

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ویروس موزائیک جنوبی مرغ بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ۳' ژنوم*

GENETIC VARIATION OF BERMUDA GRASS SOUTHERN MOSAIC VIRUS ISOLATES BASED ON SEQUENCE OF 3' REGION OF GENOME

فریده فرح بخش^۱، محمود معصومی^{۲*}، علیرضا افشاریفر^۱، کرامت اله ایزدپناه^۱
و نرجس راه‌پیما سروسستانی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۷/۱۹)

چکیده

ویروس موزائیک جنوبی مرغ (Bermuda grass southern mosaic virus, BgSMV)، فراوان‌ترین ویروس مولد موزائیک در مرغ در نواحی گرمسیری جنوب ایران می‌باشد. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی BgSMV، گیاهان مرغ با علائم موزائیک از جیرفت، بوشهر، برازجان، رامهرمز، اندیمشک، شوشتر، بهبهان و داراب جمع‌آوری و ناحیه ۳' ژنوم آنها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ویروس با روش RT-PCR تکثیر و همسانه‌سازی شد. ناحیه CP-UTR این جدایه‌ها به همراه تعدادی از ترادف-های پوتی ویروس‌های غلات موجود در بانک ژن مقایسه و پس از انجام هم‌ردیف‌سازی چندگانه، مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی قرار گرفت. جدایه‌های مورد مقایسه در درخت فیلوژنتیکی در ۶ شاخه جداگانه قرار گرفتند که عبارت بودند از: BgSMV، ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (Maize dwarf mosaic virus, MDMV)، ویروس موزائیک نیشکر (Sugarcane mosaic virus, SCMV)، ویروس موزائیک قیاق (Johnson grass mosaic virus, JGMV)، ویروس موزائیک سورگوم (Sorghum mosaic virus, SrMV) و دو ویروس موزائیک ایرانی قیاق (Iranian Johnson grass mosaic virus, IJMV) و موزائیک زآ (Zea mosaic virus, ZeMV) که در یک شاخه قرار گرفتند. در بین پوتی ویروس‌ها، BgSMV بیشترین تشابه را با MDMV داشت. اما در ناحیه ۵' ژن پروتئین پوششی BgSMV، ۹۰ نوکلئوتید (معادل ۳۰ آمینو اسید) بیشتر از MDMV داشت و این مساله در تمام جدایه‌های BgSMV صادق بود. میانگین درصد تشابه نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR بین جدایه‌های BgSMV، ۹۸/۱ درصد به دست آمد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی پایین این ویروس در این ناحیه از ژنوم است. به رغم وجود تشابه نوکلئوتیدی بالای BgSMV با MDMV، با توجه به تفاوت‌های اساسی از نظر دامنه میزبانی و سرولوژی بین دو ویروس و وجود یک قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی اضافی در ناحیه ۵' ژن CP، BgSMV به عنوان گونه‌ای نزدیک به MDMV در جنس پوتی ویروس در نظر گرفته می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پوتی ویروس، آنالیزهای فیلوژنی، ویروس موزائیک جنوبی مرغ، ویروس موزائیک کوتولگی ذرت، ناحیه

CP-UTR

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: masoumi@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشگاه شیراز

۲. استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس و مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشگاه شیراز

۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مقدمه

(Izadpanah 2000, Masumi et al., 2004, Zare et al. 2005).

این ویروس که به نام ویروس موزائیک جنوبی مرغ (Bermuda grass southern mosaic virus, BgSMV) نامیده شد (Masumi and Izadpanah 2000) از نظر ترادف نوکلئوتیدی، خصوصیات سرولوژیکی، انتقال و دامنه میزبانی تشابه بسیار زیادی با MDMV که گسترده ترین پوتی ویروس ذرت در دنیا می‌باشد دارد، ولی به دلیل داشتن ۹۰ نوکلئوتید اضافی نسبت به MDMV در ناحیه ۵ ژن پروتئین پوششی (CP)، تشکیل مهمیزک (spur) در آزمون نشت دو طرفه در ژل آگار، عدم توانایی انتقال با شته *Rhopalosiphum maidis* و عدم ایجاد آلودگی در قیاق، از MDMV متمایز می‌شود (Zare et al. 2005).

گروه دوم شامل جدایه‌هایی است که در مناطق معتدل ایران از جمله شیراز و کرج شایع هستند و به نام ویروس موزائیک مرغ (Bermuda grass mosaic virus, BgMV) نامیده شدند (Masumi and Izadpanah 2000). BgMV از نظر ویژگی‌های علائم شناسی، مورفولوژی و انتقال، به پوتی ویروس‌ها تشابه دارد ولی فاقد رابطه سرولوژیک با پوتی ویروس‌های غلات است (Hosseini and Izadpanah 2005). BgMV با *Spartina mottle virus* (SpMV) قرابت سرولوژیکی و فیلوژنتیکی دارد و جنس جدید *Sparmovirus* برای آنها پیشنهاد شده است (Hosseini et al. 2010). به رغم فراوانی BgSMV در جنوب ایران در خصوص میزان تنوع ژنتیکی آن اطلاعاتی در دست نیست. در این تحقیق، میزان تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف BgSMV جمع‌آوری شده از مناطق جیرفت، برازجان، بوشهر، شوشتر، اندیمشک، بهبهان، رامهرمز و داراب با استفاده از آنالیز مولکولی ترادف ناحیه CP-UTR مورد بررسی قرار گرفت.

گیاهان غیرزراعی تیره غلات به ویژه گونه‌های چندساله از قبیل مرغ، میزبان تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی هستند که برخی از آنها دارای اهمیت اقتصادی بوده و تعدادی دارای اهمیت بالقوه هستند (Buddenhagen 1983). علف هرز مرغ یا Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) به طور گسترده‌ای در سراسر دنیا در شرایط اقلیمی مختلف انتشار دارد. تاکنون چندین ویروس از جمله ویروس خراشک مرغ (*Bermuda grass etched-line virus, BELV*), ویروس نوارک سبزرده مرغ (*Cynodon chlorotic streak virus, CCSV*), ویروس کوتولگی زرد جو (*Barley yellow dwarf virus, BYDV*), MDMV, SCMV و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*) در مناطق مختلف جهان از مرغ گزارش شده‌اند (Garrido and Trujillo 1992, Jorda et al. 1995, Lockhart et al. 1993, Louie 1980, McKirdy and Jones 1985a, b). در ایران نیز این علف هرز منبع چندین ویروس می‌باشد که تعدادی از آنها از لحاظ اقتصادی اهمیت دارند (Izadpanah 1989; Izadpanah et al. 2003; Masumi and Izadpanah 1996). برای اولین بار علائم موزائیک در مرغ توسط معصومی و ایزدپناه ابتدا در شیراز و سپس در سایر مناطق کشور دیده شد (Masumi and Izadpanah 1998). بررسی‌های بیشتر نشان داد که ویروس‌های مولدموزائیک مرغ در دو گروه قرار می‌گیرند (Masumi and Izadpanah 2000). گروه اول شامل جدایه‌هایی است که گسترش وسیعی در نواحی گرمسیر جنوب ایران مانند جیرفت، بوشهر و اهواز دارند و در طبیعت علاوه بر مرغ، ذرت و رشدی را نیز آلوده می‌کنند (Ghasemi and Izadpanah 2000; Masumi and

