

ردیابی مولکولی ویروس‌های زردی رگبرگ خیار و کوتولگی زرد کدوئیان در جنوب شرق ایران و آنالیز ژنتیکی جدایه از CVYV

زهره صادقی¹، سعید نصرالله‌نژاد^{2*}، میلاد لگزبان³، سیداسماعیل رضوی⁴، مجید جعفری⁵

1. دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی و بیماری‌های ویروسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

2. دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

3. استادیار، گروه زیست‌شناسی دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

4. استادیار، گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

5. استادیار، گروه گیاهپزشکی، مجتمع عالی سراوان، سراوان، ایران

(تاریخ دریافت: 1398/2/28 - تاریخ پذیرش: 1398/9/21)

Molecular detection of Cucumber vein yellowing virus and Cucurbit yellow stunting disorder virus in southeastern Iran and the genetic analysis of isolates from CVYV

Zahra Sadeghi¹, Saeed Nasrollanejad^{2*}, Milad Lagzian³, Seyyed Esmail Razavi⁴, Majid Jafari⁵

1. Ph. D. Student of Virology and Plant Viral Diseases, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

5. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Higher Educational Complex of Saravan, Saravan, Iran.

(Received: May 18, 2019 - Accepted: Dec. 12, 2019)

Abstract

Yellowing diseases of field and greenhouse-grown cucurbits caused by whitefly-transmitted viruses are increasingly becoming important and cause economic losses in many cucurbits growing areas of the world. In this research, 195 samples with symptoms such as yellowing, stunting and deformation of leaves were collected from fields of cucurbits in the South-East Iran (Sistan and Baluchestan) during summer winter in 2016 and 2017. In order to detect CVYV and CYSDV, cDNAs were prepared using Random Hexamer primer and total RNAs extracted from the collected samples. Then, Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using synthesized cDNA and specific primers the part of coat protein (CP) gene (CYSCPF and CYSCPr for CYSDV, CV+ and CV- for CVYV). The results revealed that a 450 bp fragment from the CVYV-CP and a 700 bp fragment from CYSDV-CP were amplified from 55 and 17 samples, respectively. The coat protein gene nucleotide sequences of two isolates of CVYV were determined. The CP sequences of two isolates were compared with each other and with 17 other isolates of the virus. Based on the Phylogenetic studies CVYV were divided into two main groups I (subgroups IA and IB) and II: the first group belongs of isolates from Lebanon, Jordan, Tunisia, Spain and France but the second group contained only isolates of Iran (Chabahar and Zahak) which indicates the high diversity of this isolate. The results of the genetic diversity and selection indices showed that the gene flow from Europe to Asia is very small and the genetic difference is high between them. The CP region is under severe pressure a negative choice, and has caused variation and evolution of the CVYV. Generally, based on the results, the most diversity molecular and host are in Asia group.

Keywords: Coat Protein Gene, Cucumber vein yellowing virus, Cucurbit yellow stunting disorder virus, Genetic Diversity, Sistan and Baluchestan Province.

چکیده

بیماری‌های زردی ناشی از ویروس‌های قابل انتقال با سفیدبالک در مزارع کدوئیان اهمیت زیادی داشته و به کدوئیان مناطق وسیعی از جهان خسارت زیادی وارد می‌کنند. در تحقیق حاضر، از مزارع مختلف کدوئیان در جنوب شرق (سیستان و بلوچستان) 195 نمونه طی تابستان و زمستان سال‌های 1395-96، با علائم مانند: زردی، کوتولگی و بدشکلی برگ‌ها جمع‌آوری شد. به‌منظور ردیابی ویروس‌های زردی رگبرگ خیار و کوتولگی زرد کدوئیان، با استفاده از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی و آر آن ای کل استخراج‌شده از نمونه‌های گیاهی، cDNA تهیه شد. سپس آزمون پی سی آر با استفاده از cDNA سنتز شده و آغازگرهای اختصاصی منطبق با بخشی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی (CV+/CV- و CYSCPF/CYSCPr) انجام گردید. نتایج حاصل نشان داد در 55 نمونه مشکوک قطعه 450 جفت بازی و در 17 نمونه، قطعه 700 جفت بازی مربوط به بخشی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی ویروس‌های CVYV و CYSDV به ترتیب تکثیر شدند. توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی مربوط به دو جدایه ویروس CVYV تعیین شد. توالی پروتئین پوششی دو جدایه با یکدیگر و با 17 جدایه دیگر قابل دسترسی در بانک ژن مقایسه گردید. براساس مطالعات تبارزایی جدایه‌های CVYV به دو گروه اصلی I (زیرگروه‌های IA و IB) و II تقسیم شدند: گروه اول شامل جدایه‌های از لبنان، اردن، تونس، اسپانیا و فرانسه اما گروه دوم تنها شامل جدایه‌های ایران (چابهار و زهک) بود که نشان دهنده تنوع بالای این جدایه‌ها است. نتایج شاخص‌های تنوع ژنتیکی و انتخاب نشان داد: جریان ژنی از اروپا به آسیا بسیار کم و تفاوت ژنتیکی بین آن‌ها زیاد است و منطقه CP تحت محدودیت‌های شدید انتخاب منفی است که باعث تنوع و تکامل گونه CVYV شده است. به‌طور کلی، براساس نتایج بیشترین تنوع مولکولی و میزبانی مربوط به گروه آسیا است.

