

تعیین ویژگی‌های ژنوم کامل یک جدایه ویروس کوتولگی زرد جو (BYDV-PAV) از ایران

Molecular characterization of the complete genome of a barley yellow dwarf virus-PAV isolate from Iran

آرزو پاکدل^۱، علیرضا افشاری^{۱*}، علی نیازی^۲ و کرامت‌اله ایزدپناه^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۷)

چکیده

ویروس‌های کوتولگی زرد جو یکی از مهمترین ویروس‌های غلات در دنیا می‌باشند. بررسی‌های انجام‌شده بیانگر پراکنش ویروس‌های کوتولگی زرد جو (Barley yellow dwarf virus, BYDV) و غلات (Cereal yellow dwarf virus, CYDV) در کشور و غالب بودن BYDV-PAV می‌باشد. به منظور تعیین ترادف کامل ویروس کوتولگی زرد جو (BYDV-PAV) در ایران، جدایه‌ای از منطقه اسفندقه از استان کرمان که دارای علائم شدید آلودگی به ویروس مذکور بود انتخاب شد. استخراج آر. ان. ای کل از بافت گیاهی آلوده به ویروس با استفاده از کیت RTTM (-plus) (شرکت سیناژن) انجام شد. کل ژنوم ویروس با استفاده از نه جفت آغازگر اختصاصی PAV با روش RT-PCR تکثیر شد. قطعه‌های تکثیرشده با استفاده از InsT/AClone PCR Product Cloning Kit (Fermentas) در پلاسמיד PTZ57R/T وارد و در سویه DH5a باکتری *Escherichia coli* همسانه‌سازی شد. آنالیز ترادف نوکلئوتیدی کامل نشان داد که جدایه کرمان ویروس کوتولگی زرد جو (KP771878) با ۹۴٪ در صد تشابه با جدایه‌های AF235167 (از ایلوی نویز آمریکا) و EF043235 (جدایه کانزاس از آمریکا) در یک گروه قرار می‌گیرند در حالیکه در صد تشابه این جدایه با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن کمتر از ۹۰٪ می‌باشد و کمترین در صد تشابه آن با جدایه AY855920 از چین (۷۸٪) است. نتایج حاصل از مقایسه ترادف‌ها در سطح هر یک از ژن‌ها نیز، وجود تنوع زیاد در بین جدایه‌های این ویروس و همچنین احتمال نوترکیبی ژن‌ها را تایید می‌نماید. به طوری که ORF4 حفاظت‌شده‌ترین و ORF6 متغیرترین ناحیه در ژنوم این ویروس است.

کلیدواژه: آغازگر اختصاصی، RT-PCR، تعیین ترادف کامل، آنالیز ترادف نوکلئوتیدی، Luteoviruses

* 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 the complete genome of a barley yellow dwarf virus-PAV isolate from Iran

A. PAKDEL¹, A. AFSHARIFAR^{1*}, A. NIAZI² and K. IZADPANAHI¹

(Received: 28.12.2014; Accepted: 16.2.2015)

Abstract

BYDV-PAV is one of the major agents causing yellowing and dwarfing of cereals worldwide. Previous study has been report the wide distribution of BYDVs in Iran and the prevalence of BYDV-PAV in cereal fields of the country. Due to the importance of this virus, and to investigate the taxonomic position of the Iranian isolate, the full length sequence of an Iranian severe isolate of BYDV-PAV from Kerman province (KP771878) was determined. Total RNA was extracted using RNX (-plus)TM Kit. Nucleic acid extracts were reverse transcribed and amplified using PAV specific primers. The amplified fragments were inserted into PTZ57R/T vector using Ins T/A clone PCR Product Kit (MBI Fermentas) and cloned in *Escherichia coli* (DH5 α) and sequenced. Complete nucleotide sequence of this isolate comprises 5668 nucleotides. Sequence analysis at nucleotide level showed that the Kerman isolate has maximum homology of about 94% with two American isolates (AF235167 and EF043235) of BYDV-PAV and grouped in the same cluster, while it showed the least similarity with a Chinese isolate of BYDV-PAV (AY855920) with only 78% homology. In addition, nucleotide sequence comparison of each ORF showed that the ORF4 was the most conserved while the ORF6 was the most divergent regions.

Keywords: BYDV-PAV, full length sequencing, Luteoviruses, Phylogenetic analysis, RT-PCR

* 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

دارد. چارچوب ژنی شش یک چارچوب ژنی خیلی کوچک در انتهای ۳' ژنوم است و نقش آن مشخص نشده است (Harrison 1999, Mayo & Miller 1999, Miller et al. 2002). کاربردی‌ترین و اقتصادی‌ترین روش کنترل این ویروس‌ها، استفاده از واریته‌های مقاوم و متحمل به ویروس‌ها و یا ناقلین آنها است. اما با توجه به محدودیت منابع ژن‌های مقاومت در طبیعت به نظر می‌رسد که استفاده از گیاهان تراژن، می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. نخستین بار ایزدپناه و همکاران در سال زراعی ۶۹-۱۳۶۸ بر اساس مشاهده علائم و آزمون ELISA آلودگی به این ویروس‌ها را در مزارع ایران گزارش کردند (ایزدپناه و همکاران ۱۳۷۰). بررسی‌های انجام‌شده توسط افشاریفر و همکاران بر روی ویروس‌های کوتولگی زرد جو (BYDVs) و کوتولگی زرد غلات (CYDV) نشان داد که این ویروس‌ها در ایران گسترش وسیعی دارند و در اکثر مناطق، سروتیپ غالب PAV تشخیص داده شد (افشاریفر و همکاران ۱۳۸۳). با توجه به اهمیت ویروس‌های کوتولگی زرد جو، طرح جهانی تعیین ترادف ژنوم کامل تعدادی از سروتیپ‌های این ویروس از نقاط مختلف دنیا انجام‌شده تا امکان طراحی روش‌های نوین کنترل مبتنی بر ترادف ژنوم این گروه از ویروس‌ها فراهم گردد (Barker & Waterhouse 1999, Miller & Young 1995). علیرغم گسترش وسیع این ویروس‌ها در سراسر کشور و نقش آنها در بروز خسارت و کاهش محصول در مزارع غلات اطلاعات جامعی از ترادف و ویژگی‌های ژنوم این ویروس‌ها وجود ندارد. در تحقیق حاضر ژنوم یک جدایه از BYDV-PAV که از منطقه اسفندقه کرمان جمع‌آوری گردیده بود و باعث بروز علائم شدید در گیاهان میزبان می‌شود بطور کامل تعیین و خصوصیات مولکولی آن مورد مطالعه قرار گرفت.

