

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ویروس موزائیک جنوبی مرغ بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ۳' ژنوم*

GENETIC VARIATION OF BERMUDA GRASS SOUTHERN MOSAIC VIRUS ISOLATES BASED ON SEQUENCE OF 3' REGION OF GENOME

فریده فرح بخش^۱، محمود معصومی^{۲*}، علیرضا افشاریفر^۱، کرامت اله ایزدپناه^۱

و نرجس راه‌پیما سروسستانی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۷/۱۹)

چکیده

ویروس موزائیک جنوبی مرغ (Bermuda grass southern mosaic virus, BgSMV)، فراوان‌ترین ویروس مولد موزائیک در مرغ در نواحی گرمسیری جنوب ایران می‌باشد. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی BgSMV، گیاهان مرغ با علائم موزائیک از جیرفت، بوشهر، برازجان، رامهرمز، اندیمشک، شوشتر، بهبهان و داراب جمع‌آوری و ناحیه ۳' ژنوم آنها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ویروس با روش RT-PCR تکثیر و همسانه‌سازی شد. ناحیه CP-UTR این جدایه‌ها به همراه تعدادی از ترادف-های پوتی ویروس‌های غلات موجود در بانک ژن مقایسه و پس از انجام هم‌ردیف‌سازی چندگانه، مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی قرار گرفت. جدایه‌های مورد مقایسه در درخت فیلوژنتیکی در ۶ شاخه جداگانه قرار گرفتند که عبارت بودند از: BgSMV، ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (Maize dwarf mosaic virus, MDMV)، ویروس موزائیک نیشکر (Sugarcane mosaic virus, SCMV)، ویروس موزائیک قیاق (Johnson grass mosaic virus, JGMV)، ویروس موزائیک سورگوم (Sorghum mosaic virus, SrMV) و دو ویروس موزائیک ایرانی قیاق (Iranian Johnson grass mosaic virus, IJMV) و موزائیک زآ (Zea mosaic virus, ZeMV) که در یک شاخه قرار گرفتند. در بین پوتی ویروس‌ها، BgSMV بیشترین تشابه را با MDMV داشت. اما در ناحیه ۵' ژن پروتئین پوششی BgSMV، ۹۰ نوکلئوتید (معادل ۳۰ آمینو اسید) بیشتر از MDMV داشت و این مساله در تمام جدایه‌های BgSMV صادق بود. میانگین درصد تشابه نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR بین جدایه‌های BgSMV، ۹۸/۱ درصد به دست آمد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی پایین این ویروس در این ناحیه از ژنوم است. به رغم وجود تشابه نوکلئوتیدی بالای BgSMV با MDMV، با توجه به تفاوت‌های اساسی از نظر دامنه میزبانی و سرولوژی بین دو ویروس و وجود یک قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی اضافی در ناحیه ۵' ژن CP، BgSMV به عنوان گونه‌ای نزدیک به MDMV در جنس پوتی ویروس در نظر گرفته می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پوتی ویروس، آنالیزهای فیلوژنی، ویروس موزائیک جنوبی مرغ، ویروس موزائیک کوتولگی ذرت، ناحیه

CP-UTR

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

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

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشگاه شیراز

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

۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مقدمه

(Izadpanah 2000, Masumi et al., 2004, Zare et al. 2005).

این ویروس که به نام ویروس موزائیک جنوبی مرغ (Bermuda grass southern mosaic virus, BgSMV) نامیده شد (Masumi and Izadpanah 2000) از نظر ترادف نوکلئوتیدی، خصوصیات سرولوژیکی، انتقال و دامنه میزبانی تشابه بسیار زیادی با MDMV که گسترده ترین پوتی ویروس ذرت در دنیا می‌باشد دارد، ولی به دلیل داشتن ۹۰ نوکلئوتید اضافی نسبت به MDMV در ناحیه ۵ ژن پروتئین پوششی (CP)، تشکیل مهمیزک (spur) در آزمون نشت دو طرفه در ژل آگار، عدم توانایی انتقال با شته *Rhopalosiphum maidis* و عدم ایجاد آلودگی در قیاق، از MDMV متمایز می‌شود (Zare et al. 2005).

گروه دوم شامل جدایه‌هایی است که در مناطق معتدل ایران از جمله شیراز و کرج شایع هستند و به نام ویروس موزائیک مرغ (Bermuda grass mosaic virus, BgMV) نامیده شدند (Masumi and Izadpanah 2000). BgMV از نظر ویژگی‌های علائم شناسی، مورفولوژی و انتقال، به پوتی ویروس‌ها تشابه دارد ولی فاقد رابطه سرولوژیک با پوتی ویروس‌های غلات است (Hosseini and Izadpanah 2005). BgMV با *Spartina mottle virus* (SpMV) قرابت سرولوژیکی و فیلوژنتیکی دارد و جنس جدید *Sparmovirus* برای آنها پیشنهاد شده است (Hosseini et al. 2010). به رغم فراوانی BgSMV در جنوب ایران در خصوص میزان تنوع ژنتیکی آن اطلاعاتی در دست نیست. در این تحقیق، میزان تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف BgSMV جمع‌آوری شده از مناطق جیرفت، برازجان، بوشهر، شوشتر، اندیمشک، بهبهان، رامهرمز و داراب با استفاده از آنالیز مولکولی ترادف ناحیه CP-UTR مورد بررسی قرار گرفت.

گیاهان غیرزرعی تیره غلات به ویژه گونه‌های چندساله از قبیل مرغ، میزبان تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی هستند که برخی از آنها دارای اهمیت اقتصادی بوده و تعدادی دارای اهمیت بالقوه هستند (Buddenhagen 1983). علف هرز مرغ یا Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) به طور گسترده‌ای در سراسر دنیا در شرایط اقلیمی مختلف انتشار دارد. تاکنون چندین ویروس از جمله ویروس خراشک مرغ (*Bermuda grass etched-line virus, BELV*)، ویروس نوارک سبزرده مرغ (*Cynodon chlorotic streak virus, CCSV*)، ویروس کوتولگی زرد جو (*Barley yellow dwarf virus, BYDV*)، MDMV، SCMV و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*) در مناطق مختلف جهان از مرغ گزارش شده‌اند (Garrido and Trujillo 1992, Jorda et al. 1995, Lockhart et al. 1993, Louie 1980, McKirdy and Jones 1985a, b). در ایران نیز این علف هرز منبع چندین ویروس می‌باشد که تعدادی از آنها از لحاظ اقتصادی اهمیت دارند (Izadpanah 1989; Izadpanah et al. 2003; Masumi and Izadpanah 1996). برای اولین بار علائم موزائیک در مرغ توسط معصومی و ایزدپناه ابتدا در شیراز و سپس در سایر مناطق کشور دیده شد (Masumi and Izadpanah 1998). بررسی‌های بیشتر نشان داد که ویروس‌های مولدموزائیک مرغ در دو گروه قرار می‌گیرند (Masumi and Izadpanah 2000). گروه اول شامل جدایه‌هایی است که گسترش وسیعی در نواحی گرمسیر جنوب ایران مانند جیرفت، بوشهر و اهواز دارند و در طبیعت علاوه بر مرغ، ذرت و رشدی را نیز آلوده می‌کنند (Ghasemi and Izadpanah 2000; Masumi and

روش بررسی

منبع جدایه‌های BgSMV

جدایه‌های مورد مطالعه از گیاهان مرغ با علائم موزائیک از مناطق جیرفت، برازجان، بوشهر، شوشتر، اندیمشک، بهبهان و داراب جمع آوری گردید و از هر منطقه تنها یک نمونه برای استخراج ویروس و تعیین ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج ویروس، جداسازی RNA و واکنش RT-PCR

