

ویژگی های مولکولی ژن‌های گلیکوپروتئین (G) و فسفوپروتئین (P) یک جدایه ایرانی و ویروس موزائیک زرد نواری جو (BYSMV) و بررسی کارایی انتقال جدایه‌های مختلف

Molecular characterization of glycoprotein and phosphoprotein genes of a BYSMV isolate from Iran and transmission efficiency of different isolates

رضا الماسی^۱، علیرضا افشاری‌فر^{۱*}، علی نیازی^۲ و کرامت اله ایزدپناه^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۱)

چکیده

ویروس موزائیک زرد نواری جو (*Barley yellow striate mosaic virus, BYSMV*) متعلق به جنس *Cytorhabdovirus* و خانواده *Rhabdoviridae* می‌باشد. این ویروس عامل بروز علائم موزائیک و نوارهای کلروتیک در غلات است و توسط زنجبرک *Laodelphax striatellus* با رابطه تکثیری منتقل می‌شود. در مطالعه حاضر ترادف نوکلئوتیدی ژن‌های گلیکوپروتئین و فسفوپروتئین جدایه زنجان این ویروس گزارش می‌شود. پس از خالص سازی نوکلئوکسپید ویروس، ژنوم با روش random RT-PCR تکثیر شد. آغازگرهای اختصاصی نیز با نرم افزار VECTOR-NTI version 9.0 جهت بدست آوردن ترادف نواحی مابین قطعات تکثیر شده با PCR، طراحی شدند. پس از هم ردیف سازی چندگانه ترادف ترجمه آمینواسیدی دو ژن جدایه زنجان با سایر رابدوویروس‌های گیاهی موجود در بانک ژن توسط نرم افزار CLUSTAL W، این جدایه BYSMV بیشترین میزان شباهت را با *Northern cereal mosaic virus (NCMV)* نشان داد. در درخت‌های فیلوژنتیکی ترسیم شده، رابدوویروس‌های گیاهی در دو گروه اصلی مرتبط با دو جنس *Cytorhabdovirus* و یا *Nucleorhabdovirus* قرار گرفتند که BYSMV و NCMV در یک زیر گروه جداگانه قرار گرفتند. بررسی قابلیت انتقال چهار جدایه BYSMV در این مطالعه نشان داد که جدایه‌های زنجان، نرده و سرو با کارایی بالاتری نسبت به جدایه مشهد توسط یک بیوتیپ از زنجره *L. striatellus* منتقل می‌شوند.

کلیدواژه: ژن گلیکوپروتئین، ژن فسفوپروتئین، BYSMV، رابطه فیلوژنتیکی، قابلیت انتقال، رابدوویروس

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

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲- دانشیار بخش بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

Molecular characterization of glycoprotein and phosphoprotein genes of a BYSMV isolate from Iran and transmission efficiency of different isolates

R. ALMASI¹, A. AFSHARIFAR^{1*}, A. NIAZI² and K. IZADPANAHI¹

(Received: 8.12.2014; Accepted: 31.1.2015)

Abstract

Barley yellow striate mosaic virus (BYSMV) belongs to the genus *Cytorhabdovirus* in the family *Rhabdoviridae*. It causes mosaic and chlorotic striation in gramineous plants and is transmitted by *Laodelphax striatellus* in a propagative manner. In the present study, nucleotide sequences of glycoprotein and phosphoprotein genes of BYSMV Zanzan isolate are reported. Following the purification of viral nucleocapsid, the nucleotide sequence of G and P genes was determined using random-PCR method (rPCR) followed by PCR with specific primers. Putative amino acid sequences of the two proteins were aligned with other members of *Rhabdoviridae* using CLUSTAL W software and the phylogenetic trees were depicted. BYSMV G and P proteins showed the highest similarity to the *Northern cereal mosaic virus* (NCMV). In phylogenetic analysis, the viruses were grouped into two main clusters reflecting the *Cytorhabdovirus* and *Nucleorhabdovirus* genera. These results support our previous phylogenetic analysis based on polymerase gene. Analysis of transmission efficiency showed that Zanzan, Naghadeh and Sero isolates were transmitted with a higher efficiency than Mashhad isolate by the same biotype of *L. striatellus*.

Keywords: Glycoprotein, Phosphoprotein, BYSMV, Phylogenetic relationship, Rhabdovirus

* Corresponding author's E-mail: afshari@shirazu.ac.ir

1. PhD student and Assoc. Prof. and Prof. of Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Assoc. Prof. of Biotechnology department, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

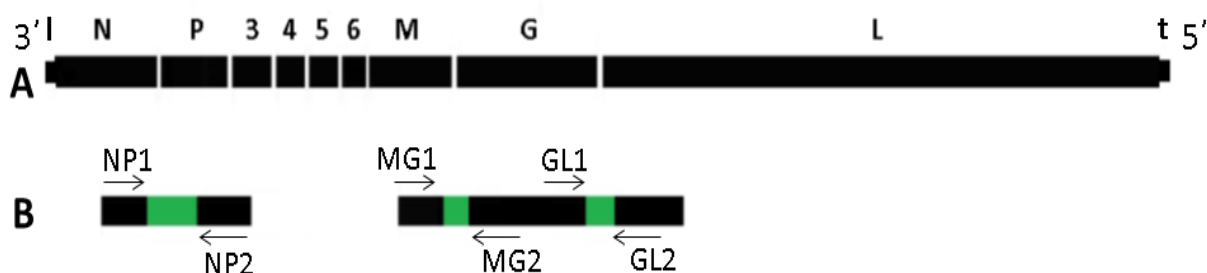
مقدمه

موجود در منطقه، به عنوان میزبان‌های طبیعی این ویروس گزارش گردیدند (Izadpanah et al. 1991).