روش بررسی

منبع جدایه‌های BgSMV

جدایه‌های مورد مطالعه از گیاهان مرغ با علائم موزائیک از مناطق جیرفت، برازجان، بوشهر، شوشتر، اندیمشک، بهبهان و داراب جمع آوری گردید و از هر منطقه تنها یک نمونه برای استخراج ویروس و تعیین ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج ویروس، جداسازی RNA و واکنش RT-PCR

پس از عصاره‌گیری نمونه‌ها در ۳ حجم بافر سترات آمونیوم ۰/۱ مولار، pH= ۶/۵، با کلروفرم به نسبت ۳۰ درصد تیمار و سانتریفوژ شدند و از روشین به دست آمده برای تهیه cDNA استفاده گردید. مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت mRNA Capture (Roche) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. از آن ای متصل شده به لوله برای واکنش ترانویسی معکوس (Reverse Transcription, RT) با آنزیم (Moloney murine Reverse Transcriptase (leukemia virus, MmLV (Fermentas) استفاده شد. واکنش RT با مخلوط نمودن ۱۰ میکرولیتر بافر ۵ برابر غلظت مخصوص، ۰/۴ میلی مولار DTT، ۰/۴ میلی مولار مخلوط dNTPs، ۰/۶ میکرومولار آغازگر N1T یا Oligo dT (جدول ۱) و ۲۰ واحد آنزیم MmLV تهیه شد. مخلوط حاصل با افزودن آب به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگه‌داری گردید. cDNA حاصل از واکنش RT با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شد. مخلوط مورد استفاده در واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase buffer (۱۰×)، ۱/۵ میلی مولار MgCl₂، ۰/۲ میلی مولار مخلوط dNTPs، ۰/۴

میکرومولار از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (جدول ۱)، ۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (Cinagen, Iran) و ۳ میکرولیتر cDNA بود و در نهایت حجم مخلوط با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR متشکل از یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه به منظور واسرشته‌سازی اولیه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، تافتن (Annealing) به مدت ۱ دقیقه در دمای مناسب برای هر جفت آغازگر (جدول ۲) و سنتز در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، به علاوه یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای امتداد رشته‌ها (Extension) بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندورف و یا مدل iCycler شرکت Bio Rad انجام شد.

محصول PCR با استفاده از InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit طبق دستورالعمل سازنده (Fermentas) در پلاسמיד pTZ57R/T وارد و در باکتری *E. coli* استرین DH5 α هم‌سانه‌سازی گردید. پلاسמידها پس از استخراج به روش هولمز و کویگلی (Holmes and Quigley 1981)، به منظور تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال گردیدند و با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 تعیین ترادف شدند.

آنالیز فیلوژنتیک

پس از تجمیع قطعات تعیین ترادف شده حاصل از ۳ تا ۶ کلنی از هر قطعه ترادف استنتاجی (Consensus sequence) با استفاده از نرم‌افزارهای DNAMAN و Edit Seq (DNASTAR) به دست آمد. سپس این ترادف‌ها با ترادف سایر پوتی ویروس‌های مرتبط موجود در بانک ژن (جدول ۴) شامل SCMV، MDMV، JGMV، IJMV و SrMV مقایسه

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر ناحیه CP-UTR جدیده‌های BgSMV

Table 1. Primers used in polymerase chain reaction (PCR) for amplification of the CP-UTR region of BgSMV isolates

Name	Orientation	Sequence**	Reference
N1T	Reverse	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T)18-3'	Ha <i>et al.</i> 2007
MDR3	Reverse	5'-ACCAVACCATYARWCCACTC-3'	*
MDR1	Reverse	5'-RTGCATRATTTGTCTGAAAGTTGG-3'	*
BJPr2	Reverse	5'-GTGCTGGAGTGCAGATGAC-3'	*
BJPr1b	Reverse	5'-CGGTAAAGTTTCGCTGAAGTCC-3'	*
BJPf2	Forward	5'-CACACGAGCAACCAAGGCTG-3'	*
BJPf1	Forward	5'-GATCTTCCAGATTATTGGCTGAYG-3'	*
MDF3	Forward	5'-GATGAGTTRAAYGTYTATGCACGAC-3'	*
Oligo1n	Forward	5'-ATGGTHTGGTGYATHGARAAYGG-3'	Mari- Jeanne <i>et al.</i> 2000
Oligo2n	Reverse	5'-TGCTGCKGCYTTTCATYTG-3'	Mari- Jeanne <i>et al.</i> 2000

*:Primes used in this study

** : Degenerated Codes: V(A/C/G) , D(A/G/T),M(A/C),Y(T/C),R(A/G)

جدول ۲. چرخه دمایی آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگرهای مندرج در جدول ۱

Table 2. Thermal cycle used in polymerase chain reaction (PCR) for primers of table 1

Number of cycle	Reaction stage	Temperature (°C)	Time(min)
1	Initial denaturation	94	4
35	Denaturation	94	1
	Annealing	*	1
	Extension	72	1
1	Final extension	72	1

* دمای تافتن ۵۶ °C برای جفت آغازگر Mdf3/MDr3

دمای تافتن ۶۰ °C برای جفت آغازگر Mdf3/MDr1

دمای تافتن ۵۸ °C برای جفت آغازگرهای BJPf1/BJPr2, BJPf1/BJPr1b و BJPf2/N1T

*56 °C for primer pair Mdf3/MDr3

60 °C for primer pair Mdf3/MDr1

58 °C for primer pairs BJPf1/BJPr2, BJPf1/BJPr1b and BJPf2/N1T

با استفاده از برنامه Treeview 1.6.6 (Page 1996) ترسیم گردید. در این آنالیز ویروس موزائیک رگه‌ای گندم (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) به عنوان out group به کار گرفته شد.

برای مقایسه جدایه‌های BgSMV با یکدیگر و نیز با سایر پوتی ویروس‌های غلات از ترادف نوکلئوتیدی ژن

گردیدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه (Multiple alignment) با برنامه‌های MegAlign (DNASTAR) و CLUSTAL X (Thompson *et al.* 1997) انجام و مشابهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با روش Neighbour joining در برنامه CLUSTAL X محاسبه شد. درخت فیلوژنتیکی حاصل از هم‌ردیف‌سازی چندگانه

در پروتئین است. در غیر این صورت پروتئین در سطح آمینو اسیدی محافظت شده (Conserved) بوده و انتخاب منفی در تکامل و تغییر ویروس دخالت داشته است. در صورتی که این نسبت برابر با یک باشد تکامل خنثی داشته است.

