

تعیین توالی کامل جدایه ایرانی ویروس موزاییک چغندرقد

موسی محمدی^۱ و احمد حسینی^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۵)

چکیده

ویروس موزاییک چغندر (*Beet mosaic virus, BtMV*)، تنها پوتی ویروس آلوده کننده چغندرقد بوده و امروزه در سراسر چغندرکاری‌های جهان پراکنش دارد. در مطالعه حاضر ژنوم کامل جدایه‌ای از این ویروس (*Ir-VRU*) با استفاده از آغازگرهای دژنره عمومی پوتی ویروس‌ها، آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و همچنین روش 5'-RACE برای اولین بار در ایران توالی یابی شد. ژنوم کامل جدایه ایرانی *BtMV* بدون در نظر گرفتن دنباله poly-A، ۹۵۹۱ باز طول داشته، و بخش‌های 5'-UTR و 3'-UTR به ترتیب ۱۶۵ و ۱۶۸ باز می‌باشند. موتیف‌های معمول، چارچوب ژنی پلی‌پروتئین و PIPO در این جدایه شناسایی گردید. کد شدن پلی‌پروتئینی به طول ۳۰۸۶ آمینواسید و نه جایگاه برش در این پلی‌پروتئین پیش بینی گردید. بر بررسی‌ها بر روی پنج جدایه مختلف *BtMV* نشان داد که جدایه ایرانی یکسانی زیادی به دو جدایه آلمانی و چینی داشته و از طرف دیگر بیشترین تفاوت را با جدایه آمریکایی نشان می‌دهد. تحلیل تبارزائی نیز جدایه *Ir-VRU* را به عنوان یک عضو از سوپر گروه *BCMV* نشان می‌دهد.

کلیدواژه: چغندرقد، ویروس موزاییک چغندر، تبارزائی، پوتی ویروس.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hosseini@vru.ac.ir

۱. کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران.

۲. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران.

Full genome sequencing of Iranian isolate of *Beet mosaic virus*

M. Mohammadi¹ and A. Hosseini^{2*}

(Received: 2.7.2019; Accepted: 24.1.2020)

Abstract

Beet mosaic virus (BtMV), the only potyvirus infecting beets, is distributed worldwide in beet growing areas. Here we report the full-length genome sequence of a BtMV isolate from Iran (Ir-VRU), which has enabled us to better understanding the evolutionary history of the virus. The complete nucleotide sequence of Ir-VRU genome was determined using degenerate and specific primers and 5'-RACE and The complete genomes consisted of 9591 nucleotides, excluding the poly-A tails. The genome has a 165 nt 5'-UTR and a 168 nt 3'-UTR. The RNA of Ir-VRU potentially encodes a single polyprotein of 3086 amino acid residues and has a deduced genome organization typical for members of the genus Potyvirus. Study on five different BtMV isolates showed that Iranian isolate closely related to German and Chinese isolates, and on the other hand, it showed more differences with American isolate. Phylogenetic analysis, along with other potyviruses, also presents the Ir-VRU as a member of the BCMV supergroup.

Keywords: Sugar beet, *Beet mosaic virus*, Phylogentic, *Potyvirus*

*Corresponding author's E-mail: hosseini@vru.ac.ir

1. MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran.

مقدمه

(Summers et al. 1990). پیکره‌های BtMV، میله‌ای خمش‌پذیر به طول ۷۳۰ نانومتر و عرض ۱۳ نانومتر می‌باشد. وزن پروتئین پوششی BtMV ۳۴۷۰۰ دالتون می‌باشد. ویروس موزاییک چغندر از نظر ایمونوژنیک و سرولوژیک با ویروس‌های *Bean yellow mosaic virus*، *Potato virus Y* و *Soybean mosaic virus* در ارتباط است (Rogov et al. 1991). ویروس موزاییک چغندر عضو جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* می‌باشد. همانند سایر پوتی‌ویروس‌ها، پلی‌پروتئین کد شده توسط ویروس بر اثر فعالیت سه پروتئیناز به ده پروتئین با عملکردهای مختلف شکسته می‌شود. در انتهای 5' ژنوم یک پروتئین متصل به ژنوم (Vpg) و در انتهای 3' یک دنباله‌ی پلی‌آدنین قرار دارد (Nemchinov et al. 2004).

با وجود پراکنش جهانی این ویروس و گزارش‌های متعدد از ایران (Farahmand et al. 2017, Jalali et al. 2004, Jalali et al. 2001)، ژنوم آن تاکنون در ایران به صورت دقیق و کامل مورد مطالعه قرار نگرفته است، همچنین از این ویروس توالی‌های ژنومی اندکی از سراسر جهان ثبت شده است. با توجه به این موضوع در پژوهش حاضر ژنوم جدایه‌ی ایرانی ویروس موزاییک چغندر قند به طور کامل تعیین توالی گردید.

مواد و روش‌ها

جدایه BtMV، استخراج آر ان ا. و تکثیر ژنوم

برای انجام این پژوهش از جدایه خالص Ir-VRU ویروس موزاییک چغندر موجود در کلکسیون ویروس-شناسی دانشگاه ولی عصر رفسنجان که از مزارع چغندر قند مرودشت استان فارس در سال ۱۳۹۴ جداسازی شده بود، پس از مایه‌زنی مکانیکی بر روی بوته‌های سالم چغندر قند

