

## **Determining the evolutionary characteristics and genetic structure of the isolates of *Beet curly top Iran virus* based on the V2 gene**

**Mohamad Hamed Ghodoum Parizipour** 

\*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. E-mail address: parizi@asnrukh.ac.ir

**Aminallah Tahmasebi** 

Assistant Professor, Department of Agriculture, Minab Higher Education Center, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran. E-mail address: tahmasebi.info@yahoo.com

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

*Beet curly top Iran virus* (BCTIV) is a destructive virus causing damage to agriculture industry annually. BCTIV has a circular single-stranded DNA genome with five open reading frames (ORFs): V1, V2 and V3 on genomic strand, and C1 and C2 on complementary strand. V2 acts as a suppressor of silencing interfering with this defense pathway. This study was aimed to determine the evolutionary characteristics and genetic structure of V2 among different BCTIV isolates.

#### **Materials and methods**

Total number of 31 BCTIV V2 nucleotide sequences were extracted from the GenBank and analyzed. The nucleotide sequence was aligned and the phylogenetic tree was drawn. Nucleotide polymorphism analysis was determined. Also, the occurrence of insertion-deletion polymorphism (InDel) was investigated. Nonsynonymous (dN) and synonymous (dS) substitution rates and dN/dS ratio were calculated in order to check the selection pressure on nucleotide sequences and V2 codons. Entropy analysis was also performed to investigate possible variations in nucleotide positions.

#### **Results**

Based on the host and geographical location, V2 sequences were placed in different clusters of the phylogenetic tree. 20 haplotypes and 94 polymorphic loci was detected. Haplotype and

nucleotide diversity was calculated as 0.963 and 0.06517, respectively. The mean nucleotide differences were 23.463. InDel polymorphism was not observed. The rates of dN and dS were calculated as -0.60699 and 0.03020, respectively, both of which were not significant. The dN/dS ratio was also -20.10201. Total number of 26 positions among the codons showed a positive value of dN/dS ratio, while 34 positions had a negative value. Also, at least 9 recombination events were observed. Entropy analysis showed that nucleotide position 247 has the most changes with an entropy rate of 0.93.

## Conclusions

The results suggest that the variation in the nucleotide sequence of BCTIV V2 can be effective in suppressing gene silencing and the pathogenicity of different isolates in different hosts. The variability of this part of the virus genome may in the future lead to an increase in the range of host range of the virus or to overcome the resistance of plant varieties.

**Keywords:** Defense response, Geminivirus, Gene silencing, Nucleotide analysis, Plant infection.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Ghodoum Parizipour MH, Tahmasebi A (2023) Determining the evolutionary characteristics and genetic structure of the isolates of *Beet curly top Iran virus* based on the V2 gene. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (4), 43-60.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 15 (4), 43-60.

DOI: 10.22103/jab.2023.20978.1455

Received: August 06, 2023.

Received in revised form: September 30, 2023.

Accepted: October 01, 2023.

Published online: December 30, 2023.


Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors


## تعیین ویژگی‌های تکاملی و ساختار ژنتیکی جدایه‌های ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند

### ایران (*Beet curly top Iran virus*) بر پایه ژن V2

محمد حامد قدوم پاریزی پور 

\*نویسنده مسئول: استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.

رایانامه: parizi@asnrukh.ac.ir

امین الله طهماسبی 

استادیار، گروه کشاورزی، مجتمع آموزش عالی میناب، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران. رایانامه:

tahmasebi.info@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۷/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۹

