

بررسی بیوانفورماتیکی پروتئین همولوگ شوک حرارتی جدایه‌های ایرانی ویروس زردی کلروتیک کدوئیان (*Cucurbit chlorotic yellows* *virus*) در افزایش تفاوت ژنتیکی

Bioinformatics study on the role of homolog heat shock protein 70 gene of Iranian isolates of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in increasing genetic variation

زهره صادقی^۱، سعید نصرالله نژاد^{۱*}، میلاد لگزیان^۲، سید اسماعیل رضوی^۱، مجید جعفری^۳

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، استادیار، گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان زاهدان

۳- استادیار، گروه گیاهپزشکی، مجتمع عالی سراوان

Sadeghi Z¹, Nasrollanejad S^{*1}, Lagzian M², Razavi SE¹, Jafari M³

1. PhD Student, Associate Professor, Assistant Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Higher Educational Complex of Saravan, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Snasrollanejad1967@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۰۴ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۲۷)

چکیده

پروتئین شوک حرارتی در کلستروویروس‌ها نقش‌های متعددی به‌ویژه حرکت سلول به سلول را برای ایجاد آلودگی سیستمیک بر عهده دارد. در پژوهش حاضر، تفاوت ژنتیکی ژن همولوگ پروتئین شوک حرارتی (*HSP70h*) جدایه‌های ایرانی ویروس زردی کلروتیک کدوئیان و همچنین فشار انتخاب وارد شده بر آن‌ها بررسی شد. به این منظور تعداد ۱۹۵ نمونه با علایم زردی، کوتولگی و بدشکلی برگ‌ها از مزارع کدوئیان استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، از منطقه ژنتیکی پروتئین همولوگ شوک حرارتی ویروس CCYV قطعه‌ای به طول ۶۲ جفت‌باز برای ۱۵ نمونه توسط روش RT-PCR تکثیر شد و ۷ جدایه مورد بررسی فیلوژنتیکی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشانگر آلودگی ۷ درصد نمونه‌ها به ویروس زردی کلروتیک کدوئیان در مناطق مورد بررسی بود. آنالیز فیلوژنی توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای جدایه‌های CCYV را به دو گروه ایرانی و شرق آسیا تقسیم نمود و جدایه‌های سیستان و بلوچستان در دو شاخه مجزا قرار گرفتند. هم‌ردیفی توالی اسید آمینه فرضی پروتئین همولوگ شوک حرارتی و مطالعات فشار انتخاب بر روی ۷ جدایه موجود در تحقیق با ۳ جدایه ایرانی و جدایه‌های خارجی این ویروس نشان داد که ژن *HSP70h* در جدایه‌های ایرانی و سایر جدایه‌های این ویروس تحت فشار انتخاب مثبت در کدون ۸۲ قرار دارند که منجر به تغییر یک اسید نوکلئیک (CTC به TTC) به ترتیب برای جدایه‌های مرکزی و جدایه‌های زابل، هیرمند و نیمروز در موقعیت ۲۴۴ شده و اسید آمینه لوسین به فنیل آلانین در پروتئین همولوگ شوک حرارتی تغییر نموده است. نتایج نشان‌دهنده وجود جدایه‌های متنوع ویروس CCYV در کشور بوده و تفاوت در توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای می‌تواند حاکی از تفاوت در منشا میزبانی باشد بنابراین فشار انتخاب در تنوع ژنتیکی جدایه‌ها دخالت داشته است.

واژه‌های کلیدی

اسید آمینه فنیل آلانین
پروتئین همولوگ شوک حرارتی (*HSP70h*)
فیلوژنی
فشار انتخاب مثبت
CCYV

مقدمه

استان سیستان و بلوچستان پس از استان کرمان به عنوان دومین استان پهناور کشور در جنوب شرقی ایران واقع است. این استان با حدود ۱۸۰,۷۲۶ کیلومتر مربع وسعت کمابیش اندازه کشور سوریه بزرگی دارد و بیش از ۱۱ درصد وسعت ایران را دربرمیگیرد و با سطح زیرکشت ۲۳۸۹۴ هکتار و میزان تولید ۵۳۲۹۸۱ تن رتبه پنجم را از نظر تولید محصولات جالیزی و مقام اول تولید هندوانه خارج فصل را در کشور را به خود اختصاص داده است (Ahmadi et al. 2017).

