

تعیین ترادف شش جدایه ایرانی ویروس موزائیک هندوانه و مقایسه فیلوژنتیکی جدایه‌های ایران با سایر جدایه‌های دنیا*

SEQUENCING OF SIX IRANIAN ISOLATES OF WATERMELON MOSAIC VIRUS AND PHYLOGENETIC COMPARISON OF IRANIAN ISOLATES WITH OTHER ISOLATES OF THE WORLD

سارا شعبی^۱، محمود معصومی^{۲*}، سعید نصراله‌نژاد^۳، سارا حیدری^۲، کرامت‌اله ایزدپناه^۲

و اسداله احمدی‌خواه^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۳/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۸/۲۰)

چکیده

ویروس موزائیک هندوانه (*Watermelon mosaic virus, WMV*) یکی از پوتی ویروس‌های مهم و گسترده در دنیاست که به کدوئیان خسارت وارد می‌کند. به منظور ردیابی و تعیین پراکنش این ویروس در مزارع استان گلستان ۱۷۹ نمونه از گیاهان دارای علائم موزائیک کدو، هندوانه، خربزه و خیار از شش منطقه از استان گلستان جمع‌آوری و با آنتی‌سرم WMV در آزمون DAS-ELISA مورد بررسی قرار گرفت و از تعداد مزبور ۲۸ نمونه آلوده به WMV تشخیص داده شدند. برای تعیین جایگاه تاکسونومیک جدایه‌های گرگان در میان سایر جدایه‌های دنیا، چهار جدایه از کدو و هندوانه از این استان، به همراه دو جدایه کدو از شیراز و مشهد، برای آزمون RT-PCR با یک جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده از ناحیه CP، انتخاب شدند. محصول PCR به طور مستقیم ترادف‌یابی شد و ترادف‌های به دست آمده هر یک شامل ۹۶۴ نوکلئوتید با ۴۱ ترادف از GenBank مقایسه شدند. آنالیز فیلوژنتیک و محاسبه فاصله ژنتیکی (Genetic distance) و تنوع (Diversity) نشان داد که جدایه‌های WMV از تمام دنیا در ۶ گروه قرار می‌گیرند و جدایه‌های مشهد و گرگان از ایران همراه با جدایه‌های اسپانیا، استرالیا و فرانسه در یک گروه و جدایه شیراز همراه با جدایه‌های ژاپن در گروه دیگر قرار می‌گیرند. فاصله ژنتیکی بین گروه‌ها و داخل گروه‌ها نیز نتایج فوق را تأیید کردند. محاسبه تنوع ژنتیکی (π) نشان داد که به رغم تنوع وسیع این ویروس در دنیا میزان تنوع آن در یک منطقه مانند اروپا بسیار پایین است. محاسبه تنوع جمعیت‌های مختلف دنیا نشان‌دهنده افزایش میزان این تنوع از غرب به شرق است. در شرق آسیا بیشترین میزان تنوع میزبانی و مولکولی دیده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزائیک هندوانه، DAS-ELISA، CP-UTR، آنالیز فیلوژنتیک، تنوع ژنتیکی، پوتی‌ویروس

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: masoumi@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. به ترتیب استادیار، کارشناس و استاد مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

۳. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

معتدل شناخته شده است و تنوع بیولوژیکی آن به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Purcifull & Hiebert 1979, Purcifull et al. 1984). اما تمایز سویه‌ها و جدایه‌های آن بویژه آنالیزهای تنوع و تکامل آن به طور جدی و دقیق با گسترش ابزارهای مولکولی در دو دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Moreno et al. 2004). این بررسی‌ها در مقیاس‌های جهانی و یا قاره‌ای و حتی ناحیه‌ای می‌تواند راهگشای درک تکامل و توسعه بیمارگر، و نهایتاً ارائه راهکار مناسب برای کنترل آن باشد (Moreno et al. 2004).

تاکنون گزارش‌های بسیاری از وجود، گسترش و دامنه میزبانی WMV از مناطق مختلف ایران منتشر شده است. دامنه میزبانی طبیعی این ویروس در ایران عمدتاً محدود به کدوئیان است (Bahar et al. 1983, Ebrahim-Nesbat 1974, Massumi et al. 2007, Parvizy 1989, Rahimian & Izadpanah 1978, Shabani et al. 2007). اولین گزارش از تنوع مولکولی WMV در ایران مربوط به کار Desbiez و همکاران در سال ۲۰۰۷ است که تنوع مولکولی ۴۲ جدایه از نقاط مختلف دنیا از جمله ۸ جدایه ایران را بر اساس یک قطعه ۲۱۸ نوکلئوتیدی از ناحیه ۵ ژن CP بررسی کردند. به دنبال آن شریفی و همکاران (۲۰۰۸) ۱۸ جدایه از مناطق مرکزی و جنوبی ایران را بر اساس ژن CP آنالیز کردند. در سال ۲۰۰۸ ترادف کامل جدایه IR02-01 توسط Desbiez و Leqoq تعیین شد. هیچ یک از این جدایه‌ها مربوط به استان گلستان نبوده است.

با توجه به این‌که استان گلستان از جمله مناطق مهم کشت جالیز در ایران و در عین حال دارای شرایط متفاوت از بسیاری از مناطق دیگر است، در این تحقیق ردیابی سرولوژیکی و مولکولی و پراکنش ویروس موزائیک هندوانه در مناطق مختلف این استان روی گیاهان خربزه، هندوانه، کدو و خیار بررسی قرار شد. سپس ترادف ژن پروتئین پوششی (Coat protein, CP) چند جدایه از مناطق مختلف این استان و همچنین یک نمونه از مشهد و یک نمونه از شیراز تعیین و از لحاظ فیلوژنتیکی با سایر جدایه‌های دنیا مقایسه شده است.

بیش از ۴۱ ویروس و چهار ویروئید به طور طبیعی و یا آزمایشگاهی یک یا چند گونه از کدوئیان را آلوده می‌سازند (Zitter et al. 1996). از این میان ۸ ویروس علائم موزائیک را تولید می‌کنند (Hsu et al. 2005, Lovisolo 1980) که در بین آنها ویروس موزائیک هندوانه (*Watermelon mosaic virus, WMV*) از شایع‌ترین ویروس‌هاست. نخستین بار در ۱۹۶۵ توسط Scott و Webb توصیف شد (مراجعه شود به Purcifull et al. 1984) و جزء اولین پوتی ویروس‌های کشف شده است که کدوئیان را آلوده می‌کند (Webb & Scott 1965). WMV از تیره *Potyviridae* و جنس *Potyvirus* می‌باشد. این ویروس پیکره‌های میله‌ای خمش‌پذیر به طول ۷۶۰ و عرض ۱۱ نانومتر دارد. WMV رابطه فیلوژنتیکی نزدیکی با ویروس موزائیک سویا (*Soybean mosaic virus, SMV*) دارد. با وجود این‌که این ویروس‌ها از نظر سرولوژیکی و بیولوژیکی تفاوت زیادی دارند اما به عقیده برخی از محققین WMV یکی از نزادهای SMV می‌باشد (Frenkel et al. 1989, Shukla et al. 1994, Yu et al. 1989) و احتمالاً بر اثر یک نوترکیبی بین گونه‌ای در چارچوب ژنی P1 میان ویروس موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus, BCMV*) و ویروس موزائیک سویا، ظهور کرده باشد (Desbiez & Lecoq 2004). WMV در کدوئیان خسارت ایجاد می‌کند و در مقایسه با سایر پوتی ویروس‌ها دامنه میزبانی وسیع‌تری دارد. WMV به طور آزمایشی بیش از ۱۷۰ گونه گیاهی متعلق به ۲۷ خانواده را آلوده می‌کند (Shukla et al. 1994). به طور طبیعی بسیاری از علف‌های هرز به WMV آلوده می‌شوند و می‌توانند منبع پایداری این ویروس در طول سال باشند (Lecoq 1992). این ویروس روی تیره‌های غلات (Inouye 1964)، پنیرک، اسفناجیان (Purcifull et al. 1984) و ارکیدها (Gara et al. 1997, Grisoni et al. 2004) و *Habenaria radiata* (Gara et al. 1997) گزارش شده است. WMV به عنوان یک بیمارگر مهم در مناطق مدیترانه‌ای و

روش بررسی

در ماه‌های تیر و مرداد ۱۳۸۷، ۱۷۹ نمونه از گیاهان هندوانه، خربزه، خیار و کدو با علائم موزائیک، بدشکلی، تاوولی شدن، بندکشی شدن برگ‌ها و کاهش رشد از مزارع جالیز گنبد، بندرگز، بندرتکمن، کلاله، گنبد، علی آباد و گرگان جمع‌آوری و برای انجام آزمایش‌های سرولوژیک و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شد (جدول ۱).

آزمون الیزا و تعیین پراکنش

به منظور شناسایی و تعیین پراکنش ویروس از آزمون الیزا (DAS-ELISA) (Clark & Adams, 1977) با استفاده از آنتی-بادی چند همسانه‌ای اختصاصی این ویروس (DSMZ, Germany) استفاده شد.

آزمون RT-PCR

تعداد چهار جدایه WMV از استان گلستان، به اضافه یک جدایه از مشهد و یک جدایه از شیراز انتخاب و از آنها در آزمون PCR استفاده شد. این نمونه‌ها پس از عصاره‌گیری در سه حجم بافر سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار pH=۶/۸ مستقیماً با کلروفرم به نسبت ۳۰ درصد تیمار و سانتریفوژ شدند و از فاز روئی برای تهیه cDNA استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از کیت mRNA capture (Roche) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. از آر.ان.ای جذب شده به لوله برای واکنش ترا نویسی معکوس (reverse transcription) با آنزیم Moloney murine leukemia virus (MmLV) Revert Aid (Fermentas) استفاده گردید. واکنش RT با مخلوط کردن ۱۰ میکرولیتر بافر ۵ برابر Expand RT ۰/۴ mM، DTT ۰/۴ mM، مخلوط dNTP ۲۰ U RNase inhibitor ۰/۶ μM آغازگر oligodT ۲۰U و Expand RT ۲۰U انجام شد. مخلوط حاصل با افزودن آب به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و در دمای ۴۲°C به مدت یک ساعت نگه‌داری شد.

cDNA به دست آمده از واکنش RT با واکنش زنجیره‌ای

پلی مرز (polymerase chain reaction, PCR) تکثیر شد. مخلوط واکنش PCR شامل یک میکرولیتر Taq DNA polymerase buffer (۱۰ x) ۵ M، MgCl₂ ۷/۵ M، یک میکرولیتر از مخلوط dNTP، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای IWM3f (پیشرو) و IWM2r (پیشرو) به ترتیب با ترادف‌های 5'-GYTGTGARTCAGTGTCTYTRC-3' و 5'-CGGTATTGTAATGGTTCTCCCTG-3' آنزیم Taq DNA polymerase (Cinagen, Iran) و ۴ میکرولیتر DNA بود که با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر سترون حجم آن به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR شامل ۳۶ چرخه به شرح زیر بود: ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه (چرخه یک): ۹۴°C به مدت یک دقیقه، ۵۳°C به مدت یک دقیقه و ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه (چرخه‌های دو تا ۳۶). نهایتاً مخلوط واکنش به مدت ده دقیقه در دمای ۷۲°C نگه‌داری شد. محصول PCR مستقیماً همراه با آغازگرهای اختصاصی ویروس برای تعیین ترادف به شرکت Macrogen (کره جنوبی) ارسال گردید.

آنالیز فیلوژنتیک

پس از ادغام ترادف‌های به دست آمده از ۲ تا ۴ قطعه مختلف محصول PCR، ترادف‌های استتاجی (Consensus sequence) با استفاده از نرم‌افزارهای DNAMAN و Edit (DNASTAR) seq به دست آمد. این ترادف‌ها همراه با ۴۱ ترادف انتخاب شده از GenBank (جدول ۲) مقایسه شدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه (multiple alignment) با برنامه Clustal X (Thompson et al. 1997) انجام شد. فایل‌های هم‌ردیف‌سازی شده حاصل از این برنامه در نرم‌افزار MEGA3 (Kumar et al. 2001) برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی به روش Maximum parsimony (MP) استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی به روش neighbour-joining (NJ) از برنامه Clustal X به دست آمد و در برنامه Tree view 1.6.6 (Page 1996) مشاهده و بررسی گردید. آنالیز NJ در نرم‌افزار MEGA3 مجدداً مورد بررسی و

جدول ۱. تعداد و محل نمونه برداری گیاهان مختلف جالیزی و میزان آلودگی آنها به WMV در استان گلستان در ماه‌های تیر و مرداد ۱۳۸۷
 Table 1. Location and number of cucurbits samples tested and number of WMV infected plants in Golestan province in July and August 2008 based on ELISA tests.

محل نمونه‌برداری	محصول	تعداد نمونه‌ای مورد آزمایش	تعداد نمونه‌ای آلوده
Gonbad	Watermelon	10	0
	melon	5	0
	Pumpkin	18	2
	cucumber	8	0
kalaleh	watermelon	9	0
	pumpkin	11	0
Aliabad Katul	melon	7	2
	pumpkin	11	0
Gorgan	melon	4	0
	pumpkin	12	4
	cucumber	3	0
Bandar Torkaman	melon	10	6
	pumpkin	16	0
	cucumber	9	2
	watermelon	14	1
Bandar Gaz	watermelon	14	8
	pumpkin	10	0
	melon	8	3

نتیجه

علائم بیماری در بوته‌های آلوده به WMV در چهار گونه از خانواده کدوئیان، متنوع بود. عمده‌ترین علائمی که مشاهده گردید موزائیک همراه با تاوولی شدن برگ‌ها به صورت خفیف تا شدید بود. از علائم دیگر می‌توان به بدشکلی برگ‌ها، کوچکی برگ به ویژه در هندوانه‌های دیم سیاه (تنها علائمی که در این نوع از هندوانه‌ها دیده شد، کوچکی برگ بوده است)، تیره شدن قسمتی از برگ، کوتولگی بوته در روی هندوانه و کلروز حاشیه برگ اشاره کرد. کم رشدی بوته‌های هندوانه، کوتاه و کمانی شدن بوته‌های خیار همراه با برآمدگی‌هایی روی آن از علائم دیگر بیماری است. به طور کلی علائم مشهود آلودگی در روی میوه‌های کدو، هندوانه، خربزه و خیار به صورت تاوولی شدن، بدشکلی و تغییر رنگ دیده شد (شکل ۱).

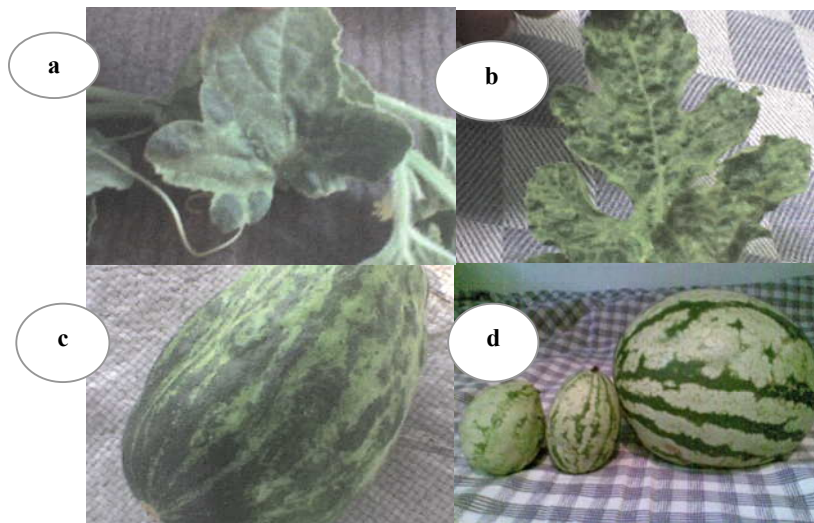
تأیید قرار گرفت. در این آنالیزها از مترادف ویروس موزائیک هندوانه مراکشی *Moroccan watermelon mosaic virus* (MWMV) (رس شمار 009995 NC) به عنوان outgroup استفاده شد.

برای محاسبه فاصله ژنتیکی (Genetic distance) و تعیین میزان تنوع ژنتیکی (π , diversity) بین مترادف‌ها و گروه‌های فیلوژنتیکی و جمعیت‌های WMV از ایران و اروپا که جداگانه هم‌ردیف شده بودند به روش Kimura's two parameter از نرم‌افزار MEGA3 و برای آنالیز انتخاب طبیعی (Natural selection) و تعیین نسبت جانیشینی نامترادف (nonsynonymous substitution, dN) بر جانیشینی مترادف (synonymous substitution, dS) که با علامت ω نشان داده می‌شود (Kimura 1983) از نرم‌افزار DnaSP (Rozas & Rozas 1999) استفاده شد.

جدول ۲. رس شمار، میزبان، کشور، ناحیه ژنوم و اندازه قطعه جدایه ها یا استرین های WMV در GenBank

Table 2. Accession number, host, country, genome region and length of segment of the strains or isolates of watermelon mosaic virus deposited in GenBank