واژه‌های کلیدی: استان سیستان و بلوچستان، تنوع ژنتیکی، ژن پروتئین پوششی، ویروس زردی رگبرگ کدوئیان، ویروس کوتولگی زرد کدوئیان.

مقدمه

ایران یکی از مهمترین مناطق کشت کدوئیان از جمله کدو، هندوانه، طالبی، خربزه و خیار در دنیا است. این محصولات در تمام مناطق کشور به‌طور عمده در مزارع کشت می‌گردند و استان سیستان و بلوچستان دارای سابقه دیرینه‌ای در کشت محصولات جالیزی است (Samei et al., 2008). براساس اطلاعات مندرج در آمارنامه کشاورزی سال زراعی 95-96 سطح زیرکشت جالیز در ایران بالغ بر 296 هزار هکتار و میزان تولید حدود 8 میلیون تن برآورد گردیده است، از این مقدار، استان سیستان و بلوچستان با 6/6 درصد رتبه پنجم از میزان تولید محصولات جالیزی کشور را به خود اختصاص داده است (Ahmadi et al., 2017).

از بین عوامل بیماری‌زای مختلف، ویروس‌ها هر سال موجب بروز خسارات فراوان در کدوئیان در سراسر دنیا می‌شوند (Shoeibi and Nasrollanezhad, 2009). کدوئیان حداقل به 59 ویروس گیاهی حساس هستند و اکثر این ویروس‌ها دارای ناقل هستند و با شته و مگس سفید منتقل می‌شوند (Lecoq and Desbiez, 2012). مگس سفید ناقل بیش از 100 گونه ویروس گیاهی شناخته شده در جنس‌های *Begomovirus*، *Crinivirus*، *Ipomovirus* و *Cucurbit yellowing virus*، *CVYV* (Gil-Salas, 2011). ویروس زردی رگبرگ خیار و *Cucurbit yellowing virus*، *CVYV* (Cucumber vein yellowing virus) و ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*، *CYSDV*) هر دو توسط مگس سفید *Bemisia tabaci* به‌روش نیمه‌پایا منتقل می‌شوند، افزایش کلونیزاسیون تدریجی این ناقل در کشورهای مختلف و قاره‌ها باعث گسترش ویروس‌های مورد مطالعه در سال‌های اخیر در سراسر مدیترانه و منجر به آلودگی‌های مخلوط در محصولات کدوئیان شده است (Yakoubi et al., 2007). مهمترین گونه جنس *Ipomovirus* و متعلق به خانواده

Potyviridae که باعث خسارت به محصولات جالیزی می‌شود (Lecoq et al., 2003). گونه *CVYV*، پیکره‌های این ویروس رشته‌ای به طول 960 نانومتر و ژنوم آن دارای یک مولکول آر ان ای مثبت با 9751 نوکلئوتید است که پلی پروتئینی با 3148 اسید آمینه را رمزگذاری می‌کند. این ویروس به‌طور طبیعی خیار، هندوانه، خربزه و کدو را آلوده می‌نماید (Mansour and Al-Musa, 1993) این گونه ابتدا در اسرائیل شناسایی گردید و سپس در سراسر خاورمیانه گسترش یافت (Cohen and Nitzany, 1960; Abou-Jawdah, 2014). در ایران ویروس زردی رگبرگ خیار تنها در منطقه‌ای در نزدیکی جیرفت (استان کرمان) در مزارع خیار شناسایی گردید (Bananej et al., 2014).

گیاهان آلوده ابتدا علائم روشنی رگبرگ‌ها و سپس زردی برگ‌ها را نشان می‌دهد (Janssen et al., 2002). از جمله علائم دیگر در ارتباط با این ویروس شامل کاهش رشد میوه، میوه نارس و ترک خوردن میوه است (Picó et al., 2005). در طبیعت احتمال آلودگی یک گونه گیاهی به بیشتر از یک گونه ویروس وجود دارد که در برخی از موارد آلودگی همزمان سبب تشدید علائم ویروسی و در نهایت خسارت شدیدتر خواهد شد (Hull, 2014).

با توجه به اهمیت و میزان سطح کشت جالیز در کشور به‌ویژه در جنوب شرق کشور و شناسایی عوامل مختلف محدودکننده کشت این محصولات، شناسایی و آگاهی دقیق از خصوصیات و تنوع این ویروس‌ها در منطقه در مدیریت و کاهش خسارت ضروری به نظر می‌رسد. لذا هدف این تحقیق ردیابی مولکولی ویروس‌های زردی رگبرگ خیار و کوتولگی زرد کدوئیان و سپس بررسی تنوع ژنتیکی ویروس زردی رگبرگ خیار در نمونه‌های برداشت‌شده از مزرعه است.

cDNA برای تکثیر آن مقدار 3 میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل ساخته شده همراه با 12/5 میکرولیتر مستر میکس پی‌سی‌آر ساخت شرکت Ampliqon و 1/5 میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی ویروس‌های رگبرگ زردی خیار و ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (جدول 1) با غلظت 10 پیکومول و در نهایت 6/5 میکرولیتر آب دیونیزه در واکنش 25 میکرولیتری زنجیره‌ای پلیمرز مورد استفاده قرار گرفت. چرخه دمایی پی‌سی‌آر عبارت از یک برنامه یک مرحله‌ای شامل دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و یک برنامه 35 مرحله‌ای شامل دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، 56 درجه سانتی‌گراد (برای CVYV) و 51 درجه سانتی‌گراد (برای CYSDV) به مدت 45 ثانیه و 72 درجه به مدت 45 ثانیه بود. پس از آخرین مرحله مخلوط واکنش به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور بررسی نتایج حاصل از واکنش، محصول پی‌سی‌آر بر روی ژل آگارز 1% در بافر TBE 1X الکتروفورز شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید با دستگاه UV Transilluminator باند مورد نظر مشاهده و مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیزهای تبارزایی

توالی دو جدایه به دست آمده از محصولات پی‌سی‌آر با 17 توالی دیگر موجود در بانک ژن (NCBI) مورد مقایسه قرار گرفتند (جدول 2). هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌ها با نرم‌افزار Clustal X ver. 1.83 انجام گردید (Thompson *et al.*, 1994).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های برگ‌ی و استخراج اسید نوکلئیک ویروس

در طی بازدیدهای به عمل آمده از 53 مزرعه جالیز در تابستان و زمستان سالهای 1395 و 1396، از یازده شهرستان استان سیستان و بلوچستان تعداد 195 نمونه برگ در مرحله رشدی تشکیل گیاه کامل با علائم مشکوک به آلودگی‌های ویروسی از قبیل زردی، شکنندگی، تردی، زردی رگبرگ و کوتولگی بوته‌ها از روی محصولات مختلف شامل هندوانه، خربزه، طالبی، کدو حلواپی و کدو مسمایی جمع‌آوری گردید (شکل 1). در مرحله بعد نمونه‌های برگ‌ی با توجه به گیاه میزبان و منطقه نمونه‌برداری، برای استخراج آر.ان.ای مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج آر.ان.ای با استفاده از کیت NucleoSpin[®] RNA شرکت MN آلمان و طبق دستورالعمل شرکت سازنده و کلیه مراحل استخراج در شرایط سترون انجام شد.

ساخت رشته cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای سنتز cDNA، ابتدا از آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی و مستر میکس cDNA (SuPrimeScript RT Premix) ساخت شرکت GeNet Bio در واکنشی با حجم نهایی 30 میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (Biorad, Singapore) قرار داده شدند. برنامه سنتز cDNA شامل یک مرحله دمایی 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه، یک مرحله 50 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت برای فعالیت آنزیم نسخه‌بردار معکوس و یک مرحله در درجه حرارت 70 درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه برای غیر فعال کردن این آنزیم اجرا شد. پس از ساخت

جدول 1. توالی آغازگرهای استفاده‌شده در تحقیق حاضر

نام پرایمر	توالی	منشأ	اندازه باند	منبع
CV+	AGCTAGCGCGTATGGGGTGAC	CP	450	(Cuadrado <i>et al.</i> , 2001)
CV-	GCGCCGCAAGTGCAAATAAAT			
CYSCPF	ATGGCGAGTTCGAGTGAGAATAA	CP	700	(Desbiez <i>et al.</i> , 2003)
CYSCPR	ATTACCACAGCCACCTGGTGCTA			

جدول 2. مشخصات توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های CVYV مورد استفاده برای تجزیه‌های تبارزایی

جدایه	میزبان	منشأ	رس شمار	منبع
ALM32	<i>Cucumis sativus</i>	Spain	NC_006941	Janssen <i>et al.</i> , 2005
FEY03-9	-	France	EF441272	Lecoq <i>et al.</i> , 2007
JY7	<i>Cucumis sativus</i>	Lebanon: Jiyee	KC990502	Abrahamian <i>et al.</i> , 2013
ISM	-	Israel	KT276369	Velasco <i>et al.</i> , 2016
TN05-65	<i>Zucchini squash</i>	Tunisia	EF538680	Yakoubi <i>et al.</i> , 2007
ALM32	<i>Cucumis sativus</i>	Spain	AY578085	Janssen <i>et al.</i> , 2005
NS34	<i>Cucumis sativus</i>	Jordan: Amman	KP777459	Velasco <i>et al.</i> , 2016
NS30	<i>Cucumis sativus</i>	Jordan: Al-Qren	KP777457	Velasco <i>et al.</i> , 2016
NS3	<i>Cucumis sativus</i>	Jordan: Al-Baqa	KP777456	Velasco <i>et al.</i> , 2016
NS26	<i>Cucumis sativus</i>	Jordan: Karameh	KP777452	Velasco <i>et al.</i> , 2016
ACV04-2	<i>Cucumis sativus</i>	Spain	DQ287320	Janssen <i>et al.</i> , 2007
AB1	<i>Cucumis sativus</i>	Lebanon: Byblos	KC990497	Abrahamian <i>et al.</i> , 2013
Sp1	-	Spain:Almeria	AJ301640	Cuadrado <i>et al.</i> , 2001
JY4	<i>Cucumis sativus</i>	Lebanon: Jiyee	KC990501	Abrahamian <i>et al.</i> , 2013
BB9	<i>Cucumis sativus</i>	Lebanon: Byblos	KC990500	Abrahamian <i>et al.</i> , 2013
NS8	<i>Cucumis sativus</i>	Jordan: Al-Baqa	KP777463	Velasco <i>et al.</i> , 2016
BB8	<i>Cucumis sativus</i>	Lebanon: Byblos	KC990499	Abrahamian <i>et al.</i> , 2013
Chb	<i>Cucurbita moschata</i>	Iran: Chabahar	MH348162	This study

نتایج و بحث

علائم بیماری ویروسی مانند روشن شدن رگبرگ‌ها و ترددی و شکنندگی و نقطه‌نقطه بر روی پهنک برگ‌ها بر روی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده قابل مشاهده بود (شکل 1). همچنین، براساس علائم و سپس تأیید آن-ها در آزمون پی سی آر مشخص شد که آلودگی به ویروس CVYV نسبت به ویروس CYSDV بیشتر است زیرا در بین نمونه‌های بررسی‌شده فراوانی نمونه‌های دارای آلودگی ویروس CVYV بیشتر بود به طوری که، 55 نمونه از 195 نمونه آلوده بودند (شکل 1-ج). همچنین نتایج نمونه‌برداری نشان داد؛ محصول خربزه با علائم زردی رگبرگ و خشبی شدن برگ بیشترین میزان آلودگی را به ویروس CVYV در بین میزبان‌های جمع‌آوری‌شده در سال‌های زراعی 1396-1397 داشته است (جدول 3).

در مجموع آلودگی 72 نمونه گیاهی مشکوک و علائم دار به دو ویروس به طور جداگانه تأیید شد.

درخت فیلوژنتیکی این جدایه‌ها برحسب تطابق ترادف نوکلئوتیدی و اسیدآمینهای با استفاده از روش Maximum likelihood و مدل Tamura 3- +G parameter نرم‌افزار Mega 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) و براساس 1000 تکرار (bootstrap)، رسم گردید. از نرم‌افزارهای DnaSP ver. 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017) و DnaSP version 2.2.4 Hyphy (Kosakovsky Pond *et al.*, 2005) و وبگاه Datamonkey به آدرس www.datamonkey.org برای محاسبه پارامترهای ژنتیک جمعیت و فشارهای انتخابی در سطح کدون برای 25 (از 33) جدایه در دسترس در بانک ژن با روش‌های (Fixed) FEL (Mixed Effects) MEME (Effects Likelihood Single-) SLAC و (Model of Evolution Likelihood Ancestor Counting) استفاده گردید.

نمونه‌برداری، مگس سفید که ناقل دو ویروس مورد مطالعه هستند نیز به‌طور قابل توجه مشاهده شد. هرچند مطالعات بیولوژیکی انجام نگردیده است. همچنین براساس نتایج این تحقیق ارتباط چندانی بین میزبان و الودگی ویروس‌های مذکور یافت نشد.

علائم بیماری ویروسی در مواردی با شدت کم تا شدید در مزرعه قابل مشاهده بود که با توجه به نتایج آزمون پی‌سی‌آر بیانگر آلودگی همزمان ویروس زردی رگبرگ خیار و ویروس کوتولگی زرد کدوئیان بود و نتایج نشان داد در 14 نمونه آلودگی همزمان وجود داشت. لازم به ذکر است که در برخی از مناطق مورد

جدول 3. تعداد میزبانان مختلف کدوئیان و میزان آلودگی آن‌ها به ویروس‌های CVYV و CYSDV در استان سیستان و بلوچستان

میزبان	تعداد نمونه‌های آلوده به ویروس CVYV	تعداد نمونه‌های آلوده به ویروس CYSDV	تعداد نمونه‌های مورد آزمایش	تعداد نمونه جمع‌آوری شده
خربزه	26	6	41	61
طالبی	9	4	22	27
هندوانه	12	7	59	83
کدو حلوایی	4	-	6	8
کدو مسمایی	4	-	11	16

مطالعه از مناطق مختلف دنیا در 2 گروه قرار گرفتند (شکل 3). گروه یک شامل 2 زیرگروه است، زیرگروه A شامل جدایه‌های اروپا (فرانسه، اسپانیا) و (لبنان، اردن) و زیرگروه B شامل خاورمیانه از جمله تونس، اسرائیل، جدایه‌های اردن و لبنان است. جدایه ایران در یک گروه جدا از سایر جدایه‌ها قرار گرفته است. تاکنون توالی دیگری از ژن پوشش پروتئینی ویروس زردی رگبرگ خیار در ایران در بانک ژن موجود نیست. توالی مزبور با رس شماره MH348162 در بانک ژن ثبت شده است.

در تمام نمونه‌های علائم‌دار مورد بررسی، آلودگی به ویروس‌های مذکور مشاهده نشد. این موضوع نشان می‌دهد که برخی از این علائم ناشی از دیگر ویروس‌های بیماری‌زای کدوئیان و یا عوامل بیماری‌زای غیرویروسی است، همچنین برخی تنش‌های محیطی مانند کمبودها یا مسمومیت‌های تغذیه‌ای نیز می‌تواند موجب بروز علائم مشابه با آلودگی ویروسی گردد. در هر صورت هدف این تحقیق مطالعه تمام ویروس‌های کدوئیان دارای علائم زردی و آلودگی‌های مخلوط آن‌ها نیست.

نتایج حاصل از مطالعات ژنتیکی

مقدار π (شاخص تنوع ژنتیکی) در گروه‌های آسیا و اروپا به ترتیب برابر با 0/003 و 0/028 بود و بیشترین تنوع ژنتیکی و نسبت dN/dS مربوط به گروه آسیا است که نشان‌دهنده نقش انتخاب طبیعی در تکامل و تنوع این ویروس است (جدول 4). همچنین میزان Fixation index (F_{ST}) شاخص

تعیین توالی و آنالیزهای تبارزایی

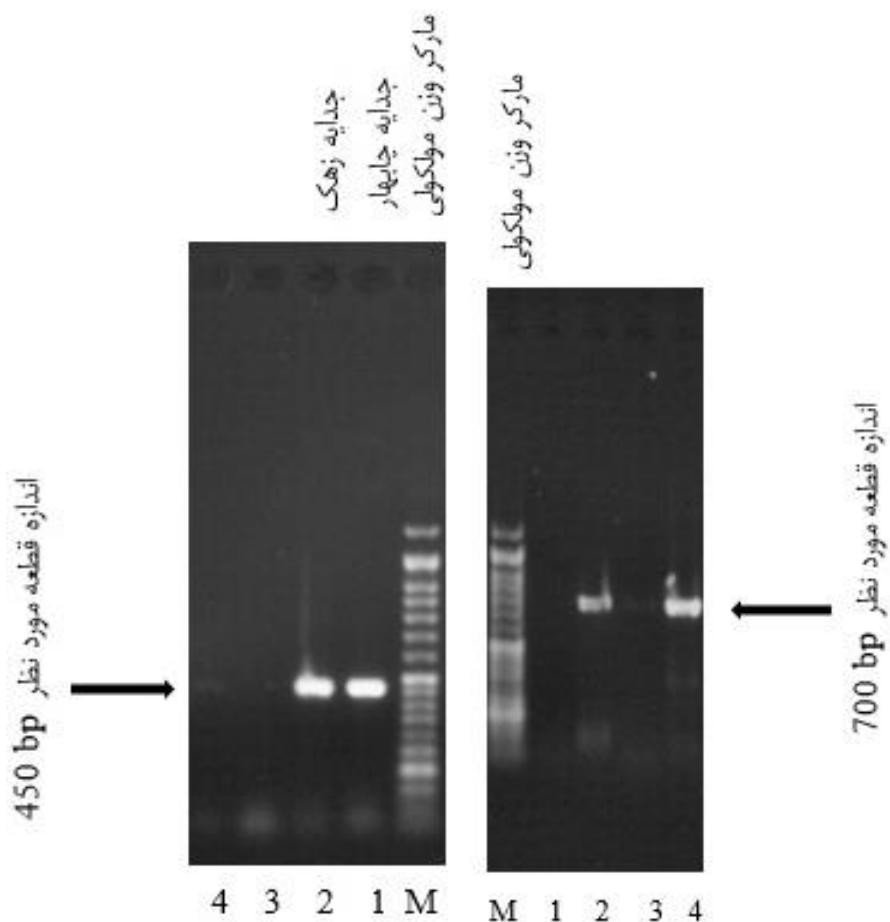
پس از تعیین توالی و بلاست نتایج، وجود گونه‌های CVYV و CYSDV و شباهت توالی قطعات تکثیر یافته به توالی ناحیه ژن رمزکننده پروتئین پوششی موجود در بانک ژن تأیید شد (شکل‌های 2 و 3). براساس تجزیه کلاستر توالی‌ها به روش Maximum Likelihood، کلیه جدایه‌های مورد

نتایج آنالیزهای انتخاب نشان داد؛ از 25 جدایه، در روش MEME کدون در موقعیت 109 به‌عنوان مثبت انتخاب گردید و در نهایت در روش‌های FEL و SLAC 16 کدون به‌عنوان منفی شناسایی گردید که کدون‌های (21، 23، 30، 47، 49، 62 و 86) در این دو روش مشترک بودند (شکل 4) و در نیمه ابتدایی CP قرار داشتند (جدول 5).

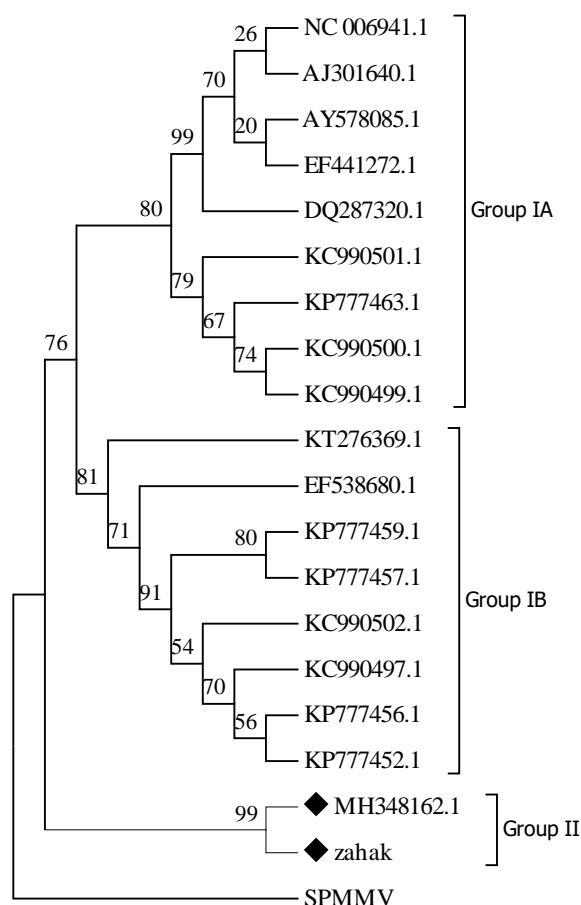
جریان ژنی (Gene flow) برابر با 0/68 و نشان داد جریان ژنی بین جمعیت اروپا به آسیا بسیار کم و تفاوت ژنتیکی زیاد است. همچنین تعداد مکان‌های متغیر و مکان‌های پارسیمونی مفید برای گروه آسیا به‌ترتیب 32 و 16 است در نتیجه تعداد تغییرات نوکلئوتیدی که منجر به تغییرات آمینواسیدی شده است در این گروه بیشتر از اروپا است و تنوع ژنتیکی در گروه آسیا بیشتر است.



شکل 1. علائم برخی از نمونه‌های برداشت‌شده در مزرعه. الف) بوته خربزه آلوده به ویروس CYSVDV. ب) بوته طالبی آلوده به CVYV و CYSVDV به‌صورت همزمان. ج) علائم ویروس زردی رگبرگ خیار بر روی کدو حلوایی



شکل 2. نتایج آزمون پی‌سی‌آر در ژل آگارز 1 درصد مربوط به ناحیه ژن رمزکننده پروتئین پوششی ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (700bp)، راهک 4 و 2 باند حاصل از آغازگرهای (CYSCP F/ CYSCPR)؛ شکل سمت راست، نتایج آزمون پی‌سی‌آر در ژل آگارز 1 درصد مربوط به ناحیه ژن رمزکننده پروتئین پوششی ویروس زردی رگبرگ خیار (450 bp)، راهک 1 و 2 باند حاصل از آغازگرهای CV+/CV-؛ شکل سمت چپ؛ راهک M مربوط به نشانگر اندازه (Gene ruler DNA ladder 50 bp شرکت Fermentas، لیتوانی).



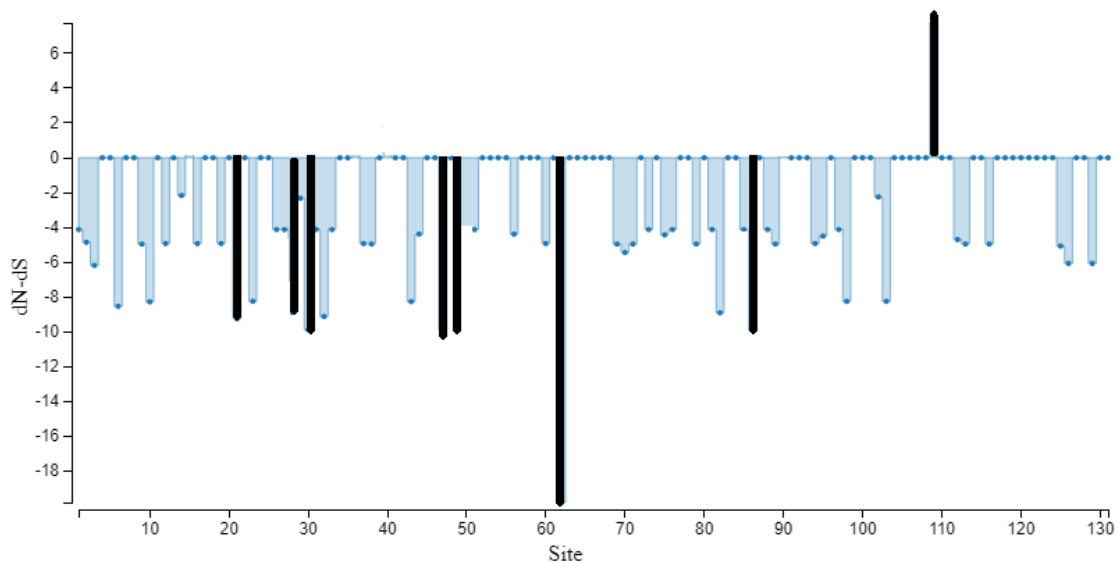
شکل 3. درخت تبارزایی رسم‌شده به روش Maximum Likelihood بر اساس توالی نوکلئوتیدی قطعه 450 جفت بازی ژن پروتئین پوششی دو جدایه ویروس CVYV و 17 جدایه‌های موجود در بانک ژن (Sweet potato mild mottle, SPMMV) به‌عنوان برون گروه (out group) در نظر گرفته شده است. جدایه‌های ایرانی با \blacklozenge نشان داده شده‌اند.

جدول 4. پارامترهای ژنتیکی مربوط به تنوع ژنتیکی ویروس CVYV در گروه‌های تبارزایی

مکان‌های پارسیمونی مفید Parsimony informative sites	جانشینی مترادف Synonymous substitution	جانشینی نامترادف Non-Synonymous substitution	dN/dS	تنوع ژنتیکی Genetic diversity (π)	مکان‌های متغیر Variable sites (polymorphic)
0	0	0/004	0/005	0/003	3
16	0/011	0/031	0/027	0/028	32

جدول 5. نتایج آنالیزهای انتخاب کدون با استفاده از روش‌های انتخاب (MEME و SLAC، FEL) بر روی ژن پروتئین پوششی ویروس CVYV

روش method	منفی (Negative)	مثبت (Positive)	موقعیت منفی	موقعیت مثبت
FEL	16	0	86, 98, 103, 82, 62, 49, 47, 43, 32, 30, 28, 23, 21, 10, 6, 2	-
MEME	-	1	-	109
SLAC	7	0	86 و 62, 49, 47, 30, 28, 21	-



شکل 4. تنوع ژنتیکی جدایه‌های ویروس CVYV در هر کدون از ژن پوشش پروتئینی، مقادیر تنوع برآوردشده (dN-dS) در محور عمودی و موقعیت کدون در محور افقی نشان داده شده است. خطوط سیاه مشخص شده، نشان‌دهنده سایت‌های تحت انتخاب است که توسط روش‌های SLAC، FEL و MEME مشخص شده است.

آب‌وهوایی تأثیر زیادی روی فعالیت ناقلین و به دنبال آن اختلاف در فراوانی و شدت علائم ویروسی در مزارع جالیز استان داشته و مشخص شده است که کشت دیر هنگام به دلیل افزایش دوره سبز ماندن مزرعه و مصادف شدن آن با زمان اوج فعالیت سفید بالک‌های ناقل در تابستان در منطقه سیستان (زهک) و اواخر پاییز و زمستان در چابهار موجب افزایش آلودگی‌های ویروسی در مزارع می‌شود (De Bokx and Van der Want, 1987). از این رو رعایت بهداشت زراعی بویژه حذف علف‌های هرز و نیز مبارزه با ناقلین حشره‌های نیز در فراوانی این ویروس‌ها تأثیرگذار است.

در ایران مطالعات محدودی در مورد ویروس زردی رگبرگ خیار انجام شده و تنها بخشی از پلی پروتئین (مربوط به NIa-Protein) جدایه تهران تعیین توالی شده است (Bananej *et al.*, 2014). با ترسیم درخت فیلوژنی برای جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق مشاهده شد که جدایه‌ها ایران (چابهار و زهک) با هیچ کدام از جدایه‌های آسیا در یک گروه قرار نمی‌گیرد، و جدایه‌های خاورمیانه و اروپا در

با توجه به اهمیت کشت محصولات جالیزی در استان سیستان و بلوچستان اما اطلاعات دقیقی از پراکنش و خصوصیات جدایه‌های CVYV و CYSDV در دسترس نیست، به این منظور از مزارع استان بازدید به عمل آمد و براساس نتایج حاصل از مشاهدات مزرعه‌ای، بیشترین علائم مشاهده شده شامل روشن شدن رگبرگ‌ها و ترددی و شکنندگی برگ‌ها بود که اختلاف در شدت علائم ویروسی و فراوانی آن‌ها در مناطق مختلف مورد بررسی می‌تواند دلایل متعددی از جمله ارقام کشت شده، حجم کم نمونه‌های مورد بررسی، تفاوت در الگوی کشت، تفاوت در بهداشت مزارع و روش‌های زراعی اعمالی در آن‌ها، تنوع فعالیت ناقلین، سن مزارع، تنوع در کشت‌های مجاور، وضعیت علف‌های هرز، شرایط جوی داشته باشد (Ehtesham Rasi *et al.*, 2018). از طرفی دما نیز بر نرخ اپیدمی و به طور قابل توجهی بر پویایی ناقل تأثیر می‌گذارد. در جنوب شرق ایران همانند کشورهای خاورمیانه بیماری ناشی از ویروس CVYV اغلب در طی گرم‌ترین فصل سال مشاهده می‌شود (Ruiz *et al.*, 2006). بنابراین شرایط

محدودیت‌های تکاملی در پوتی‌ویروس‌ها شود، اما اعتقاد بر این است که گیاه میزبان یکی از مهمترین عوامل است. اگرچه ارائه شرایط پایدار محیطی برای ویروس و ناقل و تعامل گیاه-ناقل به عنوان فشار انتخابی غالب می‌تواند به ثبات ژنتیکی کمک کند (Janssen *et al.*, 2003). اگرچه تعداد بسیار محدودی از جدایه‌های CVYV (دو جدایه) مورد مطالعه تبارزایی قرار گرفت ولی همین نتایج نیز نشان‌دهنده حضور واریانت‌ها و جدایه‌های نسبتاً متنوعی از این ویروس در مناطق مورد بررسی در کشور است. با مطالعه بیشتر روی این جدایه‌ها و تعیین مشخصات مرتبط با بیماری‌زایی آن‌ها، می‌توان درک بهتری از وضعیت جدایه‌های ایرانی CVYV به‌دست آورد. ویروس‌ها در مزارع جالیز ایران گسترش داشته و اغلب به‌صورت آلودگی مخلوط وجود دارند و آلودگی‌های به‌وجودآمده با این ویروس‌ها همیشه با چشم قابل تشخیص نیستند. بنابراین بهره‌گیری از تکنیک‌های پیشرفته و دقیق در شناسایی ویروس‌ها و بررسی تغییرات ژنتیکی جمعیت آن‌ها در جهت کنترل مؤثر این عوامل بیماری‌زا و مطالعه اپیدمیولوژی آن‌ها حائز اهمیت است. عمده‌ترین راهکار برای کنترل ویروس‌های گیاهی، پیشگیری از وقوع و گسترش بیماری است (Hull, 2014).

REFERENCES

- Abrahamian PE, Abou-Jawdah, Y (2014) Whitefly-transmitted criniviruses of cucurbits: current status and future prospects. *Virus Disease*. 25: 26-38.
- Ahmadi K, Ebadzadeh HR, Abdi Shah H, Kazemian A, Rafiei M (2017) Agricultural statistics crop year 2016-2017. Ministry of Agriculture Jihad, Iran.
- Bananej K, Kianfar N, Winter S, Menzel W (2014) The status of *Cucumber vein yellowing virus* in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*. 53: 269-276.

گروه‌های مجزا قرار گرفتند و این حکایت از همبستگی بین منشأ جغرافیایی و ژنوتیپی دارد. یکی از عوامل تغییر ویروس‌ها انتخاب است که در مناطق مختلف با فشار متفاوت انجام می‌گیرد بنابراین جدایه‌های قرار گرفته در مناطق متفاوت دارای میزان تغییرات متفاوت می‌باشند به عبارت دیگر سرعت تکامل آن‌ها متفاوت است. جمعیت‌های که دارای انزوای جغرافیایی هستند نرخ بالای جریان ژنی باعث افزایش تنوع ژنتیکی در آن‌ها می‌شود (Sanchez-Campos *et al.*, 2002). بنابراین موانع فیزیکی طبیعی مانند (دریا) در منطقه چابهار باعث محدودیت‌های تکاملی و تنوع ژنتیکی ویروس CVYV شده است و بالا بودن میزان شاخص جریان ژنی تأییدکننده این موضوع است. همچنین انتخاب منفی به دلیل محدودیت‌های عملکردی برای پروتئین‌های کدکننده ویروسی می‌تواند میزان تغییرات ژنتیکی را در جمعیت ویروس‌ها محدود نماید (Rubio *et al.*, 2001). میزان dN/dS در گروه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد؛ که منطقه CP تحت محدودیت‌های شدید انتخاب منفی است و بیشترین مقدار dN/dS مربوط به گروه آسیا است که نشان‌دهنده قدمت بالای این ویروس در این گروه است. اگرچه بسیاری از عوامل محیطی می‌تواند باعث

- Cohen S, Nitzany FE (1960) A whitefly-transmitted virus of cucurbits. *Phytopathology Mediterranea*. 1: 44-46.
- Cuadrado IM, Janssen D, Velasco L, Ruiz L, Segundo E (2001) First report of Cucumber vein Yellowing virus in Spain. *Plant Disease*. 85: 336.
- Desbiez C, Lecoq H, Girard M, Cotillon AC, Schoen L (2003) First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in commercial cucumber greenhouses in France. *Plant Disease*. 87: 600.
- De Bokx, Van der JA, Want JPH (1987)

- Viruses of potato and seed-potato production, 2nd Ed. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Pudoc., Wageningen, Netherlands, 259 pp.
- Gil-Salas FM, Peters J, Boonham N, Cuadrado IM, Janssen D (2011) Yellowing disease in zucchini squash produced by mixed infections of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus*. *Phytopathology* 101:1365-1372.
- Hull R (2014) Comparative plant virology. 2th ed. Academic press.
- Janssen D, Ruiz L, Velasco L, Segundo E, Cuadrado IM (2002) Non-cucurbitaceous weed species shown to be natural hosts of *Cucumber vein yellowing virus* in south-eastern Spain. *Plant Pathology*. 51: 797.
- Janssen D, Ruiz L, Cano M, Belmonte A, Martin G, Segundo E, Cuadrado IM (2003) Physical and genetic control of *Bemisia tabaci*-transmitted *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus* in cucumber. International Organisation for Biological and integrated Control (west palaeartic regional section) Bulletin 26: 101-6.
- Janssen D, Martín G, Velasco L, Cuadrado IM, Segundo E (2007) Low genetic diversity among *Cucumber vein yellowing virus* isolates from Spain. *Virus Genes*. 34: 367–371.
- Kosakovsky Pond SL, Frost SDW, Muse SV (2005) HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*. 21: 676-679.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870-1874.
- Lecoq H, Desbiez C (2012) Advances in virus research In: Gad L, Herve´ L (ed) Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture, Academic Press, London, pp 67-126.
- Mansour A, Al-Musa A (1993) *Cucumber vein yellowing virus*; host range and virus vector relationships. *Journal of Phytopathology*. 137: 73-78.
- Pic´o B, Sifres A, Nuez, F (2005) Quantitative detection of *Cucumber vein yellowing virus* in susceptible and partially resistant plants using real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. 128: 14-20.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sanchez-Gracia A (2017) DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 34: 3299-3302.
- Rubio L, Abou-Jawdah Y, Lin H-X, Falk BW (2001) Geographically distant isolates of the crinivirus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* show very low genetic diversity in the coat protein gene. *Journal General Virology*. 82: 929-33.
- Ruiz L, Janssen D, Martín G, Velasco L, Segundo E, Cuadrado IM (2006) Analysis of the temporal and spatial disease progress of *Bemisia tabaci*-transmitted *Cucurbit yellow stunting disorder virus* And *Cucumber vein yellowing virus* in cucumber. *Plant Pathology*. 55: 264-275.
- Sanchez-Campos S, Di´az JA, Monci F, Bejarano ER, Reina J, Navas-Castillo J, Aranda MA Moriones E (2002) High genetic stability of the begomovirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in southern Spain over an 8-year period. *Phytopathology*. 92: 842-849.
- Samei A, Massumi H, Shaabani M, Hosseinipour A, Heydarnejad J (2008) Evaluation of some cucurbit cultivars grown in the fields and greenhouses to six important viruses. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*. 15: 4-12.

- Shoeibi S, Nasrollanezhad S (2009) Detection and Distribution of *Watermelon mosaic virus* (WMV) in cucurbits fields of Golestan province Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. 16: 1-4.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22: 4073-4080.
- Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H, Wipf-Scheibel C, Marrakchi M Lecoq H (2007) Occurrence of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus* in Tunisia. Journal of Plant Pathology. 89: 417-20.