بررسی‌های الکترون میکروسکوپی نشان می‌دهد که اغلب رابدوویروس‌های گیاهی براساس محل تشکیل اندامک‌های همراه در سلول و محل جوانه‌زنی آن‌ها از غشاء داخلی هسته یا از غشاهای سیتوپلاسمی، قابل طبقه‌بندی هستند. بدین ترتیب رابدوویروس‌های گیاهی براساس دو محل مختلف همانندسازی در دو جنس *Cytorhabdovirus* و *Nucleorhabdovirus* طبقه‌بندی می‌شوند (Tordo et al. 2005).

ژنوم رابدوویروسها به طور کلی دارای پنج ژن است. در دو طرف ژنوم ترادف‌های leader و trailer قرار دارند (3'-leader-N, P, M, G, L-trailer-5'). ژنوم دست کم پنج پروتئین ساختمانی را کد می‌کند: نوکلئوکپسید پروتئین (N)، فسفوپروتئین (P)، ماتریکس پروتئین (M)، گلیکوپروتئین (G) و پلیمراز (L) (Tordo et al. 2005) (شکل ۱). تمام رابدوویروس‌های گیاهی که تاکنون تعیین ترادف شده‌اند، دارای یک تا چهار چارچوب خوانش اضافی هستند که در وضعیت X (بین ژن‌های M و P) قرار گرفته‌اند. علاوه بر این، *Strawberry crinkle virus* (SCV) و *Rice yellow stunt virus* (RYSV) و برخی از

ویروس موزائیک زرد نواری جو (*Barley yellow striate mosaic virus*, BYSMV) عامل موزائیک و تشکیل نوآرهای کلروتیک در غلات بوده که توسط زنجکر *Laodelphax striatellus* به صورت پایا و تکثیری انتقال می‌یابد (Conti & Plumb 1977, Conti 1969, 1972 & 1980). علائم این ویروس شامل کوتولگی، موزائیک و نوآرهای سبزرده روی برگ، باریک شدن پهنک برگ و زردی انتهایی است که بسته به گونه‌ها و واریته‌های میزبان متغیر است (Conti 1985). دامنه میزبانی BYSMV به تیره *Poaceae* محدود می‌شود. ویروس موزائیک زرد نواری جو متعلق به تیره *Rhabdoviridae* از راسته *Mononegavirales* است (Dietzgen et al. 2011). این ویروس اولین بار در سال ۱۹۶۹ در حین مطالعه بر روی اپیدمیولوژی ویروس کوتولگی زبر ذرت *Maize rough dwarf virus* (MRDV) در بدن زنجکر *L. striatellus* ردیابی شد (Conti 1969). سپس این ویروس از نقاط دیگری شامل اروپا، آفریقا، استرالیا، سوریه و ایران گزارش شد (Makkouk 2004, Conti 1969, Izadpanah et al. 1991). BYSMV به عنوان ویروس خسارت‌زا و مهم از مزارع گندم استان فارس معرفی و گونه‌های مختلف ارزن



شکل ۱- سازمان ژنوم NCMV (A). موقعیت ترادف‌های بدست آمده از همسانه‌های تصادفی (به رنگ سیاه) و تعیین ترادف فواصل همسانه‌های تصادفی توسط آغازگرهای اختصاصی (به رنگ سبز) (B)

Fig. 1. Genome organization of NCMV (A). Position of the random clones (black bands) and filling the gaps between them using specific primers (green bands).

استان‌های زنجان، آذربایجان غربی (جدایه‌های نقده و سرو) و خراسان (جدایه مشهد) که مشکوک به آلودگی با BYSMV بودند، انجام شد. برای تشخیص گیاهان آلوده به ویروس از آزمون الیزای غیرمستقیم با آنتی سرم چندهمسانه ای BYSMV (تهیه شده در مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی دانشگاه شیراز) و به روش Converse و Martin (۱۹۹۰) استفاده شد. در این آزمون بافت گیاه در ۱۰ حجم (وزن به حجم) بافر سیترات سدیم ۰/۱ مولار، pH ۶/۵، عصاره گیری و با سانتریفوژ کردن در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه زلال سازی و در چاهک‌های پلیت الیزا ریخته شد. ترکیب آنزیم و Goat anti rabbit antibody در بافر نمونه حاوی ۳ درصد شیر خشک رقیق شد. بقیه مراحل طبق روش متداول انجام گرفت.

تکثیر جدایه‌های ویروس در گلخانه

برای تکثیر جدایه‌های این ویروس در شرایط گلخانه، حدود ۱۵ تا ۲۰ عدد از پوره‌های سنین مختلف زنجبرک *L. striatellus* به مدت یک هفته بر روی بوته‌های آلوده جمع آوری شده قرار داده شدند. سپس برای طی دوره نهفتگی یا کمون که ۱۴ تا ۲۰ روز است، زنجبرک‌ها بر روی بوته‌های سالم جو رقم ریحان زیر پوشش‌های پلاستیکی منتقل شد و در نهایت زنجبرک‌های آلوده به مدت یک شبانه روز روی گیاهچه‌های جوان قرار داده شدند. در نهایت پس از چندین سری انتقال، تعداد زیادی از گیاهچه‌های جو با جدایه‌های ویروس مایه زنی شدند.

