مقاله کوتاه

بررسی خصوصیات بیولوژیکی و فیلوژنتیکی ویروس موزائیک کلم‌گل (*Cauliflower mosaic virus*) از گیاه کلزا در ایران*

BIOLOGICAL AND PHYLOGENETIC STUDY OF *Cauliflower mosaic virus* ON CANOLA IN IRAN

مریم قادری سهی[1]**، نوح شهرآیین[2] و فرشاد رخشنده رو[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۵/۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۲۸)

چکیده

ویروس موزائیک کلم‌گل (CaMV) یکی از ویروس‌های مهم آلوده‌کننده و خسارت‌زا در گیاهان تیره *Brassicaceae* از جمله کلزا (*Brassica napus* L.) است. جهت ردیابی CaMV در گیاه کلزا، در مجموع ۶۸۴ عدد از نمونه‌های برگی دارای علائم ویروسی از مزارع کلزای استان‌های تهران، قزوین، چهارمحال و بختیاری، مازندران، اردبیل، آذربایجان غربی و فارس جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با روش سرولوژیک DAS-ELISA با آنتی سرم چند همسانه‌ای اختصاصی برای وجود CaMV مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس جدایه‌های CaMV که توسط آزمون الایزا وجودشان تأیید شده بود به نمایندگی از ۷ استان، برای مطالعه بیشتر انتخاب شدند. برای بررسی تنوع بیولوژیکی، از علائم مشخصه و متمایز کننده این ویروس روی دو میزبان شلغم، کلم قمری و تاتوره استفاده شد. همه جدایه‌ها در شلغم لکه‌های موضعی ایجاد کردند لکن اندازه و زمان ظهور در برخی جدایه‌ها متفاوت بود. در کلم‌قمری و تاتوره هیچ علائمی دیده نشد. تکثیر ژن مربوط به پروتئین رپلیکاز در چارچوب خوانش شماره ۵ از ژنوم ویروس، در آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی با تشکیل باند ۸۴۰ جفت بازی نتایج مثبت آزمون الایزا را تأیید کرد. مطالعات فیلوژنتیکی و ترسیم درخت تبارزایی نشان داد ۸ جدایه مذکور به همراه دو جدایه از کشور چین (Xinjiang, AF140604) و مجارستان (Cabb-D/H, M10376)، در یک شاخه و بقیه جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن در شاخه جداگانه قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی: کلزا، ویروس موزائیک کلم‌گل، چارچوب خوانش ۵، تبارزایی، ویروس‌های کلزا

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mghaderi_82@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۲. دانشیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

مقدمه

دانه‌های روغنی پس از غلات، دومین ذخایر غذائی جهان را تشکیل می‌دهند. این محصولات علاوه بر دارا بودن ذخایر غنی اسیدهای چرب، حاوی پروتئین نیز می‌باشند (Sharyati & Ghazi Shahni-Zade 2000). براساس آمار سازمان خوار و بار جهانی (FAO)، در سال ۲۰۰۸، سطح زیر کشت کلزا در ایران ۱۹۰۰۰۰ هکتار بوده است (FAO 2008). کلزا معمولاً بین ماه‌های مهر تا آذر کاشته می‌شود و برداشت در ماه‌های اردیبهشت و خرداد سال بعد خواهد بود. بنابراین کلزا مدت نسبتا زیادی در مزرعه خواهد بود و در این مدت میزبان مناسبی برای آفات و بیماری‌های ارقام مختلف چلیپاییان (*Crucifereae*) خواهد بود و در سال‌های اخیر بروز این عوامل رو به افزایش بوده است. حداقل ۱۱ ویروس شناخته شده، محصولات جنس *Brassica* را آلوده می‌سازند (Sutic *et al.* 1999, Kolte 1985) اینها عبارتند از: ویروس زرد غربی چغندر (BWYV)، زردی نکروتیک بروکلی (BNYV)، موزائیک کلم گل (CaMV)، موزائیک خیار (CMV)، موزائیک تربچه (RaMV)، بدشکلی زرد تربچه (RYEV)، موزائیک بارهنگ(RMV)، چروکیدگی شلغم (TCV)، موزائیک شلغم (TuMV)، روزت شلغم (TRoV) و موزائیک زرد شلغم (TYMV). نتایج بررسی‌های گذشته در ایران نشان داده است که از میان ویروس‌های آلوده‌کننده کلزا سه ویروس CaMV, BWYV و TuMV از فراوانی و اهمیت بیشتری در کلزا برخوردارند (Shahraeen *et al.* 2003). CaMV یکی از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده‌کننده ارقام مختلف چلیپائیان و جزو عوامل خسارتزا و کاهش‌دهنده عملکرد در این گیاهان از جمله گیاه کلزاست و در گذشته کاهش ۹۰ درصدی محصول کلزا، به دلیل کاهش تعداد و اندازه بذر در اثر آلودگی به ویروس‌های CaMV و TuMV گزارش شده است (Walsh & Tomlinson 1985, Hardwick *et al.* 199).در سال‌های اخیر در یک پژوهش پراکنش و برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ویروس موزائیک کلم‌گل (CaMV) که از مزارع ۶ استان ایران جمع‌آوری شده بود، مورد بررسی قرار گرفت (Farzadfar *et al.* 2007). در این پژوهش، ۸ جدایه CaMV به نمایندگی از جدایه‌های آلوده‌کننده کلزا از ۷ استان کشور انتخاب و ویژگی‌های بیولوژیکی و فیلوژنتیکی آنها مورد بررسی تکمیلی قرار گرفته است.