#### چکیده

**هدف:** ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند ایران (BCTIV) یکی از ویروس‌های مخرب در ایران است که سالانه خسارت قابل توجهی به صنعت کشاورزی کشور وارد می‌سازد. BCTIV دارای ژنوم دی‌ان‌ای تک‌لای حلقوی است که پنج چارچوب خوانش باز شامل V1، V2 و V3 بر روی رشته ژنومی، و C1 و C2 بر روی رشته مکمل ژنومی دارد. چارچوب خوانش باز V2 علاوه بر نقش داشتن در همانند سازی و بروز نشانه‌های بیماری، به عنوان یک سرکوب‌گر خاموشی فعال است و با تداخل در این مسیر دفاعی گیاه، منجر به پیدایش بیماری می‌شود. این پژوهش با هدف تعیین ویژگی‌های تکاملی و ساختار ژنتیکی V2 در میان جدایه‌های مختلف BCTIV انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۳۱ توالی نوکلئوتیدی V2 متعلق به جدایه‌های مختلف BCTIV از بانک ژن استخراج و مورد واکاوی قرار گرفت، بدین ترتیب که ابتدا هم‌ردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی انجام شد و سپس درخت تبارزایی ترسیم گردید. واکاوی چندشکلی نوکلئوتیدی در بین توالی‌ها تعیین گردید و وقوع چندشکلی واردسازی-حذف (InDel) در بین توالی‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نرخ‌های جایگزینی نامترادف (dN) و مترادف (dS) و نسبت dN/dS به منظور بررسی فشار انتخاب طبیعی بر روی توالی‌های نوکلئوتیدی و رمزهای V2 محاسبه گردید. واکاوی آنروپی نیز برای بررسی تغییرات احتمالی در جایگاه‌های نوکلئوتیدی انجام گرفت.

**نتایج:** بر اساس میزبان و محل جغرافیایی، توالی‌های V2 در خوشه‌های مختلفی از درخت فیلوژنتیکی قرار گرفتند. واکاوی چند شکلی نوکلئوتیدی منجر به شناسایی تعداد ۲۰ هاپلوتیپ در بین توالی‌ها شد و تعداد ۹۴ جایگاه چند شکلی با تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی به ترتیب برابر با ۰/۹۶۳ و ۰/۰۶۵۱۷ محاسبه گردید. میانگین تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی نیز ۲۳/۴۶۳ بود. چند شکلی InDel در بین توالی‌ها مشاهده نشد و نرخ‌های dN و dS نیز در مورد توالی‌های به ترتیب ۰/۶۰۶۹۹- و ۰/۰۳۰۲۰ محاسبه شد که هر دو معنی‌دار نبودند. همچنین نسبت dN/dS نیز برابر ۲۰/۱۰۲۰۱- بود و تعداد ۳۴ و ۲۶ جایگاه در بین رمزها به ترتیب مقدار منفی و مثبتی از این نسبت را نشان دادند. همچنین، ۹ رویداد نوترکیبی در موقعیت‌های نوکلئوتیدی مختلف مشاهده گردید. نتایج واکاوی آنتروپی نیز نشان داد که جایگاه نوکلئوتیدی ۲۴۷ با نرخ آنتروپی ۰/۹۳ بیشترین تغییرات را دارد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج پیشنهاد می‌کند که تنوع موجود در توالی نوکلئوتیدی V2 در جدایه‌های مختلف BCTIV، فعالیت سرکوب خاموشی ژن و شدت بیماری‌زایی ویروس را در میزبانان مختلف، تحت تأثیر قرار می‌دهد. بعلاوه، تغییرپذیری این بخش از ژنوم ویروس ممکن است در آینده منجر به افزایش دامنه میزبانی ویروس یا غلبه بر مقاومت ارقام گیاهی گردد.

**کلیدواژه‌ها:** آلودگی گیاه، پاسخ دفاعی، جمینی‌ویروس، خاموشی ژن، واکاوی نوکلئوتیدی.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** قدوم پاریزی پور محمد حامد، طهماسبی امین الله (۱۴۰۲) تعیین ویژگی‌های تکاملی و ساختار ژنتیکی جدایه‌های ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند ایران (*Beet curly top Iran virus*) بر پایه ژن V2. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۴)، ۴۳-۶۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian

Biotechnology Society.



