

پراکنش و تنوع ژنتیکی جدایه های ویروس تریستزای مرکبات (citrus tristeza virus) در استان کرمان

Distribution and genetic diversity of citrus tristeza virus isolates in Kerman province

سمیه احمدی*، علیرضا افشاریفر**، علی نیازی و کرامت اله ایزدپناه

بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز و پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه
شیراز

پذیرش ۱۳۸۷/۱/۲۸

دریافت ۸۶/۴/۱۲

چکیده

علیرغم گسترش ویروس تریستزا در بعضی مناطق شمالی و جنوبی کشور، اطلاعات چندانی از وضعیت این ویروس در استان کرمان و تنوع ژنتیکی جدایه های آن در دست نمی باشد. در این تحقیق علاوه بر مطالعه پراکنش ویروس تریستزای مرکبات (*Citrus tristeza virus*, CTV) در چهار منطقه مرکبات خیز استان کرمان شامل جیرفت، بم، حسین آباد، ارزوئیه و حومه، تنوع ژنتیکی جدایه های ویروس مورد بررسی قرار گرفت. آران ای کل از پوست ساقه و رگبرگ اصلی برگ مرکبات استخراج و جهت تکثیر دو قطعه از ژنوم CTV (ژن پروتئین پوششی و ناحیه K17 ژن پلیمراز) در نسخه برداری معکوس و سپس واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بکار برده شد. به منظور تعیین پراکنش ویروس در چند منطقه مهم استان کرمان از آزمون الیزا استفاده گردید. بر اساس نتایج بدست آمده از ۲۰۳ نمونه جمع آوری شده از چهار منطقه استان کرمان بیش از نیمی از آن ها به ویروس آلوده بودند. میزان آلودگی در نمونه های جیرفت، بم، حسین آباد و * قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه شیراز با کمک مالی

قطب علمی ویروس شناسی

** مسئول مکاتبه

۳۵۴ احمدی و همکاران: پراکنش و تنوع ژنتیکی جدایه های ویروس تریستزای مرکبات ...

ارزوئیه به ترتیب ۶۰، ۵۶، ۵۰ و ۴۵ درصد بود. نتایج حاصل از پی سی آر بیانگر تکثیر قطعات مورد انتظار (۶۷۲ و ۴۰۹ جفت باز به ترتیب برای ژن پروتئین پوششی و ناحیه K17 ژن پلیمرز) در اکثر جدایه ها بود. قطعات دی.ان.ای حاصل از پی سی آر جدایه های مختلف ویروس همسانه سازی و سپس تعیین ترادف گردیدند. مقایسه ترادف های بدست آمده با اطلاعات موجود در بانک ژن نشان داد که ترادف آمینو اسیدی و نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی و ناحیه K17 جدایه های مورد مطالعه، به ترادف جدایه های زردی گیاهیچه (seedling yellows) ژاپن (NUagA) و ساقه آبله‌ای (stem pitting) کالیفرنیا (SY568) شباهت بیشتری دارد. اما در شش جدایه استان کرمان (KBA, KG-9, KG-10, KH-10, KS-7) علیرغم شباهت زیاد، تفاوت هایی نیز در چهار آمینو اسید ژن cp با سایر جدایه های کرمان، جدایه های دیگر کشور و سایر نقاط دنیا و از جمله دو جدایه ژاپن و کالیفرنیا وجود دارد و در دندروگرام تشکیل یک شاخه جداگانه را میدهند.

واژه های کلیدی: کلستروویروس، ویروس تریستزای، مرکبات، کرمان

مقدمه

مرکبات یکی از مهمترین محصولات کشاورزی است که در بسیاری از کشورهای دنیا تولید می شود و از نظر اقتصادی اهمیت دارد. بیماری ویروسی تریستزای، یکی از مخرب ترین بیماری هایی است که در طول تاریخ مرکبات از آن یاد شده و از دهه ۱۹۳۰ تا کنون اپیدمی های گسترده آن موجب نابودی ده ها میلیون اصله درخت در نقاط مختلف دنیا گردیده است (Rocha-Pena et al. 1995, Costa & Muller 1980). ویروس تریستزای مرکبات (citrus tristeza virus, CTV) متعلق به جنس *Closterovirus* از خانواده *Closteroviridae* می باشد، این ویروس محدود به آوند آبکشی بوده و به صورت نیمه پایا توسط چند گونه شته انتقال می یابد. پیکره این ویروس از نوع میله ای خمش پذیر به ابعاد حدود ۱۲ × ۲۰۰۰ نانومتر می باشد. ژنوم CTV به صورت آر. ان. ای تک لای مثبت (ssRNA)، به طول حدود ۲۰ kb و دارای ۱۲ چارچوب ژنی (open reading frame; ORF) است که قادر به بیان حداقل ۱۹ پروتئین می باشد (Ayllon et al. 2006, Sentandreu et al. 2006). با توجه به طویل بودن ژنوم، تا به حال

تنها ۱۰ جدایه ویروس به طور کامل تعیین ترادف شده اند (Ruiz-Ruiz *et al.* 2006) و عمده مطالعات مولکولی به بعضی از قسمت های ژنوم، به ویژه ژن پروتئین پوششی معطوف شده است (Pappu *et al.* 1993). ژن پروتئین پوششی در تعدادی از جدایه های CTV با منشأ جغرافیایی متفاوت، با روش RT-PCR تکثیر و مورد مقایسه قرار گرفته است (Roy *et al.* 2003, Mooney *et al.* 2000). همچنین مطالعات نشان داد که در جدایه های مختلف CTV، ترادف ژن های ناحیه ۵' ژنوم از تنوع بیشتری نسبت به ژن های واقع در انتهای ۳' برخوردار می باشند (Roy *et al.* 2003, Roy & Brlansky 2004).

