

بررسی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی چند جدایه ویروس موزائیک خیار

(*Cucumber mosaic virus (CMV)*) از مناطق شمال غرب ایران

سویل نعمت‌اللهی^{۱*}، نعمت سخندان بشیر^۲، فرشاد رخشنده رو^۳ و حمیدرضا زمانی‌زاده^۳

۱- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز.

۲- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۳- استادیار، گروه گیاه پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

*مسئول مکاتبه nematollahi2001@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲

چکیده

ویروس موزائیک خیار یکی از مهمترین ویروس‌های آلوده کننده گیاهی در ایران می‌باشد. به منظور بررسی فنوتیپ آلودگی جدایه‌های مختلف این ویروس در سال ۱۳۹۰ تعداد ۳۴۲ نمونه گیاهی مشکوک به آلودگی با این ویروس از گیاهان خیار، کدو، خربزه و گوجه فرنگی از مناطق مختلف شمال غرب کشور جمع‌آوری و با آزمون الیزا ۹۱ نمونه آلوده به CMV ردیابی شد. از بین جدایه‌ها هشت جدایه که توالی ژنومی و موقعیت تبارزایی آن‌ها مشخص گردیده بود، برای مقایسه‌ی خصوصیات بیولوژیکی و مطالعات بیشتر انتخاب شدند. شاخص بیماری برای این جدایه‌ها روی کدو محاسبه گردید. براساس علایم، جدایه‌ها در دو گروه متمایز شدند. بررسی بیان ژن پروتئین پوششی و سرکوب گر خاموشی RNA (2b) با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه کمی، نشان داد که غلظت جدایه‌ها در گیاهان محک متفاوت می‌باشد. جدایه‌های ایرانی زیر گروه IB علائم شدیدتری را بر روی گیاهان محک نسبت به جدایه‌های زیر گروه IA نشان دادند. بنابراین به نظر می‌رسد که بین ویژگی‌های ژنوتیپی و خصوصیات بیماری زایی جدایه‌ها ارتباط معنی داری وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزائیک خیار، خصوصیات بیولوژیکی، تبار زایی، زیر گروه.

مقدمه

پروتئین‌های حرکتی (3a) و پوششی (CP) که از RNA3 تولید می‌شوند در حرکت ویروس نقش دارند. پروتئین پوششی که از RNA4 زیر ژنومی ترجمه می‌شود برای بسته‌بندی ویروس، حرکت در مسافت طولانی و انتقال با شته مورد نیاز است (شای و همکاران ۲۰۰۲). پروتئین 2b از RNA 4A زیر ژنومی حاصل از RNA2 ترجمه می‌شود و در حرکت ویروس در مسافت طولانی در گیاه (سوار و همکاران ۲۰۰۲) و به عنوان سرکوب گر خاموشی RNA عمل می‌کند (دینگ و همکاران ۱۹۹۴). جدایه‌های زیادی از CMV بر اساس علایم و دامنه‌ی میزبانی گزارش شده است (پالوکایتیسو گارسیا آرنال ۲۰۰۳، چوی و همکاران ۲۰۰۵، نوری و همکاران ۲۰۱۴). در تحقیقی که زنگ و همکاران (۲۰۰۷) انجام دادند با

ویروس موزائیک خیار عضو شاخص جنس *Cucumovirus* از خانواده‌ی Bromoviridae با بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاه میزبان، یکی از مهمترین ویروس‌های آلوده کننده گیاهی است. این ویروس با بیش از ۸۰ گونه شته به روش ناپایا منتقل می‌شود (پالوکایتیسو و گارسیا آرنال ۲۰۰۳). ژنوم CMV شامل سه قطعه - RNA ۱ تک رشته‌ای با قطبیت مثبت (RNA1-3) و دو RNA زیر ژنومی (RNA4, RNA4A) می‌باشد که پروتئین‌های (1a, 2a, 2b, 3a) و پروتئین پوششی را رمز گذاری می‌کند. پروتئین 1a و 2a که به ترتیب توسط RNA1 و RNA2 رمز گذاری می‌شوند، در تکثیر ویروس نقش دارند (هایس و همکاران ۱۹۹۰).

بین خصوصیات بیماری‌زایی جدایه‌ها و موقعیت تبارزایی آنها بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های ویروس و آزمون الایزا

تعداد ۳۴۲ نمونه‌ی برگ گیاهان کدو، خیار، خربزه و گوجه فرنگی با علایم مشابه آنچه که توسط ویروس موزائیک خیار ایجاد می‌شود از مزارع مختلف آذربایجان شرقی و غربی در سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری گردید. محل و تعداد نمونه‌ی جمع‌آوری شده به تفکیک میزبان در جدول ۲ آمده است. به منظور تایید آلودگی و غلظت سنجی ویروس، الایزا از نوع^۲ TAS – ELISA (با استفاده از آنتی‌بادی‌های چند همسانه‌ای) (Agdia, USA) انجام شد (کانورس و مارتین ۱۹۹۰). گیاه سالم مایه‌زنی نشده به عنوان شاهد منفی استفاده شد. برای هر کدم از نمونه‌ها سه چاهک بصورت سه تکرار لحاظ شدند. میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌های با جذب بالاتر از دو تا سه برابر میانگین جذب نوری چاهک تیمار شده با شیرۀ گیاهی سالم، مثبت تلقی شدند. از بین جدایه‌ها هشت جدایه‌ی Ajs4، Esf172، Bas3، Mgh191، Mgh91، Khn1، Bon175، Jol186 برای مقایسه‌ی خصوصیات بیولوژیکی و مطالعات بیشتر انتخاب شدند. در تحلیل تبارزایی بر اساس توالی ژن پروتئین پوششی، این جدایه‌ها در دو گروه مجزا قرار گرفته بودند. یک گروه شامل جدایه‌های Esf172، Mgh91، Mgh191، Bon175، Jol186 با ۹۳ تا ۹۹ درصد تشابه توالی در کنار جدایه‌های شناخته شده متعلق به زیر گروه IA مانند Fny و Y و مابقی جدایه‌ها در زیر گروه IB قرار گرفتند که بیشترین تشابه به جدایه Ixora از فیلیپین داشتند (۹۹ درصد) (نعمت‌الهی و همکاران ۲۰۱۲).

