تعیین ترادف ژن پروتئین پوششی دو جدایه ایرانی ویروس موزائیک هندوانه و بررسی جایگاه فیلوژنتیکی آنها

حسین معصومی[۱*]، فاطمه محمدی پاقلعه[۲]، خدیجه سالاری[۳]، جهانگیر حیدرنژاد[۴] و اکبر حسینی‌پور[۴]

۱- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر.
۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.
۳- مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت.
۴- دانشیاران بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.
*مسئول مکاتبه: Massomi@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۹

چکیده

ویروس موزاییک هندوانه (WMV) *Watermelon mosaic virus* متعلق به جنس *Potyvirus* و خانواده Potyviridae از ویروس‌های مهم آلوده کننده کدوئیان در دنیا محسوب می‌شود. دو جدایه این ویروس به نام‌های YAZ.WMV.41 و YAZ.WMV.55 از مزارع خیار و طالبی استان یزد جمع‌آوری گردید. آلودگی نمونه‌ها با آزمون سرولوژیکی الایزای مستقیم و غیرمستقیم و آنتی بادی پلی‌کلونال این ویروس بررسی شد. این دو جدایه در مقابل آنتی‌بادی واکنش نشان ندادند. در بررسی علائم این جدایه‌ها برروی گیاهان آزمون کدوی مراغه، لوبیا چیتی و لوبیا چشم بلبلی، علائم متفاوتی با آنچه تا کنون در مورد جدایه‌های این ویروس گزارش شده، مشاهده گردید. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه‌ای به طول ۸۰۹ جفت باز از ژن پروتئین پوششی تکثیر و تعیین ترادف شد. مقایسه‌ی ترادف‌های بدست آمده در این تحقیق با ترادف‌های موجود در بانک جهانی ژن نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه به همراه یک جدایه‌ی ایرانی (رس شمار EU667627) با دامنه‌ی میزبانی متفاوت، در زیر گروه IIB قرار می‌گیرند. سایر جدایه‌های ایرانی گزارش شده قبلی در گروه‌های I و AII قرار گرفتند. مقایسه‌ی میزان تشابه اسید نوکلئیک این جدایه‌ها با یکدیگر نشان داد که جدایه‌های ایرانی مربوط به این مطالعه بیشترین و کمترین میزان شباهت را با جدایه‌های کشورهای اسپانیا (رس شمار AJ579518) و ایران (رس شمار GQ421161) به ترتیب به میزان ۹۹/۵ و ۹۲/۲ درصد دارا می‌باشند. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر این است که کدوئیان در مزارع وگلخانه‌های ایران بوسیله جدایه‌های متعدد این ویروس آلوده می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: الایزا، کدوئیان، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ویروس موزائیک هندوانه.

مقدمه

ویروس‌های آلوده کننده‌ی کدوئیان بعنوان مهمترین عوامل خسارت‌زای این تیره در سراسر دنیا مطرح می‌باشند. ویروس‌های جنس *Potyvirus* از خانواده Potyviridae از ویروس‌های اصلی آلوده کننده کدوئیان محسوب می‌شوند (زیتر و همکاران ۱۹۹۶، لکوک و همکاران ۲۰۰۸). از رایج‌ترین ویروس‌های تیره کدوئیان، ویروس موزائیک هندوانه *Watermelon mosaic virus* (WMV)، ویروس موزائیک زرد کدو (ZYMV) *Zucchini yellow mosaic virus*، و ویروس لکه حلقوی پاپایا *Papaya ring spot virus*-W (PRSV-W) می‌باشند (زیتر و همکاران ۱۹۹۶، ابو-جواد و همکاران ۲۰۰۰). ویروس موزائیک هندوانه (WMV) دارای ژنوم (RNA) تک لا به طول حدود ۱۰۰۳۵ نوکلئوتید و پیکره‌های رشته‌ای و قابل انعطاف به طول ۸۰۰-۷۰۰ نانومتر و قطر ۱۲ نانومتر می‌باشد. انتهای ´۵ ژنوم دارای ساختار Vpg و در انتهای

۳´ دارای ساختار PolyA می‌باشد (ون رگنمورتل و همکاران ۱۹۶۰). این ویروس دارای یک چارچوب خوانش (ORF) بزرگ می‌باشد که یک پلی پروتئین متشکل از ۳۲۱۷ اسید آمینه را رمز می‌کند (ژنگ و یانگفنگ ۲۰۰۹). ویروس موزائیک هندوانه به عنوان یک ویروس مهم در مناطق مدیترانه‌ای و معتدل شناخته شده است و در مورد تنوع بیولوژیکی آن نیز بررسی‌هائی صورت گرفته است (پارسیفول و همکاران ۱۹۸۴). همچنین در مورد تمایز جدایه‌های این ویروس از نظر مولکولی نیز در دو دهه اخیر مطالعاتی صورت گرفته است (مورنو و همکاران ۲۰۰۴). از مناطق مختلف ایران تاکنون گزارش‌هائی از وجود، گسترش و دامنه‌ی میزبانی WMV منتشر شده است. اولین گزارش در مورد WMV توسط ابراهیم نسبت در سال ۱۳۵۱ انتشار یافته است. نامبرده بر اساس گیاهان آزمون، ویروس مزبور را جداسازی و شناسایی نموده است (ابراهیم نسبت ۱۳۵۱). سپس در همان سال وایدمن و مصطفوی با بررسی پیکره‌های ویروس توسط میکروسکوپ الکترونی و با استفاده از گیاهان آزمون، وجود WMV را از گیاهان طالبی از نقاط مختلف ایران، گزارش نمودند. نامبردگان در ضمن قابلیت انتقال ویروس توسط چند گونه شته از قبیل شته‌ی سبز هلو (*Myzus persicae* Sulzer)، شته‌ی پنبه (*Aphis gossypii* Glover) و شته‌ی سیب زمینی (*Macrosiphum euphorbias* Thomas) را مطالعه نمودند. ویروس موزائیک هندوانه در گیاهان خربزه، هندوانه، کدو، خیار و خیارچنبر از استان فارس گزارش گردیده است (رحیمیان و ایزد پناه ۱۹۷۸). در سالهای ۱۳۸۳-۱۳۸۱ درصد آلودگی کدوئیان نسبت به WMV در گلخانه‌های ایران در استان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت (سمیعی ۱۳۸۳). دامنه‌ی میزبانی طبیعی این ویروس در ایران اغلب محدود به کدوئیان است (رحیمیان و ایزد پناه ۱۹۷۸و معصومی و همکاران ۲۰۰۷). در مورد تنوع ژنتیکی WMV نیز در ایران مطالعاتی صورت گرفته است. در یک بررسی توسط شریفی و همکاران (۲۰۰۸)، تعداد ۱۸ جدایه از این ویروس از مناطق مرکزی و جنوبی ایران بر اساس ترادف ژن پروتئین پوششی (CP) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین تعداد شش جدایه از این ویروس از استان گلستان بر اساس ترادف ژن CP مورد بررسی قرار گرفتند (شعیبی و همکاران ۲۰۰۹). در این تحقیق بر اساس بررسی‌های انجام شده بر روی تعدادی از نمونه‌های مشکوک به ویروس موزائیک هندوانه (WMV) مشخص گردید که دو نمونه از این ویروس علی‌رغم تکثیر بر روی گیاهان محک در آزمون سرولوژی نسبت به تعدادی از آنتی‌بادی‌های ویروس‌های خانواده پوتی ویریده از جمله ویروس موزائیک هندوانه و ویروس موزائیک زرد کدو قابل ردیابی نیستند در حالیکه در بررسی مولکولی نسبت به آغازگرهای عمومی خانواده مذکور واکنش مثبت نشان دادند بر این اساس در این بررسی سعی می‌گردد وضعیت این دو جدایه مورد بحث و بررسی بیشتری قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و ردیابی ویروس WMV