© the authors

## مقدمه

بیماری پیچیدگی بوته چغندر قند یکی از عوامل خسارت‌زای کشت چغندر قند در ایران و سایر کشور های دنیا به حساب می‌آید. این بیماری توسط چندین گونه ویروس متعلق به تیره *Geminiviridae* به نام‌های ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند (*Beet mild curly top virus*, BMCTV)، ویروس پیچیدگی خفیف بوته چغندر قند (*Beet curly top virus*, BCTV)، ویروس پیچیدگی بوته اسفناج (*Spinach curly top virus*, SpCTV)، ویروس پیچیدگی شدید بوته چغندر قند (*Beet severe curly top virus*, BSCTV) و ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند ایران (*Beet curly top Iran virus*, BCTIV) ایجاد می‌شود (Heydarnejad et al. 2007). این ویروس‌ها دارای ژنوم دی‌ان‌ای تک‌لا (single-stranded) و حلقوی هستند و پیکره‌های آن‌ها به شکل دوقلو و جور ترا (isometric) است. افزون بر این، این ویروس‌ها محدود به آوند آبکشی اند و انتقال

مکانیکی آن‌ها دشوار است. انتقال این ویروس‌ها با دانه امکان‌پذیر نیست، اما به طور مؤثری با دو گونه زنجبرک چغندرقد مکانیکی *Circulifer haematoceps* و *Circulifer tenellus* انجام می‌گیرد (Harrison 1985; Bennett 1971).

BCTIV طیف و سیعی از گیاهان دو لپه‌ای را آلوده می‌کند و علاوه بر چغندرقد، از خیار، گوجه فرنگی، اسفناج، لوبیا، کدو و یونجه و چندین علف هرز از خانواده‌های مختلف گیاهی جدا شده است (Heydarnejad et al. 2007). طبق تحقیقات صورت گرفته توسط حیدرنژاد و همکاران (۲۰۰۷)، BCTIV برای اولین بار از نواحی مرکزی، جنوب شرقی و جنوبی ایران گزارش شده است، که از نظر ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی پروتئین پوششی، تفاوت چشمگیری با جدایه‌های موجود در بانک ژن دارد. این مطالعات نشان داد که این ویروس به صورت غالب در ایران وجود دارد. این ویروس دارای پنج چارچوب خوانش باز (ORF) محافظت شده است که از یک بخش بین ژنی (IR) آغاز می‌شوند (Bolok Yazdi et al. 2008). سه چارچوب خوانش باز به نام‌های VI، V2 و V3 بر روی رشته ژنومی و ۲ چارچوب خوانش باز به نام‌های CI و C2 بر روی رشته مکمل ژنومی - که بعد از ورود ویروس به یاخته، ساخته می‌شود- جای دارند (Bolok Yazdi et al. 2008). چارچوب خوانش باز VI پروتئین پوششی (CP) را رمزگذاری می‌کند که در انتشار سیستمیک ویروس در گیاه و انتقال با زنجبرک نقش دارد. چارچوب خوانش باز V2 در تکثیر ویروس و ظهور علائم مؤثر است. چارچوب خوانش باز V3 نقش مؤثری در حرکت ویروس دارد (Rojas et al. 2005). ضمناً چارچوب خوانش باز CI پروتئین همراه با همانند سازی ویروس یا Replication-associated protein (Rep) را رمزگذاری می‌کند که جهت نسخه‌برداری و تکثیر لازم است. گرچه C2 مستقیماً در آلودگی ویروس دخالت ندارد، اما به عنوان فاکتور بیماری‌زایی عمل می‌کند (Rojas et al. 2005). همچنین، پژوهش‌های انجام شده نشان داده‌اند که علاوه بر نقش داشتن در همانند سازی و بروز نشانه‌های بیماری، چارچوب خوانش باز V2 به عنوان یک سرکوب‌گر خاموشی ژن در BCTIV فعال است و با تداخل در این مسیر پدافندی گیاه، به پیدایش بیماری می‌انجامد (Luna et al. 2017). بررسی ژن‌های شرکت کننده در سرکوب خاموشی ژن می‌تواند شیوه تکامل و تنوع ژنتیکی آنان را آشکار سازد. این یافته‌ها در پیش‌آگاهی پیدایش سویه‌های نوین ویروس و پایداری ژنتیکی گیاه، کاربرد دارند. به علاوه، استفاده از تکنیک‌های مولکولی در سال‌های اخیر جهت مطالعه موجودات بومی و حفاظت شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است (Askari et al. 2010; Ghasemi Meymandi et al. 2016). میزان اطلاعات به‌دست‌آمده از این تکنیک‌های ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Alinaghizadeh et al. 2007; Mohamadipoor Saadatabadi et al. 2021; Mohammadifar and Mohammadabadi 2018). همچنین، مطالعه نژادهای مختلف با استفاده از تکنیک‌های مولکولی بسیار مهم و برای طبقه‌بندی آن‌ها مفید است (Barazandeh et al. 2016; Gholamhoseini et al. 2018). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای مختلف بسیار اهمیت دارد (Bahador et al. 2016; Mohammadabadi et al. 2021; Gooki et al. 2019). تنوع ژنتیکی یک عنصر اساسی برای پیشرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سازگاری به شرایط محیطی متغیر و مختلف می‌باشد (Askari et

2011; Mohammadifar and Mohammadabadi 2008). لذا، هدف این پژوهش واکاوی توالی‌های چارچوب خوانش باز V2 در میان جدایه‌های BCTIV به عنوان گونه چیره و اقتصادی ایجاد کننده بیماری پیچیدگی بوته در ایران، و تعیین ویژگی‌های تکاملی و ساختار ژنتیکی آن است. بررسی تنوع نوکلئوتیدی این ژن می‌تواند اطلاعات بیشتری از نحوه تکامل این ویروس آشکار سازد که در مهندسی ژنتیک برای تولید ارقام مقاوم کاربردی خواهد بود.

## مواد و روش‌ها

**همردیف سازی توالی‌ها:** توالی نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز V2 از جدایه‌های BCTIV از بانک ژن استخراج شد. سپس همردیف سازی توالی‌های جدایه‌های سراسر ایران با بهره‌گیری از نرم‌افزار CLC Main Workbench (کیازن، آلمان) (<https://digitalinsights.qiagen.com>) انجام شد. توالی‌های نوکلئوتیدی V2 همردیف‌سازی شده با برنامه MEGA (دانشگاه ایالتی پنسیلوانیا، ایالات متحده) (<https://www.megasoftware.net>)، نسخه ۶,۰۶، درخت فیلوژنتیکی ترسیم گردید. الگوی جایگزینی نوکلئوتید یا آمینو اسید با رویکرد بیشینه احتمال ارزیابی شد. الگو و نرخ‌های جایگزینی با مدل‌های مختلف برآورد گردید.

**واکاوی نوکلئوتیدی:** نرخ‌های جایگزینی غیر مترادف (dN) و مترادف (dS) که عبارتند از میزان تنوع ژنی در بین ژنوتیپ‌های جدایه‌های مختلف از موجودات، با بازسازی‌های مشترک بیشینه احتمال در الگوی جایگزینی رمز Muse-Gaut و الگوی جایگزینی نوکلئوتید Felsenstein برآورد شد (Nei & Gojobori 1986). از رابطه ۱ برای محاسبه dN و dS استفاده گردید که در آن  $s$  و  $n$  به ترتیب معادل جایگزینی مترادف و غیر مترادف،  $S_i$  برابر است با مقدار  $s$  برای آی‌مین ( $i$ th) رمز نوکلئوتیدی و  $r$  برابر است با تعداد رمزهای مقایسه شده (Nei & Gojobori 1986). نرخ تکاملی میانگین (نسبی) با کمک الگوی جونز-تیلور-تورنتون (G+), تخمین زده شد (Jones et al. 1992). یک توزیع گسسته گاما (G+) برای الگو سازی ناهمگونی‌های نرخ تکاملی میان مکان‌ها به کار گرفته شد (Yang 1994). الگوهای جایگزینی شامل نرخ جانشینی انتقالی (transition substitution) و نرخ جانشینی عرضی (transversion substitution)، فراوانی نوکلئوتیدی برای ژن V2 بر پایه الگوی Tamura-Nei برآورد شد (Tamura & Nei 1993). این الگوها نشان دهنده میزان تغییر در توالی‌های نوکلئوتیدی هستند.

$$S = \sum_{j=1}^r S_i \quad \& \quad n = (3r - S) \quad \text{رابطه ۱}$$

**واکاوی مقایسه‌ای تکامل توالی V2:** برای شنا سابی مکان‌های آمینو اسید ویژه تحت محدودیت‌های انتخابی، شمار تفاوت میان نرخ‌های جایگزینی dN و dS برای هر جایگاه در همردیف‌ها با برنامه MEGA، نسخه ۶,۰۶ برآورد گردید. مقدار

$dN-dS > 0$  به عنوان شواهدی برای فشار مثبت انتخاب در نظر گرفته شد، در حالی که مقادیر  $> 0$  نشان دهنده فشار منفی انتخاب بود. آزمون‌های آماری برای تمایز ژنتیکی، تخمین شماری از هاپلوتیپ‌ها و گوناگونی هاپلوتیپ با نرم افزار DnaSP 5.10.01 (دانشگاه بارسلونا، اسپانیا) (<http://www.ub.edu/dnasp>) انجام گرفت (Rozas et al. 2003). رویدادهای نوترکیبی بالقوه میان توالی‌های نوکلئوتیدی توالی‌های  $V2$  با نرم افزار DnaSP 5.10.01 مورد سنجش قرار گرفت. همچنین، رخداد نوترکیبی در توالی‌های چارچوب خوانش باز  $V2$  مورد بررسی قرار گرفت و مکان‌های بالقوه نوترکیبی شناسایی شد.

**واکاوی آنروپی:** از آنالیز آنروپی برای ارزیابی گوناگونی و پیچیدگی هر جایگاه نوکلئوتیدی در توالی‌های نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز  $V2$  بهره گرفته شد. آنروپی شانون بر پایه تعریف (۲۰۱۰) Sherwin محاسبه گردید. آنروپی شانون با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد که در آن،  $p_{ij}$  برابر است با فراوانی نوکلئوتید یا آمینو اسید  $j$  در جایگاه  $i$  و  $H_i$  معادل آنروپی هر جایگاه  $i$  است. شاخص  $j$  برابر است با ۱، ۲، ۳ یا ۴ به ترتیب مربوط به نوکلئوتیدهای A، C، G و T، یا عدد صحیحی از ۱ تا ۲۰ مربوط به رمزهای مختلف آمینو اسیدها. جایگاه‌هایی با مقدار آنروپی برابر با ۰ به عنوان جایگاه‌هایی که پیچیدگی و تنوع ندارند، تعریف می‌شوند. از نرم‌افزار ClustalW2 (دانشگاه دوبلین، ایرلند) (<https://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2>) به منظور تعیین آنروپی شانون برای توالی‌های نوکلئوتیدی  $V2$  استفاده گردید.

$$H_i = \sum_j p_{ij} \log_2 p_{ij} \quad \text{(رابطه ۲)}$$

## نتایج

**۱ استخراج توالی و هم‌ردیف سازی:** تعداد ۳۱ توالی نوکلئوتیدی متعلق به چارچوب خوانش باز  $V2$  از جدایه‌های مختلف BCTIV از بانک ژن استخراج و مورد واکاوی قرار گرفت (جدول ۱). هم‌ردیف سازی توالی نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز  $V2$  و ترسیم درخت تبارزایی از جدایه‌های مختلف BCTIV نشان داد که این توالی‌ها در خوشه‌های مختلفی قرار می‌گیرند (شکل ۱). اولین خوشه‌ی مجزا شامل پنج جدایه از BCTIV (رس شماره‌های JQ707945، JX987671، JQ707943، JQ707948، JQ707944) بودند که با نرخ بوت استرپ ۶۲ در کنار هم قرار گرفتند. به غیر از یک جدایه که از چغندر ماریتیما (*Beta vulgaris subsp. maritima*) جدا شده بود (رس‌شمار JX987671) سایر جدایه‌ها از میزبان چغندر قند (*B. vulgaris*) جداسازی شده بودند. دومین خوشه‌ی مجزا شامل هفت جدایه از BCTIV (رس شماره‌های JQ707949، JQ707942، JQ707941، JQ707940، JQ707938 و JX082259) بودند که با نرخ بوت استرپ ۴۳ در کنار هم قرار گرفتند. تمامی جدایه‌ها از میزبان چغندر قند (*B. vulgaris*) جدا سازی شده بودند. سومین خوشه که بزرگترین خوشه است شامل ۱۲ جدایه از

