آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۳، شماره ۱، شهریور ۱۳۹٤

# تشخیص و پراکنش جغرافیایی ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک‌ها در برخی از گلخانه‌های خیار ایران*

**نسیبه کیانفر[۱ و ۲]، کاوه بنانج[۱]✉ و مژده ملکی[۲]**
۱- بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛ ۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین (پیشوا)
(تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۲؛ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۳)

**چکیده**

تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی قابل انتقال توسط سفید بالک‌ها همراه و یا دخیل در نشانه‌های زردی از مزارع و یا گلخانه‌های خیار در دنیا گزارش شده‌اند. در سال‌های اخیر، نشانه‌های زردی و جمعیت‌های زیادی از سفید بالک‌ها در بسیاری از گلخانه‌های خیار در ایران مشاهده گردیده است. در این تحقیق در سال‌های ۹۰ و ۹۱، تعداد ۲۸۷ نمونه برگ خیار با نشانه‌های زردی و تردی برگ‌ها از گلخانه‌های خیار در استان‌های تهران، سمنان، اصفهان و یزد جمع آوری و آلودگی آنها به برخی از ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک‌ها از قبیل ویروس زردی رگبرگ خیار (*Cucumber vein yellowing virus*, CVYV)، ویروس زردی سبزرد کدوئیان (*Cucurbit chlorotic yellows virus*, CCYV)، و ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*, CYSDV) به روش (Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشانگر آلودگی ۵۲، ۴۲ و ۱۸ درصد نمونه‌ها(به ترتیب) به CCYV، CVYV وCYSDV بود. دو ویروس CCYV و CVYV در تمام مناطق مورد بررسی ردیابی و CYSDV در استان اصفهان ردیابی نگردید. حدود ۶۲ درصد نمونه‌های آلوده دارای آلودگی هم زمان به دو و یا بیش از دو ویروس بودند. بیشترین آلودگی هم زمان مربوط به آلودگی‌های هم زمان CCYV+CVYV (۴۹ درصد) بود. ناحیه‌ای از ژن (Heat shock protein 70, hsp70) سه جدایه ایرانی CYSDV به اندازه ۴۶۰ جفت باز تکثیر و تعیین توالی گردید. بر اساس نتایج بدست آمده از تحلیل فیلوژنتیکی، جدایه‌های ایرانی CYSDV در گروه مجزایی از سایر جدایه‌های گزارش شده این ویروس قرار گرفتند که می‌تواند نشانگر منشا ژنتیکی متفاوت جدایه‌های ایرانی باشد. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشانگر وجود آلودگی‌های گسترده به ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک‌ها همراه با نشانه‌های زردی در گلخانه‌های خیار مورد بررسی می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی**: آنالیز فیلوژنتیکی، خیار، زردی، ویروس‌های کدوئیان، DAS-ELISA.

## Detection and geographical distribution of whitefly transmitted viruses in cucumber greenhouses in Iran

**N. KIANFAR[1, 2], K. BANANEJ✉[1] and M. MALEKI[2]**
1- Department of Plant Virus Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; 2- Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Islamic Azad University, Varamin (Pishva); Iran

**Abstract**

In recent years, yellowing symptoms and high population of whiteflies have been observed in many cucumber grown greenhouses in Iran. During 2011- 2012, surveys were performed in the major cucumber growing greenhouses of Tehran, Semnan, Isfahan, and Yazd provinces of Iran and a total of 287 leaf samples showing yellowing and thickening symptoms were collected. The samples were tested for the presence of whitefly-transmitted viruses (WTVs) such as *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV), *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) *and Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), using double/triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS/TAS-ELISA) and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The majority of the collected samples were infected by CCYV and CVYV (52 and 42%, respectively), and detected in all surveyed provinces. The least infection of samples was related to CYSDV (18%) which not detected in Isfahan province. Mixed infections were also found in 62% of the symptomatic samples. Double infection was the most mixed infection: CCYV+CVYV (49%). A 460 bp fragment of heat shock protein gene (hsp70) of three Iranian CYSDV isolates was amplified and sequenced. Phylogenetic analyses based on the nucleotide sequence of amplified fragment showed that Iranian isolates of CYSDV clustered into a separate clade than other isolates of this virus. The results of this study showed the presence of high level of WTVs infection in greenhouses associated with yellowing symptom induction.

**Key words:** Cucumber, Cucurbit viruses, DAS-ELISA, Phylogenetic analyses, Yellowing.

---

*بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا

✉ **Corresponding author: k_bananej@yahoo.com**

## مقدمه

طی سال‌های اخیر، کشت‌های گلخانه‌ای خیار در کشور با هدف افزایش میزان تولید و اشتغال زایی، توسعه و گسترش زیادی یافته که نشانگر اهمیت کشت محصولات گلخانه‌ای در کشور می‌باشد. در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹، سطح زیر کشت و میزان تولید خیار مزرعه‌ای (۶۴هزار هکتار، ۱/۵میلیون تن) و گلخانه‌ای (۴۲۲۲ هکتار، ۷۵۰ هزار تن) بوده است (Anonymous, 2010).

ویروس‌های گیاهی از مهم‌ترین عوامل ایجاد خسارت و کاهش میزان محصولات کدوئیان (Cucurbitaceae) در بسیاری از کشورهای دنیا به شمار می‌آیند. تا کنون ۵۹ ویروس گیاهی از جنس‌ها و تیره‌های مختلف ویروس‌های گیاهی از کدوئیان در سراسر دنیا گزارش شده‌اند (Lecoq and Desbiez, 2012). در سال‌های اخیر، نشانه‌های زردی در بسیاری از مزارع و گلخانه‌های کدوئیان در دنیا به یکی از مشکلات مهم کشاورزان تبدیل گشته است. هم زمان با بکار گیری روش‌های دقیق و سریع شناسایی و تشخیص آلودگی‌های ویروسی از طریق آزمون‌های سرولوژیکی و یا مولکولی، نقش ویروس‌های گیاهی در بروز نشانه‌های زردی خصوصا در مزارع و یا گلخانه‌های کدوئیان به اثبات رسید (Wisler *et al*., 1998). تعداد زیادی از ویروس‌های قابل انتقال توسط شته‌ها (Aphid-transmitted viruses, ATVs) و سفید بالک‌ها (Whitefly-transmitted viruses, WTVs) از کدوئیان در شرایط مزرعه و یا گلخانه گزارش شده‌اند که غالباً منجر به بروز نشانه‌های زردی در سطوح وسیعی از مزارع کدوئیان گردیده‌اند. بیماری‌های ویروسی نوظهور در دو دهه اخیر در بسیاری از مناطق دنیا موجب بروز محدودیت‌هایی در کشت سبزیجات و کاهش میزان محصول گردیده و بسیاری از آنها از طریق سفید بالک‌ها (Hemiptera: Aleyrodidae) انتقال می‌یابند (Navas-Castillo *et al*., 2011). ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک‌ها (WTVs) از مهم‌ترین و خسارت‌زاترین ویروس‌های گیاهی در گلخانه‌ها و مزارع کدوئیان در دو دهه اخیر می‌باشند (Wisler *et al*., 1998).

ویروس زردی سبزرد کدوئیان و ویروس کوتولگی زرد کدوئیان از اعضای جنس کرینی ویروس (Crinivirus)، تیره کلاستروویریده (Closteroviridae) و قابل انتقال با سفید بالک‌ها (Whiteflies) می‌باشند (Navas-Castillo *et al*., 2011). CCYV اولین بار در گلخانه‌های خربزه ژاپن (Gyoutoku *et al*., 2009) و سپس از تایوان (Huang *et al*., 2010)، چین (Gu *et al*., 2011)، سودان (Hamed *et al*., 2011)، لبنان (Abrahamian *et al*., 2012) و ایران (Bananej *et al*., 2013) گزارش شده است. ویروس کوتولگی زرد کدوئیان اولین بار از امارات متحده عربی در سال ۱۹۸۲ میلادی از مزارع هندوانه، خربزه و خیار گلخانه‌ای گزارش گردیده است (Hassan and Duffus, 1991). این ویروس از نقاط مختلف دنیا از قبیل قبرس (Papayiannis *et al*., 2005)، فرانسه (Desbiez *et al*., 2003)، یونان (Boubourakas *et al*., 2006)، فلسطین اشغالی (Cohen and Nitzany, 1960)، لبنان (Abou-Jawdah *et al*., 2000)، مراکش (Desbiez *et al*., 2000)، پرتقال (Louro *et al*., 2000)، اسپانیا (Célix *et al*., 1996)، سوریه (Hourani and Abou-Jawdah, 2003)، تونس (Yakoubi *et al*., 2007)، ترکیه، عربستان سعودی، مصر، اردن (Wisler *et al*., 1998)، چین (Liu *et al*., 2010)، ایالات متحده (Kao *et al*., 2000) و در ایران اولین بار از برخی مزارع خربزه در استان بوشهر (Keshavarz and Izadpanah, 2004) و سپس از برخی از گلخانه‌های خیار در استان‌های تهران و البرز (Salehi *et al*., 2012) و مزارع خربزه، کدو و خیار در استان‌های تهران، سمنان، یزد، فارس و بوشهر (Bananej *et al*., 2013) گزارش شده است. CVYV یکی از اعضای جنس ایپوموویروس (Ipomovirus)، تیره Potyviridae می‌باشد (Lecoq *et al*., 2000). ویروس رگبرگ زردی خیار توسط سفید بالک (*B. tabaci*) بصورت نیمه پایا (Semipersistent) و مایه زنی مکانیکی منتقل می‌شود (Mansour and Al-musa,

1993). این ویروس اولین بار از مزارع خیار در فلسطین اشغالی (Cohen and Nitzany, 1960) و سپس از اردن (Al-Musa *et al*., 1985)، ترکیه (Yilmaz *et al*., 1989)، اسپانیا (Cuadrado *et al*., 2001)، سودان (Desbiez *et al*., 2001)، پرتقال (Louro *et al*., 2004)، قبرس (Papayiannis *et al*., 2005)، فرانسه (Lecoq *et al*. 2007)، تونس (Yakoubi *et al*., 2007) و لبنان (Abrahamian *et al*., 2013) گزارش شده است. در ایران، ویروس رگبرگ زردی خیار اولین بار از برخی از مزارع خیار منطقه جیرفت (جنوب کرمان) (Bananej *et al*., 2006) گزارش شده و تاکنون در مناطق شمالی و مرکزی ایران گزارش نشده است.

تا قبل از سال ۱۳۸۳، گزارشی در زمینه شناسایی و تشخیص ویروس‌های کدوئیان در گلخانه‌های خیار در ایران وجود ندارد. ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)، ویروس موزائیک هندوانه (*Watermelon mosaic virus*, WMV)، ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus* ,TSWV) از گلخانه‌های خیار در منطقه جیرفت گزارش شده‌اند (Shaabanian *et al*., 2004). CMV، WMV، ZYMV از گلخانه‌های کدوئیان در استان‌های گیلان، مازندران، گلستان، تهران، البرز و خراسان (Samei *et al*., 2004; Massumi *et al*., 2007) و ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (*Tomato leaf curl palampur virus*, ToLCpMV) از برخی گلخانه‌های خیار شهرستان تفت در استان یزد گزارش شده‌اند (Hessari *et al*., 2010). نتایج بدست آمده از انجام یک تحقیق نشانگر آلودگی برخی از نمونه‌های خیار جمع‌آوری شده از برخی گلخانه‌های خیار در استان‌های تهران و البرز به ویروس‌های (*Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV، ZYMV, CYSDV, WMV ویروس موزائیک کدو (*Squash mosaic virus*, SqMV)، ویروس ارومیه خربزه (*Ourmia melon virus*, OuMV) و ویروس لکه نکروتیک خربزه (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) بود (Salehi *et al*., 2012; Salehi and Bananej, 2014). ویروس زردی سبزرد کدوئیان (CCYV) از برخی گلخانه‌های خیار در ایران گزارش شده است (Bananej *et al*., 2013).

در این تحقیق با توجه به گسترش و توسعه کشت گلخانه‌ای خیار در نقاط مختلف کشور، شیوع نشانه‌های زردی مشابه در بسیاری از گلخانه‌ها و مزارع کدوئیان، وجود جمعیت‌های زیادی از ناقلین خصوصاً سفید بالک‌ها در بسیاری از گلخانه‌ها، عدم وجود اطلاعات کافی در مورد آلودگی‌های ویروسی همراه و یا دخیل در بروز نشانه‌های زردی و هم چنین مراجعات متعدد گلخانه‌داران، آلودگی‌های ویروسی همراه با نشانه‌های زردی در کشت‌های گلخانه‌ای خیار در استان‌های سمنان، تهران، اصفهان و یزد از طریق روش‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است.

## روش بررسی

**نمونه برداری:** در طی سال‌های ۱۳۹۰و ۱۳۹۱ تعداد ۲۸۷ نمونه برگ خیار با نشانه‌های زردی، شکنندگی، تردی برگ‌ها و بدشکلی میوه از برخی از گلخانه‌های خیار در استان‌های تهران (۹۰ نمونه: ورامین و پیشوا)، سمنان (۴۰ نمونه: ایوانکی و دامغان)، اصفهان (۱۰۲ نمونه: شهر ابریشم ، فلاورجان ،شهرضا و مبارکه) و یزد (۵۵ نمونه: تفت، رستاق، چاه شهردار و اکرم آباد) جمع‌آوری گردید.

**تعیین آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون سرولوژیکی الایزا (Double/Triple-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbont assay, DAS/TAS-ELISA):** آلودگی نمونه‌های برگ خیار جمع آوری شده به ویروس‌های CCYV, CYSDV و CVYV، از طریق آزمون سرولوژیکی الایزا (DAS/TAS-ELISA) (Clark and Adams, 1977) و استفاده از آنتی بادی‌های چند همسانه‌ای اختصاصی (اهدایی DSMZ،

آلمان) مورد بررسی قرار گرفت. عصاره گیاه سالم به عنوان شاهد منفی و از نمونه آلوده به ویروس به عنوان شاهد مثبت (اهدایی DSMZ، آلمان) استفاده گردید. میزان جذب نوری چاهک مربوط به هر کدام از نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه (Microplate reader) مدل ( Labsystems Multiskan MCC/340) قرائت و ثبت گردید. نمونه‌های دارای جذب بیش از ۳ برابر متوسط میزان جذب گیاه سالم (شاهد منفی)، آلوده ازریابی گردیدند.

**تعیین آلودگی نمونه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به طریق نسخه برداری معکوس (RT-PCR):** آلودگی ۱۰ تا ۱۵ نمونه از نمونه‌های دارای واکنش مثبت در آزمون سرولوژیکی الایزا از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به طریق نسخه برداری معکوس (RT-PCR) و استفاده از آغازگرهای برای ناحیه (N-terminal) از ژن (HSP70) جنس کرینی ویروس و ناحیه (NIb-CP) در جنس ایپوموویروس مورد بررسی قرار گرفت (جدول یک). استخراج آر.ان.ای کل گیاهی با استفاده از محلول تجاری (TRI-Reagent) بر اساس روش توصیه شده توسط شرکت سازنده (Sigma Chemical, St Louis, Mo, USA) با تغییرات جزئی انجام گرفت. برای ساخت رشته مکمل (cDNA)، چهار میکرولیتر آر.ان.ای کل استخراج شده، دو میکرولیتر مخلوط dNTP ده میلی‌مولار و یک میکرولیتر آغازگر معکوس (15pm) (جدول ۱) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس دو میکرو لیتر بافر (reaction buffer 5x)، دویست واحد آنزیم (M-MuLV) (Fermentas)، اضافه وحجم آن با استفاده از آب دو بار تقطیر به بیست میکرولیتر رسانده شده و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس نگهداری شد. مخلوط واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر(10X)، یک میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی‌مولار)، نیم میکرولیتر dNTP (ده میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از هر آغازگر بالا دست و پائین دست (ده پیکو مول در میکرولیتر) (جدول ۱)، نیم میکرولیتر از آنزیم ( Taq DNA polymerase) (10 u/µl) (Fermentas)، ۲/۵ میکرولیتر cDNA و حجم آن توسط آب دو بار تقطیر سترون به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید (به نسبت یک میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۸۰ ولت ثابت به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. مشاهده و عکس‌برداری از قطعات دی.ان.ای تکثیر یافته طی واکنش پی.سی.آر با استفاده از دستگاه UV-illuminator مدل ایماکو (هلند) انجام گرفت.

**جدول ۱**- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

**Table 1.** The list of primers used in this study

| Primer | Sequence | Position of primers on genome | The size of product (bp) | Reference |
|---|---|---|---|---|
| **CYSDV** | F: 5'-CATTCCTACCTGTTTAGCCA-3′<br>R: 5′-ATCCTTCGCAGTGAAAAACC-3′ | 1332-1742nt | 410~ | Hamed *et al*., 2011 |
| **CCYV** | F: 5′-TGCGTATGTCAATGGTGTTATG-3′<br>R: 5′-ATCCTTCGCAGTGAAAAACC-3′ | 1257-1718nt | ~462 | Bananej *et al*., 2013 |
| **CVYV** | F: 5'-CCAAAGCTCAGCAAAGAGAGG-3'<br>R: 5'- GCATTGGGTTGTCCACAAG-3' | 8138-8640 nt | ~500 | Bananej *et al*., 2006 |

**تعیین توالی جدایه‌های ایرانی ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (CYSDV):** سه جدایه ایرانی CYSDV شامل جدایه‌های Teh، Sem و Yaz به ترتیب از گلخانه‌های خیار در استان‌های تهران (پیشوا)، سمنان (ایوانکی) و یزد (تفت) انتخاب و قطعه‌ای از ژن (heat shock protein 70, hsp70) آنها طی واکنش (PCR) تکثیر و سپس برای تعیین توالی در هر دو جهت پیشرو و معکوس به شرکت Bioneer, South Korea ارسال شد. آنالیز و هم ردیفی توالی جدایه ایرانی با استفاده از http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2 و توالی‌های قابل دسترس در بانک ژن (GenBank) (جدول ۴) انجام گردید.

تحلیل تبارزایی و رسم درخت تبارزایی با استفاده از نرم افزار MEGA 5.1، به روش (neighbor joining, NJ) با ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید (Tamura *et al*., 2011).

## نتیجه و بحث

نتایج بدست آمده از آزمون سرولوژیکی الایزا (DAS-ELISA)، نشانگر آلودگی ۲۴۱ نمونه جمع‌آوری شده از گلخانه‌های خیار تهران، سمنان، اصفهان و یزد حداقل به یکی از CYSDV، CVYV و CCYV بود (جدول ۲).

**آلودگی هم زمان (Mixed infection):** نتایج آزمون الایزا نشانگر آلودگی هم زمان ۱۴۹ نمونه از مجموع ۲۴۱ نمونه آلوده، به دو ویروس (۷۳ نمونه) و سه ویروس (۵۵ نمونه) مورد مطالعه در این تحقیق بود. بیشترین میزان آلودگی دوتایی مربوط به ترکیب (CCYC+CVYV) و سه تایی (CCYV+CVYV+CYSDV) بود (جدول ۳).

**تعیین آلودگی نمونه‌های دارای واکنش مثبت در آزمون الایزا با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR):** نتایج بدست آمده از RT-PCR، نمونه‌های دارای واکنش مثبت در آزمون الایزا به ویروس‌های CYSDV و CCYV را تأیید نمود (شکل‌های ۱ و ۲).

**جدول ۲**- نرخ آلودگی نمونه‌های علائم دار خیار جمع‌آوری شده از گلخانه‌های چهار استان مورد بررسی به ویروس‌های مورد بررسی

**Table 2.** Viral infection rate of symptomatic cucumber samples collected from greenhouses

| Province | CYSDV | CVYV | CCYV | Total |
|---|---|---|---|---|
| Tehran | 42/90 (47%) | 26/90 (29%) | 68/90 (76%) | 82/90 (91.1%) |
| Semnan | 2/40 (5%) | 27/40 (68%) | 36/40 (90%) | 39/40 (97.5%) |
| Isfahan | 0/102 (0%) | 42/102 (41%) | 30/102 (29%) | 79/102 (77.4%) |
| Yazd | 8/55 (15%) | 25/55 (45%) | 13/55 (24%) | 41/55 (75.5%) |
| Results | 52/287 (18%) | 120/287 (42%) | 147/287 (52%) | 241/287 (84%) |

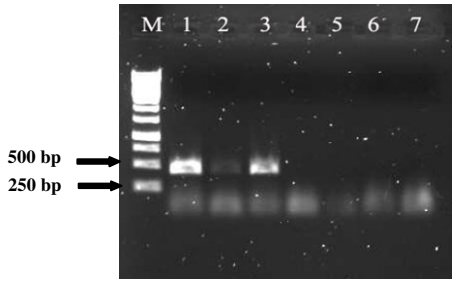
**جدول ۳**- وضعیت آلودگی هم زمان به دو و یا سه ویروس در گلخانه‌های خیار استان‌های تهران، سمنان، اصفهان و یزد

**Table 3.** The number of double/triple infected (mixed infection) samples to CCYV,CVYV, and CYSDV, in surveyed provinces: Tehran, Semnan, Isfahan, and Yazd

| Double, Triple infection | CCYV CVYV | CYSDV CCYV | CYSDV CVYV | CYSDV CCYV CVYV |
|---|---|---|---|---|
| Tehran | 3/27 | 10/27 | 2/27 | 12/20 |
| Semnan | 17/19 | 0/19 | 0/19 | 1/10 |
| Isfahan | 0/20 | 0/20 | 0/20 | 0/21 |
| Yazd | 1/7 | 2/7 | 2/7 | 1/4 |
| Total | 21/73 | 12/73 | 4/73 | 14/55 |

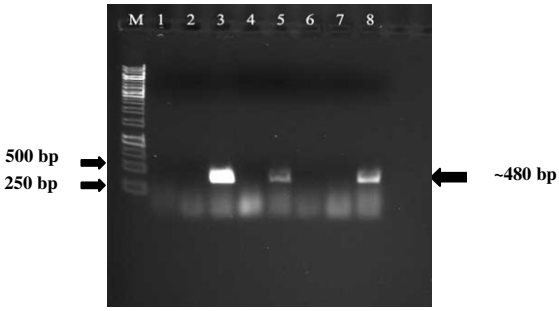
**آنالیز تبارزایی:** نتایج بدست آمده از مقایسه توالی نوکلئوتیدی ناحیه (N-terminal) از ژن (Hsp70) جدایه‌های ایرانی ویروس کوتولگی زرد کدوئیان با جدایه‌های قابل دسترس در بانک ژن (GenBank) نشانگر شباهت (98-99%) جدایه‌های ایرانی با یکدیگر و شباهت (88-89%) با سایر جدایه‌های این ویروس در دنیا بود. نتایج بدست آمده از آنالیز تبارزایی نشانگر گروه‌بندی جدایه‌های ویروس کوتولگی زرد کدوئیان به دو گروه (I and II) بود (شکل ۳).

نتایج بدست آمده از همردیف سازی ترجمه ترادف آمینو اسیدی Hsp70 جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌ها نشانگر تفاوت جدایه‌های سمنان و یزد در ۳ امینو اسید و جدایه تهران در یک آمینو اسید با سایر جدایه‌های ویروس کوتولگی زرد کدوئیان CYSDV در بانک ژن بود (شکل ۴).




**شکل ۱**- الکتروفورز محصول (RT-PCR) در ژل آگاروز ۱٪ .M: مارکرDNA با فواصل ۲۵۰ جفت باز(GeneRuler,1Kb, Fermentas)، راهک۱تا ۳ (به ترتیب جدایه های تهران، سمنان و اصفهان) ویروس زردی سبزرد کدوئیان (قطعه‌ای، اندازه حدود ۴۸۰ جفت باز تکثیر شده است).

**Fig.1.** RT-PCR product electrophoresis on agarose gel 1%. M: GeneRuler 1Kb DNA marker, Fermentas 250bp. Lanes 1, 2, and 3. Tehran, Semanan, and Isfahan isolates of CCYV infection, respectively (a 480 bp fragment is amplified).



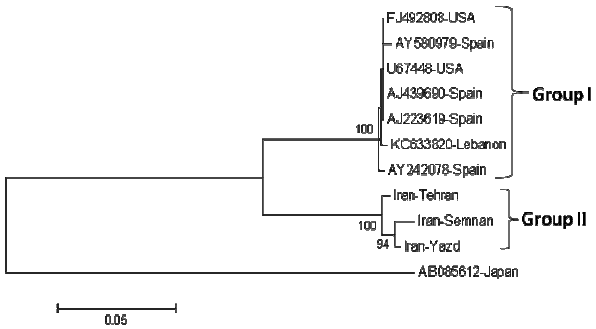

**شکل ۲**- الکتروفورز محصول(RT-PCR) در ژل آگاروز ۱٪ .M: مارکرDNA با فواصل ۲۵۰ جفت باز(GeneRuler,1Kb, Fermentas)، راهک های ۵،۳ و ۸، به ترتیب جدایه‌های تهران، سمنان و یزد ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (قطعه ای به اندازه حدود ۴۸۰ جفت باز تکثیر شده است).

**Fig. 2.** RT-PCR product electrophoresis on agarose gel 1%. M: GeneRuler 1Kb DNA marker, Fermentas 250bp. Lanes 3, 5, and 8, Tehran, Semanan, and Yazd isolates of CYSDV infection, respectively (a 480 bp fragment is amplified).

**جدول ۴**- فهرست توالی‌های مورد مطالعه در این بررسی

**Table 4.** List of CVSDV isolates that used in this study

| Country | Isolate | Host | Accession No. |
|---|---|---|---|
| United States | Arizona | *Cucumis melo* | FJ492808 |
| Spain | 01021 | *Cucumis melo* | AY580979 |
| United States | Srain Israel | *Cucumis melo* | U67448 |
| Spain | Almeria | *Cucumis sativus* | AJ439690 |
| Spain | Almeria | *Cucumis melo* | AJ223619 |
| Lebanon | jb8 | *Cucumis sativus* | KC633820 |
| Spain | AILM | *Cucumis melo* | AY242078 |




**شکل ۳**- درخت تبارزایی حاصل از تحلیل ترادف نوکلئوتیدی ناحیه‌ای از ژن (Hsp70) جدایه های ویروس کوتولگی زرد کدوئیان قابل دسترس در بانک ژن با سه جدایه ایرانی تهران، سمنان و یزد با استفاده از نرم افزار (MEGA 5). اعداد نمایانگر درصد (bootstrap) و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار. در این تحلیل از ویروس (Cucumber yellows virus, CYV, Acc. No. AB085612) به عنوان (outgroup) استفاده شده است.

**Fig. 3.** Phylogenetic tree based on Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) sequences (Hsp70) available at GenBank and 3 isolates from Iran(Tehran, Semnan, and Yazd). Tree was inferred with 1000 bootstrap replicates of the maximum likelihood procedure applying MEGA 5 default settings, bootstrap values above 70% are shown at the nodes. Cucumber yellows virus (CYV, Acc. No. AB085612) was used as the out group.

نشانه‌های زردی در بسیاری از مزارع و گلخانه‌های کدوئیان در دنیا به یکی از مشکلات مهم کشاورزان تبدیل گشته است در طی بیست سال اخیر، ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک‌ها (WTVs) به یکی از عوامل اصلی کاهش میزان و کیفیت محصولات کدوئیان تبدیل گشته‌اند. یکی از دلایل بروز زردی در کدوئیان آلودگی به ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک‌ها (WTVs) می‌باشند (Wisler *et al*., 1998).

در ایران نیز هم زمان با توسعه و گسترش کشت گلخانه‌ای خیار در سال‌های اخیر، نشانه‌های زردی و وجود جمعیت‌های زیادی از سفید بالک‌ها در بسیاری از گلخانه‌های خیار به یکی از مشکلات مهم کشاورزان تبدیل گشته است.

```
FJ492808-USA      1 DSINYNVIKTKINPAYVTELRGNDVYITGIDRGYTCTYTVKQLILLYIETLVRLFSKVES
Iran-Semnan       1 ..............................V...............................
Iran-Yazd         1 ..............................V...............................
Iran-Tehran       1 ..............................V...............................
AJ223619-Spain    1 ............................................................
AJ439690-Spain    1 ............................................................
AY580957-Spain    1 ............................................................
AY580985-Spain    1 ............................................................
U67448-USA        1 ............................................................
KC633820          1 ............................................................
AY242078-Spain    1 ...............V............................................

FJ492808-USA     61 ITITSLNVSVPADYKCKQRMFMKSVCDSLGFSLRRI
Iran-Semnan      61 ................................WL..
Iran-Yazd        61 ................................WP..
Iran-Tehran      61 ....................................
AJ223619-Spain   61 ....................................
AJ439690-Spain   61 ....................................
AY580957-Spain   61 ....................................
AY580985-Spain   61 ....................................
U67448-USA       61 ....................................
KC633820         61 ....................................
AY242078-Spain   61 ....................................
```

**شکل ۴**- همردیف سازی چندگانه توالی ترجمه اسید آمینه‌ای ناحیه (N-terminal) از ژن Hsp70 ( امینو اسید ۷۵ تا ۱۷۷ ) برای ۳ جدایه ایرانی (سمنان، یزد و تهران). تمام جدایه‌های ویروس کوتولگی زرد کدوئیان در این ناحیه دارای توالی حفاظت شده می‌باشند (به استثنا جدایه اسپانیا AY242078). جدایه‌های ایرانی (سمنان و یزد) مورد مطالعه در این تحقیق در ۳ موقعیت و جدایه تهران در یک موقعیت با سایر جدایه‌ها متفاوت می‌باشند.

**Fig. 4.** Multiple alignments of deduced amino acid sequences start from aa75 to 177 aa of the Hsp70 (N-terminal part of the protein) for three Iranian CYSDV isolates (Iran-Semnan, Yazd, and Tehran). Only different amino acid positions are shown. All CYSDV isolates are highly conserved in this portion (except one Spain isolates (AY242078). The Iranian isolates differ in 3 positions (Semnan, Yazd) and 1 position (Tehran).

در این تحقیق با هدف بررسی وضعیت آلودگی گلخانه‌های خیار استان‌های سمنان، تهران، اصفهان و یزد به ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک‌ها همراه با نشانه‌های زردی، تعداد ۲۸۷ نمونه برگ خیار با نشانه‌های زردی با استفاده از آزمون‌های سرولوژیکی (DAS/TAS-ELISA) و مولکولی (RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشانگر آلودگی نمونه‌های جمع آوری شده حداقل به یکی از بیمارگرهای CYSDV، CVYV و CCYV بود. این نتایج وجود گسترده آلودگی‌های ویروسی در گلخانه‌های خیار را به اثبات می‌رساند. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشانگر وجود آلودگی به ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک‌ها از قبیل ویروس زردی سبزرد کدوئیان و ویروس زردی رگبرگ خیار برای اولین بار در گلخانه‌های خیار در ایران می‌باشد.

بیشترین میزان آلودگی نمونه‌های جمع آوری شده از گلخانه‌های مورد بررسی در این تحقیق به ویروس زردی سبزرد کدوئیان (۵۲ درصد)، ویروس زردی رگبرگ خیار (۴۲ درصد) و ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (۱۸ درصد) بود. ویروس‌های زردی سبزرد کدوئیان و زردی رگبرگ خیار در تمام مناطق مورد مطالعه در این تحقیق ردیابی گردیدند. ویروس کوتولگی زرد کدوئیان در گلخانه‌های مورد بررسی در استان اصفهان ردیابی نگردید. بیشترین میزان آلودگی نمونه‌های جمع آوری شده از گلخانه‌های خیار در استان تهران به ویروس زردی سبزرد کدوئیان (۷۶ درصد) و ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (۴۷ درصد)، سمنان به

ویروس زردی سبزرد کدوئیان (۹۰ درصد) و ویروس زردی رگبرگ خیار (۶۸ درصد)، و در استان یزد به ویروس زردی رگبرگ خیار (۴۵ درصد) بود. با توجه به نتایج فوق، بیشترین میزان آلودگی گلخانه‌های خیار در استان‌های سمنان، تهران و یزد به ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک‌ها (WTVs) بود در حالی که در گلخانه‌های خیار استان اصفهان بیشترین میزان آلودگی مربوط به ویروس‌های قابل انتقال با شته‌ها (ATVs) می‌باشد. شرایط آب وهوایی، استفاده از سازه‌های متفاوت گلخانه‌ای، استفاده از سموم شیمیایی موثر و استفاده از ارقام مختلف بذر را می‌توان از عوامل موثر در این تفاوت برشمرد.

ویروس زردی رگبرگ خیار برای اولین بار در ایران، از استان کرمان (منطقه جیرفت) از مزارع خیار، خربزه و هندوانه گزارش شده است (Bananej *et al*., 2006) و تا قبل از این تحقیق اطلاعی از وضعیت آلودگی و پراکنش جغرافیایی CVYV در سایر مناطق ایران در دسترس نبود. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشانگر آلودگی ۴۲ در صد از نمونه‌های جمع‌آوری شده به CVYV بود. این اولین گزارش از آلودگی به ویروس زردی رگبرگ خیار در گلخانه‌های خیار در ایران می‌باشد. نتایج فوق می‌تواند نشانگر انتشار احتمالی آلودگی از مناطق جنوبی کشور به نواحی مرکزی و شمالی کشور باشد. چنین وضعیتی قبلاً در مورد بیماری ناشی از ویروس Tomato yellow leaf curl virus-TYLCV در مزارع گوجه‌فرنگی کشور مشاهده و گزارش شده است (Bananej *et al*., 2009; 2011). ویروس کوتولگی زرد کدوئیان برای اولین بار در ایران از مزارع خربزه در استان بوشهر (Keshavarz and Izadpanah, 2004) و سپس از گلخانه‌های خیار در استان‌های تهران و البرز (Salehi and Bananej, 2014; Salehi *et al*., 2012) و مزارع خیار، خربزه و کدو (Bananej *et al*., 2013) گزارش شده است. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشانگر وجود آلودگی به ویروس CYSDV در گلخانه‌های خیار در استان‌های سمنان و یزد می‌باشد. علیرغم وجود جمعیت‌های زیادی از سفید بالک‌ها در گلخانه‌های خیار مورد بازدید در استان اصفهان و وجود نشانه‌های زردی، آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده از گلخانه‌های خیار استان اصفهان به ویروس CYSDV منفی ارزیابی گردید در حالی که بیشترین میزان آلودگی به ویروس مذکور به ترتیب مربوط به استان تهران (۴۷٪)، یزد (۱۵٪) و سمنان (۵٪) بود. نتایج فوق نشانگر گسترش محدودتر CYSDV در مقایسه با سایر ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک‌ها از قبیل ویروس زردی سبزرد کدوئیان و ویروس زردی رگبرگ خیار در این تحقیق می‌باشد. با توجه به نتایج فوق، فاصله بین استان‌های مورد مطالعه در این تحقیق با استان بوشهر و هم چنین گزارش ویروس CYSDV برای اولین بار در دنیا از امارات متحده عربی در سال ۱۹۸۲ میلادی (Hassan and Duffus, 1991)، احتمال دارد سابقه طولانی آلودگی به ویروس کوتولگی زرد کدوئیان در ایران قبل از گزارش از استان بوشهر (Keshavarz and Izadpanah, 2004) باشد. در این تحقیق ناحیه‌ای به طول ۴۶۰ جفت باز از ژن (Hsp70) در سه جدایه ایرانی ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (سمنان، تهران و یزد) تکثیر و تعیین توالی گردید. نتایج بدست آمده از درخت تبارزایی، علیرغم کوتاه بودن قطعه تعیین توالی شده، نشانگر تمایز جدایه‌های ایرانی از سایر جدایه‌های ویروس کوتولگی زرد کدوئیان می‌باشد و در یک گروه جداگانه (Group II) از سایر جدایه‌ها قرار می‌گیرند (شکل ۴). علیرغم نزدیکی جغرافیایی ایران با لبنان در مقایسه با سایر جدایه‌ها، جدایه‌های ایرانی در گروه متفاوت از گروه جدایه لبنانی (GroupI) قرار می‌گیرند و می‌توان فرضیه وجود منشا ژنتیکی متفاوت جدایه‌های ایرانی از سایر جدایه‌ها و خصوصاً جدایه لبنانی را مطرح نمود. نتایج حاصل از آنالیز توالی آمینو اسید جدایه‌های ایرانی مؤید نتایج بدست آمده از آنالیز توالی نوکلئوتید جدایه‌های ایرانی و قرار گرفتن آنها در گروه جداگانه و متفاوت از سایر جدایه‌های ویروس کوتولگی زرد کدوئیان بود (شکل۴ و ۵).

## References

ABOU-JAWDAH, Y., H. SOBH, A. FAYAD, H. LECOQ, B. DELÉCOLLE and J. TRAD-FERRÉ, 2000. *Cucurbit yellow stunting disorder virus*: A new threat to cucurbits in Lebanon. Journal of Plant Pathology, 82: 55-60.

ABRAHAMIAN, P. E., H. SOBH and Y. ABOU-JAWDAH, 2012**.** First Report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* on cucumber in Lebanon. Plant Disease, 96: 1704.

ABRAHAMIAN, P. E., H. SOBH, R. SEBLANI, J. SAMSATLY, M. JAWHARI and Y. ABOU-JAWDAH, 2013. First report of *Cucumber vein yellowing virus* on cucumber in Lebanon. Plant Disease, 97: 1516.

AL-MUSA, A. M., S. J. QUSUS and A.N. MANSOUR, 1985. *Cucumber vein yellowing virus* on cucumber in Jordan. Plant Disease, 69: 361.

ANONYMOUS, 2010. *Agricultural statistics yearbook*. Ministry of Jihad-E-Agriculture, Statistical and Information Technology Unit, Tehran, 137 pp. www.maj.ir

BANANEJ, K., A. VAHDAT and G. HOSSEINI-SALEKDEH, 2009. Begomoviruses associated with yellow leaf curl disease of tomato in Iran. Journal of Phytopathology 157: 243–257.

BANANEJ, K., C. DESBIEZ, M. GIRARD, C. WIPF-SCHEIBEL, A. VAHDAT, A. KHEYR-POUR, A. AHOONMANESH and H. LECOQ, 2006. First Report of *Cucumber vein yellowing virus* on cucumber, melon, and watermelon in Iran. Plant Disease, 90: 1113.

BANANEJ, K., W. MENZEL, N. KIANFAR, A. VAHDAT and S. WINTER, 2013. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucumber, melon and squash in Iran, Plant Disease, 97: 1005.

BOUBOURAKAS, I. N. A., D. AVGELIS, P. E. KYRIAKOPOULOU and N. I. KATIS, 2006 Occurrence of yellowing viruses *Beet pseudo-yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucurbit aphid-borne yellows virus* affecting cucurbits in Greece. Plant Pathology, 55: 276–283.

CÉLIX, A., A. LÓPEZ-SESÉ, N. ALMARZA, M. L. GÓMEZ-GUILLAMÓN and E. RODRÍGUEZ-CEREZO, 1996. Characterization of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, a *Bemisia tabaci* -transmitted closterovirus. Phytopathology, 86: 1370–1376.

CLARK, M. F. and A. N. ADAMS, 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-83.

COHEN, S. and F. E. NITZANY, 1960. A whitefly-transmitted virus of cucurbits in Israel. Phytopathologia Mediterranea, 1: 44-46.

CUADRADO, I. M., D. JANSSEN, L. VELASCO, L. RUIZ and E. SEGUNDO, E. 2001. First report of Cucumber vein yellowing virus in Spain. Plant Disease, 85: 336.

DESBIEZ, C., B. DELÉCOLLE, C. WIPF-SCHEIBEL and H. LECOQ, 2001. Le *Cucumber vein yellowing virus*, virus transmis par l'aleurode *Bemisia tabaci*, est unmember des Ipomovirus Potyviridae. 8èmes Rencontres de Virologie Végétale. CNRS, Aussois (FR).

DESBIEZ, C., H. LECOQ, M. GIRARD, A. C. COTILLON and L. SCHOEN, 2003. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in commercial cucumber greenhouses in France. Plant Disease, 87: 600.

DESBIEZ, C., H. LECOQ, S. ABOULAMA and M. PETERSCHMITT, 2000. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in Morocco. Plant Disease, 84: 596.

GU, Q. S.; Y. H. LIU, Y. H. WANG, W. G. HUANGFU, H. F. GU, L. XU, F. M. SONG and J. K. BROWN, 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in China, Plant Disease, 95: 73.

GYOUTOKU, Y., S. OKAZAKI, A. FURUTA, T. ETOH, M. MIZOBE, K. KUNO, S. HAYASHIDA and M. OKUDA, 2009. Chlorotic yellows disease of melon caused by Cucurbit chlorotic yellows virus, a new crinivirus, Japanese Journal of Phytopathology, 75: 109-111.

HAMED, K., W. MENZEL; G. DAFALLA, A. M. A. GADELSEED and S. WINTER, 2011. First Report of CUCURBIT CHLOROTIC YELLOWS VIRUS

Infecting Muskmelon and Cucumber in Sudan. Plant Disease, 95: 1321.

HASSAN, A. A. and J. E. DUFFUS, 1991. A review of a yellowing and stunting disorder of cucurbits in the United Arab Emirates. Emirates Journal of Agricultural Sciences, 2: 1-16.

HESSARI, M., J. HEYDARNEJAD, N. KEYVANI, A. MOZAFFARI, H. MASSUMI and Z. LORI, 2010. New natural hosts and introduction of *Tomato leaf curl Palampur virus* to central Iran. Proceedings 19th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran, 675.

HOURANI, H. and Y. ABOU-JAWDAH, 2003. Immunodiagnosis of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* using polyclonal antibodies developed against recombinant coat protein. Plant Pathology, 85: 197–204.

HUANG, L. H., H. H. TSENG, J. T. LI and T. C. CHEN, 2010. First Report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* Infecting Cucurbits in Taiwan. Plant Disease, 94: 1168-1168.

KAO, J., L. JIA, T. TIAN, L. RUBIO and B.W. FALK, 2000. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (genus Crinivirus) in North America. Plant Disease, 84: 101.

KESHAVARZ, T. and K. IZADPANAH, 2004. Report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (Genus *Crinivirus*) in Iran. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Page 264, Tabriz-Iran.

LECOQ, H. and C. DESBIEZ, C. 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: An ever-changing picture. Advances in Virus Research, 84: 67-126.

LECOQ, H., C. DESBIEZ, B. DELÉCOLLE, S. COHN and A. MANSOUR, 2000. Cytological and molecular evidence that the whitefly-transmitted *Cucumber vein yellowing virus* is a tentative member of the family *Potyviridae* Journal of General Virology, 81: 2289–2293.

LECOQ, H., Q. DUFOUR, C. WIPF-SCHEIBEL, M. GIRARD, A. C. COTILLON and C. DESBIEZ, 2007. First Report of *Cucumber vein yellowing virus* in Melon in France. Plant Disease, 9: 909.

LIU, L. Z., Y. Y. CHEN and W. M. ZHU, 2010. First Report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* on Melon in China . Plant Disease, 94: 485.

LOURO, D., A. QUINOT, E. NETO, J. E. FERNANDES, D. MARIAN, M.VECCHIATI, P. CACIAGLI and A. M. VAIRA, 2004. Occurrence of *Cucumber vein yellowing virus* in cucurbitaceous species in southern Portugal. Plant Pathology, 53: 241.

LOURO, D., M. VICENTE, A. M. VAIRA, G. P. ACCOTTO and G. NOLASCO, 2000. *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (genus Crinivirus) associated with the yellowing disease of cucurbit crops in Portugal. Plant Disease, 84: 1156.

MANSOUR, A. and A. AL-MUSA, 1993. *Cucumber vein yellowing virus*: host range and virus vector relationships. *Journal of* Phytopathology, 137: 73-78.

MASSUMI, H., A. SAMEI, A. HOSSEINI POUR, M. SHAAABANIAN and H. RAHIMIAN, 2007. Occurrence, distribution, and relative incidence of seven viruses infecting greenhouse-griwn cucurbits in Iran. Plant Disease 91, 159-163.

NAVAS-CASTILO, J., E. FIALLO-OLIVE and S. SANCHEZ-CAPOS, 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. Annual Review of Phytopathology 49: 219-248.

PAPAYIANNIS, L. C., N. IOANNOU, I. N. BOUBOURAKAS, C. I. DOVAS, N. I. KATIS and B. W. FALK, 2005. Incidence of Viruses Infecting Cucurbits in Cyprus. Phytopathology, 153: 530–535.

SALEHI, S. and K. BANANEJ, 2014. Detection and geographical distribution of viral infections in cucumber greenhouses in Tehran and Alborz provinces. Applied Entomology and Phytopathology, 81: 153-166.

SALEHI, S., A. VAHDAT and K. BANANEJ, 2012. Occurrence of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* associated with yellowing symptoms on greenhouse-grown cucumber in Alborz and Tehran provinces. Proceedings 20th Iranian Plant Protection Congress, Shiraz, Iran, 856.

SAMEI, A., H. MASSUMI, A. HOSSEINI POUR and M. SHAABANIAN, 2004. Identification, distribution and incidence rate of some viruses infecting cucurbits in

glasshouses in the north and north-east if Iran. Proceedings 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran, 263.

SHAABANIAN, M., H. MASSUMI, J. HEYDARNEJAD, A. HOSSEINI POUR and Z. AZAMI, 2004. Identification of cucumber infecting viruses in greenhouse and study of their wild natural hosts in Jiroft. Proceedings 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran, 259.

TAMURA K, D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI and S. KUMAR, 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology evolution, 28: 2731-2739.

WISLER, G. C., J. E. DUFFUS, H. Y. LIU and R. H. LI, 1998. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. Plant Disease, 82: 270-280.

YAKOUBI, S., C. DESBIEZ, H. FAKHFAKH, C. WIPF-SCHEIBEL, M. MARRAKCHI and H. LECOQ, 2007. Occurrence of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus* in Tunisia. Journal of Plant Pathology, 89: 417-420.

YILMAZ, M. A., M. OZASLAN and D. OZASLAN, 1989. *Cucumber vein yellowing virus* in cucurbitaceae in Turkey. Plant Disease, 73: 610.