

شناسایی ویروس‌های آران‌ای دار همراه با زردی کدوئیان در جنوب شرق ایران و تنوع ژنتیکی ویروس شایع آن

زهرا صادقی^۱، سعید نصرالله نژاد^{۲*}، میلاد لگزیان^۳، سید اسماعیل رضوی^۲ و مجید جعفری^۴

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

۲- به ترتیب دانشیار و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.

۴- استادیار گروه گیاهپزشکی، مجتمع آموزش عالی سراوان، ایران.

*مسئول مکاتبه Snasrollanejad1967@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۸

چکیده

بیماری‌های زردی محصولات در گلخانه و مزارع کدوئیان که توسط ویروس‌های قابل انتقال با مگس سفید (*Bemisia tabaci*) ایجاد می‌شود به طور فزاینده‌ای در جهان و ایران در حال افزایش می‌باشند. به منظور بررسی آلودگی‌های ویروسی در استان سیستان و بلوچستان، تعداد ۱۹۵ نمونه‌ی برگ دارای علائم ویروسی جمع‌آوری و آلودگی آن‌ها به برخی از ویروس‌های شایع کدوئیان از طریق RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی و برخی از آنها تعیین توالی شدند. نتایج بدست آمده نشانگر آلودگی ۵۹٪ نمونه‌ها به ویروس‌های غالب کدوئیان در کلیه‌ی مناطق مورد بررسی بود. برخی از نمونه‌ها به ویروس اختلال کوتولگی زرد کدوئیان (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*)، ویروس زردی شته زاد کدوئیان (*Cucurbit Aphid Borne Yellows virus*)، ویروس زردی رگبرگ خیار (*Cucumber vein yellowing virus*)، ویروس زردی کلروتیک کدوئیان (*Cucurbit chlorotic yellows virus*) و ویروس کوتولگی سبز زرد هندوانه (*Watermelon chlorotic stunt virus*) آلوده بودند. بیشترین میزان آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده به ترتیب ۴۳، ۲۸ و ۸ درصد مربوط به ویروس‌های WCSV، CVYV و CYSDV بود. نتایج آنالیزهای تبارزایی روی جدایه‌های CYSDV نشان داد که جدایه‌ها در دو زیرگروه شرقی و غربی و دو جدایه SB و SB2 همراه با ۱۲ جدایه‌ی ایرانی و چهار جدایه‌ی عربستان در زیرگروه شرقی قرار گرفتند. همچنین مطالعات ژنتیکی روی بخشی از ژن پروتئین پوششی نشان داد که در جدایه‌های ایرانی و زیرگروه شرقی، جهش CGA به CCA اتفاق افتاده که منجر به جایگزینی آرژنین به جای گلوتامین در کدون ۷۳ پروتئین پوششی شده است. بنابراین اختلاف نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی در مقایسه با جدایه‌های مناطق مختلف نشان‌دهنده‌ی تنوع ژنتیکی بالا و قدمت طولانی این ویروس بومی در ایران است.

واژه‌های کلیدی: آلودگی‌های ویروسی، استان سیستان و بلوچستان، تنوع ژنتیکی، ویروس اختلال کوتولگی زرد کدوئیان (CYSDV).

مقدمه
تیره‌ی کدوئیان که به جالیز معروف هستند دارای ۹۰ جنس و ۷۵۰ گونه است و همگی طالب آب و هوای گرم می‌باشند. تعدادی از جنس و گونه‌های مهم این تیره عبارتند از: خیار (*Cucumis sativus L.*)، کدو مسمایی (*Cucurbita pepo*)، کدو حلوائی (*Curcubita*)، کدو تنبل (*Cucurbita maxima*)، خربزه (*Cucumis melo*) و هندوانه (*Citrullus lanatus*) (Salehi and Bananej, 2013). براساس اطلاعات مندرج در آمارنامه‌ی کشاورزی سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵، استان سیستان و بلوچستان با سطح زیرکشت ۲۳۸۹۴ هکتار و میزان تولید ۵۳۲۹۸۱ تن رتبه‌ی پنجم را از نظر تولید

تیره‌ی کدوئیان که به جالیز معروف هستند دارای ۹۰ جنس و ۷۵۰ گونه است و همگی طالب آب و هوای گرم می‌باشند. تعدادی از جنس و گونه‌های مهم این تیره عبارتند از: خیار (*Cucumis sativus L.*)، کدو مسمایی (*Cucurbita pepo*)، کدو حلوائی (*Curcubita*)، کدو تنبل (*Cucurbita maxima*)، خربزه (*Cucumis melo*) و هندوانه (*Citrullus lanatus*) (Salehi and Bananej, 2013). براساس اطلاعات مندرج در آمارنامه‌ی کشاورزی سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵، استان سیستان و بلوچستان با سطح زیرکشت ۲۳۸۹۴ هکتار و میزان تولید ۵۳۲۹۸۱ تن رتبه‌ی پنجم را از نظر تولید

آلودگی گیاهان تیره‌ی کدوئیان به ویروس تعداد، وزن و اندازه‌ی میوه شدیداً کاهش مییابد به طوریکه کاهش محصول به میزان ۳۰ تا ۴۰ درصد گزارش شده است (López-Sesé and Gómez-Guillamón, 2000).

در ایران این ویروس اولین بار در سال ۱۳۸۴ از مزارع خربزه‌ی استان بوشهر گزارش شد (Keshavarz and Izadpanah, 2005) و در مطالعات بعدی آلودگی کدوئیان مناطق جنوبی و مرکزی ایران به این ویروس مشخص شد (Keshavarz et al., 2013). تاکنون چند ویروس از جمله ویروس موزائیک هندوانه (*Watermelon mosaic virus*)، ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*)، ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic*)، ویروس نقطه زرد کدو (*Zucchini yellow fleck virus*)، ویروس زرد شته زاد کدوئیان (*Cucurbit Aphid Borne Yellows virus*) و ویروس موزائیک کدو (*Squash mosaic virus*) از جنوب سیستان و بلوچستان گزارش شده‌اند (Bananej and Vahdat, 2008). بنابراین، باتوجه به بروز همه‌گیری بیماری‌های ویروسی در مزارع جالیز استان سیستان و بلوچستان، شناسایی و آگاهی دقیق از خصوصیات و تنوع عوامل ویروسی منطبقه در مطالعات مرتبط با جدایه‌های ویروسی یا مقاومت ارقام میزبان اهمیت بسزایی دارد. لذا در این تحقیق، برای اولین بار در سطح استان سیستان و بلوچستان ردیابی مولکولی ویروس‌های مولد زردی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با تاکید بر آنالیزهای ژنتیکی ویروس CYSDV در نمونه‌های برداشت شده از مزرعه مورد بررسی قرار گرفت و ضمن تعیین توالی ژن CP برخی جدایه‌ها، بررسی تبارزایی این ویروس با سایر جدایه‌های ایرانی و خارجی آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌های برگ‌ی و استخراج آر ان ای کل گیاهی

طی بازدیدهای بعمل آمده در سال‌های ۹۷-۱۳۹۵، تعداد ۱۹۵ نمونه‌ی برگ از گونه‌های مختلف کدوئیان شامل هندوانه، خربزه، طالبی، کدو حلواپی و کدو

محصولات جالیزی به خود اختصاص داده است (Ahmadi et al., 2017).