تحقیقات انجام گرفته در ایران نیز که یکی از هفت کشور مهم تولید کننده مرکبات در دنیا به شمار می رود حاکی از گسترش این ویروس در مناطق شمالی و جنوبی کشور می باشد (Ebrahimi *et al.* 1988, Rahimian 1994, Shafiee & Izadpanah 1996, Izadpanah *et al.* 2002). به علاوه بررسی هایی نیز در خصوص تنوع ژنتیکی CTV در ایران صورت گرفته است (Alavi *et al.* 2005, Barzegar *et al.*, 2005, 2006) در حالی که از وضعیت این ویروس و تنوع ژنتیکی جدایه های آن در استان کرمان که پس از استان های مازندران و فارس مقام سوم تولید را در کشور داراست، اطلاع چندانی در دست نمی باشد. در این تحقیق ضمن ردیابی ویروس تریتزا و تعیین پراکندگی آن با استفاده از آزمون الیزا، تنوع ژنتیکی جدایه های مختلف آن مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تفاوت قابل ملاحظه در حفاظت ترادف نوکلئوتیدی دو نیمه ژنوم ویروس تریتزا (نیمه ۳' ژنوم بسیار حفاظت شده تر از نیمه ۵' ژنوم می باشد)، قسمت هایی از چهار چوب ژنی شماره یک واقع در نیمه ۵' ژنوم و چهارچوب ژنی شماره ۷ در نیمه ۳' ژنوم برای تکثیر و مطالعه تنوع ژنتیکی در جدایه های CTV کرمان انتخاب شدند. همچنین پارامترهای ژنتیکی شامل جایگزینی های مترادف (synonymous substitution) و نامترادف (nonsynonymous substitution) در جدایه های CTV مورد بررسی قرار گرفتند.

روش بررسی

نمونه برداری

به منظور ردیابی ویروس CTV در استان کرمان، در فصول زمستان و بهار ۸۴-۱۳۸۳ از

چند منطقه مرکبات خیز بازدید بعمل آمده و از دو الی سه باغ مرکبات در هر منطقه که دارای درختانی با علائم مشکوک به CTV همچون زوال، زردی و خشکیدگی سرشاخه بودند، نمونه برداری بعمل آمد. دویست و سه نمونه از درختان پرتقال، نارنگی و لیمو شیرین که بر روی پایه های لیموترش و نارنج پیوند شده بودند از مناطق جیرفت، بم، ارزوئیه، حسین آباد و صوغان جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

سرولوژی

جهت تعیین آلودگی نمونه ها به CTV از آزمون الیزا با دو آنتی سرم محلی فارس و تجاری Bioreba به روش غیر مستقیم (Converse & Martin 1990) استفاده شد. از هر منطقه چند نمونه آلوده انتخاب و پس از استخراج آر. ان. ای و ساخت سی دی. ان. ای در آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج آر. ان. ای کل از پوست ساقه و یا رگبرگ اصلی سیزده جدایه (جدول ۱) با استفاده از فنول و کلروفرم به روش هیستونز و همکاران (Hailstones *et al.* 2000) صورت گرفت. مقدار ۲٪ گرم پوست ساقه آلوده به CTV با استفاده از ازت مایع به صورت پودر درآورده، سپس ۶۰ میکرولیتر بافر (TES 2% , 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA) و ۶۰ میکرولیتر فنول - کلروفرم (به نسبت مساوی) اضافه و پس از مخلوط کردن به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. از ۴۰ میکرولیتر روشن حاصل شده، با استفاده از ستون کروماتوگرافی حاوی سفادکس (Sephadex G50-80, Sigma-Aldrich, Castle Hill, NSW)، آر. ان. ای کل خالص گردید.

برای ساخت دی. ان. ای مکمل (cDNA)، ۱۴ میکرولیتر آر. ان. ای کل با ۳ میکرولیتر (10μM) آغازگر معکوس مخلوط و پس از ده دقیقه حرارت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد، بلافاصله به روی یخ قرار داده شد. به این مخلوط، ۶ میکرولیتر بافر RT (5x)، ۲ میکرولیتر دی تی تی ۱، مولار (0.1 M DTT)، ۲/۵ میکرولیتر مخلوط داکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات ها ۱۰ میکرو مولار (dNTPs, 10μM)، آب مقطر استریل ۱/۷۵ میکرولیتر و ۱/۷۵ میکرولیتر آنزیم Expand RT (40U/μl) (Roche) اضافه گردید و سپس به مدت ۱۰ و ۴۵ دقیقه به ترتیب در درجه حرارت های ۳۰ و ۴۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد. توقف واکنش با

قرار دادن مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

واکنش PCR در حجم های ۲۵ میکرولیتری شامل ۸ میکرولیتر از محصول RT، ۰/۷۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (به غلظت ۱۰ میکرو مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰x)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲/۵ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتید تری فسفاتها (dNTPs) (۱۰ میکرو مولار) و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (۵U/μl) (سینازن) انجام گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل یک مرحله واسرشته سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت. قطعات تکثیر شده در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. آغازگرهای CP) T36CP و (ORF1a) T30K17 (جدول ۲) که توسط هیلف و همکاران، بر اساس ترادف دو جدایه ویروس تریستزا از فلوریدا شامل T36 (ایجاد کننده زوال) و T30 (جدایه خفیف)، طراحی شده بودند (Hilf *et al.* 1999)، مورد استفاده قرار گرفتند.

همسانه سازی، تعیین ترادف و تجزیه و تحلیل ترادف ها

در نه جدایه از سیزده جدایه ای که به عنوان نماینده مناطق مختلف استان کرمان انتخاب شد (جدول ۱)، قطعات دی. ان. ای حاصل با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و آغازگرهای T36cp و T30K17 تکثیر گردیدند، در پلاسمید pTZ57R/T وارد و در باکتری *E. coli* سویه DH5α همسانه سازی و توسط شرکت ماکروژن (سنول، کره جنوبی) از هر دو سمت تعیین ترادف شدند. از ترادف های بدست آمده برای جستجوی ترادف های مشابه موجود در بانک های اطلاعاتی با کمک نرم افزار بلاست استفاده گردید. از ترادف های CTV موجود در بانک ژن، ۱۹ ترادف (جدول ۳) جهت مقایسه مورد استفاده قرار گرفتند و سپس با کمک نرم افزار PhyloDraw 0.8 (Graphics Application Lab, Pusan University) دندروگرام مربوطه رسم گردید. ترجمه ترادف نوکلئوتیدی به ترادف آمینواسیدی با استفاده از نرم افزار DNASTAR صورت گرفت. همردیف سازی ترادف ها با استفاده از نرم افزار CLUSTAL-X انجام شد (Thompson *et al.* 1997) و برای تعیین درصد تشابه بین ترادف ها از نرم

افزار MEGALINE از مجموعه نرم افزار DNASTAR استفاده گردید.

تخمین فاصله ژنتیکی ترادفها با استفاده از روش PBL، توصیف شده توسط پامیلو و بیانچی (Pamilo & Bianchi 1993)، لی (Li 1993) و همچنین روش دو پارامتری کیمورا (Kimura 1980) انجام گردید. برای تخمین تنوع نوکلئوتیدی بین و درون جمعیت نیز از روش نی (Nei 1987) استفاده گردید. برای محاسبه پارامترهای ژنتیکی جمعیت از نرم افزار MEGA 3.1 استفاده شد.

نتیجه

پراکنش CTV در چهار منطقه استان کرمان

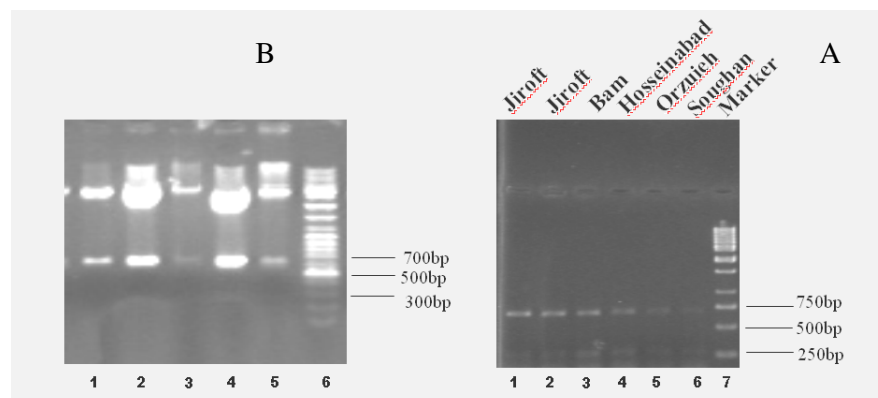
بر اساس آزمون الیزا از مجموع ۲۰۳ نمونه جمع آوری شده از باغ های مرکبات چهار منطقه مهم استان کرمان تعداد ۱۰۶ نمونه، بر اساس حد اقل واکنش با یکی از دو آنتی سرم مورد استفاده، به CTV آلوده تشخیص داده شدند (جدول ۴). چهار منطقه مورد مطالعه بین ۴۵ تا ۶۰ درصد به CTV آلوده بودند و آلوده ترین باغ های مرکبات با ۶۰ درصد آلودگی، در منطقه جیرفت قرار داشتند.

استخراج آر. ان. ای کل و تکثیر دو ناحیه از ژنوم CTV

در این آزمون ژن پروتئین پوششی و قسمتی از ژن پلیمراز (ناحیه K17 در ORF 1a) به ترتیب با جفت آغازگرهای اختصاصی T36CP و T30k17، به ترتیب با دمای اتصال ۵۶ و ۵۵ درجه سانتی گراد، تکثیر گردیدند (شکل های A و B). اندازه قطعات بدست آمده ۶۷۲ باز برای T36CP و ۴۰۹ باز برای T30K17 بود.

