

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

حسین معصومی<sup>۱\*</sup>، فاطمه محمدی پاقلعه<sup>۲</sup>، خدیجه سالاری<sup>۳</sup>، جهانگیر حیدرنژاد<sup>۴</sup> و اکبر حسینی‌پور<sup>۴</sup>

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 موزائیک هندوانه *Watermelon mosaic virus* (WMV) متعلق به جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* از ویروس‌های مهم آلوده‌کننده 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 بر روی 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 و گلخانه‌های ایران بوسیله جدایه‌های متعدد این ویروس آلوده می‌شوند.

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

### مقدمه

(WMV)، ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus*) و ویروس لکه حلقوی پاپایا (*Papaya ring spot virus-W*) (PRSV-W) می‌باشند (زیترو 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 ۷۰۰-۸۰۰ نانومتر و قطر ۱۲ نانومتر می‌باشد. انتهای ۵' ژنوم دارای ساختار Vpg و در انتهای

ویروس‌های آلوده‌کننده‌ی کدوئیان بعنوان مهمترین عوامل خسارت‌زای این تیره در سراسر دنیا مطرح می‌باشند. ویروس‌های جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* از ویروس‌های اصلی آلوده‌کننده کدوئیان محسوب می‌شوند (زیترو و همکاران ۱۹۹۶، لکوک و همکاران ۲۰۰۸). از رایج‌ترین ویروس‌های تیره کدوئیان، ویروس موزائیک هندوانه *Watermelon mosaic virus*

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 (شعبی 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 نمونه‌هایی 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), virus (PRSV), Squash mosaic virus (SqMV), virus Watermelon mosaic (WMV), Papaya ring spot virus Morrocon watermelon mosaic virus (MWMV), virus تهیه شده از کمپانی DSMZ آلمان با روش الایزای ساندویچی (DAS-ELISA) Double antibody sandwich-ELISA بررسی شدند (کلارک و آدامز ۱۹۷۷). در مورد ویروس موزائیک خیار (CMV) Cucumber mosaic virus از روش الایزای غیر مستقیم (Indirect

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 بررسی‌هایی 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 گزارش‌هایی 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 euphorbiae 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 ۱۹۷۸ و 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

سنتز<sup>۱</sup> cDNA در آزمون<sup>۲</sup> RT-PCR، آنزیم نسخه‌برداری معکوس (M-MLV (Fermentas) و آغازگر پس سوی 5'-ATTTCACGTCCCTTGCAGTGG-3' (WMV-R) (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 (5x) RT، دو میکرولیتر مخلوط dNTPs (10μM)، ۵/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری 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 پلی‌مرز انجام شد. در این واکنش از آغازگرهای هم‌سو (5'-WMV-F: GAATCAGTGCTCTGCAATCAGG-3' (شریفی و همکاران ۲۰۰۸) مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن رمزکننده‌ی 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 نانوگرم بر میکرولیتر، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها به غلظت ۱۰ پیکومول، ۱/۵ میکرولیتر از بافر MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتید تری فسفات‌ها (dNTPs) (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵ واحد در میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر

ELISA استفاده گردید. آنتی‌بادی این ویروس بصورت هدیه از دکتر فیمل جونز (IACR-Rothamsted, Harpenden, UK) دریافت گردید. همچنین در بعضی موارد در مورد ویروس WMV و ZYMV نیز آزمون ایذا 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 ایذا 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 بر روی 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، مجدداً 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 جدایه‌های ویروس WMV با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز

دو جدایه از ویروس که در آزمون ایذا 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

<sup>1</sup>Complementary DNA

<sup>2</sup>Reverse transcriptase- Polymerase chain reaction

جدول ۱- گیاهان آزمون جهت بررسی و تعیین دامنه‌ی میزبانی جدایه‌های ویروس موزائیک هندوانه WMV.

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

داده‌های نوکلئوتیدی به ترادف‌های اسید آمینه از نرم افزار MEGA 5 (تامورا و همکاران ۲۰۱۱) استفاده شد.

### نتایج

شناسایی دو جدایه ویروس موزایک هندوانه (WMV) دو جدایه از ویروس موزایک هندوانه به نام های YAZ.WMV41 (رس شماره KP162269) و YAZ.WMV.55 (رس شماره 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 دادند. در حالی که آلودگی گیاهان نسبت به WMV بر اساس آزمایش‌های استفاده از گیاهان آزمون و روش RT-PCR تأیید 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 YAZ.WMV.55 بر روی این رقم از کدو علائم موزایک و روشن شدن رگبرگ‌ها را سبب گردید (شکل ۱- 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 می‌گردد (شکل ۱- 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

بافر PCR (10X) و ۱۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام گرفت. در برنامه‌ی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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

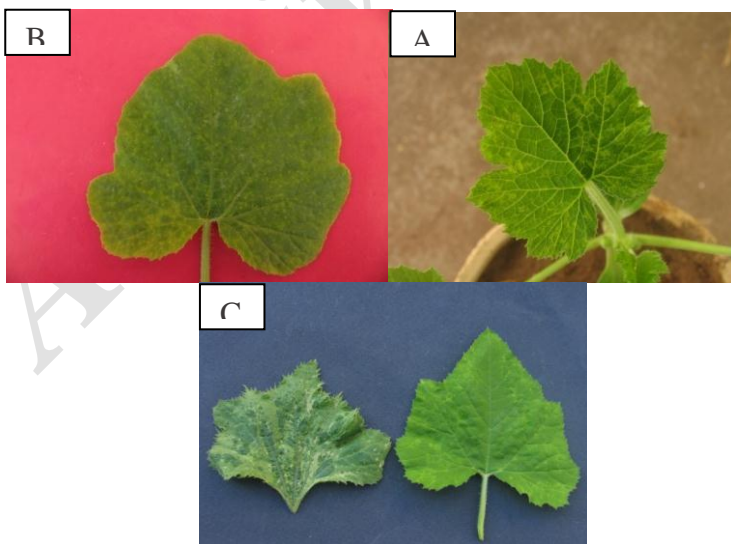
به منظور تایید کامل وجود جدایه‌های این ویروس و همچنین بررسی جایگاه فیلوژنی آنها در مقایسه با جدایه‌های دنیا، محصول PCR از دو جدایه مربوط به استان یزد جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد و با دستگاه Automatic Sequencer 3730XL تعیین توالی شدند. توالی‌های حاصل با استفاده از ابزار BLAST در پایگاه (<http://www.ncbi.nlm.nih>) از ایزار 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

### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، تعیین توالی و تجزیه فیلوژنتیکی جدایه‌های WMV

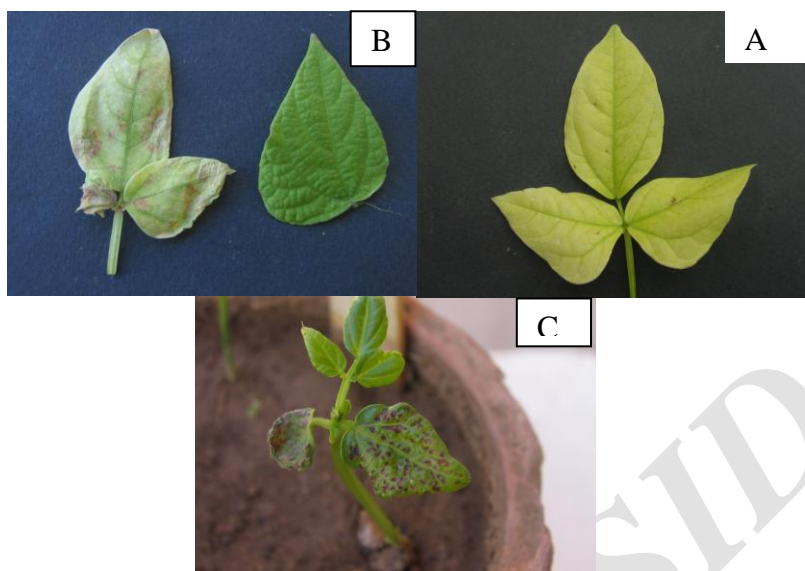
در واکنش زنجیره ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی WMV-CP-F/R قطعاتی به طول ۸۰۹ جفت باز مربوط به پروتئین پوششی این ویروس تکثیر شد (شکل ۳).

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).

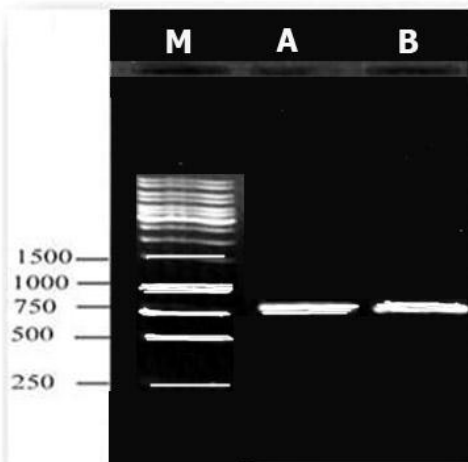
صورت لکه‌های قهوه‌ای رنگ کوچک به تعداد کم بر روی پهنک برگ ظاهر گردید، که به تدریج تعداد این لکه‌ها افزایش یافته و در نهایت ویروس در گیاه سیستمیک شده و علائم زردی ایجاد می‌کند (شکل ۲- A). در حالیکه جدایه YAZ.WMV.55 بر روی این رقم از لوبیا، لکه‌های نکروتیک قرمز رنگ را سبب شد (شکل ۲- B). نتایج حاصل از مایه‌زنی 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.



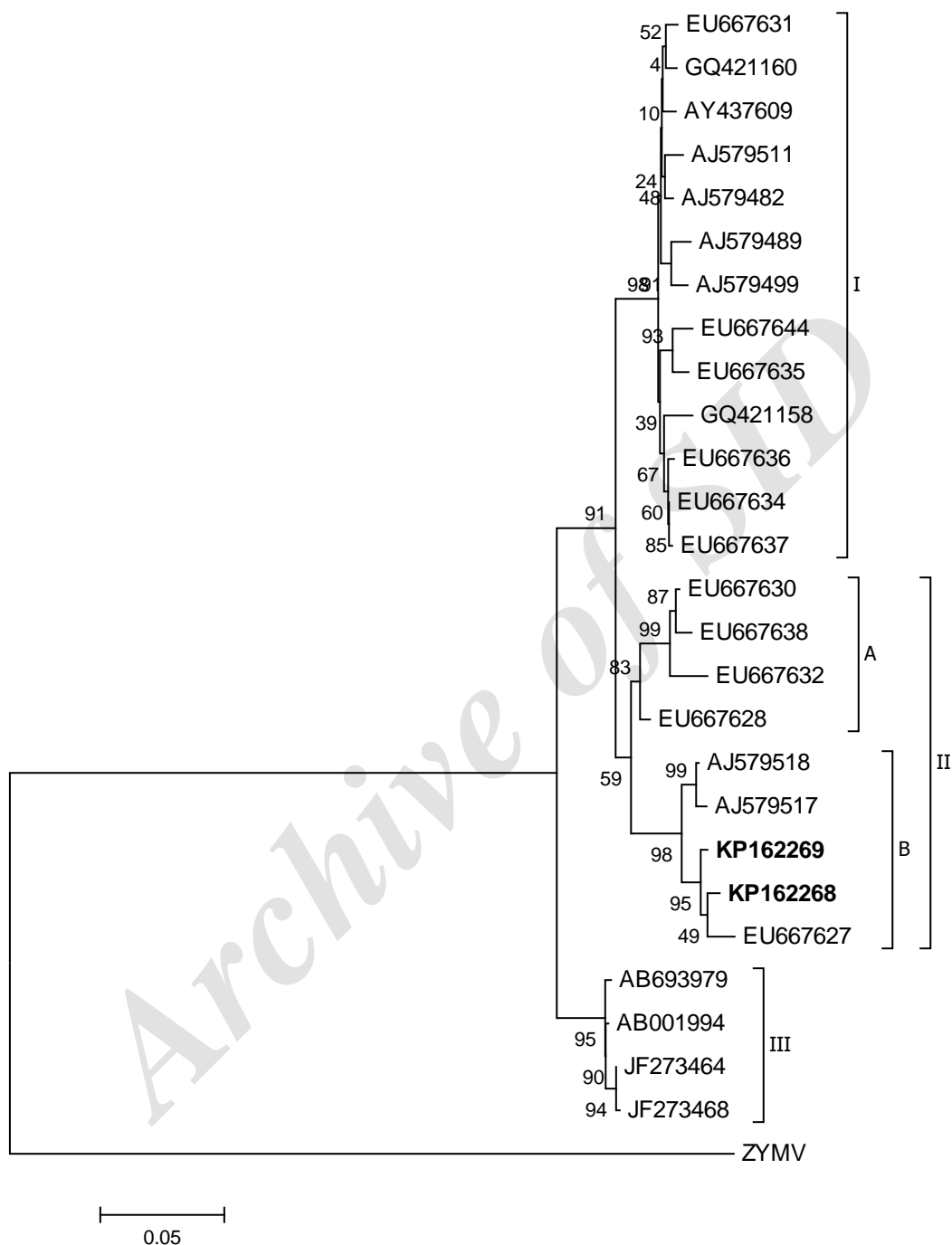
شکل ۱- علائم موزائیک و روشن شدن رگبرگ‌ها بر روی کدوی رقم مراغه (*Cucurbita moschata* cv. ES152F1) مایه زنی شده با جدایه YAZ.WMV.55 (A). علائم موزائیک و نقاط کلروتیک بر روی کدوی رقم مراغه (*Cucurbita moschata* cv. ES113) مایه زنی شده با جدایه YAZ.WMV.41 (B). علائم تاولی شدن رگبرگ‌ها در نمونه‌ی کدوی رقم مراغه (*Cucurbita moschata* cv. ES152F1) مایه زنی شده با جدایه معمولی WMV (C) (سمت چپ) در کنار شاهد (سمت راست).



شکل ۲- (A) علائم زردی و کلروز در لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris*) مایه زنی شده با جدایه YAZ.WMV.41 و 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.

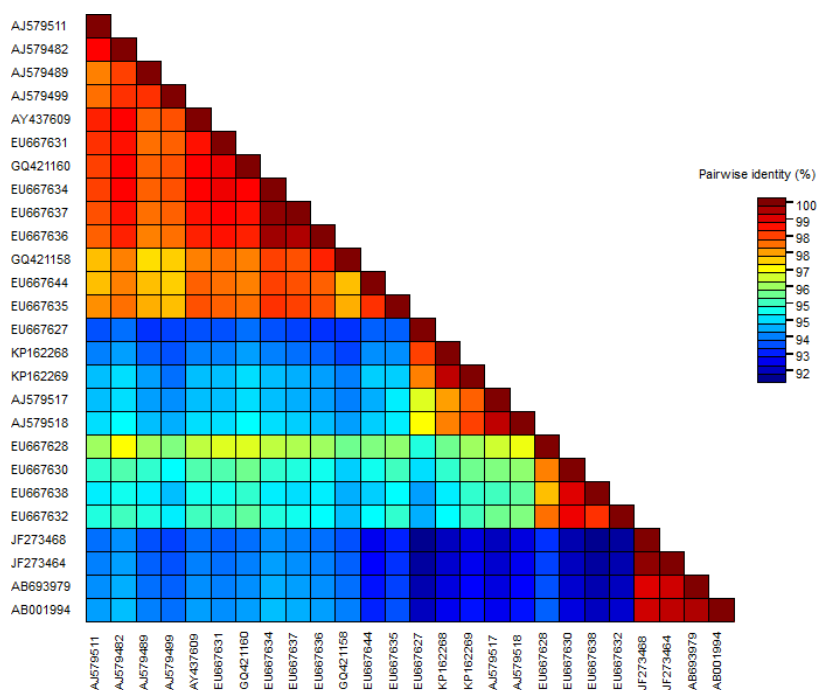


شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR مربوط به تکثیر ژن پروتئین پوششی جدایه های ویروس موزائیک هندوانه در ژل آگاروز ۱/۵ درصد. نشانگر اندازه دی ان اِ DNA 1Kb Ladder (Gen Ruler™ Fermentase, lithuania) چاهک M، جدایه YAZ.WMV.41 چاهک A، جدایه YAZ.WMV.55 چاهک B. قطعه ای به اندازه ۸۰۹ جفت باز تکثیر شده است.



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**.

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 جمع‌آوری 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

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 از هندوانه 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

جدول ۲- 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
خریزه	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.JL.1	جیرفت	EU667627
خریزه	KER.KER.1	کرمان	EU667644
کدو حلوایی	ESF.GA.2	اصفهان	EU667634
کدو حلوایی	ESF.ES.1	اصفهان	EU667637
خریزه	ESF.ZA.2	اصفهان	EU667636
خریزه	HOR.HA.1	هرمزگان	EU667628
خریزه	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
خریزه	SG99.2	اسپانیا	AJ579518
خریزه	MAD95.7	اسپانیا	AJ579511
خریزه	SG99.1	اسپانیا	AJ579517
خریزه	MUR95.2	اسپانیا	AJ579499
خریزه	ZAR99.5	اسپانیا	AJ579489
خریزه	ZAR95.1	اسپانیا	AJ579482
خریزه	C07-014	فرانسه	JF273464
کدو	C07-284	فرانسه	JF273468
-	WMV-Fr	فرانسه	AY437609

جدول ۳- تفاوت در توالی اسیدهای آمینه مربوط به پروتئین پوششی بر اساس گروه‌های فیلوژنتیکی در میان جدایه های ویروس موزائیک هندوانه

Type <sup>a</sup>	20	27	30	37	59	77	116
CP	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-
IIA							
IIB	E	D	N	V	-	-	-
III	-	-	-	-	V	G	A

<sup>a</sup>: تجزیه توالی ها بر اساس موقعیت کل ۲۸۳ اسیدهای آمینه مربوط به ژن پروتئین پوششی می‌باشد. اعداد در ردیف بالا نمایانگر ستون توالی های 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 جغرافیایی و بررسی‌های فیلوژنتیکی.

جمعیت های جغرافیایی/گروههای فیلوژنتیکی	تعداد توالی	dS <sup>a</sup>	dN <sup>b</sup>	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

جایگزینی های مترادف **b**. جایگزینی های مترادف **a**.

(رس شمار 667627 EU) 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 667627 EU) 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

*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.

بر اساس درخت فیلوژنتیکی رسم شده، جدایه‌های WMV در سه گروه واقع گردیدند (شکل ۴). گروه I شامل جدایه‌های ایرانی گزارش شده توسط شریفی و همکاران (۲۰۰۸) و شعبی 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

شده‌اند و هر سه در زیر گروه فیلوژنتیکی IIB واقع گردیده‌اند. احتمالاً 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.

نوکلئوتیدی ژن CP جدایه KER.JI.1 (رس شمار YAZ.WMV.41) با جدایه‌های YAZ.WMV.55 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 اسید آمینه 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

## 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 ۱۷ تا ۲۰.

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 Delecalle 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, Shabani 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, Shabani 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<sup>1\*</sup>, F Mohammadi<sup>1</sup>, Kh Salari<sup>2</sup>, J Heydarnejad<sup>1</sup> and A Hosseini Pour<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.

<sup>2</sup>Former MSc Student, Department of Plant Protection Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.

<sup>3</sup>Instructor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft.

<sup>4</sup>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 Potyviridae. 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 including YAZ.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*.