از اردیبهشت تا تیر ماه سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۰ از مزارع خیار و طالبی در استان یزد از بوته‌های دارای علائم رگبرگ نواری و نکروز برگ نمونه‌برداری صورت گرفت. بر طبق گزارش قبلی (شریفی و همکاران، ۲۰۰۸) از تعداد ۷۵۷ نمونه جمع‌آوری شده، تعداد ۱۹۰ نمونه نسبت به آنتی‌بادی ویروس موزائیک هندوانه واکنش مثبت نشان دادند و از بین نمونه‌هائی که دارای علائم ویروسی بودند اما نسبت به آنتی‌بادی ویروس WMV واکنش منفی نشان دادند، ضمن بررسی با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال سایر ویروس‌ها از جمله Zucchini yellow mosaic (ZYMV) virus، *Cucumber green mottle mosaic* (CGMMV)، *Squash mosaic virus* (SqMV)، *Papaya ring spot virus* (PRSV)، *Watermelon mosaic virus* (WMV)، *Morrocon watermelon mosaic virus* (MWMV) تهیه شده از کمپانی DSMZ آلمان با روش الایزای ساندویچی Double antibody sandwich-ELISA (DAS- ELISA) بررسی شدند (کلارک و آدامز ۱۹۷۷). در مورد ویروس موزائیک خیار (CMV) Cucumber mosaic virus از روش الایزای غیر مستقیم (Indirect

(ELISA) استفاده گردید. آنتی‌بادی این ویروس بصورت هدیه از دکتر فیل جونز (IACR-Rothamsted, Harpenden, Hearts, UK) دریافت گردید. همچنین در بعضی موارد در مورد ویروس ZYMV و WMV نیز آزمون الایزا بصورت غیر مستقیم انجام و از آنتی‌بادی تهیه شده در آزمایشگاه ویروس شناسی دانشکده کشاورزی استفاده گردید. نحوه آماده‌سازی بافرهای مورد نیاز در این آزمایش در مقاله شریفی و همکاران (۲۰۰۸) ذکر شده است. نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الایزا خوان مدل EL800 (Biotek Instrument–آمریکا) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.تعدادی جدایه بر روی گیاهان آزمون مایه زنی گردیده و در نهایت دو جدایه بر روی گیاهان آزمون تکثیر گردیدند.

مایه‌زنی جدایه‌های ویروس WMV برروی گیاهان آزمون

جهت خلوص دو جدایه‌ی مذکور از ویروس موزائیک هندوانه، ابتدا بر روی گیاه سلمه تره *Chenopodium amaranticolor* مایه کوبی و لکه‌های کلروتیک ایجاد شده جدا و بعد از تهیه‌ی عصاره‌ی آنها، مجددا بر روی گیاه آزمون *C. quinoa* مایه کوبی شدند. عصاره‌ی بدست آمده از لکه‌های جدا شده از این گیاه آزمون، از این به بعد به عنوان ویروس خالص شده محسوب گردیدند و مایه زنی بر روی گیاهان محک از چندین تیره گیاهی صورت گرفت. (جدول ۱).

شناسایی جدایه های ویروس WMV با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

دو جدایه از ویروس که در آزمون الایزا نسبت به WMV واکنش مثبت نشان ندادند، پس از تکثیر بر روی کدوی رقم مراغه، برای استخراج RNA کل با استفاده از کیت High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Biochemical, Germany) براساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام مرحله‌ی سنتز cDNA[1] در آزمون RT-PCR[2]، آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MLV (Fermentas) وآغازگر پس سوی WMV-R:5´- ATTCACGTCCCTTGCAGTGG-3´ (شریفی و همکاران ۲۰۰۸) استفاده شدند. جهت انجام واکنش نسخه‌برداری معکوس (RT) و ساخت DNA مکمل، ۲/۵ میکرولیتر آر.ان.ای از دو میکروگرم RNA استخراج شده از ۰/۲ گرم بافت گیاهی استفاده گردید، همچنین ۲/۵ میکرولیتر آغازگر پس سو (10µM) و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به لوله‌ها اضافه و پس از یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس، بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد. سپس مقدار چهار میکرولیتر بافر RT (5x)، دو میکرولیتر مخلوط dNTPs (10µM)، ۵/. میکرولیتر آنزیم نسخه برداری معکوس M-MuLV (200U/µL)، نیم میکرولیتر RNase inhibitor (10U/µL) به لوله‌ها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. توقف واکنش با قرار دادن مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس انجام گرفت.