ویروس زردی کلروتیک کدوئیان (*Cucurbit chlorotic yellows virus*, CCYV) عضو جنس *Crinivirus* خانواده *Closteroviridae* می باشد (Okuda et al. 2010). در ابتدا در خربزه در ژاپن و همراه با بیماری زردی کدوئیان گزارش شد (Gyoutoku et al. 2009). ژنوم آن دو بخشی شامل ۸۶۰۷ و ۸۰۴۱ عدد نوکلئوتید به ترتیب برای RNA1 و RNA2 می باشد. RNA1 پروتئین های دخیل در تکثیر را رمزگذاری می کند، در حالی که RNA2 ژن های دخیل در حرکت و انتقال توسط سفید بالک *Bemisia tabaci* را کدگذاری می کند (Orfanidou et al. 2017). این ویروس به روش نیمه پایا توسط بیوتیپ های Q و B سفید بالک *B. tabaci* منتقل می شود (Li et al. 2016). ویروس CCYV در کشورهای خاورمیانه (لبنان) و آسیایی (چین، ژاپن و تایوان) و همچنین در منطقه مدیترانه گزارش شده است (Gu et al. 2015; Bananej et al. 2013; 2011; Hamed et al. 2010; Huang et al. 2010; Okuda et al. 2011). علائم بر روی کدوئیان شامل: شکنندگی، ضخامت و زردی میانی برگ ها که معمولا بر روی برگ های پایین مشخص تر است اما به تدریج در شاخ و برگ های جدید گسترش می یابد و علائم آن قابل تشخیص از سایر کرابنی ویروس ها مانند CYSDV و BPYV و یا پولروویروس ها (CABYV و PABYV) نیست. در ایران این ویروس اولین بار در سال ۱۳۹۲ از کدوئیان مناطق مرکزی ایران گزارش شد (Bananej et al. 2013). این ویروس نه تنها قادر به آلوده کردن اعضاء خانواده کدوئیان است بلکه گونه های حداقل چهار خانواده *Asteraceae*، *Chenopodiaceae*، *Solanaceae* و *Convolvulaceae* میزبان های آزمایشی این

مواد و روش ها

ویروس هستند (Okuda et al. 2010). ویروس CCYV در اکثر مناطق مرکزی (تهران و سمنان) و جنوبی کشور شناسایی شده (Bananej et al. 2013; Keshavarz et al. 2013) اما در منطقه جنوب شرق تاکنون بررسی جامعی صورت نگرفته است.

طی سال های ۹۵-۱۳۹۶، از ۵۳ مزرعه جالیز مربوط به محصولات مختلف کدوئیان شامل: هندوانه، خربزه، طالبی، کدو حلوائی و کدو مسمایی در دوازده شهرستان استان سیستان و بلوچستان با شرایط آب و هوایی متفاوت و وسعت زیاد مانند: هامون، نیمروز، زابل، زهک، هیرمند، زاهدان، سراوان، ایرانشهر، کنارک، چابهار، سرباز و نیکشهر تعداد ۱۹۵ نمونه برگ با علائم شبیه به آلودگی های ویروسی شامل: زردی، شکنندگی، تردی، زردی رگبرگ و کوتولگی بوته ها، جمع آوری و برای آزمایش های مولکولی به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه های برگ با استفاده از کیت NucleoSpin[®] RNA (شرکت Macherey-Nagel، آلمان) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. برای سنتز cDNA از آغازگر عمومی شش نوکلئوتیدی تصادفی و مستر میکس cDNA (SuPrimeScript RT Premix) (شرکت GeNet Bio، کره) در واکنشی با حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر استفاده شد. واکنش سنتز cDNA برای هر نمونه، ۱ میکرولیتر از آغازگر (Random Hexamer) (10 pmol) با ۲ میکرولیتر از آن ای کل (200 ng/μl) و ۱۵ میکرولیتر از مستر میکس به همراه ۱۲ میکرولیتر آب دیونیزه تهیه شد. برنامه سنتز cDNA شامل یک چرخه دمای ۲۵°C به مدت ۱۰ دقیقه، یک چرخه ۵۰°C به مدت یک ساعت برای فعالیت آنزیم نسخه بردار معکوس و یک چرخه در درجه حرارت ۷۰°C به مدت ده دقیقه برای غیر فعال کردن این آنزیم اجرا شد. در مرحله بعد تکثیر PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (شرکت سیناکلون، ایران)، یک ماکرولیتر از هر کدام آغازگرهای CCYV-F پیش رونده و پس رونده CCYV-R با غلظت (۱۰ pmol) منطبق بر بخشی از ژن پروتئین همولوگ شوک حرارتی به ترتیب با توالی های 5'-TGCGTATGTCAATGGTGTATG-3' و

