

## همسانه‌سازی، تنوع ژنتیکی ژن رمزکننده پروتئین پوششی و تعیین زیرگروه‌های نژادی جدایه‌های ویروس موزائیک خیار در مزارع طالبی شهرستان ورامین

مجید جعفری<sup>۱\*</sup> - سمیه قلی زاده روشنی<sup>۲</sup> - شاهین نوری نژاد زرقانی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۰۴

### چکیده

منطقه‌ی ورامین واقع در جنوب تهران یکی از مراکز مهم تولید خربزه و طالبی است. اخیراً تغییر در جمعیت ویروس‌های کدوئیان گزارش شده است. از این رو، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ویروس موزائیک خیار و بررسی تغییر احتمالی جمعیت این ویروس در مزارع طالبی مناطق ورامین، پیشوا و پاکدشت، ۱۳۲ نمونه‌ی برگ‌ی طی سالهای ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ با علائم مشکوک به آلودگی ویروسی شامل موزائیک، پیسک و بدشکلی برگ و نیز کوتولگی گیاه جمع‌آوری شد. آلودگی ۵۹ نمونه از کل نمونه‌ها (۴۴/۶۹ درصد) به CMV توسط آزمون الایزا تعیین شد که نشان دهنده میزان آلودگی بالای گیاهان طالبی نمونه‌برداری شده از مزارع مورد مطالعه است. از نمونه‌های الایزا مثبت، آر‌ان‌ای کل استخراج و ژن پروتئین پوششی به همراه بخشی‌هایی از اطراف آن طی RT-PCR تکثیر شد. برای تعیین زیرگروه‌های جدایه‌های جمع‌آوری شده، محصولات RT-PCR با استفاده از آنزیم *MspI* (*HpaII*) برش داده شدند که در اثر آن قطعاتی به اندازه‌های ۳۳۵ و ۵۳۷ جفت باز تولید شدند. بر این اساس جدایه‌های جمع‌آوری شده در این مطالعه در گروه I قرار گرفتند. ژن CP در چهار جدایه که بر اساس فاصله مکانی انتخاب شده بودند به حامل pTG19-T متصل و در میزبان *Escherichia coli* همسانه‌سازی شد. نتایج تعیین توالی، وجود جایگاه برشی آنزیم *MspI* را در موقعیت یاد شده تأیید کرد. چهار جدایه‌ی تعیین توالی شده در این پژوهش، ۹۹-۱۰۰ درصد در سطح اسیدهای نوکلئیک و همچنین ۱۰۰ درصد در سطح آمینواسیدی با یکدیگر تشابه داشتند. میزان تشابه این جدایه‌ها با جدایه‌های از قبل گزارش شده از ایران به ترتیب ۹۳-۱۰۰ و ۹۸-۱۰۰ درصد در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی دیده شد. نتایج فیلوژنی در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی نیز نتایج RT-PCR-RFLP را تأیید نمود و مشخص شد که جدایه‌های CMV در مزارع طالبی ورامین متعلق به زیرگروه IA و جدایه‌هایی با شدت بیماری‌زایی شدید هستند.

واژه‌های کلیدی: طالبی، فیلوژنی، ورامین، ویروس موزائیک خیار، RT-PCR-RFLP

### مقدمه

و II تقسیم بندی می‌شوند. از لحاظ توالی نوکلئوتیدی اعضای یک زیرگروه تشابه بالایی دارند ولی تشابه نوکلئوتیدی بین جدایه‌های متعلق به دو زیرگروه ۷۵-۷۰ درصد است بطوریکه برخی محققین معرفی دو گونه مستقل را پیشنهاد می‌کنند (۱۰). سویه‌های متعلق به زیرگروه I نیز بعدها بر اساس مقایسه نوکلئوتیدی در منطقه رمز نشده انتهای ۵' مربوط به RNA3 یا فیلوژنی مبتنی بر ژن پروتئین پوششی (CP) به دو زیرگروه IA و IB تقسیم شدند (۲۱). اعضای زیرگروه-های I و II از لحاظ توزیع در آب و هوای مختلف با هم فرق می‌کنند بطوریکه اعضای زیر گروه I در مناطق گرمسیری و اعضای زیرگروه II در مناطق سردسیری پراکنده هستند (۱۸). بررسی سویه‌های CMV با روش‌های مختلفی مانند سرولوژی (۲۶، ۲۷) مطالعات dsRNA (۱۷)، PCR-RFLP (۲۴، ۲۰) و ریزآرایه (۴) انجام شده است. روش RT-PCR-RFLP که یک روش سریع و ساده برای گروه‌بندی جدایه‌های CMV به دو زیرگروه I و II با استفاده از آنزیم‌های برشی *MluI* و *HpaII*، *EcoRI*، *BsuRI* (*HaeIII*) است (۲).

ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus, CMV*) به جنس *Cucumovirus* از خانواده *Bromoviridae* تعلق داشته (۱۰) و دارای دامنه میزبانی بسیار وسیع مشتمل بر بیش از ۱۰۰۰ گونه گیاهی از ۷۵ خانواده است (۱۶). بسیاری از جدایه‌های ویروس باعث ایجاد خسارت اقتصادی و علائم موزائیک در گیاهان میزبان می‌شوند. ویروس از طریق انتقال مکانیکی، از طریق شته‌های ناقل به روش ناپایا و نیز عصاره گیاهی در طبیعت انتقال می‌یابد (۱۱). این ویروس دارای سویه‌های مختلفی است. سویه‌های CMV بر اساس ویژگی-های بیولوژیکی، سرولوژیکی، فیزیکی و نیز مولکولی در دو زیرگروه I

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان  
\* نویسنده مسئول: (Email: majafari59@yahoo.com)  
۲ و ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و استادیار گروه حشره شناسی و بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران  
DOI: 10.22067/jpp.v33i2.72268

