نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 31، شماره 4، زمستان 1396، ص. 580-576

Journal of Plant Protection
Vol. 31, No. 4, Winter 2018, P. 576-580

شناسایی و بررسی خصوصیات مولکولی ویروس موزائیک کدو (*Squash mosaic virus*) در استان‌های خراسان رضوی، جنوبی و مازندران

علی نصرآبادی[1]- محسن مهرور[2*] - محمد زکی عقل[3]

تاریخ دریافت: 1394/09/28
تاریخ پذیرش: 1396/07/01

چکیده

ویروس موزائیک کدو (SqMV) یکی از مهم ترین ویروس‌های آلوده کننده گیاهان خانواده کدو در جهان می‌باشد. این ویروس متعلق به خانواده *Sequviridae* و جنس *Comovirus* بوده، ژنوم آن شامل دو قطعه RNA تک رشته‌ای مثبت می‌باشد. در طی ماه‌های فروردین تا مرداد ماه سال 1393، از گیاهان دارای علائم موزائیک، زردی و پیچیدگی سطح برگ در مزارع کدو، خربزه و هندوانه استان‌های خراسان رضوی، جنوبی و مازندران نمونه‌برداری صورت گرفت. آلودگی نمونه‌های مورد نظر توسط روش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت، از میان176 نمونه گیاهی جمع‌آوری شده 10 نمونه آلوده به ویروس موزاییک کدو تشخیص داده شدند، نمونه‌های آلوده پس از همسانه‌سازی تعیین ترادف گردیدند. جهت تعیین جایگاه تکاملی این جدایه‌ها در مقایسه با سایر جدایه‌های موجود، درخت فیلوژنتیکی توسط نرم افزار MEGA6 رسم گردید. نتایج حاصله بیانگر آن بود که براساس مقایسه ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی، جدایه‌های ایرانی در دو گروه جداگانه قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی : ایران، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، ویروس موزائیک کدو

مقدمه

بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های ویروسی از عوامل محدودکننده تولید کدوئیان در دنیا می‌باشند (16). ویروس موزائیک کدو (SqMV) یکی از اعضای جنس *Comovirus* و خانواده *Sequiviridae* است که توسط بذر، سوسک و بصورت مکانیکی منتقل شده، باعث ایجاد بیماری‌های مهمی در دامنه وسیعی از گیاهان جنس *Cucurbita* و *Cucumis* می‌شود (2 و 4). این ویروس دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای دوقسمتی است (RNA-2 ,RNA-1) که هر کدام درون پروتئین پوششی جداگانه‌ای بنام پروتئین پوششی بزرگ و پروتئین پوششی کوچک قرار می‌گیرند (12). RNA1 پلی پروتئین‌هایی چون پلی‌مراز، هلیکاز، پروتئاز و پروتئین ویروسی متصل شونده به ژنوم VPg را کد می‌کند و RNA2 پلی پروتئین‌هایی چون پروتئین حرکتی (MP)، پروتئین پوششی بزرگ (CPL) و پروتئین پوششی کوچک (CPS) را کد می‌کند (4). در این ویروس جایگاه ژن های CPL (41Kda) و CPS (22Kda) بوسیله مطالعات ترجمه در محیط آزمایشگاه برروی RNA2 نقشه یابی شده است (5 و 8). توالی نوکلئوتیدی کامل RNA-1 ویروس موزائیک کدو در جدایه ژاپنی (SqMV-Y) تعیین شده است (6). تاکنون SqMV از آمریکای شمالی و جنوبی، استرالیا، ژاپن، چین، جمهوری چک و ترینیداد گزارش شده است (3، 12 و 17). نلسون و کنواستون جدایه‌های SqMV را از ایالات متحده و پورتوریکو بصورت سرولوژیکی شناسایی کرده‌اند (12). همچنین محققین گزارش کردند که می‌توان براساس واکنش‌های میزبانی، جدایه‌های SqMV را به شش بیوتیپ تقسیم نمود (11 و 12). تنوع در بین جدایه‌های SqMV مربوط به ایالات متحده مورد بررسی قرار گرفته است (7). شناسایی سروتیپ های مختلف ویروس موزاییک کدو با استفاده از آزمون سلامت بذر توسط لینگ و همکاران صورت پذیرفته است (13). میزان تنوع در بین سایر جدایه‌های گزارش شده از دیگر مناطق دنیا تعیین نشده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی فروردین تا مرداد ماه سال 1393 تعداد 176 نمونه‌ی برگ مشکوک به آلودگی به ویروس SqMV شامل گیاهان کدو

1، 2 و 3- 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.v31i4.51886

(*Cucurbita pepo*)، خربزه (*Cucumis melo*)، خیار چنبر (*melo var. flexuosus Cucumis*) و هندوانه (*Citrullus lanatus*) که دارای علائمی همچون موزائیک، تاولی، بندکفشی و توته‌ای شدن برگ‌ها بودند، از مزارع شهرستان‌های بشرویه، جوین، خوسف، بیرجند، قاین، تربت جام، طبس، درح، سربیشه، جویبار و قائم شهر به صورت تصادفی (حرکت به صورت W در قطر مزرعه از مزارع شدیدا آلوده) جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها بلافاصله در شرایط سرد به آزمایشگاه جهت انجام آزمایشات تکمیلی منتقل گردید.

استخراج RNA ویروس

به منظور استخراج RNA کل، از کیت استخراج RNA شرکت دنازیست (Total RNA Isolation Kit) استفاده گردید. RNA استخراج شده طبق دستوالعمل شرکت سازنده جهت انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون مولکولی ترانویسی معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز RT-PCR

به منظور شناسایی ویروس در نمونه‌های جمع‌آوری شده از آزمون مولکولی ترانویسی معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده گردید تا صحت وجود ویروس SqMV تائید گردد. به منظور انجام واکنش RT، 2 میکرولیتر آغازگر اختصاصی برگشت با 3-5 میکرولیتر RNA و 6 میکرولیتر آب دیپسی مخلوط گردید. این مخلوط در 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه قرار داده شد و بعد از گذشت این مدت بلافاصله به روی یخ منتقل گردیده، به مدت یک دقیقه نگهداری گردید، در این فاصله 2 میکرولیتر از dNTP(10mM)، 4 میکرولیتر بافر M-MuLV RT، و 1 میکرولیتر آنزیم M-MuLV Reverse transcriptase با هم مخلوط گردید و به میکروتیوب‌های روی یخ اضافه گردید. پس از تولید cDNA با استفاده از واکنش RT، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

برای تکثیر ژن کد کننده پروتئین پوششی کوچک (CPS) جدایه‌ها از مخلوط آماده (Red Amplicon PCR mix, Kit-Denmark) استفاده شد. به این منظور 3 میکرولیتر از cDNA حاصل از واکنش RT با دو میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت (TGTGTACAAGATTGGTGGAGATGC) مربوط به ناحیه ژنی 1384-1364 و برگشت (AGGCTTCTAAAGCGAACTGGG) مربوط به ناحیه ژنی 3380-3301 با یکدیگر مخلوط و به وسیله آب مقطر استریل حجم نهایی به 25 میکرولیتر رسید.

محصول PCR سپس در ژل آگاروز یک درصد حاوی 2 µl از DNA Green Viewer در بافر TBE با ولتاژ 90 ولت الکتروفورز شده، به وسیله دستگاه Gel documentation (Syngene- UK) عکسبرداری انجام شد. تخمین طول قطعات تکثیر شده به کمک نشانگر مولکولی انجام شد.

همسانه‌سازی وتعیین ترادف نوکلئوتیدی

قطعات تکثیر شده در PCR با استفاده از کیت Denazist Gel Extraction Kit مطابق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل خالص سازی شدند. الحاق قطعات خالص‌سازی شده در ناقل PTG19 (Vivantis, Malaysia) با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase (Fermentas) به مدت یک شب در دمای 4 درجه سانتی‌گراد انجام شد. همسانه‌سازی ناقل در باکتری *E. coli* سویه DH5α به روش شوک حرارتی انجام شد. استخراج پلاسمید نوترکیب از سلول باکتری با استفاده ازکیت استخراج پلاسمید Denazist Plasmid DNA Isolation Kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تعیین ترادف نوکلئوتیدی پلاسمید نوترکیب با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 انجام شد (ماکروژن- کره جنوبی).

مقایسه توالی‌ها و آنالیزهای مولکولی

توالی‌های رفت و برگشت هر جدایه به وسیله نرم‌افزار بلاست بررسی و پس ازحصول اطمینان از صحت توالی‌ها، با استفاده از نرم افزار Vector NTI Advance ™ 9.0 آن‌ها به یک توالی نهایی تبدیل شده، ترادف ناقل پلاسمیدی از توالی‌ها حذف شد. از ترادف ژن پروتئین پوششی سایر جدایه‌های SqMV موجود در بانک ژن در آنالیز فیلوژنتیکی استفاده شد (جدول 1).

همردیف‌سازی چندگانه توالی‌ها، ترجمه پروتئینی هر جدایه با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN v.4. 02 انجام شد. ماتریس درصد شباهت بین جدایه‌های SqMV با استفاده از نرم‌افزار Species Demarcation Tool (SDT) v. 1.0 ترسیم شد. جهت تعیین ارتباط فیلوژنتیکی جدایه ها از نرم‌افزار MEGA 6 و Bootstrap با 1000 تکرار استفاده شد.

نتایج و بحث

در نمونه‌های آلوده به SqMV علائم به صورت زردی برگ ، موزائیک، بند کفشی شدن و تاولی شدن رگبرگ‌ها مشاهده گردید (شکل 1). برای شناسایی این ویروس از آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر پروتئین پوششی کوچک (CPL) ویروس SqMV استفاده شد. مشاهده باند 1900 نوکلئوتیدی در ژل الکتروفورز تائیدی بر وجود ویروس مورد نظر در نمونه‌های آلوده بود.

جدول 1- جدایه‌های مورداستفاده در آنالیزهای فیلوژنتیکی

Table 1- Isolates used for phylogenetic analysis

نام جدایه Isolate	ناحیه ژنومی موردمطالعه Genome	رس‌شمار Accession number	کشور Country
RZ	پروتئین پوششی Coat Protein	KP223324.1	اسپانیا Spain
melon	پروتئین پوششی Coat Protein	M96148.1	آمریکا USA
Kimble	پلی پروتئین شماره 2 Poly Protein No. 2	AF059533.1	آمریکا USA
Y-SqMV	ژنوم کامل Full Genome	AB054689.1	ژاپن Japan
Arizona	پلی پروتئین شماره 2 Poly Protein No. 2	AF059532.1	آمریکا USA
Tas-1	پلی پروتئین شماره2 Poly Protein No. 2	JF922966.1	جمهوری چک Check Republic
CH 99/211	ژنوم کامل Full Genome	EU421060.1	چین China
CA-SqMV	پلی پروتئین Poly Protein	HQ263619.1	آمریکا USA

شکل 1- علائم بیماری ناشی از ویروس SqMV. در نمونه‌های جمع‌آوری شده از کدو و خربزه، علائم بصورت تاولی، بند کفشی و موزائیک می باشند

Figure 1- Symptoms induced by SqMV. Symptomes in collected samples of Squash and Watermelon were consist of blistering, shoe string and mosaic

جدول 2- مشخصات نمونه‌های جمع‌آوری شده و میزان آلودگی آنها

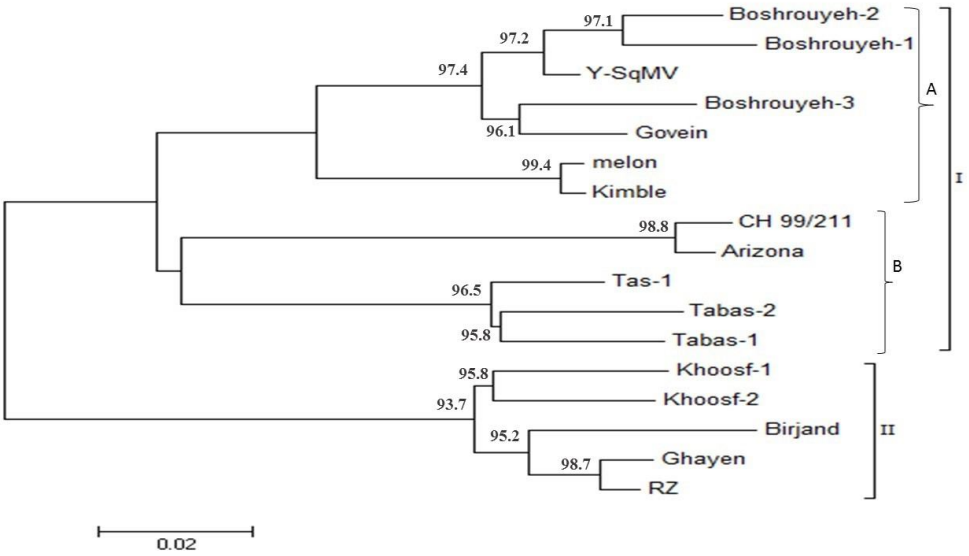
Table 2- Sampling sites and the number of infected cucurbits by SqMV

نام استان Province	نام شهر City	تعداد کل نمونه‌های جمع آوری Total no of samples	تعداد نمونه آلوده Infected Samples	درصد گیاه آلوده به سالم Infected/Healthy plant
خراسان رضوی Khorasan Razavi	جوین Jovain	10	1	10
	تربت جام Torbat Jam	4	0	0
	بیرجند Birjand	30	1	3.33
	بشرویه Boshroye	45	3	6.66
خراسان جنوبی Southern Khorasan	خوسف Khosf	40	2	5
	طبس Tabas	4	2	50
	درح Dorroh	5	0	0
	قاین Ghayen	25	1	4
	سربیشه Sarbishe	5	0	0
مازندران Mazandaran	قائم شهر Ghaemshahr	4	0	0
	جویبار Joybar	4	0	0
تعداد کل نمونه ها Total no of Samples		176	10	5.68

در این تحقیق تعداد 176 نمونه از گیاهان کدوئیان مزارع استان های خراسان رضوی، جنوبی و مازندران جمع‌آوری شد. نتیجه آزمون مولکولی زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، نشان داد که تعداد 10 نمونه (حدود 6 درصد) دارای آلودگی به ویروس SqMV هستند.

در این تحقیق، تعیین پراکنش ویروس موزائیک کدو در مزارع کدوئیان سه استان خراسان رضوی، جنوبی و مازندران نشان داد که پراکنش این ویروس در نواحی مورد بررسی بسیار محدود بوده، به طوری‌که تنها در استان خراسان رضوی تعداد 1 نمونه از 14 نمونه، در استان خراسان جنوبی تعداد 9 نمونه از 154 نمونه، آلوده به این ویروس بوده و در استان مازندران از 8 نمونه مشکوک هیچ کدام آلوده به ویروس نبودند. طبق بررسی‌هایی که سمیعی و همکاران از برخی گلخانه‌های ایران در سال‌های 1381تا 1383 در استان‌های مختلف انجام دادند (14) و همچنین براساس گزارش شمشیری و همکاران در استان‌های خراسان و یزد (15) مؤید این مطلب است که ویروس موزائیک کدو دارای گسترش محدودی در ایران می‌باشد. در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده گاهی تعدادی از نمونه‌ها دارای علائم خاصی شبیه علائم ویروسی بودند، اما در هیچ کدام باند مورد نظر در RT-PCR تکثیر نگردید. می‌توان این چنین استنباط کرد که این علائم مربوط به سایر ویروس‌های آلوده کننده کدوئیان بوده‌اند و یا مصرف بعضی مواد مانند کود و سموم شیمیایی در مواردی باعث به وجود آمدن علائمی مانند علائم بیماری‌های ویروسی می‌گردند، که تشخیص آنها از علائم ویروس بسیار مشکل می‌باشد. همچنین تعداد معدودی علف‌هرز هم در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع کدوئیان وجود داشتند که به هیچ وجه باند مورد نظر در واکنش PCR در آنها تکثیر نگردید.

اکثر نمونه‌هایی که در این تحقیق آلوده به ویروس موزائیک کدو بودند مربوط به گیاه خربزه بوده، به طوری‌که از بین 10 نمونه آلوده به این ویروس تنها یک نمونه کدوی آلوده مشاهده گردید، از طرفی بیشتر جدایه‌های این ویروس که تاکنون از سراسر جهان از جمله کالیفرنیا (10)، آریزونا (12)، کانادا (9)، یونان (1) و ژاپن (17) گزارش شده، از روی نمونه‌های خربزه بوده است. از آنجایی که بذور مورد استفاده در کشاورزی در سال‌های گذشته از کشورهای دیگر وارد می گردیده، به عنوان مثال بذر کدو از آمریکا و ایتالیا و بذر خربزه از هلند و آمریکا، می‌توان این طور تصور کرد که ویروس موزائیک کدو از طریق بذر آلوده ازسایر کشورها وارد ایران شده است و در داخل ایران توسط بذر و حشرات ناقل (سوسک) پراکنده شده است.



شکل 2- درخت فیلوژنتیکی براساس توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های مختلف SqMV، به همراه Bootstrap با 1000 تکرار

Figure 2- Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of SqMV isolates with 1000 frequencies in Bootstrap

به منظور مقایسه جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های گزارش شده در دنیا از نرم افزارهای DANMAN version8 و MEGA6 استفاده شد. بر طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق جدایه‌های این ویروس براساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی به دو گروه اصلی I و II تقسیم شدند. گروه I به دو زیر گروه فرعی A و B طبقه‌بندی شد. در گروه IA جدایه‌های ژاپن (melon،Y-SqMV

Kimble به همراه جدایه‌های ایرانی بشرویه 1و2و3 و جوین قرار می‌گیرند. گروه IB شامل جدایه‌های چینی CH99/211، آریزونا، جمهوری چک (Tas-1) و جدایه‌های ایرانی مربوط به شهرستان طبس می‌باشد. و در گروه II جدایه‌های ایرانی مربوط به شهرستان خوسف، بیرجند و قاین به همراه جدایه‌ای از اسپانیا (RZ) قرار دارند (شکل 2).

برمبنای مقایسه بین ترادف نمونه‌ها، در سطح نوکلئوتیدی جدایه ایرانی قاین بیشترین شباهت را با جدایه اسپانیایی به میزان 98/7 % و جدایه ایرانی بیرجند کمترین شباهت را با جدایه چین به میزان 84/1 % دارا می‌باشد. در سطح آمینواسیدی جدایه ایرانی بشرویه-1 بیشترین شباهت را با جدایه ژاپن (99/8 %) و جدایه‌های ایرانی بیرجند و بشرویه-3 کمترین تشابه را با جدایه چین (94 %) دارند.

منابع

1- Avgelis A. D., and Katis N. 1989. Occurrence of *Squash mosaic virus* in melons in Greece. Plant Pathology, 38: 111-113.

2- Freitag J. H. 1956. Beetle transmission, host range, and properties of *Squash mosaic virus*. Phytopathology, 46:73-81.

3- Chinnadurai C., Ramkissoon A., Rajendran R., Tony S.T., Ramsubhag A., and Jayaraj J. 2015. First Report of *Zucchini yellow mosaic virus* and *Squash mosaic virus* Infecting *Cucurbits* in Trinidad. Plant Disease, 100 (4):866.

4- Goldbach R. W., and Wellink J. 1996. Comoviruses: molecular biology and replication. In The Plant viruses, vol. 5, Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes, pp. 35±76. Edited by B. D. Harrison & A. F. Murant. New York: Plenum Press.

5- Gopo J. M., and Frist R. H. 1977. Location of the gene specifying the smaller protein of the cowpea mosaic virus capsid. Virology, 79:259-266.

6- Han S.S., Yoshida K., Karasev A.V., and Iwanami T. 2001. Nucleotide sequence of Japanese isolate of Squash mosaic virus. Archive of virology, 147 (2):437-443.

7- Haudenshield J.S., and Palukaitis P. 1998. Diversity among isolates of squash mosaic virus. Journal of Gen Virology, 79:2331–2341.

8- Hu J., Zhou T., Liu L., Peng B., Li H., Fan Z., and Gu Q. 2009. The genomic sequence of a Chinese isolate of *Squash mosaic virus* with novel 5' conserved ends. Virus Genes, 38 (3):475-477.

9- Kempo W. G., Wieda J., and Patrick Z. A. 1972. *Squash mosaic virus* in muskmelon and distributed commercially in Ontario. Canadian Plant Disease, 52:58-59.

10- Kendrick J. B. 1934. Cucurbit mosaic transmitted by muskmelon seed. Phytopathology. 24: 820-823.

11- Knuhtsen H.K., and Nelson M.R. 1968. Identification of two serotypes in squash mosaic virus. Phytopathology, 58:345–347.

12- Nelson M.R., and Knuhtsen H.K. 1973. Squash mosaic virus variability: review and serological comparisons of six biotypes. Phytopathology, 63:920–926.

13- Ling K.S., Wechter W.P., Walcott R.R., and Keinath A.P. 2011. Development of a Real-time RT-PCR Assay for Squash Mosaic Virus Useful for Broad Spectrum Detection of Various Serotypes and its Incorporation into a Multiplex Seed Health Assay. Journal of Phytopathology, 159 (10): 649-656.

14- Samiee A. 2004. Identification, distribution and some characteristics of viruses that infect greenhouse Iran. Master thesis. 158pp.

15- Shamshiri N. 2008. Biology and genome characterization features squash mosaic virus isolates in Iran. Master thesis. Shahid Bahonar University of Kerman.

16- Ullman D. E., Cho J. J., and German TL. 1991. Occurrence and distribution of viruses in Hawaiian Islands. Plant Diseases, 75:367-370.

17- Yoshida K., Goto T., Nemoto M., and Tsuchizaki T. 1980. *Squash mosaic virus* isolated frommelon (*Cucumis melo* L.) in Hokkaido. Ann Phytopath Soc. Japan, 46: 349–356.