چغندر قند با نام علمی *Beta vulgaris* L. گیاهی دوساله از تیره *Chenopodiaceae* است که در زبان انگلیسی به آن *Sugar beet* اطلاق می‌شود (Langer et al. 1991). چغندر قند به طور طبیعی توسط چندین ویروس آلوده می‌شود. از این ویروس‌ها می‌توان به ویروس زردی چغندر^۱ (BYV)، ویروس زردی غربی چغندر^۲ (BWYV)، ویروس سبزد چغندر^۳ (BChV)، ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر^۴ (BNYVV)، ویروس پیچیدگی برگ چغندر^۵ (BCTV) و ویروس موزاییک چغندر^۶ (BtMV) نام برد. ویروس موزاییک چغندر ابتدا در سال ۱۸۹۸ از شمال فرانسه و سپس در سال ۱۹۱۵ از آمریکا و سایر کشورهای اروپایی گزارش شده و برای اولین بار توسط راسل توصیف گردیده است (Milne 1988, Russell 1971). اطلاعات مربوط به میزان خسارت این ویروس بسیار محدود بوده و مطالعات اندکی در این مورد صورت گرفته است. این ویروس تا ۲۰٪ بر محصول چغندر قند خسارت وارد می‌کند و در چغندرهای بذری تولید بذر به میزان ۵۰٪ کاهش می‌یابد (Dusi 1999, Watson & Watson 1953). دامنه میزبانی BtMV محدود به چغندر قند و گیاهان خویشاوند آن می‌باشد. همچنین گزارشی از آلودگی طبیعی کاهو توسط موزاییک چغندر از چین وجود دارد (Wang et al. 2008). ویروس موزاییک چغندر قند توسط شته‌ها به خصوص شته سبز هلو (*Myzus persicae*) با راندمان ۵۰ درصد به طور ناپایا انتقال می‌یابد

¹ Beet yellows virus

² Beet western yellow virus

³ Beet chlorosis virus

⁴ Beet necrotic yellow vein virus

⁵ Beet curly top virus

⁶ Beet mosaic virus



شکل ۱. علائم جدایه ایرانی ویروس موزاییک چغندر روی برگ‌های بالغ (A) و جوان (B) *B. vulgaris* به صورت موزاییک و تاولی شدن، (C) *N. benthamiana* به صورت موزاییک و (D) *C. quinoa* به صورت لکه‌های نکروزه.

Fig 1. Symptoms of the Iranian isolate of *Beet mosaic virus* on A) adult and B) young leaves of *B. vulgaris* as mosaic and mottle, D) *N. benthamiana* as mosaic and C) *C. quinoa* as chlorotic spots.

سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد، سپس در مرحله پس از افزودن بافر، آنزیم‌ها و dNTP لوله‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه‌ی سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر (BioRad T100) قرار گرفتند. برای انجام واکنش PCR از محلول آماده‌ی Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red (Ampliqon, Denmark) استفاده شد. به منظور بررسی نتایج حاصل از PCR، ژل الکتروفورز یک درصد همراه با نشانگر DNA (Thermo Fisher Scientific, USA) جفت بازی ۱۰۰ مورد استفاده قرار گرفت.

(*Beta vulgaris*)، *Nicotiana benthamiana* و *Chenopodium quinoa* (شکل ۱) استفاده شد. آر آن ا. کل بوته آلوده به BtMV- Ir-VRU با استفاده از کیت Top Plant and Fungi RNA Purification kit (شرکت توپاز ژن-ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت استخراج گردید. سپس با استفاده از کیت RevertAid RT (Thermo Scientific, USA) و آغازگرهای اختصاصی، cDNA ویروسی طبق روش توصیه شده توسط شرکت سازنده در دو مرحله و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه گردید. در مرحله اول آغازگر اختصاصی و آر آن ا. الگو در حجم ۱۲ میکرولیتر به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای دژنره و اختصاصی طراحی شده (براساس رس شمار DQ674264.1) برای توالی یابی جدایه ایرانی ویروس موزاییک چغندر.

Table 1. List of specific primers designed for genome sequencing of *Beet mosaic virus*.

Position of Amplicon	Length of Amplicon	Primer Sequence	Primer
10-753	744	CATCTCAATACAACACATGC AATTTCAACAGGGATATTCC	Bt-1-F Bt-1-R
652-1251	619	GCGAGGAAGAAAACCCCGAA CACAGGCCATTTTGTGGCAT	Bt-2-F Bt-2-R
1155-1905	751	GCTTGTTCCAGCTCAGAAGG CCCCTTAAGTGCTTGTCTGTG	Bt-3-F Bt-3-R
2248-3028	781	CAGGACCTTGCAACAGCATG GCGGTTTGTGCTTGTACACA	Bt-4-F Bt-4-R
2900-3649	750	CAAATTTTCAGTGAGCGATTT GTGTGCTGAACACTGATTTG	Bt-5-F Bt-5-R
3530-4117	588	ATGAGAAGAAGCTAGAGAAA TCACACTTATATTGCTTGAG	Bt-6-F Bt-6-R
4482-4981	500	GAAGGGCTACTTGGTCACAA CACAGCCATTGAAATGAACT	Bt-7-F Bt-7-R
4862-5652	791	TGACACACAATGTTACATCA TATCAGAAGATCTGTTGCAG	Bt-8-F Bt-8-R
5400-6114	715	AGCAGGTATGGTCAACAACA GAAATAAGCTTGAATTCCGG	Bt-9-F Bt-9-R
5900-6649	750	CGAGACGCTTCGTACACATG AACGTGAACCAACCAAGCAA	Bt-10-F Bt-10-R
6530-7293	768	ATGTGAAGGACAAAGACATG ACCTACAGTTATCGGACCAG	Bt-11-F Bt-11-R
7174-8036	863	ACACATGAGGAAGCAGCCAG ATCGCGTAATGCATTGCAAG	Bt-12-F Bt-12-R
7800-8543	744	TGATAGCTCTCTCACACCTT TTCCAGTACTTGACAAGCTC	Bt-13-F Bt-13-R
3812-4497 (Ha et al. 2008)	700	GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC ACICCRTTYTCDATDATRTTIGTIGC	CIfor CIrev
1620-227 (Ha et al. 2008)	700	TGYGAYAAAYCARYTIGAYIIIAAYG GAICCRWAIGARTCIAIIACRTG	HPfor HPrev
7993-9591 (Chen et al. 2001)	1700	GTTTTCCCAGTCACGAC(T)15 GGXAAAYAGYGGXCAZCC	M4T Sprimer

X=A/G/C/T; Y=T/C; Z=A/G*

شد. به منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی، پس از مطالعه تبارزائی مقدماتی بر اساس توالی حاصل از قطعات تکثیرشده توسط آغازگرهای دژنره، نزدیک‌ترین جدایه به جدایه ایرانی شناسایی و ۱۳ جفت آغازگر همپوشان (با حداقل ۱۰۰ باز همپوشانی) بر اساس توالی جدایه چینی Vector NTI (DQ674264.1) با استفاده از نرم‌افزار Advance™ 11 در روش 5'-RACE، برای

استراتژی تکثیر ژنوم به منظور تعیین توالی کامل ژنوم ویروس موردنظر، از استراتژی Primer-walking، با استفاده از آغازگرهای دژنره عمومی پوتی ویروس‌ها (CIrev، CIfor، HPfor، HPprev (Ha et al. 2008)، M4T و Sprimer (Chen et al. 2001)) و آغازگرهای اختصاصی ویروس موزاییک چغندر (جدول ۱) به همراه روش 5'-RACE بهره برده

توالی‌های هم‌ردیف سازی شده توسط نرم‌افزار Posort حذف شدند. بهترین مدل‌های جانیشینی آمینواسیدی توسط نرم‌افزار protest-3.4.2 مشخص گردید. سپس نرم‌افزارهای RAXML-8 برای محاسبه روابط تبارزائی بر اساس الگوریتم Maximum likelihood مورد استفاده قرار گرفت. برای ارزیابی میزان اعتبار توپولوژی درخت‌های محاسبه‌شده از روش SH-like بهره گرفته شد. و در نهایت درخت‌های محاسبه‌شده توسط Figtree 1.4.4 رسم گردید.

نتایج و بحث

تکثیر قطعات ژنومی

بررسی قطعات تکثیری از نواحی HC-Pro، CI و انتهای 3' ژنوم (حاصل از آغازگرهای دژنره) در ژل آگارز ۱٪ وجود قطعاتی به ترتیب به طول ۷۰۰، ۷۰۰ و ۱۷۰۰ جفت‌باز را نشان داد (شکل ۲- A). برای تکثیر سایر نواحی ویروس مورد مطالعه از ۱۳ جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد. تمامی این آغازگرها قطعات محاسبه‌شده را به درستی تکثیر نمودند و باندهای غیراختصاصی اندکی با استفاده از برخی از این آغازگرها مشاهده شد (شکل ۲- B). با به‌کارگیری روش RACE-5' انتهای 5' ژنوم جدایه مورد مطالعه به اندازه ۷۷۰ جفت‌باز تکثیر شد.

بررسی ساختار ژنوم جدایه ایرانی BtMV

با تکثیر ۱۶ قطعه همپوشان و تعیین توالی در دو جهت (۳۲ خوانش)، ژنوم کامل جدایه BtMV- Ir-VRU تعیین و در GenBank با رس شماره KY012334 به ثبت رسید. ژنوم این ویروس به جز انتهای Poly-A به صورت یک قطعه آر ان ا. تک رشته به طول ۹۵۹۱ باز بوده که مشابه اکثر پوتی‌ویروس‌ها (ویروس Scallion mosaic virus به

ساخت cDNA از آغازگر Bt-2-R استفاده شد. برای پی‌سی آر اول، از آغازگر یادشده و برای nested PCR از آغازگر اختصاصی دیگری به نام Bt-1-R استفاده شد.

توالی‌یابی ژنوم ویروس

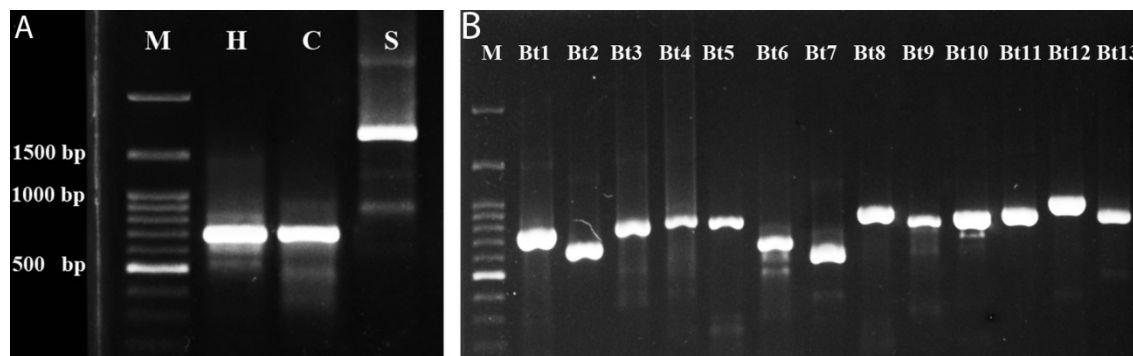
پس از تکثیر ژنوم جدایه مورد نظر در ۱۶ قطعه و حصول اطمینان از خالص بودن قطعات تکثیری، تمامی محصولات PCR به شرکت ماکروژن کره جنوبی به منظور توالی‌یابی در دو جهت، ارسال گردید. پس از مقایسه توالی‌های خام با استفاده از برنامه BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI و تأیید آنها، توالی‌ها توسط نرم‌افزارهای SnapGene Viewer و MEGA7 ویرایش شده و در نهایت با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI Advance™ 11 مونتاژ گردید.

تجزیه و تحلیل توالی کامل جدایه IR-VRU

پس از ویرایش و مونتاژ کردن توالی‌ها، به منظور شناسایی ORF‌های احتمالی، نرم‌افزار تحت وب ORF Finder از سرور NCBI، برای ترجمه توالی ORF شناسایی شده به توالی آمینواسیدی از ابزار موجود در سرور ExPASy و برای شناسایی دامنه‌های پروتئینی از سرورهای NCBI، ExPASy و Pfam استفاده گردید. برای پیدا کردن جایگاه‌های برش و موتیف‌های حفاظت‌شده، ژنوم جدایه ایرانی همراه با سایر جدایه‌های دیگر در نرم‌افزار MEGA-7 مورد بررسی قرار گرفت. برای تأیید جایگاه‌های برش شناسایی‌شده توالی مورد بحث توسط نرم‌افزار NetPicoRNAV1.0 نیز تحلیل گردید.

بررسی تبارزائی

هم‌ردیف سازی‌ها توسط نرم‌افزار MAFFT (با متد L-INS-I) و TranslatorX انجام گرفت. گپ‌های موجود در



شکل ۲. A) قطعات ژنومی تکثیرشده جدایه ایرانی ویروس موزاییک چغندر در آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای دژنره Sprimer و M4T (چاهک S)، CIRev و CIFor (چاهک C) و HPRev و HPFor (چاهک H). M مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی. B) قطعات ژنومی تکثیرشده در آزمون RT-PCR با ۱۳ جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده برای جدایه ایرانی ویروس موزاییک چغندر. چاهک‌های Bt1 تا Bt13 قطعات تکثیرشده با این آغازگرها و M مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی.