خالص سازی نوکلئوکسپید جدایه زنجان

خالص سازی نوکلئوکسپید با تغییراتی در روش

رابدوویروس‌های جانوری، ژن‌هایی در وضعیت Y (بین G و L) دارند. به نظر می‌رسد که تعداد و محل این چارچوب‌های اضافی ارتباطی با این طبقه‌بندی ندارد (Jackson et al. 2005).

در حال حاضر هیچ‌گونه اطلاعات منتشر شده‌ای از ترادف ژنوم BYSMV موجود نیست. در تحقیق پیشین (Almasi et al. 2010) ضمن ارائه ترادف ژن پلیمراز این ویروس به عنوان بزرگترین چارچوب ژنی آن، رابطه فیلوژنتیکی آن با سایر رابدوویروس‌ها، شامل *Maize Taro vein chlorosis virus mosaic virus (MMV)*، *Sonchus. Rice yellow stunt virus (RYSV)*، *(TaVVCV)*، *Barley yellow striate, yellow net virus (SYNV)*، *Northern cereal mosaic mosaic virus (BYSMV)*، *Lettuce necrotic yellows virus, virus (NCMV)* و *(LNYV)* *Vesicular stomatitis Indiana virus* (VSIV) (به عنوان خارج از گروه) بررسی شد و BYSMV در جنس *Cytorhabdovirus* قرار گرفت. (Almasi et al. 2010)

در تحقیق حاضر ترادف دو ژن گلیکوپروتئین و فسفوپروتئین جدایه زنجان این ویروس تعیین شده تا با مقایسه وضعیت تاکسونومی بر اساس دو ژن گلیکوپروتئین و فسفوپروتئین با ژن پلیمراز به یک جمع بندی در طبقه بندی این ویروس دست یابیم. همچنین کارایی انتقال چهار جدایه مشهد، نقده، سرو و زنجان این ویروس در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه برداری و تشخیص ویروس

نمونه برداری در سال ۱۳۸۵ و از مزارع گندم و جو

و سپس برای تولید دی ان ای دولا از آنزیم Klenow به صورت زیر استفاده شد:

ترکیبی شامل بیست نانوگرم ویروس خالص به همراه ۲۰ pmol آغازگر K1 و ۲۰ nmol مخلوط چهار نوع dNTP به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد حرارت داده و سپس به سرعت بر روی یخ گذاشته شد و برای ساخت رشته اول به آن ۲۰U آنزیم Expand reverse transcriptase به همراه ۵ میکرولیتر بافر 5× Expand reverse transcriptase اضافه و در ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از ۶۰ دقیقه مخلوط به مدت ۱ دقیقه در ۹۹ درجه سانتی گراد جوشانده شد و بلافاصله بر روی یخ منتقل گردید.

برای ساخت رشته مکمل cDNA مواد زیر به آن اضافه شد:

سه میکرولیتر از 10 × Klenow buffer (Fermentas) و ۲۰ U آنزیم Klenow با آب دی یونیزه تا حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس به منظور حذف مواد و آغازگر K1 اضافی از کیت High Pure PCR Purification (Roche) استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

تکثیر cDNA دو لا با استفاده از آغازگر تصادفی به روش زیر انجام شد:

پنج میکرولیتر از ds-cDNA، ۲۰ pmol آغازگر K₂، (Froussard 1992) (5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTC-3')، ۵ میکرولیتر از بافر PCR reaction 10 × (سیناژن) به اضافه ۲/۵ U از آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن) و ۲۰ nmol از dNTPs مخلوط کرده و به حجم نهایی ۵۰

Shirako و Ehara (۱۹۸۴) انجام شد که در آن ۵۰ گرم بافت تازه جو آلوده شده به جدایه زنجان در سه حجم بافر ۰/۱ مولار سیترات سدیم، pH ۶/۵، عصاره‌گیری شد. سپس عصاره از پارچه ململ عبور داده و مایع عبوری به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه با گردان 34-Sorval سانتریفوژ شد. روشین جمع‌آوری و ۲ درصد تریتون - ایکس ۱۰۰ به روشین اضافه گردید و روی همزن مغناطیسی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به هم زده شد. سپس محلول تیمار شده به مدت ۲ ساعت در ۲۸۰۰۰ دور در دقیقه با گردان ۳۰ سانتریفوژ Beckman روی ۶ میلی لیتر بالشک سوکروز ۲۰ درصد سانتریفوژ شد و رسوب حاصل در بافر ۰/۱ مولار فسفات پتاسیم، pH ۷/۲، حل و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سوسپانسیون روی ستون شیب چگالی سوکروز ۱۰ تا ۵۰ درصد قرار داده و به مدت ۲ ساعت با سرعت ۲۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس باند ویروسی حاصل جمع‌آوری و به نسبت حجمی ۱:۱ با بافر فسفات رقیق و با سرعت ۲۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو ساعت و ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار، pH ۷/۲، حل شد.

ساخت cDNA

برای ساخت cDNA از روش random-PCR (واکنش زنجیره ای پلیمرز با آغازگرهای تصادفی) (Froussard 1992) استفاده شد. از نوکلئوکسید جدایه زنجان به عنوان قالب به همراه آغازگر K1 (5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNNNNNN-3') که آغازگری ۲۶ نوکلئوتیدی است و در انتهای ۳' دارای random hexamer است، برای ساخت cDNA استفاده شد

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای تعیین ترادف فواصل موجود بین همسانه های تصادفی

Table 1. Specific primers which were used to sequence the gaps between random clones.