ویروس‌های عامل کوتولگی زرد از مهمترین عوامل خسارت‌زا در غلات و محدود کننده کشت این محصولات در دنیا به شمار می‌روند (D'Arcy 1995, Mathre 1982). این گروه از ویروس‌ها متعلق به تیره *Luteoviridae* می‌باشند که با شته به صورت پایا (گردشی و غیر تکثیری) منتقل می‌شوند (Bencharaki et al. 2000, Burnett 1990, Oswald & Houston 1951). پیکره این ویروس‌ها ایزومتریکی و به قطر ۲۵ نانومتر می‌باشد. ویروس‌های گروه کوتولگی زرد جو (BYDVs) دارای ژنوم آر آن ای تک لای مثبت باحدود ۵۶۰۰ نوکلئوتید می‌باشند. انتهای ۵' ژنوم فاقد هرگونه ساختار انتهایی است (Shams-bakhsh & Symons 1997) و در انتهای ۳' آن ترادف CCC که قبل از آن یک stem-loop محافظت‌شده قرار گرفته وجود دارد (Miller et al., 2002). همچنین تعیین ترادف نوکلئوتیدی این ویروس‌ها نشان داده است که در انتهای ژنوم فاقد دنباله Poly (A) و ساختار انتهایی 3' - tRNA می‌باشند (Miller et al. 1988, Veidt et al. 1988, Mayo et al. 1989). اندازه ژنوم در لوتئوویروس‌ها تقریباً یکسان می‌باشد (D'Arcy et al. 2000). ژنوم لوتئوویروس‌ها از پنج تا شش چارچوب ژنی تشکیل شده است (D'Arcy et al. 2000). دو چارچوب ژنی یک و دو با هم همپوشانی دارند و پروتئین‌های حاصل از آنها در همانند سازی نقش دارند. چارچوب ژنی سه پروتئین پوششی (CP) را رمزگذاری می‌کند. چارچوب ژنی چهار به طور کامل در داخل چارچوب ژنی شماره سه قرار دارد و در حرکت ویروس در درون آوند آبکشی موثر است. چارچوب ژنی پنج در پائین دست چارچوب ژنی شماره سه قرار گرفته است و محصول آن در انتقال با شته نقش

مواد و روش‌های بررسی

طی بازدیدهای به عمل آمده در سال زراعی ۱۳۸۵-۱۳۸۴، نمونه‌های گیاهی شامل گندم، جو، یولاف و علف هرز که حاوی علائم ویروس از قبیل کوتولگی، زردی و قرمزی برگ‌ها بودند جمع آوری شد. تعداد ۳۲ بوته گیاهی از استان کرمان که دارای علائم بیماری بودند مورد بررسی قرار گرفتند.

تشخیص نمونه‌های آلوده به ویروس کوتولگی زرد جو

جهت تعیین آلودگی در نمونه‌ها از آزمون‌های (Huth 1999) Tissue Print Immuno Assay (TPIA) و (Converse & Martin 1990) Indirect-ELISA استفاده شد. در این آزمون‌ها آنتی‌بادی‌های چندهمسایه‌ای BYDV-SGV، BYDV-MAV، BYDV-PAV و CYDV-RPV تهیه‌شده از شرکت Agdia مورد استفاده قرار گرفت و نمونه‌هایی که فقط آلوده به BYDV-PAV بودند، انتخاب شدند.

انتقال ویروس از منبع آلودگی

به منظور انتقال ویروس، ابتدا با استفاده از یک شته بالغ *Rhopalosiphum padi* عاری از ویروس، از یک کلنی سالم موجود در گلخانه مرکز تحقیقات بیماری‌های گیاهی ویروسی که منشاء آن منطقه دشتک فارس بود، یک کلنی شته سالم تهیه و در گلخانه نگهداری شد. گیاه جو جمع‌آوری‌شده از منطقه اسفندقه استان کرمان با علائم زردی و کاهش رشد شدید، به گلدان انتقال و بر روی آن تعدادی شته *Rhopalosiphum padi* عاری از ویروس قرار داده شد. سپس این گیاه در زیر یک سرپوش پلاستیکی که قسمت بالای آن پارچه توری چسبانده شده بود قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت تغذیه گیرش، شته‌ها به گیاهان

جو سالم در زیر سرپوش انتقال و در گلخانه با دمای متوسط ۲۲ درجه سلسیوس، هشت ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

آزمون RT-PCR

برای تهیه آر ان ای مورد نیاز جهت آزمون RT-PCR از کیت جداسازی آر ان ای (- Plus) RNXTM شرکت سیناژن طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای سنتز سی دی ان ای، مقدار دو میکرولیتر از اسید نوکلئیک استخراج‌شده با دو میکرولیتر آغازگر پس‌سو و هشت و نیم میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط و در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه حرارت و بلافاصله روی یخ قرار داده شد. سپس به آن مخلوط واکنش RT (دو و نیم میکرولیتر (10 mM) dNTPs، پنج میکرولیتر بافر پنج برابر Expand RT، نیم میکرولیتر آنزیم Expand RT و هشت و هفتاد و پنج صدم میکرولیتر آب دیونیزه) اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس قرار داده شد.

پنج میکرولیتر از سی دی ان ای به دست آمده از واکنش RT با واکنش زنجیره ای پلیمراس (Polymerase Chain Reaction, PCR) تکثیر شد. مخلوط واکنش PCR شامل پنج مولار مخلوط dNTP، ۱۰ μM از هر کدام از آغازگرهای پیش‌سو و پس‌سو (جدول ۱)، دو و نیم میکرولیتر Taq DNA polymerase buffer (۱۰×)، هفت و نیم مولار MgCl₂، پنج میکرولیتر سی دی ان ای و یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناژن، ایران) بود که با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر سترون حجم آن به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

برنامه PCR به شرح زیر انجام شد: ۹۴°C به مدت سه دقیقه (یک چرخه) (Initial denaturation)، ۹۴°C به

جدول ۱. ترادف آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR برای تکثیر ژنوم سروتیپ PAV ویروس کونولگی زرد جو

Table 1. The Primers used to amplify BYDV-PAV genome by PCR

Name نام آغازگر	Orientation جهت آغازگر	Sequence ترادف نوکلئوتیدی آغازگر	Annealing Temperature (°C) دمای اتصال به درجه سلسیوس	Position in the genome on the basis of Illinois isolate (AF235167) موقعیت در ژنوم بر اساس ژنوم جدایه ایلی- نویز (AF235167)
PA1	Forward	5'-CAC TGA CAC GGC AGG ACA AT-3'	62	3400-3419
PA2	Reverse	5'-ACT TGA GAT CTT AGT GGC CTG-3'		3954-3974
PAV-ORF1-F	Forward	5'-GCC CAT GAC GCC TTT GTC AA-3'	58	274-293
PAV-ORF1-R	Reverse	5'-CGG TAC AGA GCC CCT CTA A-3'		1158-1176
PAV1	Forward	5'-GTG AAG ATT GAC CAT CTC ACA AA-3'	55	2-24
PAV1	Reverse	5'-AAG CAC ATG TTG ACA AAG GC-3'		283-302
PAV2	Forward	5'-GTG GGT TTT TAG AGG GGC TC-3'	58	1150-1169
PAV2	Reverse	5'-GAC GGG GCA TGC AAA CTT TT-3'		1807-1826
PAV3	Forward	5'-AAA AGT TTG CAT GCC CCG TC-3'	57	1807-1828
PAV3	Reverse	5'-CAT CTG TTC CAT ACG ATA TGA CG-3'		2495-2517
PAV4	Forward	5'-AGA CCA GGC CAT AAG GAT CT-3'	57	3950-3969
PAV4	Reverse	5'-GAG TAG TGT GGA GGG TGT TTT-3'		4622-4642
PAV5	Forward	5'-ATT TAC CCT GAA GAC GTG CC-3'	57	4541-4560
PAV5	Reverse	5'-CGG TTA CCA CTT CGT CTT AT-3'		5159-5178
PAV6	Forward	5'-AAA AAC GTC ATA TCG TAT GGA AC-3'	55	2490-2512
PAV6	Reverse	5'-AAT GAA TTG TCC TGC CGT GT-3'		3405-3424
PAV7	Forward	5'-TAA CCG CCC ACT GAT CAA ATG G-3'	58	5173-5194
PAV7	Reverse	5'-GGG TTG CCG AAC TGC TT-3'		5649-5665

