

جایگاه تاکسونومیکی دو جدایه ایرانی ویروس موزائیک نیشکر بر

اساس تعیین ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ۳'-ژنوم*

Taxonomic position of two Iranian isolates of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) based on sequence of the 3'-region of the genome

محمود معصومی**، آوا زارع و کرامت‌اله ایزدپناه

مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز و سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی

دریافت ۱۳۸۴/۲/۱۷ پذیرش ۱۳۸۶/۶/۱۹

چکیده

دو جدایه ایرانی ویروس موزائیک نیشکر (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) به نام‌های KhzL66 و KhzQ86 از مزارع نیشکر شرکت کشت و توسعه نیشکر و صنایع جانبی آن در خوزستان جمع‌آوری و با استفاده از آغازگرهای دژنره پوتی ویروس‌ها یا اختصاصی SCMV، ناحیه ۳' ژنوم آنها به روش RT-PCR تکثیر و همسانه سازی گردید. قطعات پس از تعیین ترادف با هم جمع شدند و ترادف قطعه‌ای به طول ۱۸۱۵ نوکلئوتید بدست آمد که شامل قسمتی از ژن Nib، کل CP و 3'-UTR بود. ناحیه CP-UTR از این دو جدایه همراه با سایر جدایه‌های SCMV موجود در GenBank با برنامه‌های MegAlign (DNASTAR) و CLUSTAL X آنالیز شد. این جدایه‌ها با تعدادی از ترادف‌های پوتی ویروس‌های دیگر شامل ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV)، ویروس موزائیک سورگوم (*Sorghum mosaic virus*, SrMV)، ویروس موزائیک قیاق (*Johnson grass mosaic virus*) * هزینه انجام این تحقیق از محل اعتبارات سازمان تحقیقات کشاورزی و قطب علمی ویروس شناسی تامین شده است.

** مسئول مکاتبه

(JGMV)، ویروس موزائیک ایرانی قیاق (*Iranian Johnson grass mosaic virus*, IJMV) و ویروس

موزائیک زآ (*Zea mosaic virus, ZeMV*) موجود در GenBank مقایسه و پس از انجام هم‌ردیف سازی چندگانه درخت فیلوژنتیکی آنها با روش Neighbor-joining ترسیم گردید. در آنالیز فیلوژنتیکی ۴۱ ترادف در ۵ گروه شامل MDMV, JGMV, IJMV و ZeMV، SrMV و دو زیر گروه SCMV (زیرگروه I و II) قرار گرفتند. در این آنالیز قرار گرفتن جدایه های SCMV از ایران در کنار جدایه های مصر و آفریقای جنوبی در زیرگروه I این احتمال را به وجود می آورد که استرین های ایرانی منشاء خارجی داشته و با قلمه به کشور وارد شده باشند.

واژه های کلیدی: ویروس موزائیک نیشکر، نیشکر، ویروس های غلات، پوتی ویروس، ایران، خوزستان

مقدمه

نیشکر یکی از محصولات صنعتی استراتژیک در بسیاری از کشورهای دنیاست. کشت این محصول در سالهای اخیر در استان خوزستان گسترش وسیعی یافته است. SCMV از جمله عوامل زیانبار و محدودکننده این محصول است. SCMV عضو جنس *Potyvirus* از تیره *Potyviridae* است. علائم این ویروس به صورت موزائیک روی نیشکر در سال ۱۸۹۲ در اندونزی مشاهده شد و در سال ۱۹۲۰ ماهیت عامل بیماری و نحوه انتقال آن روشن شد (رجوع شود به Koike & Gillaspie 1989). پس از آن سویه های مختلف از این ویروس روی نیشکر، سورگوم و ذرت گزارش شدند. در سال ۱۹۶۲ بیماری موزائیک کوتولگی ذرت در جنوب آمریکا شایع شد (Janson & Ellett 1963) و عامل آن MDMV نام گرفت که عضو دیگری از جنس *Potyvirus* می باشد. این ویروس بعداً در ایالات دیگر آمریکا روی ذرت و سورگوم اهمیت اقتصادی پیدا کرد (Toler 1985, Williams & Alexander 1965). SCMV و MDMV گسترش جهانی دارند و تاکنون سویه های زیادی از آنها روی نیشکر، ذرت، سورگوم و گیاهان غیر مزرعی غلات گزارش شده اند. تا سال ۱۹۸۹ تفکیک و تمایز جدایه های این ویروس ها با مشکلات زیادی مواجه بود تا اینکه در این سال Shukla و همکاران براساس ویژگی های سرولوژیکی پروتئین پوششی، آنها را در چهار گروه (یا چهار گونه) به نام های SCMV، MDMV، JGMV و SrMV قرار دادند (Shukla et al. 1989a,b). این ویروس ها به عنوان پوتی ویروس های غلات معروف شده اند. پس از آن چند ویروس دیگر به نام های ZeMV، IJMV، ویروس موزائیک مرغ (*Bermuda grass mosaic virus, BGMV*)، ویروس موزائیک

جنوبی مرغ (Southern Bermuda grass mosaic virus, SBgMV) و ویروس موزائیک پنی‌سیتوم (Pennisetum mosaic virus, PeMV) به این گروه اضافه شدند (Fan *et al.* 2003, Fan & Li 2004, Masumi & Izadpanah 1998, Masumi *et al.* 2001, 2004, 2005, Seifers *et al.* 2000, Salomon & Seifers 2004, Zare *et al.* 2005). تاکنون تعیین و تشخیص سویه‌های SCMV در دنیا براساس روش‌های سرولوژیکی، بیولوژیکی مانند دامنه میزبانی و حفاظت تقاطعی (cross protection) و در دو دهه اخیر بر اساس آنالیز ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ۳' ژنوم، شامل ژن پروتئین پوششی (coat protein, CP) و ناحیه ترجمه نشدنی (untranslated region, UTR)، بالاخص ناحیه پایانه آمینی (N-terminus) در ژن CP انجام شده است (Adams *et al.* 2004). ناحیه پایانه آمینی ژن CP یک ناحیه کاملاً تغییرپذیر است و تمایز آشکاری بین سویه‌های مختلف نشان می‌دهد. این تمایز در نواحی دیگر CP یا 3'-UTR کمتر بچشم می‌خورد. با اینهمه بیشتر محققین برای مقایسه و تمایز جدایه‌ها از کل ناحیه CP-UTR استفاده کرده‌اند. اگر چه Adams و همکاران (۲۰۰۴) ژن CI (cylindrical inclusion) را برای مقایسه و تمایز گونه‌ها و سویه‌های پوتی‌ویروس‌ها پیشنهاد می‌کنند، ولی هنوز در بسیاری از منابع استفاده از ناحیه CP-UTR متداول است.

ویروس موزائیک نیشکر در ایران در سال ۱۳۷۲ از خوزستان گزارش شد و براساس روابط سرولوژیکی و خصوصیات مورفولوژیکی جدایه SCMV-SC-1 نامیده شد (Amiri & Izadpanah 1993). قاسمی و همکاران (۲۰۰۲) بر اساس رابطه سرولوژیکی با آنتی‌سرم چند همسانه‌ای MDMV-B در آزمون ELISA عوامل مولد موزائیک در نیشکر را در خوزستان در دو گروه قرار دادند که یک گروه آن بنام SC-Q86 با این آنتی‌سرم واکنش مثبت داشت (Ghasemi 2005, Ghasemi *et al.* 2002). قاسمی در سال ۲۰۰۵ ترادف نوکلئوتیدی حدود ۷۰۰ باز از ناحیه ۳' جدایه SC-Q86 و یک جدایه دیگر بنام SCMV-CP68 را که شامل ناحیه UTR و قسمتی از انتهای ۳' ژن CP می‌شد، تعیین کرد. معصومی و همکاران جدایه‌های SCMV از خوزستان را بطریق آنالیز مولکولی بررسی و آنها را سویه SCMV-A تشخیص دادند (Masumi *et al.* 2004, 2006). در این تحقیق جدایه‌های KhzL66 و KhzQ86 جدا شده از مزارع نیشکر شرکت کشت و توسعه نیشکر و صنایع جانبی با استفاده از آنالیز مولکولی ناحیه CP-UTR مورد بررسی قرار گرفتند و جایگاه تاکسونومیکی آنها در میان سویه‌های SCMV تعیین

گردید. در این مقاله پیشنهاد برای بازنگری در وضعیت کنونی SCMV ارایه گردیده است.

روش بررسی

منبع جدایه‌های SCMV

دو جدایه SCMV که از ارقام L66 و Q86 در مزارع شرکت کشت و توسعه نیشکر و صنایع جانبی در خوزستان جدا شده و در مرکز تحقیقات آن شرکت نگهداری می‌شود در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج ویروس، جداسازی RNA و واکنش RT-PCR

این نمونه‌ها پس از عصاره‌گیری در سه حجم بافر سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار، pH= ۶/۵، مستقیماً با کلروفورم به نسبت ۳۰ درصد، تیمار و سانتریفوژ شدند و از فاز رویی برای تهیه cDNA استفاده گردید. استخراج RNA با استفاده از کیت mRNA Capture (Roche) Kit طبق دستورالعمل سازنده انجام گرفت، از آن‌ای جذب شده به لوله برای واکنش نسخه‌برداری معکوس (reverse transcription, RT) با آنزیم (Moloney murine leukemia virus, RT) استفاده گردید. واکنش RT با مخلوط کردن ۱۰ میکرولیتر بافر ۵ برابر Expand RT، ۰/۴ mM DTT، ۰/۴ mM مخلوط dNTP، ۲۰ U RNase inhibitor، ۰/۶ μM آغازگر RCF1 (جدول ۱) و ۲۰U Expand RT تهیه گردید. مخلوط حاصل با افزودن آب به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و در دمای ۴۲°C به مدت یکساعت نگهداری شد.

cDNA بدست آمده از واکنش RT با واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (polymerase chain reaction, PCR) تکثیر شد. مخلوط واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase، ۱/۵ mM MgCl₂، ۰/۲ mM dNTP، ۰/۴ μM از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (جدول ۱)، ۵ U آنزیم Taq DNA polymerase (Cinagen, Iran) و ۳ میکرولیتر cDNA بود که با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر استریل حجم آن به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR شامل ۳۸ چرخه به شرح زیر بود: ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه (چرخه یک)؛ ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵°C به مدت یک دقیقه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه (چرخه‌های دو تا شش)؛ ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵°C به مدت یک دقیقه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه (چرخه‌های

۷ تا ۳۸). نهایتاً مخلوط واکنش به مدت ده دقیقه در دمای ۷۲°C نگهداری شد (Colinet & Kummert 1993).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر جدایه‌های ایرانی

SCMV

Table 1. Primers used for amplification of SCMV isolates of Iran by RT-PCR.

Orientation	Name	Sequence	Reference
Reverse	Pot1	5'-gAC Tgg ATC CAT TTT CTA TgC AAC A-3'	Collinet & Kummert 1993
Forward	Pot2	5'-GaC gAA TTC TgT gAT gCT gAT ggt TTC-3'	Collinet & Kummert 1993
Forward	SC1	5'-CHA TWT Tgg ART ggg Aytg-3'	Yang & Mirkov 1997
Forward	WEq1F	5'-ggA CAC CAg CTA gAg CTA Agg AAg -3'	*
Reverse	RCF1	5'-AgC Tgg ACT CTT TTT TTT TTT TTT T-3'	French & Robertson 1993
Forward	Oligo1n	5'-ATg gTH Tgg TgY ATH gAR AAY gg-3'	Marie-Jeanne <i>et al</i> 2000
Reverse	Oligo2n	5'-TgC TgC KgC YTT CAT Ytg-3'	Marie-Jeanne <i>et al</i> 2000

* این آغازگر توسط نگارندگان طراحی شده است.

* This primer was designed by authors.

محصول PCR بوسیله PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Lithuania) InsT/Aclone در پلاسمید pTZ57R/T وارد و در باکتری *E. coli* استرین DH5α طبق دستورالعمل سازنده در پلاسمیدها پس از استخراج (Holmes & Quigly 1981) به منظور تعیین ترادف به شرکت Macrogen (کره جنوبی) ارسال گردید و تعیین ترادف با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 انجام شد.

