مجله دانش گیاهپزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۴۹-۴۱)

مقایسه خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه ویروس رگه‌ای توتون (*Tobacco streak virus*) جدا شده از مزارع آفتابگردان ایران با جدایه‌های هندی و سودانی

ثمین‌السادات حسینی فرهنگی[۱]*، استفان وینتر[۲]، غلامحسین مصاحبی[۳]، مینا کوهی حبیبی[۴] و نورالدین هابیلی[۵]
۱، ۳، ۴، دانشجوی سابق دکتری و دانشیاران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۲، رئیس موسسه ویروس شناسی DSMZ، برانشویگ، آلمان
۵، عضو هیات علمی گروه حفاظت گیاهان، دانشکده کشاورزی دانشگاه آدلاید استرالیا
(تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۰ - تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۲۰)

چکیده

ویروس رگه‌ای توتون (*Tobacco streak virus*) متعلق به جنس ایلارویروس (*Ilarvirus*) بوده و به طیف وسیعی از گیاهان از جمله آفتابگردان (*Helianthus annus*) که یکی از گیاهان دانه روغنی مهم در بسیاری از کشورها می‌باشد خسارت وارد می‌کند. در این تحقیق در سال ۲۰۰۸ دو جدایه آفتابگردان و یک جدایه باقلا به ترتیب جدا شده از مزارع ایران، هند و سودان، جمع‌آوری شد و برخی از خصوصیات مولکولی و بیولوژیکی آنها مورد مقایسه قرار گرفت. وزن مولکولی پروتئین پوششی سه جدایه با استفاده از روش SDS-PAGE، ۳۰/۹ کیلودالتون تعیین شد. آزمون وسترن بلات این نتایج را تأیید کرد. در شرایط آزمایشگاهی ویروس قادر به آلوده سازی در برخی گیاهان بود. دامنه میزبانی و میزان علایم ایجاد شده توسط این سه جدایه متفاوت بود. با استفاده از آزمون TAS-ELISA و آنتی‌بادی مونوکلونال TSV (AP-696 DSMZ) هیچ تنوع سرولوژیکی مشاهده نشد. برای هر جدایه یک قطعه ۷۴۷ نوکلئوتیدی با پرایمر اختصاصی ناحیه CP تکثیر شد. آنالیز توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه پروتئین پوششی این جدایه‌ها نشان داد که جدایه ایرانی و جدایه سودانی با هم در یک گروه قرار می‌گیرند و جدایه هندی با حدود ۹۱٪ تشابه در گروه جداگانه‌ای قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: **ویروس رگه‌ای توتون، پروتئین پوششی، آفتابگردان، وسترن بلات، TAS-ELISA و RT-PCR.**

مقدمه

آفتابگردان (*Hellianthus annus*) از جمله گیاهان دانه روغنی مهم است. با افزایش سطح زیر کشت این گیاه، آفات و بیماری‌های بسیاری آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. تاکنون حدود ۳۰ بیماری از آفتابگردان گزارش شده است (Berglund, 2007). یکی از ویروس‌ها که خسارت زیادی به این محصول وارد می‌کند، ویروس رگه‌ای توتون (*Tobacco streak virus*) است. این ویروس متعلق به جنس ایلار ویروس و خانواده بروموویریده (*Boromoviridae*) است. ژنوم ویروس مانند

* نویسنده مسئول: ثمین السادات حسینی فرهنگی تلفن: ۰۹۱۳-۲۹۰۴۱۰۷ E-mail: samin_hf@yahoo.com

سایر اعضای بروموویریده به صورت RNA مثبت، تک رشته‌ای و سه بخشی می‌باشد. ویروس TSV برای اولین بار توسط Dijkstra (1983) از آفتابگردان‌های هلند گزارش شد. در ایران برای اولین بار توسط Hosseini *et al.* (2006) از آفتابگردان جداسازی شد. در سالهای ۲۰۰۵- ۲۰۰۶ در شمال سودان علایم ویروسی بر روی گیاه باقلا (*Vicia faba*) مشاهده شد که خسارت زیادی به این محصول وارد کرد. نتایج تحقیقات انجام شده نشان داد که این علایم در اثر TSV ایجاد شده‌اند (Ali *et al.*, 2008). در استرالیا ویروس برای اولین بار توسط Greber (1971) از روی توتون، توت فرنگی، گل کوکب شناسایی شد. Sharman *et al.* (2008) TSV را از روی آفتابگردان، پنبه، نخود، ماش و سپس در سال ۲۰۰۹، از روی علفهای هرز Parthenium در استرالیا جداسازی کردند. علایم TSV بر روی آفتابگردان عبارتند از: رگه‌های سیاه روی ساقه و دمبرگ، کوتولگی و کاهش رشد، کوتاه شدن فاصله بین گره‌ها، بدشکلی و لکه‌های زرد روی برگ و در نهایت مرگ گیاه. میزان خسارت بیماری در مناطق و مزارع مختلف، متنوع می‌باشد. میزان خسارت در مزارع آفتابگردان هند از سه تا ۱۰۰ درصد متغیر است (Rao *et al.*, 2000). خسارت وارده بستگی به مرحله رشد گیاه و زمان آلودگی دارد. آلودگی در مراحل انتهایی رشد تنها باعث ایجاد علایم خفیف‌تر شده و تأثیر کمی بر روی رشد و میزان محصول دارد. در آزمایشگاه، ویروس به راحتی از طریق مکانیکی قابل انتقال است. آزمایشات نشان داده که دانه‌های گرده در انتقال این ویروس به گیاهان می‌توانند نقش داشته باشند که در این بین تریپس در انتقال دانه‌های گرده نقش عمده‌ای ایفا می‌کند (Greber *et al.*, 1991).

