ردیابی و تعیین جایگاه تاکسونومیکی جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک چغندرقند براساس ترادف پروتئین پوششی ویروس

Detection and Phylogenetic Analysis of Iranian *Beet Mosaic Virus* Isolates Based on the Viral Coat Protein Gene

اکرم فرهمند[۱]، مسعود شمس‌بخش[۲*] و محمدرضا حسین‌زاده[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۳۱

چکیده

در این پژوهش وقوع ویروس موزائیک چغندرقند (BtMV) در مزارع چغندرقند استآن‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی و البرز بررسی شد و به‌منظور تعیین جایگاه تاکسونومیکی جدایه‌های ایرانی BtMV و بررسی رابطه فیلوژنتیکی آن‌ها با سایر جدایه‌های گزارش شده از دنیا، بخشی از ژنوم ویروس شامل منطقه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی و انتهای NIb تعیین ترادف شد. به این منظور، استخراج RNA و واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی روی نمونه‌های الایزا مثبت انجام و محصول پی‌سی‌آر در پلاسمید PTZ57R/T همسانه‌سازی و تعیین ترادف شد. منطقه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی و بخشی از انتهای NIb در این توالی‌ها به همراه سایر توالی‌های موجود در GenBank هم‌ردیف‌سازی شدند. سپس ماتریس درصد برابری و مولفه‌های تکاملی به‌دست آمد. ترسیم درخت فیلوژنتیکی و ردیابی وقوع نوترکیبی نیز انجام شد. براساس درخت فیلوژنتیکی رسم شده، جدایه‌های BtMV به دو گروه تقسیم شدند؛ جدایه‌های چین، اسلواکی و استرالیا (Euroasia) در یک گروه و جدایه امریکا در گروهی دیگر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که جدایه‌های ایران در دسته مجزایی درگروه Euroasia قرار گرفتند. این اولین گزارش از ترادف بخشی از ژنوم ویروس موزائیک چغندرقند از ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: BtMV، همسانه‌سازی، الایزا

۱ و ۲. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بجنورد، بجنورد

*: نویسنده مسؤول Email: shamsbakhsh@modares.ac.ir

مقدمه

ویروس موزائیک چغندرقند (*Beet mosaic virus*, BtMV) اولین‌بار در سال ۱۸۹۸ در مزارع چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) شمال فرانسه و سپس در سال ۱۹۱۵ از امریکا و سایر کشورهای اروپایی گزارش شد *دافیس* (Duffus, 1963). این بیماری در سال ۱۹۵۶ از آلمان گزارش شد *زیمر* و همکاران (Zimmer *et al.*, 1956). امروزه این ویروس یکی از ویروس‌های مهم چغندرقند محسوب می‌شود که پراکنش جهانی دارد و از تمام مناطق مهم چغندرکاری جهان گزارش شده است *کافکا و لولن* (Kaffka and Lewellen, 2001). کاهش در بازدهی چغندرقند (۲ تا ۲۶ درصد) و بازدهی ریشه (۸ تا ۲۰ درصد) بسته به سن گیاه آلوده و بیمارگری سویه درگیر در آلودگی، گزارش شده است *شفرد* و همکاران (Shepherd *et al.*, 1969). این ویروس بر قدرت رویش بذر نیز تأثیر دارد؛ به‌طوری‌که بذرهای به‌دست آمده از گیاهان آلوده نسبت به گیاهان سالم ۲۶/۵ درصد کاهش نشان داده است *استکی و جسنیک* (Stakie and Jasnic, 1985). این بیماری از کرج و سایر مناطق چغندرکاری ایران شامل اصفهان، شیراز و مشهد گزارش کرده است *رضائیان* (Rezaeian, 1969). درصد آلودگی و میزان پراکنش این ویروس در مناطق مختلف کرج را از ۹۵ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است. هم‌چنین با مطالعه تأثیر ویروس موزائیک چغندر روی تولید بذر چغندرقند قبل از سرمادهی نشان داده شده است که تولید بذر در موارد آلودگی قبل از دوره سرمادهی به میزان ۴۳ درصد کاهش می‌یابد، درحالی‌که آلودگی بوته‌ها بعد از سرمادهی در کاهش تولید بذر اثر چندانی نداشته است *جلالی* و همکاران (Jalali *et al.*, 2002).

ویروس موزائیک چغندرقند (BtMV)، عضو جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* می‌باشد *کینگ* و همکاران (King *et al.*, 2012). این ویروس دامنه میزبانی وسیعی دارد و بیشتر گیاهان متعلق به خانواده‌های Chenopodiaceae, Fabaceae و Solanaceae را مورد حمله قرار می‌دهد *ونگ* و همکاران (Wang *et al.*, 2008). بیش از ۲۸ گونه شته قادر به انتقال BtMV به‌روش ناپایا می‌باشد، در این میان دو گونه *Myzus persicae* و *Aphis fabae* مهم‌ترین ناقل‌های این ویروس در مزرعه هستند *اسمیت و کاراسیو* (Smith and Karasev, 1991).

برای اولین بار توالی کامل نوکلئوتیدی ژنوم جدایه BtMV-Wa جداشده از روی چغندرقند از واشینگتن تعیین شد و بررسی کامل پلی‌پروتئین و توالی آمینواسیدهای آن، نشان داد که این ویروس بیش‌ترین قرابت را با گونه *Peanut mottle virus* دارد *نمچینو* و همکاران (Nemchinov *et al.*, 2004). هم‌چنین مشخصات مولکولی دو جدایه BtMV- XJ (BtMV-Xinjiang) و BtMV- IM (BtMV-Inner Mongolia) مورد بررسی قرار گرفت و با جدایه‌های امریکایی BtMV- Wa و آلمانی BtMV- G مقایسه شده است *ژیانگ* و همکاران (Xiang *et al.*, 2007). بررسی ملکولی جدایه BtMV- SD جدا شده از گیاه کاهو نشان داد که توالی ژنوم در منطقه ´۳، ۹۸/۸ -۹۱/۱ درصد و توالی آمینواسیدی آن ۱۰۰- ۹۷/۵ درصد با سایر جدایه‌های BtMV شباهت دارد (*ونگ* و همکاران، 2008). آنالیزهای فیلوژنیک براساس توالی CP در BtMV، جدایه‌های این ویروس را به دو گروه Euroasia شامل جدایه‌های BtMV-SD و BtMV- REN-1 و گروه امریکایی تقسیم می‌کند (*ژیانگ* و همکاران، 2007).