محاسبه شاخص بیماری (DI) و بررسی میزان

آلودگی بر اساس نتایج آزمون الایزا

شاخص بیماری (DI) برای هشت جدایه CMV ذکر شده بر روی گیاه کدو اندازه‌گیری شد. گیاه

مقایسه‌ی علایم بیماری، شاخص بیماری^۱ را محاسبه و از آن به عنوان معیاری در مقایسه جدایه‌های مختلف استفاده کردند. بر طبق مطالعات تبارزایی بر اساس ژن پروتئین پوششی، جدایه‌های CMV به سه زیر گروه IA، IB و زیرگروه II تقسیم می‌شوند (روسینک ۲۰۰۲). تحقیقات نشان می‌دهند که جدایه‌های متعلق به زیر گروه I در حالت کلی بیماری‌زاتر از جدایه‌هایی هستند که در زیر گروه II قرار می‌گیرند (وهیونی و همکاران ۱۹۹۲، شای و همکاران ۲۰۰۲). هرچند در مورد خصوصیات بیماری‌زایی جدایه‌های زیر گروه IA و IB اطلاعات کمی وجود دارد. بعضی از محققین نشان داده‌اند که جدایه‌های متعلق به زیر گروه IB از جدایه‌های زیر گروه IA بیماری‌زاتر هستند (دو و همکاران ۲۰۰۷). پروتئین 2b و پس از آن پروتئین پوششی به عنوان دو عامل مهم تاثیرگذار در تفاوت شدت بیماری زایی جدایه‌ها معرفی شده‌اند (شای و همکاران ۲۰۰۲، دینگ و همکاران ۱۹۹۶). پروتئین 2b با تاثیر بر روی تجمع سیستمیک ویروس در گیاه و سرکوب خاموشی RNA، همچنین با تداخل در مسیر miRNA و تنظیم بیان ژن‌ها (ژانگ و همکاران ۲۰۰۶، لوسای و همکاران ۲۰۰۷) و پروتئین پوششی با مکانیسم‌های مختلف نظیر کاهش بیان ژن‌های دخیل در فتوسنتز و تغییرات ساختاری کلروپلاست در شدت بیماری‌زایی ویروس در میزبان‌های مختلف تاثیر می‌گذارد (موچیزوکی و همکاران ۲۰۱۴). در ایران تحقیقاتی در مورد ردیابی و پراکنش ویروس موزائیک خیار (بنانچ و وحدت ۲۰۰۸، معصومی و همکاران ۲۰۰۹) و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی این ویروس انجام شده است (بشیر و همکاران ۲۰۰۶، ۲۰۰۸، رسول پور و ایزدپناه ۲۰۰۸). در مورد تفاوت بیماری‌زایی جدایه‌ها و ارتباط آن با تغییرات ژنومی جدایه‌های ایرانی تحقیقی صورت نگرفته است. در حالیکه برای مطالعات اپیدمیولوژی و کنترل ویروس، مطالعه خصوصیات بیماری‌زایی جدایه‌ها سودمند است. در تحقیق حاضر ضمن انجام آرتی پی سی ار نیمه کمی در جهت تعیین غلظت جدایه‌های CMV در میزبان‌ها، ارتباط

²Triple-antibody sandwich ELISA

¹ Disease index

الایزا و شاخص علایم با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 انجام شد و جهت مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نسخه‌برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلیمرز نیمه کمی^۱

به منظور مقایسه بیان ژن 2b و CP در چهار جدایه Mgh191, Bon175, Esf172 و Bas3 به عنوان نماینده از بین جدایه‌هایی که شاخص‌های بیماریزایی متفاوت داشتند و نتایج الایزا بر روی آنها بیانگر تفاوت احتمالی در توان بیماریزایی آنها بود، برای آزمون نسخه‌برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نیمه کمی (تاکشیتا و همکاران ۲۰۰۹) استفاده گردید. برای این منظور در روز دهم پس از مایه‌زنی، از ۰/۱ گرم از دومین برگ درآمده پس از برگ کوتیلدونی گیاه کدو (مایه‌زنی شده با جدایه‌های ویروس موزائیک خیار) RNA مطابق روش روحانی و همکاران (۱۹۹۳) استخراج گردید. سپس یک میکروگرم RNA با نانودراپ اندازه‌گیری شده و برای انجام واکنش نسخه‌برداری معکوس از آغازگر تصادفی (Fermentas, Lithuania) استفاده گردید. برای این منظور، ۰/۲ میکروگرم از آغازگر تصادفی در حجم ۲۰ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت مالتی پلکس برای تکثیر همزمان ژن 2b و CP ویروس و ژن 18S گیاه به عنوان کنترل داخلی انجام شد. برای این منظور ۰/۲۵ میکرولیتر از هر جفت آغازگر (5pmol/ μl) (نام و مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آمده است) در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر اضافه گردید. PCR با دمای اتصال ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد انجام شد. واکنش PCR در چرخه‌های ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ متوقف گردید و در هر مرحله شش میکرولیتر از محصول PCR برای الکتروفورز نگهداری گردید. به منظور بررسی نتایج حاصل از واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد.

