

## بررسی آلودگی ارقام مختلف نیشکر به ویروس موزاییک نیشکر (SCMV) در استان خوزستان

زینب سنجابی فرد<sup>۱</sup>، حمید رجبی معماری<sup>۲\*</sup> و مهدی مهرابی کوشکی<sup>۳</sup>

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم

زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷)

### چکیده

ویروس موزاییک نیشکر (SCMV) یکی از بیماری‌های مهم گیاه نیشکر است. در این پژوهش غربالگری بیماری ویروس موزاییک نیشکر در ارقام وارداتی و نمونه‌های موجود در داخل با روش‌های مولکولی مبتنی بر اسید نوکلئیک انجام شد. در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳، نمونه‌های دارای علائم بیماری از ۹۰ رقم مختلف مربوط به شش کشتخوان نیشکر جمع‌آوری و بخش‌هایی از پهنک آن‌ها جداسازی شدند. نمونه‌ها در شرایط سرمای خشک-انجمادی و در ازلت مایع پودر شدند. آغازگر مناسب جهت تکثیر حدود ۱۰۴۰ جفت باز از ناحیه پروتئین پوششی و پروتئین Nib طراحی و با استفاده از روش RT-PCR تکثیر شد. از بین ۹۰ نمونه مورد بررسی، ۱۰ نمونه نیشکر با تولید قطعات تکثیری مورد انتظار آلوده به ویروس موزاییک نیشکر بودند. این نمونه‌ها مربوط به ارقام IRC99-06، V58-4 و Q58 از موسسه تحقیقات و آموزش توسعه جانبی نیشکر خوزستان، IRC99-09، IRC00-21 و 4380-3 از کشت و صنعت سلمان فارسی، CP80-1557 و V68-74 از کشت و صنعت امام خمینی و دو رقم نامشخص بودند. چهار نمونه از قطعات تکثیری به صورت دو جهته و مستقیم توالی‌یابی و در بانک ژن ذخیره شدند. جستجوی بلاست توالی‌های مربوط به چهار جدایه ردیابی شده Kh44، Kh41، Kh40 و Kh28 نشان داد که این جدایه‌ها دارای بیشترین شباهت به جدایه‌های ایرانی و آرژانتینی هستند. درخت فیلوژنتیکی ترسیمی با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه نشان داد که جدایه‌های ایران احتمالاً از جمعیت‌های آرژانتینی و چین منشأ گرفته‌اند.

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیکی، پوشش پروتئینی، خوزستان، ویروس موزاییک نیشکر.

## A study on the infection of Sugarcane Mosaic Virus in different cultivars of sugarcane in Khuzestan province

Zeinab Sanjabifard<sup>1</sup>, Hamid Rajabi-Memari<sup>2\*</sup> and Mehdi Mehrabi-Koushki<sup>3</sup>

1, 2. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran and Biotechnology and Bioscience Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(Received: Apr. 16, 2017 - Accepted: Feb. 6, 2019)

### ABSTRACT

*Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) is one of the important diseases of the sugarcane. In this study, the infection of sugarcane mosaic virus in imported and existing cultivars was screened based on nucleic acid-based molecular methods. During 2014–15, samples showing disease symptoms were collected from 90 different cultivars grown in six sugarcane agro-industries and their partial blades were separated. The samples were freeze-dried and powdered in liquid nitrogen. Suitable primers were designed to amplify 1040 bp from the nuclear inclusion B and coat protein gene sequences using the RT-PCR method. Ten out of 90 surveyed samples were SCMV-infected and produced expected-size fragments. These samples belonged to the cultivars of IRC99-06, V58-4, and Q58 from Sugarcane Research and Training Institute for the Development of Industries in Khuzestan, IRC99-09, IRC00-21, and 4380-3 from Salman Farsi agro-industry, CP80-1557 and V68-74 from Imam Khomeini agro-industry and two uncertain cultivars. Four out of 10 detected samples were directly sequenced and deposited in GenBank. A BLASTn search of the four detected isolates, including Kh10, Kh41, Kh44, and Kh28, showed the highest identity to isolates from Iran and Argentina. Phylogenetic tree constructed using the maximum likelihood algorithm showed that the Iranian isolates were probably originated from Argentina and China.

