این جدایه ها در سه گروه مجزا قرار گرفتند. جدایه های بجنورد و تربت حیدریه در گروه I، برخی جدایه‌های کرمان در گروه II و جدایه های همدان، اصفهان و برخی از جدایه‌های کرمان در گروه III طبقه‌بندی می‌شوند.

کلمات کلیدی: ویروس S سیب‌زمینی، تنوع ژنتیکی، ایران

مقدمه

ویروس S سیب‌زمینی یکی از ویروسهای مهم در سیب‌زمینی و دارای گسترش جهانی می‌باشد (۳). ویروس S سیب‌زمینی متعلق به خانواده Betaflexiviridae و جنس Carlavirus است. ژنوم ویروس آر.ان.ای تک لای مثبت به اندازه تقریبی ۸۵۰۰ باز و حاوی شش چارچوب ژنی (ORF) است (٦). این ویروس در اغلب واریته‌های سیب‌زمینی بدون علائم است ولی در ارقام حساس تولید موزائیک و زردی می‌کند (۱۰). تا کنون دو نژاد PVS^O (Ordinary Strain) و PVS^A (Andean Strain) برای این ویروس شناسایی شده است (۱۲، ۱). نژاد A در گونه‌های سلمک ایجاد آلودگی سیستمیک می‌کند و توسط شته‌ها به طریق ناپایا منتقل می‌شود در حالیکه نژاد O فاقد این خصوصیت است. با وجود این Cox و همکاران (۲۰۱۰) ایزوله‌هایی از استرالیا را گزارش کرده اند که علیرغم آنکه در سلمک آلودگی سیستمیک ایجاد می‌کنند، لیکن از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی مشابه با نژاد PVSO بودند (۳). علت این اختلاف بیولوژیکی بین دو نژاد ویروس تفاوت در آمینواسیدهای انتهای ´۵ پروتئین پوششی و تغییراتی در پروتئینهای ۱۱ و ۷ کیلو دالتون ذکر شده است (۵). این ویروس اولین بار در ایران در سال ۱۹۷٤ از مزارع استانهای فارس و آذربایجان گزارش شد (۹) و در سالهای بعد نیز در سایر استانهای کشور ردیابی شده است (٤، ۷ و ۱۱). سالاری و همکاران وجود تنوع ژنتیکی بالائی را در جدایه های این ویروس در کرمان گزارش کرده اند (۱۰). در تحقیق حاضر تنوع ژنتیکی این ویروس در جدایه های ایرانی ویروس در نقاط عمده کاشت سیب زمینی در ایران بررسی شده است.

مواد و روشها

از مزارع سیب‌زمینی استانهای همدان، کرمان، خراسان و اصفهان تعداد ۵۰۰ نمونه برگی جمع‌آوری شد. در بعضی از نمونه ها علائم موزائیک یا زردی مشاهده شد ولی اغلب انها فاقد علائم بودند . تشخیص نمونه‌های آلوده با استفاده از آزمون الیزای مستقیم (DAS-ELISA) طبق روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷) انجام شد (۲).

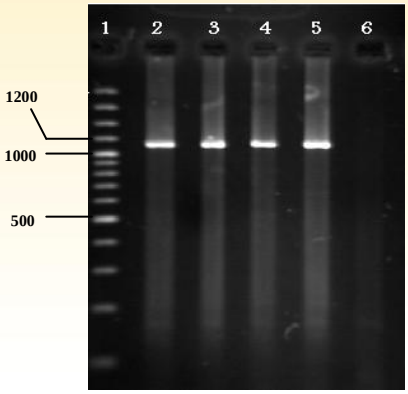
تکثیر، همسانه سازی و تعیین ترادف ژن پروتئین پوششی

آر.ان.ای کل از نمونه‌های آلوده با استفاده از CV total RNA isolation kit (Promega) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. جهت تکثیر قطعه مورد نظر از آغازگرهای اختصاصی PVS.CPF (TGGGGAATCAGTCCGGCTGGTC) و PVS.CPR (AACTGGACCTGCGCTTAGGCT) که قسمتی (۱۲۰ نوکلئوتید) از انتهای ناحیه بلوک سه‌ژنی و ژن پروتئین پوششی ویروس را تکثیر میکنند استفاده شد(۸).جهت سنتزcDNA از آنزیم MMuLV مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد. در واکنش زنجیره ای پلی مراز ٤ میکرولیتر از رشته الگو با ۱ میکزولیتر از هر آغازگر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش با غلظت ۱۰ برابر، ۱/۲۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs (10 میلی مولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) مخلوط شد. پروفایل دمایی واکنش شامل $٩٤^{\circ}C$ به مدت ۳ دقیقه بمنظور واسرشته سازی ابتدائی و بدنبال آن ۳۵ چرخه شامل $٩٤^{\circ}C$ برای ۵۰ ثانیه، $٥٩^{\circ}C$ برای ٤٥ ثانیه و $٧٢^{\circ}C$ برای یک دقیقه و در انتها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه برای تکمیل پلیمریزاسیون بود. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شده و قطعه تکثیر شده به کمک کیت QIAquick Gel Extraction Kit از ژل استخراج و با استفاده از کیت InsT/A clone PCR product cloning kit طبق دستورالعمل سازنده همسانه سازی شد. پلاسمیدهای نوترکیب پس از خالص سازی بوسیله کیت Mini Plasmid Extraction Kit (Genetbio) جهت توالی‌یابی به کمپانی بیونیر ارسال شدند. ترادف حاصل با برنامه BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI با ترادفهای موجود در بانک ژن مقایسه و آنالیز فیلوژنی توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega 5 نسخه β و به روش Neighbor joining، با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شد (۱۳).