مواد و روش‌ها

تکثیر جدایه‌های TSV در شرایط گلخانه

در سال ۲۰۰۸ یک جدایه ایرانی جمع‌آوری شده از استان تهران (43R)، یک جدایه هندی (In) جدا شده از روی آفتابگردان ایالت اندراپرادش و یک جدایه سودانی جدا شده از روی باقلا (S1)، که دو جدایه هندی و سودانی در مجموعه DSMZ آلمان موجود بودند، در شرایط گلخانه به منظور تهیه دامنه میزبانی و یافتن میزبان تکثیری مناسب، مورد بررسی قرار گرفتند. برای خالص سازی بیولوژیکی جدایه‌های فوق از گیاه سلمه تره (*Chenopodium quinoa*) با روش تک لکه استفاده شد. سپس جدایه ایران بر روی گیاه باقلا (*Vicia faba*) و جدایه سودان بر روی توتون (*Nicotiana benthamiana*) مایه‌زنی شدند و به عنوان منبع ویروس در گلخانه نگهداری شدند. جدایه هندی نیز بر روی *C. quinoa* تکثیر و نگهداری شد. برای مایه‌زنی از بافر فسفات ۰/۰۵ مولار pH 7 حاوی یک میلی‌مولار EDTA، پنج میلی‌مولار Na-DIECA، پنج میلی‌مولار تیوگلیکولیک اسید، ۰/۰۱ درصد پودر سیلایت و زغال فعال استفاده شد.

مقایسه دامنه میزبانی

به منظور مقایسه دامنه میزبانی جدایه‌های ایران، سودان و هند، ۲۷ گونه گیاهی متعلق به هفت خانواده مایه‌زنی مکانیکی شدند. گیاهان مایه‌زنی شده درگلخانه با شرایط $^{\circ}$C ۲۵-۲۳ و دوره روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه روز نگهداری شدند.

آزمون داس الیزا (DAS-ELISA) و تاس الیزا (TAS-ELISA)

برای تشخیص ویروس TSV در میزبان‌های تکثیری از آزمون داس‌الیزا و آنتی‌بادی پلی کلونال TSV (AS-906-DSMZ) بر اساس روش Clark & Adams (1977) استفاده شد. برای مقایسه خصوصیات سرولوژیکی جدایه‌های مختلف ایران، سودان و هند، از یک آنتی‌بادی مونوکلونال تهیه شده در موسسه DSMZ آلمان برای ویروس TSV (AP-696 DSMZ) و بر طبق دستوالعمل معمول تاس‌الیزا استفاده گردید (Jordan, 1990).

ایمونوالکترون میکروسکوپی (IEM)

مشاهده پیکره های ویروس با دستگاه میکروسکوپ الکترونی مستقر در DSMZ و بر اساس روش دکوراسیون Milne & Luisoni (1977) انجام شد.

تعیین و مقایسه وزن مولکولی پروتئین پوششی سه جدایه TSV

برای تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی (CP) از ژل پلی اکریل آمید حاوی سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) بر روی ژل جداکننده با غلظت ۱۵٪ و

ژل متراکم کننده با غلظت ۴٪ اکریل آمید استفاده شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت و شدت جریان متغیر به مدت یک تا دو ساعت تا رسیدن نمونه‌ها به انتهای ژل جداکننده ادامه یافت (Laemmeli, 1970 & Sambrook, 2001). از آزمون وسترن بلات جهت تأیید باند پروتئین پوششی جدایه‌های فوق بر اساس روش Towbin *et al.* (1979) و Sambrook *et al.* (1989) استفاده گردید. ابتدا پروتئین ها به کمک الکتروفورز با ژل پلی اکریل آمید از هم جدا شد و سپس انتقال نمونه‌ها از ژل به غشا نیتروسلولزی در شدت جریان الکتریکی ثابت ۳۰۰-۴۰۰ میلی آمپر به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت انجام گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به غشا نیتروسلولزی عمل بلاکینگ با محلول ۲٪ شیر خشک در بافر شستشو به مدت یک شب در ۴°C صورت گرفت. در مرحله بعد آنتی‌بادی پلی‌کلونال TSVAS-0906 DSMZ (۱:۵۰۰) رقیق شده در بافر شستشو به مدت دو ساعت و سپس آنتی بادی تهیه شده علیه سرم خرگوش متصل به آنزیم شرکت سیگما (Goat antirabbit IgG AP conjugate sigma) رقیق شده در بافر شستشو به نسبت ۱:۳۰۰۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه به غشا اضافه گردید. بعد از اتمام هر مرحله سه مرتبه شستشو با بافر شستشو صورت پذیرفت. در نهایت رنگ آمیزی درون ۱۰ میلی‌لیتر بافر زمینه حاوی نیترو بلو تترازولیوم (Nitro blue tetrazolium (NBT)) و ۵- برمو-۴-کلرو-۳- ایندولیل فسفات (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)) در تاریکی انجام شد. برای مشاهده باندها غشا در آب مقطر شسته شد، بین دو کاغذ صافی خشک قرار گرفت.

