

بررسی تبارزایی دو جدایه‌ی ایرانی ویروس موزاییک رگه‌ای گندم (Wheat streak mosaic virus)

بر اساس ناحیه‌ی کد کننده‌ی پروتئیناز NIa-Pro

سیده عاطفه حسینی^{۱*} و خدیجه سالاری^۲

۱- استادیار بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.

۲- مربی بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت.

* مسئول مکاتبه ahosseini@birjand.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۰۷

چکیده

ویروس موزاییک رگه‌ای گندم (*Wheat streak mosaic virus* (WSMV) از ویروس‌های خسارت زای غلات مربوط به خانواده *Potyviridae* و جنس *Tritimovirus* است. در این تحقیق، NIa-Pro که یکی از مهم‌ترین پروتئینازهای این ویروس می‌باشد، مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور ۱۱۶ نمونه‌ی علائم‌دار گندم از مزارع خراسان شمالی، خراسان جنوبی و آذربایجان غربی جمع‌آوری و به منظور شناسایی اولیه، کلیه‌ی نمونه‌ها با آزمون الایزا آزمایش گردیدند و تعداد ۱۰ نمونه در مقابل آنتی بادی اختصاصی WSMV واکنش مثبت نشان دادند. این ۱۰ نمونه مثبت در گلخانه روی گیاه گندم تکثیر و با آغازگر اختصاصی مربوط به توالی کامل NIa-Pro در آزمون RT-PCR سنجش شده و قطعه‌ای به طول ۷۳۲ جفت باز تکثیر گردید. سپس دو جدایه متفاوت از نظر جغرافیایی مربوط به آذربایجان غربی و خراسان شمالی، همسانه سازی و تعیین ترادف شد. در مقایسه‌ی ترادف‌های به دست آمده در این تحقیق با ترادف‌های موجود در ژن بانک، دو گروه تشکیل شد. جدایه‌های ایرانی مربوط به این مطالعه در گروه یک، زیر گروه IB و مجزا از جدایه‌های اروپایی و جدایه ایرانی که در تحقیقات پیشین تعیین توالی شده بود و نزدیک به جدایه آمریکایی (NC-001886)، بودند قرار گرفتند. بررسی مکان‌های برشی در ژن NIa-Pro نشان داد که مناطق برش، در این پروتئین حفاظت شده است، جایگزینی تعدادی اسید آمینه در مکان‌های حفاظت شده نظیر توالی GKSH در محل ۱۲۴-۱۲۱، A/T در جایگاه ۱۵۴ و گلوتامین با آلانین در جایگاه ۲۰۸ در جدایه‌های ایرانی مشهود بود. تحقیق حاضر اولین بررسی جدایه‌های ایرانی در ناحیه‌ی کد کننده مذکور می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: الایزا، غلات، واکنش زنجیره‌ای پلیمران، تبارزایی.

مقدمه

وارد شده است (سانچز-سانچز و همکاران ۲۰۰۱). این ویروس از اعضای خانواده *Potyviridae* با ژنوم RNA تک لا، رشته‌ای و تک بخشی به اندازه ۹۳۳۹-۹۳۸۳ نوکلئوتید است (استنجر و همکاران ۱۹۹۸). ژنوم یک بخشی، دارای یک ORF بزرگ (۵'-P1/HC/P3/6K1/CI/6K2/VPg/NIa-Pro/NIb/CP-3') و یک ORF کوچک‌تر در ناحیه PIPO که در درون P3 قرار گرفته و به طور مستقل بیان می‌گردد، می‌باشد (چانگ و همکاران ۲۰۰۸). این گونه تا سال ۱۹۹۸ در جنس *Rymovirus* طبقه بندی می‌شد، ولی با تعیین توالی کامل

حدود ۵۰ ویروس گیاهی مختلف می‌توانند گندم و جو را آلوده کنند که یکی از مهم‌ترین آنها ویروس موزاییک رگه‌ای گندم (WSMV)^۱ است که موجب خسارت زیادی در تولید غلات در بسیاری مناطق دنیا می‌گردد. این ویروس اولین بار در سال ۱۹۳۷ شناسایی گردید (مک کینی ۱۹۳۷) و ظاهراً در دهه ۱۸۰۰ از ترکیه وارد ایران (باروس و همکاران ۲۰۰۹) و سپس به کانادا و مکزیک

^۱Wheat streak mosaic virus

۲۰۰۲). همچنین معصومی و همکاران به بررسی ترادف نوکلئوتیدی انتهای ۳' ژنوم ویروس پرداختند و نتیجه گرفتند که جدایه‌های ایرانی دارای جد مشترک بوده ولی به دلیل تفاوت جغرافیایی جدایه‌ها در دو مسیر تکامل قرار گرفته اند (معصومی و همکاران ۱۳۸۵). بررسی نقش توالی N1a-Pro، پروتئین پوششی و پلی پروتئین در تبار زایی پوتی ویروس نشان داد که N1a-Pro ناحیه‌ای حفاظت شده است و درختی کم و بیش مشابه با درخت رسم شده بر اساس توالی‌های پلی پروتئین ویروس ایجاد می‌کند (تاتیتی و همکاران ۲۰۱۰). همچنین تعیین توالی کامل ویروس ابلقی جو دو سر که یک *Tritimovirus* بسیار نزدیک به ویروس موزاییک رگه‌ای گندم است نشان داد که ناحیه N1a-Pro حفاظت شده بوده و مناسب برای تبارزایی است (استنجر و فرنچ ۲۰۰۹).

