مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۹۹-۹۱

بذور آلوده وارداتی کدوئیان عامل استقرار و انتشار جدایه‌های اروپای مرکزی ویروس موزائیک زرد کدو در منطقه ورامین

سمیه قلی‌زاده روشنق[۱]، شاهین نوری نژاد زرقانی[۲]*، حشمت اله امینیان[۳]، مجید جعفری[۴] و حسین رامشینی[۵]

Imported infected cucurbit seeds cause of establishment and distribution of central Europe isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* in Varamin

Somayeh Gholizadeh-Roshanagh[1], Shaheen Nourinejhad Zarghani[2*], Heshmatolah Aminian[3], Majid Jafari[4] and Hossein Ramshini[5]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، ۲- استادیار ۳- دانشیار
گروه حشره‌شناسی و بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
۴- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان
۵- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

[1] M.Sc., [2] Assistant Professor [3] Associated Professor
Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran
[4] Assistant Professor of Department of Plant Protection, College of Agriculture, Higher Educational Complex of Saravan
[5] Assistant Professor of Department of Agronomy, College of Abouraihan, University of Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sh_nourinejhad@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۳/ ۹۵/۸- تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۴)

چکیده

ویروس موزائیک زرد کدو (ZYMV) از ویروس‌های مهم کدوئیان است. پروتیین پوششی (Coat Protein, CP) پوتی‌ویروس‌ها به لحاظ تبارزایی حائز اهمیت است و از سوی دیگر منطقه ورامین نیز از مناطق مهم تولید کدوئیان بشمار می‌آید، اما تاکنون ناحیه ZYMV-CP در جدایه‌های این منطقه تعیین‌توالی نشده است. بنابراین، هدف این پژوهش، تعیین‌توالی ZYMV-CP در جدایه‌های ورامین و بررسی روابط فیلوژنتیکی آن با دیگر جدایه‌های ZYMV است. از این‌رو، نمونه‌برداری از مزارع طالبی ورامین، پاکدشت و پیشوا طی بهار و تابستان ۹۴-۱۳۹۳ انجام و ۳۴ درصد نمونه‌ها آلوده به ZYMV در تست الایزا مثبت نشان دادند. نتایج نشان داد که ناحیه ZYMV-CP در جدایهٔ ورامین (ZYMV-Varamin) ۸۴۰ نوکلئوتید بود. در درخت تبارزایی مبتنی بر ZYMV-CP، تمامی جدایه‌های ZYMV در سه گروه A، B و C قرار گرفتند که گروه A خود به هشت زیرگروه A1-A8 تقسیم شد. جدایه‌های ایرانی در زیرگروه‌های A1، A6 (شامل جدایه ورامین) و A8 قرار گرفتند. زیرگروه‌های A7 و A8 برای اولین بار در این پژوهش معرفی شدند. هرچند انتهای‌آمینی ZYMV-CP بیشترین تنوع را نسبت به سایر بخش‌های CP دارد، موتیف $N_{16}N_{17}A_{27}M_{37}$ از ویژگی‌های منحصربفرد جدایه‌های اروپای‌مرکزی است که توسط بذر نیز منتقل می‌شوند، در جدایه ورامین هم ردیابی شد که نشان‌دهنده ورود این جدایه‌ها به ورامین توسط بذور آلوده کدوئیان است.

واژه‌های کلیدی

طالبی،
تبارزایی،
الایزا،
تاکسونومی،
انتقال با شته

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-14]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]

مقدمه

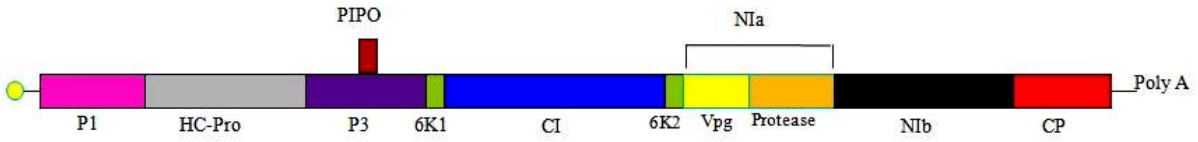
ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) یکی از سه ویروس مهم و محدودکننده کشت کدوئیان و سبزیجات است. با اینکه دامنهٔ میزبانی این ویروس محدود به گیاهان جالیزی و چند گیاه زینتی است، از پراکنش زیادی برخوردار بوده و از ۵۰ کشور دنیاگزارش‌شده است (Desbiez and Lecoq 1997). حدود ۲۶ گونهٔ شته نظیر *Aphis gossypii*، *A. craccivora*، *Macrosiphum euphorbiae* و *Myzus persicae* به‌روش ناپایا، ناقل ZYMV هستند (Katis *et al*. 2006; Lisa and Lecoq 1984; Yuan and Ullman 1996). علایم ZYMV در طالبی شامل روشن شدن رگبرگ‌ها، موزائیک زرد، بدشکلی برگ و تاولی شدن برگ‌هاست (Loebenstein and Lecoq 2012). ژنوم ZYMV همانند سایر گونه‌های جنس *Potyvirus* از یک رشته RNAی تک‌لا با قطبیت مثبت تشکیل شده است که در انتهای '۵ خود دارای VPg و در انتهای '۳ خود به دم پلی‌A ختم می‌شود. این مولکول یک پلی پروتیین بزرگ و یک پروتیین کوچک بنام PIPO را رمز می‌کند. پلی پروتیین بزرگ به پروتیین‌های کوچک‌تر عملکردی هضم می‌شود که مشخصات آنها در شکل ۱ آورده شده است. ژنوم این ویروس نیز همانند سایر ویروس‌ها دارای تنوع است. برای بررسی این تنوع بین جدایه‌های ویروس از بخش‌های مختلف ژنوم ZYMV استفاده شده است (Wisler *et al*. 1995; Desbiez *et al*. 1996). ناحیه پروتیین پوششی (Coat Protein, CP) از مهمترین این نواحی است که طول کامل آن نه تنها برای بررسی تنوع جدایه‌های ZYMV (Rybicki and Schukla 1992; Desbiez *et al*. 2002; Massoumi *et al*. 2011; Bananej *et al*. 2008) بلکه در بیشتر پژوهش‌های انجام یافته برای تعیین رابطه تبارزایی بین جدایه‌های پوتی‌ویروس‌ها نیز استفاده می‌شود (Tobias and Palkovics 2003). جدایه‌های ZYMV بر اساس طول کامل ناحیه CP در سه گروه A، B و C قرار می‌گیرند. گروه A خود به سه زیرگروه تقسیم شده بود که امروزه با افزایش تعداد جدایه‌های مورد بررسی، زیرگروه‌های ۴، ۵ و ۶ نیز به این تقسیم بندی اضافه شدند (Loebenstein and Lecoq 2012.; Massumi *et al*. 2011; De Almeida Spadotti *et al*. 2015; Glasa and Pittnerová 2006; Romay *et al*. 2014; Bananej *et al*. 2008; Özer *et al*. 2012; Vučurović *et al*. 2012; Coutts *et al*. 2011).