برای بررسی این نسبت از برنامه Hy Phy از بسته نرم‌افزاری MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2011) استفاده شد که جاننشینی‌ها را در جایگاه کدون آمینو اسیدی محاسبه می‌کند. برای این کار ابتدا آزمون خنثی بودن (Neutrality test) به دو روش Tajima's test و Z-test با مدل تکاملی Nei-Gojobori (Nei & Kumar 2000) با همان نرم‌افزار انجام گرفت و در صورت رد فرضیه صفر مبنی بر نبودن حالت خنثی و امکان وقوع جاننشینی مثبت یا منفی نسبت جاننشینی تعیین گردید. هم‌چنین تنوع ژنتیکی (Genetic diversity) با همان بسته نرم‌افزاری در درون گونه‌ها و بین گونه‌ها با مدل Kimura 2-parameter محاسبه گردید.

نتیجه

با تجمیع قطعات نوکلئوتیدی حاصل از ترادف یابی، قطعاتی به اندازه ۱۲۸۴-۱۲۴۶ نوکلئوتید به دست آمد. قطعات تعیین ترادف شده شامل قسمتی از نیمه ۳' ژن N1b (در جدایه‌های مختلف ۸۴-۴۸ نوکلئوتید) و کل ژن پروتئین پوششی (۹۶۳ نوکلئوتید) و ناحیه ترجمه نشدنی ۳' (3'-untranslated region, 3'-UTR) (۲۳۴-۲۳۲) نوکلئوتید) است. کدون خاتمه چهارچوب خوانش (ORF) پلی پروتئین ویروس در انتهای ژن CP در برخی جدایه‌ها TGA و در تعدادی TAA بود (جدول ۳).

سایت برشی احتمالی CP با N1b، VIDVKHQ/A

کامل CP به علاوه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه 3'-UTR (CP-UTR) استفاده گردید.

بررسی روند تغییرات در ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR

تشابه نوکلئوتیدی با روش maximum likelihood با مدل جاننشینی نوکلئوتیدی F84 و با نسبت transition/transversion متغیر که برای هر جایگاه نوکلئوتیدی محاسبه می‌شود، در طول ترادف نوکلئوتیدی CP-UTR با برنامه SimPlot محاسبه گردید و طرح تشابه ترسیم گردید. در این روش تشابه گروه‌های (ویروس‌های) مختلف نسبت به یک ویروس سنجیده می‌شود (Ray 1999).

بررسی وقوع نوترکیبی بین BgSMV و سایر پوتی ویروس‌های غلات

برای بررسی امکان وقوع نوترکیبی بین پوتی ویروس‌ها، به ویژه بین BgSMV و سایر ویروس‌ها، ترادف‌های CP-UTR این ویروس‌ها با نرم‌افزار SimPlot (Ray 1999) و نرم‌افزار RDP3 برنامه‌های Bootscan و MaxKai مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی نسبت جاننشینی مترادف و غیر مترادف آمینو اسیدی و فشارانتخاب

نسبت جاننشینی غیر مترادف (Non-Synonymous) به مترادف (Synonymous) در آمینو اسیدها که با علامت ω نشان می‌دهند، تخمین مناسبی از فشار انتخاب (Selective pressure) در سطح پروتئین به دست می‌دهد (Kimura 1983). اگر این نسبت بالاتر از یک باشد نشان‌دهنده انتخاب مثبت و تثبیت جاننشینی آمینو اسیدی

جدول ۳. اندازه ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های BgSMV در قسمت‌های مختلف ناحیه انتهای ۳' ژنوم

Table 3. Length (nt) of 3'-region in BgSMV isolates.

	Segment length (nt)	Nib	CP	3'UTR	Termination codon
Behbahan	1284	84	963	233	TGA
Andimeshk	1249	48	963	234	TAA
Borazjan	1246	48	963	232	TGA
Bushehr	1246	48	963	232	TAA
Jiroft	1281	81	963	234	TGA
Ramhormoz	1248	48	963	234	TGA
Shushtar	1246	48	963	232	TGA
Darab	1248	48	963	234	TGA

ویروس‌های مختلف بین ۸/۸۵-۶/۵۴ درصد متغیر است. کمترین میزان تشابه بین این ویروس با JGMV و بیشترین درصد تشابه بین این ویروس با MDMV به دست آمد. با بررسی درصد شباهت نوکلئوتیدی درون جدایه‌های مختلف BgSMV بیشترین درصد شباهت بین دو جدایه بهبهان و شوشتر (۹۹/۸) و کمترین شباهت بین دو جدایه داراب و برازجان (۹۲/۴) به دست آمد (جدول‌های ۶ و ۷). با هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف ناحیه CP-UTR جدایه‌های BgSMV با ترادف‌های تعدادی از جدایه‌های MDMV موجود در بانک ژن مشخص شد که تمام جدایه‌های تعیین ترادف شده BgSMV، در ناحیه ۵' ژن CP، ۹۰ نوکلئوتید بیش از MDMV دارند (شکل ۳).

روند تغییرات در تشابه نوکلئوتیدی بین BgSMV و سایر پوتی ویروس‌های غلات در ناحیه CP-UTR

تشابه هر ویروس نسبت به سایر ویروس‌ها با برنامه Simplot در ناحیه CP-UTR ترسیم گردید (شکل ۴). طرح مشابهت (Similarity Plot) بر اساس تشابه نوکلئوتیدی در جایگاه‌های مختلف از طرف ۵' به ۳' ترسیم گردید. در این مقایسه BgSMV به عنوان مبنا قرار

است. طرح حفاظت شده DAG که در انتقال با شته دخالت دارد (Aterya *et al.* 1991; 1995)، K/DK/DV محل برش ناحیه انتهای آمینی (N-terminal) ژن CP، QMKAAA و نیز MVWCIENGSP که مشخصه اعضای جنس پوتی ویروس هستند (McDaniel and Gordon 1989) در ترادف‌های به دست آمده از ژن CP جدایه‌های BgSMV مشاهده شدند (شکل ۱). به علاوه طرح حفاظت شده R-X43-D نیز که محل اتصال پروتئین پوششی به RNA است (Jacquet *et al.* 1998) در این ژن وجود داشت و با علامت ستاره مشخص شده‌اند (شکل ۱). موقعیت طرح‌های ذکر شده در ژن پروتئین پوششی جدایه‌های BgSMV در جدول ۵ مشخص شده است.

رابطه فیلوژنتیکی پوتی ویروس‌های غلات که بر اساس ترادف ناحیه CP-UTR ترسیم شده است، در شکل ۲ مشاهده می‌شود. در درخت فیلوژنتیک ترادف‌های مربوط به جدایه‌های مختلف BgSMV در کنار جدایه‌های MDMV، اما در شاخه‌ای جداگانه قرار می‌گیرند. ترادف‌های SrMV، SCMV و JGMV نیز هر کدام گروه جداگانه‌ای را تشکیل می‌دهند. IJMV و ZeMV نیز در یک شاخه قرار می‌گیرند. میزان تشابه نوکلئوتیدی بین جدایه‌های مختلف BgSMV بیش از ۹۰٪ و بین پوتی

جدول ۴. رس شمار و منشأ پوتی ویروس‌های غلات که در آنالیزهای فیلوژنتیک به کار برده شدند.

Table 4. Accession numbers and origins of cereal potyviruses used in phylogenetic analysis

virus	accession No.	strain or isolate	country
MDMV	AF395135		Israel
MDMV	FM883223	Sz0705	Hungary
MDMV	AJ001691	MDMV-BU	Bolgaria
MDMV	NC 003377	ACOL01003377.1	USA
MDMV	AM110758	SP	Spain
MDMV	AJ416634	M3	Spain
MDMV	DQ973169	MDMV-Arg	Argentina
MDMV	U007216	MDMV-JIL	USA
MDMV	AJ542536	Sc/H	Hungary
JGMV	U07218	JGMV-KS1	USA
JGMV	AF032404	Krish	Australia
JGMV	Z26920	JGMV-AUST	Australia
ZeMV	AF228693		Israeal
IJMV	AF533363	IJMV-Shiraz	Iran
SCMV	D00948	Sc	Australia
SCMV	U57354	A	USA
SCMV	U57357	E	USA
SCMV	D00949	SCMV-MDB	USA
SCMV	AJ006200	SCMV-G952	Germany
SCMV	AJ271085	Zhejiang	China
SrMV	U57360	SrMV-SCM	USA
SrMV	U07219	SrMV-Sch	USA
BgSMV	KC107758	Behbahan	Iran
BgSMV	KC107759	Andimeshk	Iran
BgSMV	KC113506	Shushtar	Iran
BgSMV	KC113505	Ramhormoz	Iran
BgSMV	KC113504	Jiroft	Iran
BgSMV	KC107761	Bushehr	Iran
BgSMV	KC107760	Borazjan	Iran
BgSMV	KC113507	Darab	Iran

ناحیه است. سپس از موقعیت نوکلئوتیدی حدود ۳۵۰ شیب منحنی به شکل یکنواختی رو به کاهش می‌گذارد. این قسمت به دلیل نزدیک تر بودن به خط مبنا، بیشترین تشابه را نشان می‌دهد و مربوط به ناحیه میانی ژن CP (Core protein) (ناحیه حفاظت شده ژن CP) می‌باشد. از موقعیت نوکلئوتیدی حدود ۷۰۰، شیب منحنی با زاویه

گرفته و سایر ویروس‌ها با آن مقایسه شدند. در این طرح (شکل ۴) BgSMV به ترتیب با MDMV، SCMV و IJMV بیشترین شباهت را داشت. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، از موقعیت نوکلئوتیدی حدود ۲۲۰ بتدریج شیب منحنی افزایش می‌یابد. این قسمت که مربوط به ناحیه آمینی CP است نشان‌دهنده تفاوت زیاد در این

ELNVYARQFFNDLPDYLA**DEVIDVKHQ**/AGENV**DAG**QETEAQKEAKKKAEEKKARE
TEAKRKQEAETKQKADDEARERQRVKEAADKKKAEDDAKKKAAEKPSGSGSAE**KDK**
DVDAGTLGSMTVPKLGKAMSKMRLPQAKGKNILHLDFLLQYKPQQQDLSNTRATKAE
FD*RWYEA VQKEYELDDTQMTVVMVMSGL**MVWCIENG CSP**NINGVWTMMD*GDEQRTF
PLKPVIEASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTEKYMPRYGLQRNLTDFFSLARYAFDFY
EMSSRTPARAKEAHM**QMKAAA**VRGSNTRMFGLDGNVGETQENTERHTAGDVS RNMH
SLLGVQQGH

شکل ۱. موقعیت جایگاه‌های برشی و طرح‌های حفاظت شده پروتئین پوششی جدایه‌های BgSMV

Fig. 1. Positions of cleavage sites and conserved motifs in CP of BgSMV isolates

جدول ۵. موقعیت طرح‌های حفاظت شده در CP جدایه‌های BgSMV

Table 5. Position of conserved motifs in CP of BgSMV isolates

Conserved motifs	Amino acid position in BgSMV CP	Putative function
DAG	6-8	Aphid transmission
MVWCIENGSP	169-179	Motif of coat protein
K/DK/DV	83-87	N-terminal cleavage site of CP
QMKAAA	272-277	Motif of coat protein
R-X43-D	145-189	RNA binding

جدول ۶. درصد تشابه (Similarity) نوکلئوتیدی گونه‌های مختلف پوتی ویروس‌های غلات بر اساس ناحیه CP-UTR

Table 6. Nucleotide identity between cereal potyvirus species in CP- UTR region

	JgMV	IJMV	MDMV	BgSMV	SrMV	SCMV
JgMV						
IJMV	38.2-42.1					
MDMV	38.1-41.5	61-72.2				
BgSMV	37-52.3	58.9-69.8	85.5-90.2			
SrMV	38.8-56	60.4-64.5	65.2-72.6	70.1-72.2		
SCMV	38.1-52.7	62.2-63.3	62-65.2	59.3-66.6	56.3-61.5	

MDMV یکسان است (شکل ۴-B).

ردیابی نو ترکیبی در BgSMV

وقوع نو ترکیبی در جدایه‌های BgSMV به روش BootScan مورد بررسی قرار گرفت (نشان داده

کمتری نسبت به ناحیه آمینی CP افزایش می‌یابد. این تغییر شیب مربوط به ناحیه کربوکسیلی CP است که نسبت به ناحیه آمینی تغییر پذیری کمتر دارد (شکل ۴-A). با مبنای قرار دادن ویروس SCMV مشخص شد که تغییرات در جایگاه‌های نوکلئوتیدی بین دو ویروس BgSMV و

جدول ۷. درصد تشابه نوکلئوتیدی جدایه‌های مختلف BgSMV با یکدیگر بر اساس ناحیه CP-UTR

Table 7. Nucleotide identity between BgSMV isolates in CP- UTR region

Isolates	Jiroft	Ramhormoz	Behbahan	Shushtar	Andimeshk	Borazjan	Bushehr	Darab
Jiroft								
Ramhormoz	99.3							
Behbahan	98.8	98.6						
Shushtar	99.1	98.9	99.8					
Andimeshk	98.1	98.2	98.2	98.3				
Borazjan	97.4	96.8	97.3	97.4	96.7			
Bushehr	97.8	98.3	97.8	97.9	97.7	97.8		
Darab	93	93.1	93.4	93.5	93.1	92.4	92.5	

در صورتی که درون جدایه‌های MDMV این نسبت ۰/۳۶۵۳ محاسبه گردید (جدول ۸).