بنابر اهمیت این ناحیه ژنی در تبارزایی و پردازش پلی پروتئین، در تحقیق حاضر به بررسی بیشتر آن و همچنین و تغییرات احتمالی آن در جدایه‌های ایرانی مربوط به دو منطقه‌ی جغرافیایی متفاوت، پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه برداری و ردیابی ویروس

از اسفندماه تا فروردین‌ماه سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ از مزارع گندم استان‌های خراسان شمالی، خراسان جنوبی و آذربایجان غربی تعداد ۱۱۶ نمونه‌ی گندم از بوته‌های دارای علائم موزاییک خطی و کوتولگی برداشته شد. ردیابی ابتدایی ویروس موزاییک رگه‌ای گندم با آزمون سرولوژیکی الایزای ساندویچی^۱ و آنتی بادی پلی‌کلونال تهیه شده از شرکت DSMZ آلمان انجام شد (کلارک و آدامز ۱۹۹۷). شاهد مثبت از شرکت بیوربا تهیه گردید. نمونه‌های دارای جذب نوری سه برابر جذب شاهد منفی که با دستگاه الایزا خوان اندازه‌گیری شدند، به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شدند.

نوکلئوتیدی و بررسی تبارزایی در گروهی مجزا از گونه‌های *Rymovirus* و به جنس *Tritimovirus* منتقل گردید (رابنستین و همکاران ۲۰۰۲). علائم این ویروس در انتهای فصل به صورت زردی شدید، کلروز و شکستگی کلروفیل، نکروز و مرگ گیاه است و در پاییز نسبت به بهار شدت بیشتری دارد (ماتیوس و همکاران ۱۹۹۴؛ ورکنه و همکاران ۲۰۰۹) این ویروس در ایران توسط فولاد و همکاران (۱۹۸۶) گزارش و معصومی و همکاران (۲۰۰۱) میزان خسارت آن را در استان فارس برآورد کردند. همچنین ویروس مذکور با روش‌های سرولوژیک و مولکولی از استان گلستان و خراسان شمالی ردیابی شده است (خدیور و همکاران ۱۳۸۸، رضایی و همکاران ۱۳۸۸). همانطور که اشاره شد، ویروس موزاییک رگه‌ای به پلی پروتئینی بزرگ ترجمه می‌شود و با سه پروتئیناز HC، P1 و N1a-Pro به پروتئین‌های عملکردی تبدیل می‌گردد (استنجر و همکاران ۲۰۰۲) دو پروتئین P1 و HC-pro تنها یک واکنش پروتئولیتیکی را در انتهای کربوکسیلی پلی پروتئین انجام می‌دهند. پروتئیناز N1a با پروتئیناز 3C پیکورناویروس‌ها مشابه و ساختاری شبیه به پروتئیناز نوع سرین دارد ولی در جایگاه فعال برش، دارای اسید آمینه سیستئین به جای سرین می‌باشد (ژیبور و همکاران ۲۰۰۳). N1a-Pro هفت تا از ده پروتئین خانواده پوتی ویریده را در جهت سیس و ترانس برش می‌دهد و چهار جایگاه برش، شامل هیستیدین، آسپاراتیک اسید، سیستئین و هیستیدین دارد که در تمامی جنس‌ها حفاظت شده می‌باشد (آدامز و همکاران ۲۰۰۵). این ناحیه ژنی با RNA پلیمرز وابسته به RNA نیز برهمکنش داده و در تکثیر RNA نقش دارد. هر گونه تغییر در جایگاه‌های برش، منجر به تغییر فعالیت پروتئینازی می‌گردد (آدامز ۲۰۰۵) در بررسی تبارزایی این ویروس، یک جدایه‌ی ایرانی در مقایسه با جدایه‌های دنیا بر مبنای پروتئین پوششی مورد بررسی قرار گرفتند که چهار گروه تشکیل دادند بطوری که جدایه‌ی ایرانی در گروهی مجزا از جدایه‌های مکزیکی، اروپا، روسیه و آمریکا قرار گرفت (استنجر و همکاران

¹Double antibody sandwich-ELISA (DAS-ELISA)

ب) مطالعات گلخانه‌ای

cDNA واکنش زنجیره ای پلی مرز انجام شد. در این واکنش از آغازگر مستقیم (WS-F1:5'-3' GAGAACAAATCAACCTTTGAA) و پس سو (WS-R1: 5'-CCACAATATTTTGTTCATCTG-3') مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن رمز کننده N1a-Pro که با نرم افزار (Vector NTI11 (Invitrogen, USA) طراحی شده بود، استفاده شد. آزمون PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل یک میکرولیتر cDNA به غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر (با نانودراپ مدل Thermo 2000 اندازه گیری شد)، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها به غلظت ۱۰ پیکومول، ۱/۲ میکرولیتر از بافر $MgCl_2$ (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتید تری فسفات ها (dNTPs) (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *Taq DNA Polymerase* (Fermentas, Lithuania) به غلظت پنج واحد در میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱۷/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام گرفت. در برنامه دمایی واکنش زنجیره ای پلیمرز ابتدا یک مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت سه دقیقه در ۹۴ درجه‌ی سانتیگراد، ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشت سازی ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتیگراد، اتصال ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتیگراد و گسترش ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد و در انتها برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد انجام گرفت. در نهایت محصولات PCR به طول ۷۳۲ جفت باز، در ژل آگاروز یک در صد، الکتروفورز شد.

