

مقایسه مولکولی ناحیه ۵' ژنوم جدایه گلستان ویروس موزاییک کوتولگی ذرت با دیگر پوچی ویروس‌های غلات (MDMV)

فروه سادات مصطفوی نیشابوری^۱ و سعید نصرالله نژاد^۲

۱، ۲، دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۶ - تاریخ تصویب: ۹۱/۲/۲۰)

Molecular Comparison of Genomic 5' Region of *Maize Dwarf Mosaic virus* (MDMV) Golestan Isolate with other Cereal Potyviruses

F. S. MOSTAFAVI NEISHABURI¹ AND S. NASROLAHNEJAD²

1, 2, Graduate Student, and Associate Professor, Plant Pathology,
Gorgan University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan, Iran

(Received: April. 14, 2012 - Accepted: May. 9, 2012)

Abstract

Maize dwarf mosaic virus is one of the most important and most extensive viruses of maize in the world. In this paper investigated molecular comparison and nucleotide sequence analysis of coding regions of proteins of genomic 5' region of Maize dwarf mosaic with other isolate and other cereal potyviruses. In order to this, maize plants with mosaic symptoms and dwarfing were collected from Golestan province. After verification of plants by Elisa test against MDMV antiserum, an infected sample was selected for isolation of total RNA. Amplification of genomic 5' region has been conducted using five specific primer pair that was obtained 5 overlap segments including P1, HC-Pro, p3, 6k1genes, as well as 5'-UTR region of the genome and was obtained 3460bp. The comparative analysis of nucleotide sequences of MDMV isolates showed that the Iranian (Golestan) isolate have 95.7 and 92.3 percent similarity at the amino acid level and 90.5 and 85.1 percent at the nucleotide level with Bulgarian and Spanish isolates respectively, and with other homogeneous viruses, MDMV had similarity maximum with sorghum mosaic virus from Texas and sugarcane mosaic virus from China 72.9 and 72.3 percent respectively.

Keywords: Sequences, Genome, Feature molecular, *Maize dwarf mosaic virus*

چکیده

ویروس موزاییک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) یکی از مهم‌ترین و گسترده‌ترین ویروس‌های ذرت در دنیا می‌باشد. تحقیق حاضر به منظور مقایسه خصوصیات مولکولی و آنالیز ترادف نوکلئوتیدی نواحی کدکننده پروتئین‌های موجود در ناحیه ۵' ژنوم ویروس موزاییک کوتولگی ذرت و مقایسه آن با سایر جدایه‌های این ویروس و نیز سایر پوچی ویروس‌های غلات انجام گردید. بدین منظور گیاهان ذرت با علائم موزاییک و کوتولگی از استان گلستان جمع‌آوری شد. پس از تعیین آنودگی در آزمون الایزای غیرمستقیم با آنتی‌سرم اختصاصی MDMV یک نمونه آنوده جهت استخراج RNA کل انتخاب شد. جهت تکثیر ناحیه ۵' ژنوم ویروس از ۵ جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد که ۵ قطعه هم پوشان شامل ۵'-UTR، P1، HC-Pro، P3 و 6K1 به اندازه کل ۳۴۶۰ جفت باز به دست آمد. آنالیزهای مقایسه‌ای ترادف نوکلئوتیدی این ناحیه از ژنوم MDMV نشان داد که جدایه ایران (گلستان) به ترتیب دارای شباهت ۹۵/۷ و ۹۲/۳ درصد در سطح آمینواسیدی و ۹۰/۵ و ۸۵/۱ درصد در سطح نوکلئوتیدی با جدایه‌های بلغارستان و اسپانیا است و در مقایسه با سایر ویروس‌های آنوده کدکننده غلات هم گروه با MDMV بیشترین شباهت با ویروس موزاییک سورگوم از تگراس و ویروس موزاییک نیشکر از چین به ترتیب با ۷۲/۹ و ۷۲/۳ درصد به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ترادف، ژنوم، خصوصیات مولکولی، ویروس موزاییک کوتولگی ذرت

(2002). با استفاده از جفت آغازگرهای Pot1 و Pot2 قسمتی از ژن CP و N1b و با آغازگرهای اختصاصی MD3f، MD3r و MD1r با استفاده از RT-PCR قسمتی از ژن CP عوامل مولد موzaïek در ذرت ساری و اصفهان تکثیر شد و پس از همسانه‌سازی و تعیین تراوید وجود MDMV در استان‌های مازندران و اصفهان مورد تایید قرار گرفت (Masumi *et al.* 2004). با استفاده از روش‌های سرولوژیک و تراوید نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR، MDMV جداشده از ذرت و قیاق مناطق دشت ناز ساری و اصفهان با سایر پوتوی ویروس‌های غلات مورد مقایسه قرار گرفت و ارتباط سرولوژیک آن‌ها با یکدیگر گزارش شد و نشان داده شد که MDMV از MDMV-G از آلمان ارتباط سرولوژیک نزدیک دارد و ارتباط ضعیفی با ویروس موzaïek ایرانی قیاق (IJMV) دارد و از ویروس موzaïek مرغ (Zare *et al.* 2005) کاملاً متفاوت است.

پلی‌پروتئین ژنوم اعضای پوتوی ویروس به ۱۰ پروتئین کوچک‌تر تقسیم می‌شود که هر یک در بین اعضای این خانواده نقش مشخصی دارند. پروتئین P1 که یکی از پروتئازهای ویروسی است و باعث تجزیه بخشی از پروتئین ویروسی می‌گردد و متغیرترین پروتئین از نظر تراوید نوکلئوتیدی در میان سایر پروتئین‌های اعضای جنس پوتوی ویروس است و اندازه آن بین ۳۰ تا ۶۳ کیلodalton است با این وجود ناحیه کربوکسیلی این پروتئین نسبتاً حفاظت‌شده است (Adams *et al.* 2005). پروتئین P1 توسط انتهای ۵' ژنوم کد می‌شود که پروتئینازی از جنس سرین است که در برش پلی‌پروتئین نقش دارد و به عنوان یک فاکتور کمک‌کننده در همانندسازی ژنوم عمل می‌کند انتهای آمینی P1 از لحاظ اندازه و تراوید بسیار متغیر است. نقش این پروتئین در