آزمون RT-PCR و تعیین توالی نمونه‌ها

به منظور دستیابی به روش مناسب جهت استخراج RNA کل از برگ‌های آلوده به جدایه‌های ایرانی، سودانی و هندی از دو روش استفاده شد: استفاده از RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) و استفاده از محلول Peq Gold RNA pure™ (PeQ lab company). پس از استخراج RNAی کل جدایه‌ها، به منظور کنترل کیفیت روی ژل آگارز ۱٪ برده شد. واکنش RT-PCR یک مرحله‌ای در حجم نهایی ۵۰µl و با استفاده از کیت Superscript™ III One-Step Platinum® Taq HiFi RT-PCR System (Invitrogene) انجام شد. جفت پرایمر TSV CP RNA3 express (5′-TCG ACT CTA GAA ACT AGT CTT GAT TCA CCA GAA AT CTT C-3′ و 5′-AGG TAG CAG AG ATA TAA CAA TGA ATA CTT TGA TCC AAG G-3′) برای تکثیر ناحیه CP مورد استفاده قرار گرفت. طراحی پرایمر با استفاده از برنامه Vector NTI Advance10.01 software انجام شد. قبل از انجام آزمون PCR در ابتدا یک مرحله واسرشت در ۵۰°C برای ۳۰ دقیقه و سپس ۹۵°C برای سه دقیقه صورت پذیرفت. واکنش PCR در ۳۰ سیکل انجام شد (۹۵°C در یک دقیقه، ۶۰°C در یک دقیقه و ۶۸°C در دو دقیقه) و در نهایت مرحله پایانی با دمای ۶۸°C در ۱۰ دقیقه پایان پذیرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد و جهت تعیین توالی ابتدا محصول به دست آمده از روی ژل با استفاده از کیت High pure PCR product purification (محصول شرکت آلمانی رشه) جدا و قطعات استخراج شده، جهت الحاق به حامل پلاسمیدی pDrive بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده، در دمای اتاق و به مدت دو ساعت کلون گردید. به منظور غیرفعال نمودن آنزیم لیگاز، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و پس از آن با استفاده از شوک الکتریکی به داخل سلول‌های مستعد *Escherichia coli* DH5α ترانسفورم شدند و پس از آن یک یا دو میلی‌لیتر محلول کشت LB-Amp به آن اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. سپس محلول فوق بر روی پلیت‌های حاوی LB-Amp-Xgal-IPTG (یک میلی‌لیتر آمپی سیلین ۱۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب، یک میلی‌لیتر IPTG ۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتردر آب و یک میلی‌لیتر X-Gal ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در DMF) کشت داده شد و در دمای ۳۷°C و به مدت یک شب قرار گرفت تا کلونی‌های باکتری رشد کنند. پس از خالص‌سازی کلنی‌های سفید و کشت آنها در محیط مایع LB-Amp، جهت استخراج پلاسمید از کیت NucleoSpin Plasmid® (ساخت شرکت آلمانی ماشری ناجل) استفاده شد. پس از آن به منظور هضم حامل‌های نوترکیب برای بررسی قطعات DNA الحاقی به حامل،

چهار میکرولیتر از حامل نوترکیب با آنزیم‌های برشی مناسب *Kpn*I و *Xba*I و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده به مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷°C گذاشته شد و در نهایت نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شدند و همسانه‌های مفید انتخاب، برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت آلمانی MWG Biotech فرستاده شد.

بررسی فیلوژنتیکی

تحلیل ترادف نوکلئوتیدی، ترجمه ترادف به اسید آمینه و ترسیم درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی و سایر جدایه‌ها با نرم افزار DNAman version 4.02 انجام شد.

نتایج و بحث

انتقال مکانیکی و مقایسه دامنه میزبانی

جدایه‌های مختلف TSV در آزمایشگاه به طریقه مایه‌زنی مکانیکی به راحتی منتقل شدند. دامنه میزبانی و شدت علایم جدایه‌های ایرانی، هندی و سودانی متفاوت بودند (جدول۱).

