

تعیین ویژگی‌های مولکولی و پراکنش جغرافیایی ویروس کوتولگی سبزرده نخود در ایران

بلدا سخن سنج^۱، کاوه بنانج^{۲*}، فرشاد رخشنده رو^۱، علی آهون منش^۳

۱- گروه گیاه‌پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- بخش تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- موسسه آموزش عالی صنعتی فولاد، فولادشهر، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۸)

چکیده

ویروس کوتولگی سبزرده نخود (*Chickpea chlorotic dwarf virus*, CpCDV) از جنس *Mastrevirus* تیره *Geminiviridae*، از مهمترین عوامل ویروسی همراه با عارضه زردی نخود می‌باشد. در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ تعداد ۲۴۸ نمونه نخود و عدس با نشانه زردی از پنج استان لرستان، کرمانشاه، زنجان، آذربایجان شرقی و غربی انتخاب و از طریق آزمون TBIA و PCR بررسی شدند. استخراج دی‌ان‌ای از نمونه‌های آلوده انجام و از طریق روش دایره غلطان (RCA) تغلیظ و پس از هضم آنزیمی محصول (RCA) با استفاده از آنزیم برشی *Xho I*، قطعات با اندازه حدود ۲/۶ کیلو جفت باز روی ژل آگاروز مشاهده شد. با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی و انجام PCR، قطعه ۹۶۰ جفت بازی تکثیر و پس از همسانه‌سازی، تعیین ترادف گردید. نتایج آزمون TBIA و PCR نشان‌دهنده پراکنش ویروس CpCDV در هر پنج استان بود. بیشترین میزان آلودگی در میزبان نخود مشاهده شد. مقایسه ترادف قطعه ژنومی جدایه‌های ایرانی CpCDV نشانگر بیشترین یکسانی با سویه A، D و F از کشورهای هند، پاکستان و یمن بود. آنالیز تبارزائی نشانگر هم گروهی جدایه‌های ایرانی با سویه‌های D (جدایه‌های سودان، مراکش، هند و پاکستان (گروه III تبارزائی)، سویه F (جدایه‌های سودان، عمان، سوریه، یمن و پاکستان (گروه IV تبارزائی) و سویه A (جدایه‌های تونس، مصر، سوریه و ترکیه (گروه V تبارزائی) بود.

واژه‌های کلیدی: زردی نخود، پراکنش جغرافیایی، ویروس کوتولگی سبزرده نخود

Molecular characterization and geographical distribution of *Chickpea chlorotic dwarf virus* in IranY. SOKHANSANJ¹, K. BANANEJ^{2*}, F. RAKHSHANDEHROO¹, A. AHOONMANESH³

1. Department of Plant Protection, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Plant Virus Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; 3. Foulad Institute Technology (FIT), Foulad-shahr, Isfahan-Iran

Abstract

Chickpea chlorotic dwarf virus (CpCDV, genus *Mastrevirus*, family *Geminiviridae*) is one of the most important viral agents which associated with yellowing symptom in the chickpea fields. During the surveys, 2015-2016, 248 chickpea and lentil plant samples showing yellowing symptom were collected from five provinces: Lorestan, Kermanshah, Zanjan, East and West Azarbaijan, in Iran. The samples were tested to CpCDV infection, using TBIA and positive samples in TBIA were tested by PCR. Total DNA of positive samples were extracted and enriched using rolling-circle amplification (RCA). RCA products were restricted using *Xho I* enzyme and yielding products of ~2.5-6 kb. These fragments were used for polymerase chain reaction (PCR), using specific primers for RepA protein of CpCDV. PCR amplicons with an expected size of ~960 bp were amplified, cloned and sequenced. TBIA and PCR results showed the presence of CpCDV infection in all surveyed provinces with the highest infection in chickpea plants. Nucleotide sequence comparisons showed that Iranian isolates shared the highest identity to strain A, D and F from India, Pakistan, and Yemen. Phylogenetic analyses showed that Iranian CpCDV strains were grouped with Sudan, Morocco, India, and Pakistan (strain D, group III), Sudan, Oman, Yemen, and Pakistan (strain F, Group IV), and Tunisia, Egypt, Syria, and Turkey (strain A, group V).

Keywords: *Chickpea chlorotic dwarf virus*, chickpea yellowing symptom, geographical distribution.

