ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵
صفحه ۱۰۹-۱۰۱

هم‌ردیف‌سازی چندگانه و رسم درخت فیلوژنتیک به روش Neighbor-joining ژن *cp* ویروس موزاییک کاهو در استان گلستان

Multiple alignment and phylogenetic tree drawn by the neighbor-joinin *cp* gene of *Lettuce mosaic virus* in Golestan province

سپیده علی‌جانی*[۱]، سعید نصرالله نژاد[۱]، مجید جعفری[۱]، فاطمه زینتی فخرآباد[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

Aligani S*[1], Nasrollahnejad S [1], Jafari M [1], Zinati fakhrabad F [1]

1-MSc Student, Associate Professor, Graduated MSc Students, Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alijani.sepideh@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/۲۵)

چکیده

اخیراً علائم بیماری ویروسی موزاییک کاهو (*Lettuce mosaic virus*, LMV) در سطح وسیعی از مزارع کاهو استان گلستان شایع شده‌است. این ویروس از بیمارگرهای مخرب و مهم اقتصادی است که متعلق به جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* می‌باشد. طی سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ به‌منظور ردیابی ویروس LMV، ۹۳ نمونه که دارای علائم موزاییک، پیسک، کوتولگی و عدم تولید تاج طبیعی بودند از مزارع کاهو استان گلستان جمع‌آوری شده و آلودگی ویروسی در نمونه‌ها به وسیله آزمون DAS-ELISA و آنتی‌سرم منوکلونال LMV بررسی شد. نتایج آزمون سرولوژیکی نشان داد که ۸۰ نمونه از نظر آلودگی به ویروس مثبت بودند، در حالی‌که علائم زردی منفی بود. از نمونه‌های آلوده، تعدادی از آن‌ها به منظور ردیابی ویروس تعیین ترادف شدند. RNA کل از نمونه‌های مذکور استخراج شد و در آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگر عمومی پوتی‌ویروس، قطعه ۳۲۷ جفت بازی تکثیر شد که مربوط به ژن *Cp* می‌باشد. توالی‌های بدست آمده، با توالی‌های موجود در GenBank، مقایسه شدند. هم‌ردیف‌سازی‌های چندگانه و آنالیزهای تبارزایی با نرم‌افزارهای DNASTAR، DNAMAN، Clustal X انجام و درخت فیلوژنتیک به روش Neighbor-joining ترسیم شد. نتیجه ترادف توالی نشان داد که نمونه‌های استان گلستان به LMV آلوده می‌باشند و آنالیزهای تبارزایی تعیین کرد که جدایه گلستان شباهت ۹۹/۷ درصدی در سطح نوکلئوتیدی با جدایه فرانسه (Z78229) داشت. این اولین گزارش از آلودگی LMV و تعیین توالی *Cp* ژنوم این ویروس در استان گلستان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

RT-PCR
آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA
تجزیه تبارزایی
ویروس موزاییک کاهو (LMV)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.11.4]

