

بررسی آلودگی‌های منفرد و مخلوط ویروس موزاییک خیار با ویروس- های جنس پوتی ویروس در منطقه‌ی شمال غرب ایران

Survey on presence of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in single and mixed infections with potyviruses in North-West of Iran

مهرداد صالح زاده*

Mehrdad Salehzadeh*

کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز،

ایران

M.S.c of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture,
University of Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: mehrdadsalehzadeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۷)

چکیده

ویروس موزائیک خیار *Cucumber mosaic virus* (CMV) یکی از مهم‌ترین ویروس‌های کدوئیان و دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی می‌باشد. وجود آلودگی‌های مخلوط با سایر ویروس‌ها سبب کاهش و یا تشدید علائم و خسارت ناشی از این ویروس می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی آلودگی مخلوط ویروس موزاییک خیار با ویروس‌های جنس پوتی-ویروس در گیاهان جمع‌آوری شده از خانواده‌های کدویان (*Cucurbitaceae*) شامل خیار و کدو، بادمجانیان (*Solanaceae*) شامل گوجه‌فرنگی، فلفل و تاج‌ریزی، پنیرکان (*Malvaceae*) شامل ختمی و پنیرک می‌باشد. تعیین آلودگی مخلوط CMV با جنس پوتی‌ویروس، از لحاظ بوجود آمدن هم‌افزایی و خسارت مضاعف بین این ویروس‌ها در کشاورزی مهم است. به منظور تعیین اینکه ویروس‌های جنس پوتی‌ویروس بیشتر در چه نوع میزبان‌هایی با ویروس موزاییک خیار آلودگی مخلوط دارند و در کدام گیاهان این آلودگی مخلوط کمتر است مهم می‌باشد. برای این منظور، تعداد ۳۰۰ نمونه گیاهی مشکوک به آلودگی از خانواده‌های مذکور از منطقه‌ی شمال غرب کشور جمع‌آوری، نگهداری و از هر میزبان ۲۵ نمونه مربوط به جدایه‌های مختلف مورد بررسی واقع شد. نمونه‌ها دارای علائم موزاییک، پیسک، تاول‌های برجسته، بدشکلی، موزاییک زرد، کوتولگی بوته و نیز سایر علائم بیماری‌های ویروسی از جمله نخی‌شدن برگ بودند. به منظور بررسی اولیه‌ی وجود ویروس موزاییک خیار کارهای گلخانه‌ای با استفاده از میزبان‌های لکه‌موضعی و سیستمیک CMV همچنین کارهای آزمایشگاهی با استفاده یک جفت آغازگر اختصاصی منطبق بر ژن پروتئین پوششی CMV انجام شد. سپس، برای ردیابی آلودگی مخلوط با جنس پوتی‌ویروس از نمونه‌هایی که آلودگی آنها به ویروس موزاییک خیار محرز شده بود از آغازگرهای عمومی جنس پوتی‌ویروس استفاده شد و بیشترین آلودگی مخلوط ویروس موزاییک خیار با ویروس‌های جنس پوتی‌ویروس در کدو و گوجه‌فرنگی و کمترین اختلاط در ختمی، پنیرک، فلفل و خیار مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

آلودگی مخلوط،

پوتی‌ویروس،

سینترزیسم،

ویروس موزاییک خیار

مقدمه

با توجه به اهمیت سبزی ها و مصارف متعدد آنها در تغذیه انسان، بررسی خسارت ناشی از ویروس ها در سبزیجات و نیز بررسی وضعیت شیوع بیماری های ویروسی مربوط به آنها در منطقه از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. سبزیجات از جمله گیاهان حساس به ویروس ها به شمار می روند که مورد حمله ویروس های متنوع گیاهی قرار می گیرند (Rizos et al, 1992). یکی از مهمترین ویروس های آلوده کننده کدوئیان و همچنین سایر سبزیجات کوکومو ویروس ها می باشند و مخصوصا روی کدوئیان که یکی از محصولات عمده و مهم کشاورزی در ایران و شمال غرب کشور هستند از نظر اقتصادی اهمیت فراوانی دارند (Kolivand et al, 2012). ویروس موزاییک خیار پراکندگی جهانی داشته و وسیع ترین دامنه میزبانی را در بین ویروس های گیاهی دارد، بطوریکه طیف وسیعی از گیاهان زراعی، باغی و زینتی را آلوده می کند (Gallitelli, 2000). تعداد گونه های میزبان CMV بیش از ۱۳۰۰ گونه گیاهی در بیش از ۱۰۰ خانواده از تک لپه ای ها و دو لپه ای ها شامل اکثر سبزیجات، گیاهان زینتی و گیاهان چوبی و نیمه چوبی بیان شده است (Duarte et al., 2013). ویروس موزاییک خیار علائم متنوعی را در میزبان های مختلف بروز می دهد و منجر به آلودگی سیستمیک در اکثر میزبان های گیاهی می شود اما ممکن است در تعدادی از محصولات از جمله یونجه بدون علائم باشد. اغلب کدوئیان به CMV حساس هستند (Zitter et al., 2009). آلودگی توام دو یا چند ویروس در گیاهان یک امر طبیعی است و ممکن است بر اپیدمی و تکامل ویروس ها تأثیرگذار باشد (Edwardson, 1966). در بعضی از موارد آلودگی مخلوط دو ویروس غیر مرتبط با هم منجر به تشدید علائم می شود، که این پدیده هم افزایی (synergism) نامیده می شود. آلودگی مخلوط ممکن است بر غلظت ویروس های آلوده کننده تأثیر بگذارد (Hull, 2013). هدف از این تحقیق بررسی آلودگی مخلوط ویروس موزاییک خیار با جنس پوتی ویروس در گیاهان جمع آوری شده از خانواده های مختلف سبزی صیفی، جالیزی بود (لازم به ذکر است چون جنس پوتی ویروس شامل گونه ها و گونه ها دارای سویه های متفاوتند، بررسی آلودگی مخلوط به طور اختصاصی برای هر گونه و سویه

به دلیل حجم بالای کار در این تحقیق امکان پذیر نبود و بررسی صورت گرفته در حد جنس پوتی ویروس با پرایمرهای یونیورسال بود).

