مقاله کوتاه

خالص‌سازی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل ویروس موزائیک زرد کدو- جدایه فارس*

PURIFICATION AND THE COMPLETE GENOME SEQUENCE OF ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS- FARS ISOLATE

آرمین آذرفر[۱]، کرامت اله ایزدپناه[۱]، علیرضا افشاریفر[۱] و محمود معصومی[۲]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۵/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۱۷)

چکیده

ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus*) از نمونه‌های کدوی دارای علایم موزائیک، تاولی شدن و بدشکلی برگ و میوه و کاهش رشد از مزارع منطقه کفترک شیراز به کمک آزمون الیزا، جداسازی و یک نمونه به‌عنوان جدایه فارس این ویروس (ZYMV-F) به منظور انجام مراحل بعدی تحقیق بررسی شد. ZYMV-F در شرایط گلخانه در کدو تکثیر و از بافت‌های آلوده برای خالص‌سازی فیزیکی ویروس استفاده شد. از آنتی‌سرم به‌دست آمده از آموده خالص ویروس، در آزمون‌های سرولوژیکی استفاده شد. با بهره‌گیری از روش به دام اندازی آر ان ای پیک و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، واکنش ترانویسی معکوس و زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR) انجام شد و دی ان ای‌های تکثیر شده، همسانه‌سازی و تعیین ترادف شدند. با تجمیع ترادف‌های به‌دست آمده، ترادف کامل ژنوم ZYMV-F شامل ۹۵۹۱ نوکلئوتید (رس‌شمار JN183062 در بانک ژن) به‌دست آمد. آنالیزهای فیلوژنتیکی براساس ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ژنوم کامل و هر کدام از ژن‌ها به‌طور انفرادی نشان داد که ZYMV-F بیشترین شباهت را به جدایه‌های اسرائیل و اسلواکی ZYMV دارد. هم‌چنین براساس ترادف قسمتی از ژن پروتئین پوششی، مشخص شد که جدایه‌های ویروس در ایران در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی شباهت زیادی به هم دارند و جدایه فارس و کرج در یک گروه قرار می‌گیرند. این اولین گزارش از تعیین ترادف کامل ژنوم ZYMV در ایران و دومین گزارش از منطقه خاور میانه و نزدیک است.

واژه‌های کلیدی: فارس، ویروس موزائیک زرد کدو، خالص‌سازی ویروس، پوتی ویروس، آنالیز فیلوژنتیک، ژنوم کامل

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: masoumi@shirazu.ac.ir

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد، استاد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز

۲. استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس و مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV*) برای اولین‌بار در سال ۱۹۷۱ از ایتالیا و پس از آن به سرعت از نقاط دیگر اروپا، آفریقای شمالی، آمریکا و خاورمیانه گزارش شد. این ویروس یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های کدوئیان است و علایمی همچون کاهش رشد، موزائیک، زردی و بد شکلی برگ‌ها و میوه‌ها در گیاهان آلوده ایجاد می‌کند (Lisa *et al*. 1981) و عامل محدودکنندهٔ کشت کدوئیان محسوب می‌شود. ZYMV از جنس *Potyvirus* و دارای پیکره رشته‌ای خمش پذیر به طول ۷۵۰ نانومتر است. ژنوم ویروس از یک آر ان ای تک لای مثبت تشکیل شده که حدود ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید طول و تنها یک چارچوب خوانش باز (ORF) دارد. حاصل ترجمهٔ این چارچوب خوانش باز، یک پروتئین مرکب با بیش از ۳۰۰۰ آمینو اسید است که توسط آنزیم‌های پروتئاز کد شده توسط ویروس به ۱۰ پروتئین کوچک‌تر تبدیل می‌شود (Revers *et al*. 1999).

تاکنون تعداد معدودی جدایه ZYMV از نقاط مختلف دنیا به‌طور کامل تعیین ترادف شده ولی بیشتر آنالیزهای فیلوژنتیک براساس پروتئین پوششی انجام شده است (Lin *et al*. 2001, Glasa & Pittnerova 2006).

