



شناسایی مولکولی سه جدایه ویروس موزائیک هندوانه از کدوئیان استان آذربایجان شرقی و غربی

ندا پناه‌برهانی^{۱*}، سویل نعمت‌اللهی^۲

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی ایران واحد تبریز
۲- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی ایران واحد تبریز

* borhanneda2016@gmail.com

ارسال: اردیبهشت ماه ۹۹ پذیرش: خرداد ماه ۹۹

چکیده

ویروس موزائیک هندوانه (WMV) متعلق به جنس Potyvirus از خانواده Potyviridae می‌باشد. به منظور ردیابی، تعیین پراکنش و آنالیز فیلوژنتیکی این ویروس در مزارع مختلف کدوئیان استان آذربایجان شرقی و غربی، ۳۰۵ نمونه گیاهی مشکوک به آلودگی، از ۱۳ منطقه جمع‌آوری شد. در مطالعات گلخانه‌ای از کدو مسمایی (Cucurbita pepo) به عنوان میزبان تشخیصی و تکثیری استفاده شد. جدایه‌های WMV دو هفته پس از مایه‌زنی علائم متنوعی شامل بدشکلی، باریک و پاره شدن برگ به همراه تاول‌های برجسته سبز تیره و موزائیک روی برگ گیاه (C.pepo) ایجاد نمودند. از گیاهان آلوده، RNA ویروس‌ها مطابق پروتوکل روحانی و همکاران استخراج و cDNA تهیه گردید. واکنش RT-PCR روی ۵۴ نمونه که به عنوان نماینده از بین نمونه‌ها از لحاظ تنوع علائم و منطقه انتخاب شدند، انجام شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه‌ی ۸۰۰ جفت‌باز از بخش عمده ژن پروتئین پوششی WMV تکثیر یافت. محصول PCR سه جدایه WMV بر مبنای تنوع علائم و محل نمونه‌برداری، به طور مستقیم ترادف‌یابی شدند. ترادف‌های بدست‌آمده شامل ۷۸۰ نوکلوتید از ژن پروتئین پوششی همراه با ۲۲ ترادف انتخاب شده از GenBank هم‌ردیف‌سازی شد. آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس ترادف نوکلوتیدی ژن پروتئین پوششی WMV، این جدایه‌ها را در ۳ گروه قرار داد که جدایه T1.Ahar و جدایه Tab.32 استان آذربایجان شرقی در کنار جدایه‌هایی از اصفهان، یزد، کرمان و تعدادی از کشورهای اروپایی در گروه I قرار گرفتند. البته جدایه T1.Ahar و Tab.32 در یک زیرخوشه شامل جدایه‌های اروپایی و اصفهانی قرار دارند. جدایه T5.Nagd استان آذربایجان- غربی در گروه II در کنار جدایه‌های ردیابی شده از قسمت‌های مختلف جهان قرار گرفت.

کلمات کلیدی: WMV، بیولوژیکی، RT-PCR، پروتئین پوششی، فیلوژنتیکی.

۱- مقدمه

در جهان بیش از ۵۰ ویروس و چهار پروتئید که آلوده‌کننده شماری از اعضای تیره کدوئیان هستند، گزارش شده است. کمتر از نصف این ویروس‌ها بیمارگرهای رایج کدوئیان و به لحاظ اقتصادی مهم می‌باشند [۱].

ویروس‌های جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* از ویروس‌های اصلی آلوده کننده کدوئیان محسوب می‌شوند [۲،۳]. گونه‌های مهم آلوده کننده کدوئیان از جنس پوتی ویروس، ویروس موزائیک هندوانه (*Watermelon mosaic virus, WMV*)، ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV*) و ویروس لکه حلقوی پاپایا (*Papaya ring spot virus-W, PRSV-W*) می‌باشند [۲،۴]. ویروس موزائیک هندوانه دارای ژنومی یک بخشی از نوع RNA تک لای مثبت به طول ۱۰۰۳۵ نوکلوتید است که توسط یک پروتئین پوششی (CP) که وزن مولکولی آن ۳۴ کیلوداتون است، در برگرفته شده است. این ژنوم حاوی یک چهارچوب باز خواندنی (ORF) واحد است که کد کننده یک پلی پروتئین با ۳۲۱۷ اسید آمینه می‌باشد. این پلی پروتئین به کمک آنزیم‌های پروتئاز که توسط ویروس کد می‌شود به ۱۰ پروتئین کوچک به نام‌های P1، HC، P3، CI، VPg، Nib، Nia، CP و دو پروتئین 6K شکسته می‌شود و هر یک از پروتئین‌های کوچک نقش خاصی را ایفا می‌کنند [۵]. پیکره ویروس 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 [۶]. ویروس موزائیک هندوانه دامنه میزبانی وسیعتری در مقایسه با سایر پوتی ویروس‌ها دارد و بیش از ۱۷۰ گونه گیاهی متعلق به ۲۷ تیره گیاهی را آلوده می‌کند [۷].