مدت یک دقیقه (Denaturing)، دمای مناسب بر اساس

آغازگر (جدول ۱) به مدت یک دقیقه (Annealing) و

۷۲°C به مدت یک دقیقه (Extension) (۳۵ چرخه). نهایتاً

مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲°C (Final

extension) نگه داری شد. آزمون RT-PCR با استفاده از

نه جفت آغازگر اختصاصی که با استفاده از نرم افزار

Vector NTI (version 9.0.0) طراحی شدند، صورت

گرفت.

همسانه سازی

محصول PCR در ژل آگاروز یک در صد الکتروفورز

شد و قطعه مورد نظر با اسکالپل از ژل جدا گردید. سپس

با استفاده از High Pure PCR Product Purification

Kit(Roche) و طبق دستور العمل شرکت سازنده خالص

(Biosciences) و طبق دستور العمل شرکت‌های سازنده استخراج گردید و با روش هضم آنزیمی، مجدداً مورد بررسی قرار گرفت. پلاسمید استخراج‌شده با استفاده از دستگاه concentrator تغلیظ و به منظور تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی ارسال گردید. حداقل دو تکرار از هر نمونه با آغازگرهای M13 پیش‌سو و پس-سو خوانده و تعیین ترادف شدند. ترادف‌های بدست آمده با استفاده از برنامه Blast N با ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه شدند و ارتباط آنها با BYDV-PAV تأیید شد. از نرم افزار Vector NTI (version 9.0.0) جهت پیدا نمودن همپوشانی قطعات تعیین ترادف‌شده استفاده شد. سپس با تعدادی از ترادف‌های کامل BYDV-PAV موجود در بانک ژن و با استفاده از برنامه Clustal X موجود در پایگاه اطلاعاتی CMBI و Megalign DNA STAR مقایسه چند گانه (multiple alignment) صورت گرفت و دندروگرام با روش Neighbour joining ترسیم شد. در این قسمت مقایسه‌ها و ترسیم دندروگرام برای چارچوب‌های ژنی به طور جداگانه نیز انجام شد.

نتایج و بحث

با توجه به اهمیت جهانی ویروس کوتولگی زرد جو، در حال حاضر اطلاعات نسبتاً جامعی از این ویروس بدست آمده و یا در حال تهیه است اما اطلاعاتی از ژنوم این ویروس‌ها بویژه ترادف کامل آن در ایران وجود ندارد. بنابراین این مطالعه به منظور تهیه این اطلاعات و برای نخستین بار در کشور صورت گرفت.

در این تحقیق، جدایه منطقه اسفندقه از استان کرمان به طور کامل تعیین ترادف شد. دلیل انتخاب این جدایه برای تعیین ترادف کامل شدت علائم مشاهده‌شده در گیاهان

سازی صورت گرفت. بمنظور همسانه‌سازی و تعیین ترادف، محصول PCR با استفاده از کیت InsT/AClone PCR Product Cloning Kit (Fermentas) به طور مستقیم در ناقل PTZ57R/T وارد شد. عمل انتقال پلاسمید به باکتری *E. coli* نژاد DH5α با استفاده از کیت TransformAid™ Bacterial Transformation (Fermentas) انجام گرفت. پس از رشد باکتری روی محیط کشت به مدت یک شب پرگنه‌های سفید که حاوی پلاسمید نوترکیب بودند انتخاب و پس از انتقال هر یک به محیط LB مایع، به مدت یک شب در shaker incubator (دمای ۳۷°C و سرعت ۱۸۰rpm) کشت داده شدند. استخراج پلاسمید با استفاده از روش هولمز و کوئیگلی (Holmes & Quigley 1981) انجام شد. برای بررسی صحت قطعه همسانه‌سازی شده و تشخیص پلاسمیدهای نوترکیب از میان پلاسمیدهای استخراج‌شده، از دو روش PCR و هضم آنزیمی پلاسمید استفاده شد. در روش PCR، مقدار یک میکرولیتر از پلاسمید استخراج‌شده، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و نتایج حاصل با الکتروفورز بررسی گردید. در روش هضم آنزیمی پلاسمید، پلاسمیدهای استخراج‌شده با آنزیم‌های برشی *Pst* I و *Eco*RI به مدت دو ساعت تا یک شب در دمای ۳۷°C تیمار شدند. اندازه قطعه حاصل با انجام الکتروفورز و مقایسه اندازه قطعات دی‌ان‌ای حاصل تعیین گردید.

تعیین ترادف و مقایسه با ترادف‌های موجود در بانک ژن

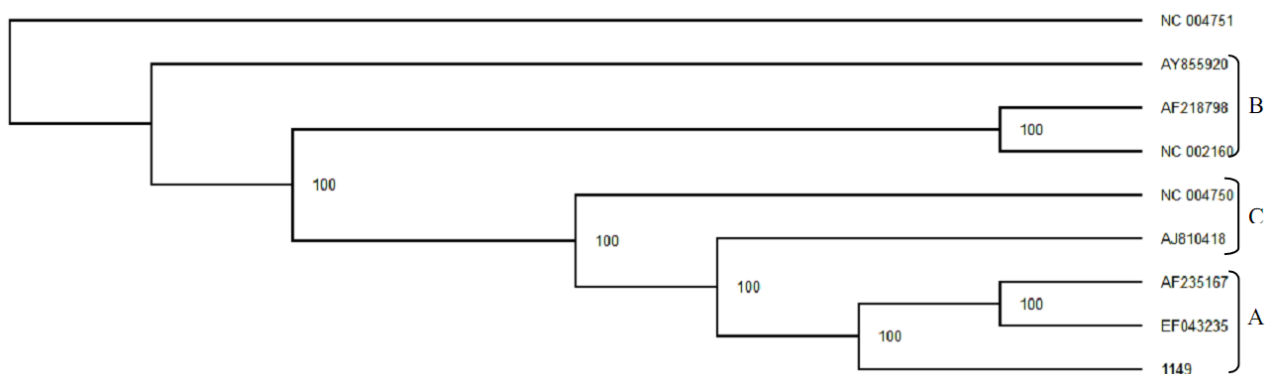
پس از تأیید صحت قطعه همسانه‌سازی‌شده با دو روش فوق، باکتری حاوی پلاسمید انتخاب و مجدداً کشت داده شد و پلاسمید آن با استفاده از High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) یا FlexiPrep Kit (Amersham) استخراج گردید.