پس از عصاره‌گیری نمونه‌ها در ۳ حجم بافر سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار، pH= ۶/۵، با کلروفرم به نسبت ۳۰ درصد تیمار و سانتریفوژ شدند و از روشنین به دست آمده برای تهیه cDNA استفاده گردید. مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت mRNA Capture (Roche) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. از آن ای متصل شده به لوله برای واکنش ترانویسی معکوس (Reverse Transcription, RT) با آنزیم (Moloney murine Reverse Transcriptase (leukemia virus, MmLV (Fermentas) استفاده شد. واکنش RT با مخلوط نمودن ۱۰ میکرولیتر بافر ۵ برابر غلظت مخصوص، ۰/۴ میلی مولار DTT، ۰/۴ میلی مولار مخلوط dNTPs، ۰/۶ میکرومولار آغازگر N1T یا Oligo dT (جدول ۱) و ۲۰ واحد آنزیم MmLV تهیه شد. مخلوط حاصل با افزودن آب به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگه‌داری گردید. cDNA حاصل از واکنش RT با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شد. مخلوط مورد استفاده در واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase buffer (۱۰×)، ۱/۵ میلی مولار MgCl₂، ۰/۲ میلی مولار مخلوط dNTPs، ۰/۴

میکرومولار از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (جدول ۱)، ۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (Cinagen, Iran) و ۳ میکرولیتر cDNA بود و در نهایت حجم مخلوط با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR متشکل از یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه به منظور واسرشته‌سازی اولیه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، تافتن (Annealing) به مدت ۱ دقیقه در دمای مناسب برای هر جفت آغازگر (جدول ۲) و سنتز در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، به علاوه یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای امتداد رشته‌ها (Extension) بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندورف و یا مدل iCycler شرکت Bio Rad انجام شد.

محصول PCR با استفاده از InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit طبق دستورالعمل سازنده (Fermentas) در پلاسمید pTZ57R/T وارد و در باکتری *E. coli* استرین DH5 α هم‌سانه‌سازی گردید. پلاسمیدها پس از استخراج به روش هولمز و کویگلی (Holmes and Quigley 1981)، به منظور تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال گردیدند و با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 تعیین ترادف شدند.

آنالیز فیلوژنتیک

پس از تجمیع قطعات تعیین ترادف شده حاصل از ۳ تا ۶ کلنی از هر قطعه ترادف استنتاجی (Consensus sequence) با استفاده از نرم‌افزارهای DNAMAN و Edit Seq (DNASTAR) به دست آمد. سپس این ترادف‌ها با ترادف سایر پوتی ویروس‌های مرتبط موجود در بانک ژن (جدول ۴) شامل SCMV، IJMV، JGMV، MDMV و SrMV مقایسه

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر ناحیه CP-UTR جدیده‌های BgSMV

Table 1. Primers used in polymerase chain reaction (PCR) for amplification of the CP-UTR region of BgSMV isolates

| Name | Orientation | Sequence** | Reference |
|---------|-------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| N1T | Reverse | 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T)18-3' | Ha <i>et al.</i> 2007 |
| MDR3 | Reverse | 5'-ACCAVACCATYARWCCACTC-3' | * |
| MDR1 | Reverse | 5'-RTGCATRATTTGTCTGAAAGTTGG-3' | * |
| BJPr2 | Reverse | 5'-GTGCTGGAGTGCAGATGAC-3' | * |
| BJPr1b | Reverse | 5'-CGGTAAAGTTTCGCTGAAGTCC-3' | * |
| BJPf2 | Forward | 5'-CACACGAGCAACCAAGGCTG-3' | * |
| BJPf1 | Forward | 5'-GATCTTCCAGATTATTGGCTGAYG-3' | * |
| MDF3 | Forward | 5'-GATGAGTTRAAYGTYTATGCACGAC-3' | * |
| Oligo1n | Forward | 5'-ATGGTHTGGTGYATHGARAAYGG-3' | Mari- Jeanne <i>et al.</i> 2000 |
| Oligo2n | Reverse | 5'-TGCTGCKGCYTTTCATYTG-3' | Mari- Jeanne <i>et al.</i> 2000 |

*:Primes used in this study

** : Degenerated Codes: V(A/C/G) , D(A/G/T),M(A/C),Y(T/C),R(A/G)

جدول ۲. چرخه دمایی آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگرهای مندرج در جدول ۱

Table 2. Thermal cycle used in polymerase chain reaction (PCR) for primers of table 1

| Number of cycle | Reaction stage | Temperature (°C) | Time(min) |
|-----------------|----------------------|------------------|-----------|
| 1 | Initial denaturation | 94 | 4 |
| 35 | Denaturation | 94 | 1 |
| | Annealing | * | 1 |
| | Extension | 72 | 1 |
| 1 | Final extension | 72 | 1 |

* دمای تافتن ۵۶ °C برای جفت آغازگر Mdf3/MDr3

دمای تافتن ۶۰ °C برای جفت آغازگر Mdf3/MDr1

دمای تافتن ۵۸ °C برای جفت آغازگرهای BJPf1/BJPr2, BJPf1/BJPr1b و BJPf2/N1T

*56 °C for primer pair Mdf3/MDr3

60 °C for primer pair Mdf3/MDr1

58 °C for primer pairs BJPf1/BJPr2, BJPf1/BJPr1b and BJPf2/N1T

با استفاده از برنامه Treeview 1.6.6 (Page 1996) ترسیم گردید. در این آنالیز ویروس موزائیک رگه‌ای گندم (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) به عنوان out group به کار گرفته شد.

برای مقایسه جدایه‌های BgSMV با یکدیگر و نیز با سایر پوتی ویروس‌های غلات از ترادف نوکلئوتیدی ژن

گردیدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه (Multiple alignment) با برنامه‌های MegAlign (DNASTAR) و CLUSTAL X (Thompson *et al.* 1997) انجام و مشابهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با روش Neighbour joining در برنامه CLUSTAL X محاسبه شد. درخت فیلوژنتیکی حاصل از هم‌ردیف‌سازی چندگانه

در پروتئین است. در غیر این صورت پروتئین در سطح آمینو اسیدی محافظت شده (Conserved) بوده و انتخاب منفی در تکامل و تغییر ویروس دخالت داشته است. در صورتی که این نسبت برابر با یک باشد تکامل خنثی داشته است.

برای بررسی این نسبت از برنامه Hy Phy از بسته نرم‌افزاری MEGA 5.05 (Tamura et al. 2011) استفاده شد که جاننشینی‌ها را در جایگاه کدون آمینو اسیدی محاسبه می‌کند. برای این کار ابتدا آزمون خنثی بودن (Neutrality test) به دو روش Tajima's test و Z-test با مدل تکاملی Nei-Gojobori (Nei & Kumar 2000) با همان نرم‌افزار انجام گرفت و در صورت رد فرضیه صفر مبنی بر نبودن حالت خنثی و امکان وقوع جاننشینی مثبت یا منفی نسبت جاننشینی تعیین گردید. هم‌چنین تنوع ژنتیکی (Genetic diversity) با همان بسته نرم‌افزاری در درون گونه‌ها و بین گونه‌ها با مدل Kimura 2-parameter محاسبه گردید.

نتیجه

با تجمیع قطعات نوکلئوتیدی حاصل از مترادف یابی، قطعاتی به اندازه ۱۲۸۴-۱۲۴۶ نوکلئوتید به دست آمد. قطعات تعیین ترادف شده شامل قسمتی از نیمه ۳' ژن N1b (در جدایه‌های مختلف ۸۴-۴۸ نوکلئوتید) و کل ژن پروتئین پوششی (۹۶۳ نوکلئوتید) و ناحیه ترجمه نشدنی ۳' (3'-untranslated region, 3'-UTR) (۲۳۴-۲۳۲) نوکلئوتید) است. کدون خاتمه چهارچوب خوانش (ORF) پلی پروتئین ویروس در انتهای ژن CP در برخی جدایه‌ها TGA و در تعدادی TAA بود (جدول ۳).

سایت برشی احتمالی CP با N1b، VIDVKHQ/A

کامل CP به علاوه مترادف نوکلئوتیدی ناحیه 3'-UTR (CP-UTR) استفاده گردید.

بررسی روند تغییرات در مترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR

تشابه نوکلئوتیدی با روش maximum likelihood با مدل جاننشینی نوکلئوتیدی F84 و با نسبت transition/transversion متغیر که برای هر جایگاه نوکلئوتیدی محاسبه می‌شود، در طول مترادف نوکلئوتیدی CP-UTR با برنامه SimPlot محاسبه گردید و طرح تشابه ترسیم گردید. در این روش تشابه گروه‌های (ویروس‌های) مختلف نسبت به یک ویروس سنجیده می‌شود (Ray 1999).

