

دامنه میزبانی و برخی مشخصات مولکولی تعدادی از جدایه های ویروس موزائیک یونجه در استان کرمان

فاطمه منگلی^۱، حسین معصومی^{۲*}، جهانگیر حیدر نژاد^۳ و اکبر حسینی پور^۴
۱، ۲، ۳ و ۴ دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه
شهید باهنر کرمان.
(تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۱ - تاریخ تصویب: ۹۱/۳/۳۰)

چکیده

ویروس موزائیک یونجه (*Alfalfa mosaic virus, AIMV*) یکی از مهم ترین ویروس های یونجه در سرتاسر دنیاست. به منظور مطالعه جدایه های این ویروس در استان کرمان، در طی سالهای ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷ از ۵۱۴ بوته یونجه با علائم موزائیک، زردی، تاوولی شدن سطوح برگ ها، بدشکلی و پیچیدگی و ۶۶ بوته سیب زمینی با علائم زرد ابلقی (*Calico*)، در شهرستان های مختلف استان کرمان نمونه برداری به عمل آمد. آلودگی نمونه های فوق به *AIMV* با استفاده از آزمون سرولوژیکی الایزای غیر مستقیم (*Indirect ELISA*) و واکنش *RT-PCR* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی چارچوب ژنی پروتئین پوششی (*CP*) اثبات گردید. در مطالعات بیولوژیکی، نمونه های آلوده در شرایط گلخانه بر روی گیاهان محک مایه زنی گردیدند. جدایه های مختلف، در ارقام مختلف توتون (*Nicotiana tabacum L.*) علائم بسیار متنوعی ایجاد کردند و در بوته های داتوره (*Datura maxima*) فقط دو جدایه *Ke. Si. Al* و *Ke. Ba. Al* علائم ویروسی متفاوتی به ترتیب به صورت ایجاد علائم توت ای و لکه های موضعی نکروز ایجاد نمودند. از بین جدایه های جمع آوری شده، چهار جدایه (شامل سه جدایه یونجه و یک جدایه سیب زمینی) براساس موقعیت جغرافیایی به منظور مطالعات مولکولی انتخاب گردیدند. واکنش *RT-PCR* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی پروتئین پوششی ویروس منجر به تکثیر قطعه ای به طول ۷۸۰ جفت باز شد. پس از همسانه سازی جدایه های ایرانی، تعیین ترادف و مقایسه آنها با ناحیه متناظر از جدایه های موجود در بانک ژن، بیانگر درصد تشابه بالا در ترادف اسید نوکلئیک (۹۸/۳-۹۲/۹٪) و اسید آمینه ترجمه شده از ترادف نوکلئوتیدی (۱۰۰-۹۱/۹٪) بین جدایه های ایرانی با جدایه های ایتالیایی این ویروس بود. در درخت فیلوژنتیکی رسم شده براساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه *CP*، جدایه های *AIMV* مورد بررسی در این تحقیق و جدایه های ایتالیایی در یک شاخه و جدایه های فرانسوی در شاخه ای جداگانه قرار گرفتند. بررسی بیولوژیکی و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه های *AIMV* مربوط به استان کرمان برای اولین بار گزارش می شوند.

واژه های کلیدی: ویروس موزائیک یونجه، *RT-PCR*، *Indirect ELISA*، همسانه سازی

مقدمه

ویروس موزاییک یونجه (AIMV) گونه تیپ جنس *Bromoviridae* متعلق به خانواده می باشد (Murphy *et al.*, 1995). این ویروس برای اولین بار در سال ۱۹۳۱ توسط Weimer به عنوان عامل بیماری موزائیک یونجه گزارش گردید. این ویروس دارای ژنوم سه قسمتی RNA1، RNA2، RNA3 می باشد. همچنین دارای یک آر.ان.ا. زیر ژنومی می باشد که از ناحیه ۳' قطعه RNA3 نسخه برداری می گردد. قطعات RNA1 (۳/۶۵kb) و RNA2 (۲/۶kb) ۲۵۹۳، RNA1 نوکلئوتید بوده و تنها دارای یک چارچوب ژنی بزرگ هستند که پروتئین های P1 و P2 را رمزگذاری می کنند که این پروتئین ها در همانندسازی ویروس نقش دارند (Ahlquist, 1994). آر.ان.ا. شماره سه (با وزن مولکولی ۲۰۳۷ نوکلئوتید، ۲/۲kb) دارای دو چارچوب ژنی بوده و پروتئین های حرکتی (movement protein, MP) و پوششی (coat protein, CP) را رمز گذاری می کند (Dore *et al.*, 1991).

علاوه بر این، CP از روی RNA4 نیز ترجمه می شود. این ویروس یکی از گسترده ترین دامنه میزبانی را در بین ویروس های گیاهی دارد و قادر به آلوده سازی ۶۹۸ گونه از ۱۶۷ جنس مربوط به ۷۱ خانواده گیاهی می باشد (Hull, 1969; Schmelzer *et al.*, 1973; Edwardson & Christie, 1997).

بیشتر گونه های گیاهی که توسط این ویروس آلوده می شوند از چهار خانواده Compositae، Umbelliferae، Leguminosae و Solanaceae می باشند. AIMV با دامنه میزبانی بسیار گسترده و انتقال از طریق بذر و شته، یکی از پاتوژن های مهم گونه های مختلف گیاهی است (Crill *et al.*, 1970; Smith, 1972; Miczynski & Hiruki, 1987). این ویروس از طریق شته (Weimer, 1931, 1934)، گونه های مختلف سس شامل *C. epilinum*، *C. europea*، *Cuscuta campestris* (Schmelzer *et al.*)، *C. subinclinosa* و *C. lupuliformis* Belli, 1962; Frosheiser, 1964; Zschau, 1973)، بذر (Janke, 1962) و غده های سیب زمینی آلوده (Oswald, 1950) قابل انتقال می باشد. معمولا علائم این ویروس بر روی گیاه سیب زمینی بصورت نکروز رگبرگها

و غده ها و زرد و ابلقی شدن برگ ها می باشد. در یک مطالعه ترادف نوکلئوتیدی ژن CP، هفت نژاد AIMV از ایتالیا (126A، 195 AN، F430 و Da) و فرانسه (Lye-80، Caa-1 و Dac-16) تعیین و با ترادف سایر نژاد های ALMV شامل 425M، 425L، YSMV، S، VRU، 15/64 و Da مقایسه گردید (Parrella *et al.*, 2000).

بر اساس این مقایسه، نژادهای این ویروس به دو گروه فرانسوی و ایتالیایی تقسیم شدند به طوری که نژادهای ایتالیایی در زیرگروه I (126A، 195 AN، F430، Da، 425L، 425M، YSMV و S) و نژاد های فرانسوی در زیر گروه II (80-Lye، Caa-1، Dac-16، VRU و 15/64) قرار گرفتند. علیرغم نظریه Codoner *et al.* (2005) مبنی بر استفاده از ترادف نوکلئوتیدی کل ژنوم در تعیین روابط فیلوژنتیک بین اعضای خانواده *Bromoviridae*، هنوز ناحیه CP در بررسی فیلوژنتیکی از اهمیت خاصی برخوردار بوده و بیشترین ترادف های موجود در بانک ژن مربوط به این ناحیه می باشد (Parrella *et al.*, 2000).

ویروس موزائیک یونجه برای اولین بار در ایران، در سال ۱۹۶۸ توسط Manouchehri-Kashani از روی گیاه یونجه از کرج، شیراز و ورامین گزارش شد. Kaiser & Danesh (1971) این ویروس را از نظر علائم، میزبان های ثانویه، خصوصیات بیولوژیکی، دامنه میزبانی، انتقال از طریق بذر و ناقل و تاثیر آلودگی این ویروس بر روی رشد و کاهش عملکرد بذر مورد بررسی قرار دادند. Mossahebi & Alizadeh (1974) موفق به تهیه آنتی سرم این ویروس گردیدند. همچنین Massoumi & Negarestani در سال ۱۹۹۵ برای اولین بار این ویروس را از مزارع یونجه کرمان گزارش کردند.

بررسی پراکنش ویروس موزائیک یونجه با استفاده از آزمون Das-ELISA نشان داد که مزارع یونجه، سیب زمینی و گوجه فرنگی در مناطق شمالی و مرکزی استان خراسان به این ویروس آلوده بوده و میانگین درصد آلودگی در مناطق مورد بررسی ۵۳ درصد مشخص گردید (Zeynaddini *et al.*, 2005). از آنجایی که سطح زیرکشت یونجه در استان کرمان با حدود ۴۲۹۳۷ هکتار از اهمیت خاصی برخوردار بوده (Anonymous, 2009) و

خالص سازی بیولوژیک

با توجه به دامنه میزبانی و علائم متفاوت این ویروس در ارقام مختلف یونجه، شرایط آب و هوایی متفاوت در مناطق نمونه برداری شده و محدودیت آنتی سرم های مورد استفاده در آزمون الایزا، ابتدا خالص سازی بیولوژیکی بر روی جدایه های این ویروس انجام گردید. به این منظور از ارقام مختلف لوبیا از جمله رقم Bountiful استفاده گردید. سپس از لکه های موضعی، جهت تکثیر ویروس بر روی میزبان های تکثیری از جمله *N. tabacum* cv. Samsun و *N. tabacum* cv. Turkish استفاده گردید.

تعیین دامنه میزبانی

جهت تعیین دامنه میزبانی، هفت جدایه (پنج جدایه از روی یونجه در مناطق شهراباک، سیرجان، کرمان، بافت و بردسیر و دو جدایه از روی سیب زمینی بردسیر) انتخاب شدند و در شرایط گلخانه بر روی گیاهان محک متعلق به خانواده های Leguminosae، Cucurbitaceae، و Solanaceae مایه زنی گردیدند. برای این منظور از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH ۷/۴ و پودر کاربوردوم با مش ۶۰۰ استفاده گردید. گیاهان مایه زنی شده در شرایط گلخانه در دمای °C ۲۵-۲۰ و رطوبت نسبی ۷۰-۶۰ درصد و نور مناسب نگهداری و از نظر ظهور علائم بطور مرتب مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تأیید نتایج حاصله، کلیه بوته های مایه زنی شده توسط آزمون الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین به منظور تکثیر و نگهداری ویروس از ارقام مختلف توتون از جمله *Nicotiana tabacum* L. cv. Turkish، *N. tabacum* L. cv. Samsun NN، *N. glutinosa* L.، *N. debneyii* L.، *N. clevelandii* Gray و *N. tabacum* L. cv. White burly استفاده گردید.

واکنش RT-PCR

به منظور بررسی های مولکولی، تعداد چهار جدایه (سه جدایه از روی یونجه در مناطق شهراباک، سیرجان و بردسیر و یک جدایه از روی سیب زمینی بردسیر) براساس تنوع علائم بر روی گیاهان محک و منطقه نمونه برداری (جدول ۲)، انتخاب و استخراج آران.ا کل با استفاده از کیت High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Germany) انجام گرفت. تکثیر چارچوب ژنی

در بعضی از مناطق استان از جمله لاله زار بردسیر نیز سطح زیرکشت سیب زمینی قابل توجه می باشد، لذا در این بررسی سعی گردیده است که آلودگی مزارع یونجه و سیب زمینی در مناطق مختلف استان نسبت به AIMV مورد بررسی قرار گیرد. همچنین وضعیت تکاملی چهار جدایه AIMV از مزارع یونجه و سیب زمینی مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

نمونه برداری

به منظور شناسایی و بررسی ویروس موزائیک یونجه، طی سالهای ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ از تعدادی مزارع یونجه واقع در مناطق مختلف استان کرمان شامل کرمان، جیرفت، کهنوج، شهراباک، بافت، سیرجان، بردسیر و بم و مزارع سیب زمینی منطقه لاله زار بردسیر نمونه برداری به عمل آمد.

تعداد ۵۱۴ نمونه یونجه و ۶۶ نمونه سیب زمینی از گیاهانی که دارای علائم مشکوک به آلودگی با AIMV شامل موزائیک، موزائیک زرد روشن (ابلقی)، موزائیک خفیف، زردی، تاوولی، بدشکلی و پیچیدگی برگها بودند، انتخاب گردیدند. نمونه های مورد نظر جهت انجام آزمون سرولوژیکی الایزا و آزمون RT-PCR به آزمایشگاه منتقل و در دمای °C ۴ سانتی گراد نگهداری شدند.

آزمون الایزا

آزمون الایزا به روش غیر مستقیم با استفاده از آنتی بادی چند همسانه ای (با رقت ۱:۱۰۰۰)، اهدایی دکتر فیل جونز (IACR-Rothamsted Harpenden, Herts, UK)، صورت گرفت.

نتایج حاصل از آزمون الایزا بر اساس تغییر رنگ چاهک ها و میزان جذب آنها در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا خوان مدل (Biotek Instrument EL800, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (شاهد منفی) و با استفاده از فرمول $\bar{x} + 3SD$ آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید.

در این فرمول \bar{x} میانگین جذب و SD انحراف معیار استاندارد در مورد چاهک های نمونه سالم منظور گردید (Clarck & Adams, 1997).

CP جدایه های انتخاب شده با روش RT-PCR و با استفاده از جفت آغازگرهایی که توسط Xu & Nie (2006) طراحی شده اند (جدول ۱) انجام شد.

جدول ۱- جفت آغازگر مورد استفاده جهت تکثیر چارچوب ژنی پروتئین پوششی (CP) جدایه های ویروس موزائیک یونجه (Xu & Nie, 2006)

نام آغازگر	توالی آغازگرها 5' → 3'	موقعیت ژنومی 5' → 3'	طول قطعه تکثیر شده
ALMV-F30F	CATTGATCGGTAATGGGCCGT	1121-1158*	780 bp
ALMV-F 30R	ATCCACCCAGTGGAGGTCAGCA	1894- 1916	

*موقعیت ژنومی 3' → 5' آغازگرها براساس رس شمار، NC-002025 موجود در بانک ژن

به مدت ۹۰ ثانیه انجام و در انتها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C تکمیل ساخت رشته ثانویه انجام گرفت. جهت انجام الکتروفورز محصول PCR، از ژل آگاروز ۱/۵ درصد و بافر 1X TBE (Tris Boric Acid EDTA) استفاده گردید. سپس جهت بررسی، ژل در دستگاه Gel documentation مدل Bio-Doc (Biometra, Germany) قرار داده شد. پس از حصول اطمینان از تکثیر قطعه مورد انتظار، محصول PCR نمونه های انتخابی جهت همسانه سازی مورد استفاده قرار گرفتند.

همسانه سازی و تعیین ترادف

همسانه سازی با استفاده از کیت Ins T/A Clone PCR Product Cloning Kit (Fermentase, Lithuania) در حامل PTZ57R/T و باکتری *Escherichia coli* سویه DH5 α صورت گرفت. استخراج پلاسمید نو ترکیب از باکتری توسط High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Germany) انجام گرفت (Brown, 2001). نمونه های همسانه سازی شده، پس از هضم آنزیمی، الکتروفورز و اطمینان از الحاق محصول PCR در حامل، جهت تعیین ترادف به کمپانی Macrogen در کشور کره جنوبی ارسال گردیدند. پس از تعیین ترادف نتایج به دست آمده با فرمت الکتروگرام Chromas Chromas Version 1.41 مورد بررسی قرار گرفتند. ترادف های بدست آمده در این بررسی با ترادف قطعه مورد نظر از جدایه های مختلف ویروس موجود در بانک

جهت سنتز cDNA ابتدا دو میکرولیتر آر.ان.ا. کل با دو میکرولیتر آغازگر پسر AIMV-F30R (با غلظت 10 μ M) و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به لوله ها اضافه و به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار داده شدند. سپس لوله ها بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد و سایر مواد لازم برای انجام این مرحله از آزمون (۴/۵ میکرولیتر 5X RT buffer، دو میکرولیتر 10 dNTPmix mM ۰/۵، میکرولیت RNase inhibitor 10U/ μ l، و یک میکرولیتر MMLV 200U/ μ l)، به مخلوط اضافه شد. سپس لوله ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲°C و در مرحله آخر نیز به منظور حذف آنزیم RT به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفتند. آزمون PCR پس از اضافه نمودن مواد مورد نیاز (شامل ۲/۵ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase 5U/ μ l، ۰/۵ میکرولیتر از دو آغازگر ALMV-F30F و ALMV-F30R با غلظت 10 μ M، ۰/۵ میکرولیتر MgCl₂ 50mM، ۰/۵ میکرولیتر dNTP mix 10 mM، ۲/۵ میکرولیتر 10x PCR Buffer و ۱۷/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل) در لوله مخلوط و در دستگاه ترموسایکلر Techne مدل TC-132 (Cambridge, UK) قرار داده شد. واسرشتی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴°C انجام و PCR در طی ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشت سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸°C و ساخت رشته ثانویه در ۷۲°C

ژن NCBI (جدول ۲) مقایسه گردیدند. همچنین همردیف سازی چندگانه (multiple alignment) با برنامه های MEGA3.1 و DNAMAN Version 4.02 انجام و درخت فیلوژنتیکی حاصل به روش neighbor joining ترسیم شد. (Kumar *et al.*, 2004)

جدول ۲- مشخصات جدایه های ALMV مورد مطالعه در این تحقیق و جدایه های موجود در بانک ژن جهت مقایسه و مطالعات فیلوژنتیکی.

میزبان	نام جدایه	منطقه	رس شمار در بانک ژن
یونجه	Ke. Sh. Al ^a	شهرابک	JQ685858
یونجه	Ke. Ba. Al	بردسیر	JQ673587
یونجه	Ke. Si. Al	سیرجان	JQ685859
سیب زمینی	Ke. Ba. Po	بردسیر (کشتاب)	JQ685860
گوجه فرنگی	Lye 80	فرانسه	AJ130703
خرغه	126 A	ایتالیا	AJ130704
گوجه فرنگی	195 AN	ایتالیا	AJ130705
لوبیا	F 430	ایتالیا	AJ130706
فلفل	Caa 1	فرانسه	AJ130707
هویج	Dac 16	فرانسه	AJ130708
گوجه فرنگی	Lyh 1	فرانسه	AJ130709
Garden Lupin	VRU	انگلستان	AF015716
Garden Lupin	15/64	انگلستان	AF015717
شبدر	425 Madison	آمریکا	K02703
شبدر	425 L	آمریکا	L00162
یونجه	YSMV	آمریکا	M59241
گوجه فرنگی	Danza	ایتالیا	Y09110
یونجه	S	انگلستان	X00819

^a مبنای نام گذاری جدایه های ایرانی به ترتیب براساس استان نمونه برداری شده، منطقه نمونه برداری شده و میزبان نمونه برداری شده می باشد. به عنوان مثال Ke. Sh. Al جدایه جمع آوری شده از منطقه شهرابک در استان کرمان از روی گیاه یونجه می باشد.

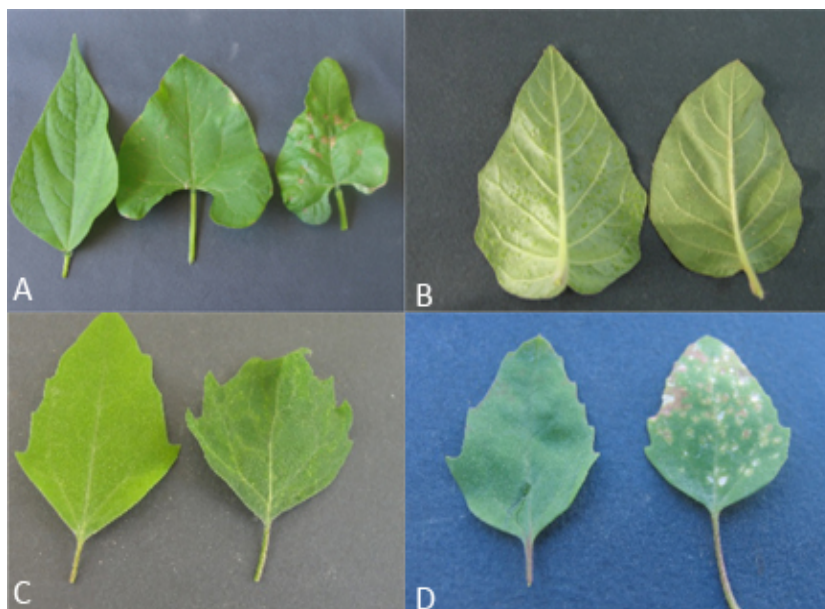
نتایج

نسبت به آنتی سرم AIMV واکنش نشان دادند. سپس از هر منطقه نمونه ای که بیشترین غلظت ویروس را در الایزا نشان داده بود، انتخاب و با توجه به محدودیت آنتی سرم های مورد استفاده در این آزمون، خالص

نتایج حاصل از آزمون الایزا نشان داد که در میان ۵۱۴ نمونه یونجه و ۶۶ نمونه سیب زمینی مورد بررسی ، به ترتیب ۱۶۲ نمونه (۳۱/۳٪) و ۸ نمونه (۱۲/۱۲٪)

N. tabacum cv. *N. tabacum* L. cv. Turkish
N. clevelandii *N. glutinosa* L., Samsun NN.
N. tabacum L. cv. White *N. debneyii* L., Gray.
 burly، و *Datura maxima* L. علائم بسیار متنوعی
 شامل موزائیک در شدت‌های مختلف، موزائیک همراه
 با زردی (ابلقی)، بدشکلی، از بین رفتن قسمتی از
 کلروفیل و تاولی شدن برگ، روشن شدن و نواری شدن
 رگبرگ‌ها و در مواردی ایجاد نقوش حلقوی و لکه‌های
 موضعی نکروز مشاهده گردید (اشکال A-۲ و B).

سازی بیولوژیکی با استفاده از ارقام مختلف لوبیا
 مخصوصاً رقم Bountiful بر روی این جدایه انجام گرفت.
 علائم ایجاد شده بر روی این گیاه محک بصورت لکه
 های موضعی قرمز رنگ بعد از ۳-۴ روز پس از مایه زنی
 مشاهده گردید (شکل ۱- A). در گیاهان مایه زنی شده
 متعلق به خانواده *Chenopodiaceae* از جمله
Chenopodium amaranticolor Coste et Reyn و *C.*
quinoa Wild علائم ویروسی بصورت ایجاد لکه‌های
 موضعی نکروز و در مواردی بصورت علائم سیستمیک
 مشاهده شدند. در گیاهان خانواده *Solanaceae* از جمله



شکل ۱- A) ایجاد لکه‌های موضعی قرمز رنگ در لوبیا سبز و لوبیا چیتی مایه زنی شده با جدایه‌های مختلف ویروس موزائیک
 یونجه (به ترتیب از راست به چپ جدایه Ke. Si. Al, Ke. Ba. Al و شاهد، B) ایجاد علائم توت‌ای بر روی داتوره (*Datura*
maxima) مایه زنی شده با جدایه Ke. Si. Al (سمت چپ) در کنار گیاه شاهد (راست)، C) بدشکلی و سیستمیک شدن ویروس در
 سلمه تره (*Chenopodium amaranticolor*) مایه زنی شده با جدایه Ke. Sh. Al (راست) در کنار گیاه شاهد (چپ)، D) ایجاد
 لکه‌های موضعی نکروز در گیاه سلمه تره (*C. amaranticolor*) مایه زنی شده با جدایه Ke. Ke. Al (راست) در کنار گیاه شاهد
 (چپ).

جدایه مجزا شده این ویروس از مزارع شهرستان‌های
 سیرجان و بردسیر (Ke. Si. Al و Ke. Ba. Al) به ترتیب
 علائم توت‌ای در پشت برگ‌ها و رگبرگ‌های نواری مشاهده
 گردید (شکل ۲- C).

مطالعات مولکولی بر روی تعداد چهار جدایه این
 ویروس انجام شد. در مورد انجام واکنش RT-PCR
 جدایه‌های ALMV با استفاده از جفت آغازگر

در حالیکه در گیاهان متعلق به خانواده
Cucurbitaceae از جمله *Cucurbita pepo* L. cv. Maragheh, Khoy
 و *C. pepo* L. cv. Peto Seed هیچ گونه علائمی مشاهده
 نگردید. علائم جدایه‌های ایرانی بر روی داتوره (*D.*
maxima) بصورت ایجاد لکه‌های موضعی بود (شکل ۱- B)
 که پس از مدتی علائم محو می‌شوند و تنها در مورد دو

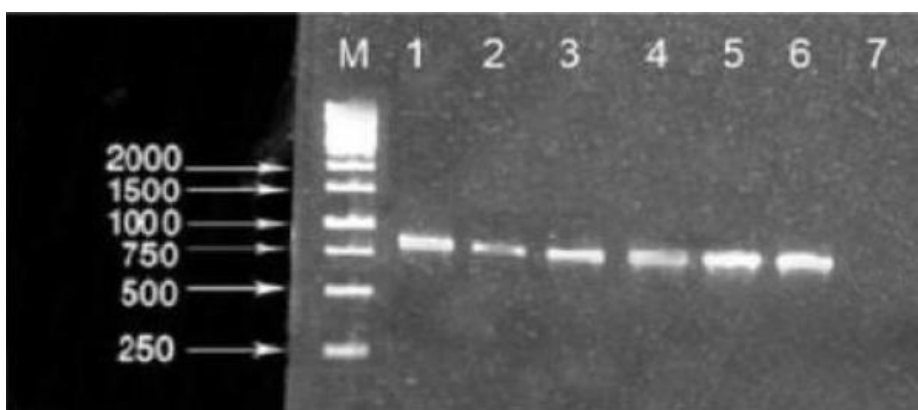
اختصاصی ALMV-F30F و ALMV-F30R منجر به تکثیر قطعه ای به طول ۷۸۰ جفت باز گردید (شکل ۳).



شکل ۲- A) علائم بدشکلی، تاوولی شدن و موزائیک شدید همراه با لکه های نکروز در *Nicotiana tabacum* cv. Samsun مایه زنی شده با جدایه های مختلف ویروس موزائیک یونجه (به ترتیب از راست به چپ: شاهد، جدایه های Ke. Sh. Al, Ke. Si. Al, Ke. Ke. Al) ، علائم موزائیک شدید همراه با لکه های نکروز در *N. tabacum* cv. Turkish مایه زنی شده با جدایه Ke. Si. Al (سمت چپ) در کنار شاهد (راست)، علائم ایجاد لکه های موضعی نکروز (سمت راست) و رگبرگ نواری شدید (وسط) بر روی گیاه داتوره (*Datura maxima*) مایه زنی شده با جدایه Ke. Ba. Al در مقایسه با گیاه شاهد (چپ).

DNAMAN Version همردیف سازی چندگانه انجام گرفت.

ترادف قطعات تکثیر شده با ترادف ناحیه متنظر از دو جدایه های مورد بررسی توسط Parrella *et al.* (2000) (جداول ۲) با استفاده از نرم افزار 4.02



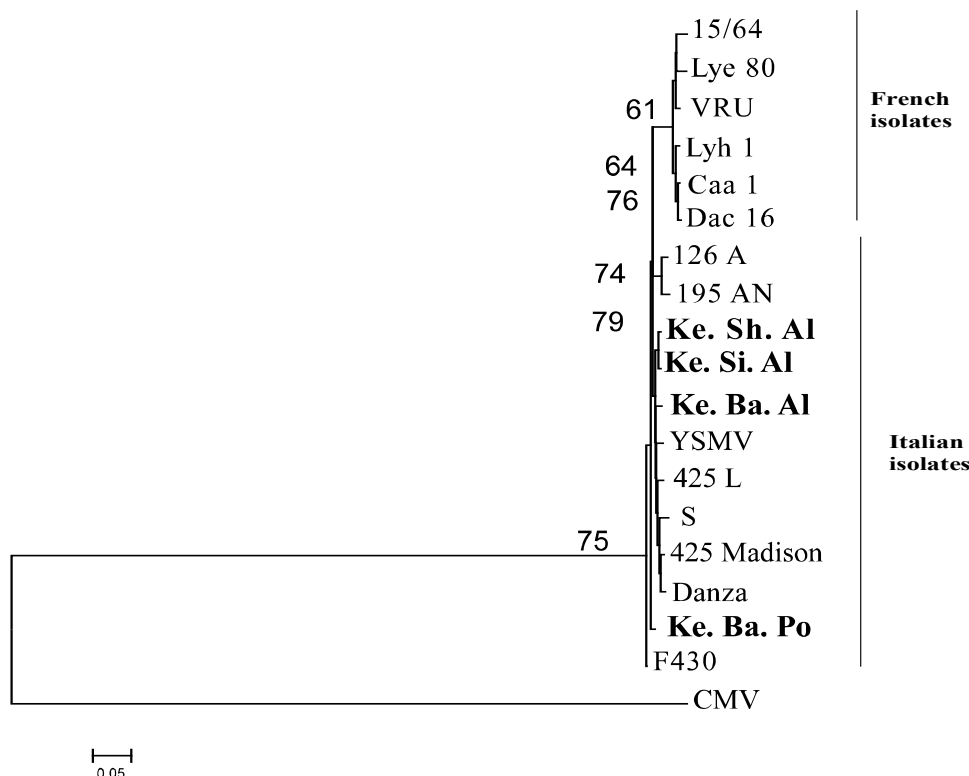
شکل ۳- نفوس الکتروفورزی محصول PCR مربوط به تکثیر ژن پروتئین پوششی شش جدایه ویروس موزائیک یونجه در ژل آگاروز ۱/۵ درصد. M) نشانگر اندازه دی.ان.ا، DNA 1Kb Ladder (Gen Ruler™ Fermentase, lithuania) (۱) Ke. Ke. Al (۲) Ke. Sh. Al (۳) Ke. Ba. Al (۴) Ke. Ji. Al (۵) Ke. Ba. Po (۶) Ke. Si. Al (۷) گیاه شاهد

(۹۲/۹) بین جدایه ایرانی Ke. Si. Al و 80 Lye از کشور فرانسه می باشد. براساس مقایسه و همردیف سازی ترادف اسیدآمینیه های ترجمه شده از ترادف نوکلئوتیدی پروتئین پوششی جدایه های ایرانی و جدایه های موجود در بانک ژن، درصد تشابه اسیدهای آمینه جدایه های ایرانی با سایر جدایه ها حدود ۱۰۰-۹۱/۹٪ می باشد. کمترین درصد تشابه اسیدهای آمینه (۹۱/۹٪) مربوط به

همچنین براساس درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش neighbor joining با استفاده از نرم افزار MEGA3.1 (Kumar *et al.*, 2004) (شکل ۴)، همگی جدایه های ایرانی در گروه ایتالیایی قرار می گیرند و درصد تشابه بین آنها ۹۸/۳-۹۲/۹ می باشد، ضمناً بیشترین درصد تشابه (۹۸/۳) بین جدایه ایرانی Ke. Ba. Po و F430 از کشور ایتالیا و کمترین درصد تشابه

Al با جدایه S از کشور انگلستان می باشد.

جدایه Ke. Si. Al با جدایه Lye 80 از کشور فرانسه و بیشترین درصد تشابه (۱۰۰٪) مربوط به جدایه Ke. Sh.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه های ویروس موزائیک یونجه مربوط به استان کرمان و جدایه های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA3.1 و روش neighbor joining (با bootstrap ۱۰۰۰). مشخصات جدایه ها در جدول ۲ ذکر شده است.

میزبانی جدایه های مورد بررسی، مشخص گردید که علائم ایجاد شده بر روی گیاهان محک مختلف در اغلب موارد شبیه علائم گزارش شده توسط *et al.* (2005) Zeynaddini می باشد، به نحوی که مایه زنی مکانیکی جدایه ای از این ویروس توسط نامبرده، موجب بروز لکه های موضعی در *C. quinoa*، *C. P. vulgaris* cv. و *V. unguiculata amaranticolor* Red kidney و علائم سیستمیک رگبرگ روشنی و موزائیک در *N. glutinosa* Samsun، *N. tabacum* cv. ، *Cicer arietinum*، *Ocimum basilicum*، و *Lycopersicon esculentum* گردید. در مورد گیاه *Cucumis sativus* مایه زنی شده با جدایه های مورد بررسی در این تحقیق هیچ گونه علائمی ظاهر نگردید. همچنین در این مطالعه، بعد از مایه زنی دو

بحث

براساس نتایج بدست آمده در این بررسی که بر روی ۵۱۴ نمونه یونجه و ۶۶ نمونه سیب زمینی حاوی علائم صورت گرفت، ویروس موزائیک یونجه در مناطق یونجه کاری استان کرمان از گسترش بالایی (میزان ۳۱/۳٪ آلودگی) در مقایسه با مزارع سیب زمینی (میزان ۱۲/۱۲٪ آلودگی) برخوردار می باشد. در مورد بررسی دامنه میزبانی جدایه های ایرانی مشخص گردید که فقط مایه کوبی جدایه Ke. Ba. Al بر روی *C. amaranticolor* منجر به ایجاد علائم بدشکلی در برگها و بر روی *D. maxima* لکه های موضعی و سپس سبب رگبرگ نواری شدید گردید، در حالیکه مایه کوبی سایر جدایه های مورد بررسی در این تحقیق، بر روی این گیاهان، علائمی ایجاد نکرد. همچنین در مورد دامنه

می باشند. موطن اصلی یونجه، ایران و جنوب غربی آسیاست و در ۴۷۰ سال قبل از میلاد مسیح از ایران به یونان و سپس از آنجا به ایتالیا و سایر کشورها منتقل گردیده است (Karimi, 1988). در مجموع به نظر می رسد که ویروس ALMV از دیرباز در ایران وجود داشته است (Hull, 1969)، اما با انتقال آن به نقاط مختلف دنیا، ژنوتیپ های مختلف ALMV به آنجا وارد شده و در طی سالها در کنار یکدیگر بصورت ترکیبی از ژنوتیپ های مختلف درآمدند. با توجه به برداشت یونجه در چین های مختلف در سال و امکان انتقال ژنوتیپ های مختلف ویروس از طریق مکانیکی و یا حشرات ناقل، تجمع ژنوتیپ های متنوع در طی زمان و تغییرات احتمالی در اثر انتقال توسط شته های ناقل و اثر گیاهان میزبان، دور از انتظار نمی باشد. لازم به ذکر است که اگر چه بهترین راه جهت مطالعه تنوع ژنتیکی استفاده از ژنوم کامل می باشد، اما با توجه به چند قسمتی بودن ژنوم ALMV، تعیین ترادف کامل ژنوم بسیار مشکل و وقت گیر است.

بنابراین علیرغم اینکه در ژنوم ALMV بیشترین مطالعه در مورد ژن پروتئین پوششی صورت گرفته است اما به نظر می رسد که استفاده از چندین ناحیه از ژنوم جهت بررسی تغییرات ژنتیکی مفیدتر باشد، زیرا این روش تصویر بهتری از کل ژنوم را ارائه می نماید (Codoner *et al.*, 2005). بر اساس این بررسی و بررسی های قبلی (Massoumi & Negarestani, 1995; Bananej *et al.*, 1995; Kaiser *et al.*, 1971; Manouchehri-Kashani, 1968) این ویروس از گسترش بالائی در مزارع یونجه ایران برخوردار می باشد و بر این اساس به نظر میرسد دارای دامنه میزبانی وسیعی بر روی علفهای هرز و همچنین سایر گیاهان زراعی از قبیل سیب زمینی (Danesh *et al.*, 1986; Massoumi Shahrehabak & Kaiser *et al.*, 1991) و حبوبات (Mosahebi-Mohammadi, 1991) و غیره دارد. (Danesh & Kaiser, 1968; *al.*)

اگرچه وجود آلودگی در مزارع سیب زمینی و حبوبات نسبت به این ویروس به اثبات رسیده است، اما مطالعات در مورد میزان آلودگی علف های هرز موجود در مزارع یونجه که احتمالا در گسترش این ویروس نقش دارند لازم و ضروری می باشد. ضمناً ارقام بومی متعددی از

جدایه Ke. Ba. Al و Ke. Si. Al از چهار جدایه مورد بررسی بر روی گیاه داتوره، علائمی بصورت توتیه ای و لکه های نکروز ایجاد گردید، در حالیکه دو جدایه دیگر این ویروس (Ke. Sh. Al و Ke. Ba. Po) هیچ گونه علائمی بر روی این گیاه ایجاد نمودند. نتایج حاصل از بررسی و تعیین پراکنش این ویروس در کشور عمان نشان دهنده گسترش وسیع این ویروس و تایید علائم مذکور می باشد (Zadjali *et al.*, 2002). براساس درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر مبنای ژن CP، جدایه های این ویروس به دو گروه فرانسوی و ایتالیایی تقسیم بندی می گردند. کمترین و بیشترین میزان مشابهت ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی در این دو گروه به ترتیب ۹۸/۳-۹۲/۹ و ۹۱/۹-۱۰۰ درصد می باشد. در این بررسی چهار جدایه ایرانی همگی در گروه جدایه های ایتالیایی واقع گردیدند، اما بین جدایه های مجزا شده از گیاهان یونجه، تنها جدایه ایرانی Ke. Ba. Po از گیاه سیب زمینی از نظر تشابه نوکلئوتیدی به میزان ۹۷/۸٪ با بقیه جدایه ها تفاوت دارد، این در حالی است که درصد تشابه نوکلئوتیدی در بین جدایه های مجزا شده از گیاه یونجه، ۹۸/۵-۹۹/۳ درصد می باشد و این موضوع بیانگر آنست که میزبان می تواند در تمایز نوع جدایه موثر باشد.

بعلاوه اینکه جدایه Ke. Ba. Po مجزا شده از گیاه سیب زمینی از نظر تشابه نوکلئوتیدی، بیشتر به نژاد F430 گزارش شده از کشور ایتالیا نزدیکتر می باشد. در این مطالعه تنها دو جدایه Ke. Si. Al و Ke. Ba. Al از چهار جدایه مورد بررسی بر روی گیاه داتوره، ایجاد علائم نمودند. بر این اساس و با توجه به نتایج مولکولی و واکنش این جدایه ها بر روی گیاه داتوره می توان بیان نمود که ظاهراً هیچگونه همبستگی بین ژنوتیپ ویروس و علائم ایجاد شده بر روی این گیاه محک مشاهده نمی گردد. به عبارت دیگر، جدایه ها صرفاً بر اساس واکنش بر روی گیاه محک داتوره قابل تفکیک نیستند. لازم به ذکر است که تفکیک جدایه ها به دو گروه ایتالیایی و فرانسوی مربوط به مطالعات اولیه مولکولی این ویروس بوده است و اخیراً با افزایش جدایه های گزارش شده در دنیا این گروه بندی در حال تغییر می باشد، به نحویکه جدایه هائی وجود دارند که از این دو گروه مجزا

یونجه در ایران وجود دارند که وضعیت مقاومت آنها نسبت به این ویروس می بایست مورد بررسی قرار گیرد.

REFERENCES

- Ahlquist, P. (1994) Bromoviruses. In R. G. Webster & A. Graniff, (Eds), *Encyclopedia of virology*, Vol. 1.. Academic Press, San Diego, CA.
- Anonymous, (2009). Statistics of Agriculture. 2007-2008 growth season. *Jahad-e Agriculture Press*. Retrived August 15, 2010, from <http://www.Agrijahad.kr.ir>.
- Bananej, K., Mosahebi, G. H., Okhovat, M. & Ghorbani, S. (1995). Identification of *Alfalfa mosaic* (ALMV), *Cucumber mosaic* (CMV), *Bean common mosaic* (BCMV) and *Bean yellow mosaic* (BYMV) viruses in alfalfa fields in Karaj, Iran. In: *Proceeding of the 12th Iranian Plant Protection Congress*, September 2-7, Karaj, Iran, p. 95.
- Belli, G. (1962). Notes and experiments on the transmission of *Lucerne mosaic virus* through the seed and demonstration of its exclusion from clones of virus infected vines. *Review of Applied Mycology*, 42, 431. (Abstr.).
- Brown, T. A. (2001). *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Clark, M. F. & Adams, S. A. N. (1997). Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34:475-483.
- Codoner, F. M., Cuevas, J. S., Sanchez-Navarro, J. A., Pallas, V. & Elena, S. F. (2005). Molecular evolution of the plant virus family *Bromoviridae* based on RNA3 encoded proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 61, 697-705.
- Crill, P., Hagedorn, D. J. & Hanson, E. W. (1970). Incidence and effect of ALMV on alfalfa. *Phytopathology*, 60, 1432-1435.
- Danesh, D. & Kaiser, W. J. (1969). Chickpea virus diseases in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 5(2), 16.
- Danesh, D., Dehghan, M., Naderi, A. & Afshari, M. (1986). Two new hosts of *Alfalfa mosaic virus* in Iran. In: *Proceedings of the Eighth Plant Protection Congress of Iran*, August 30-September 4, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran, p. 114.
- Dore, J. M., Van Dun, C. M. P., Pink, L. & Bol, J. F. (1991). *Alfalfa mosaic virus* RNA3 mutants do not replicate in transgenic plants expressing RNA3-specific genes. *Journal of General Virology*, 72, 253-258.
- Edwardson, J. R. & Christie, R. G. (1997). *Virus infecting peppers and others solanaceous crops*. Volume 1. University of Florida Agricultural Experiment Station. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, Gainesville, Florida. PP. 5-50.
- Frosheiser, F. L. (1964). *Alfalfa mosaic virus* transmitted through alfalfa seed. *Phytopathology*, 54, 893(Abstr.).
- Frosheiser, F. L. (1969). Variable influence of *Alfalfa mosaic virus* strains on growth and survival of alfalfa and on mechanical and aphid transmission. *Phytopathology*, 59: 857- 862.
- Frosheiser, F. L. (1974). Alfalfa mosaic virus transmission to seed through alfalfa gametes and longevity in alfalfa seed. *Phytopathology*, 64: 102– 105.
- Gibbs, A. J. & Tinsley, T. W. (1961). *Lucerne mosaic virus* in Great Britain. *Plant Pathology*, 10,61-63.
- Hiruki, C. & Hampton, R. O. (1990). Alfalfa Mosaic. In: , (Eds.): Stuteville, D. L. and Erwin, D. C. *Compendium of Alfalfa Diseases 2nd Edition*, APS Press, St. Paul, PP. 54.
- Hull, R. (1969). *Alfalfa mosaic virus*. *Advances in Virus Research*, 15, 365 – 433.
- Jaspars, E. M. J. & Bos, L. (1980). *Alfalfa mosaic virus*. *AAB Description of Plant Viruses*, No. 229.
- Kaiser, W. J., Danesh, D., Okhovat, M. & Mossahebi, Gh. (1968). Diseases of pulse crops (edible legumes) in Iran. *Plant Disease Reporter*, 25, 678-691.
- Kaiser, W. J. & Danesh, D. (1971). Biology of four viruses affecting *Cicer arietinum* in Iran. *Phytopathology*, 61, 372-375.
- Kaiser, W. J., Mossahebi, G. H. & Okhovat, M. (1971). Alternate hosts of viruses affecting food legumes in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 7(2), 85.
- Karimi, H. (2005). *Agronomy and plant breeding of forage plants*. Tehran University Press. (In Farsi).
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3.1: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150-163.
- Langereis, K., Mugnier, M. A., Cornelissen, B. J. C., Pinch, L. & Bol, J. F. (1986). Variable repeats and poly (A)-stretches in the leader sequence of *Alfalfa mosaic virus* RNA 3. *Virology*, 154, 409-414.
- Manouchehri-Kashani, A. (1968). *Virus diseases of plants*. Tehran University Press, 194 pp.

27. Massumi, H. & Negarestani, M. (1995). *Alfalfa mosaic virus* distribution in alfalfa fields in Kerman province. In: Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress, September 2-7, Karaj, Iran, p. 98.
28. Massoumi Shahrehabakh, H. & Mosahebi-Mohammadi, G. H. (1991). Investigation on *Alfalfa mosaic virus* isolates on potatoes in Karaj, Damavand, Varamin and Hamedan areas. In: Proceedings of the 10th Plant Protection Congress of Iran, September 1-5, Kerman, Iran, p. 177.
29. Miczynski, K. A & Hiruki, C. (1987). Effect of *Alfalfa mosaic virus* on the yield and regeneration of alfalfa at different growth temperature, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 9, 49- 55.
30. Mossahebi, G. H. & Alizadeh, A. (1974). A study on the purification and preparation of *Alfalfa mosaic virus* (ALMV) antiserum. In: Proceedings of the 1th Plant Medicine Congress of Iran, September 7-11, Azarbadagan University, Tabriz, Iran, p. 65.
31. Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabriel, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. (1995). *Virus Taxonomy, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer- Verlag New York,.
32. Oswald, J. W. (1950). A strain of *Alfalfa mosaic virus* causing vine and tuber necrosis in potato. *Phytopathology*, 40, 973-991.
33. Parrella, G., Lanave, C., Marchouz, G., Sialer, M. M. D., Fronko, A. & Gallitelli, D. (2000). Evidence for two distinct subgroups of *Alfalfa mosaic virus* (ALMV) from France and Italy and their relationships with other ALMV strains (brief report). *Archives of Virology*, 145, 2659-2667.
34. Schmelzer, K., Sghmidt, H. B. & Beczner, L. (1973). Spontanne wirtspflanzen des luzernemosaik-virus. *Biologie Zentralbl*, 92, 211-227.
35. Smith, K. M. (1972). *A text book of plant virus diseases* (3rd ed.). Academic Press, New York.
36. Tu, J. C. & Holmes, T. M. (1980). Effect of *Alfalfa mosaic virus* infection on nodulation, forage yield, forage protein and overwintering of alfalfa. *Phytopathology*, 97, 1-9.
37. Van Der Vossen, E. A. G., Neelman, L. & Bol, J. F. (1993). Role of the 5' leader sequence of *Alfalfa mosaic virus* RNA3 in replication and translation of the viral RNA. *Nucleic Acids Research*, 21: 1361-1367.
38. Weimer, J. L. (1931). *Alfalfa mosaic virus*. *Phytopathology*, 21, 122 – 123.
39. Weimer, J. L. (1934). Studies on *Alfalfa mosaic virus*. *Phytopathology*, 24, 239 – 247.
40. Xu, H. & Nie, J. (2006). Identification, characterization and molecular detection of *Alfalfa mosaic virus* in potato. *Phytopathology*, 96, 1237-1242.
41. Zadjali, A. D., Matrooshi, A. R. & Moghal, S. M. (2002). Occurrence, distribution and properties of *Alfalfa mosaic virus*. *Agricultural Sciences*, 7, 47-51.
42. Zaumeyer, W. J. (1963). Two new strains of *Alfalfa mosaic virus* systemically infections to bean. *Phytopathology*, 53, 444 – 449.
43. Zeynaddini, A., Jafarpour, B. & Flahaty Rastegar, M. (2005). Study of *Alfalfa mosaic virus* in central and northern regions of Khorasan province. *Journal of Science and Technology Agricultural and Natural Resource*, 2, 147-152 (In Farsi).
44. Zschau, K. & Janke, C. (1962). Samenübertragung des luzerne-mosaikvirus an luzerne. *NachrBl. Dtsch. PFLSchDienst*. 16, 94-96.