نتایج و بحث

نتایج الیزا نشاندهنده گسترش وسیع ویروس S سیب زمینی در نواحی نمونه برداری شده بود. این ویروس هم در نمونه‌های بدون علائم و هم در نمونه‌های دارای علائم موزائیک ردیابی شد. همچنین در آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی باندی با اندازه ۱۱۱۸ جفت باز تکثیر شد و در گیاه سالم هیچگونه باندی مشاهده نشد (شکل ۱).

۱۳ جدایه از توالی کامل ژن پروتئین پوششی این ویروس به عنوان نماینده انتخاب و جهت تعیین روابط خویشاوندی و رسم درخت فیلوژنتیکی از آنها استفاده شد. میزان شباهت جدایه های ایرانی با همدیگر بین ۹۷/۵– ۹۳/۳ درصد و با جدایه های موجود در بانک ژن ۹۵/۱–۶۳/۹ بود. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده، نمونه‌های توالی‌یابی شده در سه گروه مجزا قرار گرفتند. گروه I شامل جدایه‌های بجنورد و تربت حیدریه بوده که در کنار جدایه‌های چین و هلند قرار می‌گیرند. این جدایه‌ها بیشترین شباهت در سطح نوکلئوتیدی را با جدایه هلند بین ۹۷/۵–۹۶ درصد و کمترین شباهت را با جدایه جمهوری چک به میزان ٦٣ درصد دارا می‌باشند.

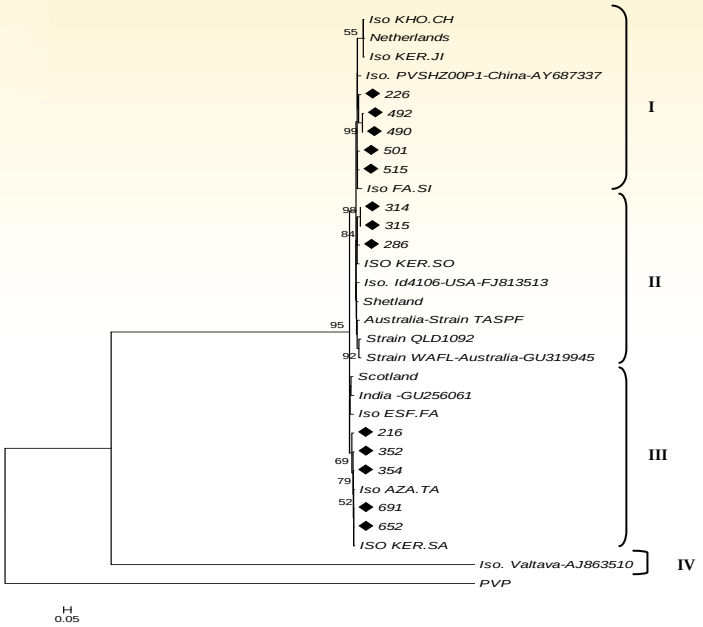


شکل ۱– محصول واکنش RT-PCR ویروس S سیب زمینی در ژل آگاروز یک درصد: ستون ۱ و ۷ نشانگر bp ۱۰۰، ستون های ۵–۲ نمونه های آلوده به ویروس، ستون ٦ گیاه سالم (شاهد منفی)