کدو (*Cucurbita pepo cv. Ps*)، به عنوان گیاهان محک در گلدانهایی به قطر ۱۲ سانتی‌متر در خاک استریل کشت شده و در گلخانه در دمای ۲۸-۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۳۰-۴۰ درصد نگهداشته شد و در مرحله‌ی کوتیلدونی، با عصاره برگ گیاه منبع هر جدایه در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=۷/۴)، به نسبت یک به ده (یک گرم بافت گیاه در ده میلی‌لیتر بافر) مایه زنی مکانیکی شد. برای محاسبه‌ی شاخص بیماری بر روی کدو، مایه‌زنی در شش تکرار (یک بوته در هر گلدان) برای هر جدایه انجام شد و ظهور و شدت بیماری هفت، ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۳۵ روز پس از مایه‌زنی یادداشت‌برداری شد. رتبه‌دهی بر اساس علایم انجام شد که شامل ۰: بدون علایم، به عنوان رتبه ۱: موزائیک خفیف یا پیسک خفیف، رتبه ۲: موزائیک سیستمیک مشخص بدون تغییر شکل گیاه، رتبه ۳: موزائیک مشخص و تغییر شکل برگ و کوتولگی، رتبه ۴: موزائیک مشخص و نکروز کلی تا ۵۰٪ و رتبه ۵: نکروز بالای ۵۰٪ و منتهی شونده به مرگ گیاه بود. بر اساس علایم، شاخص بیماری، بر طبق فرمول زیر محاسبه شد (زنگ و همکاران ۲۰۰۷).

$$DI = \frac{\sum nx \times gradex}{n} \times 100\%$$

که در آن DI نشان دهنده‌ی disease Index (شاخص بیماری) است $gradex$ نشان دهنده‌ی رتبه خاصی است، nx تعداد گیاهان در این رتبه است، $grade\ highest$ بالاترین رتبه و $n\ total$ کل تعداد گیاهان.

گیاهانی که شاخص بیماری در آنها ارزیابی شده بود با آزمون الایزای غیرمستقیم مورد آزمایش قرار گرفت. برای این منظور از برگهای میانی گیاهان در موقعیت یکسان برای استخراج عصاره استفاده شد و آزمون به روش قبل انجام و نتایج ثبت گردید.

طرح آزمایشی و تحلیل داده ها

طرح آزمایشی و تحلیل داده‌ها در این پژوهش با استفاده از طرح کامل تصادفی در شش تکرار برای تیمارها انجام شد. تحلیل آماری مقایسه میانگین نتایج

¹Semi-quantitative RT-PCR (sq-RT-PCR)

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در واکنش RT-PCR و Semi-quantitative RT-PCR

نام آغازگر	موقعیت	قطعه‌ی مورد انتظار	دمای اتصال °C	منبع	توالی نوکلئوتیدی
2b-F 2b-R	۲۳۶۷-۲۳۹۱ ۳۰۱۰-۳۰۳۱	۶۶۴	۵۰	Ziebell <i>et al.</i> , 2007	5'-AGTACAGAGTTCAGGGTTGAGCGTG-3' 5'-CCACAAAAGTGGGGGGGCACCCG-3'
CMVCPf CMVCPr	-۲۰۱۵۱۱۴۹-۱۱۶۱ ۱۹۹۸	۸۶۷	۵۰	(Rizos <i>et al.</i> , 1992)	5'- GCTTCTCCGCGAG-3' 5'- GCCGTAAGCTGGATGGAC-3'
18s1 18s2	۳۵۷-۳۷۵ ۷۹۸-۸۱۷	۴۶۱	۵۰		5'- AACGGCTACCACATCCAAG-3' 5'- TCATTACTCCGATCCCGAA-3'

نتایج

ردیابی ویروس، تعیین شاخص بیماری (DI) و تحلیل نتایج آنها

نتایج الایزا روی ۳۴۲ نمونه‌ی جمع‌آوری شده، تعداد کل ۹۱ نمونه‌ی آلوده به ویروس موزائیک خیار را به تفکیک ۳۶، ۳۰، ۱۲ و ۱۶ درصد آلودگی در گیاهان گوجه فرنگی، خیار، کدو و خربزه نشان داد. تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده و آلوده از هر منطقه و میزبان در جدول دو آمده است. هشت جدایه‌های ردیابی شده CMV (Mgh91, Mgh191, Khn1, Bon175, Bas3, Esf172)، و Jo1186 برای مقایسه خصوصیات بیولوژیکی روی گیاه محک کدو مایه‌زنی گردید. آلودگی گیاهان محک مایه‌زنی شده نیز با الایزا مورد تایید قرار گرفت. علایم غالب در مورد جدایه‌های Mgh91, Bon175 و Jo1186 روی کدو به صورت موزائیک شدید و در مورد جدایه‌ی Mgh191 موزائیک خفیف بود. جدایه‌های Ajs4, Esf172, Bas3, Khn1 و Ajs4 در ۱۴ روز پس از آلودگی باعث بروز نکروز در بوته‌های کدو شدند که در ۳۵ روز پس از مایه‌زنی منجر به مرگ بوته شد (شکل ۱). در مورد جدایه‌ی Jo1186 فقط نکروز ملایم در ۳۵ روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد. (مشخصات این جدایه‌ها شامل میزبان و منطقه‌ای که از آن جمع‌آوری شده اند به همراه علایم بارز آنها بر روی گیاه محک کدو در جدول شماره ۴ آمده است). برای محاسبه‌ی شاخص بیماری با بررسی پیشرفت بیماری، رتبه دهی از صفر تا پنج، به مدت سی و پنج روز پس از مایه‌زنی برای هشت جدایه مورد مطالعه (Mgh91, Bon175, Jo1186, Ajs4, Bas3, Esf172, Khn1)

Mgh91 و Mgh191, Bon175) ثبت شد و شاخص محاسبه شد. جدول سه نتایج محاسبه شاخص و تحلیل نتایج شاخص بیماری را نشان میدهد. نتایج تحلیل با نرم افزار SAS و در سطح احتمال پنج درصد نشان داد که چهار جدایه Ajs4, Bas3, Khn1 و Esf172 بیشترین شاخص علایم را به خود اختصاص داده و جدایه‌های Mgh91, Bon175, Jo1186 و Mgh191 از شاخص بیماری کمتری برخوردار بودند.

