

## بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ویروس موزائیک زرد کدو بر اساس قسمتی از ژن پروتئین پوششی

حمیدرضا مقام‌نیا<sup>۱</sup>، محمد حاجی زاده<sup>۲</sup>✉ و عبدالباسط عزیزی<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه کردستان؛ ۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه کردستان

(تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۵؛ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۵)

### چکیده

به منظور بررسی آنالیز تبارزایی، تنوع ژنتیکی و فشار انتخاب وارد بر ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس موزائیک زرد کدو (ZYMV)، هفت جدایه B10، B21، B22، H7، W5، Z3 و Z14 از غرب کشور و از میزبان‌های متفاوت تعیین توالی شدند و با ۶۴ جدایه قابل دسترس در پایگاه داده‌های نوکلئوتیدی مورد مقایسه قرار گرفتند. همریف‌سازی توالی‌ها و ترسیم درخت تبارزایی جدایه‌های این ویروس بر اساس ۴۳۲ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی در نرم‌افزار MEGA6 و برآوردهای تنوع ژنتیکی و فشار انتخاب وارد بر پروتئین پوششی با نرم افزار DnaSP v.5.10.05 انجام شد. نتایج همریف‌سازی توالی‌ها نشان داد که جدایه‌های این تحقیق ۸۶-۱۰۰٪ با همدیگر و ۸۵-۹۹٪ با سایر جدایه‌های ایرانی تشابه نوکلئوتیدی داشتند. در بررسی تبارزایی، جدایه‌ها در سه گروه مجزا تفکیک شدند که جدایه‌های B10، B21، B22، H7 و Z3 در گروه جدایه‌های ایرانی و اروپایی و دو جدایه Z14 و W5 در گروهی مجزا همراه با جدایه‌های شرقی قرار گرفتند که نشان‌دهنده دو دودمان متفاوت جدایه‌های ZYMV در ایران است. بررسی نوترکیبی با نرم‌افزار RDP4 v.4.63 حاکی از عدم نوترکیبی در این بخش از ژنوم بود. واژه‌های کلیدی: تبارزایی، فشار انتخاب منفی، نوترکیبی، ویروس موزائیک زرد کدو.

## Genetic diversity of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates based on the partial coat protein gene

H. R. MAGHAMNIA<sup>1</sup>, M. HAJIZADEH<sup>2</sup>✉ and A. AZIZI<sup>2</sup>

1- M.Sc. Student in Plant Protection, University of Kurdistan; 2- Assistant Professor, Plant Protection Department, University of Kurdistan

### Abstract

In order to study phylogenetic analysis, genetic diversity and the effect of selection forces on partial coat protein (CP) of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates, seven isolates B10, B21, B22, H7, W5, Z3 and Z14 were collected from several hosts in west of Iran. The sequences of the partial CP gene were compared with 64 isolates retrieved from the GenBank. Phylogenetic tree were constructed based on 432 nucleotides of CP gene in MEGA6 software and estimation of genetic diversity and selection forces were performed in DnaSP v.5.10.05. Sequence analysis revealed that our isolates shared 86-100 % nucleotide identity with each other and 85-99 % with Iranian isolates. In phylogenetic analysis, isolates B10, B21, B22, H7, Z3 were placed into European and Iranian group whereas, W5 and Z14 were placed in distinct group with east isolates. These results indicated the existence of two different lineages of the ZYMV isolates in Iran. No recombination events were detected in this part of ZYMV-CP.

**Key words;** Negative selection, Phylogeny, Recombination, ZYMV.

## مقدمه

ویروس موزائیک زرد کدو (*Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV*) برای اولین بار در سال ۱۹۷۳ از ایتالیا و پس از آن به سرعت از نقاط دیگر جهان همچون اروپا، آفریقای شمالی، آمریکا و خاورمیانه گزارش شد (Lisa et al., 1981; Tobias et al., 2008). امروزه ZYMV تقریباً در سراسر جهان و در تمام کشورهای با آب و هوای معتدل و نیمه گرمسیری که دارای کشت کدوئیان هستند، گزارش شده است. گیاهان آلوده به این ویروس علائمی همچون موزائیک، تاوولی شدن، کوتولگی و بدشکلی در میوه و برگ ایجاد می‌کنند و اگر بیماری در مراحل اولیه رشد گیاه رخ دهد، خسارت بسیار زیاد خواهد بود. این خسارت به گونه‌ای است که در ارقام حساس تا صد درصد کاهش عملکرد و بازار پسنندی میوه را به دنبال خواهد داشت (Al-Ani et al., 2011).

ویروس موزائیک زرد کدو از جنس پوتی ویروس<sup>۱</sup>، متعلق به خانواده پوتی ویریده<sup>۲</sup> و دارای پیکره رشته‌ای خمش پذیر به طول ۷۵۰ نانومتر است. ژنوم آن از یک آران‌ای تک‌لای مثبت تشکیل شده که حدود ۹۶۰۰ نوکلئوتید طول و تنها یک چارچوب خوانش باز<sup>۳</sup> دارد. حاصل ترجمه این چارچوب خوانش باز یک پروتئین مرکب است که توسط آنزیم پروتئاز کد شده توسط ویروس به ده پروتئین کوچکتر تبدیل می‌شود (Hasiow-Jaroszewska et al., 2013). این ویروس مانند سایر اعضای جنس پوتی ویروس‌ها توسط شته‌ها با مکانیسم انتقال ناپایا، انتقال مکانیکی و بذری منتقل می‌شود (Lisa et al., 2008).

در ایران، ZYMV برای اولین بار در سال ۱۳۶۶ از مزارع کدو و طالبی استان تهران گزارش شد (Ghorbani, 1988). سپس، در مطالعات دیگر این ویروس با استفاده از روش‌های سرولوژیکی و مولکولی از اغلب استان‌های کشور از جمله استان کردستان گزارش گردید (Shaabanian et al., 2005).