Fig 2. A) Amplified genomic segments of the Iranian isolate of *Beet mosaic virus* by RT-PCR using M4T and Sprimer (S), CIFor and CIRev (C) and HPFor and HPRev (H) degenerate primers. M, 100 bp DNA ladder. B) Amplified Genomic segments with RT-PCR using specific primers of *Beet mosaic virus* (Bt1 – Bt13). M is 100 bp DNA ladder.

در فرآیند ترجمه یا همانندسازی ویروس مهم ارزیابی شده است. توالی ACAACAC که در ابتدای ناحیه 5'-UTR ژنوم (نوکلئوتیدی‌های ۱۹-۲۵) جدایه IR-VRU قرار دارد تا حد زیادی با توالی AxACAACAU (potybox a) مشابهت دارد. موتیف مذکور در پوتی ویروس‌های واجد آن عموماً پس از نوکلئوتید ۱۵ دیده می‌شود (Turpen 1989). توالی مشابه با موتیف UCAAGCA (potybox b) در ناحیه 5'-UTR ژنوم این جدایه به صورت UCAAGCA در موقعیت ۱۱۷-۱۱۱ یافت گردید. همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد ORF اصلی از موقعیت ۱۶۸-۱۶۶ با کدون AUG شروع شده و در موقعیت ۹۴۲۳-۹۴۲۱ با کدون UAA خاتمه می‌یابد. این ORF دارای ۹۲۵۸ نوکلئوتید بوده که پیش‌بینی می‌شود باعث رمز شدن پلی‌پروتئینی به طول ۳۰۸۶ آمینواسید می‌شود. با استفاده از ابزار موجود در وبسایت Expasy وزن مولکولی پلی‌پروتئین پیش‌بینی شده، ۳۴۹/۹۴ کیلو دالتون تخمین زده شد. به دنبال این ORF ناحیه غیر رمز شونده 3'-UTR به طول ۱۶۸

طول ۹۳۲۴ باز، *Sweet potato virus C* به طول ۱۰۸۲۰ (باز) می‌باشد. ترکیب نوکلئوتیدی ژنوم مانند سایر پوتی ویروس‌ها به صورت ۵۶٪ A+U و ۴۴٪ G+C می‌باشد. تعداد هر کدام از بازها نیز بدین صورت است: اوراسیل ۲۳۸۵ (۲۴/۸۶۷٪)، سیتوزین ۱۹۳۲ (۲۰/۱۴۴٪)، آدنین ۲۹۷۰ (۳۰/۹۶۷٪) و گوانین ۲۳۰۴ (۲۴/۰۲۳٪). چارچوب ژنی توسط نرم‌افزار آنالین ORF Finder شناسایی شد. زمینه کدون آغاز مانند mRNAهای گیاهان دولپه (Hull, 2009) به صورت AAAAUGGC در موقعیت ۱۶۳-۱۷۰ و کدون پایان UAA در موقعیت ۹۴۲۳-۹۴۲۱ تعیین شد. ناحیه غیر رمز شونده 5'-UTR در ابتدای ژنوم به طول ۱۶۵ نوکلئوتید می‌باشد که حاوی پانزده تکرار از توالی CAA مرتبط با فرآیند ترجمه بوده که پیش‌ازین برای سایر پوتی ویروس‌ها نیز گزارش شده است (Gallie et al. 1987, Gallie et al, 1992). در بسیاری از پوتی ویروس‌ها توالی‌های حفاظت‌شده‌ای به نام potybox a و b وجود دارد که در بعضی منابع نقش آن‌ها

جدول ۲. جایگاه‌های برش شناسایی شده در پلی پروتئین رمزگذاری شده توسط جدایه‌ی Ir-VRU با استفاده نرم‌افزار تحت وب NetPicoRNAV1.0.

Table 2. Identified cleavage sites of the deduced polyprotein for the Ir-VRU isolate using the NetPicoRNAV1.0 web application.

Position	Sequence	Comment	Residue	Location
2809	IVTYQGDEK	Potential	Q	N1b/CP
1952	IALVQSEIG	Potential	Q	
2293	EVVEQGYSS	Potential	Q	N1a/N1b
1855	IVQYQKRR	Potential	Q	6K2/VPg
1169	EVKYQSLDE	Potential	Q	6K1/CI
1109	LPEEEGKAE	Potential	E	
2107	IRSHQGEFT	Potential	Q	
1803	TVQYQSATD		Q	CI/6K2
1117	EVEYQANKV		Q	P3/6K1
2046	VVREEGKSI		E	VPg/N1a

مقایسه با سایر جدایه‌ها، نرم‌افزار NetPicoRNAV1.0 نیز اکثر جایگاه‌های برشی شناسایی شده را تأیید نمود. جایگاه‌های برش مربوط به N1a/N1b، N1b/CP، 6K2/VPg و K1/CI۶ به طور کامل توسط این نرم‌افزار به‌عنوان جایگاه برش احتمالی شناسایی شدند. ولی جایگاه‌های برش دیگر مانند CI/6K2، P3/6K1 و VPg/N1a با احتمال پایین‌تری تأیید گردیدند (جدول ۲). شواهدی مانند حضور دامنه پروتئازی سرین در پروتئین N1a (H2092-X43-D2167-X69-C2198-G2199) و P1 (I286VRGR290) امکان برش پلی پروتئین را کاملاً محتمل می‌سازند (Adams et al. 2005). تفاوت‌های نیز بین جایگاه‌های برش شناسایی شده در این جدایه با سایر پوتی ویروس‌ها وجود دارد. برای مثال، جایگاه برش بین N1a و N1b (Q/G) در بین پوتی ویروس‌ها رایج بوده ولی سایت برش بین N1b و CP (Q/G) نسبتاً کمیاب است. چنین تفاوت‌های در جایگاه‌های برش ممکن است باعث کارایی پایین برش پلی پروتئین نسبتاً به ویروس‌هایی مانند TEV شود (Varrelmann et al. 2007).