آنالیز فیلوژنتیکی

پس از ادغام ترادف‌های حاصل از ۲ تا ۴ کلنی از قطعات مختلف، ترادف استنتاجی (consensus sequence) با استفاده از نرم افزارهای DNAMAN و EditSeq (DNASTAR) بدست آمد. این ترادف‌ها با ترادف سایر ویروس‌های مرتبط شامل SCMV، MDMV، SrMV و JGMV و MegAlign مقایسه گردیدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه (multiple alignment) با برنامه‌های

(DNASTAR) و CLUSTAL X (Thompson *et al.* 1997) انجام شد و مشابهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در برنامه MegAlign محاسبه گردید.

درخت فیلوژنتیکی حاصل از همردیف سازی چندگانه در برنامه Treeview 1.6.6 (Page 1996) مشاهده و بررسی گردید. در این آنالیز ویروس موزائیک رگه‌ای گندم (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) بعنوان outgroup بکار رفت.

برای مقایسه جدایه‌های KhzQ86 و KhzL66 با سایر پوتی‌ویروس‌های غلات از ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن کامل CP به اضافه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه 3'-UTR (CP-UTR) استفاده شد. برای مقایسه جدایه‌های SCMV تعداد ۲۰۰ ترادف SCMV موجود در GenBank به اضافه تعدادی از ترادف‌های MDMV، SrMV، IJMV و JGMV انتخاب گردید. ترادف جدایه‌های SCMV که از ناحیه CP یا CP-UTR از کشورهای مختلف در GenBank قرار داده شده بود، بر حسب تشابه اندازه ترادف، کشور یا کشورهای منشاء جدایه، بطور جداگانه همردیف سازی شدند (جدول ۲) و درخت فیلوژنتیکی برای هر گروه ترسیم گردید (اطلاعات نشان داده نشده است). از بین جدایه‌های مذکور تعدادی انتخاب گردیدند و نهایتاً ۳۹ جدایه SCMV با جدایه‌های سایر ویروس‌ها و دو جدایه SCMV مورد مطالعه در یک درخت فیلوژنتیکی آنالیز شدند (جدول ۳). توپوگرافی حاصل از مقایسه نوکلئوتیدی (ناحیه CP-UTR) و آمینواسیدی (ناحیه CP) تشابه زیادی داشت و بهمین دلیل تنها درخت فیلوژنتیکی حاصل از ترادف نوکلئوتیدی مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه

موقعیت قطعات بدست آمده از PCR با آغازگرهای مختلف در شکل ۱ مشخص شده است. پس از تجمیع این قطعات ترادف بدست آمده شامل ۱۸۱۵ نوکلئوتید بود. این قطعات برای جدایه‌های KhzQ86 و KhzL66 به ترتیب با رس شماره‌های (Accession number) DQ438949 و DQ369960 در GenBank قرار داده شدند. قطعات تکثیر شده شامل نیمه ۳' ژن Nib (موقعیت ۱ تا ۶۴۴) و ژن پروتئین پوششی (موقعیت ۶۴۵ تا ۱۵۸۳) است. ناحیه ترجمه نشدنی ۳' (3'-untranslated region, 3'-UTR) از نوکلئوتید شماره ۱۵۸۷ تا ۱۸۱۵ می باشد و کدون پایانی TAG در موقعیت ۱۵۸۴ تا ۱۵۸۶ قرار دارد (شکل ۱).

جدول ۲- تعداد ترادف‌های SCMV موجود در GenBank به تفکیک کشور و میزبان

Table 2. SCMV sequences deposited in GenBank, isolated from sugarcane, maize and some other plants in different countries

	Sugarcane	Maize	Other plants
USA	13	2	2
Mexico	-	1	-
Germany	-	9	-
Spain	-	3	-
Egypt	1	-	-
Congo	20	-	-
Cameron	26	-	-
South Africa	5	-	-
Iran	4	-	-
China	26	37	2
Australia	10	-	-
Brazil	-	-	14*
Pakistan	1	-	-
Thailand	4	1	-
Philippines The	-	-	4

* میزبان ترادف‌های ذخیره شده از این کشور معلوم نیست.

* The hosts of these sequences are unknown.

طرح‌های حفاظت شده GDD و GNNSGQPSTVVDNTLMV که در تمام ویروس‌های با ژنوم RNA مثبت وجود دارند و نشان دهنده محل فعال آنزیم پلی‌مراز هستند

جدول ۳- رس شمار GenBank، اسامی استرین‌ها یا جدایه‌ها و منشأ ویروس‌های غلات که از آنها در آنالیز فیلوژنتیک استفاده شده است

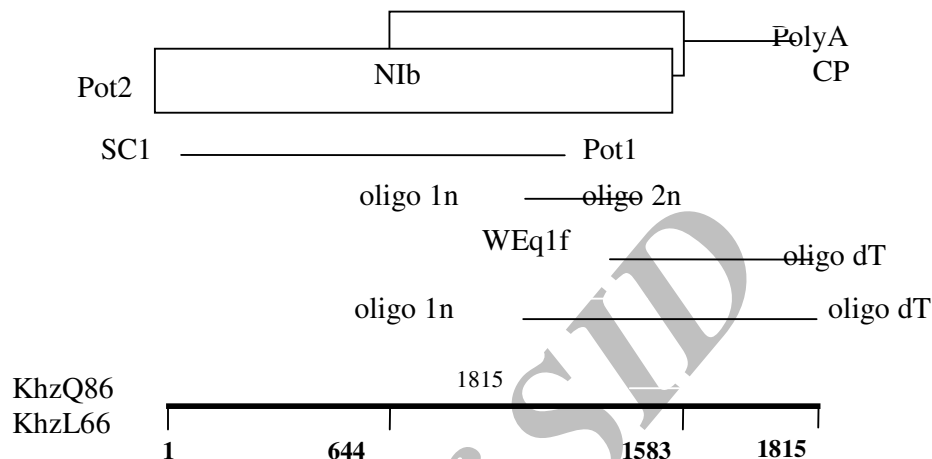
Table 3. Database accession numbers, strains or isolate designations and origin of poaceous potyviruses used in phylogenetic analysis

Virus	Accession No.	Isolate, Strain	Country
SCMV I			
	DQ438949	KhzQ86	Iran
	DQ369960	KhzL66	Iran
	AJ491963	WGY70-1	Egypt
	AJ491972	ZAF52-1	South Africa
	AY241923	Uttar Pradesh	India
	D00948	Sc	Australia
	AF006733	Nambour 7	South Africa
	AJ278405	Strain A Brisbane	Australia
	AM040436	CSSG-567	Pakistan
	U57354	A	USA
	AJ491966	Lou41-1	USA
	DQ316248	So-b14	
	AY819719	FER-1	Brazil
	U57357	E	USA
	AJ491946	CoN102-1	Congo
	DQ316251	Wd-dz	
	DQ316232	Mz-gz2	China
	DQ227694	Gx-1	China
	AY953351	Strain D	China
	AF006737	USF 1	Australia/ USA
	U57355	B	USA
	U57356	D	USA
SCMV II			
	AJ271085	Zhejiang	China
	AJ297628	Zhejiang	China
	NC 003398	Zhejiang	China
	AY042184	Beijing	China
	AF494510	Henan	China
	AY569692	SCMV-SX	China
	X98168	SCMV-Boetzingen	Germany

Table 3. (continued) جدول ۳- (ادامه)

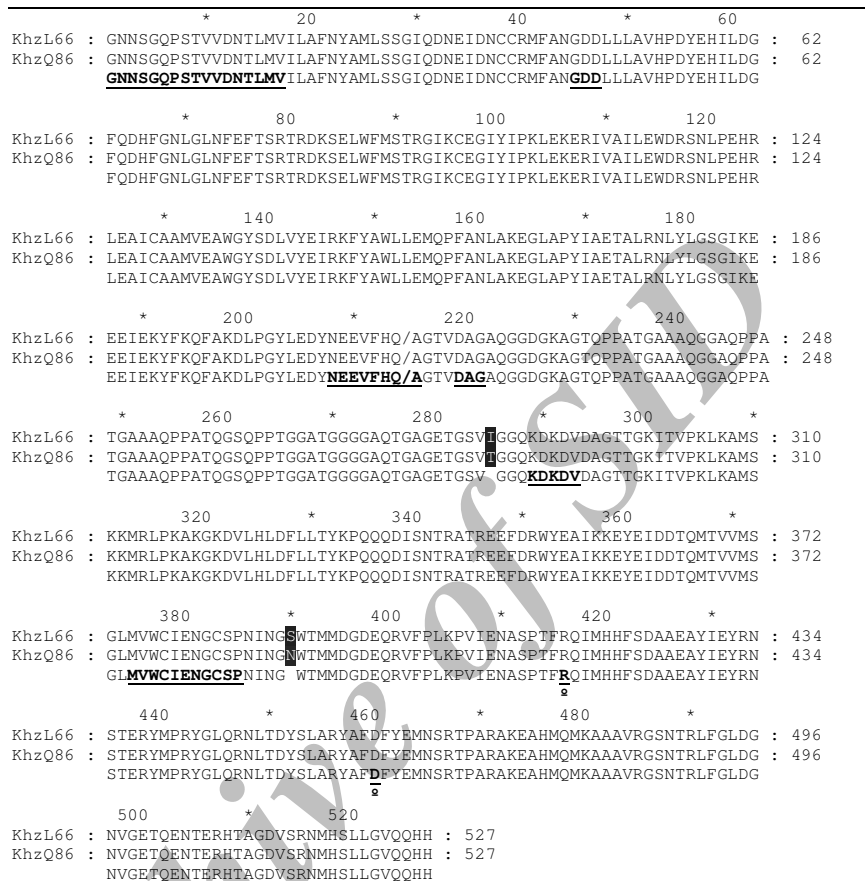
	AJ311168	S12	Spain
	AJ006202	SCMV-G96	Germany
	X98167	SCMV-Borsdorf	Germany
	AJ006201	SCMV-BC	Germany
	AJ421468	Sc	China
	DQ316233	mz-gz2	China
	AJ310104	yuhang	China
	DQ315497	BR14	Brazil
	DQ315498	BR15	Brazil
	D00949	SCMV-MDB	USA
SrMV	U07219	SrMV-Sch	USA
	U57358	SrMV-SCI	USA
	U57360	SrMV-SCM	USA
MDMV	U07216	MDMV-JIL	USA
	AJ001691	MDMV-BU	Bolgaria
		MDMV-Maz	Iran
IJMV	AF533363	IJMV-Shiraz	Iran
ZeMV	AF228693	ZeMV	Israeal
JGMV	AF032404	Krish-infecting	Australia
	Z26920	JGMV-AUST	Australia
	U07218	JGMV-KS1	USA

(Dougherty & Carrington 1988) در این دو مترادف نیز مشاهده می‌شوند. طرح‌های DAG که در انتقال با شته دخالت دارد (Atreya *et al.* 1991, 1995)، محل برش ناحیه انتهای آمینی (N-terminal) ژن CP و MVWCIENGCSF که در ناحیه CP در پوتی ویروس‌ها و طرح NEEVFHQ/A محل برش ژن CP از Nib که در گروه I گونه SCMV حفاظت شده هستند (Badge *et al.* 1997, Shukla *et al.* 1988)، در این مترادف‌ها مشاهده می‌شوند (شکل ۲). دو آمینواسید R و D که محل اتصال پروتئین پوششی به RNA است (Jacquet *et al.* 1998) با علامت دایره مشخص شده است (شکل ۲). موقعیت این طرح‌های حفاظت شده برای هر دو جدایه در جدول ۴ مشخص است.



شکل ۱- شکل شماتیک ناحیه ۳' ژنوم ویروس موزائیک نیشکر، موقعیت قطعات تکثیر شده با جفت آغازگرها و نتیجه تجمع ترادف های بدست آمده جدایه های KhzL66 و KhzQ86.
 Fig. 1. Schematic representation of the 3'-terminal region of the sugarcane mosaic virus genome and position of PCR-products amplified with indicated primer pairs and assembled sequence of KhzQ86 and KhzL66 isolates.

