نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، ص. ۴۴۴-۴۳۷

Journal of Plant Protection
Vol. 28, No. 4, Winter 2015, P. 437-444

# تعیین برخی از خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه ارومیه ویروس موزاییک هندوانه

شیوا قربانی- مینا راستگو[۲*] - محمد عبداللهی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۶/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۰۷

## چکیده

ویروس موزاییک هندوانه یکی از شایع‌ترین ویروس‌ها روی کدوییان می‌باشد. به منظور ردیابی و تعیین پراکنش این ویروس در مزارع منطقه ارومیه، ۳۲۶ نمونه از گیاهان کدو، هندوانه، خربزه و خیار دارای علایم موزاییک و رگبرگ نواری و غیره از ۲۲ روستای منطقه ارومیه جمع‌آوری و با آنتی‌بادی اختصاصی WMV در آزمون DAS-ELISA مورد بررسی قرارگرفتند. از این تعداد، ۹۴ نمونه آلوده تشخیص داده شدند. جهت بررسی دامنه میزبانی از گیاهان متنوعی متعلق به چهار خانواده استفاده گردید که گیاهان *Cucurbita pepo*، *Cucumis melo* L.cv.Felexusus، *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn، *Cucumis sativus* L.cv. Peto Seed و *Nicotiana tobacum* cv. Burly به عنوان میزبان‌های ویروس تشخیص داده شدند. یک قطعه ۹۶۶ نوکلئوتیدی با آزمون IC-RT-PCR تکثیر و مستقیماً برای تعیین ترادف فرستاده شد. در درخت‌های فیلوژنتیکی ترسیم شده جدایه ارومیه داخل هیچ‌کدام از ۶ گروهی که قبلاً توسط محققین دیگر تعیین شده بود قرار نگرفت.

**واژه‌های کلیدی:** ویروس موزاییک هندوانه، آنالیز فیلوژنتیک، DAS-ELISA، ارومیه

## مقدمه

از بین عوامل بیماری‌زای مختلف، ویروس‌ها هر ساله موجب بروز خسارت فراوان در کدوییان سراسر دنیا می‌شوند. شدت پراکنش بیماری‌های ویروسی متغیر و به رابطه بین بیمارگر، میزبان، ناقل، شرایط محیطی و موقعیت جغرافیایی محلی که بیماری اتفاق می‌افتد بستگی دارد (۸). ویروس موزاییک هندوانه (*Watermelon mosaic virus*, WMV) یکی از شایع‌ترین ویروس‌ها می‌باشد. WMV نخستین بار از روی کدو توسط Webb و Scott گزارش شد (۱۳). WMV از تیره پوتی‌ویریده و جنس پوتی‌ویروس می‌باشد. این ویروس به وسیله ۳۸ گونه شته به طریق ناپایا منتقل می‌شود و در مقایسه با سایر پوتی‌ویروس‌ها دامنه میزبانی وسیع‌تری دارد. WMV به طور آزمایشی بیش از ۱۷۰ گونه گیاهی متعلق به ۲۷ خانواده را آلوده می‌کند (۱۸).WMV به عنوان یک بیمارگر مهم در مناطق مدیترانه‌ای و معتدل شناخته شده است و تنوع بیولوژیکی آن به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۳). تاکنون گزارش‌های متعددی از وجود، گسترش و دامنه میزبانی WMV از مناطق مختلف ایران گزارش شده است. دامنه میزبانی طبیعی این ویروس در ایران عمدتاً محدود به کدوییان است (۳، ۵، ۱۰، ۱۱، ۱۴ و ۱۶). اولین گزارش از تنوع مولکولی WMV در ایران مربوط به کار دسبایز و همکاران است که تنوع مولکولی ۴۲ جدایه از نقاط مختلف دنیا از جمله ۸ جدایه از ایران را براساس یک قطعه ۲۱۸ نوکلئوتیدی از ناحیه ´۵ ژن پروتئین پوششی بررسی کردند. به دنبال آن شریفی و همکاران (۱۶) ۱۸ جدایه از مناطق مرکزی و جنوبی ایران را براساس ژن پروتئین پوششی آنالیز کردند. ترادف کامل جدایه IR02-01 توسط دسبایز و لکوک تعیین گردید.

## مواد و روش‌ها

در طول فصل زراعی ۱۳۹۰- ۱۳۸۹، ۳۲۶ نمونه کدو، خیار، خربزه و هندوانه از مزارع جالیز وقاصلوی علیا، مرنگلوی بزرگ، ساری بگلوی چراغ، آده بزرگ، زرمانلو، قرابقلو، نازلو، الله لوی بزرگ، چنقرانلوی پل، زنبلان، امامزاده، میاوق، کشتیبان، یورقانلو، زینالو، قره‌جلو، طلاتپه، موش آباد، قوطولو، اصالوی بزرگ و یکنجه جمع‌آوری و برای انجام آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند.