توالی‌های نوکلوتیدی ویروس‌ها اطلاعات با ارزش و دقیقی درباره‌ی میزبان روابط بین ویروس‌ها و روابط تکاملی آنها و سنجش تغییرات ژنتیکی در جمعیت یک ویروس در اختیار ما می‌گذارد. تعداد زیادی از برنامه‌های کامپیوتری برای محاسبه‌ی درجات مشابهت یا مغایرت ویروس‌های مرتبط یا نژادهای آنها بوجود آمده‌اند که با کنار هم قرار گرفتن توالی‌های نوکلوتیدی به مقایسه‌ی آنها می‌پردازند و اطلاعات جامع و قابل اطمینانی در مورد جدایه‌های ویروس و روابط فیلوژنتیکی آنها ارائه می‌دهند [۸،۹]. تنوع ژنتیکی پدیده‌ای ضروری در جمعیت ویروس می‌باشد که به یک ویروس امکان می‌دهد در طول تغییر شرایط محیط زیست و تحمل فشار انتخابی تکامل حاصل نماید [۱۰].

اولین گزارش از تنوع مولکولی WMV در ایران مربوط است به کار دسیبیز و همکاران در سال ۲۰۰۷ که تنوع مولکولی ۴۲ جدایه از نقاط مختلف دنیا از جمله ایران (۸ جدایه) را بر اساس یک قطعه ۲۱۸ نوکلوتیدی از ناحیه ۵' ژن CP بررسی کردند [۱۱]. به دنبال آن شریفی و همکاران در سال ۲۰۰۸، ۱۸ جدایه از مناطق مرکزی و جنوبی ایران براساس ژن CP آنالیز کردند [۱۲]. در سال ۲۰۰۸ جدایه ترادف کامل IR02-01 توسط دسیبیز و لکوک تعیین گردید [۱۳]. مرادی و همکاران (۱۳۹۰) دو جدایه از استان خراسان، قربانی و همکاران (۱۳۹۳) یک جدایه از ارومیه و معصومی و همکاران (۱۳۹۶) دو جدایه از استان یزد را براساس ترادف ژن CP مورد بررسی قرار دادند [۱۴،۱۵،۱۶]. در این تحقیق جهت تعیین جایگاه فیلوژنتیکی و تنوع بیولوژیکی جدایه‌های WMV نمونه برداری از برخی مزارع جالیزی مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی و غربی صورت گرفت. سپس با توجه به گیاه میزبان و منطقه نمونه برداری و علایم بیماری، محصول RT-PCR مربوط به ژن پروتئین پوششی سه جدایه‌ی T1Ahr-CP، T5Ngd-CP و Tab32-CP به طور مستقیم از دو جهت تعیین ترادف و از لحاظ فیلوژنتیکی با سایر جدایه‌های دنیا مقایسه شدند. توالی نوکلوتیدی آنها در GenBank به ترتیب با شماره‌های دسترسی MH711915، MH711919 و MH711921 به ثبت رسیده است. نمود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه برداری

از اردیبهشت تا مرداد ماه سال ۱۳۹۶، از برگ‌های کدو مسمایی (*Cucurbita pepo*)، کدو حلوائی (*C. moschata*)، کدو تنبل (*C. maxima*)، طالبی (*Cucumis melon*)، خیار (*C. Sativus*)، خربزه (*Cucumis melo*) و هندوانه (*Citrullus lanatus*) با علایم موزائیک، تاولی شدن، بدشکلی، بند کفشی شدن برگ‌ها و کوتولگی بوته از مزارع جالیز اشنویه، اهر، باسمنج،

بناب، پیرانشهر، تبریز، دیزج خان، سعیدآباد، شندآباد، عجب شیر، مرند، مهاباد، میاندوآب، نقده نمونه برداری انجام شد. نمونه‌های مشکوک به آلودگی با WMV در کیسه‌های پلاستیکی جداگانه و در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲-۲- خالص سازی بیولوژیکی و تکثیر WMV

جهت جداسازی بیولوژیکی ویروس، ابتدا بر روی گیاه سلمه تره (*Chenopodium quinoa*) مایه کوبی و لکه‌های کلروتیک ایجاد شده جدا و بعد از تهیه‌ی عصاره‌ی آنها، بر روی گیاه آزمون کدو مسمایی (*Cucurbita pepo*) به منظور تکثیر و نگهداری جدایه‌ها، مایه کوبی شد.

۳-۲- واکنش نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

پس از تکثیر جدایه‌های ویروس بر روی گیاه میزبان تکثیری، از این گیاهان به عنوان منبع ویروس استفاده شد. RNA کل از برگ‌ها مطابق روش روحانی و همکاران (۱۹۹۳) استخراج گردید. جهت سنتز cDNA در واکنش RT از آغازگر معکوس (5' ATTCACGTCCCTTGCAGTGTG 3') مبتنی بر ترادف نوکلوتیدی بخشی از ژن رمزکننده‌ی پروتئین پوششی استفاده شد. جهت انجام واکنش نسخه برداری معکوس (RT) و ساخت DNA مکمل، ۳ میکرولیتر RNA استخراج شده به همراه ۱ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل و ۱ میکرولیتر از محلول آغازگر معکوس ۱۰ pmol/μl در میکروتیوپ مخلوط شده و آنگاه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس جهت اجتناب از تشکیل مجدد ساختارهای ثانویه، میکروتیوپ‌ها سریعاً بر روی یخ منتقل شدند و ۵ میکرولیتر Hyperscript RT Master mix شرکت پیشگام تهران، به عنوان مواد واکنش مرحله دوم به میکروتیوپ‌ها اضافه گردید.