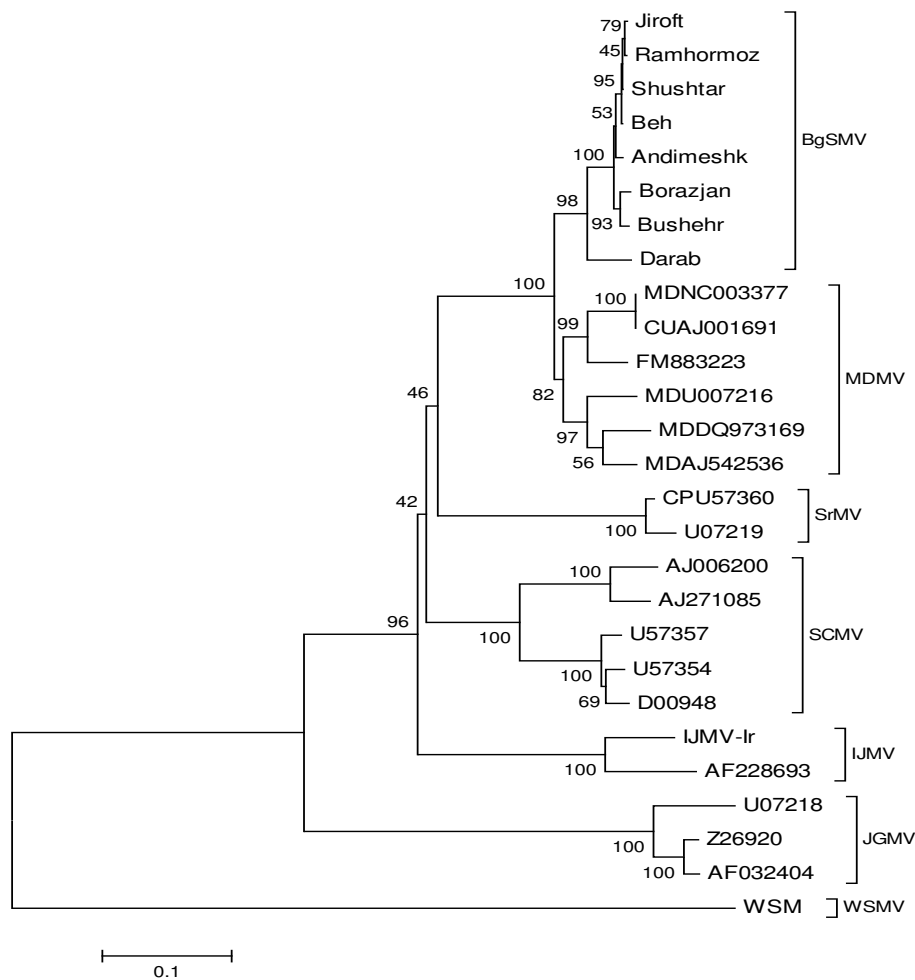
نشده است). هیچ نوع نو ترکیبی مشخصی در بررسی ناحیه CP-UTR جدایه‌های این ویروس با پوتی ویروس‌های دیگر غلات تشخیص داده نشد.

بحث

با بررسی مترادف‌های به دست آمده ناحیه CP-UTR جدایه‌های مختلف BgSMV مشخص شد که پروتئین پوششی BgSMV دارای ۳۲۲ آمینو اسید است که با آمینو اسید آلانین آغاز می‌شود و کدون انتهایی آن در جدایه‌های اندیمشک و بوشهر TAA و در سایر جدایه‌ها، TGA می‌باشد. در همدیف‌سازی چندگانه این ویروس با سایر اعضای جنس پوتی ویروس، مشخص شد که این ویروس نیز همانند سایر اعضا دارای ناحیه مرکزی حفاظت شده در ژن CP است، در صورتی که انتهای آمینی و کربوکسیلی این ناحیه متغیر می‌باشد. حفاظت شدگی بالا در ناحیه مرکزی (Core region) ژن پروتئین پوششی مبین اهمیت این ناحیه در ساختار و هم آیش مولکول‌های CP است (Shukla and Ward 1989)، در حالی که تنوع در ناحیه N-terminal نشان‌دهنده نقش این ناحیه در فعالیت‌های اختصاصی ویروس و نیز برهمکنش‌های ویروس، ناقل و میزبان است (Reichmann *et al.* 1992). از بین پوتی

بررسی انتخاب طبیعی درون گروهی و بین گونه‌های مختلف پوتی ویروس‌های غلات

بر اساس آزمون‌های Tajima's test و Z-test در سطح ۰.۵٪ تمام dN های محاسبه شده بین گروه‌ها کمتر از dS بود (با توجه به فرضیه صفر که $dN=dS$ باشد) بنابراین انتخاب (selection) بین گروه‌ها حالت خنثی نداشته است. بنابراین میزان جانشینی مترادف و غیر مترادف برای گروه‌های مختلف محاسبه گردید. آزمون‌های میزان جانشینی غیر مترادف (dN) در حالت‌های مختلف بین جدایه‌های یک گونه و گونه‌های مختلف، نشان می‌دهد که جانشینی آمینو اسیدی در بین جدایه‌های BgSMV نسبت به سایر گونه‌ها بسیار پایین است (۰/۰۸۷۹). در صورتی که درون جدایه‌های MDMV ۰/۱۶۲۸ و SCMV ۰/۲۰۹۴ محاسبه گردید. همین‌طور جانشینی‌های مترادف نیز همین روند را داشت. نسبت dN/dS یا ω نیز در بین جدایه‌های BgSMV کمترین مقدار را به خود اختصاص داده است.