* Corresponding author: k_bananej@yahoo.com

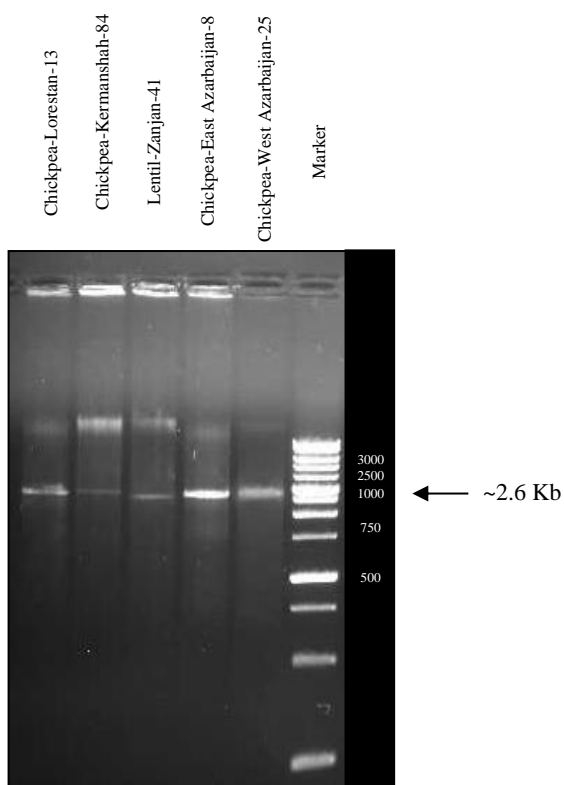
مقدمه

al., 2002; Mumtaz et al., Kumari et al., 2004; Makkouk et al., 2011; Akhtar et al., 2013; Nahid et al., 2008; Ouattara et al., 2017; Fiallo-Olive et al., 2017). ویروس کوتولگی سبزرده نخود دارای دامنه میزبانی وسیع تری نسبت به سایر گونه‌های ماستروویروس آلوده کننده گیاهان دولپه‌ای می‌باشد. این ویروس تاکنون در ۱۱ خانواده گیاهی مختلف شامل *Cucurbitaceae*, *Brassicaceae*, *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Leguminosae*, *Fabaceae*, *Chenopodiaceae*, *Caricaceae*, *Malvaceae* و *Pedaliaceae* *Solanaceae* ردیابی شده است (Kanakala and Kuria, 2019). ویروس کوتولگی سبزرده نخود به سرعت در حال گسترش به مناطق جغرافیایی جدید و ایجاد آلودگی در میزبان‌های جدید است به گونه‌ای که در سال‌های اخیر گزارشات متعدد از آلودگی به این ویروس در میزبان‌های مختلف از قبیل کدو (مصر)، هندوانه (تونس)، چغندر قند (ایران) گوجه‌فرنگی، خیار، بامیه و اسفناج (پاکستان) و پاپایا (نیجریه و بورکینافاسو) ثبت شده است (Zia-Ur-Rehman et al., 2017; Hamza et al., 2018; Fahmy et al., 2017; al., 2015; Farzadfar et al., 2008; Zaaguari et al., 2017; Ouattara et al., 2017). پس از گزارش ویروس کوتولگی سبزرده نخود از ایران (Makkouk et al., 2002)، ژنوم تعدادی از جدایه‌های مذکور (۹ جدایه، بدون ذکر محل نمونه‌برداری) به‌طور کامل تعیین توالی شده (GenBank, Acc. No. KC172653-61) که همگی آنها سویه (A) تشخیص داده شده‌اند (Kraberger et al., 2015).

روش بررسی

نمونه برداری: در سال زراعی ۹۵-۹۴ از برخی مزارع نخود و عدس در استان‌های لرستان (الشتر، نورآباد، خرم آباد، فیروزآباد، زاغه و بروجرد) و کرمانشاه (روانسر، کنگاور، هرسین، سرارود، کرند و اسلام آباد)، زنجان (قیدار و زرین آباد)، آذربایجان شرقی (هشترود و قره‌آغاج) و آذربایجان غربی (ارومیه، سرو، نقده و مهاباد)، بازدید و تعداد ۲۴۸

خاورمیانه، شمال آفریقا و شبه قاره هند از تولید کنندگان اصلی نخود (*Cicer arietinum*)، باقلا (*Vicia faba*) و عدس (*Lens culinaris*) هستند. نخود (*C. arietinum*) پس از لوبیا و نخود فرنگی رتبه سوم اهمیت را در بین حبوبات دارد. هندوستان بزرگترین تولید کننده نخود و استرالیا و میانمار (به ترتیب) رتبه‌های دوم و سوم تولید نخود را در دنیا دارند. ایران با تولید ۲۷۱۴۸۷ تن محصول نخود در سال ۲۰۱۷ رتبه نهم را در دنیا به خود اختصاص داده است (FAOSTAT, 2017). بر مبنای آخرین آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی بیشترین میزان تولید نخود در ایران به ترتیب در استان‌های کرمانشاه، لرستان، آذربایجان غربی، کردستان و آذربایجان شرقی می‌باشد (Anonymous, 2017). ویروس کوتولگی سبزرده نخود (*Chickpea chlorotic dwarf virus*, CpCDV) به‌عنوان یکی از مهم ترین عوامل کاهش میزان محصول نخود قادر به کاهش میزان محصول بین ۷۵ تا ۹۵ درصد می‌باشد (Kanakala and Kuria, 2019). ویروس (CpCDV) از اعضای جنس ماستروویروس (*Mastrevirus*) در تیره ویروس‌های دوقلو (*Geminiviridae*)، توسط زنجیره‌ها (*Hemiptera*, *Cicadelidae*) از قبیل (*Orosius orientalis* and *O. albicinctus*) انتقال می‌یابد (Horn et al., 1994; Akhtar et al., 2011; Kumari et al., 2004). پراکنش ویروس تا سال ۱۹۹۴ میلادی محدود به شبه قاره هند بود ولی در سال‌های بعد از بسیاری از مناطق دنیا خاورمیانه و آفریقا گزارش شده است. تاکنون ۱۹ سویه مختلف از این ویروس (A تا S) گزارش شده است (Kanakala and Kuria, 2019). سویه‌های مختلف ویروس CpCDV تاکنون از کشورهای هند (C و D)، پاکستان (B, C, D, F, H و L)، سودان (C, D, E, F, H, I, J, K, M, N, O و P)، سوریه (A و F)، ترکیه (A)، مصر (A)، ایران (A)، تونس (A و H)، مراکش (D)، عمان (F)، یمن (F)، اریتره (F, H, I و K)، بورکینافاسو (Q) و آفریقای جنوبی (B) و نیجریه (S) گزارش شده است (Horn et al., 1994; 1995; Kraberger et al., 2013; 2015;)



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی دی‌ان‌ای تغلیظ شده به روش دایره غلطان و واکنش هضم آنزیمی محصول RCA با آنزیم برشی *XhoI* قطعاتی به‌اندازه ۲/۶ kb در هر راهک مشاهده می‌شود. نام میزبان و جدایه در بالای هر راهک نشان داده شده است. نشانگر: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb)

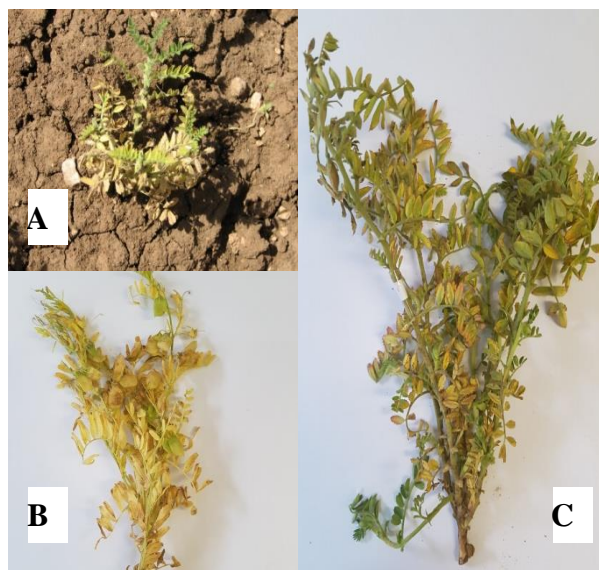
Fig. 2. Electrophoresis pattern of RCA products and digestion using *XhoI* restriction enzyme of Iranian CpCDV isolates. Name of the host and isolate showed at the top of the each lane, respectively. Marker: DNA ladder (SMOBio, 1 Kb).

براساس اطلاعات موجود در GenBank، CpCDV تاکنون از کشورهای ایران، مصر، ترکیه، سوریه، تونس، پاکستان، آفریقای جنوبی، هند، سودان، مراکش، عمان، اریتریا، یمن، بورکینافاسو و نیجریه گزارش و تعیین توالی شده است. با توجه به این اطلاعات، در ایران تاکنون تنها سویه A این ویروس از میزبان نخود تعیین ترادف شده است (Kraberger, et al., 2013). تکثیر و تعیین توالی جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق و مقایسه آن با توالی‌های موجود در بانک ژن GenBank نشانگر احتمال وجود سویه‌های D و F علاوه بر سویه A در ایران بود (جدول ۳).

نمونه با نشانه‌های زردی و کوتولگی شبیه به آلودگی به ویروس کوتولگی سبزرده نخود (شکل ۱) جمع‌آوری و پس از ثبت نشانه‌های هر نمونه، محل و تاریخ جمع‌آوری آنها (جدول ۱) ثبت و روی یخ به آزمایشگاه منتقل و در شرایط دمایی ۴ درجه سلسیوس تا هنگام انجام آزمایش‌های مربوطه نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction) با

استفاده از دی‌ان‌ای تغلیظ شده اختصاصی ویروس: نتایج به‌دست آمده از PCR با استفاده از دی‌ان‌ای تغلیظ شده اختصاصی ویروس (RCA product) و هم‌چنین جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده در این تحقیق (جدول ۲) برای تکثیر بخشی از ژن تولیدکننده پروتئین Rep A ویروس کوتولگی سبزرده نخود، قطعات با اندازه‌ای در حدود ۹۶۰ جفت باز (bp) تکثیر شد که نشانگر جدایه‌های ایرانی و ویروس CpCDV بود (شکل ۳).



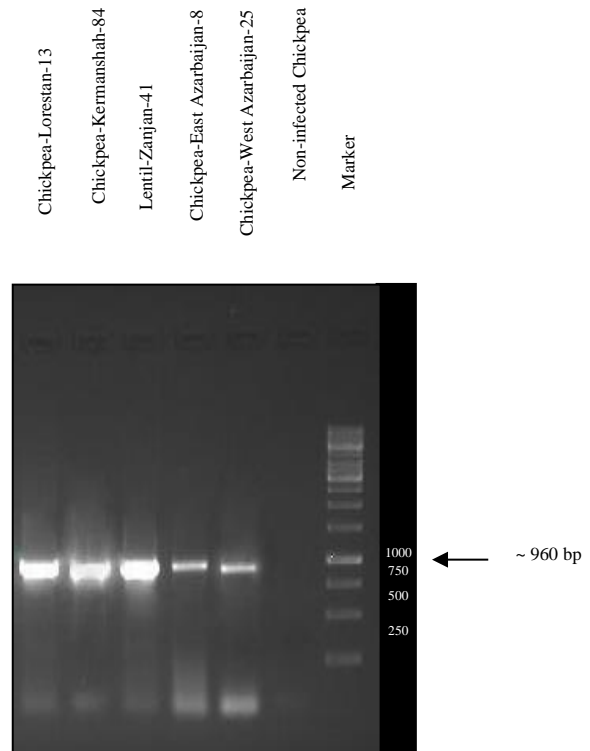
شکل ۱- (A) علائم زردی و کوتولگی مشاهده شده در مزرعه نخود (B) علائم زردی و کوتولگی در میزبان عدس (C) علائم قرمزی حاشیه برگ در میزبان نخود.

Fig. 1. Yellowing and stunting symptoms in chickpea field (A). Yellowing and stunting symptoms in lentil plant (B). Reddening symptoms in chickpea plant (C).

(جدول ۴) با استفاده از موتور جستجوگر NBLAST در NCBI انجام پذیرفت. نتایج نشان دهنده میزان یکسانی ۸۴-۹۹ درصد در ترادف نوکلئوتیدی و ۶۴-۹۹ درصد یکسانی در ترادف آمینواسیدی جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن از سویه‌های مختلف ویروس کوتولگی سبزرده نخود بود. نتایج به دست آمده بیانگر بیشترین یکسانی جدایه‌های C-LOR13، C-KER13، C-AZW5، C-AZW25، C-AZW33 و C-AZE8 با سویه A، دو جدایه C-ZAN40، L-ZAN41 با سویه D، و چهار جدایه C-KER84، C-KER94، C-ZAN35 و L-ZAN35 با سویه F ویروس بود (جدول ۴).

سویه A جدایه‌های ایرانی در این تحقیق به میزان ۹۹ درصد در ترادف نوکلئوتیدی و ۹۸-۹۹ درصد در ترادف آمینواسیدی با سایر جدایه‌های ثبت شده از این سویه در کشورهای مصر، ترکیه، سوریه، تونس و ایران یکسانی داشتند. همچنین بیشترین میزان یکسانی جدایه‌های C-Lor13، C-Ker13، C-AzW5، C-AzW25، C-AzW33 در ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی (۹۹ درصد) با دو جدایه ایرانی (KR014247 و Acc.No. KC172660) بود و در مقایسه با سایر کشورها، جدایه‌های ایرانی دارای بیشترین میزان یکسانی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی (۹۹ درصد و ۹۸-۹۹ درصد به ترتیب) با جدایه کشور ترکیه (Acc. No. KC172662) بودند (جدول ۴).

سویه D دو جدایه ایرانی (L-Zan41 و C-Zan40) به میزان ۹۹-۹۷ درصد در ترادف نوکلئوتیدی و ۹۷ درصد در ترادف آمینواسیدی با سایر جدایه‌های ثبت شده از این سویه در کشورهای پاکستان، هند، سودان و مراکش یکسان بودند. نتایج همچنین بیانگر کمترین میزان یکسانی نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی با جدایه کشور سودان (Acc. No. KM229787) (۹۷ درصد) در مقایسه با جدایه‌های کشورهای پاکستان، هند و مراکش (۹۹ درصد یکسانی در ترادف نوکلئوتیدی) بود (جدول ۴).

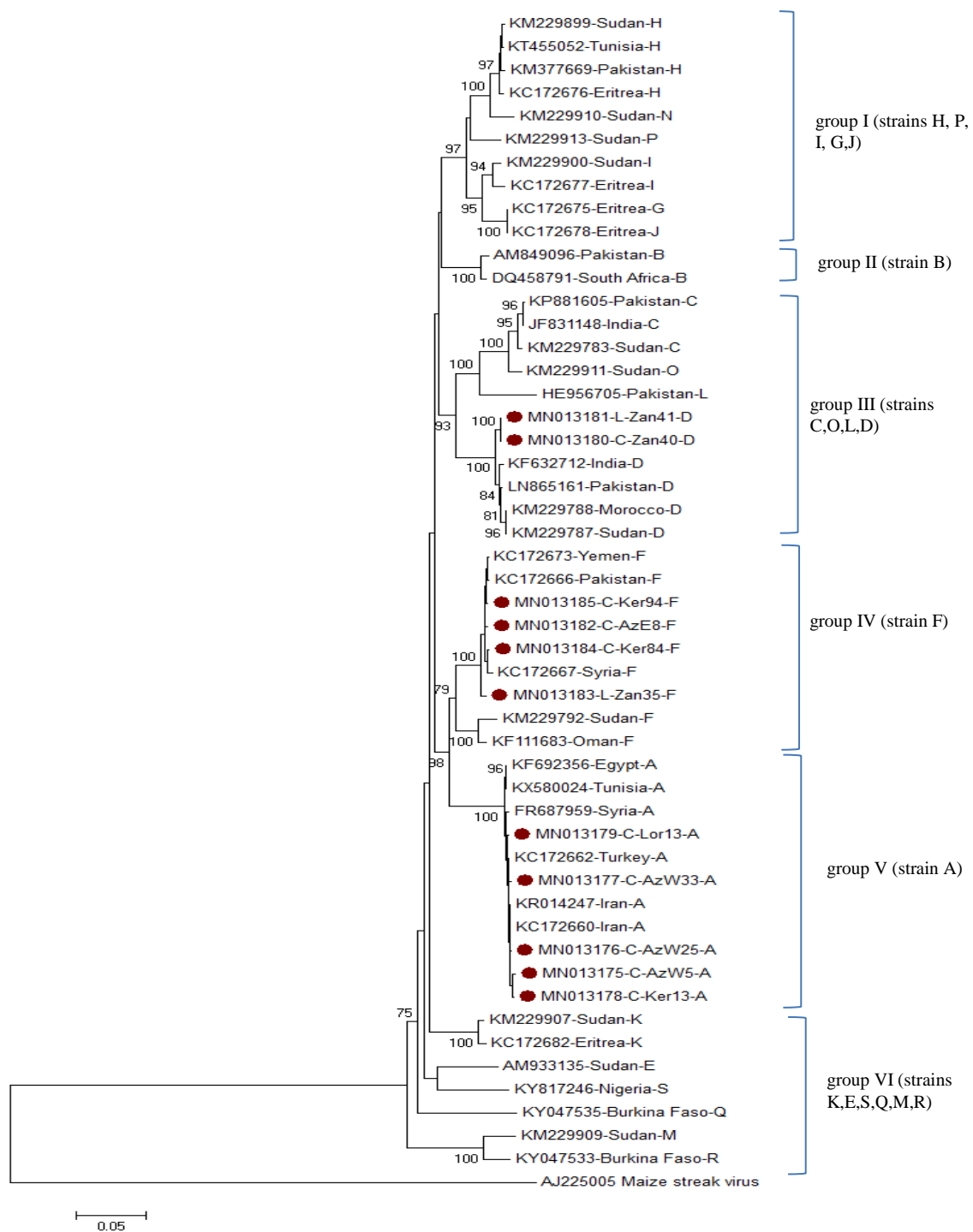


شکل ۳- نقوش الکتروفورزی قطعات ۹۶۰ جفت بازی تکثیر شده از ژن Rep A جدایه‌های ایرانی CpCDV با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده در این تحقیق. نام میزبان و جدایه در بالای هر راهک نشان داده شده است. نشانگر: DNA ladder (SMOBio, 1 Kb).

Fig. 3. Electrophoresis pattern of 960 bp amplified fragments of RepA gene of Iranian CpCDV isolates using specific primers designed in this study, name of the amplified fragments, host, and isolate showed at the top of the each lane, respectively. Marker: DNA ladder (SMOBio, 1 Kb).

آنالیز تبارزایی و موقعیت تاکسونومیکی جدایه‌های ایرانی

ویروس کوتولگی زرد نخود: ترادف نوکلئوتیدی ۱۱ جدایه ایرانی به دست آمده در این تحقیق در بانک ژن با رس‌شماره‌های MN013175 تا MN013185 ثبت گردید. استرین، منطقه جغرافیایی، میزبان و رس‌شماره‌های هر جدایه به تفکیک در جدول ۳ آمده است. مقایسه ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این جدایه‌ها با سایر ترادف‌های ثبت شده در GENBANK (یک جدایه از هر کشور و از هر سویه ثبت شده در بانک ژن)



شکل ۴- دندروگرام حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژن RepA جدایه‌های ویروس کوتولگی زرد نخود (CpCDV) با تعدادی از ترادف‌های نوکلئوتیدی ثبت شده از این ویروس با استفاده از نرم افزار MEGA6. اعداد کنار شاخه‌ها درصد ارزش Bootstrap در میان ۱۰۰ تکرار را نشان می‌دهند. شاخه‌ها با درصد ارزش Bootstrap پایین تر از ۷۵ حذف گردیدند. از ویروس *Maize streak virus* به عنوان ویروس خارج از گروه (outgroup) استفاده شد.

Fig. 4. Phylogenetic tree obtained from the alignment of nucleotide sequences (RepA) of chickpea chlorotic dwarf virus (CpCDV) isolates and other isolate of this virus using MEGA6 program. Numbers on the branches indicate bootstrap percentage. Branches with <75 % bootstrap value were collapsed. In Phylogenetic analysis *Maize streak virus* (MSV) were used as outgroup

جدول ۱- بررسی آلودگی ویروس کوتولگی زرد نخود CpCDV با استفاده از آزمون سرولوژیکی TBIA برای نمونه‌های جمع آوری شده از استان‌های لرستان، کرمانشاه، زنجان، آذربایجان شرقی و غربی

Table 1. Incidence of CpCDV obtained by TIBA serological test for chickpea and lentil samples collected from Lorestan, Kermanshah, Zanjan, East and West Azerbaijan provinces.

Infected samples (Total)	Selected samples (Total)	Host				Region	Province
		Lentil		Chickpea			
		Infected samples	Selected samples	Infected samples	Selected samples		
4	17	1	6	3	11	Nourabad	Lorestan
2	11	-	-	2	11	Alashtar	
1	12	0	2	1	10	Khorrarnabad	
3	12	-	-	3	12	Firouzabad	
0	13	-	-	0	13	Zagheh	
1	13	-	-	1	13	Boroujerd	
11	78	1	8	10	70	6	Total
8	18	-	-	8	18	Ravansar	Kermanshah
6	16	1	4	5	12	Kangavar	
4	12	-	-	4	12	Hersin	
2	15	0	2	2	13	Sararoud	
2	10	-	-	2	10	Kerend	
2	15	-	-	2	15	Eslamabad	
24	86	1	6	23	80	6	Total
3	13	1	5	2	8	Zarrinabad	Zanjan
4	19	2	9	2	10	Gheydar	Total
7	32	3	14	4	18	2	
2	11	0	4	2	7	Hashtroud	East Azarbaijan
1	5	-	-	1	5	Ghareh-Aghaj	
3	16	0	4	3	12	2	Total
3	11	-	-	3	11	Orumiyeh	West Azarbaijan
1	6	-	-	1	6	Seru	
3	9	-	-	3	9	Mahabad	
5	10	-	-	5	10	Naghadeh	
12	36	-	-	12	36	4	Total

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق برای ردیابی ویروس کوتولگی سبزرده نخود.

Table 2. Characteristics of primers used in this study for detection of CpCDV.

Primer	Sequence	Size (bp)	Nucleotide position
CDV-s2710	5'-GAGAGGCACGTTTCAGTGACT-3'	~960	1305-1324
CDV-as710	5'-TGAGCTTCATCAAGATGGCA-3'		2241-2260

جدول ۳- مشخصات جدایه‌های ایرانی ویروس کوتولگی سبزرده نخود تعیین ترادف شده در این تحقیق.

Table 3. Characteristics of Iranian isolates of CpCDV, which were sequenced in this study

Isolate name	Host	Region	Similar to strain	Accession number
C-Lor13	<i>C.arietinum</i>	Lorestan- Firouz abad	A	MN013179
C-Ker13	<i>C.arietinum</i>	Kermanshah- Kangavar	A	MN013178
C-Ker84	<i>C.arietinum</i>	Kermanshah- Ravansar	F	MN013184
C-Ker94	<i>C.arietinum</i>	Kermanshah- Hersin	F	MN013185
L-Zan35	<i>L.culinaris</i>	Zanjan- Zarin abad	F	MN013183
C-Zan40	<i>C.arietinum</i>	Zanjan- Gheydar	D	MN013180
L-Zan41	<i>L.culinaris</i>	Zanjan- Gheydar	D	MN013181
C-AzE8	<i>C.arietinum</i>	East Azarbaijan- Hashtroud	F	MN013182
C-AzW5	<i>C.arietinum</i>	West Azarbaijan- Mahabad	A	MN013175
C-AzW25	<i>C.arietinum</i>	West Azarbaijan- Naghadeh	A	MN013176
C-AzW33	<i>C.arietinum</i>	West Azarbaijan- Orumiyeh	A	MN013177

جدول ۴- مشخصات جدایه‌های مورد استفاده در آنالیز تبارزایی و درصد یکسانی با جدایه‌های ایرانی ویروس CpCDV با استفاده از موتور جست و جوگر nBlast

Table 4. Characteristics of Isolates used phylogenetic analyses and percentage of sequence identity with CpCDV Iranian isolates using nBlast.

CpCDV isolates			Iranian CpCDV isolates																					
			C-Lor13		C-Ker13		C-AzW5		C-AzW25		C-AzW33		C-Zan40		L-Zan41		C-Ker84		C-Ker94		L-Zan35		C-AzE8	
Acc.number	Country	Strain	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
KR014247	Iran	A	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	89	75	89	75	93	82	93	82	93	83	93	83
KC172660	Iran	A	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	89	78	89	78	93	83	93	83	93	83	93	83
KF692356	Egypt	A	99	98	99	98	99	98	99	98	99	98	89	75	89	75	93	83	93	83	94	83	93	83
KC172662	Turkey	A	99	99	99	99	99	98	99	99	99	99	89	78	89	78	93	82	93	82	93	83	93	83
FR687959	Syria	A	99	99	99	98	99	98	99	99	99	99	90	75	90	75	93	82	93	82	94	83	93	83
KX580024	Tunisia	A	99	98	99	98	99	98	99	98	99	98	89	75	89	75	93	83	93	83	93	83	93	83
AM849096	Pakistan	B	90	76	89	73	89	73	90	74	90	74	90	78	90	78	92	82	92	83	93	83	92	82
DQ458791	South Africa	B	91	76	90	73	90	73	90	73	90	74	90	78	90	78	93	82	94	83	94	83	93	82
KP881605	Pakistan	C	89	74	86	69	86	69	87	69	86	69	91	79	91	79	91	76	91	79	91	78	91	79
JF831148	India	C	89	74	86	69	87	70	87	70	87	69	90	78	90	78	91	76	92	79	92	78	91	79
KM229783	Sudan	C	90	75	88	74	88	74	88	74	88	74	90	81	90	81	91	80	92	80	92	80	92	80
LN865161	Pakistan	D	90	77	89	74	89	74	89	74	89	73	99	97	99	97	92	79	92	79	92	80	91	78
KF632712	India	D	90	76	89	73	89	73	89	73	89	72	99	97	99	97	92	79	92	80	92	80	92	79
KM229787	Sudan	D	90	78	88	77	88	77	89	78	88	77	97	97	97	97	91	80	91	81	91	81	91	80
KM229788	Morocco	D	90	78	89	77	89	77	89	78	89	77	99	97	99	97	91	80	92	81	92	81	91	80
AM933135	Sudan	E	89	73	88	71	88	71	88	71	88	71	90	75	90	75	91	78	91	78	91	78	91	77
KC172666	Pakistan	F	93	82	93	81	93	80	93	81	93	82	90	79	90	79	99	98	99	99	99	98	99	99
KM229792	Sudan	F	92	82	92	81	92	80	92	81	92	82	89	75	89	75	95	88	94	88	95	89	94	89
KF111683	Oman	F	92	83	92	82	92	82	92	82	92	83	89	73	89	73	95	90	94	90	95	91	94	90
KC172673	Yemen	F	93	83	93	81	93	81	93	82	93	82	90	79	90	79	99	99	99	99	99	98	99	99
KC172667	Syria	F	92	82	92	80	92	80	92	80	92	82	89	79	89	79	99	99	99	99	98	98	98	98
KC172675	Eritrea	G	93	67	93	68	93	70	93	70	93	70	90	69	90	69	95	72	95	72	95	72	95	72
KM377669	Pakistan	H	90	76	89	75	89	75	89	75	89	75	91	79	91	79	92	81	92	81	92	81	91	81
KC172676	Eritrea	H	92	76	90	75	90	75	90	75	91	75	91	79	91	79	92	82	93	82	93	81	92	81
KT455052	Tunisia	H	90	77	89	75	89	75	89	75	89	75	90	76	91	79	91	79	92	82	92	81	92	81
KM229899	Sudan	H	90	77	89	75	89	75	89	75	89	75	90	75	92	79	92	81	92	81	92	81	92	81
KC172677	Eritrea	I	90	76	88	74	88	74	89	74	89	74	90	77	90	77	92	83	92	83	91	83	91	83
KM229900	Sudan	I	91	77	90	75	90	75	90	75	90	75	90	79	90	79	93	83	93	83	93	83	92	83
KC172678	Eritrea	J	91	67	89	68	90	70	90	70	90	70	91	69	91	69	92	72	92	72	92	72	92	72
KC172682	Eritrea	K	91	78	89	76	89	75	89	76	89	76	90	77	90	77	92	82	92	83	92	83	92	83
KM229907	Sudan	K	91	78	89	77	89	77	89	77	89	77	90	77	90	77	92	82	92	83	92	83	92	83
HE956705	Pakistan	L	88	72	86	68	86	68	86	68	86	68	89	74	89	74	90	73	90	75	90	75	90	75
KM229909	Sudan	M	85	65	84	64	85	64	85	64	85	64	86	66	86	66	86	66	86	66	86	66	85	66
KM229910	Sudan	N	89	75	88	73	88	74	88	74	88	74	89	79	89	79	91	82	92	82	92	81	91	81
KM229911	Sudan	O	89	76	88	74	88	74	88	74	88	74	90	81	90	81	91	79	92	80	91	80	91	80
KM229913	Sudan	P	91	77	89	75	89	74	89	75	89	75	90	76	90	76	93	85	93	84	93	84	93	84
KY047535	Burkina Faso	Q	88	73	87	71	87	71	87	71	87	71	86	69	86	69	88	73	88	72	88	73	88	72
KY047533	Burkina Faso	R	86	67	86	64	86	64	86	64	86	64	87	68	87	68	86	66	86	67	86	67	86	67
KY817246	Nigeria	S	89	71	88	68	88	68	88	68	88	69	89	72	89	72	91	73	91	74	91	74	90	74

در زیر گروه اول و جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق در کنار دو جدایه ایرانی (KR014247 و Acc.No. KC172660) و جدایه‌های ثبت شده از کشورهای ترکیه (Acc.No. FR687959) و سوریه (Acc.No. KC172662) در زیر گروه دوم از گروه پنجم قرار گرفتند (شکل ۴).

بر مبنای نتایج به دست آمده از مقایسه ترادف‌ها و آنالیز تبارزایی، از میان سه سویه A، F و D در جدایه‌های مورد بررسی، بیشترین و کمترین میزان تنوع ژنتیکی به ترتیب در سویه‌های F و A ویروس مشاهده شد (جدول ۴ و شکل ۴). همچنین دو سویه M و R دارای کمترین میزان یکسانی در ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی (به ترتیب ۸۶-۸۴ درصد و ۶۶-۶۴ درصد برای سویه M و ۸۷-۸۶ درصد و ۶۸-۶۴ درصد برای سویه R) با جدایه‌های مورد بررسی بوده (جدول ۴) و در آنالیز تبارزایی نیز با فاصله بیشتری نسبت به سایر سویه‌ها قرار گرفتند (شکل ۴).

نتایج حاصل از محاسبه فاصله ژنتیکی در درون و بین سویه‌های A، F و D برای قطعه ۹۶۰ جفت بازی تولید کننده بخشی از ژن Rep A با استفاده از نرم افزار Mega6 (Tamura et al., 2013) بیانگر بالاتر بودن فاصله ژنتیکی بین سویه‌ها (گروه‌ها) (به ترتیب ۰/۰۷۵، ۰/۰۹۶ و ۰/۱۰۱ بین F، A و F، A و D) نسبت به فاصله ژنتیکی در درون سویه‌ها (گروه‌ها) (به ترتیب ۰/۰۳۷، ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۷ برای سویه‌های F، A و D) بود که نشان‌دهنده تفکیک و تمایز این گروه‌ها بر مبنای این بخش از ژنوم ویروس کوتولگی سبزرده نخود می‌باشد (جدول ۵).

از سال ۱۹۹۳ که برای اولین بار ویروس کوتولگی سبزرده نخود از مزارع نخود در هندوستان شناسایی شد (Horn et al., 1993)، تاکنون در بسیاری از کشورهای آفریقایی و خاورمیانه گزارش شده است و همچنان به‌عنوان یک تهدید بسیار جدی برای لگوم‌ها به ویژه محصول نخود محسوب می‌شود. این ویروس به دلیل داشتن ناقل پلی‌فاژ و گسترده در جهان، به سرعت در حال گسترش در میزبان‌ها و مناطق مختلف می‌باشد. از

سویه F جدایه‌های ایرانی (C-Ker84، C-Ker94، L-Zan35 و C-Aze8) به میزان ۹۹-۹۴ درصد در ترادف نوکلئوتیدی و ۹۹-۸۸ درصد در ترادف آمینواسیدی با سایر جدایه‌های ثبت شده از این سویه در کشورهای پاکستان، سودان، عمان، یمن و سوریه یکسان بودند. نتایج نشان‌دهنده بیشترین میزان یکسانی جدایه‌های ایرانی در ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی (به ترتیب ۹۹ و ۹۸-۹۹ درصد) با جدایه کشورهای پاکستان (Acc. No. KM229787) و یمن (Acc. No. KM229787) بود (جدول ۴).

دندروگرام رسم شده حاصل از مطالعات تبارزایی (شکل ۴) نشان داد که جدایه‌های ثبت شده از نوزده سویه ویروس کوتولگی سبزرده نخود در کشورهای مختلف، در ۶ گروه اصلی قرار گرفتند. گروه I شامل جدایه‌های ثبت شده از سویه‌های H، N، P، I، G و J، گروه II شامل جدایه‌های ثبت شده از سویه B، گروه III شامل جدایه‌های ثبت شده از سویه‌های C، O، L و D ویروس بود. سویه F در گروه IV، A در گروه V و سویه‌های K، E، S، Q، M و R در گروه VI قرار گرفتند (شکل ۴). مطالعات تبارزایی نشان‌دهنده وجود سویه‌های C، O و L در زیر گروه اول و سویه D در زیر گروه دوم از گروه سوم بود. در جدایه‌های ثبت شده از سویه D جدایه‌های ایرانی زیر گروهی جداگانه از جدایه‌های کشورهای هند، پاکستان، مراکش و سودان (به ترتیب KF632712، LN865161، KM229788 و KM229787) تشکیل دادند. دندروگرام رسم شده نشان داد که جدایه‌های ثبت شده از سویه F ویروس به دو زیر گروه طبقه بندی شدند که جدایه‌های ایرانی به همراه جدایه کشورهای سوریه، یمن و پاکستان (به ترتیب KC172667، KC172673 و Acc.No. KC172666) در زیر گروه اول و جدایه کشورهای سودان و عمان (به ترتیب KM229792 و KF111683) در زیر گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۴). دندروگرام رسم شده در سویه A ویروس نشان داد که دو جدایه ثبت شده از کشور تونس (Acc.No. KX580024) و مصر (Acc.No. KF692356)

وجود گزارشات مبنی بر حضور ویروس کوتولگی سبزدرد نخود در کشورهای از قبیل ترکیه، سوریه، پاکستان، یمن و عمان احتمال انتقال سویه‌های مختلف ویروس در بین این کشورها وجود دارد. از طرف دیگر با توجه به سابقه طولانی کشت نخود در ایران و وجود سویه‌های دیگر این ویروس در کشورهای همسایه، احتمالاً سویه‌های بیشتری از ویروس کوتولگی سبزدرد نخود در ایران وجود دارد که ردیابی آن‌ها نیازمند انجام نمونه‌برداری‌های گسترده‌تر از مناطق بیشتر و تعیین ترادف کل ژنوم ویروس می‌باشد.

آنجایی که آلودگی‌های مخلوط، ظهور سویه‌های جدید و وقوع نوترکیبی بین گونه‌ها و سویه‌های مختلف ویروس CpCDV می‌تواند طیف میزبانی این ویروس را افزایش داده و منجر به بروز اپیدمی‌های جدید گردد (Kanakala and Kuria, 2019)، لذا ردیابی و تعیین خصوصیات مولکولی سویه‌های ویروس CpCDV در جهت اتخاذ تدابیر مدیریتی مناسب ضروری است. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و ردیابی سه سویه A، D و F ویروس CpCDV (با توجه به این ناحیه ژنومی) در مناطق عمده کشت نخود و عدس در ایران و

جدول ۵- محاسبه فاصله ژنتیکی در درون و بین سویه‌های A، F و D برای قطعه ۹۶۰ جفت بازی تولید کننده بخشی از ژن Rep A

با استفاده از نرم افزار Mega6

Table 5. Calculation of genetic distance within and between strains A, F, and D for the 960-bp sequence encoding partial of Rep A gene using the Mega6 software

Partial RepA gene (960 nt)	Mean distance within group			Mean distance between group			Mean Diversity in Entire Population
	F	A	D	F and A	F and D	A and D	
	0.037	0.004	0.007	0.075	0.096	0.101	0.065

References

- AKHTAR, K. P., AHMAD, M., SHAH, T. M., ATTA, B. M. 2011. Transmission of *Chickpea chlorotic dwarf virus* in chickpea by the leafhopper *Orosius albicinctus* (Distant) in Pakistan. *Plant Protect. Science*, No. 47: 1-4.
- AKHTAR, S., KHAN, A. J., BRIDDON, R. W. 2013. A distinct strain of *Chickpea chlorotic dwarf virus* infecting pepper in Oman. *Plant Disease*, No. 98: 286-286.
- ANONYMOUS, 2017. Statistical annual report of Iranian agricultural crops. Ministry of Agriculture Jihad, NO. 40(1): 53.
- FAHMY, I. F., TAHA, O., EL-ASHRY, A. N. 2015. First genome analysis and molecular characterization of *Chickpea chlorotic dwarf virus* Egyptian isolate infecting squash. *Virus Diseases*, No. 26: 33-41.
- FAOSTAT, 2014. Prunus production: National Agricultural statistics Service, USDA.
- FAO, 2014. FAOSTAT Database results from FAO website. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FARZADFAR, S., POURRAHIM, R., GOLNARAGHI, A. R., AHOONMANESH, A. 2008. PCR detection and partial molecular characterization of *Chickpea chlorotic dwarf virus* in naturally infected sugar beet plants in Iran. *Jouranal of Plant Pathology*, No. 90: 247-251.
- FIALLO-OLIVE, E., MOHAMMED, I. U., TURAKI, A. A., MUHAMMAD, A., NAVAS-CASTILLO, J. A. 2017. Novel Strain of the mastrevirus *Chickpea chlorotic dwarf virus* infecting papaya in Nigeria. *Plant Disease*, No. 101: 1684.
- HAMZA, M., TAHIR, M. N., MUSTAFA, R., KAMAL, H., KHAN, M. Z., MANSOOR, S., BRODDON, R.W., AMIN, I. 2018. Identification of a dicot infecting mastrevirus along with alpha-and betasatellite associated with leaf curl disease of spinach (*Spinacia oleracea*) in Pakistan. *Virus Research*, No. 256: 174-182.

- HORN, N. M., REDDY, S. V., REDDY, D. V. R. 1994. Virus-vector relationships of *Chickpea chlorotic dwarf geminivirus* and the leafhopper *Orosius orientalis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Ann. Appl. Biol.*, No. 124: 441-450.
- HORN, N. M., REDDY, S. V., REDDY, D. V. R. 1995. Assessment of yield losses caused by *Chickpea chlorotic dwarf geminivires* in chickpea (*Cicer arietinum*) in India. *European Journal of Plant Pathology*, No. 101: 221-224.
- HORN, N. M., REDDY, S. V., ROBERTS, I. M., REDDY, D. V. R. 1993. *Chickpea chlorotic dwarf virus*, a new leafhopper-transmitted geminivirus of chickpea in India. *Ann. Appl. Biol.*, No. 122: 467-479.
- HORN, N. M., REDDY, S. V., van den Huevel, J. F. J. M., and REDDY, D. V. R. 1996. Survey of chickpea (*Cicer arietinum* L.) for chickpea stunt disease and associated viruses in India and Pakistan. *Plant Disease*, NO.80: 286-290.
- KANAKALA, S., KURIA, P. 2019. *Chickpea chlorotic dwarf virus*: An Emerging Monopartite Dicot Infecting Mastrevirus. *Viruses*, No. 11(1): 5-20.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, No. 16:111-120.
- KRABERGER, S., HARKINS, G. W., KUMARI, S.G., THOMAS, J. E., SCHWINGHAMER, M. W., SHARMAN, M., COLLINGS, D. A., BRIDDON, R.W., MARTIN, D. P., VARSANI, A. 2013. Evidence that dicot-infecting mastreviruses are particularly prone to inter-species recombination and have likely been circulating in Australia for longer than in Africa and the Middle East. *Virology*, NO.444: 282-291.
- KRABERGER, S., KUMARI, S. G., HAMED, A. A., GRONENBORN, B., THOMAS, J. E., SHARMAN, M., HARKINS, G. W., MUHIRE, B. M., MARTIN, D. P., VARSANI, A. 2015. Molecular diversity of *Chickpea chlorotic dwarf virus* in Sudan: High rates of intra-species recombination – a driving force in the emergence of new strains. *Infection, Genetics and Evolution*, No. 29: 203-215.
- KUMARI, S. G., MAKKOUK, K. M., ATTAR, N., GHULAM, W. 2004. First report of *Chickpea chlorotic dwarf virus* infecting spring chickpea in Syria. *Plant Disease*, No. 88: 424.
- MAKKOUK, K. M., COMEAUE, A. 1994. Evaluation of various methods for the detection of *Barley yellow dwarf luteovirus* by the tissueblot immunoassay and its use for BYDV detection in cereals inoculated at different growth stages. *European Journal of Plant Pathology*, No. 100: 71-80.
- MAKKOUK, K. M., FAZLALI, Y., KUMARI, S. G., and FARZADFAR, S. 2002. First record of *Beet western yellows virus*, *Chickpea chlorotic dwarf virus*, *Faba bean necrotic yellows virus* and *Soybean dwarf virus* infecting chickpea and lentil crops in Iran. *Plant Pathology*, No. 51: 387-387.
- MAKKOUK, K. M., KUMARI, S. G., SHAHRAEEN, N., FAZLALI, Y., FARZADFAR, S., GHOTBI, T., MANSOURI, A. R. 2002. Identification and seasonal variation of viral diseases of chickpea and lentil in Iran. *Journal of Plant Diseases and Protection*, No. 110(2): 157-169.
- MUMTAZ, H., KUMARI, S. G., MANSOOR, S., MARTIN, D. P., BRIDDON, R.W. 2011. Analysis of the sequence of a dicot-infecting mastrevirus (Family Geminiviridae) originating from Syria. *Viris Genes*, No. 42: 422-428.
- NAHID, N., AMIN, I., MANSOOR, S., RYBICKI, E. P., VAN DER WALT, E., BRIDDON, R. W. 2008. Two dicot-infecting mastreviruses (family Geminiviridae) occur in Pakistan. *Archive of Virology*, No. 153: 1441-1451.
- SAITOU, N., NEI, M., 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. No. 4: 406-425.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. No. 30(12): 2725-2729.

- OUATTARA, A., TIENDREBEOGO, F., LEFEUVRE, P., HOAREAU, M., CLAVERIE, S., TRAORE, E. V., BARRO, N., TRAORE, O., VARSANI, A., LETT, J. M. 2017. New strains of *Chickpea chlorotic dwarf virus* discovered on diseased papaya and tomato plants in Burkina Faso. *Archive of Virology*, No. 162: 1791–1794.
- OWOR, B. E., SHEPHERD, D. N., TAYLOR, N. J., EDEMA, R., MONJANE, A. L., THOMSON, J. A., MARTIN, D. P., VARSANI, A. 2007. Successful application of FTA® Classic Card technology and use of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase for large-scale field sampling and cloning of complete maize streak virus genomes. *Journal of Virological Methods*, No. 140: 100–105.
- SHEPHERD, D. N., MARTIN, D. P., LEFEUVRE, P., MONJANE, A. L., OWOR, B. E., RYBICKI, E. P., VARSANI, A. 2008. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *Journal of Virological Methods*, No. 149: 97–102.
- ZAAGUERI, T., MIOZZI, L., MNARI-HATTAB, M., NORIS, E., ACCOTTO, G. P., VAIRA, A. M. 2017. Deep sequencing data and infectivity assays indicate that *Chickpea chlorotic dwarf virus* is the etiological agent of the “hard fruit syndrome” of watermelon. *Viruses*, NO. 9: 311.
- ZIA-UR-REHMAN, M., HAMEED, U., ALI, C. A., HAIDER, M. S. 2017. First Report of *Chickpea chlorotic dwarf virus* infecting Okra in Pakistan. *Plant Disease*, No. 101: 1336.