بعد از تهیه cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد. در این واکنش از آغازگرهای هم‌سو (WMV-F: 5'-GAATCAGTGCTCTGCAATCAGG-3´) و پس‌سوی (WMV-R:5´- ATTCACGTCCCTTGCAGTGG-3´) (شریفی و همکاران ۲۰۰۸) مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن رمز کننده‌ی پروتئین پوششی استفاده گردید. آزمون PCR با استفاده از کیت AccuPower PCR PreMix Kit (Bioneer-South Korea) در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی ۲/۵ میکرولیتر cDNA به غلظت ۲۰۰ نانو گرم بر میکرولیتر، یک میکرولیتر از هریک از آغازگرها به غلظت ۱۰ پیکومول، ۱/۵ میکرولیتر از بافر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتید تری فسفات‌ها (dNTPs) (۱۰میلی مولار)، ۰/ ۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵ واحد در میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر

[1]Complementary DNA
[2]Reverse transcriptase- Polymerase chain reaction

جدول۱- گیاهان آزمون جهت بررسی و تعیین دامنه‌ی میزبانی جدایه‌های ویروس موزائیک هندوانه **WMV**.

تیره	نام علمی	نام فارسی
Cucurbitaceae		
	***Cucurbita pepo* L.cv. Peto Seed**	کدو مسمایی
	***Cucumis melo* L.cv. Asgrown**	خربزه
	***C. sativus* L.cv. Peto Seed**	خیار
	***Citrllus lanatnus* Thunb.cv. Crimson Sweet**	هندوانه
	***Cucurbita moschata* .cv. White Bush Scallop**	کدو
	***Cucurbita moschata*.cv. ES152F1**	کدومراغه رقم **ES152F1**
	Cucurbita moschata. Cv. ES113	کدومراغه رقم **ES113**
	Cucumis melo	طالبی
Amaranthaceae		
	***Gomphrena globosa* L.**	گل تکمه‌ای
Chenopodiaceae		
	***Chenopodium quinoa* Wild.**	سلمه تره
	***C. amaranticolor* Coste et Reyn**	"
	***C. mural* L**	"
	***C. album* L**	"
Leguminosae		
	***Phaseolus vulgaris* L.cv. RedKidney**	لوبیا
	***P. vulgaris* L.cv. Bountiful**	"
	***Pisum sativum* L**	نخود فرنگی
	Lentis lensculinaris	عدس
	Phsaeolus vulgaris	لوبیا چیتی
	Vigna unguiculata	لوبیا چشم بلبلی
Solonaceae		
	***Datura metel* L .**	تاتوره
	***D. stramonium* L .**	"
	***D. maxima* L**	"
	***Lycopersicon esculentum* L.cv. Global**	گوجه فرنگی
	***Nicotiana tabacum* L.cv. Samson.N**	توتون
	N. tabacum L.cv. Turkish	"
	N. benthamiana L	"
	N. *clevalendii* Gray	"
	***N. glutinosa* L.**	"

بافر PCR (10X) و ۱۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام گرفت. در برنامه‌ی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ابتدا یک مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت سه دقیقه در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس، ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشت سازی ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس، اتصال ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس و گسترش ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس و در انتها برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس انجام گرفت. در نهایت محصولات PCR به دست آمده، در ژل آگاروز یک در صد الکتروفورز گردیدند.

تعیین توالی بخشی از پروتئین پوششی دو جدایه‌ی ایرانی WMV و بررسی فیلوژنتیکی

به منظور تایید کامل وجود جدایه‌های این ویروس و همچنین بررسی جایگاه فیلوژنی آنها در مقایسه با جدایه‌های دنیا، محصول PCR از دو جدایه مربوط به استان یزد جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد و با دستگاه Automatic Sequencer 3730XL تعیین توالی شدند. توالی‌های حاصل با استفاده از ابزار BLAST در پایگاه (http://www.ncbi.nlm.nih) NCBI مشابهت‌یابی شدند. پس از به دست آوردن میزان مشابهت، قطعه ۸۰۹ جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی توسط نرم افزار Bio Edit (هال ۱۹۹۹) هم‌ردیف‌سازی شدند. به منظور بررسی رابطه‌ی فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه، درخت فیلوژنتیکی به روش neighbor joining توسط نرم افزار MEGA 5 (تامورا و همکاران ۲۰۱۱) با حذف تمامی جایگاه‌های دارای خطا و فواصل ترسیم شد. سپس مجموعه داده‌های هم‌ردیف‌شده بسته به مورد جهت تعیین ساختار ژنتیکی جدایه‌های ویروسی به کمک نرم افزار DnaSP (روزاز و همکاران ۲۰۰۳) و مقایسه‌ی درصد همولوژی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی توسط نرم افزار SDTv1.2 (موهایر و همکاران ۲۰۱۴) مورد بررسی قرار گرفت. جهت تبدیل داده‌های نوکلئوتیدی به ترادف‌های اسید آمینه از نرم افزار MEGA 5 (تامورا و همکاران ۲۰۱۱) استفاده شد.

نتایج

شناسایی دو جدایه ویروس موزاییک هندوانه (WMV)

دو جدایه از ویروس موزاییک هندوانه به نام های YAZ.WMV41 (رس شمار KP162269) و YAZ.WMV.55 (رس شمار KP162268) از مزارع استان یزد از میزبان‌های خیار و طالبی جمع‌آوری گردیدند. گیاهان آلوده به این دو جدایه با آزمون الایزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌بادی WMV مورد بررسی قرار گرفتند و بر خلاف سایر جدایه‌های ایرانی این ویروس (شریفی و همکاران ۲۰۰۸) در آزمون الایزا نسبت به آنتی‌بادی‌های WMV واکنش مثبت نشان ندادند. در حالی که آلودگی گیاهان نسبت به WMV بر اساس آزمایش‌های استفاده از گیاهان آزمون و روش RT-PCR تائید گردید.