بعد از تهیه cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی WMV مبتنی بر بخشی از منطقه ژنومی پروتئین پوششی، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل آغازگرهای مستقیم (5' GAATCAGTGTCTCTGCAATCAGG 3') و معکوس (5' ATTCACGTCCCTTGCAGTGTG 3') مبتنی بر ترادف نوکلوتیدی ژن رمزکننده‌ی پروتئین پوششی به ترتیب واقع در ناحیه ۸۹۲۶-۸۹۴۸ و ۹۷۲۷-۹۷۴۷ ژنوم کامل به شماره‌درس EU660584 است. بدین منظور مقدار ۲/۵ میکرولیتر از cDNA ساخته‌شده همراه با ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس (۱۰ pmol)، ۷ میکرولیتر آب خالص دیونیزه و ۱۲/۵ میکرولیتر PCR master Mix Red (MgCl₂:1.5 mM-(2X) به تیوپ‌ها اضافه شد. چرخه دمایی PCR عبارت است از یک چرخه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه (جهت واسرشتگی اولیه)، ۳۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه (جهت واسرشت رشته‌های سنتز شده)، ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه (جهت اتصال آغازگرها)، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه (جهت سنتز دی‌ان‌ای) و در انتها یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه (جهت کامل شدن رشته‌های ناقص) انجام گرفت. در نهایت محصولات PCR بدست آمده، بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

۴-۲- تعیین توالی بخشی از ژن پروتئین پوششی جدایه ایرانی WMV و تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تایید کامل وجود جدایه‌های این ویروس و همچنین بررسی جایگاه فیلوژنتیکی آنها در مقایسه با جدایه‌های دنیا، محصول PCR از دو جدایه مربوط به استان آذربایجان شرقی و یک جدایه مربوط به استان آذربایجان غربی جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام تهران ارسال شد و با دستگاه Automatic Sequencer 3730XL تعیین توالی شدند. از ترادف‌های حاصل پس از انجام تصحیحات، حذف توالی‌های آغازگرها، قطعه‌ای به اندازه ۷۸۰ نوکلوتید از بخش عمده ژن پروتئین پوششی WMV به دست آمد. این ترادف‌ها همراه با ۲۲ ترادف انتخاب شده از GenBank (جدول ۱) مقایسه شدند. قطعات ۷۸۰ جفت بازی مربوط به ژن

پروتئین پوششی توسط نرم افزار Mega7 برنامه Clustal W2 هم ردیف سازی شدند. به منظور بررسی رابطه ی فیلوژنتیکی جدایه های مورد مطالعه، درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor-Joining توسط نرم افزار Mega7 با حذف تمامی جایگاه های دارای خطا، فواصل و براساس ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap) ترسیم شد.

جدول ۱- مشخصات جدایه های WMV مورد مطالعه در این تحقیق و جدایه های موجود در بانک ژن جهت مقایسه و مطالعات فیلوژنتیکی

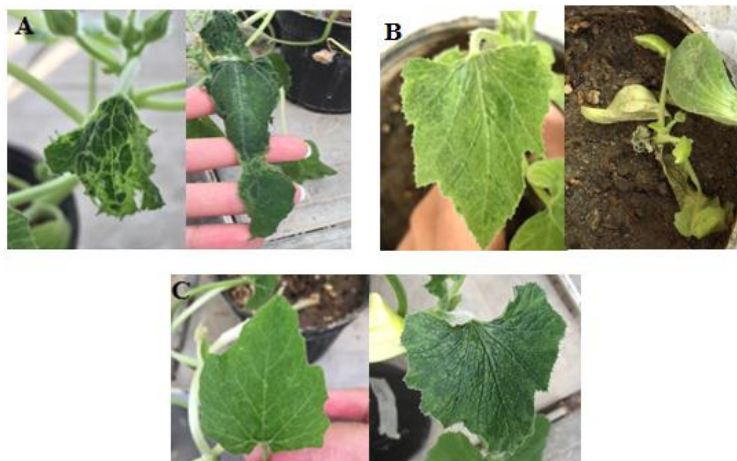
براساس ترادف نوکلوتیدی ژن پروتئین پوششی

شماره دسترسی	محل گزارش	جدایه / نژاد	میزبان
AJ579491.1	Spain	BAR95.1	Cucumis melo
AJ579524.1	Spain	MAL99.5	Cucumis melo
KU246036.1	USA	TX29	Watermelon
EU667640.1	Iran/Esfahan	ESF.ES.2	Cucumis melon
MH711915.1	Iran/Ahar	T1Ahr-CP	Cucumis sativus
MH711919.1	Iran/Naghadah	T5Ngd-CP	Cucurbita pepo
MH711921.1	Iran/Tabriz	Tab32-CP	Cucurbita pepo
Eu667627.1	Iran/Kerman	KER.II.1	Colocynth
EU667638.1	Iran/Yazd	YAZ.MO.1	Cucumis sativus
JX079685.1	China	WMV-ShanXi	Watermelon
AB353119.1	Japan	596-6	Pumpkin
AY437609.1	France	WMV-Fr	-
EU660588.1	France	C06-666	-
EU660581.1	France	FMF00-LL1	-
EU660583.1	France	FMF03-141	-
JF273466.1	France	A08-170	Zucchini
JF273465.1	France	A08-160	Zucchini
EU660586.1	France	FBR04-37	-
KT992070.1	Sout Korea	Buan4-1_2013	Panax ginseng
KU240108.1	Sout Korea	Yeongiu7-3_2013	-
KT992090.1	Sout Korea	Yeongjus-2012	-
KM597071.1	India	RKG2	Watermelon

۳- نتایج

۳-۱- علایم بیولوژیکی سه جدایه WMV

علایم ایجاد شده توسط دو جدایه T1Ahr-CP و Tab32-CP از WMV بر روی کدو مسمایی (*C. pepo*) با علایم جدایه T5Ngd-CP متفاوت است. به طوری که جدایه T1Ahr-CP بر روی این میزبان علایمی از قبیل موزائیک، تاول‌های برجسته سبز تیره، بدشکلی و باریک شدن برگ و جدایه Tab32-CP علایم موزائیک خیلی خفیف و تاول‌های برجسته سبز تیره را ایجاد کردند. در مقابل جدایه T5Ngd-CP علایم کوتولگی بوته، موزائیک خفیف و مرگ سریع بوته سبب گردید (شکل ۱).

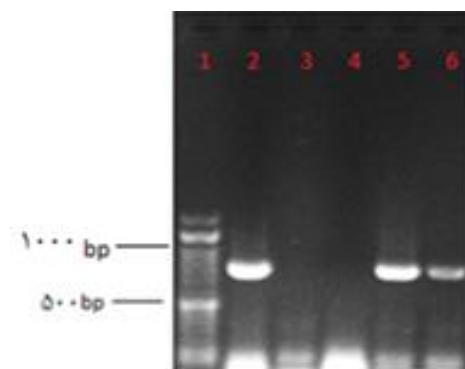


شکل ۱- علایم ایجاد شده بر روی *Cucurbita pepo* مایه‌زنی شده با سه جدایه مورد بررسی. A: علایم تغییر شکل، باریک شدن، موزائیک و تاول‌های برجسته سبز تیره توسط جدایه T1Ahr-CP. B: علایم موزائیک خفیف، کوتولگی و مرگ سریع بوته توسط جدایه T5Ngd-CP. C: علایم موزائیک خیلی خفیف و تاول‌های برجسته سبز تیره توسط جدایه Tab32-CP

۳-۲- شناسایی سه جدایه WMV با استفاده از آزمون RT-PCR

از بین ۳۰۵ نمونه‌ی جمع‌آوری شده ۵۴ نمونه بر مبنای گیاه میزبان، محل نمونه‌برداری و تنوع علایم با آغاز گره‌های اختصاصی RT-PCR شدند که از ۱۴ نمونه آلوده به WMV قطعاتی به طول ۸۰۰ جفت باز مربوط به پروتئین پوششی این ویروس تکثیر شد (شکل ۲) (جدول ۲).

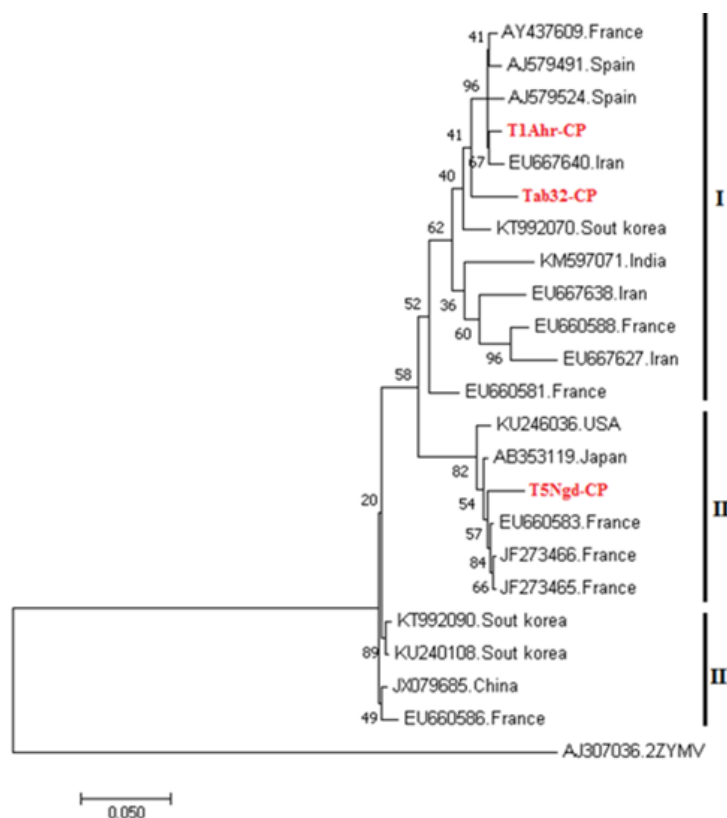
بر اساس درخت فیلوژنتیکی رسم شده، جدایه‌های WMV بر اساس پروتئین پوششی در سه گروه واقع گردیدند (شکل ۳). گروه I شامل سه جدایه از فرانسه، یک جدایه از کره جنوبی، یک جدایه از هند، دو جدایه از اسپانیا، سه جدایه از ایران (اصفهان، یزد، کرمان) و دو جدایه مورد بررسی در این تحقیق T1Ahr-CP و Tab32-CP بود. گروه II شامل یک جدایه از ایالات متحده آمریکا، سه جدایه از فرانسه، یک جدایه از ژاپن و جدایه T5Ngd-CP مورد بررسی در این تحقیق بود. گروه III شامل دو جدایه از کره جنوبی، یک جدایه از فرانسه و یک جدایه از چین هست. یک جدایه از ZYMV با شماره دسترسی AJ307036.2 به عنوان فرد برون گروه در نظر گرفته شد.



شکل ۲- الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصد قطعات DNA حاصل از RT-PCR با آغازگرهای منطبق بر بخشی از منطقه رمزکننده پروتئین پوششی WMV. چاهک ۱: 500bp DNA Ladder، ۲: جدایه T1Ahr-CP، ۳: جدایه T5Ngd-CP، ۴: جدایه Tab32-CP. قطعاتی به اندازه ۸۰۰ جفت باز تکثیر شده است.

جدول ۲- تعداد و محل نمونه برداری گیاهان مختلف جالیزی و میزان آلودگی آنها به WMV در مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی و غربی در سال زراعی ۱۳۹۶

تعداد نمونه آلوده	تعداد نمونه مورد آزمایش توسط RT-PCR	محل نمونه برداری
۰	۲	اشنویه
۲	۴	اهر
۲	۳	باسمنج
۰	۲	بناب
۰	۳	پیرانشهر
۲	۴	تبریز
۰	۲	دیزج خان
۰	۲	سعیدآباد
۱	۴	شندآباد
۱	۵	عجب شیر
۲	۸	مرند
۲	۵	مهاباد
۱	۴	میاندوآب
۱	۶	نقده



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی براساس ترادف نوکلوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های WMV مربوط به استان آذربایجان شرقی و غربی و جدایه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Mega7 و روش neighbor joining مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ ذکر شده‌است. اعداد بالای شاخه‌ها نتایج اعتبار سنجی (Bootstrap) را براساس ۱۰۰۰ تکرار نشان می‌دهند. میله مقیاس در پایین سمت چپ نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی است. جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق به رنگ قرمز نوشته شده‌اند.

جدول ۳- میزان تشابهات توالی نوکلوتیدی منطبق بر بخش عمده پروتئین پوششی جدایه‌های WMV مورد بررسی در این تحقیق

	T1Ahr-CP				T5Ngd-CP				Tab-CP			
	Score	Query cover	E Value	Ident	Score	Query cover	E Value	Ident	Score	Query cover	E Value	Ident
T1Ahr-CP	-	-	-	-	1144	99%	0.0	93%	1288	99%	0.0	97%
T5Ngd-CP	1144	99%	0.0	93%	-	-	-	-	1175	100%	0.0	94%
Tab32-CP	1288	99%	0.0	97%	1175	100%	0.0	94%	-	-	-	-

۴- بحث

کدوئیان یکی از محصولات مهم و عمده کشت شده در ایران به ویژه در شمال غرب کشور است. نیاز به ذکر است که بیماری‌های ویروسی از مشکلات جدی در کدوئیان شمال غرب ایران می‌باشد [۱۷]. ویروس‌های خانواده پوتی‌ویریده و جنس پوتی‌ویروس بزرگترین گروه ویروس گیاهی هستند و دارای بیشترین اهمیت اقتصادی می‌باشند [۱۸]. WMV جزء اولین پوتی‌ویروس‌های کشف شده‌است که کدوئیان را آلوده می‌کند [۱۹].

نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف در این تحقیق که آلودگی آنها به WMV در مرحله بعدی با آزمون RT-PCR محرز شد، دارای علائم متفاوتی بودند و در هر منطقه بعضی از این علائم غالبیت بیشتری داشتند که احتمالاً واریانت خاصی از ویروس در آن منطقه غالب بود. البته علائم تاول برجسته سبزه‌تیره که می‌توانست حاصل از WMV باشد در اغلب نمونه‌ها نمایان بود. در مزارع

آلودگی محصول کدو مسمایی بیشتر از سایر محصولات کدوئیان مشاهده شد که این امر می تواند ناشی از پایین بودن مقاومت نسبی ارقام استفاده شده کدو مسمایی نسبت به سایر محصولات کدوئیان در این استان ها باشد. در این مطالعه از گیاهان محک نیز برای ردیابی WMV استفاده شد. در رابطه با استفاده از گیاهان محک هر چند که اتکا به این روش در ردیابی ویروس ها به دلیل متغیر بودن واکنش های گیاهی تحت شرایط محیطی، قابل اعتماد نمی باشد ولی در مواردی نتایج قابل توجهی با استفاده از گیاهان محک در شناسایی اولیه عوامل ویروسی و بررسی تفاوت علائم ناشی از آنها حاصل می شود [۲۰]. همچنین از روش حساس و دقیق RT-PCR برای ردیابی و شناسایی مولکولی WMV استفاده شد. قطعه ۸۰۰ جفت باز از بخش عمده ژن پروتئین پوششی WMV در PCR با دمای اتصال 50°C از ۱۴ نمونه تکثیر یافت. ۲۶ درصد از نمونه های RT-PCR شده آلوده به WMV بودند. قطعه DNA تولید شده با نتایج حاصل از سایر محققین که از این جفت آغازگر برای تشخیص WMV استفاده کرده بودند نیز مطابقت داشت [۲۱،۲۲،۲۳،۲۴].

تحقیق درباره تنوع ژنتیکی ویروس و نقشه پراکندگی جمعیت ویروس کمک به حل مشکلات ناشی از آن و نیز کمک به فهم اپیدمیولوژی پاتوژن می کند [۲۵]. در این تحقیق قسمتی از توالی ژنوم جدایه های WMV تعیین شده و موقعیت فیلوژنتیکی جدایه ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. علی رغم نظر برخی محققین مبنی بر استفاده از ترادف نوکلوتیدی ژن CI در تعیین روابط فیلوژنتیک بین جدایه های پوتی ویروس ها، هنوز ناحیه CP-UTR در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک و تعیین روابط بین جدایه ها بیشترین کاربرد را دارد [۲۶]. تجزیه و تحلیل توالی ناحیه Nib-CP تغییرات جالب توجهی را WMV نشان داده است. مقایسه ترادف های بدست آمده در این تحقیق که هر یک شامل ۷۸۰ نوکلوتید از بخش عمده ژن پروتئین پوششی، با ترادف های موجود در بانک جهانی ژن نشان داد جدایه های WMV بر اساس پروتئین پوششی در سه گروه واقع گردیدند (شکل ۳). جدایه T1Ahr-CP از اهر و جدایه Tab32-CP از تبریز در کنار جدایه های اروپا و جدایه های ردیابی شده قبلی ایرانی (اصفهان، کرمان و یزد)، در گروه I قرار گرفتند. البته جدایه T1Ahr-CP و 32.Tab-CP در یک زیرخوشه شامل جدایه های اروپایی و اصفهانی قرار گرفتند. گروه I شامل طیف وسیعی از جدایه های اروپا و خاورمیانه است و اغلب جدایه های ایرانی ثبت شده در بانک ژن نیز در همین گروه قرار گرفته اند [۱۴]. جدایه T5Ngd-CP در گروه II در کنار جدایه های ردیابی شده از قسمت های مختلف جهان قرار گرفت. تشابه بیشتر جدایه T5Ngd-CP به جدایه های ردیابی شده از سایر نقاط جهان و قرارگیری آن در موقعیت دورتر نسبت به دو جدایه قبلی می تواند نشان دهنده پراکنش ژنوتیپ های مختلف این ویروس در این منطقه باشد. جدایه T5Ngd-CP از منطقه ای جمع آوری شده بود که از لحاظ جغرافیایی دورتر از بقیه بود. علائم این جدایه نیز متفاوت از بقیه بود و مرگ سریع بوته ها را باعث می شد. بنابراین می توان گفت جدایه هایی که از یک محل یا محل های نزدیک جمع آوری شده بودند خصوصیات مشابه دارند. چرا که خصوصیات بیولوژیکی دو جدایه T1Ahr-CP و Tab-CP نیز مشابه هم بود. در مطالعه دینامیک و ژنتیک جمعیت ویروس های گیاهی، وقتی چندین نژاد یک ویروس در یک منطقه حضور دارند و علائم متفاوتی ایجاد می کنند عموماً اشاره می شود که نژادهایی با علائم خفیف تر در تکامل جدیدتر بوجود آمده اند و به تازگی در منطقه جغرافیایی جدید استقرار یافته اند [۲۷]. اگرچه درخت فیلوژنتیکی در بعضی از موارد با توزیع جغرافیایی هم خوانی دارد ولی قرابت فیلوژنتیکی یا هم گروه شدن بعضی از جدایه ها از مناطق مختلف جهان با یکدیگر، همانطور که در بعضی از شاخه ها دیده می شود انطباق کاملی با قرابت جغرافیایی ندارد [۲۸]. این توزیع نشان می دهد که انتشار جهانی و گسترده WMV نمی تواند تنها به وسیله ناقلین طبیعی یعنی شته ها صورت گیرد و این مسئله احتمال دخالت انسان و به بیان دیگر انتشار با بذر را تقویت می کند [۱۵].