مقدمه

ذرت یکی از مهم‌ترین غلات در دنیا می‌باشد. عوامل مختلفی از جمله ویروس‌ها در کشت ذرت محدودیت ایجاد کرده‌اند. یکی از مهم‌ترین و گسترده‌ترین بیماری‌های ویروسی ذرت، ویروس (Maize dwarf mosaic virus, MDMV) موzaïek کوتولگی ذرت (Masumi *et al.* 2012) تک‌رشته‌ای مثبت با پیکرهای به ابعاد ۱۳×۷۵۰ نانومتر است (Kathrin *et al.* 2010). این ویروس در خانواده پوتوی ویریده و جنس پوتوی ویروس قرار دارد و ژنوم آن همانند سایر اعضای خانواده پوتوی ویریده (open reading frame, ORF) دارد. تنها یک چارچوب‌زنی (UTR) دارای تنها یک پلی‌پروتئین بزرگ را کد می‌کند، در دو انتهای دارای نواحی ترجمه‌نشونده (Achon *et al.* 2007). دیگر ویروس‌های موجود در جنس پوتوی ویروس که غلات را آلوده می‌کنند شامل ویروس موzaïek (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) و ویروس موzaïek سورگوم (*Sorghum mosaic virus*, SrMV) و پنی‌سیتوم (Pennisetum mosaic virus, PeMV) و ویروس موzaïek قیاق (Johnson grass mosaic virus, JGMV) می‌باشند. در ایران، برای اولین بار پوتوی ویروسی مشابه به MDMV از منطقه دشت ناز ساری گزارش شد و آن را سویه MM (maize mazandaran) نامیدند بر اساس آزمون‌های سرولوژیکی این ویروس با MDMV رابطه نزدیک، با IJMV رابطه‌ای دور و با SCMV رابطه ضعیف داشت اما با SrMV و JGMV فاقد واکنش بود. واکنش جدایه ذرت مازندران با آنتی‌سرم خودی و عدم واکنش جدایه‌های AGD و SCMV با این آنتی‌سرم در آزمون نشان داد که این جدایه در سطح این آزمون متفاوت (Moiini *et al.* 2012) است.

پروتئین‌هایی با نقش‌های اساسی در روند آلووده سازی گیاهان توسط ویروس‌های این گروه است لذا در این تحقیق ترادف نوکلئوتیدی این ناحیه از ژنوم ویروس موزاییک کوتولگی ذرت جدایه استان گلستان تعیین و مورد آنالیز مولکولی قرار گرفت و پایداری و ناپایداری این پروتئین‌ها در MDMV با سایر پوتی‌های غلات مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گیاهان ذرت آلووده به ویروس موزاییک کوتولگی ذرت در آزمون الایزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی ویروس تشخیص داده شدند. mRNA capture kit RNA ویروس با استفاده از طبق دستورالعمل شرکت سازنده از گیاهان ذرت آلووده استخراج گردید، نسخه‌برداری معکوس به روش RT (Fermentas, Lithuania) معمول با آنزیم 5'-Mmulv و آغازگر معکوس 5'-N1T GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T) 3'-17' به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید (Ha et al. 2007). ترکیبات مورد استفاده در مخلوط واکنش نسخه‌برداری معکوس در جدول ۱ ذکر شده است. cDNA به دست آمده از این روش برای تکثیر قطعات کدکننده پروتئین‌های P1، P3، HC-Pro و نیز ناحیه 5'-UTR 6K1، P3، 6K2 در واکنش PCR و با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی هم‌پوشان (جدول ۲) که با استفاده از نرم‌افزار Fast PCR طراحی شدند، استفاده گردید. مواد و مقادیر استفاده از آن‌ها در هر واکنش PCR طبق جدول ۳ استفاده شد.

جدول ۱- مواد لازم در مخلوط واکنش نسخه‌برداری معکوس (RT)

نوع ماده	مقدار مواد (میکرولیتر)
dNTPs (10 mM)	۲
DTT (Dithiotreitol) (100 mM)	۲
Mmulv RT buffer (5x)	۱۰
Reverse Primer (N1T) 10µM	۳
Deionized water	۳۲

آلوودگی پوتی‌ویروس‌ها هنوز مشخص نیست، اما شواهدی وجود دارد که P1 باعث افزایش توانایی پروتئین HC-Pro در سرکوب خاموشی ژن می‌شود (Rajamaki et al. 2005). همچنین این پروتئین موجب افزایش بیماری‌زاوی ویروس‌های دیگر در آلوودگی‌های مخلوط با برهم‌کنش هم‌افزایی می‌گردد (Adams et al. 2005). پروتئین کمکی^۱ (HC-Pro) دارای چندین نقش شناخته شده است که از آن جمله دخالت در انتقال ویروس با شته و نقش پروتئازی (Maia et al. 1996)، اهمیت در حرکت سیستمیک و تحریک تکثیر ژنوم ویروس می‌باشد (Shen et al. 2010).

ناحیه کربوکسیلی در HC-Pro پوتی‌ویروس‌ها اولین بار به صورت یک پروتئاز سیستمیک در TEV^۲ تشخیص داده شد (Jin et al. 2007).

نقش پروتئین P3 به خوبی شناخته نشده است، اما تصور می‌شود که در بیماری‌زاوی و ایجاد فتوتیپ پژمردگی در گیاه نقش داشته باشد (Urcuqui-Inchima et al. 2001). P3 یک پروتئین بسیار متنوع در پوتی‌ویروس‌های است و شباهت بسیار اندکی در گونه‌های مختلف دارد و احتمالاً به همراه پروتئین 6K2، اتصال دهنده به غشا برای فرایند نسخه‌برداری می‌باشد. P3 به همراه P1 از متغیرترین ژن‌های پوتی‌ویروس‌ها می‌باشد (Adams et al. 2005).

