

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۵، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۶

پراکنش و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های

ویروس موزائیک کلم‌گل از مزارع کلم‌گل ایران

Distribution and some biological and molecular properties of *Cauliflower mosaic virus* isolates from Iranian cauliflower fields

شیرین فرزادفر^{۱*}، غلامحسین مصاحبی^۱، علی آهون‌منش^۲، مینا کوهی حبیبی^۱،

کازوساتو اوشیما^۳، رضا پوررحیم^۴ و علی‌رضا گلنراقی^۵

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- آزمایشگاه ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ساگا، ژاپن

۴- بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

۵- گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

(تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۶، تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۸۷)

چکیده

به منظور تعیین پراکنش و مطالعه برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک کلم‌گل (*Cauliflower mosaic virus*-CaMV)، از ۳۲ مزرعه کلم‌گل (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) واقع در ۶ استان کشور بازدید به عمل آمد. نمونه برداری در فصول مختلف انجام و مجموعاً ۳۲۳ نمونه برگ کلم‌گل علائم‌دار جمع‌آوری گردید. این نمونه‌ها با روش سرولوژیکی الایزا و به کمک آنتی‌بادی اختصاصی CaMV مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج آزمون سرولوژیکی با استفاده از آزمون‌های بیولوژیکی و نیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس مورد تأیید قرار گرفت. بر اساس آزمون الایزا، ۲۹۲ نمونه کلم‌گل (۹۰/۴ درصد) به

* Corresponding author: farzadfar2002@yahoo.com

شیرین فرزادفر، غلامحسین مصاحبی، علی آهونمنش، مینا کوهی حبیبی، کازوساتو اوشیما، رضا پوررحیم و علیرضا گلنراقی

CaMV آلوده بودند. میزان آلودگی در مزارع نمونه برداری شده بین ۶۳/۶ تا ۱۰۰ درصد متفاوت بود. خصوصیات بیولوژیکی ۲۱ جدایه از مناطق مختلف و با شدت علائم متفاوت، بر اساس بیماریزایی آن‌ها روی شلغم (*Brassica rapa*)، داتوره (*Datura stramonium*) و کلم قمری (*Brassica oleracea var. gongyolodes*) مورد مطالعه قرار گرفت. این جدایه‌ها روی شلغم علائم متفاوتی شامل لکه‌های موضعی و پس از آن رگ‌روشنی، موزائیک، رگ‌نواری، چین خوردگی و بازماندن از رشد ایجاد نمودند. شدت علائم سیستمیک ایجاد شده بسته به جدایه مورد بررسی متفاوت بود. برخلاف شلغم، علائم ایجاد شده در کلم قمری محدود به برگ‌های پایینی و مایه‌زنی شده بود و شدت علائم نیز در مقایسه با شلغم بسیار خفیف‌تر بود. تمامی گیاهان کلم قمری مایه‌زنی شده با جدایه‌های مورد نظر حالت بهبودی نشان داده و علائم در برگ‌های بالایی مشاهده نشد. یازده جدایه در گیاه داتوره نیز لکه‌های موضعی ایجاد نموده و دو جدایه علاوه بر ایجاد لکه موضعی، این میزبان را بصورت سیستمیک آلوده نمودند. همه ۲۱ جدایه CaMV با شته سبز هلو (*Myzus persicae*) منتقل گردیدند. برای تجزیه مولکولی و رسم درخت تبارزایی، ژن شماره شش (ORFVI) مربوط به نه جدایه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، تکثیر و تعیین ترادف گردید. نتایج بدست آمده، نشان‌دهنده یکنواختی بالای این ناحیه (۹۶/۹ تا ۱۰۰ درصد) در بین جدایه‌های ایرانی بود. مقایسه این ترادف‌ها با ترادف‌های موجود در بانک ژن نشان داد که این جدایه‌ها دارای بیشترین یکنواختی (۹۶/۱ تا ۹۶/۷ درصد) با جدایه D/H (از مجارستان) می‌باشند. بر اساس تجزیه تبارزایی، جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه در گروه جدایه‌های غیر آمریکای شمالی و در یک شاخه جداگانه قرار گرفتند. همچنین با استفاده از آنزیم برشی Hpy99I، جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه از سایر جدایه‌های خارجی، کاملاً تفکیک شدند.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزائیک کلم‌گل، ژن شماره ۶ ویروس موزائیک کلم‌گل، ترادف

مقدمه

تاکنون ویروس‌های متعددی از گیاهان تیره کلم گزارش شده‌اند که از آن جمله می‌توان به ویروس موزائیک شلغم (*Turnip mosaic virus-TuMV-Potyvirus*)، ویروس موزائیک کلم‌گل

پراکنش و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ویروس موزائیک کلم گل از مزارع کلم گل ایران

Turnip crinkle virus (-) شلغم (*Cauliflower mosaic virus-Caulimovirus*)، ویروس چروکیدگی شلغم (*Turnip rosette virus-TuRV-Sobemovirus*)، ویروس وردمانی شلغم (*Turnip yellow mosaic virus-TuYMV-Tymovirus*)، ویروس زردی شلغم (*Turnip yellows virus-TuYV-TYV*) و ویروس موزائیک تربچه (*Radish mosaic virus* (-) *RaMV-Comovirus*) اشاره نمود. ویروس موزائیک کلم گل یکی از مهم‌ترین عوامل خسارتزا و کاهش عملکرد در این محصولات بوده و در هر کجا که این نوع گیاهان کشت می‌شوند، یافت می‌گردد. گیاهان آلوده از رشد کمی برخوردارند و میزان گل‌دهی و تولید بذر در آن‌ها به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. کاهش میزان محصول بویژه در ارقام مختلف کلم گل بین ۲۰ تا ۵۰ درصد گزارش شده است (Sutic et al., 1999; Shepherd, 1981). ویروس موزائیک کلم گل عضو تیپ جنس *Caulimovirus* از خانواده *Caulimoviridae* می‌باشد (Haas et al., 2002). پیکره‌های این ویروس چند وجهی (ایزومتریک)، با قطر ۵۰ نانومتر بوده و از ۴۲۰ زیر واحد پروتئین پوششی تشکیل شده است. ژنوم CaMV از نوع دی.ان.ای دولای حلقوی به اندازه ۸ کیلو جفت‌باز است که از شش چارچوب ژنی (open reading frame-ORF) تشکیل شده است (Haas et al., 2002). تکثیر آن با استفاده از نسخه‌برداری برگردان (reverse transcription) از روی یک آر.ان.ای حدواسط (RNA intermediate) انجام می‌گیرد (Haas et al., 2002; Mason et al., 1987).

در گیاهان تیره کلم آلوده به CaMV، دامنه متفاوتی از علائم مانند سبزدی (chlorosis)، موزائیک (mosaic)، رگ‌روشنی (vein clearing)، بدشکلی برگ (leaf deformation) و بازماندن از رشد (stunting) ایجاد می‌گردد (Shepherd, 1981). کلیه جدایه‌های این ویروس قادر به ایجاد آلودگی در گیاهان تیره کلم هستند، ولی برخی از جدایه‌ها مانند D4 و W260 می‌توانند تعدادی از گونه‌های متعلق به جنس *Datura* و *Nicotiana* از تیره سیب‌زمینی را نیز آلوده نمایند (Qiu et al., 1997; Qiu & Schoelz, 1992; Anderson et al., 1991; Daubert & Routh, 1990; Daubert et al., 1984). در طبیعت چندین شته از جمله شته سبز هلو (*Myzus persicae* Sulzer) به عنوان ناقل فعال برای CaMV شناخته شده‌اند (Palacios et al., 2002; Kennedy et al., 1962) این ناقلین ویروس را بروش ناپایا (non-persistent manner) و با استفاده از استراتژی کمکی

شیرین فرزادفر، غلامحسین مصاحبی، علی آهونمنش، مینا کوهی حبیبی، کازوساتو اوشیما، رضا پوررحیم و علیرضا گلنراقی