در ایران این ویروس برای اولین‌بار در سال ۱۳۶۶ از مزارع کدو و طالبی استان تهران (Ghorbani 1988) و سپس از سایر مناطق کشت کدوئیان در کشور گزارش شد. به منظور مقایسه سویه‌های ZYMV از روش‌های مختلف مانند علایم شناسی، دامنه میزبانی، PCR-RFLP و در حال حاضر مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR استفاده شده است (Bananej *et al*. 2008, Hosseini *et al*. 2007, Safaeizadeh 2008). مطالعات مولکولی پیشین انجام شده در ایران براساس ترادف قسمت محدودی از ژنوم ZYMV (ژن پروتئین پوششی به اضافه بخشی از ژن NIb) بوده است. در تحقیق حاضر ژنوم جدایه فارس این ویروس به‌طور کامل تعیین ترادف شد و آنالیزهای فیلوژنتیکی و تعیین جایگاه تاکسونومیکی آن براساس کل ژنوم و هر یک از پروتئین‌های رمزگذاری شده توسط آن انجام گرفت.

روش بررسی

طی بازدیدهای انجام شده از مزارع کدوی منطقهٔ کفترک (شیراز) نمونه‌های کدو دارای علایمی از قبیل موزائیک، کاهش رشد، تاولی شدن برگ و بد شکلی برگ و میوه جمع‌آوری و یک نمونه که در آزمون الیزای غیرمستقیم با آنتی سرم ZYMV از ایتالیا واکنش مثبت و با آنتی‌سرم ویروس موزائیک خیار (CMV)، ویروس موزائیک هندوانه (*Watermelon mosaic virus,* WMV-2)، ویروس موزائیک کدو (*Squash mosaic virus,* SqMV) و ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (*Cucrubit yellow stunting disorder virus,* CYSDV) واکنش منفی داشت، به‌عنوان منبع ویروس برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

ZYMV-F روی گیاه کدو تکثیر و به روش *معصومی و همکاران* (Masumi *et al*. 2000) خالص‌سازی شد. خلوص ویروس با بررسی‌های الکترون میکروسکوپی و آزمون نشت دو طرفه در ژل آگاروز تأیید شد. آنتی سرم ZYMV-F با تزریق دو میلی‌گرم ویروس خالص در چهار نوبت به فواصل یک هفته، به خرگوش نیوزیلندی تهیه و در آزمون‌های نشت دو طرفه در ژل آگاروز و ELISA (Converse & Martin 1990, Ball *et al*.1990)

www.SID.ir

مورد استفاده قرار گرفت. به کمک کیت mRNA capture (Roche) آر ان ای ویروس استخراج شده از بافت گیاه آلوده به دام انداخته شد و در واکنش ترانویسی معکوس (Reverse Transcription, RT) با آغازگر N1T (5′-GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T)17- 3′) cDNA (Ha *et al*. 2007) تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای دژنره (جدول ۱) که از هم‌ردیف‌سازی چندگانه (multiple alignment) ترادف کامل ژنوم جدایه‌های ZYMV موجود در بانک ژن (رس شمارهای نشان داده شده در شکل ۱) به کمک نرم‌افزار Fast PCR (Kalendar *et al*. 2009) طراحی شده بود انجام شد. چرخه‌های دمایی این واکنش شامل ۴ دقیقه در ۹۴°C برای واسرشته کردن اولیه، ۳۵ چرخه شامل ۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای باز جفتی مناسب برای هر آغازگر (جدول ۱) به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ °C به‌مدت ۱ دقیقه و به‌دنبال آن یک چرخه در ۷۲°C به‌مدت ۱۵ دقیقه بود.

محصولات PCR حاصل از تکثیر ژنوم ZYMV با استفاده از کیت Ins T/A clone PCR product cloning kit (Fermentas) طبق دستورالعمل شرکت سازنده در ناقل pTZ57R/T وارد شد (Sambrook *et al*. 1989). ناقل نوترکیب به منظور تکثیر به باکتری *E. coli* سویهٔ DH5α انتقال داده شد. پلاسمیدها پس از خالص‌سازی با کیت High Pure Plasmid Isolation kit (Roche) برای تعیین ترادف به شرکت Tech Dragon (هونگ کنگ) ارسال شدند.