نوکلئوتید قرار دارد. این ناحیه غیر رمز شونده در انتهای خود به دنباله Poly-A ختم می‌شود. توالی‌های موجود در GenBank نشان دادند که طول ناحیه 3'-UTR در بین پوتی ویروس‌ها از ۱۶۶ نوکلئوتید (Pea seedborne mosaic virus) تا ۵۶۹ نوکلئوتید (Leek yellow stripe virus) متغیر است: بر اساس این داده‌ها طول ناحیه 3'-UTR در جدایه مورد مطالعه جزو کوتاه‌ترین‌ها در بین پوتی ویروس‌ها می‌باشد که از این نظر مشابه ویروس‌هایی مانند BYMV و CYVV است.

شناسایی جایگاه‌های برش احتمالی در ژنوم Ir-VRU

بر اساس موقعیت احتمالی جایگاه‌های برش و همچنین هم‌ردیف‌سازی با پوتی ویروس‌های دیگر، نه موقعیت احتمالی برای برش پلی پروتئین شناسایی شد. با در نظر گرفتن محل‌های برش در پلی پروتئین رمز شده توسط جدایه BtMV-Ir-VRU، پروتئین‌های حاصله به همان ترتیب حفاظت شده در تیره *Potyviridae* استقرار دارند. سه پروتئیناز در برش ژنوم BtMV دخالت دارند: پروتئیناز P1، پروتئیناز HC-Pro، پروتئیناز N1a-Pro. محل برش در انتهای کربوکسیلی سیسترون P1 احتمالاً بر روی دی پپتید Y/S قرار دارد. این جایگاه برش مشابه ویروس‌هایی مانند *Cocksfoot streak virus* و *Cowpea aphid-borne mosaic virus* می‌باشد. جایگاه برش HC-Pro در انتهای کربوکسیلی این سیسترون قرار دارد که بخشی از موتیف حفاظت شده YXVG/G می‌باشد (Carrington et al. 1989). هفت موقعیت دیگر در دی پپتیدهای Q/S، Q/A، Q/G و E/G توسط پروتئیناز N1a-Pro برش می‌خورند (جدول ۳) که کاملاً مشابه جایگاه‌های برش معرفی شده توسط ریچمن برای پروتئاز N1a می‌باشد (Riechmann et al. 1992). علاوه بر نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی و

جدول ۳. درصد یکسانی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی (درون پرانتز) نواحی مختلف جدایه‌های ویروس موزاییک چغندر نسبت به جدایه ایرانی.

Table 3. Nucleotide and amino acid identities of different regions of *Beet mosaic virus* isolates in comparison with the Iranian isolate.

	P1	HC-Pro	P3	PIPO	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP
Ge	89 (91)	96 (98)	97 (100)	99 (100)	97 (100)	98 (99)	98 (96)	98 (100)	98 (100)	97 (100)	98 (99)
IM	90 (92)	93 (98)	87 (89)	94 (91)	90 (100)	92 (99)	90 (94)	93 (96)	95 (100)	97 (100)	98 (99)
Xi	88 (91)	96 (98)	97 (97)	99 (98)	99 (100)	98 (99)	94 (92)	97 (99)	98 (100)	98 (100)	98 (99)
Wa	88 (90)	89 (94)	87 (89)	94 (89)	91 (100)	91 (99)	88 (92)	89 (98)	89 (96)	89 (98)	93 (97)

می‌باشد: (368-365) KMAC، (624-622) PTK و (-496) 560) FRNK. موتیف LIAGN که در حرکت سلول به سلول ویروس دخالت دارد در موقعیت ۵۶۴-۵۶۰ قرار دارد (Hammond & Hammond 2003). موتیف SCCVT را نیز می‌توان در موقعیت ۶۰۸-۶۰۴ یافت، این موتیف در جایجایی ویروس نقش دارد (Carrington *et al.* 1989). توالی CDNQRD نیز موتیفی با نقش ناشناخته است، CDNQRD در موقعیت ۵۱۴-۵۰۹ قرار دارد. در جدایه ایرانی برخلاف سایر پوتی ویروس‌ها لوسین با آرژنین در این موتیف جایگزین شده است. پروتئین P3 در جدایه Ir-VRU ۳۴۷ آمینواسید طول داشته و وزن مولکولی ۴۰/۳۱ کیلودالتون برای آن محاسبه شد. موتیف DPY-7X-SP-2X-L در این جدایه‌ی شناسایی شد. این موتیف در موقعیت ۸۱۴-۸۰۱ توالی پلی‌پروتئین قرار داشته و احتمالاً در تنظیم فرایند شکستن پلی‌پروتئین نقش دارد. همچنین چارچوب ژنی PIPO نیز بر اساس موتیف GAAAAAA در موقعیت ۲۹۳۲ توالی نوکلئوتیدی ژنوم کامل یافت شد (Chung *et al.* 2008). موتیف دیگری در توالی این پروتئین یافت نشد و تنها چند آمینواسید حفاظت شده پراکنده مانند گلوتامین (Q861)، گلیسین