(helper strategy) منتقل می‌کند (Gray & Banerjee, 1999; Pirone & Blanc, 1996). بررسی‌های انجام گرفته نشان داده است که محصول ژن شماره دو (P2) برای انتقال ویروس لازم می‌باشد (Blanc *et al.*, 2001; Al-Kaff *et al.*, 1997; Al-Kaff & Covey, 1994). البته برخی از جدایه‌های CaMV با شته منتقل نمی‌شوند (Lung & Pirone, 1973). عدم انتقال با شته در جدایه‌های Campbell و CM1841 به دلیل جهش در نوکلئوتیدهای ۹۴ و ۱۰۵ بوده که به ترتیب موجب تغییر اسیدآمینه گلایسین به آرژنین و ایزولوسین به والین می‌گردد (Al-Kaff & Covey, 1994; Al-Kaff *et al.*, 1997). تا کنون گزارشی از انتقال این ویروس با بذر یا دانه گرده ارائه نشده است (Blanc *et al.*, 2001). جدایه‌های CaMV بر اساس واکنش روی گیاهان محک مختلف از جمله شلغم، کلم‌قمری و برخی از گونه‌های متعلق به جنس *Nicotiana* و *Datura* از تیره سیب‌زمینی (Lung & Pirone, 1972; Schoelz *et al.*, 1986; Al-Kaff & Covey, 1995) و نیز بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن شماره ۶ (ORF VI) گروه‌بندی شده‌اند. این ژن در مقایسه با دیگر ژن‌های این ویروس، بیشترین تنوع (variation) را نشان داده (Chenault & Melcher, 1994b) و به همین دلیل برای مقایسه جدایه‌های CaMV مورد استفاده قرار گرفته است (Pique *et al.*, 1991; Sanger *et al.*, 1991; Chenault & Melcher, 1994a). در سال‌های اخیر، سطح زیر کشت محصولات تیره کلم بخصوص کلم‌گل در ایران افزایش یافته است، به طوری که سطح زیر کشت این محصول از ۸۰۰ هکتار با تولید ۲۰ هزار تن در سال ۲۰۰۰، به ۱۰۰۰ هکتار با تولید ۲۵ هزار تن در سال ۲۰۰۳ رسیده است (Anonymouos, 2000, 2003). آلودگی کلم‌گل با CaMV قبلاً از ایران گزارش شده است (Farzadfar *et al.*, 2005)، ولی تا کنون در خصوص پراکنش، خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ایرانی این ویروس از کلم‌گل مطالعه‌ای انجام نگرفته است. در این تحقیق علاوه بر تعیین پراکنش CaMV در مزارع کلم‌گل، خصوصیات بیولوژیکی ۲۱ جدایه بر اساس بیماری‌زایی روی شلغم (*Brassica rapa*)، داتوره (*Datura stramonium*) و کلم‌قمری (*Brassica oleracea var. gongylodes*) و نیز قابلیت انتقال آن‌ها با شته مورد مطالعه قرار گرفت. جهت بررسی خصوصیات مولکولی، ژن شماره شش (ORF VI) مربوط به نه جدایه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (polymerase chain reaction, PCR) تکثیر و پس از همسانه‌سازی در باکتری *Escherichia coli*، تعیین ترادف شدند. این نتایج که

پراکنش و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ویروس موزائیک کلم گل از مزارع کلم گل ایران

برای اولین بار در مورد جدایه‌های ایرانی CaMV بدست آمده است، با اطلاعات موجود در مورد سایر جدایه‌ها مقایسه گردید.

روش بررسی

نمونه برداری و آزمون الایزا: در مجموع، ۳۲۳ نمونه برگگی از گیاهان کلم گل، با علائم موزائیک (mosaic)، پیسک (mottling)، نکروز (necrosis)، چین خوردگی (rugosity)، بازماندن از رشد (stunting)، بدشکلی برگ (leaf deformation) و رگ‌نوازی (vein banding) از ۳۲ مزرعه واقع در استان‌های آذربایجان غربی، اصفهان، فارس، خراسان، تهران و قزوین جمع‌آوری گردیدند (جدول ۱). در غالب موارد زمان نمونه برداری به نحوی تنظیم گردید که گیاهان رویشی در مزرعه در اواسط سن خود در فصل رویشی باشند. این نمونه‌ها پس از شماره‌گذاری، در کیسه‌های پلاستیکی جداگانه قرار داده شده و تا انجام آزمون‌های بعدی، در شرایط چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آزمون الایزا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی تهیه شده علیه CaMV (Loewe, Germany) و روش توصیف شده توسط Adams و Clark (۱۹۷۷) انجام گرفت. میزان جذب نور هر چاهک در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه microplate reader (Multiscan-334, Lab system, Finland) اندازه‌گیری گردید. نمونه‌هایی که میزان جذب چاهک مربوطه مساوی یا بیش از سه برابر میانگین جذب چاهک شاهد منفی (سالم) بود، به عنوان نمونه آلوده (مثبت) ارزیابی شدند.

مطالعه دامنه میزبانی: برای مطالعه تنوع بیولوژیکی، ۲۱ جدایه CaMV از کلم گل، با شدت علائم متفاوت و از مناطق مختلف، انتخاب شدند (جدول ۲). آلودگی این نمونه‌ها قبلاً با استفاده از روش الایزا تأیید شده بود. نمونه‌های مورد نظر در بافر فسفات ۰/۱ مولار، حاوی ۰/۰۲ درصد ۲-مرکاپتواتانول عصاره‌گیری شده و خالص‌سازی بیولوژیکی آن‌ها، طی سه بار مایه‌زنی تک لکه (single lesion) روی شلغم (*Brassica rapa*) انجام گرفت. این جدایه‌ها در گیاه تربچه (*Raphanus sativus*) تکثیر شدند. برای ارزیابی جدایه‌ها، ۴-۶ بوته از گیاه شلغم، کلم قمری (*Brassica oleracea var. gongylodes*) و داتوره (*Datura stramonium*) با هر یک مایه‌زنی

شیرین فرزادفر، غلامحسین مصاحبی، علی آهونمنش، مینا کوهی حبیبی، کازوساتو اوشیما، رضا پوررحیم و علیرضا گلنراقی

شدند (Schoelz *et al.*, 1986; Lung & Pirone, 1972; Al-Kaff & Covey, 1995). گیاهان در مرحله چهار تا شش برگی مایه‌زنی شده و در شرایط گلخانه‌ای تا سه ماه نگهداری شده و مورد بررسی قرار گرفتند. آلودگی بوته‌های مورد نظر بر اساس علائم ایجاد شده و نیز با استفاده از آزمون الایزا مورد تأیید قرار گرفت.

انتقال با شته: در مجموع، نه جدایه بر اساس نوع و شدت علائم مزرعه‌ای و نیز واکنش روی سه میزبان شلغم، کلم قمری و داتوره انتخاب شده (جدول ۲ و ۳) و قابلیت آن‌ها در انتقال با شته مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون، از شته سبز هلو (*M. persicae*) و روش توصیفی (Feres *et al.*, 1993) استفاده گردید. شته‌های سالم که به مدت یک ساعت گرسنگی داده شده بودند، به مدت ۱۰ دقیقه از بوته‌های شلغم آلوده به CaMV که سه هفته از مایه‌زنی آن‌ها گذشته بود، تغذیه نمودند. سپس این شته‌ها به بوته‌های جوان شلغم سالم انتقال داده شده و پس از ۲۴ ساعت تغذیه، با استفاده از سم کنفیدور (Bayer, Germany) از بین برده شدند. برای هر گیاه از پنج تا هفت شته و برای هر جدایه، حداقل ۱۰ بوته شلغم مورد آزمون قرار گرفت. به منظور اثبات آلودگی CaMV در بوته‌های شلغم مایه‌زنی شده با شته، از آزمون الایزا و PCR استفاده گردید.