۱-Potyvirus  
۲-Potyviriidae  
۳-Open reading frame, ORF

(Bananej et al., 2008). اغلب مطالعات انجام شده روی این ویروس در ایران در جهت ردیابی آن از میزبان‌های مختلف بوده است و علی‌رغم اهمیت و پراکنش وسیع این ویروس مطالعات معدودی در زمینه‌ی تبارزایی و تنوع ژنتیکی آن انجام گرفته است (Mirhosseini et al., 2011; Massumi et al., 2014; Bananej et al., 2008). ۲۱ جدایه از ۱۳ استان کشور جداسازی و تعیین توالی شده است و همراه با جدایه‌هایی از سایر نقاط جهان بر اساس طول کامل ژن پروتئین پوششی (CP) و قسمت انتهایی کربوکسیلی ژن NIB از لحاظ تبارزایی و دامنه‌ی میزبانی مورد مطالعه قرار گرفته است (Massumi et al., 2011). جدایه‌ها از لحاظ تبارزایی در سه گروه و تمام جدایه‌های ایرانی در گروه اول قرار گرفتند. در مطالعه‌ی دیگر، یک جدایه از شیراز به صورت کامل تعیین توالی شد که آنالیز توالی این جدایه نشان داد که جدایه‌های ایرانی بیشترین شباهت را با جدایه‌های اروپایی دارند (Bananej et al., 2008; Azarfar et al., 2012). برای بررسی تنوع ژنتیکی در ویروس‌های گیاهی از روش‌های مختلف مانند بیولوژیکی، دامنه میزبانی و مولکولی استفاده می‌شود. در روش مولکولی، تاکنون اکثر بررسی‌های تنوع ژنتیکی در ویروس ZYMV بر اساس ژن CP (Lin et al., 2001; Glasa and Pittnerová, 2006) و یا NIB-CP (Lecoq et al., 2009) انجام شده است. تخمین تنوع ژنتیکی ویروس‌ها و عوامل و فاکتورهای دخیل در این تنوع برای درک پیچیدگی اپیدمیولوژی پاتوژن و به کارگیری ژن‌های مقاومت ضروری بوده و در نتیجه برای طراحی استراتژی کنترل موثر است. همچنین، تنوع ژنومی به ویژه ژن پروتئین پوششی باعث بروز مشکلاتی در بهینه کردن و کاربرد روش‌های ردیابی این ویروس‌ها دارد (Desbiez et al., 1996)، زیرا اغلب روش‌های ردیابی ویروس‌ها مبتنی بر خصوصیات این ژن است. در ویروس‌های دارای ژنوم آران‌ای به دلیل نسبت جهش بالا، تکثیر سریع و اندازه بالای جمعیت پتانسیل تغییرات ژنومی در سطح وسیع را دارند و این تغییرات می‌تواند منجر به ظهور واریانت‌های جدید ویروس شود که

### روش بررسی

**منبع جدایه‌های ZYMV:** جدایه‌های این ویروس از نمونه‌های آلوده خشک شده در کلرید کلسیم موجود در آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه کردستان که در سال ۱۳۹۴ از استان‌های کردستان و کرمانشاه جداسازی شده بودند، به دست آمد (Mohammadi, 2015). مشخصات مربوط به هر جدایه در جدول ۲ آمده است.

#### استخراج اسید نوکلئیک کل و واکنش آر تی-پی سی آر:

اسید نوکلئیک کل از بافت‌های خشک شده آلوده به این ویروس بر اساس روش Foissac *et al.* (2000) استخراج گردید. سپس، دی‌ان‌ای مکمل<sup>۱</sup> در واکنش آر تی<sup>۲</sup> با استفاده از کیت HyperScript™ Reverse Transcrip از شرکت ژن آل کره جنوبی<sup>۳</sup> و آغازگرهای تصادفی شش‌تایی<sup>۴</sup> طبق دستورالعمل شرکت سازنده تهیه و یک میکرولیتر از آن به عنوان الگو در واکنش پی سی آر مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش پی سی آر در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر و استفاده از مسترمیکس<sup>۵</sup> (Tris-HCl pH 8.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% Tween 20, 0.4 mM dNTPs, 0.2 Units/μl Ampliqon Taq DNA polymerase) ساخت شرکت ژن آل کره جنوبی در حضور آغازگرهای رفت (-5' ZYMV (f) و برگشت (3'-AGAAACATTGCTAAGGGCTG-3' Shimomoto and (5'-TCTCATCAGCAATTCGCCT-3' Takeuchi, 2006) انجام گرفت. برنامه پی سی آر متشکل از یک چرخه ۹۴ درجه سلسیوس ۲ دقیقه به منظور واسرشت‌سازی اولیه دی‌ان‌ای و ۳۰ سیکل شامل واسرشت‌سازی دی‌ان‌ای در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به الگو<sup>۶</sup> به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و تکثیر دی‌ان‌ای<sup>۷</sup> در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، به علاوه

باعث غلبه بر ژن‌های مقاومت، آلوده کردن میزبان‌های جدید و پراکنش با ناقل‌های جدید گردد. به طور مثال، در مطالعه‌ای که در فرانسه روی تغییرات ژنومی جدایه‌های این ویروس بین سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۰۹ انجام شد، دو گروه تبارزایی جدید ظهور پیدا کردند (Lecoq *et al.*, 2009). همچنین، مطالعه‌ی دیگر روی این ویروس نشان داد که تغییر یک نوکلئوتید که منجر به تغییر اسید آمینه در منطقه P3 شد، بیماری‌زایی ویروس از حالت خفیف به حالت شدید تغییر پیدا کرد (Nováková *et al.*, 2014). از منابع این تنوع‌ها در ویروس‌های با ژنوم آر‌ان‌ای می‌توان به جهش‌های ناشی از اشتباه آر‌ان‌ای پلی‌مراز ویروس‌ها اشاره کرد که فشار انتخاب وارد بر این ژن منجر به حذف و یا حفظ واریانت ویروس خواهد شد (Biebricher and Eigen, 2006; Sokhandan-Bashir and Melcher, 2012).

نسبت جایگزینی مکان‌های نامترادف (dN) به مکان‌های مترادف (dS) به‌عنوان شاخص برای تعیین نوع فشار وارد بر یک ژن استفاده می‌شود. اگر این نسبت برابر یک باشد نوع فشار انتخاب خنثی و در صورت بزرگتر و کوچکتر از یک نوع فشار انتخاب به ترتیب مثبت و منفی خواهد بود. علی‌رغم فراوانی جهش در ویروس‌های آر‌ان‌ای دار، ژنوم این ویروس‌ها پایدار است و این به دلیل وقوع فشار انتخاب منفی در ژن‌های حیاتی ویروس است. پدیده فشار انتخاب منفی برای بقای ویروس‌های گیاهی بسیار حیاتی است (Sokhandan-Bashir and Melcher, 2012).