بررسی علائم دو جدایه YAZ.WMV.41 و YAZ.WMV.55 بر روی گیاهان آزمون

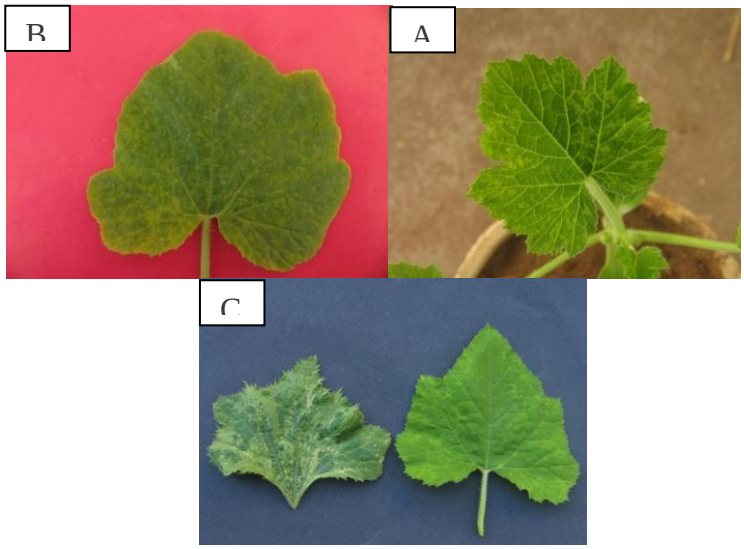
علائم ایجاد شده توسط دو جدایه مورد بررسی از این ویروس (YAZ.WMV.41 و YAZ.WMV.55) بر روی تعدادی از گیاهان آزمون با جدایه‌های گزارش شده قبلی WMV (شریفی و همکاران ۲۰۰۸) متفاوت می‌باشد. بنحوی که اکثر جدایه‌های WMV بر روی کدوی رقم مراغه تاول‌های سبزرنگ را ایجاد می‌کنند (شکل ۱-C). در مقابل جدایه YAZWMV.55 بر روی این رقم از کدو علائم موزاییک و روشن شدن رگبرگ‌ها را سبب گردید (شکل۱-A). همچنین دیگر جدایه‌ی مورد بررسی در این تحقیق YAZ.WMV.41 نیز بر روی این رقم از کدو سبب ایجاد نقاط کلروتیک بر روی پهنک برگ می گردد (شکل۱-B). پس از مایه‌زنی جدایه‌های YAZ.WMV.41 و YAZ.WMV.55 بر روی لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.)، جدایه YAZ.WMV.41 تولید لکه‌های کلروتیک بر روی پهنک برگ‌ها کرد. این علائم در ابتدا به

صورت لکه‌های قهوه‌ای رنگ کوچک به تعداد کم بر روی پهنک برگ ظاهر گردید، که به تدریج تعداد این لکه‌ها افزایش یافته و در نهایت ویروس در گیاه سیستمیک شده وعلائم زردی ایجاد می‌کند (شکل ۲- A). در حالیکه جدایه YAZ.WMV.55 بر روی این رقم از لوبیا، لکه‌های نکروتیک قرمز رنگ را سبب شد (شکل ۲-B). نتایج حاصل از مایه‌زنی این دو جدایه از WMV بر روی لوبیا چشم بلبلی (*Vigna sinensis* L.)، حاکی از ایجاد لکه‌های نکروتیک توسط جدایه YAZ.WMV.55 بود که در نهایت این جدایه باعث ایجاد علائم سیستمیک بصورت روشن شدن رگبرگ‌ها و موزائیک گردید (شکل ۲-C)، این در حالی است که جدایه YAZ.WMV.41 و جدایه گزارش شده قبلی WMV (شریفی و همکاران ۲۰۰۸) هیچ گونه علائمی بر روی این گیاه آزمون ایجاد نمی‌نمایند. مضافاً بر اینکه دو جدایه مورد بررسی در این تحقیق بر خلاف سایر جدایه‌های معمول WMV قادر به آلوده نمودن کدوهای هیبرید ES125 و White Bush Scallop نبودند.

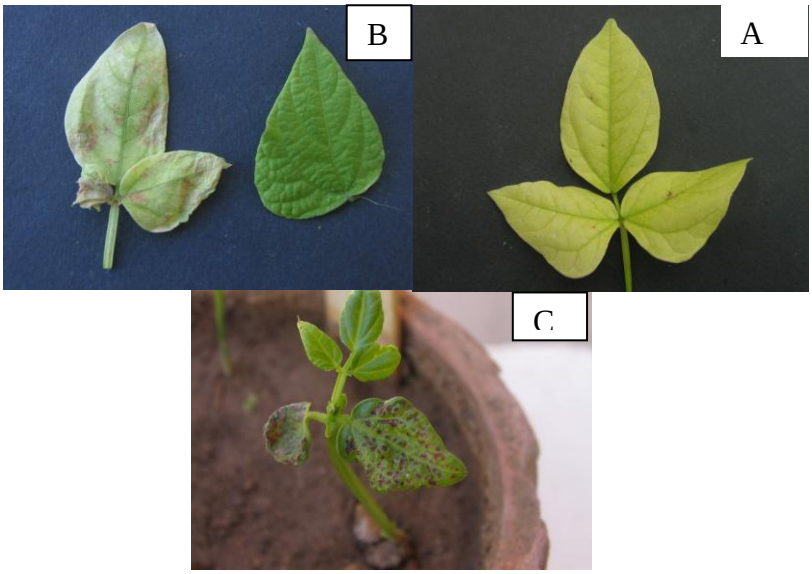
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تعیین توالی و تجزیه فیلوژنتیکی جدایه‌های WMV

در واکنش زنجیره ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی WMV -CP-F/R قطعاتی به طول ۸۰۹ جفت باز مربوط به پروتئین پوششی این ویروس تکثیر شد (شکل ۳).

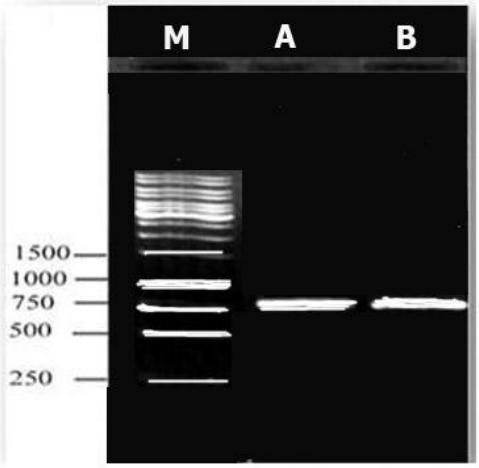
درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر ژن پروتئین پوششی، سه گروه فیلوژنتیکی (I، II،III) آشکار نمود. در گروه I جدایه‌های ایرانی مطالعات قبلی و جدایه‌های مربوط به کشورهای اسپانیا و فرانسه واقع گردیدند. گروه II نیز به دو زیر گروه IIA و IIB تقسیم شد. در زیر گروه IIA جدایه‌های ایرانی مطالعه قبلی مربوط به استان هرمزگان و یزد واقع شدند. زیرگروه IIB شامل جدایه‌های ایرانی مربوط به این مطالعه همراه با جدایه جیرفت با رس شماره EU667627 (شریفی و همکاران ۲۰۰۸) و یک جدایه از کشور اسپانیا می‌باشد. در گروه سوم جدایه‌هایی از کشورهای ژاپن و فرانسه قرار گرفت (شکل ۴).



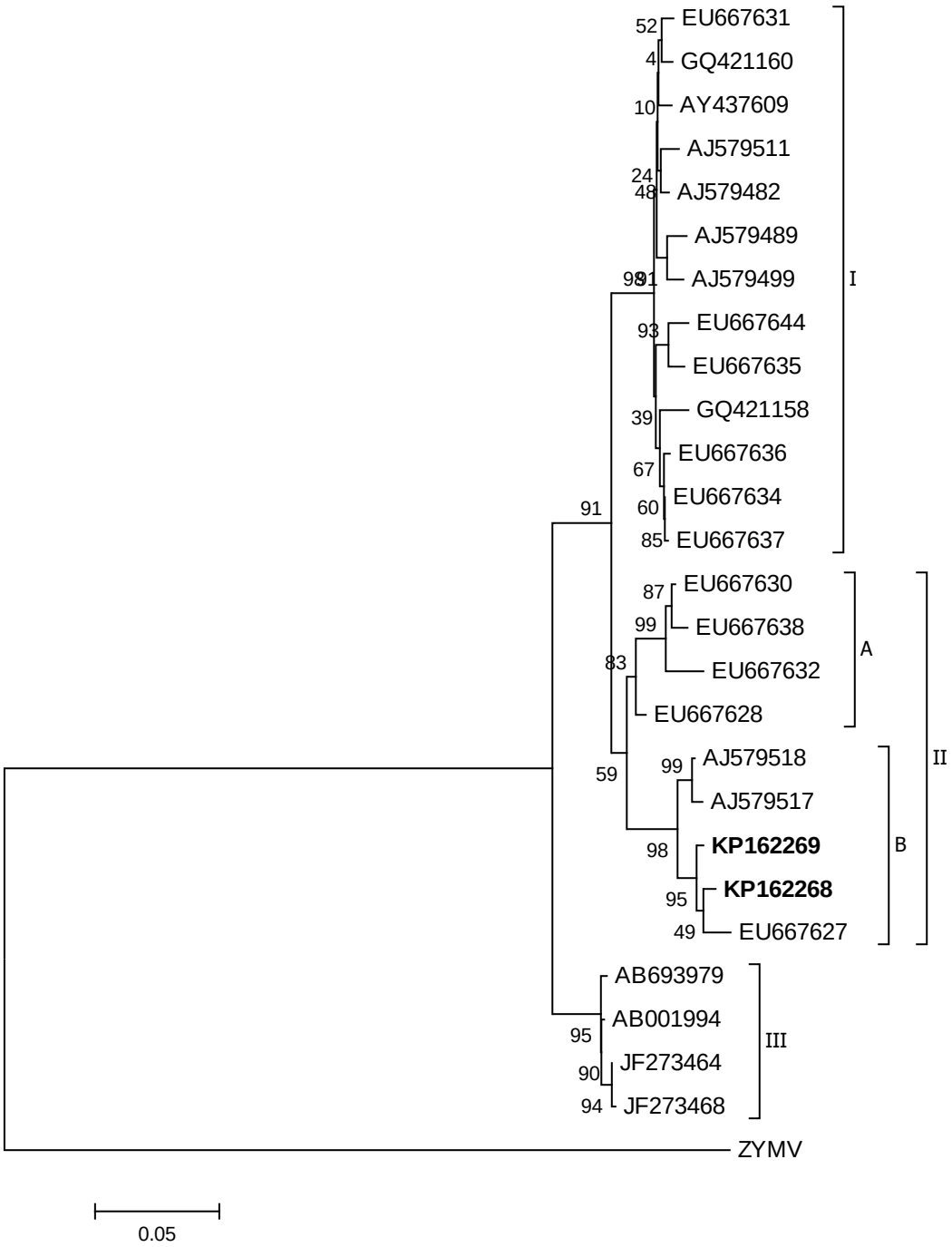
شکل۱- علائم موزاییک و روشن شدن رگبرگ‌ها بر روی کدوی رقم مراغه (*Cucurbita moschata* cv. ES152F1) مایه زنی شده با جدایه YAZ.WMV.55 (A). علائم موزاییک و نقاط کلروتیک بر روی کدوی رقم مراغه (*Cucurbita moschata* cv. ES113) مایه زنی شده با جدایه YAZ.WMV.41 (B). علائم تاولی شدن رگبرگ‌ها در نمونه‌ی کدوی رقم مراغه (*Cucurbita moschata* cv. ES152F1) مایه زنی شده با جدایه معمولی WMV (C) (سمت چپ) در کنارشاهد (سمت راست).



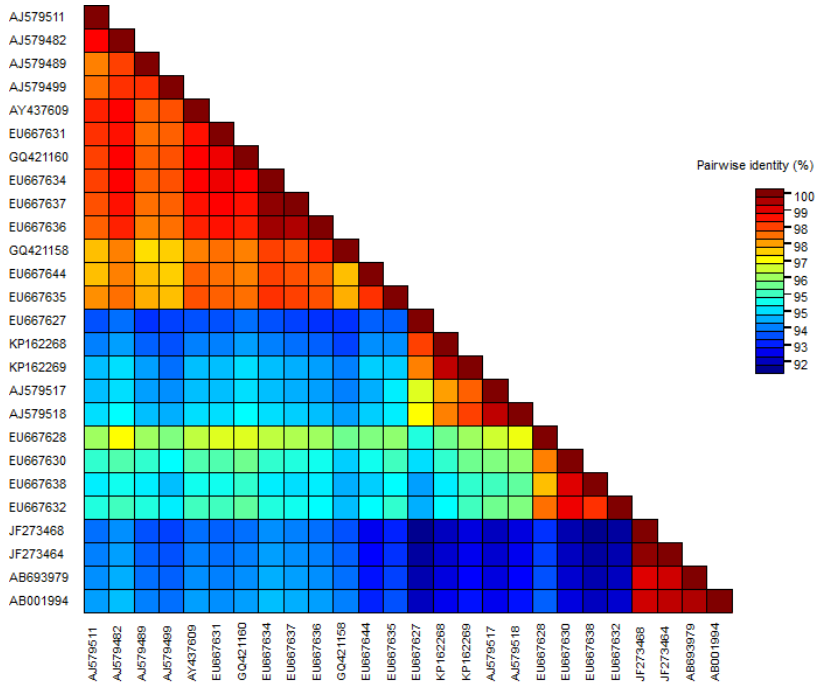
شکل ۲-A) علائم زردی و کلروز در لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris*) مایه زنی شده با جدایه YAZ.WMV.41 ویروس موزائیک هندوانه. (B) علائم نکروز قرمز برگی بر روی لوبیا چیتی مایه زنی شده با جدایه YAZ.WMV.55 در کنار شاهد. C) علائم ایجاد لکه های موضعی نکروز در لوبیا چشم بلبلی (*Vigna sinensis*) مایه زنی شده با جدایه YAZ.WMV.55.



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR مربوط به تکثیر ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس موزائیک هندوانه در ژل آگاروز ۱/۵ درصد. نشانگر اندازه دی اِن اِ DNA 1Kb Ladder (Gen Ruler^{TM} Fermentase, lithuania) چاهک M، جدایه YAZ.WMV.41 چاهک A، جدایه YAZ.WMV.55 چاهک B. قطعه‌ای به اندازه ۸۰۹ جفت باز تکثیر شده است.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس موزائیک هندوانه (WMV) مربوط به استان یزد و جدایه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA5.1 و روش neighbor joining. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۲ ذکر شده است. ویروس موزائیک کدو ZYMV به عنوان Outgroup در نظر گرفته شده است. جدایه‌های ایرانی تعیین ترادف شده این تحقیق بصورت پر رنگ نشان داده شده است. اعداد بالای شاخه‌ها نتایج اعتبارسنجی (Bootstrap) را بر اساس ۱۰۰۰ تکرار نشان می‌دهند. میله مقیاس در پائین سمت چپ نشان دهنده فاصله ژنتیکی است.



شکل ۵- مقایسه‌ی درصد مشابهت نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه YAZ.WMV.41 با رس شمار KP162269 و جدایه YAZ.WMV.55 با رس شمار KP162268 با جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار SDTv1.2.

میزان مشابهت اسید نوکلئیکی جدایه‌های مختلف WMV بیانگر آن است که جدایه‌های ایرانی مربوط به این مطالعه بیشترین شباهت را با یکدیگر و به میزان ۹۹/۴۸ درصد و با جدایه‌های ایرانی جدا شده ازهندوانه ابوجهل جیرفت با رس شمار EU667627 به میزان ۹۸/۴۴ درصد مشابهت دارند. همچنین، کمترین میزان شباهت اسید نوکلئیکی جدایه‌های ایرانی مربوط به این مطالعه با جدایه کدو مسمایی مربوط به استان خراسان رضوی با رس شمار GQ421158 به میزان ۹۲/۹۶ درصد می‌باشد (شکل ۵). مشخصات جدایه‌های ویروس موزائیک هندوانه WMV مورد مطالعه در این تحقیق و جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن جهت مقایسه و مطالعات فیلوژنتیکی در جدول ۲ منعکس شده است.

بحث

در طی سالهای اخیر مطالعات مزرعه‌ای نشان داده است که ویروس‌های آلوده کننده کدوئیان یکی از عوامل خسارت‌زای این محصولات در مزارع ایران محسوب می‌شوند (شریفی و همکاران ۲۰۰۸). در میان این ویروس‌ها، WMV دارای دامنه‌ی میزبانی گسترده‌ای در بین کدوئیان می‌باشد. در مورد دو جدایه YAZ.WMV.41 و YAZ.WMV.55 که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند، نتایج حاصل از مایه‌زنی بر روی گیاهان آزمون، بیانگر آن شد که این جدایه‌ها از نظر ایجاد علائم و حتی دامنه‌ی میزبانی با جدایه‌های قبلی گزارش شده از ایران تفاوت‌هایی داشتند. طبق گزارش شریفی و همکاران از ۱۸ جدایه از WMV که از نقاط مختلف ایران جمع آوری گردیده بود، تنها یک جدایه KER.JI.1 با رس شمار (EU667627) توانایی تکثیر بر روی توتون رقم *N. debneyii* را دارا می‌باشد (شریفی و همکاران ۲۰۰۸). اما این جدایه بر خلاف جدایه YAZ.WMV.41 (جدایه مورد بررسی در این تحقیق) توانایی تکثیر بر روی لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.) را ندارد. همچنین جدایه YAZ.WMV.41 توانایی تکثیر بر روی توتون رقم

جدول۲- مشخصات جدایه‌های ویروس موزائیک هندوانه **WMV** مورد مطالعه در این تحقیق و جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن جهت مقایسه و مطالعات فیلوژنتیکی.

میزبان	نام جدایه	منطقه	شماره دسترسی
خیار	**YAZ.WMV.41**	یزد	**KP162269**
طالبی	**YAZ.WMV.55**	یزد	**KP162268**
خربزه	**YAZ.SH.1**	یزد	**EU667635**
کدو مسمایی	**YAZ.MO.2**	یزد	**EU667630**
خیار	**YAZ.MO1**	یزد	**EU667638**
کدو مسمایی	**YAZ.TA.1**	یزد	**EU667632**
هندوانه ابوجهل	**KER.JI.1**	جیرفت	**EU667627**
خربزه	**KER.KER.1**	کرمان	**EU667644**
کدو حلوایی	**ESF.GA.2**	اصفهان	**EU667634**
کدو حلوایی	**ESF.ES.1**	اصفهان	**EU667637**
خربزه	**ESF.ZA.2**	اصفهان	**EU667636**
خربزه	**HOR.HA.1**	هرمزگان	**EU667628**
خربزه	**URO.OS.1**	ارومیه	**EU667631**
کدو مسمایی	**Kordkuy 127**	کردکوی گیلان	**GQ421160**
کدو مسمایی	**Mashhad**	مشهد	**GQ421158**
ارکیده سفید	**Habenaria**	ژاپن	**AB001994**
خیار	**S96-3**	ژاپن	**AB693979**
خربزه	**SG99.2**	اسپانیا	**AJ579518**
خربزه	**MAD95.7**	اسپانیا	**AJ579511**
خربزه	**SG99.1**	اسپانیا	**AJ579517**
خربزه	**MUR95.2**	اسپانیا	**AJ579499**
خربزه	**ZAR99.5**	اسپانیا	**AJ579489**
خربزه	**ZAR95.1**	اسپانیا	**AJ579482**
خربزه	**C07-014**	فرانسه	**JF273464**
کدو	**C07-284**	فرانسه	**JF273468**
-	**WMV-Fr**	فرانسه	**AY437609**

جدول۳- تفاوت در توالی اسیدهای آمینه مربوط به پروتئین پوششی بر اساس گروهای فیلوژنتیکی در میان جدایه های ویروس موزائیک هندوانه

Type[a]	20	27	30	37	59	77	116
CP	–	–	–	–	–	–	–
I	–	–	–	–	–	–	–
IIA							
IIB	E	D	N	V	–	–	–
III	–	–	–	–	V	G	A

[a]: تجزیه توالی ها بر اساس موقعیت کل ۲۸۳ اسیدهای آمینه مربوط به ژن پروتئین پوششی می‌باشد. اعداد در ردیف بالا نمایانگر ستون توالی‌های اسید آمینه‌ای در بین ۲۸۳ اسید آمینه می‌باشد. فقط ستون‌های متغیر نشان داده شده است.

جدول ۴- تنوع ژنتیکی و میانگین جایگزینی نوکلئوتیدی جدایه‌های WMV بر اساس گروه بندی‌های ایجاد شده در جمعیت‌های جغرافیائی و بررسی‌های فیلوژنتیکی.

جمعیت های جغرافیایی/گروههای فیلوژنتیکی	تعداد توالی	dS[a]	dN[b]	dN/dS	تنوع ژنتیکی
کلیه توالی ها	۲۶	۰.۲۱۴۳۶	۰.۰۱۱۷۶	۰.۰۵۴۸۶	۰.۰۵۱
دنیا	۱۱	۰.۲۳۳۵۲	۰.۰۱۰۴۲	۰.۰۴۴۶۲	۰.۰۵۳
ایران	۱۵	۰.۱۷۱۲۴	۰.۰۱۱۵۲	۰.۰۶۷۲۷	۰.۰۴۳
گروه I	۱۳	۰.۰۶۱۳۷	۰.۰۰۵۳۷	۰.۰۸۷۵	۰.۰۱۷
گروه II	۹	۰.۱۲۲۷۹	۰.۰۱۴۹۱	۰.۱۲۱۴۲	۰.۰۳۷
گروه I-A	۴	۰.۰۴۷۵۷	۰.۰۰۷۶۱	۰.۱۵۹۹۷	۰.۰۱۶
گروه I-B	۵	۰.۰۶۰۳۲	۰.۰۰۹۹۷	۰.۱۶۵۲۸	۰.۰۲۱
گروه III	۴	۰.۰۲۰۶۴	۰.۰۰۰۸۱	۰.۰۳۹۲۴	۰.۰۰۵

a. جایگزینی‌های مترادف **b.** جایگزینی‌های مترادف

N. debneyii را نیز ندارد. بر این اساس، این اولین گزارش از تکثیر یک جدایه از WMV (YAZ.WMV.55) بر روی لوبیا چیتی و لوبیا چشم بلبلی در ایران می‌باشد.

براساس درخت فیلوژنتیکی رسم شده، جدایه‌های WMVدر سه گروه واقع گردیدند (شکل ۴). گروه I شامل جدایه‌های ایرانی گزارش شده توسط شریفی و همکاران (۲۰۰۸) و شعیبی و همکاران (۲۰۰۹) جدا شده از گیاهان کدوئیان مختلف از جمله خیار، طالبی، خربزه، کدو مسمائی و کدو حلوائی و تعدادی جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن گزارش شده از کشور اسپانیا و یک جدایه از کشور فرانسه می‌باشد. در حالیکه در گروه II که خود به دو زیر گروه IIA و IIB تقسیم می‌گردد جدایه ایرانی KER.JI.1 (رس شمار EU667627) تنها جدایه در بین ۱۸ جدایه می‌باشد که از نظر دامنه‌ی میزبانی و شدت علائم بر روی گیاهان محک با سایر جدایه‌ها متفاوت بوده است (شریفی و همکاران ۲۰۰۸) و دو جدایه مورد بررسی در این تحقیق در زیر گروه IIB واقع گردیدند.لازم به ذکر است که جدایه KER.JI.1 (رس شمار EU667627) همچون دو جدایه مورد بررسی در این تحقیق نسبت به آنتی بادی WMV واکنش مثبت نشان نداده است. بر اساس آنالیز اسیدهای آمینه در موقعیت‌های ۲۰، ۲۷، ۳۰ و ۳۷ CP گروه IIB از گروه IIA تفاوت‌هایی تشخیص داده شد (جدول ۳) که این موضوع بیانگر وضعیت متفاوت جدایه‌های موجود در زیر گروه IIB نیز می‌باشد. در ضمن میزان مشابهت توالی

نوکلئوتیدی ژن CP جدایه KER.JI.1 (رس شمار EU667627) با جدایه‌های YAZ.WMV.41 و yaz.WMV.55 به میزان ۹۶/۲ درصد می‌باشد. در CP اعضای گروه III نیز مشخص گردید که والین در موقعیت ۵۹، اسید آسپارتیک در موقعیت ۷۷ و آلانین در موقعیت ۱۱۶ به ترتیب با اسیدهای آمینه لیزین، گلیسین و والین جایگزین شده‌اند و براین اساس می‌توان نتیجه گرفت که به چه دلیل گروه مذکور از سایر گروه‌های دیگر مجزا گردیده است. نسبت جایگزینی غیر مترادف به مترادف d_N/d_S در نواحی مورد بررسی در زیرگروه IIB و سایر گروه‌ها کمتر از یک بود (جدول ۴) و بیشتر جهش‌های انجام شده منجر به تغییر اسیدآمینه نمی‌شوند به عبارتی، نسبت d_N/d_S کمتر از یک در نواحی مورد بررسی نشان دهنده اعمال انتخاب منفی جهت حفظ ساختار ژنی این نواحی است تا ماهیت پروتئینی رمز شده در این نواحی محفوظ باقی مانده و کمتر دستخوش تغییرات شوند. از آنجایی که دو جدایه مذکور در این بررسی از دو میزبان متفاوت (خیار و طالبی) و همچنین جدایه ایرانی KER.JI.1 (رس شمار EU667627) از میزبان ثانویه هندوانه ابوجهل گزارش شده توسط شریفی و همکاران (۲۰۰۸) جداسازی شده‌اند و هرسه در زیر گروه فیلوژنتیکی IIB واقع گردیده‌اند. احتمالا فشار انتخاب میزبانی در تنوع ژنتیکی آنها دخالت داشته است. نتایج حاصل از این بررسی بیانگر آن است که WMV به دلیل تنوع در دامنه‌ی میزبانی و قدرت بیماریزایی بالا از نظر ایجاد علائم در گیاهان مختلف، از تنوع ژنتیکی بالایی نیز برخوردار می‌باشد. همچنین مطالعات مولکولی بیانگر آن است که جدایه‌هایی از این ویروس وجود دارند که از نظر توالی نوکلئوتیدی ژن CP با بقیه جدایه‌ها متفاوت بوده و علاوه بر اینکه از نظر گروه بندی در گروه مجزا قرار می‌گیرند، از نظر دامنه‌ی میزبانی نیز تفاوت‌هایی با بقیه جدایه‌های WMV دارند. لذا این موضوع که جدایه‌هایی همچون YAZ.WMV.41 ، YAZ.WMV.55 و KER.JI.1 که از نظر درصد تشابه نوکلئوتیدی ژن CP با جدایه‌های معمولی WMV متفاوت بوده و همچنین از نظر دامنه‌ی میزبانی نیز در آن‌ها تفاوت‌هایی مشاهده می‌گردد، بایستی مورد بررسی بیشتری قرار گیرد که آیا این جدایه‌ها در اثر موتاسیون در جدایه‌های معمولی این ویروس ایجاد شده و یا خود از والدین WMV می‌باشند.