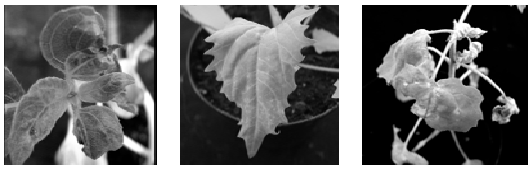
بر اساس نتایج به دست آمده، دامنه میزبانی جدایه هندی تنها محدود به آفتابگردان و سلمه‌تره بود که روی گونه های سلمه تره *C. quinoa* و *C. foliusum* در ابتدا لکه‌های موضعی کلروتیک و سپس علایم سیستمیک شدید به صورت موزاییک و در نهایت تنها پس از سه تا پنج روز پژمردگی ایجاد شد. این ویروس در آفتابگردان نیز به صورت سیستمیک در آمد و باعث ایجاد علایم موزاییک شدید و پژمردگی بوته‌ها گردید (شکل۱). این جدایه با جدایه هندی جدا شده از روی بادام‌زمینی توسط Reddy *et al.* (2002) که دامنه میزبانی بسیار وسیعی داشت و در اکثر محصولات علایم نکروزه سیستمیک ایجاد می‌کرد، کاملاً متفاوت بود. اما با نتایج Ravi *et al.* (2001) در مورد جدایه‌های این ویروس از

جدول۱- دامنه میزبانی جدایه‌های TSV

Family	Species	S1 (Local lesion/systemic)	In (Local lesion/systemic)	43R (Local lesion/systemic)
Aizoaceae	*Tetragonia tetragonoides*L.	CLL/M	-/-	-/-
Chenopodiaceae	*Chenopodium quinoa* L.	CLL/M	CLL/M;W	CLL/-
	C. amaranticolor L.	CLL/M	-/-	CLL/-
	C. murale L.	CLL/-	-/-	CLL/-
	C. foliusum L.	CLL/M	CLL/M;W	CLL/-
Copmositae	*Lactuca sativa* L.	-/-	-/-	-/-
	Helianthus annus L.	NLL/M	-/M;W	-/M
Cucurbitaceae	*Cucumis melo* L.	CLL/-	-/-	-/-
	Cucurbita pepo Duch.	CLL/-	-/-	-/-
Leguminosae	*Phaseolus vulgaris* L.	-/-	-/-	-/-
	Pisum sativum L.	CLL/-	-/-	-/-
	Vicia faba L.	NLL/M; D	-/-	NLL/ DC
Solanaceae	*Datura metel* L.	NLL/M; D	-/-	NLL/-
	Datura stramonium L.	NLL;CLL/M; DC	-/-	NLL/-
	Lycopersicon esculentum Mill.	NLL/M;W	-/-	-/-
	Nicotiana benthamiana L.	-/M; DC	-/-	-/L
	Nicotiana clevelandii L.	NLL/M	-/-	-/-
	Nicotiana debneyi L.	NLL/M	-/-	-/L
	Nicotiana glutinosa L.	NLL/M;R; DC	-/-	-/L
	Nicotiana hesperis L.	NLL/M;W	-/-	NLL/L
	Nicotiana rustica L.	NLL/M; DC;W	-/-	-/-
	Nicotiana occidentalis L.	NLL/M; DC;W	-/-	-/L
	Nicotiana tabacum cv. Samsun L.	NLL/M;W	-/-	-/L
	Nicotiana tabacum cv. Xanthi L.	NLL/M;R;W	-/-	-/L
	Nicotiana tabacum cv. White Burley L.	NLL/M;W	-/-	-/-
	Physalis floridana L.	NLL/M	-/-	NLL/-
	Solanum demissum L.	NLL/M	-/-	NLL/-

CLL: لکه‌های موضعی کلروتیک، NLL :لکه‌های موضعی نکروتیک، M: موزاییک، DC:برگشت لبه ها به سمت پایین، W: پژمردگی، R: لکه حلقوی، L:آلودگی پنهان و - :عدم ایجاد آلودگی.

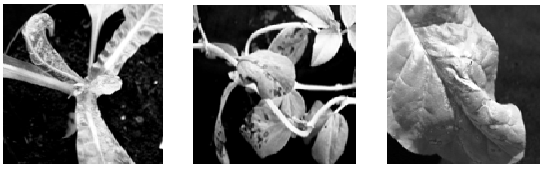
آفتابگردان کاملاً مطابقت داشت.



A B C

شکل ۱- لکه‌های موضعی و سیستمیک ناشی از مایه‌زنی جدایه هندی ویروس TSV بر روی تعدادی از گیاهان محک. A) علایم موزاییک و بد شکلی برگ‌ها در آفتابگردان، B) لکه‌های موضعی کلروتیک روی *C.quinoa*، C) لکه موضعی کلروتیک و روشنی رگبرگ‌ها در *C.foliusum*.

جدایه سودانی دامنه میزبانی وسیع‌تری نسبت به دو جدایه دیگر داشت. این جدایه در *Tetragonia tetragonoides*، گونه‌های سلمه‌تره ابتدا لکه‌های موضعی کلروتیک و پس از حدود یک هفته علایم موزاییک ایجاد کرد. در گیاهان آفتابگردان، باقلا، تاتوره، گوجه‌فرنگی و گونه‌های مختلف توتون به جز *N. benthamiana* علایم موضعی به صورت نکروتیک و علایم سیستمیک که در برخی موارد منجر به مرگ بوته می‌شد، مشاهده گردید. در *N. benthamiana* بر خلاف سایر گونه‌های توتون، ویروس علایم موضعی ایجاد نکرد و تنها پس از سه روز باعث بروز علایم موزاییک و در نهایت پژمردگی بوته شد (شکل۲). علایم ایجاد شده با نتایج Ali *et al.* (2008) مطابقت داشت.