آلوده به BYDV-PAV در این منطقه بود. علائم مشاهده شده در این گیاهان شامل زردی و کوتولگی شدید بود.

تشخیص و ترادف ژنوم کامل جدایه BYDV-PAV جدا شده از یک گیاه جو

نمونه‌های گندم، جو، یولاف و علف هرز جمع‌آوری شده از مزارع منطقه اسفندقه استان کرمان با استفاده از آزمون‌های TPIA و ELISA مورد آزمایش قرار گرفتند. با توجه به اینکه بعضی از نمونه‌ها دارای آلودگی مخلوط به چند ویروس از گروه زردی بودند، پس از انجام آزمونهای سرولوژیکی از میان نمونه‌هایی که فقط به BYDV-PAV آلوده بودند یک نمونه جو جهت انتقال و مطالعات بعدی انتخاب گردید. پس از تغذیه دهش و انتقال ویروس توسط شته *R. padi*، علائم آلودگی به BYDV-PAV در گیاهان جو سالم رقم ریحان در شرایط گلخانه پس از دو هفته مشاهده شد. علائم روی برگ‌های جو به صورت زردی بود که از نوک برگ شروع و سپس همه برگ را در برگرفت. به منظور تعیین ترادف کامل نوکلئوتیدی ژنوم جدایه ایرانی BYDV-PAV از نه جفت آغازگر اختصاصی (جدول ۱) استفاده شد. استفاده از جفت آغازگر PA1/PA2 (جدول ۱) منجر به تکثیر یک قطعه ۵۷۵ جفت بازی شد. استفاده از هشت جفت آغازگر PAV1-F/PAV1-R، PAV-ORF1-F/PAV-ORF1-R، PAV2-F/PAV2-R، PAV3-F/PAV3-R، PAV4-F/PAV4-R، PAV5-F/PAV5-R، PAV6-F/PAV6-R و PAV7-F/PAV7-R (جدول ۱) نیز منجر به تکثیر قطعات دی ان ا به ترتیب با اندازه‌های ۹۰۳، ۳۰۱، ۶۷۷، ۷۱۱، ۶۹۳، ۶۳۸، ۹۳۵ و ۴۹۳ جفت باز گردید.

که کل ژنوم BYDV-PAV را پوشش دادند. پس از تعیین ترادف و مرتب نمودن ترادف‌ها، با استفاده از همپوشانی ترادف‌ها، یک contig به طول ۵۶۶۵ باز به دست آمد که حدود ۴۶۸۲ باز آن کد کننده و ۶۲۳ باز آن در انتهای ۳ ژنوم و ۱۴۱ باز در انتهای ۵ ژنوم غیر کد کننده می باشد. همه چارچوب‌های ژنی کد کننده که در این ویروس شامل شش چارچوب ژنی است در ترادف حاصل وجود داشتند. ترادف حاصل با گزارش‌های موجود مبنی بر این که طول ژنوم این ویروس حدود ۵۷۰۰ باز می باشد (Fomitcheva et al. 2005) مطابقت دارد. به منظور دستیابی به ترادف کامل دو انتهای ژنوم لازم است از فناوری Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) استفاده شود. اما در تحقیق حاضر هدف مقایسه نواحی رمز کننده ژنوم بود. بنابراین با توجه به این که اطلاعی از ژنوم جدایه ایرانی این ویروس در دسترس نبود. این ویروس برای نخستین بار در ایران تعیین ترادف کامل شد. در مطالعه انجام شده توسط پاکدل و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر اساس بخشی از ژن پلیمرز و ناحیه پیوسته‌خوانی مشخص شده بود که جدایه اسفندقه بیشترین شباهت را با جدایه ایلی‌نویز دارد، بنابراین آغازگرها بر اساس ژنوم این جدایه طراحی شدند. با استفاده از این آغازگرها و تعیین ترادف جدایه اسفندقه مشاهده شد که این جدایه از نظر ترادف ژنوم و جایگاه و طول ژن‌ها شباهت زیادی با جدایه ایلی‌نویز دارد. طول ژنی در جدایه استرالیایی این ویروس (NC_004750) ۵۶۷۷ باز (Miller et al. 1988)، در جدایه آلمانی (AJ810418) ۵۶۷۴ باز (Fomitcheva et al. 2005)، در جدایه چین (AY855920) ۵۶۵۲ باز (Liu et al. 2007)، در جدایه ایلی‌نویز آمریکا (AF235167) ۵۶۶۵ باز، در جدایه کانزاس آمریکا (EF043235) ۵۶۶۵



شکل ۱. دندروگرام حاصل از مقایسه ترادف نوکلئوتیدی جدایه کرمان ویروس کوتولگی زرد جو (1149) (KP771878) با جدایه های موجود در بانک ژن. جدایه ایلی نویز (AF235167)، جدایه کانزاس (EF043235)، جدایه های آمریکایی PAV-129 (AF218798) و (NC_004750) (PAS-PAV)، جدایه چین (AY855920)، جدایه آلمانی (AJ810418) و جدایه استرالیایی (NC_004750). جدایه نیویورک ویروس BYDV-RPV است که به عنوان out group در نظر گرفته شده است. اعداد نمایانگر درصد bootstrap هستند.

Fig 1. Position of the Kerman, Iran isolate of BYDV-PAV (KP771878) in dendrogram with other isolates of the virus from GenBank based on complete nucleic acid sequence. The numbers indicate bootstrap percentage.

قرار گرفتند. مطالعات پیشین نیز نشان دادند که بر اساس مقایسه ترادف چارچوب ژنی یک این ویروس در ایران، تنوع زیادی وجود دارد و جدایه های ایرانی در دو گروه قرار گرفتند (Pakdel et al. 2009). در مطالعه پیشین و بر اساس میزان شباهت در سطح نوکلئوتیدی چارچوب ژنی یک، جدایه منطقه اسفندقه همراه با جدایه استرالیا (PAV-VIC)، جدایه P-PAV و جدایه ایلی نویز (PAV-III) در یک گروه قرار گرفت (Pakdel et al. 2009). اما بر اساس ناحیه پیوسته خوانی ژنوم تفاوت قابل ملاحظه ای مشاهده نشده بود و همه جدایه ها در یک گروه قرار می گرفتند. بنابراین تصمیم گرفته شد که این تنوع بر اساس ترادف سایر ژن ها و ترادف کامل ژنوم نیز مورد بررسی قرار گیرد.