**Keywords:** Coat protein, Khuzestan, Phylogenetic analysis, Sugarcane Mosaic Virus.

\* Corresponding author E-mail: hamidmemory@gmail.com

### مقدمه

نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) از خانواده گرامینه یکی از مهم‌ترین گیاهان صنعتی راهبردی در بسیاری از کشورهای دنیا است (Sadrruy, 2009). نیشکر مستعد آلودگی توسط تعداد زیادی بیمارگر است که باعث کاهش عملکرد این گیاه در سطح دنیا می‌شوند (Goncalves, 2012). بیماری‌های ویروسی باعث کاهش اقتصادی شدید از طریق کاهش عملکرد و کیفیت محصول می‌شوند (Zambrano, 2003). ویروس موزاییک نیشکر (Sugarcane mosaic virus) به دلیل کاهش عملکرد زیاد در محصول به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گیاه نیشکر محسوب می‌شود. این ویروس در مزرعه با ایجاد علائم برگ‌ی تشخیص داده می‌شود و شدت بروز آن با توجه به ارقام مختلف نیشکر، شرایط محیطی از قبیل درجه حرارت و نوع نژاد ویروس بسیار متغیر است. گیاه میزبان در مراحل اولیه توسعه بیماری همراه با بافت‌مردگی ساقه و برگ و کوتولگی گیاه است. معمولاً در پهنک برگ علائم سایه‌روشن همانند جزایری سبزرنگ در یک زمینه سبز کم‌رنگ یا سبز مایل به زرد دیده می‌شوند و این علائم بیشتر در انتهای برگ در قسمت پهنک قابل‌مشاهده هستند (Li et al., 2013).

ویروس موزاییک نیشکر برای اولین بار در جاوا (اندونزی) در سال ۱۸۹۲ تشخیص داده شد و در سال ۱۹۲۰ ماهیت بیماری و نحوه انتقال آن روشن گردید (Koike, 1989). تاکنون سویه‌های مختلفی از این ویروس روی نیشکر، ذرت، سورگوم و گیاهان غیر مزروعی غلات گزارش شده‌اند. تا سال ۱۹۸۹ تفکیک و تمایز جدایه‌های این ویروس‌ها با مشکلات زیادی مواجه بود (Shukla, 1989). در گذشته، تعیین و تشخیص سویه‌های موزاییک نیشکر در دنیا بر اساس روش‌های سرولوژیکی و بیولوژیکی مانند دامنه میزبانی و حفاظت تقاطعی انجام شده است؛ اما در دو دهه اخیر بر اساس آنالیز ترادف نوکلئوتیدی سه ناحیه از ژنوم شامل توالی کدکننده پروتئین پوششی و ناحیه ترجمه نشدنی (UTR) و بالأخص پروتئین P انجام شده است (Adams, 2004).

ویروس موزاییک نیشکر در ایران در سال ۱۳۷۲ از خوزستان بر اساس روابط سرولوژیکی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی شناسایی شد (Amiri & Izadpanah, 1993). Ghasemi (2002, 2005) بر اساس روابط سرولوژیکی با آنتی‌سرم چند همسانه‌ای MDMV-B در آزمون ELISA عوامل ایجادکننده موزاییک نیشکر را در خوزستان در دو گروه قرار دادند که یک گروه آن به نام SC-Q86 با این آنتی‌سرم واکنش مثبت نشان داد. Masoumi (2008, 2011) جدایه‌های SCMV از خوزستان را به طریق آنالیز مولکولی بررسی و آن‌ها را سویه SCMV-A تشخیص داد. Masoumi (2008) جدایه‌های KHQ86 و KhzL66 جدا شده از مزارع نیشکر شرکت کشت و توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان را با استفاده از آنالیز مولکولی ناحیه پوشش پروتئینی و قسمت‌های ترجمه نشدنی پایین دست ژنوم (CP-UTR) بررسی و جایگاه رده‌بندی آن‌ها را در میان سویه‌های SCMV تعیین کرد.

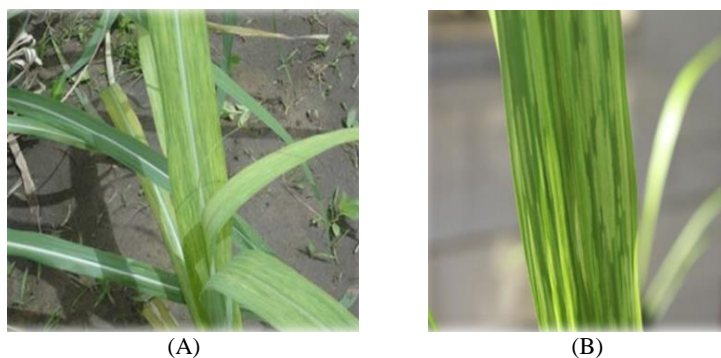
با در نظر گرفتن اهمیت زراعت نیشکر در استان خوزستان و نامشخص بودن آلودگی ارقام مختلف به ویروس موزاییک نیشکر و پراکنش آن در کشتخوان‌های مختلف، این پژوهش جهت بررسی آلودگی ۹۰ رقم نیشکر از شش کشتخوان مختلف برنامه‌ریزی شد.

### مواد و روش‌ها

#### جمع‌آوری و نگهداری نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های آلوده برگ‌ی گیاه نیشکر مورد استفاده در این پژوهش در چندین نوبت از پاییز ۱۳۹۳ تا پاییز ۱۳۹۴ جمع‌آوری گردیدند. نمونه‌های آلوده به موزاییک نیشکر با توجه به علائم ظاهری موزاییک شامل ظهور نواحی رنگ‌پریده، نواحی سبز تیره‌رنگ در یک زمینه سبز کم‌رنگ یا سبز مایل به زرد در قاعده برگ‌های جوان (شکل ۱) جمع‌آوری شدند.

