

تعیین توالی کامل RNA2 یک جدایه از ویروس موزاییک کدو (*SqMV*) از استان خراسان جنوبی در ایران

محدثه گرامی نوقابی^۱ - محسن مهرور^{۲*} - محمد زکی عقل^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۶

چکیده

ویروس موزاییک کدو (*Squash mosaic virus, SqMV*)، تقریباً در تمامی نقاط کشت این محصول در دنیا گسترده بوده، و یکی از عوامل مهم خسارت و کاهش بازارپسندی این محصول می‌باشد. به منظور شناسایی و بررسی برخی از خصوصیات مولکولی ویروس موزاییک کدو، در سال ۱۳۹۴ از مزارع عمده کشت خربزه در استان خراسان جنوبی، تعداد ۶۲ نمونه برگ‌های دارای علائم جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده توسط آزمون مولکولی RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده مربوط به پروتئین پوششی، قطعه‌ای به طول ۱۹۰۰bp جهت شناسایی نمونه‌های آلوده تکثیر گردید. سپس از بین نمونه‌های آلوده، یک نمونه (شهرستان طبس) انتخاب، و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، RNA2 ویروس به طول ۳۲۷۱ جفت باز، طور کامل تعیین توالی گردید. RNA2 ایزوله طبس دارای یک ORF بوده که با AUG121 آغاز و در UAG3148 پایان یافته و پلی پروتئینی به طول ۱۰۰۹ آمینو اسید را کد می‌کند. مقایسه توالی پلی پروتئین RNA2 بدست آمده با جدایه‌های موجود در بانک ژن نشان داد، که جدایه تعیین توالی شده دارای بیشترین درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی (۸۸/۴۵ درصد) و آمینو اسیدی (۹۰/۵۹ درصد)، با جدایه‌ای از استرالیا (شماره دسترسی MF166754) بوده و کمترین درصد تشابه آن در سطح نوکلئوتیدی (۸۶/۸۲ درصد) با جدایه‌ای از ژاپن (شماره دسترسی NC_003800) و در سطح آمینو اسیدی (۸۶/۳۶ درصد) با جدایه اسپانیا (شماره دسترسی KP223324)، بود. بررسی‌های فیلوژنتیکی جدایه‌های SqMV را در دو گروه مجزا قرار داد که جدایه خراسان جنوبی - طبس در کنار جدایه‌هایی از چین (EU 421060)، آریزونا (AF059532) و اسپانیا در یک زیرگروه قرار گرفت که نشان‌دهنده قرابت این جدایه‌ها با یکدیگر است.

واژه‌های کلیدی: توالی‌یابی، ویروس موزاییک کدو، ایران، RNA2

مقدمه

است که توسط بذر، سوسک و به صورت مکانیکی منتقل شده، باعث ایجاد بیماری‌های مهمی در دامنه وسیعی از گیاهان جنس *Cucumis* و *Cucurbita* می‌شود (۵ و ۶). این ویروس دارای ژنوم RNA مثبت تک رشته‌ای دو قسمتی است (RNA-1، RNA-2) که هر کدام درون پوشش پروتئینی جداگانه‌ای بنام پروتئین پوششی بزرگ و کوچک قرار می‌گیرند (۱۴). RNA1 ویروس SqMV پلی پروتئینی را کد می‌کند که در برگ‌برنده پلی‌مراز ویروسی، هلیکاز، پروتئاز و VPg بوده و RNA2 ویروس کد کننده پلی پروتئینی شامل پروتئین حرکتی (MP)، پوشش پروتئینی بزرگ (Large Capsid Protein, LCP)، پوشش پروتئینی کوچک (Small Capsid Protein, SCP) می‌باشد. هر دو قطعه ژنومی ویروس دارای دم پلی آدنیل در انتهای ۳ و پروتئین VPg در انتهای ۵ هستند (۷ و ۶).

کلروز، موزاییک شدید، نخ‌شدن برگ‌ها و کم‌رشدی همگی از علائم ویروس SqMV روی کدو و خربزه هستند (۶). این ویروس تا

بر اساس آمار فائو (۲۰۱۶) ایران یکی از پنج کشور اول تولید کدوئیان در جهان است. حدود ۳۵ ویروس از روی کدوئیان در ایران گزارش شده است (۲ و ۱۵). در سال‌های اخیر ویروس موزاییک کدو (*Squash mosaic virus, SqMV*) به دلیل گستردگی وسیع، روی کمیت و کیفیت محصولات تأثیر مهمی گذاشته و عملاً بازارپسندی آن‌ها را کاهش داده است (۳ و ۹).

ویروس موزاییک کدو (SqMV) یکی از اعضای جنس *Comovirus*، زیر خانواده *Comovirinae* و خانواده *Comoviridae*

۱، ۲ و ۳ - به ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشیار و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*) نویسنده مسئول: (Email: Mehrvar_M@yahoo.com)

به منظور تعیین توالی کامل RNA-2 ویروس SqMV، تعداد سه جفت آغازگر که دارای منطقه هم پوشان بودند، بر اساس ایزوله ژاپن (شماره دسترسی NC-003800) به صورت دستی طراحی گردید (جدول ۱).

در واکنش ساخت رشته مکمل (cDNA)، به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر ۳ میکرولیتر از آر. ان. ا. کل استخراج شده با ۲ میکرولیتر از آغازگر اختصاصی S-R1 (جدول ۱) و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط و میکروتیوب در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۲ میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۴ میکرولیتر بافر ۵x واکنش و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Thermo scientific Reverse Transcriptase) به مخلوط اضافه گردیده و میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد ترموسایکلر قرار گرفت (۲۰).

به منظور واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مقدار ۴ میکرولیتر از cDNA، ۲ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت (S-R1 و S-F1) و مقدار ۱۲ میکرولیتر از Red Ampliqon PCR mix kit در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با یکدیگر مخلوط شدند. پروفایل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک چرخه در دمای ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه در مرحله واسرشت‌سازی، ۵۵°C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۵ ثانیه و در نهایت یک سیکل ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر (بیومترا-آلمان) انجام گردید.

کنون از آمریکا، اسپانیا، استرالیا، ژاپن، چین و جمهوری چک گزارش شده است (۱۹، ۱۱، ۴ و ۱۲).

با توجه به موقعیت کشور در تولید این محصولات و از آن جا که بررسی مولکولی صورت گرفته بر روی این ویروس محدود به پژوهش های شمشیری و نصرآبادی و همکاران می‌باشد (۱۳ و ۱۷)، لذا این تحقیق با هدف تعیین توالی کامل RNA-2 ویروس انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در بهار و تابستان سال ۱۳۹۶ تعداد ۴۶ نمونه‌ی خربزه (*Cucumis melo*) مشکوک به آلودگی به ویروس SqMV که دارای علائمی مانند موزاییک، تاولی، بندکشی شدن و بدشکلی برگ‌ها بودند، از مزارع متعدد شهرستان‌های طبرس، بشرویه و گناباد جمع‌آوری شدند.

استخراج RNA ویروس

به منظور استخراج RNA کل، از کیت استخراج (RNeasy RNA Mini Kit شرکت کیژن (Qiagen-Germany) استفاده گردید. RNA خالص‌سازی شده طبق دستورالعمل شرکت سازنده جهت آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی SqMV در واکنش RT-PCR برای تعیین توالی کامل RNA2

Table 1- SqMV specific primer pairs for complete genome sequence of SqMV RNA2 by RT-PCR

نام آغازگر Primer	ژن Gene	طول قطعه (جفت باز) Product size(bp)	محل اتصال Position	طول Size	توالی Sequence
S_F1	RNA2-MP	1700	1-22	21	5'-TGTAAGTTTGAGAGAGTTTAA-3'
S_R1	RNA2-MP	1700	1689-1711	20	5'-CGAAGGGAAGTAGTATCATCCAA-3'
S-F2	CpL, CpsRNA2	1900	1464-1487	23	5'-TGTGTACAAGATTGGTGGAGATGC-3'
S-R2	CpL, CpsRNA2	1900	3421-3441	20	5'-(AGGCTTCTAAAGCGAACTGGG-3'
S-R3	NTR	2200	3470-3495	25	5'-AAAGAAAACAAGCTCTTAAAATTTAT-3'

قطعات تکثیر شده در PCR با استفاده از کیت Denazist Gel Extraction Kit مطابق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل خالص سازی شده (Denazist-Iran) و به همراه ناقل PTG19 (Vivantis) (Malaysia) و آنزیم Takara-Japan (Takara-Japan) T4 DNA Ligase به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا قطعه ژنی وارد ناقل گردد. همسانه‌سازی ناقل در باکتری *E. coli* سویه DH5α به روش شوک حرارتی انجام شد. استخراج پلاسمید نوترکیب از سلول باکتری با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Denazist Plasmid DNA Isolation Kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت

مراحل فوق برای آغازگرهای (S-R2 و S-F2) و (S-F2 و S-R3) نیز تکرار شد.

محصول PCR در ژل آغاز ۱ درصد حاوی ۲ میکرولیتر از Green viewer به همراه سایز مارکر (GeneRuler 100pb Plus) (DNA Ladder Thermo scientific Cat No SM: 0321)، الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داگ (ساخت شرکت GeneFlash) عکس‌برداری شد.

همسانه‌سازی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی

فیلوژنتیکی به کمک نرم‌افزار MEGA 6 و Bootstrap در ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

در نمونه‌های آلوده به *SqMV* علائم بندکشی، موزاییک، تاولی و بد شکلی مشاهده گردید (شکل ۱). ابتدا برای اطمینان از حضور ویروس در نمونه‌های دارای علائم به کمک آغازگرهای (S-F2) و (S-R2) قطعه ژنی پوشش پروتئینی ویروس تکثیر شد و با مشاهده باند ۱۹۰۰bp در ژل الکتروفورزی تأیید شد. سپس در میان نمونه‌های آلوده یک نمونه از طیس برای تعیین توالی کامل RNA2 انتخاب و سپس با آغازگرهای (S-F1) و (S-R1) و (S-F2) و (S-R3) سایر بخش‌های ژنومی تکثیر شدند.



شکل ۱- علائم بیماری ناشی از ویروس *SqMV* در نمونه‌های جمع‌آوری شده از خربزه طیس، علائم بصورت تاولی، بندکشی و موزاییک
Figure 2- Symptoms induced by *SqMV*. Symptoms in collected samples of melon were consist of blistering, shoe string and mosaic

می‌تواند مربوط به سایر ویروس‌های آلوده‌کننده کدوئیان و یا سایر عوامل باشد.

توالی یابی کامل RNA2 ایزوله طیس نشان داد که این قطعه ژنی دارای ۳۲۷۱ جفت باز و یک ORF می‌باشد که توالی نسبتاً حفاظت شده‌ای داشته و پلی پروتئینی به طول ۱۰۰۹ آمینواسید را کد می‌کند. بیان این پلی پروتئین با AUG121 آغاز و در UAG3148 خاتمه می‌یابد. هم چنین توالی‌های non coding در ۵' و ۳' ویروس، به ترتیب ۱۲۰ و ۱۲۴ جفت باز داشته که در هر دوی این مناطق درصد بازهای C و G کم بوده و در عوض غنی از باز U می‌باشد، این امر با نتایج سایر محققان نیز مطابقت دارد (۸).

مقایسه توالی کامل RNA2 جدایه طیس (Tabas) با سایر جدایه‌های جهان، بر اساس هر سه ژن موجود در این قطعه ژنی (MP، LCP و SCP) و نیز بر اساس پلی پروتئین صورت گرفت. مطابق

گرفت. پلاسمیدهای نوترکیب جهت تعیین ترادف با آغازگرهای عمومی M13 به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

مقایسه توالی‌ها و آنالیزهای مولکولی

توالی‌های رفت و برگشت هر قطعه ژنی به وسیله نرم‌افزار بلاست بررسی و پس از حصول اطمینان با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI Advance™ 9.0 توالی‌ها به یک توالی نهایی تبدیل شده، ترادف ناقل پلاسمیدی از توالی‌ها حذف شدند. سپس سه قطعه ژنی به وسیله نقاط هم‌پوشان به یک توالی واحد تبدیل و کل RNA2 ژنومی توالی یابی شد. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی از جدایه‌های موجود در بانک ژن بهره گرفته شد.

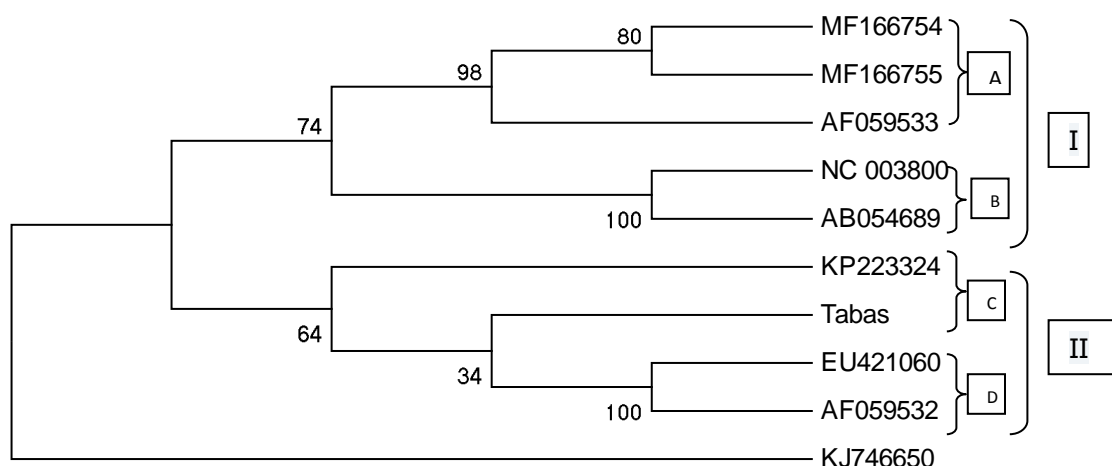
هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌ها، ترجمه پروتئینی هر قطعه ژنی با نرم‌افزار DNAMAN v4.02 انجام شد. ماتریس درصد شباهت بین جدایه‌های *SqMV* با استفاده از نرم‌افزار Clustal w2 و درخت

بیشتر جدایه‌هایی که تاکنون از سراسر دنیا گزارش شده اند از جمله کالیفرنیا (۱۱)، آریزونا (۱۴)، کانادا (۱۰)، ژاپن (۱۹)، یونان (۱) و ایران (۱۳) مربوط به گیاه خربزه بوده، از همین رو ما در این تحقیق تنها از میزبان خربزه برای شناسایی و بررسی این ویروس استفاده کردیم.

بررسی‌های سمیعی و همکاران (۱۶) در سال‌های ۱۳۸۳-۱۳۸۱ و نیز پژوهش‌های شمشیری و همکاران از استان‌های یزد و خراسان (۱۷) بیانگر این مطلب است که پراکنش ویروس موزاییک کدو در ایران محدود می‌باشد. در این تحقیق نیز از میان نمونه‌های جمع‌آوری شده، تنها تعداد ۸ نمونه (۱۲/۰۹ درصد) آلودگی به ویروس را در آزمون مولکولی نشان دادند. اگر چه تعداد زیادی از نمونه‌های جمع‌آوری شده علائم شدید ویروسی را نشان می‌دادند اما آلودگی آن‌ها در آزمون RT-PCR تأیید نشد و می‌توان نتیجه گرفت که این علائم

بر اساس ژن LCp جدایه طیس دارای بیشترین درصد شباهت در سطح نوکلئوتیدی (۸۸/۴۵ درصد) و آمینواسیدی (۹۰/۵۹ درصد)، با جدایه‌ای از استرالیا (MF166754) بوده و کمترین درصد تشابه آن در سطح نوکلئوتیدی (۸۶/۸۲ درصد) با جدایه‌ای از ژاپن (NC_003800) و آمینواسیدی (۸۶/۳۶ درصد) با جدایه اسپانیا (KP223324) بود. بر اساس ژن MP جدایه طیس دارای بیشترین درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی (۸۸/۲۱ درصد) و در سطح آمینواسیدی (۹۷/۲۴) با جدایه اسپانیا (KP223324) و کمترین درصد تشابه (۸۲/۶۲ درصد) با جدایه Kimble (AF059533) در سطح نوکلئوتیدی و (۹۱/۹۶) در سطح آمینواسیدی با جدایه استرالیا (MF166754) می‌باشد.

نتایج به دست آمده جدایه طیس دارای بیشترین درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی (۸۸/۴۵ درصد) و آمینواسیدی (۹۰/۵۹ درصد)، با جدایه‌ای از استرالیا (MF166754) بوده و کمترین درصد تشابه آن در سطح نوکلئوتیدی (۸۶/۸۲ درصد) با جدایه‌ای از ژاپن (NC_003800) و آمینواسیدی (۸۶/۳۶ درصد) با جدایه اسپانیا (KP223324) بود. بر اساس ژن MP جدایه طیس دارای بیشترین درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی (۸۸/۲۱ درصد) و در سطح آمینواسیدی (۹۷/۲۴) با جدایه اسپانیا (KP223324) و کمترین درصد تشابه (۸۲/۶۲ درصد) با جدایه Kimble (AF059533) در سطح نوکلئوتیدی و (۹۱/۹۶) در سطح آمینواسیدی با جدایه استرالیا (MF166754) می‌باشد.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی رسم شده توسط نرم‌افزار MEGA7 بر اساس توالی پلی پروتئین RNA2 جدایه‌های مختلف SqMV، به روش Maximum likelihood و ۱۰۰۰ تکرار

جدایه‌های استرالیا (MF166754 و MF166755)، جدایه Kimble (AF059533)، جدایه‌های ژاپن (NC003800 و AB054689)، جدایه اسپانیا (KP223324)، جدایه چین (EU421060) و جدایه آریزونا (AF059532)، جدایه KJ746650 مربوط به ویروس Cowpea mosaic virus به عنوان Out Group استفاده شده است.

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

ساختار ثانویه شده و در نهایت تفاوت‌هایی بیولوژیکی و میزبانی را برای جدایه‌های مختلف ویروس رقم زند (۷). از آن‌جا که ویروس SqMV یک ویروس بذرزاد می‌باشد (۵ و ۶) و نیز با توجه به اینکه ۹۹ درصد بذور خربزه مورد استفاده در کشاورزی در سال‌های اخیر از کشورهای هلند و به ویژه آمریکا وارد شده است (۱۸)، شاید بتوان نتیجه گرفت که ویروس موزاییک کدو از طریق بذور آلوده از سایر کشورها وارد ایران شده و در داخل کشور توسط بذر و حشرات ناقل (سوسک) پراکنده شده است.

همان‌طور که تنوع توالی‌یابی موجود در بین ایزوله‌های SqMV در دنیا حاکی از تفاوت قابل توجه بین آن‌ها بود، نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی نیز نشان داد که جدایه‌های SqMV در دو گروه فیلوژنتیکی مجزا قرار می‌گیرند که جدایه طیس به همراه جدایه‌های چین، اسپانیا و آریزونا در یک زیرگروه قرار گرفته‌اند. این نتیجه بر مشاهده نلسون و ناتسون (۱۹۷۳) مبنی بر وجود ۶ نژاد بیولوژیکی متفاوت در جدایه‌های ویروسی SqMV تطابق دارد، به طوری که شاید این تفاوت‌های ژنتیکی منشاء تفاوت‌های بیولوژیکی جدایه‌های ویروس باشند (۱۴ و ۷). هودنشید و همکاران همچنین معتقدند که ممکن است توالی نوکلئوتیدی خاصی در هر یک از RNA های ویروسی وجود داشته باشد که منجر به تغییرات آمینواسیدی و یا ایجاد

منابع

- 1- Avgelis A.D., and Katis N. 1989. Occurrence of Squash mosaic virus in melons in Greece. *Plant Pathology* 38: 111-113.
- 2- Bananej K., and Vahdat A. 2008. Identification, distribution and incidence of viruses in field grown cucurbit crops of Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 247-257.
- 3- Campbell R.N. 1971. *Squash mosaic virus*. Description of plant viruses. Applied Biology. No. 43, 4p.
- 4- 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: 866-870.
- 5- Freitag J.H. 1956. Beetle transmission, host rang and properties of *Squash mosaic virus*. *Phytopathology* 46: 73-81.
- 6- Goldbach R.W., and Wellink J. 1996. *Comoviruses: molecular biology and replication*. In *The Plant Viruses. Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes* 5: 35-76.
- 7- Haudenshield J.S., and Palukaitis P. 1998. Diversity among isolates of *squash mosaic virus*. *Journal of General Virology* 79: 2331-2341.
- 8- Hu J., Zhou T., Liu L., Peng B., Li H., Fan Z., and Gu Q. 2009. The genomic sequences of a Chinese isolate of *Squash mosaic virus* with novel 5' conserved ends. *Virus Genes* 38: 475-477.
- 9- Hull R. 2002. *Mathews Plant Virology*. Academic press New York.
- 10- 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.
- 11- Kendrick J.B. 1934. Cucurbit mosaic transmitted by muskmelon seed. *Phytopathology* 24: 820-823.
- 12- Li R., Gao A.S., Berendsen B.S., Fei C.Z., and Linga B.K. 2015. Complete Genome Sequence of a Novel Genotype of *Squash Mosaic Virus* Infecting Squash in Spain. *Genome Announcements*. V3. 13-14.
- 13- Nasr Abadi A., Mehrvar M., and Zaki Aghl M. 2018. Identification and Molecular Analysis of *Squash mosaic virus* in Khorasan Razavi, Southern Khorasan and Mazandaran Provinces. *Journal of Plant Protection* 31: 576-580.
- 14- Nelson M.R., and Knuhtsen H.K. 1973. *Squash mosaic virus* variability: review and serological comparisons of six biotypes. *Phytopathology* 63: 920-926.
- 15- Privvidenti R., Gonsalves D., and Humaydan H.S. 1984. Occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California. *Plant Disease* 68: 443-446.
- 16- Samiee A. 2004. Identification, distribution and some characteristics of viruses that infect greenhouse Iran. Master thesis. Master thesis. 158pp.
- 17- Shamshiri N. 2008. Biology and genome characterization features *Squash mosaic virus* isolates in Iran. Master thesis. Shahid Bahonar university of Kerman.
- 18- Sobhani A.R., and Hmidi H. 2015. Melon breeding and production management. Tak press.
- 19- Yoshida K., Goto T., Nemoto M., and Tsuchizaki T. 1980. *Squash mosaic virus* isolated from melon (*Cucumis melo* L.) in Hokkaido. *Annual Phytopathology Society Japan*, 46: 349-356.
- 20- Zimmern D. 1975. The 5' end group of tobacco mosaic virus RNA is m7 G5'ppp5'Gp. *Nucleic Acids Research* 2: 1189-1201.

The Complete Nucleotide Sequence of Genomic RNA2 of *Squash Mosaic Virus* (SqMV) in Southern Khorasan Province of Iran

M. Gerami Nooghabi¹- M. Mehrvar^{2*}- M. Zaki Aghl³

Received: 04-07-2018

Accepted: 17-11-2018

Introduction: Squash mosaic virus (SqMV) is a member of the genus Comovirus in the family Comoviridae. It is a seedborne and beetle-transmitted virus infecting most plants in the genera Cucurbita and Cucumis. Like other comoviruses, SqMV has a bipartite positive-strand RNA genome consisting of RNA1 and RNA2, which are separately encapsidated in isometric particles of 28 nm in diameter. The genomes contain a poly (A) tail at the 3'-terminus and the genome-linked viral protein (VPg) attached to the 5'-end. It has been frequently reported in North and South America and Japan. Isolates from different regions have been extensively characterized and based on agar double-diffusion serological tests and host reactions, those isolates had been classified into different serogroups and biotypes. SqMV, which causes a serious disease of cucurbits, is transmitted by beetles and plant-plant contact and is readily seedborne in cucurbits. Fifteen species including, *Cowpea mosaic virus* (CPMV; type member), *Andean potato mottle virus* (APMoV), *Bean pod mottle virus* (BPMV), *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), and *Red clover mottle virus* (RCMV) are distinguished in the genus *Comovirus*. SqMV has been reported frequently from North and South America, and less often from Australia, Israel, and Japan. Nelson and Knuhtsen have extensively characterized SqMV isolates from the United States and Puerto Rico biologically and serologically. They reported that SqMV isolates in the western hemisphere could be classified into six biotypes based on host reactions, but only into two serotypes (group I and II) by agar double-diffusion serological tests.

Materials and Methods: Plant material and virus isolates

In order to verify the presence of this virus in Southern Khorasan (Tabas) province of Iran and characterize some molecular aspects of it, 62 symptomatic leaf samples showing mosaic, vein clearing and distortion were collected from melon fields in growing season of 2015. RT-PCR reactions were used as a molecular method for the virus detection. The symptomatic leaves samples were used for RNA extraction using Rneasy mini Kit (Qiagen) and the extracted RNA were used directly or stored at minus 70 °C.

- RT-PCR and sequencing

An amplification of the expected size of 1900bp for SqMV coat protein gene was obtained followed by specific primers for complete genome sequencing of RNA2. The SqMV total RNA2 was sequenced.

Results and Discussion: In spring and summer 2015, a survey was carried out in southern Khorasan province of Iran which were under the cultivation of melon (Tabas) in order to assess the current situation of SqMV. The 62 gathered samples were tested for the presence of SqMV. The symptoms were mostly mosaic, vein clearing and distortion. RT-PCR was developed using three pairs of specific primers targeting SqMV total poly protein and RNA2. The detection method was validated with melon plants sampled in fields known to be infested by this virus. The RT-PCR method also allowed SqMV to be detected in fruit and leaf samples. The RNA2 of Tabas isolate was 3271 nt in length, excluding the 3'terminal poly (A) tail. This sequence encoded a single ORF starting at AUG121 and terminating at UAG3148. This isolate translates a polyprotein containing 1009 amino acids with 110.99 KDa. The results showed that Iranian isolate RNA2 poly protein shared the highest nucleotide (88.45%) and amino acid (90.59%) identity with an Australia isolate (MF166754) and the lowest identity with a Japan isolate (NC_003800) 86.82% and Spanish isolate (KP223324) 86.36% in amino acid and nucleotide level, respectively.

Conclusion: The results illustrated that Iranian isolate RNA2 poly protein shared the highest nucleotide (88.45%) and amino acid (90.59%) identity with an Australia isolate (MF166754) and the lowest identity with a Japan isolate (NC_003800) 86.82% and Spanish isolate (KP223324) 86.36% in amino acid and nucleotide level, respectively. Phylogenetic analysis of SqMV RNA2 nucleotide sequences showed that Khorasan isolate was clustered with China (EU421060), Arizona (AF059532) and Spanish isolate in one subgroup.

1, 2 and 3- Ph.D. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, respectively.

(*- Corresponding Author Email: Mehrvar_M@yahoo.com)

This is consistent with the observation of Nelson & Knuhtsen (1973) for six biotypes, on the basis of symptoms and host range, but only two serological groups, one of which (group I) contained all the variability in host range and symptomatology. Hu *et al.* (1993) reported typing H-SqMV as a member of SqMV serogroup I on the basis of biological rather than serological comparisons, and L-SqMV was typed to serogroup I by Alvarez & Campbell (1978). Given that other studies have encountered difficulties in reproducing the expected phenotypes on watermelon, the latter explanations are most likely. In comoviruses, RNA-2 encodes the two CPs and the MP. Thus, amino acid sequence differences found in the putative polyprotein of our RNA-2 clones may be expected to result in possible variations in serological response. However, both RNAs may function in determining host range and symptomatology and a precise correlation of our hybridization groups with the serological groupings has not yet been established.

Keywords: RNA2 and Southern Khorasan, Sequence, *Squash mosaic virus*