(Zeng et al. 2011) - 5'- ATCCTTCGCAGTGAAAAACC - 3'، آبمقطر دیونیزه ۸/۵ میکرولیتر و دن ان ای مکمل ۲ میکرولیتر انجام شد. واکنش PCR با چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸°C به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و به تعداد ۳۵ چرخه در دستگاه ترموسایکلر (شرکت Biorad، آمریکا) انجام شد. قطعه تکثیر شده در الکتروفورز ژل آگارز یک درصد رویت و از اندازه باند ۴۶۲ جفت‌باز اطمینان حاصل شد. محصول PCR مستقیماً همراه با آغازگرها برای تعیین توالی به شرکت بایونیر (کره جنوبی) ارسال شد. داده‌های نوکلئوتیدی حاصل، در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLASTn با ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه و با استفاده از نرم‌افزار Clustal X (Thompson et al. 2002) هم‌ردیف‌سازی چندگانه

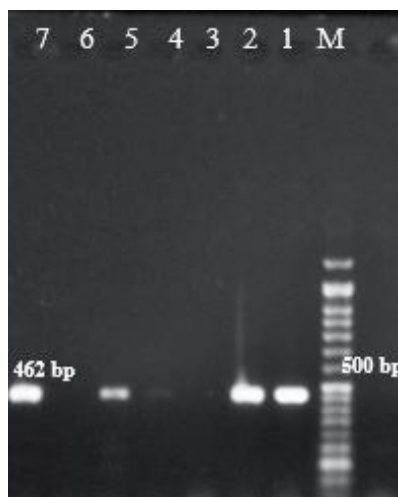
جدایه‌های مختلف ویروس CCYV صورت گرفت (جدول ۱). درخت فیلوژنتیک این جدایه‌ها با استفاده از روش Maximum likelihood و مدل Tamura 3-parameter در نرم‌افزار (Kumar et al. 2016) Mega 7.0 و براساس ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap)، ترسیم شد. از نرم‌افزار Dna SP version 6.12.03 برای محاسبه پارامترهای ژنتیک جمعیت استفاده شد. همچنین فشارهای انتخابی در سطح کدون بخشی از ژن HSP70h ویروس CCYV با استفاده از نرم‌افزار Hyphy version 2.2.4 و وبگاه Datamonkey به آدرس www.datamonkey.org با روش‌های (Fixed Effects (Mixed Effects Model of Evolution)، FEL (Likelihood SLAC (Single-Likelihood Ancestor Counting) و MEME تخمین زده شد.

جدول ۱- شماره دسترسی، منشا (کشور) و میزبان‌های جدایه‌های مختلف CCYV موجود در بانک ژن NCBI و مورد استفاده برای تجزیه‌های تبارزایی و فشار انتخاب

شماره دسترسی در NCBI	منشا	میزبان	شماره دسترسی در NCBI	منشا	میزبان
KY400633	China	<i>Cucumis melo</i>	MH939359	Zabol (In this study)	<i>Cucumis melo var. canaloupensis</i>
JQ904629	China: Beijing	<i>Cucumis</i>	MH939358	Hirmand (In this study)	<i>Cucumis melo var. canaloupensis</i>
KC559449.1	Iran: Semnan	<i>Cucumis sativus</i>	MH939357	Hamon (In this study)	<i>Cucumis melo var. canaloupensis</i>
KC559451.1	Iran: Tehran	<i>Cucumis sativus</i>	MH939356	Nimruz (In this study)	Watermelon
KC559450.1	Iran: Semnan	<i>Cucumis melo</i>	MH939355	Hirmand (In this study)	<i>Cucumis melo</i>
HM581659.1	China: Ningbo	<i>Cucumis sativus</i>	MH939360	Zahak (In this study)	<i>Cucumis melo var. canaloupensis</i>
HQ148667.1	China	<i>Cucumis melo</i>	MH660532	Konark (In this study)	<i>Cucumis melo var. cantalupo</i>
HM120250.1	Taiwan: Yunlin	<i>Cucumis melo</i>	KU507602	China: Henan	-
NC_018174	Japan: Kumamoto	<i>Cucumis melo</i>	JF502222.1	Taiwan: Yilan	<i>Cucumis melo</i>
AB523789	Japan: Kumamoto	<i>Cucumis sativus</i>	JN126046.1	Taiwan: Yilan	muskmelon
GU721110.1	China: Ningbo	<i>Cucumis sativus</i>	JX014263.1	Lebanon	<i>Cucumis sativus</i>
KY400632.1	China	melon			