بررسی موتیف‌های حفاظت‌شده در ژنوم Ir-VRU

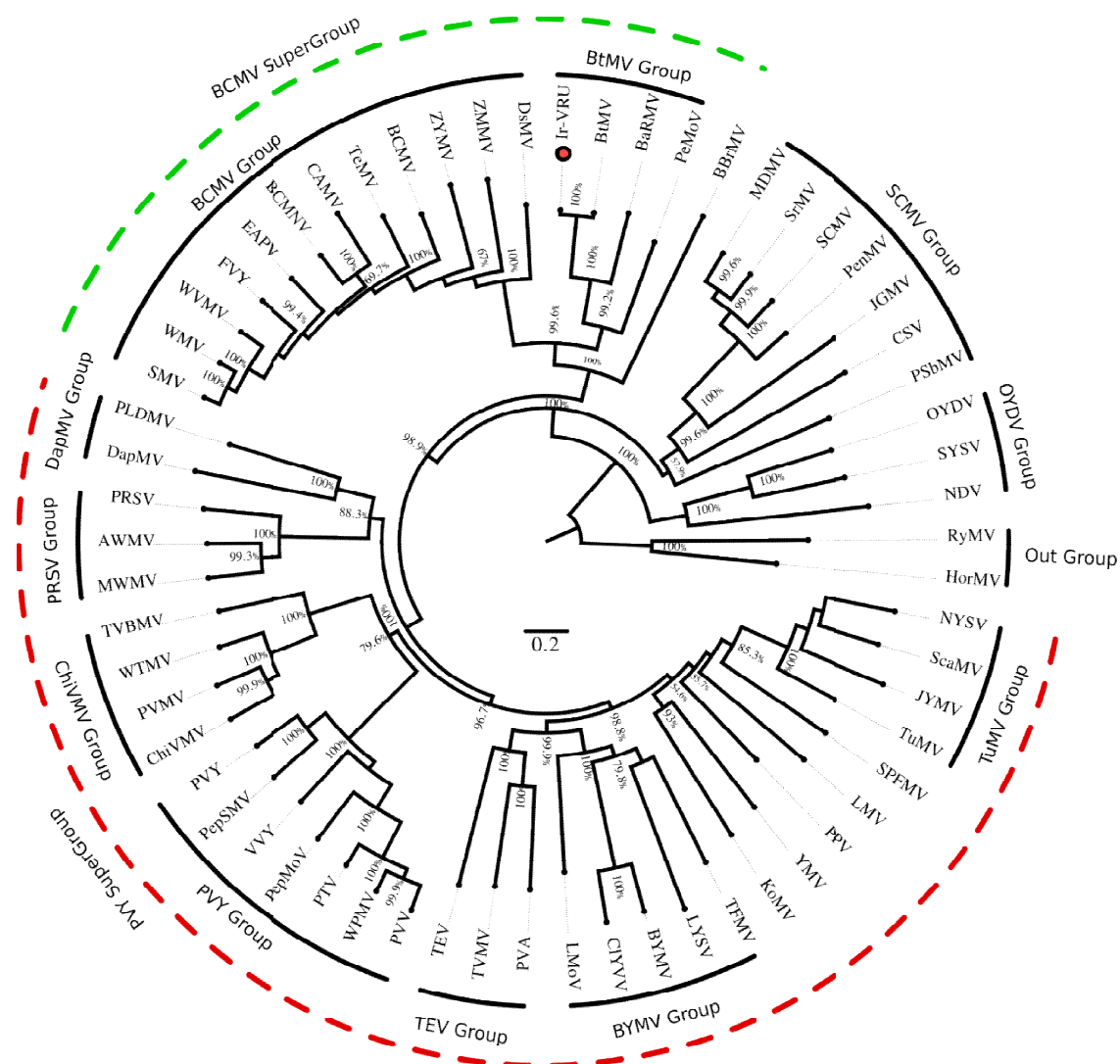
چندین موتیف آمینواسیدی حفاظت شده اختصاصی پوتی ویروس‌ها در توالی پلی‌پروتئین جدایه Ir-VRU شناسایی شد که برخی از آن‌ها دارای اختلافات جزئی با گزارش‌های پیشین است. پروتئین P1 جدایه Ir-VRU شامل ۳۱۳ آمینواسید است که وزن مولکولی معادل ۳۵/۳ کیلو دالتون دارد. این پروتئین متغیرترین پروتئین پوتی ویروسی است در مقایسه با سایر پوتی ویروس‌ها تنها تعداد اندکی ناحیه حفاظت‌شده در بخش انتهایی کربوکسیلی وجود دارد که آن نیز مربوط به فعالیت پروتئین‌سازی می‌باشد (Revers & García 2015). دامانه پروتئولیتیک IVRGR در موقعیت ۲۹۰-۲۸۵ توالی آمینواسیدی جدایه ایرانی قرار دارد. همچنین دو موتیف دیگر (GWSGLIL و DAR) در این ناحیه شناسایی شد. ناحیه HC-Pro جدایه ایرانی به طول ۴۵۶ آمینواسید و وزن مولکولی ۵۱/۴ کیلو دالتون یکی از حفاظت‌شده‌ترین ناحیه‌های ژنومی پوتی ویروس‌ها می‌باشد. هم‌ردیف‌سازی توالی آمینواسیدی HC-Pro با سایر پوتی ویروس‌ها باعث شناسایی شش موتیف حفاظت شده شد. این پروتئین دارای سه موتیف مهم مشارکت‌کننده در انتقال ویروس با شته

پلی پروتئین ویروس مورد مطالعه یافت شد.

بررسی تبارزائی

جدایه ایرانی BtMV از نظر میزان یکسانی توالی نوکلئوتیدی بیشترین قرابت (۹۷ درصد) را با دو جدایه آلمانی Ge و چینی Xi (DQ674264.1) نشان می‌دهد (جدول ۳). این موضوع از نظر پراکنش جغرافیایی قابل توجه می‌باشد. از طرف دیگر جدایه آمریکایی با ۸۹ درصد یکسانی نوکلئوتیدی دورترین جدایه می‌باشد. بررسی درصد یکسانی جداگانه هر یک از پروتئین‌های نیز با وجود تغییرات در طول ژنوم بیانگر نتایج مشابهی بود و همواره دو جدایه چینی و آلمانی بیشتر یکسانی را به جدایه ایرانی نشان دادند. بر اساس این نتایج در بین پروتئین‌ها P1 متغیرترین پروتئین بوده و کمترین درصد یکسانی را نشان می‌دهد. درصد یکسانی نوکلئوتیدی پروتئین‌های دو جدایه آلمانی و چینی بسیار مشابه هم بوده و تنها دو پروتئین 6K1 و 6K2 تفاوت قابل توجهی را در این دو جدایه نشان می‌دهند. پروتئین‌های جدایه آمریکایی Wa (AY206394.2) همواره کمترین میزان درصد یکسانی را نسبت به سایر جدایه‌ها نشان می‌دهند به نظر می‌رسد شرایط جغرافیایی نسبتاً متفاوت این جدایه سبب تغییرات قابل توجهی در ژنوم شده است. مقایسه یکسانی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی پروتئین‌های این جدایه نشان‌گر وقوع جهش‌های نا مترادف در پروتئین‌های P1, HC-Pro و P3 است، این پروتئین‌ها عموماً در سازگاری با شرایط و میزبان جدید نقش دارند (Hull 2009, Revers & García 2015)، از طرف دیگر این بررسی‌ها نشان می‌دهد که پروتئین‌های بخش 3' ژنوم اکثراً درگیر جهش‌های خاموش بوده و تغییرات شدیدی را در بین جدایه‌های مختلف نشان نمی‌دهند.

(G910) و لیسین (K924) را می‌توان یافت. پروتئین CI شامل ۶۳۴ آمینواسید بوده و وزن مولکولی آن ۷۱/۱ کیلودالتون است. پنج موتیف حفاظت شده در توالی این پروتئین شناسایی شد. این موتیف‌ها در تکثیر ویروس نقش دارند. موتیف DESH فعالیت آر آن ا. هلیکازی داشته و در موقعیت ۱۳۴۶-۱۳۴۳ پلی پروتئین قرار دارد. در موقعیت ۱۳۷۶-۱۳۶۹ نیز موتیف LKVSATPP را با نقش اتصال به آر آن ا. می‌توان یافت. موتیف GERLQRLGRVGR در موقعیت ۱۵۲۷-۱۵۱۶ دارای فعالیت ATPase می‌باشد. موتیف VGSGKST دارای نقش اتصال به NTP بوده و در موقعیت ۱۲۶۳-۱۲۵۶ قرار دارد. آخرین موتیف شناسایی شده در CI دارای توالی VATNIENGVTL بوده و به آن فعالیت هیدرولیز NTP نسبت داده شده است (Fan et al. 2003, Lain et al. 2003, Spetz & Valkonen 1990). البته باید توجه داشت که آمینواسیدهای سیستمین یا فیل آلانین در موتیف آر آن ا. هلیکاز با آمینواسید سرین جایگزین شده است. پروتئین NIB دارای دو موتیف حفاظت شده بسیار مهم می‌باشد (CDADGS و SGX3SX3NTX30GDD) که در فعالیت آر آن ا. پلیمرز نقش دارند. این دو موتیف به ترتیب در موقعیت‌های ۲۵۴۴-۲۵۳۸ و ۲۶۴۶-۲۶۰۳ قرار دارند (Fan et al. 2003, Revers & García 2015). پروتئین پوششی (CP) جدایه IR-VRU ۲۷۶ آمینواسید طول داشته و وزن مولکولی آن ۳۱/۱ کیلودالتون است. اولین موتیف حفاظت شده در این پروتئین، DAG می‌باشد. این موتیف در انتقال با شته دخیل می‌باشد. همچنین در موقعیت ۲۹۷۵-۳۰۱۹ موتیف RX43D یافت شد که نقش آن مشارکت در جابجایی ویروس است (Fan et al. 2003). به طور خلاصه، تمامی موتیف‌های مسئول در انتقال با شته (PTK, KITC, FRNK (HC-Pro) و DAG (CP)) در



شکل ۳. درخت‌های فیلوژنتیک محاسبه‌شده به وسیله RAXML با مدل LG+I+F بر اساس مقایسه ترادف آمینواسیدی پلی‌پروتئین Ir-VRU در مقایسه با سایر پوتی‌ویروس‌ها. توالی‌های مورد استفاده بر اساس گزارش ژیبس و اوشیما (Gibbs & Ohshima 2010) می‌باشد. دو ریموویروس *Hordeum mosaic virus* (HorMV, NC_005904.1) و *Ryegrass mosaic virus* (RyMV, NC_001814.1) به‌عنوان اعضای خارج از گروه مورد استفاده قرار گرفتند.

Fig 3. The phylogenetic trees calculated by RaxML with LG+I+F model based on the comparison of amino acid sequence of the Ir-VRU alongside with other *Potyvirus* species. The sequences are based on Gibbs & Ohshima (2010). Two Rymoviruses, *Hordeum mosaic virus* (HorMV, NC_005904.1) and *Ryegrass mosaic virus* (RyMV, NC_001814.1), were used as outgroup.

محاسبه‌شده به وسیله RAXML نشان داد که پوتی‌ویروس‌ها خود به دو سوپر گروه PVY و BCMV تقسیم می‌شوند (شکل ۳). در این درخت جدایه ویروس مورد مطالعه همراه با جدایه مرجع و پوتی‌ویروس‌های *Basella rugosa*

برای بررسی موقعیت تبارزائی جدایه ایرانی ویروس موزاییک چغندر توالی آمینواسیدی پلی‌پروتئین آن همراه با جدایه مرجع NC_005304.1 (به‌عنوان شاهد) در کنار ۵۸ پوتی‌ویروس دیگر مورد بررسی قرار گرفت. درخت

راسته Caryophyllales آلوده می‌کنند (Huang & Change 2006)، به نظر می‌رسد این دو ویروس بر اثر تغییر در میزبان گیاهی از یکدیگر جدا شده و به مرور زمان جهش‌ها و اثر انتخاب طبیعی دو گونه ویروسی متفاوت را سبب شده است. امروزه نیز تغییر میزبانی در پوتی ویروس‌های مختلف به فراوانی گزارش می‌شود (Kumari et al. 2010, Wang et al. 2008).

سپاسگزاری

نویسندگان از حمایت مالی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان به دلیل فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای کمال تشکر را دارند.

Peanut mottle virus و *(BaRMV) mosaic virus* (PeMoV) در سوپر گروه BCMV گروهی مستقل را تشکیل می‌دهد که آن را در بررسی‌های پیشین (Gibbs & Ohshima 2010) گروه BtMV نامیده‌اند. این بررسی‌ها نشان می‌دهد که برخلاف گزارش‌های پیشین (Nemchinov et al. 2004, Xiang et al. 2007) یک پوتی ویروس معمولی بوده و هیچ تفاوت خاصی را نسبت به سایر پوتی ویروس‌ها نشان نمی‌دهد. به نظر می‌رسد نمچینو و همکاران در مقاله خود به علت مشخص نکردن ریشه فیلوگرام مربوطه، به اشتباه ویروس موزاییک چغندر را یک پوتی ویروس بسیار خاص جلوه داده‌اند. جدایه مورد مطالعه در گروه BtMV با ویروس BaRMV (با ۶۲٪ یکسانی آمینواسیدی) رابطه‌ی خواهری نشان می‌دهد. ویروس‌های BtMV و BaRMV هر دو، گیاهانی را از