محصولات بدست آمده از PCR همسانه سازی و اصالت همسانه ها با آنزیم های برشی *EcoRI* و *PstI* تائید شد (شکل های B-۱ و B-۲). تعیین ترادف محصولات همسانه سازی شده نشان داد که ترادف های ژن CP25 دقیقاً بطول ۶۷۲ جفت باز و حاوی کدون های شروع و پایان ATG و TGA هستند و ترادف های مربوط به ناحیه K17 در ORF 1a بطول ۴۰۹ جفت باز می باشند. نه جدایه از ۱۳ جدایه مورد بررسی (جدول ۱) استان کرمان، با جفت آغازگرهای T36CP و T30K17 تکثیر و قطعه مورد انتظار را تولید نمودند در حالی که علیرغم تلاش های زیاد چهار جدایه KBL12، KO-10، KG-27، و KH-4 با جفت آغازگر T36CP و چهار جدایه

با آغازگر T30K17 تکثیر نگردیدند. ارتباط ترادف های بدست آمده با ژن های CP25 و ناحیه K17 در ORF 1a ژنوم CTV با کمک نرم افزار بلاست تعیین گردید.



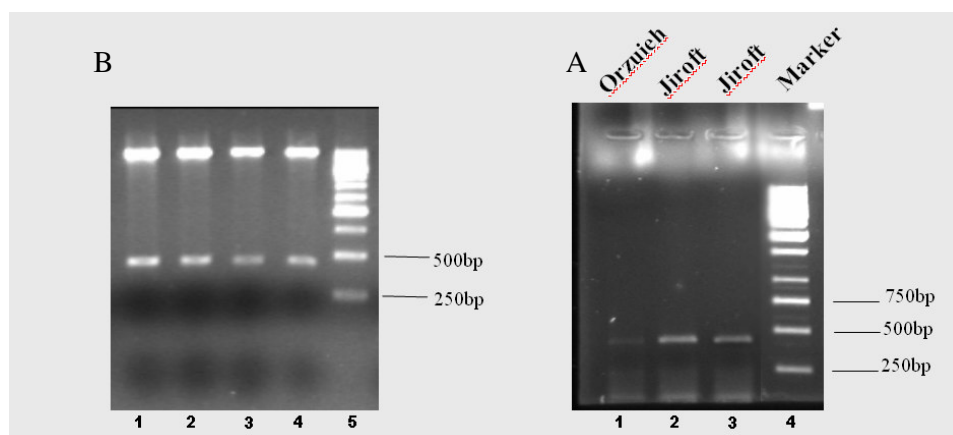
شکل ۱- A) نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR از ژنوم CTV جدایه های استان کرمان با آغازگر اختصاصی T36CP. B) الکتروفورز تعدادی از محصولات همسانه سازی شده مربوط به ژن CP پس از تیمار با آنزیم های برشی *EcoRI* و *PstI* (راهک های ۱-۵)؛ راهک شماره ۶ نشانگر دی.ان.ای. یک کیلو باز.

Fig. 1. A) Electrophoresis pattern of RT-PCR products with citrus samples from Kerman province using, T36CP primer pair. B) Lane 1-5, electrophoresis pattern of some cloned PCR products of CTV-CP gene after treatment with *EcoRI* and *PstI* restriction enzymes. Lane 6, 1kb DNA Marker.

بررسی تنوع ژنتیکی ویروس تریستزا در جدایه های استان کرمان

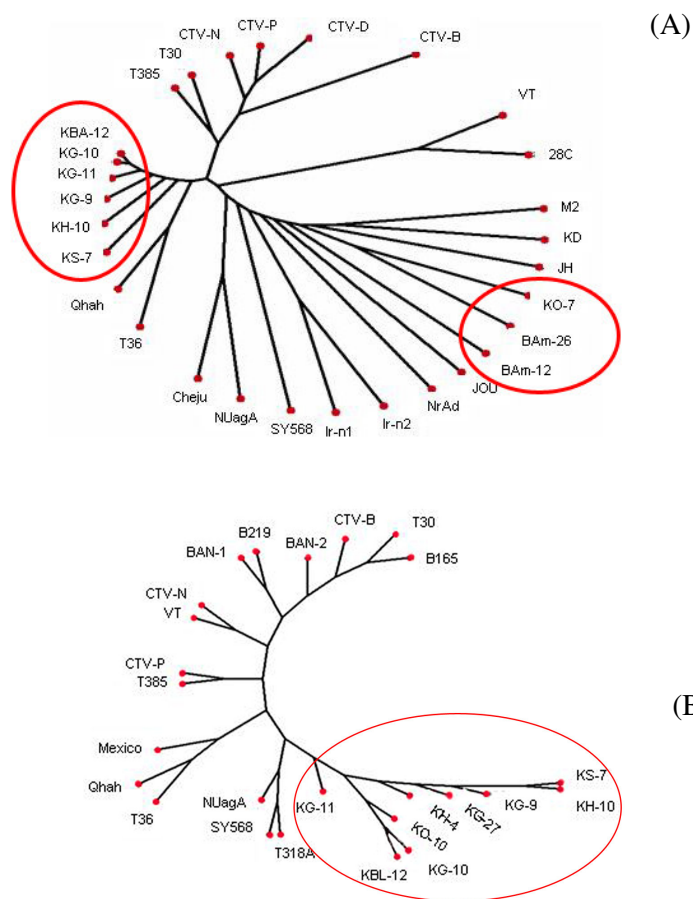
براساس آنالیز هم ردیف سازی چندگانه (multiple sequence alignment) ترادف آمینو اسیدی پروتئین پوششی نه جدایه از ۱۳ جدایه استان کرمان که در PCR با آغازگر T36CP تکثیر گردیده بودند، بیشترین شباهت (۹۸/۷-۹۶/۹) را با جدایه ساقه آبله ای کالیفرنیا (SY568)، و جدایه زردی گیاهیچه ژاپن (NUagA)، (۹۸/۲-۹۶/۴) نشان دادند. در حالی که از نظر ناحیه K17 ژن پلیمرز بیشترین تشابه (۱۰۰-۹۹/۳) را با یک جدایه خفیف از