د) همسانه‌سازی و تعیین توالی ژن

برای همسانه‌سازی ناحیه N1a-Pro، محصول PCR دو جدایه از استان خراسان شمالی و آذربایجان غربی، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند. محصولات PCR موردنظر، از روی ژل بریده شدند و با استفاده از کیت *SV Gel and Clean-up System Wizard®* PCR خالص سازی گردیدند. به منظور قرار دادن قطعه DNA درون حامل، از کیت *pGEM-T Easy Vector*

پس از جمع آوری و انتقال نمونه‌ها از مزارع غلات به آزمایشگاه، از میان نمونه‌هایی که وجود ویروس در آنها با استفاده از آزمون الایزا ثابت شده بود، پنج جدایه مربوط به استان آذربایجان غربی و پنج جدایه مربوط به استان خراسان جنوبی انتخاب و به روش مکانیکی بر روی گندم برابر با هفت، در pH تکثیر و با بافر فسفات ۰/۱ مولار و مرحله ی سه برگی مایه زنی شد. این گیاهان در شرایط گلخانه‌ای، در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد و ۱۲ ساعت نورنگهداری و هر روز آبیاری گردید و با محلول هوگلند به منظور رشد بهتر محلول پاشی گردید. علائم روی گیاهان گندم مایه زنی شده، پس از دو هفته بررسی شد.

ج) ردیابی جدایه‌های ویروس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرز - نسخه برداری معکوس

ده جدایه از ویروس که در آزمون الایزا مثبت بود در گلخانه تکثیر گردیدند، RNA کل با استفاده از کیت *SV Total RNA Isolation System* (Promega, USA) براساس دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج و در آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی WSMV (طراحی شده در این تحقیق) مربوط به ناحیه N1a-Pro مورد بررسی قرار گرفت. برای ساخت DNA مکمل، ۲/۵ میکرولیتر RNA کل، ۲/۵ میکرولیتر آغازگر معکوس WS-R1 (10µM) که با نرم افزار (Invitrogene, USA) طراحی گردید و توالی آن در ادامه آمده است و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به لوله‌ها اضافه و پس از ۱ دقیقه در دمای ۹۵°C، بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد. سپس مقدار چهار میکرولیتر بافر RT (5x)، دو میکرولیتر مخلوط dNTPs (10µM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه برداری معکوس M-MuLV (۱۰µL، RNase inhibitor)، نیم میکرولیتر *200U/Fermentase* (40U/µL) به لوله‌ها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲°C قرار داده شد. توقف واکنش با قرار دادن مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام گرفت. بعد از تهیه

ویروس مذکور در هیچ یک از نمونه‌های مربوط به استان خراسان جنوبی، ردیابی نشد (جدول ۱).

ب) مطالعات گلخانه‌ای

علائم ایجاد شده توسط ۱۰ جدایه مایه‌زنی شده بر روی گندم در شرایط گلخانه به صورت موزاییک شدید، خطی شدن سطح برگ و کلروز مشاهده گردید (شکل ۱). هیچ تفاوت مشخصی بین علائم مربوط به جدایه‌های مختلف مشاهده نگردید.

ج) واکنش زنجیره ای پلیمرز، همسانه سازی و

تعیین ترادف جدایه‌های ویروس موزاییک رگه‌ای گندم به منظور شناسایی ویروس موزاییک رگه‌ای گندم در ده نمونه‌ی مثبت در الیزا، از یک جفت آغازگر اختصاصی WS-F1/WS-R1 استفاده و قطعه‌ای به طول ۷۳۲ جفت باز در تمامی آنها تکثیر گردید. به منظور مطالعات تبارزایی، دو جدایه از ویروس موزاییک رگه‌ای گندم به نام‌های AH10 (رس شمار KX398590) و AH11 (رس شمار KX398591) از مزارع استان‌های آذربایجان غربی (ارومیه) و خراسان شمالی (شیروان) از گندم جمع آوری و تعیین توالی شد. دلیل انتخاب این دو جدایه، تفاوت در منطقه‌ی جغرافیایی و بررسی ارتباط آن با تبارزایی ویروس بود اگر چه علائم هر دو جدایه در گلخانه یکسان بود. در ابتدا توالی به طول ۸۵۰ جفت باز به دست آمد که پس از حذف توالی‌های مربوط به پلاسمید، ۷۳۲ نوکلئوتید مربوط به NIa-Pro باقی ماند.

د) آنالیزهای تبارزایی

جستجوی صورت گرفته در پایگاه Blast نشان از آلودگی هر دو جدایه تعیین توالی شده در این تحقیق به ویروس موزاییک رگه‌ای گندم داشت. در درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس ژن NIa-Pro دو جدایه‌ی ایرانی ویروس موزاییک رگه‌ای گندم در مقایسه با جدایه‌های دنیا، دو گروه تشکیل شد. گروه یک شامل دو زیر گروه است.

