نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۲۰۳-۲۰۱

Journal of Plant Protection
Vol. 32, No. 2, Summer 2018, P. 201-203

ردیابی ویروس موزاییک زرد کدو از کدوییان استان گیلان و شهرستان ارومیه

محمد احمدزاده زاویه جیکی[۱]- احمد روحی بخش[۲]- مینا راستگو[۳]*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۱۹

چکیده

ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) از ویروس‌های آلوده‌کننده کدوییان می‌باشند. به منظور ردیابی ZYMV و TSWV طی سال زراعی ۹۳، تعداد ۴۵۷ نمونه‌ی برگی کدو، خیار، خربزه، هندوانه و طالبی مشکوک به آلودگی به این ویروس‌ها از مزارع کدوییان در استان گیلان و شهرستان ارومیه جمع‌آوری و با استفاده از آزمون الیزای مستقیم بررسی شدند. هیچکدام از نمونه‌ها آلودگی به TSWV را نشان ندادند. ZYMV نیز فقط در ۳۹ نمونه‌ی کدو شناسایی شد. نمونه‌های کدوی آلوده به ZYMV به گیاهان محک مایه‌زنی شدند. جهت ردیابی مولکولی، از آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ناحیه پروتئین پوششی ZYMV انجام و قطعه‌ای به اندازه ۴۵۸ جفت باز تکثیر و تبارزایی ۳ جدایه از روی کدو نشان داد که این جدایه‌ها در گروه A که شامل جدایه‌های اروپایی و ایرانی است قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی: توالی‌یابی، DAS-ELISA، RT- PCR، TSWV، ZYMV

مقدمه

کشت کدوییان از جمله کدو، خربزه، هندوانه و خیار در ایران از اهمیت خاصی برخوردار است. بیماری‌های ویروسی یکی از عوامل محدودکننده تولید کدوییان در دنیا محسوب می‌شوند (۱۸). تاکنون بیش از ۵۹ ویروس از روی کدوئیان شناسایی شده‌اند که تعداد زیادی از این ویروس‌ها ایجاد بیماری‌های مهمی در کدوئیان می‌نمایند (۱۱). ویروس موزاییک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) از جمله ویروس‌های مهم کدوییان در سراسر دنیا محسوب می‌شود (۱۲). ZYMV متعلق به جنس *Potyvirus* از تیره *Potyviridae* می‌باشد. پیکره ویروس بصورت میله‌ای خمش‌پذیر با ۷۵۰ نانومتر طول و ۱۱ نانومتر عرض می‌باشد. ژنوم ویروس از نوع RNA تک لای مثبت و تقریبا ۹۶۰۰ نوکلئوتید طول دارد (۶). در ایران این ویروس برای اولین بار در سال ۱۳۶۷ از مزارع کدو و طالبی استان تهران گزارش شد (۱۰). ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV) اولین بار در سال ۱۹۱۹ از استرالیا (۳) و در سال ۱۳۷۵ از روی گوجه‌فرنگی در ایران گزارش گردید (۲). TSWV متعلق به جنس ارتوتوسپوویروس (*Orthotospovirus*) از تیره *Tospoviridae* می‌باشد (۴). پیکره ویروس گرد (spherical) بوده و به قطر ۱۱۰-۸۰ نانومتر می‌باشد. ژنوم ویروس بصورت RNA تک لا و سه قسمتی است که RNA بزرگ (LRNA) قطبیت منفی (negative) دارد و RNA متوسط (MRNA) و RNA کوچک (SRNA)، متضاد (ambisence) می باشند. (۱۲). این ویروس در ایران از روی کدوییان فقط از روی خیار گلخانه‌ای در جیرفت گزارش شده است (۱۶). علی‌رغم کشت وسیع کدو و گزارش ویروس موزاییک زرد کدو از استان گیلان و شهرستان ارومیه تاکنون هیچ جدایه‌ای از میزبان کدو در این دو منطقه تعیین توالی نشده است. بنابراین در تحقیق حاضر وقوع و انتشار دو ویروس موزاییک زرد کدو و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در مزارع کدوییان این دو منطقه با استفاده از آزمون سرولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت تا ترادف جدایه‌هایی از این دو ویروس مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های برگی

جهت ردیابی و بررسی میزان آلودگی کدوییان به ویروس موزاییک زرد کدو و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در سال

۱ و ۲- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه گیلان
۲- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
(*- نویسنده مسئول: (Email: m.rastgou@urmia.ac.ir
DOI: 10.22067/jpp.v32i2.67619

www.SID.ir

Archive of SID

زراعی ۱۳۹۳ از مزارع کدوییان استان گیلان و شهرستان ارومیه تعداد ۳۳۲ نمونه کدو (*Cucurbita pepo* L.)، خیار (*Cucumis sativus* L.)، طالبی (*C. melo* L.var. *cantalupenesis*) و هندوانه (*C. citrulus* L.) از شهرهای مختلف استان گیلان از جمله رشت، صومعه‌سرا، لاهیجان، آستانه، کیاشهر، لنگرود و بندرانزلی و تعداد ۱۲۵ نمونه کدو، خیار و خربزه (*C. melo* L.) از مزارع اطراف شهرستان ارومیه دارای علایم ویروسی مانند موزاییک، تاولی شدن، بدشکلی برگ، بند کفشی شدن و رگبرگ‌نواری نمونه‌برداری شد و برای تشخیص از آزمون سرولوژیکی الیزای مستقیم (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, DAS-LISA) و آنتی‌سرم‌های چندهمسانه‌ای (polyclonal) اختصاصی هر دو ویروس تهیه شده از مؤسسه IVV ایتالیا بر اساس روش کلی توصیفی توسط کلارک و آدامز استفاده گردید (۵) و نمونه هایی که میزان جذب آنها از آستانه محاسبه شده براساس فرمول ($\bar{X}$ + 3SD) ($\bar{X}$ میانگین جذب گیاهان سالم) بیشتر بود، به عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته شدند.

ردیابی ZYMV و TSWV با استفاده از آزمون مولکولی

به‌منظور تایید نتایج آزمون سرولوژیکی، از روش آر.تی.پی.سی.آر (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) جهت ردیابی مولکولی ZYMV و TSWV استفاده شد. برای ردیابی ZYMV از آغازگرهای اختصاصی که ناحیه‌ای به طول ۴۸۵ جفت‌باز از ژن پروتئین پوششی این ویروس را تکثیر می‌کنند استفاده شد (۷). برای ردیابی TSWV از جفت آغازگر مشتق شده از آر.ان.ای بزرگ (L-RNA) استفاده شد. ترادف‌های حاصل، در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLASTn با ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه شدند. مقایسه هم‌ردیف سازی چندگانه[1] ترادف نوکلئوتیدی بین جدایه‌های این ویروس‌ها و سایر جدایه‌های ثبت شده از ایران و دنیا در بانک ژن با روش ClustalW و رسم درخت تبارزایی حاصل از هم‌ردیف‌سازی چندگانه به روش Neighbor joining به وسیله برنامه MEGA6 و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap) انجام شد (۱۷).

نتایج

نتایج آزمون سرولوژیکی الیزا (ELISA)

علایم موزاییک، تاولی شدن، بدشکلی، بندکفشی شدن برگ و رگبرگ نواری از علایم ویروسی مشاهده شده روی گیاهان کدو، خیار، خربزه، هندوانه و طالبی در مناطق نمونه‌برداری بود. نتایج حاصل از آزمون الایزا روی نمونه‌های دارای علائم نشان داد که ZYMV در مزارع کدوی تمام شهرستان‌های نمونه‌برداری شده در استان گیلان و شهرستان ارومیه به نسبت‌های مختلف وجوددارد و از مجموع ۴۵۷ نمونه جمع‌آوری شده که علایم مشکوک به این ویروس‌ها در آن‌ها دیده می‌شد، ۳۹ نمونه‌ی کدو آلودگی به ZYMV را نشان دادند. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین آلودگی ZYMV (۱۲/۷۶ درصد) مربوط به منطقه کیاشهر از مزارع استان گیلان و کمترین درصد آلودگی مربوط به شهر ضیابر (۲/۲۷ درصد) می‌باشد. درصد آلودگی مزارع کدوییان شهرستان ارومیه به ZYMV در حدود ۱۳/۶ درصد برآورد شد. در بررسی سرولوژیکی، TSWV ردیابی نگردید.

نتایج حاصل از آزمون RT- PCR و توالی‌یابی

بر اساس نتایج حاصل از آزمون RT- PCR ردیابی مولکولی ویروس موزاییک زرد کدو (ZYMV) روی گیاه کدو با موفقیت صورت گرفت و جفت آغازگر رفت و برگشت یک قطعه ۴۵۸ جفت بازی از ژن CP ویروس را تکثیر کرد. در تأیید نتایج سرولوژیکی، TSWV در آزمون RT-PCR نیز ردیابی نشد. اندازه قطعه تکثیر شده مربوط به دو جدایه گیلان (E09، F09) که بترتیب از آستانه و کیاشهر استان گیلان و از روی کدو جدا شده بودند بعد از حذف دو انتهای خوانده نشده، ۳۷۹ نوکلئوتید و جدایه ارومیه ۳۸۹ نوکلئوتید تعیین شد و با برنامه BLASTn نزدیک بودن آنها با جدایه‌های مختلف ویروس موزاییک زرد کدو به اثبات رسید. توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های E09، F09 (گیلان) و B12 (ارومیه) بترتیب با رس شمارهای MF804836 تا MF804838 در بانک ژن ثبت شد. بعد از رسم درخت تبارزایی مشخص شد که جدایه‌های گیلان (E09, F09) با جدایه‌های کشور جمهوری چک و ایران (جدایه فارس)، بیشترین شباهت (۹۸ درصد) و جدایه ارومیه (B12) با جدایه اسلواکی و جمهوری چک (۹۹ درصد) بیشترین تشابه را دارند و همگی در گروه A که شامل جدایه‌های اروپایی و ایرانی است قرار می‌گیرند.

بحث

ZYMV قبلا با روش سرولوژیکی از استان گیلان (۸) و مزارع اطراف ارومیه (۱۵) گزارش شده بود. یک جدایه از این ویروس نیز از روی خیار از شهر رشت تعیین توالی شده است (۱۳). اما در این تحقیق با روش مولکولی وجود این ویروس در استان گیلان (کیاشهر و آستانه) و شهرستان ارومیه و از روی میزبان کدو برای اولین بارگزارش گردید. ZYMV روی خیار، طالبی، هندوانه و خربزه از این دو منطقه جغرافیایی متفاوت ردیابی نشد. در این تحقیق هیچکدام از نمونه‌های جمع‌آوری شده آلودگی به TSWV را نشان ندادند. در تحقیق حاضر در درخت تبارزایی جدایه‌ها در ۳ گروه عمده قرار گرفتند که جدایه‌های تعیین توالی شده در این تحقیق در گروه A که حاوی

1- Multiple alignment

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های ایرانی و اروپایی است و بیشترین پراکنش جغرافیایی را دارد، قرار گرفتند که با توجه به بذربرد بودن این ویروس و احتمال انتقال این ویروس از طریق بذر از کشورهای اروپای مرکزی به ایران دور از انتظار نیست (۱ و ۹). داده‌های حاصل از این تحقیق می‌تواند در مدیریت این بیماری‌های ویروسی بخصوص در زمینه تولید ارقام مقاوم و پایدار مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1- Azarfar A., Izadpanah K., Afsharifar A., and Masumi M. 2012. Purification and the complete genome sequence of *Zucchini yellow mosaic virus*- Fars isolate. Iranian Journal of Plant Pathology, 48, 403-409. (In Farsi with English abstract).

2- Bananej K., Shahraeen N., and Ahoonmanesh A. 1996. Distinguishing and determining the characteristics of *Tomato spotted wilt virus* in Varamin farms. Iranian Journal of Plant Pathology, 32 (1-2): 42-45.

3- Brittlebank C.C. 1919. Tomato diseases. Journal of Agriculture, Victoria, 27:231-235.

4- Briese T., Alkhovskiy S., Beer M.H., Calisher C., Charrel R., Ebihara H., Jain R., Kuhn J., Lambert A., Maes P., Nunes M., Plyusnin A., Schmaljohn C.B. Tesh R., Yeh S., Elbeaino T., Digiaro M., Martelli G., Muehlbach H., and Junglen S. 2016. Create a new order, Bunyavirales, to accommodate nine families (eight new, one renamed) comprising thirteen genera.

5- Clark M. F., and Adams S. A. N. 1997. Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.

6- Desbiez C., and Lecoq H. 1997. *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Pathology, 46: 809-829.

7- Desbiez C., Wipf-Scheibel C., and Lecoq H. 2002. Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* with special reference to Caribbean Islands. Virus Research, 85: 5-16.

8- Gholamalizadeh R., Vahdat A., Keshavarz T., Elahinia S. A., Shahraeen N., and Bananej K. 2008. Occurrence and distribution of ten viruses infecting cucurbit plants in Guilan province, Iran. Acta Virologica, 52:113-118.

9- Gholizadeh-Roshanagh S., Nourinejhad Zarghani Sh, Aminian H., Jafari M., and Ramshini H. 2017. Imported infected cucurbit seeds cause of establishment and distribution of central Europe isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* in Varamin. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 5 (2):91-99.

10- Ghorbani S. 1988. Isolation of *Zucchini yellow mosaic virus* in the Tehran province. Iran Journal of Plant pathology, 24:25-34.

11- Lecoq H., and Desbiez C. 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture. Advances in Virus Research, 84: 67-126.

12- Lecoq H., Wipf-Scheibel C., Chandeysson C., Le Van A., Fabre F., and Desbiez C. 2009. Molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* in France: an historical overview. Virus Research, 141:190–200.

13- Massumi H., Shaabanian M., Heydarnejad J., Hosseinipour A., and H. Rahimian H. 2011. Host range and phylogenetic analysis of Iranian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus.* Journal of Plant Pathology, 93: 187-193.

14- Nascimento L. C., Pensuk V., Costa N. P., Deom C. M., and Sherwood J. 2006. Evalution of peanut genotypes for resistance to *Tomato spotted wilt virus* by mechanical and thrips inoculation. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41: 937-942.

15- Rastgou M., Koohi Habibi M., Izadpanah K., and Mosahebi Gh. 2010. Frequency of cucurbit viruses around Urmia and first report of *Zucchini yellow fleck virus*. Proceeding of 19th Iranian Plant Protection Congress .31 July-3 August. p.755.

16- Shaabanian M., Massumi H., Hosseinipour A., Heydarnejad J., and Poramini N. 2005. Detection and distribution of *Zucchini yellow mosaic virus* based on Immunocapture RT-PCR in some parts of Iran, The Fourth National Biotechnology Conference Islamic Republic of Iran, Kerman. P. 2098.

17- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.

18- Zitter T. A., Hopkins D. L., and Thomas C. E. 1996. Compendium of cucurbit diseases. APS press. 87pp.

www.SID.ir