همانطور که جدول درصد تشابه نشان می دهد (جدول ۲)، میزان شباهت جدایه ایرانی ویروس کوتولگی زرد جو

باز، و در دو جدایه دیگر از آمریکا PAV-129 (AF218798) و (NC_002160) (PAS-PAV)، ۵۶۹۵ باز می باشد.

پس از ترسیم درخت فیلوژنتیکی (شکل ۱) و مقایسه درصد تشابه جدایه ها (جدول ۱) مشاهده شد که جدایه ایرانی ویروس کوتولگی زرد جو (BYDV-PAV) و هفت جدایه انتخاب شده از بانک ژن در سه گروه مجزا قرار می گیرند (شکل ۱). جدایه های ایران (KP771878)، ایلی نویز (AF235167) و کانزاس (EF043235) در گروه A، جدایه های آمریکایی PAV-129 (AF218798) و (PAS-PAV) (NC_002160) همراه با جدایه چین (AY855920) در گروه B و جدایه آلمانی (AJ810418) و استرالیایی (NC_004750) در گروه C قرار گرفتند. ترسیم این درخت فیلوژنتیکی نشان می دهد که در بین جدایه های مختلف ویروس کوتولگی زرد جو تنوع زیادی وجود دارد به طوری که جدایه های آمریکایی در دو گروه مجزا

جدول ۲. درصد تشابه نوکلئوتیدی جدایه کرمان ویروس کوتولگی زرد جو (۱۱۴۹) با جدایه‌های موجود در بانک ژن

Table 2. Percent sequence identity of the Kerman isolate of Barley yellow dwarf virus (1149) (KP771878) with other isolates in GenBank

Percent Identity										
1	2	3	4	5	6	7	8	9		
	82.5	94.3	90.6	78.5	94.7	82.5	89.8	14.6	1	1149
		81.2	82.0	81.1	81.3	100.0	80.8	14.3	2	AF218798
			92.5	78.2	97.6	81.2	92.5	14.6	3	AF235167
				78.3	92.7	81.9	93.2	14.3	4	AJ810418
					77.9	81.0	77.8	14.2	5	AY855920
						81.2	92.7	14.6	6	EF043235
							80.8	14.3	7	NC_002160
								14.3	8	NC_004750
									9	NC_004751

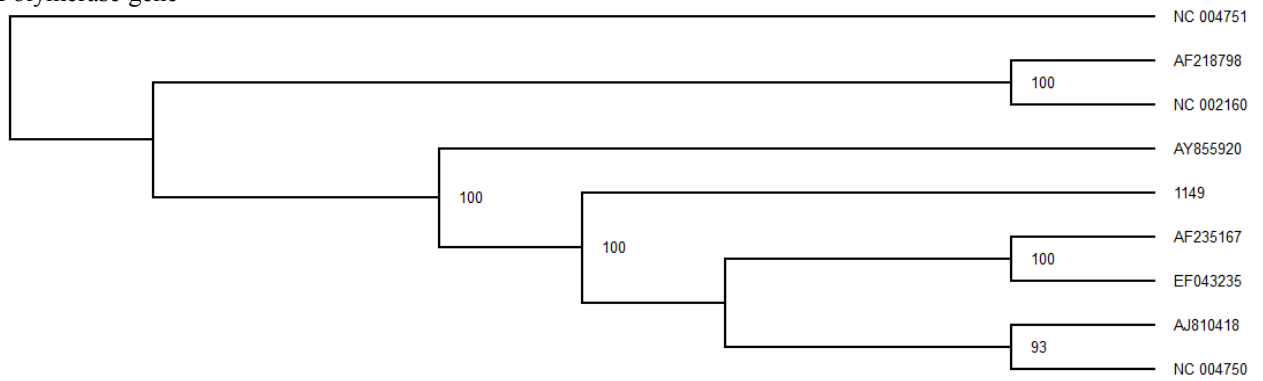
۷۹٪ تشابه) دارد.

بر اساس ترادف نوکلئوتیدی چارچوب ژنی سه که پروتئین پوششی را رمز می کند بدلیل وجود تنوع زیاد، جدایه‌های BYDV-PAV در ابتدا به دو زیر گروه A و B طبقه بندی شدند (Mastari *et al.* 1998). جدایه PAV-129 کاملاً از سایر جدایه‌ها مجزا است (Koev *et al.* 2002). به دلیل اینکه ترادف پروتئین پوششی جدایه PAV-129 با زیرگروه A، ۸۶ درصد شباهت دارد، این جدایه در گروه B قرار گرفته است (Miller *et al.* 2002). در تحقیق حاضر، بر اساس ترادف نوکلئوتیدی این قسمت از ژنوم، جدایه اسفندقه بیشترین شباهت (۹۹-۹۴٪) را با جدایه های ایلی نویز، کانزاس و استرالیا دارد و با این جدایه ها در یک گروه قرار می گیرد (شکل ۲B). در حالی که کمترین شباهت را با جدایه چین (۳۲٪) دارا می باشد و با سایر جدایه ها ۸۹٪ شباهت دارد. پروتئین پوششی در ویروس کوتولگی زرد جو، تعیین کننده اختصاصیت انتقال باشته و خصوصیات سرولوژیکی است (Vincent *et al.* 1990). وجود تنوع در ژن رمز کننده این پروتئین، توجیه کننده اختصاصی بودن ناقل و خصوصیات سرولوژیکی

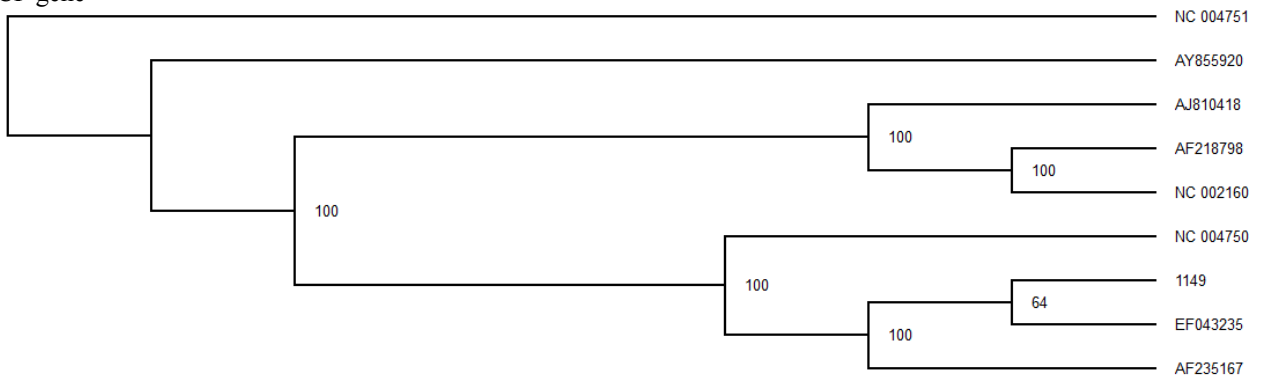
با جدایه ایلی نویز و جدایه کانزاس در سطح نوکلئوتیدی ۹۴٪ می باشد و به دلیل شباهت زیاد در یک گروه (گروه A) قرار می گیرند. میزان شباهت جدایه ایرانی با گروه B شامل جدایه های PAV-129، PAS-PAV و جدایه چین، ۷۸٪ تا ۸۹٪ و میزان شباهت آن با جدایه های استرالیایی و آلمانی (گروه C) ۹۰٪ است.