استخراج اسید نوکلئیک کل گیاه: به منظور تکثیر ORF VI و ORF II مربوط به هر یک از جدایه‌های انتخاب شده در مرحله قبل (جدول ۲)، ابتدا این جدایه‌ها در گیاه شلغم تکثیر و سپس اسید نوکلئیک کل آن‌ها (total nucleic acid) استخراج گردید. برای این منظور، حدود سه هفته پس از مایه‌زنی هر یک از جدایه‌ها، یک گرم برگ از بوته‌های آلوده شلغم علائم‌دار جمع‌آوری و در یک میلی‌لیتر از بافر تریس (250 mM NaCl, 0.25% SDS, 30 mM EDTA, and 100 mM Tris, pH 8) عصاره‌گیری شد. به هر میلی‌لیتر از عصاره بدست آمده، ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۱۰ mg/ml) اضافه گردید و سپس به مدت یک ساعت در ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. عصاره مورد نظر با یک حجم آب مقطر استریل، رقیق شده و پس از ده دقیقه قرار گرفتن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، بلافاصله به روی یخ منتقل و سپس به مدت پنج دقیقه در ۱۳۰۰۰g سانتریفوژ گردید. از رانشین (supernatant) بدست آمده برای انجام آزمون PCR استفاده شد (Agama *et al.*, 2002). همین مراحل برای نمونه شاهد (شلغم سالم) نیز انجام

پراکنش و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ویروس موزائیک کلم‌گل از مزارع کلم‌گل ایران

گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ده میکرولیتر نوکلئیک اسید استخراجی از گیاه، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای بالادست و پایین‌دست (۲۰ pmol/ μ l)، پنج میکرولیتر از ۱۰X بافر تریس (۲۰۰ mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ mM)، یک میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ mM) و یک میکرولیتر از آنزیم *Taq* DNA-polymerase (۵ unit، سیناژن) انجام گرفت. در این آزمون، از آغازگرهای CM42F (5'-TCGCTGCAACGGCTTCTAAG-3') و CM42R (5'-GGAAACAGTGCTTCATCCTC-3') به منظور تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۷۲۴ جفت‌باز، مربوط به چارچوب ژنی شماره ۲ (ORF II) استفاده شد (Agama et al., 2002). برنامه PCR مورد استفاده شامل پنج چرخه تکثیر اولیه با برنامه ۹۵°C، ۳۰ ثانیه، ۳۵.۹۰°C، ۳۰ ثانیه و ۷۲°C، ۴۰ ثانیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه با برنامه ۹۴°C، ۳۵ ثانیه، ۴۵°C، ۳۰ ثانیه و ۷۲°C، ۴۰ ثانیه بود. همچنین برای تکثیر ژن شماره ۶ (ORF VI)، از دو آغازگر CaMV6F (5-ACGCGTCGACATGGAGAACATAGAAAAA-3) و CaMV6R (5-ACGCGTCGACTCAATCCACTTGCTTTGAA-3) استفاده گردید. این آغازگرها قطعه‌ای به طول ۱۵۸۰ جفت‌باز مربوط به ناحیه ORF VI را تکثیر می‌نمایند. برنامه مورد استفاده با این جفت‌باز شامل ۹۴°C، ۲ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل ۹۴°C، ۳۰ ثانیه، ۴۵°C، ۱/۵ دقیقه، ۷۲°C، یک دقیقه و در پایان ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به کمک دستگاه PCR (Primus, MWG Biotech. Co., Germany) انجام گرفت. محصولات بدست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به همراه مارکر مولکولی (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3, Fermentas, Lithuania) در ژل آگاروز یک درصد حاوی ۱ μ g/ml اتیدیوم بروماید در ۱۰۰ ولت ثابت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شده (Sambrook et al., 1989) و ژل در نور ماوراءبنفش با استفاده از دستگاه UV-illumination (Imago, The Netherlands) مورد ارزیابی و عکس‌برداری قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده در این آزمون، توسط شرکت MWG Biotech (آلمان) ساخته شدند.

همسانه‌سازی و تعیین ترادف: در مورد هر یک از نه جدایه مورد بررسی (جدول ۴)،

شیرین فرزادفر، غلامحسین مصاحبی، علی آهونمنش، مینا کوهی حبیبی، کازوساتو اوشیما، رضا پوررحیم و علیرضا گلنراقی

قطعه دی.ان.ای مربوط به ORF VI بدست آمده طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، با استفاده از کیت Nucleospin (Macherey-Nagel, Germany) و طبق روش توصیه شده توسط سازنده کیت، از سایر اجزای واکنش PCR جدا شد. قطعه مورد نظر با استفاده از کیت pGEM-T Easy vector (Promega Corp, USA) به پلاسمید pGEMT مطابق با دستورالعمل ارائه شده، الحاق (insertion) گردید. محصول واکنش لیگاسیون به روش کلرید کلسیم و شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه) به سلول‌های *Escherichia coli* DH5α پذیرنده دی.ان.ای (competent) منتقل شد (Sambrook *et al.*, 1989). پس از کشت سلول‌های باکتری تراریخت (transformed) در محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، کلنی‌های سفید مقاوم به آمپی‌سیلین انتخاب و دی.ان.ای پلاسمیدی بروش هضم قلبایی (Sambrook *et al.*, 1989) از ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت سلول‌های (کشت ۱۲ ساعته) تراریخت، استخراج گردید. به منظور اطمینان از وجود قطعه الحاقی در پلاسمیدهای استخراجی، پلاسمیدها با آنزیم برشی *EcoRI* (سیناژن) به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شده و سپس محصول هضم آنزیمی در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شد. از هر جدایه، سه پلاسمید نو ترکیب انتخاب و برای تعیین ترادف به شرکت MWG Biotech در آلمان ارسال گردید. ترادف‌های تعیین شده در مورد جدایه‌های ایرانی با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information)، با یکدیگر و با ترادف‌های ثبت شده در بانک ژن (GenBank) مقایسه شدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه (multiple sequence alignment)، با برنامه ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) و با استفاده از نسخه شماره ۵ برنامه MegAlign بسته نرم‌افزاری DNASTAR (DNASTAR, Madison, WI, USA) انجام گردید (Burland, 2000). سپس به کمک نرم افزار TreeView (version 1.5.2) درخت تبارزایی رسم شد. در این مطالعه، از *Horseradish latent virus-HRLV-Caulimovirus* به عنوان برون‌گروه (outgroup) استفاده گردید. همچنین جهت تعیین آنزیم یا آنزیم‌های برشی (restriction enzyme) احتمالی برای تفکیک جدایه‌های ایرانی از سایر جدایه‌های CaMV (جداول ۳ و ۴) از نسخه شماره ۵ برنامه Mapdraw (DNASTAR, Burland, 2000) استفاده گردید.

پراکنش و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ویروس موزائیک کلم گل از مزارع کلم گل ایران

نتیجه و بحث

نمونه برداری و آزمون الایزا: نتایج بدست آمده از نمونه برداری در جدول شماره یک آمده است. این ویروس در تمامی ۳۲ مزرعه کلم گل مورد نمونه برداری، ردیابی گردید. از میان ۳۲۳ نمونه علائم دار، ۲۹۲ نمونه (۹۰/۴ درصد) با آنتی بادی اختصاصی تهیه شده علیه CaMV واکنش مثبت نشان دادند. ولی میزان وقوع این ویروس در مناطق مختلف و نیز در مزارع واقع در این مناطق با یکدیگر متفاوت بود (جدول ۱).

مطالعه دامنه میزبانی: تنوع بیولوژیکی جدایه‌های ایرانی جمع‌آوری شده از جمعیت‌های طبیعی CaMV، با استفاده از علائم مشخصه و متمایز کننده این ویروس روی دو میزبان شلغم (*B. rapa*) و کلم قمری (*B. oleracea* var. *gongylodes*) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای تعیین جدایه‌های آلوده کننده گیاهان تیره سیب‌زمینی، از گیاه محک *D. stramonium* استفاده شد. علائم ایجاد شده روی دو میزبان شلغم (جدول ۲) و کلم قمری (جدول ۳) مطابق با روش ارائه شده توسط Al-Kaff و Covey (۱۹۹۵) ارزیابی شدند. در مورد هر جدایه، علائم حاصله از مایه‌زنی آن در تکرارهای مختلف از هر گیاه محک یکسان بود. تمامی ۲۱ جدایه مورد بررسی، گیاه شلغم را آلوده نمودند. در گیاهان شلغم مایه‌زنی شده، ابتدا علائم لکه موضعی سبزرده ایجاد گردید. جدایه‌های مختلف از نظر قطر لکه‌های موضعی ایجاد شده، تفاوت نشان دادند. در شش جدایه Ca-Az22، Ca-Az20، Ca-CT4، Ca-CE1، Ca-V98 و Ca-CVa5 لکه‌های موضعی ریز و مشخص با قطر ۱-۲ میلی‌متر و در بقیه جدایه‌ها، لکه‌های درشت و مشخص با قطر ۳ تا ۴ میلی‌متر تولید گردید (شکل ۱A و ۱B). هیچ یک از جدایه‌ها روی این میزبان لکه‌های بزرگ و پخش شده (diffuse) تولید نکردند. از نظر زمان ظهور لکه‌های موضعی، جدایه‌ها در دو گروه (۷ تا ۱۰ روز و ۱۰ تا ۱۵ روز پس از مایه‌زنی) قرار گرفتند. متعاقباً علائم سیستمیک در برگ‌های جوان به ترتیب ۱۰ تا ۱۵ روز و ۱۵ تا ۲۰ روز پس از مایه‌زنی و با ایجاد رگ‌روشنی آغاز گردید. علائم رگ‌روشنی تولید شده در این جدایه‌ها متنوع و به سه گروه شامل مشخص (distinct) (شکل ۱C)، خفیف (mild) (شکل ۱D) و خیلی خفیف (very mild) تقسیم گردید. بر این اساس، اکثر جدایه‌های CaMV مورد مطالعه (۱۲ جدایه) در گروه یک، هفت جدایه در گروه دو و جدایه‌های Ca-CAz26 و Ca-CAz20 در گروه سه قرار

شیرین فرزادفر، غلامحسین مصاحبی، علی آهونمنش، مینا کوهی حبیبی، کازوساتو اوشیما، رضا پوررحیم و علیرضا گلنراقی

گرفتند. توسعه بعدی علائم با ایجاد رگ‌نواری، موزائیک، چروکیدگی و بازماندن از رشد همراه بود. همان‌طور که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است، بیشتر جدایه‌های CaMV از نظر نوع علائم رگ‌نواری ایجاد شده در شلغم، در یک گروه قرار گرفته و تولید علائم رگ‌نواری پهن (wide) نمودند (شکل ۱E). در شش جدایه، شدت علائم رگ‌نواری متوسط (normal) (شکل ۱F) و در سه جدایه (Ca-CAz22، Ca-CSH216 و Ca-CMo1)، این علائم در مقایسه با دیگر جدایه‌ها خفیف‌تر (fine) (شکل ۱G) بود. علاوه بر علائم برگگی، بوته‌های شلغم آلوده با CaMV در مقایسه با گیاه سالم از رشد کمتری برخوردار بودند. در هیچ یک از جدایه‌ها علائم بازماندن از رشد، از نوع خیلی شدید (very severe) نبود. این علائم از حالت شدید تا خفیف و در یک مورد (جدایه Ca-CKh64) خیلی خفیف، متفاوت بود. شدت چین‌خوردگی (rugosity) و چروکیدگی برگ‌ها نیز از دیگر علائمی بود که در بوته‌های آلوده مشاهده و مورد مقایسه قرار گرفت. میزان بدشکلی و چین‌خوردگی در جدایه‌ها بیشتر از نوع چین‌خوردگی و نیز حالت تخت (flat) بود. حالت چین‌خوردگی و کاهش شدید رگبرگ‌ها (wrinkling) در هیچ کدام از جدایه‌های CaMV مورد مطالعه دیده نشد. علائم ایجاد شده در دو میزبان کلم‌قمری و داتوره نیز برای این ۲۱ جدایه ارزیابی گردید (جدول ۳). فقط برخی از جدایه‌های مورد بررسی، دو میزبان کلم‌قمری و داتوره را آلوده نمودند. در این گیاهان نیز ابتدا لکه‌های موضعی ایجاد گردید. لکه‌های موضعی ایجاد شده در کلم‌قمری از نوع سبزرده، بزرگ و پخش شده (diffuse) (شکل ۱H) و در داتوره، نکروزه، بزرگ و مشخص (شکل ۱L) بود. جدایه‌های Ca-CKh64، Ca-CV98، Ca-CK75 و Ca-CK52 بدون ایجاد علائم لکه موضعی، علائم سیستمیک رگ‌روشنی (شکل ۱I) و رگ‌نواری (شکل ۱J) را در کلم‌قمری ایجاد نمودند، ولی شدت این علائم در مقایسه با شلغم خفیف‌تر بود. همچنین علائم سیستمیک فقط به برگ‌های مایه‌زنی شده محدود بوده و توسعه بعدی آن‌ها در برگ‌های بالایی مشاهده نگردید. از میان ۱۲ جدایه‌ای که در داتوره لکه موضعی ایجاد نمودند، تنها دو جدایه (Ca-CK52 و Ca-CQ50) این میزبان را به صورت سیستمیک آلوده نمودند (شکل ۱K).

انتقال با شته: تمامی ۲۱ جدایه مورد بررسی، توسط شته *M. persicae* به شلغم منتقل شدند. حدود دو هفته پس از تغذیه شته‌های آلوده، در بوته‌های شلغم علائم رگ‌روشنی،

پراکنش و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ویروس موزائیک کلم گل از مزارع کلم گل ایران

موزائیک و بدشکلی در برگ‌ها ظاهر گردید. آلودگی بوته‌های شلغم با آزمون الایزا و PCR مورد تأیید قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تعیین ترادف و آنالیز ترادف‌های بدست آمده: در آزمون PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ORF VI و ORF VI، به ترتیب قطعات ۷۲۴ و ۱۵۸۰ جفت‌بازی تولید گردید (شکل ۲). اندازه این قطعات در همه جدایه‌های مورد بررسی مشابه بود. همچنین در آزمون مربوط به بافت سالم هیچ بانندی تشکیل نگردید. ترادف‌های ORF VI مربوط به نه جدایه ایرانی CaMV، تحت شماره‌های DQ870907، DQ119041، DQ119040، DQ870908، DQ870910، DQ870912، DQ870914، DQ870915 و EF503597 در بانک ژن ثبت گردید (جدول ۴). جستجو با استفاده از ابزار BLAST نیز تأیید نمود که این ترادف‌ها با ORF VI ویروس موزائیک کلم گل مطابقت دارند. همچنین هم‌ردیف‌سازی چندگانه این ژن در برنامه CLUSTAL W نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه، دارای ۹۶/۹ تا ۱۰۰ درصد یکنواختی (identity) می‌باشند. مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ORF VI جدایه‌های ایرانی با ترادف‌های گزارش شده در مورد سایر جدایه‌ها، نشان داد که جدایه‌های ایرانی دارای بیشترین مشابهت با جدایه D/H از مجارستان (۹۶/۷-۹۶/۱ درصد) و کمترین مشابهت با جدایه XinJing از چین (۸۳/۷-۸۴/۴ درصد) می‌باشند.

در دندروگرام حاصل از مطالعات تبارزایی بر اساس ORF VI، تمامی جدایه‌های ایرانی در یک شاخه قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های متعلق به آمریکای شمالی (North-American) و جدایه B29 از فرانسه، یک شاخه جداگانه تشکیل دادند. در این درخت تبارزایی، جدایه‌های Cabbage S همراه W260، S-Japan، Bari 1 و XinJing نیز هر یک در شاخه جداگانه‌ای قرار گرفتند (شکل ۳). میزان مشابهت جدایه‌های ایرانی در سطح آمینواسید بین ۹۶/۱ تا ۱۰۰ درصد بدست آمد. بر اساس نتایج حاصله از مقایسه ترادف آمینواسیدی استنتاجی محصول ORF VI، جدایه‌های ایرانی به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مشابهت با جدایه D/H (۹۴/۵-۹۵/۹ درصد) و XinJing (۸۲/۳-۸۱/۳ درصد) بودند.