مقدمه

کاهو (*Lactuca sativa*) متعلق به خانواده آفتابگردان (*Helianthus annuus*) می‌باشد. شواهد باستانی نشان می‌دهد که ٤٥٠٠ سال قبل از میلاد مسیح در مصر و حوالی دریای مدیترانه کشت می‌شده است. این گیاه احتمالا بومی اروپا و آسیا بوده بنا به گزارش Vin. H. C از ۲۰۰۰ سال پیش کاشته می‌شده است (Clewley and Arnold 1997; Thompson et al. 2002). یکی از سبزی‌های پرطرفدار آمریکای شمالی بوده، این گیاه پس از سیب-زمینی و گوجه‌فرنگی در رتبه سوم قرار دارد. (2010) Mulabagal et al. کاهو در رژیم غذایی و همچنین مصرف تازه آن از نظر سالادی اهمیت فراوانی دارد و دارای ویتامین C و ترکیبات فنولی است. آسیا، آمریکای شمالی و اروپا به ترتیب مقام‌های اول تا سوم تولید کاهوی جهان را به خود اختصاص داده‌اند (Hasandokht 1391; Pavan et al. 2008). چین از نظر تولید و آمریکا از نظر میزان عملکرد در واحد سطح، مقام اول را دارند. کشت کاهو جهانی است و چیزی بالغ بر ۳۰۰۰۰ هکتار در برزیل (سائوپائولو) کشت می‌شود. سطح زیرکشت کاهو در ایران ۱۳ هزار هکتار، تولید ٤٠٣ هزارتن و متوسط عملکرد ۳۲ تن در هکتار می‌باشد (Javanmardi 1389). میزان سطح کشت کاهو تا سال ۸۹– ۱۳۸۸ در کشور ۲۰۱۰۷ هکتار بوده و سطح زیر کشت کاهو در استان گلستان تقریبا ۸۰۰–۷۰۰ هکتار بود. در استان گلستان رقم کاهوی برگی[1] نسبت به سایر ارقام بیشتر و رقم کاهوی پیچ[2] کمتر کاشته می‌شود. کاهو دارای ارقام مختلفی است، کاهو پرک (*L. S. var. capitata*) در کشورهای خارجی برای مصرف نوعی سالاد کشت می‌شود و کاهو پیچ معمولی (*L. S. var. Longifolia*) به نام کاهوی رومن[3] معروف است و اکثر کاهوی مصرفی ایران نیز از نوع رومن است. ویروس موزاییک کاهو متعلق به جنس *Potyvirus* می‌باشد. جنس پوتی‌ویروس به-عنوان بزرگترین جنس از نظر تعداد گونه در ویروس‌های گیاهی به حساب می‌آید و از گروه ویروس‌های با اهمیت اقتصادی هستند. پوتی‌ویروس‌ها یکی از مهم‌ترین جنس از بین ۲۸ خانواده ویروس‌های گیاهی می‌باشند. Shukla and Ward (1988) گزارش کردند که این جنس ۵۳ خانواده گیاهی و ۱۱۱۲ گونه را آلوده کرده‌است. حدود یک چهارم از تمام ویرس‌های شناخته شده در سراسر جهان که آلوده کننده گیاهان هستند متعلق به این جنس می‌باشند. طبق تحقیقات Gibbs and Ohshima (2010) پیکره‌های آن رشته‌ای انعطاف‌پذیر، به ابعاد ۱۲×۷۵۰ نانومتراست و پیکره ژنوم پوتی‌ویروس‌ها RNA تک رشته‌ای مثبت و تقریبا ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید طول دارد و شامل یک قالب باز خواندنی[4] است که یک پلی‌پروتئین بزرگ را کد می‌کند و حداقل به ۱۰ پروتئین تجزیه می‌شود. ویروس موزاییک کاهو برای اولین بار به-عنوان یک بیماری ویروسی در فلوریدا گزارش شد (1921 Jagger). این ویروس به‌صورت ناپایا توسط برخی از شته‌ها فرآیند انتقال بیماری را انجام می‌دهند که شته سبز هلو *M. persicae* از مهم‌ترین ناقلین ویروس مذکور است (Abd El Ryder et al. 2003; Wahab 2012). علاوه بر آن این ویروس همچنین از طریق مکانیکی توسط بذر به میزان ۱۰–۳ درصد منتقل می‌شود (Bannerote 1969). علائم آن روی کاهو شامل پیسک[5] یا زردی و به دنبال آن بدشکلی و بافت‌مردگی حاشیه در برگ‌ها، کوتولگی[6] و در انواع کاهوهای پیچیده (کلم مانند)، باز-ماندن (پیچیده نشدن) بوته می‌باشد (Izadpanah et al. 1389) این بیماری طبق گزارشات Bos et al. (1994) در ٤ نوع پاتوتیپ طبقه‌بندی می‌شود و دارای سه نوع ژن مقاوم *MO12*،*MO11*، *MO2* می‌باشد که ابتدا ژن *MO11* شناسایی شد. ایزوله Most-LMV ویروس موزاییک کاهو، می‌تواند در ارقام مختلف کاهو دارای ژن *Mo1* به‌صورت بذر زاد و عامل بیمارگر باشد. (1961) Yasuo جهت شناسایی بیماری‌های ویروسی کاهو ۲۳ نمونه از روی ارقام Imperial 877، Crisp head، Waya head و Great lakes که علائم موزاییک داشتند از ژاپن جمع‌آوری و بر روی چندین گیاه محک تلقیح کردند. نتایج نشان داد ٤ نمونه آلوده به ویروس موزاییک خیار بودند و ۱۹ ایزوله دیگر دارای ویروسی بودند که تا آن زمان از ژاپن گزارش نشده بود. (1997) et al.

[1] Leaf lettuce
[2] Head lettuce
[3] Roman
[4] Open reading frame
[5] Mottle
[6] Stunt

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.11.4]

Revers در فرانسه مقایسه کامل توالی نوکلیوتیدی دو جدایه متفاوت LMV انجام دادند. دو جدایه 0 و E ویروس موزاییک کاهو به‌واسطه رفتارهایشان از جمله خصوصیات ژن‌های نهفته و انتقال با بذر با هم تفاوت داشتند. Pink et al. (1992) از روش‌های سرولوژیکی و مولکولیRFLP-PCR برای تشخیص LMV مورد استفاده کردند و توصیف تنوع زیستی و مولکولی با انتخاب مجموعه‌ای از جدایه‌های LMV با توجه به تنوع پوشش جغرافیایی این ویروس در جدایه تونس مورد بررسی قرار گرفت. Fakhfakh et al. (2001) خواص بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ویروس موزاییک کاهو از نمونه‌های کاهوی کشور فرانسه را با جدایه‌های نمونه‌های کشور تونس مورد مقایسه و بررسی قرار دادند. Sakate et al. (2002) در برزیل تنوع ژنتیکی ۷۳ جدایه LMV را بر اساس ناحیه متغیر کد شونده NIb و پوشش پروتئینی بررسی کردند. Peypelut et al. (2004) در فرانسه از آزمون RT-PCR برای تشخیص جدایه LMV-Most استفاده کردند. Sakate et al. (2004) تحقیقاتی بر اساس آزمون RT-PCR و تکثیر ناحیه خاصی از جدایه LMV–TN_2 از گروه LMV-Most را انجام داده، که این جدایه قبلاً به‌عنوان LMV-Common شناسایی شده بود. توالی انتخاب شده از نواحی بلند ژنوم نشان داد که در جدایه LMV – TN_2، یک نوترکیبی طبیعی درون نواحی کد شونده p3 بین جدایه‌های LMV-Most و LMV-Common اتفاق افتاده بود. این اولین گزارش از وقوع نوترکیبی در جدایه LMV بود. Firmino et al. (2008) گزارش دادند که برخی از جدایه‌های LMV توانایی غلبه بر ژن‌های مقاومت *Mo1* و *Mo2* دارند و براین اساس جدایه‌ها را به دو گروه تقسیم کردند. جدایه LMV-Most می‌تواند در ارقامی که دارای ژن *Mo1* و بذرزاد هستند آلودگی ایجاد کند و LMV-Common علائم را در ارقام بروز نمی‌دهند و تنها با بذر در ارقام حساس منتقل می‌شوند. Pereira et al. (2012) در برزیل نرخ انتقال LMV توسط بذر را ۱۶-۱ درصد تعیین کردند که بیشتر به دلیل تعامل بین جدایه LMV-Most و LMV-Common و رقم کاهو بود. در این مطالعه، تشخیص LMV توسط روش PTA-ELISA در هشت رقم بذر و نشا کاهو با استفاده از آنتی‌سرم پلی‌کلونال خاص بررسی شد. Sharma and Jain (2012) برای نخستین بار روش‌های مولکولی قطعی در شیوع ویروس موزاییک کاهو را در هند بررسی کردند. این بیماری را در ایران بری اولین بار در سال ۱۳۴۳ توسط ارشاد از اطراف تهران و ورامین گزارش کردند. Soleimani et al. (2011) به بررسی برخی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک کاهو در استان مازندران پرداختند. نمونه‌های آلوده با آزمون DAS-ELISA مورد بررسی قرار گرفتند و خصوصیات بیولوژیکی سه جدایه از ویروس بررسی شد. وزن پروتئین پوششی با استفاده از روش (SDS-PAGE) و لکه برداری، KDa ۲۹ تعیین شد. ژن *CP* این ویروس از استان‌های تهران و مازندران تعیین توالی شد، لذا اهداف این تحقیق ردیابی مولکولی، تعیین توالی ناحیه پوشش پروتئینی LMV با استفاده از آغازگرهای عمومی جنس پوتی‌ویروس و تعیین تنوع ژنتیکی در مناطق مختلف اطراف گرگان از مز ارع کاهو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

