

بررسی تنوع و تبارزایی جدایه‌های ویروس موزائیک خیار در ایران*

مریم شیروانی^۱ و مجید صیام‌پور^{۱*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲۹)

چکیده

ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus; CMV*) عضو جنس *Cucumovirus* از خانواده *Bromoviridae* است. این ویروس در مقایسه به دیگر ویروس‌های گیاهی دارای وسیع‌ترین دامنه میزبانی بوده و در ایران از مناطق مختلف گزارش شده است. در این مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی این ویروس بر اساس ترادف همه ژنها بررسی و با ترادف‌های هم‌تا در جدایه‌های کشورهای دیگر مقایسه شده است. در این مطالعه ترادف کامل ژنوم دوجدایه از *CMV* از کدو (*SqSh*) و خربزه (*MeEs*) از استان‌های فارس و اصفهان گزارش شد. بررسی تبارزایی با هر سه آر آن ای و نیز با هر کدام از پنج ژن روی ژنوم *CMV* نیز نشان از قرابت بسیار نزدیک دو جدایه مذکور داشت. بررسی ترادف‌های نوکلئوتیدی موجود نشان داد که اکثر جدایه‌های ایرانی که تاکنون تعیین ترادف شده‌اند به زیرگروه *IA* متعلق بودند هر چند بر اساس آر آن ای‌های ۲ و ۳ همگی یک نیای مشترک نداشتند. بر اساس نتایج این مطالعه تصور میشود که رخداد نوجوری (*Reassortment*) از نوع *IA-IA-IB* در ایجاد تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی نقش داشته باشد. ژن *Ia* کمترین تنوع و *CP* بیشترین تنوع را در جدایه‌های ایرانی زیرگروه *I* نشان دادند. احتمالاً مهاجرت در فواصل دور و نیز نزدیک نقشی در تکامل و ساختار ژنتیکی *CMV* در جدایه‌های ایرانی داشته است.

کلیدواژه: ویروس موزائیک خیار، آر آن ای، تبارزایی، نوجوری

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Siampour@sku.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

Genetic diversity and Phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus strains in Iran*

M. Shirvani¹ and M. Siampour^{1*}

(Received: 1.9.2018; Accepted: 20.12.2018)

Abstract

Cucumber mosaic virus (CMV) belongs to the genus *Cucumovirus* of the family *Bromoviridae*. Compared to other plant viruses, it has the broadest host range, and is reported from different regions of Iran. In the present study, the genetic diversity of Iranian CMV isolates was estimated through the sequence analysis of all the CMV genes and compared to those in other countries. To this purpose we report the genome sequence of two CMV strains isolated from squash (SqSh) and melon (MeEs) in Shiraz and Esfahan. The two isolates were closely related based on the analysis of all gene sequences. Phylogenetic analysis revealed that most of the Iranian CMV isolates belonged to the subgroup IA, however, they did not share a most recent common ancestor based on RNAs 2 and 3. The reassortment type of IA-IA-IB was found to have played a very important role in the evolution and genetic diversity of CMV population in Iran. 1a and CP ORFs had the lowest and highest genetic diversity among Iranian CMV population of the subgroup I, respectively. We suggested that migration in long and short distances have played a role in evolution and genetic structure of CMV strains in Iran.

Keywords: CMV, RNA, Phylogeny, Reassortment

* Part of MSc. Thesis of the First Author Submitted to the College of Agric. Shahrekord Univ.

** Corresponding author's E-mail: Siampour@sku.ac.ir

1. MSc. Grad. and Assis. Prof. of the Dept. of Plant Protection, Shahrekord University, Sahrekord, Iran.

مقدمه

متفاوت است هر چند که ORFها در جدایه‌های مختلف اندازه‌های تقریباً مشابهی دارند.

در برخی مطالعات ساختار و تنوع ژنتیکی CMV مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که تنوع ویروس CMV تحت اثر نیروهای تکاملی مختلف از جمله جهش، نوترکیبی و نوجوری (Reassortment) می‌باشد. بر اساس روشهای سرولوژیکی و مولکولی جدایه‌های CMV در دو زیر گروه I و II قرار داده شده‌اند. اعضای گروه I از نظر تبارزایی در دو زیر گروه IA و IB قرار می‌گیرند (Jackmond 2012). اعضای زیر گروه IA در سراسر جهان توزیع شده‌اند در حالی که جدایه‌های زیر گروه IB در آسیا توزیع بیشتری دارند (Roossinck 2001, Palukaitis and Zaitlin 1997). در ایران مطالعات مولکولی و گروه بندی جدایه‌ها در برخی مناطق کشور انجام گرفته است (Sokhandan-Bashir et al. 2006, Rasoulpour and Izadpanah 2008, Nematollahi et al. 2016, Rasoulpour et al. 2012). نتایج این مطالعات وجود جدایه‌های متعلق به هر سه زیر گروه (IA, IB و II) در کشور را تایید میکند.

هر چند بررسی‌هایی در خصوص گروه بندی جدایه‌های CMV در برخی از مناطق ایران وجود دارد ولی این بررسی‌ها غالباً محدود به یک میزبان خاص و یا در ارتباط با یکی از آر آن‌های ویروس و در تعداد اندکی از جدایه‌های ویروس می‌باشد. در یک مطالعه جدید ژنتیک جمعیت CMV در یک مقیاس جهانی بررسی شده که در آن اهمیت استفاده از اطلاعات ژنتیکی هر سه آر آن‌های ویروس در بررسی‌های ژنتیک جمعیت حائز اهمیت برشمرده شده است. تا کنون ترادف کامل ژنوم ۱۴۸ جدایه CMV در دنیا مشخص شده که اکثر آنها مربوط به شرق آسیا و از میزبانهای گیاهی Solanaceae و Brassicaceae

ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus*; CMV) عضو جنس *Cucumovirus* و از خانواده *Bromoviridae* است. این ویروس برای اولین بار در سال ۱۹۱۶ به عنوان ویروس بیماری زای گیاهی معرفی گردید (Doolittle 1916). CMV با پراکنش جهانی از گونه‌های ویروسی است که در قالب جدایه‌های مختلف و متعدد در طبیعت وجود دارد و در مقایسه با سایر ویروسها وسیع‌ترین دامنه میزبانی را دارد. این ویروس قادر به آلوده سازی ۱۲۰۰ گونه در بیش از ۱۰۰ خانواده گیاهی است (Jacquemond 2012). انتشار CMV در طبیعت به وسیله بذر و بیش از ۶۰ گونه شته صورت می‌گیرد و در گیاه در ابتدا دارای حرکت سلول به سلول و سپس حرکت در آوند آبکشی می‌باشد. علائم ایجاد شده توسط این ویروس روی میزبان‌هایش بسته به جدایه‌ی ویروس متفاوت و به صورت لکه‌های سبز تیره و روشن به شکل موزاییک، زردی عمومی، کوتولگی، نخعی شدن برگ‌ها و زردی و نکروز موضعی می‌باشد. (Palukaitis and García-Arenal 2003, Jacquemond 2012).

ژنوم این ویروس شامل سه آر آن‌ای تک رشته‌ای با قطبیت مثبت است (Jacquemond 2012). آر آن‌ای شماره ۱ پروتئین 1a را کد می‌کند که دارای دامنه متیل ترنس فراز در انتهای N و دامنه هلیکاز در انتهای C است. آر آن‌ای شماره ۲ پروتئین 2a و 2b را کد می‌کند. پروتئین 2a نقش مهمی در همانندسازی و 2b نیز نقش مهمی در بیماری زایی CMV دارد. آر آن‌ای شماره ۳ نیز دو پروتئین 3a و 3b را تولید میکند. پروتئین 3a پروتئین حرکتی (MP) و پروتئین 3b پروتئین پوششی ویروس (CP) را می‌باشند. مجموع اندازه آر آن‌های CMV در جدایه‌های مختلف

موزائیک سیستمیک به دست آید. گیاهان توتون آلوده شده به این روش در آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج آر ان ای کل گیاه، آزمونهای RT-PCR و تعیین ترادف

برای استخراج آر ان ای کل از گیاهان توتون آلوده شده به جدایه‌های CMV خربزه (MeEs) و کدو (SqSh) از روش گامبینو و همکاران (Gambino et al. 2008) استفاده شد. با استفاده از آغازگرهای طراحی شده (جدول ۱)، ترادف کل ژنوم هر دو جدایه ویروس در آزمون PCR تکثیر شد. آغازگرها به گونه ای طراحی شدند تا کل ژنوم ویروس پوشش داده شده و نیز نواحی تکثیر شده مربوط به دو قطعه مجاور با یکدیگر حداقل ۱۰۰ نوکلئوتید همپوشانی داشته باشند. آزمون ترانویسی معکوس (RT) با آغازگرهای معکوس (جدول ۱) و با استفاده از آنزیم MMLV انجام و cDNA تولید شده با استفاده از آنزیم Taq DNA Polymerase (Amplicon, Denmark) تکثیر شد. قطعات تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی در دو جهت تعیین اوالی شدند (بایونیر، کره جنوبی). برای اطمینان، نواحی انتهایی هر کدام از آر ان ای‌ها (انتهای 3' و 5') نیز با طراحی آغازگر در فاصله حدود ۳۰۰ نوکلئوتیدی از این نواحی خوانش مجدد شد. مونتاژ قطعات تعیین ترادف شده با برنامه DNAMAN انجام شد (<https://www.lynnon.com>).

هم ردیف سازی (Alignment) ترادفها

ترادف‌های ژنومی مربوط به آر ان ای‌های شماره ۱، ۲ و ۳ و نیز ترادف مربوط به ژنهای CMV موجود در ژن بانک (GenBank) جدایه‌های ایران و چند کشور دیگر به

است (Ohshima et al. 2016, Andika et al. 2017). اخیراً اوشیما و همکاران (Ohshima et al. 2016) برای اولین بار ژنوم کامل ۱۳ جدایه CMV از ایران را که عمدتاً از چند گیاهان خانواده Brassicaceae جدا سازی شده را تعیین توالی کردند. این گروه با استفاده از اطلاعات ژنومی جدایه‌های این ویروس از سراسر دنیا ارتباطات تبارزایی و نیز زمان سنج تکاملی و نرخ تکاملی آنها را بررسی کردند. در این مطالعه ترادف کامل ژنوم CMV از دو گیاه خربزه و کدو در ایران نیز گزارش میشود و با استفاده از ترادفهای بدست آمده از جدایه‌های دیگر این ویروس در سراسر دنیا تحلیل تبارزایی و تنوع ژنهای این ویروس با تاکید بر جدایه‌های ایرانی مورد بررسی جامع قرار گرفته است.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه و خالص سازی ویروس

نمونه‌های گیاهی با موزائیک شدید و بد شکلی برگ از مزارع خربزه در اطراف اصفهان و کدو در اطراف شیراز جمع آوری گردید. آزمون الیزای غیر مستقیم با استفاده از آنتی بادی تهیه شده بر علیه CMV (تهیه شده در مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی دانشگاه شیراز) با روش استاندارد انجام شد. یک نمونه از گیاهان خربزه (اصفهان) و کدو (شیراز) پس از تایید آلودگی به CMV برای آزمون‌های بعدی خالص سازی بیولوژیکی شدند. برای این منظور عصاره این گیاهان (در بافر فسفات ۰.۱ M، مولار pH ۷) روی نهال‌های کینوا (*Chenopodium quinoa*) بطور مکانیکی تلقیح شدند. لکه‌های موضعی (یک لکه) به دست آمده جدا و عصاره آن به گیاهان توتون رقم تورکیش (*Nicotiana tabacum* cv. Turkish) تلقیح شد تا علایم

جدول ۱. آغازگرهای طراحی شده در این مطالعه برای تکثیر و ترادف یابی آر ان ای های ژنومی جدایه های MeEs و CMV SqSh

Table 1. Primers designed in this study for amplification and sequencing of full length RNAs 1, 2 and 3 from CMV isolates MeEs and SqSh.

Primer (Forward/Reverse)	Primer sequence (5'-3') Forward/Reverse	Positions ^a	Target RNA
RN1F1/RN1R1	GTTTATTTACAAGAGCGTACGGTTC/ TTCCTCCATTGACAATTAAG	1-800	RNA1
RN1F2/RN1R2	AGCCCACTTT GCTATATCTA/ TTCATACTTCATTTTTGTGTG	600-1380	RNA1
RN1F3/RN1R3	GCGTGGATGGAGCAATTCAAG/ GGAATTTCTTTTGTGCATCACC	1210-1940	RNA1
RN1F4/RN1R4	TCGACTCCCTGTCAGCTCAG/ TTCGCCCTTGAAATCAGTGA	1780-2820	RNA1
RN1F5/RNEnd	CCATTCAAATAACACGAAAT/ TGGTCTCCTTTYAGA	2660-3355	RNA1
RN2F1/RN2R1	GTTTATTTACAAGAGCGTACGGTTC/ GCGCACGATTTCTTTAAAGC	1-720	RNA2
RN2F2/RN2R2	TTCTTTTGAACCGTGGTCCC/ ACATCGGATTTTATCATGTG	600-1380	RNA2
RN2F3/RN2R3	AACTTCCACGATTACATGG/ GGAAATTAGCGGTATACTTC	1275-2275	RNA2
RN2F4/RNEND	CTATTATTCAGATCGTCGTC/ TGGTCTCCTTTYAGA	2170-3025	RNA2
RN3F1/RN3R1	GTAATCTTACCACTGTGTGTG/ TAGAGTCTTCCCAGCTGCGA	1-680	RNA3
RN3F2/RN3R2	CAAGCAAGGTTTTCTTCTAAG/ AGGAGGGGCGGAGCGGGAA	580-1320	RNA3
RN3F3/RNEnd	CTTTTGTGTCGTAGAATTGAG/ TGGTCTCCTTTYAGA	1200-2190	RNA3

^a: approximate nucleotide positions of forward-reverse primers in CMV strain SqSh.

بررسی نوترکیبی ونوجوری (Reassortment)

مکان‌های احتمالی نوترکیبی در آر ان ای‌های CMV بوسیله برنامه‌های نرم افزار RDP4 (Martin *et al.*, 2015) شامل RDP (Martin and Rybicki 2000)، GENECO، (Sawyer 1999)، BOOTSCAN (Salminen *et al.*، 1995)، MAXCHI (Meynard Smith 1992)، و SISCAN (Gibbs *et al.* 2000) رد یابی شد. آنالیزهای مذکور با تنظیمات پیش فرض برای هر کدام از برنامه‌ها و نیز تعیین *p*-Value به مقدار ۰/۰۱ انجام گرفت. مکاهای

همراه ترادف‌های به دست آمده در این مطالعه برای آزمون‌های تعیین درصد تشابه، تبارزائی، نوترکیبی و نوجوری مورد استفاده قرار گرفت. در این بررسی ترادف اکثر جدایه‌های ایرانی موجود در ژن بانک استخراج و مورد بررسی قرار گرفت. همراه با این جدایه‌ها، ترادف مربوط به جدایه‌های شناخته شده قبلی از دیگر کشورها که ترادف کامل ژنوم آنها در ژن بانک در دسترس هستند نیز مورد استفاده قرار گرفت. ترادف‌های یدست آمده با استفاده از برنامه MAFT (https://mafft.cbrc.jp/align/ment/server) هم ردیف سازی شد.

(2010) استفاده شد. بهترین مدل‌جانشینی نوکلئوتیدی برای هر کدام از آر ان ای‌ها یا ژنهای روی آنها از طریق برنامه SMS تعیین و مورد استفاده قرار گرفت (-www.atgc.com). میزان اعتبار هر کدام از شاخه‌های ایجاد شده در درخت تبارزایی با آزمون Bootstrap حاصل از ۱۰۰ تکرار تخمین زده شد. برای شناسایی جدایه‌های ویروس در سطح زیرگروه‌ها، جدایه‌های Bn-57 و Fny به عنوان جدایه‌های استاندارد زیر گروه JA، جدایه IXORA به عنوان جدایه استاندارد معرف زیر گروه IB و جدایه Q استرالیا به عنوان جدایه استاندارد زیر گروه II در نظر گرفته شد (Lin et al., 1988, Davis and Symons 2004).

نتایج

PCR و تعیین ترادف

تمام آغازگرهای طراحی شده در این مطالعه در آزمون RT-PCR از گیاهان آلوده به جدایه‌های MeEs و SqSh تولید باندهای اختصاصی مورد انتظار کردند. قطعات تکثیر شده مربوط به هر کدام از سه قطعه آر ان ای بعد از تعیین ترادف مونتاژ شدند تا ترادف کامل آر ان ای‌ها بدست آید. ترادف آر ان ای‌های این دو جدایه در پایگاه داده‌های GenBank تحت رس شماره‌های MH782235 تا MH782240 قرار داده شد. نتایج نشان داد که آر ان ای‌های شماره ۱، ۲ و ۳ در جدایه MeEs به ترتیب شامل ۳۳۱۴، ۳۰۱۰ و ۲۱۷۷ نوکلئوتید و در مورد SqSh برابر ۳۳۱۷، ۳۰۱۰ و ۲۱۷۹ باز بود (با حذف ۲۲ تا ۲۶ نوکلئوتید سمت ۵' و ۱۵ نوکلئوتید انتهای ۳' مربوط به ترادفهای منطبق بر آغازگرها). چارچوب ژنی مربوط به پروتئین Ia در آر ان ای شماره ۱ هر دو جدایه دارای ۹۹۳ آمینو اسید

نو ترکیبی شناسایی شده بطور مجزا بررسی شده و با استفاده از درختان تبارزایی ایجاد شده صحت ترادفهای والدی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در روشهای اشاره شده قطعات ۵۰ نوکلئوتیدی ترادفها برای ردیابی رخدادهای نو ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت. بررسیهای مذکور نزدیکترین ترادفهای غیر نو ترکیب به ترادفهای شناسایی شده به عنوان نو ترکیب را نیز تعیین کرد. این ترادفهای غیر نو ترکیب به عنوان ترادفهای والد (Parental strains) مشخص شدند. رخدادهای شناسایی شده زمانی به عنوان نو ترکیب مورد پذیرش قرار گرفتند که حداقل توسط سه روش (برنامه) با p -Value کمتر از 10^{-6} تأیید شدند. جدایه‌های غیر نو ترکیب که بیشترین شباهت را با جدایه نو ترکیب داشتند به عنوان والدین اصلی و فرعی منظور شدند (Ohshima et al. 2016).

وقایع مربوط به نوجوری جدایه‌های ایرانی CMV با توجه به موقعیت آن‌ها روی درخت‌های تبارزایی در مقایسه با جدایه‌های استاندارد مربوط به زیرگروه‌های JA، IB و II تعیین شد (Davis and Symons 1988, Lin et al., 2004) تعیین میزان تنوع و شباهت نوکلئوتیدی

برای تعیین میزان شباهت بین جدایه‌های CMV و نیز میانگین شباهت بین گروهی جدایه‌های CMV از برنامه Mega4 (<https://www.megasoftware.net/mega4>) استفاده شد. همچنین با استفاده از روش Jukes-Cantor موجود در این برنامه میزان تنوع نوکلئوتیدی (از طریق محاسبه فاصله نوکلئوتیدی) در ژنهای مختلف جدایه‌های CMV مربوط به ایران و چند کشور دیگر محاسبه شد.

ترسیم درخت‌های تبارزایی

برای ترسیم درخت‌های تبارزایی از روش maximum likelihood (ML) در برنامه Phyl 3.0 (Guindon et al.)

همردیف ایجاد شده شامل ۳۱۵۵ نوکلئوتید بود. در مجموع تعداد ۲ رخداد نوترکیبی در آر ان ای شماره ۲ یافت گردید که حداقل با سه روش با p -Value کمتر از 10^{-6} مورد تایید قرار گرفتند. این رخدادها نیز مربوط به سه جدایه از کره جنوبی بودند. آر ان ای شماره ۲ مربوط به ۷۶ جدایه CMV از مجموع ۷۹ جدایه فاقد هر گونه نوترکیبی تشخیص داده شدند. وقوع نوترکیبی در آر ان ای شماره ۲ هیچ یک از ۱۵ جدایه CMV گزارش شده از ایران (از جمله MeEs و SqSh) ردیابی نشد.

ترادف آر ان ای شماره ۳ مربوط به ۱۱۱ جدایه ی CMV برای وجود نوترکیبی مورد آزمون قرار گرفت. همردیف ایجاد شده در ترادف‌های مذکور شامل ۲۴۴۵ نوکلئوتید بود. (۱۵۵ تا ۱۰۲۲ مربوط به 3a و ۱۳۸۴ تا ۲۰۴۷ مربوط به CP). در این بررسی وجود سه رخداد با حداقل ۳ روش (با p -Value کمتر از 10^{-6}) تایید شد.

یکی از رخدادها با بیشترین فراوانی وقوع در ۸ جدایه CMV از اسپانیا شناسایی شد (اطلاعات نشان داده نشده است). رخداد نوترکیبی دیگر نیز مربوط به جدایه ای از کره جنوبی (RP45/2006) بود. آخرین رخداد نوترکیبی نیز مربوط به سه جدایه ی ویروسی از ایران (-IRN BRES/2007, MeEs و SqSh) بود. موقعیت این نوترکیبی بین نوکلئوتیدهای ۲۱۴۱ (3'-NCR; non-coding region) و ۲۴۱۰ (انتهای 3'-NCR) شناسایی شد. والد اصلی برای این رخداد جدایه ی IWD41J/2000 از ژاپن (والد ترادف ۱-۲۱۴۰) و والد فرعی جدایه ایران IRN-REY6/2004 (والد ترادف ما بین نوکلئوتیدهای ۲۴۱۰-۲۱۴۱) پیش بینی شد.

از آنجا که محل وقوع نوترکیبی آر ان ای سوم در این جدایه‌های ایرانی خارج از ژن‌های CP و MP و تنها در ناحیه ی 3'-NCR است، ترادف‌های مربوط برای

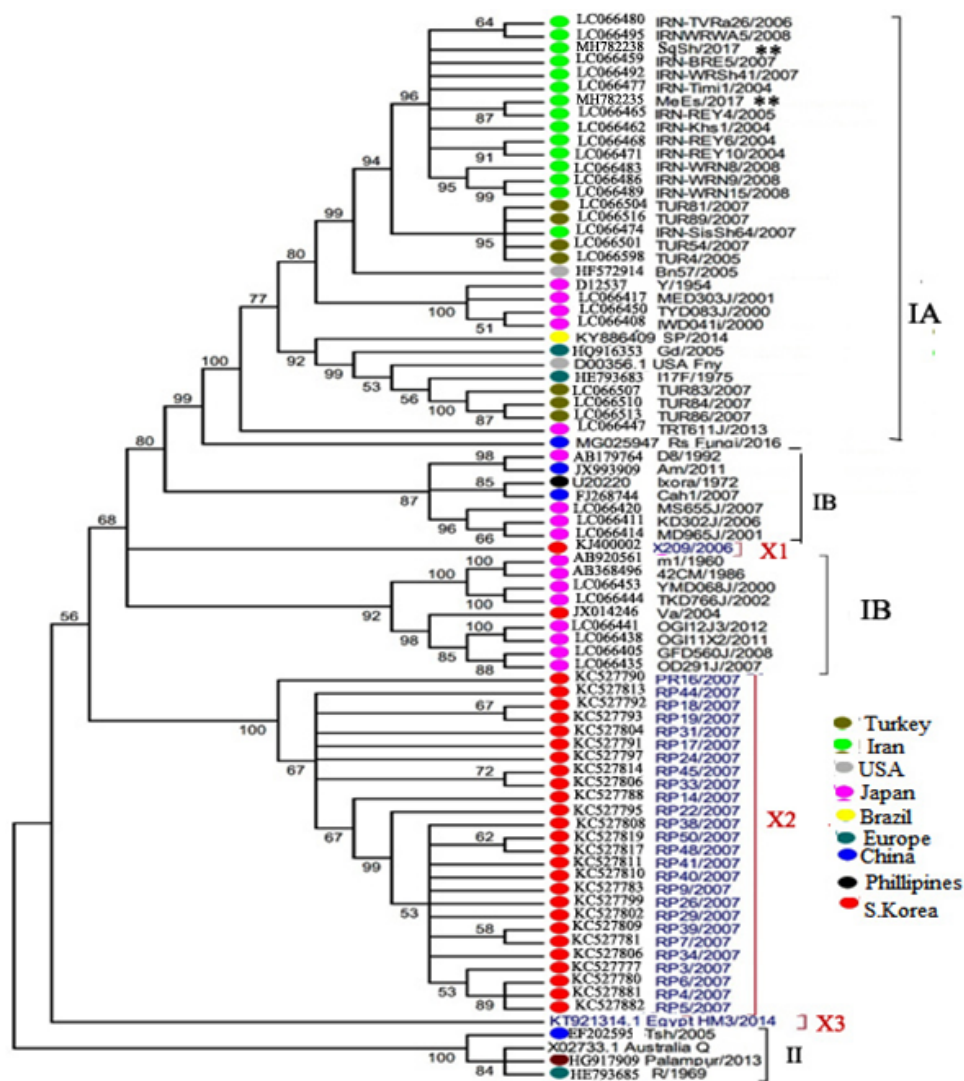
بود. بر روی آر ان ای شماره ۲، اندازه پروتئین 2a در هر دو جدایه برابر با ۸۵۷ آمینو اسید و اندازه 2b، ۱۱۰ آمینو اسید بود. دو چارچوب ژنی مذکور ۲۴۰ نوکلئوتید همپوشانی داشتند.

بررسی انجام شده در مورد آر ان ای شماره ۳ دو جدایه SqSh و MeEs نشان از وجود چارچوب‌های ژنی مربوط به پروتئین‌های حرکتی (3a یا MP) و پوششی (CP) به ترتیب در انتهای ۵' و ۳' داشت. اندازه پروتئین حرکتی و پوششی در هر دو جدایه به ترتیب ۲۷۹ و ۲۲۰ آمینو اسید بود. حدود ۳۰۳ نوکلئوتید بین نوکلئوتیدهای شماره ۹۳۳ تا ۱۲۳۶ ناحیه ی بین دو ژن CP و 3a را تشکیل داده‌اند. درصد یکسانی نوکلئوتیدی در آر ان ای‌های شماره ۱، ۲ و ۳ دو جدایه مذکور به ترتیب ۹۹/۲، ۹۹/۶ و ۹۹/۴ بود.

بررسی وجود نوترکیبی در جدایه‌های ایرانی

برای بررسی وجود نوترکیبی در آر ان ای شماره ۱ CMV، ترادف کامل این قطعه از ۱۰۶ جدایه ی این ویروس از سراسر دنیا مورد بررسی قرار گرفت (۳۴۵۵ نوکلئوتید در همردیف). از این تعداد، ۱۵ ترادف مربوط به جدایه‌های ایران بود. نتایج این بررسی وجود ۱۰ رخداد نوترکیبی را در آر ان ای شماره ۱ CMV نشان داد. (تایید شده به وسیله حداقل سه روش با p -Value کمتر از 10^{-6}). این رخدادها در آر ان ای شماره ۱ در ۲۵ جدایه CMV (غالباً جدایه‌های کره جنوبی) ردیابی شد (اطلاعات نشان داده نشده است). وجود نوترکیبی در آر ان ای شماره ۱ هیچ کدام از ۱۵ جدایه CMV ایران ردیابی نشد. در مجموع ۸۱ جدایه بدون رخداد نوترکیبی شناسایی و برای تحلیل‌های فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفت.

ترادف آر ان ای شماره ۲ مربوط به ۷۹ جدایه CMV نیز برای تعیین وجود نوترکیبی مورد ارزیابی قرار گرفت.



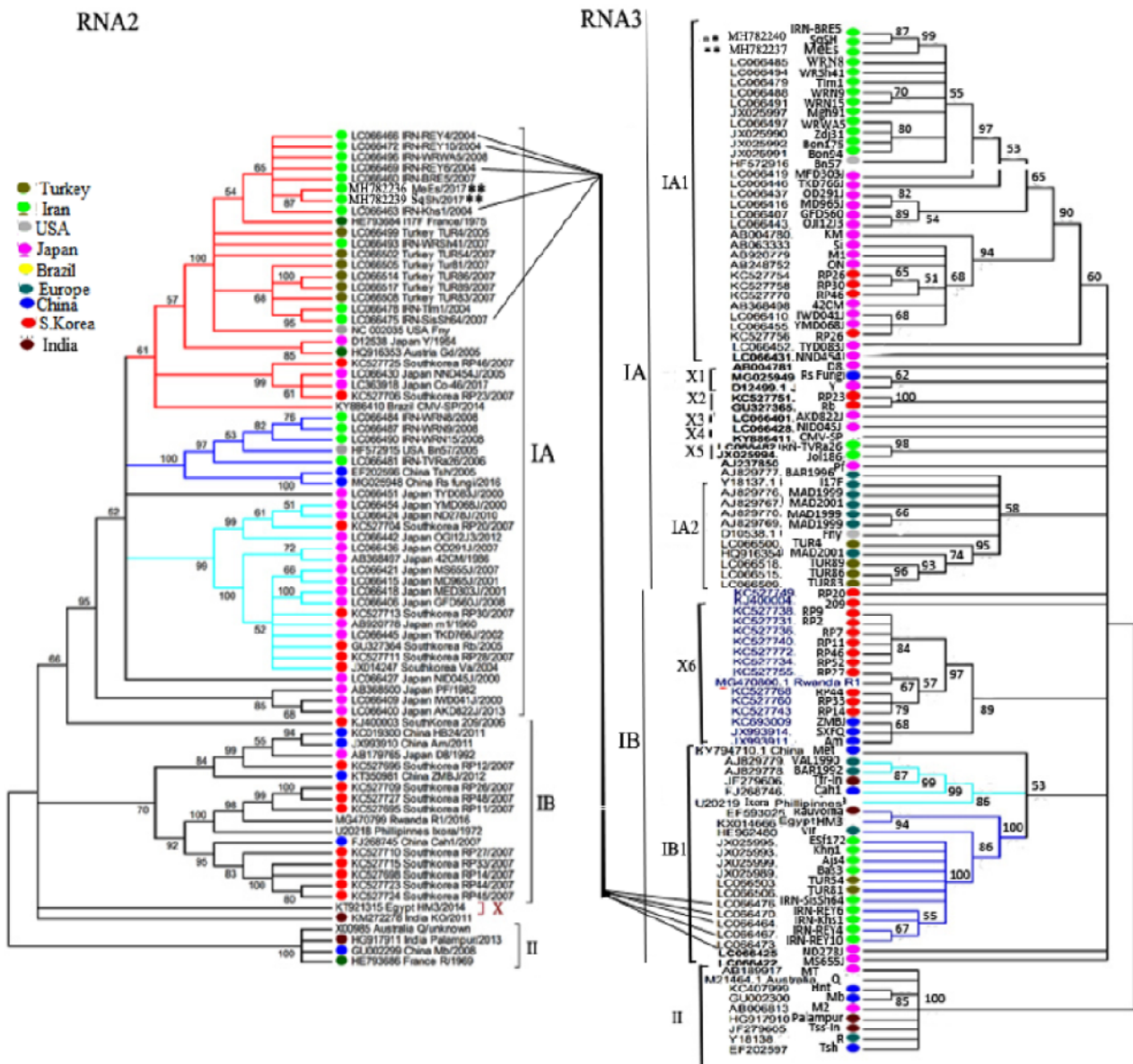
شکل ۱. درخت تبارزایی ایجاد شده به روش maximum likelihood با استفاده از ترادف مربوط به آر ان ای شماره ۱ در جدایه‌های مختلف CMV از سرتاسر دنیا. اعداد نمایش داده شده روی گره (Node) مربوط به درصد Bootstrap حاصل از ۱۰۰ تکرار است. فقط مقادیر بوت استرپ بیش از ۵۰ نشان داده شده و گره‌ها با بوت استرپ کمتر از ۵۰ حذف شده است. جدایه‌های مربوط به کشورهای مختلف با رنگهای متفاوت نمایش داده شده است. جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه با ستاره مشخص شده اند.

Fig.1. ML phylogenetic tree generated based on the nucleotide sequences of RNA1 segment of CMV isolates from different countries. Bootstrap values of above 50 are shown on the nodes and nodes with lower bootstrap values are collapsed. Isolates are represented by their strain names and ccession numbers

تبارزایی بر اساس آر ان ای‌های ۱ تا ۳

در شکل‌های ۱ و ۲ درخت‌های تبارزایی (بر اساس روش maximum likelihood; ML) ترسیم شده براساس ترادف کامل آر ان ای‌های ۱ تا ۳ جدایه‌های مختلف

تحلیل‌های فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفت و این قسمت از ناحیه 3'NCR این جدایه‌ها در تحلیل تبارزایی آر ان ای شماره ۳ حذف گردید.



شکل ۲. درختهای تبارزائی ایجاد شده به روش maximum likelihood با استفاده از ترادف مربوط به آر ان ای های شماره ۲ و ۳ و جدایه های مختلف CMV از سرتاسر دنیا. اعداد نمایش داده شده روی گره (Node) مربوط به درصد بوت استرپ حاصل از ۱۰۰ تکرار است. فقط مقادیر بوت استرپ بیش از ۵۰ نشان داده شده و گره ها با بوت استرپ کمتر از ۵۰ حذف شده است. جدایه های مربوط به کشورهای مختلف با رنگهای متفاوت نمایش داده شده است. جدایه های مورد بررسی در این مطالعه با ستاره مشخص شده اند. تغییر موقعیت جدایه های ایرانی بین دو درخت تبارزائی نشان داده شده است

Fig.2. ML phylogenetic tree generated based on the nucleotide sequences of RNAs 2 and 3 of CMV isolates from different countries. Bootstrap values of above 50 are shown on the nodes and nodes with lower bootstrap values are collapsed. Isolates are represented by their strain names and accession numbers. Change in phylogenetic position of Iranian strains between the two trees is shown.

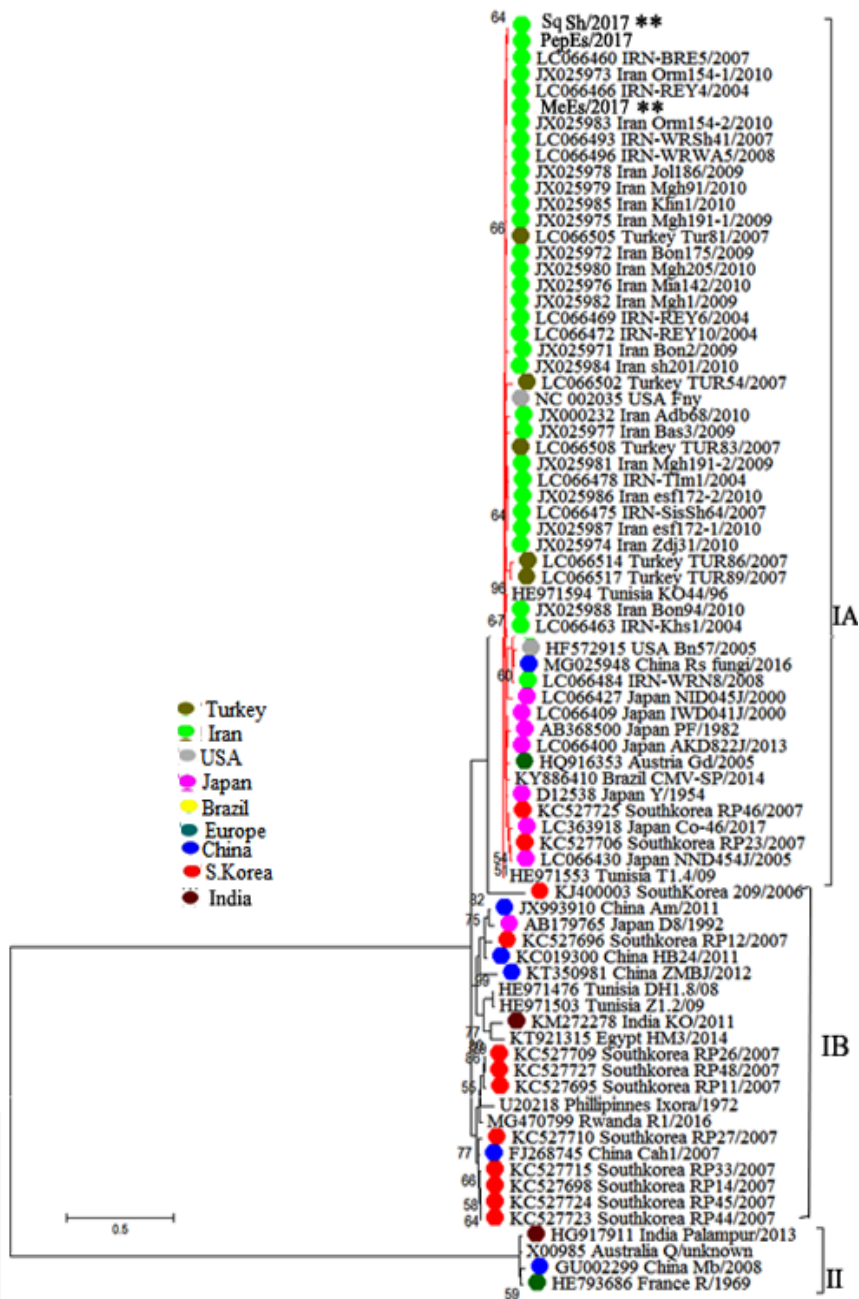
تبارزایی را تأیید می‌کند که در آن جدایه‌های X2 (متعلق به کره جنوبی) در هیچ کدام از زیرگروه‌های IA و IB قرار نگرفتند. با لحاظ کردن اعضاء X1 و X2 و X3 به عنوان اعضاء زیرگروه IB در درخت تبارزایی ترسیم شده (بر اساس آر ان ای‌های شماره ۱، شکل ۱) میانگین شباهت در اعضاء زیر گروه IA، IB و II به ترتیب ۹۷/۷، ۹۳/۶ و ۹۸/۲ محاسبه شد. میانگین شباهت بین دو زیر گروه IA و IB نیز حدود ۹۱/۶ درصد بود. میانگین شباهت آر ان ای ۱ بین اعضاء زیر گروه II با IA و IB نیز کمتر از ۷۷ درصد بود.

بر اساس درخت تبارزایی حاصل از آر ان ای شماره ۲ (شکل ۲)، دو جدایه SqSh و MeEs با ۹ جدایه CMV دیگر از ایران و جدایه‌های دیگری از ترکیه، فرانسه و جدایه استاندارد Fny آمریکا یک زیر گروه تبارزایی را تشکیل دادند. نکته جالب توجه آنکه چهار جدایه CMV دیگر از ایران (WRN8، WRN9، WRN15 و TVRA26) با جدایه ی استاندارد Bn57 آمریکا قرابت نزدیکتری داشته و جد نزدیکتری داشته‌اند. از این رومشخص میشود که تاریخچه تکاملی آر ان ای شماره ۲ در برخی جدایه‌های CMV ایران تا حدودی با تاریخچه تکاملی آر ان ای شماره ۱ آنها متفاوت بوده است. این موضوع میتواند نشاندهنده وقوع نوجوری در بین جدایه‌های زیرگروه IA باشد. علیرغم این موضوع همه جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه بر اساس آر ان ای‌های شماره ۱ و ۲ مربوط به زیر گروه IA بودند. میانگین شباهت کل در آر ان ای شماره ۲ (جدایه‌های نشان داده شده در شکل ۲) ۹۲/۶ درصد محاسبه شد. میانگین شباهت در جدایه‌های IA، IB و II به ترتیب ۹۷، ۹۵/۴ و ۹۷/۵ بود. میانگین شباهت بین دو زیر گروه IA و IB ۹۱/۴ بود. همچنین میانگین شباهت بین اعضا زیر گروه II با IA و IB کمتر از ۷۲ درصد بود.

CMV نشان داده شده است. بهترین مدل جاننشینی نوکلئوتیدی (Substitution model) برای هرسه آر ان ای (Generalized Time Reversible + Gamma) GTR+G+I (distribution + Invariable) بود. جدایه‌های MeEs و SqSh در هر سه درخت تبارزایی با یکدیگر قرابت کاملاً نزدیکی داشته و در یک گروه تبارزایی نزدیک به هم قرار گرفتند. با توجه به درخت‌های فیلوژنتیک و مقایسه با جدایه‌های استاندارد (شکل‌های ۱ و ۲) هر دو جدایه ی SqSh و MeEs بر اساس ترادف هر سه آر ان ای به زیر گروه IA تعلق داشتند.

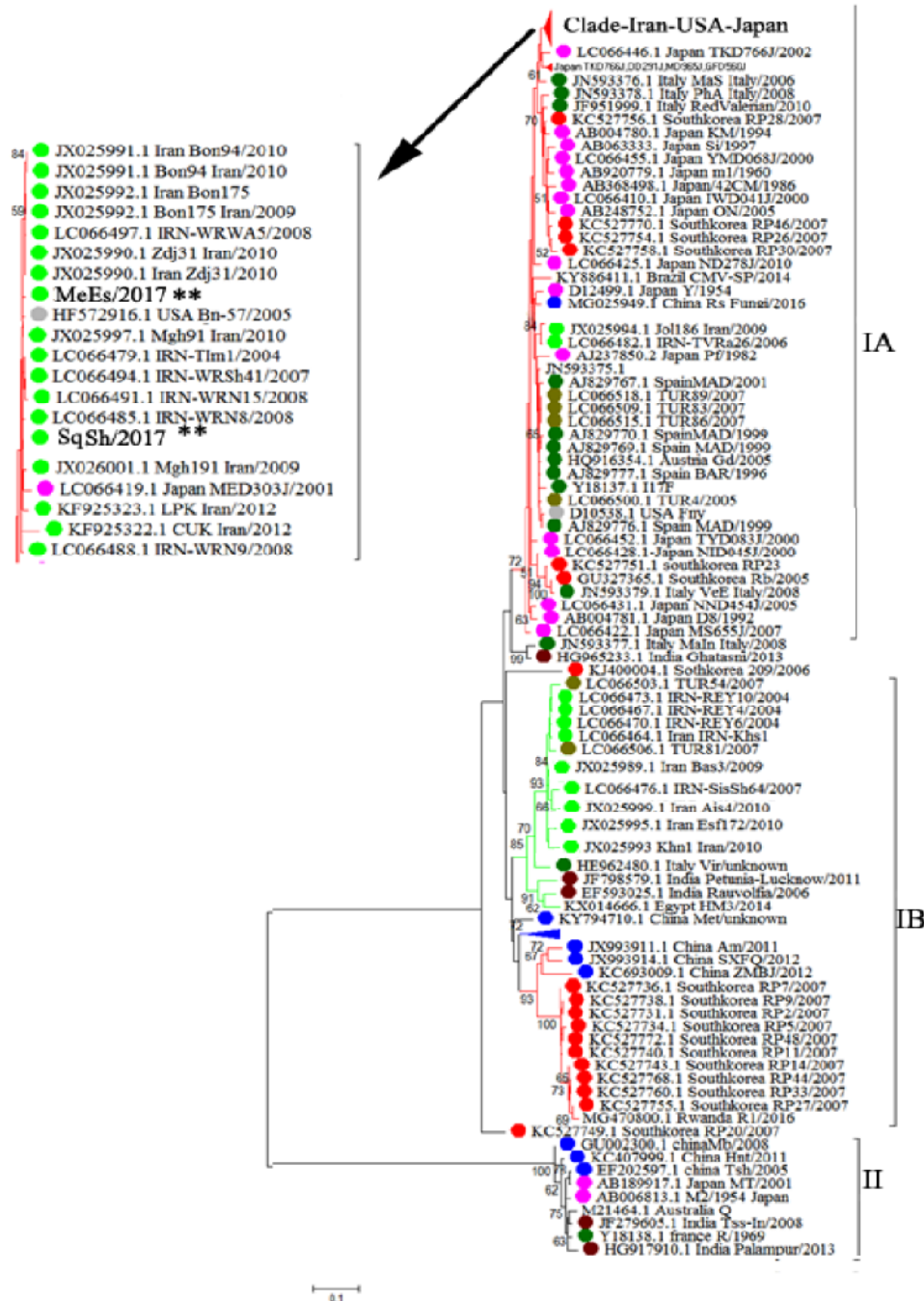
بر اساس درخت تبارزایی مربوط به آر ان ای شماره ۱، جدایه‌های SqSh و MeEs با چند جدایه (۱۳ جدایه) CMV به دست آمده از ایران و چند جدایه از ترکیه در یک کلاستر قرار گرفتند. جدایه‌های مذکور با Bn57 از آمریکا قرابت نزدیکی داشتند. تمام جدایه‌های ایرانی بر اساس ترادف آر ان ای شماره ۱ با یکدیگر قرابت کاملاً نزدیکی داشته و از این رو دارای نیای مشترک نزدیک هستند.

هیچ کدام از جدایه‌های ایرانی CMV بر اساس آر ان ای شماره ۱ در زیر گروه‌های IB و II قرار نگرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که میانگین یکسانی کل (Identity) در آر ان ای شماره ۱ (جمعیت مربوط به همه جدایه‌های مشخص شده در شکل ۱) ۹۱/۸۷ درصد بود. همانطور که در درخت تبارزایی ترسیم شده مشخص شده است ارتباط چندین جدایه CMV با زیر گروه‌های IA و IB مشخص نشده است (به عنوان مثال جدایه‌های کره جنوبی در کلاستر X2 و جدایه‌های X1 و X3). میانگین شباهت زیر گروه X2 با زیر گروه‌های IA و IB تفاوت معنی داری نشان نداده (اطلاعات نشان داده نشده) و به ترتیب ۹۱/۲ (±/۵) و ۹۰/۴ (±/۴) بود. این موضوع نتایج درخت



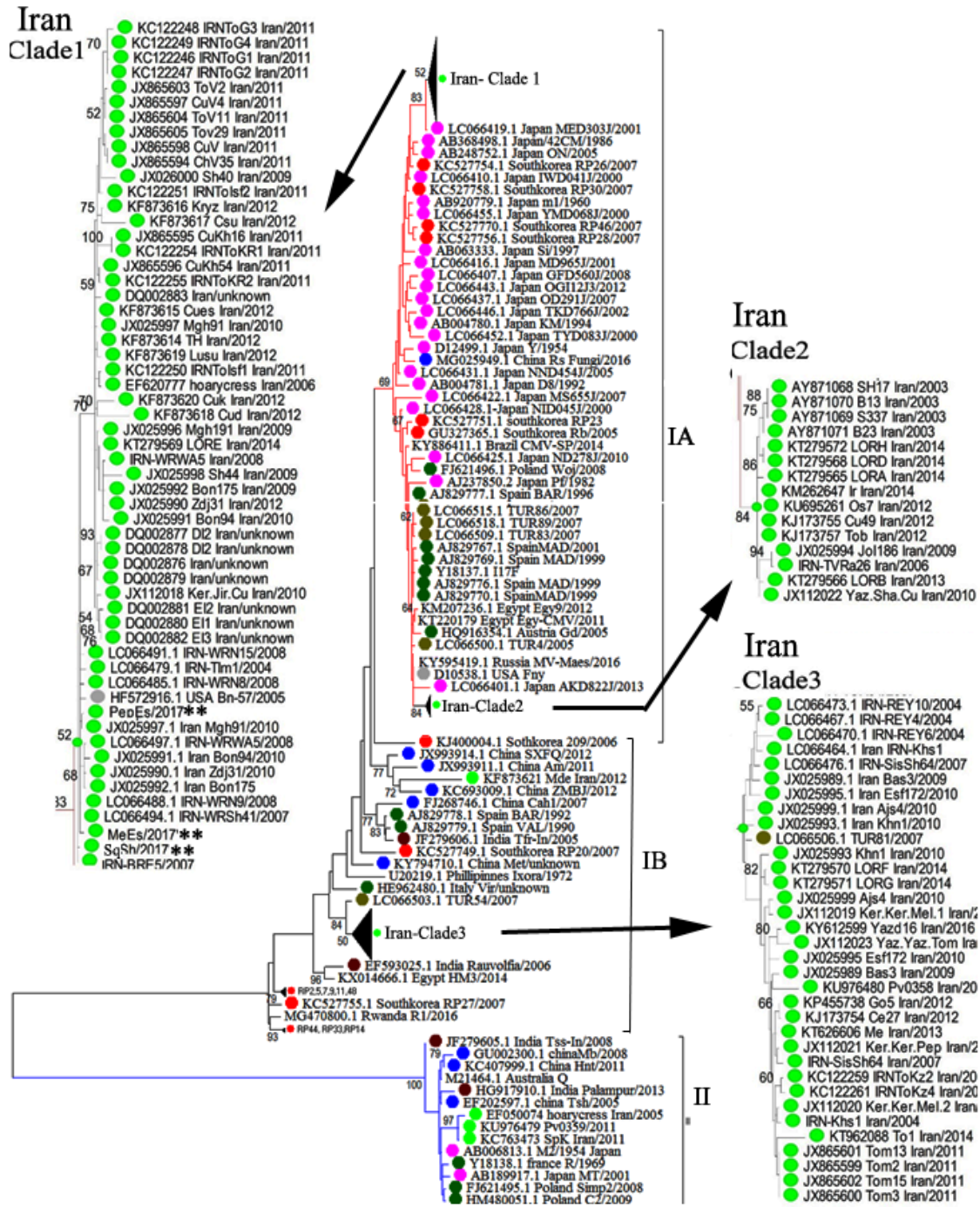
شکل ۳. درخت تبارزائی ایجاد شده به روش maximum likelihood با استفاده از ترادف مربوط به ژن 2b در جدایه های مختلف CMV از سرتاسر دنیا. اعداد نمایش داده شده روی گره (Node) مربوط به درصد بوت استرپ حاصل از ۱۰۰ تکرار است. فقط مقادیر بوت استرپ بیش از ۵۰ نشان داده شده و گره ها با بوت استرپ کمتر از ۵۰ حذف شده است. جدایه های مربوط به کشورهای مختلف با رنگهای متفاوت نمایش داده شده است. جدایه های مورد بررسی در این مطالعه با ستاره مشخص شده اند.

Fig.3. ML phylogenetic tree generated based on the 2b gene sequence of CMV isolates from different countries. Bootstrap values of above 50 are shown on the nodes. Isolates are represented by their strain names and accession numbers



شکل ۴. درخت تبارزایی ایجاد شده به روش maximum likelihood با استفاده از ترادف مربوط به ژن 3a در جدایه های مختلف CMV از سرتاسر دنیا. اعداد نمایش داده شده روی گره (Node) مربوط به درصد بوت استرپ حاصل از ۱۰۰ تکرار است. فقط مقادیر بوت استرپ بیش از ۵۰ نشان داده شده است. جدایه‌های مربوط به کشورهای مختلف با رنگهای متفاوت نمایش داده شده است. جدایه های مورد بررسی در این مطالعه با ستاره مشخص شده اند.

Fig.4. ML phylogenetic tree generated based on the 3a gene sequence of CMV isolates from different countries. Bootstrap values of above 50 are shown on the nodes. Isolates are represented by their strain names and accession numbers



شکل ۵. درخت تبارزائی ایجاد شده به روش Maximum likelihood با استفاده از ترادف مربوط به ژن CP در جدایه های مختلف CMV از سرتاسر دنیا. اعداد نمایش داده شده روی گره (Node) مربوط به درصد بوت استرپ حاصل از ۱۰۰ تکرار است. فقط مقادیر بوت استرپ بیش از ۵۰ نشان داده شده است. جدایه های مربوط به کشورهای مختلف با رنگهای متفاوت نمایش داده شده است. جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه با ستاره مشخص شده‌اند.

Fig.5. ML phylogenetic tree generated based on the CP gene sequence of CMV isolates from different countries. Bootstrap values of above 50 are shown on the nodes. Isolates are represented by their strain names and accession numbers

دارای میانگین تفاوت نوکلئوتیدی قابل توجه با هر دو زیرگروه IA و IB بود ولی در این مطالعه به عنوان اعضاء زیرگروه IB لحاظ شدند.

درخت تبارزایی بر اساس ژن‌های ویروس

در این مطالعه درختهای تبارزایی بر اساس ژن‌های 1a و 2a (نشان داده نشده)، 2b، 3a، 2b (MP) و CP (شکل‌های ۳ تا ۵) به روش maximum likelihood ترسیم شد. درختهای 1a، 2a و 2b شبیه درخت ترسیم شده بر اساس آر آن ای‌های مربوطه (شماره ۱ و ۲) آنها است. همه جدایه‌های ایرانی بر اساس تحلیل تبارزایی این ژنها در زیرگروه IA قرار گرفتند. در درخت تبارزایی بر اساس ژن 2b موقعیت ۳۵ جدایه ی CMV ایران در زیرگروه IA نمایش داده شده است. همه این جدایه‌ها در یک کلاستر جداگانه قرار نگرفته‌اند و بنابراین جد واحد نداشته‌اند. چنین حالتی در درخت تبارزایی بر اساس ژن 2a نیز مشاهده شد.

ترادف ژن MP در بیش از ۳۰ جدایه ی ایرانی CMV در تحلیل تبارزایی مورد استفاده قرار گرفت. در درخت تبارزایی مذکور ۱۹ جدایه ی ایران در زیرگروه IA و ۱۳ جدایه ی دیگر ایران در زیرگروه IB قرار گرفتند. به مانند تحلیل تبارزایی آر آن ای شماره ۳ جدایه‌های ایرانی در زیرگروه IB همراه با جدایه‌هایی از ترکیه دارای یک جد مشترک بوده‌اند. اعضاء ایرانی زیرگروه IA بر اساس این درخت تبارزایی با جدایه‌هایی از کشورهای دیگر از جمله جدایه Bn-57 آمریکا و MED303J ژاپن هم گروه هستند. دو جدایه ایرانی TVRa و Jol186 با بقیه جدایه‌های ایرانی زیرگروه IA همگروه نشدند.

درخت ترسیم شده بر اساس ژن CP جدایه‌های زیرگروه IA و II را به خوبی در کلاسترهای مشخص متمایز کرد. جدایه‌های زیرگروه IB روی یک کلاستر با بوت

بر اساس درخت تبارزایی حاصل از آر آن ای شماره ۳، جدایه‌های Sqsh و MeEs و چند جدایه ی دیگر از ایران (۱۱ جدایه) به همراه جدایه‌های CMV از کشورهای شرق آسیا مانند ژاپن، کره جنوبی و جدایه ی Bn57 آمریکا در یک کلاستر قرار گرفته و به زیرگروه IA تعلق داشتند. هیچ کدام از جدایه‌های ایران با Fny آمریکا در یک کلاستر قرار نگرفتند. دو جدایه ایرانی TVRa26 و Jol186 (متعلق به زیرگروه IA) با هیچ کدام از جدایه‌های دیگر موجود در این درخت تبارزایی دسته بندی نشدند. از این رو آر آن ای شماره ۳ جدایه‌های ایرانی در زیرگروه IA یک نیای مشترک نداشتند.

بر اساس تحلیل تبارزایی آر آن ای شماره ۳، نه جدایه CMV ایران در زیرگروه IB قرار گرفتند. آر آن ای شماره ۳ جدایه‌های ایران CMV در زیرگروه IB همراه با جدایه‌هایی از ترکیه و سپس با جدایه‌هایی از اروپا (جدایه Vir ایتالیا)، هند و مصر در یک گروه تبارزایی قرار گرفتند (شکل ۲).

میانگین شباهت کل آر آن ای شماره ۳ در جدایه‌های CMV (جدایه‌های مورد استفاده در شکل ۲) ۹۹/۱ محاسبه شد. تحلیل تبارزایی انجام شده در این مطالعه بر اساس آر آن ای شماره ۳ نیز نشان داد که همه اعضاء زیرگروه I در کلاسترهای مربوط به IA یا IB گروه‌بندی نمی‌شوند. از این رو در درخت تبارزایی مذکور موقعیت چند زیرگروه (X1 تا X6) قابل شناسایی نیست. حالت‌های مشابه در آر آن ای‌های ۱ و ۲ نیز تا حدودی وجود داشت. بر اساس آنالیزهای درصد تشابه مشخص شد که زیرگروه‌های X1 تا X5 و نیز جدایه‌های D8 و PF شباهت بسیار بیشتری به زیرگروه IA داشته و به این زیرگروه تعلق دارند (اطلاعات نشان داده نشده). زیرگروه X6 و نیز جدایه‌های 209، RP20 که از کره جنوبی بود

ای‌های ۱ و ۲ متعلق به زیر گروه‌های IB و II در جدایه‌های ایرانی CMV بدست نیامد. براساس درخت تبارزائی ترسیم شده با ژن‌های روی آر ان ای شماره ۳ (و یا با کل آر ان ای شماره ۳) تعدادی از جدایه‌های ایرانی در زیر گروه IB و II قرار گرفتند. درخت‌های تبارزائی ایجاد شده بر اساس ترادف آر ان ای‌های ۱ تا ۳ تعداد ۵ جدایه از بین ۱۵ جدایه ایرانی (۳۳ درصد) شامل Khs1, REY4, REY6, REY10 و Sissh64 را به عنوان نوجوره (Reassortant) شناسایی کرد. آر ان ای شماره ۱ و ۲ جدایه‌های مذکور متعلق به زیر گروه IA و آر ان ای شماره ۳ آن‌ها متعلق به IB شناسایی شد. بنابراین نوع نوجوری تشخیص داده شده در جدایه‌های ایرانی IA:IA:IB بود. هیچ کدام از دو جدایه SqSh و MeEs نوجوره نبوده و هر سه آر ان ای آنها متعلق به IA بود. مقایسه درخت‌های تبارزائی بر اساس ژن 2b, CP و MP نشان داد که چند جدایه ایرانی دیگر از جمله Khs1, Bas3 و Esf172 بر اساس ترادف 2b (آر ان ای شماره ۲) متعلق به زیر گروه IA و بر اساس ترادف‌های CP یا MP (آر ان ای شماره ۳) متعلق به زیر گروه IB بودند. از این نظر جدایه‌های مذکور نیز به عنوان نوجوره شناسایی شدند. در مورد ترادف و گروه بندی آر ان ای شماره ۱ این جدایه‌ها اطلاعی وجود ندارد. مقایسه موقعیت جدایه‌های ایرانی زیر گروه IA در درخت‌های تبارزائی نشان داد که آر ان ای شماره ۱ این جدایه‌ها دارای یک نیای مشترک نزدیک بهم بودند. برعکس آر ان ای‌های شماره ۲ و نیز ۳ این جدایه‌ها (زیر گروه IA) یک نیای نزدیک مشترک نداشتند. این موضوع با تحلیلهای یکسانی نوکلئوتیدی نیز همخوانی داشت. مقایسه ترادف آر ان ای‌های ۱ تا ۳ در جدایه‌های ایرانی زیر گروه IA نشان داد که میانگین یکسانی در آر ان ای شماره ۱ آنها برابری ۹۹/۱، در آر ان ای ۲ برابر ۹۸

استرپ بالا قرار نگرفتند. این موضوع نشان دهنده هتروژنی (غیر همگونی ژنی) در بین اعضاء این زیر گروه است. تا کنون ژن CP در تعداد قابل توجهی از جدایه‌های CMV ایران تعیین ترادف شده که موقعیت آن‌ها روی درخت تبارزائی نمایش داده شده است. اکثر جدایه‌های ایران در زیر گروه IA قرار داشتند. همان گونه که از درخت تبارزائی مشخص است اعضاء ایرانی این زیر گروه حداقل در دو کلاستر جداگانه قابل تفکیک بودند و این موضوع نشان می‌دهد که جدایه‌های مذکور یک نیای مشترک در ایران نداشته و حداقل ۲ بار از منشاء مختلف وارد ایران شده‌اند. اکثر قریب به اتفاق جدایه‌های ایرانی زیر گروه IB نیز در یک کلاستر مشخص قرار گرفتند که نشان می‌دهد اعضاء ایرانی این زیر گروه دارای نیای مشترک در ایران هستند. تنها استثناء در این زمینه جدایه Mde بود. جدایه‌های ایرانی زیر گروه IA در دو کلاستر Iran-Clade 1 و 2 و جدایه‌های ایرانی زیر گروه IB در کلاستر 3 Iran-Clade گروه‌بندی شدند. همانگونه که در شکل ۵ مشخص است جدایه‌های CMV متعلق به Iran-Clade 1 فراوان ترین جدایه‌های شناخته شده در ایران بودند. دو جدایه SqSh و MeEs تعیین ترادف شد در این مطالعه نیز به 1 Iran-Clade تعلق داشتند. نکته مهم در بررسی انجام شده با همه درخت‌های تبارزائی عدم ارتباط مشخص بین میزبان‌ها، سال نمونه برداری و محل نمونه برداری (شهر یا استان) با تبارزائی جدایه‌های CMV در ایران بود (اطلاعات نشان داده نشده).

شناسایی رخداد نوجوری در جدایه‌های ایران

آر ان ای‌های شماره ۱ و ۲ و ژن‌های روی آن‌ها در همه جدایه‌های ایرانی CMV به زیر گروه IA تعلق داشتند. بر اساس نتایج این مطالعه شواهدی مبنی بر وجود آر ان

شبهات در ترادف ژنهای MP و CP بین دو جدایه ایرانی زیرگروه I (مورد بررسی در این تحقیق) نیز به ترتیب ۹۱/۵ و ۸۹ درصد بود.

برای بررسی دقیق تر میزان تنوع ژنتیکی در ژنهای مختلف CMV (زیرگروه I) در جمعیت‌های ایران و کشورهای دیگر از مدل Jukes-Cantor استفاده شد (جدول ۳). در این روش نیز ژن 1a در جدایه‌های ایرانی در مقایسه با میانگین جهانی کمترین تنوع را داشت. زمانیکه فقط اعضاء IA بررسی شدند میانگین جهانی تنوع نوکلئوتیدی در ژنهای 1a، 2a، 2b، MP و CP به ترتیب ۳/۵، ۱/۴، ۲، ۱/۹ و ۱/۲ برابر میانگین تنوع در جدایه‌های ایرانی بود. از این نظر میتوان نتیجه گرفت که ژنهای CP و سپس 2a در جدایه‌های ایرانی زیرگروه IA دارای بیشترین و ژن 1a دارای کمترین تنوع هستند. میانگین تنوع ژنهای CP و MP در جمعیت‌های ایرانی متعلق به زیرگروه I (IA+IB) در حد میانگین جهانی بود.

میزان تنوع نوکلئوتیدی ژنهای CMV در جمعیت‌های مربوط به ایران و چند کشور و ناحیه جغرافیایی دیگر محاسبه و با یکدیگر مقایسه شد (جدولهای ۴ و ۵). از بین سه ژن مستقر روی آر آن ای‌های ۱ و ۲ در جدایه‌های متعلق به زیرگروه IA، ژن 1a در جدایه‌های ایرانی دارای کمترین تنوع در مقایسه با جمعیت کشورهای دیگر بود و بیشترین قرابت را با جدایه‌های ترکیه داشت. تنوع ژن 2a جدایه‌های ایرانی در زیر گروه IA از تنوع جدایه‌های ترکیه بیشتر بوده ولی اندکی از تنوع جدایه‌های ژاپن و کره جنوبی کمتر بود. بر اساس ژن 2a جمعیت ایرانی CMV بیشترین قرابت را با جدایه‌های ترکیه داشت. تنوع ژن 2b در جدایه‌های ایرانی متعلق به زیرگروه IA از تنوع جدایه‌های ترکیه و ژاپن کمتر بوده و در حد جدایه‌های کره جنوبی بود.

جدول ۲. درصد یکسانی ژنهای مختلف جدایه‌های CMV در جمعیت‌های جغرافیایی مختلف (ایران و کشورهای دیگر)

Table 2: Sequence identity (%) of the CMV gene sequences from geographical populations of Iran and other countries

Population	Open Reading Frame ¹				
	1a	2a	2b	MP	CP
Subgroup I					
World (mean) ²	92.7	94.3	93.02	94.8	95.2
Iran (mean)	99.2	98.1	98.6	96	95.6
Subgroup I+II					
World (mean)	91.7	92.7	93	92.7	92.8
Iran (mean)	ND ⁴	ND	ND	ND	94.6

1. See figs1-5 for list of isolates used
2. excluding Iranian strains
3. Minimum sequence identity between pairs of sequences
4. Not determined

و در آر آن ای ۳ برابر ۹۸/۷ بود. با توجه به اینکه جدایه‌های مورد استفاده در این تحلیلها غالباً مشابه بود میتوان گفت که تنوع آر آن ای ۱ جدایه‌های ایرانی از تنوع آر آن ای‌های دیگر کمتر است. همانطور که قبلاً نیز اشاره شد این یافته‌ها وقوع یک نوع نوجوری درون زیرگروهی (IA) را در جدایه‌های ایرانی زیر گروه IA پیشنهاد میکند.

تخمین تنوع نوکلئوتیدی جمعیت‌های ایرانی CMV و مقایسه آن با جمعیت دیگر کشورها

میزان (درصد) یکسانی نوکلئوتیدی ژنهای مختلف CMV در جمعیت‌های ایران در مقایسه با دیگر کشورها (میانگین جهانی) در جدول ۲ آمده است. میانگین شبهات جدایه‌های زیرگروه I (IA+IB) در دنیا نشان دهنده تنوع بیشتر ژن 1a و تنوع کمتر ژن CP داشت. دقیقاً برعکس این حالت در جدایه‌های ایرانی دیده شد. البته باید توجه داشت که ژن 1a در جدایه‌های ایرانی تنها شامل اعضاء زیرگروه IA بود در حالیکه ژنهای CP و MP جدایه‌های ایرانی شامل اعضاء زیرگروه IA و IB بودند. حداقل

جدول ۳. میانگین ا تنوع (فاصله) نوکلئوتیدی ژنهای مختلف جدایه‌های CMV در جمعیت‌های جغرافیایی مختلف (ایران و کشورهای دیگر) با استفاده از مدل Jukes-Cantor

Table3: Mean nucleotide distance of CMV genes in different geographical populations (Iran and other countries) using Jukes-Cantor model

Population	Open Reading Frame ¹				
	1a	2a	2b	MP	CP
Subgroup I					
World ²	0.077(0.003)	0.061(0.003)	0.074(0.008)	0.054(0.005)	0.049(0.005)
Iran	0.008(0.001)	0.021(0.002)	0.014(0.003)	0.043(0.005)	0.045(0.005)
Overall ³	0.073(0.003)	0.055(0.002)	0.059(0.007)	0.053(0.005)	0.050(0.005)
Subgroup I+II					
World ²	0.028(0.002)	0.028(0.002)	0.027(0.004)	0.027(0.003)	0.023(0.003)
Iran	0.008(0.001)	0.021(0.002)	0.014(0.003)	0.014(0.002)	0.021(0.003)

1. See figs1-5 for list of isolates used
2. excluding Iranian strains
3. Minimum sequence identity between pairs of sequences
4. Not determined

ترکیه، اروپا و در انتها با چین و کره جنوبی هستند. تنوع نوکلئوتیدی ژن CP در بین جدایه‌های IA نشان داد که میزان تنوع جدایه‌های ایران قابل توجه و به عنوان مثال حدود ۱/۵ برابر تنوع جدایه‌های کره جنوبی است (جدول ۵). در بررسی حاضر میزان میانگین تنوع MP (محاسبه شده با روش Jukes-Cantor) جدایه‌های ایرانی (زیرگروه I، ۰/۴۳) در حد جدایه‌های ترکیه و اروپا، بیش از جدایه‌های ژاپن، و کمتر از جدایه‌های کره جنوبی و چین بود. از نظر فاصله نوکلئوتیدی بر اساس ژن MP (به مانند ژن CP) نزدیکترین جدایه‌های زیرگروه I به جدایه‌های ایران به ترتیب جدایه‌های مربوط به آمریکا، ژاپن، ترکیه، اروپا، چین و کره جنوبی بود. بر اساس تحلیل ژن MP مربوط به جدایه‌های IA، جدایه‌های آمریکا و ترکیه نزدیکترین جمعیتها به جمعیت ایرانی CMV بودند (جدول ۵). میانگین تنوع ژن MP در جدایه‌های ایرانی زیرگروه IA از برخی کشورها از جمله کره جنوبی، ژاپن و اروپا کمتر ولی از ترکیه بیشتر بود. میانگین تنوع ژن CP در جمعیت‌های ایرانی CMV متعلق به زیر گروه IA از تنوع ژن MP بیشتر بود.

تنوع در ترادف ژنهای CP و MP در بین جدایه‌های ایران و چند کشور دیگر نیز با روش Jukes-Cantor محاسبه شد. نتایج نشان داد که میانگین تنوع نوکلئوتیدی ژن CP در بین جدایه‌های ایرانی (اعضاء هر دو گروه I و II، برابر ۰/۵۷) و کمتر از جدایه‌های چین (۰/۱۵۴) و اروپا (۰/۱۲) و ژاپن (۰/۰۷) بود. زمانی که تنها جدایه‌های CMV از زیر گروه I مورد بررسی قرار گرفت مشخص شد که میانگین تنوع ژنتیکی ژن CP در جدایه‌های ایرانی قابل توجه (۰/۴۵) و از جمعیت‌های ژاپن و اروپا بیشتر و در حد جمعیت‌های ترکیه و کره جنوبی بوده ولی اندکی کمتر از جدایه‌های چین است (جدول ۵). همچنین این مقدار تنوع در حدود میانگین جهانی تنوع محاسبه شده برای این ژن بود (۰/۴۹). این تنوع قابل توجه با نتایج مربوط به درخت تبارزائی ژن مذکور نیز هماهنگی دارد چرا که جدایه‌های ایرانی زیر گروه I در چند موقعیت از درخت تبارزائی پراکندگی داشتند. مقایسه تنوع نوکلئوتیدی ژن CP با استفاده از این روش (Jukes-Cantor) نشان داد که جدایه‌های ایرانی (زیرگروه I) دارای بیشترین میانگین شباهت به ترتیب با جدایه‌های آمریکا (دو جدایه)، ژاپن و

جدول ۴. میانگین تنوع (فاصله) نوکلئوتیدی جدایه‌های CMV (زیرگروه IA) محاسبه شده بر اساس ژن های 1a، 2a و 2b در جمعیت‌های جغرافیایی مختلف با استفاده از مدل Jukes-Cantor

Table 4. Mean nucleotide diversity of CMV isolates (Subgroup IA) calculated by averaging over all CMV 1a, 2a and 2b gene sequence pairs in different geographical regions using Jukes-Cantor model

ORF and Population ¹	N ²	Iran	Turkey	Japan	S.korea	China	Europe	USA
ORF 1a								
Iran	15	0.008(0.001)³			ND ⁴			
Turkey	7	0.021(0.002)	0.022(0.002)		ND			
Japan	9	0.029(0.003)	0.030(0.003)	0.021(0.002)	ND			
S.Korea	ND	ND	ND	ND	ND			
China	1	0.050(0.004)	0.053(0.004)	0.052(0.004)	ND	ND		
Europe	2	0.029(0.003)	0.024(0.002)	0.027(0.002)	ND	0.052(0.005)	ND	
USA	2	0.022(0.002)	0.022(0.002)	0.026(0.002)	ND	0.051(0.004)	0.018(0.002)	ND
ORF 2a								
Iran	15	0.021(0.002)³						
Turkey	6	0.019(0.001)	0.013(0.001)					
Japan	18	0.031(0.002)	0.030(0.002)	0.025((0.002))				
S.Korea	7	0.031(0.002)	0.030(0.002)	0.025(0.002)	0.024(0.002)			
China	2	0.037(0.003)	0.041(0.003)	0.040(0.003)	0.041(0.003)	ND		
Europe	2	0.020(0.002)	0.016(0.002)	0.027(0.002)	0.027(0.002)	0.038(0.003)	ND	
USA	2	0.024(0.002)	0.025(0.002)	0.032(0.002)	0.032(0.002)	0.031(0.003)	0.024(0.002)	ND
ORF 2b								
Iran	35	0.014(0.003)³						
Turkey	6	0.020(0.004)	0.024(0.006)					
Japan	19	0.027(0.005)	0.033(0.006)	0.023(0.005)				
S.Korea	8	0.026(0.006)	0.032(0.007)	0.020(0.004)	0.017(0.005)			
China	2	0.039(0.008)	0.046(0.009)	0.042(0.008)	0.041(0.009)	ND		
Europe	2	0.018(0.005)	0.024(0.005)	0.024(0.005)	0.024(0.006)	0.037(0.008)	ND	
USA	2	0.023(0.005)	0.029(0.006)	0.031(0.006)	0.030(0.007)	0.028(0.006)	0.021(0.005)	ND

1. Related to the subgroup IA
2. Number of isolates. See figures 1-3 for list of isolates used
3. Genetic distance within each country is shown in bold. Numbers in parenthesis are standard errors
4. ND, not determined

بحث

است (Bashir et al. 2006, Roossinck 2012, Davino et al. 2017, Nouri et al. 2014, Kim et al. 2014, Ohshima et al. 2016, Bolou et al. 2018). بر اساس مطالعات مذکور جدایه‌های مختلف CMV در دو زیر گروه (کلاستر) I و II طبقه بندی می‌شوند. جدایه‌های زیرگروه II عمدتاً در مناطق خنک و جدایه‌های زیرگروه I در مناطق گرمتر شیوع بیشتری داشتند (Haas et al. 1989, Ben Tamarzizt et al. 2013). مطالعات تبارزایی بعدی نشان داد که اعضاء زیرگروه I به دو زیرگروه کوچکتر IA و IB قابل تقسیم هستند. (Roossinck et al. 1999,

در این مطالعه ترادف کامل ژنوم دو جدایه CMV از کدو و خربزه از استان‌های فارس و اصفهان گزارش شد. نتایج این مطالعه نشان داد که دو جدایه ی SqSh و MeEs از نظر ترادف با یکدیگر شباهت قابل توجهی داشته (بیش از ۹۹ درصد) و بر اساس تحلیل‌های تبارزایی، این دو جدایه به زیرگروه IA تعلق داشتند. تحلیل تبارزایی جدایه‌های CMV در مطالعات زیادی از کشورها و از میزبان‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته

جدول ۵. میانگین اختلاف ژنتیکی جدایه‌های CMV محاسبه شده بر اساس ژن های MP و CP در جمعیت‌های جغرافیایی مختلف با استفاده

از مدل Jukes-Cantor

Table 5: Mean genetic distance of CMV isolates calculated by averaging over all CMV MP and CP gene sequence pairs in different geographical populations using Jukes-Cantor model

ORF and Population ¹	N ²	Iran	Turkey	Japan	S.Korea	China	Europe	USA
MP								
IA+IB								
Iran	29	0.043(0.005)³						
Turkey	6	0.044(0.005)	0.039(0.005)					
Japan	21	0.043(0.005)	0.042(0.005)	0.027(0.004)				
S.Korea	18	0.066(0.007)	0.064(0.007)	0.062(0.007)	0.052(0.006)			
China	6	0.064(0.007)	0.061(0.007)	0.062(0.007)	0.062(0.006)	0.058(0.006)		
Europe	15	0.047(0.005)	0.040(0.004)	0.038(0.005)	0.063(0.007)	0.060(0.006)	0.041(0.005)	
USA	2	0.037(0.004)	0.034(0.004)	0.026(0.004)	0.059(0.007)	0.057(0.007)	0.030(0.004)	ND⁴
IA								
Iran	22	0.014(0.002)						
Turkey	4	0.022(0.004)	0.003(0.001)					
Japan	21	0.025(0.004)	0.026(0.004)	0.027(0.004)				
S.Korea	6	0.027(0.004)	0.027(0.005)	0.027(0.004)	0.023(0.004)			
China	1	0.026(0.005)	0.018(0.005)	0.027(0.005)	0.030(0.006)	ND		
Europe	12	0.024(0.004)	0.014(0.002)	0.028(0.004)	0.028(0.004)	0.023(0.004)	0.021(0.003)	
USA	2	0.017(0.003)	0.014(0.003)	0.026(0.004)	0.027(0.005)	0.021(0.004)	0.019(0.003)	ND
CP								
IA+IB								
Iran	107	0.045(0.005)						
Turkey	6	0.049(0.006)	0.037(0.006)					
Japan	21	0.046(0.006)	0.042(0.006)	0.025(0.003)				
S.korea	18	0.065(0.007)	0.059(0.007)	0.055(0.007)	0.048(0.006)			
China	6	0.064(0.007)	0.058(0.007)	0.056(0.007)	0.066(0.007)	0.059(0.007)		
Europe	11	0.049(0.006)	0.034(0.004)	0.035(0.005)	0.055(0.007)	0.054(0.006)	0.030(0.004)	
USA	2	0.038(0.005)	0.035(0.005)	0.028(0.005)	0.054(0.007)	0.056(0.007)	0.030(0.005)	ND
IA								
Iran	72	0.021(0.003)						
Turkey	4	0.034(0.006)	0.005(0.002)					
Japan	21	0.032(0.004)	0.029(0.005)	0.025(0.003)				
S.korea	6	0.030(0.005)	0.026(0.005)	0.021(0.003)	0.014(0.003)			
China	1	0.032(0.006)	0.025(0.006)	0.024(0.004)	0.022(0.005)	ND		
Europe	8	0.033(0.005)	0.009(0.002)	0.029(0.004)	0.025(0.005)	0.023(0.005)	0.009(0.002)	
USA	2	0.024(0.004)	0.020(0.004)	0.029(0.004)	0.026(0.005)	0.025(0.005)	0.020(0.004)	ND

1. Related to the subgroup I(IA +IB) or IA

2. Number of isolates. See figures 4 and 5 for list of isolates used

3. Genetic distance within each country is shown in bold. Numbers in parenthesis are standard errors

4. ND, not determined

جدایه‌های CMV در ایران و دنیا بدست داده است و در آن اکثر قریب به اتفاق ترادفهای گزارش شده از CMV در ایران تحلیل شده‌اند. بر این اساس مشخص شد که آر آن ای‌های ۱ و ۲ در همه جدایه‌های ایرانی متعلق به زیرگروه IA بودند. بر اساس ترادف ژنهای آر آن ای شماره ۳ نیز اکثر جدایه‌های CMV در ایران متعلق به زیرگروه IA و

(Roossinck 2002). اعضاء زیرگروه IA دارای دامنه گسترش وسیع در کل دنیا بوده در صورتی که IB غالباً در آسیا وجود دارند و تا قبل از دهه ۱۹۸۰ از خارج از آسیا گزارش نشده بودند (Jacqumond 2012, Palukaitis and Garcia-Arenal 2003).

مطالعه حاضر ارزیابی جامعی از تنوع و قرابت تبارزائی

شد که نو ترکیبی نقش چندانی در تنوع جدایه‌های کالیفرنیا نداشته است (Lin et al. 2004). در این ارتباط میتوان احتمال داد که نو ترکیبی بین دو جدایه نزدیک به هم انجام گرفته و بوسیله روشهای مذکور در این مطالعه قابل ردیابی نبوده و یا اینکه جدایه‌های نو ترکیب سازش کافی برای بقاء نداشته‌اند (Lin et al., 2004). به علاوه به دلیل این که ژنوم کامل آر آن ای‌های CMV (مخصوصاً آر آن ای‌های ۲ و ۳) در ایران کمتر مورد بررسی قرار گرفته، نمی‌توان به طور دقیق نقش این پدیده را در تنوع جمعیت CMV در ایران تخمین زد. یکی از مکانیزمهای اصلی دیگر در ایجاد تنوع در ویروسهای دارای ژنوم چند بخشی نوجوری است (Pressing and Reaney 1984, Lin et al. 2004, Jacquemond 2012). در این مطالعه پنج جدایه از بین ۱۵ جدایه ی ایرانی با ژنوم کاملاً تعیین ترادف شده نوجوره تشخیص داده شدند. از بین شش نوع نوجوری قابل وقوع بین زیرگروه‌های IA و IB تنها رخداد IA:IA:IB در بین جدایه‌های ایرانی مشاهده شد. این موضوع احتمال می‌دهد که بر اساس ترکیب ژنتیکی آر آن ای‌های CMV ایران، وقوع بقیه ی رخدادها برای بیماریزایی، بقاء و یا انتقال مطلوب نباشد. البته در این ارتباط نیاز به اطلاعات ژنومی از جدایه‌های بیشتری از ایران است. قبلاً نیز وقوع نوجوری با تحلیل ترادف مربوط به ژن 2b و ژنهای CP و MP در برخی جدایه‌های ایرانی گزارش شده بود (Nematollahi et al. 2012). اخیراً در مطالعه ای در تونس وقوع چهار رخداد از این شش رخداد در بین جدایه‌های آن کشور شناسایی شده است که از نظر تنوع رخداد از جدایه‌های ایران بیشتر است (Ben Tamarzizt et al. 2013). علاوه بر این رخدادهای بین زیرگروهی، بررسی دقیق توپولوژی درختهای تبارزایی، احتمال وقوع نوجوری درون زیرگروهی بین برخی از جدایه‌های ایرانی

سپس IB بوده و جمعیت جدایه‌های زیر گروه II کمتر از بقیه بود. گونه میزبان اصلی نیز تاثیر مشهودی بر تبارزایی و تمایز جدایه‌های CMV نداشت. به طور مثال جدایه‌های ایرانی زیر گروه IA که اکثراً از گیاه تربچه (خانواده Brassicaceae) (بودند (Ohshima et al. 2016) با جدایه‌های Sqsh و MeEs که از خانواده گیاهی Cucurbitaceae بودند قرابت نزدیکی داشتند. حتی یک جدایه CMV از قارچ *Rhizoctonia solani* (Andika et al. 2017) نیز از نظر تبارزایی در زیرگروه IA قرار گرفت و با برخی سویه‌های جدا شده از گیاهان قرابت نزدیک داشت.

یکی از فاکتورهای مهم تنوع پذیری در ویروس‌ها وجود نو ترکیبی است. در CMV نیز این پدیده نقش مهمی در تنوع ژنتیکی و احتمالاً تعیین خصوصیات بیولوژیکی ویروس داشته است هر چند که محل وقوع آنها غالباً داخل چارچوبهای ژنی نبوده است (Ohshima et al. 2016, Bonnet et al. 2005, Ben Tamarzizt et al. 2013). یک بررسی روی مجموعه ای از جدایه‌های CMV در اسپانیا، نو ترکیبی به عنوان مکانیسم مهم در شکل دادن ساختار ژنتیکی جمعیت ویروس مشخص شده است (Bonnet et al. 2005). فراوانی نو ترکیبی در این جدایه‌ها غالباً بر روی آر آن ای شماره ۳ گزارش شده در حالی که فراوانی نو ترکیبی مشاهده شده در این بررسی و نیز در مطالعه ای دیگر (Ohshima et al. 2016) در آر آن ای شماره ۱ بیشتر بود. آن گونه که از نتایج این بررسی در مورد جدایه‌های CMV ایران به دست آمد (۱۵ جدایه با ژنوم کامل تعیین ترادف شده) نو ترکیبی از نظر تعداد وقوع، نقش چندانی در تنوع ژنتیکی این ویروس نداشته و تنها شامل یک رخداد مشابه در قسمت NTR-3' آر آن ای شماره ۳ در ۳ جدایه بود. در یک تحقیق دیگر نیز مشخص

تنوع MP بیشتر باشد. در یک بررسی نیز میزان تنوع ژنتیکی محاسبه شده ژن CP جدایه‌های CMV کالیفرنیا نزدیک به تنوع MP بیشتر بود (Lin et al. 2004).

ژن CP در تعداد قابل توجهی از جدایه‌های ایرانی CMV از نقاط مختلف ایران تعیین ترادف شده است (Sokhandan Bashir et al. 2006, Rasoulpour and Izadpanah 2008, Nematollahi et al. 2012). بر اساس جستجو در پایگاه داده NCBI ترادف کامل این ژن از حدود ۱۲۰ جدایه ایرانی در GenBank قرار گرفته است. از این نظر تحلیل تبارزائی این ژن می‌تواند تخمین بهتری از تنوع ژنتیکی جمعیت CMV در ایران بدست دهد. تحلیلها نشان داد که جدایه‌های ایرانی CMV تقریباً (و نه بطور کامل) مجزا از جدایه‌های دیگر کشورها گروه‌بندی شدند. از این نظر می‌توان گفت که نقش توزیع جغرافیایی در تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایران تا حدودی مهم بوده است. از طرفی قرابت تبارزائی جدایه‌های CMV با توزیع جغرافیایی آنها در داخل کشور همبستگی نداشت. به عنوان مثال جدایه‌های MeES و SqSh که از میزبانهای مختلف و از دو منطقه جغرافیایی مختلف جداسازی شده‌اند با جدایه‌های این ویروس از دیگر نواحی ایران در شمالغرب، شمالشرق و نواحی جنوبی و مرکزی ایران در یک کلاستر قرار گرفتند. این یافته احتمال می‌دهد که آلودگی‌ها ی CMV در داخل ایران جابه جا می‌شوند. توزیع جغرافیایی در قرابت تبارزائی جدایه‌های CMV در چندین کشور دیگر مانند ژاپن و ایتالیا تاثیر چندانی نداشته است (Davino et al. 2012, Ohshima et al. 2016). این موضوع می‌تواند به دلیل چگونگی انتقال ویروس باشد که علاوه بر شته‌ها به راحتی توسط بذور برخی میزبان‌ها در فواصل طولانی نیز صورت می‌گیرد. نکته جالب توجه اینکه بر اساس تحلیل ژنهای CP و MP جدایه‌های ایرانی

در زیرگروه IA را نیز تایید میکند. وقوع این نوع نوجوری‌ها که کمتر به آن پرداخته شده است در برخی مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Lin et al. 2004).

نتایج این بررسی و نیز برخی مطالعات دیگر به وضوح نشان می‌دهد که جدایه‌های زیرگروه I به قدری هتروژن و از نظر ژنتیکی متنوع هستند که نمی‌توانند تنها در دو زیرگروه جداگانه طبقه بندی شوند (Liu et al. 2009). احتمالاً عامل انتشار جغرافیایی یکی از دلایل این نوع تنوع ژنتیکی باشد چرا که به عنوان مثال بسیاری از جدایه‌های کره جنوبی در هیچکدام از دو زیر گروه IA یا IB قرار نگرفتند. به عبارت دیگر توانایی این جدایه‌ها در انتشار وسیع جغرافیایی و وقوع گسترده در میزبانهای متنوع می‌تواند بدلیل ویژگی آنها در تثبیت این تنوع ژنتیکی قابل توجه باشد.

تحلیل‌های انجام شده نشان داد که میانگین تنوع نوکلئوتیدی ژنهای CMV در جدایه‌های ایرانی در انطباق کامل با میانگین جهانی آنها نیست و به عنوان مثال در جدایه‌های ایرانی میانگین تنوع Ia بسیار کمتر از میانگین جهانی است. این موضوع احتمال می‌دهد که برخی تغییرات نوکلئوتیدی در آر ان ای ۱ جدایه‌های CMV ایران باعث عدم سازگاری آن در برهمکنش با آر ان ای‌های ۲ و ۳ میشود. برعکس میانگین تنوع CP در جدایه‌های ایرانی (زیرگروه I) در حد میانگین جهانی محاسبه شد. همچنین میانگین تنوع ژن CP و MP در اعضاء زیرگروه I جدایه‌های ایرانی در مقایسه با میانگین آنها در کشورهای دیگر نیز قابل توجه بود. هرچند میانگین تنوع این دو ژن در جدایه‌های ایرانی زیرگروه I تفاوت معنی داری نشان نداد، ولی در مقایسه با کشورهای دیگر و نیز میانگین جهانی محاسبه شده به نظر میرسد که تنوع ژنتیکی CP در این جدایه‌ها (زیرگروه I) تا حدودی از

نزدیک به جدایه‌های یک کشور خاص داشته و از بقیه کشورها فاصله بیشتری دارد. این نکته نیز می‌تواند نشان دهنده مهاجرت استرینها به ایران از کشورهای مختلف (یا برعکس) باشد. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود یک دسته از جدایه‌های ایران (Iran-Clade1) قرابت بسیار نزدیکی با یک جدایه از آمریکا و سپس با یک جدایه از ژاپن دارد. در همین ارتباط جدایه‌های IB قرابت بسیار نزدیکی با جدایه‌های ترکیه دارند. این موضوع می‌تواند بدلیل مهاجرت جدایه‌های CMV در فواصل بسیار دور و نزدیک باشد. این چنین مهاجرتها در فواصل طولانی در مورد جدایه‌های ایتالیایی نیز گزارش شده است. (Davino *et al.* 2012). در این ارتباط آزمونهای زمان سنج تکاملی برای بررسی قدمت ویروس در ایران و مسیر احتمالی ورود ویروس به کشور پیشنهاد می‌شود.

زیر گروه IB (همراه به تعداد معدود جدایه از ترکیه) از یک نیای واحد تفرق یافته‌اند در حالیکه جدایه‌های زیرگروه IA حداقل در دو کلاستر بزرگ قابل تفکیک بودند. این یافته احتمال می‌دهد که جدایه‌های CMV زیر گروه IA در ایران حداقل ۲ بار وارد ایران شده و تفرق یافته است.

بر اساس تحلیل تبارزایی ژن CP اکثر جدایه‌های CMV شناسایی شده در ایران متعلق به زیرگروه IA و در این زیرگروه متعلق به کلاد ۱ شناسایی شدند (Iran-Clade 1, شکل ۵) بودند. اطلاعات این مطالعه پیشنهاد می‌کند که اعضاء این گروه در ایران توانسته‌اند با راندمان بالایی انتقال یافته و در مناطق وسیعی انتشار یابند.

مطالعات مربوط به فاصله تکاملی نشان داد که نمی‌توان به طور صریح بیان کرد که جدایه‌های ایران قرابت کاملاً

منابع

- Andika I.B., Wei S., Cao C., Salaipeth L., Kondo H. and Sun L. 2017. Phytopathogenic fungus hosts a plant virus: A naturally occurring cross-kingdom viral infection. *PNAS*, 114: 12267-12272.
- Ben Tamarzizt H., Montarry J., Girardot G., Fakhfakh H., Tepfer M. and Jacquemond M. 2013. Cucumber mosaic virus populations in Tunisian pepper crops are mainly composed of virus reassortants with resistance-breaking properties. *Plant Pathology* 62:1415-1428.
- Bolou B.A., Moury B., Abo K., Sorho F., Cherif M., Girardot G., Kouassi N.P., and Kone D. 2018. Survey of viruses infecting open-field pepper crops in Côte d'Ivoire and diversity of Pepper veinal mottle virus and Cucumber mosaic virus. *Plant Pathology* 67: 1416-1425
- Bonnet J., Fraile A., Sacristán S., Malpica J.M. and Garcia-Arenal F. 2005. Role of recombination in the evolution of natural populations of Cucumber mosaic virus, a tripartite RNA plant virus. *Virology* 332: 359-368.
- Davies C. and Symons R. H. 1988. Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA 3. *Virology* 165: 216-224.
- Davino S., Panno S., Rangel E.A., Davino M., Bellardi M.G., and Rubio L. 2012. Population genetics of Cucumber mosaic virus infecting medicinal, aromatic and ornamental plants from northern Italy. *Archives of virology* 157: 739-745.
- Doolittle S. P., 1916. A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology* 6: 145-147
- Gambino G., Perrone I. and Gribaudo I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19, 520-525.
- Gibbs M.J., Armstrong J.S. and Gibbs A.J. 2000. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16: 573-582.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W. and Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* 59: 307-21
- Haase A., Richter J. and Rabenstein F. 1989. Monoclonal antibodies for detection and serotyping of cucumber

- mosaic virus. *Journal of Phytopathology* 127: 129-136.
- Jacquemond M. 2012. Cucumber mosaic virus, pp. 439-504. In: Loebenstein G. and Lecoq H. (Eds.). *Advances in Virus Research*. Academic Press.
- Kim M.K., Seo J.K., Kwak H.R., Kim J.S., Kim K.H., Cha B.J. and Choi H.S. 2014. Molecular genetic analysis of cucumber mosaic virus populations infecting pepper suggests unique patterns of evolution in Korea. *Phytopathology* 104: 993-1000.
- Lin H.X., Rubio L., Smythe A.B. and Falk B.W. 2004. Molecular population genetics of Cucumber mosaic virus in California: evidence for founder effects and reassortment. *Journal of virology* 78: 6666-6675
- Liu YY., Yu SL., Lan YF., Zhang CL., Hou SS., Li XD., Chen XZ. and Zhu XP. 2009. Molecular variability of five Cucumber mosaic virus isolates from China. *Acta virologica* 53: 89-97
- Martin D. and Rybicki E. 2000 RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16: 562-563.
- Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A. and Muhire B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus evolution* 1: 1-5
- Maynard Smith S. J. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution* .34: 126-129.
- Nematollahi S., Sokhandan-Bashir N., Rakhshandehroo F. and Zamanizadeh H.R. 2012. Phylogenetic analysis of new isolates of Cucumber mosaic virus from Iran on the basis of different genomic regions. *The Plant Pathology Journal* 28: 381-389.
- Nouri S., Arevalo R., Falk B.W. and Groves R.L. 2014. Genetic structure and molecular variability of cucumber mosaic virus isolates in the United States. *PLoS ONE* 9: e96582.
- Ohshima K., Matsumoto K., Yasaka R., Nishiyama M., Soejima K., Korkmaz S., Ho S.Y.W., Gibbs A.J. and Takeshita M. 2016. Temporal analysis of reassortment and molecular evolution of Cucumber mosaic virus: Extra clues from its segmented genome. *Virology* 487: 188-197.
- Palukaitis P. and Zaitlin M. 1997. Replicase-mediated resistance to plant virus disease, pp. 349-377. In: K. Maramorosch, F. A. Murphy, A. J. Shatkin (Eds) *Advances in Virus Research*. Vol.48.
- Palukaitis P., and Garcí'a-Arenal F. 2003. Cucumoviruses. *Advances in Virus Research* 62:242-323.
- Pressing J. and D. C. Reaney. 1984. Divided genomes and intrinsic noise. *Molecular Evolution* 20:135-146
- Rasoulpour R. and Izadpanah K. 2008. Properties and taxonomic position of hoary cress strain of cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Pathology* 90:97-102.
- Rasoulpour R., Afsharifar A. and Izadpanah K. 2016. Partial biological and molecular characterization of a Cucumber mosaic virus isolate naturally infecting Cucumis melo in Iran. *Virus Disease* 27:193-197.
- Roossinck M. J. 2001. Cucumber mosaic virus as a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology* 2:59-63.
- Roossinck M. J., Zhang L. and Hellwald K.-H. 1999. Rearrangements in the 50 nontranslated evolution region and phylogenetic analyses of Cucumber mosaic virus RNA3 indicate radial of three subgroups. *Journal of Virology* 73:6752
- Roossinck M.J. 2002 Evolutionary history of Cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology* 76:3382-338
- Roossinck MJ. 2012. Persistent Plant Viruses: Molecular Hitchhikers or Epigenetic Elements? *Viruses: Essential Agents of Life* (Springer, Dordrecht, The Netherlands), pp 177-186.
- Salminen M.O., Carr J.K., Burke D.S. and McCutchan F.E. 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type1 by Bootscanning. *AIDS Research and Human Retroviruses* 11: 1423-1425.
- Sawyer S.A. 1999. GENECONV: A Computer Package for the Statistical Detection of Gene Conversion. Washington University in St Louis, USA, Distributed by the author. Department of Mathematics. Available at: (<http://www.math.wustl.edu/~sawyer>).
- Sokhandan-Bashir N., Kalhor M. and Zarghani S. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of Cucumber mosaic virus isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes* 32: 277-88.