در این تحقیق، میزان تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف ZYMV جداسازی شده از میزبان‌های کدو، هندوانه، خیار و لوبیا سبز از استان‌های کردستان و کرمانشاه محاسبه و همراه با سایر جدایه‌های ایرانی به عنوان یک زیرجمعیت این ویروس با سایر جدایه‌ها از نقاط مختلف جهان بر اساس ترادف قسمتی از ژن پروتئین پوششی مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین، تبارزایی این ویروس و فشار انتخاب به این قسمت از ژنوم بررسی شد.

۱- Complementary DNA, cDNA  
 ۲- RT (reverse transcription)  
 ۳- GeneAll, Korea  
 ۴- Random hexamer primer  
 ۵- Master mix  
 ۶- Annealing  
 ۷- Extension

مشخصات جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است.

#### آنالیز تنوع ژنتیکی، فشار انتخاب و وقوع نوترکیبی:

جدایه‌های تعیین توالی شده در این تحقیق به همراه سایر جدایه‌های توالی‌شده منحصر به فرد (هاپلو تیپ) از بعضی استان‌های کشور به عنوان جمعیت ایرانی ویروس ZYMV با سایر جمعیت‌های این ویروس از آمریکا، اروپا و شرق مورد مقایسه قرار گرفتند. در زیر جمعیت شرق توالی‌هایی از کشورهای چین، کره جنوبی، ژاپن، ویتنام، سنگاپور، استرالیا و نیوزیلند قرار گرفتند. توالی‌هایی از یک کشور که صد درصد مشابهت داشتند در آنالیز لحاظ نشدند. در این مقایسه پارامترهای ژنتیکی مانند تعداد هاپلو تیپ (H)، تنوع هاپلو تیپ (Hd)، تعداد جایگاه‌های افتراقی (S)، تعداد کل جهش‌ها ( $\eta$ )، تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ )، نسبت جانشینی مترادف (dS)، نسبت جانشینی غیر مترادف (dN) و فشار انتخاب ( $\omega = dN/dS$ ) با استفاده از نرم‌افزار DnaSP v.5.10.05 (Librado and Rozas, 2009) محاسبه گردید. برای محاسبه شدت فشار انتخاب وارد به ژن (dN-dS) روی هر کدون از نرم‌افزار MEGA6 و برای بررسی امکان وقوع نوترکیبی در این قسمت از ژنوم بین جدایه‌ها از نرم‌افزار RDP4 v.4.63 (Martin *et al.*, 2015) استفاده شد. برای تعیین میزان درصد تشابه نوکلئوتیدی بین جدایه‌های این تحقیق با یکدیگر و با سایر جدایه‌های ایرانی این ویروس و همچنین با برخی جدایه‌های در دسترس از سایر کشورها از نرم‌افزار SDT v.1.2 (Muhire *et al.*, 2014) استفاده شد.

#### نتیجه و بحث

##### آزمون آر تی-پی سی آر و مطالعات تبارزایی: با استفاده

از آغازگرهای اختصاصی این ویروس، قطعه‌ای به طول تقریبی ۴۳۲ جفت باز برای تمامی جدایه‌ها در واکنش آر تی-پی سی آر به دست آمد در حالی که این قطعه در شاهد منفی تکثیر نشد (شکل مربوطه نشان داده نشده است).

یک چرخه دمایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه برای تکمیل تکثیر رشته‌های ناقص بود. واکنش پی سی آر در دستگاه ترموسایکلر بایو رد (Bio Rad) ساخت کشور آمریکا انجام شد.

##### همسانه سازی محصولات آر تی-پی سی آر و تعیین

##### توالی نوکلئوتیدی: قطعات مورد نظر با استفاده از آنزیم T4

DNA Ligase به حامل pTG19-T که دارای آویزه‌های تیمینی است، متصل شد. واکنش فوق به مدت سه ساعت در دمای اتاق انکوبه و سپس به سلول باکتریایی *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  مستعد شده با کلرید کلسیم و روش شوک حرارتی، منتقل شد. برای غربالگری سلول‌های نوترکیب از محیط کشت جامد LB انتخابی حاوی  $30 \mu\text{L}$  از X-Gal ( $50 \text{ mg/ml}$ ) و آمپی سیلین ( $100 \text{ mg/ml}$ ) استفاده شد. کلونی‌های سفید رشد کرده بر روی تشتک پتری، در  $3$  میلی لیتر از محیط کشت LB مایع حاوی آمپی سیلین ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) به مدت یک شب رشد داده شدند و از باکتری‌های کشت شده برای استخراج حامل استفاده گردید. استخراج حامل با کیت Expres<sup>TM</sup> Plasmid SV ساخت شرکت ژن آل کره جنوبی مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی ویروس ZYMV توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس عمومی T7-promoter که توالی‌های آن‌ها در دو طرف محل اتصال دی‌ان‌ای خارجی در حامل pTG19-T وجود دارند، انجام گرفت.

##### آنالیز تبارزایی: ترادف‌های بدست آمده از تعیین توالی

توسط نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999) تصحیح و با ۶۴ توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های این ویروس که از قبل در پایگاه اطلاعاتی موجود بودند، با برنامه ClustalW هم‌ردیف شدند. برای بررسی روابط تبارزایی بین این جدایه‌ها از نرم‌افزار MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) استفاده شد. درخت تبارزایی توالی‌های هم‌ردیف شده با بوت استرپ ۱۰۰۰ با دو روش Neighbor joining و Maximum likelihood ترسیم شد.

جدول ۱- رس شماره‌ها، منشا و میزبان جدایه‌های ویروس موزائیک زرد کدو مورد استفاده در این تحقیق

Table 1 Accession numbers, hosts and origins of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates/strains analyzed in this study

