مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 online الکترونیکی
دوره ۱۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۳
صفحه ۲۳۴-۲۲۵

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2025
Volume 13, Number 2, Pages: 225-234

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

10.61882/gebsj.13.2.3

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 افشاریفر

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

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email
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 orthotospoviruses, total genomic RNA was extracted from five independent isolates from each area, along with an asymptomatic negative control, confirmed free of orthotospoviruses through molecular analysis. RT-PCR using degenerate primer pairs targeted orthotospoviruses, 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, Orthotospovirus, Genetic diversity, Melon yellow spot virus.

چکیده

Citation رفرانس دهی این مقاله

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
URL: http://gebsj.ir/article-1-511-en.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.3]

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 سبزرد روی میوه گیاهان خیار کشت‌شده مشاهده شد. برای ارزیابی آلودگی جدایه‌ها به ارتوتوسپوویروس‌ها، RNA ژنومی کل (از هر منطقه ۵ جدایه مستقل) به‌صورت جداگانه استخراج و یک جدایه بدون علامت نیز به‌عنوان شاهد منفی انتخاب شد. نمونه‌های RNA استخراج‌شده 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 توباموویروس‌ها، پوتکس‌ویروس‌ها، بگوموویروس‌ها و پوتی‌ویروس‌ها 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، اورتوسپوویروس، 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 سالیانه 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 (*Orthotospovirus meloflavi, Melon yellow spot orthotospovirus*, MYSV)، برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ در ژاپن شناسایی شد و باعث ایجاد علائم پژمردگی لکه‌ای و سبزردی 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 علاوه‌بر 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 stechusriaace*n)، پنیرک 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.3]

al., 2014). MYSV روی خانواده کدوئیان باعث ایجاد لکه‌های سبزرد، لکه‌های موزاییکی، حلقوی، زرد و نکروز روی میوه می‌شود. این علائم منجربه کاهش کیفیت میوه و کاهش قابل‌توجهی در عملکرد میوه می‌گردد.

MYSV مانند سایر اعضای جنس توسپوویروس‌ها دارای یک پوشش شبه‌کروی، با ۳ قطعه RNA رشته‌ای حلقوی، با نام‌های M، S و L بوده و مانند سایر اعضاء 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 به‌صورت اختصاصی آفت خربزه نیز می‌باشد، MYSV را به‌طور 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 به‌عنوان 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 بین۳۰٪ تا ٦۰٪ 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 spotted wilt tospovirus* (TSWV), *orthotospovirus*)، 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 به‌عنوان یک ویروس نوظهور در ایران نیز احتمال می‌رود در آینده‌ای نزدیک خسارت جدی به‌دلیل حضور ناقل ویروس در کشور وارد کند. این تحقیق اولین گزارش ارتوتوسپوویروس لکه زرد خربزه را در ایران ارائه می کند.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

نمونه‌برداری و نگهداری نمونه‌ها

به‌منظور 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 علایم لکه‌های زرد روی برگ، موزاییک خفیف روی برگ، علایم لکه‌حلقوی شدید روی میوه و بد شکلی میوه، نمونه‌برداری از گلخانه‌های آلوده و دارای علایم ویروس در بهار و تابستان سال ۱٤۰۳ انجام گرفت. از هر گلخانه نیز یک نمونه به ظاهر سالم به‌عنوان نمونه کنترل منفی انتخاب شد که در آزمایشات مولکولی عاری‌بودن 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 پلیمراز معکوس (RT-PCR) برای ردیابی ارتوتوسپوویروس‌های احتمالی از جفت آغازگرهای عمومی ویروس مبتنی‌بر بخشی از توالی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.3]