روش بررسی

تعداد ۶۸۴ نمونه برگی گیاه کلزا به صورت تصادفی از بوته‌های دارای علایم مشکوک به آلودگی ویروسی از مزارع کلزای ورامین (استان تهران)، قزوین و تاکستان (استان قزوین)، شهرکرد (استان چهارمحال بختیاری)، ساری (استان مازندران)، مغان (استان اردبیل)، نقده (استان آذربایجان غربی) و شیراز (استان فارس) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با آزمون الایزای مستقیم (DAS-ELISA) با آنتی‌سرم چند همسانه‌ای اختصاصی (شرکت DSMZ آلمان) برای وجود CaMV مطابق روش کلارک و آدامز مورد ردیابی سرولوژیک قرار گرفتند (Clark & Adams 1977). میزان جذب نور هر چاهک در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه Microplate reader (Biorad, USA) اندازه‌گیری شد. نمونه‌هایی که میزان جذب چاهک آنها مساوی یا بیش از سه برابر میانگین جذب چاهک گیاه سالم (شاهد منفی) بود، به عنوان نمونه آلوده (مثبت) در نظر گرفته شدند. بر اساس نتایج آزمون تشخیص سرولوژیکی ELISA تعدادی از نمونه‌های کلزا که به ویروس موزائیک‌کلم‌گل آلوده بودند، انتخاب و جهت تکثیر و حفظ منبع ویروس،