Origin (Number of isolates)	*Accession Numbers	*Isolates	*Host
Germany (1)	AJ420019	Berlin 1	<i>Cucurbita pepo</i>
Italy (1)	AJ420020	Italy 1	<i>C. pepo</i>
Slovenia (1)	AJ420018,	Slovenia 1	<i>C. pepo</i>
Slovakia (1)	DQ124243	SE04T	<i>C. pepo</i>
Austria (1)	AJ420012	Austria 2	<i>C. pepo</i>
Hungary (2)	AJ459954, AJ459956	H266-2, H272-8	<i>C. pepo</i>
Japan (2)	AB063251, AB188116	Japan M39, 2002	<i>Cucumis melo</i> , <i>Cucumis sativus</i>
China (7)	AF513550, AY074808, KM405795, KM405800, KJ848750, KJ848752, KJ848769, AJ316228, AJ889243	Shangyu, Shanxi, Z37-2, Jashi-1, Shanshan-1, SG, LG1	<i>Cucurbita moschata</i> , <i>C. moschata</i> , <i>melo</i> , <i>C. Benincasa hispida</i> , <i>C. .melo</i> , <i>Luffa cylindrical</i> , <i>C. pepo</i>
Singapore (1)	AF014811	Singapore	<i>C. sativus</i>
(2) South Korea	AJ429071, KT884450	A, Andong	<i>Altheae rosea</i> , <i>Citrullus lanatus</i>
Taiwan (2)	AF127932, AF127933	TW-TNML1, TW-NT1	<i>C. melo</i> , <i>C. sativus</i>
Iran (19)	FJ705272, FJ705256, FJ705257, FJ705253, FJ705264, FJ705269, FJ705262, FJ705266, FJ705271, FJ705268, FJ705267, KP748228, JN183062, FJ705259, FJ705260, FJ705261, FJ705263, FJ705270, FJ705258	Azr.Mak.W, Bos.Bor.S, Esf.Esf.C, Azr.Sha.C, Ker.Baf. S, Sis.Zah.C, Hor.Haj.W, Ker.Ker.S, Yaz.Yaz.C, Sis.Zab.W, Kho.Mash.S, Dezful, ZYMV-Fars, Gil.Ras.C, Ham, Aas.C, Ham.Mal.W, Hor.Min.S. The Kar.S, Far.Mar.M	<i>Citrullus vulgaris</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>C. maxima</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>C. maxima</i> , <i>C. pepo</i> , <i>C. pepo</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>C. maxima</i> , <i>C. maxima</i> , <i>C. melon</i>
Poland (1)	EU561044	Zuy	<i>C. pepo</i>
Australia (6)	JF792449, JF795795, JF795796, JF792368, JF792369, JF792444	Cvn-2, Cvn-11, Cvn-12, Knx-6, Knx-7, Qld-1	<i>C. pepo</i> , <i>C. maderaspatanus</i> , <i>C. maderaspatanus</i> , <i>C. melo</i> , <i>C. maxima</i> , <i>C. moschata</i>
USA (5)	KJ923769, HM768199, EU371648, JX028592, D13914	leaf23, GH81, L5, HBCF-74, Florida	<i>C. pepo</i> , <i>C. pepo</i> , <i>C. pepo</i> , <i>Cucurbita foetidissima</i> , <i>C. moschata</i>
France (3)	FJ389695, JN861005, JN861004	C05-205, E15, E9	<i>C. pepo</i> , <i>C. pepo</i> , <i>C. pepo</i>
Viet Nam (3)	DQ925447, DQ925450, DQ925451	ZYMV-VN/Cm3, ZYMV-VN/Cm2, ZYMV-VN/Bh1	<i>C. moschata</i> , <i>C. moschata</i> , <i>B. hispida</i>
New Zealand (1)	AY995216	-	<i>C. pepo</i>
Serbia (2)	JN561294, JX262125	550-11, 308-10	<i>C. lanatus</i> , <i>C. pepo</i>
Bosnia & Herzegovina(1)	KF836440	314-12	<i>C. lanatus</i>
Spain (1)	DQ645729	ZYMV C-16	<i>C. pepo</i>
Czech Republic (1)	KF976712	H	<i>C. pepo</i>

\* نام جدایه‌ها هم‌ردیف با رس شماره‌ها و میزبان‌ها آورده شده‌اند.

\* Names of isolates are written in an order respective to their accession numbers and hosts

مربوط به پلاسמיד در دو طرف توالی مورد نظر ویروس، در پایگاه اطلاعاتی داده‌های نوکلئوتیدی (NCBI) به ثبت رسیدند (جدول ۲). موقعیت این ترادف‌ها از نوکلئوتید ۲۸۹ تا ۷۲۱

قطعات به دست آمده پس از همسانه‌سازی در باکتری *E. coli* تعیین توالی شدند که صحت نتایج آر تی-پی سی آر را تایید کرد. ترادف‌های حاصل پس از حذف توالی نوکلئوتیدی

افزار SDT v.1.2 نشان داد که این جدایه‌ها ۸۶-۱۰۰٪ در سطح اسید نوکلئیک و ۹۳-۱۰۰٪ در سطح آمینواسید با هم تشابه دارند. از طرفی دیگر، جدایه‌های این تحقیق ۸۵-۹۹٪ در سطح اسید نوکلئیک با سایر جدایه‌های ایرانی (مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است) مشابهت نشان دادند. همچنین این جدایه‌ها ۸۵-۹۲٪ با جدایه‌ی مرجع (TW-TN3) تشابه نوکلئوتیدی داشتند (شکل ۱).

ژن پروتئین پوششی این ویروس است. این قسمت تعیین ترادف شده متناظر با موقعیت ۸۸۳۰ تا ۹۲۶۱ از ترادف کامل جدایه مرجع TW-TN3 (رس‌شمار NC\_003224) بود.

این قسمت از ژنوم در تمام جدایه‌ها ۴۳۲ نوکلئوتید طول داشت. این نشان می‌دهد که در این قسمت از ژنوم حذف و یا اضافه شدن نوکلئوتیدها صورت نگرفته است. نتایج مقایسات دوجه‌دوی این قسمت از ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ترادف‌یابی شده در این تحقیق با استفاده از نرم

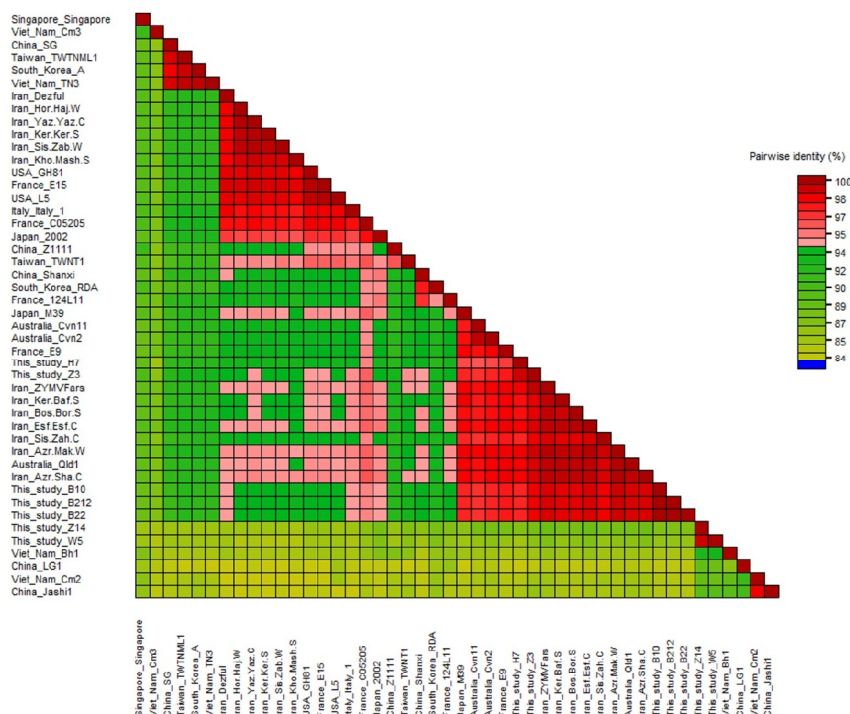
جدول ۲- مشخصات جدایه‌های تعیین ترادف شده ZYMV در این تحقیق