بررسی وقوع نوترکیبی بین BgSMV و سایر پوتی ویروس‌های غلات

برای بررسی امکان وقوع نوترکیبی بین پوتی ویروس‌ها، به ویژه بین BgSMV و سایر ویروس‌ها، مترادف‌های CP-UTR این ویروس‌ها با نرم‌افزار SimPlot (Ray 1999) و نرم‌افزار RDP3 برنامه‌های Bootscan و MaxKai مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی نسبت جاننشینی مترادف و غیر مترادف آمینو اسیدی و فشار انتخاب

نسبت جاننشینی غیر مترادف (Non-Synonymous) به مترادف (Synonymous) در آمینو اسیدها که با علامت ω نشان می‌دهند، تخمین مناسبی از فشار انتخاب (Selective pressure) در سطح پروتئین به دست می‌دهد (Kimura 1983). اگر این نسبت بالاتر از یک باشد نشان‌دهنده انتخاب مثبت و تثبیت جاننشینی آمینو اسیدی

جدول ۳. اندازه ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های BgSMV در قسمت‌های مختلف ناحیه انتهای ۳' ژنوم

Table 3. Length (nt) of 3'-region in BgSMV isolates.

| | Segment length (nt) | Nib | CP | 3'UTR | Termination codon |
|-----------|---------------------|-----|-----|-------|-------------------|
| Behbahan | 1284 | 84 | 963 | 233 | TGA |
| Andimeshk | 1249 | 48 | 963 | 234 | TAA |
| Borazjan | 1246 | 48 | 963 | 232 | TGA |
| Bushehr | 1246 | 48 | 963 | 232 | TAA |
| Jiroft | 1281 | 81 | 963 | 234 | TGA |
| Ramhormoz | 1248 | 48 | 963 | 234 | TGA |
| Shushtar | 1246 | 48 | 963 | 232 | TGA |
| Darab | 1248 | 48 | 963 | 234 | TGA |

ویروس‌های مختلف بین ۸/۸۵-۶/۵۴ درصد متغیر است. کمترین میزان تشابه بین این ویروس با JGMV و بیشترین درصد تشابه بین این ویروس با MDMV به دست آمد. با بررسی درصد شباهت نوکلئوتیدی درون جدایه‌های مختلف BgSMV بیشترین درصد شباهت بین دو جدایه بهبهان و شوشتر (۹۹/۸) و کمترین شباهت بین دو جدایه داراب و برازجان (۹۲/۴) به دست آمد (جدول‌های ۶ و ۷). با هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف ناحیه CP-UTR جدایه‌های BgSMV با ترادف‌های تعدادی از جدایه‌های MDMV موجود در بانک ژن مشخص شد که تمام جدایه‌های تعیین ترادف شده BgSMV، در ناحیه ۵' ژن CP، ۹۰ نوکلئوتید بیش از MDMV دارند (شکل ۳).

روند تغییرات در تشابه نوکلئوتیدی بین BgSMV و سایر پوتی ویروس‌های غلات در ناحیه CP-UTR

تشابه هر ویروس نسبت به سایر ویروس‌ها با برنامه Simplot در ناحیه CP-UTR ترسیم گردید (شکل ۴). طرح مشابهت (Similarity Plot) بر اساس تشابه نوکلئوتیدی در جایگاه‌های مختلف از طرف ۵' به ۳' ترسیم گردید. در این مقایسه BgSMV به عنوان مبنا قرار

است. طرح حفاظت شده DAG که در انتقال با شته دخالت دارد (Aterya *et al.* 1991; 1995)، K/DK/DV محل برش ناحیه انتهای آمینی (N-terminal) ژن CP، QMKAAA و نیز MVWCIENGSP که مشخصه اعضای جنس پوتی ویروس هستند (McDaniel and Gordon 1989) در ترادف‌های به دست آمده از ژن CP جدایه‌های BgSMV مشاهده شدند (شکل ۱). به علاوه طرح حفاظت شده R-X43-D نیز که محل اتصال پروتئین پوششی به RNA است (Jacquet *et al.* 1998) در این ژن وجود داشت و با علامت ستاره مشخص شده‌اند (شکل ۱). موقعیت طرح‌های ذکر شده در ژن پروتئین پوششی جدایه‌های BgSMV در جدول ۵ مشخص شده است.

رابطه فیلوژنتیکی پوتی ویروس‌های غلات که بر اساس ترادف ناحیه CP-UTR ترسیم شده است، در شکل ۲ مشاهده می‌شود. در درخت فیلوژنتیک ترادف‌های مربوط به جدایه‌های مختلف BgSMV در کنار جدایه‌های MDMV، اما در شاخه‌ای جداگانه قرار می‌گیرند. ترادف‌های SrMV، SCMV و JGMV نیز هر کدام گروه جداگانه‌ای را تشکیل می‌دهند. IJMV و ZeMV نیز در یک شاخه قرار می‌گیرند. میزان تشابه نوکلئوتیدی بین جدایه‌های مختلف BgSMV بیش از ۹۰٪ و بین پوتی

جدول ۴. رس شمار و منشأ پوتی ویروس‌های غلات که در آنالیزهای فیلوژنتیک به کار برده شدند.

Table 4. Accession numbers and origins of cereal potyviruses used in phylogenetic analysis

| virus | accession No. | strain or isolate | country |
|-------|---------------|-------------------|-----------|
| MDMV | AF395135 | | Israel |
| MDMV | FM883223 | Sz0705 | Hungary |
| MDMV | AJ001691 | MDMV-BU | Bolgaria |
| MDMV | NC 003377 | ACOL01003377.1 | USA |
| MDMV | AM110758 | SP | Spain |
| MDMV | AJ416634 | M3 | Spain |
| MDMV | DQ973169 | MDMV-Arg | Argentina |
| MDMV | U007216 | MDMV-JIL | USA |
| MDMV | AJ542536 | Sc/H | Hungary |
| JGMV | U07218 | JGMV-KS1 | USA |
| JGMV | AF032404 | Krish | Australia |
| JGMV | Z26920 | JGMV-AUST | Australia |
| ZeMV | AF228693 | | Israeal |
| IJMV | AF533363 | IJMV-Shiraz | Iran |
| SCMV | D00948 | Sc | Australia |
| SCMV | U57354 | A | USA |
| SCMV | U57357 | E | USA |
| SCMV | D00949 | SCMV-MDB | USA |
| SCMV | AJ006200 | SCMV-G952 | Germany |
| SCMV | AJ271085 | Zhejiang | China |
| SrMV | U57360 | SrMV-SCM | USA |
| SrMV | U07219 | SrMV-Sch | USA |
| BgSMV | KC107758 | Behbahan | Iran |
| BgSMV | KC107759 | Andimeshk | Iran |
| BgSMV | KC113506 | Shushtar | Iran |
| BgSMV | KC113505 | Ramhormoz | Iran |
| BgSMV | KC113504 | Jiroft | Iran |
| BgSMV | KC107761 | Bushehr | Iran |
| BgSMV | KC107760 | Borazjan | Iran |
| BgSMV | KC113507 | Darab | Iran |

ناحیه است. سپس از موقعیت نوکلئوتیدی حدود ۳۵۰ شیب منحنی به شکل یکنواختی رو به کاهش می‌گذارد. این قسمت به دلیل نزدیک تر بودن به خط مبنا، بیشترین تشابه را نشان می‌دهد و مربوط به ناحیه میانی ژن CP (Core protein) (ناحیه حفاظت شده ژن CP) می‌باشد. از موقعیت نوکلئوتیدی حدود ۷۰۰، شیب منحنی با زاویه

گرفته و سایر ویروس‌ها با آن مقایسه شدند. در این طرح (شکل ۴) BgSMV به ترتیب با MDMV، SCMV و IJMV بیشترین شباهت را داشت. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، از موقعیت نوکلئوتیدی حدود ۲۲۰ بتدریج شیب منحنی افزایش می‌یابد. این قسمت که مربوط به ناحیه آمینی CP است نشان‌دهنده تفاوت زیاد در این