شکل ۳ گروهبندی ترادف‌های مرتبط با پوتی‌ویروس‌های گیاهان تیره غلات را نشان می‌دهد. چنانکه از شکل پیداست ترادف‌های مربوط به گروه SCMV در دو زیر گروه قرار می‌گیرند. ترادف‌های MDMV، SrMV و JGMV هر یک گروه جداگانه‌ای را تشکیل می‌دهند. ZeMV و IJMV نیز در یک شاخه قرار می‌گیرند. میزان تشابه نوکلئوتیدی جدایه‌ها در درون هر گروه (ویروس) بجز SCMV و MDMV بیشتر از ۹۰٪ می‌باشد و بین گروه‌ها از ۳۵/۳ تا ۴۷/۷ درصد متغیر است. میزان شباهت (similarity) در ترادف‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی هم‌ردیف شده درون و بین گروه‌ها در جدول ۵ مشخص شده است. تشابه نوکلئوتیدی جدایه‌های KhzQ86 و KhzL66 ۹۸/۶ درصد و تشابه آمینواسیدی آنها ۹۹/۶ درصد می‌باشد. تشابه ترادف آمینواسیدی در بین سویه‌های هر ویروس بیشتر از ۹۰٪ و در بین گونه‌ها از ۳۹/۲ تا ۷۸/۲٪ متغیر است اما سویه‌های SCMV از این قاعده تبعیت نمی‌کنند.



شکل ۲- همردیف سازی آمینواسیدی ناحیه ۳ ژنوم (Nib-CP) جدایه های KhzL66 و KhzQ86 ویروس موزائیک نیشکر. این همردیف سازی با برنامه MegAlign (DNASTAR) انجام شده است. محل برش CP از Nib با علامت / در موقعیت ۲۱۴ ترادف دیده می شود. طرح های حفاظت شده در پوتی ویروس ها با قلم سیاه با خط زیرین مشخص شده است (رجوع شود به جدول ۴). دو آمینواسید R و D که محل اتصال پروتئین پوششی به RNA است با علامت دایره مشخص شده است.

Fig. 2. Alignment of amino acid residues of the 3'-region of KhzQ86 and KhzL66 isolates of *Sugarcane mosaic virus*. The alignments were generated using the MegAlign program (DNASTAR package). The putative cleavage site of CP from Nib is indicated by / sign in position 214. The conserved motifs of potyviruses are demarcated in bold face and underlined (see Table 4). The conserved amino acids R and D involved in RNA binding are indicated by open circle.

جدول ۴- موقعیت طرح های حفاظت شده در ناحیه NIB-CP جدایه های KhzL66 و KhzQ86 ویروس موزائیک نیشکر

Table 4. The position of the conserved motifs in NIB-CP region in KhzL66 and KhzQ86 isolates of *Sugarcane mosaic virus*

Conserved motifs	Amino acid position in KhzQ86 and KhzL66
GDD	45-47
GNNSGQPSTVVDNTLMV	1-17
NEEVFHQ/A	208-215
DAG	221-219
K/DK/DV	289-293
MVWCIENGCS	375-385

جدول ۵- درصد تشابه نوکلئوتیدی در ناحیه CP-UTR (قسمت بالای خط مورب) و آمینواسیدی در ناحیه CP (قسمت پائین خط مورب) بین ویروس های IJMV, JGMV, SrMV, MDMV و دو زیر گروه I و II، SCMV بدست آمده از مقایسه ترادف ها در برنامه MegAlign (DNASTAR)

Table 5. The range of nucleotide similarity in CP-UTR (above diagonal) and amino acid similarity in CP (below diagonal) between IJMV, SrMV, JGMV, MDMV and two subgroups of SCMV (I and II). The sequence similarities were calculated by MegAlign program (DNASTAR package)

	IJMV	MDMV	JGMV	SrMV	SCMVI	SCMVII	MDMV-D*
IJMV		36 - 67.1 84.2 - 88	31.9 - 62.1	35.3 - 62.9	55.3 - 64.3	57.1 - 62.5	55.3 - 57.5
MDMV	42.0 - 60.3		38.7 - 56.7	63.3 - 74.7	58.2 - 65.7	57.0 - 63.4	56.6 - 63.5
JGMV	43.4 - 57.7	91.5 - 94.2		50.7 - 54.6	28 - 55.6	31.6 - 63.5	39.5 - 51.8
SrMV	42.7 - 60.7	64.7 - 78.2	94.1 - 96.7		97.8 - 83.3	57.1 - 62.7	55.5 - 59.4
SCMVI	62.9 - 62.0	56.9 - 76.8	53.1 - 55.4	96.4 - 98.5		53.3 - 63.4	55.5 - 59.4
SCMVII	62.2 - 69.3	71.0 - 76.1	54.8 - 61.0	66.7 - 73.9	91.7 - 99		63.8 - 78.8
MDMV-B	64.4 - 69.3	54.9 - 76.1	57.0 - 58.4	64.2 - 68.7	78.8 - 100	70.3 - 84.6	63.8 - 78.8
						84.0 - 100	75.6 - 83.8
						86.7 - 100	85.9 - 91.7
							86.7 - 94.0