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی وقوع BtMV در مزارع تولید غده و بذر به ترتیب در استآن‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی و البرز بود، هم‌چنین با توجه به اینکه هیچ‌گونه اطلاعاتی از ژنوم این ویروس در ایران وجود ندارد، در پژوهش حاضر قسمت‌هایی از توالی ژنوم جدایه‌های این ویروس در ایران تعیین ترادف و شباهت‌ها و تفاوت‌های این جدایه‌ها با سایر جدایه‌های دنیا بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در شهریور ماه سال ۱۳۹۱ تعداد ۱۷۸ نمونه مشکوک به آلودگی ویروسی از مزارع چغندر ریشه‌ای استآن‌های خراسان رضوی و خراسان شمالی و در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۲ تعداد ۴۷ نمونه با علائم بارز ویروس موزائیک چغندرقند از مزرعه تولید بذر استان البرز جمع‌آوری شد.

آزمون سرولوژیکی الایزا (ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay)

به‌منظور تشخیص ویروس موزائیک چغندرقند از آزمون ساندویچ دوطرفه (Double Antibody Sandwich ELISA) به روش *کلارک* و *آدامز* (Clark and Adams, 1977) استفاده شد، آنتی‌بادی از شرکت DSMZ آلمان تهیه و به نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق شد. نمونه‌هایی با بیش از دو برابر جذب کنترل منفی، به‌عنوان نمونه‌های مثبت ارزیابی شدند.

استخراج RNA، طراحی آغازگرها، واکنش RT-PCR و استخراج قطعه‌ی DNA از ژل

استخراج RNA از نمونه‌هایی که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شده بودند به روش مبتنی بر بافر RNX- Plus (سیناژن، تهران) انجام شد. به‌منظور بررسی کیفیت RNA، نمونه استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

به‌منظور ساخت cDNA از RNA استخراج شده و تکثیر ویروس موزائیک چغندرقند توسط پی‌سی‌آر، آغازگرهای اختصاصی ویروس با استفاده از نرم افزار Oligo 7 *وجسیه* (Wojcieh, 2009) به طوری که بتوانند ژن پروتئین پوششی را به طور کامل تکثیر کنند و با استفاده از توالی جدایه BtMV-IM (شماره دسترسی: DQ674263) طراحی و توسط شرکت پیشگام ساخته شد.

به‌منظور ساخت cDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (آغازگر پیش‌رو (Forward Primer): 5´ATTCGTGAGTTT TATCTATGG3´ و آغازگر پس‌سو (Reverse Primer): 5´AATAGAAATAAGCAACGGAGG3´)، ابتدا ۲ میکرولیتر RNA الگو (20ng/µl) و ۱ میکرولیتر آغازگر پس‌سو (10pm) به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار داده شد. سپس میکروتیوب‌ها روی یخ منتقل شدند و ۳ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر بافر واکنش (Reaction Buffer) 5X، ۰/۵ میکرولیتر (40u/µl Ribonuclease inhibitor) به‌همراه ۱ میکرولیتر dNTPs (10mM) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RT 200u/µl (M, MLuV) به آن‌ها اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷°C و سپس به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴۲°C و در آخر به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار داده شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر cDNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (10pm)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (50mM)، ۱ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۳ میکرولیتر *Taq* Polymerase 10u/µl (Fermentas) و ۱۵/۵ میکرولیتر آب، با برنامه دمایی یک چرخه حرارتی به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C و سپس ۳۵ چرخه حرارتی شامل دمای ۹۴°C به‌مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۵۳°C به‌مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۷۲°C به‌مدت ۹۰ ثانیه و در آخر یک چرخه حرارتی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. محصولات پی‌سی‌آر با استفاده از ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

همسانه‌سازی حامل قطعات DNA حاصل از پی‌سی‌آر

قطعات تکثیر یافته توسط پی‌سی‌آر پس از اتصال در حامل همانندسازی pTZ57R/T در باکتری *Escherichia coli* DH5α همسانه‌سازی شدند. اتصال DNA (Ligation) موردنظر در مولکول پلاسمید pTZ52R/T با استفاده از کیت همسانه‌سازی شرکت Fermentas و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* و تراریخت‌سازی آن‌ها به‌وسیله شوک حرارتی از روش *گرین* و *سمبروک* (Green and Sambrook, 2012) استفاده شد.

کلنی‌های سفید رنگ رشد یافته در محیط‌کشت LB جامد حاوی ۴۰ میکرولیتر X-Gal (20mg/ml) و ۴۰ میکرولیتر IPTG (0.1M) و آمپی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر (که دارای DNA نوترکیب می‌باشند)، در محیط‌کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک، تکثیر شد. استخراج پلاسمید با استفاده از روش تغییر یافته لیز قلیایی *گرین* و *سمبروک* (2012) انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده جهت تعیین توالی به روش سنگر و همکاران توسط شرکت بایونیر کشور کره‌جنوبی انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تعیین توالی

توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده به‌وسیله نرم‌افزارهای Editseq و MEGA5 بازسازی و سپس شش جدایه با رس شمار KJ145894 - KJ145899 در پایگاه داده‌های NCBI ثبت و در مقایسه‌ها استفاده شد. از بین پنج جدایه IR1، IR2، IR5، IR6 و IR7 به سبب تشابه توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به میزان صددرصد (شکل‌های ۲ و ۳) فقط توالی IR1 به ثبت رسید. مقایسه درصد برابری ژنوم‌های ویروسی با کمک الگوریتم BLASTn موجود در پایگاه (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) NCBI با نزدیک‌ترین خویشاوندان در بین سایر پوتی‌ویروس‌های موجود در GenBank تعیین گردید. سپس توالی‌های پروتئین پوششی و پروتئین پوششی باضافه بخشی از NIb با کمک الگوریتم CLASTAL W موجود در نرم‌افزار MEGA5 *تمورا* و همکاران (Tamura *et al*., 2011) با رعایت پارامترهای پیش فرض الگوریتم هم‌ردیفی، جهت بررسی‌های ژنتیکی بعدی آماده شدند. سپس مجموعه داده‌های هم‌ردیف شده بسته به مورد در مقایسه‌های دو به دو درصد برابری توالی‌ها توسط نرم‌افزار BioEdit *هال* (Hall, 1999)، تعیین ساختار ژنتیکی جدایه‌های ویروسی به کمک نرم‌افزار DnaSP *روزاز* و همکاران (Rozas *et al*., 2003)، بررسی شد. هم‌چنین روابط فیلوژنتیکی و تعیین مولفه‌های تکاملی توسط نرم‌افزار

MEGA5 و ردیابی وقایع نوترکیبی از طریق نرم‌افزار RDP *مارتین* و همکاران (Martin *et al*., 2010) انجام شد.

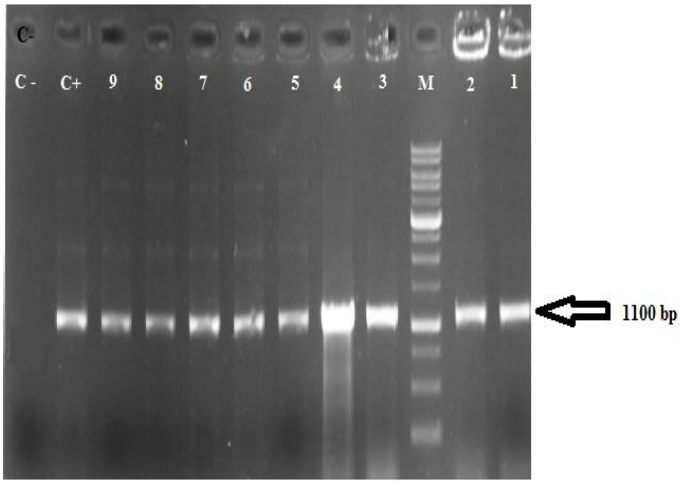
نتایج

آزمون الایزا (DAS-ELISA)

نتایج این آزمون در تمامی ۱۷۸ نمونه جمع‌آوری شده از چغندرقند ریشه‌ای استآن‌های خراسان رضوی و خراسان شمالی منفی ارزیابی شد. درحالی‌که ۱۵ نمونه از ۴۷ نمونه‌ی جمع‌آوری شده از چغندر بذری مثبت ارزیابی و میزان آلودگی را ۳۴٪ برآورد شد.

نتایج حاصل از RT-PCR

تفکیک محصول واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز یک درصد با استفاده از نشانگر ۱۰۰۰ جـــفت بازی (GeneRuler™ 1 kb, Fermentas) حاکی از تکثیر قطعه مورد انتظار به اندازه ۱۱۰۰ جفت باز بود (شکل ۱).



شکل۱: محصول‌های RT-PCR اختصاصی *Beet mosaic virus* به‌اندازه ۱۱۰۰ جفت باز تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی از نمونه‌های چغندرقند الایزا مثبت در آگارز ۱٪ رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. M: نشانگر اندازه DNA (GeneRuler™ 1 kb, Fermentas)، -C: شاهد منفی، +C: شاهد مثبت، ۱ تا ۹: نمونه‌های الایزا مثبت

Fig. 1: RT-PCR products of *Beet mosaic virus* specific 1100 bp DNA fragment amplified by specific primers from ELISA positive sugar beet samples, electrophoresis on a 1% agarose gel and staining by ethidium bromide. M: Size marker (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas); C-: Negative control; C+: Positive control; 1-9: ELISA positive Samples

تجزیه و تحلیل توالی‌های ویروسی و ترسیم ماتریس برابری

نتایج اولیه حاصل از جستجوی BLASTn در GenBank توالی‌های به‌دست آمده از نمونه‌برداری نشان داد که جدایه‌های ایرانی بیش از ۹۰٪ برابری با سایر جدایه‌های BtMV داشتند. هم‌ردیف‌سازی ترادف ده جدایه ایرانی و شش جدایه از سایر کشورها به کمک نرم‌افزار MEGA5 انجام شد و ماتریس برابری توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit برای ژن CP به‌اضافه بخشی از انتهای NIb به‌دست آمد (شکل ۲).