گروه II شامل جدایه‌های کرمان بوده که در کنار جدایه‌های استرالیا، جزایر Shetland در بریتانیا و آمریکا قرار می‌گیرند. این جدایه‌ها بیشترین شباهت را در سطح نوکلئوتیدی با جدایه جزایر Shetland به میزان ۹۵ درصد و کمترین شباهت را با جدایه جمهوری چک دارند. گروه سوم که شامل جدایه‌های همدان، اصفهان و برخی از جدایه‌های کرمان می‌باشد که در کنار جدایه‌های هند و اسکاتلند قرار می‌گیرند. این جدایه‌ها بیشترین شباهت را با جدایه هند ۹۶–۹۵ درصد و کمترین شباهت را با جدایه جمهوری چک دارا می‌باشند (جدول ۱).گروه چهارم شامل نژاد A ویروس است. از مقایسه جدایه‌ها در سطح آمینواسیدی نیز نتایج مشابهی بدست آمد. از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن پروتئین پوششی، جدایه های ایرانی ویروس همگی متعلق به نژاد PVS^O بودند و بیشترین فاصله را از نژاد PVS^A داشتند لیکن در این تحقیق خصوصیات بیولوژیکی جدایه ها بررسی نشد. نتایج حاصل بیانگر تنوع ژنتیکی زیادی در بین جدایه‌های ایرانی ویروس S سیب زمینی است. نتایج مشابهی پیشتر نیز گزارش شده است (۱۰).

جدول ۱– شباهت در سطح نوکلئوتیدی بین جدایه‌های ایرانیPVS با جدایه‌های جهانی

Seq->	216	691	226	314	315	352	492	490	652	515	501	286	354	Aus.	Neth.	Sco.	Shet.	Ind.	Cze.	USA.	Chi.
216-Kerman-La.	ID	0.974	0.940	0.936	0.936	0.971	0.936	0.937	0.975	0.948	0.957	0.933	0.974	0.951	0.906	0.944	0.954	0.945	0.217	0.942	0.937
691-Esfahan-Cha.	0.974	ID	0.943	0.941	0.941	0.986	0.938	0.940	0.994	0.953	0.957	0.940	0.990	0.954	0.905	0.948	0.955	0.949	0.215	0.940	0.937
226-Bojnord-Ga.	0.940	0.943	ID	0.950	0.950	0.941	0.959	0.958	0.946	0.962	0.963	0.949	0.943	0.959	0.923	0.940	0.964	0.952	0.218	0.954	0.955
314-Kerman-La.	0.936	0.941	0.950	ID	1.000	0.934	0.943	0.942	0.942	0.953	0.951	0.962	0.938	0.957	0.909	0.940	0.958	0.940	0.218	0.951	0.938
315-Kerman-Ja.	0.936	0.941	0.950	1.000	ID	0.934	0.943	0.942	0.942	0.953	0.951	0.962	0.938	0.957	0.909	0.940	0.958	0.940	0.218	0.951	0.938
352-Kerman-Ja.	0.971	0.986	0.941	0.934	0.934	ID	0.935	0.936	0.987	0.950	0.955	0.935	0.986	0.952	0.902	0.943	0.951	0.946	0.218	0.937	0.935
492-Torbat-Ka.	0.936	0.938	0.959	0.943	0.943	0.935	ID	0.996	0.940	0.962	0.963	0.943	0.941	0.955	0.925	0.937	0.962	0.948	0.216	0.950	0.958
490-Torbat-Ro.	0.937	0.940	0.958	0.942	0.942	0.936	0.996	ID	0.941	0.963	0.964	0.944	0.942	0.954	0.925	0.938	0.961	0.949	0.217	0.951	0.957
652-Esfahan-Da.	0.975	0.994	0.946	0.942	0.942	0.987	0.940	0.941	ID	0.954	0.958	0.938	0.992	0.955	0.906	0.949	0.957	0.950	0.217	0.942	0.938
515-Torbat-Jo.	0.948	0.953	0.962	0.953	0.953	0.950	0.962	0.963	0.954	ID	0.974	0.957	0.953	0.967	0.925	0.952	0.970	0.960	0.217	0.962	0.957
501-Torbat-Fa.	0.957	0.957	0.963	0.951	0.951	0.955	0.963	0.964	0.958	0.974	ID	0.955	0.957	0.963	0.932	0.951	0.967	0.961	0.214	0.962	0.963
286-Kerman-La.	0.933	0.940	0.949	0.962	0.962	0.935	0.943	0.944	0.938	0.957	0.955	ID	0.937	0.958	0.910	0.937	0.957	0.942	0.217	0.950	0.936
354-Hamedan	0.974	0.990	0.943	0.938	0.938	0.986	0.941	0.942	0.992	0.953	0.957	0.937	ID	0.954	0.906	0.945	0.953	0.946	0.217	0.940	0.937
Aus.GU319950	0.951	0.954	0.959	0.957	0.957	0.952	0.955	0.954	0.955	0.967	0.963	0.958	0.954	ID	0.919	0.945	0.978	0.949	0.218	0.962	0.951
Neth.GU319952	0.906	0.905	0.923	0.909	0.909	0.902	0.925	0.925	0.906	0.925	0.932	0.910	0.906	0.919	ID	0.906	0.926	0.918	0.219	0.919	0.937
Sco.GU144328	0.944	0.948	0.940	0.940	0.940	0.943	0.937	0.938	0.949	0.952	0.951	0.937	0.945	0.945	0.906	ID	0.953	0.970	0.213	0.941	0.938
Shet.GU144326	0.954	0.955	0.964	0.958	0.958	0.951	0.962	0.961	0.957	0.970	0.967	0.957	0.953	0.978	0.926	0.953	ID	0.961	0.218	0.968	0.957
Ind.GU256061	0.945	0.949	0.952	0.940	0.940	0.946	0.948	0.949	0.950	0.960	0.961	0.942	0.946	0.949	0.918	0.970	0.961	ID	0.216	0.950	0.952
Cze.AJ863510	0.217	0.215	0.218	0.218	0.218	0.218	0.216	0.217	0.217	0.217	0.214	0.217	0.217	0.218	0.219	0.213	0.218	0.216	ID	0.221	0.226
USA.FJ813513	0.942	0.940	0.954	0.951	0.951	0.937	0.950	0.951	0.942	0.962	0.962	0.950	0.940	0.962	0.919	0.941	0.968	0.950	0.221	ID	0.951
Chi.AY687337	0.937	0.937	0.955	0.938	0.938	0.935	0.958	0.957	0.938	0.957	0.963	0.936	0.937	0.951	0.937	0.938	0.957	0.952	0.226	0.951	ID