ELNVYARQFFNDLDPDYLA **DEVIDVKHQ**/AGENV **DAG**QETEAQKEAKKKAEEKKARE
TEAKRKQEAETKQKADDEARERQRVKEAADKKKAEDDAKKKAAEKPSGSGSAE **KDK**
DVDAGTLGSMTVPKLGKAMSKMRLPQAKGKNILHLDFLLQYKPQQQDLSNTRATKAE
FD*RWYEA VQKEYELDDTQMTVVMVMSGL **MVWCIENG CSP**NINGVWTMMD*GDEQRTF
PLKPVIEASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTEKYMPRYGLQRNLTDFFSLARYAFDFY
EMSSRTPARAKEAHM **QMKAAA**VRGSNTRMFGLDGNVGETQENTERHTAGDVS RNMH
SLLGVQQGH

شکل ۱. موقعیت جایگاه‌های برشی و طرح‌های حفاظت شده پروتئین پوششی جدایه‌های BgSMV

Fig. 1. Positions of cleavage sites and conserved motifs in CP of BgSMV isolates

جدول ۵. موقعیت طرح‌های حفاظت شده در CP جدایه‌های BgSMV

Table 5. Position of conserved motifs in CP of BgSMV isolates

| Conserved motifs | Amino acid position in BgSMV CP | Putative function |
|------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| DAG | 6-8 | Aphid transmission |
| MVWCIENGSP | 169-179 | Motif of coat protein |
| K/DK/DV | 83-87 | N-terminal cleavage site of CP |
| QMKAAA | 272-277 | Motif of coat protein |
| R-X43-D | 145-189 | RNA binding |

جدول ۶. درصد تشابه (Similarity) نوکلئوتیدی گونه‌های مختلف پوتی ویروس‌های غلات بر اساس ناحیه CP-UTR

Table 6. Nucleotide identity between cereal potyvirus species in CP- UTR region

| | JgMV | IJMV | MDMV | BgSMV | SrMV | SCMV |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| JgMV | | | | | | |
| IJMV | 38.2-42.1 | | | | | |
| MDMV | 38.1-41.5 | 61-72.2 | | | | |
| BgSMV | 37-52.3 | 58.9-69.8 | 85.5-90.2 | | | |
| SrMV | 38.8-56 | 60.4-64.5 | 65.2-72.6 | 70.1-72.2 | | |
| SCMV | 38.1-52.7 | 62.2-63.3 | 62-65.2 | 59.3-66.6 | 56.3-61.5 | |

MDMV یکسان است (شکل ۴-B).

ردیابی نو ترکیبی در BgSMV

وقوع نو ترکیبی در جدایه‌های BgSMV به روش BootScan مورد بررسی قرار گرفت (نشان داده

کمتری نسبت به ناحیه آمینی CP افزایش می‌یابد. این تغییر شیب مربوط به ناحیه کربوکسیلی CP است که نسبت به ناحیه آمینی تغییر پذیری کمتر دارد (شکل ۴-A). با مبنا قرار دادن ویروس SCMV مشخص شد که تغییرات در جایگاه‌های نوکلئوتیدی بین دو ویروس BgSMV و

جدول ۷. درصد تشابه نوکلئوتیدی جدایه‌های مختلف BgSMV با یکدیگر بر اساس ناحیه CP-UTR

Table 7. Nucleotide identity between BgSMV isolates in CP-UTR region

| Isolates | Jiroft | Ramhormoz | Behbahan | Shushtar | Andimeshk | Borazjan | Bushehr | Darab |
|-----------|--------|-----------|----------|----------|-----------|----------|---------|-------|
| Jiroft | | | | | | | | |
| Ramhormoz | 99.3 | | | | | | | |
| Behbahan | 98.8 | 98.6 | | | | | | |
| Shushtar | 99.1 | 98.9 | 99.8 | | | | | |
| Andimeshk | 98.1 | 98.2 | 98.2 | 98.3 | | | | |
| Borazjan | 97.4 | 96.8 | 97.3 | 97.4 | 96.7 | | | |
| Bushehr | 97.8 | 98.3 | 97.8 | 97.9 | 97.7 | 97.8 | | |
| Darab | 93 | 93.1 | 93.4 | 93.5 | 93.1 | 92.4 | 92.5 | |

در صورتی که درون جدایه‌های MDMV این نسبت ۰/۳۶۵۳ محاسبه گردید (جدول ۸).

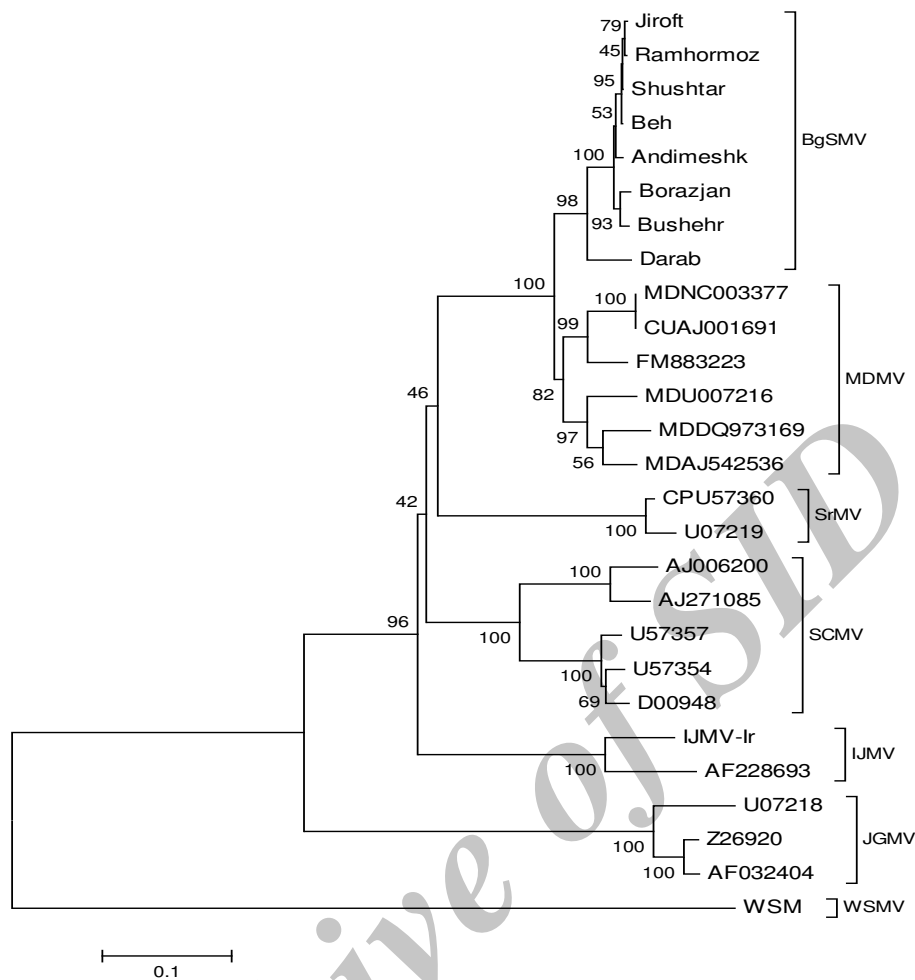
نشده است). هیچ نوع نو ترکیبی مشخصی در بررسی ناحیه CP-UTR جدایه‌های این ویروس با پوتی ویروس‌های دیگر غلات تشخیص داده نشد.

بحث

با بررسی مترادف‌های به دست آمده ناحیه CP-UTR جدایه‌های مختلف BgSMV مشخص شد که پروتئین پوششی BgSMV دارای ۳۲۲ آمینو اسید است که با آمینو اسید آلانین آغاز می‌شود و کدون انتهایی آن در جدایه‌های اندیمشک و بوشهر TAA و در سایر جدایه‌ها، TGA می‌باشد. در همدیف‌سازی چندگانه این ویروس با سایر اعضای جنس پوتی ویروس، مشخص شد که این ویروس نیز همانند سایر اعضا دارای ناحیه مرکزی حفاظت شده در ژن CP است، در صورتی که انتهای آمینی و کربوکسیلی این ناحیه متغیر می‌باشد. حفاظت شدگی بالا در ناحیه مرکزی (Core region) ژن پروتئین پوششی مبین اهمیت این ناحیه در ساختار و هم آیش مولکول‌های CP است (Shukla and Ward 1989)، در حالی که تنوع در ناحیه N-terminal نشان‌دهنده نقش این ناحیه در فعالیت‌های اختصاصی ویروس و نیز برهمکنش‌های ویروس، ناقل و میزبان است (Reichmann et al. 1992). از بین پوتی

بررسی انتخاب طبیعی درون گروهی و بین گونه‌های مختلف پوتی ویروس‌های غلات

بر اساس آزمون‌های Tajima's test و Z-test در سطح ۰/۵٪ تمام dN های محاسبه شده بین گروه‌ها کمتر از dS بود (با توجه به فرضیه صفر که $dN=dS$ باشد) بنابراین انتخاب (selection) بین گروه‌ها حالت خنثی نداشته است. بنابراین میزان جانشینی مترادف و غیر مترادف برای گروه‌های مختلف محاسبه گردید. آزمون‌های میزان جانشینی غیر مترادف (dN) در حالت‌های مختلف بین جدایه‌های یک گونه و گونه‌های مختلف، نشان می‌دهد که جانشینی آمینو اسیدی در بین جدایه‌های BgSMV نسبت به سایر گونه‌ها بسیار پایین است (۰/۰۸۷۹). در صورتی که درون جدایه‌های MDMV ۰/۱۶۲۸ و SCMV ۰/۲۰۹۴ محاسبه گردید. همین‌طور جانشینی‌های مترادف نیز همین روند را داشت. نسبت dN/dS یا ω نیز در بین جدایه‌های BgSMV کمترین مقدار را به خود اختصاص داده است.

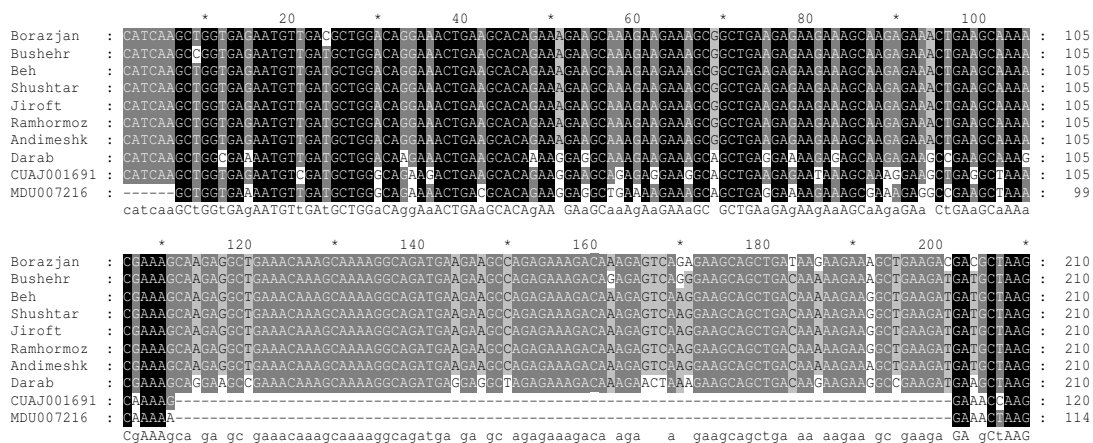


شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی که رابطه BgSMV را با پوتی ویروس‌های غلات نشان می‌دهد. این فیلوگرام بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR با روش Neighbour-joining و با استفاده از نرم افزار MEGA5 ترسیم شده است. اعداد روی شاخه‌ها نشان دهنده درصد bootstrapping هر کدام از آنهاست که گروه‌بندی را تأیید می‌کند. در این آنالیز از ویروس موزائیک رگه ای گندم به عنوان out group استفاده شده است. در سمت راست، گونه‌های ویروس مربوط به هر گروه از ترادف‌ها نشان داده شده است.

Fig. 2. Phylogenetic tree illustrating the relationships of BgSMV with other cereal potyviruses. The phylogram was generated by using the neighbour- joining method by MEGA5 from multiple alignment of CP- UTR sequences. The number of each branch indicates the percentage of bootstraps, which support the grouping at that made. WSMV was used as an outgroup in this phylogram. The species acronyms present at the right of phylogram.

در تمام جدایه‌های آنالیز شده این قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی موجود و در موقعیت مشابهی قرار دارد. نتایج این مطالعه هم‌چنین نشانگر حفاظت شدگی بسیار زیاد (نزدیک به ۱۰۰ درصد) در ترادف ناحیه ۹۰ نوکلئوتیدی در میان هشت جدایه مورد بررسی بود. در مورد نقش این ۹۰ نوکلئوتید و منشأ آن اطلاعاتی در دست نیست. ولی از

ویروس‌های غلات، BgSMV بیشترین تشابه نوکلئوتیدی را با MDMV دارد (Zare et al. 2005). علی‌رغم این تشابه بالا، در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۹۸-۱۰۸ ژن CP، BgSMV یک ترادف ۹۰ نوکلئوتیدی معادل ۳۰ آمینواسید بیشتر از MDMV دارد (Zare et al. 2005). در این تحقیق علاوه بر تأیید مطالعات قبلی، مشخص شد که



شکل ۳. مقایسه چند ردیفی ترادف ناحیه ۵ پروتئین پوششی جدایه‌های BgSMV با دوجایه MDMV موجود در بانک ژن. محل حذف ۹۰ نوکلئوتیدی در ترادف‌های MDMV در موقعیت ۱۱۲ تا ۲۰۱ مشاهده می‌شود.

Fig. 3. Multiple alignment of 5'-region at coat protein gene of BgSMV and MDMV isolates. The deleted 90nt region has been showed at position 112 to 201 corresponding to BgSMV isolates.

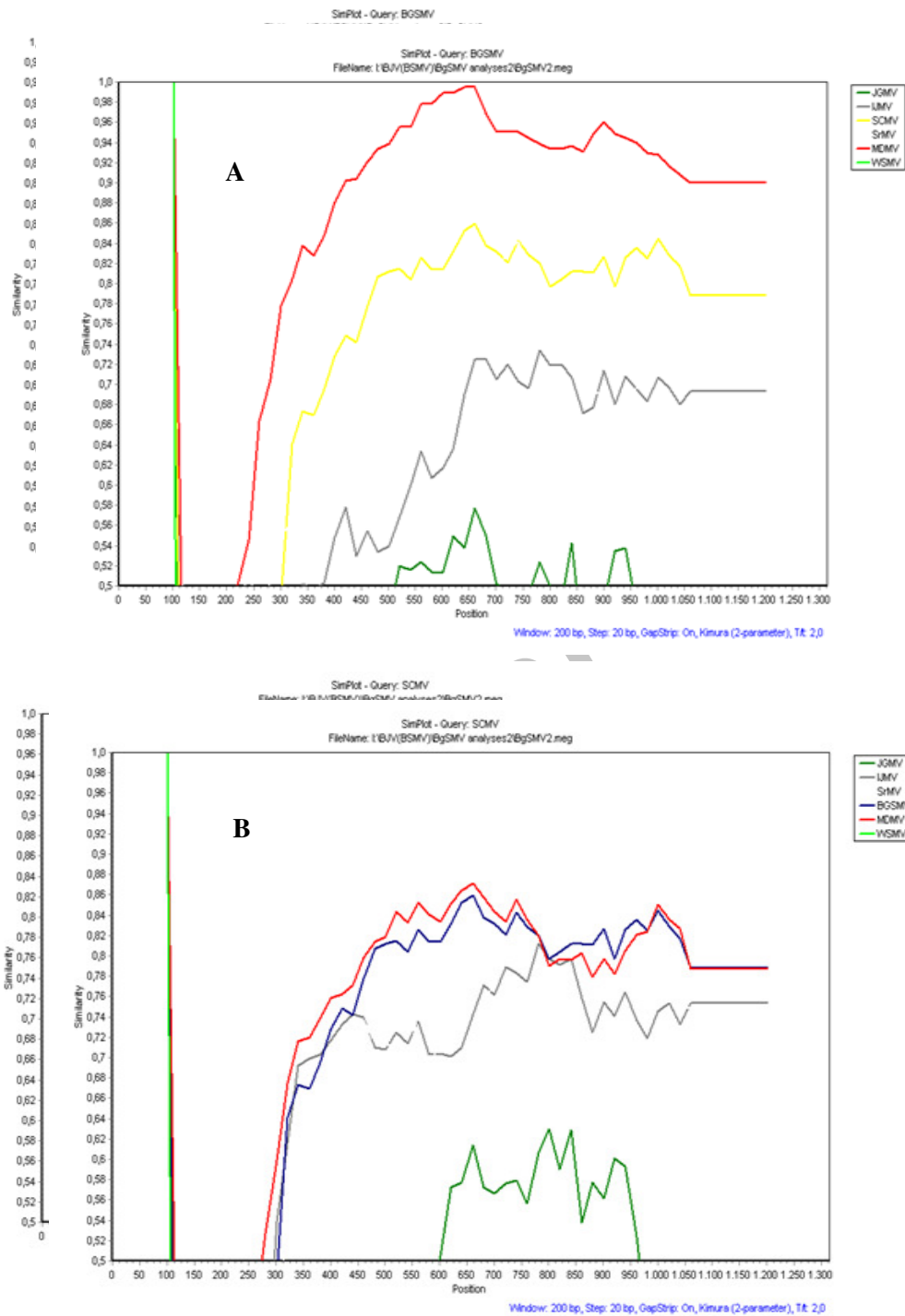
۶۲/۹۵ درصد شباهت اضافی قرابت را نشان می‌دهد که تأییدی بر مطالعات قبلی بود که براساس قسمتی از ژن پروتئین پوششی انجام شده بود (Masumi and Izadpanah 2002).

با مقایسه درصد شباهت ژنتیکی (Genetic similarity) بین جدایه‌های مختلف BgSMV مشخص شد که علی‌رغم وجود انشعابات در درخت فیلوژنتیکی بین جدایه‌های BgSMV، میزان تنوع ژنتیکی (Genetic diversity) بین جدایه‌ها بسیار پایین است، به طوری که میانگین تشابه بین جدایه‌ها ۹۸/۱ درصد و کمترین میزان شباهت مربوط به جدایه‌های اندیمشک و برازجان و بیشترین شباهت مربوط به جدایه‌های بهبهان و شوشتر بود. علت این تنوع که شاید بتوان به رابطه تکاملی نزدیک ویروس- میزبان نسبت داد. به نظر می‌رسد که به دلیل تکثیر غیر جنسی مرغ (ریزوم) و انتشار ویروس با اندام‌های غیرجنسی گیاه، نوعی سازگاری تکاملی بین ویروس و مرغ در طول زمان به وجود آمده و در نتیجه تنوع بسیار کمی در جدایه‌ها

انجایی که این قطعه در ناحیه پایانی آمینی (N-terminal) قرار دارد و این ناحیه در سطح پیکره ویروس قرار گرفته و بنظر می‌رسد بیشتر در صفات بیولوژیکی مانند انتقال با شته و بر همکنش میزبان- ویروس نقش داشته باشد، بنابراین شاید بتوان برخی تفاوت‌های بیولوژیکی بین MDMV و BgSMV مانند انتقال و دامنه میزبانی را به این تفاوت نوکلئوتیدی نسبت داد (Revers et al. 1999).

در آنالیز فیلوژنتیک بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR، پوتی ویروس‌های غلات در ۶ گروه شامل BgSMV، MDMV، SrMV، SCMV، JJMV، JgMV قرار گرفتند. نکته قابل توجه در این تقسیم‌بندی قرار گرفتن دو ویروس BgSMV و MDMV در دو شاخه جداگانه می‌باشد.

بر پایه مقایسه چند ردیفی در سطح نوکلئوتیدی BgSMV با سایر پوتی ویروس‌های غلات مشخص شد که BgSMV پس از MDMV با ۸۷/۸۵ درصد شباهت با SrMV، SCMV و JJMV به ترتیب با ۷۰/۶۵، ۶۴/۳۵ و



شکل ۴. طرح مشابهت در ناحیه CP-UTR BgSMV (A) و SCMV (B) نسبت به سایر پوتی ویروس‌های غلات

Fig. 4. Similarity plot in CP-UTR region of BgSMV (A) and SCMV (B) against other cereal potyviruses.

جدول ۸. تنوع ژنتیکی و نسبت جانشینی آمینواسیدی در گونه‌های مختلف و بین گونه‌های پوتی ویروس های غلات

Table 8. Genetic diversity and amino acid substitution ratios in different species and inter-species of cereal potyviruses

| | | dN ^b | dS ^c | $\omega = dN/dS$ | Genetic diversity(π) |
|--------------------|------|-----------------|-----------------|------------------|----------------------------|
| BgSMV ^a | | 0.0879 | 0.3509 | 0.2505 | 0.026 |
| BgSMV | MDMV | 0.3061 | 0.7870 | 0.3889 | 0.120 |
| BgSMV | SrMV | 0.3669 | 0.6188 | 0.5929 | 0.326 |
| BgSMV | SCMV | 0.5707 | 0.9242 | 0.6175 | 0.313 |
| BgSMV | IJMV | 0.4635 | 0.7096 | 0.6532 | 0.370 |
| BgSMV | JGMV | 0.6039 | 0.8226 | 0.7341 | 0.559 |
| MDMV | | 0.1628 | 0.4456 | 0.3653 | 0.092 |
| MDMV | SrMV | 0.4702 | 0.7651 | 0.6146 | 0.326 |
| MDMV | SCMV | 0.6169 | 0.9717 | 0.6348 | 0.330 |
| MDMV | IJMV | 0.5095 | 0.8863 | 0.5748 | 0.376 |
| MDMV | JGMV | 0.7099 | 0.9678 | 0.7335 | 0.593 |
| SrMV | | | | | 0.030 |
| SrMV | SCMV | 0.5213 | 0.6739 | 0.7735 | 0.346 |
| SrMV | IJMV | 0.4369 | 0.4984 | 0.8766 | 0.410 |
| SrMV | JGMV | 0.5334 | 0.5935 | 0.8987 | 0.569 |
| SCMV | | 0.2094 | 0.4099 | 0.5108 | 0.127 |
| SCMV | IJMV | 0.5214 | 0.8179 | 0.6375 | 0.372 |
| SCMV | JGMV | 0.6960 | 0.8889 | 0.7830 | 0.578 |
| IJMV | | | | | 0.124 |
| IJMV | JGMV | 0.6170 | 0.6991 | 0.8827 | 0.572 |
| JGMV | | 0.0852 | 0.1531 | 0.5565 | 0.073 |
| All species | | 1.5921 | 2.3788 | 0.6693 | 0.363 |

a. جانشینی آمینواسیدی و تنوع ژنتیکی برای جدایه‌های هر گونه بطور جداگانه و بین گونه‌ها (دو به دو) محاسبه گردید

b. جانشینی نا مترادف (non-synonymous)

c. جانشینی مترادف (synonymous)

a. Amino acid substitution and genetic diversity of isolates of each species separately and between species was calculated

بسیار پایین در بین جدایه‌هاست که این می‌تواند ناشی از آثار محیطی باشد که در تمام این مناطق گرمسیر وجود دارد.

مقایسه روند تغییرات و تشابه ترادف نوکلئوتیدی CP-UTR در BgSMV با سایر پوتی ویروس‌ها نشان داد که این ویروس به ترتیب با MDMV، SCMV و IJMV بیشترین شباهت را دارد. این تشابه در ناحیه ۵' ژن CP کمترین مقدار است و از حدود موقعیت نوکلئوتیدی ۲۲۰

ایجاد شده است. در مواردی می‌توان پائین بودن تنوع را به محدودیت در دامنه میزبانی و فشار کارکردی (Functional constraint) که در رابطه بین میزبان و ویروس (Host-virus interaction)، از طرف میزبان به ویروس وارد می‌شود و اجازه تنوع به ویروس نمی‌دهد، نسبت داد (Gorbalena 1992; Garcia-Arenal et al. 2001). دومین نکته‌ای که می‌توان اشاره کرد به رغم پراکندگی جغرافیایی وسیع در استان‌های جنوب کشور، وجود تنوع

غلات مقایسه شدند، نشان داد که این دو ویروس با یکدیگر بیشترین تشابه به خصوص در ناحیه مرکزی ژن CP را دارند و پس از آن به ترتیب با SCMV، SrMV و IIMV بیشترین شباهت را دارند. در مقایسه بین SCMV با ویروس‌های دیگر، MDMV و BgSMV روند تغییرات مشابهی داشتند که نشان‌دهنده تشابه بسیار زیاد این دو ویروس با یکدیگر بود.