مورد پروتئین 6K1 با وجود مطالعات گسترده در مورد بیولوژی مولکولی پوتی‌ویروس‌ها، اطلاعات اندکی در مورد آن وجود دارد و نقش آن به طور کامل شناخته نشده است اما مشخص شده که 6K1 دارای بر هم‌کنش با سیستم غشایی است و در فرآیند نسخه‌برداری ژنوم نقش به سزاوی دارد (Waltermann and Maiss. 2006).

ناحیه ۵ ژنوم پوتی‌ویروس‌ها کدکننده

1. Helper component protease (HC-Pro)
2. *Tobacco etch virus*

جدول ۲- مشخصات جفت آغازگرهای مورد استفاده در آزمون RT-PCR برای تکثیر ناحیه ۵' ژنوم MDMV
جدا ایه گلستان

نام آغازگر	ترادف آغازگرها	جهت	اندازه محصول PCR (جفت باز)	دماي اتصال (°C)	موقعیت جفت آغازگرها روی ژنوم
Pot F0 / SP3	5'-AAAAACAAACAARACTCAACACAACACAAC -3' 5'-GGAGCTGTTCGCTGCAAAGG -3'	Forward Reverse	237	55	1-237
MDM1F / MDM1R	5'-CCTTGACAACCCTCGtGACG-3' 5'-GTGGCAAGCTATGGCGTTAT -3'	Forward reverse	669	55.5	118-787
MDM2F / MDM2R	5'-ACACAAAGGGCACAGTGGTC -3' 5'-CACAGACCCTCCAACGATGT -3'	Forward reverse	1216	53	636-1852
MDM3F / MDM3R	5'-ACAGAGTTTGGACAACCTG -3' 5'-GTCGCAGTCGAGTCAGCTCT -3'	Forward reverse	1158	55.5	1731-2889
MDM4F / MDM4R	5'-TCTCCGAAACATGGCGTGTG -3' 5'-GACATCAGGCTTGCACTTCA -3'	Forward reverse	1198	55.5	2737-3935

دستورالعمل سازنده در پلاسمید pJET1.2 وارد و در باکتری *Escherichia.coli* استرین XL-Blue همسانه‌سازی گردید، پس از تشکیل کلنی‌های سفید و آبی در محیط کشت، کلنی‌های سفید که حاوی پلاسمید نوترکیب بودند به صورت جداگانه در ۲-۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آمپیسیلین کشت و به مدت یک شب در انکوباتور دوار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج DNA پلاسمیدهای نوترکیب از سلول‌های باکتری (Holmes and Quigley, 1981) استفاده گردید، پلاسمیدها سپس با کیت استخراج پلاسمید (Fermentas) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردیدند، همچنین محصول PCR تعدادی از آغازگرها به وسیله (Bioneer, South Korea) Purification kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی گردید و به همراه همسانه‌ها برای تعیین ترادف به شرکت در تحلیل‌های فیلوجنتیک تشابه ترادف نوکلئوتیدی این جدا ایه با ۲ چرخه سانسیتی (Clone JET PCR) (Fermentas, Lithunia) Cloning Kit و پوتی‌ویروس‌های غلات که ترادف نوکلئوتیدی آن‌ها در GenBank قرار داشت با نرم‌افزار Clustal X و

جدول ۳- مواد و مقادیر استفاده شده از آن‌ها در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

نوع ماده	مقدار مورد استفاده در هر واکنش ۲۵ میکرولیتری (میکرولیتر)
Taq buffer (10×)	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	0.75
dNTPS (10 mM)	0.5
forward -Primer (10 μM)	1
reverse -Primer (10 μM)	1
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.25
cDNA	2
Deionized water	17

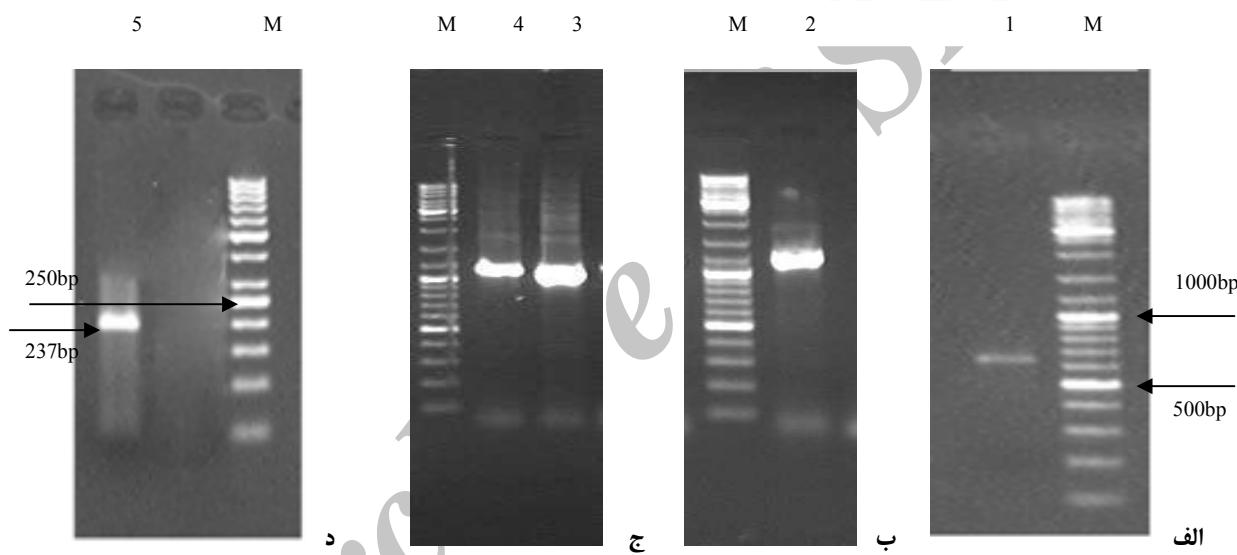
برنامه PCR برای تکثیر هر قطعه با دماي واسرشت‌سازی اوليه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه آغاز، با ۳۵ چرخه (شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال جفت آغازگرها بر اساس دماي مندرج در جدول ۲ به مدت یک دقیقه و تکثیر در دماي ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) ادامه و تکثیر نهایی در دماي ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه به پایان رسید. پس از مشاهده قطعات تکثیر شده در ژل آگاراز ۱٪ و اطمینان از اندازه مورد انتظار هر یک از آن‌ها، قطعات تکثیر شده با استفاده از Clone JET PCR (Fermentas, Lithunia) Cloning Kit