آغازگر	ترادف (5'→3')	جهت	دمای اتصال (Ta)
GL1	ATTCCCACAATTCTGGAGACATGAG	Forward	۶۱
GL2	TGATTAAGAGCGTAAAGAAAAGCCC	Reverse	
MG1	TGCTGCCAACAACATACCAT	Forward	۵۹
MG2	GGAAAGGGAAGCCCGTAATA	Reverse	
NP1	TAGTTGCGCACACTTTTGGGA	Forward	۵۹
NP2	GCGTGATCCTTGAGAAGAG	Reverse	

شد و پلاسمید آن با استفاده از High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و با روش هضم آنزیمی مجدداً مورد بررسی قرار گرفت. پلاسمید استخراج شده با استفاده از دستگاه concentrator، تغلیظ و به منظور تعیین ترادف به شرکت Macrogen کشور کره جنوبی ارسال گردید. ترادف‌های به دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه X Blast با ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه شدند و صحت آنها تایید گردید.

پر کردن فاصله‌ها (gaps) برای تولید ترادف کامل

چارچوب‌های خوانش

بمنظور دست یابی به ترادف نوکلئوتیدی موجود در فاصله‌های موجود بین ترادف‌هایی که قبلاً با استفاده از آغازگرهای تصادفی به دست آمده بود (شکل ۱)، از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده شد که بر اساس ترادف‌های به دست آمده و به وسیله نرم‌افزار (Invitrogen) VECTOR-NTI 9.0 طراحی شده بود.

آنالیز ترادف‌ها و ترسیم دندروگرام

آنالیز ترادف‌ها با استفاده از نرم افزارهای ClustalX2.0 (Nicholas et al.) GenDoc3.2، (Larkin et al. 2007)

میکرولیتزر رساننده شد. واکنش PCR در دستگاه Thermocycler 5330 شرکت اپندورف (آلمان) و یا مدل FTGENE2D شرکت Techne (کره جنوبی) انجام شد. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصد بررسی گردید. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. با دستگاه UV transilluminator باندهای نوکلئیک اسید مشاهده گردید و به وسیله دستگاه Gel documentation از ژل عکسبرداری شد.

همسانه سازی محصول PCR و تعیین ترادف نوکلئوتیدی

برای همسانه سازی محصول PCR از (Fermentas) Ins T/A Clone PCR Product cloning Kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پلاسمید نو ترکیب که در باکتری در محیط‌های مایع LB تکثیر شده بود به روش Holmes & Quigley (۱۹۸۱) استخراج گردید. ۱۰ میکرولیتزر از پلاسمید استخراج شده با آنزیم برشی EcoRI تیمار و اندازه قطعات حاصل با انجام الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصد تعیین شد. پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی قطعاتی با وزن بیش از ۴۰۰ bp به منظور تعیین ترادف انتخاب شدند. پس از تأیید صحت قطعه همسانه سازی شده، باکتری حاوی پلاسمید انتخاب و مجدداً کشت داده



شکل ۲- علائم موزائیک بر روی گندم آلوده به BYSMV که از مزارع آلوده نقده جمع آوری گردید.

Fig. 2. BYSM symptoms on wheat plants collected from Naghadeh.

زنجبرک در مرحله کلئوپتیل مایه زنی شد. پس از گذشت حدود دو هفته جهت اطمینان از آلودگی و انتقال ویروس، گیاهان توسط آزمون الیزای غیرمستقیم مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با رویه GLM در نرم افزار آماری SAS مورد مقایسه قرار گرفت.