تغییرات ژن پروتئین پوششی جدایه های ایرانی مورد مطالعه نسبت به هم ۹۷-۹۳ درصد بود (جدول ۳). تغییرات ژن CP به دلیل اینکه این ژن در انتقال با ناقل نیز نقش دارد دور از انتظار نیست.

نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر آن است که WMV دارای تنوع در علایم و همچنین ژنوتیپ می باشد و جدایه های ردیابی شده در این تحقیق از لحاظ دو منطقه مختلف ژنومی موقعیت مختلفی را از لحاظ تقسیم بندی فیلوژنتیکی نشان دادند که این خود می تواند نشان دهنده وقوع نوترکیبی در جمعیت این ویروس باشد. البته با بررسی توالی های بیشتر این ویروس، این موضوع قابل بحث و بررسی کامل می باشد.

۵- منابع

1. Kucharek, T., and D. Purcifull. 2001. Aphid-Transmitted Viruses of Cucurbits in Florida. Plant Pathology Department, University of Florida, Gainesville. 454p.
2. Zitter, T.A., D.L. Hopkins, and C.E. Thomas. 1996. Compendium of Cucurbit Diseases. American Phytopathological Society (APS) press, St. Paul, Minnesota, USA, 44 p.
3. Lecoq, H., C. Desbiez, and B. Delecolle. 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. J. Gen. Virol. 81: 2289-2293.
4. Abou-Jawadah, Y., H. Sobh, S. EL-Zammar, A. Fayyad, and H. Lecoq. 2000. Incidence and management of Virus disease of Cucurbits in Lebanon. Crop Protection. 19: 217-224.
5. Desbiez, C., and H. Lecoq. 2004. The nucleotide sequence of Watermelon mosaic virus (WMV, Potyvirus) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 5_ part of the genome. Arch. Virol. 149(8): 1619-1632.
6. Van Regenmortel, M.H.V. 1960. Zone electrophoresis and electron microscopy of a Watermelon mosaic virus from Sout Africa. Virol. 12:27-130.
7. Shukla, D.D., C.W. Ward, and A.A. Brunt. 1994. Potyviruses: Biology, Molecular Structure, and Taxonomy. CAB Int., walling-ford, England.
8. Roossinck, M.J., 2001. Cucumber mosaic virus as a model for RNA virus evolution. Mol. Plant Pathol. 2(2): 59-63.
9. Sokhandan Bashir, N., M. Rasaei Kalhor. 2004. Serological subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates from Basmenj and Shabestar districts and detection by RT-PCR. Danesh Keshavarzi (Agricultural Science) 15: 103-114.
10. Schneider, W.L., M.J. Roossinck. 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. J. Virol. 78(14): 6566-6571.
11. Desbiez, C., C. Costa, C. Wipf-Scheibel, M. Girard, and H. Lecoq. 2007. Serological and molecular variability of Watermelon mosaic virus (genus Potyvirus). Arch. Virol. 157: 775-781.
12. Sharifi, M., H. Massumi, J. Heydarnejad, A. Hosseini Pour, M. Shaabani, and H. Rahimian. 2008. Analysis of the biological and molecular variability of Watermelon mosaic virus isolates from Iran. Virus Genes. 37(3): 304-313.
13. Desbiez, C., and H. Lecoq. 2004. The nucleotide sequence of Watermelon mosaic virus (WMV, Potyvirus) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 5_ part of the genome. Arch. Virol. 149(8): 1619-1632.
۱۴. مرادی، ز.، ب. جعفرپور و م.ع. سبک خیز. ۱۳۹۰. تعیین ترادف نوکلئوتیدی و بررسی علایم دو جدایه جدید ویروس موزائیک هندوانه از استانهای خراسان رضوی و شمالی. نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشور). جلد ۲۵. شماره ۴. صفحه: ۴۱۶-۴۰۷.
۱۵. قربانی، ش.، م. راستگو و م. عبداللهی. تعیین برخی از خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه ارومیه ویروس موزائیک هندوانه. ۱۳۹۳. نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشور). جلد ۲۸. شماره ۴. صفحه: ۴۴۴-۴۳۷.

۱۶. معصومی، ح.، ف. محمدی پاقلعه، خ. سالاری، ج. حیدرنژاد و ا. حسینی پور. ۱۳۹۶. تعیین ترادف ژن پروتئین پوششی دو جدایه ایرانی ویروس موزائیک هندوانه و بررسی جایگاه فیلوژنتیکی آنها. مجله پژوهش‌های کاربردی در گیاه پزشکی. جلد ۶. شماره ۱. صفحه: ۲۷-۴۰.
17. Sokhandan Bashir, N., M. Rasaei kalhor and S. Nourinejhad Zarghani. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes* 32: 277-288.
18. Gray, D.F., and S.C. Taylor. 1998. *Plant Virology protocols*. Humana press Inc. P: 151-154.
19. Webb, R.E., and H.A. Scott. 1965. Isolation and identification of Watermelon mosaic virus 1 and 2. *Phytopathol.* 55:895-900.
20. Wahuny, W. S., R.G. Dietzgen, K. Hanada, and R.H.B. Francki. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathol.* 41: 282-297.
21. Massumi, H., M. Shabaniyan, J. Heydarnejad, A. Hosseini Pour. and H. Rahimian. 2011. Host range and phylogenetic analysis of Iranian isolates of zucchini yellow mosaic virus. *J. Plant Pathol.* 93(1): 187-193.
22. Glasa, M., K. Bananej, L. Predajňa, and A. Vahdat. 2011. Genetic diversity of Watermelon mosaic virus in Slovakia and Iran shows distinct pattern. *Plant Dis.* 95:38-42.
23. Shabaniyan, M., H. Masomi, A. Hoseinipour, J. Heidarnejad, and Z. Azami. 2007. Identification and distribution of cucumber-infecting viruses in the jiroft greenhouses and partial characterization of Zucchini yellow mosaic virus collected from this region. *J. sci. and Technol. of Agric and Natur. Resour.* 11: 393 – 406.
24. Wisler, G.C., D.E. Purcifull, and E. Hiebert. 1995. Characterization of the P1 protein and coding region of the Zucchini yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 76: 37-45.
25. Desbiez, C., B. Joannon, C. Wipf-Scheibel, C. Chandeysson, and H. Lecoq. 2011. Recombination in natural populations of Watermelon mosaic virus: new agronomic threat or damp squib. *J. Gen. Virol.* 92(8): 1939-1948.
26. Shoeibi, S., M. Masumi, S. Nasrollahnezhad, S. Heydari, K. Izadpanah, and A. Ahmadikhah. 2009. Sequencing of six Iranian Isolates of Watermelon Mosaic Virus and phylogenetic comparison of Iranian isolates with other isolates of the world. *Iran. J. Plant Path.* 45: 39-42.
27. Purcifull, D.E., and E. Hiebert. 1979. Serological distinction of Watermelon mosaic virus isolates. *Phytopathol.* 69: 112-116.
۲۸. شعبی، س.، م. معصومی، س. نصرالله نژاد، س. حیدری، ک. ایزدپناه و ا. احمدی خواه. ۱۳۸۸. تعیین ترادف شش جدایه ایرانی ویروس موزائیک هندوانه و مقایسه فیلوژنتیکی جدایه‌های ایران با سایر جدایه‌های دنیا. مجله بیاریهای گیاهی، جلد ۴۵. شماره ۲. صفحه: ۱۵۴-۱۴۳.

Molecular Identification of Three Watermelon Mosaic Virus Isolates from Cucurbits of East Azarbaijan and West Provincence

Neda Panahborhani^{1*}, Sevil Nematollahi²

1. Former MSC Student, Department of Plant Protection Faculty of Agriculture, Islamic Azad University of Iran, Tabriz branch.

2. Rofegari, Department of Plant Protection Faculty of Agriculture, Islamic Azad University of Iran, Tabriz branch.

*Borhanneda2016@gmail.com

Abstract

Watermelon mosaic virus (WMV) is member of the genus Potyvirus in the family Potyviridae. To stady determine distribution and phylogenetic analysis this virus in cucurbits various fields of East Azarbaijan and West province, 305 plant samples suspected to be infected were collected from thriteen regions. Inoculation were done on the diagnostic hosts and propagation hosts cucurbita pepo. Two weeks after inoculation, WMV isolates caused various symptoms including leaf deformation, thin and torn with green blistering and mosaic on the leaf of Cucurbita pepo. Viral RNA was extracted from infected plant according to Rouhani et al's protocol and cDNA was prepared. RT-PCR reaction was performed on 54 samples selected as representative of the samples, in terms of the diversity of symptoms and the region. Using specific primers, 800bp fragment was amplified of coat protein gene area of WMV. PCR products of three WMV isolates was directly sequenced based on the variety of symptoms and the region and was compared containing 780 nt from coat protein gene, along with 19 sequences selected from GenBank. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of coat protein gene placed these isolates in three groups where T1.Ahr and 32.Tab isolates of East Azarbaijan were placed next to some isolates from Isfahan, Kerman, Yazd and some European countries into group I. of course, T1.Ahr and 32.Tab isolates and ESF.ES.2 isolates from Isfahan and isolates from Europe were clustered into group I. T5.Nagd isolate of West Azarbaijan and isolates traced from different parts of the world were classified in group II.

Key words: WMV, Biological, RT-PCR, Coat protein, Phylogenetical.