پوتی ویروس ها در شرایط آب و هوایی مختلف دامنه وسیعی از گیاهان مانند گندمیان، حبوبات، کدوئیان، اسفناجیان و بادمجانیان را آلوده می کنند. آب و هوای گرمسیری و نیمه گرمسیری بهترین شرایط آب و هوایی برای فعالیت این ویروس هاست (Holling and Brunt, 1981). پوتی ویروس ها به عنوان پاتوژن های طبیعی غالباً در طبیعت حضور و در کاهش بازدهی محصولات اثر دارند (Hasan, 2004). پوتی ویروس ها در درجه اول با شته ها انتقال می یابند. چند گونه ی شته از ناقلین موثر پوتی ویروس ها می باشند. این شته ها از طریق پارتونوز تولید مثل می کنند و بدین وسیله شته بدون وقفه تا موقعی که شرایط زندگی فراهم است زاد و ولد می نماید. هر شته در طول ۲۰ روز قادر است ۶۰ تا ۱۰۰ تخم تولید کند. ازدیاد سریع شته ها و انتقال آسان ویروس توسط آنها از یکسو و دامنه میزبانی وسیع ویروس از طرف دیگر باعث وقوع پیوستن اپیدمی های مخرب در سراسر دنیا شده است (Garcia- Arenal et al., 2000). در بررسی آلودگی همزمان پوتی ویروس ها و ویروس های متعلق به سایر جنس ها، یک افزایش قابل توجه در شدت علائم دیده شده است. در بیشتر این برهمکنش ها تجمع پوتی ویروس افزایش نمی یابد، اما تجمع سایر ویروس ها افزایش می یابد. به طور مثال در آلودگی همزمان کدوئیان به CMV و سایر پوتی ویروس های *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) و *Watermelon mosaic virus* (WMV) غلظت CMV افزایش یافت و غلظت پوتی ویروس ها ثابت ماند (Wang et al., 2002). همچنین بررسی آلودگی همزمان ویروس موزاییک خیار و ویروس پیسک فلفل (PepMoV) در گیاهان فلفل نشان داده که در گیاهان به تنهایی آلوده، تیتراژ CMV کاهش یافته اما در گیاهان آلوده به این دو ویروس تیتراژ افزایش یافته است. اما تیتراژ PepMoV هیچ تفاوتی نشان نداد و این موید این است که این برهمکنش موجب هم افزایی CMV و PepMoV بوده است (Morphy et al., 2006). آلودگی مخلوط ویروس موزاییک هندوانه (WMV) که یک پوتی ویروس است با ویروس نکروز هندوانه (WNV) اثر تشدید کننده ای را روی کدوئیان نشان داده است (Fintti et al.,

(2012). گزارشهایی نیز در مورد افزایش تجمع پوتی ویروس ها در آلودگی مخلوط با سایر ویروس ها داده شده است. در سیب زمینی شیرین آلوده به پوتی ویروس *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) و کراینی ویروس *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) مشاهده شد که غلظت SPFMV افزایش یافته در حالی که غلظت SPCSV ثابت مانده است (Karyeija et al., 2006). برهم کنش تشدید کننده بین ویروس سبزدی گوجه-فرنگی و ویروس پژمردگی لکه دار گوجه فرنگی منجر به شکستن مقاومت در گیاه گوجه فرنگی گردید (Garcia-Arenal et al., 2006). بهترین هم افزایی ویروس های گیاهی توصیف شده در برهم کنش بین ویروس ایکس سیب زمینی (PVX) و ویروس وای سیب زمینی (PVY) در توتون می باشد (Srinivasan et al., 2007). در آلودگی همزمان سویا با ویروس موزاییک سویا (پوتی ویروس) و ویروس موزاییک یونجه (آلفامو ویروس)، شدت علائم و سطح تجمع هر یک از این دو ویروس در سویا بررسی گردیده و مشاهده شد، که تعامل AMV با SMV منجر به هم افزایی می شود (Malapi-Nelson et al., 2009). در مطالعه ای آلودگی همزمان ویروس موزاییک خیار (CMV)، پروتئین پوششی آن را که با ویروس موزاییک زرد زوکی (ZYMV) (پوتی ویروس) بیان شده پایدار می کند (Kim, 2010). در آزمایشی که روی برهم کنش برخی ویروس ها مانند ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV) از بگومو ویروس ها، ویروس موزاییک خیار (CMV) با ویروس موزاییک گوجه فرنگی و اثر آنها بر رشد و عملکرد گیاهان گوجه فرنگی انجام پذیرفته مشاهده شده که در علائم و شدت بیماری، اثرات هم افزایی بیشتر توسط مخلوط ToMV + TYLCV + CMV و ToMV + TYLCV ایجاد می شود، در حالی که ترکیبی از ToMV + CMV باعث ایجاد علائم خفیف شده است. تمامی این برهم کنش ها باعث کاهش اثرات ویروس موزاییک گوجه فرنگی در گیاهان گوجه فرنگی آلوده گردیده است (Mohamed, 2010). طبق مطالعات انجام شده آنچه در آلودگی چندگانه به ویروس ها سبب افزایش غلظت یا میزان انتقال یک ویروس می شود، وجود یک پروتئین کد شده فعال از ویروس دیگر است (Ding et al., 2003). برهم کنش کاملاً خنثی بین ویروس ها، در حالت سوم، به این دلیل است که

همانندسازی و انتقال هر ویروس مستقل از دیگری می باشد و هیچ افزایشی در غلظت دو ویروس وجود ندارد، در حالیکه شدت بیماری زایی مجموعه دو ویروس در گیاه ممکن است افزایش یابد (Zhang et al., 2011). بررسی برهم کنش ویروس های موزاییک خیار و موزاییک چغندر در گیاه چغندر قند در شرایط گلخانه نشان داد که غلظت ویروس موزاییک خیار در اغلب گیاهانی که با دو ویروس آلوده شده بودند نسبت به گیاهانی که تنها با CMV آلوده شده بودند افزایش یافته بود و غلظت ویروس موزاییک چغندر در گیاهان دارای آلودگی منفرد و دوگانه یکسان بود (Mali et al., 2013). در مطالعه ای دیگر آلودگی مخلوط ویروس موزاییک خیار استرین های (Ls, Sny) که دارای آر آن ای ماهواره بودند (WL47-sat RNA, B5sat RNA) در آلودگی مخلوط با پوتی ویروس ها، میزان تجمع و بسته بندی ویروس موزاییک خیار کاهش یافت مگر زمانی که B5sat RNA در آلودگی مخلوط با Ls-CMV بود. همچنین زمانی که استرین های CMV در آلودگی مخلوط با ویروس موزاییک زرد کدو بودند، آر آن ای ماهواره نقش ممانعت کننده روی تجمع و بسته بندی ویروس موزاییک خیار داشت و تجمع آن در گیاه را کاهش داد (Wang et al., 2001). طهماسبی و همکاران بر روی برهم کنش ویروس موزاییک خیار و ویروس موزاییک زرد لوبیا به صورت همزمان در گیاهان لوبیا و باقلا پرداخته و نشان داده اند که برهم کنش CMV و BYMV وابسته به گونه های میزبان و مرحله رشد گیاه فرق می کند (Tahmasebi et al., 2010). می توان گفت که تعیین آلودگی مخلوط CMV با سایر ویروس ها مخصوصاً پوتی ویروس ها، از لحاظ بوجود آمدن هم افزایی بین این ویروس ها مهم است (البته بررسی هم افزایی نیازمند شناسایی گونه ها و نژادهای جنس پوتی ویروس و برهم کنش های آنها با ویروس موزاییک خیار در میزبان های مختلف با روش های آزمایشگاهی و گلخانه ای می باشد که در این تحقیق فقط به بررسی آلودگی های مخلوط این جنس با ویروس موزاییک خیار پرداخته شد و اثرات هم افزایی یا آنتاگونیستی بین دو ویروس مورد بررسی قرار نگرفت). همچنین به درک اینکه جنس پوتی ویروس بیشتر در چه نوع میزبان هایی با ویروس موزاییک خیار آلودگی مخلوط دارند و در کدام نوع گیاهان این آلودگی مخلوط کمتر است.

مواد و روش ها

نمونه برداری در طی فصل های بهار، تابستان و پاییز از برخی محصولات صیفی، سبزی و گیاهان میزبان ویروس موزاییک خیار در شمال غرب کشور شامل استان های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل به منظور تهیه منبع ویروسی، در سال ۱۳۹۴ انجام گرفت (جدول ۲). نمونه ها بر اساس علائم مشاهده شده و معمول ویروس موزاییک خیار شامل موزاییک بر روی برگ و میوه، پیسک، تاول های برجسته روی میوه، بدشکلی میوه، موزاییک زرد، کوتولگی بوته و نیز سایر علائم بیماری های ویروسی از جمله نخی شدن در برگ گوجه فرنگی، باریک شدن و بد شکلی برگ و کلروز در طی فصل های بهار، تابستان و پاییز طبقه بندی و انتخاب شدند. از هر مزرعه نیز یک نمونه به ظاهر سالم به عنوان شاهد منفی برداشته شد که بعداً عاری بودن آن از CMV از طریق کارهای گلخانه ای و آزمایشگاهی محرز شد. در این پژوهش ۲۵ جدایه ی مشکوک به آلودگی از هر میزبان (مجموعاً ۱۷۵ جدایه از کل نمونه های جمع آوری شده) که از مناطق مختلف جمع آوری شده بود انتخاب گردید. به منظور در دست بودن منبع ویروسی در گیاه تازه قسمتی از نمونه های جمع آوری شده بر روی گیاه میزبان گلخانه ای مایه زنی شدند. سپس بخشی از آن نمونه گیاهی جهت مطالعات فوری به یخچال منتقل شد، بخشی نیز بر روی کلرید کلسیم آب گیری و خشک شده و بخش دیگری نیز در فریزر ۲۰- درجه سانتی- گراد به حالت منجمد نگهداری شدند. به منظور بررسی بیشتر علائم ناشی از ویروس موزاییک خیار بر روی میزبان های مختلف تشخیصی، از گیاهان تشخیصی متفاوت شامل سلمه تره (*Chenopodium* (C.amaranticolor, quinoa Wild) گل تکمه ای (*Gomphrena globosa*) به عنوان میزبان لکه- موضعی برای خالص سازی بیولوژیکی ویروس

موزاییک خیار مورد استفاده قرار گرفتند (البته لازم به ذکر است برای خالص سازی تک لکه های ایجاد شده در گیاهان لکه موضعی چندین بار به گیاهان لکه موضعی عاری از ویروس پاساژ داده شد و برای دقت در خالص سازی از چندین میزبان لکه موضعی ویروس موزاییک خیار استفاده شد. همچنین تعداد لکه ها در مایه زنی های اولیه زیاد و اندازه ی لکه ها کوچکتر بود شاید دلیل آن وجود آلودگی مخلوط با سایر ویروس ها در مایه زنی های ابتدایی بوده است) (شکل ۱).

استخراج آران ای کل از نمونه های انتخاب شده (جدول ۲) با استفاده از روش روحانی و همکاران با تغییرات انجام شد (Rowhani et al., 2003). در این روش ۰/۱ گرم از برگ آلوده در ۲ میلی لیتر بافر استخراج سرد استخراج شد. جهت انجام آر تی پی سی آر از یک جفت آغازگر اختصاصی ویروس موزاییک خیار که بر اساس بخشی از RNA3، مربوط به پروتئین پوششی، بر اساس توالی جدایه بومی (AY871070) طراحی شده بودند استفاده شد. توالی آغازگر مستقیم (CMVCP-F) 5'AGTGGATCCATGGAAAAATCTGAATCAACCAG3' و آغازگر معکوس (CMVCP-R) 5'

عبارت بود از 5' AACTTCGAATTC(GT)ACTGGGAGCAA(CT)CC(AG)GACGTGGG 3' (جدول ۱). با این آغازگرها قطعه ای به اندازه ی ۶۷۵ جفت باز انتظار می رفت تکثیر یابد (تمرکز ما در منطقه ی شمال غرب بر روی زیرگروه یک ویروس موزاییک خیار بود به دلیل اینکه زیرگروه دوم بیشتر در مناطق جنوب کشور مشاهده شده و تاکنون از وجود آن در شمال غرب کشور گزارشی در دسترس نیست). این واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در ترموسایکلر مدل Quanta biotech Q-24 انجام گرفت. مرحله اول برای از بین رفتن ساختار ثانویه و اتصال اولیه آغازگرها با الگو انجام شد و مواد واکنش شامل ۱ میکرولیتر آر ان ای استخراج شده به همراه ۱/۱ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل و ۰/۴ میکرولیتر از محلول آغازگر معکوس (۵ pmol/μl) در میکروتیوب مخلوط شده و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده

شد. سپس جهت اجتناب از تشکیل مجدد ساختارهای ثانویه میکروتیوب ها سریعاً بر روی یخ منتقل شدند. آنگاه ۷/۵ میکرولیتر از ترکیب حاوی دو میکرولیتر بافر آر تی ۱, 5x میلی مولار dNTP- ۴۰ واحد RNasin ۲۰۰ واحد (نیم میکرولیتر) آنزیم ترانسکریپتاز (Fermentas, M-MulvLithuania) به هر واکنش اضافه شد. پس از ریختن مخلوط تهیه شده به هر کدام از تیوبها، به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند و سپس مجدداً به دستگاه ترموسایکلر انتقال و تحت برنامه یک ساعت در ۴۲°C که دمای مورد نیاز برای فعالیت بهینه آنزیم نسخه بردار معکوس را فراهم می کند، قرار داده شدند. سپس در ۷۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه به منظور غیر فعال نمودن آنزیم نسخه بردار معکوس و یک دقیقه در ۲۵°C قرار داده شدند. واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه شد که حاوی ۲ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲ میلی مولار MgCl₂، ۲/۵ پیکو مول آغازگر مستقیم و ۱/۲۵ واحد آنزیم TaqDNA polymerase (Fermentas Lithuania) بود. سپس ۲/۵ میکرولیتر از cDNA سنتز شده در واکنش آر تی به این ترکیب اضافه شد. در پی سی آر از پروفیل حرارتی یک چرخه ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، سی و پنج سیکل متشکل از ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه، در نهایت یک سیکل ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. به منظور ارزیابی نتایج حاصل از RT-PCR، الکتروفورز افقی در ژل آگارز ۱/۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TBE الکتروفورز گردید. آن گاه ۴ μl از فرآورده های RT-PCR با ۲ μl رنگ بروموفنول بلو 6X و ۶ μl آب مقطر دیونیزه مخلوط و در چاهک های ریخته شدند. برای دانستن اندازه ی محصولات RT-PCR، از نشانگر وزن مولکولی (EcoRI 1 μg/μl) DNA HindIII+ Lambda استفاده شد. جهت ردیابی ویروس های جنس پوتی ویروس در نمونه هایی که آلودگی مثبت به (CMV) داشتند انجام آر تی- پی سی آر از جفت آغازگر عمومی جنس پوتی ویروس استفاده گردید. آغازگر مستقیم 5' Nib2F (GTGGTGTIG AYGYTTTAAAYAA) 3' مطابق با توالی نوکلئوتیدی ۷۶۱۹-۷۶۴۱، و آغازگر معکوس 3R Nib 3' (TCIACIACIGTIGAIGGYTGNC) 5' (جدول

۱) مطابق با توالی نوکلئوتیدی ۷۹۴۵-۷۹۶۸ در ویروس وای سیب زمینی (که حالت حفاظت شده در جنس پوتی ویروس دارد) طراحی شده بودند (Zheng et al., 2008) که با این آغازگرها انتظار می رفت تکثیر قطعه ای به طول تقریباً ۳۵۰ جفت باز در واکنش پی سی آر قابل انتظار باشد. واکنش سنتز رشته اول مکمل آر ان ای که دی ان ای مکمل (cDNA) نامیده می شود مطابق با همان مراحل که در سنتز cDNA مربوط به قاب خواندنی پروتئین پوششی ویروس CMV ذکر شد (پرتکول روحانی و همکاران با تغییرات)، صورت پذیرفت. لازم به ذکر است غلظت محلول های مورد استفاده و حجم آنها در واکنش بر حسب میکرولیتر در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر مواد واکنش شامل ۱ میکرولیتر آر ان ای استخراج شده به همراه ۱/۱ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل و ۰/۴ میکرولیتر از محلول آغازگر معکوس (۵ pmol/μl) در میکروتیوب مخلوط شده و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس جهت اجتناب از تشکیل مجدد ساختارهای ثانویه میکروتیوب ها سریعاً بر روی یخ منتقل شدند. آنگاه ۷/۵ میکرولیتر (ترکیب حاوی دو میکرولیتر بافر آر تی ۱, 5x میلی مولار dNTP- ۴۰ واحد RNasin ۲۰۰ واحد (نیم میکرولیتر) آنزیم ترانسکریپتاز (Fermentas, M-MulvLithuania) به هر تیوب اضافه شد. الکتروفورز افقی در ژل آگارز ۱/۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TBE الکتروفورز گردید. آن گاه ۴ μl از فرآورده های RT-PCR با ۲ μl رنگ بروموفنول بلو 6X و ۶ μl آب مقطر دیونیزه مخلوط و در چاهک ها ریخته شدند. برای دانستن اندازه ی محصولات RT-PCR، از نشانگر وزن مولکولی مارک (Gene Ruler 100bp DNA) استفاده شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 1- Primers used in this study

ژن	توالی آغازگرها	محصول PCR
(CMV CP-F)	5'AGTGGATCCATGGAAAATCTGAATCAACCAG3'	۶۷۵
(CMV CP-R)	5'AACTTCGAATTC(GT)ACTGGGAGCAA(CT)CC(AG)GACGTGGG3'	۶۷۵
Nib2F	5'GTTTGYGTIG AYGTYTYAAYAA3'	۳۵۰
Nib3R	5'TCIACIACIGTIGAIGGYTGNCC3'	۳۵۰

نتایج و بحث

مشاهدات مزرعه‌ای نشان داد که تنوع زیادی از علائم بیماری ویروسی در منطقه به خوبی قابل مشاهده است. این تنوع علائم به احتمال زیاد ناشی از آلودگی مخلوط، جدایه‌ی ویروسی و نوع ارقام کشت‌شده در منطقه است. با بررسی‌هایی که بر روی میزبان‌های مختلف لکه‌موضعی انجام شد دو نوع سلمه‌تره *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*، برای لکه‌گیری و مایه‌زنی بر روی میزبان تکثیری ویروس موزاییک خیار استفاده شدند. تعداد، شدت و نوع علائم در جدایه‌های مختلف بر روی میزبان‌های مختلف، متفاوت بود. جدایه‌هایی که در حدواسط و دارای لکه‌های متوسط قرار می‌گرفتند، از لکه‌های آنها بر روی مایه‌زنی میزبان‌های سیستمیک و تکثیری برای بررسی نوع علائم مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱). علاوه بر سلمه‌تره برخی از جدایه‌ها نیز بر روی گل تکمه‌ای (*Gomphrena globosa*) نیز مایه‌زنی شدند. لکه‌های ایجاد شده بر روی گل تکمه‌ای اندازه‌ی متوسط داشته و خیلی زود لکه‌های ایجاد شده نکروزه می‌شدند به همین دلیل از لکه‌های این گیاه برای خالص‌سازی سیستمیک سریع استفاده شد. بطور کلی علائم ویروس موزاییک خیار روی کدو بخوبی مشخص بود و نسبت به سایر میزبان‌های تکثیری ویروس شدیدتر و زودتر بروز کردند. اولین علائم بر روی خیار از روز هشتم به بعد قابل مشاهده بود هر چند علائم بر روی این میزبان تکثیری به اندازه کدو واضح نبود اما در برخی از موارد در مراحل ابتدایی آلودگی ویروس سبب از بین رفتن و مرگ بوته‌های خیار شد. از نظر شدت علائم خیار بعد از کدو در جایگاه دوم در میان گیاهان مایه‌زنی شده قرار گرفت. برخی از جدایه‌هایی که بر روی گوجه‌فرنگی مایه زنی شدند هیچ علائمی نشان

ندادند اما در برخی دیگر حدود ۱۰ روز پس از مایه‌زنی موزاییک خفیف همراه با تغییر شکل برگ و تاول‌هایی بر روی برگ مشاهده شد و در مواردی نیز بدشکلی برگ در مراحل ابتدایی رشد گوجه‌فرنگی و باریک شدن و نخی شدن برگ‌های انتهایی دیده شد. علائم ویروسی بر روی توتون به مراتب دیرتر از سایر میزبان‌های تکثیری ویروس دیده شد (در حدود ۱۲ تا ۲۰ روز). علائم ایجاد شده نسبتاً ملایم بود فقط در موارد نادری علائم شدید در *N. tabacum* دیده شد که با باریکی برگ‌های انتهایی همراه بود. بطور کلی علائم ایجاد شده بر روی توتون شامل موزاییک خفیف بود که در اکثر جدایه‌ها دیده شد. کوتولگی بوته در *N. rustica* و در موارد کمی نیز کلروز و زردی برگ در توتون دیده شد. علائم ویروسی در گیاهان تکثیری گلخانه‌ای مخصوصاً کدو مایه‌زنی شده با جدایه‌هایی که از مزرعه جمع آوری شده بودند خیلی شدید و در فاصله ۴ تا ۶ روز علائم اولیه دیده می‌شد و پس از مدتی علائم شدیدتر و بصورت سیستمیک درآمد و حتی پارگی برگ نیز در برخی از جدایه‌ها قابل مشاهده بود که به احتمال زیاد ناشی از آلودگی ویروس موزاییک خیار با سایر ویروس‌های آلوده کننده بود. اما پس از خالص‌سازی و مایه‌زنی لکه‌های خالص شده علائم به مراتب کمتر و ملایم‌تر بود البته در برخی از جدایه‌ها تغییری در علائم ایجاد نشد و حتی در موارد کمی خفیف‌تر نیز بود (شکل ۱).

در این مطالعه از گیاهان محک برای ردیابی پوتی ویروس‌ها استفاده نشد چرا که هدف ابتدا شناسایی ویروس موزاییک خیار و سپس بررسی آلودگی مخلوط آن با پوتی ویروس‌ها بود. البته در کارهای گلخانه‌ای بعضاً مشهود بود نمونه‌هایی که آلودگی مخلوط در آنها بعداً با کارهای آزمایشگاهی مشاهده شد در گیاهان لکه موضعی لکه‌های ریزتر و بیشتر و در گیاهان سیستمیک سریع تر

بروز می کردند. در این تحقیق آر آن ای کل جهت ردیابی آلودگی مخلوط جنس پوتی ویروس با ویروس موزاییک خیار از نمونه های هایی گرفته شد که آلودگی آنها به ویروس موزاییک خیار در آنها به روش گلخانه ای و آزمایشگاهی مورد تایید قرار گرفته بود.

ردیابی ویروس موزاییک خیار

به منظور بررسی ویروس موزاییک خیار می بایست ویروس موزاییک خیار را از نمونه های جمع آوری شده با روش های گلخانه ای ردیابی می کردیم. ردیابی براساس ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار انجام گرفت. علاوه بر نمونه های مثبت در تست های گلخانه ای از تعدادی نمونه که علائم بیماری ویروسی داشتند اما با تست های گلخانه ای وجود ویروس ردیابی نشده بود نیز در این آزمون استفاده شد. در این آزمون از شاهد منفی (گیاه سالم و بدون علائم) و شاهد مثبت (ژن پروتئین پوششی کلون شده در یک پلاسمید (Nematollahi et al., 2003)) نیز استفاده شد. در نهایت با انجام این آزمون با استفاده از آغازگرهای منطبق بر توالی پروتئین پوششی روی نمونه های مشکوک به آلودگی با CMV قطعه ای به طول حدود ۶۷۵ جفت باز از نمونه شاهد مثبت و تعداد زیادی از جدایه های نماینده تکثیر یافت و مطابق با انتظار هیچ قطعه ای در شاهد منفی افزایش پیدا نکرد که نشان دهنده قابل اعتماد بودن نتایج آرتی پی سی آر بود (شکل ۲). شکل شماره ۲ ردیابی CMV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی CMV را روی جدایه های مختلف مربوط به گوجه فرنگی که از شهرهای مختلف ناحیه شمال غرب ایران جمع آوری شده را نشان می دهد.

ردیابی آلودگی مخلوط نمونه های مثبت آلوده به ویروس

موزاییک خیار با پوتی ویروس ها

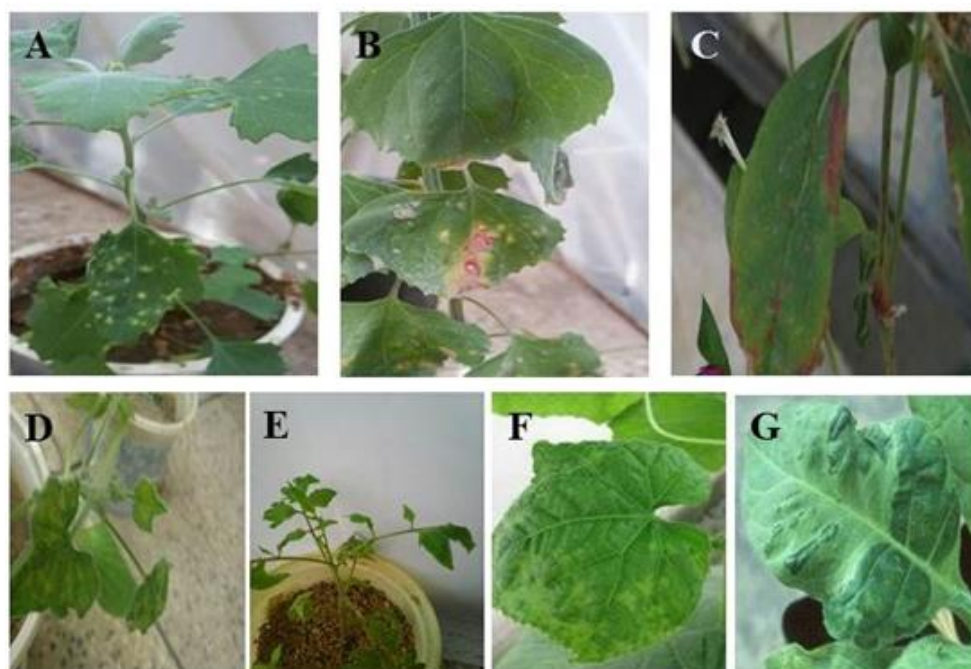
بعد از مطالعات گلخانه ای و استخراج آر آن ای کل از برگ های مشکوک و آلوده به ویروس موزاییک خیار و انجام پی سی آر و محرز شدن آلودگی به ویروس موزاییک خیار، انجام آرتی پی سی آر با جفت آغازگرهای عمومی پوتی ویروس ها برای آر آن ای کل نمونه های مثبت آلوده به ویروس موزاییک خیار که با روش روحانی و همکاران (پروتوکول در بالا ذکر شده) استخراج شده بود انجام شد. برای پی سی آر با جفت آغازگر Nib2F/Nib3R

استفاده شد همچنین در این آزمون از شاهد منفی (گیاه سالم و بدون علائم) و شاهد مثبت (cDNA های پروژی خانم آيسان قاسم زاده و همکاران در مورد ردیابی پوتی ویروس های منطقه ای شمال غرب (Ghasemzadeh et al., 2002)) نیز استفاده شد. در نهایت با انجام این آزمون با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی پوتی ویروس ها روی نمونه های مثبت به آلودگی با CMV انجام شد و در نمونه های مثبت قطعه ای به طول حدود ۳۵۰ جفت باز تکثیر یافت (لازم به ذکر است از این ۱۷۵ نمونه ی مورد بررسی، آلودگی ۱۱۶ مورد به ویروس موزاییک خیار و از بین نمونه های آلوده به ویروس موزاییک خیار آلودگی ۴۴ مورد به ویروس های جنس پوتی ویروس مشاهده گردید). مطابق با انتظار هیچ قطعه ای در شاهد منفی تکثیر پیدا نکرد که نشان دهنده قابل اعتماد بودن نتایج آرتی پی سی آر بود.

تصویر نتایج الکتروفورز را نشان می دهد (شکل ۳). شکل شماره سه آلودگی مخلوط در برخی جدایه های گوجه فرنگی را به ویروس موزاییک خیار و ویروس های جنس پوتی ویروس نشان می دهد. در چاهک شماره ی ۹ جدایه ی TaTo1 آلودگی مخلوط نشان نداد.

تعداد کل جدایه های جمع آوری شده ۳۰۰ جدایه بوده که ۲۵ نمونه از هر میزبان مربوط به جدایه های مختلف به عنوان نماینده برای کارهای گلخانه ای و آزمایشگاهی انتخاب شدند. از ۲۵ جدایه ی نماینده برای هر میزبان، تعداد آلودگی های منفرد و مخلوط ویروس موزاییک خیار با پوتی ویروس ها بر اساس کارهای ملکولی و گلخانه ای (نتایج در جدول شماره ۲) آمد. بیشترین آلودگی مخلوط ویروس موزاییک خیار با ویروس های جنس پوتی ویروس در خانواده ی سولاناسه مربوط بود به گیاه گوجه فرنگی و کمترین آلودگی به ویروس موزاییک خیار و پوتی ویروس ها در فلفل دیده شد.

در خانواده ی کدو بیان بیشترین آلودگی به ویروس موزاییک خیار همراه با پوتی ویروس ها در کدو (شاید دلیل آن عدم استفاده از ارقام مقاوم یا بذرزاد شدن ویروس موزاییک خیار و پوتی ویروس ها در آن باشد که کشاورزان از میوه های آلوده ی فصل جاری برای سال بعد بذرگیری می کنند)



شکل ۱- علائم لکه موضعی و سیستمیک ایجاد شده حاصل از مایه زنی جدایه های ویروس موزاییک خیار بر روی میزبان های لکه موضعی و سیستمیک

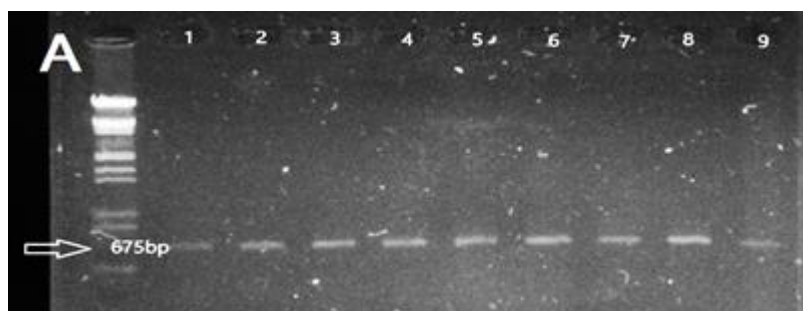
A- لکه های کلروزه بر روی برگ سلمه تره *Chenopodium quinoa*: B لکه های کلروزه بر روی برگ سلمه تره گونه *C. amaranticolor*
C- لکه های کلروزه بر روی برگ گل تکمه ای *Gomphrena globosa* همچنین علائم سیستمیک شدید روی میزبان های سیستمیک D- کدو E- گوجه فرنگی F- خیار
G- توتون حاصل از مایه زنی جدایه هایی که قبلا در گلخانه از آن ها علائم لکه موضعی گرفته شده بود به منظور خالص سازی جدایه ها.

Figure 1- chlorotic and systemic spots on inoculated leaves with CMV isolates on systemic and local hosts.

A- chlorotic spots on *Chenopodium quinoa* B- chlorotic spots on *Chenopodium amaranticolor*

C- chlorotic spots on *Gomphrena globosa* and severe systemic symptoms on systemic hosts D- *Cucurbita pepo*

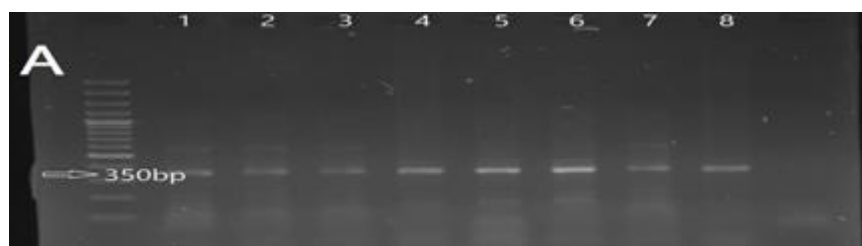
E- *Solanum lycopersicum* F- *Cucumis sativus* G- *Nicotiana tabacum* produced from inoculation of isolates that had shown symptoms of chlorotic spots in greenhouse in order to purifying isolates.



شکل ۲- ردیابی CMV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی CMV نشان داد که از جدایه های آلوده قطعه ای به اندازه ی 675bp تکثیر شده است.

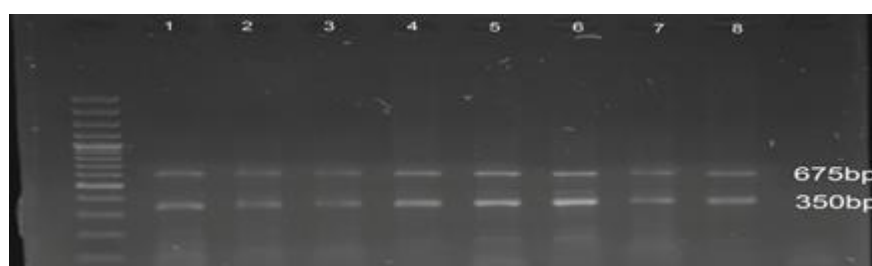
از آگارز و نشانگر وزن مولکولی ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Lambda DNA *Hind* III+) استفاده شد. به ترتیب شماره چاهک های ۱ تا ۹ عبارتند از جدایه های نمونه ی دی ان ای شاهد ShTo1- ArTo1 -OuTo3 -BoTo3 -TaTo1 -TaTo8 -MaTo2 -MaTo1-

Figure 2- Detecting of CMV using coat protein specific primers revealed that the isolates have CMV with a 675bp length .using agarose and *Eco*RI ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Lambda DNA *Hind* III+ molecular weight marker. The number of wells are respectively a witness DNA sample- BoTo3-Outo3- ArTo1- ShTo8- MaTo1- MaTo2- TaTo8.TaTo1.



شکل ۳- ردیابی پوتی ویروس ها با استفاده از آغازگرهای عمومی جنس پوتی ویروس (Nib2F-(Nib3R) نشان داد که از جدایه های آلوده قطعه ای به اندازه ی 675bp تکثیر شده است. از پودر آگارز و نشانگر وزن مولکولی مارکر (Gene Ruler 100bp DNA) استفاده شد. به ترتیب شماره چاهک های ۸ عبارتند از جدایه های نمونه ی دی ان ای شاهد-TaTo8-BoTo3-MaTo2-MaTo1-ShTo1-ArTo1-OuTo3-

Figure 3- Detecting of Potyvirus genus using universal primers revealed that the isolates have potyvirus with a 675bp length. The number of wells are respectively a witness DNA sample- BoTo3-Outo3- ArTo1- ShTo8- MaTo1- MaTo2- TaTo8.



شکل ۴- نتیجه واکنش مالتی پلکس پلی مرارز روی ژل آگارز و نشانگر وزن مولکولی مارکر (Gene Ruler 100bp DNA) استفاده شد.

Figure 4 - Multiplex polymerase chain reaction results on agarose gel and Gene Ruler 100bp DNA molecular weight marker.

جدول ۲- نتایج کلی بررسی آلودگی های منفرد و مخلوط ویروس موزاییک خیار با پوتی ویروس ها در منطقه ی شمال غرب ایران

Table 2- Overall Results for presence of single and mixed *Cucumber mosaic virus* (CMV) infections with potyviruses in North western of Iran

میزبان	تعداد نمونه ی مشکوک انتخاب شده	تعداد نمونه آلوده به CMV	تعداد نمونه ی آلوده به CMV همراه با پوتی ویروس ها
خیار	۲۵	۱۹	۵
کدو	۲۵	۲۲	۱۳
گوجه فرنگی	۲۵	۲۰	۱۴
فلفل	۲۵	۱۶	۴
تاج ریزی	۲۵	۱۶	۸
ختمی	۲۵	۱۴	۰
پنیرک	۲۵	۹	۰

مخلوط با پوتی ویروس ها را نشان دادند که این علف هرز حاشیه ی مزارع ممکن است در آلودگی مزارع سهم مهمی داشته باشد.

در مورد خانواده ی پنیرک ها (پنیرک *Malva spp.* ختمی) آلودگی به ویروس موزاییک خیار محرز ولی آلودگی به پوتی ویروس ها مشاهده نشد.

و کمترین آلودگی مخلوط در خیار محرز شد (احتمالا دلیل آن عدم استفاده از ارقام مقاوم وارداتی می باشد). علف های هرزی که از آنها ویروس موزاییک خیار و بعضا آلودگی مخلوط با پوتی ویروس گزارش شد (تاج ریزی: *Solanum nigrum*) اتفاقا در خانواده ای مشترک با گوجه فرنگی به نام *Solanaceae* قرار می گیرند. در این علف هرز پنجاه درصد نمونه هایی که در آنها وجود CMV ثابت شد آلودگی