نتایج الایزا بر روی همین گیاهان که شاخص بیماری روی آنها اندازه‌گیری شده بود، بیشترین جذب را در مورد جدایه‌های Khn1, Bas3 نشان داد. کمترین جذب هم مربوط به شاهد بود که در گروه مجزایی قرار گرفت و پس از آن Mgh91 و Mgh191 کمترین جذب را نشان دادند (جدول ۳).

نتایج ارزیابی شدت آلوده‌کنندگی جدایه‌های ایرانی CMV با استفاده از آزمون پی سی آر نیمه کمی
با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن CP در آزمون RT-PCR، قطعه مورد انتظار به طول ۸۷۰ جفت باز از نمونه‌هایی که در الایزا مثبت شده بودند، تکثیر گردید. برای ارزیابی شدت آلوده‌کنندگی که مبتنی بر میزان تکثیر آنها باشد، بیان ژن 2b و CP در چهار جدایه Mgh191, Bon175, Esf172 و Bas3 به عنوان نماینده از بین جدایه‌هایی که شاخص‌های بیماری‌زایی متفاوت داشتند، با استفاده از آزمون RT-PCR نیمه کمی مورد سنجش قرار گرفت. برای این منظور سطح بیان این ژن‌ها در گیاه کدو مایه‌زنی شده با جدایه‌های

بیشتری در مقایسه با سایر جدایه‌های مورد بررسی برخوردار می‌باشد. با مقایسه‌ی میزان بیان ژن 2b با ژن CP در جدایه با شدت آلوده‌کنندگی بیشتر (Esf172) و کمتر (Bon175) به نظر می‌رسد که ژن‌های 2b و CP در جدایه Esf172 از بیان بیشتری در مقایسه با جدایه‌ی Bon175 برخوردار است (شکل ۲).

Bon175, Mgh191, Bas3 و Esf172 مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد ژن CP و 2b جدایه Bas3 به بیشترین میزان و ژن‌های 2b و CP جدایه‌ی Mgh 191 به کمترین میزان در گیاه کدو مایه‌زنی شده تکثیر شده است (شکل ۲). به این مفهوم که گیاه میزبان از حساسیت بیشتری در برابر جدایه Bas3 برخوردار بوده است و جدایه‌ی مذکور از توان شدت آلوده‌کنندگی

جدول ۲- تعداد نمونه جمع‌آوری شده و آلوده CMV به تفکیک میزان و محل نمونه‌برداری.

محل جمع‌آوری	میزبان		خيار		گوجه فرنگی		کدو		خریزه	
	I ^۱	S ^۱	I ^۲	S ^۲	I	S	I	S	I	S
باسمنج	۷	۲	-	-	-	-	۴	۶	۰	۰
اسفهان	-	-	۲	۷	۱	۰	-	-	-	-
تبریز	۷	۲	۷	۰	۰	۰	-	-	-	-
بناب	۱۴	۴	۲۶	۱۰	۱۰	۲۰	۳	۲۰	۱۰	۱۰
مراغه	۱۲	۷	۴	۲	۲	۵	۴	۵	۱۰	۳
عجب شیر	-	-	۱۹	۸	۸	-	-	-	-	-
میاندوآب	-	-	۸	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۳	۰
سلماس	-	-	-	-	-	۷	۰	۷	۲	۰
زنجرآباد	۹	۱	-	-	-	-	-	-	-	-
مشکین شهر	۱۶	۰	-	-	-	۴	۰	۴	-	-
اهر	۵	۰	۴	۰	۰	۷	۰	۷	-	-
خدافین	۴	۲	۷	۴	۴	-	-	-	۳	۰
ورزقان	۳	۰	۴	۰	۰	-	-	-	-	-
شبستر	۱۱	۱۱	۹	۶	۶	۶	۰	۶	۴	۰
جلفا	۳	۰	۲	۰	۰	-	-	-	۶	۲
میانه	۱۳	۵	۱۵	۹	۹	-	-	-	۷	۲
ارومیه	۵	۰	۱۸	۵	۵	۴	۰	۴	-	-
کل	۱۰۹	۳۲	۱۲۵	۴۵	۴۵	۶۳	۷	۶۳	۴۵	۷

۱ تعداد نمونه جمع‌آوری شده.

۲ تعداد نمونه آلوده ردیابی شده با الیزا.

جدول ۳- ارزش‌های شاخص بیماری (DI) هشت جدایه‌ی مختلف CMV براساس علائم روی گیاه کدو به همراه میانگین شاخص علائم و میانگین جذب در ۴۰۵ نانومتر.