مطالعات نشان داده است که بر اساس چارچوب های ژنی کد کننده رپلیکاز (ORF1 و ORF2) در بین جدایه های BYDV-PAV گوناگونی وجود دارد. به طوری که جدایه آمریکایی PAV-129 شباهت کمی با سایر جدایه ها دارد (Koev *et al.* 2002). در تحقیق حاضر، جدایه اسفندقه و سایر جدایه های انتخاب شده از بانک ژن بر اساس ژن رپلیکاز مقایسه شدند. نتایج نشان داد که جدایه اسفندقه (۱۱۴۹) با جدایه PAV-129 تنها ۸۳٪ شباهت دارد. یافته حاضر، نتایج یادشده را تایید می کند. از طرفی جدایه اسفندقه بیشترین شباهت را با جدایه های ایلی نویز، کانزاس و آلمان دارد. شباهت این جدایه ها ۹۰-۹۱٪ می باشد و این سه جدایه در یک گروه قرار می گیرند (شکل ۲A). در حالی که کمترین شباهت را با جدایه چین (با

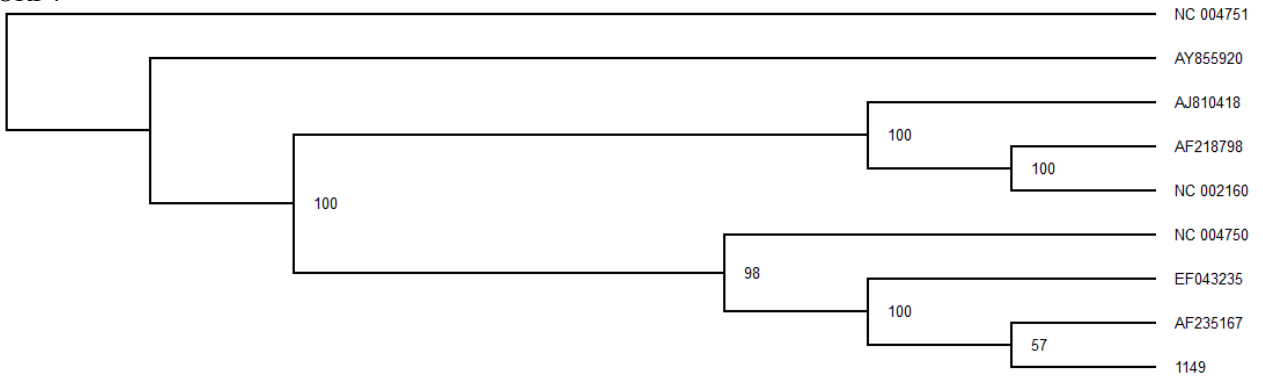
A. Polymerase gene



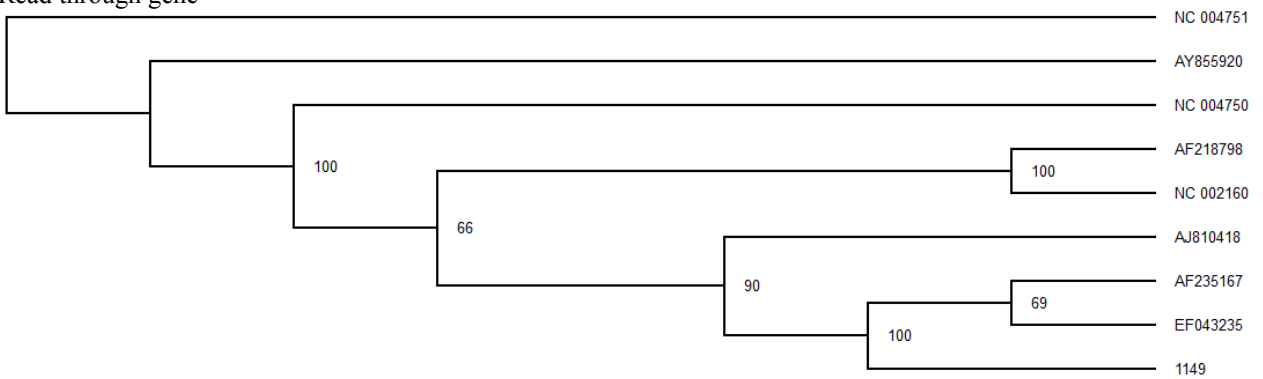
B. CP gene



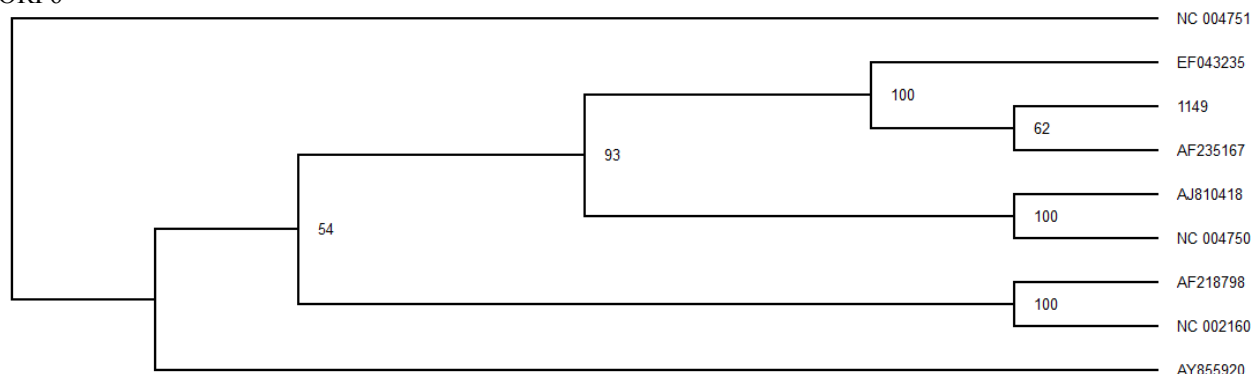
C. ORF4



D. Read through gene



E. ORF6



شکل ۲. دندروگرام‌های حاصل از مقایسه ترادف نوکلئوتیدی جدایه کرمان ویروس کوتولگی زرد جو (1149) (KP771878) با جدایه‌های موجود در بانک ژن. جدایه ایلی نویز (AF235167)، جدایه کانزاس (EF043235)، جدایه‌های آمریکایی PAV-129 (AF218798) و (NC_004750) (PAS-PAV)، جدایه چین (AY855920)، جدایه آلمانی (AJ810418) و جدایه استرالیایی (NC_004750). NC_004751 جدایه نیویورک ویروس BYDV-RPV است که به عنوان out group در نظر گرفته شده است. A: دندروگرام حاصل از مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ژن کد کننده رپلیکاز، B: دندروگرام حاصل از مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ژن کد کننده پروتئین پوششی، C: دندروگرام حاصل از مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ORF4. D: دندروگرام حاصل از مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ژن کد کننده پروتئین پیوسته خوانی و E: دندروگرام حاصل از مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ORF6. اعداد نمایانگر درصد bootstrap هستند.