جمع‌آوری نمونه‌ها از ۹۰ رقم مختلف مربوط به شش کشتخوان شرکت توسعه نیشکر و صنایع جانبی، موزه لوزان، کشت و صنعت امام خمینی، موزه کشت و صنعت امام خمینی، دعبل خرابی و کشت و صنعت نیشکر امیرکبیر انجام شد.



شکل ۱. گیاهان نیشکر آلوده به ویروس موزاییک نیشکر. برگ‌ها علائم موزاییک را نشان می‌دهند.

Figure 1. Sugarcane plants infected with Sugarcane mosaic virus. Leaves are showing the mosaic symptoms

ارقام CP73-1225، CP74-1119، C128-83، CP80-1557، CP72-370، CP68-1067، CP76-331، V68-74، CL35-76، CP70-1133، CP78-1628، V58-، IRC99-06، MEX57-473، V68-78، CO407، Q58، IRC99-09، IRC00-21، IRC99-09، A80-343، CP80-1557 و V68-74 بررسی شدند. ۹۰ نمونه پس از انتخاب و جمع‌آوری با دقت در کیسه‌های مجزا به‌صورت جداگانه بسته‌بندی شدند. نمونه‌ها بر روی یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی منتقل گردیدند. برای هر نمونه، قطعاتی از پهنک برگ که دارای علائم بودند، جداسازی و در لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری خشک انجمادی شدند. برای این منظور در ابتدا لوله‌های در بسته حاوی نمونه‌ها به مدت حداقل دو ساعت در فریز ۸۰- درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس روی یخ و با سرعت درب آن‌ها با گاز استریل جایگزین و به دستگاه فریزدرایر (Freeze-Dryer، Alpha 1-2LD Plus، Christ) منتقل گردید. نمونه‌ها پس از ۱۶ ساعت قرارگیری در شرایط خلأ و سرما به‌صورت کامل خشک و در ازلت مایع پودر شدند. پودرهای هر نمونه در لوله‌های مسدودشده به رطوبت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

#### طراحی آغازگر جهت ردیابی ویروس

با استفاده از هم‌راستایی ژنوم کامل چندین جدایه شناخته‌شده جنس Potyvirus، ابتدا جفت آغازگرهای رفت Poty-Cp-F (5'-CNTGGHTDYTGBGARATGCARCC-3') و برگشت Poty-Cp-R (5'-TGCDGCTTCATCTGCATRTGG-3') جهت تکثیر حدود ۹۳۰، ۹۷۰، ۱۰۴۰-۹۹۰ و ۱۰۴۵ جفت باز از ناحیه ژنومی پوشش پروتئینی و NIB پروتئین به ترتیب از ویروس‌های موزاییک کوتولگی ذرت (MDMV)، موزاییک جانسون‌گراس (JgMV)، موزاییک نیشکر (SCMV) و موزاییک سورگوم (SrMV) طراحی شدند. همچنین آغازگر رفت SCMV-Cp-F جهت (5'-CGTGGCTTYTYGARATGCAACC-3')

استخراج RNA جهت استخراج RNA کل، مقدار ۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه پودر شده نیشکر برداشته شد و با استفاده از فنل و بافر استخراج (EDTA 1mM، Tris-HCl 10mM، NaCl 0.1M، SDS 1%، PVP 2% and 2-

#### استخراج RNA

استخراج RNA جهت استخراج RNA کل، مقدار ۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه پودر شده نیشکر برداشته شد و با استفاده از فنل و بافر استخراج (EDTA 1mM، Tris-HCl 10mM، NaCl 0.1M، SDS 1%، PVP 2% and 2-

buffer، ۱/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  (50mM)، ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA polymerase (۵U/μl, KAPA, USA) و آب میلی کیور در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر بود. لوله‌های واکنش پس از تنظیم و اجرای برنامه PCR در ترموسایکلر مدل Biometra T Personal زمانی که دمای ذوب ۹۴ درجه سلسیوس بر روی صفحه نمایش مشاهده شد به دستگاه منتقل شد. برنامه زمانی و رژیم حرارتی برای انجام واکنش PCR بدین شرح بود، مرحله اول واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، مرحله دوم شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۴۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷۰ ثانیه (۳۵ چرخه) و مرحله آخر گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه انجام شدند. محصولات تکثیر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند و تکثیر قطعه پیش‌بینی شده با طول حدود ۱۰۴۰ جفت باز بررسی شد (شکل ۲).

#### خالص‌سازی محصولات RT-PCR، توالی‌یابی و آنالیز ترادف‌ها

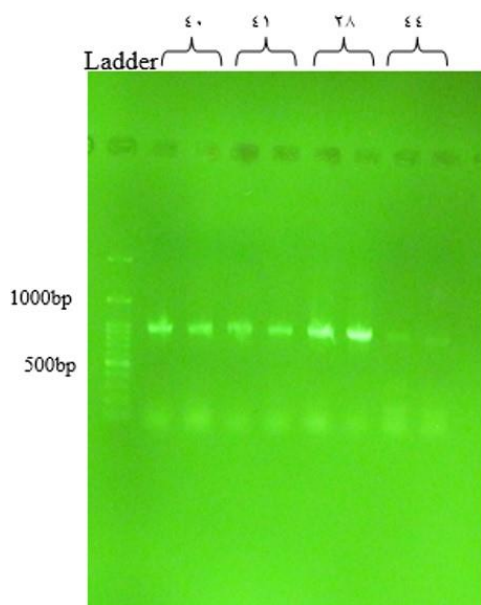
محصولات PCR مربوط به هر جدایه به روش رسوب با اتانول تغلیظ و شست‌وشو شدند (Crouse & Amorese, 1987). برای این منظور، یک‌دهم حجم محصول، استات سدیم ۳ مولار با pH ۵/۴ و ۲-۳ برابر حجم آن اتانول مطلق اضافه و به مدت یک شب در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و در ۱۰۰۰۰ g سانتی‌فیوژ و رسوب حاصله با استفاده از اتانول ۷۰ درصد شست‌وشو شد. رسوب نهایی در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر میلی کیور حل و جهت توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس به شرکت نوژن ارسال گردید. الکتروگرام مربوط به هر توالی‌یابی توسط نرم‌افزار BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall, 1999) بررسی شد. خوانش‌های پیشرو و معکوس هر ژن برای هر جدایه با استفاده از نرم‌افزار DNA Baser Sequence Assembler v4 مونتاژ و به‌عنوان توالی تصحیح‌شده‌ای نهائی مدنظر قرار گرفتند. سپس

ردیابی اختصاص ویروس موزاییک نیشکر طراحی و همگی توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) سنتز شدند.

#### تهیه cDNA و تکثیر بخش‌هایی از ناحیه ژنومی پوشش پروتئینی و Nib

با هدف ردیابی SCMV، واکنش نسخه‌برداری معکوس با استفاده از آغازگر اختصاصی برگشت Poty-Cp-R انجام شد. جهت سنتز cDNA تک‌رشته‌ای، ابتدا دو میکرولیتر dNTP مخلوط (۱۰ میکرومولار)، یک میکرولیتر آغازگر Poty-Cp-R (۱۰ میکرومولار)، دو میکرولیتر از RNA الگو و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل عاری از RNase در میکروتیوب‌های استریل با یکدیگر مخلوط شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سلسیوس درون دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. بعد از یک توقف دودقیقه‌ای روی یخ، مخلوط ۱۰ میکرولیتر بافر نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcriptase 2x Reaction Buffer)، یک میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Omniscript) (Reverse Transcriptase, Qiagen, 100U/μl) و ۰/۵ میکرولیتر Ribolock RNase Inhibitor (40U/μl) به حجم کلی ۲۰ میکرولیتر به مواد قبلی اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس، ۶۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. برای تکثیر حدود ۱۰۴۰ جفت باز از ناحیه ژنومی پوشش پروتئینی و Nib ویروس موزاییک نیشکر در ابتدا از جفت آغازگر Poty-Cp-F/Poty-Cp-R جهت ردیابی این گونه به همراه سایر اعضای جنس *Potyvirus* استفاده شد و در ادامه برای ردیابی اختصاصی SCMV در نمونه cDNA، از جفت آغازگر SCMV-Cp-F/Poty-Cp-R استفاده گردید. مخلوط واکنش‌های تکثیر قطعات نسخه‌برداری شده معکوس (RT-PCR) شامل ۱/۵ میکرولیتر آغازگر رفت Poty-Cp-F یا SCMV-Cp-F (۱۰ میکرومولار)، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت Poty-Cp-R (۱۰ میکرومولار)، دو میکرولیتر cDNA مرحله قبل، دو میکرولیتر dNTP مخلوط (۱۰ میکرومولار)، ۲/۵ میکرولیتر 10x PCR

DNA Baser Sequence Assembler v. 7.0.9.0 و ویرایش و مونتاژ شدند. توالی‌ها در بانک ژن ذخیره و تحت شماره‌های KU358938، KU358939، KU358940 و KU245509 قابل دسترسی هستند. میزان شباهت توالی‌ها با جدایه‌های مرجع تعیین شد. نتایج حاصل از عملیات جستجوی بلاست در چهار جدایه ردیابی شده SCMV-Kh40، SCMV-Kh41، SCMV-Kh44 و SCMV-Kh28 نشان دادند که این جدایه‌ها دارای بیشترین شباهت به جدایه‌های قبلی SCMV-KhzL66 (DQ369960.1) و SCMV-KhzQ86 (DQ4389.1) از ایران (با شباهت نوکلئوتیدی ۹۸-۸۸ درصد) هستند. همچنین این جدایه‌ها شباهت بالای با جدایه‌های SCMV-ARG-345 (JX23865.1) و SCMV-ARG-129 (JX23864.1) از کشور آرژانتین را نشان دادند (۹۷-۸۸ درصد شباهت نوکلئوتیدی).



شکل ۲. نقوش الکتروفورز ۳ میکرولیتر از محصولات واکنش RT-PCR روی ژل آگارز یک درصد.  
Figure 2. Electrophoresis map of 3  $\mu$ l of RT-PCR products on 1% gel agarose

ارتباط تکاملی و فیلوژنتیکی جدایه‌های این آزمایش با توالی‌های مربوط به جدایه‌های شناخته‌شده ارزیابی شد. برای رسم درخت فیلوژنی ۱۶ توالی SCMV تأیید شده و موجود در بانک ژن انتخاب گردیدند و به

جستجوی شباهت‌ها با استفاده از الگوریتم جستجوی بلاست در پایگاه داده NCBI انجام گردید.

### آنالیز فیلوژنتیکی با رسم درخت فیلوژنی

جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش و سایر جدایه‌های موجود در پایگاه داده NCBI، درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد (شکل ۳). ارتباط تکاملی و فیلوژنتیکی جدایه‌های این پژوهش با توالی‌های مربوط به جدایه‌های شناخته‌شده ارزیابی شدند. این توالی‌های رفرنس از پایگاه اطلاعات ژنوم بانک ژن NCBI برداشت شد. انتخاب توالی‌ها با در نظر گرفتن تنوع جدایه‌ها در دنیا و حداقل ۱۰۰ درصد همپوشانی توالی‌های برداشت‌شده با ناحیه تکثیری در این پژوهش انجام شد. گونه MDMV که از همین جنس است به‌عنوان outgroup جهت ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه (ML) و با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 (Tamura et al., 2013) انجام شد که از نظر مدل تکاملی مشابه روش BI است.

### نتایج و بحث

با استفاده از هر دو جفت آغازگر Poty-Cp-F/Poty-Cp-R و SCMV-Cp-F/Poty-Cp-R از بین ۹۰ نمونه مورد بررسی ۱۰ نمونه نیشکر با تولید قطعات تکثیری موردانتظار (1040 bp) آلوده به ویروس موزاییک نیشکر شناخته شدند و جهت ردیابی این گونه در نظر گرفته شدند. البته راندمان تکثیر و تولید قطعات تکثیری خالص با جفت آغازگر دوم مناسب‌تر بود. این نمونه‌ها شامل Kh-28، Kh-40 و Kh-41 مربوط به ارقام IRC99-06، V58-4 و Q58 از موسسه تحقیقات و آموزش توسعه جانبی نیشکر خوزستان، Kh-21، Kh-27 و Kh-30 مربوط به ارقام IRC00-21، IRC99-09 و 43A80-3 از کشت و صنعت سلمان فارسی، Kh-33 و Kh-39 مربوط به ارقام CP80-1557 و V68-74 از کشت و صنعت امام خمینی و نمونه‌های Kh-43 و Kh-44 تحویلی از موسسه نیشکر که رقم و کشتخوان آن نامشخص است.

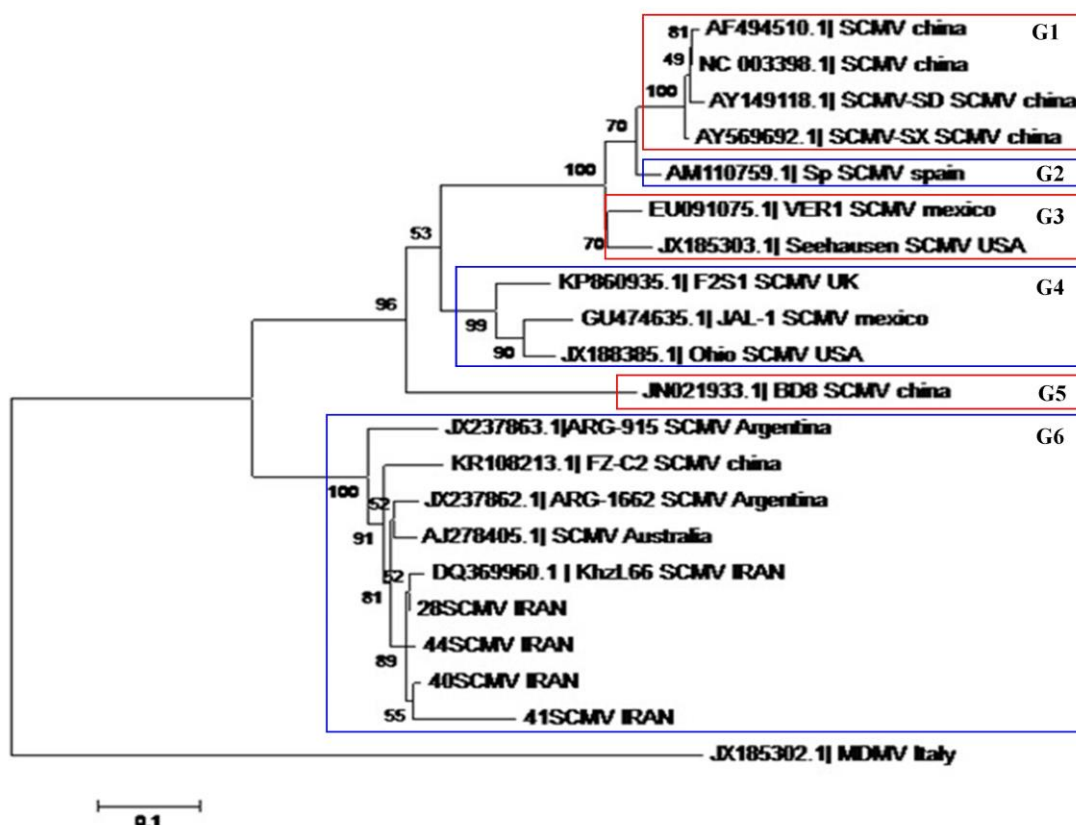
چهار نمونه از ۱۰ نمونه آلوده توالی یابی گردیدند. توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit

Masoumi (2008) از مزارع نیشکر شرکت کشت و توسعه نیشکر و صنایع جانبی استان خوزستان جداسازی شده بودند. Masoumi (2008) جدایه‌های ذکر شده را در آنالیز فیلوژنتیکی در گروه جدایه‌هایی از کشورهای مصر و آفریقای جنوبی قرار دادند و نتیجه گرفتند که جدایه‌های ایرانی SCMV دارای منشأ خارجی هستند و احتمالاً با قلمه وارد کشور شدند. با توجه به اینکه از چهار جدایه مورد بررسی در پژوهش حاضر از استان خوزستان، سه جدایه SCMV-Kh40، SCMV-Kh41 و SCMV-Kh28 از محل مشابه پژوهش Masoumi (2008) (شرکت توسعه و صنایع جانبی خوزستان) جمع‌آوری شده بود پس می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً جدایه‌های مصر و آفریقای جنوبی دارای منشأ واحدی با جمعیت‌های ایران هستند یا جمعیت‌های حد واسطی هستند که احتمالاً از جمعیت‌های آرژانتین (ARG-915) یا چین (FZ-C2) منشأ گرفته‌اند.

Gao et al. (2011) در آنالیز فیلوژنتیکی جدایه BD8 (JX021939.1) از کشور چین نشان دادند که این جدایه در گروه جدایه‌هایی از کشورهای تایلند و ویتنام قرار می‌گیرد و این نشان داد این جدایه در آسیای جنوبی پراکنش دارد. با توجه به این‌که در درخت رسم شده در پژوهش حاضر احتمال داده شده است که جدایه BD8 یکی از منشأهای احتمالی جدایه‌های چین، اسپانیا، مکزیک، آمریکا و انگلستان باشد، پس می‌تواند احتمال داد طبق آنالیز فیلوژنتیکی Gao et al. (2011)، آسیای جنوبی منشأ احتمالی این جدایه‌ها است. Xu et al. (2008) با رسم درخت فیلوژنتیکی از ۲۰۶ جدایه ویروس موزاییک نیشکر نشان دادند که تمامی آن‌ها به پنج زیرگروه فیلوژنتیکی تقسیم می‌شوند و با توجه به قرار گرفتن تمامی جدایه‌های چین در یک کلاس مجزا نتیجه گرفتند که جدایه‌های چین از بقیه جدایه‌های کشورهای دیگر متفاوت هستند. در درخت فیلوژنی به دست آمده در پژوهش حاضر با توجه به اینکه جدایه‌های چین سه گروه مجزا تشکیل دادند نمی‌توان نتیجه Xu et al. (2008) را تأیید کرد که این احتمالاً می‌تواند مرتبط به جمعیت‌های متنوع‌تری از این ویروس در چین باشد که در پژوهش فیلوژنتیکی Xu et al. (2008) نماینده نداشته‌اند.

همراه چهار جدایه به دست آمده در پژوهش حاضر و یک جدایه از MDMV (جهت ریشه‌دار کردن درخت) رسم درخت فیلوژنی انجام شد. ارزیابی بهترین مدل برای هر گروه توالی با استفاده از همین نرم‌افزار انجام شد و مدل TN93-G+I برای توالی‌ها انتخاب شد. برای رسم درخت فیلوژنیک ابتدا توالی‌ها در نرم‌افزار MEGA 6 هم‌ردیف شدند و سپس طبق مدل به دست آمده در همین نرم‌افزار درخت فیلوژنی رسم گردید (شکل ۳). بر اساس توپولوژی ارائه شده در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه (شکل ۳)، جدایه‌های مورد بررسی به همراه جدایه‌هایی از کشورهای چین، اسپانیا، مکزیک، آمریکا، بریتانیا، آرژانتین، استرالیا و قبلی خوزستان انتخاب شده از بانک ژن در شش گروه فیلوژنتیک G1 تا G6 قرار گرفتند (شکل ۳). البته در هر کدام از این گروه‌ها تنوع مشاهده می‌شود که منجر به شکل‌گیری زیرگروه‌های فیلوژنتیک می‌شود. چهار جدایه مورد بررسی در این پژوهش با جدایه دیگری از ایران (SCMV-Kh41) و جدایه‌هایی از آرژانتین (ARG-1662 و ARG-915)، چین (SCMV-FZ-C2) و استرالیا (با شماره دسترسی Aj278405) در گروه G6 خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بالای ۱۰۰ درصد ایجاد کردند. این خوشه‌بندی نشان می‌دهد که جدایه‌های ایران احتمالاً از جمعیت‌های آرژانتین (ARG-915) و چین (FZ-C2) منشأ گرفته است. جدایه‌های چین در سه گروه فیلوژنتیک G1، G5 و G6 قرار گرفتند. بیشتر جدایه‌های چین (جدایه‌های SCMV-SD، SCMV-SM و دو جدایه ناشناخته با شماره‌های دسترسی AF494510 و NC003398) گروه فیلوژنتیک G1 را ایجاد کردند و به نظر می‌رسد که از جمعیت‌های احتمالی دو جدایه دیگر چین (BD8 از گروه G5 یا FZ-C2 از گروه G6)، اسپانیا، مکزیک، آمریکا و انگلستان منشأ گرفته باشند. علاوه بر این جدایه‌های اسپانیا، مکزیک، آمریکا و انگلستان احتمالاً از جمعیت‌های چین (BD8 از گروه G5 یا FZ-C2 از گروه G6) و آرژانتین (ARG-1662 و ARG-915) ایجاد شده‌اند.

بالاترین شباهت جدایه‌های مورد بررسی با دو جدایه قبلی ایران KhzL66 (DQ369960.1) و KhzQ86 (DQ4389.1) است که قبلاً توسط



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی جدایه‌ها که در آنالیز درست‌نمایی بیشینه بر اساس بخش‌هایی از توالی‌های پروتئین پوششی و Nib با استفاده از مدل TN93-G+I به دست آمده است. درصد تکرار کلادها در ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری کاذب (بوت‌استراپ) در محل ریشه کلادها درج شده است. درخت با استفاده از گونه‌ی نزدیک MDMV ریشه‌دار شده است.

Figure 3. The phylogenetic tree of isolates constructed by the maximum likelihood analysis based on partial sequences of coat protein and NIB protein with the TN93-G+I model. Percentages of replicate trees in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree was rooted to the close species of MDMV.

مانند آلمان و اسپانیا در یک شاخه و جدایه‌های آمریکایی و استرالیایی در شاخه دیگر قرار گرفتند. در پژوهش Maasoumi (2011) جدایه‌های ایرانی در کنار جدایه‌های آمریکایی و استرالیایی قرار گرفت و نشان دادند میزان شباهت جدایه‌ی SCMV ایرانی با جدایه‌های اروپایی ۸۷/۹ تا ۹۵/۵ درصد، با جدایه‌ی چینی ۸۸/۴ درصد و با جدایه‌های آمریکایی و استرالیایی ۹۳/۶ تا ۹۵/۱ درصد است. علاوه بر این، Haider (2011) با آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌های آلوده به SCMV نشان دادند نمونه‌های استرالیا، ایران و چین در یک خوشه قرار می‌گیرند. با توجه به نتیجه‌ی ارائه‌شده در پژوهش‌های Masoumi (2008) و Haider (2011) و همچنین درخت رسم‌شده در پژوهش حاضر که جدایه‌های ایران

با ارزیابی توپولوژی به نمایش گذاشته در این درخت فیلوژنتیکی می‌توان پیشنهاد کرد که کلیه جدایه‌های این پژوهش (SCMV-Kh40، SCMV-Kh41، SCMV-Kh44 و SCMV-Kh28) و سایر جدایه‌های بومی خوزستان (SCMV-KhZL66) احتمالاً از جمعیت‌های کشور استرالیا (SCMV-Brisbane)، آرژانتین (SCMV-ARG-915)، منشأ (SCMV-FZ-C2) چین و (ARG-1662) گرفته‌اند. اگرچه جدایه‌های ایرانی بیشترین قرابت تکاملی را به ترتیب با بخشی از جمعیت‌های استرالیا (SCMV-Brisbane) و آرژانتین (SCMV-ARG-915) دارند. Maasoumi (2011) با بررسی تعدادی از جدایه‌ها و رسم دندوگرام نشان دادند که SCMV در دو زیرشاخه تقسیم می‌شود؛ که سویه‌های اروپایی

می‌توان گفت که بیشتر این تنوع‌ها و اشتقاقیات دودمانی محصول اشتقاقیات فیلوژنتیک در جمعیت‌های اولیه این ویروس در آرژانتین است.

### سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات صنایع جانبی توسعه نیشکر استان خوزستان جهت جمع‌آوری نمونه و حمایت مالی ایشان برای اجرای این طرح، تشکر و قدردانی می‌گردد.

قرابت به جدایه‌های استرالیا و چین نشان دادند، می‌توان نتیجه گرفت جدایه‌های ایران و استرالیا و چین شباهت دارند. لذا با توجه به اینکه که جمعیت‌های احتمالی اسپانیا (SCMV-SP)، مکزیک (SCMV-VER1)، آمریکا (SCMV-SCMV-E)، انگلستان (SCMV-F2S1) احتمالاً از جمعیت‌های جدایه SCMV-BD8 چین منشأ می‌گیرد و از طرفی جمعیت‌های استرالیا و چین نیز از آرژانتین (SCMV-ARG-915، ARG-1662) منشأ می‌گیرند.

### REFERENCES

1. Amiri, F. & Izadpanah, K. (1993). Purification, serology and transmission of *Sugarcane mosaic virus* in Khuzestan. In: *Proceedings of 11<sup>th</sup> Plant Protection Congress of Iran*, 28 Aug.-2 Sep. 1993 Rasht (Iran Islamic Republic).
2. Adams, M. J., Antoniw, J. F. & Fauquet, C. M. (2005). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology*, 150(3), 459-479.
3. Crouse, J. & Amorese, D. (1987). Ethanol precipitation: ammonium acetate as an alternative to sodium acetate. *Focus*, 9(2), 3-5.
4. Damaj, M. B., Beremand, P. D., Buenrostro-Nava, M. T., Riedel, B., Molina, J. J., Kumpatla, S. P. & Mirkov, T. E. (2010). Reproducible RNA preparation from sugarcane and citrus for functional genomic applications. *International Journal of Plant Genomics*, 2009, 1-13.
5. Gao, B., Cui, X. W., Li, X. D., Zhang, C. Q. & Miao, H. Q. (2011). Complete genomic sequence analysis of a highly virulent isolate revealed a novel strain of *Sugarcane mosaic virus*. *Virus Genes*, 43(3), 390.
6. Ghasemi, S., Taherkhani, K. & Izadpanah, K. (2002). *Potyviruses* causing mosaic in sugarcane in Khuzestan. In: *Proceedings of 15th Plant Protection Congress of Iran*. 7-11 Sept. Razi University of Kermanshah, Iran.
7. Ghasemi, S. (2005). *Grouping of poaceae Potyviruses in Iran on the basis of serological relationship and sequence of the 3' region of the genome and study of VPg-HC-Pro interaction of Potato virus Y using yeast two hybrid system*. Ph.D. Thesis. Faculty of Agriculture Shiraz University, Iran.
8. Gonçalves, M. C., Pinto, L. R., Souza, S. C. & Landell, M. G. A. (2012). Virus diseases of sugarcane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 6(2), 108-116.
9. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95-98.
10. Haider, M. S., Afghan, S., Riaz, H. A. R. O. N., Tahir, M., Javed, M. A., Rashid, N. A. E. E. M. & Iqbal, J. (2011). Identification of two *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) variants from naturally infected sugarcane crop in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 43(2), 1157-1162.
11. Koike, H. & Gillaspie, A. G. (1989). Mosaic. In: Ricaud, C., Eagan, B. T. & Gillaspie, A. G. (Eds), *diseases of sugarcane- major diseases*. (pp. 301-322.) *Scientific Publishers*, Amsterdam.
12. Li, Y., Liu, R., Zhou, T. & Fan, Z. (2013). Genetic diversity and population structure of *Sugarcane mosaic virus*. *Virus Research*, 171(1), 242-246.
13. Maasoumi, M., Zare, A. & Izadpanah, K. (2008). Taxonomic status of two Iranian isolates of *Sugarcane mosaic virus* by determining the nucleotide sequence -3' gene. *Journal of Plant Pathology*, 43. (in Farsi)
14. Maasoumi, M., Zare, A. & Izadpanah, K. (2011). Comparison of molecular and serological biological *Potyviruse* of poacea plant in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 47(1). (in Farsi)
15. Shukla, D. T. & Ward, C. W. (1989). Structure of *Potyvirus* coat proteins and its application in the taxonomy of the *Potyvirus* group. *Advances in Virus Research*, 36, 273-314.
16. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
17. Xu, D. L., Park, J. W., Mirkov, T. E. & Zhou, G. H. (2008). Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in southern China. *Archives of Virology*, 153(6), 1031.
18. Zambrano, A. Y., Demey, J. R., Fuchs, M., Gonzalez, V., Rea, R., De Sousa, O. & Gutierrez, Z. (2003). Selection of sugarcane plants resistant to SCMV. *Plant Science*, 165(1), 221-225.