

آنالیز فیلوژنی و نوترکیبی در ویروس M سیب زمینی

فاطمه طبسی نژاد^۱، بهروز جعفرپور^۲، محمد زکی عقل^۲، حمید روحانی^۲، مجید صیامپور^۳

^۱دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

^۲گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

^۳گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، ایران

Fatemeh_tabasinezhad@yahoo.com

چکیده

تغییرپذیری و تکامل در جمعیت‌های ویروسی از سرعت زیادی برخوردار است. موتاسیون و نوترکیبی از عوامل موثر در ایجاد تنوع در ویروسها هستند. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی و بررسی وقوع نوترکیبی در ویروس M سیب زمینی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن کدکننده پروتئین پوششی ویروس همانندسازی و توالی‌یابی و تنوع ژنتیکی، وقوع نوترکیبی و رابطه فیلوژنی جدایه‌ها بررسی شد. میزان تنوع در بین جدایه‌های PVM در سطح نوکلئوتیدی بطور متوسط $15/58 \pm 4/31$ و در سطح آمینواسیدی $7/79 \pm 3/17$ بود و در آنالیز فیلوژنی جدایه‌های PVM در دو گروه واگرا قرار گرفتند. در یازده جدایه ایرانی PVM نیز نوترکیبی شناسایی شد. با توجه به منابع موجود این اولین گزارش از وقوع نوترکیبی در ویروس PVM است.

کلمات کلیدی: ویروس M سیب زمینی، ژن کدکننده پروتئین پوششی، تنوع ژنتیکی، نوترکیبی

مقدمه

موتاسیون و نوترکیبی از عوامل موثر در ایجاد تنوع در ویروسها هستند و در پاره ای از موارد منجر به افزایش سازگاری می‌شوند (۶). همچنین نوترکیبی یک از عوامل موثر در تولید نژادها یا گونه‌های جدید می‌باشد (۱). نرخ موتاسیون و نوترکیبی در بین ویروسهای گیاهی متغیر است. نرخ موتاسیون در بین ویروسهای مختلف به طور متوسط بین 24×10^{-4} - $3/5 \times 10^{-3}$ است (۴). نوترکیبی در رترو ویروسها، پارارترو ویروسها و ویروسهای با ژنوم آر.ان.ای تک‌لای مثبت، پدیده شایعی است اما در ویروسهای با ژنوم آر.ان.ای دولا و یا تک‌لای منفی بندرت دیده می‌شود (۶).

مطالعه تغییرات جمعیت ناشی از موتاسیون و نوترکیبی در روند تکاملی ویروسهای گیاهی از اهمیت زیادی برخوردار است (۶). Chare و Holmes (۲۰۰۶) وقوع نوترکیبی را در ۱۳ جنس از ویروسهای گیاهی با ژنوم آر.ان.ای مثبت بررسی کردند و در سه جنس *Closterovirus*، *Potexvirus* و *Potyvirus* این پدیده را مشاهده کردند (۱). اخیراً در تعدادی از ویروسهای جنس *Carlavirus* نیز نوترکیبی گزارش شده است (۷، ۸، ۱۲). در ایران اطلاع چندانی از وضعیت ژنتیکی جمعیت‌های ویروسهای جنس *Carlavirus* در دسترس نیست، به همین جهت در این تحقیق ویروس M سیب زمینی جهت تعیین تنوع ژنتیکی و بررسی وقوع نوترکیبی انتخاب شد.

ویروس M سیب زمینی (*Potato virus M*، *PVM*) متعلق به جنس *Carlavirus* از خانواده *Betaflexiviridae* است. پیکره های ویروس رشته ای و دارای یک قطعه آر.ان.ای تک‌لای مثبت به اندازه ۸/۵ کیلو باز و شش چهارچوب ژنی است. میزبان اصلی این ویروس سیب زمینی و دارای گسترش جهانی است (۱۳).

مواد و روشها

تکثیر، همسانه سازی و تعیین ترادف ژن پروتئین پوششی

پس از نمونه برداری از مزارع سیب زمینی، آزمون الایزای مستقیم (DAS-ELISA) طبق روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷) انجام شد (۲). سپس آر.ان.ای کل از نمونه های آلوده با استفاده از Accuzol, total RNA extraction kit (Bioneer) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. طول کامل ژن کد کننده پروتئین پوششی ویروس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PVM-CPF (ATGGGAGATTCAACRAAGAA) و PVM-CPR (CTTCATTGTTATTCGACTT) همانندسازی شد. ساخت cDNA با استفاده از آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase انجام و ۴ میکرولیتر از رشته مکمل با ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ پیکومول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش، ۱/۲۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدها (۱۰ میلی مولار) و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) در واکنش زنجیره ای پلی مرز مخلوط شد. پروفایل دمایی واکنش شامل ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه برای واسرشته سازی ابتدائی و بدنال آن ۳۵ چرخه شامل ۵۰ ثانیه در ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در ۵۴°C و یک دقیقه در ۷۲°C و در انتها یک چرخه به مدت ۵ دقیقه در ۷۲°C برای تکمیل پلیمریزاسیون بود. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و قطعه تکثیر شده به کمک کیت QIAquick Gel Extraction Kit از ژل استخراج شده و با استفاده از Inst/A clone PCR product cloning kit درون پلاسمید pTZ57R/T الحاق و در سویه DH5α باکتری *Escherichia coli* همسانه سازی شد. پلاسمیدهای نو ترکیب پس از خالص سازی بوسیله کیت استخراج پلاسمید (Genetbio) Mini Plasmid Extraction Kit، جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شدند. ترادف حاصل با برنامه BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI با ترادفهای موجود در بانک ژن مقایسه و ماتریس شباهت با استفاده از نرم افزار SDT V.1.0 رسم گردید. درخت فیلوژنی جدایه ها با استفاده از نرم افزار Mega 5 نسخه β و به روش Maximum likelihood، با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap ترسیم شد (۹).

بررسی وقوعوترکیبی در ژن پروتئین پوششی PVM

وقوع نو ترکیبی در ژن پروتئین پوششی جدایه های مختلف PVM (شامل جدایه های ایرانی و جدایه های موجود در بانک ژن جهانی NCBI) با استفاده از نرم افزار RDP v.4.10 beta در سطح $P=0.05$ محاسبه شد (۵). به این منظور از روشهای شامل RDP، GENECONV، BOOTSCAN، MAXCHI، CHIMAERA، 3SEQ، SISCAN و LARD جهت بررسی وقوع نو ترکیبی استفاده شد (۵).

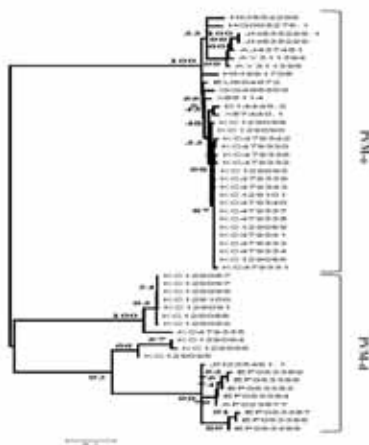
نتایج و بحث

در آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی قطعه ای به اندازه ۹۱۵ جفت باز تکثیر شد و در گیاه سالم هیچگونه باندهای مشاهده نشد. نتایج بررسی Blast نشان داد که قطعه ۹۱۵ جفت بازی تکثیر شده در واکنش زنجیره ای پلیمرز ترادف کامل ژن پروتئین پوششی ویروس M سیب زمینی است. ترادف کامل ژن پروتئین پوششی در ۳۰ جدایه ایرانی PVM با رس شمارهای KC129086-KC129101 و KC479330-KC479343 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید. از این ۳۰ جدایه به همراه ۲۱ جدایه از کشورهای دیگر، برای آنالیزهای فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی تمامی جدایه های دنیا استفاده شد (جدول ۱). درصد شباهت پروتئین پوششی بین ۵۱ جدایه در سطح نوکلئوتیدی ۱۰۰٪-۷۳/۳ و در سطح آمینو اسیدی ۱۰۰٪-۸۴/۵ بود. این مقادیر در بین ۳۰ جدایه ایرانی ۱۰۰٪-۷۵/۶ و ۱۰۰٪-۸۶/۲ به ترتیب در سطح نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی بود. کمترین و بیشترین درصد شباهت بین تمامی ۵۱ جدایه به ترتیب ۷۴٪

(بین جدایه‌های ۳۸۰ [KC479331] و [CA128][EF063387] و ۹۷/۸٪ (بین جدایه‌های ۷۳۹ [KC479340] و جدایه آلمان [X57440]) بود. میزان تنوع در بین جدایه‌های PVM در سطح نوکلئوتیدی بطور متوسط $4/31 \pm 15/58$ و در سطح آمینواسیدی $3/17 \pm 7/79$ بود. در هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالیها مشخص شد که بیشترین میزان تغییرات در انتهای آمینی بخصوص در ۳۵ آمینواسید موقعیت ۵۱-۱۶ است، که این نتیجه با مشاهدات سایر محققین نیز مطابقت دارد (۱۱، ۱۳).

پس از رسم درخت فیلوژنی مشخص شد که جدایه‌ها در دو گروه واگرا قرار می‌گیرند، که این دو گروه به اختصار PVM-o^۱ و PVM-d^۲ نامگذاری شدند، که هر یک از این گروه‌ها خود دارای چندین زیرگروه است. گروه اول شامل جدایه‌های ایرانی به همراه جدایه‌های اروپایی و در گروه دوم نیز برخی دیگر از جدایه‌های ایرانی به همراه جدایه‌های از کانادا قرار گرفتند (شکل ۱). Xu و همکاران (۲۰۱۰) جدایه‌های کانادایی را در دو گروه فیلوژنی طبقه‌بندی کردند، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۱۱). همچنین نتایج نشان‌دهنده این است که منطقه جغرافیایی تنها عامل تعیین‌کننده در قرارگیری جدایه‌ها در گروه‌های فیلوژنی مختلف نیست.

در بررسی احتمال وقوع نوترکیبی در ژن پروتئین پوششی جدایه‌های PVM با استفاده از روشهای مبتنی بر فیلوژنی (phylogenetic methods) و جایگزینی نوکلئوتیدی (substitution methods) در ۱۱ جدایه ایرانی نوترکیبی با درصد احتمال بالاشناسائی شد (جدول ۲). آنالیزهای انجام شده نشان می‌دهد که در تمامی ۱۱ جدایه، نوترکیبی بین جدایه‌های PVM-o به عنوان والد غالب (Major parent) و یک جدایه از زیر گروه PVM-d به عنوان والد مغلوب (Minor parent) اتفاق افتاده است و اکثر جدایه‌های نوترکیب بجز جدایه ۳۱۰ [KC129089] در گروه PVM-d قرار می‌گیرند (جدول ۲). اندازه قطعه نوترکیب در جدایه‌های مختلف متفاوت و ۷۱-۸۹۰ نوکلئوتید طول داشت. تحقیقات اخیر نشان داده است که وقوع نوترکیبی در پروتئینهای ساختمانی کمتر اتفاق می‌افتد (۳، ۱۰) و علاوه بر نوترکیبی در ویروسهای خانواده Flexiviridae کم است و احتمالاً به همین دلیل گزارشهای محدودی از وقوع نوترکیبی در اعضای جنس Carlavirus وجود دارد. با توجه به منابع موجود این اولین گزارش از وقوع نوترکیبی در ویروس PVM است.



شکل ۱. درخت تکاملی ترسیم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن پوشش پروتئینی جدایه‌های ایرانی PVM و بعضی از جدایه‌های موجود در بانک ژن. ترسیم درخت با نرم افزار MEGA5 به روش Maximum likelihood (Bt× 1000) انجام شده است.

¹PVM-ordinary
²PVM-divergent

جدول ۱. جدایه‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق همراه با جدایه‌های بانک جهانی NCBI و شماره دسترسی آنها

Isolate name	Origin (Province/region)	Accession number	Country of origin	Isolate name	Origin (Province/region)	Accession number	Country of origin
264	Kerman/ Bardsir	KC129086	Iran	739	Isfahan/ Daran	KC479340	Iran
286	Torbat/ Sultan Abad	KC129087	Iran	745	Isfahan/ Daran	KC479341	Iran
291	Kerman/ Lalezar	KC129088	Iran	749	Isfahan/ Daran	KC479342	Iran
310	Isfahan/ Chahdegan	KC129089	Iran	758	Isfahan/ Daran	KC479343	Iran
352	Kerman/ Bardsir	KC129090	Iran	Gansu	-	JN835299.1	China
369	Isfahan/ Daran	KC129091	Iran	VIRUBRA4/009	-	JN225461.1	Czech Republic
371	Torbat/ Jolga tokh	KC129092	Iran	VIRUBRA4/007	-	HM854296.1	Czech Republic
448	Torbat/ Fakhr abad	KC129093	Iran	VIRUBRA4/035	-	HQ005276.1	Czech Republic
490	Bojnord/ Garivan	KC129094	Iran	VIRUBRA4/016	-	HM991708.1	Czech Republic
501	Kerman/ Lalezar	KC129095	Iran	Ca128	-	EF063387.1	Canada
519	Hamadan/ Bahar	KC129096	Iran	Ca513	-	EF063389.1	Canada
688	Isfahan/ Daran	KC129097	Iran	CL4	-	EF063385.1	Canada
689	Torbat/ Jolga tokh	KC129101	Iran	CL1	-	EF063383.1	Canada
732	Isfahan/ Daran	KC129099	Iran	Ca508	-	EF063388.1	Canada
734	Isfahan/ Chahdegan	KC129100	Iran	Ca5	-	EF063386.1	Canada
760	Kerman/ Bardsir	KC129098	Iran	CL3	-	EF063384.1	Canada
315	Kerman/ Lalezar	KC479330	Iran	Priekulje	-	GQ496609.1	Latvia
380	Torbat/ Jolga tokh	KC479331	Iran	Uran	-	AY311394.1	Poland
439	Torbat/ Jolga tokh	KC479332	Iran	M57	-	AY311395.1	Poland
453	Torbat/ Jolga tokh	KC479333	Iran	Idaho	-	AF023877.1	USA
511	Torbat/ Jolga tokh	KC479334	Iran	DSMZPV0273	-	EU604672.1	Germany
515	Torbat/ Jolga tokh	KC479335	Iran	Russian-wild	-	D14449.2	Russia
655	Isfahan/ Daran	KC479336	Iran	Hangzhou	-	AJ437481.1	China
656	Isfahan/ Daran	KC479337	Iran	German-isolate	-	X57440.1	Germany
691	Isfahan/ Daran	KC479338	Iran	Bario	-	X85114	Italy
706	Isfahan/ Daran	KC479339	Iran				

جدول ۲. نرخ نوترکیبی در جدایه‌های PVM با استفاده از نرم‌افزار

Recombinant isolate	Recombination crossover site	Major:minor parents	p-value							
			RDP	GENCONV	ChiaMaera	Maxchi	BootScan	SiScan	3Seq	LARD
286	191-425	CL3* VIR.4/007	--	--	--	--	--	4.412*10 ⁻³	--	1.431*10 ⁻⁸
291	191-425	CL3* VIR.4/007	--	--	--	--	--	9.915*10 ⁻⁴	--	1.431*10 ⁻⁸
369	191-427	CL3* VIR.4/007	--	--	--	--	--	1.509*10 ⁻⁶	--	2.283*10 ⁻⁵
371	191-427	CL3* VIR.4/007	--	--	--	--	--	7.389*10 ⁻⁷	--	1.431*10 ⁻⁸
501	86-915	DSMZ*519	--	--	9.299*10 ⁻⁴	2.430*10 ⁻⁵	9.727*10 ⁻⁵	2.763*10 ⁻⁴¹	4.337*10 ⁻²⁸	7.186*10 ⁻³¹
501	19-88	519*Gansu	9.289*10 ⁻¹⁴	1.980*10 ⁻¹¹	2.810*10 ⁻⁶	3.891*10 ⁻⁷	2.154*10 ⁻²¹	--	9.550*10 ⁻²⁰	--
501	9-86	519*DSMZ	--	8.265*10 ⁻²⁰	2.206*10 ⁻⁷	2.268*10 ⁻⁷	--	--	1.307*10 ⁻²¹	6.765*10 ⁻³¹
688	191-427	CL3* VIR.4/007	--	--	--	--	--	4.412*10 ⁻³	--	1.249*10 ⁻⁵
732	191-427	CL3* VIR.4/007	--	--	--	--	--	4.412*10 ⁻³	--	1.249*10 ⁻⁵
734	191-427	CL3* VIR.4/007	--	--	--	--	--	4.412*10 ⁻³	--	1.249*10 ⁻⁵
310	10-860	519*264	--	--	5.710*10 ⁻³	1.606*10 ⁻⁴	--	--	3.121*10 ⁻²⁷	2.470*10 ⁻⁴²
490	28-902	655*CL1	--	3.850*10 ⁻⁵	--	--	--	1.797*10 ⁻⁵	--	--
519	9-902	655*CL1	--	3.850*10 ⁻⁵	--	--	--	1.797*10 ⁻⁵	--	--

RDP4

منابع و مراجع مورد استفاده

1. **Chare, E., & Holmes, E. (2006).** A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. Archives of virology, **151**(5), 933-946.
2. **Clark, M. F., & Adams, A. (1977).** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of general Virology, **34**(3), 475-483.
3. **Desbiez, C., & Lecoq, H. (2008).** Evidence for multiple intraspecific recombinants in natural populations of Watermelon mosaic virus (WMV, Potyvirus). Archives of virology, **153**(9), 1749-1754.
4. **Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., & Crow, J. F. (1998).** Rates of spontaneous mutation. Genetics, **148**(4), 1667-1686.
5. **Heath, L., van der Walt, E., Varsani, A., & Martin, D. P. (2006).** Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. Journal of Virology, **80**(23), 11827-11832.
6. **Nagy, P. D. (2008).** Recombination in plant RNA viruses Plant Virus Evolution (pp. 133-156): Springer.
7. **Singh, A. K., Mahinghara, B. K., Hallan, V., Ram, R., & Zaidi, A. A. (2008).** Recombination and phylogeographical analysis of Lily symptomless virus. Virus genes, **36**(2), 421-427.
8. **Singh, L., Hallan, V., Martin, D., Ram, R., & Zaidi, A. (2012).** Genomic sequence analysis of four new chrysanthemum virus B isolates: evidence of RNA recombination. Archives of virology, **157**(3), 531-537.
9. **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution, **28**(10), 2731-2739.
10. **Tan, Z., Wada, Y., Chen, J., & Ohshima, K. (2004).** Inter-and intralinear recombinants are common in natural populations of Turnip mosaic virus. Journal of general virology, **85**(9), 2683-2696.
11. **Xu, H., D'Aubin, J., & Nie, J. (2010).** Genomic variability in Potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes. Virology journal, **7**(1), 25.
12. **Zanardo, L., Silva, F., Bicalho, A., Urquiza, G., Lima, A., Almeida, A., et al. (2013).** Molecular and biological characterization of Cowpea mild mottle virus isolates infecting soybean in Brazil and evidence of recombination. Plant Pathology.
13. **Zavriev, S., Kanyuka, K., & Levay, K. (1991).** The genome organization of potato virus M RNA. Journal of general virology, **72**(1), 9-14.

Phylogenetic and recombination analysis of potato virus M

Tabasinejad, F.¹, Jafarpour, B.², Zakiagh, M.², Rouhani, H.², Siampour, M.³

¹P.hD student of Plant Pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

²Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

³Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahrekord University, Iran

Fatemeh_tabasinezhad@yahoo.com

"Abstract"

Viral populations have high molecular variability and evolutionary rates. Mutation and recombination are two important factors in evolution of viruses. In order to determine the genetic diversity and recombination analysis in *potato virus M*, complete nucleotide sequence of the coat protein gene was amplified using specific primers. The genetic variability in the coat protein was 15.58 ± 4.31 at the nucleotide level and 7.79 ± 3.17 at the amino acid level. Phylogenetic analysis indicated that the PVM isolates could be divided into two evolutionary divergences groups. Recombination analysis identified a total of 11 recombination events among Iranian isolates. Based on our knowledge it is the first report of recombination event in PVM population.

Key words: *Potato virus M*, Coat protein gene, genetic diversity, recombination