Fig 2. Dendrograms obtained from alignment of an Iranian isolate of BYDV-PAV (1149, KP771878) with seven isolates of the virus from GenBank based on A: ORF1 and ORF2 nucleic acid sequence, B: ORF3 nucleic acid sequence, C: ORF4 nucleic acid sequence, D: Read through nucleic acid sequence and E: ORF2 nucleic acid sequence. The numbers indicate bootstrap percentage.

در یک گروه قرار می‌گیرند (شکل ۲D). کمترین شباهت نیز با جدایه چین وجود دارد که ۲۹٪ تشابه است. با سایر جدایه‌ها ۸۹-۸۴٪ تشابه وجود دارد. بر اساس ترادف نوکلئوتیدی چارچوب ژنی شش، کمترین میزان شباهت بین جدایه‌ها وجود دارد. جدایه اسفندقه بیشترین شباهت را با جدایه‌های ایلی نویز و کانزاس دارد (۹۶٪) و در یک گروه قرار می‌گیرند (شکل ۲E). میزان شباهت با سایر جدایه‌ها و از جمله جدایه چین ۷۲-۵۳٪ می‌باشد. این میزان تشابه نشان دهنده این است که این ژن در بین جدایه‌های BYDV-PAV چندان حفاظت شده نمی‌باشد. مطالعات پیشین مشخص نموده است که این چارچوب ژنی (ORF6) در تمام جدایه‌های BYDV-PAV وجود دارد و با اینکه نقش آن مشخص

می‌باشد. براساس ترادف نوکلئوتیدی چارچوب ژنی چهار که در حرکت ویروس در آوند آبکشی دخیل است، شباهت بین تمام جدایه‌ها (به استثنای جدایه چین) بیش از ۹۰٪ می‌باشد. که نشان دهنده حفاظت شدگی این ژن در بین جدایه‌ها است. اما در بین این جدایه‌ها، شباهت جدایه اسفندقه با جدایه‌های ایلی نویز و کانزاس بیشتر است (۹۹-۹۸٪ تشابه) و این جدایه‌ها در یک گروه قرار می‌گیرند (شکل ۲C). کمترین شباهت نیز با جدایه چین وجود دارد که ۸۲٪ تشابه است. بر اساس ژن رمز کننده پروتئین پیوسته خوانی (ORF3) و (ORF5)، نیز شباهت جدایه اسفندقه با جدایه‌های ایلی نویز و کانزاس بیشتر است (۹۷٪ تشابه) و این جدایه‌ها

امکان ارائه روش‌های ردیابی خاص را بر اساس ترادف اسید نوکلئیک (مانند PCR و gene chips) فراهم می‌کند. همچنین ژن‌هایی را که مسئول بروز فنوتیپ‌های مختلف هستند را مشخص می‌نماید. ترادف کامل این ویروس مهم و اقتصادی به مطالعات جهت ارائه روش مناسب جهت کنترل ویروس کمک می‌کند. با توجه به اهمیت این ویروس‌ها پروژه‌ای برای تعیین ترادف کامل جدایه‌های این ویروس از سراسر دنیا نیز طراحی شده است. این پروژه برای اهداف قرنطینه حائز اهمیت است زیرا ویروس‌هایی که تصور می‌شود جدایه‌های یک ویروس هستند گاهی مشخص می‌شود که ویروس‌های کاملاً متفاوتی می‌باشند. مانند BYDV-RMV که بر اساس مقایسات ترادف ژنوم به-Maize yellow dwarf virus (MYDV-RMV) تغییر نام داده است (Krueger et al. 2013). همچنین استفاده از این اطلاعات در ردیابی و ایجاد مقاومت، باعث موفقیت در افزایش محصول خواهد شد.

نتایج حاضر نشان دادند که ویروس کوتولگی زرد جو که در منطقه اسفندقه باعث بروز علائم شدیدی می‌شود از نظر ترادف ژنوم در گروه‌بندی ویروس‌های کوتولگی زرد جو قرار می‌گیرد و شباهت بسیار زیادی با جدایه‌های ایلینویز و کانزاس دارد. اما شباهت این جدایه با سایر جدایه‌ها از نظر ترادف نوکلئوتیدی بعضی از ژن‌ها قابل توجه است. زیرا از نظر مقایسه ژن رمز کننده پروتئین پلیمراز علاوه بر دو جدایه یادشده (ایلینویز و کانزاس) شباهت زیادی با جدایه آلمان دارد اما از نظر مقایسه ژن کد کننده پروتئین پوششی علاوه بر دو جدایه یادشده (ایلینویز و کانزاس) شباهت زیادی با جدایه استرالیا دارد. از نظر ترادف نوکلئوتیدی ORF4 مانند سایر جدایه‌ها است که نشان دهنده حفاظت شدگی این ژن می‌باشد.

نشده است اما رمز کننده یک پروتئین عملکردی برای این ویروس‌ها می‌باشد (Chalhoub et al. 1994). بنابراین با توجه به تنوع زیاد این ژن در این ویروس‌ها، احتمالاً پروتئین حاصل از این ژن مسئول بروز خصوصیات منحصر به فرد در هر کدام از این ویروس‌ها می‌باشد. مثلاً ممکن است که در ایجاد جدایه‌های شدید و یا ملایم و شدت علائم ایجادشده در آلودگی به این ویروس‌ها نقش داشته باشد.

به طور کلی نتایج نشان می‌دهند که در بین جدایه‌های BYDV-PAV تنوع زیادی در سطح ژن‌ها وجود دارد. به دلیل این که این ویروس‌ها اغلب به صورت آلودگی‌های مخلوط هستند امکان نوترکیبی در آن‌ها زیاد است به طوری که جدایه چین حاصل نوترکیبی با GAV می‌باشد. بیشترین شباهت جدایه ایرانی با جدایه‌های ایلینویز و کانزاس و کمترین شباهت آن با جدایه چین است.

کمترین شباهت با جدایه چین مشاهده می‌شود. این جدایه شباهت زیادی با هیچ یک از جدایه‌ها ندارد. مطالعات قبل نیز نشان داده است که جدایه چین بیشترین شباهت را تنها با PAS-PAV دارد و احتمالاً نتیجه نوترکیبی با GAV می‌باشد و یک گونه جداگانه با نام PAV-CN تشکیل می‌دهد (Liu et al. 2007).

