

## شناسایی مولکولی و تجزیه‌تحلیل تبارزایی ویروس موزاییک خیار زیرگروه IB جداشده از گیاه دارویی ختمی

داود کولیوند<sup>1\*</sup>، نعمت سخندان بشیر<sup>2</sup> و سویل نعمت‌الهی<sup>3</sup>

<sup>1</sup>دانشجوی دوره دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز

<sup>2</sup>دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز

<sup>3</sup>استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

مسئول مکاتبه: [D.koolivand@gmail.com](mailto:D.koolivand@gmail.com)

تاریخ دریافت: 91/5/23 تاریخ پذیرش: 91/9/22

### چکیده

ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus* (CMV)، از جنس *Cucumovirus* و خانواده *Bromoviridae* می‌باشد. ختمی (*Althaea officinalis*) گیاهی یک‌ساله و خودرو از تیره پنیرکیان است که گل، میوه و ریشه آن مصارف دارویی دارد. در این تحقیق، پنج نمونه مشکوک به آلودگی با CMV از گیاه ختمی جمع‌آوری و وجود CMV با آزمون‌های سرولوژیکی از جمله DAS-ELISA، از نمونه‌ها ردیابی شد. از بین آن‌ها، جدایه Ta-alth انتخاب و پس از استخراج RNA کل از گیاه آلوده به آن، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه ژن پروتئین پوششی، RT-PCR انجام و قطعه 675 جفت بازی تکثیر شد. قطعه تکثیر شده درون پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی و سپس تبدیل سلول‌های مستعد *Escherichia coli* سویه DH5α انجام گردید. جهت حصول اطمینان از قرارگرفتن قطعه موردنظر درون حامل، تجزیه‌تحلیل پلاسمید نوترکیب خالص‌سازی‌شده با استفاده از آنزیم‌های برشی انجام و توالی قطعه تکثیری تعیین گردید. توالی به‌دست‌آمده با استفاده از برنامه GeneDoc با توالی‌های متناظر سایر جدایه‌های CMV از ایران و نقاط دیگر دنیا (موجود در بانک ژن) مقایسه و درخت تبارزایی با استفاده از روش Neighbor-Joining (NJ) و برنامه TREECON رسم گردید. تجزیه‌تحلیل ترادف ژن پروتئین پوششی جدایه Ta-alth نشان داد که این جدایه متعلق به زیرگروه IB ویروس موزاییک خیار می‌باشد. این اولین گزارش از آلودگی ختمی به CMV در ایران است.

واژه‌های کلیدی: تجزیه‌تحلیل تبارزایی، ختمی، ویروس موزاییک خیار، همسانه‌سازی

## مقدمه

مولکولی و مقایسه خصوصیات مولکولی این جدایه با استفاده از تعیین توالی ژن پوشش پروتئینی با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن می باشد.

## مواد و روش‌ها

## منبع نمونه

تعداد پنج نمونه برگ ختمی که بر اساس علائم توصیف شده برای ویروس موزاییک خیار، مشکوک به آلودگی توسط این ویروس بودند، در تابستان 1389 از شهر تبریز جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها درون کیسه‌های پلاستیکی تا انجام مراحل بعدی در یخچال و قسمتی از نمونه‌ها بر روی کلرید کلسیم خشک و داخل فریزر 20- نگه‌داری شدند.

## دیبا

آزمون دیبا (dot-immunobinding assay) با استفاده از غشای نیتروسولولوزی که در ابعاد مناسب بریده شده بود انجام گردید (بال 1990). این غشا در آب مقطر استریل به مدت 15 دقیقه غوطه‌ور و سپس روی دستمال کاغذی قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد. مقدار 15 میکرولیتر از عصاره گیاهی استخراج شده از نمونه‌های آلوده همراه با عصاره گیاهی نمونه سالم به صورت لکه روی غشاء نیتروسولولوزی قرارداد شد. حائل‌سازی با استفاده از بافر حائل حاوی دو درصد BSA (bovine serum albumin) به مدت دو ساعت در دمای اتاق همراه با استفاده از شیکر در دور پایین انجام گرفت. سپس سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با استفاده از بافر حائل شستشو داده شد. پس از شستشو (DSMZ, Germany) IgG-CMV با نسبت 1:500 به غشاء نیتروسولولوزی اضافه و غشاء به مدت دو ساعت در دمای اتاق در دور پایین روی شیکر قرار گرفت. شستشوی بعدی مطابق مرحله قبل انجام و کاندوگیت عمومی (DSMZ, Germany) با نسبت 1:1000 اضافه و مانند مرحله قبل به مدت دو ساعت نگهداری شد. در نهایت پس از چهار بار شستشو با بافر حائل، بافر آلکالین فسفاتاز حاوی 16/5 میکرولیتر NBT و 33 میکرولیتر