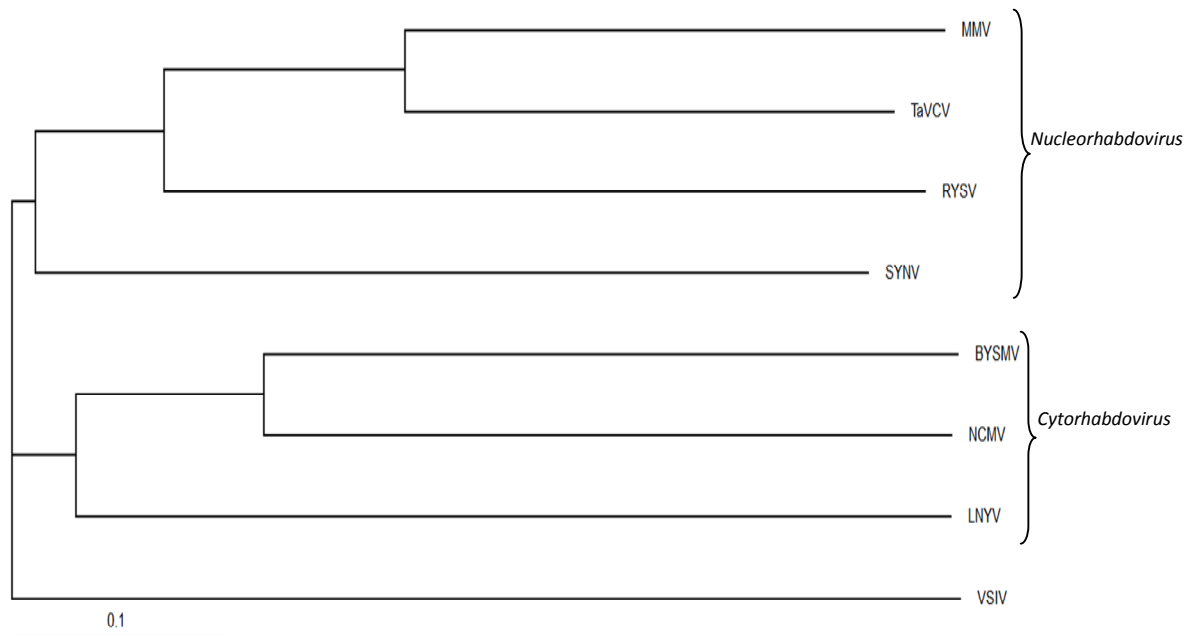
نتایج و بحث

در بازدیدهای به عمل آمده از مزارع گندم مناطق زنجان، سرو (آذربایجان غربی)، نقده (آذربایجان غربی) و مشهد بوته‌های گندم با علائم موزائیک (شکل ۲) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده به BYSMV با آزمون الیزای غیر مستقیم تایید شد. پس از گذشت حدود دو هفته از تغذیه انتقال توسط زنجبرک‌های ناقل، علائم موزائیک در گیاهچه‌های جو دیده شد.

(1997)، (Page 1996) Tree view 4.5، MegAlign (بسته نرم‌افزاری DNASTAR 8.0) (Burland 1999) و روش Neighbour-joining انجام شد.

بررسی کارایی انتقال چهار جدایه ویروس

کارایی انتقال جدایه‌ها در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تیمار (چهار جدایه زنجان، مشهد، سرو و نقده (از استان آذربایجان غربی) و ۵۰ گیاهچه جو برای هر جدایه (به عنوان تکرار) بررسی شد. پس از تکثیر جدایه‌های ویروس در گلخانه و اطمینان از آلودگی گیاهان مایه زنی شده با آزمون الیزای غیرمستقیم، زنجبرک‌های *L. striatellus* (جمع آوری شده از منطقه دشتک فارس) روی گیاهان جو آلوده قرار داده شدند. سپس هر جدایه توسط تک زنجبرک‌ها به روی پنجاه گلدان از گیاهچه‌های جو منتقل شد. به عبارت دیگر هر گیاهچه جو توسط یک



شکل ۳- فیلوگرام حاصل از مقایسه ترادف ترجمه آمینواسیدی گلیکوپروتئین جدایه زنجان BYSMV و شش رابدوویروس گیاهی دیگر. طول شاخه بر حسب مقیاس رسم گردیده و خط مقیاس بیانگر جایگزینی نوکلئوتیدی در هر سایت می باشد. ویروس جانوری VSIV به عنوان خارج از گروه در نظر گرفته شد. برای اسامی کامل ویروس ها به متن رجوع شود.

Fig. 3. Phylogenetic relationships of BYSMV and six other plant rhabdoviruses based on amino acid sequences of phosphoprotein. The scale bar indicates the average number of amino acid substitutions per site. VSIV was used as outgroup. Full names of the viruses are given in the text.

آمینواسیدی گلیکوپروتئین این جدایه با سایر رابدوویروس‌های گیاهی موجود در بانک ژن توسط نرم افزار CLUSTAL X هم ردیف سازی چندگانه شد و درخت فیلوژنتیکی ترسیم گردید (شکل ۳). ترادف ترجمه آمینواسیدی این جدایه BYSMV بیشترین میزان شباهت (۳۱/۶٪) را با NCMV نشان داد (شکل ۴). ترادف ترجمه آمینواسیدی گلیکوپروتئین جدایه زنجان BYSMV و سایر رابدوویروس‌های گیاهی برای مطالعات فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده، ویروس‌ها در دو گروه اصلی قرار گرفتند که نشان دهنده دو جنس *Nucleorhabdovirus* و *Cytorhabdovirus* است (شکل ۳) BYSMV و NCMV در یک زیر گروه جداگانه قرار گرفتند. این نتایج طبقه بندی قبلی را که

علیرغم اهمیت ویروس موزاییک زرد نواری جو، تاکنون تنها اطلاعاتی در مورد ترادف پلی مرز آن منتشر شده است و طبقه بندی آن در جنس *Cytorhabdovirus* بیشتر بر اساس محل جوانه زنی پیکره‌های ویروسی در سلول انجام شده است. در تحقیق پیشین ژن پلیمرز (FJ665628) این ویروس به طول ۶۲۸۰ باز تعیین ترادف و گزارش شد (Almasi et al.2010). در تحقیق حاضر، ترادف ژن‌های گلیکوپروتئین (دومین چارچوب بزرگ ژنی) و فسفوپروتئین جدایه زنجان این ویروس تعیین شد تا با استفاده از آن‌ها وضعیت فیلوژنی این ویروس در خانواده *Rhabdoviridae* بررسی شود.

ترادف نوکلئوتیدی ژن گلیکوپروتئین به اندازه ۱۲۶۶ باز (رس شماره KP163565) تعیین و ترادف ترجمه

		Percent Identity									
		1	2	3	4	5	6	7	8		
Divergence	1		12.1	4.5	31.6	11.2	7.1	7.4	7.1	1	BYSMV
	2	270.0		10.0	13.3	10.2	11.1	10.7	3.9	2	LNYV
	3	493.0	396.0		3.7	22.7	15.1	49.8	7.2	3	MMV
	4	143.4	273.0	357.0		12.4	13.5	9.5	9.5	4	NCMV
	5	545.0	418.0	192.1	426.0		18.5	29.4	5.7	5	RYSV
	6	482.0	410.0	265.0	396.0	232.0		17.2	9.2	6	SYNV
	7	456.0	414.0	78.0	349.0	150.2	246.0		6.8	7	TaVCV
	8	410.0	442.0	626.0	511.0	471.0	545.0	511.0		8	VSIV
		1	2	3	4	5	6	7	8		

شکل ۴- درصد تشابه (محور افقی) و درصد واگرایی (محور عمودی) مترادف ترجمه آمینواسیدی گلیکوپروتئین جدایه زنجان BYSMV با سایر رابدوویروس‌های گیاهی که به روش Clustal W با برنامه Megalign ترسیم شده است.