aa

nt / جدایه های BtMV	IR 1	IR 2	IR 3	IR 4	IR 5	IR 6	IR 7	IR 8	IR 9	IR 10	IM	SL	UK	SD	Wa	XJ
IR 1	ID	100	99.3	98.3	100	100	100	99.6	99.3	99.3	94.8	95.4	94.8	93.8	76.2	94.8
IR 2	100	ID	99.3	98.3	100	100	100	99.6	99.3	99.3	94.8	95.4	94.8	93.8	76.2	94.8
IR 3	99.7	99.7	ID	97.7	98	98.3	98.3	99	99.3	98.3	94.1	94.8	94.1	93.2	75.8	94.1
IR 4	99.3	99.3	99.1	ID	98	98.3	98.3	98	97.7	97.4	93.8	93.8	93.2	92.2	74.7	94.1
IR 5	100	100	99.7	99.3	ID	100	100	99.6	99.3	99	94.8	95.4	94.8	93.8	76.2	91.9
IR 6	100	100	99.7	99.3	100	ID	100	99.6	99.3	99	94.8	95.4	94.8	93.8	76.2	94.8
IR 7	100	100	99.7	99.3	100	100	ID	99.6	99.3	99	94.8	95.4	94.8	93.8	75.8	94.8
IR 8	99.7	99.7	99.5	99.3	100	99.7	99.7	ID	99	98.7	94.5	95.1	94.5	93.5	75.8	94.8
IR 9	99.7	99.7	99.7	99.1	100	99.7	99.7	99.5	ID	98.3	94.1	94.8	94.1	93.2	75.2	94.5
IR 10	99.5	99.5	99.4	99	100	99.6	99.6	99.4	99.4	ID	93.8	94.5	93.8	92.9	76.5	94.1
IM	98.2	98.2	98	97.8	98	98.2	98.2	98	98	97.9	ID	97.4	97.4	96.4	76.5	93.8
SL	98.2	98.2	98.2	97.8	98	98.4	98.4	98.2	98.2	98.1	98.9	ID	96.7	97.1	76.5	96.7
UK	98.4	98.4	98	97.6	98	98.2	98.2	98	98	97.9	99.1	98.7	ID	95.8	75.5	95.4
SD	98	98	97.8	97.4	98	98	98	97.8	97.8	97.7	98.7	98.9	98.5	ID	75	95.1
Wa	91.9	91.9	91.8	91.8	92	91.9	91.9	91.7	91.8	91.6	91.8	92	91.6	91.4	ID	75.8
XJ	98.2	98.2	98	97.9	98	98.2	98.2	98	98	97.9	98.5	98.7	98.3	98.3	91.8	ID

شکل ۲: ماتریس درصد برابری دوبه‌دو بین نوکلئیک اسید (پایین شکل) و آمینو اسیدهای حاصل (بالای شکل) ژن پروتئین پوششی و بخشی از انتهای NIb جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک چغندرقند و جدایه‌های ثبت شده در پایگاه GenBank

Fig. 2: Percent sequence identity matrix between *Beet mosaic virus*- coat protein and a part of terminal NIb at nucleotide (down) and deduced amino acid (above) in Iranian isolates and reported isolates from other country in GenBank

aa

nt / جدایه های BtMV	IR 1	IR 2	IR 5	IR 6	IR 7	IR 8	IR 9	IR 10	IR 4	IR 3	IM	SL	UK	SD	Wa	XJ
IR 1	ID	100	100	100	98.9	100	100	99.6	94.9	99.6	99.6	99.2	99.6	98.9	97.8	99.6
IR 2	100	ID	100	100	98.9	100	100	99.6	94.9	99.6	99.6	99.2	99.6	98.9	97.8	99.6
IR 5	100	100	ID	100	98.9	100	100	99.6	94.9	99.6	99.6	99.2	99.6	98.9	97.8	99.6
IR 6	100	100	100	ID	98.9	100	100	99.6	94.9	99.6	99.6	99.2	99.6	98.9	97.8	99.6
IR 7	99.6	99.6	99.6	99.6	ID	98.9	98.9	98.5	93.8	98.5	98.5	98.1	98.5	97.8	96.7	98.5
IR 8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.5	ID	100	99.6	94.9	99.6	99.6	99.2	99.6	98.9	97.8	99.6
IR 9	100	100	100	100	99.6	99.8	ID	99.6	94.9	99.6	99.6	99.2	99.6	98.9	97.8	99.6
IR 10	99.7	99.7	99.7	99.7	99.3	99.6	99.7	ID	95.2	99.2	99.2	98.9	99.2	98.5	97.4	99.2
IR 4	97.8	97.8	97.8	97.8	97.4	97.7	97.8	97.8	ID	94.5	94.5	94.2	94.5	93.8	92.7	94.5
IR 3	99.8	99.8	99.8	99.8	99.5	99.7	99.8	99.6	97.7	ID	99.2	98.9	99.2	98.5	97.4	99.2
IM	98.3	98.3	98.3	98.3	97.9	98.1	98.3	98	96.3	98.1	ID	99.6	100	99.2	98.1	100
SL	98.4	98.4	98.4	98.4	98	98.3	98.4	98.1	96.2	98.3	98.9	ID	99.6	98.9	97.8	99.6
UK	98.1	98.1	98.1	98.1	97.8	98	98.1	97.9	96	98	99.1	98.5	ID	99.2	98.1	100
SD	98.1	98.1	98.1	98.1	97.8	98	98.1	97.9	96	98	98.9	99	98.5	ID	97.4	99.2
Wa	92.7	92.7	92.7	92.7	92.4	92.6	92.7	92.5	91.3	92.6	92.7	92.9	92.4	92.4	ID	98.1
XJ	98.3	98.3	98.3	98.3	97.9	98.1	98.3	98	96.2	98.1	98.5	98.6	98.1	98.4	92.7	ID

شکل ۳: ماتریس درصد برابری دوبه‌دو بین نوکلئیک اسید (پایین شکل) و آمینو اسیدهای حاصل (بالای شکل) ژن پروتئین پوششی جدایه‌های BtMV ایرانی و جدایه‌های ثبت شده در پایگاه GenBank

