

Molecular Detection and Phylogenetic Relationship Analysis of ToLCPMV Isolates from Cucumber Fields and Greenhouses in Khouzestan Province

Parivash Baharvand¹ , Samira Pakbaz^{2✉} , Ehsan Hasanvand³ , Reza Almasi⁴ 

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran. E-mail: baharvand.par@fa.lu.ac.ir

2. **Corresponding author**, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran. E-mail: pakbaz.s@lu.ac.ir

3. Qazvin Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Qazvin, Iran. E-mail: e.hasanvand@areeo.ac.ir

4. Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran. E-mail: ralmasi@malayeru.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received 02 February 2026
Received in revised form 24 May 2026
Accepted 17 July 2026
Available online 22 September 2026

Keywords:

Begomovirus,
Cucurbits,
Genetic diversity,
Iran,
Phylogeny

ABSTRACT

Objective: *Tomato leaf curl Palampur virus* (ToLCPMV) is a destructive *Begomovirus* with a bipartite genome that has recently been reported from Iran, and its only vector is *Bemisia tabaci*. Despite reports of ToLCPMV in certain Iranian provinces, there is currently no information regarding the presence and genetic diversity of this virus in cucumber fields and greenhouses in Khouzestan province. Therefore, this study aims to detect ToLCPMV and determine the phylogenetic relationships of its isolates in this region.

Method: To detect and investigate the genetic diversity of ToLCPMV, suspected plants were sampled in spring and summer 2023. Using the degenerate primers specific to whitefly-transmitted *Begomoviruses*, a fragment related to the pre-coat protein gene was amplified. To study the viral species more precisely and confirm their nature, the sequence of the movement protein gene was amplified, and a phylogenetic tree was constructed. Additionally, a comparison matrix of sequences was drawn along with the sequences received from GeneBank.

Results: The amplification of the studied genes indicated infection with *Begomoviruses*. Analysis of sequences and determination of relationships based on two gene regions (Genious Prime software) showed that the Andimeshk, Dezful, and Sough isolates were placed in the Iranian isolate group and had the highest genetic similarity to the Jiroft isolates on the cucumber host. Also, the results of SDT showed the three mentioned isolates have a high similarity at the nucleotide level and showed the highest similarity at the nucleotide sequence level with isolate FJ660426.1 (cucumber, Jiroft with 96.39%), isolate FJ660435.1 (cucumber, Jiroft with 98.30%), and isolate OP810507.1 (tomato, Iraq with 98.87%), respectively.

Conclusions: This is the first report of the widespread occurrence of ToLCPMV in cucumber-cultivating areas in the north of Khouzestan province. Given the widespread distribution and extensive damage of this *Begomovirus* in cucumber farms in Khouzestan, it appears it is rapidly advancing on host crops in the western and southern regions of the country and, if not managed, will cause irreparable damage to the hosts of this virus in the coming years.

Cite this article: Baharvand, P., Pakbaz, S., Hasanvand, E & Almasi, R. (2026). Molecular Detection and Phylogenetic Relationship Analysis of ToLCPMV Isolates from Cucumber Fields and Greenhouses in Khouzestan Province. *Nova Biologica Reperta*, 13 (2), 1-20. <https://doi.org/10.22034/nbr.2026.11737>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22034/nbr.2026.11737>

Publisher: Kharazmi University.

Introduction

Cucurbits (*Cucurbitaceae*), particularly cucumber (*Cucumis sativus* L.), are cornerstone crops in both greenhouse and open-field agriculture in Iran, owing to their adaptability to diverse climatic conditions and high nutritional value (Brandenberger et al., 2021). However, the production of this crop is continuously challenged by major biotic stressors, among which viral diseases are the most significant, leading to substantial yield losses and deterioration of product quality. Among these, members of the *Geminiviridae* family, specifically the *Tomato leaf curl palampur virus* (ToLCPMV), are recognized as one of the most destructive constraints on crop production in tropical and subtropical regions. This virus, a member of the genus *Begomovirus*, possesses a bipartite genome (DNA-A and DNA-B) and is rapidly disseminated in the field by the whitefly *B. tabaci*, a highly efficient and polyphagous vector. The rapid evolution and spread of this virus in recent decades have been directly linked to climate change and the increase in vector populations (Heydarnejad et al., 2013). By inducing severe symptoms such as leaf curling, significant stunting, chlorosis (mosaic and yellowing), and physiological disturbances, ToLCPMV causes dramatic yield reduction and loss of fruit quality (Abkhoo and Mehraban, 2020). Although ToLCPMV has been previously reported from Kerman, Hormozgan, Fars, and Sistan and Baluchestan provinces—with estimated crop losses reaching up to 100% in some regions (Heydarnejad et al., 2009)—there is a lack of documented, precise information regarding its presence, distribution, and molecular characteristics in the cucumber fields and greenhouses of Khouzestan province. Given that Khouzestan is a major hub for cucumber production in the country, the infiltration and spread of this viral agent could pose a serious threat to regional production security. Furthermore, the phylogenetic relationships of potential local isolates with other Iranian and international isolates have yet to be analyzed. Therefore, the present study was designed and conducted with the objective of precisely detecting ToLCPMV in the cucumber fields and greenhouses of Khouzestan province, determining the phylogenetic placement of the obtained isolates, and comparing their genetic sequences with those reported elsewhere in Iran and globally. This research aims to fill the existing knowledge gap and facilitate the development of management programs to prevent potential epidemics and avoid irreversible damage to this strategic crop in the region.

Method

During the spring and summer of 2023, to identify and track *Tomato leaf curl Palampur virus* (ToLCPMV) in cucumber farms and greenhouses in the northern Khouzestan province (Dezful, Shoush, and Andimeshk counties), 60 leaf samples displaying suspicious symptoms such as severe mosaic, yellowing, stunting, leaf leathery/blistering, little leaf, and fruit malformation were collected and transported to the laboratory under cold conditions. Total DNA was extracted using the CTAB method (Zhang et al., 1998), and to screen for whitefly-transmitted begomoviruses, degenerate primers Bc and PCRV181, which target the pre-coat protein (AV2) gene, were utilized (Rojas et al., 1993; Deng et al., 1994). PCR reactions were optimized using 2x PCR Bio Taq Mix Red under standard thermal cycling conditions, and the quality of the amplified products was verified via 1% agarose gel electrophoresis using a 100 bp marker (Pishgam). To achieve accurate species identification and sequencing, positive samples were purified and sent to Macrogen (South Korea). For definitive confirmation of the viral species, specific primers targeting the movement protein (BC1-MP) and the intergenic region of the DNA-B component were employed (Heydarnejad et al., 2013). The raw sequences were edited and assembled using BioEdit software, and the identity of the isolates was verified using the NCBI BLASTn tool. Finally, to analyze the phylogenetic relationships and determine the evolutionary position of the isolates, multiple sequence alignment was performed using Geneious Prime 2024.0, and a phylogenetic tree was constructed based on the Muscle algorithm with 1000 bootstrap replicates. Furthermore, the genetic distance and sequence identity between the Khouzestan isolates and other sequences available in GenBank were analyzed using SDT v1.2 software (Muhire et al., 2014).

Results

Field surveys and sampling conducted in cucumber greenhouses and fields across Andimeshk, Dezful, and Shoush counties revealed a wide range of disease symptoms, including yellowing, mosaic, curling,

leaf blistering/leathery appearance, leaf curling, distortion, leaf-size reduction, and plant stunting. In some instances, flower abortion was also reported following infection, leading to significant yield losses. This diversity of symptoms, consistent with previous field observations for ToLCPMV (Astaraki and Shams-bakhsh, 2023), may be attributed to factors such as host cultivars, plant age at the time of infection, and the diversity of viral isolates. Since these symptoms can be indistinguishable from those caused by other viruses, pathogens, or environmental stresses, definitive diagnosis was confirmed solely through molecular assays (Ramazani et al., 2022a). The prevalence of this infection in the study areas coincided with high population densities of the vector *B. tabaci*.

PCR analysis using the degenerate primers Bc and PCRV181 confirmed the presence of ToLCPMV in 26 cucumber samples, yielding the expected 550-bp fragment, while no amplification was observed in the negative control. This amplified fragment encompasses the 3' end of the intergenic region and approximately 200 bp of the 5' region of the coat protein (AV2) gene. The efficacy of these primers in amplifying target fragments in other begomovirus-infected crops, such as ToLCPMV and Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV), has been previously documented (Jelavi et al., 2022; Pakbaz et al., 2024). Furthermore, the use of ToLCPMV-specific primers (ToLCPMV-1079B-F and ToLCPMV-2054B-R) successfully amplified a 950-bp fragment encompassing the intergenic region and the movement protein gene, providing high-precision confirmation of the infection.

To finalize the identification process, the nucleotide sequences of selected isolates were purified, sequenced, and deposited in the NCBI database. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the coat protein precursor region on DNA-A classified the Khouzestan isolates into Group I, with Abutilon mosaic virus (AbMV) used as the outgroup. Nucleotide similarity matrix results demonstrated that the isolates from Andimeshk, Dezful, and Shoush exhibited the highest similarity (>98%) to the Jiroft cucumber isolate, a finding consistent with the phylogenetic tree.

In addition to the DNA-A analysis, phylogenetic relationships were assessed based on the nucleotide sequence of the movement protein (BC1-MP) and the intergenic region of the DNA-B component. In this analysis, the Khouzestan isolates clustered within Group I, and the resulting tree revealed a two-group structure (Groups I and II), again using Abutilon mosaic virus as the outgroup. The similarity matrix analysis based on specific primer pairs showed that the Andimeshk, Dezful, and Shoush isolates shared the highest nucleotide identity with the previously reported Jiroft cucumber isolate and an Iraqi tomato isolate. Furthermore, pairwise nucleotide comparisons of the BC1-MP and intergenic regions using SDT v1.2 confirmed high sequence homology among the three studied isolates. These isolates exhibited minimal genetic distance from the Jiroft and Iraqi isolates, while showing the greatest genetic divergence from the papaya (Oman) and melon (Jiroft) isolates. Finally, matrix-based comparisons for both DNA-A and DNA-B genomic components revealed negligible genetic variation among the isolates from the three counties; specifically, the Andimeshk isolate showed >97% sequence identity with the Dezful and Shoush isolates, suggesting high genetic consistency of the virus within the studied region.

Conclusions

Khouzestan province is a pivotal region for cucurbit production in Iran, where widespread symptoms including mosaic, leaf curling, and stunting, often coinciding with high *B. tabaci* populations, have recently been observed. In the present study, 26 out of 60 sampled cucumber plants were identified as ToLCPMV-positive, marking the first report of this virus in Khouzestan. The successful amplification of the 950-bp BC1-MP fragment confirms the high sensitivity and diagnostic utility of current primers for Iranian isolates. Phylogenetic analysis of both DNA-A and DNA-B components revealed that the Khouzestan isolates share high nucleotide identity and cluster with the Jiroft isolates within the “Iranian” group. This high genetic affinity, contrasting with the greater divergence observed from Indian, Pakistani, and Omani isolates, suggests a relatively recent and rapid dispersal of the virus across southern Iran, likely mediated by the transport of infected seedlings or vector movement.

While Iranian isolates exhibit high sequence identity, the high recombination rate inherent to begomoviruses implies a continued risk of novel strain emergence (Ramazani et al., 2022b). Previous research has confirmed the expansion of ToLCPMV host ranges in Iran, including eggplant and pepper (Abkhoo and Mehraban, 2020), and consistent genome identity across various cucurbits (Heydarnejad et al., 2013). The prevalence of ToLCPMV (43%) in this study confirms that the virus is not merely sporadic but is firmly established within Khuzestan's production ecosystems. Driven by favorable climate conditions and high whitefly abundance, the risk of rapid viral proliferation and future epidemics is significant. Consequently, continuous molecular surveillance, integrated vector management, and strict control over the movement of potentially infected plant materials are imperative to mitigate epidemic risks and ensure the sustainability of cucurbit production. Future studies focusing on full-genome sequencing and recombination dynamics are essential to further elucidate the evolutionary trajectory and epidemiology of ToLCPMV in Iran.

Author Contributions

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to Lorestan University for offering laboratory facilities for this study.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

ردیابی مولکولی و تحلیل روابط خویشاوندی ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (ToLCPMV) جدایه‌های مزارع و گلخانه‌های خیار استان خوزستان

پریوش بهاروند^۱، سمیرا پاکباز^۲، احسان حسنونند^۳، و رضا الماسی^۴

۱. گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: baharvand.par@fa.lu.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: pakbaz.s@lu.ac.ir

۳. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، قزوین، ایران. رایانامه: e.hasanvand@areeo.ac.ir

۴. گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران. رایانامه: ralmasi@malayeru.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	مقدمه: ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی یک بگوموویروس مخرب با ژنوم دو بخشی می‌باشد که به تازگی از ایران گزارش شده است و تنها ناقل آن <i>Bemisia tabaci</i> می‌باشد. با وجود گزارش ToLCPMV از برخی استان‌های ایران، تاکنون اطلاعاتی درباره حضور و تنوع ژنتیکی این ویروس در مزارع و گلخانه‌های خیار استان خوزستان وجود ندارد. از این رو، هدف این پژوهش ردیابی ToLCPMV و تعیین روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های آن در این منطقه می‌باشد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۱۳	مواد و روش‌ها: به منظور ردیابی و بررسی تنوع ژنتیکی ToLCPMV، در بهار و تابستان ۱۴۰۲ از گیاهان مشکوک به آلودگی نمونه‌برداری شد. به کمک آغازگرهای دژنه اختصاصی بگوموویروس‌های منتقل شونده با سفیدبالک، قطعه‌ای مربوط به ژن پیش‌ساز پروتئین پوششی تکثیر شد. به منظور بررسی دقیق‌تر و تأیید ماهیت گونه ویروسی، توالی ژن پروتئین حرکتی ویروس نیز تکثیر و درخت فیلوژنی آن‌ها ترسیم شد. همچنین ماتریس مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده همراه با توالی‌های مستخرج از بانک ژن ترسیم شد.
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۶	نتایج: تکثیر ژن‌های مورد مطالعه نشان‌دهنده آلودگی به بگوموویروس‌ها در مناطق مورد بررسی بود. تحلیل تبادف‌ها و تعیین روابط خویشاوندی بر اساس دو ناحیه ژنی (نرم‌افزار Geneious Prime) نشان داد که جدایه‌های اندیمشک، دزفول و شوش در گروه جدایه‌های ایرانی قرار گرفته و بیشترین همسانی ژنتیکی را با جدایه‌های جیرفت روی میزبان خیار دارند. همچنین ماتریکس مقایسه توالی‌ها (نرم‌افزار SDT v1.2)، نشان داد که سه جدایه مذکور شباهت زیادی در سطح نوکلئوتیدی دارند و بیشترین شباهت را در سطح توالی نوکلئوتیدی به ترتیب با جدایه FJ660426.1 (خیار، جیرفت با ۹۶/۳۹٪)، جدایه FJ660435.1 (خیار، جیرفت با ۹۸/۳۰٪) و جدایه OP810507.1 (گوجه فرنگی، عراق با ۹۸/۸۷٪) نشان دادند.
تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۶/۳۱	نتیجه‌گیری: این اولین گزارش از شیوع گسترده ToLCPMV در مناطق کشت خیار در استان خوزستان می‌باشد. باتوجه به پراکنش و خسارت وسیع این بگوموویروس در مزارع خیار استان خوزستان، به نظر می‌رسد که به سرعت در حال پیشروی روی محصولات میزبان در مناطق غربی و جنوبی کشور می‌باشد و در صورت عدم مدیریت در سال‌های آینده خسارت‌های جبران‌ناپذیری به میزبان‌های این ویروس وارد خواهد کرد.
کلیدواژه‌ها: ایران، بگوموویروس، تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، کدوئیان	

استناد: بهاروند، پریوش؛ پاکباز، سمیرا؛ حسنونند، احسان و الماسی، رضا (۱۴۰۵). ردیابی مولکولی و تحلیل روابط خویشاوندی ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (ToLCPMV) جدایه‌های مزارع و گلخانه‌های خیار استان خوزستان. یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۱۳ (۲)، ۲۲-۱. <https://doi.org/10.22034/nbr.2026.11737>



مقدمه

ویروس‌های گیاهی از مهم‌ترین عوامل ایجاد خسارت و کاهش میزان محصولات مختلف از جمله گیاهان تیره کدوئیان (*Cucurbitaceae*) هستند. اعضاء این خانواده دارای پراکندگی وسیعی در جهان هستند و همگی در شرایط آب و هوای گرم به خوبی رشد می‌کنند (Newton and Eggli, 2022). خیار با نام علمی *Cucumis sativus* L. عضوی از این خانواده بوده (Brandenberger et al., 2021) و سطح زیر کشت آن در ایران در سال زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ حدود ۱۷۸۰۲ هکتار با تولید سالانه حدود ۴۳۴۷۱۷ تن و عملکرد ۱۵۳۴۶ کیلوگرم در هکتار می‌باشد و از این مقدار استان خوزستان با سطح زیر کشت ۲۲۴۴ هکتار و تولید ۳۲۴۳۵ تن بعد از استان‌های کرمان و هرمزگان بیشترین مقدار تولید خیار در کشور را دارد (Ahmadi et al., 2019).

خانواده *Geminiviridae* گروهی بزرگ و متنوع از ویروس‌های گیاهی هستند که در سراسر جهان گیاهان تک لپه و دولپه را آلوده می‌کنند (Shahid and Al-Sadi, 2022). ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (*Tomato leaf curl palampur virus*, ToLCPMV) یک عضو از این خانواده و جنس *Begomovirus* است که علاوه بر گوجه‌فرنگی، کدوئیان را نیز مورد حمله قرار می‌دهد. این ویروس به عنوان عامل اصلی تخریب و محدودکننده کشت محصول در مزارع و گلخانه‌های خیار معرفی شده است (Heydarnejad et al., 2013). اعضای خانواده *Geminiviridae* به دلیل دارا بودن ناقلین حشره‌ای و همچنین انتقال جهانی مواد گیاهی، تهدید مهمی برای گیاهان زراعی محسوب می‌شوند. *B.tabaci* به عنوان ناقل بسیار مهم ویروس‌ها از جمله ToLCPMV، در نواحی نیمه‌گرمسیری و گرمسیری جهان معرفی شده است. به‌ویژه با پیدایش بیوتیپ جدیدی از سفیدبالک، توسعه و تکامل *Geminiviridae* در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته است (Ameri and Ayazpour, 2022).

پیکره‌های ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (ToLCPMV) فاقد غلاف، دارای تقارن بیست وجهی، به‌صورت دوقلوی بهم چسبیده، با اندازه تقریبی ۳۰-۱۸ نانومتر بوده و دارای ژنوم دو بخشی و متشکل از دو قطعه DNA تک رشته‌ای موسوم به DNA-A و DNA-B هستند (Barro et al., 2011; Arif et al., 2022). این ویروس اولین بگوموویروس دوبخشی بود که در ایران توسط فاضلی و همکاران از مزارع گوجه‌فرنگی در استان‌های هرمزگان و کرمان گزارش شد. به دنبال آن، بروز ToLCPMV به‌تدریج در میان چندین گیاه کشت شده و در مناطق جغرافیایی جدید در ایران افزایش یافت (Fazeli et al., 2009). سپس پالامپور به‌عنوان عامل ویروسی مخرب که مزارع خیار و خربزه گلخانه‌ای در جیرفت، استان کرمان و هرمزگان را ویران کرده است، شناسایی شد و میزان آلودگی بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد تخمین زده شد (Heydarnejad et al., 2009). همچنین این ویروس از بوته‌های مزارع خیار و خربزه منطقه سیستان شامل شهرستان‌های زابل، زهک و هیرمند که با مشکل سفیدبالک مواجه بودند، ردیابی شد. این بوته‌ها دارای علائم موزاییک، زردی و کوتولگی شدید بودند (Abkhoo and Mehraban, 2020). اگرچه ToLCPMV تاکنون از استان‌های کرمان، هرمزگان، فارس و سیستان در ایران گزارش شده است، اما اطلاعاتی درباره حضور، پراکنش و ویژگی‌های مولکولی این ویروس در مزارع و گلخانه‌های خیار استان خوزستان، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مناطق تولید خیار کشور در دسترس نیست. همچنین روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های احتمالی این منطقه با سایر جدایه‌های ایرانی و خارجی تاکنون بررسی نشده است. از این‌رو، هدف این پژوهش ردیابی ToLCPMV در مزارع و گلخانه‌های خیار استان خوزستان، تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌های به‌دست‌آمده و مقایسه آن‌ها با سایر جدایه‌های گزارش شده در ایران و جهان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بازدید و جمع‌آوری نمونه

در طول فصل‌های بهار و تابستان سال ۱۴۰۲، از گلخانه و مزارع کشت خیار در شهرستان‌های شمال استان خوزستان (شهرستان‌های دزفول، شوش، اندیمشک) بازدید صورت گرفت. تعداد ۶۰ نمونه برگ خیار مشکوک به آلودگی و دارای علائم ویروسی از گلخانه و مزارعی که با مشکل سفیدبالک مواجه بودند، جمع‌آوری شد (جدول ۱). این نمونه‌ها که عموماً دارای علائم زردی، موزائیک شدید، چرمی، تاولی شدن و پیچیدگی برگ‌ها، کوتولگی بوته، لکه‌های کلروتیک بین رگبرگی، ریزبرگی و بدشکلی میوه بودند، درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند. مشخصات هر نمونه شامل نام نمونه، محل و تاریخ جمع‌آوری بر روی آن‌ها درج گردید و در شرایط سرد (روی یخ) به آزمایشگاه منتقل شدند.

جدول ۱- محل‌های نمونه‌برداری در استان خوزستان
Table 1. Sampling locations in Khuzestan province

تعداد نمونه	محل نمونه‌برداری	نام شهر
۶	چغامیش	دزفول
۶	سیاه منصور	
۳	سبیل	
۶	عبدالخان	شوش
۶	شاوور	
۶	چنانه	
۳	سرخه	
۶	اندیمشک	اندیمشک
۶	پشمینه زار	
۳	جاده سد	
۳	آزادی	
۶	کوی لور	
۶۰	مجموع نمونه‌ها	

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

بعد از انجام مطالعات گلخانه‌ای و اطمینان از عدم انتقال ویروس به روش مکانیکی و با توجه به آلودگی شدید گلخانه‌ها به سفیدبالک و احتمال ناقل بودن آن‌ها، استخراج DNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده به روش CTAB انجام شد (Zhang et al., 1998). به منظور رديابی ToLCPMV در گلخانه و مزارع خیار استان خوزستان، از آزمون زنجیره‌ای پلیمرز و نیز یک جفت آغازگر دژنره و عمومی بگوموویروس‌های قابل انتقال با سفیدبالک (Bc و PCRv181) (Rojas et al., 1993; Deng et al., 1994) (جدول ۲) استفاده شد. این آغازگر مربوط به بخشی از ژن پیش‌ساز پروتئین پوششی (AV2) روی قطعه ژنومی DNA-A بگوموویروس‌ها می‌باشد. آزمون PCR با استفاده از کیت 2x PCR Bio Taq Mix Red شرکت PCR Bio system انگلیس و طی سه مرحله شامل مراحل واسرشت‌سازی، اتصال آغازگرها و بسط یا گسترش انجام شد.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای دژنره
Table 2. Characteristics of degenerate primers

نام آغازگر	اندازه قطعه	توالی نوکلئوتیدی
PCRv 181	۵۵۰ bp	۵' TAATATTACCGGTGGCC ۳'
Bc		۵' TGGACYTTRCAWGGBCCTCACA ۳'

بازهای نامشخص که با حروف دیگری غیر از A، T، C و G در ترادف آغازگر قرار دارند به صورت زیر هستند:

$$Y = C/T, W = A/T, R = A/G, B = C/G$$

توالی‌یابی نوکلئوتیدی و تشخیص گونه ویروسی

محصولات واکنش PCR که با استفاده از آغازگرهای دژنره جنس بگوموویروس تکثیر شده بودند، بر اساس کیفیت محصول واکنش و نیز منطقه نمونه‌برداری، گروه‌بندی شدند و سپس از هرکدام یک نماینده به‌منظور تعیین گونه ویروس در نمونه‌های خیار آلوده، جهت خالص‌سازی و توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نمونه‌ها و آغازگرهای مربوطه طبق دستورالعمل شرکت آماده شدند. در نهایت مقایسه ترادف نوکلئوتیدی توالی‌های به‌دست‌آمده براساس قطعه DNA-A با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن با کمک ابزار نوکلئوتید بلاست (Blastn) در NCBI انجام و گونه ویروسی مشخص شد.

تکثیر ژن پروتئین حرکتی ویروس (BC1) به کمک آغازگرهای اختصاصی گونه

پس از ارزیابی نتایج به‌دست‌آمده از تعیین ترادف نوکلئوتیدی و تعیین گونه ویروس آلوده‌کننده نمونه‌های خیار، واکنش زنجیره ای پلیمرز جهت ردیابی و تأیید گونه ویروسی (ToLCPMV)، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه انجام شد. این آغازگرها قادر به تکثیر بخشی از ژن پروتئین حرکتی (BC1-MP) و نیز ناحیه بین ژنی (Intergenic region) قطعه DNA-B (Heydarnejad et al., 2013) (جدول ۳) روی ژنوم ToLCPMV بودند. کیفیت محصولات تکثیر شده PCR در حضور نشانگر مولکولی استاندارد ۱۰۰ جفت باز شرکت پیشگام و با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد ارزیابی شد. سپس نمونه‌ها بر اساس شهرهای محل نمونه‌برداری گروه‌بندی شدند و از هر گروه یک نمونه که از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار بود، جهت انجام خالص‌سازی و توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نمونه‌ها به کمک آغازگرهای اختصاصی در دو جهت رفت و برگشت خوانش و توالی‌یابی شدند.

جدول ۳- آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV

Table 3. Specific primers of ToLCPMV

نام آغازگر	اندازه قطعه	توالی نوکلئوتیدی
ToLCPMV-1079B-F	۹۵۰ bp	۵' TTGGGTCACGTTCCGCGACGAAGA ۳'
ToLCPMV-2054B-R		۵' TACGCGCTCACAAACGATGCTGCA ۳'

تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های ToLCPMV

توالی‌های دریافتی از شرکت ماکروژن، ابتدا به کمک ابزار نوکلئوتید بلاست در NCBI و مقایسه با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی ارزیابی و تأیید شدند. پس از ویرایش ابتدا و انتهای توالی‌ها و همپوشانی رشته رفت و برگشت به کمک نرم‌افزار BioEdit، توالی‌های نهایی جهت رسم درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفتند. جهت تعیین روابط خویشاوندی و جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروسی ردیابی شده در این مطالعه، چندین توالی نوکلئوتیدی از جدایه‌های ToLCPMV براساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه پیش‌ساز پروتئین پوششی روی DNA-A و ناحیه پروتئین حرکتی روی DNA-B مربوط به میزبان‌ها و مناطق جغرافیایی مختلف از جمله ایران و سایر کشورها از پایگاه NCBI استخراج شد (جدول ۴). به این منظور، هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی (Multiple sequence alignment) در مورد نواحی ژنومی مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Geneious 2024.0

Prime (<https://www.geneious.com/>) انجام شد و درخت فیلوژنی با روش Muscle و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی (Bootstrap) رسم شد. همچنین مقایسه دو به دو ترادف‌های نوکلئوتیدی نواحی ژنومی پیش‌ساز پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی همه جدایه‌های ToLCPMV با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2 انجام شد (Muhire et al., 2014).

جدول ۴- مشخصات جدایه‌های موجود در بانک ژن مورد استفاده در تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی در این مطالعه

Table 4. Characteristics of isolates available in the GenBank used in phylogenetic analyses in this study

تجزیه و تحلیل‌های مبتنی بر ناحیه ژنی DNA-A					
شماره دسترسی	کشور	جدایه	شماره دسترسی	کشور	جدایه
MK606693	عراق	TLCPV-Squash3	MW651902	ایران	PepbHsht1
EU677429	ایران: جیرفت	Ch12	MW651901	ایران	CucHsht2
MK606695	عراق	TLCPV-Squash5	MW651874	ایران	SquKavar1
OP479886	بغداد	Alyusufia MS89	MW651879	ایران: خنج	PepKhonj1
ON229618	عراق	Babylon1	MW651878	ایران: خنج	EggpKhonj1
JF501721	ایران: جیرفت	T56X:Cuc:08	MW651899	ایران	WatmHsht1
JF501720	ایران: جیرفت	T65X:Cuc:08	MW651886	ایران: جیرفت	WatmJir2
OP810506	عراق	Kufa	MZ423188	عمان	PV15-3- papaya
OR052249	عراق	Mosul	MZ423187	عمان	PV14-1- papaya
FJ660434	ایران: کهنوج	T9X:Cuc:07	KF663700	پنجاب	TC238-Tomato
FJ660433	ایران: کرمان	T8X:Cuc:07	AM494976	پاکستان	Melon
EU547682	ایران: رودان	Tomato: Roodan	EU677430	ایران: کهنوج	He- Herniaria
MW651877	ایران: خنج	SquKhonj1	HQ848383	هند	Allipur-Armenian cucumber
EU547683	ایران: جیرفت	Jiroft:melon	AJ489258	اسپانیا	Almeria: Pepper
MW651875	ایران: خنج	CantKhonj1	AF024715	جمهوری دومینیکن	Dominican isolate
MK606697	عراق	TLCPV-Datura1	MW651902	ایران	PepbHsht1
FJ660444	ایران: جیرفت	T55X:Cuc:08	MW651901	ایران	CucHsht2
U15016	هند	New Delhi	MW651874	ایران	SquKavar1
AJ223505	اسرائیل	Cuba	تجزیه و تحلیل‌های مبتنی بر ناحیه ژنی DNA-B		
AJ132711	ایران: ایرانشهر	Iran.Tomato	OP810507	عراق	Kufa
AF105975	پرتغال	Mild	FJ660427	ایران: جیرفت	IR:Jir6:T3P:Cuc:07
AF071228	اسپانیا	Mild	ON229620	عراق	Babylon1
X15656	اسرائیل	Rehovot	PP230527	بغداد	MS89
EU635776	ایران: کهنوج	Kahnooj	FJ660435	ایران: جیرفت	IR:Jir9:T7P:Cuc:07
X76319	اسرائیل	-	FJ660426	ایران: جیرفت	IR:Jir7:T11P:Cuc:07
EU085423	ایران	Iran 2	FJ668379	ایران: کرمان	Kerman: cucumber
AB014346	ژاپن	Shizuokua	OR052250	عراق	Mosul
U38239	هند	Bangalore II	FJ660424	ایران: کهنوج	IR:Kah:T9P:Cuc:07
AF188481	بنگلادش	TLCV-BD2	EU547681	ایران: جیرفت	Jiroft:melon]
AY297924	ایران: ایرانشهر	-	MZ423191	عمان	PV15-5
U88692	تایوان	pTW1	MZ423192	عمان	PV16-8
AF295401	بنگلر	Ban5	KC456162	هند	Punjab
X63015	تایلند	pDR9	LN854628	پاکستان	SAZ235
Y16421	هند	Lucknow	HQ264186	هند	Eggplant isolate
LN611625		Abutilon mosaic virus (AF isolate)	KM977734	اسپانیا	Tomato-A4

نتایج

نمونه‌برداری و بررسی علائم

طی بازدید و نمونه‌برداری از گلخانه‌ها و مزارع خیار در سه شهرستان اندیمشک، دزفول و شوش استان خوزستان (شکل ۱) دامنه وسیعی از علائم ToLCPMV از جمله زردی، موزائیک، چروکیدگی، چرمی و تاولی شدن سطح برگ، پیچیدگی و بدشکلی برگ، ریز برگ‌گی خصوصاً در برگ‌های انتهایی و کوتولگی بوته خیار در نمونه‌های آلوده مشاهده شد (شکل ۲). در برخی موارد نیز، بعد از وقوع آلودگی گل‌ها ریزش کرده و به همین دلیل باعث کاهش عملکرد محصول شد. این تنوع علائم با گزارش‌های قبلی از مشاهدات مزرعه‌ای ToLCPMV مشابهت داشت (Astaraki and Shams-bakhsh, 2023). تنوع علائم مشاهده شده می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع ارقام کشت شده، تفاوت در سن آلودگی و همچنین تفاوت در جدایه‌های ویروسی آلوده‌کننده باشد. البته تنها با مشاهده علائم، نمی‌توان تشخیص قطعی آلودگی داد و نشانه‌های فوق ممکن است در اثر آلودگی به سایر ویروس‌ها و پاتوژن‌ها و یا تنش‌های محیطی نیز ظاهر شود. لذا تشخیص قطعی آلودگی از طریق آزمایشات مولکولی امکان‌پذیر است (Ramazani et al., 2022a). علائم و آلودگی شدید ویروس پالامپور در گلخانه‌ها و مزارع خیار در شهرستان‌های اندیمشک، دزفول و شوش استان خوزستان در طول فصل رشد به همراه جمعیت بالا و گسترده حشره ناقل *B. tabaci* در این مناطق بود.



شکل ۱- نقشه و طول و عرض جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری شده: شهرستان‌های اندیمشک، دزفول و شوش در استان خوزستان (با دایره مشخص شده است).

Figure 1. Map and longitude and latitude of sampled areas: Andimeshk, Dezful, and Shoush cities in Khuzestan province (marked by a circle).

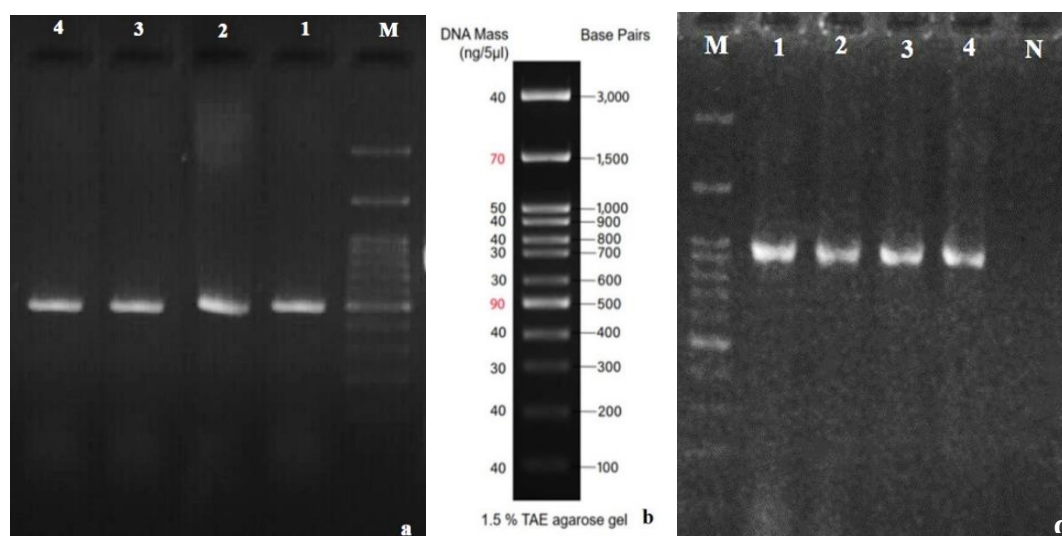


شکل ۲- چرمی و تاولی شدن سطح برگ، زردی و موزائیک شدید در نمونه‌های خیار آلوده به ToLCPMV در گلخانه‌ها و مزارع استان خوزستان

Figure 2. Leathery and blistering of the leaf surface, yellowness, and severe mosaic in cucumbers infected with ToLCPMV in the greenhouses and farms of Khouzeestan province.

نتایج آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای دژنره و اختصاصی

نتایج حاصل از آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای دژنره PCRv181 و BC، آلودگی قطعی ۲۶ نمونه خیار در گلخانه‌ها و مزارع خیار شهرستان‌های اندیمشک، دزفول و شوش استان خوزستان را به ToLCPMV تایید کرد. این آغازگرها توانستند قطعه‌ای به طول ۵۵۰ جفت باز را تکثیر کنند، این در حالی بود که در نمونه شاهد منفی که در آن از DNA گیاه سالم استفاده شده بود، این باند تکثیر نشد (شکل ۳، a). قطعه تکثیر شده شامل توالی انتهایی ناحیه بین ژنی و حدود ۲۰۰ جفت باز از ناحیه 5' ژن پروتئین پوششی (AV2) می باشد. همچنین در پژوهش‌های دیگر این آغازگرهای دژنره توانستند قطعه مورد انتظار را در نمونه‌های مشکوک محصولات مختلف به آلودگی به بگوموویروس‌ها از جمله گونه ToLCPMV و نیز گونه ویروس کوتولگی کلروتیک هندوانه (WmCSV) تکثیر کنند (Jelavi et al., 2022; Pakbaz et al., 2024). همچنین آغازگرهای ToLCPMV-1079B-F و ToLCPMV-2054B-R توانستند قطعه‌ای به طول ۹۵۰ جفت باز مربوط به توالی ناحیه بین ژنی و ژن پروتئین حرکتی را در نمونه‌های آلوده به ToLCPMV تکثیر کنند. درحالی‌که در نمونه شاهد منفی هیچ باندی تکثیر نشد (شکل ۳، c). در پژوهشی شامل ردیابی و توالی‌یابی بگوموویروس‌ها در گلخانه‌های گوجه‌فرنگی استان لرستان، آلودگی نمونه‌های مشکوک به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) در این استان به بگوموویروس‌ها تایید شد. این ویروس یک عضو مخرب با ژنوم تک‌بخشی از جنس بگوموویروس و دارای گسترش جهانی می‌باشد (Rostami et al., 2023). یک محصول PCR از هر شهر به عنوان نماینده انتخاب و بعد از خالص‌سازی، توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی توالی‌یابی شد. توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به این مطالعه در پایگاه NCBI ثبت شدند و شماره‌های دسترسی آن‌ها در جدول ۵ آمده است.



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی قطعات تکثیر شده روی ژل آگاروز یک درصد:

- (a) تکثیر با استفاده از آغازگرهای دژنره PCRv181 و Bc در محدوده ۵۵۰bp. ستون های ۱ تا ۴ قطعات تکثیر شده.
 (b) مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت باز (100 bp+3k DNA ladder).
 (c) تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-1079B-F و ToLCPMV-2054B-R در محدوده ۹۵۰bp. ستون های ۱ تا ۴ قطعات تکثیر شده و N، کنترل منفی.

Figure 3. a) Electrophoresis pattern of amplified fragments on 1% agarose gel:

- a) Amplification using PCRv181 and Bc degenerate primers in the range of 550bp. Columns 1 to 4 are amplified fragments.
 b) Molecular marker 100bp (Excel-band 100 bp+3k DNA ladder)
 c) Amplification using ToLCPMV-1079B-F and ToLCPMV-2054B-R specific primers in the range of 950bp. Columns 1 to 4 are amplified fragments and N, the negative control.

جدول ۵- خصوصیات و شماره‌های دسترسی توالی‌های نوکلئوتیدی مطالعه حاضر

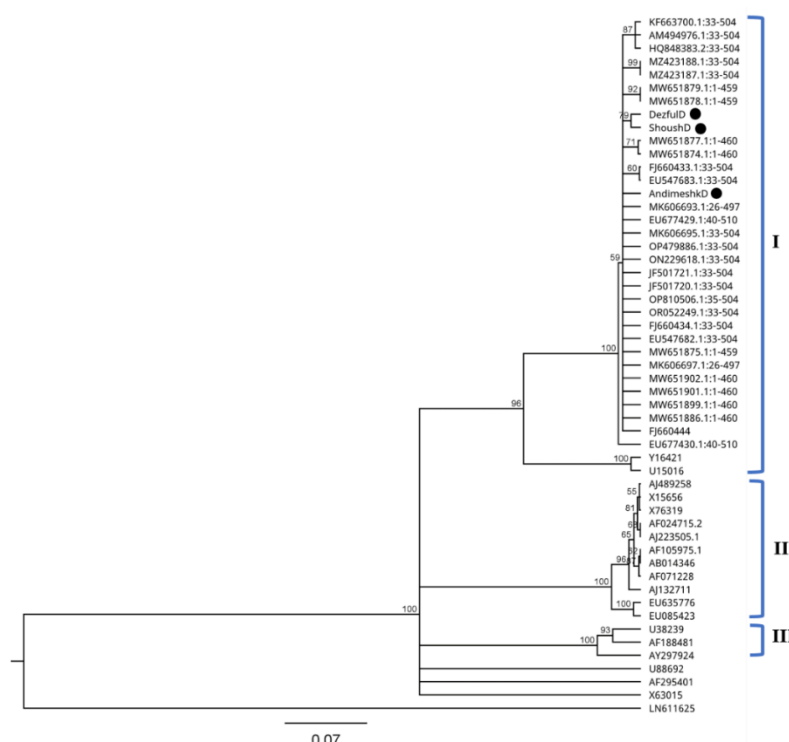
Table 5- Characteristics and accession numbers of the nucleotide sequences of the present study

ردیف	ژن	قطعه	شهر	شماره دسترسی	نام ایزوله
۱	پیش‌ساز پروتئین پوششی	DNA-A	اندیمشک	PZ369102	IR:Cu:Andimeshk
۲	پیش‌ساز پروتئین پوششی	DNA-A	دزفول	PZ369103	IR:Cu:Dezful
۳	پیش‌ساز پروتئین پوششی	DNA-A	شوش	PZ369104	IR:Cu:Shoush
۴	پروتئین حرکتی	DNA-B	اندیمشک	PZ381571	IR:Cu:Andimeshk-MP
۵	پروتئین حرکتی	DNA-B	دزفول	PZ381572	IR:Cu:Dezful-MP
۶	پروتئین حرکتی	DNA-B	شوش	PZ392817	IR:Cu:Shoush-MP

تعیین روابط خویشاوندی جدایه‌ها بر اساس ناحیه ژنومی پیش‌ساز پروتئین پوششی

مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های اندیمشک، دزفول و شوش در پایگاه NCBI ردیابی ToLCPMV را در منطقه مورد مطالعه تأیید کرد. جهت تعیین روابط خویشاوندی و جایگاه فیلوژنتیکی براساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه پیش‌ساز پروتئین پوششی روی DNA-A، چندین توالی از جدایه‌های ToLCPMV در ناحیه ژنی مورد مطالعه و مربوط به میزبان‌ها و مناطق جغرافیایی مختلف از جمله ایران و سایر کشورها از NCBI استخراج و هم‌ردیف‌سازی چندگانه این توالی‌های نوکلئوتیدی به

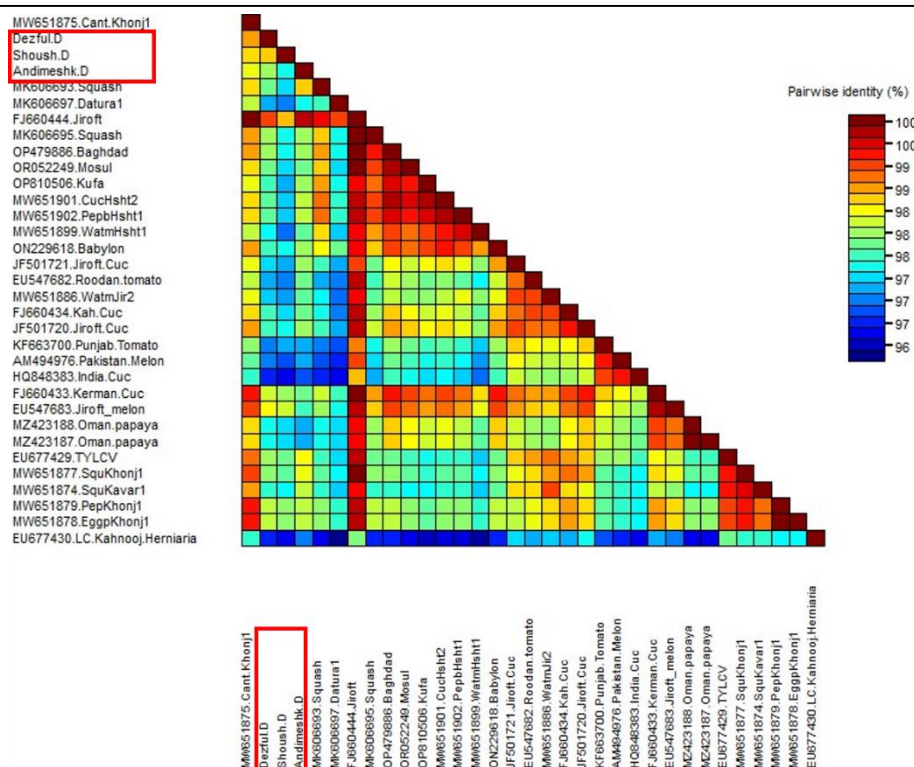
همراه جدایه‌های ToLCPMV اندیمشک، دزفول و شوش در نرم‌افزار Geneious انجام و درخت فیلوژنی با روش Muscle و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی رسم شد. براساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه تعیین شده روی قطعه ژنومی DNA-A، جدایه‌های مورد بررسی در درخت فیلوژنی در سه گروه I، II و III قرار گرفتند (شکل ۵). هر سه جدایه شهرستان اندیمشک، دزفول و شوش در گروه I قرار گرفتند. در رسم این درخت از *Abutilon mosaic virus* (LN611625) به عنوان برون گروه (Outgroup) استفاده شد. نتایج حاصل از مقایسه ماتریکس شباهت توسط نرم افزار Geneious Prime مبتنی بر جفت آغازگر دژنره نشان داد که هر سه جدایه اندیمشک، دزفول و شوش بیشترین شباهت را در سطح توالی نوکلئوتیدی با جدایه جیرفت روی میزبان خیار (FJ660444) به ترتیب با ۹۹/۷۱، ۹۸/۵۶ و ۹۹/۱۴ درصد شباهت نشان دادند که با نتایج درخت فیلوژنتیکی مشابهت دارند. همچنین براساس ماتریکس شباهت، مقایسه بین جدایه‌های اندیمشک، دزفول و شوش نشان داد که اختلاف زیادی در ناحیه مورد بررسی بین جدایه‌های این شهرستان وجود ندارد و میزان شباهت جدایه اندیمشک با جدایه‌های دزفول و شوش بسیار زیاد و به ترتیب ۹۷/۴۶٪ و ۹۷/۲۵٪ می‌باشد.



شکل ۵- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی تعیین شده روی قطعه DNA-A ویروس ToLCPMV جدایه‌های استان خوزستان و برخی از جدایه‌های موجود در بانک ژن. رسم درخت با استفاده از نرم‌افزار Geneious به روش Muscle با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی انجام شده است. جدایه‌های توالی‌یابی شده در این مطالعه با دایره سیاه در درخت مشخص شده‌اند.

Figure 5. The phylogeny tree was drawn based on the nucleotide sequences determined on the ToLCPMV DNA-A isolates from Khouzestan province and some isolates available in the Genbank. The tree was drawn using Geneious software by the Muscle method with 1000 repetitions in the evaluation. The isolates sequenced in this study are marked with a black circle in the tree.

نتایج حاصل از مقایسه دو به دو ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ژنومی پیش‌ساز پروتئین پوششی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SDT ۷۱.۲ نشان داد که توالی‌های سه جدایه ویروسی مورد مطالعه با هم شباهت بالایی دارند (شکل ۶). براساس ماتریکس مقایسه رسم شده جدایه‌های اندیمشک، دزفول و شوش بیشترین شباهت را با جدایه جیرفت (FJ660444) به ترتیب با ۹۹/۷۱، ۹۸/۵۶ و ۹۹/۱۴ درصد داشت و فاصله ژنتیکی زیادی با این جدایه نداشتند. همچنین هر سه جدایه پژوهش حاضر، بیشترین فاصله ژنتیکی را با جدایه‌های خیار هند، خربزه پاکستان، گوجه‌فرنگی پنجاب و علف هرز *Herniaria* کهنوج داراست که با نتایج درخت فیلوژنتیکی مشابهت دارند.

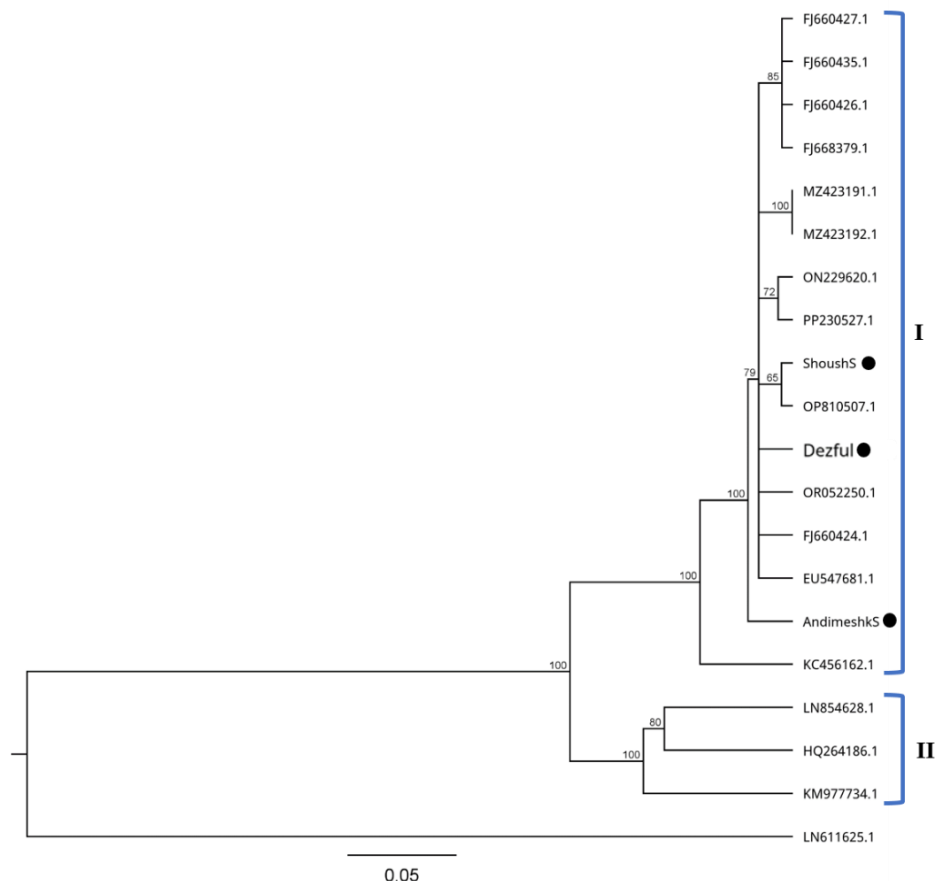


شکل ۶- ماتریکس مقایسه دو به دو ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه ژنومی پیش‌ساز پروتئین پوششی روی قطعه DNA-A جدایه‌های اندیمشک، دزفول و شوش ToLCPMV (کادر قرمز رنگ) با ۳۰ جدایه منتخب از ژن بانک با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2.

Figure 6. Pair-by-pair comparison matrix of nucleotide synonyms of the pre-coat protein genomic region on DNA-A of Andimeshk, Dezful, and Shoush isolates of ToLCPMV (red box) with 30 selected isolates from the gene bank using SDT v1.2 software.

تعیین روابط خویشاوندی جدایه‌ها بر اساس ناحیه ژنومی پروتئین حرکتی

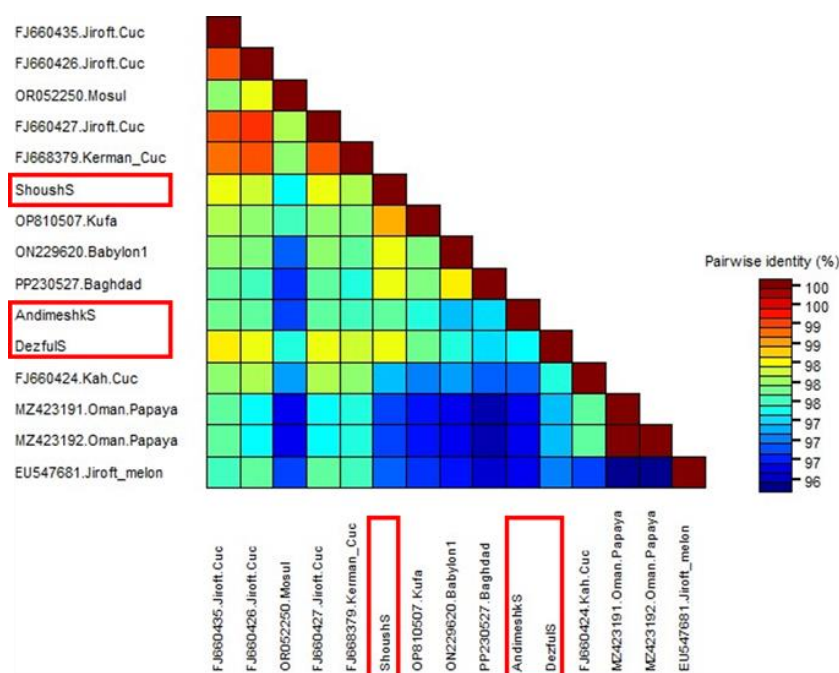
درخت فیلوژنی رسم شده براساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین حرکتی BC1-MP و ناحیه بین ژنی روی قطعه ژنومی DNA-B تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، شامل دو گروه I و II بود و جدایه‌های استان خوزستان (دزفول، شوش و اندیمشک) در گروه I قرار گرفتند (شکل ۷). در رسم این درخت نیز از *Abutilon mosaic virus* (LN611625) به عنوان برون گروه (Outgroup) استفاده شد. براساس ماتریکس شباهت رسم شده توسط نرم افزار Geneious Prime مبتنی بر جفت آغازگر اختصاصی، جدایه‌های اندیمشک، دزفول و شوش بیشترین شباهت را در سطح توالی نوکلئوتیدی به ترتیب با جدایه FJ660426.1 (جیرفت روی میزبان خیار) با ۹۶/۳۹ درصد، جدایه FJ660435.1 (جیرفت روی میزبان خیار) با ۹۸/۳۰ درصد و جدایه OP810507.1 (عراق روی میزبان گوجه‌فرنگی) با ۹۸/۸۷ درصد شباهت نشان دادند.



شکل ۷- درخت فیلوژنی رسم شده براساس ترادف نوکلئوتیدی تعیین شده روی قطعه DNA-B ویروس ToLCPMV جدایه های استان خوزستان و برخی از جدایه های موجود در بانک ژن. رسم درخت با استفاده از نرم افزار Geneious به روش Muscle با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی انجام شده است. جدایه های توالی یابی شده در این مطالعه با دایره سیاه در درخت مشخص شده اند.

Figure 7. The phylogeny tree was drawn based on the nucleotide sequences determined on the ToLCPMV DNA-B isolates from Khouzestan province and some isolates available in the Genebank. The tree was drawn using Geneious software by the Muscle method with 1000 repetitions in the evaluation. The isolates sequenced in this study are marked with a black circle in the tree.

نتایج حاصل از مقایسه دو به دو ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ژنومی پروتئین حرکتی BC1-MP و ناحیه بین ژنی روی DNA-B جدایه ها با استفاده از نرم افزار SDT v1.2 نشان داد که توالی های سه جدایه ویروسی مورد مطالعه با هم شباهت بالایی دارند (شکل ۸). براساس ماتریکس مقایسه رسم شده جدایه های اندیمشک، دزفول و شوش بیشترین شباهت را به ترتیب با جدایه FJ660426.1 (جیرفت روی میزبان خیار)، جدایه FJ660435.1 (جیرفت روی میزبان خیار) و جدایه OP810507.1 (عراق روی میزبان گوجه فرنگی) داشت و فاصله ژنتیکی زیادی با این جدایه ها نداشت. همچنین هر سه جدایه پژوهش حاضر، بیشترین فاصله ژنتیکی را با جدایه های پایا عمان و ملون جیرفت را داراست که با نتایج درخت فیلوژنتیکی مشابهت دارند.



شکل ۸- ماتریکس مقایسه دو به دو ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین حرکتی BC1-MP و ناحیه بین ژنی روی DNA-B جدایه‌های اندیمشک، دزفول و شوش ToLCPMV (کادر قرمز رنگ) با ۱۲ جدایه منتخب از ژن بانک با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2.

Figure 8. Pair-by-pair comparison matrix of BC1-MP and intergenic region nucleotide pairs on DNA-B of Andimeshk, Dezful and Shoush isolates of ToLCPMV (red box) with 12 selected isolates from the gene bank using SDT v1.2 software.

بحث

استان خوزستان یکی از مناطق عمده کشت کدوئیان از جمله خیار می‌باشد و در سال‌های اخیر علایم مشکوک به آلودگی‌های ویروسی مانند لکه‌های کلروتیک بین رگبرگی، موزائیک، تاولی و پیچیدگی برگ، ریزبرگی، کوتولگی بوته، بدشکلی میوه و کاهش شدید محصول در گلخانه‌ها و مزارع خیار این استان مشاهده شده است و اکثر مناطق کشت خیار درگیر حضور سفیدبالک‌ها می‌باشند، بنابراین بررسی وضعیت بیماری‌های ویروسی ناشی از بگمووویروس‌ها خصوصاً ویروس جدید پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (ToLCPMV) که در سال‌های گذشته از سمت کشورهای هند و پاکستان به برخی از استان‌های جنوبی کشور سرایت کرده است، در محصولات کدوئیان استان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در پژوهش حاضر از مجموع ۶۰ نمونه جمع‌آوری شده از مناطق کشت خیار در شهرستان‌های اندیمشک، دزفول و شوش، تعداد ۲۶ نمونه آلوده به ToLCPMV شناسایی شد. این اولین گزارش از وقوع ToLCPMV در مناطق کشت خیار در استان خوزستان می‌باشد. پراکنش این ویروس در برخی مناطق مورد مطالعه بسیار زیاد ارزیابی شد. این نتایج با پژوهش‌های صبوری و حیدرث‌زاد در سال ۱۳۹۲ مطابقت داشت. در این مطالعه به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین حرکتی ToLCPMV قطعه‌ای حدود ۹۵۰ جفت‌باز از بخشی از DNA-B در نمونه‌های آلوده خیار تکثیر شد (Sabouri and Heydarnejad, 2013). این همخوانی احتمالاً نشان می‌دهد که آغازگرهای طراحی شده برای ژن پروتئین حرکتی همچنان برای شناسایی جدایه‌های مختلف ایرانی حساسیت و اختصاصیت بالایی دارند و این ناحیه ژنی طی سال‌های اخیر تغییرات محدودی داشته است. در پژوهشی دیگر، تکثیر به کمک این آغازگرها در محدوده مورد انتظار انجام و ToLCPMV در گیاهان گوجه‌فرنگی، سه رقم مختلف محلی خربزه، کدوخلوایی و هندوانه در گلخانه‌های تجاری، تونل‌های پلاستیکی و یا مزارع استان‌های هرمزگان (میناب، دهبازر، برانتین، رودان و حاجی‌آباد)، سیستان و بلوچستان (خاش، ایرانشهر و لادیز)، کرمان (کرمان، جیرفت و کهنوج)، فارس (ممسنی، داراب، خنج، کاور و ظفرآباد)، یزد (تفت) و خراسان

رضوی (نیشابور) شناسایی و گزارش شد (Esmaeili et al., 2015). در نهایت ToLCPMV با استفاده از PCR در چند گونه میزبان طبیعی جدید شامل کدو، هندوانه، لوبیا و دو گونه علف هرز *Chenopodium sp.* و *Heliotropium europaeum* شناسایی شد. اپیدمی ToLCPMV به‌ویژه در محصولات خیار، خربزه و کدو ویرانگر بوده است و میزان آلودگی بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد در مزارع خیار و خربزه گلخانه‌ای تخمین زده شد، اما میزان آلودگی در هندوانه و لوبیا ناچیز بود (Heydarnejad et al., 2013).

در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل توالی‌ها و تعیین روابط خویشاوندی آن‌ها بر اساس هردو ناحیه ژنومی پروتئین پوششی و حرکتی به کمک نرم‌افزارهای مختلف، نشان داد که سه جدایه اندیمشک، دزفول و شوش شباهت زیادی در سطح نوکلئوتیدی دارند و با توالی جدایه‌های ثبت شده از شهر جیرفت روی میزبان خیار بیشترین همسانی ژنتیکی را دارند و همه در گروه جدایه‌های ایرانی قرار می‌گیرند. این یافته می‌تواند نشان دهد که انتقال ویروس در مناطق جنوبی ایران احتمالاً از طریق جابه‌جایی نشاء، مواد گیاهی آلوده یا انتشار جمعیت‌های سفیدبالک بین استان‌های مجاور صورت گرفته است. نزدیکی ژنتیکی زیاد بین جدایه‌های خوزستان و جیرفت بیانگر آن است که جمعیت‌های ایرانی ToLCPMV هنوز واگرایی ژنتیکی محدودی را تجربه کرده‌اند. همچنین آنالیزها نشان داد که سه جدایه مورد بررسی بیشترین فاصله ژنتیکی را با جدایه‌های هند، پاکستان و عمان دارند. فاصله ژنتیکی بیشتر با جدایه‌های هند و پاکستان احتمالاً ناشی از تکامل مستقل جمعیت‌های ویروس پس از ورود به ایران، فشار انتخابی ناشی از میزبان‌های مختلف و تفاوت در جمعیت‌های *B. tabaci* است. با این حال، حفظ همسانی بالا بین جدایه‌های ایرانی نشان می‌دهد که گسترش ویروس در ایران احتمالاً نسبتاً جدید بوده است. در مطالعه دیگری، ترادف‌های نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی چهار جدایه از این ویروس از منطقه سیستم که از خیار، خربزه، بادمجان و فلفل جدا شده بودند، تعیین شدند. این توالی‌ها یکسانی نوکلئوتیدی ۹۹-۹۲ درصد را با سایر جدایه‌های ویروس که قبلاً گزارش شده بودند، نشان دادند. درخت تبارزایی ترسیم شده براساس ترادف ژن پروتئین پوششی نشان داد که جدایه‌های منطقه سیستم با جدایه‌های ایرانی گروه‌بندی می‌شوند. بادمجان و فلفل میزبان‌های جدیدی برای ویروس در ایران بودند (Abkhoo and Mehraban, 2020). ژنوم کامل ده جدایه ToLCPMV از خیار، خربزه، کدو حلوا، هندوانه و لوبیا، حداقل ۹۵ درصد همسانی توالی (-DNA A) را با جدایه‌های ToLCPMV که قبلاً ثبت شده بودند، نشان داد (Heydarnejad et al., 2013).

شیوع ToLCPMV از جنوب شرق ایران به مناطق دارای شرایط آب و هوایی گرم مانند جنوب، مرکزی و شمال شرق کشور، کشت محصولات کدوئیان و گوجه‌فرنگی را در این مناطق که مناطق عمده تولید این محصولات هستند، تهدید می‌کند و در چند سال گذشته باعث ایجاد خسارت‌های سنگینی در مزارع و گلخانه‌های مناطق مرکزی و جنوبی ایران شده است (Heydarnejad et al., 2010). ویروس مخرب پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در اکثر مناطق کشت گوجه‌فرنگی، هندوانه، خیار و کدوئیان کشور از جمله استان خوزستان شیوع و گسترش یافته و همزمان جمعیت‌های زیادی از بیوتیپ‌های مختلف حشره ناقل *B. tabaci* نیز در همین مناطق و در نتیجه تغییرات شرایط آب‌وهوایی ظاهر شده است (Bananej, 2016). با توجه به نرخ بالای نوترکیبی در بین اعضای جنس بگوموویروس انتظار بروز و ظهور استرین‌های جدید در این ویروس نیز قابل پیش‌بینی می‌باشد. همچنان که گزارشی از تنوع ژنتیکی بالای این ویروس در ایران وجود دارد و در گیاهان آلوده علائم متفاوتی مشاهده شده است. این تنوع در بروز علائم با گزارشات قبلی مشابهت داشت (Ramazani et al., 2022b). شناسایی ToLCPMV در حدود ۴۳ درصد نمونه‌های بررسی شده (۲۶ از ۶۰ نمونه) نشان می‌دهد که این ویروس تنها به‌صورت پراکنده حضور ندارد، بلکه در حال استقرار در اکوسیستم‌های تولید خیار استان خوزستان است. با توجه به فراوانی بالای سفیدبالک در منطقه، شرایط اقلیمی گرم و کشت مستمر میزبان‌های حساس، احتمال افزایش سریع جمعیت ویروس و بروز اپیدمی در سال‌های آینده وجود دارد.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نخستین گزارش مولکولی از حضور ToLCPMV در مزارع و گلخانه‌های خیار استان خوزستان را ارائه می‌کند و شواهد جدیدی از پراکنش این ویروس در یکی از مهم‌ترین مناطق تولید خیار ایران فراهم می‌سازد. تحلیل‌های فیلوژنتیکی و مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که جدایه‌های خوزستان از نظر ژنتیکی به جدایه‌های ایرانی، به‌ویژه جدایه‌های جیرفت، نزدیک هستند و در مقایسه با جدایه‌های سایر کشورها واگرایی بیشتری نشان می‌دهند. این یافته‌ها بیانگر گسترش منطقه‌ای جمعیت‌های ایرانی ToLCPMV و اهمیت پایش مستمر تنوع ژنتیکی این ویروس در کشور است. با توجه به فراوانی سفیدبالک *B. tabaci*، شرایط اقلیمی مناسب و کشت گسترده گیاهان میزبان در استان خوزستان، احتمال استقرار و گسترش بیشتر این ویروس در سال‌های آینده وجود دارد. بنابراین، اجرای برنامه‌های منظم پایش، مدیریت ناقل، کنترل جابه‌جایی مواد گیاهی آلوده و رصد مستمر تغییرات ژنتیکی جمعیت‌های ویروس، از اقدامات ضروری برای کاهش خطر اپیدمی و حفظ پایداری تولید کدوئیان به شمار می‌رود. همچنین، بررسی ژنوم کامل جدایه‌های جدید و ارزیابی میزان نوترکیبی و تنوع ژنتیکی آن‌ها می‌تواند درک بهتری از روند تکامل و اپیدمیولوژی ToLCPMV در ایران فراهم کند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این پژوهش علمی رعایت نموده‌اند و این موضوع مورد تأیید همه آنهاست.

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول: تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها، انجام آزمایش، گردآوری داده‌ها.

نویسنده دوم: استاد راهنمای پایان‌نامه، طراحی و نظارت بر انجام پژوهش و نتایج، تحلیل داده‌ها، اصلاح و نهایی‌سازی مقاله

نویسنده سوم: استاد مشاور پایان‌نامه، تحلیل و تفسیر اطلاعات و نتایج، تهیه پیشنویس مقاله

نویسنده چهارم: استاد مشاور پایان‌نامه، تحلیل و تفسیر اطلاعات و نتایج، مطالعه و بازبینی مقاله

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

حامی مالی

حمایت مالی از این پژوهش از طرف دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی در قالب پژوهانه پایان‌نامه دانشجویی نویسنده اول و همچنین پژوهانه برای سایر نویسندگان انجام شده است.

References

- Abkhoo J, Mehraban A. Genetic Diversity of Tomato Leaf Curl Palampur Virus and Its Whitefly Vector, Bemisia Tabaci, in the Sistan Region. *Journal of Microbial World*. 2020; 13(13): 290–99 (In Persian).
- Ahmadi K, Ebadzade H, Hatami F, Abas-Taghani R. Statistics of Agricultural and Horticultural Products. Ministry of Agriculture. Publications of the Planning and Program Department of the Ministry of Agricultural Jihad. 2023; 18–22.
- Ameri M, Ayazpour K. Molecular Analysis of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Fars Province, Iran. *Indian Phytopathology*. 2022; 75 (1): 197–201.
- Arif M, Farooq S, Alasmari A, Alshehri MA, Hashem M, Alamri S, Hemeg H, Alabdallah N. Molecular

- Study of Geminiviruses: Complex Biology, Host-Vector Interactions, and Increasing Diversity. *Journal of King Saud University-Science*. 2022; 34 (4): 102051.
- Astaraki S, Shams-bakhsh M. Screening for Tomato Leaf Curl Palampur Virus Resistance in Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Cultivars through Phytochemical Characterization and Enzyme Activity Analysis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2023; 126: 102043.
- Bananej, K. Introduction and Management of Tomato Yellow Leaf Curl Disease. *Applied Entomology and Phytopathology*. 2016; 84 (1): 157–74.
- Brandenberger L, Shrefler J, Rebek E, Damicone J. *Cucumber Production*. 2021.
- De Barro PJD, Liu SS, Boykin L, Adam BD. Bemisia Tabaci: A Statement of Species Status. *Annual Review of Entomology*. 2013; 56: 1–19.
- 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.
- Esmaili M, Heydarnejad J, Massumi H, Varsani A. Analysis of Watermelon Chlorotic Stunt Virus and Tomato Leaf Curl Palampur Virus Mixed and Pseudo-Recombination Infections. *Virus Genes*. 2015; 51: 408–16.
- Fazeli R, Heydarnejad J, Massumi H, Shaabani M, Varsani A. Genetic Diversity and Distribution of Tomato-Infecting Begomoviruses in Iran. *Virus Genes*. 2009; 38: 311–19.
- Heydarnejad J, Khosrowfar F, Razavinejad S, Massumi H, Tabatabaei Fard SJ. Incidence of Watermelon Chlorotic Stunt Virus in Fars and Kerman Provinces. In Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress. Tehran. 2010; Vol. 672 (In Persian).
- Heydarnejad J, Hesari M, Massumi H, Varsani A. Incidence and Natural Hosts of Tomato Leaf Curl Palampur Virus in Iran. *Australasian Plant Pathology*. 2013; 42: 195–203.
- Heydarnejad J, Mozaffari A, Massumi H, Fazeli R, Alistair JA, Meredith S, Lakay F, Dionne N, Darren PM, Varsani A. Complete Sequences of Tomato Leaf Curl Palampur Virus Isolates Infecting Cucurbits in Iran. *Archives of Virology*. 2009; 154: 1015–18.
- Jelavi Z, Pakbaz S, Gharouni Kardani S, Darvishnia M. The First Report of Tomato Leaf Curl Palampur Virus (ToLCPMV) from the Watermelon Fields in the North of Khouzestan Province. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*. 2022; 11 (1): 72–84.
- Muhire BM, Varsani A, Darren PM. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PloS One*. 2014; 9 (9): e108277.
- Newton LE, Eggli U. Cucurbitaceae. In *Dicotyledons: Rosids*. 2022; 1–10. Springer.
- Pakbaz S, Jelavi Z, Hasanvand E, Mirzaei Najafgholi H. Molecular Detection and Determination of Phylogenetic Position of Watermelon Chlorotic Stunt Virus Khouzestan Isolate Based on Coat Protein Gene. *Journal of Genetic Resources*. 2024; 10 (1): 98–108.
- Ramazani MA, Ayazpour K, Niazmand AR, Najafipour G. Begomoviruses of Solanaceae in the Southern Provinces of Iran. 2022a; 70-89.
- Ramazani MA, Ayazpour K, Niazmand AR, Najafipour G. Detection of Begomoviruses of Solanaceae Crops in Southern Iran. *Indian Phytopathology*. 2022b; 75 (4): 1137–42.
- Rojas, M. R. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, 77(4), 340.
- Rostami F, Pakbaz S, Darvishnia M. The First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)

- Occurrence in Tomato Greenhouses of Lorestan Province. *Journal of Genetic Resources*. 2023; 20–28.
- Sabouri M, Heydarnejad J. Construction and Demonstration of Infectivity of the Infectious Clone of the Bipartite Genome of Tomato Leaf Curl Palampur Virus-Iranian Isolate. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 2013; 49 (4): 403–9 (*In Parsian*).
- Shahid M, Abdullah M Al-Sadi. First Identification of Tomato Leaf Curl Palampur Virus in Oman: Detection and Characterization. *Journal of Plant Protection Research*. 2022; 295–301.
- Zhang Y, Uyemoto JK, Kirkpatrick B. A Small-Scale Procedure for Extracting Nucleic Acids from Woody Plants Infected with Various Phytopathogens for PCR Assay. *Journal of Virological Methods*. 1998; 71 (1): 45–50.