تنوع ژنتیکی (Genetic diversity, π) در درون گونه‌های مختلف متفاوت است اگرچه با تعداد اندک جدایه‌ها در این آنالیز امکان بیان دقیق از تنوع ژنتیکی در درون گونه‌های این زیر گروه کمتر خواهد بود، اما در مقایسه با درخت فیلوژنتیکی، تفاوت‌های بین گونه‌ها همخوانی دارد. مقدار π در درون جدایه‌های BgSMV ۰/۰۲۶ و برای MDMV ۰/۰۹۲ و برای SCMV ۰/۱۲۷ محاسبه شد. تعداد جدایه‌های استفاده شده از این سه گونه تقریباً برابر است ولی BgSMV کمترین مقدار تنوع را دارد.

فاصله ژنتیکی SrMV که نزدیک‌ترین گونه به MDMV و BgSMV است با هر دو ویروس یکسان است (۰/۳۲۶) ولی ارزش ω بین BgSMV و SrMV با مقدار ۰/۵۹۲۹، کمتر از MDMV و SrMV با مقدار ۰/۶۱۴۶ است.

پایین بودن میانگین کل (ω ۰/۶۶۹۳) نشانگر نقش احتمالی انتخاب منفی (Negative selection) در تنوع و تکامل این گونه‌ها می‌باشد و مقادیر ω با روابط فیلوژنتیک بین گونه‌ها همخوانی دارد. به عنوان مثال بین BgSMV و MDMV این مقدار ۰/۳۸۸۹ و بین BgSMV و SrMV ۰/۵۹۲۹ محاسبه گردیده است که این براساس آنالیز فیلوژنتیک طبیعی به نظر می‌رسد. طبیعی است که تنوع جغرافیایی و میزبانی می‌تواند رابطه مستقیم با تغییرات نوکلئوتیدی و جان‌شینی آمینو اسیدی داشته باشد. این

به تدریج افزایش پیدا می‌کند و در حدود ۶۸۰ به حداکثر مقدار خود می‌رسد و سپس به تدریج کم می‌شود (شکل ۴). ناحیه ابتدای ژن CP متغیرترین و ناحیه میانی (Core protein) حفاظت شده‌ترین ناحیه CP است.

عدم وقوع نوترکیبی در بین BgSMV و سایر پوتی ویروس‌های غلات نشان‌دهنده تکامل مستقل این ویروس در بین پوتی ویروس‌ها و جدایی جغرافیایی (Geographical isolation) بین آنهاست. بنابراین تشابه بین BgSMV و سایر پوتی ویروس‌ها نمی‌تواند به دلیل وقوع نوترکیبی باشد و نیز نوترکیبی نمی‌تواند در تکامل این ویروس و تمایز جدایه‌های آن نقش داشته باشد. بنابراین قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی که در تمام جدایه‌ها با حفاظت شدگی بالا در شرایط یکسان وجود دارد و هم‌چنین پراکنش این ویروس در مناطق جنوبی ایران با وجود موانع طبیعی زیاد، نشان‌دهنده قدمت طولانی این ویروس بومی در ایران است.

با مقایسه ترادف نوکلئوتیدی SCMV با ویروس‌های دیگر مشخص شد که روند تغییرات در تمام طول ناحیه CP-UTR بین BgSMV و MDMV یکسان است و این دو ویروس بیشترین شباهت را به SCMV دارند. روند تغییرات در طول این ناحیه مشابه روند قبلی است که ناحیه 5' متغیرترین و ناحیه میانی، حفاظت شده‌ترین قسمت ژن CP می‌باشد. همچنین در آنالیز تشابه نوکلئوتیدی (Similarity plot) با برنامه‌های SimPlot، Bootscan و MaxKai هیچ‌گونه نوترکیبی بین BgSMV و سایر پوتی ویروس‌های غلات به ویژه MDMV مشاهده نگردید.

نتایج به دست آمده از آنالیز با نرم‌افزار SimPlot زمانی که BgSMV و MDMV هر کدام به طور جداگانه به عنوان مبنا قرار داده شدند و با سایر پوتی ویروس‌های

به هم به کار برده‌اند، مطابقت داد. از طرف دیگر با توجه به خصوصیات بیولوژیک متفاوت مانند عدم توانایی انتقال به قیاق و وجود ۹۰ نوکلئوتید اضافه (۳۰ آمینواسید) در ناحیه آمینی ژن CP و عدم توانایی انتقال با شته *R. maydis* (Zare et al. 2005) می‌توان آن را به عنوان گونه‌ای مجزا و نزدیک به MDMV در جنس *Potyvirus* در نظر گرفت.

سپاسگزاری

بدین وسیله نگارندگان از حمایت مالی و سایر مساعدت‌های مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی و قطب علمی ویروس‌شناسی در انجام این تحقیق صمیمانه قدردانی می‌نماید.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (21-23) متن انگلیسی مراجعه شود.

تغییرات در روند تکاملی می‌تواند منجر به گونه‌زایی شود. با توجه به این‌که تنوع میزبانی طبیعی و جغرافیایی MDMV بیشتر از BgSMV است بدیهی است که تنوع جانسینی نوکلئوتیدی و تنوع ژنتیکی نیز بیشتر باشد. به همین جهت پایداری BgSMV نیز قابل توجه است.

طبق نظریه شوکلا و وارد (Shukla and Ward 1988) و فرنکل و همکاران (Frenkel et al. 1989) در پوتی ویروس‌های غلات، سویه‌هایی با شباهت بیش از ۹۰٪ به عنوان یک ویروس محسوب می‌شوند. این در حالی است که بر اساس مطالعات آدامز و همکاران (Adams et al. 2004) میزان تشابه ۷۶-۷۷ درصد در سطح نوکلئوتیدی در ژن CP مرز بهینه گونه‌ها و ۹۹-۹۰ درصد تشابه به عنوان مرز سویه‌ها پیشنهاد شده است. نتایج به‌دست آمده در مورد تشابه نوکلئوتیدی بالای دو ویروس BgSMV و MDMV (۸۵-۹۰٪)، را می‌توان با نظریه مینک و همکاران (Mink et al. 1994) که دامنه تشابه ۷۵ تا ۸۹ درصد را برای تمایز ویروس‌های نزدیک

GENETIC VARIATION OF BERMUDA GRASS SOUTHERN MOSAIC VIRUS ISOLATES BASED ON SEQUENCE OF 3' REGION OF GENOME*

F. FARAHBAKHS¹, M. MASUMI^{2**}, A. AFSHARIFAR¹, K. IZADPANA¹
and N. RAHPEYMA SARVESTANI³

(Received :09.10.2012; Accepted : 16.01.2013)

Abstract

Bermuda grass southern mosaic virus (BgSMV) is a widespread potyvirus inducing mosaic on Bermuda grass in warm regions of southern Iran. In this study, various geographical isolates of the virus were compared phylogenetically. Bermuda grass samples showing mosaic symptom were collected from Jiroft, Bushehr, Borazjan, Ramhormoz, Andimeshk, Shushtar, Behbahan and Darab. Viral RNA was extracted and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted using specific primers for amplification of the 3' region (CP- UTR) of the viral genome. PCR- products were cloned and sequenced. The sequences of CP- UTR region of BgSMV isolates were compared with each other and with available sequences of cereal potyviruses in the GenBank. Phylogenetic analyses showed that all sequences were grouped into six clades of BgSMV, *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Johnson grass mosaic virus* (JGMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV), Iranian Johnson grass mosaic virus (IJMV) and *Zea mosaic virus* (ZeMV). IJMV and ZeMV were grouped in the same clade. Among potyviruses, BgSMV was close to MDMV. However it had an additional 90- nucleotide stretch in frame (30 amino acids) in the 5' region of the coat protein compared with MDMV. This difference was consistent in all BgSMV isolates. The mean of the nucleotide similarity in CP- UTR region among BgSMV isolates was 98.1% which indicates low level of genetic diversity in intra- population of BgSMV. Despite the high nucleotide sequence similarity between BgSMV and MDMV, differences between the two viruses in host range and serology, and presence of additional 90 nt in the 5' region of CP gene, make BgSMV a distinct potyvirus species close to MDMV.