اسپانیا (T318A) و در درجه بعد با جدایه NUagA از ژاپن (۹۷/۸-۹۷/۱) و جدایه SY568 از کالیفرنیا (۹۷،۱-۹۶،۳) داشتند. دندروگرام مربوط به ژن CP و پلیمرز (شکل ۳) با استفاده از نرم افزار Mega 3.1 و بر اساس روش Neighbor-Joining رسم گردید (Saitou & Nei 1987). براساس آنالیز فیلوژنتیکی ترادف نوکلئوتیدی ژن CP، نه جدایه استان کرمان در دو گروه مجزا قرار گرفتند. جدایه های بم (Bam-12, Bam-26) و ارزوئیه (KO7) به همراه دو جدایه از شمال کشور (Alavi *et al.* 2005) و همچنین جدایه های SY568, T318A, Cheju, NUagA در یک گروه و شش جدایه دیگر استان کرمان شامل جدایه های حسین آباد (KH10)، جیرفت KG9، Mexico، (KG10, KG11)، یک جدایه بم (KBA12) و صوغان (KS7) به همراه جدایه های Qhan در T36 و در گروه دیگر جای گرفتند.



شکل ۲- A) نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR از ژنوم CTV جدایه های استان کرمان با آغازگر اختصاصی T30K17. B) راهک ۴- الکتروفورز محصولات همسانه سازی شده مربوط به قسمتی از ژن پلیمرز (ناحیه K17 در ORF 1a) پس از تیمار با آنزیم های برشی *EcoRI* و *PstI*، راهک شماره ۶ نشانگر دی. ان. ای. یک کیلو باز.

Fig. 2. A) Electrophoresis pattern of RT-PCR products with citrus samples from Kerman province using CTV specific primer pair T30K17. B) Lane 1-5, electrophoresis pattern of cloned PCR products of a part of CTV polymerase gene after treatment with *EcoRI* and *PstI* restriction enzymes. lane 6, 1kb DNA Marker.



شکل ۳- دندروگرام مربوط به مقایسه جدایه های CTV کرمان با جدایه های CTV موجود در بانک ژن بر اساس ترادف قطعه ۶۷۲ نوکلئوتیدی ژن CP (A) و قطعه ۴۰۹ نوکلئوتیدی ژن پلیمرراز (B). برای کوتاهه ها رجوع شود به جدول ۳. جدایه های کرمان با دایره مشخص شده‌اند.

Fig. 3. Dendrogram showing the genetic relationships of Kerman's CTV isolates with other CTV isolates based of sequences of CP gene (A) and the K17 region of polymerase gene (B). See Table 3 for abbreviations. Kerman isolates of CTV are circled.

دندروگرام رسم شده برای ناحیه K17 در ORF 1a نیز نشان داد که از ۱۳ جدایه استان کرمان، نه جدایه ی (KG9, KG10, KG11, KO10, KH10, KH4, KS7, KG10, KG9) که با آغازگر T30K17 تکثیر گردیدند، به همراه جدایه هایی از ژاپن (NUagA)، اسپانیا (T318A) و کالیفرنیا (SY568) در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. در این گروه جدایه T318A اسپانیا بیشترین تشابه را با جدایه های کرمان نشان داد بطوری که در سطح آمینواسیدی با بعضی از این جدایه ها ۱۰۰ درصد تشابه داشت.

آنالیز همردیف سازی چندگانه مترادف های آمینواسیدی CP نشان داد که شش جدایه استان کرمان شامل جدایه های حسین آباد (KH-10)، جیرفت (KG-9, KG-10, KG-11)، یک جدایه بم (KBA-12) و صوغان (KS-7) در چهار آمینواسید با سایر جدایه های مورد مقایسه شامل دو جدایه بم (Bam-12, Bam-26)، یک جدایه ارزوئیه (KO-7)، سه جدایه شمال M2 (ir-n1, ir-n2)، سه جدایه جنوب (KD, Jou, Jh) و همچنین دوازده جدایه غیر ایرانی CTV متفاوت بودند. در شش جدایه مزبور، آمینواسید گلیسین در موقعیت ۴۹ با آمینواسید سرین، آمینواسید تیروزین در موقعیت ۶۸ با آمینواسید هیستیدین، و آمینواسید سرین در موقعیت های ۷۲ و ۱۱۵ با آمینواسید پرولین جایگزین شده بودند (شکل ۴).