ویروس کوتولگی زرد جو از اهمیت اقتصادی زیادی در سراسر دنیا برخوردار است. جدایه‌های مختلف این ویروس از نظر علائمی که ایجاد می‌کنند، شته ناقل و توانایی در شکستن مقاومت میزبان با هم تفاوت‌های زیادی دارند. تشخیص و تمیز این ویروس‌ها با روش‌های سرولوژیکی که فقط پروتئین پوششی ویروس را ردیابی می‌کنند مشکل است. بنابراین ترادف کامل ژنوم این ویروس‌ها می‌تواند در درک بهتر گوناگونی ترادف این ویروس‌ها کمک کند. دسترسی به ترادف کامل این ویروس

ORF6 در بین جدایه‌ها و از جمله جدایه اسفندقه از تنوع بالایی برخوردار است.

منابع

- Afsharifar, A., Masumi, M., Sadeghi, M.S., Yassaie, M., Esmailzadeh, A., and Izadpanah, K. 2004. Barley yellow dwarf virus and Cereal yellow dwarf viruses in Iran. Proc. 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran. 76 (Abst.) (in Persian with English Summary)
- Barker, H., and Waterhouse, P.M. 1999. The development of resistance to luteoviruses mediated by host genes and pathogen-derived transgenes. pp.169-210. In: The Luteoviridae (H.G. Smith and H. Barker, Eds.) CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK.
- Bencharki, B., Ei Yamani, M., and Zaoui, D. 2000. Assessment of transmission ability of *Barley yellow dwarf virus-PAV* isolates by different populations of *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. European Journal of Plant Pathology 106:455-464.
- Burnett, P.A. 1990. World Perspectives on Barley Yellow Dwarf. CIMMYT. Mexico. D.F., Mexico. 511 p.
- Chalhoub, B. A., Kelly, L., Robaglia, C., Lapierre, H. D. 1994. Sequence variability in the genome-3'-terminal region of BYDV for 10 geographically distinct PAV-like isolates of barley yellow dwarf virus: analysis of the ORF6 variation. Archives in Virology 139: 403-416.
- Converse, R.H., and Martin, R.R. 1990. ELISA methods for plant viruses. pp.179-196. In: Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, A Laboratory Manual (R. Hampton, E. Ball, and S. De Boer, Eds.). APS Press.
- D'Arcy, C.J., Domier, L.L., and Mayo, M. A. 2000. family Luteoviridae. pp.775-784. In: Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses (M.H. Van Regenmortel, C.M. Fauquet., D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Moniloff., M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R., Pringle and R.B. Wickner, Eds.). Academic Press, San Diego.
- D'Arcy, C.J. 1995. Symptomatology and host range of *Barley yellow dwarf virus*. pp.9-28. In: Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress (C.J. D'Arcy, and P.A. Burnett, Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Fomitcheva, V.W., Schubert, J., Rabenstein, F., and Habeku, A. 2005. Immunodetection of the replicative complex of Barley yellow dwarf virus-PAV in vivo. European Journal of Plant Pathology 112: 259-266.
- Harrison, B.D. 1999. Steps in the development of Luteovirology. pp.1-14. In: The Luteoviridae (H.G. Smith and H. Barker, Eds.). CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Annals of Biochemistry 114:193-197.
- Huth, W. 1999. Tissue print immunoassay-a rapid and reliable method for routinely detecting gramineae viruses. Plant Research and Development. 49:7-19.
- Izadpanah, K., Lister, M., Hout, V. 1991. Detection of barley yellow dwarf virus serotypes in Iran. Proc. 10th Iranian Plant Protection Congress, Kerman, Iran. 163 (Abst.) (in Persian with English Summary)
- Koev, G., Liu, S., Beckett, R., and Miller, W. A. 2002. The 3'-terminal structure required for replication of barley yellow dwarf virus RNA contains an embedded 3' end. Virology 292:114-126.
- Krueger, N. E., Beckett, R. J., Gray, S. M., and Miller, W. A. 2013. The complete nucleotide sequence of the genome of Barley yellow dwarf virus-RMV reveals it to be a new *Polerovirus* distantly related to other yellow dwarf viruses. Frontiers in Microbiology 4: 205-215.
- Liu, F., Wang, X., Liu, Y., Xie, J., Gray, S.M., Zhou, G., and Gao, B. 2007. A Chinese isolate of Barley yellow dwarf virus-PAV represents a third distinct species within the PAV serotype. Archives of Virology 152:1365-1373.
- Mastari, J., Lapierre, H. and Dessens, J.T. 1998. Assymetrical distribution of barley yellow dwarf virus PAV variants between host plant species. Phytopathology 88:818-821.
- Mathre, D.E. 1982. Compendium of Barley Diseases. APS Press. 77pp.
- Mayo, M.A., and Miller, W.A. 1999. The structure and expression of luteovirus genome. pp.23-42. In: The luteoviridae (H.G. Smith and H. Barker, Eds.). CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK.
- Mayo, M.A., Robinson, D.J., Jolly, C.A., and Hyman, L. 1989. Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus

- RNA. *J. Gen. Virol.* 70:1037-1051. In: *Barley yellow Dwarf: 40 years of Progress* (C.J. D'Arcy, and P.A. Burnett, Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Miller, W.A., and Young, M.J. 1995. Prospects for genetically engineered resistance to barley yellow dwarf virus. pp.345-396. In: *Barley Yellow Dwarf: 40 years of Progress* (C.J. D'Arcy, and P.A. Burnett, Eds.). APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Miller, W.A., Beckett, R., and Liu, S. 2002. Structure, function and variation of barley yellow dwarf virus genomes. pp.1-8. In: *Barley yellow Dwarf Disease; Recent Advances and Future Strategies* (M. Henry and A. MacNab, Eds.). D.F. CIMMYT, Mexico.
- Miller, W.A., Waterhouse, P.M., and Gerlach, W.L. 1988. Sequence and organization of Barley yellow dwarf virus genomic RNA. *Nucleic Acids Research* 16:6097-6111.
- Oswald, J.W., and Houston, B.R. 1951. A new virus disease of cereals transmissible by aphids. *Plant Disease Reporter* 11:471-475.
- Pakdel, A., Afsharifar, A., Niazi, A., Almasi, R., and Izadpanah, K. 2009. Distribution of cereal Luteoviruses and molecular diversity of BYDV-PAV isolates in central and southern Iran: Proposal of a new species in the genus Luteovirus. *Journal of Phytopathology* 158:357-364.
- Shams-Bakhsh, M. and Symons, R.H. 1997. Barley yellow dwarf virus – PAV RNA does not have a VPg. *Archives of Virology* 142: 2529 – 35.
- Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. 1988. Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. *Nucleic Acids Research* 16:9917-9932. In: *Barley yellow Dwarf: 40 years of Progress* (C.J. D'Arcy, and P.A. Burnett, Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Vincent, J. R., Ueng, P. P., Lister, R. M. and Larkins, B. A. 1990. Nucleotide sequences of coat protein genes for three isolates of barley yellow dwarf virus and their relationships to other luteovirus coat protein sequences. *Journal of General of Virology* 71: 2791-2799.