(Promega, USA) و باکتری *Escherchia. coli* سویه MC601 استفاده گردید. برای هر جدایه‌ی ایرانی، دو پرگنه‌ی نو ترکیب انتخاب و پلاسمید آن جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. توالی بدست آمده در مورد دو جدایه AH10 و AH11 انتخاب و سپس ترادف‌های جانبی مربوط به قسمتی از ناقل، با استفاده از نرم افزار (Invitrogen USA,) Vector NTI 11 (لو و موری یاما ۲۰۰۴) حذف و ترادف‌های ویرایش شده به شکل فایل‌های با فرمت Fasta و Text آماده شد. به منظور تایید کامل وجود جدایه‌های این ویروس و همچنین بررسی جایگاه تبارزایی آنها در مقایسه با جدایه‌های دنیا، توالی‌های حاصل با استفاده از ابزار BLAST در پایگاه NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih>) مشابهت یابی شد. پس از به دست آوردن میزان همولوژی، قطعه ۷۳۲ جفت بازی مربوط به ژن NIa-Pro کامل، توسط نرم افزار NTI 11 هم‌ردیف سازی و به منظور بررسی رابطه‌ی تبارزایی جدایه‌های مورد مطالعه، درخت مربوط به آن با روش Maximum likelihood توسط نرم افزار MEGA 6 (تامورا و همکاران ۲۰۱۳) ترسیم شد. سپس مجموعه‌ی داده‌های هم‌ردیف شده برای مقایسه درصد همولوژی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای توسط برنامه MegAlign (کلولی و آرنولد ۱۹۹۶) مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

الف) ردیابی ویروس با روش الیزا

در مجموع ۱۱۶ نمونه‌ی علائم‌دار گندم از مزارع خراسان شمالی (۵۰ نمونه)، خراسان جنوبی (۲۴ نمونه) و آذربایجان غربی (۴۲ نمونه) جمع آوری گردید. شناسایی اولیه‌ی نمونه‌ها با آزمون الیزا صورت گرفت. تعداد ۱۰ نمونه (پنج نمونه مربوط به خراسان شمالی و پنج نمونه مربوط به آذربایجان غربی) در مقابل آنتی بادی اختصاصی WSMV واکنش مثبت نشان دادند. آلودگی در نمونه‌های گندم مورد بررسی در استان آذربایجان غربی و خراسان شمالی به ترتیب ۱۲ و ۱۰ درصد برآورد گردید و

می‌دهند. گروه یک مربوط به سه جدایه از مکزیک، گروه دو جدایه‌های اروپایی، گروه سه جدایه‌ای از ایران و گروه چهار جدایه‌های آمریکا و ترکیه است. نتایج حاصل از تبارزایی بر مبنای ناحیه NIA-Pro در این تحقیق، بسیار نزدیک با نتایج حاصل از تبارزایی بر مبنای پروتئین پوششی بود و این مطلب نشان دهنده این است که تکامل این دو ژن به موازات یکدیگر صورت می‌گیرد (نیشیگاوا و همکاران ۲۰۰۸). جدایه‌های ایرانی بررسی شده در این تحقیق و جدایه سعادت شهر (EU914918) بر مبنای NIA-Pro در دو گروه تبارزایی مجزا قرار گرفتند و شباهت نوکلئوتیدی ۹۱ درصدی داشتند. جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق بیشترین شباهت را با جدایه آمریکایی (NC-001886) به میزان ۹۴ درصد نشان دادند و در گروه ۱ قرار گرفتند و تشکیل یک گروه مونوفیلیتیک دادند (شکل ۲)، بنابراین جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق، مسیر تکاملی متفاوتی در مقایسه با جدایه سعادت شهر که با جدایه‌های اروپا در یک گروه قرار گرفته، دارند و احتمالاً جدایه‌های ایرانی در این ناحیه ژنی، پلی فیلیتیک می‌باشند (استنجر و فرنچ ۲۰۰۹). در بررسی‌های معصومی و همکاران (۱۳۸۵)، نیز مشخص شد که جدایه‌های ایرانی دارای دو خط سیر تکاملی یکی در شمال غرب و دیگری در فلات مرکزی و جنوبی ایران می‌باشند، اما تمامی جدایه‌ها از جد مشترکی در منطقه هلال حاصلخیز منشا گرفته‌اند و به دلیل جدایی جغرافیایی در دو مسیر تکاملی واگرا شده‌اند که نتایج این تحقیق نیز موید این مطلب است، به طوریکه ناحیه NIA-Pro نیز متمایز کننده جدایه‌ها بر اساس تفاوت مکان جغرافیایی (شکل ۲) بوده است بطوریکه AH10 و AH11 از مناطق شمالی ایران (خراسان شمالی و آذربایجان غربی) و EU914918 از مناطق مرکز و جنوب ایران در دو گروه مجزا واقع شده‌اند. دو جدایه بررسی شده در این تحقیق کمترین شباهت را با جدایه آلمانی (HG810954) به میزان ۸۸ درصد نشان داد (شکل ۳). پروتئین NIA-Pro در حال حاضر به عنوان پروتئاز سیستئین که مرتبط به پروتئاز 3C می‌باشد طبقه

در زیرگروه 1A، جدایه‌هایی از آمریکا و ترکیه و در زیر گروه 1B جدایه‌های ایرانی (AH10-AH11) مطالعه شده در این تحقیق قرار گرفت. گروه دو نیز شامل دو زیر گروه می‌باشد. در زیر گروه 2A، یک جدایه از ایران و در زیر گروه 2B، سه جدایه اروپایی مربوط به چک، آلمان و اتریش قرار گرفت (شکل ۲).