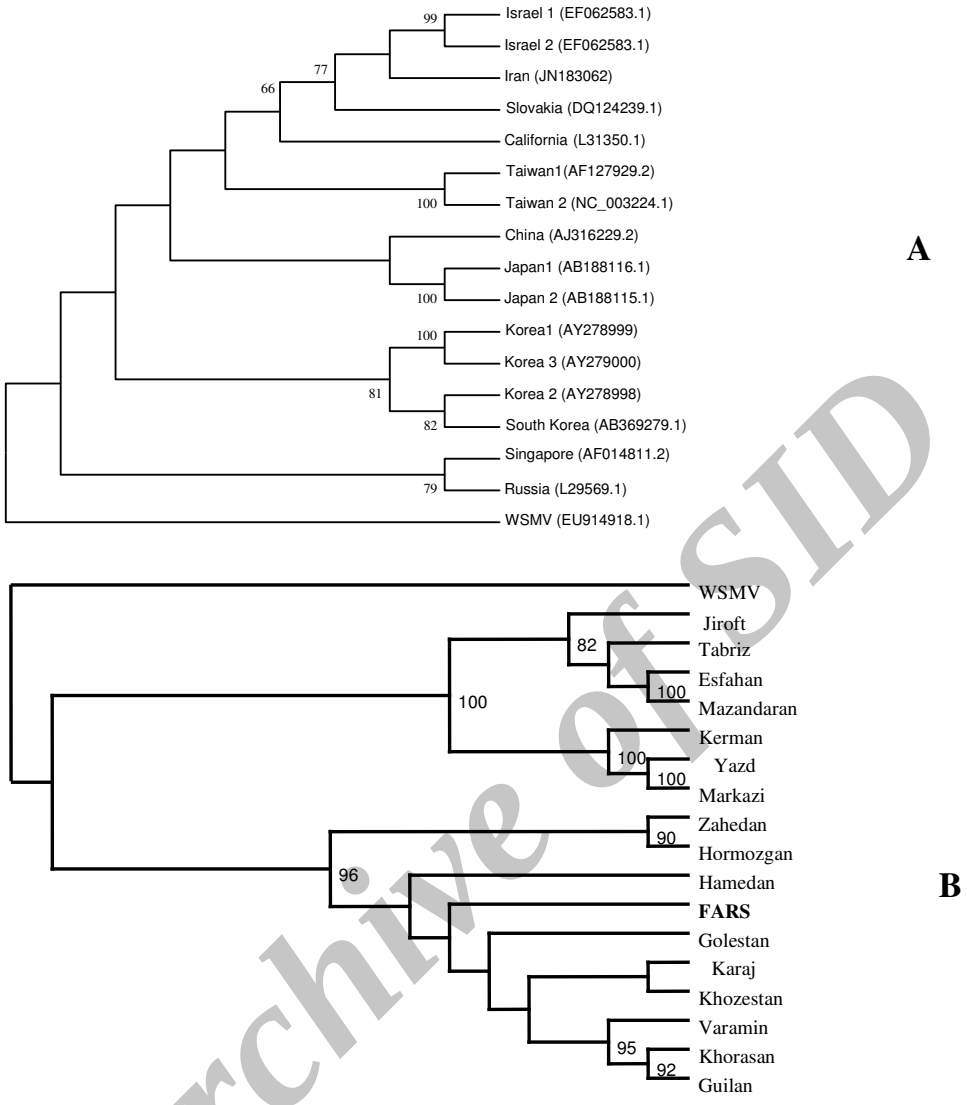
ترادف‌های به‌دست آمده از تعیین توالی در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامهٔ BLAST با ترادف‌های جدایه‌های ZYMV موجود در بانک ژن مقایسه شدند. پس از ادغام ترادف‌های به‌دست آمده، ترادف ژنوم کامل با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN version 4.02 (Lynnon Biosoft, Institute for Plant Virology, BBA, Germany) و برنامه Editseq از نرم‌افزار DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin. www.DNASTAR.com) به‌دست آمد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه (multiple alignment) به کمک نرم‌افزار Clustal X (Thompson *et al*. 1997) انجام و در برنامه MEGA5 با استفاده از الگوریتم Maximum Likelihood موقعیت تاکسونومیکی جدایه مورد مطالعه در مقایسه با سایر جدایه‌ها مشخص گردید (Tamura *et al*. 2011).