Fig.4. Identity/divergence matrix based on deduced amino acid sequences of glycoprotein from BYSMV and six other plant rhabdoviruses. Alignment was done using Clustal W method in Megalign software.

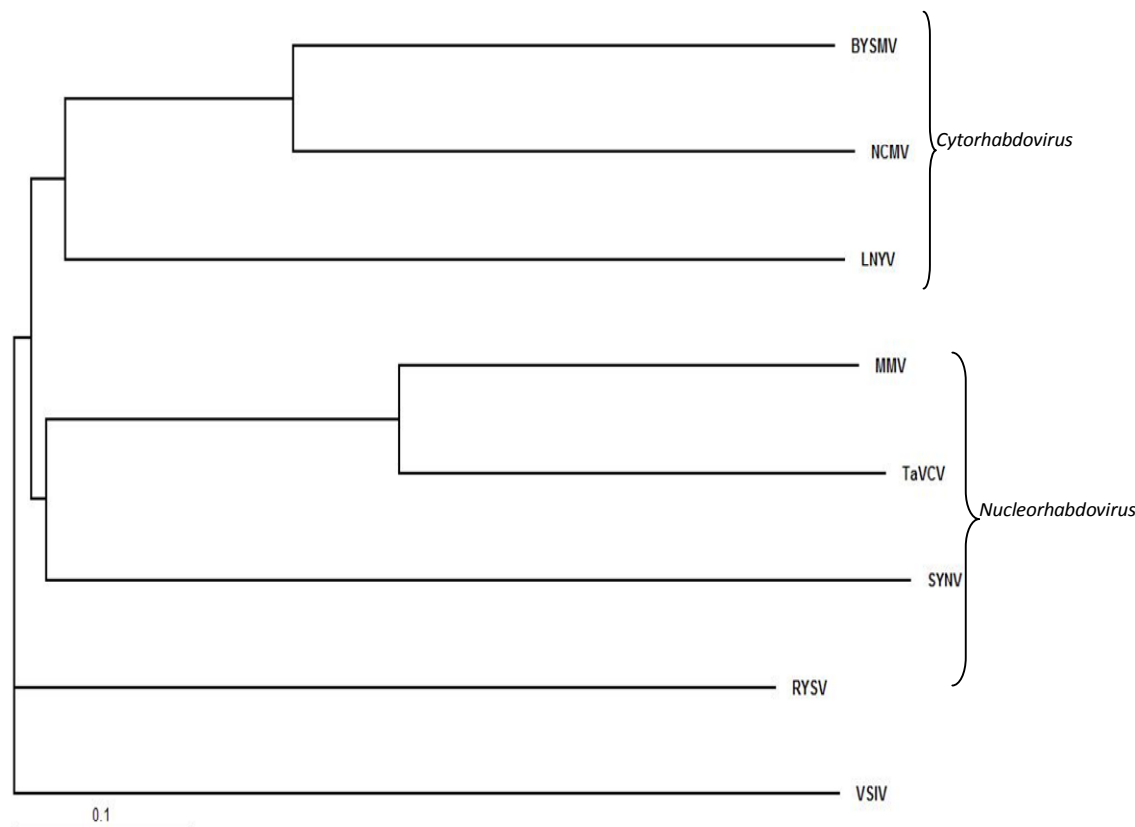
NCMV در یک زیر شاخه جداگانه قرار گرفتند و گونه LNYV بصورت جداگانه در زیر شاخه دیگری قرار گرفت. این نتایج نشان می‌دهد که گونه NCMV نزدیک ترین ویروس به BYSMV است.

از نظر خصوصیات بیولوژیکی نیز BYSMV و NCMV شباهت‌هایی دارند. به عنوان مثال می‌توان انتقال توسط زنجرک *L. striatellus* با رابطه پایا و تکثیری و محدود بودن میزبان‌ها به خانواده گرامینه را نام برد. البته در دامنه میزبانی برخی تفاوت‌ها دیده می‌شود. به عنوان مثال NCMV قادر به آلوده کردن گونه‌های *Bromus inermis*, *Poa pratensis*, *Oryza sativa*, *Dactylis glomerata* و *Zea mays* نمی‌باشد در حالی که BYSMV قادر است این گونه‌ها را آلوده نماید (Milne & Conti 1986). (Toriyama 1986). دکوراسیون نوکلئوکپسید با آنتی‌سرم‌های اختصاصی نشان داد که علی‌رغم وجود ارتباط سرولوژیکی بین دو ویروس BYSMV و NCMV، این دو، ویروس‌های مجزایی هستند (Milne et al. 1986). طول و عرض پیکره‌ها نیز در دو ویروس متفاوت است. BYSMV دارای ویریون‌هایی با ابعاد ۵۵ در ۳۳۰ نانومتر

براساس مترادف پروتئین پلیمرز این ویروس انجام گرفته بود تایید کرد (Almasi et al. 2010).