جدایه یا استرین	میزبان	کشور	منطقه ژنوم	طول (bp)	Accession رس شمار
WMV	pumpkin	Japan	Nib-CP precursor	1167	AB353119
WMV -Fr	watermelon	France	comp.	10035	NC_006262
WMV	Melon	Australia	CP-UTR	1157	D00535
WMV		South Korea	comp.	10037	AB369278
WMV		USA		3308	D13913
WMV- Ch99/69		China	Nib-CP-UTR	1154	EF127832
WMV -Pk	<i>C. melo</i> var <i>flexuosus</i>	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
WMV MAL99.5	<i>C. melo</i>	Spain	cp	873	AJ579524
WMV SG99.3	<i>C. melo</i>	Spain	cp	873	AJ579519
WMVMAD95.6	<i>C. melo</i>	Spain	cp	873	AJ579509
WMV	<i>C. melo</i>	Spain	cp	873	AJ579502
WMV	<i>C. melo</i>	Spain	cp	873	AJ579493
WMV	<i>C. melo</i>	Spain	cp	873	AJ579491
WMV	<i>C. melo</i>	Spain	cp	873	AJ579486
WMVM116		Spain	Nib-CP	1602	AF551334
WMV		Israel	cp	843	AF322376
WMV Tonga			Nib-CP-UTR	1656	L22907
WMV Habenaria		Japan	Nib-CP-UTR	1180	AB001994
KER.JI.1	<i>Citrullus colocynthis</i>	Kerman-Jiroft	cp	822	EU667627
KER.KE.1	<i>Cucumis melo</i> L.	Kerman-Kerman	cp	822	EU667644
YAZ.SH.1	<i>C. melo</i> L.	Yazd-Sadogh	cp	822	EU667635
YAZ.MO.1	<i>Cucumis sativus</i> L.(cucumber)	Yazd- Mohsenabad	cp	822	EU667638
ESF.ES.1	<i>Cucurbita moschata</i> , Iranian cultivar	Esfahan- Esfahanak	cp	822	EU667637
ESF.ES.2	<i>C. melo</i> L.	Esfahan- Esfahanak	cp	822	EU667640
YAZ.MO.2	<i>Cucurbita pepo</i>		cp	822	EU667630
ESF.GA.1	<i>C.sativus</i> L. (cucumber)	Esfahan-Gaz	cp	822	EU667641
ESF.GA.2	<i>Cucurbita maxima</i>	Esfahan-Gaz	cp	822	EU667634
ESF.ES.3	<i>C.sativus</i> L. (cucumber)	Esfahan- Esfahanak	cp	822	EU667633
HOR.HA.1	<i>C.melo</i> L. Shahabadi cultivar		cp	822	EU667628
ESF.GA.3	<i>C.sativus</i> L. (cucumber)	Esfahan-Gaz	cp	822	EU667643
ESF.ZA.1	<i>Cucurbita moschata</i> Duch (pumpkin) Iranian cultivar	Esfahan- Zarinshahr	cp	822	EU667639
ESF.ZA.2	<i>C.melo</i> L.	Esfahan- Zarinshahr	cp	822	EU667636
URO.NA.1	<i>C.maxima</i> Duch. E Lam. (winter squash)	Uromiae- Naghadae	cp	822	EU667629
URO.OS.1	<i>C.melo</i> L., kesavarz cultivar	Uromiae- Oshnaviae	cp	822	EU667631
ESF.ZA.3	<i>C.sativus</i> L. (cucumber)	Esfahan- Zarinshahr	cp	822	EU667642
YAZ.TA.1	<i>Cucurbita pepo</i> (summer squash)	Yazd-Taft	cp	822	EU667632



شکل ۱. علائم WMV روی انواع مختلف کدوئیان. a- موزائیک و ابلق روی پهنک برگ خربزه. b- موزائیک و تاولی شدن پهنک برگ هندوانه. c- تاولی شدن و بدشکلی میوه خربزه. d- کوچکی و تاولی شدن میوه هندوانه.

Fig 1. Watermelon mosaic virus symptom on cucurbit plants, a) mosaic and mottling on melon leaf blade, b) mosaic and blistering of watermelon leaf, c) blistering and deforming of melon fruit, d) reducing size and blistering of watermelon fruit

شناسایی این ویروس در عصاره گیاه آلوده بودند و کاملاً اختصاصی عمل کردند. با استفاده از این آغازگرها در آزمون PCR قطعه‌ای به اندازه ۱۰۵۵ جفت باز به دست آمد (شکل ۲). از ترادف‌های حاصل پس از ادغام و تصحیحات لازم هر کدام ۹۵۸ نوکلئوتید به دست آمد. ترادف ابتدا و انتهای قطعه‌ها به دلیل این‌که درست خوانده نشده بود حذف شده لذا ترادف حاصل کوچک‌تر از محصول PCR بود. در این ترادف‌ها از موقعیت ۱ تا ۸۲۸ ژن CP و از ۸۲۹ تا ۸۳۱ رمز پایانی TAA و از موقعیت ۸۳۲ تا 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) بود. ترادف‌های حاصل از نمونه‌های ۶۸ خربزه گنبد، ۱۲۷ کدو تنبل گرگان، ۱۲۹ هندوانه بندر ترکمن، ۱۳۲ کدو مسمایی کردکوی، کدو مسمایی مشهد و کدو مسمایی شیراز در GenBank قرار داده شدند (جدول ۳).

برای مقایسه جدایه‌ها، حدود ۸۱ جدایه موجود در GenBank بررسی شدند. ترادف‌های موجود از

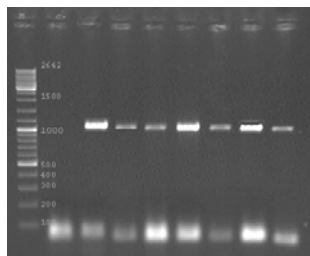
با توجه به نتایج آزمون‌های سرولوژیک علی‌رغم وجود علائم موزائیک در هندوانه‌های ابوجهل (*Citrullus colocynthis* (L.) Schrad) آلودگی به WMV دیده نشد، اما هر دو نوع کدوی مسمایی و حلوایی به این ویروس آلوده بودند. هم‌چنین در این بررسی برخی هندوانه‌های سیاه دیم بدون علائم مشخص بیماری به WMV آلوده بودند.

آزمون سرولوژیکی و تعیین پراکنش

از ۱۷۹ نمونه جمع‌آوری شده، ۲۸ نمونه آلوده به WMV بودند. آلودگی در هر چهار نوع گیاه جالیزی دیده شد. پراکنش ویروس در ۶ منطقه از استان مورد بررسی قرار گرفت تنها در منطقه کلاله WMV مشاهده نشد (جدول ۱). بیشترین آلودگی در بندر ترکمن روی خربزه و بندر گز روی هندوانه بود. به طور کلی بیشترین آلودگی در خربزه و کمترین آلودگی در خیار مشاهده گردید.

آزمون RT-PCR

آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای WMV قادر به



شکل ۲. نتایج آزمون PCR در ژل آگاروز ۱٪. سمت چپ: مارکر DNA. راهک ۱، کنترل منفی با آب مقطر و راهک‌های ۳ تا ۹، آلوده به WMV. قطعه‌ای به اندازه ۱۰۵۵ نوکلئوتید تکثیر شده است.

Fig 2. PCR products on 1% agarose gel. Left to right Lane 1) DNA marker, Lane 2) Distilled water as negative control, lanes 3-9 WMV infected samples. A 1055nt segment was amplified in PCR reaction.

جدول ۳. رس شمار، میزان و اندازه قطعه جدایه‌های تعیین ترادف شده WMV

Table 3. Accession Number, host, and length of segment of the sequenced isolates of Watermelon mosaic virus

محل جمع‌آوری	میزبان	طول (bp)	رس شمار Accession
Bandar Torkaman 129	Watermelon	958	GQ421156
Gonbad 68	melon	958	GQ421157
Mashhad	Summer squash	963	GQ421158
Gorgan 132	Winter squash	958	GQ421159
Kordkuy 127	Summer squash	958	GQ421160
Shiraz	Summer squash	962	GQ421161

شکل ۲ دندروگرام مربوط به گروه بندی جدایه‌های WMV را نشان می‌دهد. در این درخت فیلوژنتیک انشعابات و شاخه‌های با bootstrap کمتر از ۵۵ حذف و فشرده (condense) شده‌اند و این ارقام روی انشعابات ذکر نشده‌اند. چنانکه مشاهده می‌شود کلیه جدایه‌های آنالیز شده در ۶ گروه قرار گرفته‌اند:

گروه ۱- شامل جدایه‌های اسپانیا، فرانسه، استرالیا، اسرائیل، اصفهان، ارومیه، آذربایجان، گرگان و مشهد
گروه ۲- جدایه شیراز و دو جدایه ژاپن
گروه ۳- جدایه های چین، کره و ژاپن
گروه ۴- دو جدایه پاکستان
گروه ۵- سه جدایه از یزد و یک جدایه از استان کرمان
گروه ۶- یک جدایه از کرمان (KERJ11) و جدایه‌های نیوزیلند، اسپانیا، آمریکا و Tonga (یکی از جزایر جنوب شرقی آسیا)
گروه ۱ با بیشترین تعداد طیف وسیعی از جدایه‌های اروپا، و خاورمیانه را در بر گرفته است. تنها یک جدایه از استرالیا در

ناحیه CP-UTR ژنوم متناظر با ناحیه تعیین ترادف شده حدود ۷۵۰ nt، متناظر با موقعیت ۹۰۰۴ تا ۹۷۵۲ ترادف کامل جدایه ایرانی IR02-1 (رس شمار EU660584) انتخاب و برحسب تشابه اندازه ترادف، کشور یا کشورهای منشاء جدایه، به طور جداگانه هم‌ردیف‌سازی شدند (جدول ۲) و درخت فیلوژنتیکی برای هر گروه ترسیم گردید (اطلاعات نشان داده نشده است). از بین آنها تعداد ۴۱ جدایه انتخاب گردیدند. از این تعداد ۱۷ ترادف مربوط به ایران (Sharifi *et al.* 2008) بود که هر یک معادل ۸۵۰ نوکلئوتید از ناحیه CP است و مربوط به نواحی مرکزی ایران (استان‌های اصفهان، یزد و کرمان) و یک نمونه از ارومیه می‌باشد. نمونه دیگری که از ایران در GenBank قرار داده شده، جدایه IR02 است که در جدول ۲ ذکر شده و ترادف کامل آن تعیین شده احتمالاً مربوط به نواحی آذربایجان ایران است. اطلاعات مربوط به جدایه‌ها، منشاء و میزبان آنها و رس شمار GenBank در جدول ۲ ذکر شده است. این ۴۱ جدایه با ۶ جدایه تعیین ترادف شده آنالیز شدند.

بیشترین تنوع مربوط بود به مجموع جدایه‌های شرق آسیا و اقیانوسیه که در اینجا واژه شرق به آنها اطلاق می‌شود و شامل جدایه‌های استرالیا، نیوزیلند، چین، ژاپن و کره جنوبی می‌باشد. میزان این تنوع ۵/۶٪ محاسبه گردید.

نسبت dN/dS در گروه‌های مختلف در جدول ۴ ذکر شده است. این نسبت در جمعیت کل دنیا که به طور نسبی حد میانگین گروه‌های فیلوژنتیک را نشان می‌دهد ۰/۰۴۷ است. در ایران این نسبت به حدود ۰/۰۵۸ می‌رسد. بیشترین مقدار dN/dS در گروه ۶ است که ۰/۰۹۱۷۸ است. اگر توجه شود در کل جمعیت دنیا و نیز جمعیت ایران مقدار dN تقریباً برابر است ولی تفاوت در نسبت dN/dS مربوط است به مقدار جانیشینی مترادف (dS) در این گروه‌هاست که بیشترین مقدار dS را گروه شرق دارد که معادل ۰/۲۰۵۲۴ است.

بحث

یکی از شایع‌ترین پوتی ویروس‌های کدوئیان در دنیاست که به محصولات جالیزی خسارت وارد می‌کند (Grafton-Cardwell et al. 1996, Ullman et al. 1991). در ایران مطالعات متعددی در مورد این ویروس انجام شده است اما گزارشی از وضعیت این ویروس در شمال شرق ایران در دست نیست. شناسایی و تعیین پراکنش WMV در استان گلستان در سال ۱۳۸۷ نشان داد که این ویروس در بیشتر مناطق وجود دارد. از بین گیاهان جالیزی، خربزه بالاترین میزان آلودگی را به خود اختصاص داده و کمترین درصد آلودگی مربوط به خیار می‌باشد. ۱۵/۶٪ از علائم موزائیک مشاهده شده در استان به WMV مربوط می‌شود دامنه میزبانی این ویروس در ایران به گیاهان جالیزی محدود می‌شود اما در شرق گیاهان دیگری نیز مانند *Habenaria* و وانیل به عنوان میزبان گزارش شده‌اند (Wang et al. 1993, Gara et al. 1997).

وضعیت ویروس‌های کدوئیان در هر منطقه به عوامل متعددی بستگی دارد. در شرایط و مناطق مختلف غالبیت یک

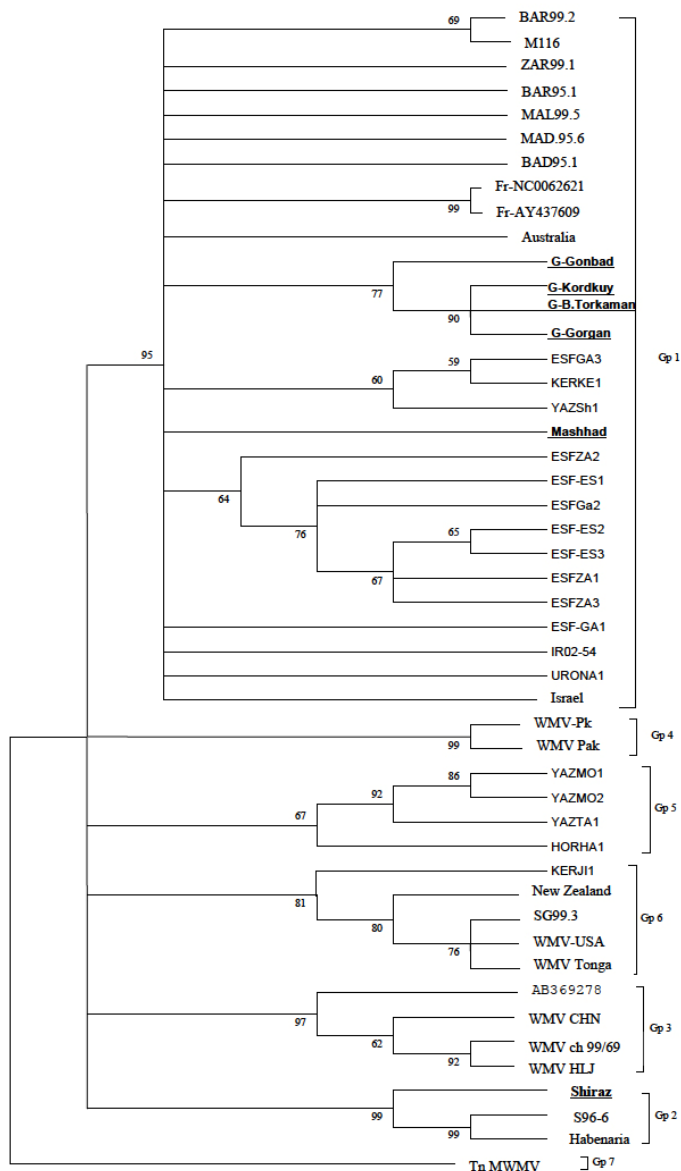
GenBank وجود دارد که در این گروه قرار گرفته است. چهار جدایه گرگان، یک جدایه مشهد و از ۱۸ مترادف ایرانی موجود در GenBank، ۱۳ جدایه در این گروه قرار می‌گیرند.

گروه‌های ۲ و ۳ مربوط به جنوب شرق آسیا هستند. در گروه ۲، جدایه شیراز با دو جدایه ژاپن همگروه شده است که بیانگر رابطه ژنتیکی بالا (۹۵٪ شباهت ژنتیکی) با سویه جدا شده از *Habenaria radiata* و یک سویه دیگر از ژاپن می‌باشد.

گروه ۴ دو جدایه پاکستان و گروه ۵ مستقلاً جدایه‌های قسمت مرکزی ایران یعنی یزد را شامل می‌شود. تنها گروهی که در آن چند جدایه دور از هم در یک جا جمع شده‌اند گروه ۶ می‌باشد که شامل جدایه‌های کرمان (KERJ11)، نیوزلند، اسپانیا، آمریکا و Tonga است که از نظر توزیع جغرافیایی یک گروه نامتجانس را تشکیل می‌دهد. به استثنای چند مورد شامل قرار گرفتن جدایه شیراز در کنار جدایه‌های ژاپن در گروه ۲، جدایه استرالیا در گروه ۱ و جدایه KERJ11 کرمان در گروه ۶، جدایی جغرافیایی (geographical isolation) با گروه‌بندی فیلوژنتیک همخوانی دارد.

بررسی تنوع ژنتیکی

میانگین فاصله ژنتیکی که میزان تنوع ژنتیکی (diversity, π) را مشخص می‌کند برای تمام جدایه‌ها با همان معیار ۰/۰۴۳ بود. مقدار π در گروه‌های مختلف تا حدودی متفاوت بود. در گروه‌های ۱ تا ۶ به ترتیب با ۰/۰۱۸، ۰/۰۱۶، ۰/۰۱۲، ۰/۰۱۰، ۰/۰۲۱ و ۰/۰۲۷ برابر بود، در صورتی که میانگین تنوع ژنتیکی درون گروه‌ها حدود ۰/۰۲۰ یعنی ۲٪ بود. این مقدار برای تمام جدایه‌های ایران که در گروه‌های مختلف قرار گرفته‌اند برابر با ۰/۰۳۶ و برای جدایه‌های اروپا که شامل ۴۵ جدایه اسپانیا و دو جدایه فرانسه بود ۰/۰۲۳ محاسبه گردید. بر این اساس تنوع ژنتیکی در ایران که برای ۲۴ جدایه محاسبه شده است ۱/۵ برابر بیشتر از اروپاست. در گروه ۶ نیز علی‌رغم وجود فاصله جغرافیایی بسیار زیاد بین آنها، میزان تنوع ژنتیکی ۰/۰۲۷ بود که باز هم نسبت به جدایه‌های ایران تنوع کمتری داشت. اما



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش neighbour joining، به دست آمده از همردیف سازی ۷۵۰ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی ۴۷ جدایه WMV. مقدار bootstrap، ۱۰۰ برای محاسبه روابط فیلوژنتیکی به کار رفته است. مقادیر bootstrap بیشتر از ۵۵ روی گره ها نشان داده شده است و ریشه های با ارقام کمتر از آن فشرده شده است. جدایه های تعیین ترادف شده در این تحقیق با حروف سیاه و زیرنام آنها خط کشیده شده است.

Fig 3. Neighbour joining tree obtained from alignment of a 750 nt of coat protein gene of the 47 isolates of WMV. A bootstrap analysis was applied using 100 replicates. Bootstrap values higher than 55 are indicated on nodes, and the nodes less than 55 were condensed. The isolates, which have been sequenced here, were underlined and bolded.

جدول ۴. تنوع ژنتیکی و نسبت جانشینی آمینواسیدی در جدایه‌های مختلف WMV در جمعیت‌ها و گروه‌های فیلوژنتیک
 Table 4. Genetic diversity and amino acid substitution ratios in different isolates of WMV in populations and phylogenetic groups

	تعداد توالی	Pi(s) ^a J&C	Pi(a) ^b J&C	dN/dS	تنوع ژنتیکی (π)
World	47	0.18198	0.00855	0.047	0.042
East	9	0.2485	0.01009	0.0406	0.056
Europe ^c	41	0.08474	0.00305	0.03599	0.023
Iran	24	0.14256	0.00821	0.05759	0.036
gr.1	29	0.06778	0.00459	0.06772	0.018
gr.2	3	0.07378	0.00229	0.031	0.016
gr.3	4	0.04717	0.00172	0.03646	0.012
gr.4	2	0.00	0.00	0.00	0.00
gr.5	4	0.04755	0.01288	0.2738	0.021
gr.6	5	0.09425	0.00855	0.09178	0.027

a. جانشینی مترادف با اعمال تصحیح (Jukes and Cantor (1969)

b. جانشینی نامترادف با اعمال تصحیح (Jukes and Cantor (1969)

c. آنالیز همردیف سازی چند گانه و محاسبه π و dN/dS برای جدایه‌های اروپا مستقلاً انجام گرفت، اما برای سایر جمعیت‌ها و گروه‌های فیلوژنتیک از همردیف سازی ۴۶ ترادف انتخابی دنیا و ایران استفاده گردید.

a. Synonymous substitution, with Jukes and Cantor (1969) correction

b. Nonsynonymous substitution, with Jukes and Cantor (1969) correction

c. Multiple alignment and dN/dS calculations for European isolates were independently performed, but multiple alignment of 46 selected sequences of the world and Iran were used for other populations and phylogenetic groups.

بررسی نیز از ترادف‌های ژن CP برای مقایسه و آنالیز استفاده شده است. تنها گزارش از ترادف ژن CP در ایران مربوط است به Sharifi و همکاران (۲۰۰۸) که عمدتاً به جدایه‌های نواحی مرکزی و جنوبی ایران و یک مورد به ارومیه مربوط می‌شود از تنوع WMV در سایر مناطق کشور اطلاعی در دست نیست. با اینکه استان‌های شمال شرق از مهم‌ترین مناطق کشت جالیز هستند اطلاعات در مورد این ویروس در این مناطق بسیار محدود است. در مورد چهار جدایه استان گلستان (کردکوی، بندر ترکمن، گرگان و گنبد) مشاهده شد که کمترین فاصله ژنتیکی (Genetic distance) بین این جدایه‌ها وجود دارد و میزان شباهت ژنتیکی بین اینها و سویه های MI16، MAD95.6، MAL99.5 و چهار جدایه دیگر از اسپانیا و سویه Fr از فرانسه بسیار زیاد (حدود ۹۹٪) است (جدول ۲) و هم‌چنین جدایه مشهد و استرالیا رابطه فیلوژنتیکی بالایی (۹۷٪ شباهت ژنتیکی) با این چهار جدایه استان گلستان دارند. این نتیجه در موارد دیگر نیز گزارش شده است مانند دو جدایه پاکستان (Ali et al. 2006) که کاملاً مشابه هستند. تعدادی زیادی از جدایه‌های اسپانیا که تشابه بسیار بالایی تا حد ۱۰۰٪

ویروس نسبت به ویروس‌های دیگر و یا نسبت آلودگی یک میزبان به میزبان دیگر متفاوت است (Yuki et al. 2000, Ullman et al. 1991, Perring et al. 1992, Massumi et al. 2007, Grafton-Cardwell et al. 1996).

درک عواملی که تکامل یک پاتوژن را تعیین می‌کند جنبه مهم بیولوژی تکاملی است که می‌تواند رهنمونی برای شناخت درست بیماری ناشی از آن پاتوژن باشد. شناخت ساختار جمعیت‌های پاتوژن یک ابزار قوی برای روشن ساختن عوامل تکاملی است. چنانچه کارکرد آن ساختار ژنتیکی را تعیین می‌کند. آنالیز ساختار جمعیت در مقیاس‌های محلی کمتر از آنالیزهای منطقه‌ای یا قاره ای انجام شده است. این آنالیزها می‌تواند اطلاعات دقیقی از ساختار ژنتیکی فراهم سازد (Moreno et al. 2004).

علی‌رغم نظریه برخی از محققین مبنی بر استفاده از ترادف ژن CI در تعیین روابط فیلوژنتیک بین جدایه‌ها و سویه‌های پوتی ویروس‌ها، هنوز ناحیه CP-UTR در آنالیز فیلوژنتیک و تعیین این روابط بیشترین کاربرد را دارد و بیشترین ترادف‌های ذخیره شده در GenBank مربوط به این ناحیه است. در این

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 جدایه‌های نیوزیلند، اسپانیا، امریکا و Tonga در شاخه ۶، جدایه استرالیا با جدایه‌های مشهد و گرگان در شاخه ۱ و نیز جدایه‌ای 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 به 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 جدایه‌های ایرانی بیان کرد این است که این احتمال وجود دارد که WMV بیش از یک بار به طرق مختلف به ایران وارد شده است.

نسبت dN/dS در جمعیت‌ها و گروه‌های فیلوژنتیک بسیار کمتر از ۱ است و این نشان‌دهنده نقش مؤثر انتخاب منفی (negative or purifying selection) در تنوع و تکامل این ویروس می‌باشد. بالا بودن $Pi(s)$ در گروه شرق (۰/۲۴۸۵)، هم نشان‌دهنده قدمت بالای این ویروس در شرق است و هم نشان از نقش اصلی انتخاب منفی در تکامل این ویروس دارد. dS در جمعیت ایران حدود ۰/۱۴۳ و در اروپا ۰/۰۸۵ است که به تدریج نسبت به شرق کاهش می‌یابد. لذا تغییرات از شرق به غرب کاهش پیدا می‌کند. همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود جانشین مترادف ($Pi(s)$) (synonymous substitution, dS) نسبت به جانشین نا مترادف ($Pi(a)$) (nonsynonymous substitution, dN) بسیار بیشتر است. بنابر تغییرات نوکلئوتیدی در این جمعیت‌ها و گروه‌ها که توسط ویروس تحمل شده است، نشان‌دهنده تحمل (Tolerance) و plasticity بالای این ویروس است. لذا مکانیزم اصلی تکامل و تنوع این ویروس انتخاب منفی بوده است.

Moreno و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی سه ژن $P1$ ، $C1$ و CP در WMV، تنوع نوکلئوتیدی (dN/dS) را به ترتیب

با هم داشته‌اند و از فاصله ژنتیکی بسیار کمی برخوردار بوده‌اند (Moreno et al. 2004) و نیز جدایه‌های یزد در گروه ۵ و جدایه‌های اصفهان در گروه ۱ از این قاعده مستثنی نبوده‌اند. آنچه از این مسئله استنباط می‌شود نشانگر گسترش سریع و وسیع این ویروس در یک منطقه است که فرصت تنوع ژنتیکی پیدا نمی‌کند. چنین وضعیتی برای ویروس (cucurbit yellow stunting disorder virus, CYSDV) نیز پیش آمده است. این ویروس در واقع از منطقه خاورمیانه به اروپا منتقل شده است و با مگس سفید گسترش وسیعی پیدا کرده است ولی به دلیل گسترش سریع و وسیع در کوتاه مدت، تنوع ژنتیکی زیادی در اروپا پیدا نکرده است (Rubio et al. 2001, Marco & Aranda 2005). مثال‌های دیگری نیز از ویروس‌های مختلف وجود دارد مانند گسترش ویروس موزائیک رگه‌ای گندم در آمریکا (McNeil et al. 1996, Stenger et al. 2002) و ویروس موزائیک نیشکر در آفریقا (Alegria et al. 2003).

در درخت فیلوژنتیک جدایه‌های جنوب شرق آسیا، شامل ژاپن، کره جنوبی و چین در دو گروه ۲ و ۳ قرار می‌گیرند. میزان تنوع ژنتیکی (π) درون این جدایه‌ها ۰/۰۴۱ است که نسبت به جمعیت‌های جغرافیایی بیشترین مقدار را بخود اختصاص داده است. اگر جدایه‌های استرالیا از گروه ۱، نیوزیلند و تونگا از گروه ۶ را به این مجموعه اضافه کنیم تنوع ژنتیکی جمعیت شرق باز هم افزایش پیدا می‌کند و معادل ۰/۰۵۶ خواهد بود (جدول ۴). این مسئله نشان می‌دهد که این ویروس احتمالاً در شرق نسبت به خاورمیانه و اروپا قدمت تکاملی طولانی‌تری داشته است و از آنجا به طرف غرب یعنی خاورمیانه و سپس اروپا وارد شده است. پایین بودن تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که WMV در اروپا یک جمعیت مونوفیلیک است و علی‌رغم پراکنش وسیعی که دارد کمتر دچار تنوع شده است، لذا از قدمت تکاملی کمتری نیز برخوردار است.

اگر چه درخت فیلوژنتیک در بعضی از موارد با توزیع جغرافیایی همخوانی دارد ولی قرابت فیلوژنتیکی یا همگروه

(founder effect) در تشکیل جمعیت‌های فیلوژنتیک در مناطق مختلف جهان است (Lin et al. 2003, Garcia-Arenal et al. 2001, Rubio et al. 2001).

با توجه به این‌که بر اساس نتایج محققین این ویروس از نوترکیبی ویروس موزائیک سویا و موزائیک معمولی لوبیا حاصل شده است. به بیان دیگر نوترکیبی نیز در تنوع و تکامل این ویروس نقش عمده داشته است (Aaziz & Tepfer 1999, Desbiez & Lecoq, 2004, 2008, Frenkel et al. 1989).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (39-42) متن انگلیسی مراجعه شود..

۰/۵۶۶، ۰/۰۸۲ و ۰/۰۸۱ محاسبه کردند. این تفاوت نشان می‌دهد که دینامیزم تکاملی برای هر ناحیه از ژنوم یا هر کدام از ژن‌ها متفاوت است یعنی فشار انتخاب (selection pressure) متفاوتی به آنها اعمال شده است. بالا بودن تنوع در ژن P1 نسبت به CP و CI نشان‌دهنده این است که این ویروس تحت فشار انتخاب منفی (purifying or negative selection) شدیدی در ناحیه P1 بوده است.

به طور کلی از این تجزیه و تحلیل سه نتیجه کلی به دست می‌آید: (۱) به نظر می‌رسد زادگاه اولیه این ویروس شرق است و به تدریج از شرق به طرف غرب وارد شده است. (۲) انتخاب منفی (purifying selection) در تکامل آن نقش اساسی داشته است. (۳) تفاوت در نسبت dN/dS در گروه‌ها و جمعیت‌های مختلف نیز نشان‌دهنده نقش مکانیزم اثر مؤسس