مورد نظر از ناحیه ۵ ژنوم جدایه گلستان MDMV را تکثیر کرد این قطعات شامل ناحیه UTR ۵- ۶K1 و نواحی P1، HC-Pro، P3 و 6K2 به ترتیب ۱۳۹، ۱۳۸۰، ۱۰۴۱ و ۲۰۱ جفت باز بودند (شکل ۱). با انتقال ترافق نوکلئوتیدی قطعات به یکدیگر با استفاده از نرم افزار DNAMAN قطعه ای ابتدای ژنوم ویروس موزاییک کوتولگی ذرت شروع شده و به انتهای ژن 6K1 ختم می شود (شکل ۲).

MegAlign بررسی شد. همچنین درخت فیلوژنی حاصل از هم رده فسازی چندگانه ترافق های مذکور به روش maximum-parsimony با برنامه MEGA5 بدست آمد. در این تحلیل ها ویروس (Wheat streak mosaic virus, WSMV) موزاییک رگه ای گندم به عنوان outgroup قرار گرفت.

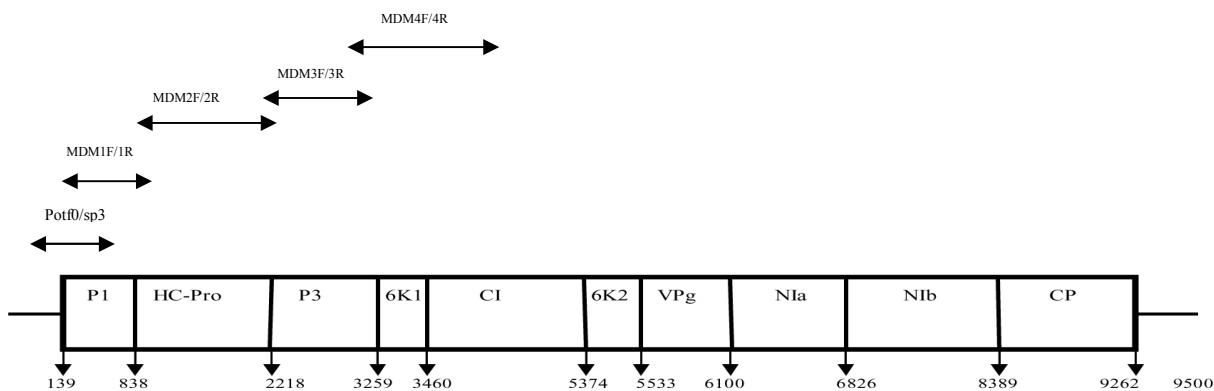
نتایج و بحث

جفت آغازگرهای اختصاصی طراحی شده قطعات



شکل ۱- نقش الکتروفورز محصول واکنش های PCR در ژل آگارز ۱٪

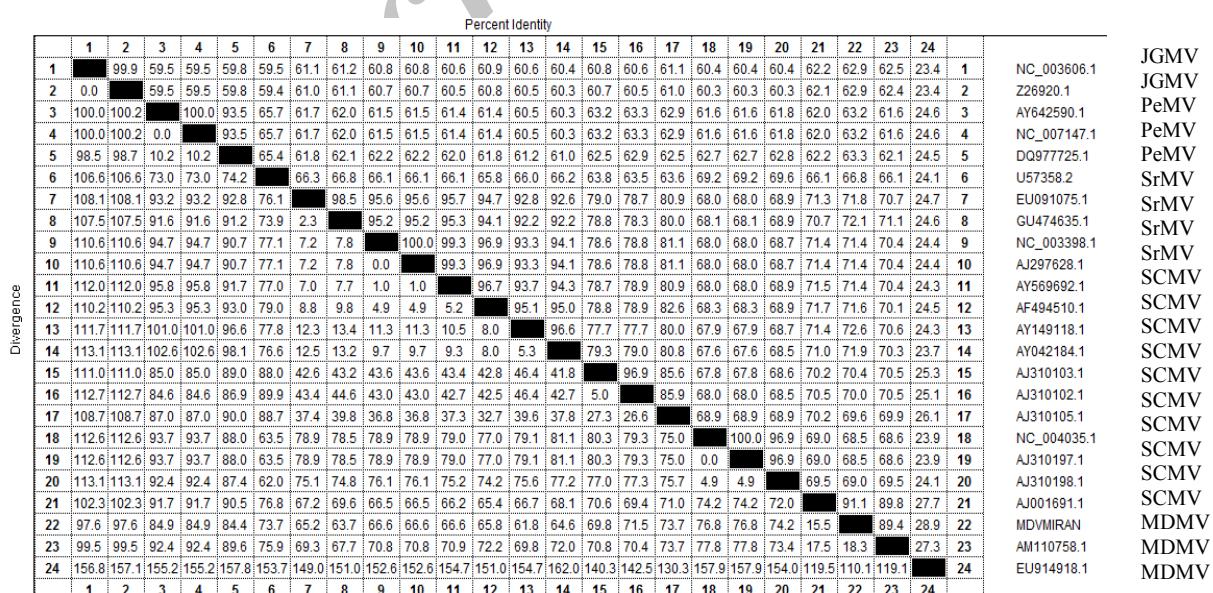
راهک های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب قطعات تکثیری جفت آغازگرهای MDMV3F / MDMV2F / 2R، MDMV1F / 1R Gene ruler DNA ladder 1Kb Pot F0 / SP3 و MDMV4F / 4R، 3R مربوط به نشانگر (Fermentas) می باشد.



شکل ۲- سازمان ژنوم MDMV و موقعیت جفت آغازگرهای استفاده شده روی ژنوم

در بین پروتئین‌های مورد بررسی P1 متغیرترین ۲۹/۸ درصد) پروتئین شناسایی شد، همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که در پروتئین P1 موتیف حفاظت‌شده H₁₅₃(8)D₁₆₂(31)G₁₉₄S₁₉₆ و F₂₀₇IVRGR₂₁₂ که در پروسه تجزیه پلی‌پروتئین نقش دارد در جدایه MDMV ایران و سایر پوتوییروس‌های غلات بررسی شده نیز وجود دارد که در برخی موقعیت آمینواسید I و V جای‌جا بود (Rohozcova and Navratil. 2011) HC-Pro برای انتقال شته در اعضای پوتوییروس موتیف‌های zinc finger-like metal binding MDMV- PTK و FRNK وجود دارد که در IRAN و سایرین نیز مشاهده شد که در مورد موتیف JGMV در FRNK به جای F، Y وجود داشت (Shen *et al.* 2010). همچنین موتیف G₁₋₂A₆₋₇. (Chung *et al.* 2008)

پس از هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی کل ۳۴۶ جفت باز جدایه گلستان با جدایه بلغاری ویروس (AJ001691.1) و جدایه اسپانیا (AM110758.1) تشابه ترادف آمینواسیدی این ناحیه در جدایه گلستان با جدایه‌های مذکور به‌ترتیب ۹۵/۷ و ۹۲/۳ درصد تعیین شد که این موضوع نشان‌دهنده شباهت بیشتر جدایه گلستان به جدایه بلغارستان در این قسمت می‌باشد. همچنین در مقایسه با سایر پوتوییروس‌های غلات بیشترین شباهت با ویروس‌های موزاییک سورگوم از تگزاس و موزاییک نیشکر از چین به‌ترتیب ۷۲/۹ و ۷۲/۳ درصد مشاهده شد. درصد شباهت ترادف نوکلئوتیدی نواحی کدکننده هر پروتئین در مورد هر یک از ویروس‌ها نیز به‌صورت مجزا تعیین گردید (شکل‌های ۳ و ۴ و ۵ و ۶). در درخت فیلوزنی به‌دست‌آمده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی قطعه ۳۴۶ جفت بازی انتهای ۵' ژنومی جدایه گلستانی ایران در کنار جدایه‌های بلغارستان و اسپانیا قرار گرفت و گروه جداشده از این‌ها گروهی شامل ویروس‌های موزاییک سورگوم می‌باشد (شکل ۷).



شکل ۳- درصد شباهت و تفاوت جدایه MDMV ایران با پوتوییروس‌های غلات براساس هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده P1 توسط نرم‌افزار (MegAlign) DNASTAR

کمک به آلدوسازی گیاه توسط ویروس می‌گردد، بنابراین با ایجاد تغییرات در این نواحی می‌توان کمک بهسزایی در کنترل این ویروس‌ها نمود به عنوان مثال تغییر در موتیف‌های موجود در پروتئین HC-Pro که در انتقال با شته نقش دارند می‌تواند مانع از انتقال و در نتیجه محدودشدن فعالیت ویروس گردد.

وجود موتیف‌های حفاظت‌شده در ترادف آمینواسیدی پروتئین‌های ناحیه ۵ ژنوم در ویروس‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که در همه ویروس‌های این گروه نقش‌های اختصاصی برای هر پروتئین تعیین شده و تغییر و موتاسیون در هر یک از این قسمت‌ها باعث اختلال در نقش آن پروتئین در

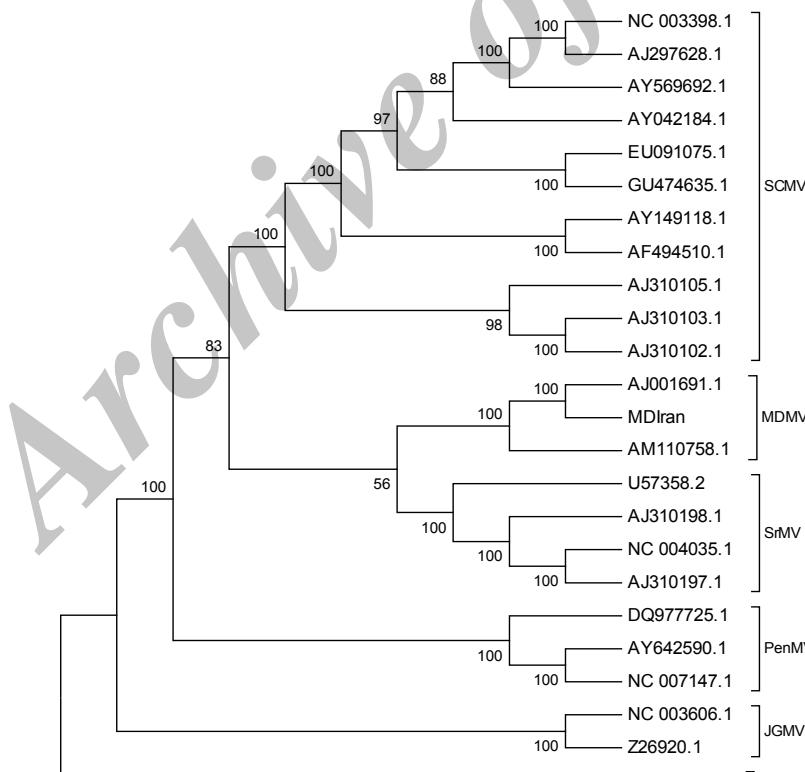
	Percent Identity																							
Divergence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1	100.0	97.8	79.2	79.0	79.0	76.6	76.6	78.3	79.6	76.4	76.4	77.2	77.2	77.2	77.2	76.6	77.2	77.4	77.7	48.2	48.4	1		
2	0.0	97.8	79.2	79.0	79.0	76.6	76.6	78.3	79.6	76.4	76.4	77.2	77.2	77.2	77.2	76.6	77.2	77.4	77.7	48.2	48.4	2		
3	2.2	2.2	79.0	79.0	78.7	76.6	76.6	78.1	79.2	76.1	76.1	77.0	77.0	77.0	77.0	76.8	77.0	76.4	77.2	77.0	77.2	47.7	47.9	3
4	24.5	24.5	24.8	98.0	96.5	82.0	82.0	84.2	85.9	83.1	83.1	83.9	83.9	83.9	83.9	84.2	84.4	83.7	83.3	83.5	83.9	46.2	46.4	4
5	24.8	24.8	24.8	2.0	96.1	80.9	80.9	83.1	85.0	82.0	82.0	82.9	82.9	82.9	83.1	83.3	82.6	82.2	82.4	82.9	46.6	46.9	5	
6	24.8	24.8	24.8	25.1	3.6	4.0	81.3	81.3	83.5	85.2	81.8	81.8	82.6	82.6	82.8	83.1	82.4	82.4	82.6	83.1	45.6	45.8	6	
7	28.2	28.2	28.2	20.7	22.1	21.6	100.0	97.6	90.5	80.3	80.3	81.1	81.6	81.6	81.3	80.9	80.3	82.4	82.4	82.0	45.1	45.3	7	
8	28.2	28.2	28.2	20.7	22.1	21.6	0.0	97.6	90.5	80.3	80.3	81.1	81.6	81.6	81.3	80.9	80.3	82.4	82.4	82.0	45.1	45.3	8	
9	25.7	25.7	26.0	17.9	193	18.7	2.4	2.4	92.4	82.2	83.1	83.5	83.5	83.3	82.9	82.2	84.6	84.6	84.6	45.3	45.6	9		
10	23.9	23.9	24.5	15.7	16.8	16.5	10.3	10.3	8.0	8.0	8.0	82.4	82.4	83.5	83.5	83.5	83.3	82.6	83.7	83.9	84.6	47.9	48.2	10
11	28.5	28.5	28.8	193	20.7	21.0	23.0	23.0	20.4	20.1	100.0	98.9	98.5	98.5	97.6	97.8	97.0	98.7	98.7	94.1	46.6	46.9	11	
12	28.5	28.5	28.8	193	20.7	21.0	23.0	23.0	20.4	20.1	0.0	98.9	98.5	98.5	97.6	97.8	97.0	98.7	98.7	94.1	46.6	46.9	12	
13	27.3	27.3	27.6	182	19.6	19.8	21.9	21.9	19.3	19.0	1.1	1.1	99.6	99.6	98.7	98.9	97.8	94.6	94.6	95.2	46.9	47.1	13	
14	27.3	27.3	27.6	182	19.6	19.8	21.3	21.3	18.7	18.7	1.5	1.5	0.4	0.4	100.0	98.9	99.1	98.0	94.8	94.8	95.4	47.1	47.3	14
15	27.3	27.3	27.6	182	19.6	19.8	21.3	21.3	18.7	18.7	1.5	1.5	0.4	0.0	98.9	99.1	98.0	94.8	94.8	95.4	47.1	47.3	15	
16	27.6	27.6	27.9	17.9	19.3	19.6	21.6	21.6	19.0	18.7	2.4	2.4	1.3	1.1	1.1	98.5	97.4	94.1	94.1	94.8	46.9	47.1	16	
17	27.3	27.3	27.6	17.6	19.0	19.3	22.1	22.1	19.6	19.0	2.2	2.2	1.1	0.9	0.9	1.5	98.5	94.4	94.4	95.0	46.9	47.1	17	
18	28.2	28.2	28.5	18.4	19.8	20.1	23.0	23.0	20.4	19.8	3.1	3.1	2.2	2.0	2.0	2.7	1.5	98.7	98.7	94.1	46.6	46.9	18	
19	27.3	27.3	27.3	19.0	20.4	20.1	20.1	20.1	17.3	18.4	6.6	6.6	5.7	5.4	5.4	6.1	5.9	6.6	9.9	96.3	45.8	46.0	19	
20	27.0	27.0	27.6	18.7	20.1	19.8	20.1	20.1	17.3	18.2	6.6	6.6	5.7	5.4	5.4	6.1	5.9	6.6	0.7	96.5	46.2	46.4	20	
21	26.6	26.6	27.3	18.2	19.6	19.3	20.7	20.7	17.9	17.3	6.1	6.1	4.9	4.7	4.7	5.4	5.2	6.1	3.8	3.6	46.4	46.6	21	
22	84.6	84.6	85.8	90.3	89.0	92.3	93.6	93.6	89.2	85.2	89.0	89.0	88.4	87.7	87.7	88.4	88.4	89.0	91.6	90.3	89.6	99.8	22	
23	84.6	84.6	85.8	90.3	89.0	92.3	93.6	93.6	89.2	85.2	89.0	89.0	88.4	87.7	87.7	88.4	88.4	89.0	91.6	90.3	89.6	0.0	23	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	

شکل ۴- درصد شباهت و تفاوت جدایه MDMV ایران با پوچی ویروس‌های غلات براساس هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده HC-Pro توسط نرم‌افزار (MegAlign) DNASTAR

	Percent Identity																										
Divergence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
1	99.7	48.6	48.6	48.6	49.9	49.9	49.8	50.1	49.9	50.0	50.6	50.4	50.5	50.3	51.2	50.4	50.4	50.6	50.2	49.1	48.1	49.4	32.5	1			
2	0.0	48.3	48.3	48.4	49.6	49.6	49.7	49.8	49.7	49.8	50.4	50.2	50.3	50.1	51.0	50.2	50.4	50.0	48.9	47.9	49.2	32.8	2				
3	87.8	88.3	100.0	90.7	67.1	67.1	66.7	67.0	67.3	67.3	68.2	68.3	67.1	67.2	67.5	67.1	67.1	67.0	66.7	67.4	67.4	69.2	38.1	3			
4	87.8	88.3	0.0	90.7	67.1	67.1	66.7	67.0	67.3	67.3	68.2	68.3	67.1	67.2	67.5	67.1	67.1	67.0	66.7	67.4	67.4	69.2	38.1	4			
5	87.8	88.0	10.2	10.2	65.7	65.7	65.5	65.6	66.0	66.1	67.4	67.6	65.8	66.4	66.9	67.7	67.7	68.0	66.6	68.2	68.6	69.0	37.6	5			
6	83.3	83.8	44.3	44.3	46.9	100.0	99.1	98.6	91.6	92.0	86.4	87.7	83.6	83.1	81.2	71.5	71.5	71.5	71.8	71.8	69.8	69.0	68.5	38.2	6		
7	83.3	83.8	44.3	44.3	46.9	0.0	99.1	98.6	91.6	92.0	86.4	87.7	83.6	83.1	81.2	71.5	71.5	71.5	71.8	71.8	69.8	69.0	68.5	38.2	7		
8	83.5	83.8	44.9	44.9	47.4	0.8	0.8	0.8	98.9	91.8	92.1	86.1	87.4	83.3	82.8	81.1	82.8	82.8	81.1	71.8	71.8	71.7	72.3	69.8	68.2	38.3	8
9	82.8	83.2	44.5	44.5	47.3	1.5	1.5	1.1	91.9	92.0	86.5	87.9	83.5	83.0	81.4	71.9	71.9	71.9	72.0	69.9	69.0	68.6	38.3	9			
10	83.4	83.5	44.0	44.0	46.4	9.2	9.2	8.8	8.8	9.2	97.3	87.2	87.7	82.8	83.0	82.8	71.5	71.5	71.6	71.3	69.5	69.7	69.6	38.4	10		
11	83.2	83.3	44.0	44.0	46.2	8.7	8.7	8.5	8.7	8.7	87.2	87.7	82.6	82.8	82.5	71.9	71.9	71.9	71.1	69.8	69.7	69.9	38.4	11			
12	81.1	81.2	42.2	42.2	43.7	15.8	15.8	16.1	15.5	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	38.6	12		
13	81.7	81.8	42.0	42.0	43.3	14.0	14.0	14.3	13.8	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	38.8	13		
14	81.5	81.6	44.1	44.1	46.6	19.1	19.1	19.4	19.3	20.2	20.5	19.4	18.5	18.5	18.5	17.9	17.9	17.9	17.9	17.9	17.9	17.9	17.9	38.0	14		
15	82.1	82.3	43.9	43.9	45.4	19.8	19.8	20.1	19.9	19.9	20.2	18.9	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	38.2	15		
16	78.8	79.2	43.4	43.4	44.4	22.5	22.5	22.5	22.1	20.1	20.5	19.2	19.6	17.1	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	38.0	16		
17	82.5	82.6	44.5	44.5	43.3	36.8	36.8	36.1	36.1	36.8	35.9	35.4	34.8	35.8	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	36.5	17		
18	82.5	82.6																									

Divergence	Percent Identity																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
1	98.1	53.8	53.8	52.6	52.6	53.8	53.8	53.8	53.2	51.9	51.3	51.9	51.9	54.5	54.5	53.8	56.4	53.8	51.3	53.2	40.4	1	NC_003606.1			
2	0.0	53.5	53.5	53.5	51.6	51.6	52.8	52.8	53.5	52.8	50.0	49.1	49.7	50.3	53.5	53.5	52.8	57.9	52.8	50.3	52.2	39.7	2	Z26920.1		
3	72.4	69.7	0.0	100.0	91.5	68.7	68.7	68.2	67.2	66.7	67.2	69.2	70.1	68.7	68.7	67.7	67.7	68.7	70.4	69.2	72.1	71.7	43.6	3	AY642590.1	
4	72.4	69.7	0.0	91.5	68.7	68.7	68.2	68.2	67.2	66.7	67.2	69.4	70.1	68.7	68.7	67.7	67.7	68.7	70.4	69.2	72.1	71.7	43.6	4	NC_007147.1	
5	72.4	69.7	9.9	9.9	66.2	66.2	66.2	66.2	65.2	69.2	68.7	67.7	67.7	66.7	66.7	68.2	68.2	68.2	67.7	69.7	71.6	68.6	41.7	5	DQ977725.1	
6	75.9	74.8	29.6	29.6	35.9	98.5	88.1	88.1	87.1	87.1	87.1	82.1	80.6	77.6	79.6	67.7	67.7	68.2	68.8	65.2	66.7	68.1	43.6	6	AY149118.1	
7	75.7	74.6	29.5	29.5	35.8	1.3	89.6	89.6	88.8	87.1	87.1	81.1	79.6	76.6	78.6	68.2	68.2	68.7	69.3	65.2	66.7	67.5	44.2	7	AF494510.1	
8	72.4	71.3	33.8	33.8	38.4	10.5	9.0	100.0	98.0	88.6	87.6	78.6	76.6	78.6	79.1	69.2	69.2	69.7	66.1	69.2	67.7	67.5	40.4	8	NC_003398.1	
9	72.4	71.3	33.8	33.8	38.4	10.5	9.0	0.0	98.0	88.6	87.6	78.6	76.6	78.6	79.1	69.2	69.2	69.7	66.1	69.2	67.7	67.5	40.4	9	AJ297628.1	
10	71.5	71.5	34.1	34.1	38.7	10.5	9.0	1.3	1.3	87.6	86.6	78.1	76.1	78.6	79.1	67.7	67.7	68.2	66.7	68.7	66.7	66.5	39.1	10	AY042184.1	
11	72.4	71.3	38.4	38.4	32.7	12.7	12.8	12.9	12.9	13.0	13.0	98.0	79.1	77.1	76.6	78.1	67.7	67.7	68.2	66.1	69.7	69.7	66.5	42.3	11	EU091075.1
12	74.3	73.2	37.2	37.2	33.8	12.7	12.8	12.9	12.9	13.0	13.0	98.0	79.6	78.6	77.1	78.1	68.2	68.2	68.7	65.1	69.2	70.6	67.5	42.3	12	GU474635.1
13	77.7	76.6	30.7	30.7	33.8	20.7	21.6	22.6	23.6	23.5	23.4	99.5	81.6	82.6	69.2	69.2	69.7	65.6	72.1	73.6	70.7	39.1	13	AY569692.1		
14	80.0	80.7	28.5	28.5	34.6	23.2	24.2	25.1	25.1	26.2	26.1	12.1	12.1	79.6	79.6	68.2	68.2	66.7	71.1	71.6	69.6	42.9	14	AJ310105.1		
15	77.4	78.1	35.0	35.0	38.5	21.8	22.9	21.0	21.0	21.1	23.8	23.8	16.9	21.3	97.0	65.2	65.2	65.7	66.1	67.2	68.2	68.6	42.9	15	AJ310103.1	
16	77.4	78.1	35.0	35.0	38.5	20.0	21.0	21.0	21.0	21.1	23.8	23.8	16.9	21.3	1.3	66.2	66.2	66.7	66.1	67.7	68.7	67.0	43.6	16	AJ310102.1	
17	72.0	70.8	32.8	32.8	31.8	38.8	38.7	36.6	36.6	38.0	39.8	41.0	36.6	37.8	39.0	39.0	100.0	99.0	80.4	68.7	69.2	63.4	39.7	17	NC_004035.1	
18	72.0	70.8	32.8	32.8	31.8	38.8	38.7	36.6	36.6	38.0	39.8	41.0	36.8	37.8	39.0	39.0	0.0	99.0	80.4	68.7	69.2	63.4	39.7	18	AJ310197.1	
19	74.0	72.8	30.7	30.7	31.8	37.6	37.6	35.5	35.5	36.8	38.7	39.8	35.7	37.8	37.8	37.8	1.3	1.3	81.5	69.7	70.1	64.4	39.7	19	AJ310198.1	
20	63.8	63.8	23.8	23.8	29.8	33.2	33.2	37.6	37.6	37.5	36.5	37.6	37.5	35.2	35.3	35.3	22.0	22.0	20.0	20.0	62.4	61.9	63.0	41.7	20	U57358.2
21	72.0	70.9	37.2	37.2	37.2	44.0	44.2	34.9	34.9	34.2	32.7	34.9	30.0	32.8	35.3	35.3	35.9	35.9	35.9	33.7	44.1	94.0	81.7	39.1	21	AJ001691.1
22	79.7	78.6	32.7	32.7	34.9	40.3	40.4	38.4	38.4	38.9	34.9	34.9	28.0	32.8	34.2	34.2	34.8	34.8	32.6	44.1	5.4	85.3	39.1	22	MDMVIRAN	
23	74.3	73.2	33.6	33.6	40.4	34.6	34.6	35.8	37.2	37.2	38.9	38.4	33.8	34.6	36.2	38.5	47.6	47.6	45.0	42.2	22.6	17.0	41.0	23	AM110758.1	
24	116.6	115.2	103.8	103.8	114.2	101.9	98.9	117.3	117.3	122.4	108.3	108.3	125.3	104.7	105.7	102.7	118.3	118.3	118.3	105.8	123.5	123.5	112.2	112.2	JGMV	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	EU914918.1	

شکل ۶- درصد شباهت و تفاوت جدایه MDMV ایران با پوتوی ویروس‌های غلات براساس هم‌دیفسازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده 6K1 توسط نرم‌افزار DNASTAR (MegAlign)



شکل ۷- درخت فیلوجنتیک رسم شده بهروش maximum-parsimony بر اساس ترادف نوکلئوتیدی قطعه ۳۴۶۰ جفت بازی انتهای ۵' ژنومی (شامل نواحی P1, P3, HC-Pro, P1-UTR) از جدایه‌های MDMV و سایر *Pennisetum* /Sorghum mosaic virus, SrMV /Sugarcane mosaic virus, SCMV (Johnson grass mosaic virus, WSMV) (Johnson grass mosaic virus, JGMV /mosaic virus, PeMV به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است).

REFERENCES

- Achon MA, Serrano L, Alanso-Duenas N, Porta C (2007) Complete genome sequences of Maize dwarf mosaic and Sugarcane mosaic virus isolates coinfecting maize in Spain. *Arch Virol.* 152: 2073–2078.
- Adams MJ, Antoniw JF, Beaudoin F (2005) Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Mol. Plant Pathol.* 6: 471–487.
- Chung WY, Miller WA, Atkins JF, Firth AE (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Microbiology.* 105: 5897-5902.
- Ha C, Coombs S, Revill PA, Harding RM, Vu M, Dale JL (2007) Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Arch. Virol.* 153:25-36.
- Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
- Jin Y, Ma D, Dong J, Li D, Deng C (2007) The HC-pro protein of potato virus Y interacts with NtMinD of tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 1505–1511.
- Kathrin P, Endre S, Gyongyver G, Ervin B (2010) Natural insertions within the N-terminal region of the coat protein of Maize dwarf mosaic potyvirus (MDMV) have an effect on the RNA stability. *Virus Gene.* 40:135-139.
- Maia IG, Haenni AL, Bernardi F (1996) Potyviral HC-Pro: A multifunctional protein. *J. Gen. Virol.* 77: 1335-1341.
- Masumi M, Zare A, Izadpanah K (2004) Analysis of 5'region of coat protein gene confirms presence of Maize dwarf mosaic virus (MDMV) in widely separated location in Iran. In: Proceeding of the secondary Iranian virology Congress. Iran, Tehran, 369-370.
- Masumi M, Zare A, Izadpanah K (2012) Biological, serological and molecular comparisons of potyviruses infecting poaceus plants in Iran. *Plant Pathology Iran.* 47:47-66.
- Moini A, Izadpanah K (2002) Identification and purification of a MDMV-like potyvirus of maize in Mazandaran. *Plant Pathology* 37: 147-159.
- Rajamaki ML, Kelloniemi J, Alminaitė A, Kekarainen T, Rabenstein F, Valkonen JP (2005) A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology.* 342: 88–101.
- Rohozkova J, Navratil M (2011) P1 peptidase – a mysterious protein of family Potyviridae. *J.Biosci.* 36: 189-200.
- Shen W, Yan P, Gao L, Pan X, Wu J (2010) Helper component-proteinase (HC-Pro) protein of Papaya ringspot virus interacts with *Papaya calreticulin*. *Mol Plant Pathol* 11: 335–346.
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Res.* 74: 157-175.
- Waltermann A, Maiss E (2006) Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus-infected *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol.* 87: 2381-6.
- Zare A, Masumi M, Izadpanah K (2005) Serological and biological properties of MDMV in Iran. In: Proceeding of the 16th Iranian plant protection Congress, Tabriz, Iran. 110.