آنالیز پارامترهای ژنتیکی جدایه های کرمان

برای تخمین میزان فشار انتخاب بر روی هر یک از این دو ناحیه تعیین مترادف شده جایگزینی های مترادف (synonymous substitution) و نامترادف (nonsynonymous substitution) بطور جداگانه محاسبه گردید. تعداد جایگزینی های مترادف (d_S) در هر جایگاه از ژن CP دامنه ای بین صفر تا ۰/۲۹ و میانگین ۰/۱۵ داشت. این مقادیر برای ژن پلیمرز بین صفر تا ۱/۶۷ و میانگین ۰/۳۹ محاسبه گردید. تعداد جایگزینی های نامترادف (d_N) در هر جایگاه از ژن CP دامنه ای بین صفر تا ۰/۳۱۴ و میانگین ۰/۰۱ داشت. این مقادیر برای ژن پلیمرز بین صفر تا ۰/۳۲۴ و میانگین همه جدایه ها ۰/۰۹۳۱ محاسبه گردید (جدول شماره ۵). نتایج این بررسی نشان داد که در هر دو ناحیه ژنومی تعداد جایگزینی نامترادف (d_N) کوچکتر از جایگزینی مترادف (d_S) بود (جدول شماره ۵).

		GRPLDAGIFAGYHYLCA DFLTGAGLTDLECAVYIOAKEQL Majority															
		170				180				190				200			
161	28C
161	VT
161	CTV-D
161	CTV-P
161	CTV-N
161	CTV-B
161	KBA-12
161	KG-10
161	KG-11
161	KG-9
161	KH-10
161	KS-7
161	Qhah
161	T36
161	T30
161	T385
161	Cheju
161	ir-n1
161	ir-n2
161	NrAd
161	NuagA
161	BAm-12
161	Jh
160	BAm-26
161	KO-7
161	SY568
161	JOU
161	KD
161	M2

		LKKRGADEVVVTNVRQLGKFNTR Majority															
		210								220							
201	28C
201	VT
201	CTV-D
201	CTV-P
201	CTV-N
201	CTV-B
201	KBA-12
201	KG-10
201	KG-11
201	KG-9
201	KH-10
201	KS-7
201	Qhah
201	T36
201	T30
201	T385
201	Cheju
201	ir-n1
201	ir-n2
201	NrAd
201	NuagA
201	BAm-12
201	Jh
200	BAm-26
201	KO-7
201	SY568
201	JOU
201	KD
201	M2

شکل ۴- هم‌ردیف‌سازی چند گانه ترادف آمینو اسیدی ژن پروتئین پوششی و ناحیه K17 ژن پلیمراز جدایه‌های کرمان و جدایه‌های بدست آمده از بانک ژن، آمینواسیدهای متفاوت با ترادف‌های حفاظت شده نشان داده شده‌اند، نقطه‌ها نشان دهنده یکسانی آمینواسیدی می‌باشند.

Fig. 4. Amino acid sequence alignment of CP gene CTV isolates from Kerman province; Nucleotides that differ from consensus sequence are shown; dots indicate where sequence identity occurs.

جدول ۱- لیست جدایه های ویروس تریستزا، منبع و محل جمع آوری آن ها

Table 1. List of CTV isolates, their sources and sampling locations

Kerman province CTV isolate جدایه های ویروس تریستزا در استان کرمان	Region ناحیه	Source منبع
KG-9	Jiroft	SwO/NA
KG-10	Jiroft	SwO/NA
KG-11	Jiroft	SwO/NA
KG-27	Jiroft	SwO/NA
KS-7	Soghan	SwO/So
KO-10	Orzuieh	SwO/NA
KO-7	Orzuieh	SwO/NA
Bam-12	Bam	SwO/So
Bam-26	Bam	SwO/So
KBA-12	Bam	SwO/So
KBL-12	Bam	SwO/So
KH-4	Hossein Abad	SwO/So
KH-10	Hossein Abad	SwO/So

SwO, sweet orange; SO, sour orange, NA, data not available

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن پروتئین پوششی و ناحیه K17 ژن پلی مرز

جدایه های ویروس تریستزا

Table 2. Oligonucleotide primers used in PCR amplification of cp gene and K17 region of polymerase gene in CTV isolates

Primer آغازگر	PCR product size (bp) اندازه محصول	Orientation جهت	Position in genome موقعیت در ژنوم	Nucleotide sequences from 5' to 3' ترادف نوکلئوتیدی (5' به 3')
T36CP	672	sense	9996-9972	5' ATGGACGACGAAAACAAAGAAATTG 3'
		antisense	9575-9596	5' TCAACGTGTGTTGAATTTCCCA 3'
T30K17	409	sense	7048-7029	5' GTTGTCGCGCCTAAAGTTCGGCA 3'
		antisense	6711-6730	5' TATGACATCAAAAATAGCTGAA 3'

جدول ۳ - ترادف های ژن پروتئین پوششی CTV موجود در بانک ژن که جهت آنالیز ترادفها مورد استفاده قرار گرفتند

Table 3. CTV coat protein gene sequences from GeneBank used in sequence analysis

CTV isolates	Country	Accession number
جدایه ها	کشور	رس شمار بانک ژن
T36	FL, U.S.A.	U16304
T30	FL, U.S.A.	AF260651
T385	Spain	Y18420
SY568	CA, U.S.A.	AF001623
P349	Israel	U56902
NuagA	Japan	AB046398
Cheju	South Korea	AF249279
28C	Portugal	AF184118
CTV-B	India	AF501867
CTV-D	India	AF501868
CTV-N	India	AF501869
CTV-P	India	AF501870
Ir.n.1	Iran	AY608507
Ir.n.2	Iran	AY608508
M2	Iran	AY190048
KD	Iran	AY803278
JOU	Iran	AY803274
Jh	Iran	AY803277
NrAd	Iran	AY803276

جدول ۴ - تعداد درختان آزمایش شده از چهار منطقه استان کرمان و درصد آلودگی به CTV در نمونه های هر منطقه بر اساس نتایج آزمون الیزا

Table 4. Number of tested citrus samples and % CTV infection in samples from four citrus growing regions of Kerman province based on ELISA results

Region	Orzuieh	Hossein Abad	Bam	Jiroft
منطقه	ارزوئیه	حسین آباد	بم	جیرفت
Total number of samples				
تعداد نمونه	68	46	44	45
No. of ELISA positive				
تعداد نمونه های مثبت در الیزا	31	26	22	27
% CTV infection				
درصد آلودگی	45	56	50	60

جدول شماره ۵- میانگین تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی در دو ناحیه کد شونده CP و ناحیه

K17 در ORF 1a جدایه های CTV از استان کرمان

Table 5. Average of nucleotide substitutions for CP and K17 region of CTV isolates from Kerman province

sequence ترادف	*D	$d_{N \times \times}$	*** d_S	d_N/d_S
cp پروتئین پوششی	0.02	0.01	0.15	0.10
K17 region of ORF1 ژن k17 ناحیه پلیمراز	0.14	0.093	0.39	0.23

D^* = تنوع نوکلئوتیدی: میانگین تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی هر جایگاه در بین ترادف ها؛ d_N (میانگین تعداد جایگزینی های نامترادف در جایگاه های نامترادف؛ d_S $***$ میانگین تعداد جایگزینی های مترادف در هر جایگاه؛ d_N/d_S میانگین نسبت بین جایگزینی های مترادف و نامترادف برای هر جفت از مقایسات. برای محاسبه d_S , d_N و d_N/d_S از روش PBL استفاده گردید (Li 1993, Pamilo and Bianchi 1993).

D = Nucleotide variation: average nucleotide substitution per site; d_S = average number of synonymous substitutions pr site; $d_{N \times}$ = average number of non-synonymous substitutions pr site; d_S and d_N are calculated by the PBL method (Li 1993, Pamilo and Bianchi 1993).

بحث

نتایج این تحقیق که بر روی ۲۰۳ نمونه مرکبات صورت گرفت نشان داد که ویروس

تریسترا در مناطق مورد مطالعه در استان کرمان که یکی از مناطق مهم تولید مرکبات در کشور می باشد بطور وسیعی پراکنده است. بیشترین آلودگی (۶۰ درصد) به منطقه جیرفت و کمترین آلودگی (۴۵ درصد) به منطقه ارزوئیه تعلق داشت.

جهت و فشار انتخاب موثر بر نواحی کد کننده پروتئین با استفاده از نسبت تنوع نوکلئوتیدی بین جایگزینی‌های نامترادف به جایگزینی‌های مترادف d_N/d_S محاسبه می‌گردد (Nei & Gojobori 1986, Nei 1987, Yang & Bielawski 2000). نتایج این تحقیق مبنی بر کمتر بودن تعداد جایگزینی نامترادف (d_N) نسبت به جایگزینی مترادف (d_S) در هر دو ناحیه ژنومی مورد مطالعه (جدول ۵)، بیانگر وجود فشار منفی انتخاب و در نتیجه جلوگیری از تغییرات زیاد در آمینواسیدهای این پروتئین‌ها می‌باشد. نکته قابل توجه این است که فشار منفی انتخاب در ژن CP نسبت به ناحیه دیگر بیشتر می‌باشد که این تفاوت می‌تواند بدلیل اختلاف در عملکرد پروتئین‌های کد شده توسط این نواحی باشد. رویو و همکاران (Rubio *et al.* 2001) نیز نشان دادند که برای نواحی کد کننده پروتئین پوششی و پروتئین متیل ترانسفراز که در تکثیر ویروس موثر است فشار انتخاب منفی وجود دارد. بین این دو ناحیه بیشترین فشار عملکردی (functional constraints) مربوط به ژن پروتئین پوششی بود که کمترین مقدار نسبت d_N/d_S را دارا بود. این امر به نقش‌های مهم این پروتئین نسبت داده شده است (Rubio *et al.* 2001).

مطالعات انجام شده نشان داده است که اکثر جدایه‌های شدید تریسترا و از جمله جدایه‌های شدید شمال ایران دارای یک آمینواسید فنیل آلانین در موقعیت ۱۲۴ و یک آمینواسید والین در موقعیت ۱۲۲ می‌باشند (Roy *et al.* 2003, Roy & Brlansky 2004, Barzegar *et al.* 2006). بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نشان داد که تمام جدایه‌های استان کرمان دارای اسید امینه والین و نیز فنیل آلانین به ترتیب در موقعیت‌های ۱۲۲ و ۱۲۴ می‌باشند. اگرچه اکثر درختانی که جهت نمونه برداری انتخاب شدند علائم ضعف و زوال نسبتاً شدیدی را نشان می‌دادند لکن با توجه به اینکه در این تحقیق ویژگی‌های بیولوژیکی جدایه‌ها مورد بررسی قرار نگرفت، نمی‌توان بطور قطع وجود این دو آمینواسید را در موقعیت‌های ذکر شده با شدید بودن جدایه‌ها مرتبط دانست، بعلاوه برخی از جدایه‌های خفیف نیز دارای اسید