ژنتیکی در ژنوم ویروس‌ها می‌شوند (Worobey and Holmes, 1999). با توجه به اهمیت بالای کشت طالبی در شهرستان ورامین و نیز وجود گزارشی مبنی بر تغییر در جمعیت ویروس موزائیک زرد کدو (قلی زاده و همکاران، ۱۳۹۵)، به منظور بررسی وجود و همچنین تغییر در جمعیت CMV در مزارع این منطقه و همچنین بررسی میزان تغییرات جمعیت این ویروس نسبت به آخرین مطالعات انجام شده در مورد CMV در منطقه ورامین و حومه این مطالعه صورت گرفت. شناسایی مولکولی، بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین زیرگروه‌های این ویروس در مزارع طالبی ورامین و بررسی تغییرات جدایه‌های شایع در آن می‌تواند اطلاعات مفیدی در ارتباط با تحقیقات شناسایی ارقام طالبی مقاوم و یا گیاهان طالبی تراریخته مقاوم به این ویروس در آینده در اختیار پژوهشگران قرار دهد.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه و آزمون الیزا

مزارع خربزه و طالبی شهرستان‌های ورامین، پاکدشت، پیشوا و نیز مزارع و گلخانه‌های پردیس ابوریحان طی اردیبهشت‌ماه و خردادماه سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ مورد بازدید قرار گرفتند و نمونه‌های مشکوک به آلودگی به CMV از این مناطق جمع‌آوری شدند. به منظور شناسایی نمونه‌های آلوده به CMV از آزمون الیزا (DAS-ELISA) به روش کلارک و آدامز استفاده شد (۳). آنتی‌بادی‌های مورد استفاده (کد: AS-0929) از شرکت DSMZ آلمان تهیه شد.

### استخراج RNA، واکنش RT-PCR و همسانه‌سازی

#### محصولات RT-PCR

استخراج اران‌ای کل و انجام RT-PCR-RFLP به روش توصیف شده انجام شد (۲۵) و قبل از برش با آنزیم، محصولات RT-PCR با استفاده از کیت استخراج از ژل سیلیکا شرکت ترموساینترفیک کشور لیتوانی خالص‌سازی شدند. بخشی از این محصولات طبق روش پیشنهادی شرکت سیناژن به پلاسمید خطی pTG19-T الحاق شدند. تهیه سلول‌های مستعد *Escherichia coli* DH5، انتقال پلاسمید نوترکیب و استخراج پلاسمید طبق روش‌های معرفی شده توسط سمبوروک و همکاران انجام شد (۲۲). برای بررسی اندازه قطعه همسانه‌سازی شده، با توجه نقشه حامل، از آنزیم *Bam*HI استفاده شد.

### تعیین توالی نوکلئوتیدی و آنالیز داده‌ها

برای تأیید درستی دی‌ان‌ای‌های اتصال داده‌شده به حامل، پلاسمیدهای نوترکیب انتخابی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شدند. داده‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده از واکنش تعیین توالی

جدایه‌های متعلق به زیرگروه I در گیاهان پراکندگی بیشتری نسبت به جدایه‌های زیرگروه II دارند، به صورتی که در برخی موارد، ۸۰ درصد جدایه‌های ردیابی شده متعلق به زیرگروه I هستند و در این بین فراوانی زیرگروه IA نسبت به IB بیشتر است (۷). مطالعات نشان داده که جدایه‌های زیرگروه I اکثراً از آسیا منشأ گرفته‌اند که به آن‌ها جدایه‌های آسیایی نیز گفته می‌شود. بنابراین پیشنهاد شد که سویه‌های آسیایی در زیرگروه IB و دیگر سویه‌ها در زیرگروه IA قرار گیرند (۱۵). نتایج پژوهش‌های انجام شده به منظور تعیین جدایه‌های CMV در شمال غرب و یا غرب کشور نشان داده که هر دو زیرگروه I و II در شمال غرب کشور و زیرگروه I در غرب وجود دارند، اما جدایه‌های زیرگروه I از فراوانی بیشتری برخوردار بودند (۱۲ و ۲۵). نتایج بررسی جدایه‌ای از CMV از شیراز که عامل ایجاد موزائیک و رگرگ روشنی در تره تیزک (CMV-Ld) بود و همچنین جدایه‌ای از خیار (CMV-Cu) نشان دادند که جدایه CMV-Ld متعلق به زیرگروه II و CMV-Cu متعلق به زیرگروه I است (۱۹). از استان‌های شمال کشور نیز سویه‌های متعلق به زیرگروه I و II گزارش شده است (۱، ۵، ۹، ۱۳). در پژوهشی بر اساس مناطق ژنومی CP، MP و 2b روی جدایه‌های CMV که از گیاهان گوجه‌فرنگی و کدوئیان مناطق مختلف آذربایجان شرقی به دست آمده بودند، نشان داد که این جدایه‌ها بر اساس CP در زیرگروه IB و IA و بر اساس 2b در زیرگروه IA قرار می‌گیرند. نتایج به دست آمده نشانگر این مطلب بود که نوترکیبی عامل مهم در افتراق جدایه‌های ایرانی است درحالی‌که همه‌ی جدایه‌های ایرانی دارای یک جد مشترک هستند (۱۳). فرزادفر و همکاران، گوجه‌فرنگی‌های آلوده به CMV از مناطق میناب، استان هرمزگان، ورامین و استان تهران را بین سال‌های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۲ مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی در ناحیه‌ی ژنومی CP نشان داد که هر سه جدایه ورامین و جدایه‌های که قبلاً در شمال ایران مورد بررسی قرار گرفته بودند در زیرگروه IA، و جدایه‌های میناب در زیرگروه IB قرار گرفتند (۶). بررسی فیلوژنی ناحیه‌ی ژنومی CP جدایه‌های CMV از مزارع گوجه‌فرنگی استان‌های گیلان، خوزستان، اصفهان، تهران، خراسان رضوی در زیرگروه II و بقیه‌ی جدایه‌ها در زیرگروه I قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که جدایه‌های ایرانی، متعلق به زیرگروه I بیشترین ارتباط فیلوژنتیکی را به یکدیگر دارند این جدایه‌ها از نظر علائم در گیاه میزبان متمایز از جدایه‌های زیرگروه II و IB است (۱). از آنجا که ویروس‌های با ژنوم RNA dependent با استفاده از آنزیم RNA polymerase (RdRP) تکثیر می‌یابند و این آنزیم فاقد خاصیت تصحیح (proof reading) می‌باشد، لذا طی مراحل تکثیر ویروس، جایگزینی‌های تک نوکلئوتیدی در ژنوم آن رخ می‌دهد (Drake and Holland, 1999). بعلاوه نوترکیبی، بازآرایی (reassortment)، توزیع مجدد جهش‌های خنثی بین ژنوم‌های کاملاً یا نسبتاً نزدیک، مکانیسم‌های دیگری هستند که سبب ایجاد تنوع

توسط نرم‌افزار BioEdit مونتاژ و زیر هم چیده شدند. از نرم‌افزار BioEdit برای محاسبه‌ی میزان تشابه توالی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای رسم درخت‌های فیلوژنتیکی از نرم‌افزار Phylogeny Inference package (Phylip) version 3.65 استفاده شد. رس شماره‌های (Accession numbers) توالی‌های مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱- رس شماره‌ها، منشأ (کشور) و میزبان‌های جدایه‌های مختلف CMV موجود در پایگاه اطلاعات بانک ژن که در بررسی‌های فیلوژنتیکی این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است

Table 1- Accession numbers, sources (country) and hosts of different CMV isolates in NCBI that were used in this study

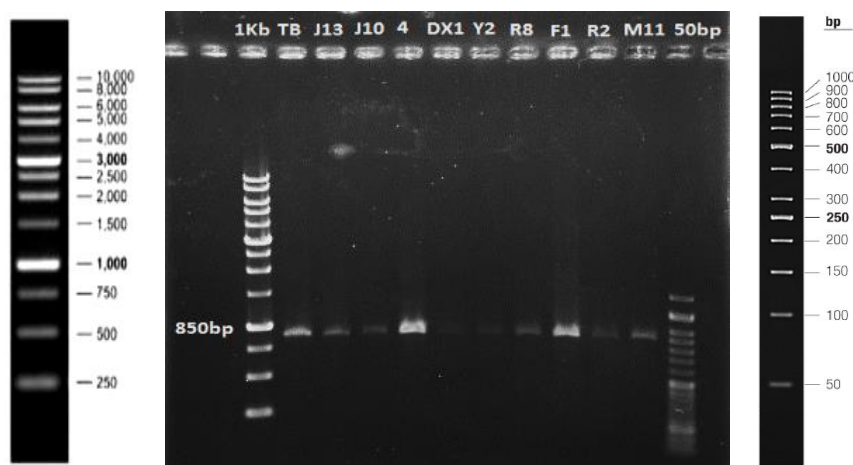
زیر گروه Sub group	سال Year	میزبان Host	کشور Country	رس شمار Accession number	جدایه یا سویه Isolate or Strain
IA	2005	<i>Cucurbita pepo</i>	Iran	DQ002881	EI2
IA	2013	<i>Cucumis sativus</i>	Iran	KF873615	Cues
IA	2005	<i>C. pepo</i>	Iran	DQ002879	DI3
IA	2005	<i>C. pepo</i>	Iran	DQ002883	FI3
IA	2012	<i>C. sativus</i>	Iran	JX025998	Sh44
IA	2013	<i>C. pepo</i>	Iran	KF873617	Csu
IA	2013	<i>C. sativus</i>	Iran	KF873618	Cud
IA	1994	<i>Cucumis melo</i>	Japan	D28487	FT
IA	2015	<i>Gladiolus dalenii</i>	India	KP713798	Glad-NBRI-4
IA	2005	<i>Lilium sp.</i>	Poland	DQ018286	Cas
IA	2006	<i>Lily longiflorum</i>	China	EF158110	CMV-BJ
IA	2007	<i>C. pepo</i>	South Korea	AB290151	LK4
IA	2009	<i>L. longiflorum</i>	South Korea	AB506800	LiCB
IA	2008	<i>Solanum tuberosum</i>	Syria	AB448695	PoCMV7-7
IA	2004	<i>C. sativus</i>	Iran	AY871069	S337
IA	2012	<i>Citrullus vulgaris</i>	Serbia	JX280942	12-449
IA	2004	<i>Cucumis melo</i>	Spain	AJ829774	MAD96/2
IA	2012	<i>C. pepo</i>	Egypt	HF545020	Behera
IA	2015	<i>C. sativus</i>	Iran	KT279565	LOR_A
IA	2014	<i>C. sativus</i>	Iran	KJ173755	Cu49
IA	1992	<i>Not reported</i>	USA	NC_001440	Fny
IA	2004	<i>C. melo</i>	Greece	AJ810265	RT06
IA	2004	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Spain	AJ829779	VAL90/1
IA	2005	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Viet Nam	AM048830	VN-Caobang
IA	2006	<i>Not reported</i>	China	DQ873558	BG_18_4
IA	2013	<i>Vigna radiata</i>	Iran	KF873621	Mde
IA	2014	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Bulgaria	AJ810262	RT144
IA	2003	<i>Passiflora edulis</i>	Australia	AJ585521	passionfruit
IA	2009	<i>C. melo</i>	Thailand	FM999067	ML-25
IB	2012	<i>L. esculentum</i>	Iran	JX025993	Khnl
IB	2015	<i>C. melo</i>	Iran	KT279570	LOR_F
IB	2014	<i>L. esculentum</i>	Iran	KJ173753	To33
IB	2001	<i>Musa sapientum</i>	Japan	AB069971	B2
IB	2004	<i>Vanilla tahitensis</i>	French	AY861397	WP120/01
IB	2012	<i>Capsicum sp</i>	Italy	HE962480	Vir
IB	2014	<i>N. tabacum</i>	China	KJ746011	PJ9
IB	2005	<i>Musa x paradisiaca</i>	India	AM158321	UP
IB	2012	<i>N. tabacum</i>	Viet Nam	HE999621	VN-Tiengiang
IB	2014	<i>Ocimum campechianum</i>	Brazil	KM651842	Alfavaca
IB	2004	<i>chilli</i>	Thailand	AJ810259	KS44
II	2006	<i>Tagetes erecta</i>	Indian	AM396983	Indian
II	2007	<i>Solanum lycopersicum</i>	Japan	AB368501	PF
II	2007	<i>Tagetes erecta</i>	CHina	F514924	CMV-WSJ
II	2011	<i>Vinca minor</i>	USA	JF918965	100
II	1999	<i>Lupinus angustifolius</i>	Australia	AF198103	LY
II	2006	<i>Ribes rubrum</i>	Poland	DQ639763	PORZ
II	2002	<i>Alstroemeria</i>	South Korea	AJ304403	PR6A
II	2014	<i>Tulipa sp</i>	Serbia	KJ854451	13-79
II	2004	<i>unknown</i>	Netherlands	AJ810256	PV0418
		Out of group		PSV-ER U15730.1	

## نتایج

### نتایج RT-PCR و RFLP-RT-PCR

طی واکنش RT-PCR قطعه‌ای به طول ۸۷۰bp از منطقه‌ی ژنومی CP به همراه نواحی اطراف با استفاده از آغازگرهای CMVCP<sub>r</sub> و CMVCP<sub>f</sub> در نمونه‌های الایزا مثبت تکثیر شد که

این نتایج تأیید کننده‌ی نتایج آزمون الایزا بودند (شکل ۱). در الکتروفورز محصولات RFLP-RT-PCR با استفاده از آنزیم *MspI* قطعات دی‌ان‌ای به طول حدود ۳۳۵ و ۵۳۷ جفت‌باز در تمامی جدایه‌ها مشاهده شد (شکل ۲).

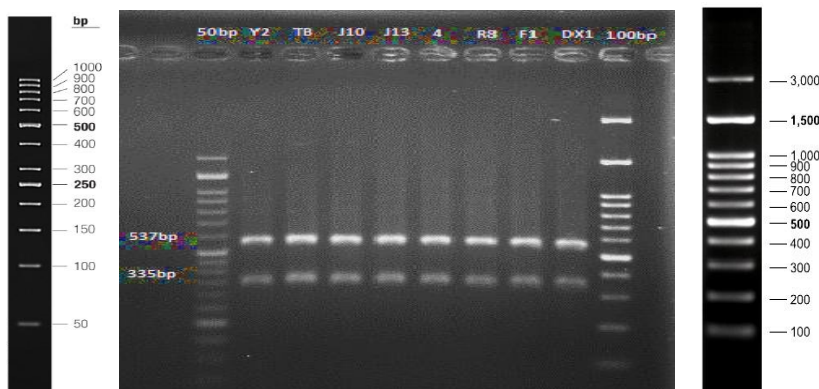


شکل ۱- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR. با استفاده از جفت آغازگر CMVCP-F و CMVCP-R

در سمت چپ اندازه‌ی قطعات مارکر وزنی 50bp و در سمت راست نیز مشخصات مارکر 1Kb نشان داده شده است.

Figure 1- Electrophoresis of the PCR products amplified by CMVCP-F and CMVCP-R primer pair.

Size of consisted fragments in the 50 bp ladder and 1Kbp ladders are shown in the left hand and right hand of the photo, respectively

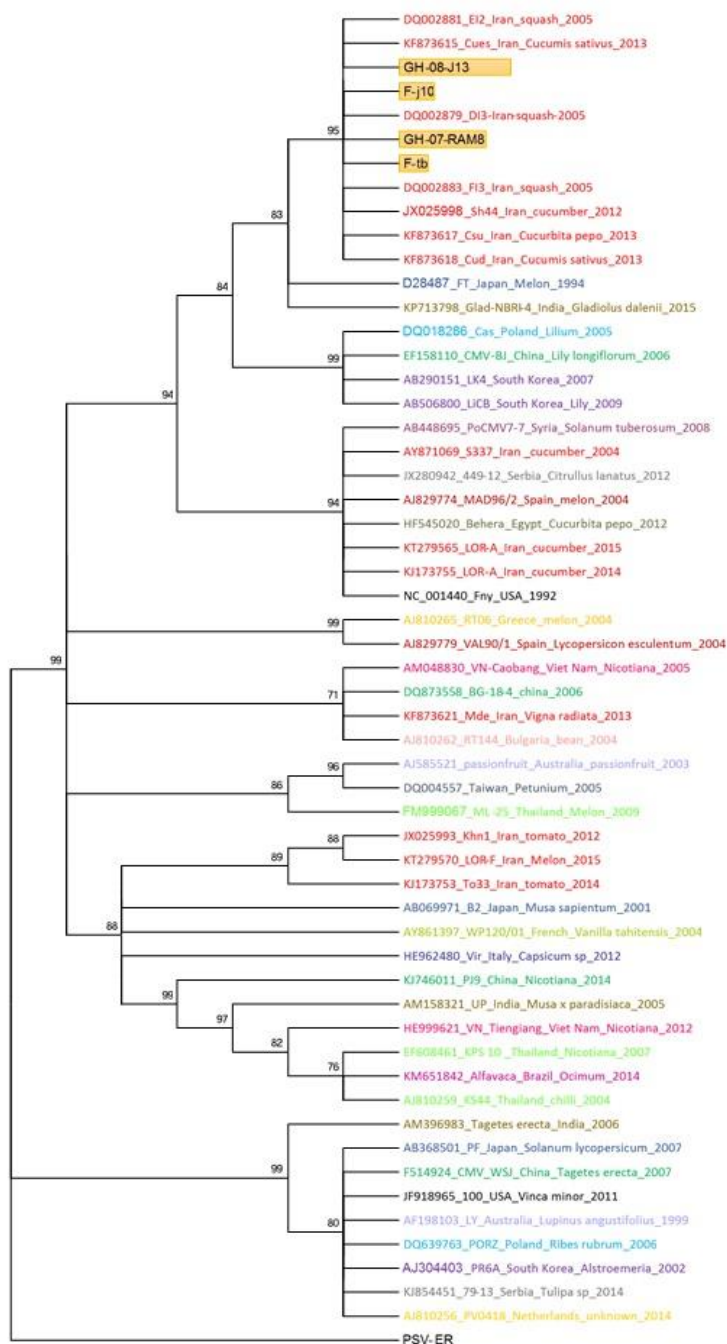


شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول برش خورده با آنزیم *MspI* برای نمونه‌های مورد بررسی

در سمت چپ مشخصات مارکر 50bp و در سمت راست نیز مشخصات مارکر 100bp مشاهده می‌شود.

Figure 2- Electrophoresis of digested RT-PCR products with *MspI*

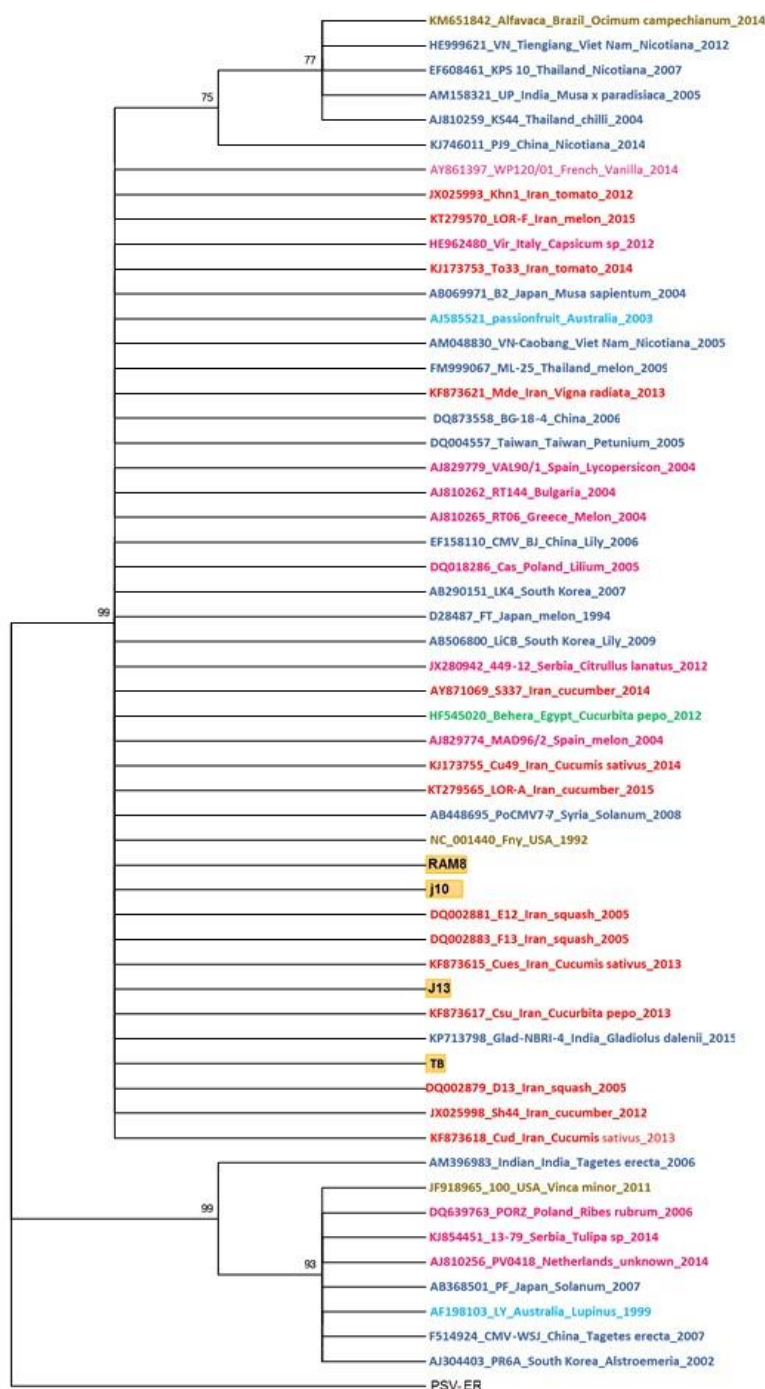
Size of consisted fragments in the 50 bp ladder and 1Kbp ladders are shown in the left hand and right hand of the photo, respectively.



شکل ۳- درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی کامل ژن پروتئین پوششی جدایه‌های CMV به روش نزدیک‌ترین همسایه (NJ) در سطح اسید نوکلئیک

شاخه‌های با بوت استرپ کمتر از ۷۰٪ ادغام شدند. زیرگروه‌های CMV در سمت راست شکل نشان داده شده‌اند. جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش به رنگ نارنجی درون کادر آورده شده است. جدایه‌های ایران به رنگ قرمز، جدایه‌های قاره‌ی آمریکا قهوه‌ای، آفریقا به رنگ سبز، آسیای به رنگ آبی و اروپایی به رنگ صورتی نشان داده شده است. برای مشاهده‌ی جزئیات جدایه‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.

**Figure 3- Neighbor joining (NJ) tree based on the complete sequence of CMV coat protein gene at nucleic acid level**  
Branches with bootstrap support less than 70% are collapsed. CMV subgroups are shown in the left. different colors are used to indicated geographical origin of reported isolated: sequenced isolates in this study in orange, , previously reported Iranian isolates in red, American isolates in brown, African isolates in green, Asian isolates in blue and European isolates in pink. For further information on isolates please refer to the table 1.



شکل ۴- درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی کامل ژن پروتئین پوششی جدایه های CMV به روش نزدیک ترین همسایه (NJ) در سطح آمینواسید

شاخه های با بوت استرپ کمتر از ۷۰٪ ادغام شدند. زیرگروه های CMV در سمت راست شکل نشان داده شده اند. جدایه های مورد بررسی در این پژوهش به رنگ نارنجی درون کادر آورده شده است. جدایه های ایران به رنگ قرمز، جدایه های قاره ای آمریکا قهوه ای، آفریقا به رنگ سبز، آسیایی به رنگ آبی و اروپایی به رنگ صورتی نشان داده شده است. برای مشاهده جزئیات جدایه ها به جدول ۱ مراجعه شود.

**Figure 4- Neighbor joining (NJ) tree based on the complete sequence of CMV coat protein gene at amino acid level**  
Branches with bootstrap support less than 70% are collapsed. CMV subgroups are shown in the left. different colors are used to indicated geographical origin of reported isolated: sequenced isolates in this study in orange, , previously reported Iranian isolates in red, American isolates in brown, African isolates in green, Asian isolates in blue and European isolates in pink. For further information on isolates please refer to the table 1.

To33, LOR\_F, Khn1 در زیرگروه IB قرار گرفتند. الگوی مشاهده شده در درخت ترسیم شده بر اساس توالی آمینواسیدی از طول کامل CP نیز مشابه درخت ترسیم شده بر اساس داده‌های نوکلئوتیدی CMV-CP بود. بنابراین جدایه‌های ورامین، پاکدشت و پیشوا در زیرگروه IA قرار گرفتند (شکل ۳).

## بحث

برش محصولات RT-PCR با آنزیم محدود کننده *MspI* دو قطعه به طول‌های ۵۳۷ و ۳۳۵ جفت بازی را ایجاد کرد (شکل ۲). اطلاعات به دست آمده از توالی سویه CMV-Y (۱۴) نشان داد که این سویه توسط این آنزیم به دو قطعه برش داده شده است و جزو اعضای گروه یک می‌باشد (۲۰ و ۲۴). همچنین اکثر جدایه‌های ویروس از شمال غرب و یا غرب کشور از طریق الگوی برشی با آنزیم *MspI* در RFLP-RT-PCR در زیرگروه I گروه‌بندی شدند (۱۲ و ۲۵). توالی نوکلئوتیدی اطلاعات بیشتری در مورد مکان‌های تشخیص آنزیم برشی نسبت به آنزیم محدود کننده در یک قطعه از DNA در اختیار ما قرار می‌دهد. جهش یکی از عوامل تکامل در ویروس‌ها می‌باشد و ویروس‌های RNA دار به دلیل عدم تصحیح RNA پلی‌مراز در هنگام همانندسازی مستعد جهش می‌باشند (۲۳) بنابراین جهش در توالی نوکلئوتیدی سبب تغییر ترتیب توالی و در نتیجه برش یا عدم برش توسط آنزیم برشی می‌شود. نتایج داده‌های فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش در زیرگروه IA کنار جدایه‌هایی از ژاپن و هند قرار می‌گیرند و می‌توان نتیجه گرفت که این جدایه‌ها دارای جد مشترک هستند. نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های از قبل تعیین توالی شده از ایران نشان داده بود که جدایه‌هایی از هر سه زیرگروه از مناطق مختلف ایران گزارش شده است اما زیرگروه IA دارای پراکنش بیشتری است (۱، ۵، ۶، ۹، ۱۳، ۱۹ و ۲۵).

الگوی مشاهده شده از درخت ترسیم شده بر اساس توالی آمینواسیدی ژن CP در جدایه‌های CMV، مشابه الگوی اسیدنوکلئیکی بود با این تفاوت که جدایه‌های S33V-1, Behera, MAD96/2, Cu49 و LORA که در زیرگروه IA قرار گرفتند (شکل ۴). اعضای گروه I دارای دامنه میزبانی وسیع‌تری هستند (۲۱). از طرف دیگر اعضای زیرگروه I غالباً از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری گزارش شده‌اند و اعضای گروه II در مناطق معتدل پراکنده‌اند (۸). جدایه‌های بررسی شده در منطقه ورامین، پاکدشت و پیشوا متعلق به زیرگروه IA بودند و این منطقه جزو مناطق دارای آب و هوای نیمه گرمسیری می‌باشد بعلاوه سایر جدایه‌های IA در ایران از اکثر مناطق کشور گزارش شده است (۱، ۵، ۶، ۹، ۱۳، ۱۹ و

## نتایج توالی‌یابی همسانه‌ها

نتایج تعیین توالی نشان داد که اندازه‌ی محصول RT-PCR همسانه سازی شده ۸۷۰bp است. این اندازه با طول قطعه‌ی مورد انتظار مطابقت داشت. این قطعه حاوی طول کامل ژن CP به همراه توالی‌های اطراف آن بود. اندازه‌ی ژن CP در هشت جدایه CMV تعیین توالی شده ۲۱۸ آمینواسید و ۶۵۴ نوکلئوتید بود و هیچ گونه جهش، حذف و یا اضافه شدن در این جدایه‌ها رخ نداده بود. اندازه‌ی این ژن در جدایه‌های از قبل تعیین توالی شده نیز ۶۵۴ نوکلئوتید و ۲۱۸ اسید آمینه بود. تشابه جدایه‌های مورد بررسی با یکدیگر در این پژوهش ۹۹-۱۰۰٪ در سطح نوکلئوتیدی و ۱۰۰٪ در سطح آمینواسیدی بود.

## نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی

تشابه جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش به جدایه‌های از قبل تعیین توالی شده از ایران از جمله E12, Cues, D13, F13, SH44, Cus و Cud که در یک خوشه کنار جدایه‌ی مورد مطالعه قرار دارند (شکل‌های ۳ و ۴) در سطح نوکلئوتیدی ۹۹-۱۰۰٪ است و در سطح آمینواسیدی ۱۰۰٪ و درصد تشابه با جدایه‌های S33V و LOR A و Med که به نسبت دورتر ولی با جدایه‌های مورد بررسی در یک گروه قرار می‌گیرد در سطح نوکلئوتیدی ۹۱-۹۸٪ و در سطح آمینواسیدی ۹۳-۹۶٪ است. دورترین جدایه به جدایه‌های مورد بررسی جدایه‌ی PV0418 از کشور هلند که درصد تشابه آن به جدایه‌های مورد بررسی در سطح اسیدهای آمینه ۸۱ درصد و در سطح نوکلئوتیدی ۷۶ درصد بود و نزدیکترین جدایه‌ها به جدایه‌ی مورد بررسی جدایه‌های ایرانی E12, Cues, D13, F13, SH44, Cus و Cud با تشابه ۹۹-۱۰۰٪ در سطح اسیدهای نوکلئیک و ۱۰۰٪ در سطح اسیدهای آمینه بود. درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی اسیدنوکلئیک کامل ژن CMV-CP نشان داد که جدایه‌های CMV در دو گروه I و II که قبلاً گزارش شده بودند (۷ و ۲۱) گروه‌بندی شدند. جدایه‌های PV0418, 79-13-Serbia, Tagetes و PF, CMV-WSJ, 100-USA, LY, PORZ, PR6A در گروه II و بقیه جدایه‌ها در گروه I قرار گرفتند. تمامی جدایه‌های تعیین توالی شده در این پژوهش در گروه I قرار گرفتند. گروه I خود به زیرگروه‌های IA و IB تقسیم می‌شود که جدایه‌های ورامین، پاکدشت و پیشوا در زیرگروه IA قرار گرفتند. این جدایه‌ها همراه با جدایه‌های ایرانی E12, Cues, D13, F13, SH44, Cus و Cud و جدایه‌ی Glad-NBRI-4 از هند و جدایه‌ی FT از ژاپن در شاخه‌ی IA قرار می‌گیرند. سایر جدایه‌های گزارش شده از ایران S33V و LOR A و Med نیز در زیرگروه IA قرار گرفتند. جدایه‌های ایرانی

۲۵). بنابراین به نظر می‌رسد در ایران جدایه‌های IA محدود به منطقه‌ی گرمسیری نیستند. طی سال‌های گذشته که جدایه‌های ورامین بررسی شده بودند، تغییری در پراکنش زیرگروه‌های CMV در این منطقه رخ نداده است (۱ و ۶).

## منابع

- 1- Arafati N., Farzadfar S., and Pourrahim R. 2013. Characterization of coat protein gene of *Cucumber mosaic virus* isolates in Iran. *Iranian Journal of Biotechnology* 11: 109-114.
- 2- Berniak H., Malinowski T., and Kaminska M. 2009. Comparison of elisa and rt-pcr assays for detection and identification of *Cucumber mosaic virus* (CMV) isolates infecting horticultural crops in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 17: 5-20.
- 3- Clark M.F., and Adams A. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- 4- Deyong Z., Willingmann P., Heinze C., Adam G., Pfunder M., Frey B., and Frey J.E. 2005. Differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates by hybridization to oligonucleotides in a microarray format. *Journal of Virological Methods* 123: 101-108.
- 5- Eyvazi A., Dizadji A., Rastgou M., and Habibi M.K. 2015. Bioassay and phylogeny of five Iranian isolates of *Cucumber mosaic virus* from different hosts based on CP gene sequence. *Plant Protection Science* 51: 200-207.
- 6- Farzadfar S., Pourrahim R., and Arafati N. 2013. Molecular identification of *Cucumber mosaic virus* subgroup IB isolates in south Iran. *Journal of Plant Pathology* 95: 423-428.
- 7- Gallitelli D. 2000. The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Research* 71: 9-21.
- 8- Haas A., and Richter J., and Rabenstein F. 1989. Monoclonal Antibodies for Detection and Serotyping of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of Phytopathology* 127: 129-136.
- 9- Hosseinzadeh H., Nasrollanejad S., and Khateri H. 2011. First report of *Cucumber mosaic virus* subgroups I and II on soybean, pea, and eggplant in Iran. *Acta Virologica* 56: 145-148.
- 10- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., and Lefkowitz E.J. 2012. *Virus Taxonomy, Classification and nomenclature of viruses*, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. 1327 p.
- 11- Liu J.C.K., Ng S., and Perry R.L. 2000. *Cucumber mosaic virus* Mutants with Altered Physical Properties and Defective in Aphid Vector Transmission. *Virology* 276: 395-403.
- 12- Mohammadi K., Hajizadeh M., and Koolivand D. 2016. Detection and identification of four vegetable fruit viruses in west and northwest of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52: 279-288.
- 13- Nematollahi S., and Rakhshandehroo F. 2012. Phylogenetic analysis of new isolates of *Cucumber mosaic virus* from Iran on the basis of different genomic regions. *The Plant Pathology Journal* 28: 381-389.
- 14- Nitta N., Masuta C., Kuwata S., and Takanami Y. 1988. Comparative studies on the nucleotide sequence of *Cucumber mosaic virus* RNA3 between Y strain and Q strain. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 54: 516-522.
- 15- Palukaitis P., and Zaitlin M. 1997. Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Advances in Virus Research* 48: 349-378.
- 16- Palukaitis P., Roosinck M.J., Dietzgen R.G., and Francki R.I.B. 1992. *Cucumber mosaic virus*. *Advances in Virus Research* 41: 281-348.
- 17- Pares R.D., Gillings M.R., and Gunn L.V. 1998. Differentiation of Australian *cucumber mosaic cucumovirus* isolates: comparison of dsRNA type, polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis, DNA hybridisation and serogrouping. *Australasian Plant Pathology* 27: 36-39.
- 18- Quiot J.B. 1981. Ecology of *Cucumber mosaic virus* in the Rhone Valley of France. III Conference on Epidemiology and Control of Virus Diseases of Vegetables, p. 9-22. Italy, Bari, 29 Agu. 1979.
- 19- Rasoulpour R., and Izadpanah K. 2008. Properties and taxonomic position of hoary cress strain of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of Plant Pathology* 90: 97-102.
- 20- Rizos H., Gunn L.V., Pares R.D., and Gillings M.R. 1992. Differentiation of *cucumber mosaic virus* isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73: 2099-2103.
- 21- Roosinck M.J., Zhang L., and Hellwald K.H. 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology* 73: 6752-6758.
- 22- Sambrook J., and Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 23- Schneider W.L., and Roosinck M.R. 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *Journal of Virology* 75: 6566-6571.
- 24- Singh Z., Jones R.A., and Jones M.G.K. 1995. Identification *Cucumber mosaic virus* subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Disease* 79: 713-716.



- 25- Sokhandan Bashir N., Kalhor M.R., and Zarghani S.N. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes* 32: 277-288.
- 26- Wilson A.D., and Halliwell R.S. 1985. Characterization and field studies of a *Cucumber mosaic virus* isolate from Spinach in the winter garden area of Texas. *Plant Disease* 69:751-754.
- 27- Yordanova A., Hristova D., Stoimenova E. 2002. Serological and electrophoretic characterization of the necrotic strain CMV-NB of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of Culture Collections* 3: 84-91.

## Cloning, Genetic Diversity of Coat Protein Gene and Detection of Subgroups of *Cucumber mosaic virus* Strains from Cantaloupe in Varamin

M. Jafari<sup>1\*</sup> - S. Gholizadeh-Roshanagh<sup>2</sup> - Sh. Nourinejad Zarghani<sup>3</sup>

Received: 29-04-2018

Accepted: 25-06-2019

**Introduction:** Varamin is one of the major producer regions of cantaloupes which is located in southern Tehran. *Cucumber mosaic virus* (CMV) is the type species of viral genus *Cucumovirus* in the family *Bromoviridae* and is causal agent of economically important losses in cucurbits. The CMV virions are isometric in shape and the genome is composed of three single-stranded positive sense RNAs. Each of the genomic RNAs 1 and 2 encodes a single large ORF and RNA-2 harbors an additional smaller ORF, 2b, involved in cell-to-cell movement and post-transcriptional gene silencing. The RNA-3 has two ORFs, 3a and 3b, encoding a movement protein and coat protein, respectively. Each of genomic RNAs has a Cap-like and tRNA-like structures at its 5' and 3' ends, respectively. The virus is transmitted by different species of aphids in a non-persistent manner and is easily transmissible to the indicator hosts by mechanical inoculation. CMV is reported from several cucurbitaceae plants in Iran. Isolates of CMV are classified in different groups or subgroups based on different methods especially serology, RT-PCR-RFLP, nucleotide sequencing and phylogeny which are useful data for decision making or choosing the strategy during the development of CMV-resistant varieties and producing transgenic plants by RNA silencing strategy.

**Materials and Methods:** During 2014-2016, a total number of 132 leaf samples were collected from cantaloupes showing viral symptoms such as mosaic, mottling, leaf deformation and plant stunting. These samples were subjected to double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) with specific antibodies (DSMZ, Germany) to detect CMV based on the manufactures' instructions. Total RNA was extracted from ELISA positive samples as explained elsewhere. Two microliters of total RNA used as template in RT-PCR to amplify a 870 base pair (bp) fragment of partial CMV genomic RNA3 including the coat protein gene and its flanking regions using specific primers CMVCPf (5'-GCTTCTCCGCGAG-3') and CMVCPr (5'-GCCGTAAGCTGGATGGAC-3') corresponded to 1149-1161 nts and 1998-2015 of CMV strain Q, respectively. In order to address the subgroups of CMV isolates, RT-PCR products were digested by *MspI* (*HpaII*) restriction enzyme and electrophoresis was done on 1.5% agarose gel. We expected the presence of the bands with 335 and 537 bp in size for the sub-group I and 393 and 559 bp for sub-group II isolates of CMV. Then, based on the geographical distance of collected CMV isolates, the CP gene from four isolates were ligated into pTG19-T, an A/T cloning vector, and the recombinant plasmids were introduced in *Escherichia coli*. The selected plasmids were extracted via alkaline lyses method and selected recombinant plasmids were sequenced by Macrogen, South Korea. The sequencing data were aligned with those of previously reported CMV isolates. The alignment and pairwise sequencing to estimate similarity between nucleotide sequences were done with BioEdit software. The Phylogeny Inference package (Phylip) version 3.65 was used to draw phylogeny trees.

**Results and Discussion:** 59 out of 132 samples (%44.69) positively reacted with CMV specific antibodies in DAS-ELISA. Expected DNA fragments of about 870 bp were successfully amplified via RT-PCR from the ELISA positive samples. In RT-PCR-RFLP for addressing the CMV subgroups, all *MspI* digested RT-PCR products from the tested samples produced two DNA bands of 537 and 335 bp and it was concluded that these isolates belong to the CMV subgroup I. Sequencing data of selected CMV CP clones showed 99-100% and 100% similarity between tested isolates at the nucleotide and amino acid levels, respectively. These isolates shared 93-100% and 97-100% similarity with previously reported CMV isolates from Iran at nucleic acid and amino acid levels, respectively. The reconstructed phylogenetic tree, re-confirmed the results of RT-PCR-RFLP, and Varamin isolates were placed with few other Iranian CMV isolates including E12, Cues, D13, F13, Sh44,

1- Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Higher Educational Complex of Saravan (\*- Corresponding Author Email: majafari59@yahoo.com)

2 and 3- Former M.Sc. Student and Assistant Professor Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran

Csu and Cud which were collected from non-melon hosts. Isolate LOR-F, the only CMV isolate previously reported from melons, belongs to the IB subgroup of CMV. This is the first report of CMV subgroup I isolates from melons.

**Conclusion:** The RT-PCR-RFLP and sequencing data confirmed the presence of subgroup IA of CMV isolates in Varamin, Pishva and Pakdasht cantaloupe fields whose express severe symptoms in melons. However, the change in *Zucchini yellow mosaic virus* has been reported from these area, the same isolate of CMV were distributed in the entire region. Unlike *Zucchini yellow mosaic virus* populations which has been changed in the Varamin, Pakdasht and Pishva regions, it seems that there is just one dominant CMV isolate widespread in these regions.

**Keywords:** *Cucumovirus*, Cantaloupe, Phylogeny, RT-PCR-RFLP, Varamin