بیماری زردی در دهه‌های اخیر در سراسر جهان مشاهده شده است. با این حال، این اختلالات در ابتدا به کمبود مواد غذایی نسبت داده می‌شد. استفاده از ابزارهای تشخیص مناسب نشان داد که این علائم عمدتاً توسط ویروس‌ها ایجاد می‌شوند (Kassem et al., 2007). در دهه‌های اخیر حدود ۳۹ گونه‌ی مختلف ویروس که به طور طبیعی کدوئیان را آلوده می‌کند، گزارش شده است (Lecoq and Desbiez, 2012). تاکنون ویروس‌های متعدد از جنس و گونه‌های مختلف همراه و یا دخیل در بروز علائم زردی کدوئیان از مناطق مختلف جهان گزارش شده‌اند (صالحی و بنانج ۲۰۱۳). حداقل چهار ویروس از جنس *Crinivirus* شامل: *Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)*, *Cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV)*, *Beet pseudo-yellows virus (BPYV)*, *Lettuce infectious yellows virus (LIYV)* بر روی کدوئیان علائم زردی ایجاد می‌کنند (Gil-Salas et al., 2011).

ویروس اختلال کوتولگی زرد کدوئیان (*CYSDV*) باعث سندروم زردی می‌شود که می‌تواند باعث کاهش عملکرد گیاهان آلوده گردد (Martelli et al., 2002). این ویروس اولین بار در سال ۱۹۹۱ از امارات متحده عربی توسط Hassan and Duffus (1991) گزارش شد. و سپس در سال ۱۹۹۶ توسط Ce'lix et al. (1996) از اسپانیا گزارش گردید. از مناطق انتشار این ویروس می‌توان به تگزاس، مکزیک، آفریقا، لبنان، عربستان سعودی، اسرائیل، اردن، ترکیه، مراکش، پرتغال، فرانسه، ایران، تونس، کالیفرنیا، آریزونا، مکزیک و چین اشاره کرد (Abrahamian and Abou-Jawdah, 2014).

این ویروس متعلق به جنس *Crinivirus* (خانواده *Closteroviridae*)، دارای پیکره‌های میله‌ای انعطاف پذیر با طول ۷۵۰-۸۰ نانومتر می‌باشد (Liu et al., 2000). ژنوم *CYSDV* حاوی دو مولکول آر ان ای تک رشته‌ای با قطبیت مثبت است که به صورت آر ان ای ۱ و آر ان ای ۲ نامگذاری شده است. دامنه‌ی میزبانی این ویروس محدود به گونه‌های تیره کدوئیان و سلول‌های آوند آبکش است (Ce'lix et al., 1996; Marco et al., 2003). بر اثر

نوکلئوتیدی (Random Hexamer) ۱۰ میکرومولار، ۱۵ میکرولیتر از مستر میکس cDNA (SuPrimeScript RT Premix) ساخت شرکت GeNet Bio (کره جنوبی) برای سنتز cDNA استفاده و مخلوط واکنش با آب دیونیزه به ۳۰ میکرولیتر رسانده شد. برای هر نمونه برنامه ساخت cDNA شامل یک چرخه دمای 25°C به مدت ۱۰ دقیقه، یک چرخه 50°C به مدت یک ساعت برای فعالیت آنزیم نسخه بردار معکوس و یک چرخه در درجه حرارت 70°C به مدت ده دقیقه برای غیر فعال کردن این آنزیم اجرا گردید.

cDNA به دست آمده از واکنش RT با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction, PCR) تکثیر شد، بنابراین، مخلوط واکنش پی‌سی‌آر با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی (جدول یک) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. به منظور بررسی نتایج حاصل از واکنش، دو میکرولیتر محصول هر واکنش پی‌سی‌آر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE 1X الکتروفورز شد و سپس با دستگاه UV Transilluminator باند مورد نظر مشاهده و مورد ارزیابی قرار گرفت.

مسمایی با علایم شبیه به آلودگی‌های ویروسی شامل: زردی (Yellowing)، شکنندگی و تردی (Brittleness)، زردی رگیگ (Vein yellowing) و کوتولگی بوته‌ها (Stunting)، از مناطق مختلف استان سیستان و بلوچستان جمع آوری و برای انجام آزمایش‌های مولکولی به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه سیستان و بلوچستان منتقل شد. برای شناسایی ویروس‌های عامل آلودگی، آران‌ای گیاهی توسط کیت NucleoSpin[®] RNA ساخت شرکت MACHERY-NAGEL (MN) آلمان و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. برای تعیین غلظت نمونه‌ها، آران‌ای‌های استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر الکتروفورز در ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس، آران‌ای استخراج شده برای مراحل بعدی در 80°C - نگهداری گردید.

سنتز دی‌ان‌ای مکمل (cDNA) و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR)

با توجه به میزان غلظت آران‌ای، یک میکروگرم از هر نمونه به همراه یک میکرولیتر از آغازگر شش

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در تحقیق حاضر.

Table 1. Sequences of primers used in this study.