جدایه	ارزش‌های شاخص بیماری					میانگین شاخص علائم	میانگین جذب در ۴۰۵ نانومتر
	vdpi ^۱	۱۴dpi	۲۱dpi	۲۸dpi	۳۵dpi		
Bas3	۲/۹	۴/۸	۷/۷	۸/۸	۸/۸	۶/۶ ^a	۲/۸۴ ^a
Khn1	۳/۷	۴/۴	۶/۶	۸/۱	۱۰	۶/۵۶ ^a	۲/۹۰ ^a
Esf172	۰/۷	۳/۷	۸/۵۱	۸/۵۱	۸/۸	۶/۴۰ ^a	۱/۸۱۲ ^{ab}
Ajs4	۲/۲	۴/۸	۵/۹	۷/۲	۸/۱	۵/۶۴ ^{ab}	۲/۷۹۵ ^a
Bon175	۲/۲	۴	۵/۵	۵/۹	۵/۹	۴/۷ ^b	۱/۴۳ ^b
Jol186	۱/۴۸	۲/۹	۴/۸	۵/۹	۷/۴	۴/۴۹ ^b	۲/۷۵۵ ^a
Mgh91	۰	۳/۳	۴	۴/۴	۵/۵	۳/۴۴ ^{bc}	۰/۷۵۱ ^c
Mgh191	۰/۳	۲/۲	۲/۶	۴	۴	۲/۶۲ ^c	۰/۷۵۸ ^c
شاهد منفی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۳۲۷ ^d

^۱ روز پس از تلقیح.

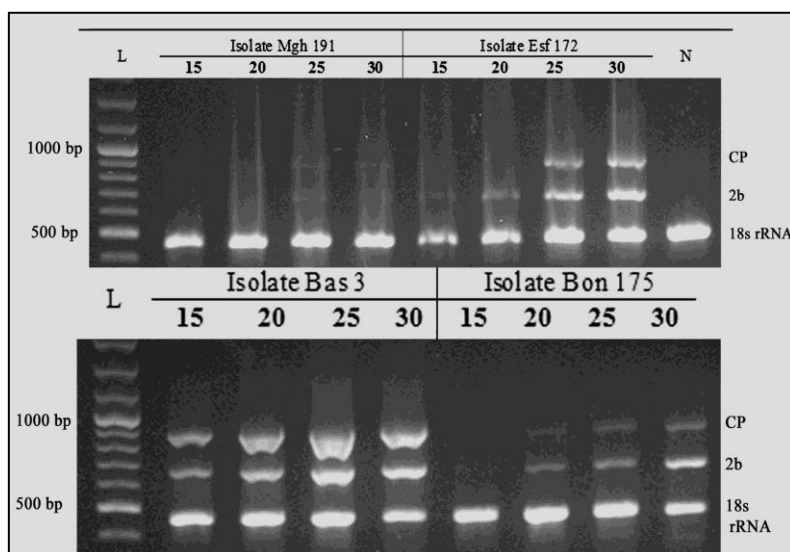
^۲ میانگین‌هایی که با حروف مشابه علامت‌گذاری شده اند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ در یک گروه قرار دارند.



شکل ۱- الف و ب) علائم ۱۰ روز پس از مایه زنی روی گیاه کدو به صورت: الف) موزائیک خفیف حاصل از جدایه Mgh191

ب) نکروز پیش رونده در برگ حاصل از جدایه Bas3. ج و د) توسعه علائم ۲۰ روز پس از مایه زنی روی گیاه کدو به صورت: ج)

موزائیک ناشی از Mgh91 و د) نکروز منتهی شونده به مرگ گیاه ناشی از Khn1.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن های CP و 2b جدایه های ایرانی ویروس موزائیک خیار در ژل آگاروز ۱/۵٪. (L) مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز. اعداد به ترتیب بیانگر چرخه ای از واکنش PCR می باشد که محصول تکثیر جمع آوری شده است. N: کنترل منفی (به جای cDNA از آب در مخلوط واکنش PCR استفاده شد). از ژن 18s rRNA به عنوان کنترل درونی استفاده شده است.

جدول ۴- مشخصات جدایه های ایرانی CMV بررسی شده از نظر خصوصیات بیماری زایی به همراه نتایج الایزا و موقعیت تبارزایی آنها.

کد نمونه	میزبان ^۲	محل جمع آوری	علائم پس از مایه زنی	موقعیت فیلوژنتیکی
Mgh91	کالک	مراغه	SM,LD	جدایه ها
Mgh191	کدو	مراغه	mM	
Bon175	خیار	بناب	SM,LD	
Jol186	خریزه	جلفا	M,Y	
Esf172	گوجه فرنگی	اسفهان	M,N	
Bas3	خیار	باسمنج	M,N	
Ajs4	گوجه رنگی	عجب شیر	M,N	
Khnl	گوجه فرنگی	خدافرین	M,Y, SN	

^۱علائم اختصاری نشان دهنده این موارد است. M موزائیک، SM موزائیک شدید، mM موزادیک خفیف، Y زردی، N نکروز، SN نکروز شدید، LD تغییر شکل برگ،

^۲ منظور گیاهی است که از آن جمع آوری شده اند.

بحث

تبارزایی جدایه ها پرداخته شده است. اطلاعات درباره‌ی تغییرات ژنتیکی و ویژگی‌های بیماری زایی ویروس موزائیک خیار می تواند دانش ما را درباره‌ی اپیدمیولوژی ویروس بالا ببرد و همین امر در مدیریت بیماری کمک کننده خواهد بود. ویروس‌ها مانند سایر موجودات زنده همیشه زیر فشارانتخاب هستند و زمانی

ویروس موزائیک خیار یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین ویروس های گیاهی در بسیاری از گونه های گیاهی شامل کدوئیان، سبزیجات و حبوبات در ایران می باشد. دراین پژوهش به بررسی خصوصیات بیماری زایی تعدادی از جدایه های CMV و ارتباط آن با موقعیت