نتایج

جدایه‌های از چین، ژاپن، تایلند و جدایه‌ی ایران (کنارک) می‌باشد، در حالی که گروه دوم تنها شامل جدایه‌هایی از مناطق جنوب شرق و مرکزی ایران بود. جدایه‌های ایران به دو زیرگروه مرکزی (جدایه‌های که قبلاً گزارش شده بودند) و جنوب شرق (جدایه‌های تعیین توالی شده در این تحقیق) تقسیم شدند.



شکل ۱- نتایج آزمون پی سی آر در ژل آگارز ۱ درصد مربوط به بخشی از ناحیه ژن رمزکننده پروتئین همولوگ شوک حرارتی ویروس زردی کلروتیک کدویان (CCYV) (۶۲۲ bp)، چاهک ۱، ۲، ۵ و ۷ باند حاصل از آغازگرهای (CCYV R/ CCYVF)، چاهک M مربوط به نشانگر اندازه Gene ruler DNA ladder 50 bp (شرکت فرمتاس، لیتوانی).

نتایج بررسی‌های مولکولی روی نمونه‌های گیاهی (هندوانه، خربزه، طالبی، کدومسمایی و کدو حلوائی) مشکوک به بیماری ویروسی نشان داد؛ ۱۱۶ نمونه از ۱۹۵ نمونه آلوده به ویروس‌های شایع کدوئیان از قبیل: ویروس شته زاد کدوئیان (CABYV)، ویروس اختلال کوتولگی زردی کدوئیان (CYSDV)، ویروس زردی رگبرگ خیار (CVYV) و ویروس کوتولگی سبزرده هندوانه (WmCSV) بودند و قطعه‌ای به اندازه‌ی ۶۲۲ جفت‌باز از ناحیه HSP70h در ۱۵ نمونه (جدول ۲) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی CCYV تکثیر شد (شکل ۱). پس از تعیین توالی و نتایج BLASTn، مشخص شد؛ قطعات تکثیر شده در آر تی- پی سی آر مربوط به بخشی از ژن HSP70h ویروس CCYV می‌باشند و جدایه MH939357 جداسازی شده از گیاه طالبی بیشترین شباهت در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی (۱۰۰ درصد) با جدایه‌های (MH939358 و MH939360) که میزبان آن‌ها طالبی می‌باشد، داشت و با جدایه‌های دیگر سیستان و بلوچستان (MH939355، MH939359 و MH939356) دارای ۹۹/۷۶ درصد تشابه نوکلئوتیدی دارد و دو جدایه‌ی هیرمند (MH939355) و نیمروز (MH939356) نیز دارای تشابه نوکلئوتیدی ۱۰۰ درصدی می‌باشند. براساس تجزیه کلاستر توالی‌ها به روش Maximum likelihood، کلیه جدایه‌های مورد مطالعه از مناطق مختلف دنیا در ۲ گروه فیلوژنتیکی قرار گرفتند (شکل ۴). گروه اول شامل