Primer Name (نام آغازگر)	Primer sequences (توالی آغازگر)	The corresponding section in the virus genome (بخش متناظر در ژنوم ویروس)	The size of the expected (اندازه قطعه مورد انتظار)	Annealing temperature (دمای اتصال)	Reference (منبع)
CV+ CV-	AGCTAGCGCGTATGGGGTGAC GCGCCGCAAGTGCAAATAAAT	CP	450	56	(Cuadrado et al., 2001)
CYSCPF CYSCPR	ATGGCGAGTTCGAGTGAGAATAA ATTACCACAGCCACCTGGTGCTA	CP	700	51	(Desbiez et al., 2003)
CABYV-F CABYV-R	GAATACGGTTCGCGGCTAGAAATC CTATTTCGGGTCTGGACCTGGC	CP	600	57	(Kassem et al., 2007)
CCYV-F CCYV-R	TGCGTATGTCAATGGTGTATG ATCCTTCGCAGTAAAAACC	Hsp70h	468	58	(Zeng et al., 2011)
BPYV-F BPYV-R	CTGACTCGAGTCAGTTTCCATAAGAA GC CTGACATATGGGAGATAATGATGATG G	CP	700	*	(Yakoubi et al., 2007)
CMV-F CMV-R	TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG GCCGTAAGCTGGATGGACAA	CP	500	*	(Hu et al., 1995)
CGMMV-F CGMMV-F	GCTTACAATCCGATCACACCT CTTTCGAGTGGTAGCCTCTGA	CP	500	*	(Antignus et al., 2001)
Gem-F Gem-R	GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG GGRTTNGANGCRTGHGTACAYG	CP(DNA-A)	600	55	(Wyatt and Brown 1996)

آنالیزهای تبارزایی

قطعات DNA تکثیرشده در واکنش پی‌سی‌آر در دو جدایه CYSDV برای توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست (تهران) ارسال شدند. توالی‌های ژن CP به دست آمده با ۳۵ جدایه‌ی ایرانی و غیرایرانی این ویروس، موجود در بانک ژن (NCBI) مقایسه شدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توسط نرم‌افزار Clustal X انجام گردید (Thompson et al., 1994). درخت تبارزایی این جدایه‌ها برحسب تطابق ترادف نوکلئوتیدی و اسیدآمینهای با استفاده از روش Maximum likelihood و مدل Tamura et al., 3-parameter نرم‌افزار Mega 7.0 (Kumar et al., 2016) با ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap)، رسم گردید. از نرم‌افزار DnaSP version 6.12.03 (Rozas et al., 2017) برای محاسبه‌ی پارامترهای ژنتیک جمعیت استفاده شد. همچنین فشارهای انتخابی در سطح کدون با استفاده از نرم‌افزار Hyphy version 2.2.4 (Kosakovsky Pond et al., 2005) و بگ‌گاه Datamonkey به آدرس www.datamonkey.org (Fixed Effects Likelihood MEME (Mixed Effects Model

Evolution (of) و (Likelihood Ancestor Counting) و (SLAC (Single تخمین زده شد.

نتایج

مشاهدات مزرعه‌ای و تعیین آلودگی نمونه‌ها با استفاده از روش RT-PCR

نتایج بدست آمده برای نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع استان نشان‌دهنده‌ی آلودگی گیاهان طالبی، خربزه و هندوانه به ویروس‌های آلوده‌کننده‌ی کدوئیان از قبیل: ویروس شته زاد کدوئیان (CABYV)، ویروس اختلال کوتولگی زردی کدوئیان (CYSDV)، ویروس زردی رگبرگ خیار (CVYV)، ویروس زردی کلروتیک کدوئیان (CCYV) و ویروس کوتولگی سبزرده‌هندوانه (WmCSV) می‌باشد (شکل ۱). همچنین ۸، ۲۸، ۴۳، ۷ و ۵ درصد از نمونه‌ها به ترتیب به ویروس‌های CYSDV، CVYV، WmCSV، CCYV و CABYV آلوده بودند. بنابراین آلودگی ۱۱۶ نمونه از ۱۹۵ نمونه‌ی برداشت شده تایید شد. همچنین نتایج RT-PCR نشان داد: آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان به ویروس‌های CMV، BPYV و CGMMV منفی ارزیابی گردید (جدول ۲).



شکل ۱- علائم برخی از نمونه‌های برداشت شده از مزرعه a: بوته‌ی خربزه‌ی دارای آلودگی ویروس زردی کلروتیک کدوئیان (CCYV). b: علائم زردی ایجاد شده توسط ویروس اختلال کوتولگی زردی کدوئیان (CYSDV) بر روی میزبان طالبی. c: علائم ابلقی و زردی ویروس کوتولگی سبزرده‌هندوانه (WmCSV) بر روی هندوانه d: علائم زردی رگبرگها ویروس زردی رگبرگ خیار (CVYV) بر روی خربزه (اصلی).

Figure 1. Symptoms of some samples collected from fields a: Melon plant infected by *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV). b: Symptoms of Yellowing caused by *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) on cantaloupe. c: Mottle and yellowing by *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) on Watermelon Plant d: Symptoms of Vein yellowing on *Cucurbit vein yellowing virus* (CVYV) in melon (Original).

تمام مناطق موردبررسی در استان سیستان و بلوچستان پراکنندگی داشت و شهرستان‌های زهک در شمال سیستان و کنارک در جنوب بلوچستان بیشترین تنوع به ویروس‌های آلوده کننده‌ی کدوئیان را دارا بودند (جدول ۲).

آلودگی همزمان بین نمونه‌های جمع آوری شده نیز مشاهده شد و بیشترین میزان آلودگی‌ها مربوط به آلودگی‌های دوگانه (۱۴ نمونه) حدود هفت درصد بود و ویروس اختلال کوتولگی زردی کدوئیان (CYSDV) از اجزای اصلی آلودگی‌های دو گانه و سه گانه بود. براساس علایم مشخص شد که ویروس‌های فوق در

جدول ۲- وضعیت آلودگی و پراکنش جغرافیایی ویروس‌های مورد مطالعه در مزارع استان سیستان و بلوچستان.

Table 2. Status of contamination and geographic distribution of viruses studied from fields of Sistan and Baluchestan province.

Numbers of sample tested (تعداد نمونه‌های مورد آزمایش)	Number of samples with simultaneous contamination (تعداد نمونه‌های دارای آلودگی همزمان)	Name of infectious viruses (نام ویروس‌های آلوده کننده)	Host (میزبان)	Sampling site (محل نمونه برداری)
6	۰	CYSDV	طالبی	زاهدان
7	2	CVYV+CYSDV	هندوانه و طالبی	سراوان
21	3	CVYV+CYSDV	کدومسمایی، طالبی و هندوانه	نیکشهر
20	-	CVYV+CYSDV+ CCYV	طالبی و هندوانه	کنارک
18	2	CVYV+CYSDV	کدو حلوائی و هندوانه	چابهار
15	-	-	هندوانه	سریاز
15	-	CVYV+ CCYV	خربزه و هندوانه	هامون
15	2	CCYV	خربزه و هندوانه	زابل
20	-	CYSDV+CCYV	خربزه	هیرمند
30	-	CVYV+CYSDV+ CCYV+CABYV	خربزه و هندوانه	زهک
16	-	CVYV+CYSDV+ CCYV	خربزه و هندوانه	نیمروز