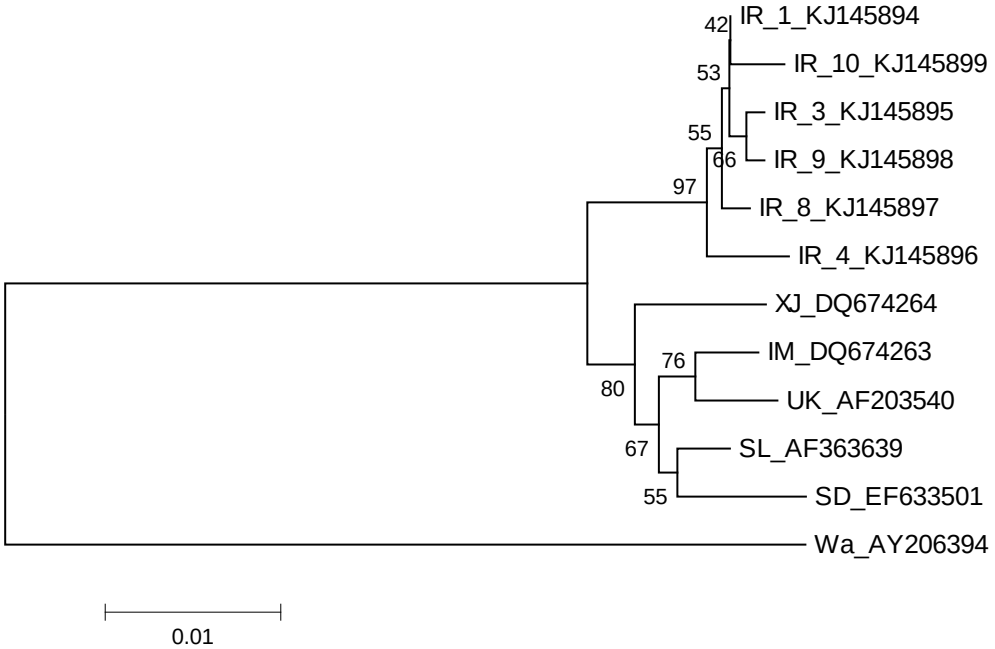
Fig. 3: Percent sequence identity matrix between BtMV coat protein at nucleotide (down) and deduced amino acid (above) in Iranian isolates and reported isolates from other country in GenBank

ردیابی وقایع نوترکیبی

ردیابی وقایع نوترکیبی با استفاده از بسته نرم‌افزاری ردیابی وقوع نوترکـیبی RDP v.4 *مارتین* و همکاران (Martin *et al.*, 2010) و با روش‌های RDP، GENECONV، BootScan، MaxChi، Chimaera، SiScan و 3Seq با رعایت پارامترهای پیش فرض موجود در نرم‌افزار، در مقایسه نواحی مورد نظر (CP به‌اضافه بخشی از انتهای NIb) هم در مقایسه جدایه‌های BtMV باهم و هم در مورد مقایسه این جدایه‌ها با سایر پوتی‌ویروس‌ها، هیچ‌گونه شواهد اولیه نوترکیبی را نشان نداد؛ که نشان‌دهنده عدم وقوع نوترکیبی در CP این ویروس است.

درخت فیلوژنتیکی BtMV

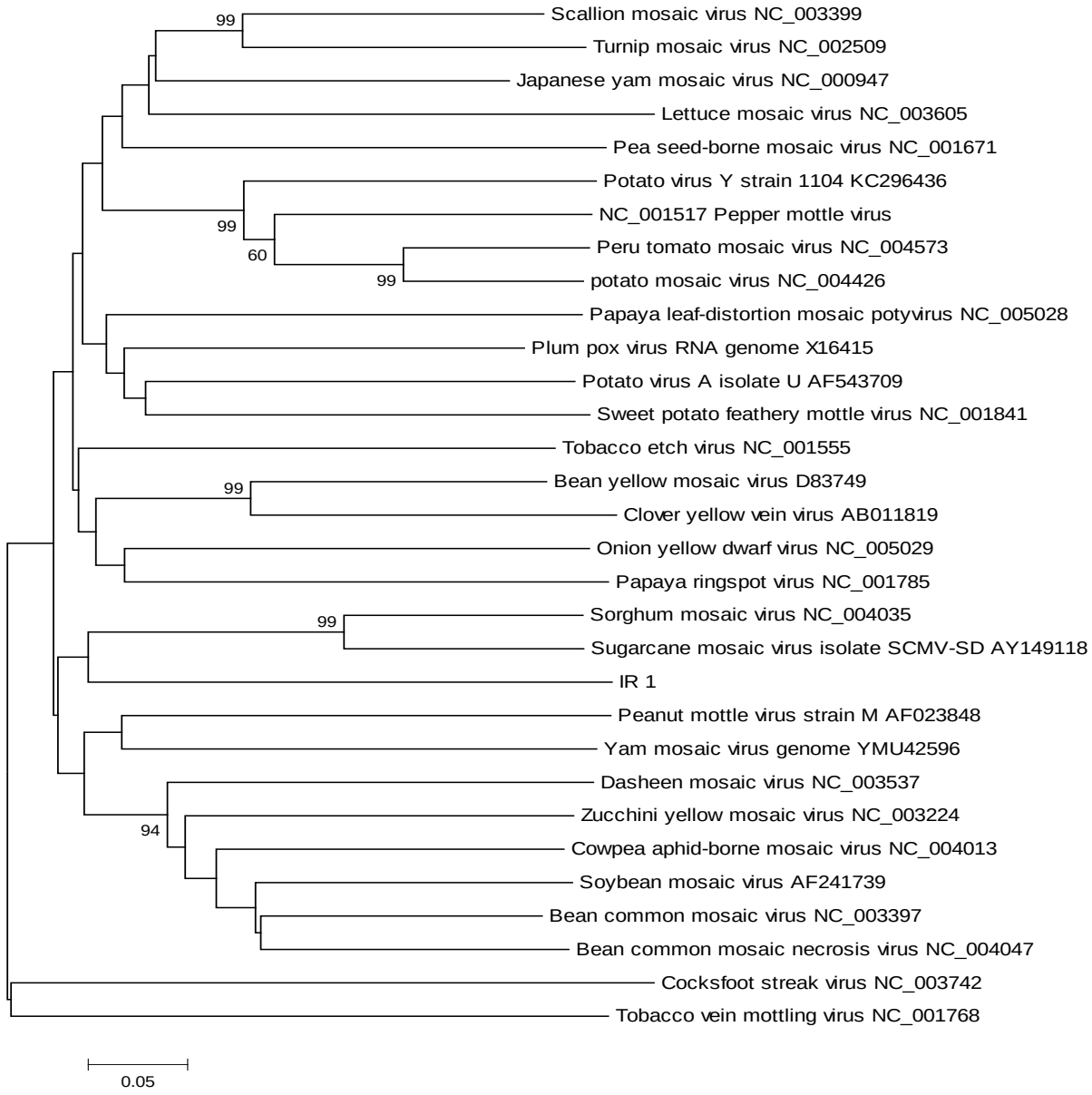
درخت فیلوژنتیکی CP به‌اضافه قسمتی از انتهای NIb در جدایه‌های حاصل از تعیین توالی و جدایه‌های موجود در GenBank با نرم‌افزار MEGA5 نشان داد که جدایه‌های ایران با جدایه‌های گروه Euroasia (چین، اسلواکی و استرالیا) خویشاوندی بیشتری داشتند درحالی‌که با جدایه امریکایی تفاوت نشان دادند (شکل ۴).