Keywords: Potyviruses, Phylogenetic analysis, MDMV, BgSMV, CP-UTR.

See Persian text for figures and tables (Pages ۶۱-۷۵).

*: A Part of MSc. Thesis of the first Author Submitted to College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

** : Corresponding Author, Email: masoumi@shirazu.ac.ir

1. Grad. Student , Assoc. Prof. and Prof. of Plant Pathol., PVRC, Shiraz University, Shiraz, Iran.

2. Res. Assis. Prof. of Agricultural and Natural Resource Research Center of Fars and PVRC, Shiraz University, Shiraz, Iran.

3. Grad. Student of Plant Breed., College of Agric., Shiraz University, Shiraz, Iran.

References

- ADAMS, M.J., ANTONIW, J.F. and FAUQUET, C.M. 2004. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. **Arch. Virol.** 150: 459-479.
- BUDDENHAGEN, L.W. 1983. Crop improvement in relation to virus diseases and their epidemiology. Pp. 25-37, *In*: Plumb, R.T. and Thresh, J.M. (Eds.), **Plant Virus Epidemiology**. Blackwell Scientific Pub., London.
- FRENKEL., M.J., WARD, R.G. and SHUKLA, D.D. 1989. The Use of 3 non-coding nucleotide sequences in taxonomy of potyviruses: Application to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus. **J. Gen. Virol.** 70: 2775-2783.
- GARCÍA-ARENAL, F., FRAILE, A., and MALPICA, J.M. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annu. Rev. Phytopathol.** 39: 157-186.
- GARRIDO, J.M. and TRUJILLO, G.E. 1992. Additional hosts of the Venezuelan strain of maize dwarf mosaic virus. **Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela** 18: 67-77. (Abstr. *In* :**Rev. Plant Pathol.** 72: 491.
- GHASEMI, S. and K. IZADPANA. 2000. Properties of a potyvirus causing mosaic in *Eleusine compressa* in Busheher province. **Proc. 14th Iran. Plant Protec. Cong., Isfahan , Iran**, 22 (Abst.).
- GORBALENA, A. E. 1992. Host-related sequences in RNA viral genomes. **Seminars in Virol.** 3:359-371.
- HA, C., COOMBS, S., REVILL, P. A., HARDING, R. M., VU, M. and DALE, J. L. 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, D. S. and QUIGLEY, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Anal. Biochem.** 114: 193-197.
- HOSSEINI, A., KOOHI HABIBI, M., IZADPANA, K., MOSAHEBI, G. H., RUBIES-AUTONELL, C. and RATTI, C. 2010. Characterization of a filamentous virus from Bermuda grass and its molecular, serological and biological comparison with *Spartina mottle virus*. **Arch. Virol.** 155:1675-1680.
- HOSSEINI, M. and IZADPANA, K. 2005. Biological, serological and physicochemical properties of Bermuda grass filamentous viruses from Iran. **Parasitica** 61: 55-59.
- IZADPANA, K. , M. ZAKI-AGHL, Y. P. ZHANG, S. D. DAUBERT and A. ROWHANI. 2003. Bermuda grass as a potential reservoir host for *Grapevine fanleaf virus*. **Plant Dis.** 87:1179-1182.
- IZADPANA, K. 1989. Report of two Bermuda grass viruses from Iran. **Proc. 9th Plant Protec. Cong., Iran, Mashhad, Iran**, 161 (Abst.).
- JACUET, C., DELLECOLE, B., LEQOQ, H., DUNEZ, J. and RAVELONANDRO, M. 1998. Use of modified Plum pox virus coat protein genes developed to limit heteroencapsidation-associated risks in transgenic plant. **J. Gen. Virol.** 79: 1509-1517.
- JORDA, C., ORTEGA, A. and JUAREZ, M. 1995. New hosts of tomato spotted wilt virus. **Plant Dis.** 79: 538.
- LOCKHART, B. E. L., KHALESS, N., LENNON A. M. AND EL MAATAOUI, M. 1985a. properties of Bermuda grass etched-line virus, a new leafhopper-transmitted virus related to maize rayado fine and oat blue dwarf viruses. **Phytopathology** 75:1258-1262.
- LOCKHART, B. E. L., KHALESS, N., EL MAATAOUI, M. and LASTRA. R. 1985b. Cynodon chlorotic streak virus, a previously undescribed plant rhabdovirus infecting Brmuda grass and maize in the Meditteranean area. **Phytopathology** 75:1094-1098.
- LOUIE, R. 1980. Sugarcane msaic virus in Kenya. **Plant Dis.** 64:994-947.
- MCKIRDY, S.J. and JONES, R.A.C. 1993. Occurance of Barley yellow dwarf virus serotypes MAV and RMV in over-summering grasses. **Aust. J. Agric. Res.** 44: 1165-1209. (Abstr. *In* Rev. Plant Pathol. 73:1595- 1994).
- 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., 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., Tabriz, Iran**, 314 (Abst.).
- MASUMI., M. and IZADPANAHA, K. 2002. Partial sequence of CP region of genome of transmission, purification and serology of Bermudagrass Jiroft mosaic virus and comparison with other cereal potyviruses. **Proc. 15th Iran. Plant Protec. Cong. , Kermanshah, Iran**, 51 (Abst.).
- MASUMI., M. and IZADPANAHA, K. 2000. Transmission, Purification and serology of Bermudagrass mosaic virus. **Proc. 14th Iran. Plant Protec. Cong. , Isfahan, Iran**, 182 (Abst.).
- MASUMI., M. and IZADPANAHA, K. 1998. Bermuda grass mosaic in Iran. **Proc. 13th Iran. Plant. Protec. Cong. , Karaj, Iran**, 314 (Abst.).
- MASUMI., M. and IZADPANAHA, K. 1996. Properties of the Iranian isolate of Bermuda grass etched-line virus. **J. Phytopathol.** 144: 231-234.
- MCDANIEL, L.L. AND GORDON, D.T. 1989. Characterization of oat infecting strain of maize dwarf mosaic virus. **Phytopathology** 79: 113-120.
- MINK, G.I., VETTEN, H.J., WARD, C.W., BERGER, P.H., MORALES, F.J., MYERS, J.M., SILBERNAGEL, M.J. and BARNETT, O.W. 1994. Taxonomy and classification of legume-infecting potyviruses. A proposal from the Potyviridae study group of the plant virus subcommittee of the ICTV. **Arch. Virol.** 139: 231-235.
- NEI, M. and KUMAR, S. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, New York 333 pp.
- PAGE, R. D. M. 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Comput. Appl. Biosci.** 12: 357-358.
- RAY, S. C. 1999. SimPlot for windows 95/98/NT, 2.5 edn. Distributed by author: [http://sray.med.som.jhmi.edu/Ray Soft/ SimPlot/](http://sray.med.som.jhmi.edu/Ray%20Soft/SimPlot/).
- REICHMANN, J.L, LAIN, S. and GARCÍA, J.A. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **J. Gen. Virol.** 73: 1-16.
- REVERSE, F., OLEGALL, O., CANDRESSE, T. and MAULE , A.J. 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interaction. **MPMI** 12: 367-376.
- SHUKLA, D.D. and WARD, C.W. 1989. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. **Adv. Virus Res.** 36: 273-314.
- SHUKLA, D.D. and WARD, C.W. 1988. Amino acid homology of coat proteins as a basis for identification and classification of potyvirus group. **J. Gen. Virol.** 96:2703-2710.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. and KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
<http://www.kumarlab.net/publications>
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. and HIGGINS, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: -exible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** 24: 4876-4882.
- ZARE, A., MASUMI, M. and IZADPANAHA, K. 2005. Bermuda grass southern mosaic virus: A distinct potyvirus infecting several gramineous species in Iran. **Parasitica** 61: 105-110.