



گزارش وقوع و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف لکه زرد خربزه از برخی
از استان‌های ایران

Report on the Occurrence and Genetic Diversity of Melon Yellow
Spot Virus Isolates in Various Provinces of Iran

مهرداد صالح زاده*، علیرضا افشاریفار

Mehrdad Salehzadeh*, Alireza Afsharifar

مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز، شیراز، ج.ا، ایران.

Plant Virology Research Center, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz,
Iran

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: Mehrdadsalehzadeh@gmail.com

Mehrdadsalehzadeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۱ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۵/۱۳)

Received: 2024/12/23 | Accepted: 2025/03/01 | Published: 2025/08/04

Abstract

In a survey conducted in spring and summer 2024 across greenhouses in Isfahan, Shiraz, Bandar Abbas, Bushehr, and Yazd, severe symptoms such as yellow spots, mosaic patterns, leaf deformity, yellowing, fruit necrosis, and chlorotic ring spots were noted on cultivated *C. sativus* plants. To assess contamination with orthospoviruses, total genomic RNA was extracted from five independent isolates from each area, along with an asymptomatic negative control, confirmed free of orthospoviruses through molecular analysis. RT-PCR using degenerate primer pairs targeted orthospoviruses, resulting in the amplification of a 420 bp fragment from infected samples. Further investigations revealed no mixed contamination with significant pathogenic viruses including Tobamoviruses, Potexviruses, Begomoviruses, and Potyviruses. Phylogenetic analysis based on nucleotide sequences indicated the presence of Melon Yellow Spot Virus. This marks the first recorded occurrence of Melon Yellow Spot Virus (MYSV) in Iran.

Keywords: Iran, Orthospovirus, Genetic diversity, Melon yellow spot virus.

چکیده

رفرنس دهی این مقاله Citation

Salehzadeh M, Afsharifar A. (2025). Report on the occurrence and genetic diversity of melon yellow spot virus isolates in various provinces of Iran. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 13 (2): 225-234. Doi: [10.61882/gebsj.13.2.3](https://doi.org/10.61882/gebsj.13.2.3)
URL: <http://gebsj.ir/article-1-511-en.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 13, Number 2, 2025

خلاصه

طی یک بررسی در بهار و تابستان ۱۴۰۳، از گلخانه‌های اطراف شهرستان‌های اصفهان، شیراز، بندرعباس، بوشهر و یزد در مرکز و جنوب ایران، لکه‌های زرد شدید، موزاییک و بدشکلی برگ، زردی، نکروز میوه و علائم لکه‌های حلقه‌ای سبزرده روی میوه گیاهان خیار کشت شده مشاهده شد. برای ارزیابی آلودگی جدایه‌ها به ارتوتوسپوویروس‌ها، RNA ژنومی کل (از هر منطقه ۵ جدایه مستقل) به صورت جداگانه استخراج و یک جدایه بدون علامت نیز به عنوان شاهد منفی انتخاب شد. نمونه‌های RNA استخراج شده متعاقباً با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی ارتوتوسپوویروس‌ها با آزمون RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. از نمونه‌های آلوده یک قطعه مورد انتظار با اندازه ۴۲۰ جفت باز تکثیر شد. برای بررسی احتمال آلودگی مخلوط نمونه‌ها با ویروس‌های مهم بیمارگر در سبزیجات شامل توپاموویروس‌ها، پوتکس ویروس‌ها، بگوموویروس‌ها و پوتی ویروس‌ها بررسی و آلودگی مخلوط مشاهده نشد. هم ردیف‌سازی توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی و ترسیم درخت تبارنمای مربوطه آلودگی جدایه‌ها به ویروس لکه زرد خربزه را نشان داد. این اولین گزارش از وقوع ویروس لکه زرد خربزه (MYSV) از ایران است.

کلمات کلیدی: ایران، ارتوتوسپوویروس، تنوع ژنتیکی، ویروس لکه زرد خربزه.

مقدمه

Introduction

خیار (*Cucumis sativus* L.) از خانواده کدوئیان (*Cucurbitaceae*) همراه با گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی از مهمترین گیاهان جالیزی در ایران به‌شمار می‌رود. با توجه به سطح زیر کشت بالای کشت گلخانه‌ای و فضای باز خیار در ایران شناسایی ویروس‌های مخرب و نوظهور در کشور بر روی این گیاه از اهمیت بالایی برخوردار است. به طوریکه، ۴۷/۷۶٪ کل گلخانه‌های کشور زیر کشت خیار هستند. ایران با تولید سالانه حدود یک میلیون و دویست هزار تن خیار پنجمین تولیدکننده این محصول در جهان به‌شمار می‌رود. بزرگ‌ترین تولیدکننده خیار در سطح جهان، کشور چین با بیش از ۷۹٪ تولید جهانی خیار و خیارشور در جهان است و پس از آن کشورهای ترکیه، روسیه، ایران و مکزیک قرار دارند. تولید سالانه خیار در سراسر جهان حدود ۹۱ میلیون تُن برآورد شده است که شامل سه گونه اصلی از خوراکی وجود دارد که شامل معمولی، ترشی و چنبر می‌شود (Tajik Khademi et al., 2024).

ویروس لکه زرد خربزه (*Orthospovirus meloiflavi*, *Melon yellow spot orthospovirus*, MYSV)، برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ در ژاپن شناسایی شد و باعث ایجاد علائم پژمردگی لکه‌ای و سبزدی شدید در کدوئیان به‌خصوص خیار (Takeuchi et al., 2001)، هندوانه (*Citrullus lanatus*) (Iwaki et al., 1984) و خربزه (*Cucumis melo*) (Wu et al., 2024) شد. پژوهش‌های بعدی نشان داد که MYSV توسط تریپس خرما (*Thrips palmi*) و به‌صورت پایا منتقل می‌شود (McLeish et al., 2022). مطالعه دامنه‌ی میزبانی ویروس نشان داد که MYSV علاوه بر گیاهان خانواده کدوئیان (*Cucurbitaceae*)، از گلابی بالزام (*Momordica charantia*) (Takeuchi et al., 2009) و همچنین در چندین گونه علف‌هرز که معمولاً در اطراف گلخانه‌های خیار مانند، آکالیفا استرالیایی (*Acalypha australis*)، کیسه کشیش (*Capsella bursa-pastoris*)، پیربهارک (*Conyza canadensis*)، پیربهار تلخ (*Conyza sumatrensis*)، بوف‌تاج (*Gnaphalium purpureum*)، گزنه سفید ساقه آغوش (*Lamium amplexicaule*)، اگزالیس آپارتمانی (*Oxalis stehchusriaacen*)، پنبرک معمولی (*Sociculata media, neglecta*)، گیاه کولا (Quito-Avila) و سیزاب ایرانی (*Veronica persica*) را آلوده کرده و در گیاهان مذکور بصورت سیستمیک درمی‌آید (Quito-Avila et al., 2024).

MYSV روی خانواده کدوئیان باعث ایجاد لکه‌های سبزرده، لکه‌های موزاییکی، حلقوی، زرد و نکروز روی میوه می‌شود. این علائم منجر به کاهش کیفیت میوه و کاهش قابل توجهی در عملکرد میوه می‌گردد. (al., 2014).
 MYSV مانند سایر اعضای جنس توسپوویروس‌ها دارای یک پوشش شبه‌کروی، با ۳ قطعه RNA رشته‌ای حلقوی، با نام‌های S، M و L بوده و مانند سایر اعضای جنس دارای توالی‌های مکمل معکوس در انتهای رشته‌های RNA خود هستند (Rotenberg et al., 2015). در انتهای کربوکسیلی RNAهای این گونه توالی AUUGCUCU بصورت حفاظت‌شده مشاهده می‌گردد (Quito-Avila et al., 2014).
 تریپس خرما که به صورت اختصاصی آفت خریزه نیز می‌باشد، MYSV را به طور پایا منتقل می‌کند. این آفت در درجه اول ویروس را در اولین سن پورگی خود اخذ کرده و آن را تا سنین بزرگسالی منتقل می‌کند. گزارشی از انتقال MYSV از طریق آلودگی خاک یا بذرها گزارش نشده است (Kato et al., 2000).

در حال حاضر، MYSV به عنوان یکی از جدی‌ترین تهدیدهای ویروسی برای تولید کدوئیان در گلخانه‌ها و کشت فضای باز شناخته شده است. هنگامی که آلودگی در اوایل فصل در مزرعه و گلخانه رخ می‌دهد، کاهش عملکرد بین ۳۰٪ تا ۶۰٪ مشاهده شده است (Kato et al., 2000).
 خیار به عنوان مهمترین میزبان برای MYSV، گزارش شده است. تحقیقات تکمیلی نشان داده است که *T. palmi* نیز نرخ رشد و باروری بالایی روی خیار نسبت به سایر کدوئیان داشته و به نوعی میزبان ترجیحی آفت محسوب می‌شود (Ghosh et al., 2020).
 مشاهده شده است در آلودگی همزمان تریپس گل مغربی (*Frankliniella occidentalis*) با MYSV و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato orthotospovirus* (TSWV)، *spotted wilt tospovirus*)، نرخ انتقال و غلظت MYSV در خیار بیشتر می‌گردد (Rotenberg et al., 2015).
 (Maris et al., 2004). همچنین، در یک گزارش همسوی دیگر مشخص گردید *F. occidentalis* آلوده به MYSV، با نرخ بالایی TSWV را به گیاهان خانواده بادنجانیان (*Solanaceae*) منتقل می‌کند (Rotenberg et al., 2015).

برخی از گزارش‌ها نشان می‌دهد، منشاء مهم و احتمالی ویروس در کشورهای شرق آسیا شامل ژاپن، چین و تایلند باشد چرا که تنوع ژنتیکی ویروس در کشورهای مذکور بالاتر است (Kato et al., 2000).
 MYSV به عنوان یک ویروس نوظهور در ایران نیز احتمال می‌رود در آینده‌ای نزدیک خسارت جدی به دلیل حضور ناقل ویروس در کشور وارد کند. این تحقیق اولین گزارش ارتوتوسپوویروس لکه زرد خریزه را در ایران ارائه می‌کند.

مواد و روش‌ها

Materials and Methods

نمونه‌برداری و نگهداری نمونه‌ها

به منظور ردیابی و شناسایی عوامل ویروسی آلوده کننده خیار در استان‌های اصفهان (شهرستان نایین)، یزد (روستای ملاباشی)، بندرعباس (منطقه قلعه قاضی)، بوشهر (اطراف شهر بوشهر) و شیراز (مرودشت) با علائم لکه‌های زرد روی برگ، موزاییک خفیف روی برگ، علائم لکه‌حلقوی شدید روی میوه و بد شکلی میوه، نمونه‌برداری از گلخانه‌های آلوده و دارای علائم ویروس در بهار و تابستان سال ۱۴۰۳ انجام گرفت. از هر گلخانه نیز یک نمونه به ظاهر سالم به عنوان نمونه کنترل منفی انتخاب شد که در آزمایشات مولکولی عاری بودن آنها از ویروس محرز شد. در این پژوهش ۵ جدایه‌ی مشکوک به آلودگی ویروسی و ۵ نمونه سالم بصورت مجزا از هر منطقه داخل ظروف پلاستیکی به مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز منتقل شدند (شکل-۱).