A B C

شکل ۲- لکه‌های موضعی و علایم سیستمیک ناشی از مایه‌زنی جدایه سودانی TSV بر روی تعدادی از گیاهان محک. A) لکه‌های موضعی نکروزه روی باقلا، B) لکه‌های موضعی نکروزه روی *N.rustica*، C) علایم موزاییک، بدشکلی و نکروز روی *N.occidentalis*.

بر خلاف جدایه‌های هندی و سودانی، جدایه ایرانی علایم بسیار خفیفی ایجاد کرد و در بسیاری از گیاهان از جمله برخی گونه های توتون، بدون ایجاد علایم مشخص در گیاه سیستمیک شد. خسارت این جدایه روی آفتابگردان بدون ایجاد لکه‌های موضعی به صورت علایم موزاییک مشاهده شد. این جدایه در باقلا ابتدا باعث لکه‌های موضعی و سپس پیچیدگی برگ‌ها گردید. علایم در گیاهان تاتوره، عروسک پشت پرده، سیب زمینی و گونه‌های سلمه‌تره محدود به لکه‌های موضعی خفیف در سطح برگ‌ها بود (شکل۳). از نظر علایم ایجاد شده، نتایج به دست آمده در مورد جدایه ایرانی مشابه علایم ایجاد شده توسط جدایه آفتابگردان موجود در تحقیقات Motamedi *et al.* (2008) بود. تنها تفاوت موجود، ایجاد لکه‌های موضعی کلروتیک روی لوبیا چشم بلبلی توسط جدایه Motamedi *et al.* (2008) بود. اما با جدایه ایرانی به دست آمده از مزارع کاهو گزارش شده توسط Abtahi & Koohi Habibi (2008) متفاوت بود. جدایه کاهو دامنه میزبانی وسیع تری داشت. جدایه‌های آفتابگردان بر خلاف جدایه کاهو که در توتون *N. Clevelandii* علایم سیستمیک به صورت بد شکلی برگ و روشنی رگبرگ ظاهر کرد، بدون هیچ علایم مشخصی سیستمیک شدند و نیز بر خلاف جدایه کاهو که در کاهو و لوبیا، لکه موضعی ایجاد کرد، هیچ علایمی ایجاد نشد.

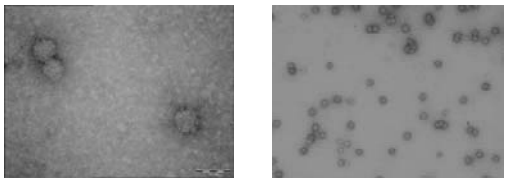
A B

شکل۳-لکه‌های موضعی و سیستمیک ناشی از مایه‌زنی جدایه ایرانی TSV بر روی تعدادی از گیاهان محک. A) علایم پیچیدگی برگ‌ها روی باقلا، B) لکه موضعی نکروزه روی تاتوره.

ایمونوالکترون میکروسکوپی

در بررسی میکروسکوپ الکترونی عصاره نمونه‌های آلوده، پیکره‌های ایزومتریک به قطر حدود ۳۵ نانومتر در رقت ۵۰۰ برابر آنتی‌بادی پلی‌کلونال TSV (AS-906) به خوبی واکنش نشان دادند و هاله تیره‌ای اطراف پیکره‌ها

را فرا گرفت (شکل۴). نتایج مطابق با نتایج Reddy et al. (2002) بود که قطر پیکره ها را ۲۵ تا ۳۵ نانومتر تشخیص دادند.



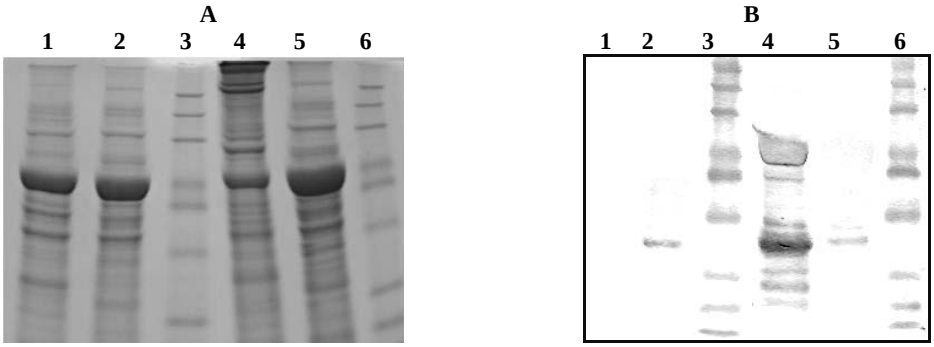
شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی پیکره های TSV با روش دکوراسیون