شکل ۴: درخت فیلوژنتیکی براساس توالی نوکلئوتیدهای NIb+CP جدایه‌های ویروس موزائیک چغندرقند ایرانی و موجود در GenBank، با روش NJ (اتصال مجاور) و درصد حمایتی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار. جدایه BtMV-Wa به‌عنوان عضو برون گروهی استفاده شد. جدایه‌های ایران (IR)، جدایه‌های چین (XJ، IM، SD)، جدایه استرالیا (UK)، جدایه اسلواکی (SL)، جدایه امریکا (Wa)

Fig. 4: Phylogentic tree based on *Beet mosaic virus*- CP and a part of terminal NIb nucleotide sequences of among Iranian and other isolates in GenBank by Neighbor-joining and bootstrap values of 1000. BtMV- Wa was used as an out-group, Iranian BtMVisolates (IR); isolates of China (XJ, IM and SD); isolate of Australia (UK); isolate of Oslovakia (SL); isolate of America (Wa)

هم‌چنین درخت فیلوژنتیکی یکی از جـدایه‌های ایـرانی (IR 1) با سایر پوتی‌ویروس‌ها براساس ناحیه CP به‌اضافه قسمتی از انتهای NIb، به روش Neighbor joining (اتصال مجاور) با نرم‌افزار MEGA5 با مقادیر Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد و خویشاوندی این ویروس با *Sugarcane mosaic virus* و *Peanut mottle virus* از جنس *Potyvirus* را به شکل زیر نشان دادند.



شکل ۵: درخت فیلوژنتیکی براساس توالی نوکلئوتیدهای CP به‌اضافه بخشی از انتهای NIb جدایه ایرانی BtMV-IR 1 و سایر پوتی‌ویروس‌ها، به روش Neighbor joining (اتصال مجاور) با درصد حمایتی (Bootstrap) ۱۰۰۰ تکرار

Fig. 5: Phylogenic tree based on *Beet mosaic virus*- CP and a part of terminal NIb nucleotide sequences among Iranian isolate IR 1 and other potyviruses by Neighbor joining with bootstrap values of 1000

جدول ۱: پارامترهای تکاملی جدایه‌های BtMV موجود در GenBank و جدایه‌های ایران
Table 1: Evolutionary parameters of BtMV isolates in GenBank and Iranian isolates

شاخص‌ها Parameters	ژن پروتئین پوششی Coat protein gene	ژن پروتئین پوششی+ Nib Nib+ Coat protein gene
بهترین مدل جایگزینی Substitution best model	K2	K2
نسبت جهش طبیعی Natural mutation rate	1×10^{-2}	1×10^{-2}
طول ترادف Sequence length	831nt	987nt
جایگزینی غیر مترادف Differential non synonym, d_N	0.05	0.05
جایگزینی مترادف Differential synonym, d_S	0.32	0.30
نسبت جایگزینی غیر مترادف به مترادف d_N/d_S	0.15	0.17
آزمون تاجیما Tajima, s	−1.84	−1.84

تعیین مولفه‌های تکاملی

مولفه‌های تکاملی جمعیت ویروسی با MEGA5 تعیین و نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است.

بحث

نتایج حاصل از آزمون الایزا با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس موزائیک چغندرقند، در تمام ۱۷۸ نمونه دارای علائم موزائیک جمع‌آوری شده از استآن‌های خراسان رضوی و خراسان شمالی منفی بود. هم‌چنین برای اطمینان تعدادی از نمونه‌ها با جذب نسبی بالاتر در آزمون الایزا، با RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BtMV بررسی شدند. نتایج حاکی از عدم ردیابی ویروس در نمونه‌های بررسی شده بود. عدم ردیابی ویروس از مزارع چغندر ریشه‌ای استان خراسان‌رضوی و خراسان‌شمالی ممکن است به سبب عاری از BtMV بودن مزارع چغندرقند این استآن‌ها باشد. هرچند کنترل شته‌های ناقل، نمونه‌برداری قبل از زمان اوج فعالیت جمعیت ناقل، کنترل علف‌های هرزی که میزبان اولیه (مانند شیرتیغک) و میزبان ثانویه (مانند تاج خروس) ویروس هستند، شرایط آب و هوایی و... را می‌توان از عوامل دیگر عدم ردیابی این ویروس در این استآن‌ها تلقی کرد.