جدول ۲- وضعیت آلودگی ویروس CCYV در مزارع استان سیستان و بلوچستان

محل نمونه‌برداری	میزبان	تعداد نمونه‌های آلوده به ویروس CCYV	تعداد نمونه‌های آلوده به ویروس‌های کدوئیان	تعداد نمونه‌های مورد آزمایش
زاهدان	طالبی	-	۳	۶
سراوان	هندوانه و طالبی	-	۶	۷
ایران‌شهر	هندوانه	-	۶	۱۲
نیک‌شهر	کدومسمایی، طالبی و هندوانه	-	۱۴	۲۱
کنارک	طالبی و هندوانه	۱	۹	۲۰
چابهار	کدو حلوائی و هندوانه	-	۱۲	۱۸
سریاز	کدو مسمایی، طالبی و هندوانه	-	۶	۱۵
هامون	خربزه و هندوانه	۲	۱۲	۱۵
زابل	خربزه و هندوانه	۲	۵	۱۵
هیرمند	خربزه و هندوانه	۶	۸	۲۰
زهک	خربزه و هندوانه	۲	۲۵	۳۰
نیمروز	خربزه و هندوانه	۲	۱۰	۱۶

ایران به آسیای شرقی کم و تفاوت ژنتیکی زیاد می‌باشد. تاکنون توالی از استان سیستان و بلوچستان از ویروس زردی کلروتیک کدوئیان در بانک ژن ثبت نشده بود توالی‌های مزبور با رس شماره‌های MH939357, MH939355, MH939358, MH939360, MH939356, MH939359 و MH660532 در بانک ژن ثبت شده است.

Species/Abbrev	50	60	70	80	82	90	100
1. MH660532.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
2. MH939355.1	EMGR	CR	NQF	NKRNKTI	VRGGTGW	CGIDWN	SRFF
3. MH939359.1	EMGR	CR	NQF	NKRNKTI	VRGGTGW	CGIDWN	SRFF
4. MH939356.1	EMGR	CR	NQF	NKRNKTI	VRGGTGW	CGIDWN	SRFF
5. MH939357.1	EMGR	CR	NQF	NKRNKTI	VRGGTGW	CGIDWN	SRFF
6. MH939360.1	EMGR	CR	NQF	NKRNKTI	VRGGTGW	CGIDWN	SRFF
7. MH939358.1	EMGR	CR	NQF	NKRNKTI	VRGGTGW	CGIDWN	SRFF
8. NC_018174	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
9. GU721111	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
10. J014263.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
11. KJ07623.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
12. GU721109.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
13. J07055.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
14. KJ400633	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
15. JQ904629	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
16. KC559449.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
17. KC559451.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
18. KC559450.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
19. HM581659.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
20. H414867.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
21. MH120250.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
22. NC_018174	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
23. AB523789.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
24. GU721110.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
25. JQ904629.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
26. J014263.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
27. JF502222	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS
28. KU507002.1	EMGWR	NQF	NKRNKTI	ICGGVRW	CGIDWN	SWFL	MYVHS

شکل ۲- هم‌ردیفی توالی‌های اسید آمینه بخشی از ژن پروتئین همولوگ شوک حرارتی (HSP70h) جدایه‌های CCYV مورد بررسی در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار Mega 7.0، اسید آمینه در موقعیت ۸۲ جدایه‌های مرکزی ایران و سه جدایه‌ی سیستان و بلوچستان به اسید آمینه فنیل آلانین تغییر یافته است.

Species/Abbrev	Group Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. MH660532.1		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	CTCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
2. MH939355.1		AATTGACTGGAATTGATCGAGGTTT	TCGTGCAGTACACAGTTAAACAGTTGATTTTATTGT																				
3. MH939359.1		AATTGACTGGAATTGATCGAGGTTT	TCGTGCAGTACACAGTTAAACAGTTGATTTTATTGT																				
4. MH939356.1		AATTGACTGGAATTGATCGAGGTTT	TCGTGCAGTACACAGTTAAACAGTTGATTTTATTGT																				
5. MH939357.1		AATTGACTGGAATTGATCGAGGTTT	TCGTGCAGTACACAGTTAAACAGTTGATTTTATTGT																				
6. MH939360.1		AATTGACTGGAATTGATCGAGGTTT	TCGTGCAGTACACAGTTAAACAGTTGATTTTATTGT																				
7. MH939358.1		AATTGACTGGAATTGATCGAGGTTT	TCGTGCAGTACACAGTTAAACAGTTGATTTTATTGT																				
8. NC_018174		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
9. JQ904629		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
10. KC559449.1		AATTGACTGGAATTGATCGAGGTTT	TCGTGCAGTACACAGTTAAACAGTTGATTTTATTGT																				
11. KC559451.1		AATTGACTGGAATTGATCGAGGTTT	TCGTGCAGTACACAGTTAAACAGTTGATTTTATTGT																				
12. KC559450.1		AATTGACTGGAATTGATCGAGGTTT	TCGTGCAGTACACAGTTAAACAGTTGATTTTATTGT																				
13. HM581659.1		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
14. H414867.1		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
15. MH120250.1		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
16. NC_018174		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
17. AB523789.1		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
18. GU721110.1		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
19. JQ904629.1		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
20. JN12046.1		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
21. JF502222		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				
22. KU507002.1		AATTGACTGGAATTGATCGTGGTTT	TCATGTACGTACACAGTTAAACAGCTGATTTTATTGT																				

شکل ۳- هم‌ردیفی توالی‌های اسید نوکلئوتید بخشی از ژن همولوگ پروتئین شوک حرارتی (HSP70h) جدایه‌های CCYV مورد بررسی در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار Mega 7.0، اسید نوکلئیک در موقعیت ۲۴۴ جدایه‌های مرکزی ایران و سه جدایه‌ی سیستان و بلوچستان به باز تیامین (T) تغییر یافته است.

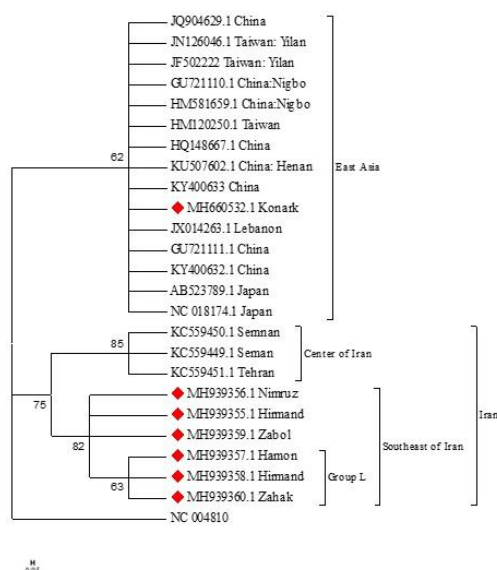
نتایج حاصل از تجزیه فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه‌های سیستان و بلوچستان در دو شاخه قرار گرفتند، جدایه‌های (MH939355)، MH939359 و MH939356 در یک شاخه مجزا و از روی میزبان‌های مختلف جمع‌آوری شدند و جدایه‌های (MH939357)، MH93958، و MH939360 در گروه L قرار گرفتند و فقط از روی طالبی جداسازی شدند.

نتایج آنالیزهای فشار انتخاب براساس بخشی از ژن پروتئین همولوگ شوک حرارتی نشان داد؛ از ۲۱ (۵۳) جدایه در روش FEL کدون ۸۲ به‌عنوان مثبت انتخاب شد، در حالی‌که در روش MEME یک کدون اضافی (کدون ۳) شناسایی شد که در تنوع نقش دارد. در نهایت، ۲ کدون شناسایی شد که همه در نیمه ابتدایی ۵' ژن Hsp70h قرار داشتند. موقعیت‌های منفی توسط این روش‌ها شناسایی نشد. (جدول ۳). مشخص شد که کدون ۸۲ در جدایه‌های مرکزی و سه جدایه‌ی از هیرمند، زابل و نیمروز اسید آمینه فنیل آلانین (F) را کد می‌کنند و در موقعیت ۲۴۴ اسید نوکلئوتید به باز تیامین تغییر یافته در حالیکه این کدون در جدایه‌های دیگر از این استان و آسیای شرقی اسیدآمینه لوسین (L) را کد می‌کند احتمالاً این موضوع سبب قرار گرفتن جدایه‌های ایرانی در زیر گروه‌های جدا و تقسیم شدن جدایه‌های شمال سیستان و بلوچستان به دو شاخه مجزا می‌باشد (شکل ۲ و ۳).