نتیجه و بحث

براساس نتایج به‌دست آمده از آزمون الیزا از ۴۰ نمونه جمع‌آوری شده از منطقه کفترک، به‌ترتیب ۱۵، ۷ و ۴ نمونه به ZYMV، CMV و WMV-2 آلوده بودند. در ۶ نمونه آلودگی توام CMV +ZYMV، در ۵ نمونه آلودگی توام CMV +WMV-2 و در ۳ نمونه آلودگی مخلوط ZYMV+ WMV-2 تشخیص داده شد. بنابراین بیشترین درصد آلودگی‌ها به‌ترتیب مربوط به ZYMV و CMV بود. آلودگی توام این دو ویروس نیز بیشتر از سایر موارد بود. در بوته‌هایی که علایم موزائیک و بندکفشی برگ‌ها را به همراه هم داشتند این دو ویروس ردیابی شدند. نتایج حاصل از خالص‌سازی ویروس مشخص کرد که روش خالص‌سازی ویروس موفقیت‌آمیز بود و غلظت ویروس به‌دست آمده از هر ۲۰ گرم بافت آلوده با در نظر گرفتن ضریب جذب ۲/۵ (Desbiez & Lecoq 1997) ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. هم‌چنین آزمون نشت در ژل آگار با آنتی سرم تولید شده نشان داد که آموده ویروس از خلوص مناسبی برخوردار بوده است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. دندروگرام رابطهٔ جدایهٔ فارس ویروس موزائیک زرد کدو (ZYMV-F, Iran, JN183062) با جدایه‌های جهان براساس ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل به روش Maximum Likelihood (A) و با جدایه‌های ایرانی براساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی به روش Neighbor-Joining (B). گروه خارجی: ویروس موزائیک رگه‌ای گندم (WSMV). بوت استرپ‌های زیر ۵۰ نشان داده نشده است.

Fig. 1. Dendrograms showing relationship of ZYMV-F (Iran, JN183062) with world isolates of ZYMV based on the sequences of complete genome using Maximum Likelihood method (A) or with Iranian isolates of ZYMV based nucleotide sequence of coat protein gene using Neighbor-Joining method (B). Wheat streak mosaic virus (WSMV) used as out group. Bootstrap values lower than 50 are not shown.

پس از ادغام ترادف‌های به‌دست آمده، ژنوم کامل ZYMV-F به اندازه ۹۵۹۱ نوکلئوتید به‌دست آمد که شامل یک چارچوب خوانش کدکننده یک پلی پروتئین با ۳۰۸۰ آمینو اسید است. این چارچوب از موقعیت نوکلئوتیدی 139 با کدون آغاز AUG شروع و در موقعیت 9378 با کدون پایانی UAA خاتمه می‌یابد. ناحیه

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲. درصد تشابه آمینواسیدی پروتئین‌های جدایه فارس ZYMV با سایر جدایه‌های ویروس

Table 3. Percent amino acid similarity of ZYMV-F proteins with selected world isolates of ZYMV

	Israel	Slovakia	Korea	Japan	Taiwan	Singapore
P1	88.7	88.3	83.2	80.9	85.8	54.7
HC-Pro	94.9	94.1	94.7	93.6	94.1	87.7
P3	99.1	99.1	95.7	97.7	97.4	93.6
6K1	100	98.1	98.1	98.1	98.1	96.2
CI	96.5	95.9	94.2	96.1	95.6	93.7
6K2	100	100	96.2	98.1	98.1	94.3
VPg	99.5	98.9	99.5	98.9	98.4	96.8
NIa	100	99.2	100	99.6	100	97.1
NIb	95.2	94.8	94.6	94.6	94.4	92.1
CP	98.9	97.8	97.5	96.3	97.8	92.4