به‌علاوه از آنجایی که بیماری موزائیک در چغندرقند توسط ویروس‌های مختلف مانند BtMV *راسل* (Russell, 1971)، *Cucumber mosaic virus* (CMV) *اجیلیز و وولیز* (Avgelis and Vovlas, 1972)، *Tobacco rattle virus* (TRV) *هریسون* (Harrison, 1970) و *Tomato black ring virus* (TomBRV) *مارنت* (Murant, 1970) ایجاد می‌شود؛ و این ویروس‌ها از نظر سرولوژیکی نیز با BtMV ارتباطی ندارند به نظر می‌رسد علائم موزائیک مشاهده شده روی گیاهان چغندرقند غده‌ای (سال اول) جمع‌آوری شده از استآن‌های خراسان‌رضوی و خراسان‌شمالی به سبب آلودگی به یکی از ویروس‌های یاد شده باشد؛ و در نتیجه نمونه‌های جمع‌آوری شده با وجود علائم شدید موزائیک در آزمون الایزا منفی ارزیابی شدند.

نتایج حاصل از آزمون الایزا در ۴۷ نمونه گیاه چغندرقند بذری جمع‌آوری شده از مزرعه موسسه تحقیقات و اصلاح بذر چغندرقند کرج، استان البرز در اواسط اردیبهشت ماه ۱۳۹۲ مثبت ارزیابی شد. از آنجایی که نمونه‌ها از چغندرهای بذری جمع‌آوری شده بودند و احتمال وجود این ویروس در چغندرهای بذری بیشتر است (*راسل*، 1971) و هم‌چنین با توجه به آب و هوای مناسب اول فصل برای فعالیت شته ناقل و انتقال کارآی ویروس، به‌علاوه عدم مبارزه شیمیایی علیه شته و علف‌های هزر در مزرعه تولید بذر به دلیل تولید ارقام اصلاحی، در نتیجه همه موارد فوق وجود BtMV در مزرعه تولید بذر استان البرز قابل انتظار بود. به‌علاوه ویروس موزائیک چغندرقند

در سال ۱۳۴۲ (*رضائیان*، 1969) و در سال ۱۳۸۰ *جلالی* و همکاران (Jalali *et al.*, 2001) از کرج گزارش شده است.

نتایج حاصل از ماتریس برابری در سطح نوکلئوتیدهای CP به‌اضافه انتهای NIb برای جدایه‌های IR1، IR2، IR5، IR6 و IR7 ایران (کرج)، حاکی از شباهت ۱۰۰ درصد و در مورد سایر جدایه‌های ایران نشان‌دهنده شباهت ۹۹ تا ۹۹/۷ درصد بود؛ هم‌چنین شباهت در سطح اسیدآمینه این منطقه ژنی نیز، جدایه‌های IR1، IR2،IR5، IR6 و IR7 شباهت ۱۰۰ درصد و در مورد سایر جدایه‌های ایران از ۹۸ تا ۹۹/۶ درصد بود. تشابه در سطح نوکلئوتید در منطقه ژنی یاد شده در جدایه‌های ایران با سایر جدایه‌های دنیا از۹۸/۹-۹۱/۴ درصد و در سطح اسیدآمینه از ۷۴/۷ تا ۹۶/۷ درصد متغیر بود. همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود بیش‌ترین اختلاف هم در سطح نوکلئوتید و هم در سطح اسیدآمینه با جدایه امریکا BtMV-Wa (با رس شمار AY206394) مشاهده شد.

نتایج حاصل از ماتریس برابری در سطح نوکلئوتیدهای CP در مورد جدایه‌های IR1، IR2،IR5، IR6 و IR9 ایران (کرج)، شباهت ۱۰۰ درصد و در مورد سایر جدایه‌های ایران از ۹۷/۴ تا ۹۹/۸ درصد شباهت را نشان داد و در سطح اسیدآمینه این منطقه ژنی نیز، شباهت در جدایه‌های ایران در جدایه‌های IR1، IR2،IR5، IR6 و IR9 صددرصد و در سایر جدایه‌ها از ۹۳/۸ تا ۹۹/۶ درصد بود. تشابه در سطح نوکلئوتید این منطقه ژنی در جدایه‌های ایران با سایر جدایه‌های دنیا از ۹۱/۳ تا ۹۹/۱ درصد و در سطح اسیدآمینه از ۹۲/۷ تا ۹۹/۶ درصد متغیر بود. همان‌طورکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود بیش‌ترین اختلاف هم در سطح نوکلئوتید CP و هم در سطح اسیدآمینه آن در جدایه امریکا BtMV -Wa (با رس شمار AY206394) و جدایه IR4 (ایران) مشاهده شد.

طبق بررسی‌های انجام شده در سال ۲۰۰۳ جدایه BtMV-REN1 (SL) از اسلواکی در منطقه ژن کدکننده NIb و CP حدود ۹۹/۶ درصد شباهت با جدایه‌های دیگر اروپایی را نشان داد *گلاسا* و همکاران (Glasa *et al*., 2003). هم‌چنین دو جدایه BtMV-XJ (BtMV-Xinjiang) و BtMV-IM (BtMV-Inner Mongolia) با جدایه امریکایی BtMV-Wa و آلمانی BtMV-G مقایسه شدند. مقایسه توالی‌ها نشان داد که BtMV-XJ از نظر توالی کامل نوکلئوتیدی ۸۹/۸ تا ۹۸/۳ درصد و جدایه BtMV-IM حدود ۹۱/۶ تا ۹۳/۸ درصد به جدایه‌های BtMV-Wa و BtMV-G شباهت داشت. جدایه BtMV- SD که از گیاه کاهو در سال ۲۰۰۸ جدا شده است، نیز در منطقه انتهای ´۳ ۹۱/۱ تا ۹۸/۸ درصد و توالی اسیدآمینه آن ۹۷/۵ تا ۱۰۰ درصد شباهت را با سایر جدایه‌های این ویروس نشان دادند (*ونگ* و همکاران، 2008). هم‌چنین بنابر آن‌چه گفته شد، تفاوت در سطح اسیدآمینه در منطقه ژنی CP به‌اضافه انتهای NIb بیشتر از CP است؛ ملاحظه می‌شود که جهش‌های انجام شده در ناحیه CP کمتر منجر به تغییر اسیدآمینه می‌شوند؛ اما در ناحیه CP به‌اضافه انتهای NIb جهش‌های انجام شده به میزان بیشتری منجر به تغییر در اسیدآمینه شده‌اند.

بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی BtMV در ناحیه CP و CP به‌اضافه انتهای NIb جدایه‌های موجود در GenBank و توالی‌های حاصل از تعیین توالی، با استفاده از روش Neighbor joining (اتصال مجاور) جدایه‌های BtMV را به دو گروه تقسیم کرد. جدایه‌های چین، اسلواکی و استرالیا (Euroasia) در یک گروه، جدایه امریکا در گروهی دیگر و جدایه‌های ایران نیز در دسته مجزایی درگروه Euroasia قرار گرفتند؛ طبق درخت فیلوژنتیکی این ویروس که به‌وسیله نرم‌افزار PHYLPRO در سال ۲۰۰۷ ترسیم شده است نیز جدایه‌های این ویروس در دو گروه Euroasia و امریکا قرار گرفتند (*ژیانگ* و همکاران، 2007). این نتایج نشان‌دهنده تفکیک جدایه‌ها براساس منطقه جغرافیایی است و جدایه‌ها در مناطق جغرافیایی نزدیک‌تر به هم شباهت بیشتری نشان دادند.

نتایج BLASTn در تجزیه و تحلیل توالی‌های ژن CP و CP به‌اضافه بخشی از انتهای NIb، نشان داد که همه آن‌ها دارای برابری بیش از ۹۱ درصد با سایر جدایه‌های BtMV موجود در GenBank بوده و از آنجایی‌که به شباهت بیشتر از ۹۰ درصد در توالی نوکلئوتیدی صرف نظر از محصول ژن، بین استرین‌ها اشاره شده است *آدام* و همکاران (Adams *et al*., 2005)؛ به‌عنوان واریانت‌های جدید این ویروس در ایران معرفی شد.

طبق درخت فیلوژنتیکی یکی از جدایه‌های ایرانی (IR 1) با سایر پوتی‌ویروس‌ها بر اساس ناحیه CP به‌اضافه قسمتی از انتهای NIb، خویشاوندی این ویروس با *Sugarcane mosaic virus* و *Peanut mottle virus* مشخص شد. طبق بررسی‌های انجام شده روی جدایه BtMV-Wa و سایر پوتی‌ویروس‌ها در سطح ژنوم کامل در سال ۲۰۰۴ نیز، این جدایه از این ویروس بیش‌ترین قرابت را با *Peanut mottle virus* نشان داده است (*نمچینو* و همکاران، 2004).

بررسی‌های انجام شده در سال ۲۰۰۷ توسط نرم‌افزار PHYLPRO در سطح CP و NIb هم‌چنین نشان داد که جدایه BtMV-XJ چه از نظر ژنومی و چه از لحاظ اسیدآمینه با جدایه BtMV-G نسبت به BtMV-Wa شباهت بیشتری دارد. به‌رغم این که جدایه BtMV-IM درحالی‌که در منطقه ۷۶۷۱-۶۶۶۶ و

۹۵۹۱-۷۶۷۲ ژنومی هم‌پوشانی حتی بیش از ۹۹/۲ درصد با BtMV-G نشان می‌دهد، اما در منطقه ۴۰۸۳-۲۳۳۱ شباهتی حدود ۹۸ درصد با جدایه BtMV-Wa دارد که پیشنهاد شده است جدایه BtMV-IM یک ویروس نوترکیب طبیعی است (*ژیانگ* و همکاران، 2007). در این بررسی نیز در نواحی CP و انتهای NIb هیچ‌گونه سیگنال نوترکیبی مشاهده نشد.

نسبت جایگزینی غیرمترادف به مترادف d_N/d_S در نواحی مورد بررسی کمتر از یک بود و بیشتر جهش‌های انجام شده منجر به تغییر اسیدآمینه نمی‌شوند به عبارتی، نسبت d_N/d_S کمتر از یک در نواحی مورد بررسی نشان‌دهنده اعمال انتخاب منفی جهت حفظ ساختار ژنی این نواحی است تا ماهیت پروتئینی رمز شده در این نواحی محفوظ باقی مانده و کمتر دست‌خوش تغییرات شوند. نتایج آزمون Tajima's D نیز منفی برآورد گردید که انتخاب منفی در این نواحی را تایید می‌کند. تعداد زیاد هاپلوتیپ (واریانت) در منطقه کرج در مقیاس مکانی کوچک نشان‌دهنده بروز فرآیندهای تکاملی در جدایه‌های این ویروس است. از آنجایی‌که تمام این جدایه‌ها از یک میزبان (چغندرقند) جداسازی شده‌اند پس فشار انتخاب میزبانی در تنوع ژنتیکی آن‌ها دخالت نداشته است اما شرایط آب و هوایی و ظهور جمعیت‌های ناقل این سطح از تنوع ژنتیکی این ویروس را می‌تواند توضیح دهد.

با توجه به نتایج این تحقیق وجود این ویروس در استآن‌های خراسان‌رضوی و خراسان‌شمالی حتی در صورت وجود طی برخی سال‌ها با شرایط آب‌وهوایی مساعد، به میزان خطرناک نیست و به نظر می‌رسد درحال حاضر تهدیدی جدی برای کشت چغندرقند در این استآن‌ها نیست، هرچند براساس اصول مدیریت بیماری‌های گیاهی اقدامات پیشگیری‌کننده انجام گیرد؛ اما طی نتایج به‌دست آمده از این تحقیق و گزارش‌های گذشته، میزان زیاد آلودگی به این ویروس در منطقه کرج، هشداری جهت انجام برخی اقدامات پیشگیری و جلوگیری از گسترش هرچه بیشتر این ویروس در این منطقه است.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲۱-۲۲ متن انگلیسی مراجعه شود.