مترادف نوکلئوتیدی فسفوپروتئین BYSMV نیز به اندازه ۸۸۸ باز (KP163566) تعیین و مترادف ترجمه آمینواسیدی این پروتئین به طول ۲۹۶ آمینواسید به دست آمد. در هم ردیف سازی چندگانه مترادف ترجمه آمینواسیدی فسفوپروتئین این جدایه با سایر رابدوویروس‌های گیاهی، این جدایه بیشترین شباهت (۳۷/۱) را به NCMV نشان داد (شکل ۴). در درخت فیلوژنتیکی بر اساس مترادف ترجمه آمینواسیدی فسفوپروتئین نیز دو شاخه تشکیل شد که شامل دو جنس *Nucleorhabdovirus* و *Cytorhabdovirus* بود (شکل ۵). البته با این تفاوت که RYSV خارج از شاخه جنس *Nucleorhabdovirus* قرار گرفت.

در تمامی درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شده براساس پروتئین‌های پلی‌مرز (Almasi et al. 2010)، گلیکوپروتئین (شکل ۳) و فسفوپروتئین (شکل ۵) اعضای جنس *Cytorhabdovirus* همگی در یک شاخه جداگانه قرار گرفتند، بدین ترتیب که دو گونه BYSMV و



شکل ۵- فیلوگرام حاصل از مقایسه ترادف ترجمه آمینواسیدی فسفوپروتئین جدایه ایرانی BYSMV و شش رابدوویروس گیاهی دیگر. طول شاخه بر حسب مقیاس رسم گردیده و خط مقیاس بیانگر جایگزینی نوکلئوتیدی در هر سایت می باشد. ویروس جانوری VSIV به عنوان برون گروه در نظر گرفته شد. برای اسامی کامل ویروس ها به متن رجوع شود.

Fig. 5. Phylogenetic relationships of BYSMV and six other plant rhabdoviruses based on deduced amino acid sequences of phosphoprotein. The scale bar indicates the average number of amino acid substitutions per site. VSIV was used as outgroup. Full names of the viruses are given in the text.

اساس ترادف گلیکو پروتئین و پلیمراز تایید کننده طبقه بندی رابدوویروس‌ها بر اساس محل جوانه زنی ویریون‌ها در سلول میزبان می باشد. هر چند که در مورد طبقه بندی بر اساس فسفوپروتئین نیز تا حدودی مطابقت با محل جوانه زنی وجود دارد اما دو پروتئین پلیمراز و گلیکوپروتئین معیارهای مناسب تری برای طبقه بندی رابدوویروس‌ها هستند.

قابلیت انتقال جدایه‌های BYSMV با استفاده از طرح بلوک کامل تصادفی و نرم افزار SAS مورد مقایسه قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها و گروه بندی جدایه‌ها توسط

می باشد و NCMV پیکره‌هایی با اندازه ۶۸ در ۳۵۰ نانومتر دارد (Milne & Conti 1986, Toriyama 1986). علاوه بر شباهت‌ها و تفاوت‌های ذکر شده، محدوده پراکنندگی جغرافیایی دو ویروس هم متفاوت می باشد. پراکنش NCMV محدود به ژاپن، کره جنوبی و چین می باشد (Tanno *et al.* 2000)، در حالی که BYSMV پراکنش وسیع تری دارد و از نقاط مختلفی مثل اروپا، آفریقا، استرالیا، سوریه و ایران گزارش شده است (Conti 1969, Izadpanah *et al.* 1991, Makkouk *et al.* 2004). در نهایت می توان گفت طبقه بندی رابدوویروس‌ها بر

		Percent Identity									
		1	2	3	4	5	6	7	8		
Divergence	1		12.2	5.2	37.1	7.8	7.5	11.1	5.7	1	BYSMV
	2	284.0		5.9	9.8	10.7	1.0	5.9	5.7	2	LNyV
	3	605.0	649.0		7.4	9.3	3.7	46.1	4.2	3	MMV
	4	105.0	268.0	511.0		8.4	3.8	7.0	6.4	4	NCMV
	5	626.0	422.0	524.0	517.0		5.0	7.0	9.4	5	RYSV
	6	661.0	482.0	471.0	560.0	511.0		3.0	2.3	6	SYNV
	7	545.0	456.0	85.0	434.0	719.0	456.0		3.0	7	TaVcV
	8	347.0	368.0	471.0	399.0	223.0	393.0	553.0		8	VSIV
		1	2	3	4	5	6	7	8		

شکل ۶- جدول درصد تشابه (محور افقی) و درصد واگرایی (محور عمودی) ترادف ترجمه آمینواسیدی فسفوپروتئین جدایه زنجان BYSMV با سایر رابدوویروس های گیاهی که به روش Clustal W با برنامه Megalign ترسیم شده است.

Fig. 6. Identity/divergence matrix based on deduced amino acid sequences of phosphoprotein from BYSMV and six other plant rhabdoviruses. Alignment was done using Clustal W method in Megalign software.

پیکره‌های ویروسی بیرون زده است و در هم کنش ویرونها با گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌های اپی تلیوم روده ناقل نقش دارد. همولوژی پایینی بین گلیکوپروتئین‌های رابدوویروس‌ها دیده شده است و تفاوت در پروتئین G می‌تواند در میزان تشخیص‌های صورت گرفته بین گلیکوپروتئین و گیرنده‌های سطح سلول‌های روده ناقل موثر باشد و باعث تغییر در میزان گیرش ویروس توسط ناقل و تغییر در کارایی انتقال ویروس شود (Hogenhout et al. 2003).