تنوع سرولوژیکی با استفاده از آزمون تاس الیزا

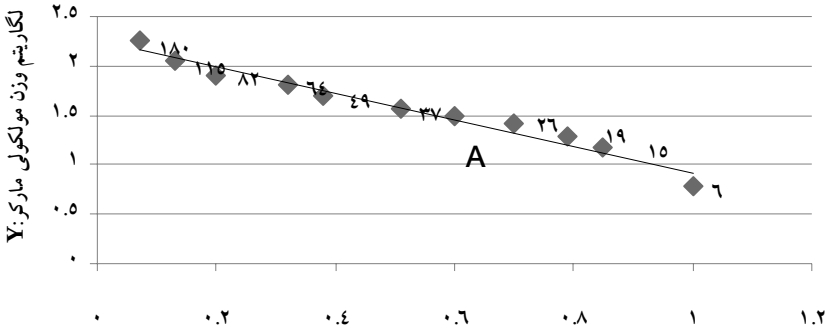
هر سه جدایه مورد بررسی با آنتی بادی مونو کلونال واکنش دادند و هیچ تنوعی بین جدایه‌ها دیده نشد که نشان‌دهنده عدم تفاوت کلی بین اپی‌توپهای مورد استفاده در تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال مورد بررسی TSV (DSMZ AS-0906) بود.

مقایسه وزن مولکولی پروتئین پوششی جدایه‌های TSV

تفاوت وزن مولکولی پروتئین پوششی جدایه‌های TSV، با انجام آزمون SDS-PAGE بررسی شد (شکل 5-A) و با آزمون وسترن بلاتینگ نتایج به دست آمده تأیید گردید (5-B). به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی، خط رگرسیون بین لگاریتم وزن پروتئین پوششی و میزان حرکت نسبی (RF) آنها رسم شد (شکل6) و بر این اساس اندازه پروتئین پوششی جدایه‌های مذکور ۳۰/۹ کیلو دالتون برآورد شد. وزن مولکولی CP در جدایه ایرانی TSV گزارش شده توسط Motamedi *et al.* (2008)، کاملاً مطابق با نتایج به دست آمده بود. جدایه هندی جدا شده از بادام‌زمینی حدود ۲۸ کیلودالتون (Reddy *et al.*, 2002)، جدایه برزیلی سویا و جدایه سودانی باقلا حدود ۳۰ کیلودالتون (Ali *et al.*, 2008; Almedia *et al.*, 2005) بود که نتایج تقریباً مشابه بود.



شکل۵- SDS-PAGE-A و B- وسترن بلات. پروتئین‌های جدایه‌های TSV ،۱: نمونه سالم،۲: جدایه سودانی S1، 4: جدایه ایرانی 43R، 5: جدایه هندی و ۳،۶: ماکرهای مولکولی (BenchMark™)

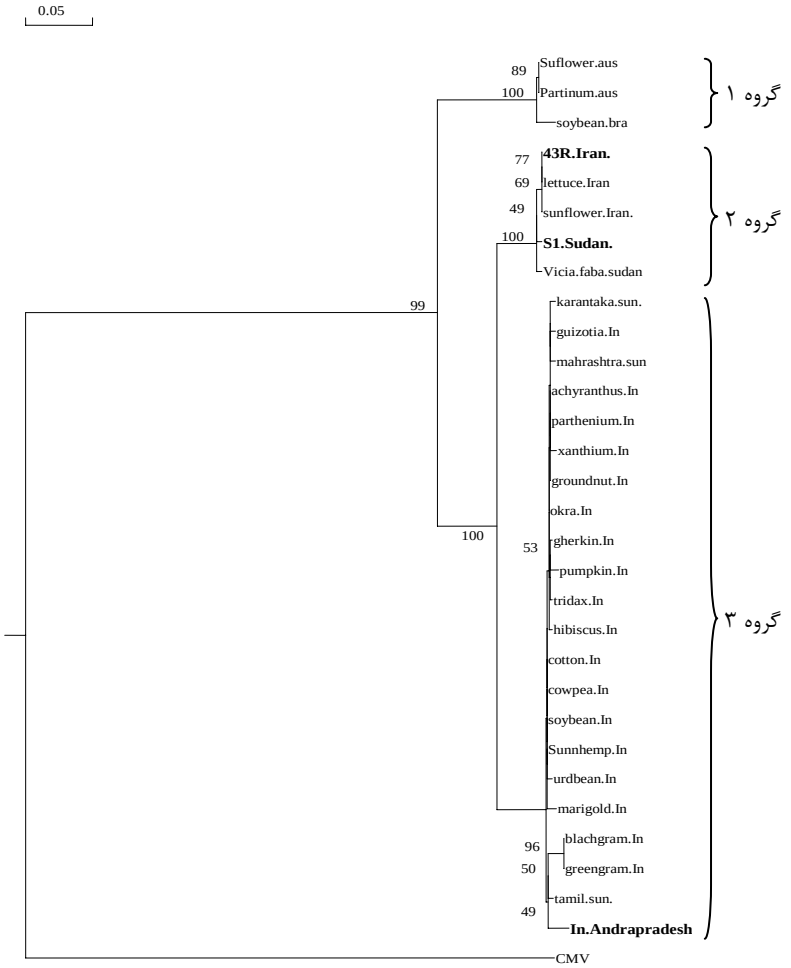


شکل۶- منحنی خط رگرسیون وزن پروتئین پوششی.
(A: نقطه نشان‌دهنده وزن پروتئین پوششی=۳۰/۹)
RF: فاصله مارکر از سر ژل/ فاصله‌ای که رنگ طی کرده است.

تنوع مولکولی جدایه‌های TSV

RNAی کل در جدایه‌ها با دو روش ذکر شده استخراج شد و پس از استخراج RNAی کل از جدایه‌های ایرانی، هندی و سودانی، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی TSV CP RNA3 express قطعه‌ای به طول ۷۴۷ جفت باز تکثیر شد. ژن‌های تکثیر شده پس از همسانه‌سازی، الحاق در پلاسمید حامل pDrive، استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی، برای تعیین توالی به شرکت MWG Biotech آلمان فرستاده شدند. نتایج حاصل از تعیین توالی جدایه‌های هند، ایران و سودان با هم و با جدایه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار DNAman version 4.02 بررسی و درخت فیلوژنی آنها ترسیم شد (شکل۷).

نتایج نشان داد که توالی CP جدایه‌های ایرانی و سودانی تنها در دو نوکلئوتید و دو اسید آمینه با هم تفاوت دارند.



شکل ۷- تحلیل فیلوژنتیکی ترادف اسید آمینه پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس رگه‌ای توتون با استفاده از نرم‌افزار DNAman version 4.02. جدایه‌ها عبارتند از: Sunflower.Iran (جدایه آفتابگردان: ایران)، Lettuce .Iran (جدایه کاهوی، ایران)، Vicia- .sudan faba (AM933669: سودان)، Cotton.In (AF515824) : هند)، Okra.In (AY501482، هند)، Tridax .In (AY501484، هند)، hibiscus.In (AY501483: هند)، Mungbean.In (AF515823: هند)، Groundnut.In (AY510128: هند)، Soybean.In (DQ518916: هند)، Cowpea.In (DQ058079: هند)، Urdbin .In (DQ225172: هند)، sunnhemp.In (AF515825: هند)، Maharashtra.sun (AY606075: هند) ، Guizotia .In (DQ864458: هند)،Parthenerium .In (AY940157: هند)، Marigold.In (FJ447358: هند)، Gherkin.In (EF159702: هند)، Pumpkin.In (EF159703: هند)، Xanthium .In (AY510131: هند)، Chili.In (AY590139: هند)،Greengram .In (FJ749260: هند)، Tamil.sun (EU085385: هند)، Karantaka.sun (AY510125: هند)، Parthenerium aus (EU871659: استرالیا)، Sunflower.aus (EU37481: استرالیا) و Soybean.bra (AY354406: برزیل). جدایه AF523352 ویروس CMV به عنوان outgroup در نظر گرفته شده است.

اما جدایه هندی ۷۲ نوکلئوتید و ۲۳ اسید آمینه با جدایه‌های دیگر تفاوت دارد. در بررسی فیلوژنتیکی جدایه Parthenerium و آفتابگردان استرالیا و جدایه سویای برزیل در گروه یک، جدایه ایرانی 43R، جدایه آفتابگردان Motamedi *et al.* (2008)، جدایه کاهوی Abtahi & Koohi Habibi (2008)، جدایه سودانی S1 و جدایه باقلای گزارش شده از سودان در گروه دو و جدایه‌های هندی پنبه، بامیه، Tridax، ختمی، ماش، بادام زمینی، سویا، لوبیا چشم بلبلی، Urdbin، کنف بنگالی، Guizotia، Parthenerium، گل همیشه بهار، خربزه، کدو، Xanthium، فلفل، Green gram و جدایه‌های آفتابگردان ایالات تامیل، کارانتاکا، ماهاراشترا و اندراپرادش (In) در گروه سه قرار می‌گیرند. گروه دو و سه حدود ۹۱٪ (۹۰/۳-۹۰/۷٪)، گروه یک و دو ۸۴ تا ۸۵٪، و گروه یک و سه حدود ۸۲٪ با هم شباهت دارند. در هر گروه جدایه‌ها ۹۸-۱۰۰٪ با هم شباهت دارند.