Table 2. Characteristic of Zucchini yellow mosaic virus isolates are sequenced in this research

Isolate	Collected area	Symptoms*	Host	Accession numbers
B10	Saqgez	S, LD	<i>Phaseolus vulgaris</i>	KU903004
B22	Kamyaran	S, M, LD	<i>P. vulgaris</i>	KU903005
B21	Baneh	S, LD	<i>P. vulgaris</i>	KU903002
W5	Kamyaran	CS, VC, LD	<i>C. lanatus</i>	KU903001
H7	Mariwan	S, LD	<i>C. lanatus</i>	KU903006
Z14	Kermanshah	CS, VC, DL	<i>Cucurbita pepo</i>	KU903003
Z3	Mariwan	VY, LD	<i>C. pepo</i>	KU903007

\* S, گوتلگی؛ LD، بدشکلی برگ؛ M، موزائیک روی برگ؛ CS، لکه‌های کلروتیک روی برگ؛ VC، رگبرگ روشنی؛ VY، رگبرگ زردی.

\* S, stunt; D, vein banding; LD, lead deformation; M, mosaic; CS, chlorotic spot; VC, vein clearing; VY, vein yellowing.



شکل ۱- پلات رنگی مقایسات دوجه‌دوی جدایه‌های ZYMV به منظور محاسبه درصد تشابه نوکلئوتیدی

Fig. 1. Two dimensional pair wise sequence identity color plot of the ZYMV isolates

و ویتنام در گروهی متفاوت از جدایه‌های ایرانی نشان می‌دهد که احتمالاً جدایه‌های ایرانی ZYMV دو خط سیر تکاملی متفاوت را طی نموده‌اند. حضور جدایه‌های گروه C در ایران که نسبت به سایر جدایه‌های از قبل شناخته شده دارای تیپ علائم متفاوت هستند بایستی در طراحی استراتژی مدیریت این ویروس مورد توجه قرار گیرند. همچنین لازم است که مطالعات تکمیلی در ارتباط با تفاوت در نوع ناقل، میزان کارایی ناقل‌ها در انتقال این جدایه‌ها، میزبان‌های طبیعی این جدایه‌ها و برآورد میزان خسارت این جدایه‌ها انجام گیرد.

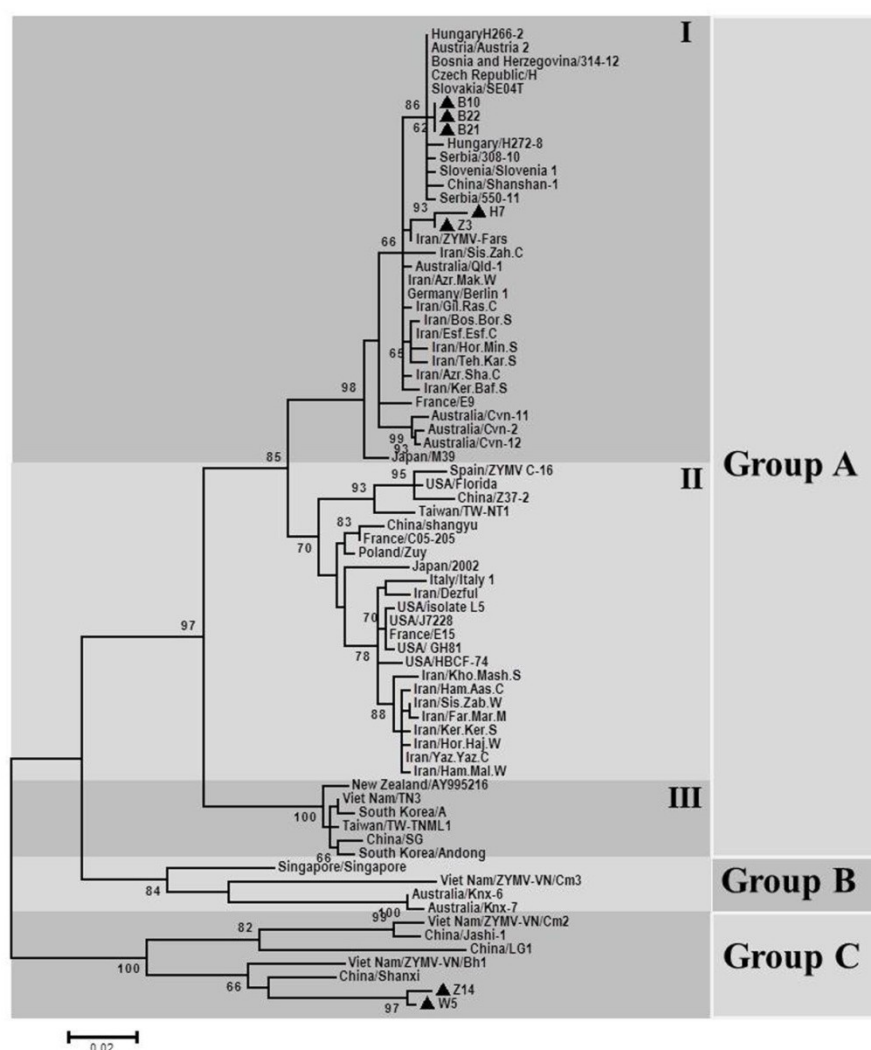
**نتایج حاصل از محاسبه پارامترهای ژنتیکی:** به منظور تخمین تنوع ژنتیکی ژن پروتئین پوششی ویروس موزایک زرد کدو چندین پارامتر ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار DnaSP v.5.10.05 مورد محاسبه قرار گرفت (جدول ۳). در بین ۴۳۲ نوکلئوتید از جدایه‌های این تحقیق، تنوع نوکلئوتیدی در مکان‌های مترادف و نامترادف به ترتیب ۰/۲۶۸۵ و ۰/۱۴۱ برآورد گردید در حالی که تنوع نوکلئوتیدی در تمامی مکان‌ها برابر با ۰/۰۶۹۹ بود ( $\pi = 0.0699$ ). در بین جمعیت‌های این ویروس، بیشترین میزان تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi = 0.0975$ ) و بیشترین تعداد جایگاه‌های افتراقی ( $S=135$ ) در جدایه‌های شرق و کمترین میزان تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi=0.0219$ ) با کمترین تعداد جایگاه‌های افتراقی ( $S=23$ ) برای جدایه‌های آمریکا به دست آمد. بالا بودن تنوع ژنتیکی در جدایه‌های شرق نسبت به بقیه‌ی زیرجمعیت‌ها نشان می‌دهد که این ویروس احتمالاً در شرق قدمت تکاملی طولانی‌تری داشته است. منشا آسیایی داشتن این ویروس با مطالعات تبارزایی محققین دیگر نیز استنتاج شده است (Simmons *et al.*, 2008). جدایه‌های ایران با میزان تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi=0.0534$ )، تنوع نوکلئوتیدی کمتر از زیرجمعیت شرق ( $\pi=0.0975$ ) و تنوع نوکلئوتیدی بیشتر نسبت به زیرجمعیت غرب ( $\pi=0.0357$ ) نشان دادند. پایین بودن تنوع ژنتیکی جدایه‌های اروپایی در مقایسه با جدایه‌های آسیایی در مطالعات پیشین نیز اشاره شده است (Zhao *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2005; Glasa *et al.*, 2007).

ترسیم درخت تبارزایی بر اساس ۴۳۲ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی با دو روش Neighbor joining و Maximum likelihood منجر به تفکیک جدایه‌های ZYMV در سه گروه تبارزایی با بوت‌استرپ بالا شد (A, B, C) که گروه A به سه زیرگروه I, II, III تفکیک شد. در دو زیرگروه I و II جدایه‌هایی از سراسر دنیا قرار گرفتند در حالی که جدایه‌های زیرگروه III، گروه B و گروه C محدود به زیرجمعیت شرق بودند (شکل ۲). در مطالعات قبلی نشان داده شد که بر اساس این ژن، جدایه‌های این ویروس از لحاظ تبارزایی در دو یا سه گروه عمده قرار می‌گیرند (Zhao *et al.*, 2003; Desbiez *et al.*, 2002; Coutts *et al.*, 2011; Simmons *et al.*, 2008) که این گروه‌بندی‌های تبارزایی در تطابق با خصوصیات بیولوژیکی شامل دامنه‌ی میزبانی و نوع علائم بوده است (Massumi *et al.*, 2011). اغلب جدایه‌های تعیین توالی شده در این تحقیق از غرب کشور شامل B22, B21, B10, H7, Z3 متعلق به زیر گروه A-I که بیشترین پراکنش جغرافیایی را در بر می‌گیرند، بودند. قرار گرفتن جدایه‌های ایرانی در گروه A در مطالعات پیشین هم مشاهده شده است. در مطالعه‌ای که Bananej *et al.* (2008) روی جدایه‌های ZYMV از استان‌های مختلف انجام دادند، تمامی جدایه‌ها در در گروه A قرار گرفتند. جدایه‌های B10, B21 و B22 بیشترین قرابت را با جدایه‌هایی از اروپا (بوسنی و هرزگوین، مجارستان، اتریش، اسلواکی، چک، صربستان، اسلونی) و دو جدایه از ترکیه و یک جدایه از چین داشتند ولی جدایه‌های Z3 و H7 با ایزوله‌ی فارس بیشترین نزدیکی را نشان دادند. در گروه A-II جدایه‌هایی از شرق، اروپا، آمریکا، هند، ترکیه و ایران قرار گرفتند در حالی که گروه A-III منحصراً به جدایه‌های شرق (کره جنوبی، نیوزیلند، تایوان، چین) بود. در گروه B جدایه‌هایی از شرق شامل سنگاپور، نیوزیلند و استرالیا و در گروه C دو جدایه تعیین توالی شده در این تحقیق Z14, W5 به همراه جدایه‌هایی از ویتنام و چین قرار گرفتند (شکل ۲). قرارگیری دو جدایه Z14 و W5 در کنار جدایه‌های چین

**جدول ۳-** نتایج تخمین پرامترهای جمعیتی بر اساس قسمتی از ژن پروتئین پوششی ZYMV از زیرجمعیت‌های مختلف. N: تعداد نمونه، H: تعداد چند شکلی، Hd: تنوع هاپلویدی، S: تعداد جایگاه‌های افتراقی،  $\eta$ : تعداد کل جهش‌ها،  $\pi$ : تنوع ژنتیکی، dN: تنوع جهش‌هایی که منجر به تغییر اسیدآمیننه نشده‌اند، dS: تنوع جهش‌هایی که منجر به تغییر اسیدآمیننه شده‌اند.

**Table 3.** Genetic characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* coat protein from different subpopulations. N, number of isolate; H, number of haplotypes/isolates; Hd, haplotype diversity; S, number of polymorphic (Segregating) sites;  $\eta$  (Eta), total number of mutations;  $\pi$ , nucleotide diversity; dS, synonymous nucleotide diversity; dN, non-synonymous nucleotide diversity.

Geographic Origin	N	H <sup>a</sup>	Hd <sup>b</sup>	S <sup>c</sup>	$\eta$ <sup>d</sup>	$\pi$	dS <sup>e</sup>	dN <sup>f</sup>	dN/dS
This study	7	5	0.857	65	66	0.0699	0.2685	0.0141	0.0525
Europe	17	13	0.926	59	63	0.0357	0.1882	0.0020	0.0106
East	29	29	1.000	135	181	0.0975	0.6128	0.0173	0.0282
Iran	20	18	0.984	91	95	0.0534	0.3134	0.0079	0.0252
USA	5	5	1.000	23	24	0.0219	0.0838	0.0071	0.0853
Total	72	64	0.0994	154	202	0.0723	0.2899	0.0112	0.0386



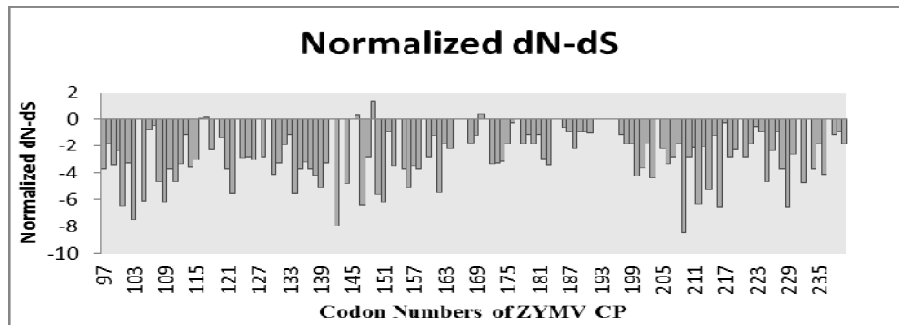
**شکل ۲-** درخت تبارزایی ترسیم شده به روش Maximum Likelihood از هم‌دید سازی ۴۳۲ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی ۸۰ جدایه ZYMV. مقادیر بوت استرپ بیشتر از ۶۰٪ روی گره‌ها نشان داده شده است. جدایه‌های تعیین ترادف شده در این تحقیق با علامت مثلث سیاه (▲) نشان داده شده است. نامگذاری گروه‌ها بر اساس مطالعات پیشین انجام گرفته است. لیست جدایه‌ها در جدول یک آورده شده است.

**Fig. 2.** Phylogenetic relationships of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates reconstructed based on CP gene sequence data using the Maximum Likelihood method. Bootstrap values over 60 % are given at the nodes. Identities of isolates are given in Table 1.



که جدایه‌های زیرجمعیت آمریکا که کمترین تنوع را داشتند تنها در زیرگروه B قرار گرفتند. نسبت جانمایی‌های غیر مترادف به جانمایی‌های مترادف محاسبه شده ( $\omega = dN/dS$ ) در تمامی زیرجمعیت‌ها کمتر از یک بود.

نتایج حاصل از محاسبه پارامترهای تنوع ژنتیکی در راستای نتایج به دست آمده از درخت تبارزایی بود. جدایه‌های زیرجمعیت شرق که بیشترین تنوع نوکلئوتیدی را نشان دادند در هر سه گروه تبارزایی این ویروس پراکنده بودند در حالی



شکل ۳- شدت فشار انتخاب بر ژن پروتئین پوششی (dN-dS) ویروس موزایک زرد کدو در طول کدون‌های ژن پروتئین پوششی

Fig. 3. The normalized dN-dS values along the CP amino acid sequence

دلیل کم بودن تعداد و همچنین اثر ناچیز اسیدآمین‌هایی که تحت فشار انتخاب مثبت هستند، فشار انتخاب منفی بر آن‌ها غلبه داشته است.

آنالیزهای نوترکیبی با همه روش‌های نرم‌افزار RDP4 v.4.63 انجام شده روی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ZYMV، بیانگر عدم وجود نوترکیبی بود. هرچند نوترکیبی به عنوان عامل مهم در ایجاد واریانت‌ها و سویه‌های ویروس‌ها به ویژه ویروس‌های دارای ژنوم آرانی محسوب می‌شود (Roossinck, 1997).

تنوع ژنتیکی در ویروس‌ها می‌تواند جدایه جدید که منجر به شکستن مقاومت شود را ایجاد کند لذا این نوع تحقیقات یک پیش‌نیاز برای برنامه‌ریزی و اجرای اقدامات کنترل مناسب مخصوصاً از طریق مهندسی ژنتیک است (Massumi et al., 2011). تنوع گونه‌های ویروسی به ویژه در پروتئین پوششی یک مشکل بزرگ برای توسعه روش‌های مبارزه با ویروس است، زیرا تحت تاثیر تنوع خواص آنتی‌ژنیک پوشش پروتئینی قرار می‌گیرد (Safaeizadeh, 2008).

این مطالعه می‌تواند اطلاعات مفیدی از ویروس موزایک زرد کدو در ایران و جهان در اختیار ما قرار دهد.

با توجه به فرضیه  $dS = dN$ ، فشار انتخاب در گروه‌ها حالت خنثی نداشته است و این نشان دهنده نقش موثر انتخاب منفی<sup>۱</sup> در تنوع و تکامل این ویروس می‌باشد. نتایج نشان داد که بیشترین فشار انتخاب ( $\omega = 0.0853$ ) در زیرجمعیت آمریکا و کمترین فشار انتخاب ( $\omega = 0.0106$ ) در زیرجمعیت اروپا وجود داشته است (جدول ۳).

فشار انتخاب روی همه کدون‌های مرتبط با این قسمت از ژن پروتئین پوششی محاسبه شد و نتایج حاصل نشان داد که شدت فشار انتخاب در طول این ژن یکسان نبوده است. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، تمامی کدون‌ها غیر از شش کدون ۱۱۷، ۱۱۸، ۱۴۷، ۱۵۰، ۱۷۱ و ۲۳۸ مطابق با توالی اسیدآمین‌های پروتئین پوششی ویروس تحت فشار انتخاب منفی بوده است. در این بین، کدون‌های ۱۰۲، ۱۰۶، ۱۱۰، ۱۴۸، ۱۵۲، ۱۶۳، ۲۱۰، ۲۱۳ تحت فشار انتخاب منفی شدیدتری نسبت به سایر کدون‌ها قرار داشته‌اند که به نظر می‌رسد اسیدآمین‌های حاصل از این کدون‌ها نقش مهمی در ایفای نقش یا نقش‌های پروتئین پوششی از جمله آلودگی و انتقال ویروس دارند که باید مورد مطالعه بیشتر قرار گیرند. به

۱- Negative selection

### سپاسگزاری

بدینوسیله از خانم مهندس کژال محمدی به خاطر جمع‌آوری نمونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق قدردانی می‌شود.

لذا با دسترسی به این اطلاعات می‌توان، روش‌های موثری از کاهش یا کنترل ویروس را در ایران و جهان اتخاذ کرد، همچنین توصیه می‌شود در آینده مطالعات بیشتری روی تنوع ژنتیکی، فشار تکاملی و تنوع بیولوژیکی ویروس در مناطق دیگر جهان صورت گیرد.

### References

- AL-ANI, R. A., M. A. ADHAB, A. A. ALI and S. N. DIWAN, 2011. *Zucchini yellow mosaic virus*: Characterization and management in Iraq, International Journal of Current Research, 11: 220-224.
- AZARFAR, A., K. IZADPANA, A. AFSHARIFAR and M. MASSUMI, 2012. Purification and the complete genome sequence of *Zucchini yellow mosaic virus*-Fars isolate, Iranian Journal of Plant Pathology, 48: 403-409. (in Persian with English summary).
- BANANEJ, K., T. KESHAVARZ, A. VAHDAT, G. HOSSEINI SALEKDEH and M. GLASA, 2008. Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran, Journal of Phytopathology, 156: 654-659.
- BIEBRICHER, C. and M. EIGEN, 2006. What is a quasispecies? In Quasispecies: Concept and Implications for Virology, 1-31 pp.
- COUTTS, B. A., M. A. KEHOE, C. G. WEBSTER, S. J. WYLIE and R. A. C. JONES, 2011. *Zucchini yellow mosaic virus*: biological properties, detection procedures and comparison of coat protein gene sequences, Archives of Virology, 156: 2119-2131.
- DESBIEZ, C., C. WIPF-SCHEIBEL, F. GRANIER, C. ROBAGLIA, T. DELAUNAY and H. LECOQ, 1996. Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in the island of Martinique, Plant Disease, 80: 203-207.
- DESBIEZ, C., C. WIPF-SCHEIBEL and H. LECOQ, 2002. Biological and serological variability evolution and molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, Potyvirus) with special reference to Caribbean islands, Virus Research, 85: 5-16.
- FOISSAC, X., L. SAVALLE-DUMAS, P. GENTIT, M. J. DULUCQ and T. CANDRESSE, 2000. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Chapillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR), Acta Horticulture, 357: 52-59.
- GHORBANI, S. 1988. Isolation of *Zucchini yellow mosaic virus* in the Tehran Province, Iranian Journal of Plant Pathology, 24: 13-15. (In Farsi With English Summary).
- GLASA, M. and S. PITTNEROVÁ, 2006. Complete genome sequence of a Slovak isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) provides further evidence of a close molecular relationship among central European ZYMV isolates, Journal of Phytopathology, 154: 436-440.
- GLASA, M., J. SVOBODA and S. NOVÁKOVÁ, 2007. Analysis of the molecular and biological variability of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates from Slovakia and Czech Republic, Virus Genes, 35: 415-421.
- HASIÓW-JAROSZEWSKA, B., N. RYMELSKA, N. BORODYNKO and H. POSPIESZNY, 2013. Biological and molecular characterization of the polish *Zucchini yellow mosaic virus* isolates, Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus, 12: 75-85.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-98.
- KWON, S. W., M. S. KIM, H. S. CHOI and K. H. KIM, 2005. Biological characteristics and nucleotide sequences of three Korean isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*, Journal of General Plant Pathology, 71:

- 80-85.
- LECOQ, H., C. WIPF-SCHEIBEL, C. CHANDEYSSON, A. LE VAN, F. FABRE and C. DESBIEZ, 2009. Molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* in France: an historical overview, *Virus Research*, 141: 190-200.
- LIBRADO, P. and J. ROZAS, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- LIN, S. S., R. F. HOU and S. D. YEH, 2001. Complete genome sequence and genetic organization of a Taiwan isolate of *Zucchini yellow mosaic virus*, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42: 243-250.
- LISA, V., G. BOCCARDO, G. D'AGOSTINO, G. DELLAVALLE and M. D'AQUILIO, 1981. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic virus, *Phytopathology*, 71: 667-672.
- MARTIN, D. P., B. MURRELL, M. GOLDEN, A. KHOOSAL and B. MUHIRE, 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes, *Virus Evolution*, 1 (1), vev003, doi: 10.1093/ve/vev003.
- MASSUMI, H., M. SHAABANIAN, J. HEYDARNEJAD, A. H. HOSSEINI POUR and H. RAHIMIAN, 2011. Host range and phylogenetic analysis of Iranian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*, *Journal of Plant Pathology*, 93: 187-193.
- MIRHOSSEINI, H., H. RAHIMIAN, V. BABAEIZAD and S. NORI, 2014. Phylogenetic analysis of Cylindrical Inclusion gene in *Zucchini yellow mosaic virus* isolated from Mazandaran Province. First National Congress on Biology and Natural Sciences in Iran, Tehran.
- MOHAMMADI, K. 2015. Detection of some cucurbit infecting viruses in Kurdistan province by RT-PCR method. M.SC Thesis, University of Kurdistan, p. 112. (In Persian with English summary).
- MUHIRE, B. M., A. VARSANI, D. P. MARTIN, 2014. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pair wise Sequence Alignment and Identity Calculation, *PLOS one*, 9: e108277.
- NOVÁKOVÁ, S., J. SVOBODA and M. GLASA, 2014. Analysis of the complete sequences of two biologically distinct *Zucchini yellow mosaic virus* isolates further evidences the involvement of a single amino acid in the virus pathogenicity, *Acta Virologica*, 58: 364-367.
- ROSSINCK, M. J. 1997. Mechanisms of plant virus evolution, *Annual Review of Phytopathology*, 35:191-209
- SAFAEIZADEH, M. 2008. Comparative biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Iran, *Asian Journal Plant Pathology*, 2: 30-39.
- SHAABANIAN, M., H. MASSUMI, A. HOSSEINI POUR, J. HEYDARNEJAD and N. PORAMINI, 2005. Detection and distribution of *Zucchini yellow mosaic virus* based on Immunocapture RT-PCR in some parts of Iran, The Fourth National Biotechnology Conference Islamic Republic of Iran, Kerman. P. 2098.
- SHIMOMOTO, Y. and S. TAKEUCHI, 2006. Simultaneous detection of three Potyvirus species from Cucurbitaceae crops by multiplex RT-PCR, *Japanese Journal of Phytopathology*. 72: 146-149.
- SIMMONS, H. E., E. C. HOLMES and A. G. STEPHENSON, 2008. Rapid evolutionary dynamics of *zucchini yellow mosaic virus*, *Journal of General Virology*, 89: 1081-1085.
- SOKHANDAN-BASHIR, N. and U. MELCHER, 2012. Population genetic analysis of grapevine fan leaf virus, *Archives of virology*, 157: 1919-1929.
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI, and S. KUMAR, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- TOBIAS, I., B. SZABO, K. SALANKI, L. SARI, H. KUHLMANN, L. PALKOVICS and M. PITRAT, 2008. Seedborne transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in Styrian Hulled group of *Cucurbita pepo*. In: Proceedings of the IX<sup>th</sup> EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae. INRA, Avignon (France), May 21-24<sup>th</sup>, p. 189-197.
- ZHAO, M. F., J. CHEN, H. Y. ZHENG, M. J. ADAMS and J. P. CHEN, 2003. Molecular analysis of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates from Hangzhou, China, *Journal of Phytopathology*, 151: 307-311.