این پوتی‌ویروس از مناطق مختلف ایران از گیاهان مختلف خانواده کدوئیان گزارش شده است (Azarfar *et al*. 2012; Salehi and Bananej 2014; Ghorbani 1988; Massoumi *et al*. 2011; Bananej *et al*. 2008; Safaeizadeh 2008; Bananej and Vahdat 2008). با معرفی آغازگرهای عمومی برای پوتی‌ویروس‌ها بویژه برای ناحیه NIb-CP (Zheng *et al*. 2010)، از این ناحیه نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی ZYMV استفاده شده است (Ghasemzadeh *et al*. 2012a,b). بر اساس ناحیه NIb-CP جدایه‌های ZYMV گزارش شده از مزارع کدوی استان‌های خراسان، مازندران، تهران (ورامین و کرج)، یزد، کرمان، همدان و مرکزی و نیز مزارع طالبی استان‌های اصفهان، خوزستان، گلستان و گیلان ۱۰۰-۹۵/۶ درصد تشابه داشتند (Bananej *et al*. 2008). بعلاوه بررسی الگوی برشی محصولات RT-PCR در ناحیه NIb-CP با آنزیم‌های برشی *Pvu*II و *Eco*RV نشان داد که جدایه‌های ZYMV مناطق مختلف کشور، تفاوتی جود ندارد (Safaeizadeh 2008). در پژوهش دیگری ناحیه CP بطور کامل در ۲۱ جدایه ZYMV از کدوی زمستانه (استان‌های کرمان، تهران، هرمزگان، بوشهر، کرمان، خراسان)، خیار (اصفهان، گیلان، یزد، سیستان و بلوچستان، همدان، آذربایجان شرقی)، هندوانه ابوجهل (کرمان)، کدوی تنبل (آذربایجان شرقی)، هندوانه (همدان، آذربایجان غربی، هرمزگان، سیستان و بلوچستان)، طالبی (بوشهر و فارس) تعیین توالی شد و براساس درخت‌های ترسیم شده مبتنی بر این ناحیه، جدایه‌ها در گروه A و در دو زیرگروه قرار گرفتند (Massoumi *et al*. 2011). جدایه فارس (ZYMV-F, JN183062) تنها جدایه ویروس موزائیک زرد کدوی گزارش شده از ایران است که بطور کامل تعیین توالی شده است. این جدایه بیشترین شباهت را به جدایه‌های اروپایی دارد (Azarfar *et al*. 2012).

خربزه و طالبی بطور وسیع در شهرستان ورامین و نیز شهرستان‌های اطراف آن کشت می‌شود و ویروس‌های مهم کدوئیان از جمله ZYMV از روی این گیاه و منطقه گزارش شده‌اند. تنها داده‌های مولکولی موجود در زمینه ژنوم جدایه‌های منطقه ورامین محدود به یک توالی از ناحیه عمومی NIb-CP است اما تاکنون فقط ناحیه NIb-CP یک جدایه از ورامین تعیین توالی شده است (Bananej *et al*. 2008) و هیچ داده‌ای در مورد ناحیه ZYMV-CP جدایه‌های این منطقه وجود ندارد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-14]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]



شکل ۱- ژنوم یک پوتی ویروس. ژنوم پوتی ویروس‌ها از یک رشته مولکول RNA با قطبیت مثبت تشکیل شده است که ابتدای ژنوم حاوی VPgو انتهای ژنوم بهPoly-A ختم می‌شود. مستطیل بزرگ چارچوب خواندنی بزرگ را در پوتی ویروس‌ها نشان می‌دهد که یک پلی‌پروتیین را رمز می‌کند. این پروتیین هضم شده و به ده پروتیین کوچک‌تر تقسیم می‌شود که با خط عمودی محل‌های برش آن و با رنگ‌های مختلف پروتیین‌های حاصل از هضم پلی پروتیین در شکل نشان داده شده‌اند و از انتهای آمینی به ترتیب عبارتند از P1 (پروتئاز)، HC-Pro (پروتئاز است و در تعامل با شته‌ها، تکثیر، حرکت ویروس و مهارخاموشی ژن نقش دارد)، P3 (در تکثیر و حرکت ویروس نقش دارد)، 6K1 (نامعلوم)، CI (هلیکاز وحرکت ویروس)، 6K2 (احتمال دارد در اتصال کمپلکس تکثیر به شبکه اندوپلاسمی نقش دارد)، NIa (پروتئاز)، NIb (رپلیکاز) و CP (پروتیین پوششی). چارچوب خواندنی دوم در پوتی ویروسها، "PIPO" است که با رنگ قرمز تیره نشان داده شده است (جهت حرکت بین سلولی ویروس ضروری است) برای جزئیات بیشتر به King *et al*., 2012 رجوع شود.

Figure 1. The genome organization of a potyvirus. The genome of potyviruses consists of a positive sense single stranded RNA which is attached to a VPg at 5’ end (small yellow circle) and is polyadenylation at 3’ end. The largest rectangle denotes the large ORF encoding for a large polyprotein proteolytically processed to 10 functional proteins indicated by different colors. The functional proteins from *N*-terminus of the polyprotein are as follows: P1 (protease), HC-Pro (protease, aphid transmission helper component, suppressor of RNA silencing, involves in movement of the virus), P3 (involves in movement of the virus), 6K1 (unknown function), CI (helicase and involves in virus movement, cylindrical-shaped inclusion body found in the cytoplasm), 6K2 (involves in attachment of replication complex to endoplasmic reticulum), NIb (replicase) and CP (coat protein). The second ORF of potyviruses, PIPO, is shown by a small dark red color rectangle (essential for virus intercellular movement). For more details please refer to King *et al*, 2012).

جدول ۱- تعداد و محل نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع طالبی جنوب استان تهران.

Table 1. Number and location of collected samples from melon fields in Sothern Tehran, Iran.