شکل ۲- دندروگرام رابطه جدایه های ایرانی PVS با بعضی از جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از ترادف ژن پروتئین پوششی ویروس. ترسیم دندروگرام در نرم افزار MEGA5 به روش Neighbour joining (bootstrap- × 1000) انجام شده است. ترادف پروتئین پوششی ویروس Potato virus P (PVP) به عنوان outgroup انتخاب شده است.

منابع

1- **Boonham, N., Walsh, K., Smith, P., Madagan, K., Graham, I., Barker, I., 2003**. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. J Virol Methods. 108:181–187.

2- **Clark, M. F., and Adams, A. N., 1977**. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.

3- **Cox, B. A., Jones, R. A. C., 2010**. Genetic variability in the coat protein gene of Potato virus S isolates and distinguishing its biologically distinct strains. Arch Virol. 155:1163–1169.

4- **Khakvar, R., Pourrahim, R., Shamsbakhsh, M., 2000**. Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, Iran., p. 312

5- **Matousek, J., Schubert, J., Dedic, P., Ptacek, J., 2000**. A broad variability of potato virus S (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase–polymerase chain reaction. Can J Plant Pathol. 22:29–37

6- **Matousek, J., Schubert, J., Ptacek, J., Kozlova, P., Dedic, P., 2005**. Complete nucleotide sequence and molecular probing of potatovirus S genome. Acta Virol. 49:195–205.

7- **Mossahebi, G.H., 1996**. Proceedings of the 1st Iranian Horticultural Congress, Iran. p. 79.

8- **Peiman, M., Xie, C. 2006.** Development and evaluation of a multiplex RT-PCR for detecting main viruses and a viroid of potato. Acta virologica 50: 129-133.

9- **Rohani, H., Taleb-Zadeh, F., 1974**. Proceedings of the 15th Plant Medical Congress, Tabriz, Iran. p. 64

10- **Salari, K., Massumi, H., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A., Varsani, A., 2011**. Analysis of Iranian Potato virus S isolates. Virus Genes. 43:281–288.

11- **Salari, K., Massumi, H., Shabanian, M., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A., 2006**. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran. p. 320.
12- **Slack, S. A., 1983**. Identification of an isolate of the Andean strain of potato virus S in North America. Plant Dis. 67:786–789
13- **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. Mol. Biol. Evol. 28(10):2731–2739.

Abstract

Genetic diversity in the coat protein gene of Potato virus S in Iran

F. Tabasinezhad*, B. Jafarpour, M. Zaki-aghl[1]

[1]- Plant Protection Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

Potato virus S (PVS) is one of the most important potato viruses with world wide distribution. To investigate the genetic diversity of PVS in Iran, samples were collected from fields of Khorasan, Hamedan, Kerman and Esfahan provinces, which shown mosaic and yellowing symptoms. The samples were tested using PVS specific antibody by DAS-ELISA. Total RNA was extracted from fresh young leaf tissue and RT-PCR carried on using specific primers. The fragments of 1118 bp corresponding to coat protein and part of triple gene block of PVS were amplified in PCR. Phylogenetic analysis of coat protein gene was clustered the Iranian isolates of PVS in three group. Isolates of Khorasan placed in group I, isolates from Kerman were located in group II, and isolates of Hamedan , Esfahan and kerman were placed in group III. In molecular level, all of the isolates have similar properties with Ordinary Strain of PVS.

Key words: Potato virus S, genetic diversity, Iran.

* Corresponding author: fatemeh_tabasinezhad@yahoo.com