امینه فنیل آلانین در موقعیت ۱۲۴ بوده و با آنتی سرم، MCA-13 واکنش نشان داده‌اند (Kano *et al.* 1998). این مطالعات همچنین نشان داد که اگر چه اکثر جدایه های مورد مطالعه با آغازگر T36CP که یک آغازگر عمومی برای ژن پروتئین پوششی می‌باشد (Hilf & Garnsey 2000, Hilf *et al.* 1999)، تکثیر گردیدند اما بعضی از جدایه ها با آغازگر مذکور تکثیر نگردیدند. وضعیت مشابهی نیز در مورد قطعه ۴۰۹ نوکلئوتیدی ژن پلیمرز وجود داشت که در آن بعضی از جدایه های مورد مطالعه علی‌رغم تلاش های زیاد، با آغازگر اختصاصی تکثیر نگردیدند. این امر بیانگر آن است که احتمالاً بعضی از جدایه ها دارای تنوع نوکلئوتیدی بیشتری هستند به نحوی که مانع از تکثیر آن ها با آغازگر های معمول این نواحی شده است. ترادف آمینو اسیدی و نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی و قسمتی از ژن پلیمرز (ناحیه K17 در ORF 1a) جدایه های کرمان به ترادف جدایه های زردی گیاهیچه (seedling yellows) از ژاپن (NUAgA) و ساقه آبله ای (stem pitting) از کالیفرنیا (SY568) شباهت بیشتری داشتند. از سوی دیگر مقایسه ترادف آمینواسیدی جدایه های مورد مطالعه و جدایه های بدست آمده از بانک ژن نشان داد که به استثناء جدایه KO-7 و دو جدایه بم (Bam-12, Bam-26)، شش جدایه دیگر استان کرمان در چهار آمینواسید (موقعیت های ۱۱۵، ۶۸، ۷۲، ۴۹، در cp)، تفاوت های مشخصی با جدایه های جنوب و شمال کشور و نیز سایر نقاط دنیا داشتند و حتی با جدایه های ژاپن (NUAgA) و کالیفرنیا (SY568) نیز متفاوت بودند. به علاوه در شش جدایه مذکور در موقعیت ۱۴۲، آمینواسید سرین وجود دارد در صورتی که در سایر جدایه های کرمان، جنوب و شمال کشور شامل ir-n1, ir-n2, NrAd, Bam-12, Jh, KD, همانند دو جدایه زردی گیاهیچه ژاپن (NUAgA) و ساقه آبله ای کالیفرنیا (SY568) در این موقعیت اسید امینه آرژنین وجود دارد. به همین دلیل در دندروگرام، این شش جدایه استان کرمان همگی در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. بنابر این بر اساس این مطالعه، علی‌رغم شباهت زیاد جدایه های استان کرمان به جدایه های ژاپن (NUAgA) و کالیفرنیا (SY568)، بطور کامل با آن ها یکسان نبوده و تفاوت های چندی نیز دارند. چنین شرایطی در مورد چهار جدایه هندی نیز گزارش گردیده است. این چهار جدایه که ژن پروتئین پوششی آنها شباهت بسیار زیادی (۹۸-۹۶٪) با جدایه SY568 (۹۸-۹۶٪) و نیز جدایه

NUagA (۹۵-۹۷٪) داشت، در درخت فیلوژنتیکی در یک دسته جداگانه ای قرار گرفتند (Roy *et al.* 2003). به نظر میرسد که یکی از دلایل شباهت جدایه های کرمان با جدایه های کالیفرنیا و ژاپن، ورود مرکبات از این نقاط به ترتیب در سال های ۱۳۴۲ و ۱۳۴۷ به ایران باشد. در مجموع به نظر می رسد که ویروس CTV از دیر باز در ایران وجود داشته است، اما با واردات انواع مرکبات از مناطق مختلف دنیا بویژه کالیفرنیا و ژاپن، ژنوتیپ های مختلف CTV نیز به ایران وارد شده و در طی سال ها مجاورت به صورت ترکیبی از ژنوتیپ های مختلف در آمده اند. با توجه به سن بالای درختان مرکبات و امکان انتقال ژنوتیپ های مختلف ویروس از طریق پیوند 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 (Ayllon *et al.* 2006). همچنین موضوع مهاجرت جدایه های CTV در بین مناطق جغرافیایی دور از هم، در دنیا از طریق مواد گیاهی آلوده، در مطالعات متعدد مورد تاکید قرار گرفته است (Rubio *et al.* 2001, Roistacher & Moreno 1991).

لازم به ذکر است که گر چه بهترین راه جهت مطالعه تنوع ژنتیکی استفاده از ژنوم کامل می باشد اما با توجه به طویل بودن ژنوم ویروس تریستزا، تعیین ترادف کامل ژنوم بسیار مشکل و وقت گیر است. بنا بر این علیرغم این که در ژنوم CTV، بیشترین مطالعه در مورد ژن پروتئین پوششی صورت گرفته است اما به نظر می رسد که استفاده از چندین ناحیه از ژنوم برای بررسی تغییرات ژنتیکی مفید تر باشد زیرا که این روش قادر است تصویر بهتری از کل ژنوم را ارائه نماید (Roy & Brlansky 2004).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (131-134) متن انگلیسی مراجعه شود.

آدرس نگارندگان: سمیه احمدی، علیرضا افشاریفر و کرامت‌اله ایزدپناه، شیراز، بخش گیاهپزشکی، علی نیازی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز