

جایگاه تاکسونومیک جدایه های ایرانی ویروس موزائیک خیار از استان های کرمان و یزد

محمد مداحیان¹، حسین معصومی^{2*}، جهانگیر حیدرنازاد²، اکبر حسینی پور²

¹دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

²دانشیار بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

تاریخ دریافت: 1391/3/13، تاریخ پذیرش: 1391/5/22

چکیده

ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus, CMV*) یکی از ویروس های مهم کدوئیان در نقاط مختلف دنیا است. به منظور شناسایی و تعیین جایگاه تکاملی جدایه های این ویروس، تعدادی نمونه از استان های کرمان و یزد جمع آوری گردید. آلودگی به CMV در این نمونه ها توسط آزمون DAS-ELISA مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس گیاه میزبان و مناطق نمونه برداری، از نمونه های آلوده شش جدایه متفاوت، جهت مطالعات مولکولی انتخاب گردیدند. با استفاده از آزمون RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی، یک قطعه 946 جفت بازی در برگیرنده ژن پروتئین پوششی، تکثیر، همسانه سازی و تعیین ترادف گردید. قطعات همسانه سازی شده جهت تعیین جایگاه تکاملی جدایه های ایرانی با ترادف های مشابه مربوط به سایر جدایه های CMV موجود در بانک ژن مقایسه شدند. آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه های بررسی شده در دو زیر گروه I و II قرار می گیرند که زیر گروه I نیز به دو زیر گروه IA و IB تقسیم می گردد. دو جدایه ایرانی CMV در زیر گروه IA و چهار جدایه دیگر در زیر گروه IB واقع گردیدند. بیشترین میزان تشابه ترادف نوکلئوتیدی در بین جدایه های ایرانی به میزان 99/1% در بین دو جدایه Ker.Ker.Pep و Ker.Ker.Mel.2 از زیر گروه IB و کمترین میزان تشابه به میزان 92/1% بین دو جدایه Ker.Jir.Cu از زیر گروه IA و Yaz.Yaz.Tom از زیر گروه IB تعیین گردید. جدایه های زیر گروه IB اختصاص به کشورهای شرق آسیا داشته و این بررسی اولین گزارش از وجود تعدادی از جدایه های CMV مربوط به زیر گروه IB از ایران و خاورمیانه می باشد.

واژه های کلیدی: فیلوژنی، پروتئین پوششی، ویروس موزائیک خیار.

مقدمه

حرکت سلول به سلول در گیاه و انتقال در مسافت- های طولانی نیز نقش دارد (Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003). نژادهای CMV در مواردی از قبیل انتقال با ناقل، علائم ایجاد شده در گیاهان آزمون و میزبان طبیعی، خواص سرولوژی و ژنتیکی با یکدیگر متفاوت می‌باشند. روش‌های مختلفی جهت بررسی تنوع در بین جدایه‌های این ویروس از قبیل تعیین نقش پپتیدی پروتئین پوششی (Palukaitis et al., 1992)، بررسی‌های سرولوژیکی (Wahyuni et al., 1992)، هیبریداسیون اسید نوکلئیک (Owen & Palukaitis, 1988) و تعیین ترادف اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه (Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003) مورد استفاده قرار گرفته- اند. از نظر فیلوژنتیکی جدایه‌های این ویروس بر اساس توالی ژن پروتئین پوششی به دو گروه I و II تقسیم می‌شوند که گروه I نیز به دو زیر گروه IA و IB تقسیم می‌گردد (Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003; Rizos et al., 1992).

در ایران بررسی‌های مولکولی محدودی در مورد جدایه‌های ایرانی CMV صورت گرفته است. رسول پور و ایزدپناه دو جدایه این ویروس را از استان‌های اصفهان و فارس مورد بررسی قرار دادند (Rasoulpour & Izadpanah, 2008). همچنین Bashir et al., (2006 & 2008) برخی از جدایه‌های ایرانی CMV را از مناطق شمال و شمال غربی کشور و (Golnaz et al., 2009) جدایه‌های CMV از استان خراسان رضوی را از نظر مولکولی طبقه بندی نمودند. با توجه به اهمیت CMV و از

ویروس موزاییک خیار (Cucumber mosaic virus) دارای میزبان‌های گیاهی متعدد و متنوعی است که با بیش از 60 گونه شته به طریقه ناپایا منتقل می‌گردد (Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003). این ویروس باعث بروز اپیدمی‌های خطرناک از جمله نکروز حاد و نابود کننده گوجه فرنگی در ایتالیا، اسپانیا و ژاپن و موزاییک حبوبات در جنوب شرقی ایالات متحده، موزاییک خربزه در کالیفرنیا شده است (Zhang, 2005).

ویروس موزاییک خیار (CMV) از جنس کوکومو ویروس (Cucumovirus) و خانواده بروموویریده (Bromoviridae) می‌باشد (Arenal et al., 2000). ژنوم ویروس از سه قطعه RNA شامل RNA-1، RNA-2 و RNA-3 تشکیل شده و حداقل دارای یک آر.ان.ای زیر ژنومی (RNA4) نیز می‌باشد که از ناحیه 3' RNA-3 نسخه برداری می‌گردند. RNA-1 پروتئین 1a، RNA-2 پروتئین های 2a و 2b و RNA-3 پروتئین پوششی (coat protein, CP) و پروتئین حرکتی (movement protein, MP) را رمز می‌نمایند. پروتئین 1a جزئی از آنزیم رپلیکاز است، پروتئین 2a به عنوان یک RNA dependent RNA polymerase (RdRp) عمل کرده و در همانند سازی ویروس دخالت دارد. پروتئین 2b چندین وظیفه دارد از جمله به عنوان بازدارنده خاموشی ژن پس از ترجمه در برابر سیستم دفاعی میزبان عمل می‌نماید. MP نقش اساسی در حرکت ویروس در گیاه دارد و CP علاوه بر اینکه یکی از اجزاء پیکره‌های ویروس می‌باشد در بیان علائم، انتقال توسط شته و کمک به

(PRSV) تهیه شده از موسسه DSMZ کشور آلمان استفاده گردید. سپس نتایج با استفاده از دستگاه الایزا خوان مدل (EL800 Biotek Instrument) در طول موج 405 نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج RNA از نمونه های آلوده با استفاده از کیت High Pure Viral Nucleic Acids Kit (شرکت Roche کشور آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. آر ان ای استخراج شده جهت واکنش نسجه برداری معکوس (Reverse transcription, RT) با آنزیم M-MLV reverse transcriptase شرکت Fermentas و آغاز گر پس سوی 5'-R-DAG: 3'-GACTGACCATTTAGCCG طراحی شده توسط (Seung et al., 1999) استفاده شد. جهت انجام واکنش RT و ساخت دی.ان.ای مکمل 2/5 میکرولیتر آر.ان.ای کل، 2/5 میکرولیتر آغازگر پس سو (10 μ M) و 8/5 میکرولیتر آب دیونیزه استریل به لوله ها اضافه و پس از 1 دقیقه در دمای 95 $^{\circ}$ C، بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد. سپس مقدار چهار میکرولیتر بافر RT (5x)، دو میکرولیتر مخلوط دئوکسی ریبونوکلوئید تری فسفات (dNTPs, 10 μ M)، 0/5 میکرولیتر آنزیم نسخه برداری معکوس (M-MuLV) (200U/ μ L)، 0/5 میکرولیتر بازدارنده RNase (10U/ μ L) به لوله ها اضافه و به مدت 45 دقیقه در دمای 42 $^{\circ}$ C قرار داده شدند. توقف واکنش با قرار دادن مخلوط به مدت 15 دقیقه در دمای 72 $^{\circ}$ C انجام گرفت. جهت تکثیر ژن پروتئین پوششی جدایه های CMV

آنجائیکه تاکنون در مورد وضعیت مولکولی جدایه های این ویروس در استان های کرمان و یزد مطالعه ای صورت نگرفته است، لذا هدف از انجام این تحقیق بررسی خصوصیات مولکولی تعدادی از جدایه های این ویروس در استان های کرمان و یزد می باشد.

مواد و روش ها

طی سال های 1387 الی 1389 از مزارع و گلخانه های گوجه فرنگی و کدوئیان استان یزد شامل مناطق: شمسی آباد، عسکر آباد، محسن آباد و خضر آباد شهر یزد و شهرستان تفت و تفت - محمد آباد و مزارع و گلخانه های فلفل و کدوئیان استان کرمان شامل شهرهای کرمان، بافت، جیرفت و عنبر آباد نمونه برداری به عمل آمد. از گیاهان با علائم مختلف ویروسی از قبیل موزائیک، بند کفشی شدن، زردی، کوتولگی، شکستگی رنگ برگ ها، رگ برگ نواری، تاولی شدن برگ ها و میوه ها و بدشکلی شدید برگ ها نمونه برداری گردید و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند.

به منظور شناسایی ویروس های آلوده کننده گیاهان نمونه برداری شده از آزمون ساندویچ دوطرفه الایزا به روش کلارک و آدامز (Clark & Adams 1977) و با استفاده از آنتی سرم چند همسانه ای CMV، *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV)، *Squash mosaic virus* (SqMV)، *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)، *Watermelon mosaic virus* (WMV) و *Papaya Ring Spot Virus*

فایل های همردیف سازی شده حاصل از این برنامه در نرم افزار MEGA 4 برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor-Joining استفاده گردیدند. همچنین جهت بررسی میزان همولوژی جدایه های مورد بررسی در این تحقیق و دیگر جدایه های CMV از نرم افزار DNAMAN Version 4.02 استفاده گردید.

نتایج و بحث

شناسایی جدایه های CMV

بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون DAS-ELISA از مجموع 390 نمونه جمع آوری شده از گیاهان کدو، فلفل، گوجه فرنگی، خیار، هندوانه، طالبی و خربزه از استان های کرمان و یزد 28 نمونه آلودگی به ویروس CMV را نشان دادند (جدول 1). علائم CMV بر روی گیاهان خانواده کدوئیان عمدتاً شامل تاولی شدن برگ ها، بدشکلی شدید برگ و میوه و موزائیک شدید بودند. در دو جدایه گیاه فلفل و گوجه فرنگی نیز علائمی مانند رگبرگ روشنی، ماتل، بدشکلی و باریک شدن برگ ها مشاهده گردید. از بین نمونه های دارای آلودگی به ویروس CMV شش نمونه جدا شده از گیاهان فلفل (Ker.Ker.Pep)، خیار (Ker.Jir.Cu) و دو نمونه خربزه (Ker.Ker.Mel.1) و (Ker.Ker.Mel.2) از استان کرمان و دو نمونه گوجه فرنگی (Yaz.Yaz.Tom) و کدو (Yaz.Sha.Cu) از استان یزد جهت مطالعات مولکولی انتخاب گردیدند (جدول 2). همچنین 105 نمونه آلودگی به ویروس موزائیک زردکدو

مورد مطالعه در این تحقیق و انجام آزمون RT-PCR به ترتیب از آغازگرهای هم سو (F-DAG: 5'-TAGTTTTGAGGTTCAATTCC - 3' و پس سوی (R-DAG: 5'-GACTGACCATTTAGCCG- 3') بر اساس مقاله (Seung et al., 1999) استفاده گردید. مراحل پی سی آر شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای 94°C، 35 چرخه شامل مرحله واسرشت سازی در دمای 94°C به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در 56 °C به مدت 30 ثانیه، مرحله گسترش در دمای 72 °C به مدت یک دقیقه و مرحله گسترش نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 °C صورت گرفت. در نهایت محصولات PCR به دست آمده، در ژل آگاروز یک در صد الکتروفورز گردیدند.

قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای اختصاصی F-DAG و R-DAG در واکنش RT-PCR با استفاده از کیت (InsTA cloneTM PCR Cloning Kit) در پلاسمید pTZ57R/T، سویه JM 107 باکتری *Escherichia coli* همسانه سازی گردیدند. پلاسمیدهای نو ترکیب پس از استخراج به وسیله آغازگرهای عمومی M13F و M13R توسط شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی از هر دو سمت تعیین ترادف شدند. جهت جستجوی ترادف های مشابه در بانک ژن از نرم افزار بلاست استفاده گردید و ترادف های مشابه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. همردیف سازی چندگانه (multiple sequence alignment) با برنامه Clustal X (Thompson et al. 1997) انجام و

کدوئیان مطابقت دارد (Massumi et al., 2007; Bananej & Vahdat, 2008).

تکثیر و همسانه سازی ژن پروتئین پوششی

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، گزارش شده توسط (Seung et al., 1999)، ژن پروتئین پوششی، جدایه های ایرانی CMV مورد مطالعه در این تحقیق در آزمون RT-PCR قطعه ای به طول 946 جفت باز حاوی طول کامل ژن CP و نواحی غیر قابل ترجمه 3' و 5' در دو انتهای این ژن تکثیر گردید (شکل 1). تعیین ترادف محصولات همسانه سازی شده پس از حذف نوکلئوتیدهای اضافی نشان داد که طول ژن CP در جدایه های تعیین توالی شده در این تحقیق 657 نوکلئوتید می باشد (شکل 2).

مطالعات فیلوژنتیکی

جهت تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه های مورد بررسی CMV در این تحقیق، جدایه های مذکور به همراه 56 جدایه گزارش شده موجود در بانک ژن مورد بررسی قرار گرفتند (جدول 3). بر اساس درخت تبارزایی رسم شده بر پایه ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه ژن پروتئین پوششی، جدایه های CMV در دو زیر گروه I و II قرار گرفتند. که گروه I خود نیز به دو زیر گروه IA و IB تقسیم شد.

(ZYMV)، 69 نمونه آلوده به ویروس موزائیک هندوانه (WMV)، 4 نمونه آلوده به ویروس موزائیک کدو (SqMV) و 1 نمونه آلودگی به ویروس لکه حلقوی پایا (PRSV) را نشان دادند. در ضمن آلودگی مزارع نسبت به ویروس موزائیک سبز خیار (CGMMV) مشاهده نگردید. علاوه براین، برخی از نمونه ها آلودگی توأم بصورت دوتائی (WMV+ZYMV و WMV+CMV) و سه تایی (CMV + WMV + PRSV) را نشان دادند. در مواردی که یک گیاه آلوده به دو یا چند ویروس بوده، این مسئله موجب اثر تشدید کنندگی ویروس ها بر روی یکدیگر گردیده و در نتیجه علائم ویروسی به نحو چشمگیری افزایش می یابند. همچنین تعدادی از نمونه ها دارای علائم ویروسی بودند که نسبت به هیچ کدام از آنتی سرم های مورد استفاده واکنش نشان ندادند که این نمونه احتمالاً می توانند به دیگر ویروس های کدوئیان نظیر *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV)، *Cucumber yellow stunting* (CYSDV)، *Watermelon disorder virus* (WcSV) و *Tomato leaf chlorotic stunt virus* (ToLCPMV) آلوده باشند. ویروس های WMV، ZYMV، CMV و CABYV شایع ترین ویروس های آلوده کننده کدوئیان در ایرن می باشند و نتایج به دست آمده در این تحقیق با دیگر نتایج گزارش شده از ایران در مورد شیوع ویروس های آلوده کننده بر روی

جدول 1- گیاهان، مناطق نمونه برداری و میزان آلودگی نسبت به ویروس موزائیک خیار.

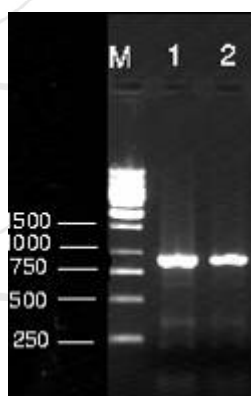
Table 1- The locations, sample plants and rate of infection of *Cucumber mosaic virus*.

منطقه نمونه برداری Region	میزبان Host	میزان آلودگی Infection rate
کرمان- Kerman	کدو- <i>Cucurbita pepo</i>	0/11
کرمان- Kerman	لفل- <i>Capsicum annum</i>	1/9
کرمان- Kerman	خریزه- <i>Cucumis melo. var. indorus</i>	2/15
بافت- Baft	کدو- <i>Cucurbita pepo</i>	0/19
جیرفت- Jiroft	هندوانه- <i>Citrullus vulgaris</i>	0/4
جیرفت- Jiroft	خیار- <i>Cucumis sativus</i>	7/21
جیرفت- Jiroft	هندوانه- <i>Citrullus vulgaris</i>	0/4
جیرفت- Jiroft	طالبی - <i>Cucumis melo. var. cantalupensis</i>	0/6
عنبر آباد- Anbaraabad	طالبی - <i>Cucumis melo. var. cantalupensis</i>	0/2
عنبر آباد- Anbaraabad	کدو- <i>Cucurbita pepo</i>	0/12
تفت - محمد آباد - Taft-Mohammad aabad	کدو- <i>Cucurbita pepo</i>	8/30
تفت - Taft	گوجه فرنگی - <i>Solanum lycopersicon</i>	1/12
تفت - محمد آباد - Taft-Mohammad aabad	خیار- <i>Cucumis sativus</i>	0/4
یزد- عسگر آباد- Yazd-Askaraabad	کدو- <i>Cucurbita pepo</i>	5/41
یزد- عسگر آباد- Yazd-Askaraabad	خیار- <i>Cucumis sativus</i>	1/4
یزد- عسگر آباد- Yazd-Askaraabad	هندوانه- <i>Citrullus vulgaris</i>	0/35
یزد- محسن آباد- Yazd-Mohsenaabad	کدو- <i>Cucurbita pepo</i>	1/18
یزد- محسن آباد- Yazd-Mohsenaabad	هندوانه- <i>Citrullus vulgaris</i>	0/22
یزد- خضر آباد- Yazd-Khezraabad	کدو- <i>Cucurbita pepo</i>	0/20
یزد- شمسی آباد- Yazd-Shamsiaabad	کدو- <i>Cucurbita pepo</i>	0/18
یزد- شمسی آباد- Yazd-Shamsiaabad	خریزه- <i>Cucumis melo. var. indorus</i>	2/73
	جمع کل- Total	28/390

جدول 2- محل جغرافیایی، گیاه میزبان و رس شماره‌های شش جدایه‌ی تعیین ترادف شده در این پژوهش.

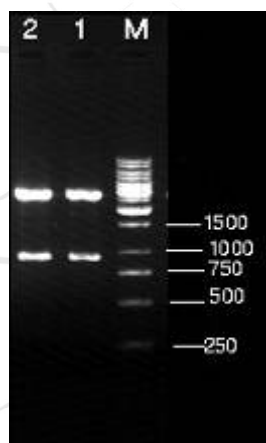
Table 2- Geographical origin, host plant and accession number of the six sequenced isolates in this study.

نام جدایه Isolate name	محل جمع آوری Collecting region	میزبان Host	شماره ثبت در بانک ژن Accession number
Ker.Jir.Cu	جیرفت Jiroft	خیار <i>Cucumis sativus</i>	JX112018
Ker.Ker.Pep	کرمان Kerman	فلفل <i>Capsicum annum</i>	JX112021
Ker.Ker.Mel.1	کرمان Kerman	خربزه <i>Cucumis melo.var.indorus</i>	JX112019
Ker.Ker.Mel.2	کرمان Kerman	خربزه <i>Cucumis melo.var.indorus</i>	JX112020
Yaz.Sha.Cu	یزد Yazd	کدو <i>Cucurbita pepo</i>	JX112022
Yaz.Yaz.Tom	یزد Yazd	گوجه فرنگی <i>Solanum lycopersicon</i>	JX112023



شکل 1- الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی R-DAG/F-DAG و تشکیل باند 946 جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی CMV درون ژل آگاروز 1%. (M نشانگر اندازه DNA (Gene Ruler™1Kb DNA Ladder، DNA اندازه Fermentase). جدایه Ker.Jir.Cu. متعلق به زیر گروه IA. 2) جدایه Yaz.Yaz.Tom متعلق به زیر گروه IB.

Figure 1- Electrophoresis of the RT-PCR products using specific primers of R-DAG/F-DAG showing amplification of 946 bp segment of coat protein gene of Iranian *Cucumber mosaic virus* isolates. Lane M, 1-kb DNA ladder. lane 1, Ker.Jir.Cu isolate belonged to IA subgroup. lane 2, Yaz.Yaz.Tom isolate belonged to IB subgroup.



شکل 2 - الکتروفورز پلاسمید نو ترکیب حاوی قطعه ژن پروتئین پوششی جدایه های ایرانی TAV هضم شده با آنزیم های *EcoR1* و *Pst1* درون ژل آگاروز 1% (M نشانگر اندازه 1Kb DNA (Gen Ruler™ DNA Ladder, Fermentase). (1) جدایه Ker.Jir.Cu. متعلق به زیر گروه IA. (2) جدایه Yaz.Yaz.Tom متعلق به زیر گروه IB.

Figure 2-B - Recombinant plasmids comprising coat protein gene of Iranian isolates of *Cucumber mosaic virus* digested with *EcoR1* and *Pst1* restriction enzymes. Lane 1, Ker.Jir.Cu isolate belonged to IA subgroup. Lane 2, Yaz.Yaz.Tom isolate belonged to IB subgroup.

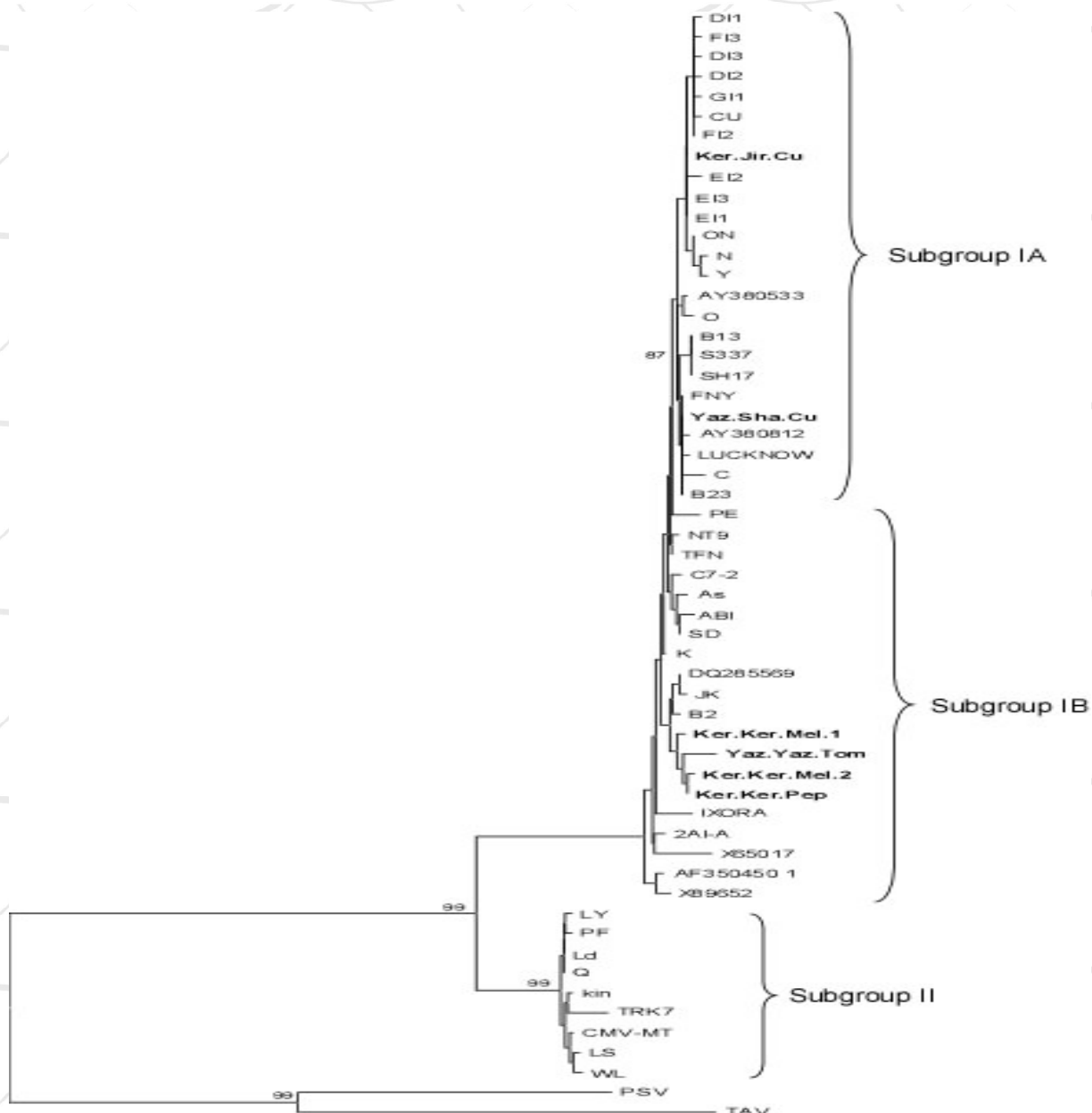
آوری شده از شهرهای کرمان و یزد در زیر گروه IB به همراه جدایه های PE، SD و X65017.1 از چین، ABI و As از کره جنوبی، NT9 از تایوان، C7-2 و K از ژاپن، 2A1-A و Ixora از آمریکا)، Tfn از ایتالیا و جدایه های B2، J&K، DQ285569، AF350450.1 و X89652.1 از هند قرار گرفتند (شکل 3 و 4). گروه II نیز شامل جدایه هایی از کشورهای ژاپن، آمریکا، استرالیا، مجارستان، ایران و انگلستان می باشد. ضمناً هیچ کدام از جدایه های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق در زیر گروه II قرار نگرفتند.

بر این اساس جدایه های Ker.Jir.Cu و Yaz.Sha.Cu به همراه چهارده جدایه دیگر گزارش شده از ایران (Bashir et al., 2006 & Rasoulpour & Izadpanah, 2008) و تعدادی از جدایه های گزارش شده از کشورهای مختلف دنیا از قبیل Y، N، O، CH و CMV-ON از ژاپن، Lucknow از هند، Fny و C از آمریکا و دو جدایه از کشور برزیل در زیر گروه IA قرار می گیرند (شکل 3 و 4). چهار جدایه دیگر شامل جدایه های Ker.Ker.Mel.1، Ker.Ker.Pep، Ker.Ker.Mel.2 و Yaz.Yaz.Tom به ترتیب جدا شده از گیاهان خربزه، گوجه فرنگی و فلفل جمع



شکل 3- درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس روش neighbor-joining با استفاده از نرم افزار MEGA 4 بر پایه ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه های ایرانی ویروس CMV و سایر جدایه های موجود در بانک ژن. جدایه های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به صورت Bold نشان داده شده‌اند. جدا یه ای از TAV به نام AJ237849.2 و جدایه ای از PSV به نام NC_002040 به عنوان Outgroup انتخاب گردیده اند.

Figure 3- neighbor-joining tree illustrating the phylogenetic relationships between the Iranian and other published *Cucumber mosaic virus* isolates. The tree was constructed using the 657 bp of coat protein sequences. Multiple sequence alignments were generated with MEGA software (Version 4). The Iranian isolates investigated in this study are shown in bold. *Tomato aspermy virus* (TAV) and *Peanut stunt virus* (PSV) were selected as outgroup.



شکل 4- درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس روش neighbor-joining با استفاده از نرم افزار MEGA 4 بر پایه ترادف اسیدهای آمینه پروتئین پوششی جدایه های ایرانی ویروس CMV و سایر جدایه های موجود در بانک ژن. جدایه های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به صورت Bold نشان داده شده اند. جدا یه ای از TAV به نام AJ237849.2 و جدایه ای از PSV به نام NC_002040 به عنوان Outgroup انتخاب گردیده اند.

Figure 4- Neighbor-joining tree illustrating the phylogenetic relationships between the Iranian and other published *Cucumbers mosaic virus* isolates. The tree was constructed using the coat protein amino acid sequences. Multiple sequence alignments were generated with MEGA software (Version 4). The Iranian isolates investigated in this study are shown in bold. *Tomato aspermy virus* (TAV) and *Peanut stunt virus* (PSV) were selected as outgroup.

جدول 3- جدایه های مورد بررسی ویروس موزائیک خیار موجود در بانک ژن جهت مقایسه و رسم دندروگرام و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه های ایرانی این ویروس.

Table 3- GenBank accession number and origin of several CMV isolates used for phylogenetic analysis.

رس شماره Accession number	جدایه Isolate	کشور country	زیر گروه Subgroup
JX112018	Ker.Jir.Cu	ایران - ایران	IA
JX112022	Yaz.Sha.Cu	ایران - ایران	IA
AB261174.1	CH	ژاپن - Japan	IA
AY380812.1	-	برزیل - Brazil	IA
D00385	O	ژاپن - Japan	IA
D00462	C	آمریکا - USA	IA
D10538	Fny	آمریکا - USA	IA
D12499	Y	ژاپن - Japan	IA
D28486	N	ژاپن - Japan	IA
DQ295914.1	Lucknow	هند - India	IA
EF620777.1	CMV-Cu	ایران - ایران	IA
AY871069.1	S337	ایران - ایران	IA
AY871070.1	B13	ایران - ایران	IA
AY871071.1	B23	ایران - ایران	IA
DQ002876.1	DI1	ایران - ایران	IA
DQ002877.1	DI2	ایران - ایران	IA
DQ002879	DI3	ایران - ایران	IA
DQ002885.1	GI1	ایران - ایران	IA
AY871068.1	SH17	ایران - ایران	IA
DQ002880.1	EI1	ایران - ایران	IA
DQ002881.1	EI2	ایران - ایران	IA
DQ002882.1	EI3	ایران - ایران	IA
DQ002883.1	FI3	ایران - ایران	IA
AY380533.1	-	برزیل - Brazil	IA
AB248752	CMV-ON	ژاپن - Japan	IA
JX112023	Yaz.Yaz.Tom	ایران - ایران	IB
JX112019	Ker.Ker.Mel.1	ایران - ایران	IB

مداحیان و همکاران، 1392

JX112021	Ker.Ker.Pep	ایران - Iran	IB
JX112020	Ker.Ker.Mel.2	ایران - Iran	IB
AB008777.1	SD	چین - China	IB
DQ285569	-	هند - India	IB
EF153737.1	J&K	هند - India	IB
AB069971.1	B2	هند - India	IB
AF268597.1	PE	چین - China	IB
AF013291.1	As	کره جنوبی South Korea	IB
D28780.1	NT9	تایوان - Taiwan	IB
D42079.1	C7-2	ژاپن - Japan	IB
AF127977.1	K	ژاپن - Japan	IB
L36525.1	ABI	کره جنوبی South Korea	IB
X65017.1	-	چین - China	IB
AF350450.1	-	هند - India	IB
AJ271416.1	2A1-A	آمریکا - USA	IB
U20219.1	Ixora	آمریکا - USA	IB
Y16926.1	Tfn	ایتالیا - Italy	IB
X89652.1	-	هند - India	IB
AB189917.1	CMV-MT	ژاپن - Japan	II
AB368501.1	PF	ژاپن - Japan	II
AF127976	LS	آمریکا - USA	II
AF198103	LY	استرالیا - Australia	II
D00463	WL	آمریکا - USA	II
L15336	Trk7	مجارستان - Hungary	II
M21464	Q	استرالیا - Australia	II
Z12818	Kin	انگلستان - England	II
EF050074.1	LD	ایران - Iran	II

داشتند (جدول 4) و بر اساس درخت فیلوژنی رسم شده نیز جدایه‌های ایرانی به صورت یک زیر شاخه از دیگر جدایه‌های موجود در زیر گروه IB مجزا

چهار جدایه ایرانی تشابه بالای ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه به ترتیب به میزان 97/9 تا 99/1 و 97/2 تا 99/5 درصد با یکدیگر

می‌گردند (Palukaitis & Zaitlin, 1997; Roossinck, 2002). بر اساس مطالعات انجام شده بر روی جدایه‌های CMV در دنیا میزان مشابهت ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی در بین جدایه‌های واقع در دو زیر گروه I و II به ترتیب بالاتر از 88 و 96 درصد می‌باشد. همچنین درصد تشابه در بین گونه‌های مربوط به دو زیر گروه I و II حدود 69 تا 77 درصد بوده است. لذا این موضوع بیانگر آن است که ناهمگونی (Heterogeneity) بالایی در بین جدایه‌های CMV وجود دارد (Roossinck, 2002). بر این اساس درصد تشابه ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق با جدایه‌های زیر گروه II به میزان 76/1-78/3% و موقعیت این جدایه‌ها در درخت تبارزایی نشان دهنده تعلق این جدایه‌ها به زیر گروه I می‌باشد. بشیر و همکاران بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن CP و RFLP، جدایه‌های ایرانی CMV را در دو زیر گروه IA و II قرار دادند و هیچ کدام از جدایه‌ها در زیر گروه IB قرار نگرفتند (Bashir et al., 2006 & 2008). بر پایه درخت تبارزایی رسم شده توسط رسول پور و ایزدپناه نیز جدایه‌های ایرانی CMV در زیر گروه IA و یک جدایه در زیر گروه II قرار می‌گیرند (Rasoulpour & Izadpanah, 2008). در این تحقیق نیز دو جدایه Ker.Jir.Cu و Yaz.Sha.Cu در درخت تبارزایی رسم شده در کنار جدایه‌های EI1، DI1، GI1، CMV-CU گزارش شده از ایران و جدایه CH گزارش شده از کشور ژاپن و Fny از کشور آمریکا در زیر گروه IA قرار گرفتند.

شدند. بیشترین میزان تشابه ترادف نوکلئوتیدی در بین جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق واقع در دو زیر گروه (IA و IB) بین جدایه‌های Ker.Ker.Pep از زیر گروه IB و Yaz.Sha.Cu از زیر گروه IA به میزان 94/5 در صد و کمترین میزان تشابه به میزان 92/1 درصد بین جدایه‌های Ker.Jir.Cu از زیر گروه IA و Yaz.Yaz.Tom از زیر گروه IB بود (جدول 4). در بین تمامی نمونه‌های مورد بررسی، بیشترین درصد تشابه ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه به ترتیب به میزان 99/8 و 100 درصد مربوط به جدایه ایرانی Yaz.Sha.Cu و جدایه Fny (از کشور آمریکا) می‌باشند. جدایه EI1 از ایران و جدایه CH (از ژاپن) نیز مشابهتی به میزان 100 درصد از نظر ترادف اسیدهای آمینه با جدایه Ker.Jir.Cu داشتند. در زیر گروه IB جدایه ایرانی Yaz.Yaz.Tom دارای تشابه بالای ترادف نوکلئوتیدی به میزان 97/3 درصد با جدایه J&K گزارش شده از کشور هند بود.

جدایه‌های مختلف CMV که از نقاط مختلف دنیا گزارش گردیده‌اند از نظر خصوصیات بیولوژیکی، سرولوژیکی و فیزیکوشیمیایی متفاوت هستند (Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003). جدایه‌های CMV بر پایه خصوصیات سرولوژی، هیبریداسیون اسید نوکلئیک، ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی و RFLP در دو زیر گروه I و II قرار می‌گیرند. جدایه‌های زیر گروه I نیز بر پایه ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی و روابط فیلوژنتیکی به دو زیر گروه IA و IB تقسیم بندی

جدول 4- میزان تشابه ترادف نوکلئوتیدی (پایین-چپ) و اسیدهای آمینه (بالا-راست) جدایه های ایرانی CMV مورد بررسی در این تحقیق و دیگر جدایه های ایرانی CMV موجود در بانک ژن.

Table 4- Percentage of nucleotide (Down-Left) and amino acid (Up-Right) sequence identity of Iranian CMV isolates investigated in this study and other Iranian CMV isolates of GenBank.

	B13	B13	D11	D12	D13	E11	E12	E13	F12	F13	G11	S337	SH17	CMV-CU	Yaz.Sha.Cu	Ker.Jir.Cu	Ker.Ker.Mel.1	Ker.Ker.Mel.2	Ker.Ker.Pep	Yaz.Yaz.Tom	LD
B13		99.1%	97.7%	97.7%	97.7%	98.6%	97.7%	98.6%	98.2%	97.7%	97.7%	100%	100%	97.7%	99.1%	98.6%	96.3%	96.3%	96.8%	94.5%	79.3%
B13	99.7%		98.2%	98.2%	98.2%	99.1%	98.2%	99.1%	98.6%	98.2%	98.2%	99.1%	99.1%	98.2%	100%	99.1%	97.2%	97.2%	97.7%	95.4%	79.7%
D11	96.5%	96.8%		99.1%	99.1%	99.1%	98.2%	99.1%	99.5%	99.1%	99.1%	97.7%	97.7%	99.1%	98.2%	99.1%	96.3%	95.4%	95.9%	94.5%	79.7%
D12	96.2%	96.5%	99.4%		99.1%	99.1%	98.2%	99.1%	99.5%	99.1%	99.1%	97.7%	97.7%	99.1%	98.2%	99.1%	96.3%	95.4%	95.9%	95.4%	79.7%
D13	96.5%	96.8%	99.7%	99.4%		99.1%	98.2%	99.1%	99.5%	99.1%	99.1%	97.7%	97.7%	99.1%	98.2%	99.1%	96.3%	95.4%	95.9%	94.5%	79.7%
E11	96.5%	96.8%	99.1%	98.8%	99.1%		99.1%	100%	99.5%	99.1%	99.1%	98.6%	98.6%	99.1%	99.1%	100%	97.2%	96.3%	96.8%	95.4%	80.6%
E12	96.3	96.7%	98.9%	98.6%	98.9%	99.5%		99.1%	98.6	98.2%	98.2%	97.7%	97.7%	98.2%	98.2%	99.1%	96.3%	95.4%	95.9%	94.5%	79.7%
E13	96.5%	96.8%	99.1%	98.8%	99.1%	100%	99.5%		99.5%	99.1%	99.1%	98.6%	98.2%	99.1%	99.1%	100%	97.2%	96.3%	96.8%	95.4%	80.6%
F12	96.2%	96.5%	99.4%	99.1%	99.4%	99.1%	98.9%	99.1%		99.5%	99.5%	98.2%	97.7%	99.5%	98.6%	99.5%	96.8%	95.9%	96.3%	95%	80.2%
F13	96.0%	96.3%	99.2%	98.9%	99.2%	98.9%	98.8%	98.9%	99.8%		99.1%	97.7%	97.7%	99.1%	98.2%	99.1%	96.3%	95.4%	95.9%	94.5%	79.7%
G11	96.3%	96.7%	99.5%	99.2%	99.5%	99.2%	99.1%	99.2%	99.5%	99.4%		97.7%	100%	99.1%	98.2%	99.1%	96.3%	95.4%	95.9%	94.5%	79.7%
S337	100%	99.7%	96.5%	96.2%	96.5%	96.5%	96.3%	96.5%	96.2%	96.0%	96.3%		100%	97.7%	99.1%	98.6%	96.3%	96.3%	96.8%	94.5%	79.3%
SH17	100%	99.7%	96.5%	96.2%	96.5%	96.5%	96.3%	96.5%	96.2%	96.0%	96.3%	100%		97.7%	99.1%	98.6%	96.3%	96.3%	96.8%	94.5%	79.3%
CMV-CU	96.0%	96.3%	99.2%	98.9%	99.2%	98.9%	98.8%	98.9%	99.2%	99.1%	99.4%	96.0%	96.0%		98.2%	99.1%	96.3%	95.4%	95.9%	94.5%	79.7%
Yaz.Sha.Cu	99.1%	99.4%	96.3%	96.0%	96.3%	96.3%	96.2%	96.3%	96.0%	95.9%	96.2%	99.1%	99.1%	95.9%		99.1%	97.2%	97.2%	97.7%	95.4%	79.7%
Ker.Jir.Cu	96.3%	96.7%	99.2%	98.9%	99.2%	99.2%	99.1%	99.2%	99.2%	99.1%	99.4%	96.3%	96.3%	99.1%	96.2%		97.2%	96.3%	96.8%	95.4%	80.6%
Ker.Ker.Mel.1	93.5%	93.8%	93.2%	92.8%	93.2%	93.2%	93.0%	93.2%	92.8%	92.7%	93.0%	93.5%	93.5%	92.7%	94.2%	93.5%		98.2%	98.6%	97.2%	80.2%
Ker.Ker.Mel.2	92.8%	93.2%	92.2%	91.9%	92.2%	92.2%	92.1%	92.2%	91.9%	91.8%	92.1%	92.8%	92.8%	91.8%	93.6%	92.5%	98.6%		99.5%	97.2%	79.3%
Ker.Ker.Pep	93.8%	94.1%	92.8%	92.5%	92.8%	92.8%	92.7%	92.8%	92.5%	92.4%	92.7%	93.8%	93.8%	92.4%	94.3%	92.8%	98.9%	99.1%		97.7%	79.7%
Yaz.Yaz.Tom	92.1%	92.4%	91.8%	91.6%	91.8%	91.8%	91.6%	91.8%	91.5%	91.3%	91.6%	92.1%	92.1%	91.3%	92.8%	92.1%	97.9%	98.3%	98.0%		78.3%
LD	76.9%	77.2%	78.1%	78.3%	78.1%	77.8%	77.7%	77.8%	78.0%	77.8%	78.0%	76.9%	76.9%	77.7%	77.4%	78.3%	77.8%	77.4%	77.5%	77.2%	

گزارش شده CMV از مناطق مختلف دنیا و از میزبان های متفاوت به زیر گروه I تعلق دارند (Gallitelli, 2000)، لذا نتایج حاصل از این تحقیق و تحقیقات انجام شده گذشته در ایران (Bashir et al., 2006 & 2008; Rasoulpour & Izadpanah, 2008) نشان دهنده گسترش بیشتر جدایه های مربوط به زیر گروه I در کشور ایران می باشد.

تعیین زیر گروه های جدایه های CMV در بررسی اپیدمیولوژی ویروس از اهمیت زیادی برخوردار است (Yu et al., 2005). همچنین ردیابی جدایه های CMV و تشخیص تنوع ژنتیکی آنها یک مرحله موثر در کنترل ویروس به ویژه از طریق مهندسی ژنتیک می باشد (Lin et al., 2003). در این تحقیق شش جدایه از CMV از نظر جایگاه تکاملی در درخت تبارزایی مورد بررسی قرار گرفتند. پیش از این بر اساس مطالعات مولکولی انجام شده بر روی جدایه های ایرانی CMV تمامی جدایه ها در دو زیر گروه IA و II قرار گرفته اند (Bashir et al., 2006; 2008; Rasoupour & Izadpanah, 2008) و در این تحقیق برای نخستین بار چهار جدایه از ایران در زیر گروه IB طبقه بندی گردیدند. جدایه های زیر گروه IB اختصاص به کشورهای شرق آسیا داشته (Gallitelli, 2000) و این بررسی اولین گزارش از وجود جدایه های این زیر گروه از ایران و منطقه خاورمیانه می باشد. ضمناً وجود جدایه های مربوط به هر سه زیر گروه IA، IB و II در ایران نشان دهنده گوناگونی و تنوع ژنتیکی جدایه های CMV

جدایه های مربوط به زیر گروه IA و II در تمام دنیا یافت می گردند و گروه بندی آن ها به ناحیه جغرافیایی ارتباطی ندارد، در حالیکه اکثر جدایه های زیر گروه IB از شرق آسیا گزارش گردیده اند و تنها یک جدایه مربوط به کشور ایتالیا و دو جدایه از کشور آمریکا در زیر گروه IB واقع گردیده اند (Gallitelli, 2000; Lin et al., 2003; Ng et al., 2000). (Dubey et al., 2010). (Srivastava & Raj (2004) تمامی جدایه های گزارش شده از کشور هند (به جز جدایه Lucknow) به همراه تعدادی از جدایه های گزارش شده از کشورهای شرق و جنوب شرقی آسیا مانند چین، کره جنوبی، تایوان، اندونزی و ژاپن در زیر گروه IB قرار می گیرند. این در حالی است که چهار جدایه ایرانی Ker.Ker.Pep، Ker.Ker.Mel.1، Ker.Ker.Mel.2 و Yaz.Yaz.Tom به همراه جدایه های گزارش شده از شرق آسیا نیز در این زیر گروه واقع گردیدند. بر این اساس در صد میزان همولوژی بالای چهار جدایه ایرانی با یکدیگر در مقایسه با سایر جدایه های زیر گروه IB و مجزا شدن این جدایه ها به صورت یک زیر شاخه و وجود در یک مکان جغرافیایی جدید (کشور ایران) می تواند نشان دهنده یک منشاء مشترک بین این جدایه ها باشد. این نتایج بر اساس اطلاعات مربوط به ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه ژن پروتئین پوششی می باشد و تحقیقات بیشتری جهت مطالعه قسمت های دیگر ژنوم این جدایه ها و سایر جدایه های منطقه لازم می باشد. بیش از 80 درصد جدایه های

در ایران می باشد، لذا تحقیقات بیشتر جهت شناسایی جدایه‌های بیشتر CMV لازم می‌باشد.

منابع

- Bananej K, Vahdat A (2008) Identification, distribution and incidence of viruses in field-Grown cucurbit crops of Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 247-257.
- Bashir NS, Rasaei-Kalhor M, Nourinejhad-Zarghani Sh (2006) Detection, differentiation and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes* 32: 277-288
- Bashir NS, Nematollahi S, Torabi E (2008) Cucumber mosaic virus subgroup IA Frequently occurs in the Iran. *Acta Virologica* 52: 237-242.
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Dubey VK, Aminuddin, Singh VP (2010) Molecular characterization of Cucumber mosaic virus infecting *Gladiolus*, revealing its phylogeny distinct from the Indian isolate and alike the Fny strain of CMV. *Virus Genes* 41: 126-134
- Gallitelli D (2000) The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research* 71: 9-21.
- Garcia-Arenal F, Escriu F, Aranda MA, Alonso-Prados JL, Malpica JM, Fraile A (2000) Molecular epidemiology of cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *Virus Research* 71: 1-8.
- Golnaz N, Jafarpour B, Rastegar MF, Sabokkhiz MA (2009) Detection of cucumber mosaic virus and typing using serological and molecular methods in Razavi Khorasan province. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12: 657-659
- Lin HX, Rubio L, Smythe A, Jiminez M, Falk BW (2003) Genetic diversity and biological variation among California isolates of Cucumber mosaic virus. *Journal of General Virology* 84: 249-258.
- Massumi H, Shaabani M, Hosseini Pour A, Heydarnejad J, Rahimian H (2009) Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. *Plant Disease* 93: 67-72 .
- Ng CK, Liu S, Perry KL (2000) Cucumber Mosaic Virus Mutants with Altered Physical Properties and Defective in Aphid Vector Transmission. *Virology* 276: 395-403.
- Owen J, Palukaitis P (1988) Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 495-502
- Palukaitis P, Garcia-Arenal F (2003) Cucumoviruses. *Advances in Virus Research* 62: 241-323
- Palukaitis P, Rossinck M J, Ditzgen RG, Francki IB (1992) *Cucumber mosaic virus*. *Advances in Virus Research* 41: 281-348.
- Palukaitis P, Zaitlin M (1997) Replicase-Mediated Resistance to Plant Virus Disease. *Advances in Virus Research* 48: 349-377.
- Rizos H, Gunn LV, Pares RD, Gillings MR (1992) *Journal of General Virology* 73: 2099-2103.
- Rasoulpour R, Izadpanah K (2008) properties and taxonomic position of hoary cress strain of Cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Pathology* 90: 97-102.
- Roossinck MJ (2002) Evolutionary history of cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyzes. *Journal of Virology* 76: 3382-3387.

- Seung KC, Jang KC, Won MP, Ki HR, (1999) RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus – specific single pair of primers. *Journal of Virology* 83: 67-73.
- Srivastava A, Raj SK (2004) High molecular similarity among Indian isolates of Cucumber mosaic virus suggests a common origin. *Current Science* 87: 1126- 1131.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Wahyuni WS, Dietzgen RG, Hanada K, Francki RIB (1992) Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathology* 41: 282-297.
- Yu C, Wu J, Zhou X (2005) Detection and sub grouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 123: 155–161.
- Zhang D (2005) Sequence variability of *Cucumber mosaic virus* (CMV) and its effects on CMV-resistance of *capsicum* sp. Ph.D. Thesis. Hamburg university, Hamburg, Germany.

Phylogenetic analysis of Iranian *Cucumber mosaic virus* isolates from Kerman and Yazd provinces

Maddahian M¹., Massumi H^{*2}., Heydarnejad J²., Hosseini Pour A.²

¹ Former MSc. student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

² Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Cucumber mosaic virus (CMV) is one of the most important viruses of cucurbits worldwide. To study the phylogenetic relationships of several CMV isolates, a number of samples were collected from Kerman and Yazd provinces. The CMV infection of the samples was tested using DAS-ELISA method. Based on the host and geographical regions, six ELISA positive samples were chosen for molecular characterization. A 946 bp fragment comprising full-length of coat protein gene with its flanks was amplified by RT-PCR using specific primer pairs, cloned and sequenced. Sequence comparisons were done using DNAMAN software on CP gene of Iranian isolates and those of available in GenBank . Phylogenetic analysis showed that CMV isolates were divided into two subgroups I and II in which the subgroup I was further divided into two subgroups of IA and IB. Two Iranian isolates sequenced in the present study were placed in the subgroup IA and the rest of isolates in the subgroup IB . The highest nucleotide sequence identity of 99.1% was obtained for the isolates Ker.Ker.Pep and Ker.Ker.Mel.2 (subgroup IB) while the lowest for the isolates Ker.Jir.Cu isolate (subgroup IA) and the Yaz.Yaz.Tom of 92.1 % . Isolates of subgroup IB belong almost exclusively to East Asia. It is the first report of occurrence of subgroup IB of CMV isolates in Iran and Middle East.

Key words: *Phylogeny, Coat protein, Cucumber mosaic virus*

* Corresponding Author: Massumi H.

Tel: 03413202673

Email: masoomi@mail.uk.ac.ir