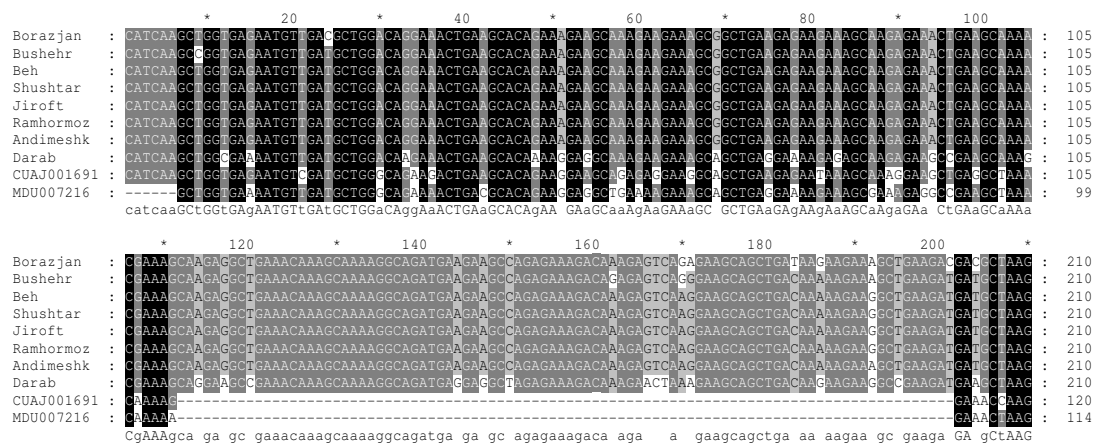


شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی که رابطه BgSMV را با پوتی ویروس‌های غلات نشان می‌دهد. این فیلوگرام بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR با روش Neighbour-joining و با استفاده از نرم افزار MEGA5 ترسیم شده است. اعداد روی شاخه‌ها نشان دهنده درصد bootstrapping هر کدام از آنهاست که گروه‌بندی را تأیید می‌کند. در این آنالیز از ویروس موزائیک رگه ای گندم به عنوان out group استفاده شده است. در سمت راست، گونه‌های ویروس مربوط به هر گروه از ترادف‌ها نشان داده شده است.

Fig. 2. Phylogenetic tree illustrating the relationships of BgSMV with other cereal potyviruses. The phylogram was generated by using the neighbour- joining method by MEGA5 from multiple alignment of CP- UTR sequences. The number of each branch indicates the percentage of bootstraps, which support the grouping at that made. WSMV was used as an outgroup in this phylogram. The species acronyms present at the right of phylogram.

در تمام جدایه‌های آنالیز شده این قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی موجود و در موقعیت مشابهی قرار دارد. نتایج این مطالعه هم‌چنین نشانگر حفاظت شدگی بسیار زیاد (نزدیک به ۱۰۰ درصد) در ترادف ناحیه ۹۰ نوکلئوتیدی در میان هشت جدایه مورد بررسی بود. در مورد نقش این ۹۰ نوکلئوتید و منشأ آن اطلاعاتی در دست نیست. ولی از

ویروس‌های غلات، BgSMV بیشترین تشابه نوکلئوتیدی را با MDMV دارد (Zare *et al.* 2005). علی‌رغم این تشابه بالا، در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۹۸-۱۰۸ ژن CP، BgSMV یک ترادف ۹۰ نوکلئوتیدی معادل ۳۰ آمینواسید بیشتر از MDMV دارد (Zare *et al.* 2005). در این تحقیق علاوه بر تأیید مطالعات قبلی، مشخص شد که



شکل ۳. مقایسه چند ردیفی ترادف ناحیه ۵ پروتئین پوششی جدایه‌های BgSMV با دوجدایه MDMV موجود در بانک ژن. محل حذف ۹۰ نوکلئوتیدی در ترادف‌های MDMV در موقعیت ۱۱۲ تا ۲۰۱ مشاهده می‌شود.

Fig. 3. Multiple alignment of 5'-region at coat protein gene of BgSMV and MDMV isolates. The deleted 90nt region has been showed at position 112 to 201 corresponding to BgSMV isolates.

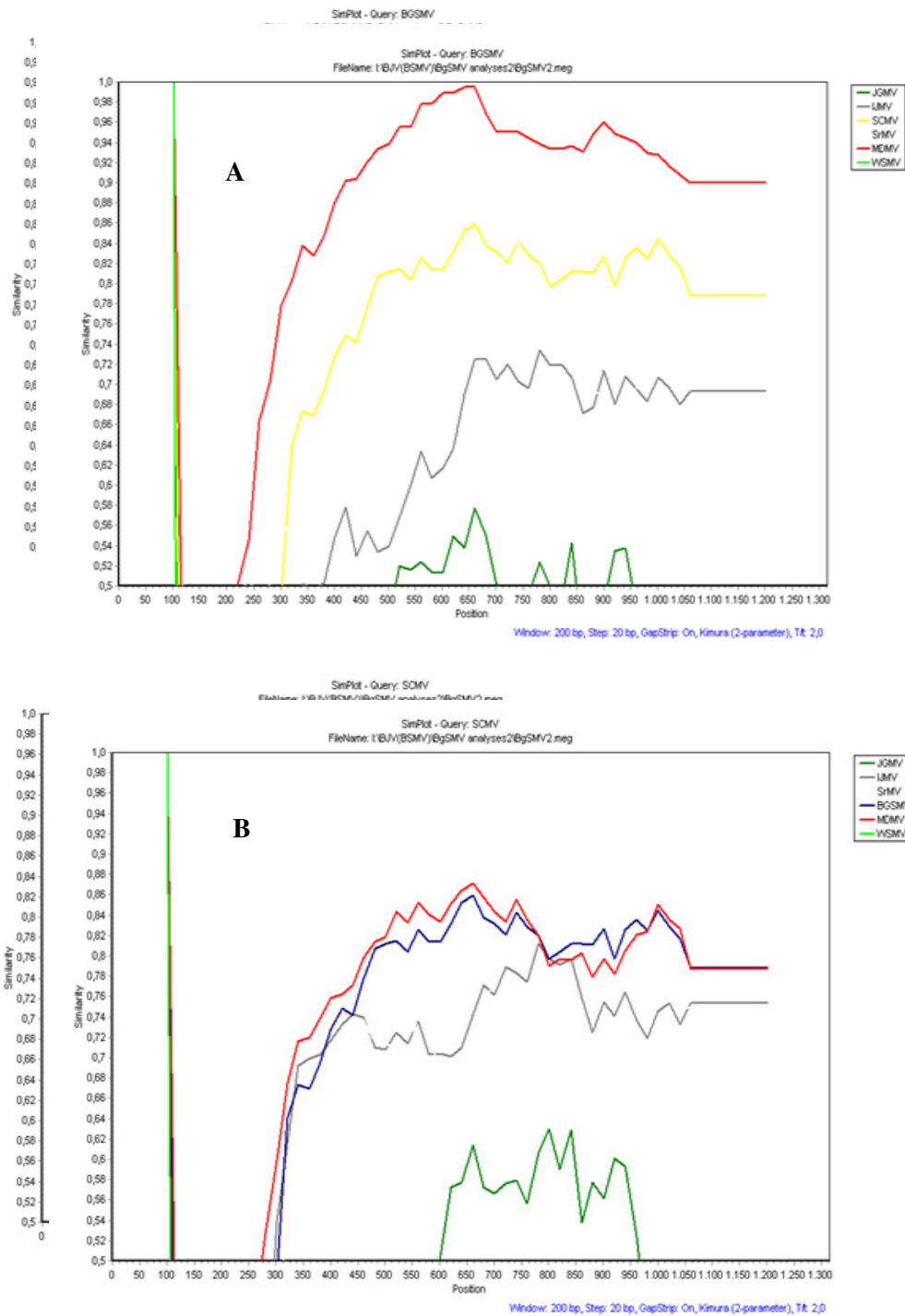
۶۲/۹۵ درصد شباهت اضافی قرابت را نشان می‌دهد که تأییدی بر مطالعات قبلی بود که براساس قسمتی از ژن پروتئین پوششی انجام شده بود (Masumi and Izadpanah 2002).