عصاره‌گیری شده و روی گیاهان محک مورد نظر در گلخانه مایه‌زنی شدند. جهت حذف ویروس‌های دیگر و نیز ایجاد جدایه‌های کاملاً خالص، هر کدام از جدایه‌های به دست آمده، ابتدا روی گیاه شلغم (*B. rapa* L. cv. Just) (Right که تولید لکه‌های موضعی می‌کند، به صورت مکانیکی و مطابق روش *برودبنت و تینسلی* مایه‌زنی شدند (Brodbent & Tinsley 1953). پس از تشکیل لکه‌های موضعی، یکی از این لکه‌ها انتخاب و با بافر فسفات پتاسیم حاوی (Polyvinylpyrrolidone (PVP) ۲٪، Na_2SO_3 ۰/۰۱، Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ۰/۰۵) با پی اچ ۷/۵ به نسبت ۳:۱ (بافت: بافر) عصاره‌گیری و روی گیاهان محک مایه‌زنی شد. برای ارزیابی تنوع بیولوژیکی، از سه گیاه شلغم (*B. rapa*)، کلم قمری (*B. oleracea* var. *gongylodes*) و تاتوره (*Datura stramonium*) استفاده شد و جدایه‌های مورد نظر روی این سه گیاه مایه‌زنی شدند. گیاهان محک در مرحله دو تا چهار برگی مایه‌زنی و در شرایط گلخانه (دمای۳ ±۲۲، نور متناوب، ۱۶ ساعت روشنایی و رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد) نگه‌داری شدند. آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده با توجه به علایم ایجاد شده و با استفاده از آزمون الایزا تا سه هفته پس از مایه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ردیابی مولکولی نمونه‌ها، دی‌ان‌ای هشت جدایه به نمایندگی از هشت منطقه نمونه‌برداری شده، بعد از مایه‌زنی روی گیاه شلغم و ایجاد علایم ویروسی توسط روش *دلا پورتا و همکاران* (Dellaporta *et al.* 1983) استخراج شد. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازها (PCR) یک جفت آغازگر اختصاصی شامل CaMV-F، به عنوان آغازگر پیش‌سو (5´- ggaagctcaatcaccatcagca-3´) و CaMV-R، به عنوان آغازگر پس‌سو (5´- ccagaatcctgacttacagtcg-3´)، با استفاده از نرم‌افزار Oligo6 (MBI, Cacade, Co, USA)، از ابتدای چارچوب خوانش ۵ (ORF V) ویروس انتخاب و ساخته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۵/۶۵ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۸ میکرولیتر مخلوط 4.dNTPmix (۱۰ میلی‌مولار)، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی (۲۰pmol/µl) ، ۲/۵ میکرولیتر دی‌ان‌ای استخراج شده از گیاه و ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم *Taq* DNA-polymerase انجام شد. برنامه مورد استفاده برای آزمون PCR شامل ۹۴°C، ۲ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴°C، ۳۰ ثانیه، ۵۴°C، ۳۰ ثانیه، ۷۲°C، ۹۰ ثانیه و در پایان ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در یک دستگاه از کمپانی Primus (MWG Biotech.Co., Germany) صورت گرفت. بعد از آن محصولات به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به همراه مارکر وزن مولکولی در ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی ۱µg/ml اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شدند و سپس ژل در دستگاه gel documentation (Imago, The Netherlands) قرار داده و از باندهای ظاهر شده عکسبرداری شد. محصول PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی دی‌ان‌ای از ژل (DNA Extraction Kit, Fermentas) از سایر اجزای واکنش PCR، طبق روش توصیه شده توسط شرکت سازنده کیت جدا و جهت تعیین ترادف به شرکت MWG Biotech. در آلمان ارسال شد. سپس ترادف‌های تعیین شده با یکدیگر و با ترادف‌های ثبت شده در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت.

هم‌ردیف‌سازی چندگانه (Multiple sequence alignment)، با برنامه ClustalX 2.0.9 انجام شد. سپس به کمک

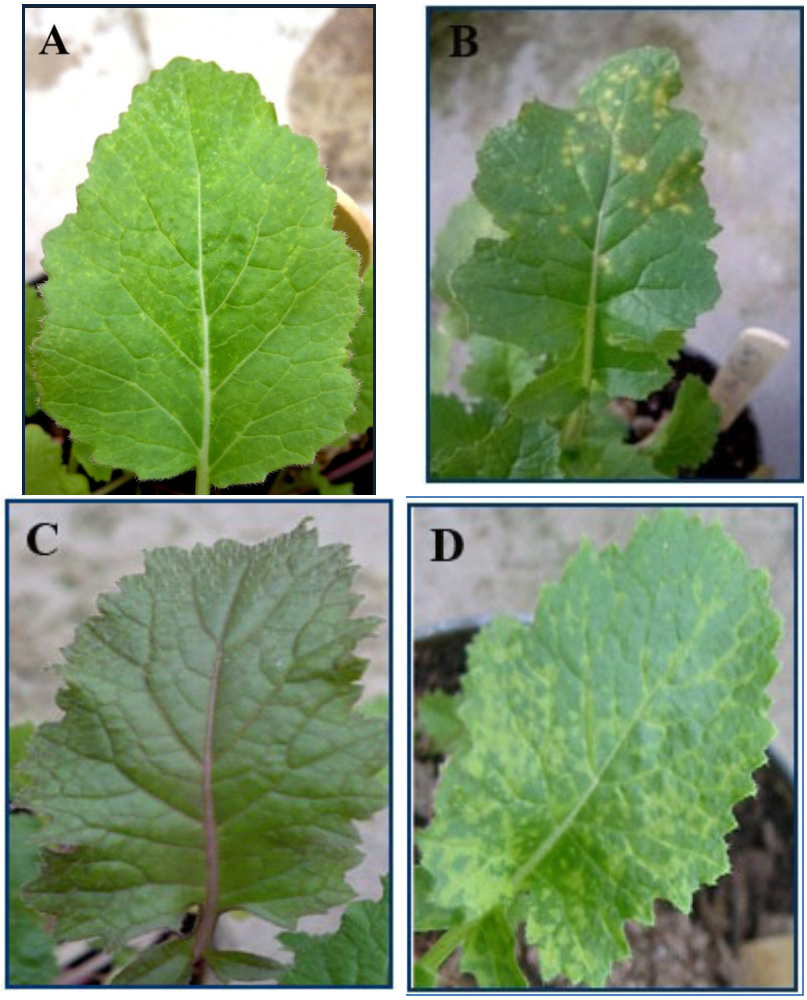
نرم‌افزار MEGA4.1 درخت تبارزایی با مدل Kimura-2 Parameter و با ۱۰۰۰ تکرار و به صورت Bootstrap ترسیم شد. هم‌چنین میزان خطای ژنتیکی با استفاده از برنامه Megalign نرمال شد. در این بررسی از ویروس رگبرگ نواری توت‌فرنگی (SVBV) به عنوان Outgroup استفاده شد.