منابع

- Adams, M. J., Antoniw, J. F. and Beaudoin, F. 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Molecular Plant Pathology* 6: 471-487.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A. and Watson, L. 1996. *Viruses of plants: Descriptions and lists from the VIDE database*. Cab International., USA. 707 p.
- Chen, J., Chen, J. and Adams, M. J. 2001. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology* 146: 757-766.
- Chung, B. Y. W., Miller, W. A., Atkins, J. F. and Firth, A. E. 2008. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 5897-5902.
- Carrington, J. C., Freed, D. D. and Sanders, T. C. 1989. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *Journal of Virology* 63: 4459-4463.
- Dusi, A. 1999. *Beet mosaic virus: epidemiology and damage.*, LUW. 137 p.
- Farahmand, A. Shams-Bakhsh, M. Hosseinzadeh, M.R. 2017. Detection and Phylogenetic Analysis of Iranian Beet Mosaic Virus Isolates Based on the Viral Coat Protein Gene. *Agricultural Biotechnology* 15: 85-94. (in Persian with English Summary)
- Fan, Z., Chen, H., Liang, X. and Li, H. 2003. Complete sequence of the genomic RNA of the prevalent strain of a *Potyvirus* infecting maize in China. *Archives of Virology* 148: 773-782.
- Gallie, D. R., Sleat, D. E., Watts, J. W., Turner, P. C. and Wilson, T. M. A. 1987. A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. *Nucleic Acids Research* 15: 8693-8711.
- Gallie, D. R. and Walbot, V. 1992. Identification of the motifs within the *Tobacco mosaic virus* 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Research* 20: 4631-4638.
- Gibbs, A. J., Mackenzie, A. M., Wei, K.-J. and Gibbs, M. J. 2008. The potyviruses of Australia. *Archives of Virology* 153: 1411-1420.
- Gibbs, A. and Ohshima, K. 2010. Potyviruses and the digital revolution. *Annual Review of Phytopathology* 48: 205-223.

- Ha, C., Coombs, S., Revill, P., Harding, R. M., Vu, M. and Dale, J. L. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives of Virology* 153: 25-36.
- Hammond, J. and Hammond, R. 2003. The complete nucleotide sequence of isolate BYMV-GDD of *Bean yellow mosaic virus*, and comparison to other potyviruses. *Archives of Virology* 148: 2461-2470.
- Huang, C. H. and Chang, Y. C. 2006. *Basella rugose mosaic virus*, a new *Potyvirus* infecting *Basella rubra*. *Plant Pathology* 55: 819-819.
- Hull, R. 2009. *Comparative plant virology*. 2 ed., Academic press. 400 p.
- Jalali, S. Masahebi, Gh. H. Okhovat, M. 2004. Effect of beet mosaic virus on sugar beet seed yield in greenhouse condition. *Journal of Sugar Beet* 18: 109. (in Persian with English Summary)
- Jalali, S. Okhovvat, M. Mossahebi, Gh. Arjmand, M. N. 2001. Isolation and identification Viruses caused mosaic symptoms in sugarbeet in Karaj. *Journal of Sugar Beet* 17: 44-56. (in Persian with English Summary)
- Kumari, S. G., Najar, A., Attar, N., Loh, M. H. and Vetten, H. J. 2010. First report of *Beet mosaic virus* infecting chickpea (*Cicer arietinum*) in Tunisia. *Plant Disease* 94: 1068-1068.
- Le, S. Q. and Gascuel, O. 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1307-1320.
- Lain, S., Riechmann, J. and Garcia, J. 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Research* 18: 7003-7006.
- Langer, R. H. M., Langer, R. H. M. and Hill, G. 1991. *Agricultural plants*. Cambridge University Press. 391 p.
- Milne, R. G. 1988. Taxonomy of the rod-shaped filamentous viruses, pp3-50. In: R. G. Milne (Ed.), *The Plant Viruses: The Filamentous Plant Viruses*. Springer US, Boston, MA.
- Nemchinov, G. L., Hammond, J., Jordan, R. and Hammond, W. R. 2004. The complete nucleotide sequence, genome organization, and specific detection of *Beet mosaic virus*. *Archives of Virology* 149: 1201-1214.
- Riechmann, J. L., Lain, S. and García, J. A. 1992. Highlights and prospects of *Potyvirus* molecular biology. *Journal of General Virology* 73: 1-16.
- Revers, F. and García, J. A. 2015. Chapter Three - Molecular biology of potyviruses, pp101-199. In: M. Karl and C. M. Thomas (Ed.), *Advances in virus research*. Academic Press.
- Russell, G. E. 1971. *Beet Mosaic Virus*. CMI/AAB descriptions of plant viruses 53.
- Rogov, V., Karasev, A., Agranovsky, A. and Gorbunova, N. 1991. Characterization of an isolate of *Beet mosaic virus* from South Kazakhstan. *Plant Pathology* 40: 515-523.
- Spetz, C. and Valkonen, J. 2003. Genomic sequence of *Wild potato mosaic virus* as compared to the genomes of other potyviruses. *Archives of Virology* 148: 373-380.
- Summers, E., Newton, A., Kirk, M. and Temple, S. 1990. Transmission of *Beet yellows* and *Beet mosaic viruses* by noncolonizing aphid vectors. *Journal of Economic Entomology* 83: 2448-2451.
- Turpen, T. 1989. Molecular cloning of a *Potato Virus Y* genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. *Journal of General Virology* 70: 1951-1960.
- Varrelmann, M., Maiss, E., Pilot, R. and Palkovics, L. 2007. Use of pentapeptide-insertion scanning mutagenesis for functional mapping of the *Plum pox virus* helper component proteinase suppressor of gene silencing. *Journal of General Virology* 88: 1005-1015.
- Watson, D. and Watson, M. A. 1953. Comparative physiological studies on the growth of field crops. *Annals of Applied Biology* 40: 1-37.
- Wang, H., Li, X., Liu, Y., Wang, B. and Zhu, X. 2008. First report of *Beet mosaic virus* infecting lettuce, in China. *Plant Pathology* 57: 764-764.
- Xiang, H., Han, Y.-H., Han, C., Li, D. and Yu, J. 2007. Molecular characterization of two Chinese isolates of *Beet mosaic virus*. *Virus Genes* 35: 795-799.