بحث

بر اساس نتایج آزمون الیاز، از تعداد ۹۲ نمونه گندم جمع آوری شده از دو استان خراسان شمالی و آذربایجان غربی، ۵ نمونه از مجموع ۵۰ نمونه جمع‌آوری شده از استان خراسان شمالی و ۵ نمونه از مجموع ۴۲ نمونه جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی آلوده به WSMV بودند. علیرغم اهمیت گندم در استان خراسان جنوبی، WSMV در نمونه‌های مربوط به این استان با روش‌های سرولوژیک و مولکولی ردیابی نگردید. دلیل آن می‌تواند مقاومت ارقام به کنه ناقل، ویروس و یا عدم مساعد بودن شرایط آب و هوایی برای ناقل یا ویروس باشد (خدیور و نصراله نژاد ۱۳۸۸). اگر چه روش‌های سرولوژیک نظیر الیاز، رایج‌ترین روش ردیابی و شناسایی ویروس‌ها می‌باشد، اما گاهی امکان خطا در ردیابی سرولوژیک ویروس به دلایلی نظیر اتصال غیر اختصاصی و یا واکنش سرولوژیک تقاطعی وجود دارد. به منظور اجتناب از این اشکال، روش RT-PCR به دلیل حساسیت بالاتر استفاده گردید (پرایس و همکاران ۲۰۱۰). تعیین توالی نواحی تکثیر شده در RT-PCR، علاوه بر تایید قطعی آلودگی ویروس، همراه با پوشش پروتئینی،^۱ CI و^۲ Nib در تبارزایی ویروس‌های خانواده پتی ویریده به کار می‌رود (تاتینایی و همکاران ۲۰۱۰). در مطالعات استنجر و همکاران (۲۰۰۹ و ۲۰۰۲) و رابناستن و همکاران (۲۰۰۲) که به بررسی تبارزایی جدایه‌های WSMV بر اساس ژن پروتئین پوششی پرداخته شده، جدایه‌های دنیا، تشکیل چهار گروه

^۱Cylindrical Inclusion

^۲Nuclear inclusion b

در محل ۱۲۴-۱۲۰ یا A/T در جایگاه ۱۵۴ جدایه‌های ایرانی دیده می‌شود (جدول ۲). همچنین جایگزینی گلوتامین با آلانین در جایگاه ۲۰۸ که یک مکان برش داخلی برای جداسازی این پروتئین از Nib/CP است (آدامز و همکاران ۲۰۰۵) دیده می‌شود که بیانگر این است که اگر چه NIA-Pro بسیار اختصاصی عمل می‌کند، اما هر گونه جایگزینی در اسید آمینه‌ها در مکان‌های برشی آن ممکن است منجر به تغییر ساختار ثانویه و کاهش میزان برش گردد (کاپوست و همکاران ۲۰۰۲). تحقیق حاضر اولین بررسی مولکولی ژن NIA-Pro در جدایه‌های ایرانی است.

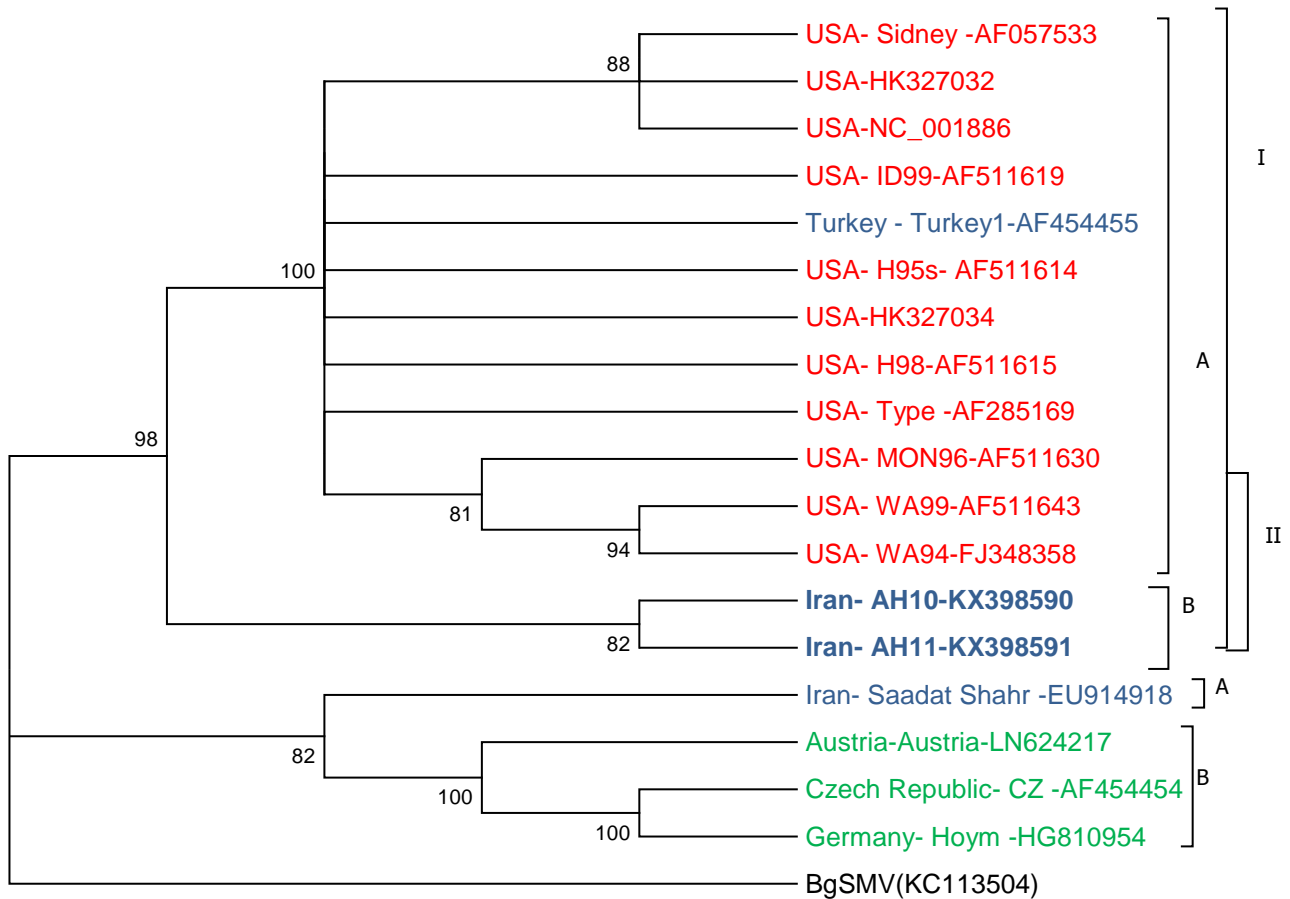
بندی می‌شود (ژیبور و همکاران ۲۰۰۳) که سبب برش بین 6K1/CI، 6K2/VPg و CI/6K2 شده و خودش نیز از ناحیه Nib-CP برش می‌خورد. چهار جایگاه فعال به صورت هیستیدین، آسپاراژین، سیستئین و هیستیدین با توالی Gly-X-Cyc-Gly در پروتئین NIA-Pro جدایه‌های ایرانی دیده می‌شود (شکل ۳) که در سایر جدایه‌های دنیا نیز وجود دارد و ظاهراً در تمامی اعضای خانواده پوتی ویریده به عنوان نواحی برشی این ویروس شناخته می‌شود (آدامز و همکاران ۲۰۰۵). البته جایگزینی تعدادی اسید آمینه در مکان‌های حفاظت شده مثلاً توالی GKSH

جدول ۱- مناطق نمونه برداری، تعداد نمونه و درصد آلودگی در نمونه‌های گندم بررسی شده با آزمون الیزا.

استان نمونه برداری	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده	درصد آلودگی در نمونه‌ها
خراسان شمالی (شیروان-فاروج)	۵۰	۵	۱۰
آذربایجان غربی (پیرانشهر-ارومیه)	۴۲	۵	۱۲
خراسان جنوبی (سربیشه-خوسف)	۲۴	۰	۰
تعداد کل	۱۱۶	۱۰/۱۱۶	۸/۶



شکل ۱- نمونه اول از سمت چپ نمونه سالم و سایر نمونه‌ها، نمونه‌های آلوده مایه زنی شده با ویروس موزاییک رگه‌ای گندم در گلخانه.



شکل ۲ - درخت فیلوژنتیک رسم شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن **N1a-Pro** از جدایه های ایرانی ویروس موزائیک رگه‌ای گندم و جدایه‌های موجود در ژن بانک با استفاده از نرم افزار **MEGA6** و روش **Maximum likelihood** ویروس موزائیک جنوبی مرغ به شماره دسترسی **KC113504** به عنوان برون گروه قرار داده شده است. جدایه های آمریکا با رنگ قرمز در گروه **IA** همراه با یک جدایه مربوط به ترکیه، جدایه های ایرانی با رنگ آبی در گروه های **IB** و **IIA** و جدایه های اروپا با رنگ سبز در گروه **IIB** قرار گرفتند. جدایه‌های ایرانی تعیین ترادف شده این تحقیق بصورت پر رنگ نشان داده شده است.