نتیجه و بحث

از بین ۶۸۴ عدد نمونه برگی جمع‌آوری شده گیاه کلزا ۲۸۹ نمونه (۴۲/۲ درصد) نسبت به آنتی‌بادی اختصاصی CaMV واکنش مثبت نشان دادند. نتایج آزمون DAS-ELISA نشان داد گیاهان کلزای استان‌های مورد بررسی به ترتیب با میانگین ۳۸/۶ (تهران)، ۳۶/۸ (قزوین)، ۴۳/۳ (چهارمحال بختیاری)، ۳۱/۸ (مازندران)، ۶۶/۶ (اردبیل)، ۵۲/۳ (آذربایجان غربی) و۳۸/۲ (فارس) درصد به CaMV آلوده هستند. همان‌طور که مشاهده می‌شود از مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده دارای علائم از استان‌های مختلف کشور نزدیک به نیمی آلوده به CaMV هستند. هر چند مقایسه آماری در این خصوص صورت نگرفته است.

تمام جدایه‌ها در این بررسی، گیاه شلغم را آلوده نمودند. در گیاه شلغم مایه‌زنی شده، ابتدا علائم لکه موضعی ایجاد گردید. جدایه‌های مختلف از لحاظ شدت و اندازه لکه‌های ایجاد شده با هم تفاوت نشان دادند. در تعدادی از جدایه‌ها مثل جدایه ساری، نقده و شهرکرد لکه‌های موضعی ریز (شکل ۱-A) و در جدایه‌های شیراز، قزوین، تاکستان، تهران و اردبیل لکه‌های درشت و مشخص (شکل ۱-B) مشاهده شد. علائم سیستمیک بیشتر به صورت رگبرگ‌روشنی، رگبرگ‌نواری و موزائیک بودند (شکل-C و D). علاوه بر علائم برگی، بوته‌های شلغم آلوده در مقایسه با بوته‌های سالم از رشد کمتری برخوردار بودند. در جدایه استان اردبیل باز ماندن از رشد بسیار شدید بود. علائم چین‌خوردگی و چروکیدگی از دیگر علائمی بود که در شلغم دیده شدند. در مورد کلم‌قمری، و تاتوره نیز هیچ‌کدام از جدایه‌ها علائم مشخصی را در این گیاهان ایجاد نکردند و آزمون الیزا نیز برای آنها منفی بود. نتایج حاصل از بررسی علائم مشخص ساخت که جدایه‌های CaMV مورد مطالعه، علائم نسبتاً مشابه با علایم گزارش شده از این ویروس بر روی این گیاهان محک ایجاد می‌کنند (Al-Kaff & Covey 1995) در جدایه‌های CaMV جدا شده از روی کلم‌گل در ایران نیز علائم روی شلغم شدیدتر بوده است (Farzadfar *et al*. 2007). این نتیجه همانند نتیجه بررسی‌های انجام شده روی جدایه‌های مختلف CaMV از نقاط مختلف دنیاست. بر اساس مطالعات صورت گرفته، این تفاوت در ایجاد علائم روی شلغم و کلم‌قمری به این صورت توضیح داده شده که گونه‌های مختلف جنس *Brassica* از لحاظ توانایی تحمل آلودگی به CaMV متفاوت هستند (Al-Kaff & Covey 1995). در گونه‌های به شدت حساس مثل شلغم (*B. rapa* subspecies *rapifera*)، mRNA ویروسی به وفور در گیاه تجمع می‌یابند. یک میزبان مقاوم‌تر مثل کلم‌قمری، بدون علائم باقی می‌ماند و حاوی مقدار کمتری از mRNA ویروسی است (Covey *et al*. 1990, Saunders *et al*. 1990). بنابراین جدایه‌های CaMV جدا شده از کلزا نیز دارای خصوصیات مشابه از این نظر هستند.

در بخش بررسی مولکولی، در جدایه‌های CaMV مربوط به مناطق تهران، مازندران، قزوین، تاکستان، فارس، آذربایجان‌غربی، اردبیل و چهارمحال و بختیاری در آزمون



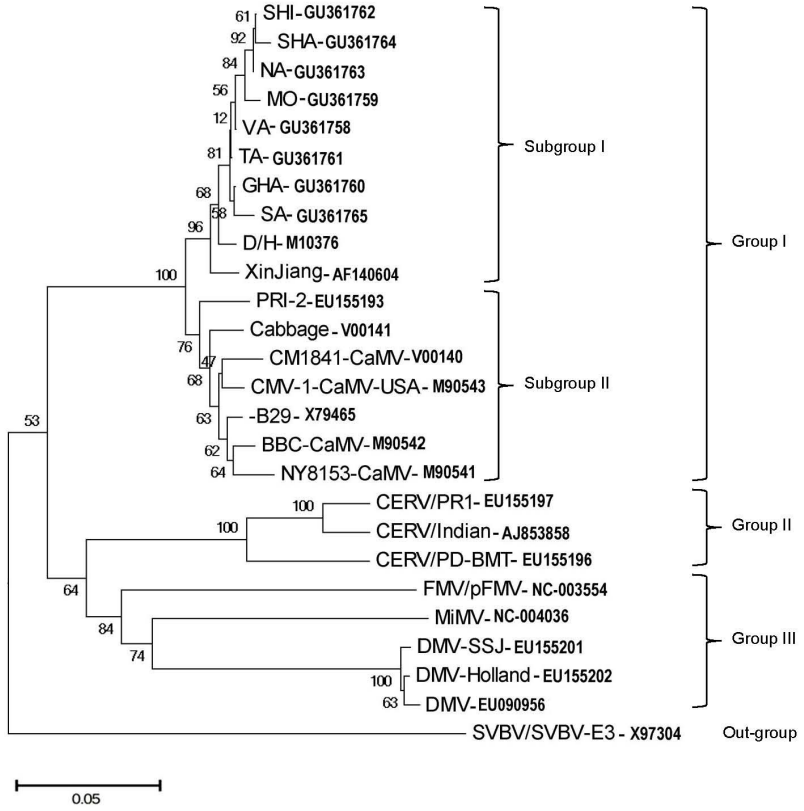
شکل ۱. (A) لکه‌های موضعی سبززرد کوچک در برگ شلغم، (B) لکه‌های موضعی سبززرد نسبتاً بزرگ در برگ شلغم، (C) رگبرگ‌نواری و ارغوانی شدن برگ شلغم، (D) رگبرگ روشنی و موزائیک در برگ شلغم

Fig. 1. Symptoms on turnip leaves: (A) small cholorotic local lesion, (B) large chlorotic local lesion, (C) vein banding, (D) vein clearing and mosaic.

جدول ۱. رس شمارهای چارچوب خوانش شماره ۵ و محل جمع‌آوری هشت جدایه ایرانی ویروس CaMV در بانک ژن

Tabe1. Accession numbers and origin of eight Iranian CaMV isolates in GenBank

Isolate	Origin	Accession No.
Ca-TA	Takestan	GU361761
Ca-GHA	Ghazvin	GU361760
Ca-VA	Tehran	GU361758
Ca-SA	Mazandaran	GU361765
Ca-SHI	Fars	GU361762
Ca-SHA	Chaharmahal-Bakhtiari	GU361764
Ca-MO	Ardabil	GU361759
Ca-NA	West Azarbijan	GU361763



شکل ۲. دندوگرام حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ORF V جدایه‌های CaMV کلزا، سایر جدایه‌های CaMV موجود در بانک ژن و ویروس‌های جنس *Caulimovirus* با استفاده از نرم‌افزار MEGA4.1 و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار. اعداد نمایانگر bootstrap هستند.

Fig. 2. Phylogenetic tree constructed from the alignment of partial nucleotide sequences of ORF V of Iranian canola CaMV isolates , the sequence of other CaMV isolates and other viruses of *Caulimovirus* available in GenBank using MEGA4.1 software based on 1000 replicates. The numbers indicate bootstrap percentage. See tables 1 and 2 for virus accession numbers.

PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که برای تکثیر بخشی از ORF V طراحی شده بود، قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۸۴۰ جفت باز به دست آمد. اندازه قطعه در همه جدایه‌های مورد بررسی مشابه بود. در نمونه مربوط به گیاه سالم هیچ باندی تشکیل نشد.

پس از تعیین ترادف اندازه دقیق قطعه تکثیر شده برای تمام جدایه‌ها ۸۴۰ جفت باز بود. هم‌ردیف‌سازی چندگانه با استفاده از ابزار BLAST نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی بر اساس ترادف چارچوب خوانش ۵ (ORF V) از قابلیت بررسی فیلوژنتیکی مناسبی با جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن برخوردار هستند. جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه، دارای ۹۶/۵ تا ۱۰۰ درصد همسانی ژنتیکی (Identity) در این ناحیه هستند.

در شجره حاصل از مطالعات تبارزایی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی بخشی از چارچوب خوانش ۵ (ORF V) (شکل۲) که توسط نرم‌افزار MEGA4.1 ترسیم شد، مشاهده شد جدایه‌های CaMV ایرانی و جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن (گروه I) از جدایه‌های مربوط به گونه‌های دیگر جنس *Caulimovirus* (گروه II و III) تفکیک شده‌اند. بنابراین آغازگرهای طراحی شده قابلیت

تفکیک جدایه‌های CaMV را از گونه‌های دیگر موجود در این جنس داراست. از سوی دیگر، هر هشت جدایه ایرانی به همراه جدایه‌های D/H و Xinjiang از بانک ژن، در یک زیرگروه (I) مجزا و نزدیک به هم قرار گرفتند. در این بین جدایه‌های B29، BBC، NY8153، CMV-1، CM1841، PRI-CaMV-Brassica21 و Cabbage S در زیرگروه (II) دیگری قرار گرفتند (شکل ۲). به نظر می‌رسد زیرگروه‌ها بر مبنای تفاوت در منطقه جغرافیایی از یکدیگر تفکیک‌پذیرند و جدایه‌های ایرانی با درصد تشابه بالا در یک زیرگروه قرار گرفتند در کنار یک جدایه از مجارستان و یک جدایه از چین و جدایه‌های اروپا و آمریکا در زیر گروه‌مستقل، در کنار جدایه‌های ایرانی قرار گرفتند. این امر احتمالا به دلیل تأثیر تغییرات جغرافیایی در تغییرات ژنتیکی مسئول در تعیین دامنه میزبانی می‌تواند باشد. در تحقیقی مشابه با آغازگر متفاوت که در آن جدایه‌های CaMV جدا شده از تعدادی از خاجیان مورد بررسی قرار گرفتند، درخت تبارزایی که براساس ORF IV ترسیم شده بود، وضعیت مشابه داشت (Farzadfar *et al*. 2007). در پژوهشی که در گذشته نیز صورت گرفته بود، توالی کامل نوکلئوتیدی ۸ جدایه از مناطق مختلف دنیا، از لحاظ فیلوژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت که عامل اصلی در تفکیک جدایه‌ها، توزیع جغرافیایی منابع آلوده به این ویروس اعلام شد(Chenault & Melcher 1994).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (30-29) متن انگلیسی مراجعه شود.