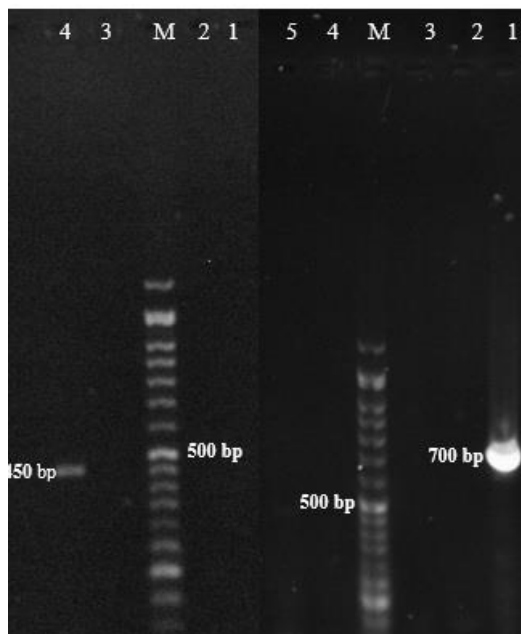
به ویروس‌های مذکور و دو جدایه از ویروس CYSDV روی طالبی (شهرستان‌های زهک و زابل) تعیین توالی و صحت اندازه‌ی قطعات تکثیر شده در RT-PCR در BLASTn تایید گردید. همچنین توالی‌های به دست آمده در بانک ژن NCBI شدند (جدول ۳) و جدایه‌ی MH348160 (زهک) بیشترین شباهت در سطح نوکلئوتیدی (۹۸/۸ درصد) با جدایه‌ی KC470000 (جیرفت) داشت و با جدایه‌ی دیگر سیستان و بلوچستان (جیرفت) MH348161 (زابل) دارای ۹۸/۵ درصد تشابه

نتایج حاصل از تعیین توالی نوکلئوتیدی

آزمون RT-PCR که با استفاده از آران ای کل استخراج شده از بافت آلوده و جفت آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) از ژن‌های CP و Hsp70h انجام گردید، منجر به تکثیر قطعاتی به طول حدود ۷۰۰، ۴۵۰، ۶۰۰ و ۴۶۸ جفت باز به ترتیب مربوط به ویروس‌های CYSDV، CVYV، CABYV و CCYV گردید و روی ژل آگارز یک درصد باندهای موردنظر مشاهده شد (شکل ۲ و ۳). تعدادی از محصول پی‌سی‌آرهای مربوط

نشده است این قطعات در بانک ژن به ترتیب با راس شماره‌های MH348160 و MH348161 و تحت عنوان SB و SB2 ثبت شده‌اند.

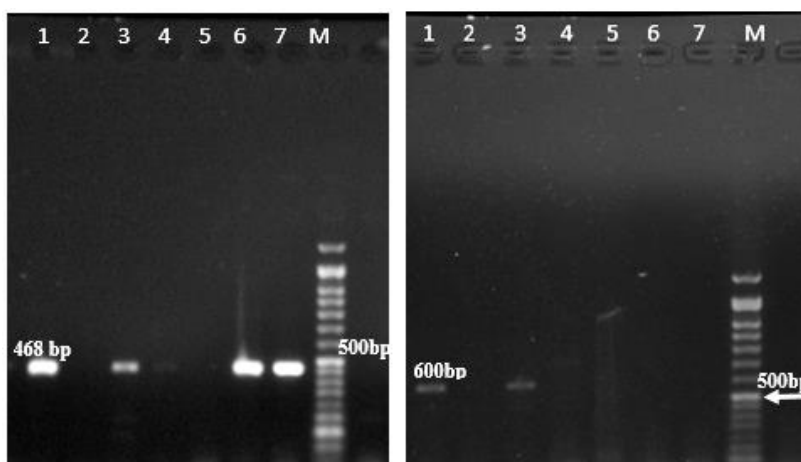
نوکلئوتیدی بود و جدایه‌ی زابل با دو جدایه‌ی دزفول (KC469991.1) و بوشهر (AY730779.1) نیز دارای تشابه نوکلئوتیدی ۹۹/۹ درصدی می‌باشند. تاکنون توالی از استان سیستان و بلوچستان از ویروس اختلال کوتولگی زرد کدوئیان در بانک ژن ثبت



شکل ۲- نتایج آزمون پی سی آر در ژل آگارز ۱ درصد مربوط به ناحیه‌ی ژن رمز کننده‌ی پوشش پروتئینی ویروس اختلال کوتولگی زرد

کدوئیان (700bp)، شکل سمت راست، ویروس زردی رگبرگ خیار (450 bp)، شکل سمت چپ، راهک M مربوط به نشانگر اندازه Gene ruler DNA ladder 50 bp (شرکت فرمنتاس، لیتوانی) (اصلی).

Figure 2. The results of the PCR test in the 1% agarose gel belong to the gene encoding coat protein of the CYSDV (700 bp) figure on the right. And CVYV (450 bp) figure on the left. M: The gene marker of DNA ladder size 50 bp (Fermentas Company, Lithuania) (Original).



شکل ۳- نتایج آزمون پی سی آر در ژل آگارز ۱ درصد مربوط به ناحیه‌ی ژن رمز کننده‌ی پوشش پروتئینی ویروس شته زاد کدوئیان (CABYV)

(600bp) شکل سمت راست، نتایج مربوط به ناحیه ژن رمز کننده‌ی پروتئین شوک حرارتی ویروس زردی کلروتیک کدوئیان (CCYV) (468bp) شکل سمت چپ. راهک M مربوط به نشانگر اندازه Gene ruler DNA ladder 50 bp (شرکت فرمنتاس، لیتوانی) (اصلی).

Figure 2. The results of the PCR test in the 1% agarose gel belong to the gene encoding coat protein of the CABYV (600 bp) figure on the right. The results of the gene encoding HSP70h of the CCYV (468 bp) figure on the left. M: The gene marker of DNA ladder size 50 bp (Fermentas Company, Lithuania) (Original).

جدول ۳- مشخصات توالی ویروس‌های تعیین توالی شده در تحقیق حاضر.

Table 3. Sequence characteristics of the sequenced viruses in this study.

The virus name (نام ویروس)	Isolate (جدایه)	Host (میزبان)	Sampling site (محل نمونه برداری)	Sequencing section (بخش تعیین توالی شده)	NCBI in accession number (شماره دسترسی در NCBI)	Year of sampling (سال نمونه برداری)
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	SB	<i>Cucumis melo var. canalouppensis</i>	Zahak	CP	MH348160	2016
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	SB2	<i>Cucumis melo var. canalouppensis</i>	Zabol	CP	MH348161	2016
<i>Cucumber vein yellowing virus</i>	Chb	<i>Cucurbita moschata</i>	Chabahar	CP	MH348162	2016
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i>	Nim	Watermelon	Nimruz	Hsp70h	MH939356	2018
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i>	Hir	Melon	Hirmand	Hsp70h	MH939355	2018
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i>	Zab	<i>Cucumis melo var. canalouppensis</i>	Zabol	Hsp70h	MH939359	2018
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i>	ham	<i>Cucumis melo var. canalouppensis</i>	Hamun	Hsp70h	MH939357	2018
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i>	Zak	<i>Cucumis melo var. canalouppensis</i>	zahak	Hsp70h	MH939360	2018
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i>	Hir2	<i>Cucumis melo var. canalouppensis</i>	Hirmand	Hsp70h	MH939358	2018
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i>	kon	<i>Cucumis melo var. canalouppensis</i>	konark	Hsp70h	MH660532	2016
<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	Sam-2	Melon	zahak	CP	MH660531	2018
<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	Sam-4	Melon	zahak	CP	MH660530	2018
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>	Zb	Melon	Zabol	CP	MH220206	2015
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>	Zh	Watermelon	Zahedan	CP	MH244459	2017
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>	Sav2	Watermelon	Saravan	CP	MH244458	2017
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>	Chb	Watermelon	Chabahar	CP	MH244454	2016
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>	NIC	<i>Cucumis melo var. cantalupo</i>	Nikshahr	CP	MH244447	2016

یک خوشه قرار گرفت و بیشترین شباهت را به آن داشت.

بررسی تنوع ژنتیکی و فشار انتخاب

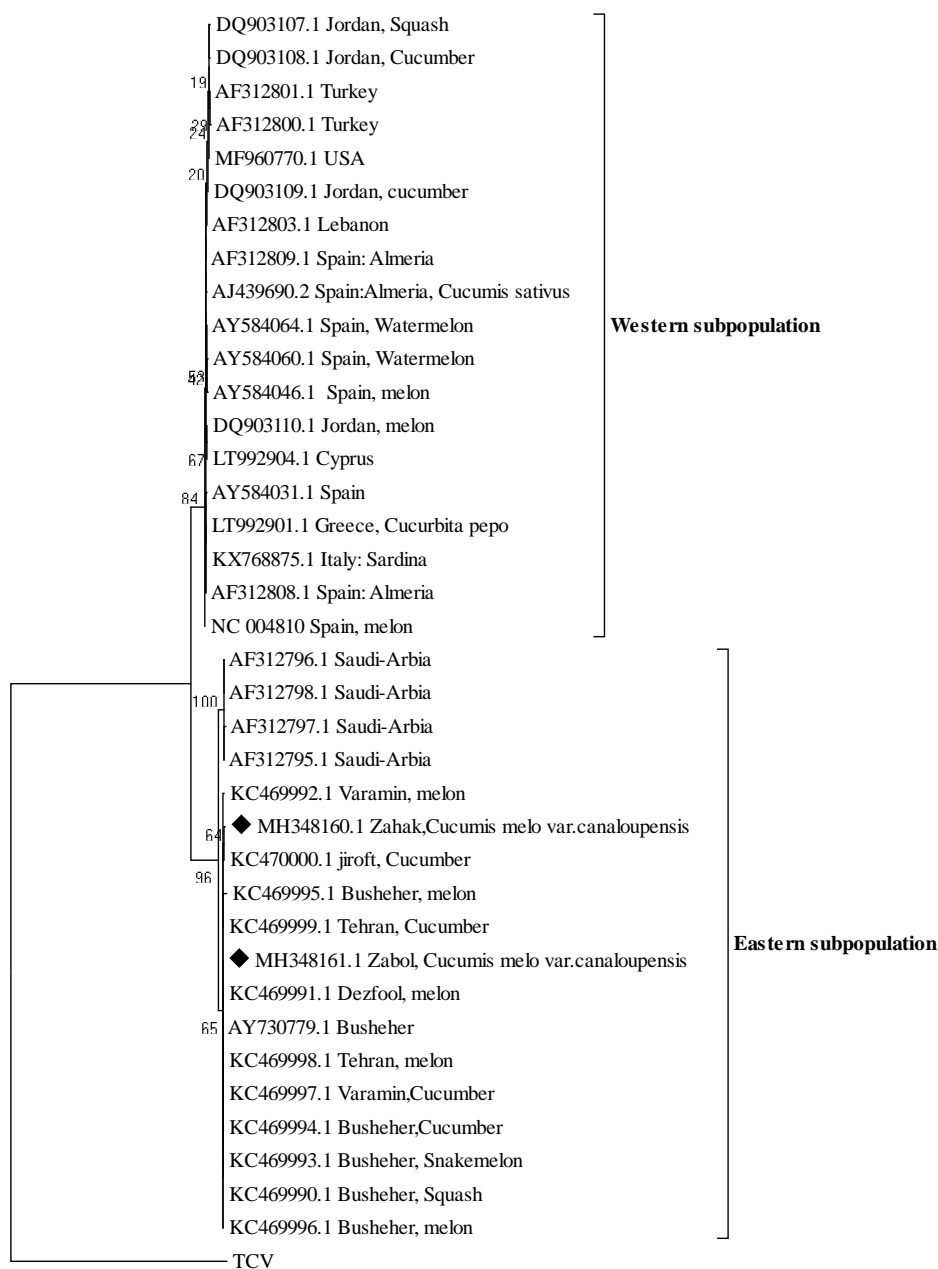
تعیین فشار انتخاب (Selective pressure) که تنوع ژنتیکی را شکل می‌دهد، بخش مهمی از مطالعات تکاملی را در بر می‌گیرد. یک روش معمول برای این امر، تعیین نسبت جاننشینی نامترادف (dN) به مترادف (dS) در آمینواسیدها است که با علامت ω نشان داده می‌شود. اگر این نسبت بالاتر از یک باشد، نشان‌دهنده انتخاب مثبت و تثبیت جاننشینی آمینواسیدی در پروتئین است. در غیر این صورت پروتئین در سطح آمینواسیدی محافظت شده (Conserved) بوده و انتخاب منفی در

آنالیزهای نبارزایی ویروس اختلال کوتولگی زرد کدئیان

بر اساس تجزیه و تحلیل کلاستر توالی‌ها به روش Maximum likelihood، کلیه جدایه‌های مورد مطالعه از مناطق مختلف دنیا همانند مطالعات روبیو و همکاران (Rubio et al., 2001) در دو زیرگروه (شرقی و غربی) قرار گرفتند (شکل ۴). زیرگروه شرقی شامل جدایه‌های ایرانی (دو جدایه مورد مطالعه در این بررسی و ۱۲ جدایه که قبلاً گزارش شده بودند) و عربستان می‌باشد، در حالی که زیرگروه غربی شامل جدایه‌های اردن، اسپانیا، ایتالیا، یونان، ترکیه و شمال آمریکا بود. جدایه‌ی زهک (MH348160) با جدایه‌ی جیرفت (KC470000) در

گروه‌هاست که بیشترین مقدار dS یا Pi(s) مربوط به گروه خاورمیانه (عربستان، لبنان و اردن) است که معادل ۰/۰۵ مشاهده شد (جدول ۴).

تکامل و تغییر ویروس دخالت داشته است (فرحبخش و همکاران ۲۰۱۳). نسبت dN/dS در گروه‌های مختلف در جدول ۴ ذکر شده است ولی تفاوت در نسبت dN/dS مربوط به مقدار جانشینی مترادف (dS) در این



شکل ۴- درخت تبارزایی رسم شده به روش Maximum likelihood براساس توالی نوکلئوتیدی قطعه 700 جفت بازی ژن پوشش پروتئینی دو جدایه ویروس CYSDV و ۳۵ جدایه‌های موجود در بانک ژن. ویروس زردی گوجه فرنگی (Tomato chlorosis virus, TCV) به عنوان عضوبرون گروه انتخاب گردید. جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق با \blacklozenge نشان داده شده‌اند.

Figure 4. Phylogenetic tree plotted by Maximum likelihood method based on the 700-bp of two CYSDV isolates and 35 isolates in the gene bank. (Tomato chlorosis virus, TCV) used as out group. The isolates examined in this study are labeled (black Diamonds).

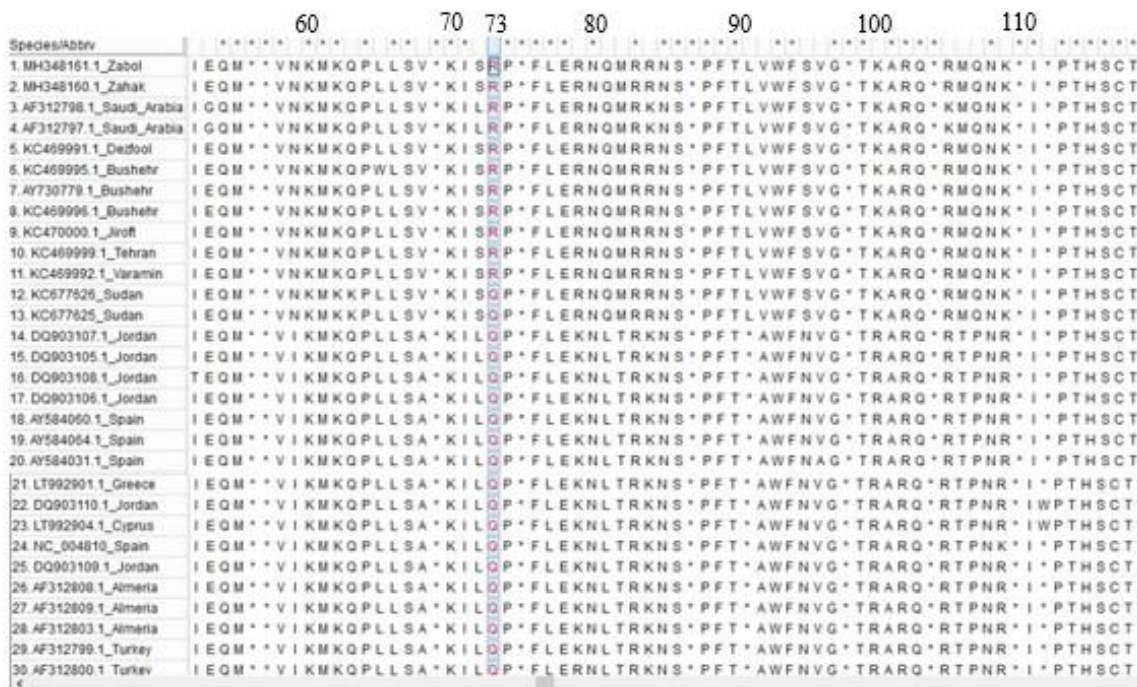
جدول ۴- پارامترهای ژنتیکی مربوط به تنوع ژنتیکی ویروس CYSDV در گروه‌های تبارزایی.

Table 4. Genetic parameters related to genetic variation of CYSDV in the Phylogenetic groups.

Group (گروه)	Number of isolates (تعداد جداها)	Non-Synonymous substitution (جاننشینی مترادف (dN)	Synonymous substitution (جاننشینی مترادف (ds)	$\omega = dN/dS$	Variable Sites (مکان‌های متغیر)	Parsimony informatives site (مکان‌های پارسیمونی)	Nucleotide diversity (π) (تنوع ژنتیکی)
Iran (ایران)	13	0/0028	0/007	0/4	20	4	0/00422
Europe (اروپا)	56	0/002	0/011	0/18	6	1	0/00455
Middle East (خاورمیانه)	16	0/003	0/05	0/06	79	70	0/03346

(جدول ۵). کدون ۷۳ در جدایه‌های زیرگروه شرقی اسید آمینه آرژنین (R) را کد می‌کند در حالیکه این کدون در جدایه‌های دیگر از مناطق مختلف جهان، اسید آمینه گلوتامین (Q) را کد می‌کند (شکل ۵). اسید آمینه ی موقعیت ۱۶۶، در طول زمان از پرولین به لوسین تغییر یافته است.

نتایج آنالیزهای انتخاب نشان داد که از ۴۵ جدایه در روش FEL، کدون‌های ۱۶۳ و ۷۳ به کدون‌های با انتخاب مثبت شناسایی شدند، در حالی که در روش MEME سه کدون دیگر شناسایی گردید (۱۶۰، ۲۱۵ و ۲۲۹) که در تنوع نقش داشتند. در نهایت، یک گروه از شش کدون شناسایی شد که همه در انتهای آمینی CP قرار داشتند. موقعیت های منفی در انتهای کربوکسیلی واقع شده‌اند



شکل ۵- هم‌ردیفی توالی‌های اسید آمینه بخشی از ژن پروتئین پوششی (CP) جدایه‌های CYSDV مورد بررسی در این تحقیق، اسید آمینه در موقعیت ۷۳ جدایه‌های عربستان و ایران (زیرگروه شرقی) به اسید آمینه آرژنین تغییر یافته است.

Figure 5. Alignment of Amino Acid Sequences as part of the CYSDV isolates of the CYSDV isolates examined in this study, the amino acid of position 73 of the Saudi and Iranian isolates (Eastern subgroup) was changed to Arginine amino acid.

جدول ۵- نتایج آنالیزهای انتخاب کدون با استفاده از روش‌های انتخاب (MEME و FEL, SLAC) بر روی ژن پوشش پروتئینی ویروس CYSDV.

Table 5. Analysis of codon selection by selection methods (FEL, SLAC and MEME) on the coat protein gene of the CYSDV.

Method (روش)	Negative (منفی)	Neutral (خنثی)	(Positive) مثبت	Positive Positions (موقعیت‌های مثبت)	Negative Positions (موقعیت‌های منفی)
FEL	4	141	2	73, 166	43, 105, 158, 111
MEME	-	-	4	215, 160, 166, 229	-
SLAC	3		0	-	193, 194, 182

بحث

خاورمیانه (جدایه‌های عربستان، لبنان و اردن) بود. بنابراین پایین بودن میزان ω در گروه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که منطقه CP تحت محدودیت‌های انتخاب منفی بوده و در تنوع و تکامل این ویروس نقش داشته است. همچنین مقادیر ω با روابط تبارزایی بین گروه‌ها همخوانی دارد. طبیعی است که تنوع جغرافیایی و میزبانی می‌تواند رابطه‌ی مستقیم با تغییرات نوکلئوتیدی و جانشینی آمینواسیدی داشته باشد این تغییرات در روند تکاملی می‌تواند منجر به گونه‌زایی شود (فرحبخش و همکاران ۲۰۱۳).

همچنین با توجه به نتایج این تحقیق، انتهای آمینی پروتئین پوششی تحت فشار انتخاب مثبت و انتهای کربوکسیلی دارای فشار انتخاب منفی است. در عوض تنوع در ناحیه N-terminal نشان‌دهنده‌ی نقش این ناحیه در فعالیت‌های اختصاصی ویروس و نیز برهمکنش‌های ویروس، ناقل و میزبان می‌باشد (Reichmann et al., 1992) و انتخاب مثبت منجر به جایگزینی یک اسید آمینه (آرژنین به جای گلوتامین) در کدون ۷۳ پروتئین پوششی در جدایه‌های ایرانی (مرکزی و جنوبی) و جدایه‌های عربستان شده است. بنابراین این کدون در تمام جدایه‌های زیر گروه شرقی با حفاظت شدگی بالا در شرایط یکسان وجود دارد و همچنین پراکنش این ویروس در مناطق جنوبی با وجود موانع طبیعی زیاد نشان‌دهنده‌ی قدمت طولانی این ویروس بومی در ایران است.

در درخت تبارزایی جدایه‌های CYSDV استان سیستان و بلوچستان همراه با اکثر جدایه‌های ایرانی در

مشاهدات مزرعه‌ای در تحقیق حاضر حاکی از تنوع علائم ویروسی در مزارع کدوئیان مناطق مورد مطالعه بود. این تنوع می‌تواند نشان‌دهنده‌ی استرین‌های متنوع از یک ویروس، یا آلودگی همزمان چند ویروس و همچنین پاسخ‌های متنوع ارقام مختلف کدوئیان در مناطق متفاوت باشد (Hull, 2014).

در این مطالعه، آزمون RT-PCR روی ۱۹۵ نمونه از کدوئیان نشان داد که ویروس اختلال کوتولگی زرد کدوئیان در بیشتر مناطق کشت محصولات جالیزی مشاهده شده و شیوع آن در استان‌های جنوبی (بوشهر، خوزستان، کرمان، هرمزگان و سیستان و بلوچستان) بیشتر است که ممکن است به دلیل شرایط مناسب‌تر برای فعالیت ناقل آن سفید بالک (*B. tabaci*) در این مناطق باشد (Keshavarz et al., 2013).

آنالیزهای تبارزایی صورت گرفته براساس توالی نوکلئوتیدی ژن پوشش پروتئینی جدایه‌های CYSDV با مطالعات کشاورز و ایزدپناه (Keshavarz and Izadpanah, 2005) مطابقت داشت و جدایه‌های CYSDV در دو زیرگروه غربی و شرقی قرار گرفتند که تنوع ژنتیکی در زیرگروه غربی علیرغم پراکنش جغرافیایی گسترده و سال‌های مختلف نمونه برداری، بسیار کم بود احتمالاً یکی از دلایل تنوع کم این زیرگروه مربوط به گسترش زیاد و کلونیزاسیون سریع مگس سفید در مناطق جدید می‌باشد (Brown et al., 1995).

تنوع ژنتیکی (π) در درون گروه‌های مختلف متفاوت است اگرچه بیشترین مقدار تنوع ژنتیکی مربوط به گروه

وجود دارد. بنابراین در مورد ویروس‌های گیاهی آران ای دار، می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های CYSDV ایران از تنوع ژنتیکی کمی برخوردار هستند، بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که راهبرد خاموشی آران ای می‌تواند برای تولید یک گیاه تراریخته با مقاومت در طیف گسترده در برابر همه جدایه‌های CYSDV ایران مناسب باشد.

زیرگروه شرقی قرار گرفتند و جدایه‌ی زهک با جدایه‌ی جیرفت در یک خوشه قرار گرفت. براساس این توزیع می‌توان فرضیه‌ی احتمال انتقال آلودگی از طریق نشاهای آلوده و یا انتقال سفید بالک‌های آلوده به همراه محصولات کدوئیان را مطرح نمود. از طرفی علیرغم پراکندگی جغرافیایی وسیع در استان‌های جنوبی کشور، وجود تنوع پایین در بین جدایه‌ها می‌تواند ناشی از شرایط محیطی باشد که در تمام این مناطق گرمسیر

منابع

- Abrahamian PE and Abou-Jawdah Yusuf, 2014. Whitefly-transmitted criniviruses of cucurbits: current status and future prospects. *Virus Disease* 25(1):26–38
- Antignus Y, Wang Y, Pearlsman M, Lachman O, Lavi N and Gal-On A, 2001. Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting *tobamovirus*. *Phytopathology* 91:565–571.
- Ahmadi K, Ebadzadeh HR, Abdi Shah H, Kazemian A, and Rafiei M. 2017. Agricultural statistics crop year 2016-2017. Ministry of Agriculture jahad, Iran.
- Bananej K, Kianfar N, Winter S and Menzel W, 2013. The status of *Cucumber vein yellowing virus* in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*. 53: 269–276.
- Bahrami S, Bahrami H, and Hassanzadeh R, 2010. Comprehensive and illustrated guide to the cultivation of vegetables (watermelon, cantaloupe, melon, squash, etc.). Agricultural Promotion, Training and Promotion Organization.
- Brown JK, Frohlich DR and Rosell RC, 1995. The sweet potato or silverleaf whiteies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Annual Review of Entomology*. 40: 511-534.
- Ce'lix A, Lopez-Sese AI, Almarza N, Gomez-Guillamon ML and Rodriguez-Cerezo E, 1996. Characterization of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, a *Bemisia tabaci*-transmitted closterovirus. *Phytopathology* 86:1370–6.
- Cuadrado IM, Janssen D, Velasco L, Ruiz L and Segundo E, 2001. First report of *Cucumber vein Yellowing virus* in Spain. *Plant Disease* 85: 336.
- Desbiez C, Lecoq H and Girard M, 2003. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in commercial cucumber greenhouses in France. *Plant Disease* 87:600.
- Farahbakhsh F, Masumi M, Afsharifar A, Izadpanah A and Rahpeyma sarvestani N, 2013. Genetic variation of *bermuda grass southern mosaic virus* isolates based on sequence of 3' region of genome. *Iran Journal of Plant Pathology*. 49 : (1) 61-75.
- Gil-Salas F M, Peters J, Boonham N, Cuadrado I M, and 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 .
- Hassan A and Duffus JE, 1991. A review of a yellowing and stunting disorder in the United Arab Emirates. *Emirates Journal of Agricultural Science*. 2:1-16.
- Hu JS, Li HP, Barry K and Wang M, 1995. Comparison of dot blot, ELISA and RTPCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Disease* 79:902–906.
- Hull R. 2014. *Plant virology*. 5th ed Academic Press.

- Kassem MA, Sempere RN, Juárez M, Aranda MA and Truniger V, 2007. *Cucurbit aphid-borne yellows virus* is prevalent in field-grown cucurbit crops of southeastern Spain. *Plant Disease* 91:232-238.
- Keshavarz T and Izadpanah K, 2005. Etiology of cucurbit yellows in Bushehr Province, Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41: 107–121.
- Kosakovsky Pond SL, Frost SDW and Muse SV, 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*. 21:676-679.
- Kumar S, Stecher G and Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33:1870-1874
- Lecoq H and Desbiez C, 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region. Pp. 67-126 In: Gad L and Herve´ L (eds.) *Advances in virus research*. Academic Press, London.
- Liu HY, Wisler GC and Duffus JE, 2000. Particle lengths of whitefly-transmitted Criniviruses, *Plant Disease* 84:803–5.
- Lopez-sese AJ and Gomez-Guillamon ML, 2000. Resistance to *Cucurbit yellowing stunting disorder virus* (CYSDV) in *Cucumis melo* L. *Horticulture Science*. 35:110-113.
- Martelli GP, Agranovsky AA and Bar-Joseph M, 2002. The family *Closteroviridae* revised. *Archive of Virology* 147: 2039–2045.
- Marco CF and Aranda MA, 2005. Genetic diversity of a natural population of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Journal General Virology* 86:815–22.
- Marco CF, Aguilar JM, Abad J, Go´mez-Guillamo´n ML and Aranda MA, 2003. Melon resistance to *Cucurbit yellow stunting disorder virus* is characterized by reduced virus accumulation. *Phytopathology* 93:844–52.
- Richmann J, Lain S and Garcia JA, 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *The Journal of general virology*. 73: 1-16.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE and Sanchez-Gracia A, 2017. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets.
- Rubio L, Abou-Jawdah Y, Lin H-X and 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.
- Salehi S. and Bananej K, 2013. Detection and Geographical of Viral Infections in Cucumber Greenhouses in Tehran and Alborz Provinces, *Journal of Pests and Plant Diseases*. 81: (2) 153-166.
- Thompson JD, Higgins DG and 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.
- Wisler GC, Duffus JE, Liu HY and Li RH, 1998. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted Closteroviruses. *Plant Disease* 82: 270–280.
- Wyatt SD and Brown JK, 1996. Detection of subgroup III *geminivirus* isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86:1288–1293.
- Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H, Wipf-Scheibel C, Marrakchi M and Lecoq H, 2007. Occurrence of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus* in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* 89: 417-20.
- Zeng R, Dai FM, Chen WJ and Lu JP, 2011. First Report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* Infecting Melon in China. *Plant Disease* 95(3): 354.

Identification of RNA-Associating Viruses with Yellow Cucurbits in South Eastern Iran and Genetic Diversity of the Prevalent Virus

Z sadeghi¹, S Nasrollanejad², M lagzian³, S Esmail Razavi² and M jafari⁴

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 and Assistant Professor Respectively, 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, Higher Educational Complex of Saravan, Iran

*Corresponding Author: Snasrollanejad1967@yahoo.com

Received: 21 December 2019

Accepted: 9 March 2019

Abstract

Yellowing disease of greenhouse and open-grown cucurbits by whitefly-transmitted viruses is dramatically rising in the world and Iran. To study the viral infection of cucurbits in Sistan-Baluchistan Province, 195 leaf samples with viral symptoms were collected and tested for infection of some prevalent cucurbit viruses by RT-PCR using specific primers and some expected amplified DNA fragments were sequenced. Results confirmed the presence of viral infection (%59) in all surveyed areas. Including CABYV, CYSDV, CCYV, CVYV and WmCSV. The most infection of collected samples were %43, % 28 and % 8 of WmCSV, CVYV and CYSDV respectively. Phylogenetic analysis showed that the CYSDV isolates were divided into two subgroups of East and West and two SB and SB2 isolates with 12 Iranian isolates and 4 Saudi Arabia isolates were clustered in eastern subgroup. Also genetic studies on the part of the coat protein gene showed that in Iranian isolates and Eastern subgroup the CGA had changed to CCA which led to the substitution of Glutamine by arginine at the codon position 73 of coat protein. Therefore, the nucleotide differences of Iranian isolates than the isolates from different regions indicate high genetic diversity and long dating of this native virus in Iran

Keywords: *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), Genetic diversity, Sistan and Baluchestan Province, viral infection