### تعیین دامنه میزبانی ویروس موزاییک هندوانه

برای تعیین دامنه میزبانی و مشاهده علایم و نیز تکثیر ویروس از

۱و ۳- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
۲- استادیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
(*-نویسنده مسئول: Email: m.rastgou@urmia.ac.ir)

میزبان‌های متعددی استفاده گردید. بذرهای مختلف در گلدان‌های کوچک سفالی در خاک متشکل از دو قسمت شن، دو قسمت خاکبرگ و یک قسمت کود حیوانی کاشته و در گلخانه در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰-۶۰ درصد و نور مناسب نگهداری شدند. نمونه‌های آلوده به نسبت ۱:۱۰ (w/v) در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار با pH= ۷ عصاره‌گیری شده و با کمک پودر کاربوراندوم به برگ‌های گیاهان محک، مایه‌زنی مکانیکی انجام شد. این گیاهان در گلخانه با دمای ۲۵ -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و نهایتاً هر یک از این گیاهان یک ماه بعد از مایه‌زنی، با آزمون الیزا مورد بررسی قرار گرفتند.

### آزمون الیزا و تعیین پراکنش

جهت شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌های آلوده‌کننده کدوییان در منطقه ارومیه، از آزمون الیزا و آنتی‌بادی‌های چندهمسانه‌ای اختصاصی (تهیه شده توسط مرکز IVV ایتالیا) این ویروس‌ها استفاده گردید. آزمون الیزا طبق روش کلارک و آدامز انجام شد (۴).

## آزمون IC-RT-PCR

این آزمون با اندکی تغییرات مطابق روش هوت انجام شد (۸). در این آزمون از آنتی‌بادی چند همسانه‌ای ویروس برای به دام انداختن پیکره‌های ویروس استفاده شد. واکنش RT با مخلوط کردن ۴ میکرولیتر RT Buffer 5x ، ۲/۵ میکرولیتر DTT، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۱میکرولیتر MMLV Reverse Transcriptase (200unit/µl)،۱ میکرولیتر آغازگر معکوس (۱۰ میکرولیتر) ، ۰/۵ میکرولیتر RNase Inhibitor Enzymes (10unit/µl) تهیه گردید. مخلوط حاصل با افزودن آب به حجم۲۰ میکرولیتر رسانده و در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگهداری شد. cDNA به دست آمده از واکنش RT با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction, PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از سه میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر از آغازگرهای IWM3f (پیشرو) و IWM2r (پسرو) به ترتیب با ترادف‌های `5-GYTGTGARTCAGTGTCTYTRC-3` و `5-CGGTATTGTAATGGTTCTCCCTG-3` (10µM) (۱)،۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X ، ۰/۷۵ میکرولیتر ($MgCl_2$(50mM، ۰/۵ میکرولیتر dNTP Mix(10 mM)،۰/۵ میکرولیتر *Taq* DNA Polymerase (2/5 unit/100µl) و ۱۵/۷۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل در ۳۵ سیکل انجام شد به طوری که هر سیکل شامل مرحله واسرشت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال یک دقیقه در دمای ۵۳ درجه سلسیوس و مرحله امتداد ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد بود. در نهایت نمونه‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس قرار گرفتند. واسرشته‌سازی آغازین در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه انجام شد.

محصول PCR دارای دو باند به اندازه متفاوت بود و علیرغم تلاش برای حذف قطعه غیراختصاصی با تغییر دمای مرحله اتصال و غلظت $MgCl_2$ ، باند اضافی حذف نشد، بنابراین باند مورد نظر با استفاده از Zymoclean ™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research corp, USA) از ژل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد.

به منظور تعیین ترادف نوکلئوتیدی محصول واکنش PCR بعد از استخراج از ژل در حجم ۲۰میکرولیتر به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. تعیین ترادف در هر دو جهت و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی WMV انجام شد.

### آنالیز فیلوژنتیک

جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه بلاست (۲) انجام شد. تحلیل نتایج ترادف نوکلئوتیدی شامل هم‌ردیف سازی چندگانه ترادف‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی و تعیین درصد یکسانی آمینواسیدی پروتئین‌های ویروس موزاییک هندوانه جدا شده از ارومیه با پروتئین‌های سایر جدایه های موجود در بانک ژن (جدول۱) (۱۷)، با نرم‌افزار MEGA5.05 انجام گرفت. فایل‌های هم‌ردیف سازی شده حاصل در نرم‌افزار MEGA5.05 برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی از روش‌های مختلف Maximum Likelihood، Maximum parsimony و Neighbour joining استفاده شد (۱۹). در این آنالیزها از ترادف ویروس موزاییک هندوانه مراکشی ( *Moroccan watermelon mosaic virus*, MWMV) (رس شمار NC_009995) به عنوان outgroup استفاده شد. معنی‌دار بودن آماری با کاربرد ۱۰۰ تکرار از bootstrap resampling از همردیف‌سازی چندگانه اصلی محاسبه شد.

## نتایج

علایم بیماری در بوته‌های آلوده به WMV متنوع بود. عمده‌ترین علایمی که مشاهده گردید رگبرگ نواری، موزاییک همراه با تاولی شدن برگ‌ها به صورت خفیف یا شدید بود (شکل۱).

### تعیین پراکندگی ویروس

از ۳۲۶ نمونه جمع‌آوری شده، ۹۴ نمونه آلوده به WMV بودند. پراکنش ویروس در ۲۲ منطقه از شهرستان مورد بررسی قرار گرفت. WMV تنها در مناطق زنبلان و میاوق مشاهده نشد. بیش‌ترین آلودگی در مرنگلوی بزرگ گزارش شد (جدول۲).

**جدول ۱- رس شمار، میزبان، کشور، ناحیه ژنومی و اندازه قطعه جدایه‌ها یا استرین‌های WMV در بانک ژن**

| جدایه یا استرین | میزبان | کشور | منطقه ژنوم | طول(bp) | رس شمار Accession no. |
|---|---|---|---|---|---|
| WMV SG99.3 | *C. melo* | Spain | cp | 873 | AJ579519 |
| WMVMAD95.6 | *C. melo* | Spain | cp | 873 | AJ579509 |
| WMV | *C. melo* | Spain | cp | 873 | AJ579502 |
| WMV | *C. melo* | Spain | cp | 873 | AJ579493 |
| WMV | *C. melo* | Spain | cp | 873 | AJ579491 |
| WMV | *C. melo* | Spain | cp | 873 | AJ579486 |
| WMVM116 | | Spain | Nib-CP | 1602 | AF551334 |
| WMV | | Israel | cp | 843 | AF322376 |
| WMV Tonga | | | Nib-CP-UTR | 1656 | L22907 |
| WMV Habenari | | Japan | Nib-CP-UTR | 1180 | AB001994 |
| KER.JI.1 | *Citrullus colocynthis* | Kerman-Jiroft | cp | 822 | EU667627 |
| KER.KE.1 | *C. melo* L. | Kerman-Kerman | cp | 822 | EU667644 |
| YAZ.SH.1 | C.melo L. | Yazd-Sadogh | cp | 822 | EU667635 |
| YAZ.MO.1 | *Cucumis sativus* L.(cucumber) | Yazd-Mohsenabad | cp | 822 | EU667638 |
| ESF.ES.1 | *Cucurbita moschata*, Iranian cultivar | Esfahan-Esfahanak | cp | 822 | EU667637 |
| ESF.ES.2 | *C.melo* L. | Esfahan-Esfahanak | cp | 822 | EU667640 |
| YAZ.MO.2 | *Cucurbita pepo* | | cp | 822 | EU667630 |
| ESF.GA.1 | *C.sativus* L. (cucumber) | Esfahan-Gaz | cp | 822 | EU667641 |
| ESF.GA.2 | *Cucurbita maxima* | Esfahan-Gaz | cp | 822 | EU667634 |
| ESF.ES.3 | *C.sativus* L. (cucumber) | Esfahan-Esfahanak | cp | 822 | EU667633 |
| HOR.HA.1 | *C.melo* L. Shahabadi cultivar | | cp | 822 | EU667628 |
| ESF.GA.3 | *C.sativus* L. (cucumber) | Esfahan-Gaz | cp | 822 | EU667643 |
| ESF.ZA.1 | *Cucurbita moschata* Duch (pumpkin) Iranian cultivar | Esfahan-Zarinshahr | cp | 822 | EU667639 |
| ESF.ZA.2 | *C.melo* L. | Esfahan-Zarinshahr | cp | 822 | EU667636 |
| URO.NA.1 | *C.maxima* Duch. E Lam. (winter squash) | Uromiae-Naghadae | cp | 822 | EU667629 |
| URO.OS.1 | *C.melo* L., kesavarz Cultivar | | cp | 822 | EU667631 |
| ESF.ZA.3 | *C.sativus* L. (cucumber) | Esfahan-Zarinshahr | cp | 822 | EU667642 |
| YAZ.TA.1 | *Cucurbita pepo* (summer squash) | Yazd-Taft | cp | 822 | EU667632 |
| WMV | Pumpkin | Japan | NIb-CP | 1167 | AB353119 |
| WMV –F | Watermelon | France | precursor | 10035 | NC_006262 |
| WMV | | Australia | comp. | 1157 | D00535 |
| WMV | Melon | South Korea | CP-UTR | 10037 | AB369278 |
| WMV | | USA | comp. | 3308 | D13913 |
| WMV- Ch99/69 | | China | NIb-CP-UTR | 1154 | EF127832 |
| WMV -Pk | *C. melo* var flexuosus | Pakistan | comp. | 10039 | AB218280 |
| WMV -CHN | Watermelon | China | comp. | 10037 | DQ399708 |
| WMV | | New Zealand | | 1736 | AY995215 |
| WMV Pak | Snake gourd | Pakistan | NIb-CP_UTR | 2045 | AB127934 |
| WMV-Fr | | France | comp. | 10035 | AY437609 |
| WMV-HLJ | | China | cp | 852 | AY464948 |
| WMVMAL99.5 | *C. melo* | Spain | cp | 873 | AJ579524 |
| WMV | Watermelon | Bandar Torkaman 129 | cp | 958 | GQ421156 |
| WMV | Melon | Gonbad68 | cp | 958 | GQ421157 |
| WMV | Summer squash | Mashhad | cp | 963 | GQ421158 |
| WMV | Winter squash | Gorgan132 | cp | 958 | GQ421159 |
| WMV | Summer squash | Kordkuy127 | cp | 958 | GQ421160 |
| WMV | Summer squash | Shiraz | cp | 962 | GQ421161 |

cp: coat protein, Nib-CP UTR: Nuclear Inclusion Body-coat protein untranslated region, comp.: complete sequence

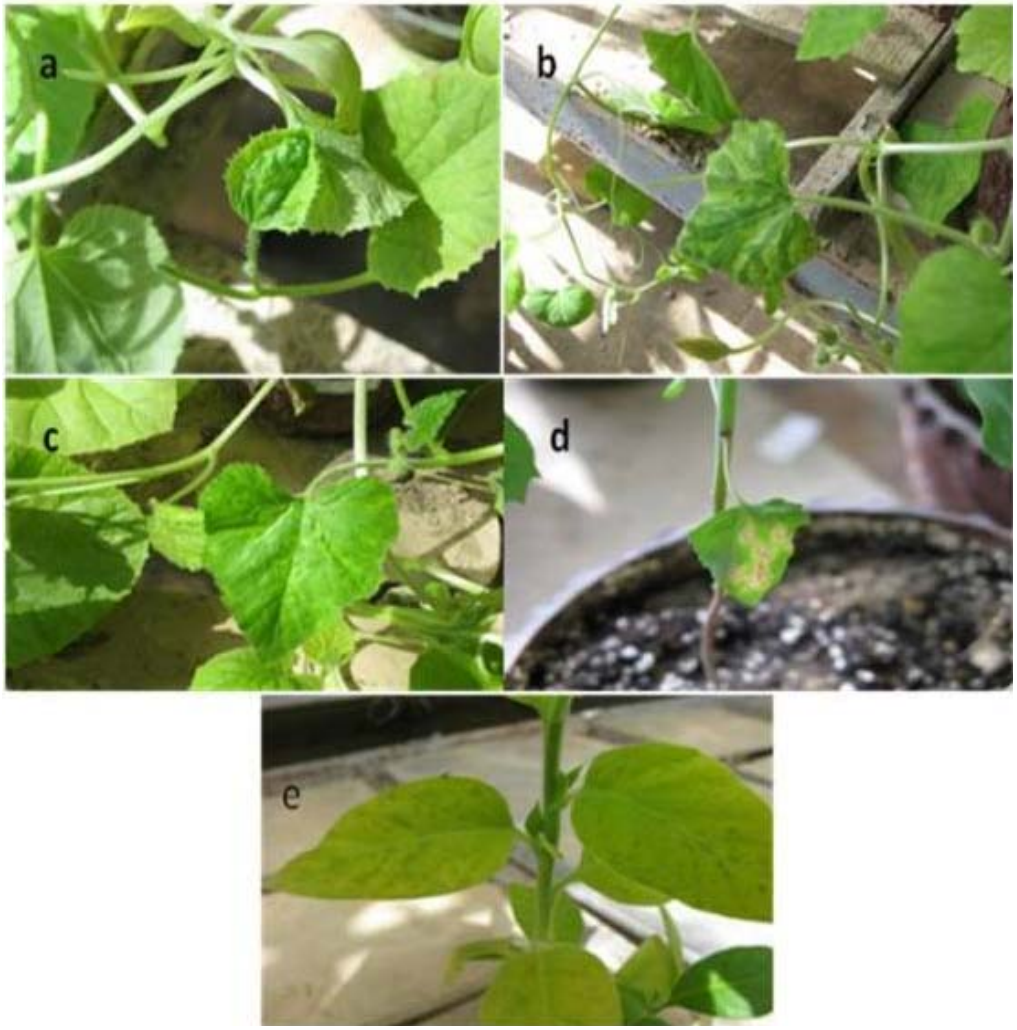
**شکل ۱- علایم WMVروی کدوییان. a. رگبرک نواری روی پهنک برگ کدو، b. موزاییک و تاولی شدن پهنک برگ کدو c. بدشکلی و تاولی شدن میوه خیار**