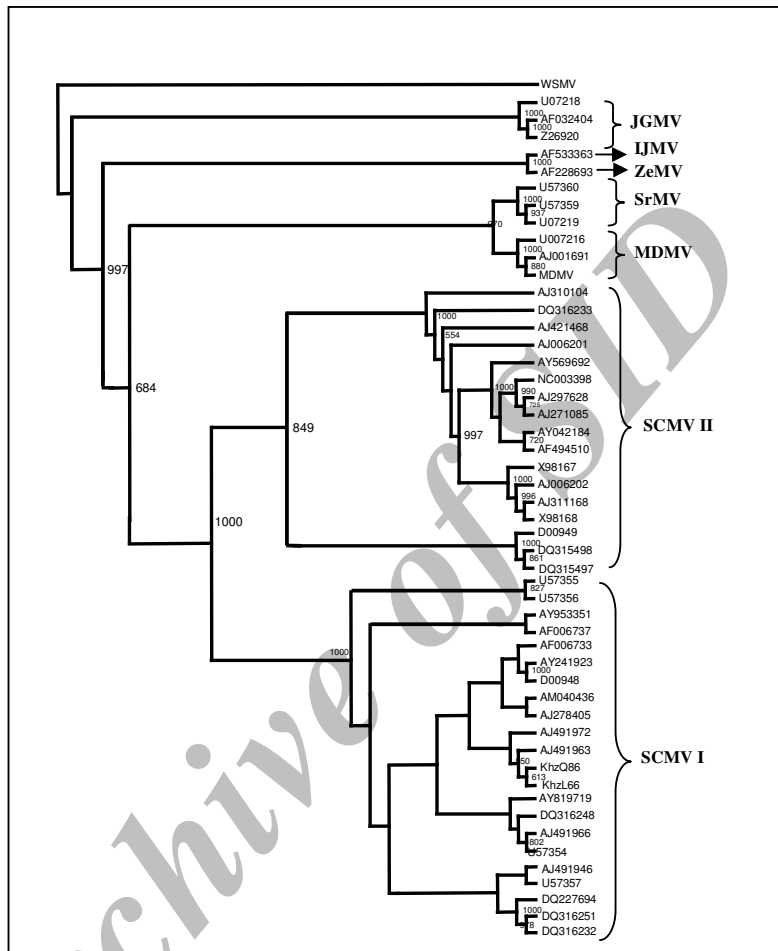
ترادف های SCMV در درخت فیلوژنتیکی که براساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR آنالیز شدند در دو گروه قرار گرفتند (شکل ۳). جدایه های ایران در کنار جدایه های مصر

(AJ491963) و آفریقای جنوبی (AJ491972) یک گروه تشکیل می‌دهند که با تعداد دیگری از سویه‌های جدا شده از نیشکر مانند (U57357) SCMV-E ، (U57354) SCMV-A و (D00948) SCMV-Sc در زیرگروه I قرار می‌گیرند. مشابهت نوکلئوتیدی جدایه‌های KhzL66 و KhzQ86 با اعضای گروه I از ۹۲/۸ تا ۹۸/۸ درصد و با اعضای گروه II از ۷۲/۲ تا ۸۳/۹ درصد می‌باشد. همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود میزان مشابهت نوکلئوتیدی بین این دو گروه ۷۰/۳ تا ۸۴/۶ می‌باشد. این در حالی است که میزان تشابه درون هر گروه بیش از ۹۰ درصد است.

علاوه بر تفاوت در ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR که سویه‌های SCMV را در دو زیرگروه عمده (I و II) قرار می‌دهد (جدول ۳)، به لحاظ دامنه میزبانی، انتشار جغرافیایی و ترادف آمینو اسیدی محل برش CP نیز تفاوت اساسی بین این دو زیرگروه وجود دارد (جدول ۶). از نظر جغرافیایی اکثر جدایه‌های چین، تمام جدایه‌های آلمان، جدایه SCMV-MDB (MDMV-B) از آیوا (آمریکا)، یک جدایه از مکزیک و چند جدایه از برزیل در گروه II قرار می‌گیرند. بااستثنای چند جدایه از چین که از نیشکر جدا شده اند بقیه جدایه‌ها از ذرت جدا شده اند. در مورد گروه I بجز چهار جدایه که از *Musa textilis* در فیلیپین جدا شده اند منشاء جدول ۶- تفاوت‌های میزبانی و مولکولی (طرح حفاظت شده در ناحیه محل برش CP از NIB) در زیرگروه‌های SCMV-I و SCMV-II و پراکنش جغرافیایی این جدایه‌ها

Table 6. Differences in host specificity and molecular properties of conserved motif of NIB-CP catalytic site and the geographical distribution of the isolates of subgroups I and II of SCMV

	Group I	Group II
NIB – CP Cleaving site	USA NEEVFHQ/A Australia NDEVFHQ/A	NEDVFHQ/S
Host	Sugarcane	Maize, a few on sugarcane
Distribution	worldwide	Europe, China, Mexico, Brazil



شکل ۳- رابطه فیلوژنتیکی بین ترادف‌های پوتی ویروس‌های گیاهان تیره غلات. دندروگرام حاصل از آنالیز neighbor-joining با برنامه CLUSTALX بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR. در این آنالیز از ویروس موزائیک رگه ای گندم بعنوان outgroup استفاده شده است. در سمت راست، گونه‌های ویروس مربوط به هر گروه ترادف نشان داده شده است.

Fig. 3. Phylogenetic relationships among selected sequences of poaceous potyvirus species. Dendrogram derived by neighbor- joining analysis using CLUSTALX based on the nucleotide sequence of CP-UTR-region. Wheat streak mosaic virus was used as outgroup. Virus species related to each clade has been shown on the right.

تمام جدایه‌ها نیشکر می‌باشد.

بحث

وجود طرح‌های (motifs) حفاظت شده در ترادف‌های آمینواسیدی جدایه‌های ایران مؤید قرار گرفتن این ترادف‌ها در جنس پوتی ویروس و گونه SCMV است. جدایه‌های ایران با تشابه نوکلئوتیدی ۹۸/۶ درصد با یکدیگر و ۹۲/۸ تا ۹۸/۸ درصد با اعضای زیرگروه I در کنار یکدیگر در این زیرگروه قرار می‌گیرند. نزدیک‌ترین ترادف‌ها به ترادف‌های ایران جدایه‌های مصر (AJ491963) و آفریقای جنوبی (AJ491972) است که با همدیگر در درخت فیلوژنتیکی یک زیرگروه را تشکیل می‌دهند. تشابه نوکلئوتیدی جدایه KhzQ86 و KhzL66 با جدایه مصر به ترتیب ۹۸/۲ و ۹۷/۲ درصد و تشابه آمینواسیدی آنها به ترتیب ۱۰۰ و ۹۹/۳ درصد است. همانطور که مشاهده می‌شود در ترادف آمینواسیدی جدایه مصر به KhzQ86 نزدیکتر است تا جدایه دیگر ایران.

