



بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌های جدید ایرانی ویروس بادنای یک انجیر بر اساس ترادف ژن پروتئین حرکتی

اطهر علی شیری^۱، فرشاد رخشنده رو^{۲*}، غلامرضا صالحی جوزانی^۳، مسعود شمس بخش^۴

^۱ دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

^۲ استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

^۳ استاد بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج.

^۴ دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۰۹

چکیده

بیماری موزائیک انجیر گسترش جهانی دارد و به عنوان شایع‌ترین بیماری ویروسی در انجیر شناخته می‌شود. یکی از مهمترین ویروس‌هایی که در این بیماری نقش دارد، ویروس بادنای یک انجیر (FBV-1) می‌باشد. در تحقیق حاضر، روابط فیلوژنتیکی بین جدایه‌های ایرانی و سایر جدایه‌های گزارش شده از این ویروس مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن رمز کننده پروتئین حرکتی ویروس، قطعه‌ی مورد انتظار به اندازه تقریبی ۱۰۹۰ جفت باز از ژنوم ویروس تکثیر شد. قطعه ژنی ۱۲ جدایه در پلاسמיד pTZ57R/T همسانه و تعیین توالی شد. ترادف‌های به دست آمده با ترادف‌های موجود در بانک ژن مقایسه و پس از هم‌ردیف‌سازی چندگانه، درخت فیلوژنتیکی بر اساس ژن پروتئین حرکتی FBV-1 ترسیم شد. بر اساس آنالیز فیلوژنتیکی، جدایه‌های FBV-1 در دو گروه متمایز دسته‌بندی شدند و جدایه‌های ایرانی در دو زیرگروه با ۹۹٪ مشابهت نوکلئوتیدی در گروه اول قرار گرفتند. در بررسی تبارزایی بر مبنای توالی اسید آمینه‌ای، جدایه‌های مورد بررسی در سه گروه با ۹۹-۹۸٪ مشابهت قرار گرفتند. جدایه‌های ایرانی از تنوع ژنتیکی پایین‌تری در مقایسه با جدایه‌های آمریکایی برخوردار بودند و شرایط جغرافیایی در تنوع ژنتیکی جدایه‌های موجود تاثیر داشت.

واژه‌های کلیدی: ویروس بادنای یک انجیر، آنالیز فیلوژنتیکی، ژن پروتئین حرکتی.

مقدمه

طی سال‌های اخیر از انجیر گزارش شده‌اند که شامل حداقل پنج گونه از خانواده *Closteroviridae* و یک گونه از هر کدام از جنس‌های *Trichovirus*، *Umbravirus*، *Luteovirus*، *Carlavirus*، *Potyvirus* و *Alphacryptovirus* می‌باشد (Elbeaino *et al.*, 2011a, 2011b; Gattoni *et al.*, 2009; Walia *et al.*, 2009). اما همچنان محققین مجموعه‌ای از این ویروس‌ها را در بروز علائم و سبب شناسی این بیماری دخیل می‌دانند (Castellano *et al.*, 2007). در سال ۲۰۰۸ و در فرایند تعیین ویژگی *FMV*، چندین ویروس جدید از درختان دارای علائم *FMD* گزارش شد. یکی از این ویروس‌ها که از شیوع بالایی برخوردار است، *FBV-1* می‌باشد. این ویروس برای اولین بار توسط *Tzanetakis et al.* (2010) از ایالت متحده گزارش شده است. بعد از این گزارش، حضور ویروس در کشورهای مختلف اروپایی، حوزه مدیترانه و کشورهای آفریقایی نیز گزارش شد (Elbeaino *et al.*, 2012; Minafra *et al.*, 2012). در ایران نیز این ویروس توسط *Alimoradian et al.* (2014) برای اولین بار گزارش شد. همچنین روابط فیلوژنتیکی بین برخی جدایه‌های ایرانی و سایر جدایه‌های موجود مورد بررسی قرار گرفته است (Alimoradian *et al.*, 2016). ژنوم این ویروس از جنس *dsDNA* بوده و به خانواده *Caulimoviridae* و جنس *Badnavirus* تعلق دارد. بادنایروس‌ها یک نوع

انجیر (*Ficus carica* L.) گیاه متعلق به خانواده *Moraceae* می‌باشد (Watson & Dallwitz, 2004). این درخت بومی آسیا و اروپا بوده و از دیرباز در بسیاری از فرهنگ‌ها و کشورها مورد توجه بوده است. انجیر حدود ۱۰۰۰ سال است که کاشته می‌شود و بر اساس آمارنامه *FAO* در سال ۲۰۱۳ ایران رتبه چهارم را از لحاظ میزان تولید انجیر در جهان به خود اختصاص داده است. به‌رغم آنکه انجیر به تعداد کمی از بیمارگرها حساس می‌باشد ولی قارچ‌های بیمارگر عامل پوسیدگی ریشه شامل *Armillaria*، *Phytophthora cryptogea* و *Rosellinia necatrix* و بیماری موزائیک انجیر (*Fig Mosaic Diseases*) از مهمترین بیماری‌های تهدید کننده محصول انجیر محسوب می‌شوند. بیماری موزائیک انجیر سال-هاست که در جهان با نام *FMD* شناخته شده و از زمانی که علائم آن به عنوان یک بیماری در انجیر توسط *Condit et al.* (1993) گزارش شده، تاکنون از هر جایی از جهان که گونه انجیر خوراکی *Ficus carica* کشت می‌شود گزارش شده است (Blodgett & Gomec, 1967). اما مهمترین عامل فرض شده برای این بیماری، ویروس موزائیک انجیر (*Fig mosaic virus*) می‌باشد که ویژگی‌های آن به طور کامل تعیین شده است. علاوه بر *FMV*، چندین ویروس دیگر از جنس‌ها و خانواده‌های دیگر ویروسی نیز در

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از استان های قم، گیلان، گلستان، مازندران، کرمانشاه، تهران، یزد، خراسان-رضوی، لرستان، فارس و کرمان و در طی فصول زراعی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳ بصورت تصادفی انجام گرفت. برای این منظور تعداد ۳۹۲ نمونه برگی از درختان علایم‌دار و بدون علایم از انجیرکاری‌های دیم و آبی کشور از درختان انجیر جوان و با ارقام مختلف جمع‌آوری و در یخ به آزمایشگاه جهت ردیابی مولکولی انتقال داده شد (Alishiri *et al.*, 2016).

ابتدا DNA کل از نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش CTAB (Dellaporta *et al.*, 1983) استخراج و غلظت DNA به دست آمده توسط دستگاه نانودراپ (Thermo scientific) تعیین شد. برای انجام PCR از جفت آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر منطقه ژن پروتئین حرکتی ویروس و در محدوده ژنومی ۵۶۰ تا ۱۶۵۰ نوکلئوتید استفاده شد (Laney *et al.*, 2012). این منطقه که در انتهای ۵' ژنوم قرار دارد، انتهای ۳' قاب خواندنی باز I و تمام طول قاب خواندنی باز II را شامل می‌شود. توالی آغازگرهای رفت و برگشتی استفاده شده در این تحقیق به صورت 5'- F: AGGCTCTAAGGTTAACTGAAG- 3' و R: 5'- ATCATCATCGTGTTCAGGTATC- 3' می‌باشد. برای انجام PCR، از یک میکرولیتر از DNA استخراج شده با غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر استفاده شد. مواد این آزمون برای یک

پارارتروویروس هستند و علاوه بر اینکه می‌توانند در ژنوم میزبان وارد شوند (Huang & Madan, 1999)، می‌توانند به صورت خارج کروموزومی نیز نسخه‌برداری فعال داشته باشند و ایجاد آلودگی کنند (Laney *et al.*, 2012). بادناویروس‌ها ژنوم‌های حلقوی به اندازه ۷-۸ کیلوگفت باز دارند و در پیکره‌های باسیلی شکل بدون غشاء کپسیدپوشی می‌شوند. این ویروس از چهار چارچوب خوانش باز (ORF) تشکیل شده است که چهار پروتئین (P1-P4) را به ترتیب با توده مولکولی ۱۵/۳، ۱۶/۵، ۲۱۲/۳ و ۱۷ کیلودالتون تولید می‌کند. موتیف‌های کلیدی بادناویروس در ORF3 و به صورت یک پلی-پروتئین وجود دارند. موتیف‌های مذکور شامل پروتئین حرکتی، پروتئین پوششی، پروتئین اسپاراتات، نسخه‌بردار معکوس و دامنه RNase H بوده و با توجه به گزارش نهم (King *et al.*, 2011)، عضو جدیدی از جنس بادناویروس بوده و به خانواده کالیموویریدا (Geering & Hull, 2012) تعلق دارد.

از آنجایی که تاکنون تحقیقات بسیار محدودی بر روی این ویروس انجام گرفته، لذا هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی خصوصیات فیلوژنتیکی جدایه‌های بومی جداسازی شده و مقایسه آنها با سایر جدایه‌های ایرانی و خارجی و همچنین ارتباط احتمالی موجود بین تنوع ژنتیکی و مناطق جغرافیایی در جهت ارزیابی راه‌کارهای مناسب مدیریتی توسط محققین مربوط بوده است.

بر روی این محیط رشد داده شدند و با استفاده از غربالگری، کلونی باکتری‌های نوترکیب حاوی پلاسمید نوترکیب که به رنگ سفید بودند انتخاب شدند و سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید فرمنتاز، پلاسمیدهای مورد نظر استخراج شدند. در مرحله بعد با آنزیم‌های برشی، حضور قطعه مورد انتظار در پلاسمیدهای نوترکیب تایید شد. پلاسمیدهای نوترکیب حاوی قطعات ۱۲ جدایه ایرانی مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف برای تعیین توالی مستقیم به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی ارسال شدند. خوانش‌ها به تعداد دو بار و با استفاده از آغازگر عمومی M13 انجام شد.

نتایج حاصل از تعیین ترادف با استفاده از نرم‌افزار Editseq مورد بررسی قرار گرفتند و پس از حذف فضاهای پوچ از درون توالی و گرفتن توالی نهایی، توالی‌ها با برنامه Blast در پایگاه اطلاعاتی NCBI بررسی شدند (جدول ۱). آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس ژن پروتئین حرکتی ۱۲ جدایه، پس از هم‌ردیف‌سازی توالی‌های بدست آمده با توالی‌های ایرانی و آمریکایی نظیر موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزارهای Pearson & Lipman,) CLUSTALX 1.8 (1988) و MEGA6 (Tamura et al., 2013) به روش Neighbor joining (Saitou & Nei, 1987) با مدل p-distance method (Nei & Kumar, 2000) با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شد. درصد شباهت در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بین جدایه‌ها توسط

واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر از 10X PCR buffer, ۰/۵ میکرولیتر از dNTP mix (از غلظت ۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر $MgCl_2$ (از غلظت ۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (از غلظت ۱۰ پیکو-مول)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5 U/mL) شرکت فرمنتاس بود و واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای انجام PCR از واکنش دمایی به شرح زیر استفاده شد: یک چرخه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و در آخر یک چرخه دمایی بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز و در زیر نور UV عکسبرداری شدند.

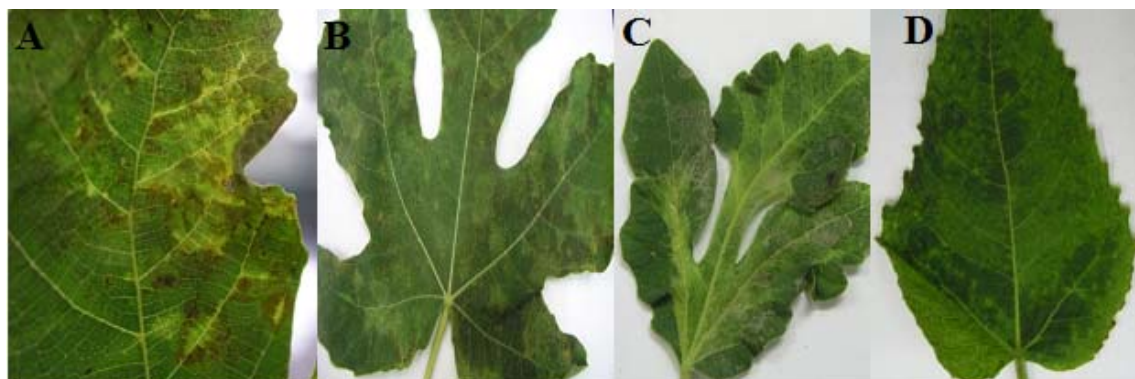
برای هم‌سانه‌سازی محصول PCR، ابتدا قطعه ژنتیکی مورد نظر توسط کیت استخراج DNA از ژل شرکت کیاژن (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN)، از ژل استخراج شد. سپس قطعه مربوطه در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T وارد شد. پس از انتقال، پلاسمید نوترکیب با استفاده از شوک حرارتی به درون سلول‌های باکتری *E. coli* سویه DH5 α منتقل شد (Sambrook & Russell, 2001). در ادامه با استفاده از محیط‌کشت انتخابی حاوی آمپی‌سیلین و همچنین معرف‌های IPTG و X-gal، باکتری‌ها

برگ‌ها وجود داشت، این علائم در اکثر گزارشات به *Fig mosaic virus (FMV)* نسبت داده شده است (Caglayan *et al.*, 2009; Shahmirzaie *et al.*, 2012). به جز این، تغییر شکل برگ بود که این علائم نیز در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده به شدت به چشم می‌خورد و شاید بتوان گفت شایع‌ترین علائم همراه با FBV-1 در ارقام ایرانی می‌باشد (شکل ۱).

موتور جستجوگر Blast تعیین شد. همچنین از ویروس *Sweetpotato badnavirus B* با شماره دسترسی FJ560944 به عنوان گروه خارجی استفاده شد.

نتایج و بحث

نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های مختلف علائم متفاوتی داشتند. اما شاخص‌ترین آنها حالت موزائیکی با حاشیه نکروز بود که در

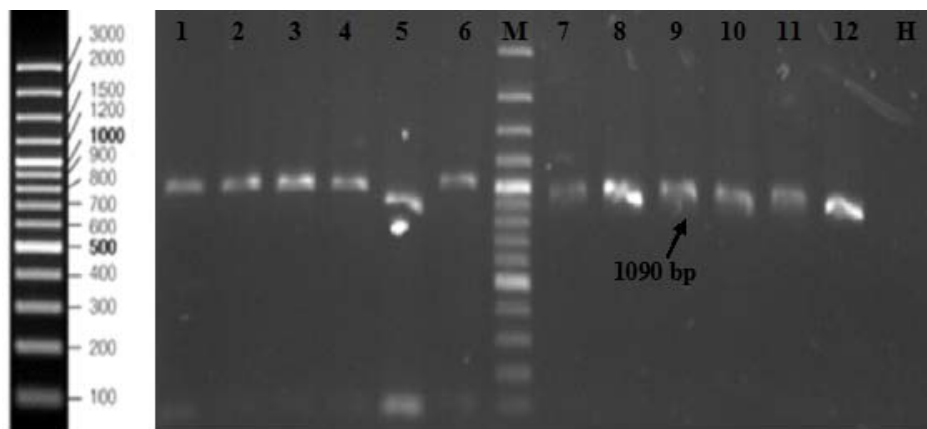


شکل ۱- علائم بیماری موزائیک انجیر در درختان آلوده. A و B: لکه‌های موزائیکی کلروز که اطراف آنها نکروز شده است. C و D: تغییر شکل و زوایای برگ از حالت اصلی خودش و همچنین رنگ پریدگی عمومی و روشن شدن رگبرگ‌ها.

Figure 1- Mosaic diseases symptoms in infected fig tree. A, B: chlorotic mosaic lesion restricted with the marginal necrosis. C, D: angle and leaf deformation, general lightness and vein clearing.

جدول ۱ اطلاعات مربوط به جدایه‌های ایرانی موجود در این تحقیق و سایر جدایه‌های بررسی شده با این جدایه‌ها که هم جدایه‌های ایرانی و هم جدایه‌های آمریکایی است را نشان می‌دهد. هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها با استفاده از برنامه ClustalX 1.8 برای توالی‌های نوکلئوتیدی ۱۲ جدایه این تحقیق با تمام جدایه‌های موجود در NCBI که شامل ۱۰ جدایه داخلی و ۲۵ جدایه خارجی بود انجام گرفت. مقایسه‌ها نشان داد که جدایه‌های ایرانی FBV-1 با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن به میزان ۹۹ درصد در سطح توالی نوکلئوتیدی با یکدیگر شباهت دارند. علاوه بر مقایسه توالی نوکلئوتیدی بین جدایه‌های مختلف FBV-1 با دیگر بادناویروس‌های انجیر، مقایسه در سطح توالی‌های آمینواسیدی هم انجام گرفت. در این مقایسه درصد شباهت بین جدایه‌های جداسازی شده در این تحقیق با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن بین ۹۸ تا ۹۹ درصد بود. همچنین میزان شباهت نوکلئوتیدی بین جدایه‌های جدید بررسی شده در این تحقیق با جدایه‌های قدیمی گزارش شده از ایران، به میزان ۹۹ درصد بود و میزان شباهت در سطح اسیدآمینو بین جدایه‌های قدیم و جدید ایرانی بین ۹۸-۹۹ درصد بود.

آغازگر اختصاصی که برای این ویروس استفاده شد یک منطقه اختصاصی از ژنوم بادناویروس‌ها را تکثیر می‌کند که در انتهای ۵' ژنوم قرار دارد. این منطقه شامل طول کامل قاب خواندنی باز II (ORF II) است که در این منطقه ژن مربوط به پروتئین حرکتی ویروس قرار دارد و همچنین بخشی از انتهای ۳' قاب خواندنی باز I (ORF I) را نیز پوشش می‌دهد. این دو منطقه ژنی اندازه‌ای در حدود ۱۰۹۰ جفت باز را شامل می‌شوند. با توجه به اینکه این ناحیه در ابتدای ۵' ژنوم قرار گرفته انتظار می‌رود که تنوع زیادی نداشته باشد و حفاظت‌شدگی بالایی را شامل شود. برای اثبات این ادعا نیاز به تعیین توالی طول کامل ژنوم می‌باشد و بیشترین توالی ژنومی ویروس در قاب خواندنی باز III قرار گرفته که هنوز توالی‌یابی نشده است. برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی، پس از هم‌سانه‌سازی و تعیین توالی، ۱۲ توالی به عنوان توالی‌های نماینده انتخاب شدند. توالی‌های نماینده براساس مناطق جغرافیایی مختلف انتخاب شدند. این توالی‌ها که مربوط به بخشی از ژن پروتئین حرکتی ویروس و به اندازه ۱۰۹۰ جفت باز بودند با شماره‌های دسترسی KU821715 تا KU821726 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شدند.



شکل ۲- محصول PCR بدست آمده بر روی ژل الکتروفورز ۱/۲ درصد با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی تکثیر کننده ژن پروتئین حرکتی ویروس. چاهک‌های ۱ تا ۱۲: قطعه تکثیر شده در نمونه‌های انجیر آلوده به ترتیب از استان‌های مازندران، گلستان، کرمانشاه، لرستان، گیلان، تهران، فارس، خراسان رضوی، لرستان، قم، یزد و کرمان می‌باشد. H: شاهد منفی (گیاه سالم). M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمتاز. (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentase).

Figure 2- Electrophoresis pattern of amplified movement protein gene of FBV-1 by PCR using specific primers in 1.2 % agarose gel. Lanes 1-12: Cloned DNA fragment for infected fig samples from Mazandaran, Golestan, Kermanshah, Lorestan, Gilan, Tehran, Fars, Khorasan Razavi, Lorestan, Ghom, Yazd and Kerman provinces, respectively. H: negative control (Healthy plant). M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Germany).

های ایرانی است (شکل ۳a). از طرفی جدایه‌های ایرانی هم متنوع هستند ولی با تنوع کمتر از جدایه‌های آمریکایی ویروس و در دو زیر گروه از گروه اول قرار گرفتند. نتایج فیلوژنی نشان داد که تنوع جغرافیایی در تنوع جدایه‌ها برای این ناحیه مورد بررسی از ژنوم ویروس تاثیر داشته است و به نظر می‌رسد که جدایه‌های بررسی شده در این تحقیق در گروه جدا از جدایه‌های ایرانی که قبلاً بررسی شده قرار گرفته است.

درخت ترسیم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین حرکتی نشان داد که جدایه‌های ایرانی در کنار سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن که از کشور آمریکا گزارش شده‌اند، قرار می‌گیرند. جدایه‌ها در مجموع در دو گروه اصلی قرار گرفتند که گروه اول نیز به دو زیرگروه تقسیم شد. جدایه‌های آمریکایی ویروس در هر دو گروه تقسیم شدند که نشان می‌دهد تنوع در بین جدایه‌های آمریکایی ویروس بیشتر از جدایه-

جدول ۱- کدهای دسترسی ثبت شده در NCBI به همراه میزان درصد شباهت‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینهای جدایه‌های FBV-1، مناطق جغرافیایی و نام جدایه‌های مربوطه استفاده شده در این تحقیق.

Table 1- Accession numbers submitted in NCBI along with the amino acid and nucleotide identities of FBV-1 isolates, geographic origins and isolate names used in this study.

Accession no. کد دسترسی	Origin- Isolate ناحیه - جدایه	Nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences identity with reference * (%)		Accession no. کد دسترسی	Origin- Isolate ناحیه - جدایه	Nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences identity with reference(./) * *درصد شباهت توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینهای جدایه مرجع	
		nt	aa			nt	Aa
JF411989	USA- Arkansas1	100	100	JQ282672	USA- SC1	99	99
JN112365	USA- AR2	99	99	KM610208	Iran- 4A	99	99
JN112366	USA- AR3	99	99	KM610209	Iran- 18A	99	99
JN112367	USA- AR4	99	98	KM610210	Iran- 2M	99	99
JN112368	USA- AR5	99	99	KM610211	Iran- 8M	99	99
JN050858	USA- CA10	99	99	KM610212	Iran- Razan	99	99
JN050859	USA- CA11	99	99	KM610213	Iran- Malayer	99	99
JN050860	USA- CA12	99	99	KM610214	Iran- 4M	99	99
JN050861	USA- CA13	99	99	KM610215	Iran- 9A	99	99
JN050864	USA- CA16	99	99	KM610216	Iran- 14M	99	99
JN050866	USA- CA18	99	98	KM610217	Iran- 2A	99	99
JN050867	USA- CA19	99	99	KU821715	Iran-mazandaran- N1	99	99
JN050869	USA- CA22	99	99	KU821716	Iran-golestan- N2	99	98
JN050872	USA- CA26	99	99	KU821717	Iran-fars- N3	99	98
JN050873	USA- CA27	99	99	KU821718	Iran-razavi khorasan- N4	99	98
JN050875	USA- CA30	99	99	KU821719	Iran-kermanshah- N5	99	99
JN050877	USA- CA32	99	98	KU821720	Iran-lorestan- N6	99	98
JN050881	USA- CA36	99	98	KU821721	Iran-lorestan- N7	99	99
JN050882	USA- CA37	99	99	KU821722	Iran-ghom- N8	99	98
JN050884	USA- CA39	99	99	KU821723	Iran-gilan- N9	99	99
JQ282673	USA- MI1	99	99	KU821724	Iran-tehran- N10	99	99
JQ282675	USA- CA41	99	99	KU821725	Iran-yazd- N11	99	99
JQ282668	USA- OH1	99	99	KU821726	Iran-kerman- N12	99	98
JQ282669	USA- OR1	99	99	FJ560944 ^a	Peru- Huachano1		

* جدایه آمریکایی **Arkansas 1 (JF411989)** که به عنوان جدایه رفرنس در این مطالعه استفاده شد.

^aعضوی از جنس بادناویروس به اسم **Sweetpotato badnavirus B (SPBV-B)** که به عنوان گروه خارجی استفاده شد.

* American isolate Arkansas 1 (JF411989) was used as a reference isolates for FBV-1.

^aSweetpotato badnavirus B (SPBV-B) members of the genus *Badnavirus* used as an out-group species.

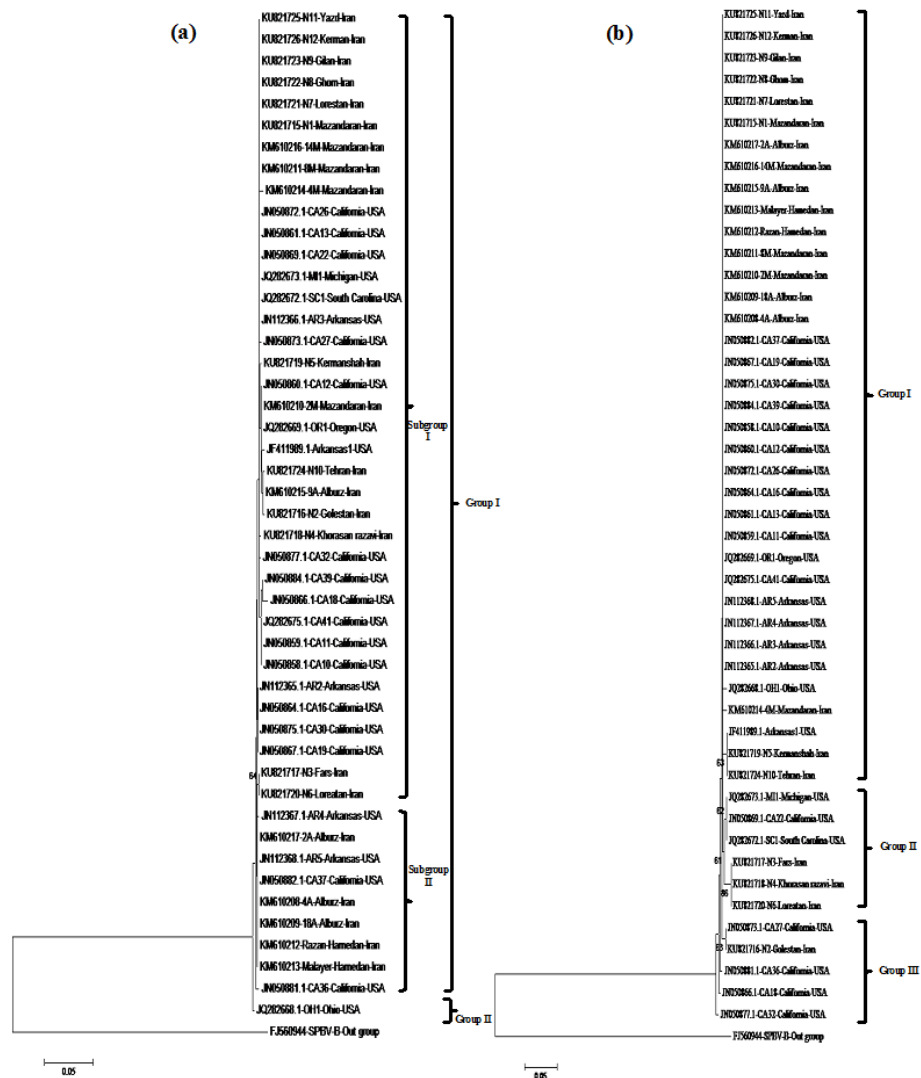
مورد بررسی قرار گرفتند در گروه اول فیلوژنتیکی بر مبنای اسیدآمینه قرار گرفتند. اما جدایه‌های بومی جداسازی شده در این تحقیق، در هر سه گروه وجود داشتند و با توجه به اینکه سویه‌های بررسی شده در این تحقیق از استان‌های مختلف کشور جمع‌آوری شده که عمده مناطق تولید انجیر را به خود اختصاص می‌دهند، می‌تواند نشانگر حضور و پراکنده بودن جمعیت‌های ژنتیکی متفاوتی از این ویروس در کشور باشد. جدایه‌های ایرانی که در گروه دوم قرار گرفتند در مقایسه با جدایه مرجع (JF411989) میزان شباهت آنها ۹۸٪ بود (جدول ۱) که این امر نشان دهنده این است که احتمالاً تنوع در جدایه‌های این گروه بیشتر بوده و تغییرات در سطح نوکلئوتید، به اسیدآمینه انتقال پیدا کرده و احتمالاً جمعیت‌های متنوع‌تری را تشکیل داده است. شاید این امر به دلیل باشد که در طول زمان جدایه‌های ویروس از همگرایی برخوردار نبوده و جمعیت‌های متنوع ویروس احتمالاً به دلیل انتقال ژن و یا فرار ژن بین جمعیت‌ها تشکیل شده است. اما، با توجه به دسته‌بندی جدایه‌ها در فیلوگرام بر مبنای توالی اسیدآمینه، نشان داد که تنوع جغرافیایی در تنوع جدایه‌ها بر مبنای ناحیه پروتئین حرکتی ویروس تاثیر داشت و توانست آنها را از هم تفکیک کند. به این صورت که جدایه‌هایی که در گروه دوم از درخت فیلوژنی ترسیم شده با اسیدآمینه قرار داشتند از مناطق گرم و خشک کشور بودند. جایی که انجیر در آن

اما آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌ها بر مبنای توالی اسیدآمینه دسته‌بندی متفاوتی را در مقایسه با توالی نوکلئوتیدی نشان داد (شکل 3b). درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر مبنای توالی اسیدآمینه-ای پروتئین حرکتی، سه گروه متمایز فیلوژنتیکی را تشکیل داد. در گروه اول جدایه‌های مربوط به استان‌های یزد (N11)، کرمان (N12)، گیلان (N9)، قم (N8)، لرستان (N7) و مازندران (N1) به همراه تعداد زیادی از جدایه‌های آمریکایی قرار گرفتند. در انتهای این گروه و با فاصله خیلی زیاد، جدایه‌هایی از کرمانشاه (N5) و تهران (N10) قرار گرفتند. در گروه دوم نیز جدایه‌هایی از فارس (N3)، خراسان‌رضوی (N4) و لرستان (N6) به همراه چند جدایه از کشور آمریکا در کنار یکدیگر قرار گرفتند. البته دو جدایه فارس و لرستان که در این گروه قرار گرفتند، در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی در زیر گروه یک از گروه اول و با فاصله خیلی زیادی نسبت به سایر جدایه‌های ایرانی بررسی شده در این تحقیق قرار گرفتند. در گروه سوم نیز جدایه N2 از استان گلستان به همراه چهار جدایه آمریکایی به صورت جدا دسته‌بندی شدند. بر اساس فیلوگرام ترسیم شده بر مبنای توالی اسیدآمینه، سویه‌های جداسازی شده از لرستان (N6 و N7) در دو گروه جدا قرار گرفتند که این امر گویای این است که سویه‌های لرستان در جمعیت‌های متفاوتی وجود دارند. همچنین تمامی جدایه‌های ایرانی FBV-1 که قبلاً

از ژنوم ویروس که مسئول بیماریزایی است و از تنوع شرایط جغرافیایی متاثر شده است را پیدا کرد که البته برای اثبات این فرضیه نیاز هست تا طول کامل ژنوم ویروس تعیین توالی شده و آنالیز فیلوژنتیکی به صورت جداگانه برای بخش‌های مختلف از ژنوم ویروس انجام گیرد.

تحقیق حاضر که به منظور شناسایی ناحیه-ای از ژنوم ویروس انجام شد که از حفاظت-شدگی نسبی برخوردار است، دومین تحقیق مولکولی می‌باشد که در سطح کشور و بر روی این ناحیه از ژنوم FBV-1 انجام شده است. اولین گزارش از این ویروس در ایران مربوط به *Alimoradian et al.* (2014) می‌باشد که این ناحیه از ژنوم را بررسی کرده و حضور این ویروس را از استان‌های همدان، البرز و مازندران گزارش کرده بودند. نتایج این تحقیق و نیز پژوهش‌های گذشته در مورد پراکندگی و وقوع عوامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک در انجیر حاکی از پراکندگی غیریکنواخت این عوامل در انجیرکاری‌های مختلف جهان و همچنین ایران دارد. پراکندگی غیریکنواخت می‌تواند به دلیل تغییرات ژنتیکی نژادهای متفاوت در جمعیت‌های ویروس در مناطق مختلف باشد (*Raybould et al.*, 1999).

مناطق بیشتر به صورت دیم کشت می‌شود و انجیرها، بومی آن مناطق هستند. مثل استان فارس که بیشترین میزان تولید انجیر دیم کشور را به خود اختصاص داده است. همچنین در گروه سوم از این طبقه‌بندی، جدایه جدا شده از استان گلستان قرار داشت. این استان نیز از مناطقی است که به علت شرایط آب و هوایی، میزان آلودگی بالاست و انجیر کشت شده در این استان به صورت آبی است و اکثراً قلمه‌هایی است که از مناطق دیگر آورده می‌شود و بومی خود این استان نیست. در گروه یک از این طبقه‌بندی نیز سایر جدایه‌های جدید جدا شده از کشور به همراه جدایه‌های قدیمی ایرانی قرار گرفتند. نتایج این تحقیق؛ نتایج محققین گذشته (*Alimoradian et al.*, 2016) را، که بر روی این قطعه ژنومی از ویروس کار کرده بودند، تایید کرد. از راهکارهایی که می‌توان در این خصوص ارائه داد این است که آزمون دامنه میزبانی را برای جدایه‌های بومی انجام داد و از آنجایی که این ویروس قابلیت انتقال به گیاهان علفی را دارد و با توجه به اینکه سایر ویروس‌های همراه با این ویروس که در بیماری موزائیک انجیر دخیل هستند قابلیت انتقال به میزبان‌های علفی را ندارند (*Alimoradian et al.*, 2016)، لذا می‌توان رابطه بین تنوع جغرافیایی و تنوع علائم را بررسی کرد تا بر این اساس بتوان بخشی



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی (a) و اسیدآمینو ای (b) ۱۲ جدایه ایرانی FBV-1 به همراه ژن‌های همولوگ آن از ایران و آمریکا (جدول ۱) با استفاده از الگوریتم Neighbor-joining و مدل p-distance و bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد. فقط ارزش‌های bootstrap بیشتر از ۶۰٪ نشان داده شده است. از توالی نوکلئوتیدی *Sweetpotato badnavirus B* به عنوان گروه خارجی در فیلوگرام استفاده شد (جدول ۱).

Figure 3- Phylogram generated from the alignment of nucleotide (a) and amino acid (b) sequences of 12 Iranian FBV-1 and other GenBank isolates from USA and IRAN (Table 1) using neighbor-joining algorithm, p-distance method and bootstrap consisting of 1,000 pseudoreplicates. Only bootstrap values greater than 60 % are shown. Nucleotide sequences of *Sweetpotato badnavirus B* was used as an outgroup to root the tree (Table 1).

موزائیک انجیر نبوده و FBV-1 در ایجاد این بیماری و شدت آن نقش موثرتری را دارا می-باشد. البته این امر را نیز نمی-توان انکار کرد که آلودگی مشترک هم بین عوامل ویروسی مختلف در انجیر وجود دارد که شاید اثر تشدید کنندگی روی هم دارند و در ایجاد علائم و بروز بیماری، چندین ویروس با هم نقش داشته باشند. از جمله مطالعاتی که در آینده در ادامه تحقیق حاضر می-توان انجام داد، می-توان به تعیین مقاومت ارقام تجاری (هم دیم و هم آبی) انجیر نسبت به ویروس‌های آلوده کننده این گیاه و همچنین تکثیر ژنوم کامل جدایه‌های ایرانی این ویروس و همچنین در ادامه تعیین عملکرد ناشناخته برخی نواحی حفاظت شده بر روی ژنوم این ویروس اشاره نمود.

اثبات این امر نیز نیازمند تحقیقات بیشتر در زمینه بررسی روابط فیلوژنتیکی و تغییرات ژنتیکی جمعیت نژادهای مختلف ویروس‌های دخیل در ایجاد بیماری موزائیک انجیر در کشورهای حوزه دریای مدیترانه می-باشد که بیشترین تولید انجیر را دارند. این دلیل یکی از دلایلی بود که این پروژه را به سمت بررسی تنوع ژنتیکی این ویروس که بسیار نیز گسترده است سوق داد. با توجه به تحقیقات انجام گرفته در ایران و جهان، ویروس موزائیک انجیر (*Fig mosaic virus*) که گفته می-شود عامل اصلی بیماری موزائیک انجیر می-باشد با درصد بسیار پایین‌تری در مقایسه با FBV-1 گزارش شده است (Shahmirzaie et al., 2012; Danesh-Amuz et al., 2014; Alimoradian et al., 2016). شاید بتوان گفت که احتمالاً FMV تنها عامل اصلی بیماری

منابع

- Alimoradian MR, Rakhshandehroo F, Shams-bakhsh M (2014). First record of Fig Badnavirus-1 in fig trees in Iran. *Journal of Plant Pathology* 96: S4.124.
- Alimoradin MR, Rakhshandehroo F, Shams-bakhsh M (2016). Prevalence and phylogenetic analysis of fig mosaic virus and fig badnavirus-1 in Iran. *Journal of Plant Protection Research* 56: 122-127.
- Alishiri A, Rakhshandehroo F, Salehi Jouzani GH, Shams-bakhsh M (2016). Detection and molecular characterization of Fig badnavirus-1 Iranian isolates on the basis of the protease gene. *Applied entomology and phytopathology* 84(1): 119-130.
- Blodgett EC, Gomec B (1967). Fig mosaic. *Plant Disease Reports* 51: 893-896.
- Caglayan K, Medina V, Yigit A, Kaya K, Gazel M, Serce CU, Caliskan O (2009). Transmission of the fig mosaic agent by the eriophyid mite *Aceria ficus* Cotte (Acari: *Eriophyidae*). *Journal of Plant Pathology* 91: 233.
- Castellano MA, Gattoni G, Minafra A, Conti M, Martelli GP (2007). Fig mosaic in Mexico and South Africa. *Journal of Plant Pathology* 89: 441-443.
- Condit IJ, Home WT (1933). A mosaic of the fig in California. *Phytopathology* 23: 887-897.
- Danesh-Amuz S, Rakhshandehroo F, Rezaee S (2014). Prevalence and genetic diversity of fig mosaic virus isolates infecting fig tree in Iran. *Acta Virology* 58:245-252.

- Dellaporta SL, Wood JY, Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Report* 1: 19-21.
- Elbeaino T, Kubaa RA, Digiario M, Minafra A, Martelli GP (2011a). The complete nucleotide sequence and genome organization of Fig cryptic virus, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin. *Virus Genes* 4: 415–421.
- Elbeaino T, Digiario M, Martelli GP (2011b). Complete sequence of Fig fleck-associated virus, a novel member of the family Tymoviridae. *Virus Research* 161: 198–202.
- Elbeaino T, Digiario M, Martelli GP (2012). RNA-5 and - 6, two additional negative-sense RNA segments associated with Fig mosaic virus. *Journal of Plant Pathology* 94:421–425.
- F.A.O (2013). F.A.O. FAOSTAT. Preliminary 2011 Production Data. Statistical Data. Internet Resource: <http://www.faostat.fao.org>.
- Gattoni G, Minafra A, Castellano MA, De Stradis A, Boscia D, Elbeaino T, Digiario M, Martelli GP (2009). Some properties of Fig latent virus 1, a new member of the family Flexiviridae. *Journal of Plant Pathology* 91: 543-552.
- Geering ADW, Hull R (2012). Caulimoviridae. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. San Diego: Elsevier, pp 429-443.
- Huang X, Madan A (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9: 868-877.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2011). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York.
- Laney AG, Hassan M, Tzanetakis IE (2012). An integrated badnavirus is prevalent in fig germplasm. *Phytopathology* 102: 1182-1189.
- Minafra A, Chiumenti M, Elbeaino T, Digiario M, Bottalico G, Pantaleo V, Martelli GP (2012). Occurrence of Fig badnavirus 1 in fig trees from different countries and in symptomless seedlings. *Journal of Plant Pathology* 94: S4.105.
- Nei M, Kumar S (2000). *Molecular evolution and phylogenetic*. Oxford University Press, New York.
- Pearson WR, Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the national academy of sciences USA* 85: 2444-2448.
- Raybould AF, Maskell LC, Edwards ML, Cooper JI, Gray AJ (1999). The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of *Brassica oleraceae*. *New Phytologist* 141: 265–75.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed, cold spring harbor laboratory press, New York.
- Shahmirzaie M, Rakhshandehroo F, Zamanizadeh HR, Elbeaino T (2012). Current status of fig mosaic disease in Iran. *Journal of Phytopathology* 160:324-330.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Tzanetakis I, Martin R (2010). New viruses found in fig exhibiting mosaic symptoms. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. *Julius-Kuhn-Archiv* 427.

Walia JJ, Salem NM, Falk BW (2009). Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic. *Plant Diseases* 93: 4-10.

Watson L, Dallwitz MJ (2004). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Available in <http://delta-intkey.com>.

Phylogenetic analysis of new Iranian Fig badnavirus-1 isolates based on their movement protein gene sequence

Alishiri A.¹, Rakhshandehroo F.^{*2}, Salehi jouzani GH.³, Shams-bakhsh M.⁴

¹PhD student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran 14515-775, Iran.

²Assistant Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran 14515-775, Iran.

³Associate Professor, Department of Microbial Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj 31535-1897, Iran.

⁴Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Abstract

Fig mosaic disease is considered as the most common fig viral disease, which occurs worldwide. *Fig badnavirus-1* (FBV-1) is one of the most important viruses involved in this viral disease. In the present research, phylogenetic relationship between the Iranian and other detected FBV-1 isolates was studied. A genomic fragment with an expected size about 1090 bp was amplified from the movement protein coding region of twelve virus isolates using specific primers. Amplified fragments were cloned in plasmid pTZ57R/T, and sequenced. Obtained sequences were phylogenetically compared with the corresponding isolates available in the GenBank after multiple alignments. The phylogenetic tree was drawn for the FBV-1 isolates based on the movement protein gene sequence. The studied isolates were categorized into two distinct phylogroups in which Iranian isolates were separated into two different subgroups in group I with 99% identity at the nucleotide level. Phylogeny on the basis of the amino acid sequences categorized isolates with 98-99% identity into three different groups. According to the results of this study, it could be concluded that genetic variation between Iranian isolates is less than that of American isolates, and additionally the genetic variation between the isolates is affected by the geographical condition.

Keywords: *Fig badnavirus-1, Phylogenetic analysis, movement protein gene.*

* Corresponding author: Rakhshandehroo F. Tel: 09124786687 Email: rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir