نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۲۶-۲۳

Journal of Plant Protection
Vol. 33, No. 1, Spring 2019, P. 23-26

مقاله کوتاه پژوهشی

ردیابی مولکولی یک جدایه از ویروس موزاییک رگبرگی اقاقیای زینتی (*Wisteria vein mosaic virus*) در استان خراسان رضوی

مهند الجابری[۱]- محسن مهرور[۲*]- محمد زکی عقل[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۲۸

چکیده

ویروس موزاییک رگبرگی اقاقیای زینتی (*Wisteria vein mosaic virus*,WVMV) یک بیماری ویروسی شایع در گونه ویستریا است. این ویروس عضو جنس *Potyvirus* از خانواده Potyviridae می‌باشد. به منظور ردیابی و شناسایی این ویروس در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ تعداد ۳ نمونه مشکوک اقاقیای زینتی از استان خراسان رضوی جمع‌آوری شده، با استفاده از آزمون RT-PCR و بکارگیری آغازگر اختصاصی مربوط به بخشی از ژن CI، قطعه‌ای به طول ۶۸۰ جفت نوکلئوتید تکثیر شد. محصول PCR مربوط به یک جدایه پس ازهمسانه‌سازی توالی‌یابی شده، با سایرتوالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که در سطح نوکلوتیدی بیشترین تشابه آن با جدایه چینی این ویروس به میزان ۹۰/۶۴ درصد و کمترین میزان تشابه آن با جدایه‌ای ازویروس موزاییک کاهو (*Lettuce mosaic virus*) به میزان ۵۶/۳۴ درصد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیکی، خراسان رضوی، ژن CI، ویروس موزائیک رگبرگی اقاقیای زینتی، RT-PCR

مقدمه

پیچ زینتی با نام علمی *Wisteria sinensis* از خانواده گل‌های پروانه‌آسا می‌باشد که بومی نواحی شرقی ایالات متحده، چین، کره و ژاپن بوده و با دارا بودن گل‌های زیبا از پر کاربردترین گیاهان در فضای سبز به شمار می‌رود. ویروس موزاییک رگبرگی اقاقیای زینتی (پیچ) (WVMV) یک بیماری شایع گونه ویستریا است. این بیماری برای اولین بار توسط Brierley & Lorentz در سال ۱۹۵۷ در ایالات متحده آمریکا بر روی گیاه *Wisteria floribunda* گزارش شد. در سال ۱۹۷۰ Bos نام *Wisteria vein mosaic virus* را برای عامل این بیماری برگزید. این ویروس در گونه‌های جنس *Wisteria* spp. در استرالیا، نیوزلند، چین، ایالات متحده و تعدادی از کشورهای اروپایی مشاهده شده است (۲). علائم این بیماری شامل رگه‌ای یا خطی شدن، زردی رگبرگ‌ها، ابلقی و موزاییک و ریزش برگ‌ها است (۲).

این ویروس به صورت مکانیکی و پیوند و همچنین شته‌های *Aphis craccivora* و *Myzus persicae* به صورت ناپایا منتقل می شود (۱). WVMV از لحاظ سرولوژیکی مرتبط به ویروس‌هایی همچون ویروس موزاییک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*, BCMV) و ویروس موزاییک هندوانه (*Watermelon mosaic virus*, WMV) بوده و نسبت به سایر پوتی ویروس‌ها دارای دامنه میزبانی بسیار کمتری می‌باشد. گونه‌های *Wisteria floribunda*، *W. sinensis* و *Atriplex hortensis* به این ویروس حساس بوده و گونه‌های *Beta vulgaris*، *Capsicum annuum* و *Cucumis sativus* نسبت به این ویروس مقاوم هستند (۳). در سال ۲۰۰۳ درخت فیلوژنتیک با استفاده از توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژنوم (شامل پروتئین پوششی و 3 UTR) WVMV و شش گونه از جنس *Potyvirus* شامل ویروس‌های موزاییک معمولی لوبیا (BCMV)، موزائیک شته زاد لوبیا چشم بلبلی (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*,ABMV)، موزاییک دندروبیوم (*Dasheen mosaic virus*, DMV)، کوتولگی بادام زمینی (*Peanut stunt virus*, PSV)، موزاییک سویا (*Soybean mosaic virus*,SMV) و موزاییک هندوانه (WMV) نشان داد که این ویروس دارای بیشترین شباهت با ویروس موزاییک سویا (SMV) و ویروس موزاییک هندوانه (WMV) می‌باشد. هدف از این تحقیق، شناسایی و بررسی بخشی از

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: mehrvar@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/jpp.v33i1.73604

www.SID.ir

Archive of SID

ژنوم این ویروس در استان خراسان رضوی می‌باشد به همین منظور بخشی از ژن CI یک جدایه جمع‌آوری شده از درختان اقاقیای زینتی استان خراسان رضوی با استفاده ازروش PCR، تکثیر و پس از توالی یابی، آنالیز مولکولی ناحیه CI و جایگاه تاکسونومیکی آن در میان سایر جدایه‌های WVMV تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و نگهداری ویروس

در تابستان سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ تعداد ۳ نمونه اقاقیای زینتی دارای علائم زردی رگبرگ‌ها، ابلقی و موزاییک، از محوطه پردیس دانشگاه فردوسی مشهد در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد.

شناسایی مولکولی ویروس با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز

استخراج RNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، آلمان) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد. با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی که بر اساس توالی‌های حفاظت شده ژن سی آی ویروس طراحی شده‌اند، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نسخه‌برداری معکوس انجام شد. با استفاده از RNA کل استخراج شده، آغازگر برگشت و آنزیم MMLV-Reverse Transcriptase (ترموساینتفیک، امریکا)، cDNA سنتز شد. آزمون PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت و آنزیم Taq DNA polymerase (ترموساینتفیک، امریکا)، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. نهایتا محصولات بدست آمده، به همراه مارکر مولکولی در ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز شدند. باندهای تکثیر شده در ناحیه مورد انتظار با استفاده از کیت Gel Recovery kit (دنا زیست، ایران) خالص‌سازی گردید. قطعه‌ژنی تکثیر شده مربوط به یکی ازجدایه‌ها، درون پلاسمید pTG19-T (ویوانتیس، مالزی) وارد و به سویه DH5α باکتری *E. coli* انتقال داده شد و همسانه‌سازی قسمتی از ژن CI انجام پذیرفت. همسانه‌های حاوی ژن مورد نظر از طریق کلونی پی‌سی‌آر (Colony PCR) با استفاده از آغازگر M13 شناسایی شدند. DNA پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت Plasmid DNA isolation (دنازیست، ایران) استخراج شده و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی شدند. توالی‌های حاصل، در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. درخت فیلوژنتیکی حاصل از همردیف‌سازی چندگانه با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و بر اساس روش Neighbor joining و با درجه اعتبار (bootstrap) ۱۰۰۰ تکرار ترسیم گردید.

نتایج و بحث

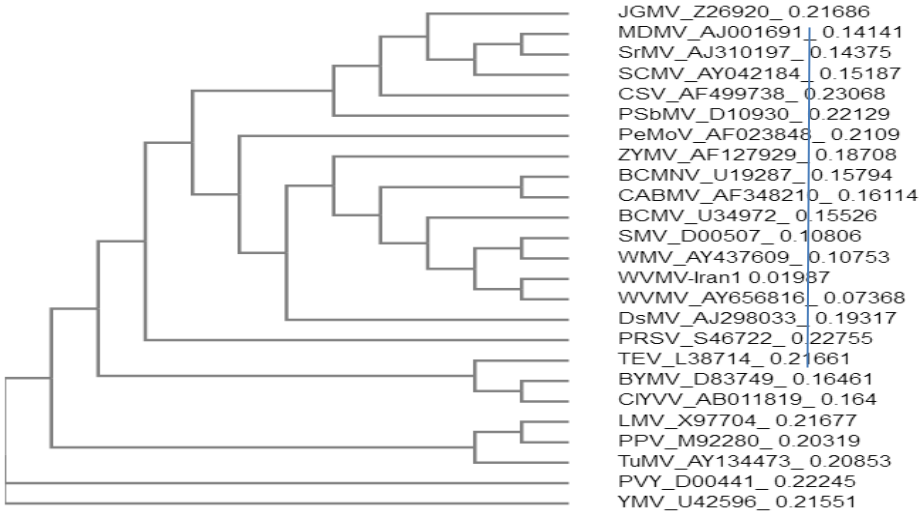
نتایج حاصله بیانگر وجود ویروس موزاییک رگبرگی اقاقیای زینتی در استان خراسان رضوی می‌باشد. در آزمون PCR در هر سه نمونه مورد آزمایش، باندی در ناحیه ۶۸۰ جفت باز مشاهده گردید. علائم مهم بیماری شامل ایجاد موزاییک، زردی و کوچک شدن برگ‌ها بود (شکل ۱). از بین سه نمونه یک نمونه انتخاب و پس از همسانه‌سازی در دو جهت توالی‌یابی شد. با مقایسه ترادف‌های حاصل با اطلاعات موجود در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه BLAST مشخص شد که قطعات همانندسازی شده در واکنش PCR مربوط به ویروس WVMV می‌باشد. آنالیز فیلوژنتیکی جدایه تعیین توالی شده به همراه تعدادی از جدایه‌های مربوط به زیر گروه Bean common mosaic virus جنس Potyvirus موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه مورد بررسی ویروس WVMV بوده و در زیر گروه ویروس موزاییک معمولی لوبیا همراه با جدایه چینی این ویروس در کنار ویروس‌های موزائیک هندوانه و سویا قرار می‌گیرد (شکل ۲). بیشترین شباهت آن در سطح نوکلئوتیدی با جدایه چینی این ویروس به میزان ۹۰/۶۴ درصد و پس از آن به ترتیب با جدایه‌های ویروس موزاییک هندوانه (WMV) و ویروس موزائیک سویا (SMV) به میزان ۸۰/۶۷ و ۸۰/۴۶ درصد می‌باشد. کمترین میزان تشابه آن نیز با ویروس موزاییک کاهو (LMV) به میزان ۵۶/۳۴ درصد می‌باشد. میزان تشابه جدایه ایرانی این ویروس در سطح نوکلئوتیدی با ویروس موزائیک معمولی لوبیا (BCMV) و ویروس موزائیک شته زاد لوبیا چشم بلبلی (CABMV) به ترتیب به میزان ۷۶/۵۱ درصد و ۷۶/۴۷ درصد می‌باشد. برخلاف جدایه چینی این ویروس که بیشتر شبیه ویروس موزائیک سویا می‌باشد، جدایه ایرانی آن بیشتر شبیه ویروس موزائیک هندوانه می‌باشد. بررسی بیشتر بروی جدایه‌های ایرانی این ویروس نشان می‌دهد که بدلیل نسبت نزدیک‌تر جدایه‌های استرالیائی این ویروس به ویروس موزائیک هندوانه به نظر جدایه‌های ایرانی این ویروس تشابه بیشتری با جدایه‌های استرالیائی نسبت به جدایه‌های چینی دارند با این وجود برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر، تعیین توالی بخش های دیگری از ژنوم ویروس مورد نیاز است. همچنین مقایسه ۳۵۰ نوکلوتید مربوط به ژن Nib این ویروس نشان داد که بیشترین تشابه آن در سطح نوکلوتیدی به میزان ۷۷/۶۵ درصد با جدایه چینی این ویروس و کمترین میزان تشابه آن به میزان ۵۸/۷۴ درصد با جدایه‌ای از ویروس موزائیک نیشکر (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) (AY042184) از چین می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- علائم موزائیک بر روی برگ‌های گیاه اقاقیای زینتی جمع‌آوری شده از استان خراسان رضوی

Figure 1- Mosaic symptoms on *Wisteria sinensis* leaves in Khorasan Razavi Province



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده حاصل از همردیف‌سازی ۶۸۰ نوکلئوتید از توالی‌های ژن CI ویروس موزاییک اقاقیای زینتی و ۲۵ جدایه مختلف متعلق به زیر گروه *Bean common mosaic virus* از جنس *Potyvirus* با استفاده از روش Neighbor Joining در نرم‌افزار MEGA6

Figure 2- Phylogenetic tree drown based on alignments of *Wisteria vein mosaic virus* CI gene nucleotide sequence (680 nt) plus 25 different isolates within Bean common mosaic potyvirus subgroup using Neighbor-joining method based on 1000 replicates

منابع

1- Adams M.J., Antoniw J.F., and Beaudoin F. 2005. Overview and analysis of the polyproteincleavage sites in the family *Potyviridae*. Molecular Plant Pathology l6: 471-487.

2- Bos L. 1970. The identification of three new viruses isolated from *Wisteria* and *Pisum* in the Netherlands, and the problem of variation within the potato virus Y group. Netherlands Journal of Plant Pathology 76: 8-46.

3- Brierley P., and Lorentz P. 1957. Wisteria mosaic and peony leaf curl, two diseases of ornamental plants caused by viruses transmissible by grafting but not by sap inoculation. Plant Disease Reporter 41: 691-693.