Percent Identity																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
1	█	97.6	77.0	88.4	98.9	98.9	97.9	99.1	97.6	98.0	92.8	93.6	89.1	97.6	88.2	100.0	99.0	88.2	100.0	1	AF057533
2	99.6	█	77.1	88.4	97.0	97.8	97.0	97.2	98.0	98.4	93.0	93.1	89.1	98.0	88.2	97.6	98.2	88.2	97.6	2	AF285169
3	91.1	90.6	█	77.6	77.1	77.4	77.0	76.8	77.0	77.2	76.0	76.2	78.0	77.1	77.5	77.0	77.8	76.9	77.0	3	AF285170
4	99.6	99.2	90.6	█	88.0	88.2	87.5	87.8	88.1	89.1	89.5	88.5	92.0	89.0	99.6	88.4	89.0	97.2	88.4	4	AF454454
5	100.0	99.6	91.0	99.6	█	98.2	97.2	98.2	97.0	97.4	92.4	92.8	88.2	97.0	87.9	98.9	98.6	87.9	98.9	5	AF454455
6	100.0	99.6	91.0	99.6	100.0	█	97.8	98.5	97.5	97.9	92.9	93.2	89.2	97.5	88.1	98.9	98.6	88.4	98.9	6	AF511614
7	100.0	99.6	91.0	99.6	100.0	100.0	█	97.5	97.2	97.4	92.9	93.2	88.2	97.5	87.4	97.9	97.9	87.6	97.9	7	AF511615
8	100.0	99.6	91.0	99.6	100.0	100.0	100.0	█	97.2	97.6	92.4	93.2	89.0	97.2	87.6	99.1	98.4	87.9	99.1	8	AF511619
9	99.6	99.2	90.6	99.2	99.6	99.6	99.6	99.6	█	98.6	93.0	93.4	88.9	98.5	88.0	97.6	98.2	88.0	97.6	9	AF511630
10	99.6	99.2	91.0	99.2	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	█	93.1	93.2	89.2	99.6	89.0	98.0	98.6	88.8	98.0	10	AF511643
11	97.7	99.6	88.3	96.6	97.0	97.0	97.0	97.0	96.6	96.6	█	96.0	91.9	93.0	89.4	93.0	93.1	89.5	93.0	11	KX398590
12	97.7	97.4	89.1	97.4	97.7	97.7	97.7	97.7	97.4	97.4	97.4	█	91.8	93.4	88.4	93.6	93.2	88.4	93.6	12	KX398591
13	99.6	99.2	91.4	99.2	99.6	99.6	99.6	99.6	99.2	99.2	96.6	97.4	█	89.1	91.9	89.1	89.5	91.6	89.1	13	EU914918
14	99.6	99.2	91.0	99.2	99.6	99.6	99.6	99.6	99.2	100.0	96.6	97.4	99.2	█	88.9	97.6	98.2	88.6	97.6	14	FJ348358
15	98.9	98.5	90.2	99.2	98.9	98.9	98.9	98.9	98.5	98.5	95.9	96.6	98.5	98.5	█	88.2	88.9	97.1	88.2	15	HG810954
16	100.0	99.6	91.0	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	99.6	97.0	97.7	99.6	99.6	98.9	█	99.0	88.2	100.0	16	HK327032
17	100.0	99.6	91.0	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	99.6	97.0	97.7	99.6	99.6	98.9	100.0	█	88.6	99.0	17	HK327034
18	98.9	98.5	89.8	99.2	98.9	98.9	98.9	98.9	98.5	98.5	95.9	96.6	98.5	98.5	98.5	98.9	98.9	█	88.2	18	LN624217
19	100.0	99.6	91.0	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	99.6	97.0	97.7	99.6	99.6	98.9	100.0	100.0	98.9	█	19	NC_001886
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		

شکل ۳- مقایسه درصد همولوژی نوکلئوتیدی (جدول بالا) و اسید آمینه‌ای (جدول پایین) ژن Nia-Pro جدایه‌های AH10 (KX398590)

و AH11 (KX398591) با جدایه‌های ژن بانک که به روش Clustal W با برنامه MegAlign ترسیم شده است.

جدول ۲- تغییرات صورت گرفته در اسید آمینه‌های (پیش بینی شده) جدایه‌های ایرانی مربوط به این مطالعه در مقایسه با جدایه‌های ژن بانک

(نتایج این جدول با نرم افزار Mega6.1 به دست آمده است).

نام جدایه	جایگاه اسید آمینه	۱۲۴-۱۲۱	۱۴۰	۱۵۴	۲۰۸	۲۵۳
جدایه های دنیا	AETT	I	A	G	R	
AH10	GKSH	I	T	A	G	
AH11	GKAI	T	T	A	R	

منابع

رضایی م، جعفرپور ب، فلاحتی رستگار ب و سبک خیز م. ۱۳۸۸. شناسایی ویروس موزاییک رگه‌ای گندم در استان خراسان شمالی با استفاده از روش‌های سرولوژیکی و مولکولی. پنجمین کنگره سراسری ویروس شناسی و اولین کنگره واکسن ایران، موسسه واکسن و سرم سازی رازی ایران، تهران.

معصومی م، یاسایی م، زارع آ، افشاریفر ع و ایزدپناه ک. ۱۳۸۵. آنالیز ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ۳ ژنوم جدایه های ویروس موزاییک رگه ای گندم در ایران. مجله بیماری‌های گیاهی ۰ جلد ۴۲. صفحه‌های ۲۵۳ تا ۲۵۵.

خدیور ر و نصران...نژاد س. ردیابی سرولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک رگه‌ای گندم در مزارع غلات استان گلستان. ۱۳۸۸. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، جلد چهارم، شماره شانزدهم، صفحه‌های ۱۳۷ تا ۱۴۷.

Adams M, Antoniw J and Beaudoin F, 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology* 6 (4): 471-487.