با مقایسه درصد شباهت ژنتیکی (Genetic similarity) بین جدایه‌های مختلف BgSMV مشخص شد که علی‌رغم وجود انشعابات در درخت فیلوژنتیکی بین جدایه‌های BgSMV، میزان تنوع ژنتیکی (Genetic diversity) بین جدایه‌ها بسیار پایین است، به طوری که میانگین تشابه بین جدایه‌ها ۹۸/۱ درصد و کمترین میزان شباهت مربوط به جدایه‌های اندیمشک و برازجان و بیشترین شباهت مربوط به جدایه‌های بهبهان و شوشتر بود. علت این تنوع که شاید بتوان به رابطه تکاملی نزدیک ویروس- میزبان نسبت داد. به نظر می‌رسد که به دلیل تکثیر غیر جنسی مرغ (ریزوم) و انتشار ویروس با اندام‌های غیرجنسی گیاه، نوعی سازگاری تکاملی بین ویروس و مرغ در طول زمان به وجود آمده و در نتیجه تنوع بسیار کمی در جدایه‌ها

انجایی که این قطعه در ناحیه پایانی آمینی (N-terminal) قرار دارد و این ناحیه در سطح پیکره ویروس قرار گرفته و بنظر می‌رسد بیشتر در صفات بیولوژیکی مانند انتقال با شته و بر همکنش میزبان- ویروس نقش داشته باشد، بنابراین شاید بتوان برخی تفاوت‌های بیولوژیکی بین MDMV و BgSMV مانند انتقال و دامنه میزبانی را به این تفاوت نوکلئوتیدی نسبت داد (Revers et al. 1999).

در آنالیز فیلوژنتیک بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR، پوتی ویروس‌های غلات در ۶ گروه شامل BgSMV، MDMV، SrMV، SCMV، JJMV، JgMV قرار گرفتند. نکته قابل توجه در این تقسیم‌بندی قرار گرفتن دو ویروس BgSMV و MDMV در دو شاخه جداگانه می‌باشد.

بر پایه مقایسه چند ردیفی در سطح نوکلئوتیدی BgSMV با سایر پوتی ویروس‌های غلات مشخص شد که BgSMV پس از MDMV با ۸۷/۸۵ درصد شباهت با SrMV، SCMV و JJMV به ترتیب با ۷۰/۶۵، ۶۴/۳۵ و



شکل ۴. طرح مشابهت در ناحیه CP-UTR BgSMV (A) و SCMV (B) نسبت به سایر پوتی ویروس‌های غلات

Fig. 4. Similarity plot in CP-UTR region of BgSMV (A) and SCMV (B) against other cereal potyviruses.

جدول ۸. تنوع ژنتیکی و نسبت جانشینی آمینواسیدی در گونه‌های مختلف و بین گونه‌های پوتی ویروس های غلات

Table 8. Genetic diversity and amino acid substitution ratios in different species and inter-species of cereal potyvirus

		dN ^b	dS ^c	$\omega = dN/dS$	Genetic diversity(π)
BgSMV ^a		0.0879	0.3509	0.2505	0.026
BgSMV	MDMV	0.3061	0.7870	0.3889	0.120
BgSMV	SrMV	0.3669	0.6188	0.5929	0.326
BgSMV	SCMV	0.5707	0.9242	0.6175	0.313
BgSMV	IJMV	0.4635	0.7096	0.6532	0.370
BgSMV	JGMV	0.6039	0.8226	0.7341	0.559
MDMV		0.1628	0.4456	0.3653	0.092
MDMV	SrMV	0.4702	0.7651	0.6146	0.326
MDMV	SCMV	0.6169	0.9717	0.6348	0.330
MDMV	IJMV	0.5095	0.8863	0.5748	0.376
MDMV	JGMV	0.7099	0.9678	0.7335	0.593
SrMV					0.030
SrMV	SCMV	0.5213	0.6739	0.7735	0.346
SrMV	IJMV	0.4369	0.4984	0.8766	0.410
SrMV	JGMV	0.5334	0.5935	0.8987	0.569
SCMV		0.2094	0.4099	0.5108	0.127
SCMV	IJMV	0.5214	0.8179	0.6375	0.372
SCMV	JGMV	0.6960	0.8889	0.7830	0.578
IJMV					0.124
IJMV	JGMV	0.6170	0.6991	0.8827	0.572
JGMV		0.0852	0.1531	0.5565	0.073
All species		1.5921	2.3788	0.6693	0.363

a. جانشینی آمینواسیدی و تنوع ژنتیکی برای جدایه‌های هر گونه بطور جداگانه و بین گونه‌ها (دو به دو) محاسبه گردید

b. جانشینی نا مترادف (non-synonymous)

c. جانشینی مترادف (synonymous)

a. Amino acid substitution and genetic diversity of isolates of each species separately and between species was calculated

بسیار پایین در بین جدایه‌هاست که این می‌تواند ناشی از آثار محیطی باشد که در تمام این مناطق گرمسیر وجود دارد.

مقایسه روند تغییرات و تشابه ترادف نوکلئوتیدی CP-UTR در BgSMV با سایر پوتی ویروس‌ها نشان داد که این ویروس به ترتیب با MDMV، SCMV و IJMV بیشترین شباهت را دارد. این تشابه در ناحیه ۵' ژن CP کمترین مقدار است و از حدود موقعیت نوکلئوتیدی ۲۲۰

ایجاد شده است. در مواردی می‌توان پائین بودن تنوع را به محدودیت در دامنه میزبانی و فشار کارکردی (Functional constraint) که در رابطه بین میزبان و ویروس (Host-virus interaction)، از طرف میزبان به ویروس وارد می‌شود و اجازه تنوع به ویروس نمی‌دهد، نسبت داد (Gorbalena 1992; Garcia-Arenal et al. 2001). دومین نکته‌ای که می‌توان اشاره کرد به رغم پراکندگی جغرافیایی وسیع در استان‌های جنوب کشور، وجود تنوع

غلات مقایسه شدند، نشان داد که این دو ویروس با یکدیگر بیشترین تشابه به‌خصوص در ناحیه مرکزی ژن CP را دارند و پس از آن به ترتیب با SCMV، SrMV و IIMV بیشترین شباهت را دارند. در مقایسه بین SCMV با ویروس‌های دیگر، MDMV و BgSMV روند تغییرات مشابهی داشتند که نشان‌دهنده تشابه بسیار زیاد این دو ویروس با یکدیگر بود.

تنوع ژنتیکی (Genetic diversity, π) در درون گونه‌های مختلف متفاوت است اگرچه با تعداد اندک جدایه‌ها در این آنالیز امکان بیان دقیق از تنوع ژنتیکی در درون گونه‌های این زیر گروه کمتر خواهد بود، اما در مقایسه با درخت فیلوژنتیکی، تفاوت‌های بین گونه‌ها همخوانی دارد. مقدار π در درون جدایه‌های BgSMV ۰/۰۲۶ و برای MDMV ۰/۰۹۲ و برای SCMV ۰/۱۲۷ محاسبه شد. تعداد جدایه‌های استفاده شده از این سه گونه تقریباً برابر است ولی BgSMV کمترین مقدار تنوع را دارد.

فاصله ژنتیکی SrMV که نزدیک‌ترین گونه به MDMV و BgSMV است با هر دو ویروس یکسان است (۰/۳۲۶) ولی ارزش ω بین BgSMV و SrMV با مقدار ۰/۵۹۲۹، کمتر از MDMV و SrMV با مقدار ۰/۶۱۴۶ است.

پایین بودن میانگین کل ω (۰/۶۶۹۳) نشانگر نقش احتمالی انتخاب منفی (Negative selection) در تنوع و تکامل این گونه‌ها می‌باشد و مقادیر ω با روابط فیلوژنتیک بین گونه‌ها همخوانی دارد. به عنوان مثال بین BgSMV و MDMV این مقدار ۰/۳۸۸۹ و بین BgSMV و SrMV ۰/۵۹۲۹ محاسبه گردیده است که این براساس آنالیز فیلوژنتیک طبیعی به نظر می‌رسد. طبیعی است که تنوع جغرافیایی و میزبانی می‌تواند رابطه مستقیم با تغییرات نوکلئوتیدی و جان‌شینی آمینو اسیدی داشته باشد. این

به تدریج افزایش پیدا می‌کند و در حدود ۶۸۰ به حداکثر مقدار خود می‌رسد و سپس به تدریج کم می‌شود (شکل ۴). ناحیه ابتدای ژن CP متغیرترین و ناحیه میانی (Core protein) حفاظت شده‌ترین ناحیه CP است.

عدم وقوع نوترکیبی در بین BgSMV و سایر پوتی ویروس‌های غلات نشان‌دهنده تکامل مستقل این ویروس در بین پوتی ویروس‌ها و جدایی جغرافیایی (Geographical isolation) بین آنهاست. بنابراین تشابه بین BgSMV و سایر پوتی ویروس‌ها نمی‌تواند به دلیل وقوع نوترکیبی باشد و نیز نوترکیبی نمیتواند در تکامل این ویروس و تمایز جدایه‌های آن نقش داشته باشد. بنابراین قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی که در تمام جدایه‌ها با حفاظت شدگی بالا در شرایط یکسان وجود دارد و همچنین پراکنش این ویروس در مناطق جنوبی ایران با وجود موانع طبیعی زیاد، نشان‌دهنده قدمت طولانی این ویروس بومی در ایران است.

با مقایسه ترادف نوکلئوتیدی SCMV با ویروس‌های دیگر مشخص شد که روند تغییرات در تمام طول ناحیه CP-UTR بین BgSMV و MDMV یکسان است و این دو ویروس بیشترین شباهت را به SCMV دارند. روند تغییرات در طول این ناحیه مشابه روند قبلی است که ناحیه 5' متغیرترین و ناحیه میانی، حفاظت شده‌ترین قسمت ژن CP می‌باشد. همچنین در آنالیز تشابه نوکلئوتیدی (Similarity plot) با برنامه‌های SimPlot، Bootscan و MaxKai هیچ‌گونه نوترکیبی بین BgSMV و سایر پوتی ویروس‌های غلات به ویژه MDMV مشاهده نگردید.

نتایج به‌دست آمده از آنالیز با نرم‌افزار SimPlot زمانی که BgSMV و MDMV هر کدام به طور جداگانه به عنوان مبنا قرار داده شدند و با سایر پوتی ویروس‌های

به هم به کار برده‌اند، مطابقت داد. از طرف دیگر با توجه به خصوصیات بیولوژیک متفاوت مانند عدم توانایی انتقال به قیاق و وجود ۹۰ نوکلئوتید اضافه (۳۰ آمینواسید) در ناحیه آمینی ژن CP و عدم توانایی انتقال با شته *R. maydis* (Zare et al. 2005) می‌توان آن را به عنوان گونه‌ای مجزا و نزدیک به MDMV در جنس *Potyvirus* در نظر گرفت.

سپاسگزاری

بدین وسیله نگارندگان از حمایت مالی و سایر مساعدت‌های مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی و قطب علمی ویروس‌شناسی در انجام این تحقیق صمیمانه قدردانی می‌نماید.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (21-23) متن انگلیسی مراجعه شود.

تغییرات در روند تکاملی می‌تواند منجر به گونه‌زایی شود. با توجه به این‌که تنوع میزبانی طبیعی و جغرافیایی MDMV بیشتر از BgSMV است بدیهی است که تنوع جانسینی نوکلئوتیدی و تنوع ژنتیکی نیز بیشتر باشد. به همین جهت پایداری BgSMV نیز قابل توجه است.

طبق نظریه شوکلا و وارد (Shukla and Ward 1988) و فرنکل و همکاران (Frenkel et al. 1989) در پوتی ویروس‌های غلات، سویه‌هایی با شباهت بیش از ۹۰٪ به عنوان یک ویروس محسوب می‌شوند. این در حالی است که بر اساس مطالعات آدامز و همکاران (Adams et al. 2004) میزان تشابه ۷۶-۷۷ درصد در سطح نوکلئوتیدی در ژن CP مرز بهینه گونه‌ها و ۹۹-۹۰ درصد تشابه به عنوان مرز سویه‌ها پیشنهاد شده است. نتایج به‌دست آمده در مورد تشابه نوکلئوتیدی بالای دو ویروس BgSMV و MDMV (۸۵-۹۰٪)، را می‌توان با نظریه مینک و همکاران (Mink et al. 1994) که دامنه تشابه ۷۵ تا ۸۹ درصد را برای تمایز ویروس‌های نزدیک