با بررسی‌هایی که در دو دهه اخیر در ایران صورت گرفته، SCMV تنها از منطقه خوزستان جدا شده است. امیری و ایزدپناه (۱۹۹۳) SCMV-SCI را از نیشکر منطقه هفت تپه جدا کردند و براساس رابطه سرولوژیکی آنرا SCMV تشخیص دادند. آنالیز فیلوژنتیکی و تشابه نوکلئوتیدی نشان می‌دهد که KhzL66 و KhzQ86 دو جدایه نزدیک بهم هستند که احتمالاً پس از ورود به ایران مشتق شده‌اند. براساس آزمون ELISA، جدایه SC-Q86 با آنتی‌سرم چند همسانه‌ای MDMV-B واکنش مثبت داشت (Ghasemi 2005, Ghasemi *et al.* 2002). اگرچه MDMV-B با SCMV رابطه سرولوژیکی دارد ولی قادر به آلوده کردن نیشکر نیست (Teakle *et al.* 1989). معصومی و همکاران (۲۰۰۴) این جدایه‌ها را استرین SCMV-A تشخیص دادند. در آنالیز فیلوژنتیک در صورتیکه جدایه مصر در آنالیز قرار داده نشود جدایه‌های ایران در کنار جدایه‌های استرالیا (استرین Brisbane A) و استرین‌های A و E آمریکا (U57354 و U57357) و آفریقای جنوبی SCMV-sa قرار می‌گیرند. ترادف جدایه‌های SCMV-Q86 و SCMV-CP68 در GenBank وجود دارد (Ghasemi 2005) ولی بدلیل اینکه تنها ترادف ۷۰۰ نوکلئوتید از ناحیه CP-UTR در دسترس بود امکان استفاده از آنها در این آنالیز فراهم نگردید. آنچه که مسلم است جدایه‌ها یا استرین‌های دیگری نیز در این منطقه وجود دارد

(Amiri & Izadpanah 1993). SCMV غیر از خوزستان از مازندران نیز گزارش شده است (معینی و ایزدپناه ۲۰۰۱) ولی اطلاعات دقیقی از سویه آن در دست نیست، در هر صورت بنظر می‌رسد که جدایه‌های مورد بررسی منشاء خارجی داشته و احتمالاً با قلمه‌های وارداتی به داخل کشور وارد و پخش شده باشند.

در اکثر مطالعاتی که تاکنون روی سویه‌های SCMV انجام شده است تمایز سویه‌ها از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی و خصوصیات بیولوژیکی مانند دامنه میزبانی و دگر پادی (cross protection) مشاهده شده است و نتایج حاصل از این مقاله این موضوع را تأیید می‌کند (Yang & Mirkov 1997, Chen *et al.* 2002, Oertel *et al.* 1997, Frenkel *et al.* 1991,) می‌کند (Teakle *et al.* 1989, Handly *et al.* 1998, Algeria *et al.* 2003). با این اطلاعات بنظر می‌رسد که باز نگری در گروه بندی این ویروس ضروری باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (1-5) متن انگلیسی مراجعه شود.

سپاسگزاری

نگارندگان لازم میدانند از همکاری آقایان دکتر ساسان قاسمی و مهندس کوروش طاهرخانی بجهت اهدای جدایه‌های ویروس موزائیک نیشکر تشکر و قدردانی نمایند.

آدرس نگارندگان: محمود معصومی، آوا زارع و کرامت‌اله ایزدپناه، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس و مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

References

- ALGERIA, O. M., ROYER, M., BOUSALEM, M., CHATENET, M., PETERSCHMITT, M., GIRARD, J-C. and ROTT, P. 2003. Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six sugarcane mosaic virus isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. **Arch Virology** **148**: 357-372.
- ADAMS, M.J., ANTONIEW, J.E. and FAUQUET, C.M. 2004. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. **Arch. Virol.** **150**: 459-479
- AMIRI, F. and IZADPANAH, K. 1993. Purification, serology and transmission of *Sugarcane mosaic virus* in Khuzestan . **Proc. 11th Iran. Plant Protec. Cong. Rasht, Iran.** P.126.
- ATREYA, P.L., ATREYA, C.D. and PIRONE, T.P. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 7887-7891.
- ATREYA, P.L., LOPEZ-MOYA, J.J., CHU, M., ATREYA, C.D. and PIRONE, T.P. 1995. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyviral transmission by aphids. **J. Gen. Virol.** **76**: 265-270.
- BADGE, J., ROBIONSON, D.J., BRUNT, A.A. and FOSTER, G.D. 1997. 3'-terminal sequences of the RNA genomes of narcissus latent and Maclura mosaic viruses that they represent new genus of the *Potyviridae*. **J. Gen. virol.** **78**: 253-257.
- CHEN, J., CHEN, J. and ADAMS, M.J. 2002. Characterization of potyviruses from sugarcane and maize in China. **Arch. Virol.** **147**: 1237-1246.
- COLINET, D. and KUMMERT, J., 1993. Identification of a sweet potato feathery mottle virus isolate from China (SPFMV-CH) by the polymerase chain reaction with degenerate primers. **J. Virol. Methods.** **45**:149-159
- DOUGHERTY, W.G. and CARRINGTON, J.C. 1988. Expression and Function of potyviral gene products. **Annu. Rev. Phytopathol.** **26**: 123-143.
- FAN, Z. and LI, H. 2004. Pennisetum mosaic. Pages: 687-689. In: **Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Graminae)**. (Lapierre, H. and Signoret, P.-A., eds.) INRA Edition, Paris.
- FAN, Z., CHEN, H., CAI, S., DONG, C., WANG, W., LIANG, X. and LI, H. 2003. Molecular characterization of a distinct potyvirus from whitegrass in China. **Arch. Virol.** **148**: 1219-1224.
- FRENCH, R. and ROBERTSON, N. L. 1993. Simplified sample preparation for detection of wheat streak mosaic virus and barley yellow dwarf virus by PCR. **J. Virol. Methods.**

49: 93-100.

- FRENKEL, M. J., JILKA, J. M., MCKERN, N. M., STRIKE, P. M., CLARK, J. M. and SHUKLA, D. D. 1991. Unexpected sequence diversity in the amino-terminal ends of the coat proteins of strains of sugarcane mosaic virus. **J. Gen Virol.** **72**: 237-242.
- GHASEMI, S. 2005. Grouping of poaceae potyviruses in Iran on the basis of serological relationship and sequence of the 3' region of the genome and study of VPg-HC-Pro interaction of *Potato virus Y* using yeast two hybrid system. **PhD Thesis**, Shiraz University.
- GHASEMI, S., TAHERKHANI, K. and IZADPANA, K. 2002. Potyviruses causing mosaic in sugarcane in Khuzestan. **Proc. 15th Iran. Plant Protec. Cong. 7-11 Sept. Razi University of Kermanshah, Iran.**
- HANDLY, J.A., SMITH, G.R., DALE, J.L. and HARDING, R.M. 1996. Sequence diversity in the NIb coding region of eight sugarcane mosaic potyvirus isolates from Australia, USA and South Africa. **Arch. Virol.** **143**: 1145-1153.
- HOLMES, D.S. and QUIGLEY, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Anal. Biochem.** **114**: 193-197.
- JACQUET, C., DELECOLLE, B., LECOQ, H., DUNEZ, J. and RAVELONANDRO, M. 1998. Use of modified *Plum pox virus* coat protein genes developed to limit heteroencapsidation-associated risks in transgenic plants. **J. Gen. Virol.** **79**: 1509-1517.
- JANSON, B. F. and ELLETT, C. W. 1963. A new corn disease in Ohio. **Plant Dis. Rep.** **47**: 1107-1108.
- KOIKE, H. and GILLASPIE, A. G., 1989. Mosaic. Pp:301-322. In: **Diseases of Sugarcane-Major Diseases.** (Ricaud, C., Eagan, B. T. and Gillaspie, A. G., eds.) Scientific Publishers, Amsterdam.
- MARIE- JEANNE, V., LOOS, R., PEYRE, J., ALLIOT, B. and SIGNORET, P. 2000. Differentiation of poaceae potyviruses by reverse transcription- polymerase chain reaction and restriction analysis. **J. Phytopathol.** **148**: 141-151.
- MASUMI, M. and IZADPANA, K. 1998. Bermudagrass mosaic in Iran. **Proc. 13th Iran. Plant Protec. Cong. Vol. II.** P. 314.
- MASUMI, M., IZADPANA, K. and BEHJATNIA, S. A. A. 2001. Taxonomical position of Iranian Johnson grass mosaic virus. **Proc. 1st Iran. Cong. Virol.** Pp: 136-137.
- MASUMI, M., ZARE, A., GHASEMI, S. and IZADPANA, K. 2004. Relationship between two dominant strains of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) from Khuzistan and other

- SCMV strains based on nucleotide sequence of 3'-region of the genome. **Proc. 16th Iran Plant Protec. Cong., Vol. 2. 28 Aug - 1 Sep. 2004. Tabriz, Iran. P:314.**
- MASUMI, M., ZARE, A. and IZADPANA, K. 2005. Revision of Sugarcane mosaic virus strain grouping in the world on the basis of phylogenetic analysis of N-terminus of coat protein gene. **Proc. 3rd Iran. Cong. Virol. Tehran. Pp: 175-176.**
- MOINI, A. A., IZADPANA, K. 2001. Identification and purification of a MDMV-like virus of maize in Mazandaran. **Iran. J. Plant Path. 37:** 147-159. (Farsi and English abstract)
- OERTEL, U., SCHUBERT, J. and FUCHS, E. 1997. Sequence comparison of the 3'-terminal parts of the RNA of four German isolates of sugarcane mosaic potyvirus (SCMV). **Arch. Virol. 142:** 675-687.
- PAGE, R. D. M., 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Application in Bioscience 12:** 357-358.
- SEIFERS, D.L., SALOMON, R., MARIE-JEANNE, V., ALLIOT, B., SIGNORET, P., HABER, S., LOBODA, A., ENS, W., SHE, Y.M. and STANDING, K.G. 2000. Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel. **Phytopathology 90:** 505-513.
- SHUKLA, D. D., STRIKE, P. M., TRACY, S. L., GOUTH, K. H. and WARD, C. W. 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. **J. Gen. Virol. 69:** 1497-1508.
- SHUKLA, D.D., JILKA, J., TOSIC, M. and FORD, R.E. 1989a. A novel approach to serology of potyviruses involving affinity purified polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. **J. Gen. Virol. 70:** 13-23.
- SHUKLA, D.D., TOSIC, M., JILKA, J., FORD, R.E., TOLER, R.W., and LANGHAM, M. 1989b. Taxonomy of potyviruses infecting maize, sorghum and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. **Phytopathology 79:** 223-229.
- SALOMAN, R. and SEIFERS, D. L. 2004. Zea mosaic. Pages: 693-696. In: **Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Graminae)**. (Lapierre, H. and Signoret, P.-A., eds.) INRA Edition, Paris.
- TEAKLE, D.S., SHUKLA, D.D. and FORD, R.E. 1989. *Sugarcane mosaic virus*. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, No. 342.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. and HIGGINS, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence

alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** **24:** 4876–4882.

TOLER, R.W. 1985. Maize dwarf mosaic, the most important virus disease of sorghum. **Plant Disease** **69:**1011-1015.

WILLIAMS, L. E. and ALEXANDER, L. J. 1965. Maize dwarf mosaic, a new corn disease. **Phytopathology** **55:** 802-804.

YANG, Z. N. and MIRKOV, T.E. 1997. Sequence and relationships of sugarcane mosaic and sorghum mosaic virus strains and development of RT-PCR- based RFLPs for strain discrimination. **Phytopathology** **87:** 932-939.

ZARE, A., MASUMI, M. and IZADPANA, K. 2005. Bermuda grass southern mosaic virus: A distinct potyvirus infecting several gramineous species in Iran. **Parasitica** **61:** 105-110.

Address of the authors: M. MASUMI, A. ZARE AND K. IZADPANA, Plant Virology
Research Center, College of Agriculture, Shiraz University and
Agricultural Research and Education Organization

Archive of SID