درنمونه‌برداری‌هایی که اواخر زمستان و بهار سال ۹۳-۱۳۹۲ از مزارع کاهو اطراف گرگان صورت گرفت، تعدادی نمونه از گیاهان با علائم آلودگی ویروسی شامل موزائیک، پیسک، کوتولگی، کاهش رشد، بدشکلی و پیچیدگی برگ‌ها و عدم تولید تاج طبیعی جمع‌آوری شد.

آزمون ساندویچ دوطرفه الایزا (DAS-ELISA)

جهت بررسی وجود آلودگی‌های ویروسی در نمونه‌ها، آزمون الایزا بر اساس روش توصیفی Clark and Adams (1997) و به روش ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی انجام گرفت. نمونه‌ها در آزمون الایزای مستقیم DAS-ELISA (با استفاده از آنتی‌سرم پلی کلونال موسسه DSMZ آلمان) از نظر آلودگی به (LMV) بررسی شدند، به این صورت که IgG ویروس LMV را در بافر پوششی ELISA رقیق کرده و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول فوق به تیوپ‌های ۰/۲ میکرولیتری انتقال یافت و به‌مدت سه ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بافت گیاه آلوده به نسبت ۱:۳ وزن/حجم در بافر عصاره‌گیری ELISA عصاره‌گیری شد و پس از سه مرتبه شستشوی تیوپ با بافر (PBST)، به تیوپ ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه آلوده اضافه و یک شب در یخچال تحت

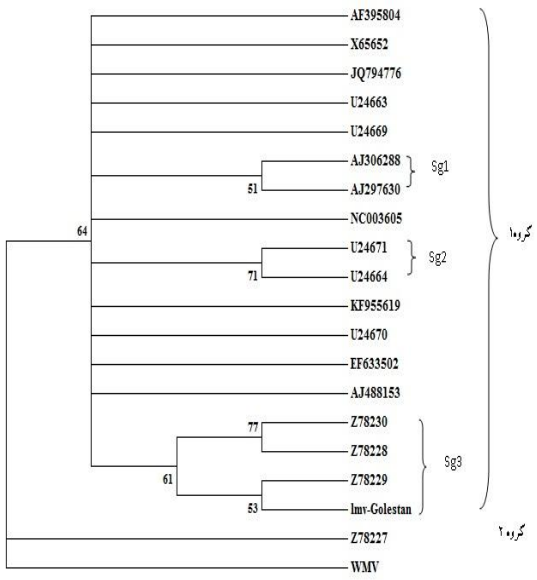
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.11.4]

دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ویال‌ها سه مرتبه با بافر (PBST) شسته شده و پس از خشک شدن، بافر کانجوکیت اضافه کرده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ ساعت انکوبه شد. پس از سه بار شستشو با بافر سوبسترا را اضافه کرده و چاهک‌ها در محل تاریکی (جهت جلوگیری از تاثیر نور بر سوبسترا) قرار داده شد و هر ۱۵ دقیقه مورد بازدید و ارزیابی قرار گرفت. یک ساعت بعد از افزودن سوبسترا ارزیابی نهایی انجام گرفت. نمونه‌هایی که جذبشان توسط دستگاه ELISA-Reader از دو برابر میانگین جذب نمونه‌های منفی بیشتر بود مثبت در نظر گرفته شدند.

واکنش نسخه‌برداری معکوس (RT)

نمونه‌ها پس از عصاره‌گیری در ۳ برابر حجم بافر سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار pH= ٦/٥، با کلروفرم به نسبت ۳۰ درصد تیمار و سانتریفوژ شدند و از مایع رویی بدست آمده برای ساخت cDNA استفاده شد. RNA ویروس، با استفاده از RNA capture Kit (Roche) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. واکنش نسخه‌برداری معکوس [1] با استفاده از RNA جذب شده به لوله با آنزیم Mmulv Lithunia RT (Fermentas) و با مخلوط کردن ۱۰ میکرولیتر بافر ۵ برابر Expand RT، ۲ میکرولیتر از dNTP (10 mM)، ۲ میکرولیتر DTT (100 mM)، ۳ میکرولیتر آغازگر oligodT(10 µM) تهیه شد. مخلوط حاصل با آب به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد و در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار می‌گیرد. در مرحله بعد برای تکثیر قطعه مورد نظر، cDNA حاصل با جفت آغازگرهای عمومی ناحیه پوشش پروتئینی (CP) پوتی‌ویروس تکثیر شد. مخلوط واکنش PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر Buffer PCR (10x)، یک میکرولیتر $Mgcl_2$ (50 mM)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (10 mM)، ۲ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای Oligo1n (رفت) و Oligo2n (برگشت) به‌ترتیب با توالی‌های 5´-atggtHtggtgYatH gaRaaYgg-3´ و 5´-tgctgcKgcYttcatYtg-3´، ۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت تکاپوزیست، ایران) و ۳ میکرولیتر cDNA بود، که با افزودن آب مقطر دو بار استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR برای تکثیر قطعه موردنظر، شامل یک چرخه با دمای واسرشت‌سازی اولیه ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه آغاز، با ۳۵ چرخه (شامل واسرشت‌سازی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ٥٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٥ ثانیه و تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) ادامه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه به پایان رسید. برای مشاهده قطعه تکثیر شده از ژل آگارز یک درصد در الکتروفورز استفاده و از اندازه باند مورد نظر اطمینان حاصل شد. محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست (تهران) ارسال شد. پس از تعیین توالی قطعه موردنظر، توالی استنتاجی با استفاده از نرم‌افزارهای DNAMAN و Editseq بدست آمد که توالی ۱۸ جدایه ثبت شده در پایگاه (NCBI)، با LMW موجود در منطقه گلستان توسط نرم‌افزارهای Clustal X (Thompson et al. 2002) MegAlign و (Clewley and Arnold 1997) هم‌ردیف‌سازی و مورد مقایسه قرار گرفت.



شکل ۱- نمودار درختی به روش Neighbour joining با برنامه MEGA5 بر اساس توالی نوکلئوتیدی قطعه ۳۲۷ جفت‌بازی ژن پوشش پروتئینی جدایه ایرانی LMV با دیگر جدایه‌های این ویروس در بانک ژن ترسیم شده‌است (Out group=WMV).

[1] Reverse transcription

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.11.4]



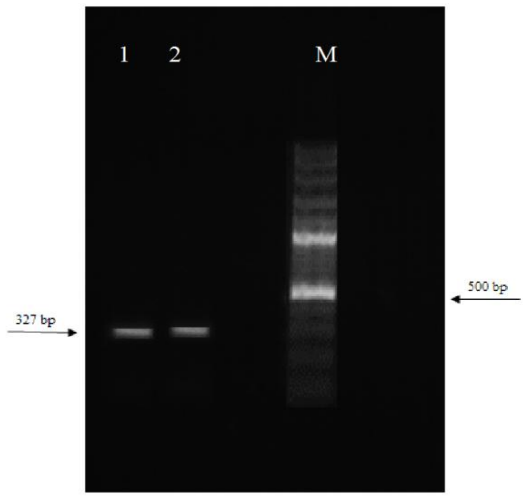
شکل ۲ – علائم ویروس موزاییک کاهو. a) گیاه سالم (بدون علائم)؛ b) موزاییک شدید؛ c) شلاقی شدن (عکس از نگارنده).

نمودار درختی به روش Neighbour joining، در برنامه MEGA5 (Kumar et al. 2008) ترسیم شد (شکل ۱). در این آنالیز ویروس موزائیک هندوانه (*Watermelon mosaic virus*, WMV) به‌عنوان گروه خارجی[1] مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج این تحقیق نشان داد نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع کاهو اطراف گرگان، علائمی شامل موزائیک، پیسکی شدن، کوتولگی، کاهش‌رشد، بدشکلی برگ‌ها، عدم تولید تاج طبیعی در بوته و نخی شدن برگ را داشتند (شکل ۲ و جدول ۱)، در آزمون سرولوژیک الایزا، آلودگی این نمونه‌ها به ویروس موزائیک کاهو مورد تایید قرار گرفت. نتایج آزمون DAS-ELISA بر روی نمونه‌های کاهوی جمع‌آوری شده از مزارع کاهو اطراف شهرستان گرگان نشان داد که آلودگی به این ویروس با توجه به وجود علائم شدید ویروسی مثبت بوده است. این آزمون نشان داد که از ۹۳ نمونه جمع‌آوری شده تعداد ۸۰ نمونه (۸۶ درصد) به این ویروس آلوده بودند. اما گیاهانی که دارای علائم زردی بودند آلودگی به ویروس مذکور را نداشتند. در بین مناطق نمونه‌برداری شده، بیشترین درصد آلودگی نمونه‌ها به ویروس موزاییک کاهو با ۳۰ درصد مربوط به مرزن‌کلاته و کمترین درصد آلودگی با ۱۲/۵ درصد مربوط به شهرستان تقی‌آباد بود. در نتایج بدست آمده از آزمون RT-PCR مشخص شد که آغازگرهای عمومی مورد استفاده، قادر به شناسایی این ویروس در عصاره گیاه آلوده بودند و باعث تکثیر قطعاتی به اندازه ۳۲۷ جفت باز از ناحیه *CP* شدند (شکل ۳).

نتایج تعیین توالی، بیانگر تکثیر ناحیه به طول ۳۲۷ جفت باز شامل ۲۸۳ نوکلئوتید از ناحیه CP ژنوم ویروس که مطابق با اندازه قطعه مورد انتظار بود، بدست آمد. همچنین در این ناحیه ۹۴ آمینو اسید کد شده از ناحیه ژن پروتئین پوششی بدست آمد. استفاده از تکنیک‌هایی که تکامل بیمارگرها را تخمین می‌زند یک بخش مهم از بیولوژی تکاملی است که در نتیجه با کاربرد این روش‌ها می‌توان بیمارگرهای ایجاد کننده بیماری را کنترل کرد.



شکل ۳- نتایج آزمون RT-PCR در ژل آگارز یک درصد مرتبط با ناحیه ژن پوشش پروتئینی (اندازه باند: 327 bp). چاهک شماره ۱و۲ نمونه‌های آلوده به ویروس موزائیک کاهو، چاهک M مربوط به نشانگر Gene (Fermentas) ruler DNA ladder 1Kb می‌باشد.

[1] Out group

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.11.4]

جدول ۱- تعداد و محل نمونه‌برداری، و درصد آلودگی آن‌ها به ویروس lmv در استان گلستان

محل جمع آوری	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های آلوده	درصد آلودگی
جلین	۲۲	۱۸	۲۲/۵
تقی آباد	۱۳	۱۰	۱۲/۵
فاضل آباد	۱۷	۱۵	۱۸/۷۵
مرزن کلاته	۲۵	۲٤	۳۰
دارکلاته	۱٦	۱۳	۱٦/۲۵
کل	۹۳	۸۰	

جدول ۲- محل و شماره دسترسی جدایه‌های مورد استفاده در آنالیزهای تبارزایی

کشور	شماره دسترسی	کشور	شماره دسترسی	کشور	شماره دسترسی
کره	KF955619	چین	EF633502	چین	AJ306288
چین	AJ297630	چین	AJ488153	آمریکا	NC003605
آمریکا	U24661	آمریکا	U24663	آمریکا	U24664
آمریکا	U24669	آمریکا	U24670	آمریکا	U24771
فرانسه	Z78227	فرانسه	Z78228	فرانسه	Z78229
فرانسه	Z78230	فرانسه	X65652	اسرائیل	AF395804

بر اساس گزارشات Moreno et al. (2007) موتاسیون و تغییرات ژنتیکی مانند نوترکیبی به عنوان نیروهای تکاملی می‌باشند که منجر به تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها می‌شوند اما جایگاه ژنتیکی جمعیت ویروس‌ها به نیروهای تکاملی انتخاب و پراکنش تصادفی ژنتیک، بستگی دارد. Abubakar et al. (2003) نشان دادند که آنالیز ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ویروسی در گیاهان اطلاعاتی حاصل می‌شود که به کمک آن می‌توان به ثبات ژنتیکی بیش‌تر ویروس‌های RNA، علی‌رغم پتانسیل تنوعی بالایشان پی برد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های ویروسی از مناطق جغرافیایی متفاوت امکان تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی ویروس‌های گیاهی را امکان پذیر می‌کند.

تجزیه و تحلیل در دندروگرام رسم شده حاکی از این است که جدایه ایران با اکثر جدایه‌های آسیا، اروپا و آمریکا با یکدیگر در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۲). البته تعیین ترادف جدایه‌های بیشتری از این ویروس در نقاط مختلف دنیا می‌تواند در شناسایی منشا اصلی تکامل جدایه ایران نقش بسزایی داشته باشد. همچنین کنار هم قرار گرفتن جدایه ایران با جدایه‌های فرانسه در زیر گروه سه توزیع جغرافیایی با قرابت فیلوژنتیک را بر هم می‌زند. این توزیع نشان می‌دهد که پتانسیل بالای LMV در آلودگی مناطق جدید نمی‌تواند تنها بوسیله ناقلین طبیعی یعنی شته‌ها صورت گیرد. German et al. (2008) نشان دادند که توزیع بذر آلوده به میزان زیادی در پخش آلودگی نقش داشته است. این امر احتمالا به خاطر صادرات بین‌المللی بذور می‌باشد. پس از هم‌ردیف‌سازی ناحیه تعیین توالی شده *CP* ژنوم جدایه این تحقیق با جدایه‌های انتخاب شده از بانک ژن، نتایج نشان داد که ناحیه پوشش پروتئینی ایزوله LMV-Golestan بیش‌ترین درصد تشابه را با جدایه‌هایی از فرانسه با میانگین ۹۹/۷ درصد و کمترین درصد تشابه را با جدایه دیگری از فرانسه با میانگین ۹۷/۷ درصد در سطح نوکلئوتیدی دارا بودند (جدول ۳). همچنین مقایسات انجام شده نشان داد که جدایه LMV-Golestan بیش‌ترین درصد تشابه را با جدایه‌های کشور فرانسه (Z78228، Z78229 و Z78230) با میانگین ۱۰۰ درصد و کم‌ترین درصد تشابه را با جدایه کالیفرنیا (U24664) با میانگین ۹۹ درصد در سطح آمینواسیدی دارا داشت (جدول ۳ و ٤).

اغلب چندین ویروس باعث شدت بیماری‌های واگیردار و کاهش قابل توجه محصولات کاهو در سراسر جهان و در استان گلستان شده‌است. ویروس موزاییک کاهو به‌طور بالقوه مهم‌ترین ویروس مخرب کاهو بوده و دارای گسترش جهانی می‌باشد. بنا بر یافته‌های Dinant and Lot (1992) و Zerbini et al (1995) ظهور اخیر پاتوژن LMV در سراسر جهان بسیار نگران کننده بوده و باعث آسیب شدید روی محصولات کاهو شده‌است. در سال‌های اخیر، LMV در استان گلستان به‌شدت شیوع یافته و خسارت قابل توجهی را به وجود آورده است. بر اساس تحقیقات تاکنون در استان گلستان، شناسایی این ویروس از طریق روش‌های سرولوژیکی و مولکولی صورت نگرفته است. در این بررسی با استفاده از روش RT-PCR که یک روش سریع و کارا است، حضور ویروس در نمونه‌های مورد بررسی به اثبات رسید.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.11.4]

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1		100.0	99.7	99.4	99.3	99.0	99.0	99.0	99.0	98.7	98.9	98.9	98.7	99.0	98.8	99.2	98.7	99.2	98.0	27.6	1
2	0.0		99.7	99.4	99.3	99.0	99.0	99.0	99.0	98.7	98.9	98.9	98.7	99.0	98.8	99.2	98.7	99.2	98.0	27.6	2
3	0.7	0.7		99.7	99.6	99.3	99.3	99.0	99.0	99.0	99.2	99.2	99.0	99.3	99.2	99.4	99.0	99.2	98.0	27.6	3
4	1.4	1.4	0.7		99.3	99.3	99.3	98.7	98.5	98.7	98.9	98.9	98.7	99.3	99.2	98.9	98.7	98.9	97.7	27.8	4
5	1.8	1.8	1.1	1.8		99.5	99.5	99.2	99.2	99.2	99.3	99.3	99.2	99.2	99.0	99.6	98.9	99.3	97.9	27.6	5
6	3.5	3.5	2.3	2.3	1.7		100.0	99.8	99.8	99.8	100.0	100.0	99.7	99.7	99.5	99.7	99.2	99.2	98.5	20.7	6
7	3.5	3.5	2.3	2.3	1.7	0.0		99.8	99.8	99.8	100.0	100.0	99.7	99.7	99.5	99.7	99.2	99.2	98.5	20.7	7
8	2.5	2.5	2.5	3.3	2.2	0.6	0.6		100.0	99.7	99.9	99.9	99.4	99.5	99.3	99.3	98.6	99.0	97.9	27.6	8
9	2.5	2.5	2.5	3.3	2.2	0.6	0.6	0.0		99.7	99.9	99.9	99.4	99.5	99.3	99.3	98.6	99.0	97.9	28.6	9
10	3.3	3.3	2.5	3.3	2.2	0.6	0.6	0.7	0.7		99.9	99.9	99.4	99.5	99.3	99.3	98.6	98.7	97.9	27.5	10
11	2.9	2.9	2.2	2.9	1.8	0.0	0.0	0.4	0.4	0.4		100.0	99.6	99.7	99.5	99.4	98.7	98.9	97.7	27.6	11
12	2.9	2.9	2.2	2.9	1.8	0.0	0.0	0.4	0.4	0.4	0.0		99.6	99.7	99.5	99.4	98.7	98.9	97.7	27.6	12
13	3.3	3.3	2.5	3.3	2.2	1.1	1.1	1.4	1.4	1.4	1.1	1.1		99.3	99.2	99.3	98.6	98.7	97.6	27.3	13
14	3.5	3.5	2.3	2.3	2.9	1.1	1.1	1.7	1.7	1.7	1.1	1.1	2.3		99.8	99.3	99.2	98.8	98.5	20.7	14
15	4.1	4.1	2.9	2.9	3.5	1.7	1.7	2.3	2.3	2.3	1.7	1.7	2.9	0.6		99.2	99.0	98.7	98.3	20.5	15
16	2.2	2.2	1.4	2.2	1.1	1.1	1.1	1.8	1.8	1.8	1.4	1.4	1.8	2.3	2.9		98.7	99.2	97.7	28.4	16
17	3.3	3.3	2.5	3.3	2.9	2.9	2.9	3.7	3.7	3.7	3.3	3.3	3.7	2.9	3.5	3.3		98.5	97.6	26.9	17
18	2.2	2.2	2.2	2.9	1.8	2.9	2.9	2.6	2.6	3.3	2.9	2.9	3.3	4.1	4.7	2.2	4.1		98.3	27.5	18
19	5.2	5.2	5.2	6.0	5.6	5.4	5.4	5.6	5.6	5.6	6.0	6.0	6.4	5.4	6.0	6.0	6.4	4.4		27.9	19
20	39.2	39.2	39.2	38.1	39.3	37.0	37.0	39.3	39.3	39.9	39.3	39.3	40.6	37.0	37.9	40.6	42.7	39.9	38.1		20
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	

Divergence

1	Z78230
2	Z78228
3	Z78229
4	Imv-Golestan
5	EF633502
6	U24669
7	U24663
8	AJ306288
9	AJ297630
10	AF395804
11	JQ794776
12	X65652
13	KF955619
14	U24671
15	U24664
16	AJ488153
17	NC003605
18	U24670
19	Z78227
20	WMV

جدول ۳- نتایج شباهت و تفاوت جدایه LMV ایران با جدایه‌های موجود در بانک ژن براساس هم‌ردیف‌سازی توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه کد کننده *CP* توسط نرم‌افزار DNASTAR (MegAlign).

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1		99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.0	99.5	99.5	31.8	1
2	2.2		99.2	99.2	99.2	99.2	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.0	99.5	99.5	31.4	2
3	2.2	2.2		100.0	100.0	100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.0	99.5	99.5	31.4	3
4	2.2	2.2	0.0		100.0	100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.0	99.5	99.5	31.4	4
5	2.2	2.2	0.0	0.0		100.0	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.0	99.5	99.5	31.4	5
6	2.2	2.2	0.0	0.0	0.0		99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.0	99.5	99.5	31.6	6
7	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.5	100.0	100.0	32.1	7
8	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.5	100.0	100.0	32.1	8
9	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.5	100.0	100.0	31.8	9
10	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.5	100.0	100.0	31.8	10
11	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.5	100.0	100.0	31.8	11
12	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	99.5	100.0	100.0	31.8	12
13	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	99.5	100.0	100.0	31.8	13
14	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	99.5	100.0	100.0	31.8	14
15	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	99.5	100.0	100.0	31.8	15
16	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.5	100.0	100.0	23.9	16
17	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7		99.5	99.5	23.4	17
18	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7		100.0	23.9	18
19	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0		23.9	19
20	22.4	23.9	23.9	23.9	23.9	23.9	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	19.6	21.9	19.6	19.6		20
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	

Divergence

1	KF955619
2	NC003605
3	Z78230
4	Z78229
5	Z78228
6	Imv-Golestan
7	AJ488153
8	AJ297630
9	AJ306288
10	U24670
11	X65652
12	AF395804
13	EF633502
14	JQ794776
15	Z78227
16	U24663
17	U24664
18	U24669
19	U24671
20	WMV

جدول ٤- نتایج شباهت و تفاوت جدایه LMV ایران با جدایه‌های موجود در بانک ژن براساس هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های آمینواسیدی ناحیه کد کننده *CP* توسط نرم‌افزار DNASTAR (MegAlign)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.11.4]

با فراهم شدن شرایط مساعدتر برای گسترش ویروس به‌ویژه از نظر فعالیت شته‌های ناقل و یا ظهور جدایه‌هایی با قدرت بیماری‌زایی بیشتر که در اثر وقوع نوترکیبی و تغییرات در ژنوم، در این مناطق نیز ویروس به‌سرعت گسترش یافته، خسارت‌های غیر قابل پیش‌بینی وارد می‌سازد. چنین خسارت‌هایی برای استان گلستان که یکی از مناطق مهم کشت کاهو در ایران بشمار می‌آید، غیر قابل جبران خواهد بود. در حال حاضر در آنالیزهای فیلوژنتیکی و تعیین تنوع ژنتیکی، از روش‌های مختلفی مانند علائم شناسی، دامنه میزبانی، RFLP-PCR، PTA-ELISA و مقایسه ترادف نوکلئوتیدی نواحی، CP، Nib، UTR N-Terminal استفاده شده است (Zerbini et al. 1995; Sakate et al. 2004; Pereira et ali. 2012 and Sharma and Jain 2012). استفاده از نواحی ذکرشده بیش‌ترین کاربرد را در بررسی‌های مولکولی داشته و بیش‌ترین ترادف‌های ثبت شده در GenBank هم مربوط به همین نواحی است. Soleimani et al. (2011) در ایران مطالعات محدودی در مورد توالی ناحیه ژن پروتئین پوششی این ویروس انجام دادند و بخش‌های کوچکی از ژنوم جدایه تهران و مازندران تعیین ترادف شده‌است. این تحقیق اولین گزارش از توالی کامل ناحیه CP ویروس موزاییک کاهو از روی میزبان کاهو در استان گلستان می‌باشد. در دنیا نیز پنج ترادف کامل از این ویروس بدست آمده‌است. با توجه به تعیین توالی جدایه گلستان و شباهت آن به جدایه‌های کشور فرانسه، بر اساس بررسی‌های Bos et al. (1994) جدایه فوق باید مربوط به پاتوتیپ نوع ٤ باشد. تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژن پوشش پروتئینی می‌تواند در تحقیقات آینده در برنامه‌های به‌نژادی و تولید ارقام مقاوم مورد استفاده قرار گیرد. به دلیل این‌که LMV ویروسی بذرزاد است، بذر آلوده منبع آلودگی اولیه مناسبی از ویروس را فراهم می‌کند که این آلودگی با فعالیت شته‌های ناقل افزایش می‌یابد. در درجه اول برای مبارزه با آن استفاده از بذر عاری از ویروس توصیه می‌شود. لذا با توجه به نقش شته‌ها در گسترش آلودگی‌های بذرزاد، باید گواهی سلامت بذور با سخت‌گیری بیشتری همراه باشد. همچنین استفاده از ارقام مقاوم نیز راه مناسبی جهت کنترل ویروس می‌باشد. با این حال تلفیقی از دو روش استفاده از بذر سالم و ارقام مقاوم مناسب‌تر است. حذف علف‌های هرز و میزبان‌های تناوبی داخل مزرعه کاهو، مبارزه با ناقل در ابتدای فصل نیز برای کنترل ویروس مناسب است.

منابع

Abd El-Wahab AS (2012) Transmission Efficiency of Lettuce mosaic virus (LMV) by Different Aphid Species and New Aphid Vectors in Egypt. Academic Journal of Entomology 5: 158-163.

Abubakar Z, Ali F, Pinel AT, raore ON, Guessan P, Notteghem JL, Konate G, Fargette D (2003) Phylogeography of Rice yellow mottle virus in Africa. Journal Virology 84:733-743.

Bannerot H, Boulidard L, Marrou J, Duteil M (1969) Etude dela tolerance au virus de la mosaique de la laitue chez la variete Gallega de Invierno. Annual Phytopathology 219-226.

Bos L, Huijberts N, Cuperus C (1994) Further observations on variation of lettuce mosaic virus in relation to lettuce (*Lactuca sativa*), and a discussion of resistance terminology. European Journal of Plant Patology 100: 293-314.

Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosrobent assay for the detection of plant viruses. Journal Virology 34:475-483.

Clewley J, Arnold C (1977) The multiple alignment module of lasergene. Methods in Molecular Biology 70:119.

Dinant S, Lot H (1992) Lettuce mosaic virus. Plant Pathology 41:528-542.

Dinant S, Lot H, Albouy J, Kuziak C, Meyer M, Astier-Manifacier S (1991) Nucleotide sequence of the 3' terminal region of lettuce mosaic potyvirus RNA shows a Gln/Val dipeptide at the cleavage site between the polymerase and the coat protein. Archive Virology 116: 235-52.

Fakhfakh H, Le Gall O, Candresse T and Marrakchi M (2001) Analysis of the variability of tunisian isolates of lettuce mosaic virus using biological and molecular properties. Journal of Plant Pathology 83: 3-11.

German Retana S, Walter J, Le Gall O (2008) Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. Plant Pathology 127-136.

Firmino AC, Krause Sakate R, Agenor Pavan M, da Silva N, Minoru Hanai S (2008) Prevalence of Lettuce mosaic virus common strain on three lettuce producing areas from Sao Paulo State Prevalencia da estirpe comum de Lettuce mosaic virus tres regioes produtoras de alface do estado de Sao Paulo. Summa Phytopathology 161-163.

Gibbs A and Oshima K (2010) Potyvirus and the digital revolution. Annual Review of Phytopathology 48:205-223.

Hasandokht MR (1391) Technology of Vegetable production. Ghom. Selseleh Press. Iran. 576. (In Farsi)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.11.4]

Izadpanah K, Askan M, Banihashemi Z, Rahimian H, Minasian V (2010) Plant Pathology. 1026 P.
Jafar pour B (1382) Applied plant pathology. Mashhad University Press. Iran. 460. (In Farsi)
Jagger ICA (1921) Transmissible mosaic disease of lettuce. Journal Agricaltur Research. 741-737.
Javanmardi J (1389) Growing organic vegetables. Mashhad University Press. Iran 349. (In Farsi)
Kumar S, Nei M, Dudly J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in Bioinformatics 9: 299-306.
Marie Jeanne V, Loos R, Peyre J, Alliot B, Signoret P (2000) Differentiation of Poaceae potyviruses by reverse transcription- polymerase chain reaction and restriction analysis. Journal Phytopathology 148: 141-151.
Moreno A, Nebreda M, Diaz BM, Garcia M, Salas F, Fereres A (2007) Temporal and spatial spreed of Lettuce mosaic virus in lettuce crops in Spain: factors involved in Lettuce mosaic virus epidemics. Journal of Biology 150: 351-360.
Mulabagal V, Ngouajio M, Nair A, Zhang Y, Gottumukkala AL, Nair MG (2010) In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. Food Chemisty 118:300-306.
Pavan A, Krause Sakate M, Silva R, Murilo N, Zerbini F, Le Gall O (2008) Virus Diseases of Lettuce in Brazil. Plant Viruses 2: 35-41.
Pereira LS, Chaves ALR, Azevedo Filho JA (2012) Addolorata Colariccio Lettuce mosaic virus indexation in seeds and seedlings of lettuce genotypes. Revista Brasileria. Doi: 10.1590/S0101-31222012000400014.
Peypelut M, Krause Sakate R, Guiraud T, Pavan MA, Candresse T, Zerbini FM, Le Gall O (2004) Specific detection of lettuce mosaic virus isolates belonging to the "Most" type Virol Methods 121:119-124.
Pink DAC, Lot H, Johnson R (1992) Novel pathotypes of lettuce mosaic virus breakdown of a durable resistance. Euphytica 63:169-174.
Revers F, Yang SJ, Walter J, Souche S, Lot H, Le Gall O, Candresse T, Dunez J (1997) Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. Virus Research 47:167-77.
Ryder EJ, Grube RC, Subbarao KV, Koike ST (2003) Breeding for resistance to diseases in lettuce: successes and challenges. Eucarpia Leafy Vegetables. The Netherlands (CGN), Wageningen: 25-30.
Sharma P, Jain RK (2013) First report of Lettuce mosaic virus infecting Lactuca sativa in India. 97 - 849.
Sherf AF, MacNab AA (1986) Vegetable Diseases and Their Control. Second edition, A wiley Interscience Publication. John wiley and Son. Newyork. 728.
Shukla DD, Ward CW (1988) Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the Potyvirus group. Journal of General Virology 69: 2703-2710.
sakate R, Mello R, Pavan M, Zambolim E, Carvalho M, Le Gall O, Zerbini FM (2001) molecular characterization of two brazilian isolates of lettuce mosaic virus with distinct biological properties. Phytopatology 26.
Sakate, kR, Le Gall O, Fakhfakh H, Peypelut M, Marrakchi M, Varveri C, Pavan MA, Souche S, Lot H, Zerbini FM and Candresse T (2002) Molecular and biological characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) isolates revealsa distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. Phytopathology 563-572.
Sakate KR, Fakhfakh H, Peypelut M, Pavan MA, Zerbini FM, Marrakchi M, Candresse T, Le Gall O (2004) A naturally occurring recombinant isolate of Lettuce mosaic virus. Archiv Virology 149:191-197.
Sing NP, Bahardoaj AK, Kumar A, Sing KM (1385) Green Mothern Technology 631.
Soleimani P, Mossahebi GH, Koohi Habibi M (2011) Identification of some viruses causing mosaic on lettuce and characterization of Lettuce mosaic virus from Tehran Province in Iran. African Journal of Agricultural Research Doi: 10.5897/AJAR11.114.
Thompson JD, Gibson T, Higgins DG (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Current Protocols in Bioinformatics: 23- 22.
Vin HC (1385) Vegetable physiology. VolumeII. 336.
Yasuo kO (1961) Recognition of lettuce mosaic virus in Japan. Japanese Journal of Phytopathology 82: 0031-9473.
Zerbini FMT, koike S, Gilbertson R (1995) Biological and Molecular characterization of lettuce mosaic potyvirus Isolates from the Salinas Valley of California. Phytopathology 85: 746-752.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.11.4]