شاخص بیماری زایی بیشتری نسبت به جدایه‌های Mgh91, Mgh191, Bon 175 و Jol186 برخوردار بودند. در مجموع از این داده‌ها می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های Esf172, Ajs4, Bas3 و Khn1 از شدت بیماری زایی بالاتری نسبت به جدایه‌های Mgh191, Jol186 و Bon175 برخوردار هستند. محاسبه‌ی شاخص بیماری در بررسی شدت بیماری‌زایی بیمارگرهای قارچی بسیار متداول است. بویژه در مورد گونه‌های جنس *Alternaria* spp. چنین شاخص‌هایی وجود دارد که در برخی از تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرد (چارانی و وریس ۲۰۰۶). از این نوع شاخص در بیماری‌های ویروسی به صورت محدود استفاده شده است و در مقایسه‌ی بیماری‌زایی جدایه‌های CMV نیز بکار رفته است (ژانک و همکاران ۲۰۰۷). در این تحقیق نیز از شاخص مذکور استفاده شد و نتایج حاصل از آن، برای جداسازی جدایه‌های CMV مورد استفاده قرار گرفت. آزمون الایزا برای مقایسه غلظت جدایه‌های مختلف ویروس استفاده شد. نتیجه این اندازه‌گیری نشان داد جذب نوری چاهک‌های مختلف با هم متفاوت می‌باشد. چون همه این نمونه‌ها از برگ‌های با موقعیت یکسان و در یک زمان برداشته شده بودند لذا می‌توان گفت که چهار هفته پس از مایه زنی همه جدایه‌ها به یک اندازه در گیاه تکثیر نشده و بعضی از آنها مثل Mgh91 و Mgh191 غلظت پایینی در گیاه داشتند. مقایسه نتایج تحلیل آماری میانگین جذب الایزا با میانگین شاخص‌های علائم نشان داد که تطابق نسبی بین عامل جذب نوری و شاخص علائم وجود داشت. جدایه‌هایی با شاخص بیماری زایی بیشتر جذب بیشتری هم در الایزا نشان دادند. جدایه Jol186 با وجود شاخص بیماری زایی کمتر نسبت به جدایه‌های Esf172, Ajs4, Bas3 و Khn1 جذب بیشتری در الایزا نشان داد. اگرچه آزمون الایزا برای اندازه‌گیری میزان غلظت ویروس در بررسی واکنش گیاه به بیمارگر ویروسی بطور عمومی مورد استفاده قرار می‌گیرد (استراسبق و همکاران ۲۰۰۳)، ولی نتایج الایزا همیشه رابطه‌ی مستقیمی با علائم بیماری ندارد (جعفری و همکاران ۱۳۹۵). و

که ویروس از یک محل به محل دیگری راه پیدا می‌کند دستخوش تغییرات ژنوتیپ می‌شود. ویروس موزاییک خیار به صورت گونه‌ی کاذب (کوازی اسپیس) یعنی متشکل از چند ژنوتیپ مختلف وجود دارد و زمانی که ویروس به منطقه‌ی جدید جغرافیایی منتقل می‌شود تعدادی از این ژنوتیپ‌ها یا واریانت‌ها نمی‌توانند به بقای خود ادامه دهند و بنابراین واریانت‌های به اصطلاح سازگار ویروس تسلط پیدا می‌کنند. با ایجاد تغییرات بیشتر در محل نوکلئوتیدها، سرانجام برخی اسیدهای آمینه نیز دچار تغییر می‌شوند تا ویروس را با شرایط جدید بهتر وفق دهند و همین تغییرات است که منجر به بروز تفاوت‌ها در علائم می‌گردد. (اشنایدر و روسینک ۲۰۰۱، چار و هلمز ۲۰۰۵). مقایسه خصوصیات بیولوژیکی چند جدایه منتخب در این تحقیق نشان داد که یک گروه از جدایه‌ها شامل Mgh91, Mgh191 و Bon175 که از کدوئیان جداسازی شده بودند، علائم مشابهی بر روی کدو، گوجه فرنگی و توتون نشان دادند. گروه دیگری از جدایه‌ها شامل Ajs4 و Esf172 (جداسازی شده از گوجه فرنگی) و Bas3 (از کدو) نیز علائم مشابهی شامل نکروز و مرگ در کدو و باریک شدن شدید برگ بر روی گوجه فرنگی و موزائیک و نواحی سبز تیره بر روی توتون و *N. benthamiana* نشان دادند. تفاوت علائم حاصل از جدایه‌های مختلف و معرفی استرین‌های مختلف ویروس موزاییک خیار از لحاظ شناسایی مولکولی ویروس و ارتباط علائم با ساختار ژنتیکی ویروس از موضوعات در خور توجه برخی از تحقیقات می‌باشد (فان و همکاران ۲۰۱۴). در این تحقیق برای مقایسه شدت بیماری زایی جدایه‌های ردیابی شده CMV از چند معیار استفاده شد. با محاسبه‌ی شاخص بیماری برای هشت جدایه CMV مشخص شد که میزان این شاخص با گذشت زمان و ۲۵ روز پس از مایه‌زنی ویروس بیشتر می‌شود که با توجه به گسترش بیماری این مساله طبیعی است. ولی نکته‌ی مهمتر این است که شاخص بیماری، در جدایه‌های مختلف با هم فرق داشت (جدول ۳). جدایه‌های Esf172, Ajs4, Bas3 و Khn1 با شاخص‌های تقریباً مشابه از

IB را نسبت به IA نشان داده بود، مطابقت داشت (دو و همکاران ۲۰۰۷). آنالیز تبارزایی جدایه‌ها همچنین نشان داده بود که جدایه‌های زیرگروه IB بیشترین شباهت را به جدایه‌های آسیایی داشتند. جدایه‌های زیر گروه IA و II در تمام دنیا یافت می‌گردند در حالیکه اکثر جدایه‌های زیرگروه IB در آسیا پراکنده‌اند (روسینک ۲۰۰۲). شباهت بالای چهار جدایه *Khnl1*, *Ajs4*, *Bas3*, *Esf172* (بیش از ۹۶ درصد) در مقایسه با سایر جدایه‌های زیر گروه IB و مجزا شدن این جدایه‌ها به صورت یک گروه می‌تواند نشان دهنده‌ی منشا مشترک بین این جدایه‌ها باشد. موقعیت نزدیک تر این جدایه‌ها به زیر گروه II ویروس نیز می‌تواند نشان دهنده‌ی قدمت بیشتر این جدایه‌ها باشد (روسینک و همکاران ۱۹۹۹). قرار گرفتن جدایه‌های *Mgh91*, *Mgh191* و *Bon175* در یک زیر خوشه‌ی مجزا در زیرگروه IA در دورترین نقطه به جدایه‌های زیرگروه II نشان می‌دهد که احتمالاً جدایه‌های ایرانی زیر گروه IA از مناطق دیگری منشا گرفته‌اند و توسط روش‌هایی مثل بذر وارد کشور شده‌اند. در مجموع نتایج این تحقیق ارتباط روشنی بین ژنوتیپ و ویژگی‌های بیولوژیکی چند جدایه منتخب *CMV* برقرار می‌کند و نشان می‌دهد که جدایه‌های ایرانی زیر گروه IB ویروس موزائیک خیار نسبت به جدایه‌های IA ویروس بیماری‌زا تر هستند. نتایج این پژوهش، استفاده از سامانه‌ی نمره‌دهی در ارزیابی شدت بیماری‌زایی جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک خیار را امکان‌پذیر می‌سازد کاری که قبلاً در مورد جدایه‌های ایرانی این ویروس انجام نشده است.

بنابراین به منظور تعیین اثر ویروس در گیاه نیاز به روش کمی دقیق‌تر و قابل اطمینان‌تری است. تکنیک نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نیمه کمی برای بررسی بیان ژن‌های *CP* و *2b* نشان داد که بیان ژن‌های *CP* و *2b*، در جدایه‌های با شدت بیماری‌زایی بیشتر، بیشتر بوده و این جدایه‌ها در میزبان حساسیت بیشتری را ایجاد کرده‌اند. همین‌طور مشاهده شد که در جدایه‌های با شدت بیماری‌زایی بیشتر، ژن *2b* بیشتر از جدایه‌های ضعیف‌تر بیان می‌شود. بیان بیشتر ژن *2b*، به عنوان عامل سرکوب‌گر خاموشی *RNA* و موثر در شدت بیماری‌زایی جدایه‌های (*CMV* لوسای و همکاران ۲۰۰۷)، باعث افزایش عملکرد ویروس و بیان بیشتر ژن‌های دیگر ویروس مثل *CP* می‌شود (وانگ و همکاران ۲۰۰۴). این امر در شکل دو نیز مشخص است که بیان *CP* در گیاهان مایه زنی شده با جدایه‌های شدیدتر از نظر بیماری‌زایی، بیشتر است. الیزا همین‌طور نشان داد که جدایه‌های *Esf172* و *Bas3* جذب نوری بیشتری نسبت به جدایه‌های *Bon175* و *Mgh191* نشان دادند.

مطالعات تبارزایی نشان داده بود جدایه‌های *Ajs4*, *Khnl1*, *Esf172* و *Bas3* با شباهت بالا در کنار جدایه‌هایی از آسیا (*Ixora* و *IA*) در زیر گروه IB ویروس موزائیک خیار قرار گرفتند (نعمت‌اللهی و همکاران). این جدایه‌ها طبق محاسبات شاخص بیماری و آزمون *sq-RT-PCR* به طور محسوسی بیماری‌زا تر از بقیه جدایه‌ها (*Mgh91*, *Mgh191*, *Bon 175*, *Jol186*) بودند که در زیر گروه IA ویروس قرار گرفتند. این امر با تحقیقات قبلی که بیماری‌زا تر بودن جدایه‌های زیر گروه

منابع مورد استفاده

جعفری م، شمس بخش م و معینی ا، ۱۳۹۵. واکنش ارقام تجاری و لاین‌های کلزا به جدایه ویروس موزائیک شلغم، بیماری‌های گیاهی، جلد ۵۲، شماره ۲: ۱۵۹-۱۴۷.

Bananej K and Vahdat A, 2008. Identification, distribution and incidence of viruses in field-grown cucurbit crops of Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 7: 247-257.