منابع

سمیعی ا، ۱۳۸۳. شناسائی، تعیین پراکنش و بررسی برخی خصوصیات ویروس‌های آلوده کننده کدوئیان در گلخانه‌های ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان.

ابراهیم نسبت ف، ۱۳۵۱. گزارشی درباره جدا کردن ویروس موزائیک هندوانه در ایران. مجله بیماری‌های گیاهی. جلد هشتم، صفحه‌های ۱۷تا۲۰.

Abou-Jawadah Y, Sobh H, EL-Zammar S, Fayyad A, and Lecoq H, 2000. Incidence and management of virus disease of Cucurbits in Lebanon. Crop Protection 19: 217-224.

Clark MF and Adams SA N, 1977. Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-483.

Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

Lecoq H, Desbiez C and Delecolle B, 2008. Cytological and molecular evidence that the whitefly-transmitted *Watermelon mosaic virus* and *Papaya ring spot virus* is a tentative member of the family Potyviridae. Journal of General Virology 81: 2289-2293.

Massumi H, Samei A, Hosseini-Pour A, Shabanian M and Rahimian H, 2007. Occurrence, distribution and relative incidence of seven virus infecting greenhouse- grown cucurbits in Iran. Plant Disease 91: 159-163.

Moreno IM, Malpica JM, Diaz-Pendon JA, Moriones E, Fraile A and Garcia-Arenal F, 2004.Variability and genomic structure of the population of *Watermelon mosaic virus* infecting melon in Spain. Virology 318: 451-460.

Muhire BM, Varsani A and Martin DP, 2014. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation',PLoS One, 9: e108277.

Nagel H and Hiebert F, 1985. Structure of *Watermelon mosaic virus* 1. Virology 68: 1006.

Purcifull DE, Heibert E and Edwarson J, 1984. *Watermelon mosaic virus*-2. Description of Plant Virus 63: 1-11.

Rahimian H and Izadpanah K, 1987. Identity and prevalence of mosaic inducing cucurbit viruses in Shiraz, Iran. Journal of Phytopathologische Zeitschrift 92: 305-312.

Rozas J, Snchez-DelBarrio JC, Messeguer X and Rozas R, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics. 19: 2496-2497.

Shoeibi S, Masumi M, Nasrollahnezhad S, Heydari S, Izadpanah K and Ahmadikhah A, 2009. Sequencing of six Iranian isolates of *Watermelon mosaic virus* and phylogenetic comparison of Iranian isolates with other isolates of the world. Journal of Plant Pathology 45: 34-37.

Sharifi M, Massumi H, Heydarnejad J, Hosseinipour A, Shabanian M and Rahimian H, 2008. Analysis of the biological and molecular variability of *Watermelon mosaic virus* isolates from Iran. Virus Genes 37: 317-330.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.

Van Regenmortel MH, 1960. Zone electrophoresis and electron microscopy of a *Watermelon mosaic virus* from South Africa. Virology 12: 27-130.

Zhang JX and Yangfeng WU, 2009. Complete nucleotide sequence of *Watermelon mosaic virus* China isolate. Virology 13: 42-50.

Zitter TA, Hopkins DL and Thomas C E, 1996. Compendium of cucurbit disease. APS Press, New York, 87pp.

Nucleotide Sequence and Phylogenetic Analysis of Coat Protein Gene of Two Iranian *Watermelon Mosaic Virus* Isolates

H Massumi[1*], F Mohammadi[1], Kh Salari[2], J Heydarnejad[1] and A Hosseini Pour[1]

[1]Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.
[2]Former MSc Student, Department of Plant Protection Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.
[3]Instractor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft.
[4]Associate Professors of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.
*Corresponding author: Massomi@uk.ac.ir

Received:6 Oct 2015 Accepted:9 July 2016

Abstract

Watermelon mosaic virus (WMV) is a member of the genus *Potyvirus* in the family Potyiviridae. This virus is one of the most common and widespread viruses infecting cucurbits worldwide. In this research, partial biological and molecular characteristics of two WMV strains includingYAZ.WMV.41 and YAZ.WMV.55 collected from cucurbit growing farms in Yazd province were studied. These isolates did not react to polyclonal WMV antiserum in Direct and Indirect ELISA tests. Also, compared to several reported WMV isolates, these isolates induced different symptoms on the test plants. Coat protein (CP) gene (809 bp length) of these isolates was amplified in PCR, cloned and sequenced. Phylogenetic analysis showed that two Iranian and one previously reported WMV isolates (EU667626) are classified in subgroup IIB. Other Iranian isolates from the previous studies were clustered into sub groups I, IIA. Nucleotide sequence comparison indicated that these isolates share minimum and maximum nucleotide sequence identities (92.2 and 99.5 %) with a Spain (Accession no. AJ579518) and an Iranian (GQ421161) isolates, respectively. According to the results of this study, cucurbits are infected by different WMV isolates in Iran.

Keyword: Cucurbitaceae, Elisa, Polymerase Chain Reaction, *Watermelon mosaic virus*.