بررسی چندشکلی طولی با آنزیم‌های برشی (RFLP) آزمایشی ترادف نوکلئوتیدی ORF VI در جدایه‌های ایرانی و غیر ایرانی با استفاده از برنامه Mapdraw نشان داد که آنزیم برشی

شیرین فرزادفر، غلامحسین مصاحبی، علی آهونمنش، مینا کوهی حبیبی، کازوساتو اوشیما، رضا پوررحیم و علیرضا گلنراقی

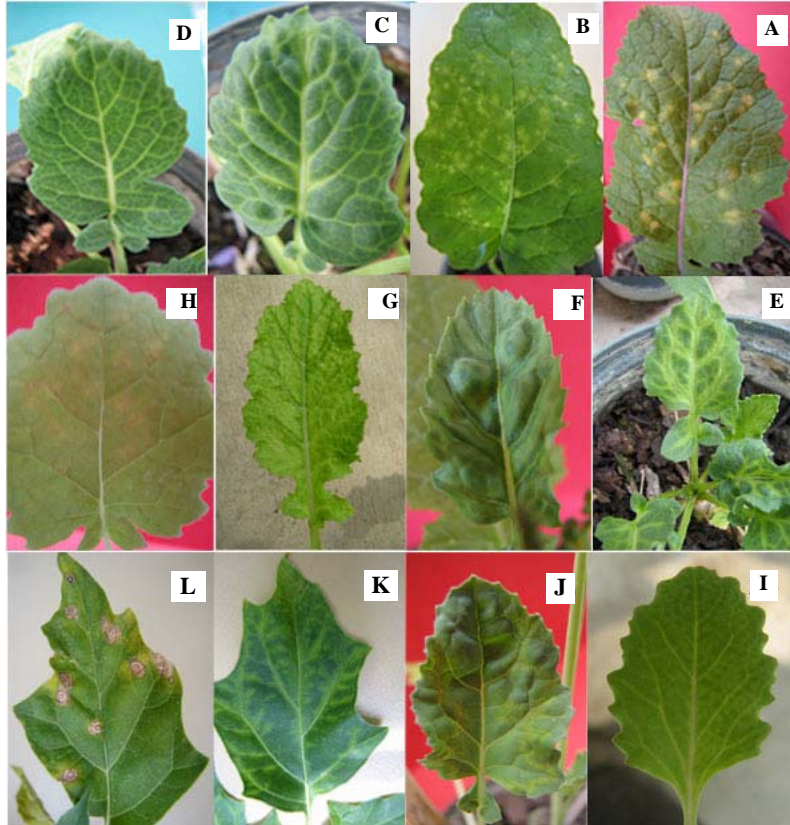
Hpy99I (Biolab, England) می‌تواند برای تفکیک جدایه‌های ایرانی از سایر جدایه‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در نقشه حاصل از هضم آنزیمی ORF VI جدایه‌های مختلف CaMV توسط *Hpy99I* از صفر تا ۳ جایگاه برشی شناسایی گردید. بر این اساس، جدایه‌های مطالعه شده به هشت گروه تقسیم شدند. تمامی نه جدایه ایرانی مورد بررسی، دارای سه جایگاه برشی با *Hpy99I* در موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۴۰۸، ۷۷۱ و ۱۴۵۸ بوده و در گروه VIII قرار گرفتند. اکثر جدایه‌های آمریکای شمالی همراه با B29 در گروه I و جدایه‌های Cabb B-JI، Bari 1، Cabbage، D/H، S، S-Japan و XinJing به ترتیب در گروه‌های II تا VII قرار گرفتند (جدول ۵). هر نه جدایه ایرانی مورد بررسی پس از تیمار با آنزیم *Hpy99I*، قطعاتی با وزن مولکولی مورد انتظار تولید نمودند (شکل ۴).

در این تحقیق، پراکنش CaMV در مزارع کلم گل شش استان مورد بررسی قرار گرفت. از میان ۳۲۳ نمونه جمع‌آوری شده از ۳۲ مزرعه، ۲۹۲ نمونه (۹۰/۴ درصد) با آنتی‌بادی اختصاصی CaMV واکنش مثبت نشان دادند. نتایج بدست آمده از آزمون الیزا نشان دهنده گسترش این ویروس در مزارع کلم گل بود. ویروس CaMV در تمامی مزارع بازدید شده ردیابی گردید. با این حال وقوع آلودگی در مزارع مختلف (بین ۶۳/۶ تا ۱۰۰ درصد) تفاوت زیادی داشت (جدول ۱). این اختلاف می‌تواند ناشی از زمان نمونه‌برداری و نیز عوامل اکولوژیکی متعددی مانند حضور و فراوانی منابع نگه‌دارنده ویروس باشد. معمولاً در کشور، گیاهان تیره کلم طی دو فصل بهار و پاییز کشت و به ترتیب در تابستان و زمستان برداشت می‌شوند. به این ترتیب منابع آلودگی طی فصول مختلف سال حفظ شده و به گسترش بعدی این ویروس کمک می‌کنند. از سوی دیگر، این گیاهان دو ساله بوده و کشاورزان به منظور تهیه بذر، از برداشت آن‌ها خودداری می‌کنند. چنانچه این گیاهان بذری، آلوده به ویروس باشند، منبع خوبی برای حفظ ویروس و نیز ناقلین آن محسوب می‌شوند. از دیگر عوامل می‌توان به شرایط محیطی، تناوب زراعی و دیگر فعالیت‌های زارعی، شته‌های ناقل و جهت باد که میزان جابجایی و انتقال شته‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، اشاره نمود.

پراکنش و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ویروس موزائیک کلم گل از مزارع کلم گل ایران

شکل ۱- علائم ایجاد شده توسط جدایه‌های ایرانی CaMV روی شلغم، کلم قمری و داتوره

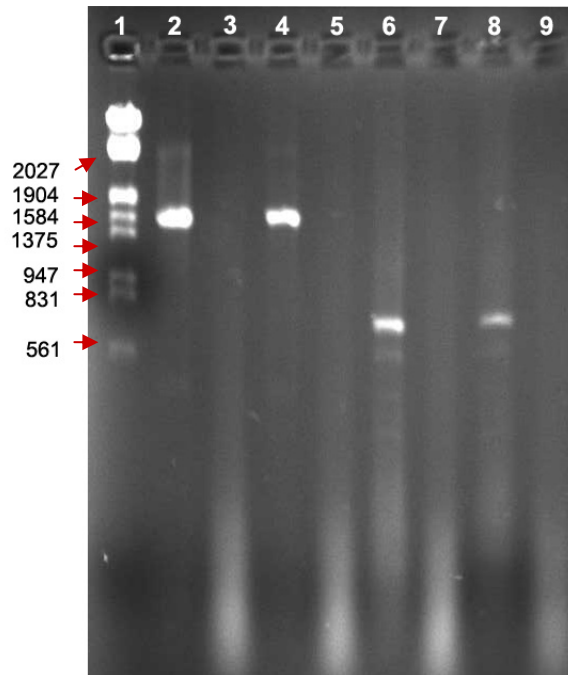
Fig. 1 (A-L). Symptoms caused by Iranian isolates of CaMV on turnip, kohlrabi and jimpson weed



- A: Large chlorotic local lesions (3-4 mm) in turnip
- B: Small chlorotic local lesions (1-2 mm) in turnip
- C: Vein clearing (distinct) in turnip
- D: Vein clearing (mild) in turnip
- E: Vein banding (wide) in turnip
- F: Vein banding (normal) in turnip
- G: Vein banding (fine) in turnip
- H: Chlorotic local lesion (diffuse) in kohlrabi
- I: Vein clearing (mild) in kohlrabi
- J: Vein banding (fine) in kohlrabi
- K: Vein banding in jimpson-weed
- L: Necrotic local lesion in jimpson-weed

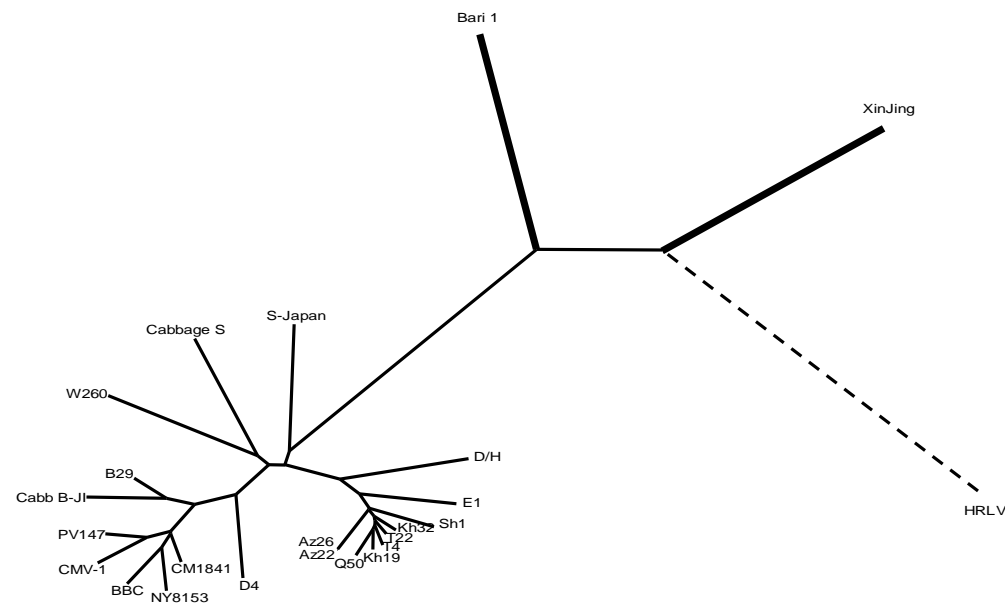
- A: لکه‌های موضعی سبزرده بزرگ (۳ تا ۴ میلی‌متر) در شلغم
- B: لکه‌های موضعی سبزرده کوچک (۱ تا ۲ میلی‌متر) در شلغم
- C: رگ‌روشنی مشخص در شلغم
- D: رگ‌روشنی خفیف در شلغم
- E: رگ‌نواری پهن در شلغم
- F: رگ‌نواری متوسط در شلغم
- G: رگ‌نواری خفیف در شلغم
- H: لکه موضعی پخش شده در کلم قمری
- I: رگ‌روشنی خفیف در کلم قمری
- J: رگ‌نواری خفیف در کلم قمری
- K: رگ‌نواری در داتوره
- L: لکه موضعی نکروتیک در داتوره