جدول ۳- نتایج آنالیزهای انتخاب کدون با استفاده از روش‌های انتخاب (MEME و FEL، SLAC) بر روی ژن شوک حرارتی ویروس CCYV

موقعیت موتیف	مثبت	خنثی	منفی	روش
اسید آمینه‌ای	(Positive)	(Neutral)	(Negative)	method
(Location)				
۸۲	۱	-	۰	FEL
۳ و ۸۲	۲	-	-	MEME
-	۰	۰	۰	SLAC

میزان Fixation index (F_{ST}) شاخص جریان ژنی (Gene flow) برابر با ۰/۹۴ و نشان‌دهنده این است که جریان ژنی بین جمعیت



شکل ۴- نمودار درختی رسم شده به روش Maximum Likelihood بر اساس توالی نوکلئوتیدی قطعه ۴۶۲ جفت‌بازی ژن همولوگ پروتئین شوک حرارتی جدایه ویروس CCYV و جدایه‌های موجود در بانک ژن NCBI. ویروس اختلال کوتولگی زرد کدوئیان (با رس شمار NC_004810) به عنوان عضو برون گروه انتخاب شد. جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق با ♦ نشان داده شده‌اند.

بحث

تنوع ژنتیکی CCYV به طور دقیق مورد مطالعه قرار نگرفته است، شاید به علت تعداد کم توالی‌های کامل و جزئی موجود در بانک ژن، مطابق با نتایج این تحقیق، جدایه‌های ایران تفاوت قابل توجهی را نسبت به جدایه‌های مناطق جغرافیایی مختلف (غیر ایرانی) نشان دادند که با نتایج بررسی (Keshavarz et al. 2013) مطابقت داشت. این احتمال وجود دارد که جدایه‌های CCYV هم دارای یک گروه‌بندی ژنتیکی (زیرگروه‌های غربی و شرقی) اما با نام‌گذاری متفاوت، مشابه با ویروس *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (Abrahamian and Abou-Jawdah. 2014).

توالی آمینواسیدی بخشی از ژن HSP70h جدایه‌های سیستان و بلوچستان از ۱۴۳ آمینواسید تشکیل شده است و این پروتئین در حرکت سلول به سلول ویروس‌ها از طریق پلاسمودسماتا از طریق فعالیت ATPase نقش دارد و در واقع یک نوع پروتئین حرکتی ویژه محسوب می‌شود. دارای دو دامنه می‌باشد، دامنه ATPase N-terminal و دامنه C-terminal که حاوی گیرنده‌های پیپتیدی است (Alzhanova et al. 2001). موتیف آمینواسیدی در موقعیت ۸۶ در ترادف‌های آمینواسیدی جدایه‌های مرکزی و گروه

L مشاهده شد و احتمالاً در حرکت بین سلولی ویروس نقش دارد و باعث تنوع ژنتیکی بالای این جدایه‌ها شده است. همچنین با توجه به تفاوت نوکلئوتیدی زیاد جدایه‌های ایران با جدایه‌های شرق آسیا این طور به نظر می‌رسد که فشار انتخاب مثبت روی جدایه‌های ایرانی زیاد است چرا که باعث تغییرات آمینواسیدی زیادی شده است.

جدایه‌های CCYV بر اساس توزیع جغرافیایی و تخصص میزبانی مورد بررسی فیلوژنی قرار گرفتند. طبیعی است که تنوع جغرافیایی و میزبانی می‌تواند رابطه مستقیم با تغییرات نوکلئوتیدی و آمینواسیدی داشته باشد و فشار انتخاب میزبانی در تنوع ژنتیکی آن‌ها دخالت داشته است (Nourinejad Zarghani et al. 2017).

بنابراین سه جدایه توالی‌یابی شده از روی طالبی در گروه L تفاوت زیادی با جدایه‌های دیگر داشتند. در نتیجه تغییر در موتیف آمینواسیدی فنیل آلانین در جدایه‌های ایران نسبت به جدایه‌های شرق آسیا نشان می‌دهد که فشار انتخاب مثبت روی ژن HSP70h زیاد است چرا که باعث تغییرات آمینواسیدی شده است.

از آنجا که ارقام مختلفی از کدوئیان در ایران کشت می‌شوند، بنابراین قرار گرفتن جدایه‌های ایران در دو شاخه مجزا (مرکزی و جنوب شرق) می‌تواند دلیل بر سازگاری تخصصی واریانت‌های

(2013) و نیز یافته‌های حاصل از این تحقیق در استان سیستان و بلوچستان حاکی از گسترش و پراکنش سراسری ویروس CCYV در جنوب کشور است.

بنابراین با توجه به کشت فراوان جالیز در جنوب کشور به‌کارگیری ارقام مقاوم از مؤثرترین راه کنترل این بیماری ویروسی می‌باشد و با توجه به اینکه توصیه ارقام مقاوم در هر منطقه، با آگاهی از نوع جدایه‌های ویروس موجود در آن منطقه امکان پذیر است پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در زمینه شناسایی جدایه‌های این ویروس، تعیین مشخصات مرتبط با بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی آن‌ها در جهت درک بهتر از وضعیت جدایه‌های ایرانی CCYV به‌دست آورد.

ویروسی با ارقام مختلف باشد. از سوی دیگر وجود فشار انتخاب مثبت در نیمه ابتدایی 5 ژن پروتئین همولوگ شوک حرارتی با نقش حرکت سیستمیک در گیاه در جدایه‌های ایرانی نشان از تثبیت برخی جهش‌ها در این ناحیه و افزایش کارایی پروتئین شوک حرارتی و سازگاری بیشتر این پروتئین با میزبان در ایران شده است و نشان‌دهنده قدمت طولانی این ویروس بومی در ایران است و به احتمال زیاد جدایه‌هایی از این ویروس از ایران به سایر نقاط جهان توسط داد و ستدهای بین‌المللی از طریق دریا انتقال یافته و در آنجا با شرایط محیطی سازگار شده باشند چرا که جدایه‌های جنوب شرق آسیا در کلاستر مجزا قرار گرفته‌اند. از طرفی تحقیقات گذشته در استان هرمزگان (Keshavarz et al.

منابع

- Abrahamian PE, Abou-Jawdah Yusuf (2014) Whitefly-transmitted criniviruses of cucurbits: current status and future prospects. *Virus Disease* 25:26-38.
- Al-Saleh MA, Al-Shahwan I, Amer MA, Shakeel MT, Abdalla AO, Orfanidou C, Katis NI (2015) First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber in Saudi Arabia. *Plant Disease* 99:734.
- Ahmadi K, Ebadzadeh HR, Abdi Shah H, Kazemian A, Rafiei M. (2017). Agricultural statistics crop year 2016-2017. Ministry of Agriculture jahad, Iran.
- Alzhanova DV, Napuli AJ, Creamer R, Dolja VV (2001) Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *EMBO Journal* 20:6997-7007.
- Bananej K, Menzel W, Kianfar N, Vahdat A, Winter S (2013) First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucumber, melon and squash in Iran. *Plant Disease* 97:1005.
- Gu QS, Liu YH, Wang YH, Huangfu WG, Gu HF, Xu L, Song FM, Brown JK (2011) First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in China. *Plant Disease* 95:73.
- Gyoutoku Y, Okazaki S, Furuta A, Etoh T, Mizobe M, Kuno K, Hayashida S, Okuda M (2009) Chlorotic yellows disease of melon caused by *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new crinivirus. *Japanese Journal of Phytopathology* 75:109-111.
- Hamed K, Menzel W, Dafalla G, Gadelseed AMA, Winter S (2011) First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting muskmelon and cucumber in Sudan. *Plant Disease* 95:1321.
- Huang LH, Tseng HH, Li JT, Chen TC (2010) First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucurbits in Taiwan. *Plant Disease* 94:1168.

- Keshavarz T, Shams-Bakhsh M, Izadpanah K, Malboobi MA (2013) Occurrence and Genome Analysis of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in Iran. . *Journal of Phytopathology* doi: 10.1111/jph.12212.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Li J, Liang X, Wang X, Shi Y, Gu Q, Kuo YW, Falk BW, Yan F (2016) Direct evidence for the semipersistent transmission of *Cucurbit chlorotic yellows virus* by a whitefly vector. *Scientific Reports* 6:36604.
- Okuda M, Okazaki S, Yamasaki S, Okuda S, Sugiyama M (2010) Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus *Crinivirus*. *Phytopathology* 100:560-566.
- Orfanidou CG, Baltzi A, Dimou NA, Katis NI, Maliogka VI (2017) *Cucurbit chlorotic yellows virus*: Insights into Its Natural Host Range, Genetic Variability, and Transmission Parameters. *Plant Disease* 101:2053-2058.
- Thompson JD, Gibson T, Higgins DG (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics* 2:3-22.
- Zeng R, Dai FM, Chen WJ, Lu JP (2011) First Report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* Infecting Melon in China. *Plant Disease*. 95: 354.