آزمون دانکن، نشان داد که از نظر قابلیت انتقال، میان جدایه‌های زنجان، نقده و سرو، به ترتیب با میانگین‌های ۶۶، ۶۲ و ۶۰ درصد تفاوت معنی داری از لحاظ آماری وجود ندارد و هر سه در یک گروه قرار می‌گیرند. اما جدایه مشهد، با میانگین قابلیت انتقال ۴۴ درصد، تفاوت معنی داری با سایر جدایه‌ها در سطح ۹۵ درصد نشان داد (جدول ۲).

تفاوت در کارایی انتقال جدایه‌های مورد مطالعه می‌تواند ناشی از وجود تفاوت در گلیکوپروتئین ویروس باشد. گلیکوپروتئین تنها پروتئینی است که از سطح

جدول ۲- تعداد بوته‌های آلوده شده در مایه‌زنی با جدایه‌های ویروس، مقایسه میانگین‌ها و گروه بندی جدایه‌ها با آزمون دانکن. ($P < 0.05$)

Table 2. Number of infected plants in transmission efficiency experiment by planthoppers. Comparison of means by Duncan test ($P < 0.05$).

جدایه‌ها	تعداد بوته آلوده در ۵۰ بوته	میانگین تعداد بوته آلوده (%)	گروه بندی جدایه‌ها با آزمون دانکن*
مشهد	۲۲	۴۴	b
نقده	۳۱	۶۲	a
زنجان	۳۳	۶۶	a
سرو	۳۰	۶۰	a

*اعدادی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند.

- Almasi, R., Afsharifar, A.R., Niazi, A., Pakdel, A., Izadpanah, K. 2010. Analysis of complete nucleotide sequence of polymerase gene of Barley yellow striate mosaic virus-an Iranian isolate. *Journal of Phytopathology* 158: 351-356.
- Burland, T.G. 1999. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology* 132: 71-91.
- Conti, M. 1969. Investigation on a bullet-shaped virus of cereals isolated in Italy from planthoppers. *Phytopathologische Zeitschrift* 66:275-279.
- Conti, M. 1972. Barely yellow striate mosaic virus isolated from plants in the field. *Phytopathologische Zeitschrift* 73:39-45.
- Conti, M. 1980. Vector relationships and other characteristics of Barely yellow striate mosaic virus (BYSMV). *Annals of Applied Biology* 95:830.
- Conti, M. 1985. Transmission of plant viruses by leafhoppers and planthoppers. Pp. 289-307. In: L.R. Nault and J.G. Rodriguez, (eds.). *The Leafhoppers and Planthoppers*. Wiley, New York.
- Conti, M. and Plumb, R. T. 1977. Barley yellow striate mosaic virus in the salivary glands of its planthopper vector *Laodelphax striatellus*. *Journal of General Virology* 34: 104-114.
- Convers, R. H. and Martin, R. R. 1990. ELISA methods for plant viruses. pp.179-196. In: R. O. Hampton, E. M. Ball, and S. H. De Boer, (eds.). *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, a Laboratory Manual*. APS Press.
- Dietzgen, R. G., Calisher, C. H., Kurath, G., Kuzmin, I. V., Rodriguez, L. L., Stone, D. M., Tesh, R. B., Tordo, N., Walker, P. J. 2011. Family Rhabdoviridae. pp. 686-714. In: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz, (eds.). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Oxford: Elsevier Academic Press.
- Froussard, P. 1992. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. *Nucleic Acids Research* 20: 2900.
- Hogenhout, S. A., Redinbaugh, M. G. and Ammar, E. 2003. Plant and animal rhabdovirus host range: A bugs view. *Trends in Microbiology* 11: 264-271.
- Holmes, D. S. and Quigly, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114 : 193-197 .
- Izadpanah, K., Ebrahim-Nesbat, F. and Afsharifar, A.R. 1991. Barley yellow striate mosaic virus as the cause of a major disease of wheat and millet in Iran. *Journal of Phytopathology* 131: 290-296.
- Jackson, A. O., Dietzgen, R. G., Goodin, M. N., Bragg, J. N. and Deng, M. 2005. Biology of plant rhabdoviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43: 623-660.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948 .
- Makkouk, K.M., Kumari, G., Ghulam, W. and Attar, N. 2004. First record of Barley yellow striate mosaic virus affecting wheat summer nurseries in Syria. *Plant Disease* 88: 83.
- Milne, R. G., Masenga, V., Conti, M. 1986. Serological relationship between nucleocapsid of some planthopper-borne rhabdoviruses of cereals. *Intervirology* 25: 83-87.
- Nicholas, K.B., Deerfield, D.W., Nicholas, H.B. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *EMB News* 4: 14-22.
- Page, R.D. 1996. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer. Applications in the Biosciences* 12: 357-358 .
- Shirako, Y., and Ehara, Y. 1984. Composition of Northern cereal mosaic virus and its detection by enzyme-linked immunosorbent assay with antinucleocapsid serum. *Phytopathology* 74:453-457.
- Tanno, F., Nakatsu, A., Toriyama, S. and Kojima, M. 2000. Complete nucleotide sequence of Northern cereal mosaic virus and its genome organization. *Archives of Virology* 145: 1373-1384.
- Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, C., Dietzgen, R. G. and Fang, R. X. 2005. Family Rhabdoviridae. In: C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. A. Ball (eds.). *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, SanDiego. 1162 p.
- Toriyama, S. 1986. Northern cereal mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. No. 332.