- Bashir NS, Kolhar MR and Zarghani SN, 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes* 32:277-288.
- Bashir NS, Nematollahi S and Torabi E, 2008. Cucumber mosaic virus subgroup IA frequently occurs in the northwest IRAN. *Acta Virologica* 52:237-242.
- Converse R H and Martin RR, 1990. ELISA methods for plant viruses. Pp. 389 . In: R., Hampton, E., Ball and S. De Boer (eds.). *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A laboratory manual.* APS Press.
- Chare ER and Holmes E C. 2005, A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives of Virology* 151:933-946.
- Chaerani R and Voorrips RE, 2006. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. *Journal of General Plant Pathology* 72:335-347.
- Choi SK, Palukatis P, Min BE, Lee MY, Choi JK and Ryu KH, 2005. Cucumber mosaic virus 2a polymerase and movement proteins independently affect both virus movement and the timing of symptom development in zucchini squash. *Journal of General Virology* 86:1213-1222.
- Ding SW, Anderson Bj, Haase HR and Symons RH, 1994. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome . *Virology* 198:593-601.
- Ding SW, Shi BJ, Li WX and Symons RH, 1996. An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:7470-7474.
- Du ZY, Chen FF, Liao QS, Zhang HR, Chen YF and Chen JS, 2007. 2b ORFs encoded by subgroup IB strains of cucumber mosaic virus induce differential virulence on *Nicotiana* species. *Journal of General Virology* 88: 2596-2604.
- Hayes RJ and Buck KW, 1990. Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63:363-368.
- Lewsey M, Robertson FC, Canto T, Palukaitis, P and Carr JP, 2007. Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant Journal* 50: 240-252.
- Massumi H, Shaabani M, Hosseini Pour A, Heydarnejad, J and Rahimian, H, 2009. Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant Disease* 93:67-72.
- Mochizuki T, Yamazaki R, Wada T and Ohki ST, 2014. Coat protein mutations in an attenuated Cucumber mosaic virus encoding mutant 2b protein that lacks RNA silencing suppressor activity induces chlorosis with photosynthesis gene repression and chloroplast abnormalities in infected tobacco plants. *Virology* 456:292-299.
- Nematollahi S, Sokhandan-Bashir N, Rakhshandehroo F and Zamanizadeh H, 2012. Phylogenetic Analysis of New Isolates of Cucumber mosaic virus from Iran on the Basis of Different Genomic Regions. *The Plant Pathology Journal* 28(4) : 381-389.
- Nouri S, Arevalo R, Falk BW and Groves RL, 2014. Genetic structure and molecular variability of Cucumber mosaic virus isolates in the United States. *PLoS NE* 9(5):1-12.
- Palukaitis P and Garcia-Arenal F, 2003. Cucumoviruses. *Advance Virus Research* 62: 241-323.
- Phan MS, Seo J, Choi HS, Lee SH and Kim KH, 2014. Pseudore combination between two distinct strains of Cucumber mosaic virus results in enhancement of symptom severity. *The Plant Pathology Journal* 30:316-322.

- Rakhshandehroo F, Takeshita M, Squires J and Palukaitis P, 2009. The Influence of RNA-Dependent RNA Polymerase 1 on *Potato virus Y* Infection and on Other Antiviral Response Genes. *Molecular Plant Microbe Interaction* 22: 1312–1318.
- Rasoulpour R and Izadpanah K, 2008. Properties and taxonomic position of hoary cress strain of Cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Pathology* 90 (1): 97-102.
- Rizos H, Gunn LV, Pares RD and Gillings RM, 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73:2099-2103.
- Roossinck M, Zhang JL and Hellwald H, 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyzes of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology* 73:6752–6758.
- Roossinck M J, 2002. Evolutionary history of Cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology* 76:3382-3387.
- Rowhani A, Chay c, Golino DA and Falk W, 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of Grapevine fanleaf virus in a grapevine tissue. *Phytopathology* 83: 749-753.
- Schneider WL and Roossinck MJ. 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *Journal of Virology* 75:6566-6571.
- Shi BJ, Palukaitis P and Symons RH, 2002. Differential virulence by strains of Cucumber mosaic virus is mediated by the 2b gene. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 15: 947–955.
- Soards AJ, Murphy AM, Palukaitis P and Carr PJ, 2002. Virulence and differential local and systemic spread of cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 15:647–653.
- Strausbaugh C. A., Myers, J. R., Forster R. L., and McClean P. E, 2003. A quantitative method to screen common bean plants for resistance to Bean common mosaic necrosis virus . *Phytopathology* 93:1430–6.
- Takeshita M, Matsuo Y, Suzuki M, Furya N, Tsuchiya K and Takanami Y, 2009. Impact of a defective RNA3 from cucumber mosaic virus on helper virus infection dynamics. *Vitology* 389:59-65.
- Wahuny WS, Dietzgen RG, Hanada K and Francki RIB, 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathology* 41:282-297.
- Wang Y, Tzfira T, Gaba V, Citovsky V, Palukaitis P and Gal-On A, 2004. Functional analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein: pathogenicity and nuclear localization. *Journal of General Virology* 85:3135-3147.
- Zeng R, Liao Q, Feng J, Li D and Chen J, 2007. Synergy between Cucumber Mosaic Virus and Zucchini Yellow Mosaic Virus on Cucurbitaceae hosts tested by Real-time Reverse Transcription-Polymerase chain reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39(6): 431-437.
- Zhang X, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel, DJ and Chua NH, 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Development* 20: 3255–3268
- Ziebell H, Payne T, Berry J O, Walsh JA and Carr JP, 2007. A cucumber mosaic virus mutant lacking the 2b counter-defence protein gene provides protection against wild-type strains. *Journal of General Virology* 88: 2862–2871.

Molecular and Biological Characteristics of Some Iranian Isolates of *Cucumber mosaic virus* from North West Region of Iran

S Nematollahi¹, N Sokhandan Bashirm², F Rakhshandehroo³ and H Zamanizadeh³

¹Assistant Professor, Department of Plant Protection, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

²Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture University of Tabriz,

³Assistant Professors, Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: nematollahi2001@yahoo.com

Received: 21 September 2016

Accepted: 23 may 2017

Abstract

Cucumber mosaic virus (CMV) is one of the most important infectious plant viruses in Iran. For evaluating infection phenotypes of different isolates 342 samples of cucurbitaceous and tomato plants were collected from different locations in the northwest region of Iran in 2012. After screening by enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA), 91 CMV-infected samples were identified. Eight representative CMV isolates whose phylogenetic positions had been determined were selected and compared for their pathological features in zucchini (*Cucurbita pepo* cv. Ps) plants. According to the determined disease indexes, the isolates were placed in two main groups. Also, evaluation of 2b (viral suppressor of RNA silencing) and CP expression with semi-quantitative RT-PCR showed different concentration of the isolates in test plants. The subgroup IB members from Iran induced more severe symptoms on the inoculated indicator test plants compared to the isolates in subgroup IA. Thus, there seemed to be a correlation between subgroup affiliation and biological properties of the CMV isolates from Iran.

Keywords: CMV, Phylogenetic, Subgroup, Phenotype.