رمزکننده پروتئین NSs ویروس (جدول-۱) (WScon1p (5′-GTCAACTTTCTCAATTTGTTCATGCATA) - WScon5 m (5′-CTCTTTATCATACAT(T/C)TTGAACACAAT(C/G)AC) به‌صورت جداگانه با ۲ تکرار برای هر جدایه‌ی جمع‌آوری شده انجام شد. انتظار می‌رفت در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با آغازگرهای فوق قطعه‌ای به طول ٤٢٠ 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 ۰/٤ میکرولیتر از آغازگر معکوس (۵pmol/µl) در میکروتیوب مخلوط شده و سپس در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به‌مدت 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، ٤٠dNTP واحد RNasin (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 به‌مدت 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 ٤٢ درجه‌ی سلسیوس و سپس در۷۰ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت 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 *Taq*DNA polymerase (Fermentas, Lithuania) بود. سپس ۲/۵ میکرولیتر از cDNA ساخته‌شده (۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) در واکنش آرتی پی‌سی‌آر به این ترکیب اضافه شد.

همچنین برای بررسی احتمال آلودگی مخلوط MYSV با سایر گروه‌های آلوده‌کننده محصولات جالیزی شامل: بگوموویروس‌ها (Begomoviruses)، پوتکس‌ویروس‌ها (Potexviruses)، پوتی‌ویروس‌ها (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 DNAدار (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 (2.5% 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 به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٦٥°C قرار گرفت و هر چند دقیقه لوله‌ها بهم زده شدند. سپس ٦۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوآمیل الکل (به نسبت ٢٤: ۱) به عصاره افزوده گردید و پس از ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شدند. رونشین تشکیل شده به لوله جدیدی منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد و به‌مدت 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 منیزیم‌کلراید ۵۰ میلی-مولار، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم *Taq* DNA polymerase با غلظت ۵ واحد در هر میکرولیتر، یک میکرولیتر از DNA الگو استفاده شد و درنهایت 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.3]

چرخه ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، سی و پنج چرخه متشکل از ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت 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 ٤µl از فرآورده‌های RT-PCR با ۲µlرنگ برومونول بلو ٦X و ٦µl آب مقطر دیونیزه مخلوط و در چاهک‌ها ریخته شدند. برای دانستن اندازه‌ی محصولات RT-PCR، از نشانگر وزن مولکولی (+*Hind* III *Eco*RI (1 µg/µl Lambda DNA 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 *et al*., 1997
Nib3R	5'CCNGTYGGIAGITGICIACAICT	Potyvirus	58	350	
TobamodF	5' TKGAYGGNGTBCCNGGNTGYGG				Li *et al*., 2018
TobamodR	5'ACNGAVTBNABCTGTAATTGCTAT	Tobamovirus	62	880	
CMVCP-F	5'-GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA				Rizos *et al*., 1992
CMVCP-R	5'-TCIACIACIGTIGAIGGYTGNCC	Cucumovirus	57	675	
primerB^C	5'-TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA				Deng *et al*., 1994
primer181^V	5'-TAATATTACCGGWTGGCC	Begomovirus	58	550	Rojas *et al*., 1993
Potex1	5′- CAYCARCARGCXAARGAYSA	Potexvirus			Gibbs *et al*., 1998
Potex2	5′-TCDGTR TTDGCRTCRAADGT		59	840	
WScon1p	5′-GTCAACTTTCTCAATTTGTTCATGCATA	*Orthotospovirus*	62	420	Kato et al., 2000
Wscon5m	5′-CTCTTTATCATACAT(T/C)TTGAACACAAT(C/G)AC	MYSV	62	420	Kato et al., 2000

انجام الکتروفورز و خالص سازی محصول PCR : برای بررسی قطعات تکثیر شده مورد نظر جدایه‌ها 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 خالص‌سازی شد.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی : به‌منظور تعیین ترادف نوکلئوتیدی، قطعات تکثیرشده‌ی مورد نظر در پی.سی.آر. به شرکت سینوهه شیراز برای ترادف‌یابی ۲ طرفه ارسال گردید. برای بررسی مقدار تشابه DNA تعیین ترادف شده با توالی‌های موجود، ترادف‌های به‌دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST با ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه شد.

بررسی ترادف‌ها و ترسیم درخت تبارنما: با استفاده از نرم‌افزار Clustal X: Ver 3 (Sievers & Higgins, 2018) هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های نوکلئوتیدی حاصل با ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های موجود در GenBank مورد مقایسه قرار گرفت و درصد تشابه آن‌ها با نرم‌افزار Megalign(Stadejek et al., 2013) تعیین شد. درخت تبارنمای مربوطه توسط نرم‌افزار MEGA 8.0 (Tamura et al., 2007) ترسیم شد و مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.3]

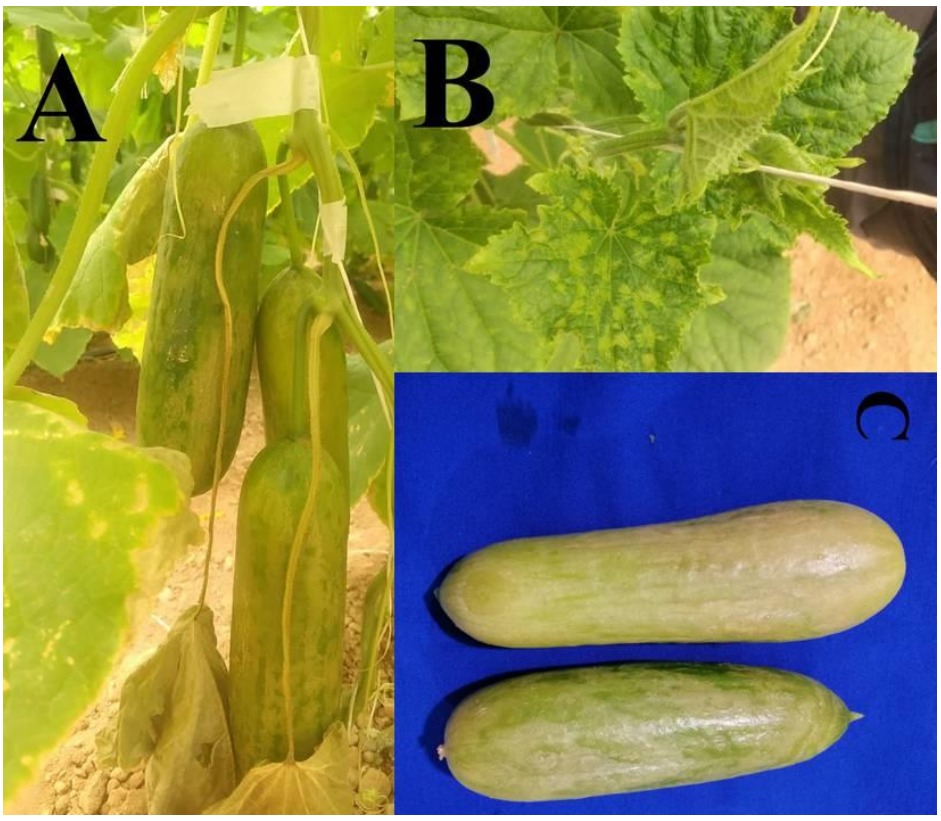
نتایج و بحث
Results and Discussion

مشخصات فنوتیپی بوته‌های خیار دارای علائم ویروسی

مشاهدات میدانی و جمع‌آوری نمونه‌ها از گلخانه‌های مناطق مختلف کشور نشان داد که علایم واضحی از آلودگی خیار گلخانه‌ای به توسپوویروس‌ها وجود دارد. در نمونه‌های آلوده لکه‌های حلقوی فرورفته و سبزرد روی میوه، بدشکلی میوه، لکه‌های زرد روی برگ، موزاییک خفیف برگ، وجود تریپس خرما، بدشکلی و کوچک ماندن برگ در بوته‌های دارای علایم مشاهده گردید (شکل-۱). به‌دلیل تنوع علایم 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

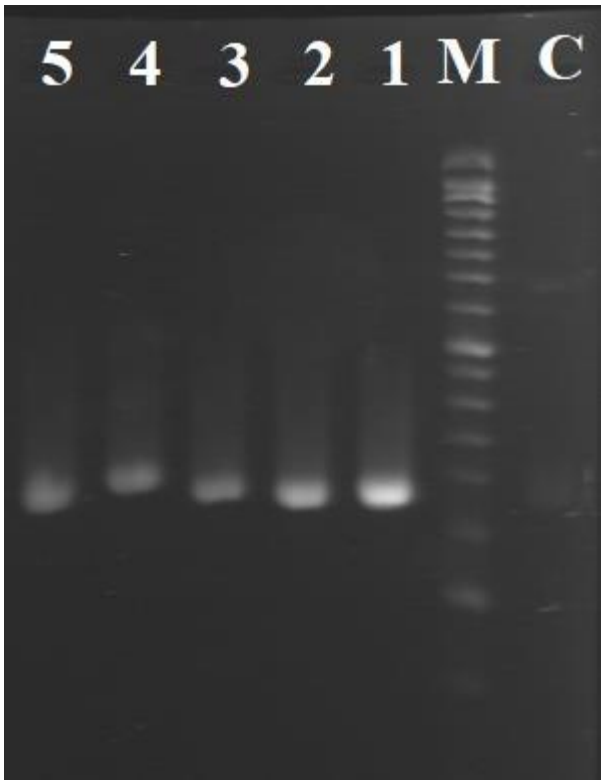
در واکنش RT-PCR، با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی اورتوتوسپوویروس‌ها (WScon1p, Wscon5m) (جدول- ۲) مبتنی‌بر بخشی از ژن NSs پوششی قطعاتی به اندازه‌ی ٤٢٠ جفت‌باز در تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده تکثیر شدند (شکل-۲). این قطعات در نمونه‌های به ظاهر سالم تکثیر نشدند (شکل -۲)



شکل ۱- علائم مشاهده شده در گیاهان *C. sativus* آلوده به MYSV در بندرعباس (منطقه قلعه قاضی). A: علایم لکه‌حلقوی شدید و نکروز بافتی روی میوه. B: لکه‌های زرد و موزاییک روی برگ‌های خیار (شیراز، جدایه مرودشت). C: علایم 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).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.3]



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 ٤٢٠ جفت باز تکثیر شد.

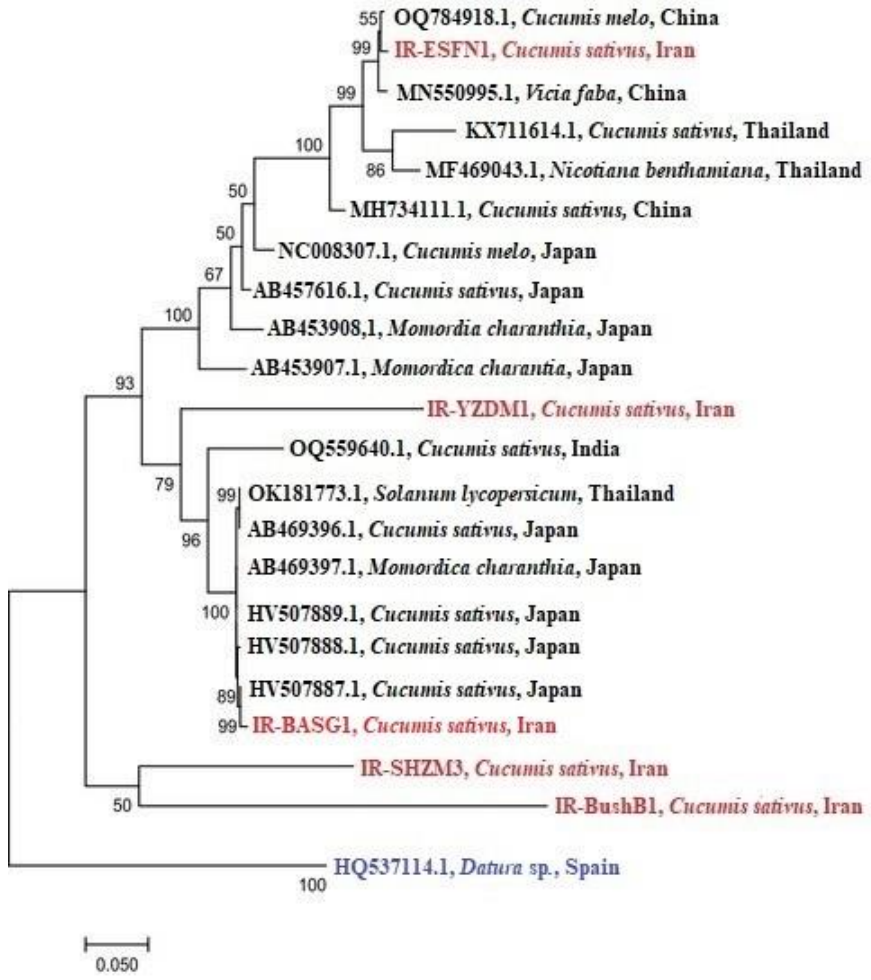
Fig 2. The results of RT-PCR test on 1% agarose gel including samples infected with MYSV from *Cucumis sativus* plant, 2 samples were considered as negative controls (apparently healthy samples collected from the field) (C-). Fragments measuring 420 bp were amplified in the infected isolates.

از هر استان بعنوان 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 (۹۸/٦٪) به جدایه MYSV از کشور هند (AC: OQ_559640.1) ؛ جدایه IN: Kar: Cucumber: 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.3]

برای کاهش بیمارگرهای ویروسی در گیاهان در قدم نخست شناخت عامل ویروسی، نحوه‌ی انتقال و دامنه میزبانی آن می‌باشد (Salehzadeh, 2018). بر این اساس و بدلیل اهمیت کشت وسیع گیاهان جالیزی در کشور و همچنین بروز و مشاهده علایم مشکوک به اینگونه عوامل بیماریزا در روی گیاهان جالیزی، نمونه‌برداری مذکور جهت تشخیص و بررسی ویژگی‌های بیماری(های) ویروسی در روی گیاهان خیار گلخانه‌ای در ۵ استان مرکزی و جنوبی بنا به درخواست گلخانه‌داران 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 می‌باشد.



شکل ۳- ترسیم درخت تبارنما بر اساس مقایسه قطعه ٤٢٠ جفت بازی مرتبط با بخشی از ژن پروتئین NSs جدایه‌های ایرانی ویروس MYSV در مقایسه با توالی‌های مشابه مربوط به ١٦ جدایه مختلف ثبت شده در GenBank ترسیم شد. برای ترسیم درخت تبارنما از روش حداکثر بهینگی (Maximum likelihood) با نرم‌افزار MEGA 8.0استفاده شد. یک جدایه از ویروس پژمردگی خالدار گوجه‌فرنگی از اسپانیا (AC: HQ_537114.1) نیز به‌عنوان گونه گروه خارجی (Out Group) در نظر گرفته شد. شاخه‌هایی با بوت‌استرپ کمتر از ۵۰ درصد حذف شدند. در درخت تبارنما اطلاعات مربوط به هر جدایه، رسشمار مربوطه، میزبان و خاستگاه جغرافیایی جدایه‌ها 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 تقریبا در تمامی گلخانه‌های مورد بازدیـد با آزمایشات مولکولی در گیاهان دارای علائم ردیابی و شناسایی شد. به‌دلیل اهمیت وجود ویروس در کشور، احتمال آلودگی مخلوط نمونه‌ها با سایر ویروس‌های متعلق‌به خانواده‌های مهم ویروسی و احتمال ناشی شدن علایم،

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.3]

مخصوصا علایم 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 آلودگی های مخلوط مهم است چرا که احتمال هم افزایی 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 احتمالا 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 جدایه های 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 به‌وسیله 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 احتمالا ورود چندباره ویروس به کشور از طریق نهاده ها یا اکوتیپ‌های مختلفی از ناقلین را تایید می‌کند (Salehzadeh et al., 2022). شناسایی MYSVدر 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.

منابع References

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.

Gholizadeh-Roshanagh, S., Nourinejhad 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., Tochihara, 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.3]

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 cucurbit 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., Schneweis, 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., dehghanpour 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., & dehghanpour 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.3]