سال	محل	زمان نمونه برداری	تعداد نمونه جمع‌آوری شده	تعداد نمونه‌های مثبت
۹۳	پیشوا	اردیبهشت ماه	۱۹	۴
	پاکدشت	اردیبهشت	۳۵	۴
	پاکدشت	خرداد ماه	۸	۱
	ورامین	خرداد ماه	۱۸	۷
	پاکدشت	اردیبهشت	۹	۲
۹۴	پیشوا	خرداد ماه	۱۸	۱۳
	ورامین	خرداد ماه	۸	-
	پیشوا	خرداد ماه	۱۷	۱۴

مواد و روشها

جمع آوری نمونه و انجام آزمون الایزا

مزارع خربزه و طالبی شهرستان‌های ورامین، پاکدشت و پیشوا (استان تهران) طی اردیبهشت‌ماه و خردادماه سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ مورد بازدید قرار گرفته و بصورت تصادفی و حرکت در راستای قطر مزارع به فاصله ۵۰-۳۰ متری از زمان گلدهی و میوه دهی تا برداشت نمونه‌برداری انجام شد. محل و تعداد نمونه‌های جمع-آوری شده در جدول ۱ نمایش داده شده اند. شایان ذکر است علایم مشاهده شده در نمونه‌های جمع آوری شده کمابیش مشابه و شامل کاهش رشد، موزاییک، بدشکلی، زردی، چین و چروک، رگ برگ روشنی و سبز روشنی در برگ‌ها بود. به منظور ردیابی ZYMV در نمونه‌های جمع‌آوری شده از آزمون الایزا (DAS-ELISA) به روش کلارک و آدامز استفاده شد (Clark and

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-14]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]

(Adams 1977). آنتی‌بادی‌های مورد استفاده از شرکت DSMZ آلمان تهیه شدند.

استخراج RNA و RT-PCR

استخراج RNAی کل از تمامی نمونه‌هایی که آلودگی آنها به ZYMV در آزمون الایزا قطعی شده بود بر اساس دستورالعمل ارایه شده توسط Nagy به نقل از سخندان و همکاران (Sokhandan-Bashir *et al.* 2006) انجام شد. مقدار ۲µl از RNAی کل استخراج شده با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit و بر اساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده (ترموساینتیفیک، لیتوانی) برای ساخت cDNA در حجم نهایی ۱۰میکرولیتر استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از کیت PCR mix شرکت سیناکلون (ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت و بکارگیری دو میکرولیتر از cDNA به عنوان الگو انجام شد. جفت آغازگر ZYMV-8407-s (5'-GCACCATACATAGCTGAGACAGC-3') (طراحی شده دراین پژوهش) و ZY3 (5'-TAGGCTTGCAAACGGAGTCTAATC-3') (Thomson *et al.* 1995) برای تکثیر طول کامل ناحیه CP به همراه ناحیه ترجمه نشونده انتهای'۳ استفاده شد. برنامه دمایی و مدت‌زمان شامل یک چرخه‌ی دمایی۹۴°C به مدت۲دقیقه، ۳۵ چرخه شامل یک مرحله از دمای ۹۴°C به مدت۳۰ ثانیه، دمای ۶۴°C به‌عنوان دمای اتصال آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه، یک مرحله از دمای ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه جهت سنتز و در آخر یک مرحلهٔ ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

همسانه‌سازی محصول RT-PCR

محصولات RT-PCR با استفاده از Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (شرکت ترموساینتیفیک، آلمان) از ژل آگارز خالص‌سازی شده و الگوی برشی محصولات RT-PCR با آنزیم-های *Bam*HI و *Hind*III مورد بررسی قرار گرفت و نمونه منتخب برای همسانه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت و به حامل خطی pTG19-T طبق پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده (Vivantis, Malaysia) الحاق شد. محصول واکنش اتصال (ligation) به سلول‌های مستعد *Escherichia coli* DH5 انتقال داده شده (Sambrook and Russell 2001) و بر روی محیط کشت LB حاوی X-Gal وIPTG کشت داده شدند. پرگنه‌های سفید رشد یافته در پنج میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین (۵۰mg/ml) و در لوله‌ی آزمایش کشت داده شدند. این لوله‌ها به مدت یک شب در انکوباتور لرزان در دمای ۳۷°C و ۲۰۰rpm قرار داده شدند و پس از تکثیر باکتری‌های نوترکیب، از آن‌ها پلاسمید به روش لیز قلیایی استخراج شد (Sambrook and Russell 2001). جهت بررسی اندازه قطعه DNAی اتصال یافته به حامل همسانه‌سازی از آنزیم *Bam*HI و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (سیناکلون) استفاده شد. برای بررسی نتایج واکنش RT-PCR و برش با آنزیم، از الکترفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد استفاده شد.

تعیین توالی نوکلئوتیدی و تجزیه وتحلیل داده‌ها

برای تأیید درستی همسانه‌سازی ناحیه ZYMV-CP در جدایه ورامین، همسانه‌های نوترکیب به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شدند. داده‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده از واکنش تعیین توالی، توسط نرم‌افزار BioEdit مونتاژ، زیر هم چیده شده (alingment) و میزان تشابه توالی‌ها محاسبه شد. برای رسم درخت‌های تبارزاییکی از نرم‌افزار Phylogeny Inference package (Phylip) version 3.65 استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی نمونه‌های آلوده توسط آزمون الایزا و RT-PCR

از ۱۳۲ نمونه برگی بررسی شده آلودگی ۴۵ نمونه (۳۴ درصد) به ZYMV محرز شد. در الکتروفورز محصولات RT-PCR قطعه‌ی مورد انتظار به طول bp ۱۲۵۷ (شامل طول کامل ناحیه CP به همراه انتهای ′۳ ترجمه نشده) در نمونه‌های الایزا مثبت تکثیر شد که شکل ۲ نمونه‌ای از این واکنش‌ها را نشان می‌دهد.

همسانه‌سازی ناحیهZYMV-CP در حامل pTG19-T

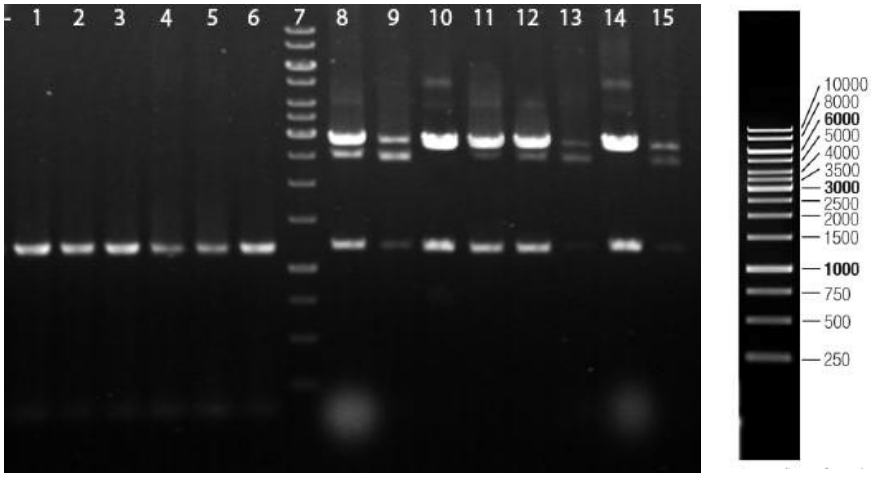
در برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم *Bam*HI، دو قطعه به اندازه تقریبی bp ۲۸۰۰ (حامل همسانه‌سازی) و ۱۲۵۰bp (قطعه DNAی مورد انتظار) مشاهده شد (شکل ۲). هیچ گونه الگوی متفاوتی در اثر برش با آنزیم *Bam*HI مشاهده نشد.