- Adams M J, Antoniw, J F and Fauquet CM, 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology* 150: 459–479.
- Allaire M, Chernaia M M, Malcolm, B A and James M N, 1994. Picornaviral 3C cysteine proteinases have a fold similar to chymo trypsin-like serine proteinases. *Nature* 369: 72–76.
- Burrows M, Franc G, Rush C, Blunt T, Ito D, Kinzer K, Olson J, O'Mara J, Price J, Tande C, Ziems A and Stack J, 2009. Occurrence of viruses in wheat in the Great Plains region. *Plant Health Progress* 9:25-29.
- Chung B Y W, Miller W A, Atkins J F and Firth AE, 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *PNAS* 105 (15) 5897–5902.
- Clark M F and Adams A N, 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483.
- Clewley J P and Arnold C, 1996. *Sequence Data Analysis Guidebook Series: Methods in Molecular Biology*|Volume: 70 Page Range: 119-129.
- Foulad P, and Izadpanah K, 1986. Identification of *wheat streak mosaic virus* in Iran. *Agricultural Research* 5: 73-84.
- Kapust RB, Tözser J, Copeland TD, and Waugh DS, 2002. The P1' specificity of *tobacco etch virus* protease. *Biochem. Biophys. Research* 294: 949–955.
- Lu G; Moriyama, 2004. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Briefings in Bioinformatics* 5 (4): 378–388.
- Masumi M, Izadpanah KA, Joukar L and Kheradnam M, 2001: Assessment of losses by *wheat streak mosaic virus*. *Iranian Journal of Plant Pathology* 37(3-4): 221-232.
- Mc Kinney H, 1937. Mosaic diseases of wheat and related cereals. United States Department of Agricultural Circ, No. 442., USA: United States Department of Agriculture.
- Matthews D A, Smith W W, Ferre R A, Condon B, and Budahazi G, 1994. Protein and 5 end RNA sequence of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 12:25-34.
- Nishigawa H, Hagiwara T, Yumoto M, Sotome T. 2008. Molecular phylogenetic analysis of *Barley yellow mosaic virus*. *Archives of Virology* 153:1783–1786.
- Price JA, Smith J, Simmons A, Fellers J, Rush CM, 2010. Multiplex real-time RT-PCR for detection of Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 165(2):198-201.
- Rabenstein F, Seifers DL, Schubert J, French R, Stenger DC, 2002. Phylogenetic relationships, strain diversity and biogeography of tritimoviruses. *Journal of General Virology* 83(4):895-906.
- Sánchez-Sánchez H, Henry M, Cárdenas-Soriano E and Alvizo-Villasana HF, 2001. Identification of Wheat streak mosaic virus and its vector *Aceria tosichella* in Mexico. *Plant Disease* 85(1):13-17.
- Stenger DC, Hall JS, Ryong C and French R, 1998. Phylogenetic relationships within the family Potyviridae: Wheat streak mosaic virus and brome streak mosaic virus are not members of the genus Rymovirus. *Phytopathology* 88(8):782-787.
- Stenger DC, Seifers DL and French R, 2002. Patterns of polymorphism in Wheat streak mosaic virus: sequence space explored by a clade of closely related viral genotypes rivals that between the most divergent strains. *Virology* 302(1):58-70.
- Stenger DC and French R, 2009. Wheat streak mosaic virus genotypes introduced to Argentina are closely related to isolates from the American Pacific Northwest and Australia. *Archives of Virology* 154(2):331-336.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei, M and Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tatineni S, Graybosch RA, Hein GL, Wegulo SN and French R, 2010. Wheat cultivar-specific disease synergism and alteration of virus accumulation during co-infection with Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. *Phytopathology* 100 (3): 230-238.
- Ziebuhr J, Bayer S, Cowley JA and Gorbalenya AE, 2003. The 3C-like proteinase of an invertebrate nidovirus links coronavirus and potyvirus homologs. *Journal of Virology* 77: 1415–1426.
- Workneh F, Price JA, Jones DC and Rush CM, 2009. *Wheat streak mosaic*: A classic case of plant disease impact on soil water content and crop water-use efficiency. *Plant Disease* 94(6):171-174.

Phylogenetic Study of Two Iranian Isolates of Wheat streak mosaic virus in NIa-Pro Proteinase Coding Region

SA Hosseini^{1*} and Kh Salary²

¹Assistant Professor of Plant Pathology, Department Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand.

²Lecturer o Plant Pathology Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Joroft.

*Corresponding author: ahosseini@birjand.ac.ir

Received: 16 June 2016

Accepted: 29 August 2017

Abstract

Wheat streak mosaic virus, a member of the genus *Tritimovirus* in the family *Potyviridae*, is a destructive pathogen of cereals. In this research, NIa-Pro as one of the most important proteinase of WSMV was analyzed. For this purpose, 116 wheat symptomatic samples were collected from North Khorasan, South Khorasan and West Azarbayjan provinces and tested by ELISA. Ten ELISA positive samples were propagated by mechanical inoculation on wheat and were tested by RT-PCR using specific primers that were amplified a 732 bp fragment of full length NIa-Pro coding region in all of the 10 samples. Then, two isolates from Iran, according to their geographical properties, were selected, cloned and sequenced. In the phylogenetic analysis, two distinct groups were separated. The isolates from iran were placed in Group I and subgroup IB close to isolate from America (NC-001886). Iranian isolates formed a sub group separate from previously reported isolates from Iran (Saadat shahr) and Europe. Analysis of cleavage sites in NIa-Pro of the isolates from iran, showed that all of them were conserved in comparison to the isolates previously recorded in GenBank but some substitutions were observed at NIa-Pro motifs. AETT residues at position 121-124 were replaced by GKSH, alanine residue was replaced by Threonin at position 154 and Glutamin alanine at position 208. This research is the first analysis of NIa- pro in isolates of WSMV from Iran.

Keywords: Cereal, ELISA, Phylogeny, Polymerase Chain Reaction.