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA کل از نمونه‌ها با استفاده از روش روحانی و همکاران با کمی تغییرات انجام شد (Rowhani et al., 1993). در این روش ۰/۱ گرم از برگ آلوده در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج سرد پودر شد. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR) برای ردیابی ارتوتوسپوویروس‌های احتمالی از جفت آغازگرهای عمومی ویروس مبتنی بر بخشی از توالی

رمزکننده پروتئین NSs ویروس (جدول-۱) (5'-) WScon5 m - (5'-GTCAACTTTCTCAATTTGTTTCATGCATA) (WScon1p) به صورت جداگانه با ۲ تکرار برای هر جدایه‌ی جمع‌آوری شده انجام شد. انتظار می‌رفت در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با آغازگرهای فوق‌قطعه‌ای به طول ۴۲۰ نوکلئوتید ساخته شود (Kato et al., 2000) (جدول-۱). لازم به ذکر است آغازگرهای فوق بر اساس توالی بخشی از اورتوتوسپوویروس لکه‌نقره‌ای هندوانه (*Watermelon silver mottle virus*) (WSMoV)) و بر اساس توالی حفاظت شده ژن NSs دو ویروس یعنی WSMoV و MYSV طراحی شده است و کارایی بالایی در ردیابی و شناسایی جدایه‌های مختلف MYSV نشان داده است (Chen et al., 2008). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در ترموسایکلر مدل Quanta biotech Q-24 انجام شد. مرحله اول برای از بین رفتن ساختار ثانویه و اتصال اولیه آغازگرها و الگو انجام شد و مواد واکنش شامل: یک میکرولیتر RNA استخراج‌شده همراه ۱/۱ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل و ۰/۴ میکرولیتر از آغازگر معکوس (۵pmol/μl) در میکروتیوب مخلوط شده و سپس در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. در ادامه جهت اجتناب از تشکیل مجدد ساختارهای ثانویه میکروتیوب‌ها بلافاصله روی یخ منتقل شدند. سپس ۷/۵ میکرولیتر از ترکیب حاوی دو میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس (RT-buffer) X ۱/۵ میلی‌مولار، ۴۰dNTP واحد (نیم میکرولیتر)، ۲۰۰ واحد (نیم میکرولیتر) آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (M-MuLV Fermentas, Lithuania) به هر میکروتیوب اضافه شد. پس از اضافه کردن مخلوط تهیه‌شده به هر کدام از میکروتیوب‌ها، لوله‌ها مطابق با دستورالعمل به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند و سپس به دستگاه ترموسایکلر انتقال و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده ابتدا یک ساعت در ۴۲ درجه‌ی سلسیوس و سپس در ۷۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه (به‌منظور غیرفعال نمودن آنزیم نسخه‌بردار معکوس) قرار داده شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۲ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ پیکومول آغازگر و ۱/۲۵ واحد آنزیم *TaqDNA polymerase* (Fermentas, Lithuania) بود. سپس ۲/۵ میکرولیتر از cDNA ساخته‌شده (۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) در واکنش آر تی پی سی آر به این ترکیب اضافه شد.

همچنین برای بررسی احتمال آلودگی مخلوط MYSV با سایر گروه‌های آلوده‌کننده محصولات جالیزی شامل: بگوموویروس‌ها (Begomoviruses)، پوتکس ویروس‌ها (Potexviruses)، پوتی ویروس‌ها (Potyviruses) و توباموویروس‌ها (Tobamoviruses) نیز بررسی گردید. آغازگر مورد استفاده و مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آمده است.

استخراج DNA از نمونه‌ها و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای احتمال ردیابی ویروس‌های DNA دار (بگوموویروس‌ها): در این روش مقدار ۰/۲ گرم بافت برگ درون لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری با استفاده از ازت مایع به صورت پودر درآمد و مقدار ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (۲.۵% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% 2-mercaptoethanol) به بافت مورد نظر اضافه گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار گرفت و هر چند دقیقه لوله‌ها بهم زده شدند. سپس ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل (به نسبت ۲:۱) به عصاره افزوده گردید و پس از ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شدند. روشن‌ترین تشکیل شده به لوله جدیدی منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از حذف ایزوپروپانول، رسوب DNA با ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو و مطابق قبل سانتریفوژ و سپس در دستگاه تغلیظ کننده (concentrator) خشک و در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شد (Bhat & Jarret, 1995).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction, PCR): واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (شرکت Techne با مدل FTGENE2D) انجام شد. واکنش در یک حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۰ میلی‌مولار dNTPs (۰/۵ میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشتی (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۰/۷۵ میکرولیتر منیزیم کلراید ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم *Taq DNA polymerase* با غلظت ۵ واحد در هر میکرولیتر، یک میکرولیتر از DNA الگو استفاده شد و در نهایت حجم نمونه با آب دیونیزه به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. و مطابق با برنامه ذکر شده انجام شد. در پی سی آر از پروفیل حرارتی یک

چرخه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، سی و پنج چرخه متشکل از ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. به منظور ارزیابی نتایج حاصل از RT-PCR، الکتروفورز افقی در ژل آگارز ۱/۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید در بافر 0.5X TBE الکتروفورز گردید. آن گاه ۴ μl از فرآورده های RT-PCR با ۲ μl رنگ بروموفنول بلو ۶X و ۶ μl آب مقطر دیونیزه مخلوط و در چاهک ها ریخته شدند. برای دانستن اندازه ی محصولات RT-PCR، از نشانگر وزن مولکولی (*EcoRI* (1 μg/μl Lambda DNA *Hind* III+) استفاده شد. دمای اتصال هر کدام از آغازگرها در جدول ۱- آمده است.

جدول ۱- نام، توالی و موقعیت نوکلئوتیدی آغازگرهای عمومی و اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Name, sequence and nucleotide position of the degenerates and specific primers used in this research

Primer names	Primer Sequences	Virus Genus	Tm C ⁰	(bp)	References
Nib2F	5'GTTTGYGTIG AYGYTTYAAYAA				Gibbs <i>et al.</i> , 1997
Nib3R	5'CCNGTYGGIAGITGICIACAICT	Potyvirus	58	350	
TobamodF	5' TKGAYGGNGTBCCNGGNTGYGG				Li <i>et al.</i> , 2018
TobamodR	5'ACNGAVTBNABCTGTAATTGCTAT	Tobamovirus	62	880	
CMVCP-F	5'-GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA				Rizos <i>et al.</i> , 1992
CMVCP-R	5'-TCIACIACIGTIGAIGGYTGNC	Cucumovirus	57	675	
primerB ^C	5'-TGGACYTTRCAWGGBCCTTACA				Deng <i>et al.</i> , 1994
primer181 ^V	5'-TAATATTACCGWTGGCC	Begomovirus	58	550	Rojas <i>et al.</i> , 1993
Potex1	5'- CAYCARCARGCXAARGAYSA	Potexvirus			Gibbs <i>et al.</i> , 1998
Potex2	5'-TCDGTR TTDGCRTCRAADGT		59	840	
WScon1p	5'-GTCAACTTTCTCAATTTGTTCATGCATA	<i>Orthotospovirus</i>	62	420	Kato <i>et al.</i> , 2000
WScon5m	5'-CTCTTTATCATACAT(T/C)TTGAACACAAT(C/G)AC	MYSV	62	420	Kato <i>et al.</i> , 2000

انجام الکتروفورز و خالص سازی محصول PCR: برای بررسی قطعات تکثیر شده مورد نظر جدایه ها از ژل الکتروفورز ۱ درصد استفاده شد. در ژل الکتروفورز، مارکر مولکولی Gen Ruler TM DNA Ladder Mix (Fermentas) مورد استفاده قرار گرفت. قطعه تکثیر یافته مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل (QIAGEN) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده خالص سازی شد.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی: به منظور تعیین ترادف نوکلئوتیدی، قطعات تکثیرشده ی مورد نظر در پی.سی.آر. به شرکت سینوهه شیراز برای ترادف یابی ۲ طرفه ارسال گردید. برای بررسی مقدار تشابه DNA تعیین ترادف شده با توالی های موجود، ترادف های به دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST با ترادف های موجود در GenBank مقایسه شد.

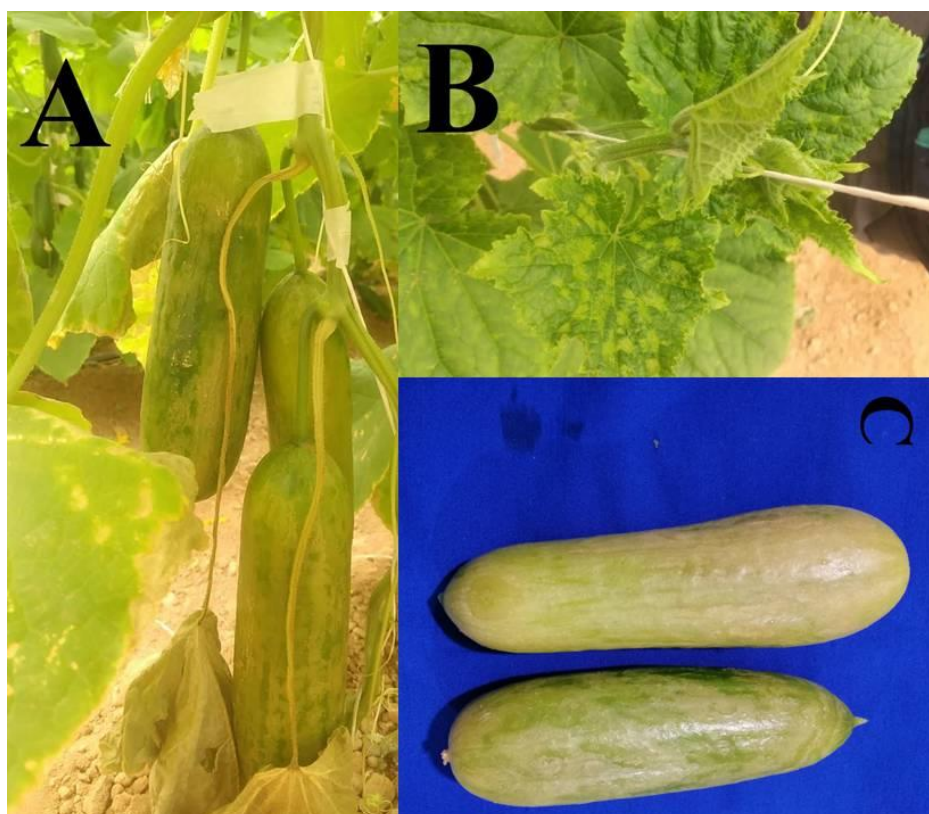
بررسی ترادف ها و ترسیم درخت تبارنما: با استفاده از نرم افزار Clustal X: Ver 3 (Sievers & Higgins, 2018) هم ردیف سازی ترادف های نوکلئوتیدی حاصل با ترادف نوکلئوتیدی جدایه های موجود در GenBank مورد مقایسه قرار گرفت و درصد تشابه آن ها با نرم افزار Megalign (Stadejek *et al.*, 2013) تعیین شد. درخت تبارنمای مربوطه توسط نرم افزار MEGA 8.0 (Tamura *et al.*, 2007) ترسیم شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مشخصات فنوتیپی بوته‌های خیار دارای علائم ویروسی

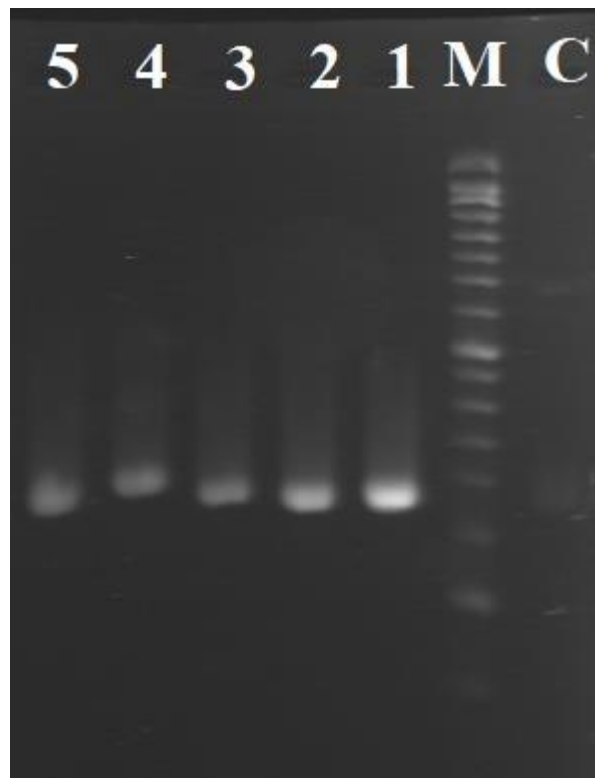
مشاهدات میدانی و جمع‌آوری نمونه‌ها از گلخانه‌های مناطق مختلف کشور نشان داد که علائم واضحی از آلودگی خیار گلخانه‌ای به توتسپوویروس‌ها وجود دارد. در نمونه‌های آلوده لکه‌های حلقوی فرورفته و سبزرده روی میوه، بدشکلی میوه، لکه‌های زرد روی برگ، موزاییک خفیف برگ، وجود تریپس خرما، بدشکلی و کوچک ماندن برگ در بوته‌های دارای علائم مشاهده گردید (شکل-۱). به دلیل تنوع علائم و برای اطمینان از عدم آلودگی مخلوط و همزمان جدایه‌ها به چندین ویروس، جدایه‌ها با آغازگرهای مربوط به خانواده‌های مهم خسارت‌زای ویروسی روی تیره کدوئیان نیز با آزمون‌های مولکولی بررسی گردید و آلودگی مخلوط در هیچ کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد.

شناسایی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی عامل ویروسی در خیار

در واکنش RT-PCR، با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی اورتوتسپوویروس‌ها (WScon1p, Wscon5m) (جدول-۲) مبتنی بر بخشی از ژن NSs پوششی قطعاتی به اندازه‌ی ۴۲۰ جفت‌باز در تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده تکثیر شدند (شکل-۲). این قطعات در نمونه‌های به ظاهر سالم تکثیر نشدند (شکل-۲)



شکل ۱- علائم مشاهده شده در گیاهان *C. sativus* آلوده به MYSV در بندرعباس (منطقه قلعه قاضی). A: علائم لکه‌حلقوی شدید و نکروز بافتی روی میوه. B: لکه‌های زرد و موزاییک روی برگ‌های خیار (شیراز، Marvdasht isolate). C: علائم واضح از چروکیدگی، بدشکلی، لکه‌های گرد و آب‌گزیده روی میوه خیار (جدایه بوشهر).
Fig 1. Symptoms in MYSV-infected *C. sativus* plants from Bandar- Abbas (Qale Ghazi region) include: A. Severe ring spots and tissue necrosis on fruit. B. Yellow spots and mosaic on *C. sativus* leaves (Shiraz, Marvdasht isolate). C. Noticeable shriveling, deformity, and water-soaked spots on *C. sativus* fruits (Bushehr isolate).



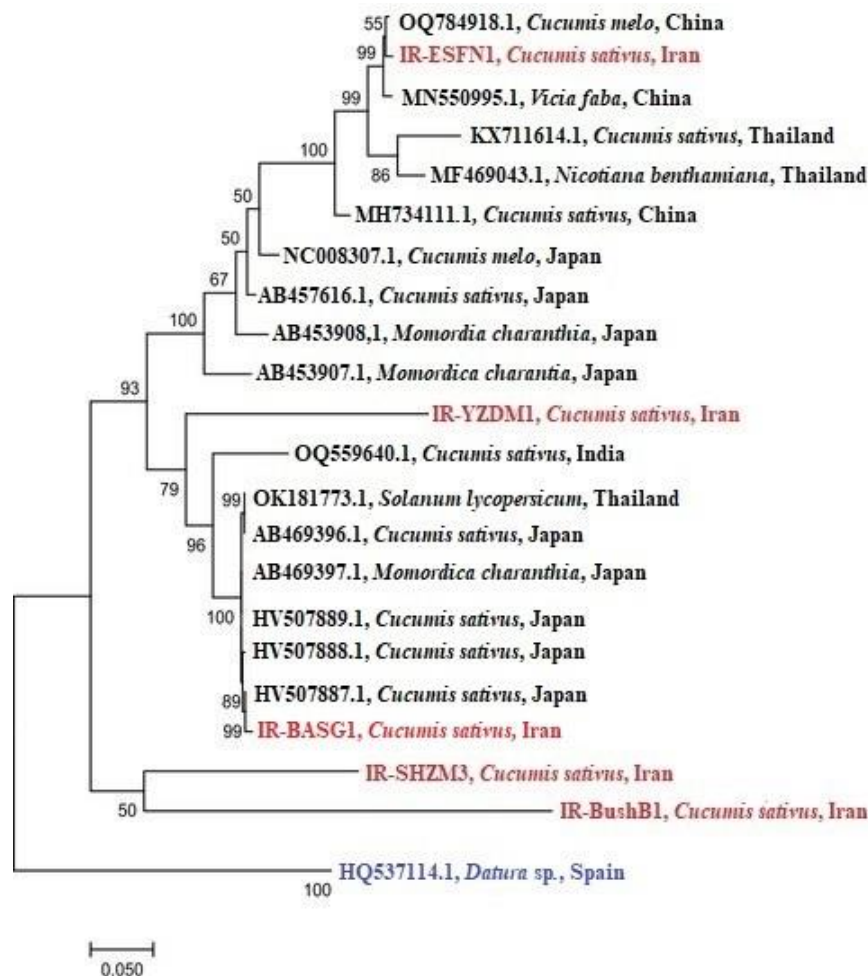
شکل ۲- نتایج آزمون RT-PCR در ژل آگارز ۱٪ شامل نمونه‌های آلوده به MYSV از گیاه خیار، ۲ نمونه به‌عنوان شاهد منفی (نمونه‌های به ظاهر سالم جمع‌آوری شده از گلخانه) در نظر گرفته شد (چاهک‌های C-). در جدایه‌های آلوده قطعاتی به طول ۴۲۰ جفت باز تکثیر شد.

Fig 2. The results of RT-PCR test on 1% agarose gel including samples infected with MYSV from *Cucumis sativus* plant, 2 samples were considered as negative controls (apparently healthy samples collected from the field) (C-). Fragments measuring 420 bp were amplified in the infected isolates.

از هر استان به‌عنوان نماینده برای توالی‌یابی به شرکت سینوهه شیراز ارسال گردید. هم ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی مرتبط با بخشی از ژن NSs نشان داد که بیشتر جدایه‌های ایرانی بیشترین شباهت را به جدایه‌های آسیایی MYSV دارند. بر این اساس، جدایه IR-ESFN1 بیشترین شباهت (۹۸/۱٪) را به جدایه MYSV از کشور چین (AC: OQ_784918.1)؛ جدایه HNTG: میزبان: *Cucumis melo*، جدایه IR-YZDM1 بیشترین شباهت (۹۸/۶٪) به جدایه MYSV از کشور هند (AC: OQ_559640.1)؛ جدایه IN: Kar: Cucumber (جدایه 21 میزبان: *Cucumis sativus*)، جدایه IR-BASG1 بیشترین شباهت (۹۸/۹٪) به جدایه MYSV از کشور ژاپن (AC: HV_507887.1)؛ جدایه JP201155903-A/3: میزبان: *Cucumis sativus*) و جدایه‌های IR-SHZM3 و IR-BUSHB1 در کنار هم در یک خوشه در نزدیکی جدایه بندرعباس و جدایه‌های آسیایی قرار گرفتند (شکل-۳).

بحث: با آنکه شرایط قرنطینه‌ای در کشور ما رعایت می‌گردد و بر ورود و خروج مواد گیاهی بخصوص در زمینه صادرات و واردات گیاهان جالیزی کنترل قابل‌توجهی وجود دارد ولی شناسایی عوامل ویروسی و ناقلین آنها احتیاج به دستگاه‌های شناسایی دقیق در محل ورود و خروج سبزیجات و جالیز در محل قرنطینه دارد. از طرف دیگر شرایط قرنطینه بین استانی و بین گلخانه‌ها کمتر مورد توجه بوده و نظارت کمتری بر روی آنها وجود دارد. وجود ناقلین ویروس‌های بیمارگر گیاهی و مقاومت این آفات به سموم متنوع مشکل را چند برابر کرده است. در نتیجه خطر وقوع و گسترش این بیماری‌های نوظهور و صعب‌العلاج بسیار اهمیت پیدا می‌نماید. با توجه به اینکه در زمینه بررسی پراکنش عوامل بیماری‌زای ویروسی نوظهور و بخصوص روی سبزیجات آمار مدونی از میزان شیوع و خسارت این عوامل بصورت جامع در دسترس نیست، بنابراین اولین قدم در این زمینه ردیابی و شناسایی این عوامل بر روی محصولات کشاورزی مهم، علف‌های هرز و ناقلین احتمالی آنها ضروری بنظر می‌رسد. چرا که مهمترین اقدام

برای کاهش بیمارگرهای ویروسی در گیاهان در قدم نخست شناخت عامل ویروسی، نحوه انتقال و دامنه میزبانی آن می باشد (Salehzadeh, 2018). بر این اساس و بدلیل اهمیت کشت وسیع گیاهان جالیزی در کشور و همچنین بروز و مشاهده علائم مشکوک به اینگونه عوامل بیماریزا در روی گیاهان جالیزی، نمونه برداری مذکور جهت تشخیص و بررسی ویژگی های بیماری (های) ویروسی در روی گیاهان خیار گلخانه ای در ۵ استان مرکزی و جنوبی بنا به درخواست گلخانه داران انجام شد. نتایج این تحقیقات دارای اهمیت بالایی است چرا که، بر اساس اطلاعات ما این اولین گزارش از همراهی ویروس لکه زرد خربزه با خیار در ایران می باشد.



شکل ۳- ترسیم درخت تبارنما بر اساس مقایسه قطعه ۴۲۰ جفت بازی مرتبط با بخشی از ژن پروتئین NSs جدایه های ایرانی ویروس MYSV در مقایسه با توالی های مشابه مربوط به ۱۶ جدایه مختلف ثبت شده در GenBank ترسیم شد. برای ترسیم درخت تبارنما از روش حداکثر بهینگی (Maximum likelihood) با نرم افزار MEGA 8.0 استفاده شد. یک جدایه از ویروس پژمردگی خالدار گوجه فرنگی از اسپانیا (AC: HQ_537114.1) نیز به عنوان گونه گروه خارجی (Out Group) در نظر گرفته شد. شاخه هایی با بوت استرپ کمتر از ۵۰ درصد حذف شدند. در درخت تبارنما اطلاعات مربوط به هر جدایه، رستمار مربوطه، میزبان و خاستگاه جغرافیایی جدایه ها مشخص شده است.

Fig 3. A phylogenetic tree was constructed using a 420 bp fragment from the NSs protein gene of Iranian MYSV isolates, compared to sequences from 16 different GenBank isolates. The maximum likelihood method in MEGA 8.0 was employed for this analysis, with a Tomato spotted wilt virus isolate from Spain (AC: HQ_537114.1) included as an outgroup. Branches with bootstrap values below 50% were excluded. The tree displays information on each isolate, including accession number, host, and geographic origin.

MYSV تقریباً در تمامی گلخانه های مورد بازدید با آزمایشات مولکولی در گیاهان دارای علائم ردیابی و شناسایی شد. به دلیل اهمیت وجود ویروس در کشور، احتمال آلودگی مخلوط نمونه ها با سایر ویروس های متعلقه خانواده های مهم ویروسی و احتمال ناشی شدن علائم،

مخصوصاً علائم زردی توسط ویروس‌ها این نمونه‌ها با سایر ویروس‌ها با استفاده از آغازگرهای دژنره و اختصاصی خانواده‌های مهم ویروسی بررسی شد که نتیجه‌ای در پی نداشت. بررسی آلودگی‌های مخلوط مهم است چرا که احتمال هم‌افزایی بین ویروس‌ها و افزایش خسارت ویروسی را بالا می‌برد (Salehzadeh et al., 2024; Salehzadeh et al., 2018). در ادامه واکاوی تبارشناسی جدایه‌های ایرانی نشان داد موقعیت بعضی از جدایه‌های ایرانی در بین سایر جدایه‌ها متمایز است و این مساله احتمالاً بدلیل ورود ویروس به کشور و تغییرات نوکلئوتیدی در توالی آن در اثر جهش، حذف و ... باشد. در حالت کلی جدایه‌های ایرانی بیشترین شباهت را بیشتر به جدایه‌های مختلف از کشورهای همسایه و آسیایی دارند. درخت تبارنما نشان داد توزیع جغرافیایی جدایه‌ها با هم هم‌خوانی نسبی داشته و قرابت فیلوژنتیکی یا هم‌گروه شدن بعضی از جدایه‌های ایرانی با جدایه‌هایی از مناطق مختلف آسیا که در بعضی از شاخه‌ها دیده می‌شود هماهنگی توزیع جغرافیایی جدایه‌های ایرانی را با جدایه‌های آسیایی نمایان می‌کند (Takeuchi et al., 2001). این توزیع همچنین نشان می‌دهد که انتشار جهانی و گسترده ویروس مذکور نمی‌تواند تنها به وسیله ناقلین طبیعی صورت گیرد و این مسئله احتمال دخالت انسان و به بیان دیگر انتشار و تجارت جهانی قلمه و نهال را تقویت می‌کند. نکته دیگری که بایستی در مورد تنوع جدایه‌های ایرانی بیان کرد این است که این احتمال وجود دارد که جدایه‌های ویروسی موجود در گلخانه‌های مناطق جنوبی و مرکزی کشور و وجود جدایه‌های متنوع ایرانی نیز احتمالاً ورود چندباره ویروس به کشور از طریق نهاده‌ها یا اکوتیپ‌های مختلفی از ناقلین را تایید می‌کند (Salehzadeh et al., 2022). شناسایی MYSV در گیاهان *C. sativus* در ایران نشان دهنده اولین گزارش این ویروس در ایران است. با توجه به اهمیت اقتصادی گیاهان گلخانه‌ای و قابلیت ویروس‌های نوظهور برای گسترش و خسارت سریع و تأثیرگذاری بر تولید در کشور، تحقیقات بعدی در جهت مناطق گسترش ویروس، تنوع ژنتیکی جدایه‌ها، همه‌گیری ویروس و میزان خسارت MYSV را روی محصولات مهم دیگر ضروری می‌کند. برای نتیجه‌گیری بهتر احتمال بررسی ناقلین و گیاهان مخزن دیگر از مناطق مختلف کشور و از روی گیاهان دیگر نیز ضروری به نظر می‌رسد. این موضوع می‌تواند تهدید جدی برای تولید خیار و سایر کدوئیان و حتی سایر محصولات کشاورزی در سراسر کشور باشد. با توجه به گسترش ویروس‌ها روی گیاهان مختلف در ایران، پیش‌بینی می‌شود که این عامل بیماری‌زا ناقل یا ناقلین حشره‌ای موثر در منطقه نیز داشته‌اند. در همین راستا مطالعه روی ناقلین و ارائه روش‌های مناسب برای مقابله با این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین، در مناطق مورد بررسی امکان حضور سایر ویروس‌های مربوط به گروه‌های مختلف بر روی محصولات مختلف ضروری به نظر می‌رسد، که نیازمند تحقیقات بیشتر برای دستیابی به این مهم می‌باشد تا با تخمین پراکنش ویروس‌ها بر روی محصولات مختلف اقدامات لازم جهت کاهش خسارت برنامه‌ریزی گردد.

References

منابع

- Bald-Blume, N., Bergervoet, J. H., & Maiss, E. (2017). Development of a molecular assay for the general detection of tospoviruses and the distinction between tospoviral species. *Archives of virology*, 162, 1519-1528. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3256-x>.
- Chen, T. C., Lu, Y. Y., Cheng, Y. H., Chang, C. A., & Yeh, S. D. (2008). Melon yellow spot virus in watermelon: a first record from Taiwan. *Plant Pathology*, 57(4), 765. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01791.x>.
- Deng, D., McGrath, P. F., Robinson, D. J., & Harrison, B. D. (1994). Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of applied Biology*, 125(2), 327-336. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1994.tb04973.x>.
- Gibbs, A., & Mackenzie, A. (1997). A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 63(1-2), 9-16. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(96\)02103-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(96)02103-9).
- Gholizadeh-Roshanagh, S., Nourinejad Zarghani, S., Aminian, H., Jafari, M., & Ramshini, H. (2017). Imported infected cucurbit seeds provoked the establishment and spread of central Europe isolates of Zucchini yellow mosaic virus in Varamin (Sothern Tehran, Iran). *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 5(2), 91-99. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.25885073.1395.5.2.10.7>.
- Iwaki, M., Honda, Y., Hanada, K., Tochiara, H., Yonaha, T., Hokama, K., & Yokoyama, T. (1984). Silver mottle disease of watermelon caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Disease*, 68(11), 1006-1008. DOI: 10.1094/PD-68-1006.

- Jensen, S. E. (2000). Insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Integrated Pest Management Reviews*, 5(2), 131-146. <https://doi.org/10.1023/A:1009600426262>.
- Kato, K., Handa, K., & Kameya-Iwaki, M. (2000). Melon yellow spot virus: a distinct species of the genus *Tospovirus* isolated from melon. *Phytopathology*, 90(4), 422-426. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.4.422>.
- Ghosh, A., Jagdale, S. S., Basavaraj, Dietzgen, R. G., & Jain, R. K. (2020). Genetics of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Pest Science*, 93, 27-39. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01160-2>.
- Li, Y., Tan, G., Lan, P., Zhang, A., Liu, Y., Li, R., & Li, F. (2018). Detection of tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. *Journal of Virological Methods*, 259, 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.012>.
- Stadejek, T., Stankevicius, A., Murtaugh, M. P., & Oleksiewicz, M. B. (2013). Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. *Veterinary microbiology*, 165(1-2), 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.029>.
- Maris, P. C., Joosten, N. N., Goldbach, R. W., & Peters, D. (2004). Tomato spotted wilt virus infection improves host suitability for its vector *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology*, 94(7), 706-711. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.7.706>.
- McLeish, M. J., Zamfir, A. D., Babalola, B. M., Peláez, A., Fraile, A., & García-Arenal, F. (2022). Metagenomics show high spatiotemporal virus diversity and ecological compartmentalisation: Virus infections of melon, *Cucumis melo*, crops, and adjacent wild communities. *Virus Evolution*, 8(2), 1-16. <https://doi.org/10.1093/ve/veac095>.
- Quito-Avila, D. F., Peralta, E. L., Martin, R. R., Ibarra, M. A., Alvarez, R. A., Mendoza, A., & Ochoa, J. (2014). Detection and occurrence of melon yellow spot virus in Ecuador: an emerging threat to cucumber production in the region. *European journal of plant pathology*, 140, 193-197. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0454-1>.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., & Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, 77(4), 340-347. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-77-0340>.
- Rotenberg, D., Jacobson, A. L., Schneeweis, D. J., & Whitfield, A. E. (2015). Thrips transmission of tospoviruses. *Current opinion in virology*, 15, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.003>.
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science*, 27(1), 135-145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>.
- Salehzadeh M., Afsharifar A., Dehghanpour Farashah S. and Rezaei M. 2022. The first report of the Chilli leaf curl virus and its beta satellite from bell peppers and tomatoes from the central provinces of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 57(4), 337-341. <https://doi.org/10.22034/ijpp.2022.549473.384>.
- Salehzadeh M., Afsharifar A., deghanpour farashah S., and rezaei., 2021. The first report of mild pepper mild mottle virus in mixed infection with Tomato brown rugose fruit virus from pepper in Isfahan province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 57(3), 263-267. doi: 10.22034/ijpp.2022.549587.385.
- Salehzadeh M., Afsharifar A., & deghanpour farashah S. 2024. The First Report of Alfalfa mosaic virus Occurrence on Pepper and Tomato Crops Based on Partial Nucleotide Sequence analysis of the Virus Coat Protein Open Reading Frame from Hormozgan Province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 59(1), 64-68. doi: 10.22034/IJPP.2024.2021784.441.
- Salehzadeh, M. (2018). Survey on presence of Cucumber mosaic virus (CMV) in single and mixed infections with potyviruses in North-West of Iran. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 7(2), 163-173. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.25885073.1397.7.2.4.5>.
- Tajik Khademi, H., Khodadadi, M., Hassanpanah, D., & Hajainfar, R. (2024). Changes in fruit yield, biochemical attributes, and leaf minerals of different cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars under foliar application of silicon nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(29), 42012-42022. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33890-x>.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1596-1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
- Takeuchi, S., Okuda, M., Hanada, K., Kawada, Y., & Kameya, M. (2001). Spotted wilt disease of cucumber (*Cucumis sativus*) caused by Melon yellow spot virus. *Japanese Journal of Phytopathology*, 67(1), 46-51. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.67.46>.
- Takeuchi, S., Shimomoto, Y., & Ishikawa, K. (2009). First report of Melon yellow spot virus infecting balsam pear (*Momordica charantia* L.) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 75(2), 154-156. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0143-7>.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596-1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
- Wu, H., Liu, M., Li, W., Wang, M., Xiu, J., Peng, B., & Gu, Q. (2024). Development and Application of Droplet Digital PCR Assay for the Detection of Watermelon Silver Mottle Virus and Melon Yellow Spot Virus. *Horticulturae*, 10(3), 1-11. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10030199>.