شیرین فرزادفر، غلامحسین مصاحبی، علی آهونمنش، مینا کوهی حبیبی، کازوساتو اوشیما، رضا پوررحیم و علیرضا گلنراقی



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول PCR مربوط به ORF VI و ORF II دو جدایه ایرانی Ca-CQ50 و Ca-CKh19 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. ستون شماره ۱، مارکر مولکولی (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3, Fermentas, Lithuania)؛ ستون‌های شماره ۲ و ۴، محصول ORF VI، ستون‌های ۶ و ۸، محصول ORF II و ستون‌های ۳، ۵، ۷ و ۹، شاهد سالم.

Fig. 2- Agarose gel electrophoresis of PCR products representing ORF VI and ORF II of two Iranian CaMV isolates using specific primers. Lane 1, DNA marker (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3, Fermentas, Lithuania); Lanes 2 and 4, PCR product of ORF VI; Lanes 6 and 8, PCR product of ORF II, and Lanes 3, 5, 7 and 9, healthy plant preparation.



شکل ۳- درخت تبارزایی رسم شده توسط برنامه CLUSTAL W برای ژن شماره شش CaMV که به منظور نمایش بهتر وضعیت قرار گرفتن جدایه‌ها نسبت به یکدیگر، بصورت بدون ریشه (unrooted) نشان داده شده است. طول بعضی از شاخه‌ها (خطوط ضخیم و خط چین) نسبت به سایر خطوط، به نصف کاهش یافته است.

Fig. 3- Unrooted phylogenetic tree constructed by CLUSTAL W program for CaMV ORF VI. Lengths of some branches (thick and dashed lines) in ORF VI are reduced to half relative to other lines.

شیرین فرزادفر، غلامحسین مصاحبی، علی آهونمنش، مینا کوهی حبیبی، کازوساتو اوشیما، رضا پوررحیم و علیرضا گلنراقی



شکل ۴- نقشه تحدید (restriction map) حاصل از هضم آنزیمی قطعه ORF VI مربوط به جدایه ایرانی با Ca-CQ50 با استفاده از آنزیم برشی *Hpy99I* ستون یک: قطعه ORF VI بدون هضم؛ ستون دو، نشانگر مولکولی (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, Farmentas, Lithuania)؛ ستون ۳، محصول هضم آنزیمی ORF VI توسط آنزیم برشی *Hpy 99I* که منجر به تشکیل چهار قطعه می‌گردد.

Fig. 4- Restriction map of ORF VI which digested by *Hpy 99I*. Lane 1: ORF VI without digestion; Lane 2: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, Farmentas, Lithuania; Lane 3: Digested PCR product of ORF VI of Ca-CQ50 with restriction enzyme (*Hpy99I*).

جدول ۱- وقوع و پراکنش ویروس موزائیک کلم گل در گیاهان کلم گل موجود در شش استان کشور^ا

Table 1- Occurrence and distribution of *Cauliflower mosaic virus* in cauliflower crops in six provinces of Iran^a

استان، میزبان Province, host	تعداد مزارع بازدید شده No. fields visited	تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده No. sample collected	تعداد مزارع آلوده No. fields infected	نمونه‌های مثبت Positive samples	
				تعداد No.	درصد %
				Azarbajejan-e-gharbi	3
Esfahan	5	30	5	27	90.0 (66.7-100) ^c
Fars	5	60	5	53	88.3 (66.7-100)
Khorasan	2	13	2	13	100
Qazvin	5	80	5	80	100
Tehran	12	120	12	99	82.5 (63.6-100)
Total	32	323	32	292	90.04 (63.6-100)

Identification based on ELISA

^اتعیین آلودگی بر اساس آزمون الایزا

Average of virus infection rate in symptomatic samples

^بمیانگین آلودگی ویروسی در نمونه‌های علائم‌دار

Percent of virus infection in symptomatic samples

^جدرصد آلودگی ویروسی در نمونه‌های علائم‌دار

جدول ۲- واکنش جدایه‌های ایرانی CaMV روی گیاه شلغم

Table 2- Reactions of Iranian Isolates of CaMV on turnip plants

جدایه Isolate	استان/شهر Province/City	شلغم Turnip											
		LL		Tim		VC		VB		LS		Wr	
Ca-CAz22	Azarbajejan-e-Gharbi (Orumiyeh)	5/5 ^a	3	5/5	2	5/5	2	5/5	3	5/5	3	5/5	3
Ca-CAz26	Azarbajejan-e-Gharbi (Orumiyeh)	6/6	3	6/6	3	6/6	3	6/6	2	6/6	3	6/6	3
Ca-CAz20	Azarbajejan-e-Gharbi (Orumiyeh)	6/6	3	6/6	3	6/6	3	6/6	2	6/6	3	6/6	3
Ca-CE1	Esfahan (Falavarjan)	4/4	3	4/4	3	4/4	1	4/4	1	4/4	2	4/4	2
Ca-CE79	Esfahan (Hassan-Abad)	5/5	1	5/5	2	5/5	1	5/5	1	5/5	2	5/5	3
Ca-CKh19	Khorasan (Mashhad)	5/5	1	5/5	2	5/5	1	5/5	1	5/5	2	5/5	3
Ca-CKh32	Khorasan (Neishabour)	6/6	1	6/6	2	6/6	1	6/6	1	6/6	2	6/6	2
Ca-CKh64	Khorasan (Neishabour)	6/6	1	6/6	3	6/6	1	6/6	1	6/6	4	6/6	3
Ca-CSH1	Fars (Shiraz)	6/6	1	6/6	2	6/6	2	6/6	2	6/6	2	6/6	2
Ca-CSH216	Fars (Shiraz)	6/6	3	6/6	3	6/6	2	6/6	3	6/6	3	6/6	3
Ca-CQ50	Qazvin (Boin-Zahra)	6/6	3	6/6	2	6/6	2	6/6	2	6/6	3	6/6	3
Ca-CT4	Tehran (Shahr-e-Ray)	6/6	3	6/6	3	6/6	2	6/6	2	6/6	2	6/6	2
CaCT22	Tehran (Shahr-e-Ray)	6/6	1	6/6	2	6/6	1	6/6	1	6/6	2	6/6	2
Ca-CV98	Tehran (Varamin)	6/6	3	6/6	3	6/6	2	6/6	2	6/6	2	6/6	2
Ca-CK66	Tehran (Karaj)	5/5	1	5/5	3	5/5	1	5/5	1	5/5	2	5/5	2
Ca-CK75	Tehran (Karaj)	6/6	1	6/6	3	6/6	1	6/6	1	6/6	3	6/6	3
Ca-CK52	Tehran (Karaj)	5/5	1	5/5	3	5/5	1	5/5	1	5/5	2	5/5	2
Ca-CM115	Tehran (Karaj-Mahdasht)	6/6	1	6/6	2	6/6	1	6/6	1	6/6	3	6/6	3
Ca-CKa2	Tehran (Karaj-Kamalshar)	6/6	1	6/6	3	6/6	1	6/6	1	6/6	2	6/6	2
Ca-CVa5	Tehran (Vavan)	5/5	3	5/5	2	5/5	1	5/5	1	5/5	3	5/5	4
Ca-CMo1	Tehran (Karaj-Mohamadshar)	6/6	3	6/6	3	6/6	2	6/6	3	6/6	3	6/6	2

LL (*Local lesion*): 1) large and distinct; 2) large and diffuse; 3) small; LS (*Leaf stunting*): 1) very severe; 2) severe; 3) mild; 4) very mild.