منابع

- Ding, S. W., Shi, B. J., Li, W. X. and Symons, R. H. 2003.** An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proceedings of the National Academy of Science*, 93: 7470- 7474.
- Duarte, L. M. L., Rivas, E. B., Alexandre, M. A. V., Harakava, R. and Veauvy, M. C. D. 2013.** Genealogy of *Cucumber mosaic virus* isolated from ornamental species. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 1081-1087.
- Edwardson, J. R. 1966.** Electron microscopy of cytoplasmic inclusion in cells infected with rod shaped viruses. *Amer. Journal of Botany*, 53: 359-364.
- FINETTI-SIALER, T. Mascia, F, Cillo. 2012.** Biological and molecular characterization of a recombinant isolate of *Watermelon mosaic virus* associated with a *Watermelon necrotic disease* in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, 132: 317-322.
- Gallitelli, D. 2000.** The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Research*, 71: 9-21.
- Garcia-Arenal, F., Escriu, F., Aranda, M. A., Alonso-Prados, J. L., Malpica, J. M. and Fraile, A. 2006.** Molecular epidemiology of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA. *Virus Research*, 71: 1-8.
- Garcia-Arenal, F., Wang, J., Xu, W., Xiang, B. and Lin, H. 2000.** Variation analysis of two *Cucumber mosaic viruses* and their associated satellite RNAs from sugar beet in China. *Virus Genes*, 33(3):293-298.
- Ghasemzadeh, A., Sokhandan Bashir, N. and Masoudi, N. 2012.** Sequencing part of *Watermelon Mosaic virus* genome and phylogenetical comparison of 5 isolate with other isolates from world. *Journal of Agriculture and food technology*, 2(6):93-101.
- Hollings, M. and Brunt, A. 1981.** Potyvirus group Description, CMI/ AAB Description of Plant viruses. No. 245.
- Hasan, H. 2004.** Generation of an infectious *Beet mosaic virus* (BtMV) full- length clone based on the complete nucleotide sequence of a German isolate. Doctoral Thesis. University of Hannover, Germany.
- Hull, R. 2013.** Characterization of synergy between *Cucumber mosaic virus* and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology*, 92: 51-58.
- Karyeija, R. F., Kreuze, J. F., Gibson, R. W. and Valkonen, J. P. T. 2006.** Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited Crinivirus in sweet potato plants. *Virology*, 269: 26-36.
- KIM, M. K. 2010.** Characteristics of *Cucumber mosaic virus* infecting zucchini in Korea. *Plant Pathology Journal*, Seoul, 26(2): 139-148.
- Kolivand, D. and Sokhandan-Bashir, N and Mozaffari, J. 2012.** .molecular detection of *Cucumber mosaic virus* non necrogenic satellite RNA in Tobacco plant. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 43: 223-231.
- Malapi-Nelson, M., Wen, R-H., Ownley, B. H. and Hajimorad, M. R. 2009.** Co-infection of soybean with *Soybean mosaic virus* and *Alfalfa mosaic virus* results in disease synergism and alteration in accumulation level of both viruses. *Plant Disease*, 93: 1259-1264.
- Mali, V. R, Subr, Z., and Kudela, O. 2013.** Seed Transmission of Comovirus and Potyviruses in Fababean and Vetch Cultivars Introduced into Slovakia. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 38: 87-97.
- Mohamed, E. F. 2010.** Interaction between some viruses which attack tomato (*Lycopersicon esculentum*) Plants and their effect on growth and yield of tomato plants. *Journal of American Science*, 6(8): 311-320.
- Murphy, J.F., Rhoads, R.E., Hunt, A.G., and Shaw, J.G. 1990.** The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24 KDa part of the proteinase or the N-terminal 24 KDa part of the proteinase. *Virology*. 178: 285-288.
- Nematollahi, S., Sokhandan Bashir, N. Torabi, E. 2008.** *Cucumber mosaic virus* subgroup IA frequently occurs in the northwest Iran. *Acta Virologica*: 52(4): 237-42.
- Rizos, H., Gunn, L.V., Pares, R. D. Gillings, M. R. 1992.** Differentiation of *Cucumber mosaic virus* isolates using polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, 73: 2099-2103.
- Rowhani, A., Maningas, M. A., Lile, L. S., Daubert, S. D., Golino, D. A. 2003.** Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 85: 347-35.
- Srinivasan, R. and Alvarez, J. M. 2007.** Effect of mixed viral infections (*Potato Virus Y - Potato leaf roll virus*) on biology and preference of vectors *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 100(3): 646-655.
- Tahmasebi, A., Dizadji A., Farhoudi, F., Koohi-Habibi, M. 2010.** Interaction of *Cucumber mosaic virus* and *Bean yellow mosaic virus* in co-infected plants of bean and broad bean. *Archives of phytopathology and plant protection*, 46: 1081-1092.
- Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P. and Galon, A. 2001.** Characterization of synergy between

Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology*, 92: 51-58.

Zhang, X. S., Holt, J. and Colvin, J. 2011. Synergism between plant viruses: A mathematical analysis of the epidemiological implication. *Plant Pathology*, 50: 732-746.

Zhang, L., Wayper, P. J., Gibbs, A. J. Fourment, M. Rodoni, B. C., and Gibbs, MX 2008. A cumulating

variation at conserved sites in potyvirus genome is driven by species discovery and effects degenerate primer design. *PLoS ONE*. 3(2), e 1586.

Zitter, T. A. and Murphy, J. F. 2009. The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Research*, 71: 9–21.

Genetic Engineering and Biosafety Journal Volume 7, Number 2

Survey on presence of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in single and mixed infections with potyviruses in North-West of Iran

Mehrdad Salehzadeh*

Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

*Corresponding Author: mehrdadsalehzadeh@gmail.com

Abstract:

Cucumber Mosaic Virus (CMV) is one of the most important viruses infecting Cucurbitaceae and has a wide host range. However, presence of mixed infections with other viruses increases symptoms and damages of viruses. The present study aimed to investigate the mixed infection of CMV with Potyvirus in plants collected from various plant families including Cucurbitaceae with cucumber and Cucurbit, *Solanaceae* with tomato, pepper and *Solanum nigrum* and Malvaceae with *Malva. sp* and *Althea sp*. Determining in which hosts Potyviruses are mix infected with CMV and in which plants this infection is negligible, is important. Thus, 300 plant samples suspected to be infected were collected and preserved from above-mentioned families from Northwestern of Iran for laboratory and greenhouse experiments with symptoms of Mosaic, deformity and mottling, shrub dwarfism, yellowing and other symptoms of viral plant diseases including (shoe – string in tomato) etc. from each host, 25 samples related to various isolates were scrutinized. In order to conduct primary research on the presence of CMV, systemic and local host of CMV were applied in greenhouse and a pair of CMV coat protein-specific primers were utilized in RT-PCR. Then, detecting mixed infection with Potyviruses was conducted using RT-PCR with universal primers of Potyvirus genus Nib2F/Nib3 in samples whose infection to CMV was proved. The most of mix infections were observed in tomato and cucurbit and the least of mix infections were observed in Malva, pepper and cucumber.

Keywords: Universal and specific primers, Mixed infection, Synergism, Cucumber Mosaic Virus