3-UTR نیز شامل ۲۱۰ نوکلئوتید می‌باشد. درخت‌های فیلوژنتیکی که براساس هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف کامل جدایه‌های مختلف ZYMV با دو روش Maximum Liklihood (M.L) و Neighbor-Joining (N.J) انجام شد، توپوگرافی مشابهی داشتند (شکل ۱). دندروگرام به‌دست آمده براساس ژنوم کامل و هم‌چنین سایر ژن‌ها به‌طور جداگانه (داده‌ها نشان داده نشده است) مشخص نمود که ZYMV-F با جدایه‌های اسرائیل، اسلواکی و کالیفرنیا بیشترین شباهت را دارد و در یک گروه قرار می‌گیرد (شکل ۱). درصد تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی نیز این نتیجه را تأیید کرد. براساس ژنوم کامل، جدایه فارس در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به‌ترتیب ۹۸ و ۹۸/۹ درصد با جدایه اسرائیل، ۹۷/۷ و ۹۸/۴ درصد با جدایهٔ اسلواکی و ۹۵/۷ و۹۷/۷ درصد با جدایهٔ کالیفرنیا شباهت دارد. در مطالعات پیشین نشان داده شده بود که می‌توان از ترادف ژن CI به جای ژنوم کامل در آنالیزهای فیلوژنتیکی استفاده کرد (Lee *et al.* 1997). در تحقیق حاضر نیز این نتیجه به‌دست آمد و آنالیزهای انجام شده براساس ژن CI با ژنوم کامل مشابه بود. مطالعات قبلی انجام شده در مورد پروتئین پوششی نشان داده است که جدایه‌های اروپای مرکزی به هم شبیه هستند و در یک گروه فیلوژنتیکی قرار می‌گیرند (Glasa & Pittnerova 2006). از آنجایی که جدایه فارس نیز با جدایهٔ اسرائیل و اسلواکی بیشترین شباهت را داشت، می‌توان این‌گونه استنباط کرد که ZYMV-F به جدایه‌های اروپایی ویروس شباهت بیشتری دارد و احتمالاً از یک جد مشترک منشأ گرفته‌اند. تشابه آمینو اسیدی پروتئین‌های ده‌گانه جدایه فارس با سایر جدایه‌های ویروس در (جدول ۲) مقایسه شده است. از لحاظ پروتئین‌های مختلف، دورترین ویروس به ZYMV-F، جدایه سنگاپور بود. در میان پروتئین‌های ده‌گانه ZYMV، کمترین شباهت مربوط به P1 و بیشترین شباهت مربوط به NIa بود.

در مورد جدایه‌های ویروس در ایران، ترادف‌های مربوط به قسمتی از ژن پروتئین پوششی موجود در بانک ژن در آنالیزهای فیلوژنتیکی به‌کار برده شد. دندروگرام رسم شده براساس ترادف این ناحیه، نشان داد که جدایه فارس با جدایه کرج بیشترین شباهت را دارد و در یک گروه قرار می‌گیرد (شکل ۱). هم‌چنین براساس تفاوت و تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، مشخص شد که جدایه‌های ZYMV در ایران شباهت زیادی دارند و

www.SID.ir

تغییرات نوکلئوتیدی در آنها بسیار اندک است. قرار گرفتن جدایه‌های جیرفت در کنار جدایه‌های تبریز، اصفهان و مازندران (شکل ۱) نشان می‌دهد که تشابه نوکلئوتیدی این جدایه‌ها رابطهٔ کاملی با موقعیت جغرافیایی آنها ندارد و گروه‌بندی جدایه‌ها از نظر جغرافیایی با گروه‌بندی آنها از نظر فیلوژنتیکی هم‌خوانی ندارد. نتایج فیلوژنتیک در مورد جدایه‌های دنیا و نیز جدایه‌های ایران این احتمال را به‌وجود می‌آورد که ویروس از طریق دیگری غیر از ناقل مانند بذر به فواصل دور منتقل شده باشد. اما به منظور رسیدن به پاسخ قطعی در مورد تنوع جدایه‌های ایران بهتر است ترادف تعداد بیشتری از جدایه‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (136-135) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir