

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروس کوتولگی سبزردهندوانه (WmCSV) استان

سیستان و بلوچستان بر اساس توالی ژن رمز کننده پروتئین پوششی

مجید جعفری^{۱*} - زهرا صادقی^۲ - سعید نصراله نژاد^۳ - احمدرضا شاهرخی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۴

چکیده

ویروس کوتولگی سبزردهندوانه (*Watermelon chlorotic stunt virus*, WmCSV) به جنس *Begomovirus* از خانواده *Geminiviridae* تعلق دارد که بیشترین تعداد گونه را در مقایسه با سایر جنس‌های آلوده‌کننده گیاهان در خانواده *Geminiviridae* دارد و از طریق سفید بالک منتقل می‌شود. به منظور شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی WmCSV در محصولات کدوپیان جنوب شرق کشور در سال‌های ۹۵ و ۹۶ بازدیدهایی از مزارع شهرستان‌های زابل، زهک، هامون، هیرمند، نيمروز، زاهدان، سراوان، ایرانشهر، نیک‌شهر، سرباز، کنارک و چابهار در استان سیستان و بلوچستان انجام گرفت و از محصولات مختلف کدوپیان شامل خربزه، طالبی، هندوانه، کدو مسمایی و حلوائی نمونه‌برداری شد. از گیاهان دارای نشانه‌های زردی رگبرگ، کوتولگی گیاه، سبزدی و پیسکی شدن برگ‌ها، بدشکلی شدید و کوچک شدن اندازه میوه نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و سپس استخراج دی ان ای کل گیاه انجام شد. جهت شناسایی WmCSV از آغازگرهای اختصاصی '5-Gem-CP-V-3' و '3-Gem-CP-V-3' شناسایی‌کننده جنس بگوموویروس در کدوپیان استفاده شد. محصولات پی سی آر مورد انتظار، به طول ۵۵۰ جفت باز از ژن رمز کننده پروتئین پوششی، مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. نتایج تعیین توالی مربوط به ۱۶ نمونه از محصولات پی سی آر متعلق به مناطق مختلف استان آلودگی نمونه‌ها را به WmCSV تأیید کرد. آنالیز فیلوژنتیکی نتایج توالی‌یابی، در این پژوهش با برنامه MEGA 5، جدایه‌های WmCSV از استان سیستان و بلوچستان را در دو گروه مجزا تفکیک کرد. نتایج نشان داد که این گروه‌بندی ارتباطی با نوع میزبان و یا منطقه جغرافیایی نداشته و برخی جدایه‌های استان ارتباط نزدیکی با جدایه‌های کشورهای عمان و عربستان داشتند.

واژه‌های کلیدی: بگوموویروس، پروتئین پوششی، درخت فیلوژنتیکی، سیستان و بلوچستان، ویروس کوتولگی سبزردهندوانه

مقدمه

بیماری‌زای گیاهان است و دارای نه جنس است که ژنوم تمام آنها از نوع دی ان ای است. در میان جنس‌های خانواده *Geminiviridae*، جنس *Begomovirus* بزرگ‌ترین جنس از ویروس‌های گیاهی از نظر تعداد گونه است که از نظر اقتصادی می‌توانند خسارات مهم و قابل توجهی به محصولات گیاهی وارد کنند. بگوموویروس‌ها دارای ژنومی یک بخشی و یا دو بخشی هستند. گونه‌هایی که ژنوم آنها دو بخشی است دارای دو قطعه دی ان ای تک‌لا و حلقوی به نام DNA-A و DNA-B هستند. هر دو قطعه دی ان ای به طور مستقل توسط پروتئین پوششی پوشیده می‌شوند. در شرایط طبیعی، جهت بیان پروتئین‌ها و ایجاد بیماری‌زایی به انتقال هر دو پیکره ویروسی توسط سفید بالک نیاز است. بگوموویروس‌هایی که دو بخشی هستند هشت نوع پروتئین مختلف را رمزگذاری می‌کنند که پروتئین پوششی (Coat Protein, CP) توسط ژن AV1 روی DNA A رمزگذاری می‌شود (۱۷).

استان سیستان و بلوچستان در جنوب شرقی ایران، به عنوان وسیع‌ترین استان کشور، بیش از ۱۱ درصد وسعت کشور را دربر می‌گیرد. سطح زیرکشت جالبز در ایران بالغ بر ۲۹۶ هزار هکتار و میزان تولید حدود ۸ میلیون تن برآورد گردیده است که از این مقدار، استان سیستان و بلوچستان با ۶/۶ درصد رتبه پنجم از میزان تولید محصولات جالبزی کشور را به خود اختصاص داده است (۲). اعضای خانواده کدوپیان حساسیت بالایی به بیماری‌های ویروسی دارند. خانواده *Geminiviridae* یکی از خانواده‌های مهم ویروسی

۱ و ۴- استادیاران گروه گیاهپزشکی، مجتمع آموزش عالی سراوان

(*)- نویسنده مسئول: (Email: majafari59@yahoo.com)

۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق دوره دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار،

گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

DOI: 10.22067/jpp.v34i3.85959

از میان ویروس‌های آلوده‌کننده گیاهی، ویروس کوتولگی سبزدرد هندوانه (WmCSV) به عنوان یکی از عوامل اصلی محدودکننده تولید کدویان از آسیای میانه و آفریقای شمالی گزارش شده است. این ویروس اولین بار از یمن و سپس سودان شناسایی و گزارش شد (۷، ۱۵ و ۲۱). این ویروس از کشورهای عربستان سعودی و همچنین لبنان، اردن، سودان، ایران و یمن، فلسطین، فلسطین اشغالی، شناسایی شده است و در این کشورها تهدیدی جدی برای کدویان می‌باشد (۳، ۴، ۱۵، ۱۹ و ۲۳).

در سال ۱۹۹۸ آلودگی شدیدی از ارقام خربزه و هندوانه به یک بیماری ویروسی در ارتباط با سفید بالک از جنوب ایران گزارش شد که نشانه‌های آن مشابه با نشانه‌های ویروس کوتولگی سبزدرد هندوانه بود که سپس با روش‌های بیولوژیکی و مولکولی شناسایی شد (۸ و ۱۶). گیاهان هندوانه آلوده به این ویروس نشانه‌هایی مانند موزاییک، زردی رگبرگ، پیسکی شدن و سبزدی، کوتولگی، بدشکلی و کاهش اندازه میوه را نشان می‌دهند (۵ و ۷). ویروس کوتولگی سبزدرد هندوانه تاکنون از مناطق جنوب، جنوب شرق و شمال کشور شامل استان‌های بوشهر، فارس، گیلان، هرمزگان، کرمان گزارش شده است (۵، ۱۱، ۱۲ و ۱۳).

این ویروس از میزبان‌های مختلفی مانند هندوانه، خربزه، خیار، کدو، هندوانه ابوچهل و تعدادی از علف‌های هرز شناسایی شده است (۱، ۵، ۹، ۱۶ و ۲۰).

همچنین چندین گونه علف هرز متعلق به خانواده‌های *Chenopodiaceae*، *Brassicaceae*، *Boraginaceae* و *Myrsinaceae*، *Malvaceae*، *Fabaceae*، *Euphorbiaceae* و *Papilionaceae* در شرایط طبیعی می‌توانند توسط این ویروس آلوده شوند. در زمینه اپیدمیولوژی ویروس، این علف‌های هرز می‌توانند به عنوان میزبان‌های تناوبی ویروس کوتولگی سبزدرد هندوانه در پراکنش آن اهمیت داشته باشند. همچنین بسیاری از این علف‌های هرز در صورت آلودگی با ویروس نشانه‌های خاصی را نشان نمی‌دهند (۹ و ۱۳).

بررسی‌های فیلوژنتیکی توالی‌های کامل نوکلئوتیدی قطعات

مواد و روش‌ها

بازدید و نمونه‌برداری

به منظور شناسایی ویروس کوتولگی سبزدرد هندوانه از مزارع مختلف محصولات هندوانه، خربزه، طالبی، کدو و خیار از شهرستان‌های مختلف استان سیستان و بلوچستان مانند زابل، هامون، زاهدان، نیمروز، سراوان، ایرانشهر، سرباز، نیکشهر، کنارک، چابهار بازدیدهایی در طول سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ انجام شد (شکل ۱) و از گیاهان دارای نشانه‌های مشکوک به این ویروس نمونه‌برداری شد. سپس نمونه‌ها جهت استخراج دی ان ای به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج دی ان ای و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

استخراج دی ان ای از نمونه‌ها به روش دلاپورتا و همکاران انجام شد (۸). سپس دی ان ای استخراجی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی '3'-Gem-CP-V و '5'-Gem-CP-V، تکثیرکننده بخشی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی گونه‌های متعلق به جنس *Bgmoovirus* در آزمون پی سی آر مورد استفاده قرار گرفت (۲۲). برنامه پی سی آر طبق جدول ۱ جهت تکثیر قطعه دی ان ای مورد انتظار (۵۵۰ جفت بازی) برای دستگاه ترموسایکلر تعریف گردید.

جدول ۱- برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر ژن رمزکننده پروتئین پوششی WmCSV
Table 1- Polymerase chain reaction program to replicate WmCSV coat protein gene

زمان	دمای چرخه	مرحله	تعداد چرخه
Times	Cycle temperature	Step	Cycle numbers
5 min	95 °C	Primery Denaturation	1
1min	92 °C	Denaturation	
30 s	55 °C	Annealing	35
45 s	72 °C	Extention	
10 min	72 °C	Final Extention	1



شکل ۱- نقشه جغرافیایی شهرستان‌های مختلف استان سیستان و بلوچستان

(مناطق نمونه‌برداری شده با دایره مشخص شده است).

Figure 1- Geography map of cities in Sistan and Baluchestan province (Sampling area are marked by circles).

روش Neighbor-joining و مدل Jukes Cantor با بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. شاخه‌هایی با بوت استرپ کمتر از ۴۰ درصد ادغام شدند. از گونه *African cassava mosaic virus* (ACMV) با رس شمار J02057 به عنوان عضو خارج از گروه استفاده شد. همچنین درصد شباهت جدایه‌های استان سیستان و بلوچستان با یکدیگر و همچنین با سایر جدایه‌های مناطق دیگر کشور با برنامه MegAlign مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است جدایه‌های ثبت شده مربوط به این ویروس در GenBank محدود به کشورهای خاورمیانه می‌باشد و توالی‌هایی از کشورهای همسایه شرق ایران مانند پاکستان و هند که دارای شرایط آب و هوایی نظیر جنوب شرق کشور می‌باشند جهت درک بهتری از روابط فیلوژنتیکی برای این ویروس در دست نیست.

توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی

محصول پی‌سی‌آر مورد انتظار، مورد توالی‌یابی قرار گرفت. نتایج تعیین توالی دی‌ان‌ای تکثیر یافته حاصل از پی‌سی‌آر، توسط بلاست نوکلئوتیدی در NCBI GenBank مورد بررسی قرار گرفت. سپس توالی‌ها در NCBI GenBank ثبت شدند. توالی نوکلئوتیدی جهت آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه MEGA5 مورد تحلیل و بررسی قرار گرفتند. در آنالیز فیلوژنتیکی از توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده مربوط به ژن پروتئین پوششی جدایه‌های به دست آمده حاصل از این پژوهش (جدایه‌های ردیف‌های ۱-۱۶ در جدول ۲) و برخی از جدایه‌های ایرانی ثبت شده از سایر استان‌های کشور (جدایه‌های ردیف‌های ۱۷-۳۱ در جدول ۲) و همچنین جدایه‌های ثبت شده سایر کشورها (ردیف‌های ۳۲-۵۵ در جدول ۲) در NCBI GenBank استفاده شد. جهت رسم درخت فیلوژنتیکی از

جدول ۲- مشخصات توالی‌های ویروس کوتولگی سبزردهندوانه که از GenBank دریافت شدند

Table 2- Properties of *Watermelon chlorotic stunt virus* sequences retrieved from GenBank

سال Year	میزبان Host	کشور Country	رس شماره Accession number	جدایه Isolate	ردیف Row
2015	<i>Cucumis melo</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Zabol)	MH220206	Zb	1
2016	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupo</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Nikshahr)	MH244447	NIC	2
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Nikshahr)	MH244448	NIC2	3
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Sarbaz)	MH244449	Sar	4
2016	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupo</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Sarbaz)	MH244450	Sar2	5

2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Konarak)	MH244451	Kon	6
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Konarak)	MH244452	Kon2	7
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Konarak)	MH244453	Kon3	8
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Chabahar)	MH244454	Chb	9
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Hamun)	MH244455	Hm	10
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Hamun)	MH244456	Hm2	11
2017	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Saravan)	MH244457	Sav	12
2017	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Saravan)	MH244458	Sav2	13
2017	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Zahedan)	MH244459	Zh	14
2017	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Zahedan)	MH244460	Zh2	15
2017	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Iranshahr)	MH244461	IRS	16
2010	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Fars-Khonj)	KT272769	W-Kh-A4	17
2010	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Fars- Mamassani)	KT272767	W-Ma-A	18
2012	<i>Brassica sp.</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480486	IR:Jir:61-1:Wat:12	19
2012	<i>Anagallis arvensis</i> L.	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480488	IR:Jir:43-6:Wat:12	20
2012	<i>Medicago polymorpha</i> L.	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480481	IR:Jir:27-2:Wat:12	21
2012	<i>Melilotus indicus</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480483	IR:Jir:34-4:Wat:12	22
2012	<i>Melilotus dentatus</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480485	IR:Jir:5-9:Wat:12	23
2012	<i>Chrozophora hierosolymitana</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480479	IR:Jir:45-1:Wat:12	24
2012	<i>Chenopodium murale</i> L.	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480482	IR:Jir:32-4:Wat:12	25
2012	<i>Heliotropium szovitsii</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480487	R:Min:17-4:Wat:12	26
2015	<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i> L.	Iran (Kerman-Bagherabad)	KY825715	IR/Ker/TBa3/Tur:15	27
1999	<i>Citrullus vulgaris</i>	Iran (Hormozgan)	AJ245652	WmCSV-IR-A	28
2012	<i>Malva parviflora</i> L.	Iran (Hormozgan-Minab)	JX480489	IR:Min:30-7:Wat:12	29
2012	<i>Suaeda aegyptiaca</i>	Iran (Hormozgan-Minab)	JX480480	IR:Min:28-1:Wat:12	30
2012	<i>Brassica sp.</i>	Iran (Hormozgan-Minab)	JX480484	IR:Min:18-2:Wat:12	31
1999	<i>Citrullus vulgaris</i>	Sodan	AJ245650	WmCSV-SD-A	32
2011	<i>Cucurbita pepo</i>	Oman	JN618984	Als-4	33
2011	<i>Cucurbita pepo</i>	Oman	JN618983	Als-3	34
2010	<i>Citrullus lanatus</i>	Palestine	KC462552	PAL	35
2009	<i>Cucumis melo</i>	Lebanon	HM368371	LB1	36
2010	<i>Citrullus lanatus</i>	West Bank	KJ854911	J40	37
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	West Bank	KM820282	PA2-Q14	38
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	West Bank	KM820278	PA1-J68	39
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	West Bank	KJ854914	J56	40
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	West Bank	KM820271	PA1-J44	41
2006	Not reported	Israel	EF201809	IL	42
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Israel	KM820260	IL3-69	43
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Israel	KM820269	IL3-84	44
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Israel	KM820240	IL1-12	45
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Israel	KM820257	IL2-118	46
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Jordan	KM820211	JO2-413	47
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Jordan	KM820234	JO3-628	48
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Jordan	KM820225	JO3-613	49
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Jordan	KM820229	JO3-619	50
2018	<i>Cucumis sativus</i>	Saudi Arabia	MH025643	Cu1	51
2018	<i>Citrullus lanatus</i>	Saudi Arabia	MH025644	10Wt	52
2013	<i>Citrullus lanatus</i>	Saudi Arabia	KJ958911	Jizan101-SA	53
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Saudi Arabia	KJ939448	Leith	54
2012	<i>Cucurbita pepo</i>	Saudi Arabia	KJ958912	Alahsaa02-SA	55
2013	<i>Manihot sculenta</i>	Kenya	J02057	Kenyan 844) Out of group	56

نتایج

نتایج آلودگی نمونه‌ها در نمونه‌برداری

به طور کلی نتایج آلودگی نمونه‌ها توسط آزمون PCR در نمونه‌های مختلف کدویان در شمال (زابل، هامون و زاهدان) و جنوب (سراوان، ایرانشهر، سرباز، نیکشهر، کنارک و چابهار) استان سیستان و بلوچستان تأییدکننده حضور ویروس کوتولگی سبزردهندوانه در محصولات هندوانه و خربزه در مناطق مورد نمونه‌برداری می‌باشد.

نتایج توالی‌یابی محصولات PCR

نتایج تفکیک محصولات PCR روی ژل آگارز در الکتروفورز بیانگر تکثیر قطعه مورد نظر (باند ۵۵۰ جفت بازی) مربوط به بخشی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی در بگوموویروس‌ها بود. جهت تأیید آلودگی نمونه‌ها به WmCSV، نتایج توالی‌یابی قطعه تکثیر یافته در PCR مورد بررسی قرار گرفت که پس از بلاست توالی‌ها در GenBank تأیید کننده حضور WmCSV در تمام نمونه‌های دارای قطعه تکثیر یافته در PCR بود.



شکل ۲- شناسایی ویروس کوتولگی سبزردهندوانه در نمونه‌های مزارع استان سیستان و بلوچستان

علامه لکه‌های سبزرده و بدشکلی برگ (تصویر راست) در هندوانه و تکثیر قطعه حدود ۵۵۰ جفت بازی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی (تصویر چپ). راهک M مربوط به نشانگر اندازه 50 bp، GeneRuler DNA ladder، شرکت فرمنتاس، لیتوانی، و راهکهای ۱-۶ مربوط به نمونه‌های آلوده به WmCSV

Figure 2- Identification of watermelon chlorotic stunt virus in field samples from Sistan and Baluchestan province
Chlorotic spots and leaf malformation symptoms in watermelon (right image) and the amplified 550 bp fragments from coat protein gene (left image), (M: GeneRuler DNA ladder 50 bp marker, Fermentas, 1-6: Infected samples to WmCSV)

خوشه قرار گرفتند (A, B) به طوریکه جدایه‌های گروه A شامل جدایه‌های کشورهای ایران، عمان و عربستان می‌باشد و جدایه‌های گروه B شامل جدایه‌های کشورهای اردن، لبنان، فلسطین، کرانه غربی، اسرائیل و عربستان می‌باشد. از طرفی دیگر جدایه‌های گروه A نیز خود به دو گروه خوشه‌بندی شدند (خوشه AI و AII) به طوری که تعدادی از جدایه‌های استان سیستان و بلوچستان در خوشه AI و برخی دیگر در خوشه AII قرار گرفتند.

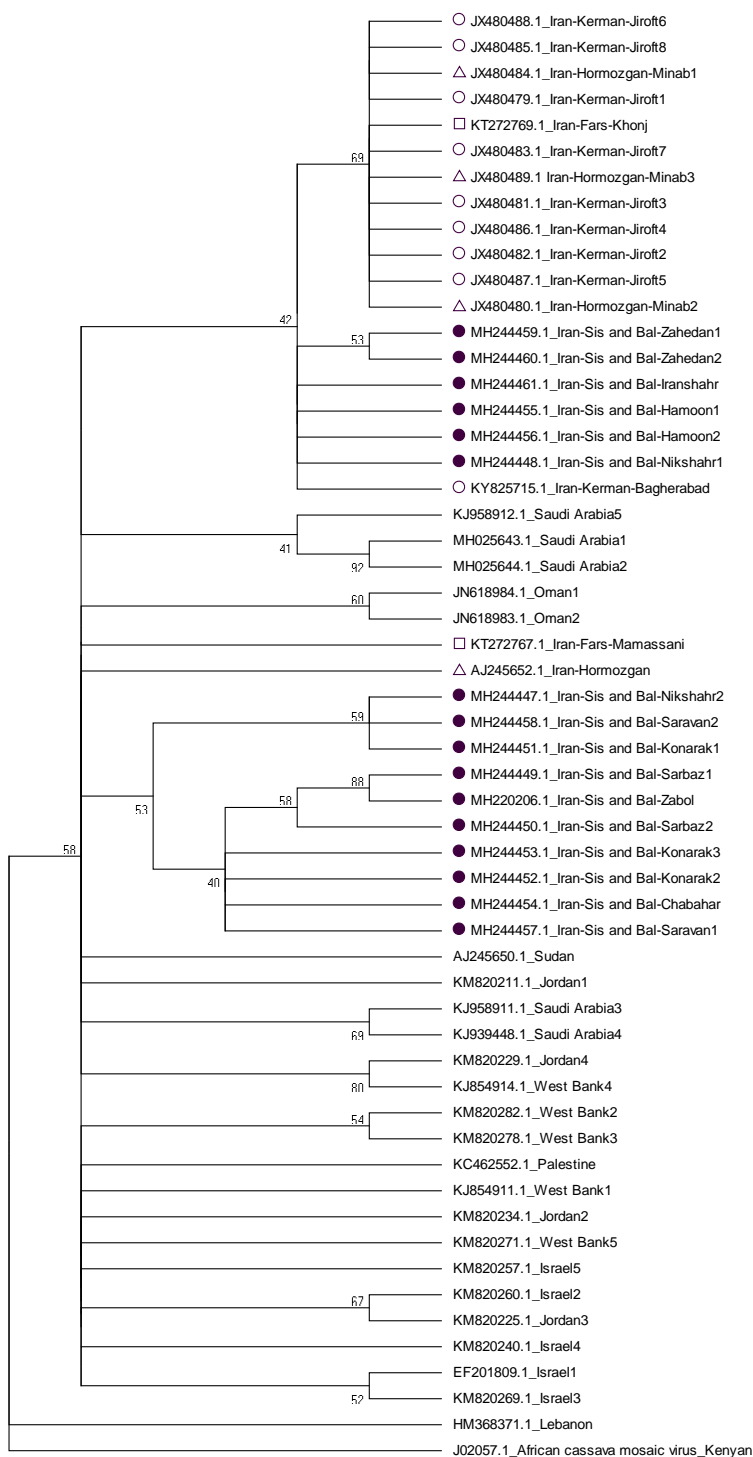
نتایج این پژوهش نشان داد جدایه‌های کشورهای عمان و عربستان نزدیک‌ترین جدایه‌ها از کشورهای دیگر به جدایه‌های استان سیستان و بلوچستان و ایران می‌باشد. الگوی ترسیم شده درخت فیلوژنی ترسیم شده برای توالی اسیدنوکلئیکی بخشی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی ویروس با درخت فیلوژنی ترسیم شده برای داده‌های اسید آمینی یکسان بود.

نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی

نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی مربوط به توالی اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه تقریباً مشابه یکدیگر می‌باشد. حداکثر و حداقل تشابه جدایه‌های مورد بررسی در ۱۶ نمونه مربوط به مناطق مختلف استان سیستان و بلوچستان با یکدیگر در این پژوهش در سطح نوکلئوتیدی ۱۰۰ و ۹۸/۱ درصد می‌باشد. همچنین بیشترین و کمترین درصد تشابه نمونه‌های این استان با نمونه‌های سایر استان‌های کشور که از پیش تعیین توالی شده‌اند در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به ترتیب ۹۹/۶ (جدایه‌های زاهدان و کرمان) و ۹۷/۷ (جدایه‌های سرباز و باقراآباد کرمان) بود.

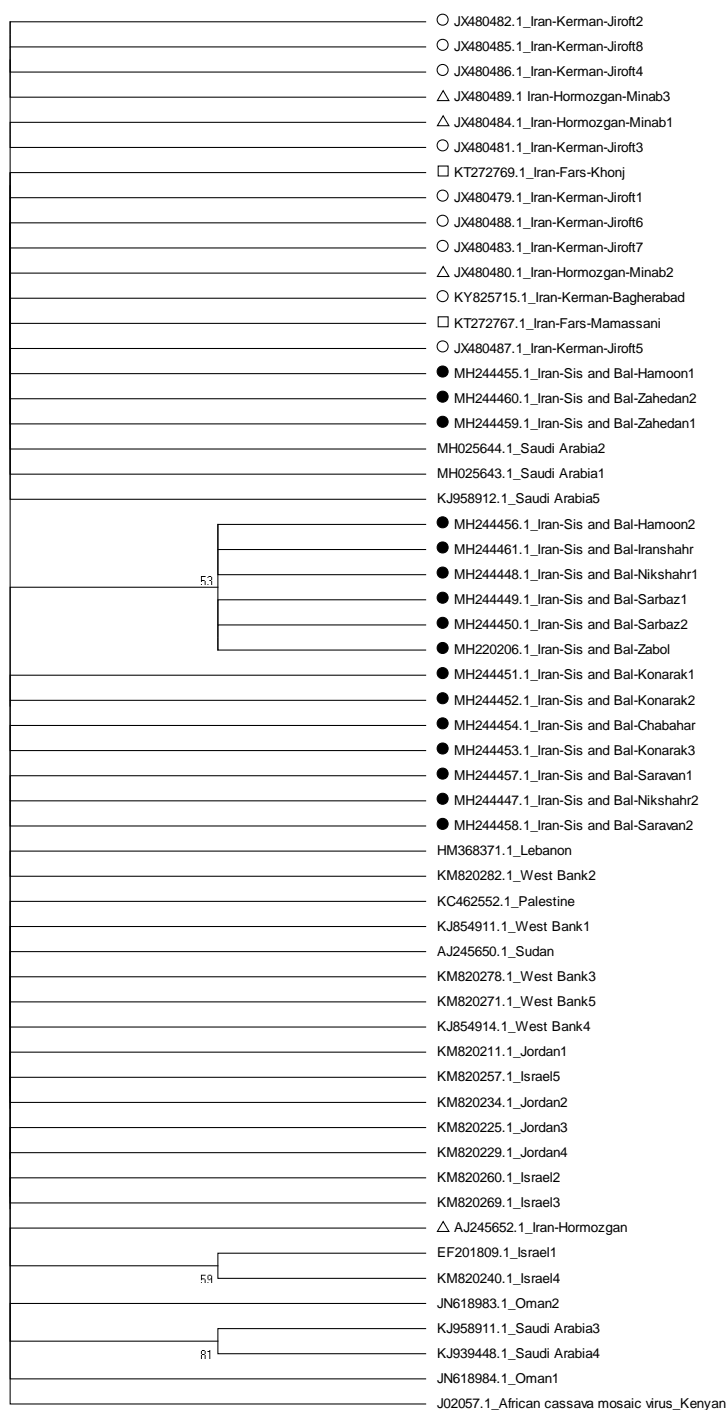
درخت فیلوژنی ترسیم شده نشان داد که جدایه‌های استان سیستان و بلوچستان در دو خوشه قرار گرفتند که البته ارتباط مستقیمی به منشأ جغرافیایی آن ندارد.

در این گروه‌بندی کلیه جدایه‌های کشورهای دنیا نیز در دو



شکل ۳- درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های WmCSV شاخه‌های با بوت استرپ کمتر از ۴۰ درصد ادغام شدند. جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش (جدایه‌های سیستان و بلوچستان) به شکل ● جدایه‌های کرمان به شکل ○ جدایه‌های فارس به شکل □ و جدایه‌های هرمزگان به شکل ▲ مشخص شده‌اند.

Figure 3- Phylogeny tree of WmCSV isolates based on coat protein gene sequence at nucleic acid level. Branches with bootstrap support less than 40% are collapsed. WmCSV subgroups are shown in the right. Different shapes are used to indicated geographical origin for different provinces of Iran: Sistan and Baluchestan isolates in ●, Kerman isolates in ○, Fars isolates in □ and Hormozghan isolates in ▲ shapes have been shown.



شکل ۴- درخت فیلوژنی ترسیم شده WmCSV بر اساس توالی ژن پروتئین پوششی جدایه‌ها در سطح آمینواسیدی شاخه‌های با بوت استرپ کمتر از ۵۰ درصد ادغام شدند. جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش (جدایه‌های سیستان و بلوچستان) به شکل ● جدایه‌های کرمان به شکل ○ جدایه‌های فارس به شکل □ و جدایه‌های هرمزگان به شکل ▲ مشخص شده‌اند.

Figure 4- Phylogeny tree of WmCSV isolates based on coat protein gene sequence at nucleic acid level. Branches with bootstrap support less than 40% are collapsed. WmCSV subgroups are shown in the right Different shapes are used to indicate geographical origin for different provinces of Iran: Sistan and Baluchestan isolates in this research in ●, Kerman isolates in ○, Fars isolates in □ and Hormozghan isolates in ▲ shapes.

		Percent Identity																																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
1		100	99.9	99.2	100.0	100.0	100.0	99.0	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	1	KT272769.1
2		1.1	100	99.0	98.9	98.9	98.8	98.8	98.9	98.9	98.9	99.1	98.6	98.9	98.8	98.3	98.9	98.5	98.7	99.0	98.7	98.5	98.3	98.7	98.7	98.8	98.1	98.3	98.1	98.8	98.7	2	KT272767.1	
3		0.8	1.0	100	99.2	99.2	99.2	99.1	99.1	99.2	99.2	99.2	99.1	98.9	99.2	99.1	98.7	99.0	98.7	98.9	99.4	99.0	98.9	98.5	99.0	99.0	99.2	98.5	98.7	98.5	99.0	98.8	3	AJ245652.1
4		0.0	1.1	0.8	100.0	100.0	99.2	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	4	JX480480.1	
5		0.0	1.1	0.8	0.0	100.0	99.2	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	5	JX480484.1	
6		0.0	1.1	0.8	0.0	0.0	99.2	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	6	JX480489.1	
7		1.0	1.2	1.0	0.8	0.8	0.8	99.1	99.2	99.2	99.2	99.1	98.9	99.2	99.1	97.9	99.2	98.9	99.0	98.7	98.3	98.1	98.7	98.3	98.3	98.5	97.7	97.7	97.8	99.2	99.0	7	KY825715.1	
8		0.2	1.2	0.9	0.2	0.2	0.2	0.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.5	99.8	99.7	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	8	JX480479.1	
9		0.0	1.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.8	0.2	100.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	9	JX480482.1	
10		0.0	1.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.8	0.2	0.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	10	JX480481.1	
11		0.0	1.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.8	0.2	0.0	0.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	11	JX480486.1	
12		0.2	0.9	0.9	0.2	0.2	0.2	0.9	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	99.5	99.8	99.7	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	12	JX480487.1	
13		0.3	1.4	1.1	0.3	0.3	0.3	1.1	0.5	0.3	0.3	0.3	0.5	99.7	99.5	98.1	99.4	99.0	99.2	98.9	98.5	98.3	98.9	98.5	98.3	98.7	98.3	97.9	98.3	99.4	99.2	13	JX480488.1	
14		0.0	1.1	0.8	0.0	0.0	0.8	0.2	0.0	0.0	0.2	0.3	0.3	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	14	JX480483.1		
15		0.2	1.2	0.9	0.2	0.2	0.2	0.9	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.5	0.2	99.1	99.4	99.0	99.2	98.9	98.5	98.3	98.9	98.5	98.5	98.7	98.3	98.4	99.1	99.3	99.4	99.2	15	JX480485.1
16		1.7	1.7	1.3	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.9	98.3	97.9	98.5	99.2	98.6	99.4	98.5	99.2	99.8	99.6	99.0	99.1	98.5	98.5	99.6	99.4	16	MH244454.1	
17		0.4	1.2	1.0	0.4	0.4	0.4	0.8	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.4	0.6	1.7	99.6	99.4	99.0	98.7	98.5	99.4	99.2	98.7	98.8	98.5	98.3	98.1	98.5	99.6	99.4	17	MH244455.1
18		0.8	1.5	1.3	0.8	0.8	1.2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	0.8	1.0	2.1	0.4	99.4	98.7	98.3	98.1	99.4	99.4	98.3	98.3	98.5	98.1	98.3	98.3	99.2	99.0	18	MH244456.1	
19		0.6	1.3	1.2	0.6	0.6	1.0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.8	1.5	0.6	0.6	99.4	98.9	98.7	99.6	98.5	98.8	98.7	98.7	98.8	98.7	98.8	98.7	99.4	99.6	19	MH244461.1	
20		1.0	1.0	0.6	1.0	1.0	1.4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.2	0.8	1.0	1.4	1.2	99.6	99.4	98.5	99.6	99.6	99.8	99.0	99.2	99.1	99.0	98.8	20	MH244451.1	
21		1.4	1.4	1.0	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.6	1.4	1.6	0.4	1.4	1.7	1.2	0.4	99.8	98.5	99.6	100.0	99.8	99.4	99.6	99.4	98.7	98.8	21	MH244452.1	
22		1.6	1.5	1.2	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.9	0.4	1.6	0.6	0.2	98.3	99.4	99.8	99.6	99.2	99.4	99.1	99.5	98.7	22	MH244453.1		
23		1.0	1.7	1.5	1.0	1.0	1.4	1.0	1.4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.2	1.5	0.6	0.6	0.4	1.6	1.6	1.8	99.6	98.1	98.6	98.5	98.3	98.6	99.2	99.2	23	MH244449.1	
24		1.4	1.4	1.0	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.6	1.4	1.6	0.8	1.4	1.7	1.6	0.4	0.6	1.9	99.6	99.8	99.0	99.2	98.9	98.6	98.5	24	MH244447.1	
25		1.4	1.3	1.0	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	0.2	1.4	1.8	1.2	0.4	0.0	0.2	1.4	0.4	99.8	99.4	99.6	99.3	98.7	98.8	25	MH244457.1	
26		1.2	1.2	0.8	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.4	1.2	1.4	0.4	1.2	1.6	1.4	0.2	0.2	0.4	1.6	0.2	0.2	0.4	1.6	0.2	0.4	1.6	26	MH244458.1	
27		1.5	1.9	1.5	1.5	1.5	2.3	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.7	1.5	1.7	1.0	1.9	1.9	1.4	1.0	0.6	0.8	1.7	1.0	0.6	0.8	99.4	100.0	98.1	98.3	27	MH244449.1	
28		1.7	1.7	1.3	1.7	1.7	1.7	2.3	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.9	1.6	1.8	1.8	1.2	0.8	0.4	0.6	1.4	0.8	0.4	0.6	0.6	99.6	98.3	98.5	28	MH244450.1		
29		1.5	2.0	1.5	1.5	1.5	2.2	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.7	1.5	1.7	0.9	2.0	1.7	1.3	0.9	0.7	0.9	1.7	1.1	0.7	0.9	0.0	0.4	98.0	98.3	29	MH220206.1	
30		0.4	1.2	1.0	0.4	0.4	0.4	0.8	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.4	0.6	1.6	0.4	0.8	1.0	1.4	1.6	0.8	1.4	1.4	1.2	2.0	1.8	2.0	99.8	30	MH244459.1		
31		0.6	1.4	1.2	0.6	0.6	0.6	1.0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.6	0.8	1.6	0.6	1.0	0.4	1.2	1.2	1.4	0.8	1.6	1.2	1.4	1.8	1.6	1.8	0.2	31	MH244460.1
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		

شکل ۵- میزان درصد شباهت و تفاوت توالی اسید نوکلئیکی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس کوتولگی سبزد هندوانه استان سیستان و بلوچستان با یکدیگر و سایر مناطق ایران

Figure 5- Identity and differences percentage of Watermelon chlorotic stunt virus nucleic acid sequence from Sistan and Baluchestan province isolates with together and other area of Iran

بحث

ژن رمزکننده پروتئین پوششی جدایه‌های استان‌های فارس و کرمان با جدایه‌های کشورهای دیگر نتایج مشابهی با رسم این درخت با توالی کامل DNA-A این ویروس برای همین جدایه‌ها توسط اسماعیلی و همکاران (۱۱) نشان داد. نتایج فیلوژنی توالی کامل DNA-A جدایه‌های کشور عربستان با سایر جدایه‌های کشورهای دنیا، جدایه‌های این کشور را در دو زیر گروه قرار داد (۱۹) که نتایجی مشابه با نتایج این پژوهش حاصل از آنالیز توالی پروتئین پوششی ویروس به دست آمد. از این جهت می‌توان بیان کرد که جهت بررسی درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های WmCSV می‌توان از توالی رمزکننده پوششی پروتئینی به جای توالی کامل DNA-A استفاده کرد. به طور کلی نتایج این پژوهش و سایر پژوهش‌ها نشان می‌دهد که جدایه‌های کشورهای ایران و عربستان نسبت به سایر کشورها از تنوع ژنتیکی بیشتری برخوردارند (۱۱ و ۱۹).

به منظور مدیریت این بیماری ویروسی استفاده از ارقام مقاوم کدوبیان به WmCSV و یا سفید بالک بهترین روش مبارزه می‌باشد. تغییر تاریخ کشت و یا روش کشت به دلیل کاهش آلودگی گیاهان گوجه‌فرنگی باعث کاهش میزان خسارت بگوموویروس TYLCV در استان سیستان و بلوچستان شده است (۱۴). تلاش‌های اولیه انجام شده به منظور شناسایی ارقام مقاوم تجاری هندوانه در ایران نسبت به WmCSV منجر به شناسایی رقم مقاوم به این ویروس نشده است اما ارقامی با حساسیت کمتر نسبت به

گسترده‌گی شناسایی و ثبت توالی اسیدهای نوکلئیکی و اسیدهای آمینی جدایه‌های گزارش شده WmCSV از دنیا در GenBank NCBI محدود به کشورهای خاورمیانه می‌باشد و از سایر کشورهای آسیا، اروپا، آفریقا و یا قاره‌های اقیانوسیه و آمریکا توالی‌ای به ثبت نرسیده است. کشور ایران از طریق بخش جنوبی استان سیستان و بلوچستان و به واسطه دریای عمان با کشورهای عمان و عربستان و سایر کشورهای خاورمیانه ارتباط می‌یابد. با توجه به اهمیت گسترده‌گی و وسعت زیاد استان سیستان و بلوچستان (حدود ۱۱ درصد کل مساحت کشور) تحقیق حاضر اولین پژوهش کاملی است که به بررسی شناسایی و تنوع ژنتیکی WmCSV بر اساس ژن رمزکننده پروتئین پوششی WmCSV در این استان می‌پردازد.

نتایج این پژوهش ارتباط نزدیک جدایه‌های استان سیستان و بلوچستان را با جدایه‌های کشورهای عمان و عربستان تأیید می‌کند. در واقع این مطلب بیانگر این واقعیت است که جدایه‌های ایران با جدایه‌های عمان و عربستان با وجود موقعیت دریا با کمترین فاصله دریایی حدود ۲۱۵ کیلومتری نیز در حال جابه‌جایی بین دو کشور می‌باشند. روش انتقال ویروس احتمالاً از طریق انتقال با سفیدبالک‌های ناقل ویروس از طریق وسایل ارتباطی بین دو کشور می‌باشد.

در این پژوهش، رسم درخت فیلوژنتیکی و ارتباط توالی بخشی از

داده‌های پژوهشی کافی در زمینه تعیین توالی نوکلئوتیدی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های کشورهای همسایه شرق ایران مانند پاکستان و هند نیز می‌تواند احتمال ایجاد القای مقاومت در گیاهان تراریخت با مکانیسم خاموشی آر آن ای را افزایش دهد.

سیاسگزاری

بدین وسیله از مجتمع آموزش عالی سراوان به دلیل تأمین هزینه طرح پژوهشی مصوب، به شماره طرح ۹۶۰۳ قدردانی می‌گردد.

ارقام تجاری هندوانه معرفی شده‌اند (۱۰ و ۱۳). منابع مقاومت کامل به این ویروس در تعدادی از لاین‌های خربزه از کشور سودان گزارش شده است (۲۳)، از این جهت تولید کدویان تراریخت مقاوم با مکانیسم‌های القاکننده خاموشی RNA از قبیل استفاده از سازه‌های hpRNA و یا miRNA و یا استفاده از مکانیسم‌های ویرایش ژنی مانند مقاومت حاصل از سیستم کریسپر جهت ایجاد مقاومت به این ویروس پیشنهاد می‌گردد. توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در این پژوهش از استان سیستان و بلوچستان به همراه سایر داده‌های ثبت شده از مناطق مختلف ایران و کشورهای خاورمیانه می‌تواند در طراحی سازه مناسب خاموشی و تولید گیاهان تراریخت مقاوم نسبت به اکثر جدایه‌های این ویروس مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- 1- Abudy A., Sufrin-Ringwald T., Dayan-Glick C., Guenoune-Gelbart D., Livneh O., Zaccari M., and Lapidot M. 2009. Watermelon chlorotic stunt and Squash leaf curl begomoviruses new threats to cucurbit crops in the Middle East. *Israel Journal of Plant Science* 58: 33-42.
- 2- Ahmadi K., Ebadzadeh H.R., Abdi Shah H., Kazemian A., and Rafiei M. 2017. Agricultural statistics crop year 2016-2017. Ministry of Agriculture jahad, Iran. (In Persian)
- 3- Al-Musa A., Anfoka G., Al-Abdulat A., Misbeh S., Haj Ahmed F., and Otri I. 2011. Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV): A serious disease threatening watermelon production in Jordan. *Virus Genes* 43: 79-89.
- 4- Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Hussein E.Y., Mallah, O.B. and Abu-Zaitoun, S.Y. 2012. First report of Watermelon chlorotic stunt virus in watermelon in the Palestinian authority. *Plant Disease*, 96,149.
- 5- Bananej K., Ahoonmanesh A., and Kheyr-Pour A. 2002. Host range of an Iranian isolate of watermelon chlorotic stunt virus as determined by whitefly-mediated inoculation and agroinfection, and its geographical distribution. *Journal of Phytopathology* 150: 423-430.
- 6- Bananej K., Kheyr-Pour A., and Ahoonmanesh A. 1998. Identification of Watermelon chlorotic stunt virus, WmCSV in Iran. In: Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress. Karaj, p 194. (In Persian with English abstract)
- 7- Bedford I.D., Briddon R.W., Jones P., Al-Kaff N., and Markham P.G. 1994. Differentiation of three whitefly-transmitted geminiviruses from the Republic of Yemen. *European Journal of Plant Pathology* 100: 243-257.
- 8- Dellaporta S.L., Wood J., and Hicks J.B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- 9- Esmaeili M., and Heydarnejad J. 2014. Identification of wild hosts of Watermelon chlorotic stunt virus in south and southeastern Iran. *Journal of Agricultural Biotechnology* 1:1-18.
- 10- Esmaeili M., and Heydarnejad J. 2016. Evaluation of reaction of watermelon cultivars to Watermelon chlorotic stunt virus by agroinoculation with an infectious clone of the virus. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52(1): 99-107. (In Persian with English abstract)
- 11- Esmaeili M., Heydarnejad J., Massumi H., and Varsani A. 2015. Analysis of Watermelon chlorotic stunt virus and Tomato leaf curl Palampur virus mixed and pseudo-recombination infections. *Virus Genes* 51: 408-416.
- 12- Gholamalizadeh R., Vahdat A., Keshavarz T., Elahinia S.A., Shahraeen N., and Bananej K. 2008. Occurrence, distribution, and relative incidence of viruses infecting cucurbit crops in Guilan province (Iran). In: Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress. Hamedan, p 503. (In Persian with English abstract)
- 13- Heydarnejad J., Khosrowfar F., Razavinejad S., Massumi H., and Tabatabaei Fard S.J. 2010. Incidence of Watermelon chlorotic stunt virus in Fars and Kerman provinces. In: Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress. Tehran, p 672. (In Persian with English abstract)
- 14- Jafari M., Valizadeh M., Valizadeh J., Ertiaei F., and Beigomi M. 2010. The effect of sowing date and sowing method on damage reduction of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in greenhouses of Baluchestan region. In: Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress. Tehran, Iran, p 667. (In Persian with English abstract)
- 15- Jones P., Sattar M.H.A., and Al-Kaff N. 1988. The incidence of virus disease in watermelon and sweet melon crops in the People's Republic of Yemen and its impact on cropping policy. *Aspects of Applied Biological* 17: 203-207.
- 16- Kheyr-Pour A., Bananej K., Dafalla G.A., Caciagli P., Noris E., Ahoonmanesh A., Lecoq H., and Gronenborn B. 2000. Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: sequence comparisons and identification of a

- whitefly transmission determinant. *Phytopathology* 90: 629-635.
- 17- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., and Lefkowitz E.J. 2012. *Virus Taxonomy classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier.
 - 18- Mohammed H.S., Zicca S., Mangli A., Mohamed M.E., E.L., Siddig M.A., Tomassoli L., and EL Hussein A.A. 2014. Identification and pathogenetic analysis of common pumpkin viruses in Sudan. *Journal of Plant Pathology* 96: 77-84.
 - 19- Rezk A.A., Sattar M.N., Alhudaib K.A., and Soliman A.M. 2019. Identification of Watermelon chlorotic stunt virus from watermelon and zucchini in Saudi Arabia. *Canadian Journal of Plant Pathology* 412: 1-6.
 - 20- Sufrin-Ringwald T., and Lapidot M. 2011. Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit-infecting begomoviruses: Squash leaf curl virus and Watermelon chlorotic stunt virus. *Phytopathology* 101: 281-289.
 - 21- Walkey D.G.A., Alhubaishi A.A., and Webb M.J.W. 1990. Plant virus diseases in the Yemen Arab Republic. *Tropical Pest Management*, 36:195-206.
 - 22- Wyatt S.D., and Brown J.K. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 1288-1293.
 - 23- Yousif M.T., Kheyr-pour A., Gronenborn B., Pitrat M., and Dogimont C. 2007. Sources of resistance to Watermelon chlorotic stunt virus in melon. *Plant Breeding* 126: 422-427.

Phylogenetic Relation of *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) Isolates of Sistan and Baluchestan Province by Sequencing of Coat Protein Gene

M. Jafari^{1*}- Z. Sadeghi²- S. Nasrollanejad³- A.R. Shahrokhi⁴

Received: 18-04-2020

Accepted: 25-07-2020

Introduction: Cucurbits are among the main vegetable crops that are extensively grown in commercial greenhouses, plastic tunnels, and open farms in many areas of Iran. Many begomoviruses are known to cause serious damages in economically important cucurbit crops such as watermelon and melon. Among these viruses, WmCSV has been quoted as one of the major limiting factors for cucurbit production throughout the south of Iran. *Begomovirus* genus is a member of *Geminiviridae* family that has the most species in comparison to other viral genus infecting plants. *Begomoviruses* are notorious pathogens infecting dicotyledonous plants globally. They are transmitted exclusively by the whitefly, *Bemisia tabaci*. Whitefly is one of the most important and prevalent pests in the warm south and southeast provinces of Iran and infects cucurbits fields in Sistan and Baluchestan province with a widespread population. *Begomoviruses* are single-stranded circular DNA viruses and have been observed in a wide host range of plants. There are different reports of infectious *Begomovirus* species such as *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) from a world that can damage the cucurbits. The purpose of this study is to find the phylogenetic relation of WmCSV isolates from Sistan and Baluchestan province, which is located southeast of Iran, together and other isolates from the world, too. Because of this province is the largest area, with about 11.4% of the total area of Iran.

Materials and Methods: To identify the WmCSV infecting cucurbits in the southeast of Iran, several surveys in different regions of Sistan and Baluchestan were selected for the study, including Saravan, Iranshahr, Nikshahr, Sarbaz, Konarak, Chabahar, Zabol, Zahak, Hamoon, Hirmand, Nimroz, and Zahedan. Sampling has been taken from different cucurbits, such as different kinds of melons, watermelon, and squash, in 2015-2017. The samples were taken from plants showing viral symptoms such as vein yellowing, stunting, chlorotic, and mottling, deformation and severe reduction of fruit size and co-infection with whiteflies. The collected samples were transformed into the laboratory and the total DNA was extracted. To identify WmCSV were used from specific primers, Gem-CP-V-5' and Gem-CP-V-3' detecting *Begomovirus* genus in cucurbits. PCR products have been sequenced and blasted in the GenBank NCBI database and submitted there. Then, carried out the Alignment of acid nucleotide sequences and description of the phylogenetic tree by MEGA5 software. The Identity and differences percentage of *Watermelon chlorotic stunt virus* nucleic acid sequence from Sistan and Baluchestan province isolates with together and other areas of Iran carried out by MegAlign software too.

Results and Discussion: All areas of sample collection of Sistan and Baluchestan province were infected with WmCSV in this study. Positive PCR watermelon samples have been infected to WmCSV, severity. The expected PCR products, 550 bp size, from 16 amplified partial CP genes from different areas of Sistan and Baluchestan province in Iran were done sequencing. Phylogenetic sequencing analysis results of isolates from other countries and other regions of Iran also WmCSV isolates in this research from Sistan and Baluchestan province, classified them in two apart groups involves A and B. The A group was divided into 2 groups, that were named AI and AII. Isolates of Sistan and Baluchestan province from this research involved both of them. These findings seem to indicate Sistan and Baluchestan as of the possible origins of WmCSV in Iran. There was no relationship between geographical source and host in this province. Some isolates of this province had a near relationship to Oman and Saudi Arabia isolates.

Conclusion: WmCSV can be considered as a serious disease threatening watermelon production, in Sistan and Baluchestan province in the southeast of Iran as severe symptoms. On another hand, individually or in interaction with other begomoviruses, WmCSV can cause severe damage in farms infected by whiteflies. Probably, the spread of isolates belong Sistan and Baluchestan province and Oman or Saudi Arabia has been taken by whiteflies that transformed via between Iran and these countries, because of the most relationships between the WmCSV isolates of these countries. More importantly, performing collaborative studies with neighboring countries such as Pakistan and India, seems necessary. Also, further studies on Iranian isolates of

1 and 4- Assistant Professors, Department of Plant Protection, Higher Educational Complex of Saravan

(*- Corresponding Author Email: majafari59@yahoo.com)

2 and 3- Former Ph.D. Student of Plant Pathology and Associate Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, respectively.

WmCSV that occurred on either cultivated or wild plants are essential to have a better understanding of the viral epidemics in the country. The results of sequencings will be used to design constructs inducing RNA silencing as a resistant strategy, against WmCSV isolates that were classified in both two groups.

Keywords: *Begomovirus*, Coat protein, Phylogeny tree, Sistan and Baluchestan, *Watermelon chlorotic stunt virus*