Tim (*Symptom timing*: local lesions, systemic symptoms, respectively): 1) 5-7 days post-inoculation (dpi), 10-12 dpi; 2) 7-10 dpi, 12-15 dpi;

3) > 10 dpi, 15-20 dpi.; VB (*Vein banding*): 1) wide; 2) normal; 3) fine. VC (*Vein clearing*): 1) distinct; 2) mild; 3) very mild; Wr (*Leaf deformation*): 1) leaf wrinkling; 2) rugosity; 3) flat; 4) leaf cupping. *a*: Number of symptom showing plants / Number of inoculated plants.

جدول ۳- واکنش جدایه‌های ایرانی CaMV روی دو میزبان کلم قمری و داتوره

Table 3- Reactions of Iranian Isolates of CaMV on kohlrabi and datura plants

جدایه Isolate	استان/شهر Province/City	کلم قمری Kohlrabi							داتوره Datura				
		LL	Tim	VC	VB	LL	Tim	VB					
Ca-CAz22	Azarbajejan-e-Gharbi (Orumiyeh)	0/4 ^a	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-
Ca-CAz26	Azarbajejan-e-Gharbi (Orumiyeh)	0/5	-	0/5	-	0/5	-	0/5	-	0/4	-	0/4	-
Ca-CAz20	Azarbajejan-e-Gharbi (Orumiyeh)	5/5	2	5/5	3	0/5	-	0/5	-	0/4	-	0/4	-
Ca-CE1	Esfahan (Falavarjan)	5/5	2	5/5	3	5/5	1	5/5	1	0/5	-	0/5	-
Ca-CE79	Esfahan (Hassan-Abad)	4/4	2	4/4	3	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-
Ca-CKh19	Khorasan (Mashhad)	4/4	2	4/4	3	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-
Ca-CKh32	Khorasan (Neishabour)	0/5	-	0/5	-	0/5	-	0/5	-	4/4	1	4/4	3
Ca-CKh64	Khorasan (Neishabour)	0/5	-	5/5	2	5/5	3	0/5	-	0/4	-	0/4	-
Ca-CSH1	Fars (Shiraz)	6/6	2	0/6	-	0/6	-	0/6	-	4/4	1	4/4	3
Ca-CSH216	Fars (Shiraz)	0/5	-	0/5	-	0/5	-	0/5	-	0/4	-	0/4	-
Ca-CQ50	Qazvin (Boin-Zahra)	5/5	2	5/5	3	5/5	1	5/5	1	4/4	1	4/4	3
Ca-CT4	Tehran (Shahr-e-Ray)	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-
CaCT22	Tehran (Shahr-e-Ray)	0/5	-	0/5	-	0/5	-	0/5	-	4/4	1	4/4	3
Ca-CV98	Tehran (Varamin)	0/5	-	5/5	3	5/5	3	5/5	3	0/4	-	0/4	-
Ca-CK66	Tehran (Karaj)	0/5	-	0/5	-	0/5	-	0/5	-	4/4	1	4/4	3
Ca-CK75	Tehran (Karaj)	0/5	-	5/5	3	5/5	3	5/5	3	5/5	1	5/5	3
Ca-CK52	Tehran (Karaj)	0/5	-	5/5	3	5/5	1	5/5	1	4/4	1	4/4	3
Ca-CM115	Tehran (Karaj-Mahdasht)	5/5	2	5/5	3	0/5	-	0/5	-	4/4	1	4/4	2
Ca-CKa2	Tehran (Karaj-Kamalshar)	5/5	2	5/5	3	5/5	3	5/5	3	4/4	1	4/4	3
Ca-CVa5	Tehran (Vavan)	0/4	-	4/4	2	4/4	2	4/4	3	4/4	1	4/4	3
Ca-CMo1	Tehran (Karaj-Mohamadshar)	5/5	2	5/5	3	5/5	3	0/5	-	4/4	1	4/4	3

LL (*Local lesion*): 1- large and distinct; 2- large and diffuse; 3- small; Tim (*Symptom timing*: local lesions, systemic symptoms, respectively): 1) 5-7 days post-inoculation (dpi), 10-12 dpi; 2) 7-10 dpi, 12-15 dpi; 3) > 10 dpi, 15-20 dpi.; VC (*Vein clearing*): 1- distinct; 2- mild; 3- very mild.; VB (*Vein banding*): 1- wide; 2- normal; 3- fine. a: Number of symptom showing plants / Number of inoculated plants.

جدول ۴- علائم جدایه‌های ایرانی انتخاب شده برای تعیین ترادف ژن شماره شش و رس‌شمار آنها

Table 4- Symptoms of selected Iranian Isolates for sequencing of ORF VI and their accession numbers.

جدایه Isolate	استان Province	علائم مزرعه‌ای Field symptoms	رس‌شمار Accession No.
Ca-CAz22	Azarbajejan-e-gharbi	Vein banding, mottling , leaf deformation	DQ870907
Ca-CAz26	Azarbajejan-e-gharbi	Vein banding, mottling, leaf deformation	DQ870908
Ca-CE1	Esfahan	Vein clearing, vein banding, mosaic, rugosity, stunting	DQ119041
Ca-CKh19	Khorasan	Vein clearing, vein banding, rugosity, stunting, yellowing	DQ870910
Ca-Kh32	Khorasan	Vein clearing, vein banding, rugosity, stunting	EF503597
Ca-CSh1	Fars	Vein clearing, vein banding, rugosity, stunting, necrosis	DQ119040
Ca-CT4	Tehran	Vein clearing, mottling, vein banding, rugosity, stunting, necrosis, leaf deformation	DQ870912
Ca-CT22	Tehran	Vein clearing, vein banding, rugosity, stunting, necrosis, leaf deformation	DQ870915
Ca-CQ50	Qazvin	Vein clearing, vein banding, rugosity, stunting, necrosis, leaf deformation	DQ870914

leaf deformation: بدشکلی برگ; mosaic: موزائیک; mottling: پیسک; necrosis: نکروز; rugosity: چین‌خوردگی; stunting: بازماندن از رشد; vein banding: زردی; vein clearing: برگ‌روشنی; yellowing: زردی.

جدول ۵- مقایسه قطعات حاصل از RFLP جدایه‌های ایرانی CaMV با جدایه‌های دیگر نقاط جهان و گروه‌بندی آن‌ها که با استفاده از آنزیم *Hpy99I* و به کمک برنامه Mapdraw بدست آمده است.

Table 5- Comparison of Iranian *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) isolates with others from different countries on the basis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern using *Hpy99I* in Mapdraw program.

گروه	جدایه‌ها	محل برش (از ابتدای قطعه)	تعداد قطعات	اندازه قطعات
<i>Hpy99I</i> RFLP group	Isolates	Restriction site (nt)	No. of segments	Size of segments (bp)
I	B29, BBC, CM1841, CMV-1, D-4, NY8153, W260	771	2	771-775
II	Bari 1	411, 777, 783	4	411, 363, 6, 745
III	Cabb B-JI	0	0	1525
IV	Cabbage S	408, 771	3	408, 363, 754
V	D/H	771, 1458	3	771, 687, 73
VI	S-Japan	408, 771	3	408, 363, 760
VII	XinJing	1242	2	1242, 292
VIII	Ca-CAz22, Ca-CAz26, Ca-CE1, Ca-CKh19, Ca-CKh32, Ca-CQ50, Ca-CSh1, Ca-CT4, Ca-CT22	408, 771, 1458	4	408, 363, 687, 73

شیرین فرزادفر، غلامحسین مصاحبی، علی آهونمنش، مینا کوهی حبیبی، کازوساتو اوشیما، رضا پوررحیم و علیرضا گلنراقی

ویروس موزائیک کلم گل علاوه بر کلم گل، از سایر گیاهان زراعی این تیره نیز گزارش شده است (Farzadfar et al., 2005; Shahraneen et al., 2003). گیاه کلزا در ایران بیشتر بصورت پاییزه کشت شده و در اواخر بهار تا اوایل تابستان برداشت می شود. در سال های اخیر توجه خاصی به این محصول شده و سطح کشت آن از ۲۰۰ هکتار در سال ۱۳۶۸ به ۷۲۰۰۰ هکتار در سال ۱۳۸۲ افزایش یافته است (Anonymous, 2003). به نظر می رسد این تغییر الگوی کشت می تواند روی جمعیت شته ها و دینامیک فعالیت آن ها (Woodford, 1988) و متعاقباً روی میزان و گسترش آلودگی به ویروس اثر داشته باشد (Loenbenstein et al., 2001).

در این مطالعه برای اولین بار، تنوع بیولوژیکی ۲۱ جدایه ایرانی CaMV با استفاده از سه میزبان شلغم، کلم قمری و داتوره مورد بررسی قرار گرفته است. این گیاهان با جدایه های مختلف جمع آوری شده از مناطق مختلف و با شدت علائم متفاوت مایه زنی شدند. علائم ایجاد شده توسط این جدایه ها روی سه میزبان مورد نظر با یکدیگر متفاوت بود. همچنین، علائم ایجاد شده در شلغم در مقایسه با دو میزبان دیگر شدیدتر بود. بررسی تنوع علائم ایجاد شده در شلغم نشان داد که جدایه های ایرانی CaMV مورد مطالعه، علائم نسبتاً مشابهی را تولید می نمایند. در تمامی آن ها علائم اولیه ایجاد شده با تولید لکه های موضعی آغاز گردید. بر اساس اندازه لکه های موضعی، این جدایه ها به دو گروه جدایه های با لکه های بزرگ (۳ تا ۴ میلی متر) و گروه لکه های کوچک (۱ تا ۲ میلی متر) تقسیم می شوند. این در حالی است که در تمامی جدایه های مورد بررسی توسط Al-Kaff & Covey (1995) نوع لکه های ایجاد شده فقط از نوع بزرگ و مشخص بوده است. مطالعه علائم سیستمیک نشان داد که جدایه های ایرانی علائم سیستمیک مشابهی روی شلغم ایجاد می نمایند. اگرچه شدت این علائم با یکدیگر متفاوت است، ولی بر اساس علائم سیستمیک نمی توان گروه بندی مشخصی را روی این جدایه ها انجام داد (Al-Kaff & Covey, 1995).

در جدایه هایی که گیاه کلم قمری را آلوده نمودند، ابتدا لکه های موضعی تولید شد، ولی این لکه ها برخلاف شلغم از نوع بزرگ و پخش بود. توسعه بعدی علائم با رگ روشنی، موزائیک و رگ نواری در برگ های مایه زنی شده همراه بود. پس از مدتی حالت بهبودی (recovery) دیده شده و علائم تولیدی فقط به برگ های مایه زنی شده محدود گردید که با نتایج

پراکنش و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ویروس موزائیک کلم گل از مزارع کلم گل ایران

قبلی ارائه شده روی این میزبان مطابقت دارد (Al-Kaff & Covey, 1995). اخیراً بررسی‌های انجام گرفته نشان داده است که این بهبودی احتمالاً ناشی از مکانیسم خاموشی ژن پس از ترجمه (post-transcriptional gene silencing) و یا ناشی از خاموشی ژن در سطح نسخه‌برداری (transcriptional gene silencing) می‌باشد (Haas *et al.*, 2002). بر اساس علائم روی کلم قمری، جدایه‌های ایرانی را می‌توان به سه گروه تقسیم نمود. گروه اول، جدایه‌هایی که علائم لکه موضعی و به دنبال آن علائم سیستمیک ایجاد می‌نمایند. گروه دوم، جدایه‌هایی که فقط لکه موضعی تولید نمودند و گروه آخر که روی این میزبان هیچ علائمی تولید نکردند. برای تعیین جدایه‌های آلوده کننده گیاهان تیره سیب‌زمینی از *D. stramonium* استفاده شد. نتایج حاصله در مورد ۲۱ جدایه نشان داد که تنها دو جدایه Ca-CQ50 و Ca-CK52 روی این میزبان، سیستمیک شده و در مورد سایر جدایه‌ها یا علائمی ایجاد نگردید و یا لکه‌های موضعی نکرده بزرگ و مشخص تولید شد که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد (Qiu & Schoelz, 1992; Schoelz & Qiu, 1992; Schoelz *et al.*, 1986; Garcia & Shepherd, 1985; Lung & Pirone, 1972; Shepherd, 1988). همه جدایه‌ها با شته *M. persicae* قابل انتقال بودند. نتایج حاصل از تعیین ترادف ژن شماره دو مربوط به نه جدایه بررسی شده نیز قابلیت انتقال با شته را مورد تأیید قرار داد (Al-Kaff & Covey, 1994; Al-Kaff *et al.*, 1997).

در این تحقیق برای اولین بار، ترادف نوکلئوتیدی ORF VI در جدایه‌های ایرانی تعیین شده و با دیگر ترادف‌های ORF VI موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفتند. بررسی خصوصیات بیولوژیکی و دامنه میزبانی نشان داد که جدایه‌های ایرانی CaMV بر اساس آلودگی گیاهان تیره کلم و سیب‌زمینی به دو گروه تقسیم می‌شوند. با این حال نتایج حاصله از مطالعه بیولوژیکی، با اطلاعات بدست آمده از مقایسه ترادف ORF VI در این جدایه‌ها مطابقت نداشت. این مطلب می‌تواند ناشی از دخالت سایر نواحی ژنی (از جمله ژن‌های شماره یک و چهار) در بیماری‌زایی ویروس موزائیک کلم گل باشد (Covey, 1991). این نتایج گزارش‌های قبلی ارائه شده را تأیید می‌نماید (Pique *et al.*, 1995; Wintermantel *et al.*, 1993). همچنین در این مطالعه، گروه‌بندی جدایه‌های ایرانی بر اساس واکنش آن‌ها روی سه میزبان شلغم، کلم قمری یا داتوره با نتایج گروه‌بندی آن‌ها بر مبنای ORF VI یکسان نبود. مطالعات تبارزایی و

شیرین فرزادفر، غلامحسین مصاحبی، علی آهونمنش، مینا کوهی حبیبی، کازوساتو اوشیما، رضا پوررحیم و علیرضا گلنراقی

گروه‌بندی جدایه‌های ایرانی و خارجی CaMV با گروه‌بندی آن‌ها بر اساس نوع میزبان طبیعی یا قابلیت انتقال با شته نیز مطابقت نداشت که مشابه گزارش‌های ارائه شده قبلی در مورد این ویروس است (Chenault & Melcher, 1994b).

به نظر می‌رسد توزیع جغرافیایی منابع آلوده به CaMV، مهم‌ترین عامل در تکامل این ویروس بوده و به این ترتیب جدایه‌های CaMV به دو گروه اصلی آمریکای شمالی (North-American) و غیر آمریکای شمالی (non-North-American) تقسیم شده‌اند (Chenault & Melcher, 1994b). تنها استثناء مربوط به جدایه B29 از فرانسه بود که در گروه آمریکای شمالی قرار گرفت. بر اساس این گروه‌بندی، جدایه‌های ایرانی CaMV در گروه غیر آمریکای شمالی قرار گرفته و یک زیرگروه مستقل را تشکیل می‌دهند. بررسی هضم آنزیمی ORF VI با *Hpy99I* نیز با اطلاعات بدست آمده از تجزیه تبارزایی ORF VI مطابقت داشت. از آنجا که این ویروس از طریق بذر یا دانه گرده منتقل نمی‌شود، به نظر می‌رسد که ویروس موزائیک کلم‌گل اولین بار از طریق مواد گیاهی آلوده به ایران وارد شده و پس از استقرار بطور مستقل تکامل یافته است. البته اثبات این نظریه به مطالعه بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری نویسنده اول می‌باشد. بدین وسیله از زحمات گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران و بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تشکر می‌گردد. همچنین از دکتر U. Melcher برای طراحی آغازگر و نیز ارسال مقالات تشکر می‌شود. از سرکار خانم مهندس سپیده ساجدی (بخش رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی) که در شناسایی نمونه‌های علف‌هرز کروسیفر همکاری داشته‌اند، قدردانی می‌گردد.

نشانی نگارندگان: دکتر شیرین فرزادفر، دکتر غلامحسین مصاحبی و دکتر مینا کوهی حبیبی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران؛ دکتر علی آهونمنش،

پراکنش و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدابه‌های ویروس موزائیک کلم‌گل از مزارع کلم‌گل ایران

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان؛ دکتر کازوساتو اوشیما، آزمایشگاه ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ساگا، ژاپن؛ دکتر رضا پوررحیم بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور؛ مهندس علی‌رضا گلنراقی گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.