تعیین توالی و تبارزایی

نتایج تعیین توالی نشان داد که اندازه‌ی ناحیه ژنومی پوشش پروتیینی در جدایه ورامین (ZYMV-Varamin) ۸۴۰ نوکلئوتید (معادل ۲۷۹ آمینو اسید بدون در نظر گرفتن کدون خاتمه) بود و در این جدایه هیچ گونه جهش حذف و اضافه مشاهده نشد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-14]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]



شکل ۲ـ الکتروفورز محصولات RT-PCR با استفاده از آغازگرهای ZYMV-8407-s وZY3 (راهک‌های ۱ تا ۶) و پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ZYMV-CP ناحیه (راهک ۸ تا ۱۵) در ژل آگارز یک درصد. راهک ۷: مارکر GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

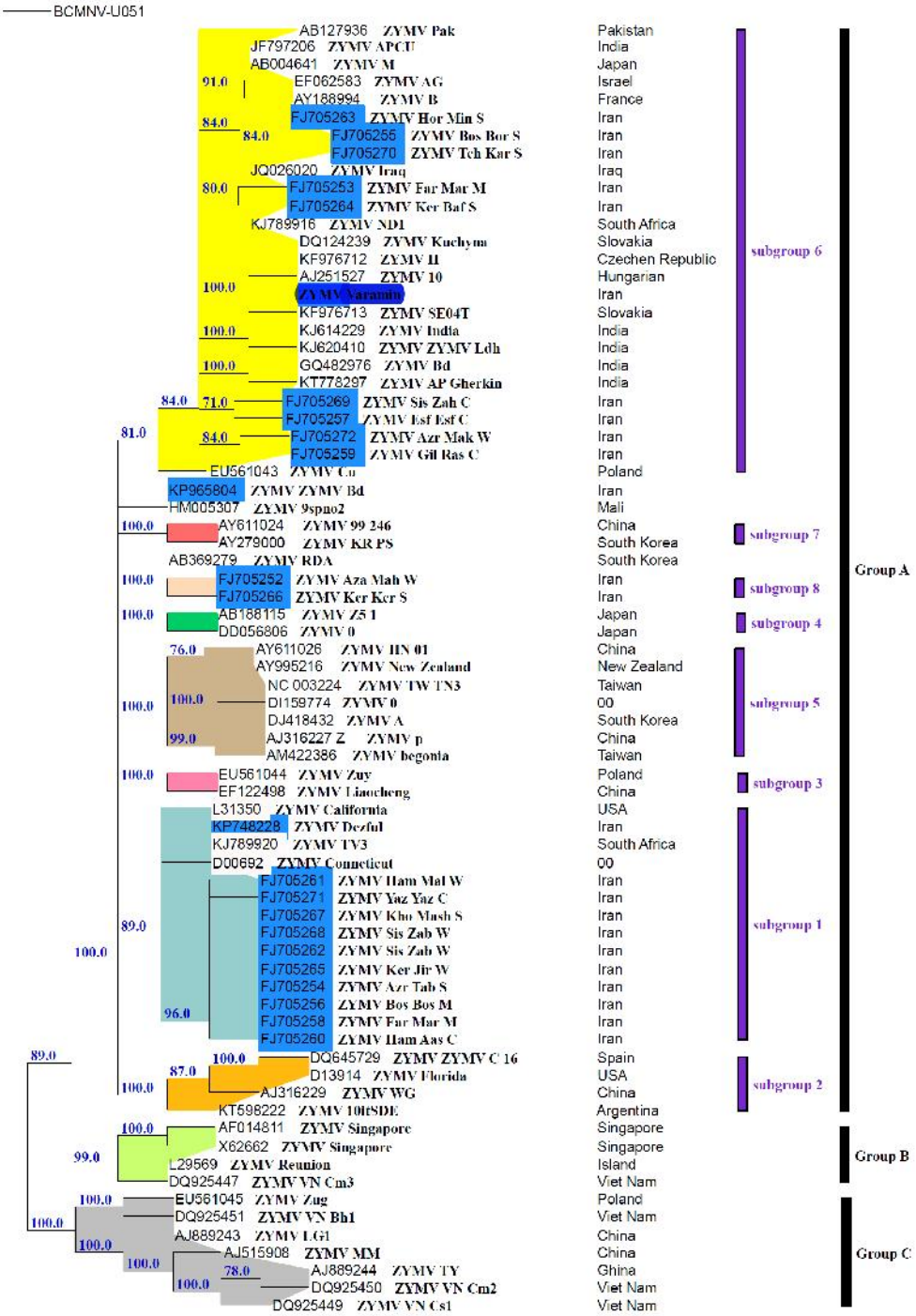
Figure 2. Electrophoresis of RT-PCR products using ZYMV-8407-s and ZY3 primers (Lanes 1-6) and *Bam*HI digestion of recombinant plasmids harboring ZYMV-CP gene (lanes 8-15) in 1% agarose gel. Lane 7: GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

جدایه ZYMV-Varamin بیشترین تشابه را در سطح اسیدهای آمینه با جدایه‌های ZYMV-Kuchyna (اسلواکی) و ZYMV-10 (مجارستان) با ۱۰۰–۹۹/۶ درصد داشت، درحالیکه با سایر جدایه-های ZYMV گزارش شده از ایران (ZYMV-Bd, KP965804) ۹۷/۱ – ۹۲/۸ درصد تشابه داشت. در سطح اسیدهای نوکلئیک، ZYMV-Varamin بیشترین تشابه را با جدایه‌های ZYMV-SE04T و ZYMV-Kuchyna (هردو از اسلواکی) و نیز ZYMV-H از جمهوری چک با ۹۹/۸ درصد و با جدایه‌های ایرانی از قبل تعیین توالی شده ۹۳/۲–۹۸/۹ درصد تشابه داشت. در درخت‌های ترسیم شده مبتنی بر طول کامل ناحیه پروتیین پوششی به روش-های ماکسیمم پارسیمونی و نزدیکترین همسایه در دو سطح اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک تنها درخت ترسم شده براساس توالی اسیدهای نوکلئیک و به روش نزدیکترین همسایه توانست جدایه‌ها را بخوبی تفکیک کند. براساس این درخت جدایه‌های ZYMV به سه گروه A، B و C تقسیم شدند (شکل ۳) که این نتایج تائید کننده نتایج لکوک و دسبیز (Lecoq and Desbiez 2012) بود. جدایه‌های ایرانی در گروه A قرار گرفتند. گروه A تا سال ۲۰۱۲ در منابع به سه زیر گروه و در سال ۲۰۱۲ به شش زیرگروه تقسیم بندی شد که در آن گروهبندی جدایه‌های ایرانی در زیرگروه A1 قرار گرفتند (Lecoq and Desbiez 2012). در پژوهش‌های بعدی جدایه‌های ایرانی در دو زیرگروه درون گروه A قرار گرفتند (Massumi *et al.* 2011) اما از آنجا که تمامی زیرگروه‌های گروه A در تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی بکاربرده نشده بودند جایگاه دقیق جدایه‌های ایرانی مشخص نبود.

در پژوهش حاضر، تمامی جدایه‌های گزارش شده از ZYMV تا تاریخ اول سپتامبر ۲۰۱۶ که ناحیه CP بطور کامل درآنها تعیین توالی شده بود به همراه جدایه تعیین توالی شده در این پژوهش در تجزیه و تحلیل‌ها بکار برده شدند. الگوی مشاهده شده در درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس ZYMV-CP جدایه‌های ایرانی و نیز سایر جدایه‌های گزارش شده از کشورهای مختلف بر اساس منطقه جغرافیایی گروه‌بندی نشدند (شکل ۳). براساس این درخت ترسیم شده، گروه A به هشت زیرگروه تقسیم شد (شکل ۳) که جدایه‌های ایرانی در زیر گروه‌های A1، A6 و A8 قرار گرفتند و یک جدایه ZYMV-Cu (رس شماره KP965804) در هیچ زیرگروهی از گروه A قرار نگرفت. همان طوری که پیش‌تر گفته شد گروه A در ابتدا به سه و درنهایت به شش زیرگروه تقسیم شد (Lecoq and Desbiez 2012). در این پژوهش زیرگروه‌های A7 (شامل ZYMV-99/246 از چین و ZYMV-KR-PS از کرهٔ جنوبی) و A8 (دو جدایه مهاباد و کرمان) نیز برای اولین‌بار معرفی شدند. زیرگروه A1 فقط شامل جدایه‌های ایرانی (۱۱ جدایه از شهرهای ملایر، یزد، مشهد، زابل، جیرفت، تبریز، اسدآباد و بوشهر)، دو جدایه از آمریکا و یک جدایه از آفریقای جنوبی بود. جدایه‌های زیرگروه A6 که بیشترین جدایه‌ها را در بر دارد شامل جدایه‌های آسیای دور، خاورمیانه، اروپا و آفریقای

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-14]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]

جنوبی و ایران (۱۰ جدایه میناب، اصفهان، کرج، رشت، زاهدان، ماکو، بوشهر، مرودشت، بافت و جدایه ZYMV-Varamin) بود.

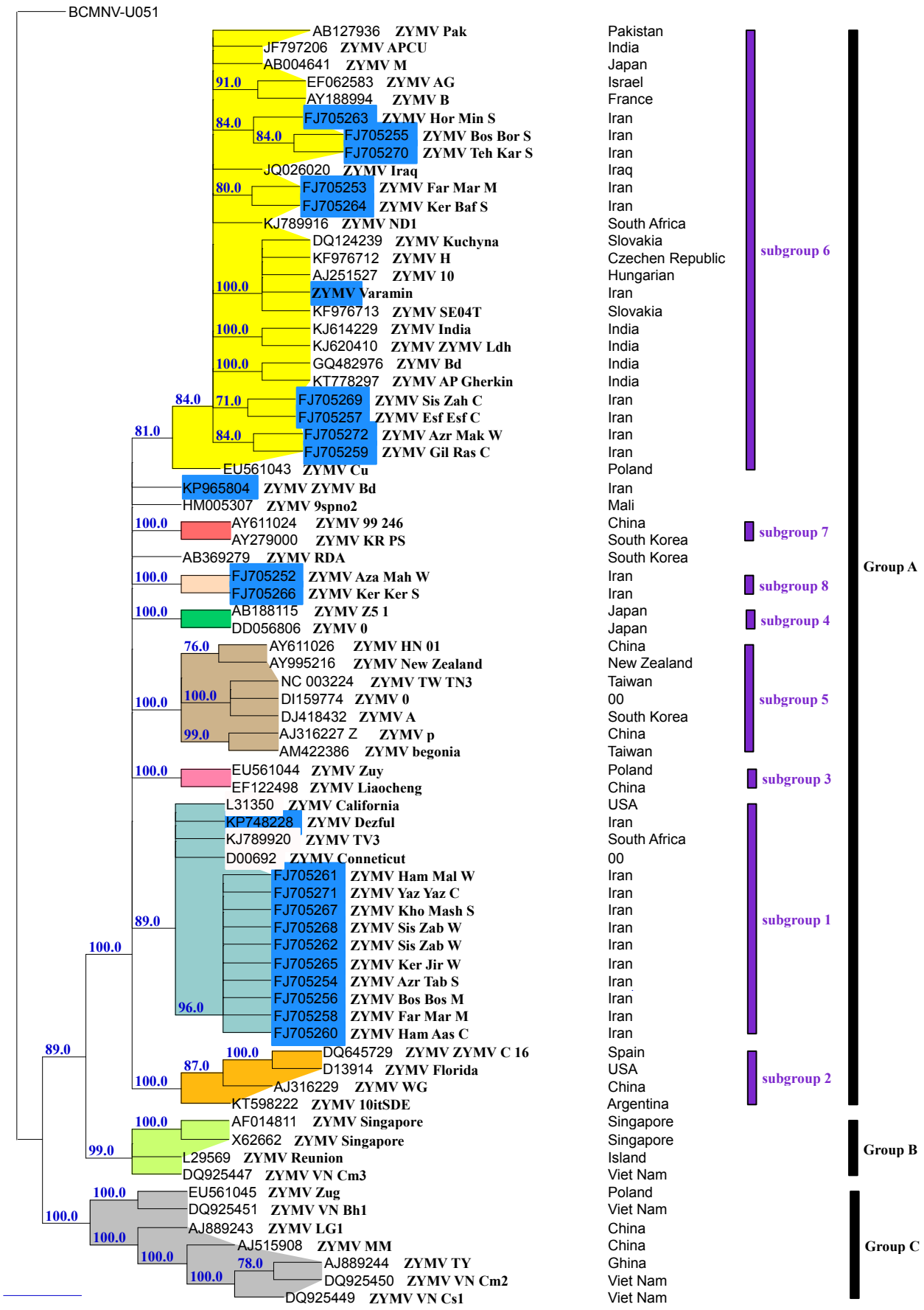


شکل ۳- درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس توالی کامل ناحیه CP جدایه‌های ZYMV به روش نزدیک‌ترین همسایه (NJ) در سطح اسیدنوکلئیک. شاخه‌های با بوت استرپ کمتر از ۷۰% ادغام شداند. منشاء جدایه‌ها و نیز زیرگروه‌های ZYMV در سمت راست شکل نشان داده شده‌اند.

Figure 3. Neighbor joining tree drawn based on full-length ZYMV-CP gene at the nucleotide level. Branches with less than 70 % bootstrap supports were collapsed. The origin of the isolates and subgroups were shown in the right.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-14]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]



[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-14]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]

با وجود اینکه ورامین یکی از مناطق مهم کشت کدوئیان است ولی تاکنون هیچ جدایه‌ای از این منطقه تعیین توالی نشده و موقعیت جدایه‌های آن تعیین نشده بود. در این پژوهش معلوم شد جدایه‌ی ورامین هم در مقایسات دوبدوی و هم در درخت ترسیم شده مبتنی بر طول کامل ناحیه CP، بیشترین شباهت را به جدایه-های اسلواکی، جمهوری چک و مجارستان داشت و به همراه آن-ها در زیرگروه A6 قرار گرفت.

در مقایسات توالی آمینواسیدی ناحیه CP در جدایه‌های ZYMV، جدایه ورامین نیز، دارای موتیف DAG (Harrison and Robinson 1988) در انتهای آمینی CP بود (شکل ۲). بیشترین تفاوت جدایه‌های ایرانی در انتهای آمینی CP مشاهده شد که در جدایهٔ ZYMV-Varamin، جدایه‌های اسلوکی، جمهوری چک و مجارستان موتیف TKKNNEDDK در موقعیت‌های ۲۱-۱۳ وجود داشت، درحالیکه این موتیف در سایر جدایه‌های ایرانی TKKDKEDDK بود. در اعضای زیرگروه A6 در موقعیت‌های ۴۲-۳۵ موتیف KTVAAATK مشاهده شد در حالیکه این موتیف در اعضای زیر گروه A1 بصورت KTVAAVTK بود. با توجه به اینکه ساختار سه بعدی پروتیین پوششی ZYMV تعیین نشده است نمی‌توان تأثیر این تغییرها را در ساختار و عملکرد CP را مشخص کرد، اما نشان داده شده است که انتهای آمینی CP در پوتی‌ویروس‌ها حاوی اپی‌توپ‌های اختصاصی پوتی‌ویروس و گونه‌های آن است و بیشترین تغییرها در جدایه‌های ZYMV در اطراف موتیف DAG مشاهده شده است (شکل ۴) (Atreya *et al.* 1995). از این‌رو، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که توالی‌های اطراف موتیف DAG تحمل بیشتری نسبت به جهش‌ها در مقایسه با سایر بخش‌های ناحیه CP دارد. از آنجا که این موتیف در انتقال با شته نقش دارد، احتمال دارد این تغییرها باعث اثرهای متقابل کشنده برای ویروس نبوده است. بنابراین نیاز به بررسی اثر یا اثرهای این تغییرها در امینواسیدهای اطراف موتیف DAG در کارایی این موتیف در انتقال با شته بشدت احساس می‌شود. بعلاوه موتیف DAG به واسطه HC-Pro (موتیف PTK) با گیرنده‌های موجود در استایلت ناقل تعامل دارد که این تنوع در انتهای آمینی پروتیین CP ممکن است آنرا تحت تاثیر قرار خواهد داد (Pirone 1991, Peng *et al.* 1998). بطوریکه نشان داده شده است در پوتی‌ویروس‌ها توالی‌های اطراف DAG تعیین خواهند کرد که موتیف DAG در انتقال با شته کارایی داشته باشد یا نداشته باشد (López-Moya *et al.* 1999). با توجه به اینکه جدایه‌ی ورامین به همراه جدایه‌های جمهوری چک، اسلواکی (SE04T و Kuchyna) و مجارستان در یک خوشه قرار گرفتند و موتیف‌های یکسانی (Glasa and Pittnerova 2006) را در مقایسه با سایر جدایه‌ها به اشتراک داشتند، می‌توان استنباط کرد که ZYMV-Varamin با این جدایه-ها از یک جد مشترک منشاء گرفته‌اند.

از سوی دیگر موتیف $N_{16}N_{17}A_{27}M_{37}$ تنها در انتهای آمینی CP جدایه‌های مجارستان، اسلواکی و اتریش (جدایه‌های اروپای مرکزی) مشاهده شده است و به عنوان ویژگی منحصر بفرد و بی-همتای این جدایه‌ها معرفی شده است (Tóbiás and Palkovics 2003). این موتیف در جدایه ZYMV-Varamin نیز مشاهده شد. نشان داده شده است که این جدایه‌ها، هرچند به میزان کم، توسط بذر انتقال می‌یابند و تنها راه گسترش یا پراکنش این جدایه‌ها در سه کشور اشاره شده انتقال با بذر است (Tóbiás and Palkovics 2003). از آنجا که رقم سمسوری (رقم بومی) در ورامین کاشت می‌شود و بذور این گیاه واردتی نیست، احتمال دارد این ویروس از طریق بذور وارداتی سایر کدوئیان نظیر خیار و کدوی آلوده به این نژاد وارد منطقه ورامین شده است. این امر تاکیدی دیگر بر اجرای سخت‌گیرانه اصول قرنطینه برای جلوگیری از ورود جدایه‌های جدید به ایران است. احتمال ضعیف‌تر این است که موتیف $N_{16}N_{17}A_{27}M_{37}$ فقط در جدایه‌های اروپای مرکزی وجود ندارد که تنها با ادامه پژوهش‌ها بویژه با تعیین توالی بخش‌های دیگر جدایه‌های اروپای مرکزی و بطور همزمان جدایهٔ ورامین مشخص خواهد شد. متفاوت بودن توالی انتهای آمینی پروتیین پوششی در جدایه ورامین نسبت به سایر جدایه‌های این ویروس در ایران و حتی مابین برخی جدایه‌های ایرانی این پیام را در بردارد که جدایه‌های موجود در ایران از تنوع بالاتری برخوردار بوده و منشاء متفاوتی دارند. به نظر می‌رسد این جدایه‌ها همراه با بذور کدوئیان وارد ایران شده‌اند و در صورت تجمع این جدایه‌ها در یک منطقه، احتمال بروز جدایه‌های نوترکیب افزایش می‌یابد. با توجه به خاصیت انتقال با بذر جدایه‌های اروپای مرکزی و شاید ZYMV-Varamin پیشنهاد می‌شود در انتخاب توده یا ارقام مقاوم به این ویروس میزان انتقال ZYMV با بذور آن توده نیز بررسی شود. بعلاوه بهتر است جدایه ای از هرگروه فیلوژنتیکی و موتیف های موجود در انتهای آمینی به عنوان مورد نماینده انتخاب و مقاومت ارقام یا توده‌ها نسبت به این جدایه‌ها و الگوی پراکنش آنها مورد توجه قرارگیرد. در غیر این‌صورت مبارزه با شته‌ها به منظور جلوگیری از ورود ویروس به مزارع به دلیل استقرار کانون‌های اولیه آلودگی در اثر کاشت بذور آلوده جز

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-14]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]

[Downloaded from gebsj.com]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]

DAG Motif

$N_{16}N_{17}$

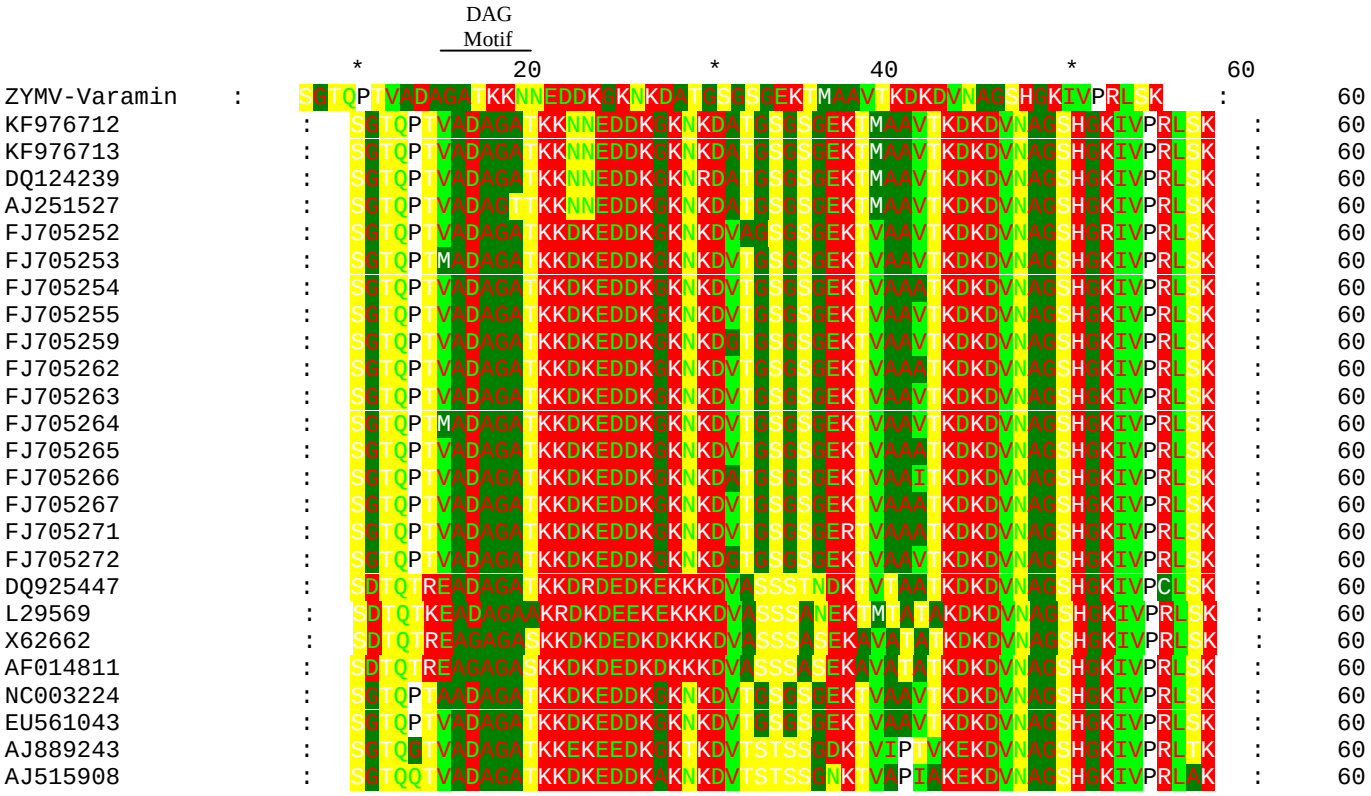
A_{27}

M_{37}

```
                                  *        20         *        40         *        60
ZYMV-Varamin  : SGTQPTVADAGATKKNNEDDKGKNKDATGSGSGEKTMAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
KF976712      : SGTQPTVADAGATKKNNEDDKGKNKDATGSGSGEKTMAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
KF976713      : SGTQPTVADAGATKKNNEDDKGKNKDATGSGSGEKTMAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
DQ124239      : SGTQPTVADAGATKKNNEDDKGKNRDATGSGSGEKTMAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
AJ251527      : SGTQPTVADAGTTKKNNEDDKGKNKDATGSGSGEKTMAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705252      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVAGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGRIVPRLSK :  60
FJ705253      : SGTQPTMADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705254      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705255      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705259      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDGTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705262      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705263      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705264      : SGTQPTMADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705265      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705266      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDATGSGSGEKTVAAITKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705267      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705271      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGERTVAAATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
FJ705272      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDGTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
DQ925447      : SDTQTREADAGATKKDRDEDKEKKKDVASSSTNDKTVTAATKDKDVNAGSHGKIVPCLSK :  60
L29569        : SDTQTKEADAGAAKRDKDEEKEKKKDVASSSANEKTMTATAKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
X62662        : SDTQTREAGAGASKKDKDEDKDKKKDVASSSASEKAVATATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
AF014811      : SDTQTREAGAGASKKDKDEDKDKKKDVASSSASEKAVATATKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
NC_003224     : SGTQPTAADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
EU561043      : SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPRLSK :  60
AJ889243      : SGTQGTVADAGATKKEKEEDKGKTKDVTSTSSGDKTVIPTVKEKDVNAGSHGKIVPRLTK :  60
AJ515908      : SGTQQTVADAGATKKDKEDDKAKNKDVTSTSSGNKTVAPIAKEKDVNAGSHGKIVPRLAK :  60
```

Central Europe isolates

افزایش آلودگی محیط زیست و ایجاد ناقلین مقاوم به سموم نتیجه‌ای در بر نخواهد داشت.



شکل ۴- زیرهم‌چینی ترادف آمینو اسیدی ناحیه پروتیین پوششی در سطح اسیدهای آمینه که نشان دهنده حضور موتیف‌های DAG، DK و NN است.

Figure 4. Alignment of ZYMV-CP sequences at the amino acid level showing DAG, DK and NN motifs.

منابع

Atreya PL, Lopez-Moya J, Chu M, Atreya CD, Pirone TP. 1995. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in *Potyvirus* transmission by aphids. Journal of General Virology 76, 265-270.

Azarfar A, Izadpanah K, Afsharifar A, Masumi M. 2012. Purification and the complete genome sequence of *Zucchini yellow mosaic virus*- Fars isolate. Iranian Journal of Plant Pathology 48, 403-409. (In Farsi with English abstract).

Bananej K, Keshavarz T, Vahdat A, Hosseini Salekdeh G, Glasa M. 2008. Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran. Journal of Phytopathology 156, 654-659.

Bananej K, Vahdat A. 2008. Identification, distribution, and incidence of viruses in field-grown cucurbit crops of Iran. Phytopathologia Mediterranea 47, 247-257.

Clark MF, Adams A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linkedimmunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34, 475-483.

Coutts R H, Livieratos I. 2003. Nucleotide sequence and genome organization of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* RNA1. Archives of Virology 148, 2055-2062.

De Almeida Spadotti DM, Wassano DT, Rezende JAM, Aranha LE, Camargo AKIN. 2015. Biological and molecular characterization of Brazilian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. Science Agriculture 72, 187-191.

Desbiez C, Lecoq H. 1997. *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Pathology 46, 809-829.

Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Granier F, Robaglia C, Delaunay T, Lecoq H. 1996. Biological and molecular

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-14]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]

variability of *Zucchini yellow mosaic virus* on the island of Martinique. Plant Disease 80, 203-207.

Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Lecoq H. 2002. Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) with special reference to Caribbean islands. Virus Research 85, 5-16.

Ghasemzadeh A, Sokhandan Bashir N, Khakvar R. 2012a. Molecular detection of *Potato virus Y* using universal primers from Ardabil province. Journal of Sustainable Agriculture and Production Science 22, 67-80. (In Farsi with English abstract).

Ghasemzadeh, A., Sokhandan Bashir, N. and Masoudi, N .2012b. Sequencing part of *Watermelon mosaic virus* genome and phylogenetical comparison of 5 isolates with other isolates from world. Journal of Agriculture and Food Technology 2, 93-101. (In Farsi with English abstract).

Ghorbani S. 1988. Isolation of *Zucchini yellow mosaic virus* in the Tehran province. Iranian Journal of Plant Pathology 24, 13-15. (In Farsi with English abstract).

Glasa M, Pittnerová S. 2006. Complete genome sequence of a Slovak isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) provides further evidence of a close molecular relationship among central European ZYMV isolates. Journal of Phytopathology 154, 436-440.

Harrison B, Robinson D, Tyrrell D, 1988. Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological [and discussion] significance. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 321, 447-62.

Katis N, Tsitsipis J, Lykouressis D, Papapanayotou A, Margaritopoulos J, Kokinis G, Perdikis DC, Manoussopoulos I. 2006. Transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* by colonizing and non-colonizing aphids in Greece and new aphid species vectors of the virus. Journal of Phytopathology 154, 293-302.

Lecoq H, Desbiez. 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture. 67-126. In: Loebenstein G, Lecoq H. (Ed.). Advances in Virus Research (Vol.84): Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin. Academic Press.

Lisa V, Lecoq H. 1984. *Zucchini yellow mosaic virus*. Description of plant viruses. No. 282.

Loebenstein G, Lecoq H. 2012. (Ed.). Advances in Virus Research (Vol.84): Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin. Academic Press. 570 p.

Lopez-Moya J, Wang R, Pirone T. 1999. Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. Journal of General Virology 80, 3281-8.

Massumi H, Shaabanian M, Heydarnejad J, Pour AH, Rahimian H. 2011. Host range and phylogenetic analysis of Iranian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. Journal of Plant Pathology 93, 187-93.

Özer M, Sipahioğlu HM, Usta M, Fidan H. 2012. Cloning and sequencing of coat protein gene of *Zucchini yellow mosaic virus* isolated from squash and muskmelon in Turkey. Turkish Journal of Biology 36, 423-429.

Peng Y, Kadoury D, Gal-On A, Huet H, Wang Y, Raccah B, 1998. Mutations in the HC-Pro gene of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*: effects on aphid transmission and binding to purified virions. Journal of General Virology 79, 897-904.

Pirone TP. 1991. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. Seminars in Virology 2, 81-87.

Romay G, Lecoq H, Geraud-Pouey F, Chirinos D., Desbiez C. 2014. Current status of cucurbit viruses in Venezuela and characterization of Venezuelan isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Pathology 63, 78-87.

Rybicki E, Shukla DD. 1992. Coat protein phylogeny and systematics of potyviruses. In: Barnett OW (Ed). *Potyvirus taxonomy*. Archives Virology Supplementum 5, 139-70.

Safaeizadeh M. 2008. Comparative biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran. Asian Journal of Plant Pathology 2, 30-39.

Salehi S, Bananej K. 2014. Detection and geographical distribution of viral infections in cucumber greenhouses in Tehran and Alborz provinces. Entomology and Phytopathology 81, 153-166. (In Farsi with English abstract).

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed., Volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 1.1-1.131.

Sokhandan Bashir N, Kalhor MR, Nourinejhad Zarghani S. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. Virus Genes 32, 277-288.

Thomson KG, Dietzgen RG, Gibbs AJ, Tang YC, Liesack W, Teakle DS, Stackebrandt E. 1995. Identification of Zucchini yellow mosaic potyvirus by RT-PCR and analysis of sequence variability. Journal of Virological Methods 55, 83-96.

Tobias I, Palkovics L. 2003. Characterization of Hungarian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) transmitted by seeds of *Cucurbita pepo* var *styriaca*. Pest Management Science 59, 493-497.

Vučurović A, Bulajić A, Stanković I, Ristić D, Berenji J, Jović J, Krstić B. 2012. Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates. Euroupean Journal of Plant Pathology 133, 935-947.

Wisler G, Purcifull D, Hiebert E. 1995. Characterization of the P1 protein and coding region of the *Zucchini yellow mosaic virus*. Journal of General Virology 76, 37-45.

Yuan C, Ullman DE. 1996. Comparison of efficiency and propensity as measures of vector importance in *Zucchini yellow mosaic Potyvirus* transmission by *Aphis gossypii* and *A. craccivorab*. Phytopathology 86, 698-703.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-14]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7]