**جدول۲- تعداد و محل نمونه‌برداری گیاهان مختلف جالیزی و میزان آلودگی آن‌ها به WMV در شهرستان ارومیه در سال زراعی ۱۳۹۰-۱۳۸۹**

| محل نمونه‌برداری | تعداد نمونه مورد آزمایش | تعداد نمونه آلوده |
|---|---|---|
| وقاصلوی علیا | ۱۰ | ۳ |
| مرنگلوی بزرگ | ۱۷ | ۹ |
| ساری بگلوی چراغ | ۲۱ | ۳ |
| آده بزرگ | ۹ | ۴ |
| زرمانلو | ۱۰ | ۳ |
| قرابقلو | ۱۴ | ۴ |
| نازلو | ۱۰ | ۸ |
| الله لوی بزرگ | ۵ | ۲ |
| چنقرانلوی پل | ۱۲ | ۵ |
| زنبلان | ۶ | ۰ |
| امام زاده | ۴۸ | ۴ |
| میاوق | ۴ | ۰ |
| کشتیبان | ۵ | ۲ |
| یورقانلو | ۲۵ | ۷ |
| زینالو | ۲۵ | ۸ |
| قره جلو | ۱۴ | ۴ |
| طلاتپه | ۸ | ۳ |
| موش آباد | ۱۶ | ۶ |
| قوطولو | ۲۹ | ۸ |
| اصالوی کاظم | ۱۱ | ۱ |
| یکنجه | ۱۴ | ۷ |
| شمس اجیان | ۱۳ | ۳ |

**تعیین دامنه میزبانی ویروس موزاییک هندوانه**

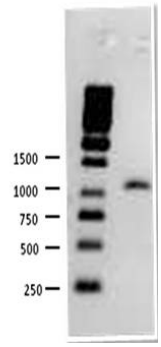
جهت بررسی دامنه میزبانی ویروس موزاییک هندوانه از گیاهان متنوعی متعلق به چهار خانواده استفاده گردید (جدول ۳). در این آزمون مشخص شد که ویروس روی *Cucurbita pepo* علایم رگبرگ نواری سبز، تاولی شدن و موزاییک، روی *C. melo* L.cv.Felexusus و *C. amaranticolor* Coste et Reyn لکه موضعی نکروز، روی *C. sativus* L.cv. Peto Seed رگبرگ نواری سبز و روی *N.tobacum* cv. Burly علامت موزاییک ایجاد کرد (شکل ۲). ویروس در سایر میزبان‌های مایه‌زنی شده از جمله *C. melo*، *Citrullus lanatus*، *Gomphrena globosa* و غیره فاقد علایم بود.




**شکل۲ –a . رگبرگ نواری روی پهنک برگ کدو b. تاولی شدن همراه با رگبرگ نواری برگ کدو c . موزاییک روی پهنک برگ کدو d. لکه موضعی نکروتیک بر روی سلمه تره (*Chenopodium amaranticolor*) e. موزاییک بر روی پهنک برگ توتون ( *N.tobacum* cv. Burly).**

## آزمون IC-RT-PCR

آزمون IC-RT-PCR با استفاده از عصاره گیاه آلوده به صورت IC-RT-PCR انجام شد. بعد از جداسازی قطعه تکثیر شده از روی ژل (شکل۳) و تعیین ترادف در دو جهت، اندازه قطعه مورد نظر، ۱۰۵۵ نوکلئوتید تعیین شد. از ترادف‌های حاصل پس از انجام تصحیحات و بدلیل خوب خوانده نشدن دو انتها، قطعه‌ای به اندازه ۹۵۸ نوکلئوتید به دست آمد. در این ترادف از موقعیت ۱ تا ۸۲۸ ژن پروتئین پوششی (CP)، از نوکلئوتید ۸۲۹ تا ۸۳۱ رمز پایانی TAA و از موقعیت ۸۳۲–۹۵۸ از ناحیه 3´UTR می‌باشد. این قسمت تعیین ترادف شده متناظر با موقعیت ۸۹۵۹ تا ۹۹۲۰ از ترادف کامل جدایه ایرانی IR02-1 (رس شمار EU660584) می‌باشد. ترادف جدایه ویروسی تعیین شده در این تحقیق با رس شمار JN597238 در بانک ژن قرار داده شد.



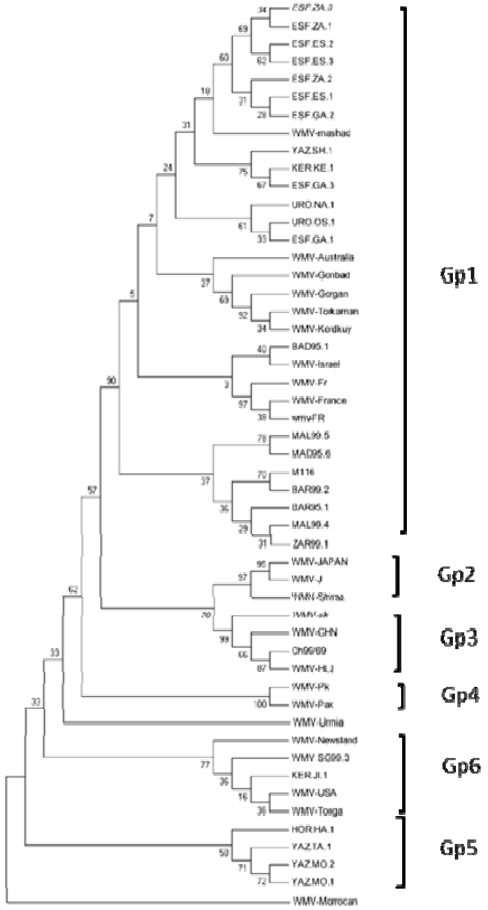

**شکل۳- الکتروفورز محصول PCR ویروس موزاییک هندوانه**

ترسیم درخت فیلوژنتیکی به روش parsimony maximum باهمردیف‌سازی ۷۷۴ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی ۴۹ جدایه WMV (شکل ۴) انجام و شاخه‌های با bootstrap کمتر از ۵۵ فشرده (condense) شدند. این ۵۰ جدایه در ۶ گروه به صورت زیر قرار گرفتند:

گروه ۱ شامل جدایه‌های اسپانیا، فرانسه، استرالیا، اسرائیل، اصفهان، دو جدایه جدا شده از نقده و اشنویه (ارومیه)، گرگان، گنبد کاووس، بندر ترکمن، کردکوی، مشهد، یک جدایه از کرمان و یک جدایه از یزد. گروه ۲ شامل جدایه شیراز و دو جدایه از ژاپن. گروه ۳ جدایه‌های چین، کره جنوبی و ژاپن. گروه ۴ دو جدایه پاکستان. گروه ۵ جدایه‌های یزد و یک جدایه از هرمزگان. گروه ۶ یک جدایه از کرمان، جدایه نیوزیلند، آمریکا و تونگا (یکی از جزایر جنوب شرقی آسیا). گروه ۱ با بیش‌ترین تعداد طیف وسیعی از جدایه‌های اروپاو خاورمیانه را در برگرفته است. تنها یک جدایه از استرالیا در بانک ژن وجود دارد که در این گروه قرار گرفته است. یک جدایه از کرمان، یک جدایه از یزد، جدایه بندر ترکمن، کردکوی، مشهد، اصفهان و دو جدایه از نقده و اشنویه در این گروه قرار می‌گیرند. گروه های ۲ و ۳ مربوط به جنوب شرق آسیا هستند. در گروه ۲، جدایه شیراز با دو جدایه ژاپن هم گروه شده است که بیانگر رابطه ژنتیکی بالا با سویه جدا شده از *Habernaria radiata* و یک سویه دیگر از ژاپن می‌باشد. گروه ۴ دو جدایه پاکستان و گروه ۵ مستقلا جدایه‌های یزد و هرمزگان را شامل می‌شود. گروه ۶ که شامل جدایه‌های کرمان (KERJI1)، نیوزیلند، اسپانیا، آمریکا و تونگا است از نظر توزیع جغرافیایی یک گروه نامتجانس‌تری را تشکیل می‌دهد. جدایه ارومیه ویروس موزاییک هندوانه در داخل هیچ‌کدام از این ۶ گروه قرار نگرفت.

## بحث

وضعیت ویروس‌های کدوییان در هر منطقه به عوامل متعددی بستگی دارد. در شرایط و مناطق مختلف غالبیت یک ویروس نسبت به ویروس‌های دیگر و یا نسبت آلودگی یک میزبان به میزبان دیگر متفاوت است (۷، ۱۰، ۱۲، ۲۰ و ۲۲). ویروس موزاییک هندوانه یکی از گسترده‌ترین پوتی‌ویروس‌های کدوییان در دنیا است که به محصولات جالیزی خسارت وارد می کند (۷ و ۲۰). در ایران مطالعات متعددی در مورد این ویروس انجام شده است. بیشترین علامتی که روی کدوییان منطقه دیده شد علامت موزاییک بود. شناسایی و تعیین پراکنش WMV در ارومیه در سال ۱۳۸۹ نشان داد که این ویروس در بیشتر مناطق ارومیه وجود دارد. ویروس تنها در دو منطقه زنبلان و میاوق مشاهده نشد که البته احتمال دارد تعداد نمونه‌های بررسی شده برای ارزیابی نهایی کم باشد.




**شکل ٤- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش maximum parsimony، بدست آمده از همردیف سازی ۷۷٤ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی ٤۹ جدایه WMV همراه با جدایه ارومیه. مقدار bootstrap، ۱۰۰ برای محاسبه فیلوژنتیکی به کار رفته است. مقادیر bootstrap بیشتر از ۵۵ روی گره‌ها نشان داده شده‌اند و ریشه‌های با ارقام کمتر فشرده شده‌اند.**

**جدول ۳- دامنه میزبانی ویروس موزاییک هندوانه جدایه ارومیه**

| گیاه مورد آزمون | خانواده | WMV علایم |
|---|---|---|
| ***Cucurbita pepo*** | **Cucurbitacae** | **رگبرگ نواری، موزاییک و تاولی شدن** |
| *Cucumis melo* | Cucurbitacae | فاقد علایم |
| L.cv.*Felexusus C. melo* | Cucurbitacae | موزاییک |
| *C. sativus* L.cv. *Peto Seed* | Cucurbitacae | رگبرگ نواری |
| *Citrllus lantanus* Thunb.cv. Crimson Sweet | Cucurbitacae | فاقد علایم |
| *Gomphrena globosa* L. | Amaranthaceae | فاقد علایم |
| *Chenopodium quinoa* Wild. | Chenopodiaceae | فاقد علایم |
| *C. amaranticolor* Coste et Reyn | Chenopodiaceae | لکه موضعی نکروز |
| *C. mural* L. | Chenopodiaceae | فاقد علایم |
| *C. album* L. | Chenopodiaceae | فاقد علایم |
| *Nicotiana clevelandii* Gray | Solonaceae | فاقد علایم |
| *N.tobacum* cv. Burly | Solonaceae | موزاییک |
| *Nicotiana tobacum* L.cv. Turkish | Solonaceae | فاقد علایم |
| *N.tabacum* L.cv. Samson | Solonaceae | فاقد علایم |
| *N. glutinosa* L. | Solonaceae | فاقد علایم |

از بین گیاهان جالیزی، کدوی زمستانی بیش‌ترین میزان آلودگی را به خود اختصاص داد و کم‌ترین میزان آلودگی مربوط به هندوانه بود. در بررسی که توسط شعیبی و همکاران در سال ۱۳۸۸ در استان گلستان انجام شد، خربزه بالاترین میزان آلودگی و خیار پایین‌ترین میزان آلودگی را نشان داد. این اختلاف احتمالاً مربوط به اختلاف در نوع و میزان محصول کشت شده در این مناطق می‌باشد. در منطقه ارومیه بیشترین سطح کشت به کدوی زمستانی مربوط می‌شود. در این بررسی دامنه میزبانی این ویروس به گیاهان جالیزی محدود می‌شود اما در شرق گیاهان دیگری مانند Hebarnaria و وانیل نیز به عنوان میزبان گزارش شده‌اند (۶ و ۲۰).بررسی ژن پروتئین پوششی جدایه ارومیه با ۴۹ جدایه WMV از بانک ژن به روش‌های neighbor joining، maximum parsimony و maximum likelihood نشان داد که جدایه ارومیه داخل هیچکدام از ۶ گروهی که قبلاً توسط محققین دیگر تعیین شده بود قرار نگرفته و یک شاخه کاملاً مجزایی ایجاد کرد. جدایه‌ای که در این تحقیق بررسی شد از کدوی زمستانی از ارومیه جدا شد و با دو جدایه قبلی جدا شده از این منطقه توسط شریفی و همکاران (۱۶) در یک گروه نیز قرار نمی‌گیرد. در تحقیق حاضر از همردیف سازی ۷۷۴ نوکلئوتید در جدایه‌ها برای ترسیم درخت‌های فیلوژنتیکی استفاده شد درحالی که شعیبی و همکاران (۱) از همردیف سازی ۷۵۰ نوکلئوتید استفاده کرده‌اند. براساس بررسی انجام شده توسط شعیبی و همکاران (۱) مشخص شده است که WMV احتمالا در شرق نسبت به خاورمیانه و اروپا قدمت تکاملی طولانی‌تری داشته و از آنجا به طرف غرب یعنی خاورمیانه و سپس اروپا وارد شده است. اگرچه درخت فیلوژنتیک در بعضی از موارد با توزیع جغرافیایی هم‌خوانی دارد ولی قرابت فیلوژنتیکی یا هم گروه شدن بعضی از جدایه‌ها از مناطق مختلف جهان با یکدیگر، همانطور که در بعضی از شاخه‌ها دیده می‌شود انطباق کاملی با قرابت جغرافیایی ندارد. در کنار هم قرار گرفتن جدایه های نیوزیلند، اسپانیا، آمریکا و تونگا در شاخه ۶، جدایه استرالیا با جدایه‌های مشهد و گرگان در شاخه ۱ و نیز جدایه‌ای از اسپانیا و فرانسه با جدایه‌های ایران در شاخه ۱ و جدایه شیراز با جدایه‌های ژاپن، چین و کره جنوبی هماهنگی توزیع جغرافیایی با قرابت فیلوژنتیک را بر هم می‌زند. این توزیع نشان می‌دهد که انتشار جهانی و گسترده WMV نمی‌تواند تنها به وسیله ناقلین طبیعی یعنی شته‌ها صورت گیرد و این مسئله احتمال دخالت انسان و به بیان دیگر انتشار با بذر را تقویت می‌کند. نکته دیگری که بایستی در مورد تنوع جدایه های ایرانی بیان کرد این است که این احتمال وجود دارد که WMV بیش از یک بار به طرق مختلف به ایران وارد شده است. در این تحقیق بدلیل کمبود امکانات تنها یک جدایه که از روی کدوی زمستانی جدا شده بود تعیین ترادف شد و در بررسی فیلوژنتیکی بکار رفت. برای نتیجه‌گیری بهتر تعیین ترادف چندین جدایه از ارومیه و از روی گیاهان دیگر نیز ضروری به نظر می‌رسد.

## منابع


۱-شعیبی س.، معصومی م.، نصراله نژاد س.، حیدری س.، ایزدپناه ک. و احمدی خواه ا. ۱۳۸۸. تعیین ترادف شش جدایه ایرانی ویروس موزاییک هندوانه و مقایسه فیلوژنتیکی جدایه‌های ایران با سایر جدایه‌های دنیا. بیماری‌های گیاهی ۴۵: ۱۵۴-۱۴۳.

2-Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., and Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403-10.

3-Bahar M., Danesh D., and Filsouf F. 1983. Prevalence and identity of cucurbit infecting viruses in Isfahan. Proc. 7th Plant Prot. Congr, Karaj, Iran. p 72.

4-Clark M.F., and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme- immunosorbent assay for the detection of linked plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.

5-Ebrahim-Nesbat F. 1974. Distribution of watermelon mosaic viruses 1 and 2 in Iran. Journal of phytopathology 79, 352-358.

6-Gara I.W., Kondo H., Maeda T., Inouye N., and Tamada T. 1997. Stunt disease of *Habenaria radiata* caused by a strain of *Watermelon mosaic virus*. Annual Review of Phytopathology, 63: 113–117.

7-Grafton-Cardwell E., Perring T.M., Smith R.F., Valencia J., and Farrar C.A. 1996. Occurrence of mosaic viruses in melons in the central valley of California. Plant Disease, 80: 1092-1097.

8-Huth W. 1999. Tissue print immunoassay-a rapid and reliable method for routinely detecting gramineae viruses. Plant Research Development 49**:**7-19.

9-Lovisolo O. 1980. Virus and viroid disease of cucurbits. Acta Horticulture 88: 33-81.

10-Massumi H., Samei A., Hosseini A., Pour A., Shaabanian M., and Rahimian H. 2007. Occurrence, distribution and relative incidence of seven viruses infecting greenhouse-grown cucurbits in Iran. Plant Diseases, 91: 159–163.

11-Parvizy R. 1989. Importance of cucurbitaceae viruses in Ourmia. p165.Proc. 9th Plant Protec. Cong. Mashhad, Iran.

12-Perring T.M., Farrar C.A., Mayberry K., and Blua M.J. 1992. Research reveals pattern of cucurbit virus spread. California Agriculture, 46: 35-40.

13-Purcifull D.E., Hiebert E., and Edwardson J. 1984. *Watermelon mosaic virus 2*. Description of Plant Viruses CMI/AAB.

14-Rahimian H., and Izadpanah K. 1987. Identity and prevalence of mosaic inducing cucurbit viruses in Shiraz, Iran. Journal of Phytopathology, 92:305-312.

15-Shabanian M., Masomi H., Hoseinipour A., Heidarnejad J., and Azami Z. 2007. Identification and distribution of cucumber-infecting viruses in the Jiroft greenhouses and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* collected from this region. Journal of Science and Technology (Agriculture and Natural Resources), 11: 393 – 406.

16-Sharifi M., Massumi H., Heydarnejad J., Hossein Pour A., Shaabanian M., and Rahimian H. 2008. Analysis of the biological and molecular variability of *Watermelon mosaic virus* isolates from Iran. *Virus Genes* **37**, 304–313.

17-Shoeibi S., Masumi M., Nasrollanezhad S., Heydari S., Izadpanah K., and Ahmadikhah A. 2009. Sequencing of six Iranian isolates of *Watermelon mosaic virus* and phylogenetic comparison of Iranian isolates with other isolates of the world. Journal of Plant Pathology, 2: 39-42.

18-Sukla D., Ward W., and Brunt A. 1994. The *Potyviridae*. CAB International.Wallingford.

19-Tamura K., Dudley J., Nei M., and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24,1596-1599.

20-Ullman D.E,. Cho J.J., and German G.L. 1991. Occurrence and distribution of cucurbit viruses in Hawaiian Islands. Plant Diseases 75, 367-370.

21-Wang Y.Y., Beck D.L., Gardner R.C., and Pearson M.N. 1993. Nucleotide sequence, serology and symptomatology suggest that *Vanilla necrosis Potyvirus* is a strain of *Watermelon mosaic virus II*. Archives of Virology, 129: 93-103.

22-Yuki V.A., Rezende, J.A.M., Kitajima E.W., Barroso P.A.V., Kuniyuki H., Groppo G.A., and Pavan M.A. 2000. Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of Sao Paulo, Brazil. Plant Diseases, 84: 516-520.