4- Clover G.R.G., Tang Z., Smales T.E., and Pearson M.N. 2003. Taxonomy of *Wisteria vein mosaic virus* and extensions to its host range and geographical distribution. Plant Pathology 52: 92–96.

5- Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E., Estes M., Lemon S., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D., Pringle C.R., and Wickner R.B. 2000. Virus Taxonomy– Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA, USA: Academic Press.

www.SID.ir

Journal of Plant Protection
Vol. 33, No. 1, Spring 2019, P. 23-26

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۲۶-۲۳

Molecular Identification of an Isolate of *Wisteria vein mosaic virus* in Khorasan Razavi Province

M. Al Jaberi[1]- M. Mehrvar[2]*- M. Zakiahgl[3]

Received: 27-06-2018
Accepted: 19-12-2018

Introduction: *Wisteria vein mosaic virus* (WVMV) is a member of the *Potyvirus* genus (Potyviridae) with flexuous filamentous particles. The disease was first reported by Brierley & Lorentz (1957) in the USA from *W. floribunda*. They cited reports of similar cases dating back to the 1940s and suspected that a virus was responsible for the disease. Afterward the virus has been reported in *Wisteria* spp. in Australia, New Zealand, China, Germany, Czech Republic, Italy and in the Netherland. In comparison to the majority of potyviruses, WVMV has a very narrow host range, naturally infecting only Wisteria spp. (*W. sinensis, W. floribunda, and W. venusta*). This virus can be introduced into the landscapes on new plants that were infected during their production. Other wisteria can become infected by mechanical inoculation if infected sap is moved on cutting tools or by aphids during feeding from sap of these plants. In terms of symptoms induction, the virus can cause systemic, local chlorotic (sometimes necrotic) lesions or mottling and mosaic on the leaves of wisteria spp. plants and other experimental hosts of Chenopodium spp., *Nicotiana megalosiphon* and several legumes. The virus is serologically related to Bean common mosaic virus (BCMV), Bean yellow mosaic virus (BYMV), Clover yellow vein virus (ClYVV) and Watermelon mosaic virus (WMV). WVMV is transmitted by aphids, grafting or mechanical means with no significant impact on ornamental host plant except inducing an unfavorable leaf appearance in the landscape.

Materials and Methods: In August 2017, a plant of *Wisteria sinensis* in the campus of Ferdowsi University of Mashhad in Iran was observed to have chlorotic, mottling and mosaics on some leaves, which resembled the symptoms caused by wisteria mosaic disease. RNA was extracted from the symptomatic plant with an RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) and tested by RT-PCR using potyvirus degenerate primers CIF/R. Amplicons of the expected size, 680 bp were obtained. The PCR product was cloned and then sequenced. The partial sequence of Nib gene was also amplified (350 bp) by degenerate primer for potyvirus Nib gene and the obtained fragment were cloned and then sequenced.

Results and Discussion: A BLASTn search in the GenBank showed 90.64% nucleotide sequence identity with WVMV Chinese isolate (AY656816) followed by *Watermelon mosaic virus* (80.67%) and *Soybean mosaic virus* (80.46%). The least identity was with an isolate of *Lettuce mosaic virus* (56.34%). It seems that the Chinese and Iranian isolates of this virus are closer to each other but due to lack of nucleotide sequence from other part of the world in CI and Nib genes it is hard to conclude that Iranian isolate is just close to Chinese isolate and it should be considered that may other isolates exist which are closer to Iranian WVMV isolate than Chinese isolate.

Conclusion: From this research, it can be concluded that this virus is present in wisteria spp. plant in Khorasan Razavi province of Iran. In terms of sequence similarity based on partial nt sequence of CI gene (680 nt), it is most similar to a Chinese isolate of WVMV (90.64 %) followed by WMV (80.67 %) and SMV (80.46 %) in nt level and within BCMV subgroup of potyviruses. It seems likely that the disease is spread primarily through vegetative propagation rather than by aphid or mechanical transmission. Although the disease does not markedly reduce the vigour of infected plants, the foliage of such plants is chlorotic and mottled, rendering them unsaleable or can cause the ornamental plants as unfavorable host.

Keywords: CI gene, Khorasan Razavi, Phylogenetic analysis, RT-PCR, *Wisteria vein mosaic virus*

1, 2 and 3- Master Student of Plant Pathology, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, Respectively
(*- Corresponding Author Email: mehrvar@um.ac.ir)

www.SID.ir