نتیجه‌گیری کلی

در سال‌های اخیر ویروس TSV خسارت زیادی به محصول آفتابگردان وارد کرده، باعث مرگ بوته‌ها و کاهش محصول شده است. میزان خسارت در مزارع مناطق مختلف، متفاوت است. در هند خسارت سالانه این ویروس قابل توجه است و سبب اپیدمی‌های متعدد در بسیاری از نواحی آن کشور می شود. در این تحقیق با توجه به اهمیت آفتابگردان و شناسایی آن در مزارع ایران، یک جدایه ویروس از ایران با یک جدایه هندی و یک جدایه سودانی مورد مقایسه قرار گرفتند. در بررسی طیف میزبانی، جدایه هندی (TSV-In) محدودتر از دو جدایه دیگر بود و جدایه‌های سودانی (TSV-S1 & TSV-S2) طیف وسیع‌تری از بقیه جدایه‌ها داشت و بر روی تعداد بیشتری از گیاهان علایم متنوعی ایجاد کرد. جدایه ایرانی ملایم‌ترین جدایه‌ها بود و شدت علایم ایجاد شده در اثر این جدایه بسیار خفیف‌تر از جدایه‌های سودانی و هندی بود. وزن پروتئین پوششی در سه جدایه ۳۰/۹ کیلودالتون بود. آزمون وسترن بلات تأییدکننده نتایج حاصل از SDS-PAGE بود. بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌ها بر اساس توالی اسیدآمینه CP نشان داد که جدایه‌های ایرانی و سودانی در یک گروه و جدایه هندی با حدود ۹۱٪ تشابه در گروه جداگانه قرار می‌گیرد.

REFERENCES

1. Abtahi, F. & Koohi Habibi, M. (2009). Host range and some characterization of TSV isolated from lettuce in Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7 (23), 4260-4264.
2. Ali, M. A., Winter, S. & Dafalla, G. A. (2008). *Tobacco streak virus* infecting faba bean reported for the first time. *The British Society for Plant Pathology*, 144.
3. Almedia, A. M. R., Sakai, J., Hanada, K., Olivera, T. G., Belintani, P., Kitajima, E. W., Souto, E. R., Novaes, T. G. & Nora, P. S. (2005). Biological and molecular characterization of an isolate of *Tobacco streak virus* obtained from soybeans in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 366-373.
4. Berguland, D. R. (2007). *Sunflower production*. Extension Publication. 120pp.
5. Clark, M. F. & Adams, S. A. N. (1977). Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
6. Dijkstra, J. (1983). *Tobacco streak virus* in sunflower (*Helianthus annus*). *Netherland Journal of Plant Pathology*, 89, 153-169.
7. Greber, R. S. (1971). Some characteristics of *Tobacco streak virus* isolates from Queesland. QueensI. *Journal of Agriculture and Animal Science*, 28, 105-114.
8. Greber, R. S., Klose, M. J., Teakle, D. S. & Milne, J. R. (1991). High incidence of *Tobacco streak virus* in tobacco and its transmission by Microcephalothrips abdominalis and pollen from *Ageratum houstonianum*. *Plant Disease*, 75, 450-452.
9. Hosseini, S., Mosahebi, G. & Koohi Habibi, M. (2006). Distribution of sunflower viruses of Iran. In: Proceedings of *the 10th International Plant Virus Epidermiology Symposium*, 15-19 Oct. Hyderabad, India, P. 2_98.
10. Jordan, R. L. (1990). Strategy and techniques for the production of monoclonal antibodies; monoclonal antibody applications for viruses. In serological methods for the detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. *A Laboratory Manual.* APS press. 389pp.
11. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
12. Motamedi, M. (2008). *Characterization of TSV and TSWV isolated from sunflower.* M. Sc. dissertation, University of Tehran, Iran (In Farsi).

13. Milne, R. & Luisoni, E. (1977). Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *Methods in Virology*. Vol. 6. Academic Press, New York. 265-281.
14. Rao, R. D. V. J. P, Reddy, A. S., Reddy Thirumala-Devi, S. V., Rao, S. C., Kumar, V. M., Subramaniam, K., Reddy, T. Y., Nigam, S. N. & Reddy, D. V. R. (2003). The host range of *Tobacco streak virus* in India and transmission by thrips. *Annual Application Biology*, 142, 365-368.
15. Ravi, K. S., Buttegereitt, A. S., Kitkaru, A. S., Deshmukh, S., Lesemann, D. E. & Winter, S. (2001). Sunflower necrosis disease from India is caused by an *ilarvirus* related to *Tobacco streak virus*. *Plant Pathalogy*, 50, 800.
16. Reddy, A. S., Prasada Rao, R. D. V. J., Thirumala-Devi, K., Reddy, S. V., Mayo, M. A., Roberts, I., Satyanarayana, T., Subramaniam, K. & Reddy, D. V. R. (2002). Occurrence of *Tobacco streak virus* on peanut (*Arachis hypogaea*) in India. *Plant Disease*, 86, 173-178.
17. Sambrook, J., Fristch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
18. Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: *A Laboratory Manual*. (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
19. Sharman, M., Thomas, J. E. & Persley, D. M. (2008). First report of *Tobacco streak virus* in sunflower, cotton, chickpea and mung bean in Australia. Australas. *Plant Disease*, 3, 27-29.
20. Sharman, M., Persley, D. M. & Thomas, J. E. (2009). Distribution in Australia and seed transmission of *Tobacco streak virus* in *Parthenium hysterophorus*. *Plant Disease*, 93, 708-712.
21. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: *Procedure and some Applications Academic Science*, 76, 4350-4354.