ویروس موزاییک خیار عضو تیپ جنس *Cucumovirus* و خانواده *Bromoviridae* می باشد که ذرات ایزومتریک و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای با قطبیت مثبت و سه قطعه‌ای دارد (بونت و همکاران 2005). دامنه میزبانی این ویروس بسیار وسیع و توسط بیش از 80 گونه شته به صورت ناپایا منتقل می‌شود (اسریو و همکاران 2003). گیاهان دارویی مانند پونه، نعنا و... از میزبان‌های این ویروس هستند (داوینو و همکاران 2012). ختمی (*A. officinalis*) از تیره پنیرکیان یک‌ساله است که گل، میوه و ریشه آن مصارف دارویی دارد (سوتوسکا و همکاران 2009). گل‌های صورتی، قرمز و سفید ختمی برای روکش داروها استفاده می‌شود. ویروس موزاییک خیار در اغلب مناطق آب‌وهوایی به صورت بومی وجود دارد و در برخی از مناطق سبب واگیری‌های شدید در محصولات میوه‌ها، میوه‌ها و علوفه‌ها می‌شود. جدایه‌های CMV بر اساس معیارهای مختلف از جمله روابط سرولوژیکی، نقشه پپتیدی پوشش پروتئینی، دورگیری اسید نوکلئیک ویروس و نیز علائم بیماری در دو زیرگروه اصلی قرار می‌گیرند (داوینو و همکاران 2005). تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های ویروس موزاییک خیار بسیار بالاست و جدایه‌ها با توجه به داده‌های مولکولی و میزان تشابه در RNA های آن‌ها در سه زیرگروه IA, IB, و II قرار می‌گیرند. جدایه‌های زیرگروه یک دارای 91 تا 99 درصد و جدایه‌های زیرگروه دو دارای 76 تا 84 درصد مشابهت هستند (بونت و همکاران 2005). به طور کلی جدایه‌های متعلق به زیرگروه یک در گیاهان پراکندگی بیشتری نسبت به جدایه‌های زیرگروه دو دارند، به صورتی که در برخی از موارد 80 درصد تمامی جدایه‌های ردیابی شده متعلق به زیرگروه یک هستند و در این بین فراوانی زیرگروه IA نسبت به IB بیشتر است (گالیتلی 2000).

هدف از این تحقیق ردیابی و شناسایی جدایه‌های ویروس موزاییک خیار از گیاه دارویی ختمی، گروه‌بندی جدایه منتخب با استفاده از روش‌های سرولوژیک و

BCIP به غشاء اضافه و تغییر رنگ لکه‌ها تا 30 دقیقه پس از اضافه نمودن ثبت شد.

#### الایزا

در آزمون الایزا به روش مستقیم (کلارک و آدامز 1977) (DAS-ELISA (double-antibody sandwich ELISA) برای ردیابی و شناسایی جدایه‌های CMV از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای و کانونجیت اختصاصی CMV (DSMZ, Germany) استفاده شد. همچنین، به منظور مشخص کردن زیرگروه، آزمون TAS-ELISA با استفاده از آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای اختصاصی زیرگروه انجام گردید (ختارپل و کومار 1995). در روش TAS-ELISA و DAS-ELISA چاهک هر تشکک ابتدا با استفاده از آنتی‌بادی پوششی تیمار و مراحل بعدی مطابق روش کلارک و آدامز (1977) انجام شد. نمونه‌های مثبت در آزمون‌های دیبا و DAS-ELISA برای آزمون TAS-ELISA مورد استفاده قرار گرفتند. مطالعه‌های مولکولی روی جدایه‌ای به نام Ta-alth انجام شد.

#### استخراج RNA کل

استخراج RNA کل از 200 میلی‌گرم بافت برگ آلوده به جدایه Ta-alth هم‌وزنیزه شده در دو میلی‌لیتر بافر استخراج مطابق روش روحانی و همکاران (1993) انجام و در نهایت سوسپانسیون RNA استخراج شده در 25 میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه گردید.

#### آغازگرها

از یک جفت آغازگر CMVCP-F به عنوان آغازگر مستقیم و CMVCP-R آغازگر معکوس استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی آغازگر مستقیم 5'AGTGGATCCATGGACA AATCTGAATCAACCAG3' و توالی آغازگر معکوس 5'AACTTCGAATTC(G/T)ACTGGGAGCAC(C/T)CC(A B13 (G)GACGTGGG3' بود که بر اساس توالی جدایه (AY871070) طراحی شدند. تکثیر قطعه‌ای به طول حدود 675 جفت باز در واکنش RT-PCR مورد انتظار بود.

#### آزمون RT-PCR

برای هر واکنش رونویسی معکوس، 0/4 میکرولیتر از آغازگر معکوس (5 pmol/μl) با 1/1 میکرولیتر از آب استریل دیونیزه مخلوط شده و یک میکرولیتر از RNA استخراج شده به هر میکروتیوب اضافه و میکروتیوب‌ها در دمای 70 درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه قرار داده شدند. نمونه‌ها بلافاصله به روی یخ انتقال یافتند تا به طور سریع سرد شوند. سپس 7/5 میکرولیتر از ترکیب محتوی دو میکرولیتر بافر واکنش 10x، یک میلی‌مولار dNTP، 40 واحد RNasin و 200 واحد (0/5 میکرولیتر) آنزیم ترانس-کریپتاز M-MuIv به هر لوله اضافه شد و لوله‌ها در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه قرار گرفتند. سپس، لوله‌ها در 42 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 دقیقه در ترموسایکلر قرار داده شدند. پس از انجام واکنش، آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس با قراردادن لوله‌ها در 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه غیرفعال گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی 20 میکرولیتر تهیه شد که محتوی دو میکرولیتر بافر 10x PCR، دو میلی‌مولار Taq DNA، 2/5 pmol آغازگر مستقیم و 1/25 واحد MgCl<sub>2</sub> پلی‌مرز بود. سپس پنج میکرولیتر فرآورده حاصل از واکنش ساخت رشته cDNA به این ترکیب اضافه گردید. برنامه PCR شامل یک چرخه 94°C به مدت یک دقیقه، 35 چرخه 94°C به مدت 30 ثانیه، 50°C به مدت 45 ثانیه، 72°C به مدت یک دقیقه و چرخه نهایی 72°C به مدت پنج دقیقه اجرا شد. به منظور بررسی نتایج حاصل از واکنش RT-PCR، پنج میکرولیتر فرآورده حاصل از هر واکنش PCR بر روی ژل آگارز 1/2 درصد، حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TBE 0.5x، الکتروفورز گردید. الکتروفورز با ولتاژ 100 ولت و شدت جریان 24 میلی‌آمپر به مدت حدود یک و نیم ساعت انجام و نتیجه توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل (Biomerta, Qiagen) و نور ماورابنفش بررسی شد.

تجزیه‌تحلیل از جدایه ER، Peanut stunt virus (PSV) به عنوان عضو برون‌گروه (out group) استفاده شد.

### نتایج

#### آزمون‌های سرولوژیک

آزمون دیبا روی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده که دارای علائم موزاییک و مشکوک به CMV بودند (شکل 1)، نشان داد که همه نمونه‌های مذکور به ویروس موزاییک خیار آلوده می‌باشند. در آزمون سرولوژیک، از کاغذ نیتروسلولزی استفاده گردید و با توجه به پادتن‌های استفاده‌شده، در نمونه‌هایی که مثبت بودند و آلودگی آن‌ها به CMV ثابت شد، تغییر رنگ در محل قراردادن عصاره گیاهی به‌وجود آمد، نتایج این آزمون در مقایسه با نمونه مثبت و منفی و بر مبنای تغییر رنگ لکه‌های ایجاد شده روی کاغذ نیتروسلولزی، ارزیابی و تفسیر گردید. در برخی موارد، شدت تغییر رنگ جدایه‌ها در زمان مساوی از هم متفاوت بود و می‌تواند ناشی از تفاوت غلظت ویروس در نمونه‌های آلوده باشد.



شکل 1- علائم موزاییک در بوته ختمی در مزرعه، آلودگی این بوته به ویروس موزاییک خیار با استفاده از الایزا، دیبا و RT-PCR مشخص شد

نتایج در DAS- و TAS-ELISA به‌صورت تغییر رنگ چاهک‌های تشتک الایزا به رنگ زرد، قابل مشاهده بود. نمونه‌هایی که در آزمون دیبا مثبت بودند در آزمون‌های

#### همضم محصول RT-PCR با آنزیم‌های برشی

قطعات تکثیرشده در RT-PCR با استفاده از آنزیم *MspI* (فرمانتس) مطابق دستورکار شرکت سازنده برای تعیین زیرگروه CMV برش داده شدند. تقریباً 100 نانوگرم از هر محصول PCR در 20 میکرولیتر بافر محدودسازی 1X محتوی BSA 100ng/μl و پنج واحد آنزیم، برش داده شد. واکنش به مدت دو الی سه ساعت در دمای 37°C انجام گردید. سپس، محصول برش در ژل آگارز 1/8 درصد مطابق روش ذکرشده الکتروفورز شد.

#### همسانه‌سازی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی

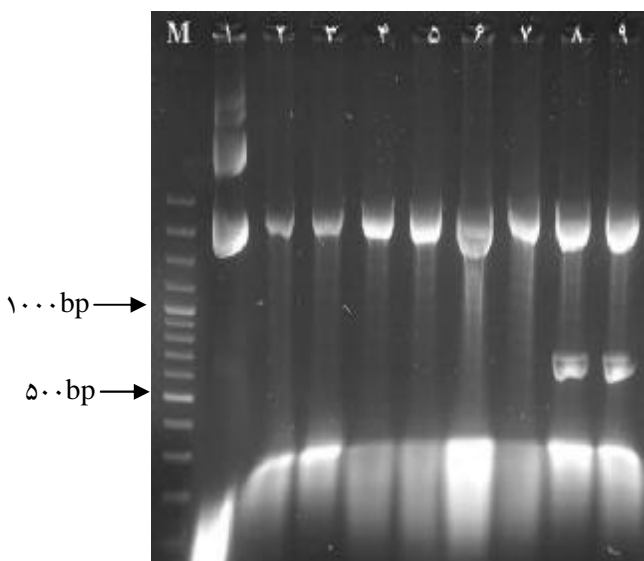
محصول PCR به اندازه قطعه موردنظر در پلاسمید InsT/Aclone™ PCR با استفاده از کیت Product Cloning Kit (Fermentas, Lithuania) همسانه‌سازی شد. پلاسمیدها از کلنی‌های سفید مشاهده‌شده با روش لیز آلکالینی (سمبروک و راسل 2001) و کیت استخراج پلاسمید شرکت کپازن استخراج شدند و سپس با استفاده از آنزیم‌های برشی مناسب، حضور قطعه مورد انتظار در پلاسمیدهای نو ترکیب تایید گردید. پلاسمید نو ترکیب به‌منظور تعیین ترادف به شرکت Macrogen (کره جنوبی) ارسال شد. تعیین ترادف با استفاده از آغازگر عمومی M13F انجام گردید.

#### تجزیه‌تحلیل تبارزایی

داده‌های نوکلئوتیدی توالی‌یابی‌شده با داده‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های ویروس موزاییک خیار که از قبل در پایگاه اطلاعاتی موجود بودند و برخی از جدایه‌هایی که قبلاً از ایران ردیابی شده بودند، با استفاده از نرم‌افزار GeneDoc هم‌ردیف‌سازی چندگانه شدند و تجزیه تبارزایی آن‌ها با استفاده از روش Neighbor-Joining در نرم افزار TREECON صورت گرفت (ون د پیر و واچر 1997). ابتدا فواصل ژنتیکی داده‌های نوکلئوتیدی بر اساس روش جیوکس کانتر (1969) مشخص شدند و کلیه شاخه‌ها با ارزش بوت‌استرپ پایین‌تر از 70 ادغام گردیدند. در این

برای تایید الحاق قطعه درون پلاسمید همسانه‌سازی شده، هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *EcoRI/BamHI* و یا *EcoRI/HindIII* برای آزادسازی قطعه از پلاسمید انجام و قطعه مورد نظر آزاد شد (شکل 3).

بررسی توالی قطعه مورد نظر در NCBI نشان داد که آن توالی مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار می‌باشد. توالی مورد نظر در NCBI با رس‌شمار (Accession Number) JX219970 برای جدایه Ta-alth ثبت شد.



شکل 3- نقوش الکتروفورز واکنش هضم پلاسمید pTZ57R/T

نو ترکیب حاوی CMV-CP توسط آنزیم های برشی

*EcoRI/ BamHI*

M: نشان گر Gene Ruler 100bp DNA Ladder

پلاسمید بدون برش 2 تا 7: کلون‌های فاقد قطعه 8 و 9: پلاسمید

دارای قطعه ژن پوشش پروتئینی CMV

هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی ناحیه ژنی پروتئین پوششی جدایه Ta-alth با سایر جدایه‌های گزارش شده از ایران و دنیا نشان داد که جدایه مورد نظر متعلق به زیر گروه IB می‌باشد. درخت تبارزایی حاصل از هم‌ردیف سازی چندگانه با 52 جدایه (جدول 1) از مناطق مختلف دنیا و روی میزبان‌های مختلف نشان داد که جدایه مورد-

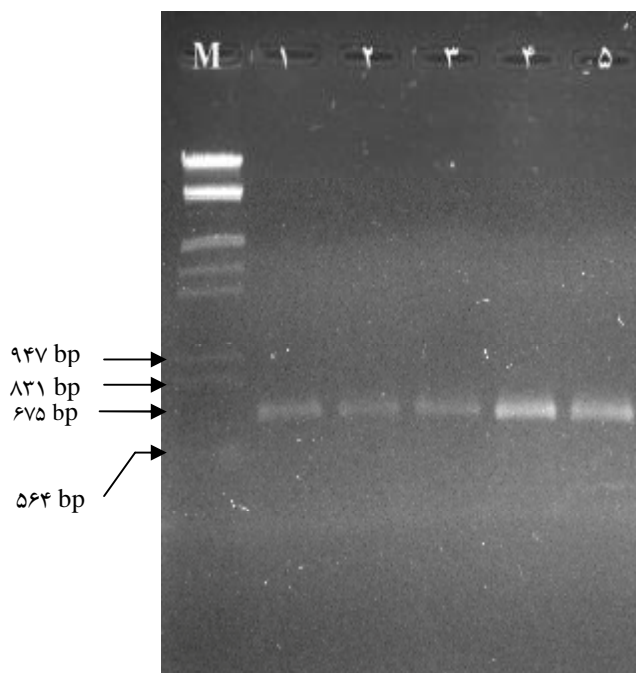
الایزا نیز مثبت ارزیابی شدند. آزمون TAS-ELISA با استفاده از anti-CMV subgroup I به عنوان آنتی‌بادی ثانویه روی نمونه‌های مثبت انجام شد و همه نمونه‌ها در این آزمون در زیرگروه یک قرار گرفتند.

#### RT-PCR

آزمون RT-PCR آماده RNA کل با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ناحیه ژنی پروتئین پوششی منجر به تکثیر یک قطعه DNA به طول 675 جفت باز (اندازه مورد انتظار) از ژن پوشش پروتئینی CMV شد (شکل 2).

#### هضم آنزیمی محصول

PCR از جدایه‌هایی که در PCR مثبت بودند، برای برش استفاده شد. نتایج نشان داد که پس از برش با آنزیم *MspI* دو باند 450 و 220 جفت‌بازی در جدایه‌ها به وجود می‌آید که به معنی تعلق این جدایه‌ها به زیرگروه یک CMV می‌باشد.



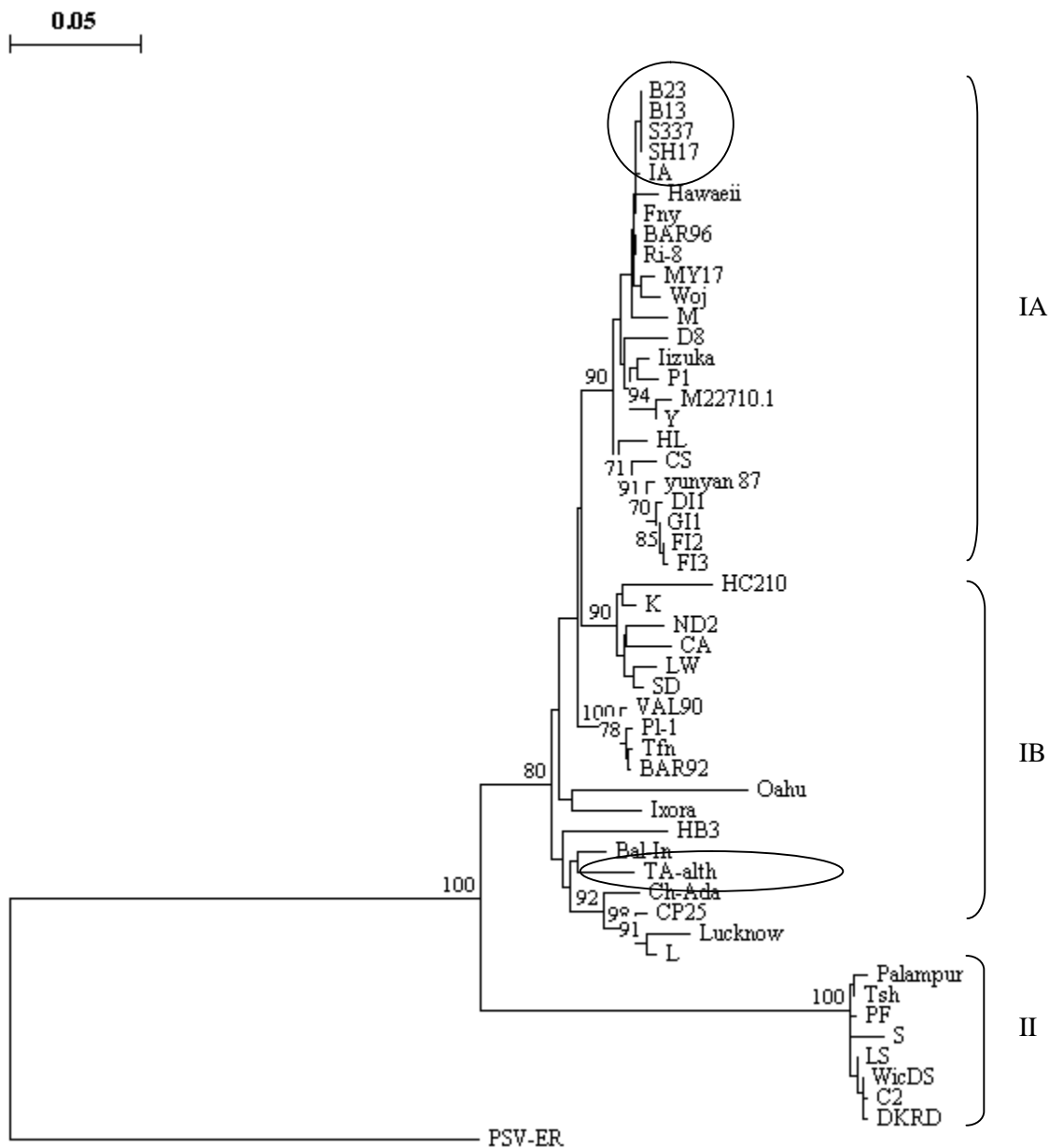
شکل 2- نقوش الکتروفورز محصول RT-PCR با استفاده

از جفت آغازگر CMVCP-F/CMVCP-R

M: نشانگر Gene Ruler 100bp DNA Ladder

1 تا 5: نمونه‌های مثبت آلوده به ویروس موزاییک خیار

نظر همراه با جدایه‌هایی از هندوستان و یک جدایه از چین در یک خوشه و در زیرگروه IB قرار می‌گیرد، در حالی که جدایه‌های ایرانی که قبلاً مورد بررسی قرار گرفته بودند در زیرگروه IA قرار گرفتند (شکل 4).



شکل 4- تجزیه تحلیل جدایه‌های ویروس موزائیک خیار شامل جدایه ردیابی شده از *Althaea officinalis* بر اساس ژن رمز کننده پروتئین پوششی. درخت بر اساس روش Neighbour-Joining در نرم افزار TREECON ترسیم شده است. درجه اطمینان بیش از 70 درصد در بالای شاخه‌ها نمایش داده شده و جدایه Ta-alth با بیضی و جدایه‌های ایرانی که قبلاً ردیابی شده بودند با دایره مشخص شده است. PSV-ER به عنوان عضو برون گروه انتخاب گردید.

جدول 1- رس شماره، منشا (کشور) و میزبان‌های جدایه‌های مختلف CMV موجود در بانک ژن NCBI که در بررسی‌های

مولکولی این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است

جدایه یا استرین	میزبان	کشور	رس شماره
B23	خیار	ایران	AY871071
B13	خیار	ایران	AY871070
S337	<i>Cucumis</i> sp.	ایران	AY871069
SH17	خیار	ایران	AY871068
IA	-	اندونزی	AB042294
BAR96	-	اسپانیا	AJ829777
Hawaeii	<i>Musca</i> sp.	هاوایی	U31219
Fny	-	آمریکا	U20668
K	-	چین	AF127977
SD	-	چین	AB008777
IA	-	اندونزی	AB042294
Ri-8	گوچه فرنگی	اسپانیا	D105381
MY17	-	ژاپن	AM183119
Woj	<i>Cucumis sativus</i>	لهستان	AF103993
M	-	آمریکا	FJ621496
D8	-	ژاپن	D10539
Iizuka	لگوم	ژاپن	AB004781
P1	-	چین	D16405
M22710	-	ژاپن	AJ006988
Y	-	ژاپن	M22710
HL	-	ژاپن	D12499
CS	-	ژاپن	AB049568
yunyan 87	<i>Nicotiana tabacum</i>	چین	D28489
DI1	-	ایران	JF327832
GI1	خیار	ایران	DQ002876
FI2	کدو	ایران	DQ002885
FI3	کدو	ایران	DQ002884
HC210	-	چین	DQ002883
			X65017

ادامه جدول 1

ND2	<i>Petunia hybrida</i>	چین	EU414786
CA	<i>Arachis hypogaea</i>	هلند	AY429432
LW	توتون	چین	EU414784
VAL90	گوچه فرنگی	اسپانیا	AJ829779
PI-1	گوچه فرنگی	اسپانیا	AM183116
Tfn	گوچه فرنگی	ایتالیا	Y10886
BAR92	گوچه فرنگی	اسپانیا	AJ829778
Oahu	موز	آمریکا	U31220
Ixora	گوچه فرنگی	آمریکا	U20219
HB3	لفل	چین	FJ788416
Bal-In	خریزه	هندوستان	JF279609
Ch-Ada	<i>Capsicum annuum</i>	هندوستان	FJ168035
CP25	<i>Physalis minima</i>	هندوستان	X89652
Lucknow	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	هندوستان	EF153733
L	<i>Hyoscyamus muticus</i>	هندوستان	AF350450
Palampur	<i>Cucumis sativus</i>	هندوستان	HE583224
Tsh	گوچه فرنگی	چین	EF202597
PF	سیب زمینی	ژاپن	AB368501
S	-	آمریکا	AF063610
LS	-	آمریکا	AF127976
WicDS	<i>Lonicera caprifolium</i>	لهستان	EU191027
C2	<i>Cucurbita pepo</i>	لهستان	HM480051
DKRD	<i>Spinacia oleracea</i>	آمریکا	U10922
Ta-alth	<i>Althaea officinalis</i>	ایران	JX219970

### بحث

جدایه‌ها قابل مشاهده است (سخندان و همکاران 2008) که چنین علائمی در گیاه ختمی نیز قابل مشاهده بود (شکل 1). با این وجود، این ویروس دامنه گسترده‌ای از علائم را روی میزبان‌های مختلف ایجاد می‌کند (سخندان و همکاران 2006). تفاوت و گستردگی علائم می‌تواند از عوامل زیادی ناشی شده باشد. یکی از این عوامل آلودگی هم‌زمان و مخلوط این ویروس با سایر ویروس‌ها می‌باشد که در برخی از موارد سبب تشدید علائم و یا کاهش آن می‌شود (سخندان و همکاران 2006، 2008). نتایج آزمون الایزا و

به دلیل اهمیت گیاهان دارویی و فراورده‌های آن‌ها، شناسایی بیمارگرهای آن‌ها مانند ویروس‌ها در پرورش و تولید این نوع از گیاهان امری ضروری به نظر می‌رسد، زیرا ممکن است عوامل بیماری‌زا اثر محدودکننده رشد و تغییر ترکیبات و خواص فراورده‌های این نوع از گیاهان را به دنبال داشته باشند. علائم ایجادشده توسط جدایه‌های مختلف CMV دامنه بسیار وسیعی دارد. برخی از علائم ایجادشده توسط CMV مانند موزاییک تقریباً در همه



جدایه‌ها استفاده کرده‌اند (ریزوس و همکاران 1992، سخندان و همکاران 1997). وجود دو باند مجزا نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی مخلوط احتمالی با زیر گروه II می‌باشد. مشخص نمودن زیرگروه‌های CMV برای شناسایی و فهم واگیری ویروس امر مهم و ضروری به نظر می‌رسد (یو و همکاران 2005). همچنین ردیابی جدایه‌های CMV و ارزیابی تنوع ژنتیکی آن‌ها مرحله مهمی در کنترل ویروس، به‌ویژه در استفاده از مهندسی ژنتیک می‌باشد (لین و همکاران 2003).

مطالعه‌های تبارزایی جدایه‌های CMV ردیابی شده از ایران نشان داده است که این جدایه‌ها در زیرگروه IA قرار می‌گیرند اما این تحقیق نشان داد که جدایه Ta-alth در زیرگروه IB قرار می‌گیرد (شکل 4). نتایج بررسی‌های پیشین نشان می‌دهند که جدایه‌های CMV متعلق به زیرگروه I بر اساس منشا به دو زیرگروه تقسیم می‌شوند به طوری که جدایه‌های متعلق به زیرگروه IB تنها در آسیا دیده می‌شوند و زیرگروه IA در همه مناطق وجود دارد (پالوکایتیس و زایتیلین 1997). با این وجود سایر مطالعه‌ها نشان داد، جدایه‌هایی از آمریکا و اروپا نیز در زیرگروه IB قرار می‌گیرند، اما فراوانی کمتری نسبت به نمونه‌های آسیایی دارند. در درخت تبارزایی رسم شده در تحقیق حاضر نیز، چهار خوشه مجزا در زیرگروه IB وجود دارند که یک خوشه شامل پنج جدایه از هندوستان و یک جدایه با قرابت کمتر از چین بود (شکل 4). همان‌طور که در جدول 1 نشان داده شده است میزبان‌های جدایه‌های قرارگرفته در این خوشه متنوع می‌باشند و شامل کدوئیان و غیرکدوئیان می‌شود. این امر نشان می‌دهد که جدایه‌های متعلق به زیرگروه II دارای تنوع بالایی میزبانی می‌باشند که می‌توانند کدوئیان و غیرکدوئیان را آلوده نمایند. جدایه تعیین توالی شده ختمی (Ta-alth) نیز به همراه جدایه‌های هندوستان در این خوشه قرار گرفتند. همان‌طور که قبلاً بیان شد نمونه‌هایی از آمریکا و اروپا نیز در خوشه‌های مجزا در زیرگروه IB جای دارند. احتمالاً گونه میزبان در پیدایش زیرگروه‌های متفاوت CMV نقش دارد، زیرا نمونه-

دیا نشان داد که جدایه موردنظر متعلق به زیرگروه I ویروس موزاییک خیار می‌باشد. گونه‌های میزبانی احتمالاً عوامل مهم در پیدایش زیرگروه‌های متفاوت CMV هستند، طوری که اکثر جدایه‌های گزارش شده از کدوئیان متعلق به زیرگروه I می‌باشند. در این مطالعه، برای گروه‌بندی سرولوژیکی، از روش TAS-ELISA استفاده شد که از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای به عنوان آنتی‌بادی اولیه و از آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای (ویژه زیرگروه I) به عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده گردید. آنتی‌بادی‌های چندهمسانه‌ای، به دلیل این‌که در مقابل اپی‌توب‌های مشترک بین دو زیرگروه واکنش می‌دهند، برای تمایز جدایه‌های متعلق به دو زیرگروه مناسب نمی‌باشند. به‌کارگیری آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای (پوشش داده شده به چاهک) در TAS-ELISA، این روش را برای تمایز سرولوژیکی جدایه‌های متنوع CMV مناسب می‌سازد. استفاده از روش‌های سرولوژیکی برای ردیابی و تعیین زیرگروه‌های CMV عاری از مشکل نبوده و همچنین قادر به تفکیک زیرگروه IA و IB نمی‌باشد. برای رفع این مشکل، در این بررسی از روش حساس‌تر RT-PCR برای ردیابی و در نهایت تعیین نوع زیرگروه استفاده شد. همان‌طور که اشاره گردید علاوه بر کاربرد RT-PCR برای ردیابی، کارهای بعدی از قبیل تعیین توالی نوکلئوتیدی و همسانه‌سازی و بررسی‌های برش آنزیمی (RFLP) (ریزوس و همکاران 1992) نیز به‌عنوان دیگر اهداف کاربرد این فن‌آوری مدنظر بود. PCR به تنهایی با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده نمی‌تواند برای گروه‌بندی جدایه‌های این ویروس کمک کند، زیرا این آغازگرها بر اساس مناطقی از ژنوم ویروس طراحی شده‌اند که در تمامی جدایه‌های این ویروس مشابه هستند. در همین رابطه، برای گروه‌بندی جدایه مورد مطالعه برش آنزیمی با استفاده از *MspI* روی قطعه DNA تکثیر یافته با PCR انجام گرفت و نشان داد که جدایه موردنظر به زیرگروه I تعلق دارد. زیرا در این تجزیه تحلیل دو قطعه به اندازه‌های 400 جفت باز و حدود 220 جفت باز حاصل شدند. سایر محققین نیز از این روش برای گروه‌بندی

در این تحقیق، ویروس موزاییک خیار برای اولین بار از گیاه دارویی ختمی ردیابی و شناسایی شد. پس از همسانه‌سازی و تعیین توالی ناحیه ژنی پروتئین پوششی، تعلق آن به زیرگروه IB ویروس موزاییک خیار تایید شد که با جدایه‌های هندوستان و جدایه‌ای از چین در یک‌خوشه قرار گرفت.

هایی که قبلاً از منطقه مورد مطالعه ردیابی شده‌اند بیشتر از میزبان‌های کدوئیان بوده و متعلق به زیرگروه IA هستند. از طرف دیگر، اکثر نمونه‌هایی که در زیرگروه IB قرار گرفته‌اند از میزبان‌هایی به‌جز کدوئیان جداسازی شده‌اند.

## منابع

- Ball EM, 1990. Agar double diffusion plates (Ouchterlony): Viruses. Pp. 111-120 In: Hampton R, Ball E and DeBoer S (eds). Serological Methods for Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, A Laboratory Manual. APS Press, Minnesota.
- Bonnet J, Fraile A, Sacristán S, Malpica JM and García-Arenal F, 2005. Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus. *Virology* 332: 359-368.
- Clark MF and Adams AN, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Davino M, Bellardi MG, Di Bella M, Davino S and Bertaccini A, 2005. Characterization of a *Cucumber mosaic virus* isolate infecting *Mandevilla sanderi* (Hemsl.) Woodson. *Phytopathologia Mediterranea* 44: 220-225.
- Davino S, Panno S, Rangel AE, Davino M, Bellardi GM and Rubio L, 2012. Population genetics of cucumber mosaic virus infecting medicinal, aromatic and ornamental plants from northern Italy. *Archives of Virology* 157: 739-745.
- Escriu F, Fraile A and García-Arenal F, 2003. The evolution of virulence in a plant virus. *Evolution* 57(4): 755-765.
- Gallitelli D, 2000. The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Research* 71: 9-21.
- Jukes, TH and Cantor CR, 1969. Evolution of protein molecules. Pp. 21-123. In: Munro HN, (ed.). Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York.
- Khetarpel RK and Kumar CA, 1995. ELISA methodology. Pp. 329-341. In: Singh PR, Singh SU (eds.). *Molecular Methods in Plant Pathology*, Lewis Publishers, Boca Raton.
- Lin HX, Rubio L, Smythe A, Jiminez, M and Falk BW, 2003. Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology* 84: 249-258
- Palukaitis P, and Zaitilin M 1997. Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Advance Virus Research* 48: 349-377.
- Rizos H, Gunn LV, Pares RD and Gillings MR, 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73: 2099-2103.
- Rowhani A, Chay C, Golino DA and Falk BW, 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology* 83: 749-758.
- Sambrook J and Russel DW, 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual (Vol3)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sokhandan NB, Gillings MR and Bowyer JW, 1997. Polymerase chain reaction detection and assessment of genetic variation in New South Wales isolates of passionfruit woodiness potyvirus. *Australasian Plant Pathology* 26: 155-164.
- Sokhandan NB, Kalhor MR and Nourinejad SZ, 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes* 32: 277-288.

- Sokhandan, NB, Nematollahi S and Torabi E, 2008. Cucumber mosaic virus subgroup IA frequently occurs in the northwest Iran. *Acta Virologica* 52: 237-242.
- Sutovska M, Nosalova G, Sutovsky J, Franova S, Prisenznakova L and Capek P, 2009. Possible mechanisms of dose-dependent cough suppressive effect of *Althaea officinalis* hamnogalacturonan in Guinea pigs test system. *International Journal of Biological Macromolecules* 45: 27-32.
- Van de Peer Y and Wachter RD, 1997. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Bioinformatics* 13: 227-230.
- Yu C, Wu J and Zhou X, 2005. Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 123: 155-161.

## Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of *Cucumber Mosaic Virus* IB Subgroup from *Althaea officinalis*

D Koolivand<sup>1\*</sup>, N Sokhandan Bashir<sup>2</sup> and S Nematolahi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PhD Student of Plant Pathology, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azad Islamic University of Tabriz, Tabriz Branch, Tabriz, Iran

\*Corresponding author: [D.koolivand@gmail.com](mailto:D.koolivand@gmail.com)

Received: 13Aug 2012

Accepted: 12 Des 2012

### Abstract

*Cucumber mosaic virus* (CMV) belongs to the genus *Cucumovirus* in the family *Bromoviridae*. *Althaea officinalis*, commonly known as hollyhocks in the family Malvaceae, is an annual plant whose fruit, flower and root are used as medicinal products. In this study, five samples of hollyhocks leaves with viral symptoms were collected and CMV was detected using DAS-ELISA from the samples. Ta-alth isolate was selected and total RNA extracted. The PCR reaction was performed using CMV-CPF and CMV-CPR primer pair corresponding to the CP region of CMV and as a result, a 675 bp band was amplified. The amplified fragment inserted into pTZ57R/T and transformed into competent cells of *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . Extracted recombinant plasmid was analyzed by restriction analysis then sequencing. The GeneDoc was used to compare the generated CP sequence with the counterpart segment of previously reported CMV isolates from Iran and other parts of the world available in GenBank. A phylogenetic tree was generated with Neighbor-Joining (NJ) method in TREECON program which showed that the Ta-alth isolate belonged to subgroup IB of CMV. This is the first report of CMV from *Althaea officinalis* in Iran.

**Keywords:** Cloning, Phylogeny, *Althaea officinalis*, *Cucumber mosaic virus*