BCTIV بودند که با نرخ بوت استرپ ۵۷ در کنار هم قرار گرفتند. در این خوشه، دو جدایه با رس‌شمارهای EU273816 و JQ707951 با نرخ بوت استرپ بالایی (۸۵) تشکیل یک گروه خواهری دادند. این دو جدایه از یک گونه گیاهی (*B. vulgaris*) و یک منطقه جغرافیایی (یزد) مشترک جدا سازی شده‌اند. همچنین دو جدایه با رس‌شمارهای KC571253 و KC571252 با نرخ بوت استرپ بالایی (۸۷) تشکیل یک گروه خواهری دیگر را در این خوشه دادند. این دو جدایه نیز از یک گونه گیاهی (*B. vulgaris*) و یک منطقه جغرافیایی (استان خراسان رضوی) مشترک جدا سازی شده‌اند. دو جدایه با رس‌شمارهای MT459433 و KX533466 نیز به ترتیب با نرخ بوت استرپ ۹۹ و ۵۰ از سایر جدایه‌های این خوشه جداگانه قرار گرفته‌اند. اولین جدایه از چغندر قند (*B. vulgaris*) در یوزگات (کشور ترکیه) جدا سازی شده و دومین مورد از حشره زنجبرک گزارش شده است. تعداد شش جدایه (رس‌شمارهای MH751505, JX945570, JX945569, JX131633, JX131634 و JX966233) نیز تشکیل یک زیرخوشه را در این خوشه دادند که در میان آن‌ها، یک جدایه (رس‌شمار JX966233) با نرخ بوت استرپ بالایی (۹۷) از سایرین جدا قرار گرفته است. این جدایه از گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) در سبزوار (استان خراسان رضوی) جدا سازی شده است. قرار گیری سایر جدایه‌ها در درخت تبارزایی از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

**واکاوای نوکلئوتیدی:** به منظور بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت BCTIV، پارامترهای مختلف ژنتیکی نظیر تعداد و تنوع هاپلوتیپ‌ها، جایگاه‌های چند شکلی و تنوع نوکلئوتیدی موجود در بین توالی‌های نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز V2 از جدایه‌های مختلف ویروس واکاوی شد و تعداد ۲۰ هاپلوتیپ (H) در بین توالی‌ها شناسایی شد (جدول ۲). سایر پارامترهای چند شکلی شامل تعداد جایگاه‌های چند شکلی (S)، تنوع هاپلوتیپی (HD)، تنوع نوکلئوتیدی (Pi)، تتا (در هر جایگاه)، تتا از اتا (Theta<sub>eta</sub>)، تتا (در هر جایگاه) از S را نشان دادند. (Theta-W) و میانگین تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی (K) در جدول ۲ نشان داده شده است. چند شکلی وارد سازی-حذف (Insertion-Deletion [InDel]) در بین توالی‌ها مشاهده نشد. نرخ‌های جایگزینی غیر مترادف (dN) و مترادف (dS) در مورد توالی‌های نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز V2 به ترتیب ۰/۶۰۶۹۹- و ۰/۳۰۲۰ محاسبه شد که هر دو معنی‌دار نبودند ( $p > 0.10$ ). نسبت dN/dS نیز اندازه‌گیری و برابر ۰/۱۰۲۰۱- بود. رویکرد dN-dS، انتخاب را با تفاوت بین مکان‌های نامترادف و مترادف (dN-dS) رمزهای V2 ارزیابی کرد. مقدار dN-dS زیر صفر، نشان دهنده انتخاب منفی است؛ در حالی که مقدار dN-dS بالای صفر به عنوان انتخاب مثبت در نظر گرفته می‌شود. تعداد ۲۶ جایگاه در طول ترادف V2 شناسایی شدند که مقدار مثبتی از نسبت dN/dS را نشان دادند و بزرگترین آن (۵/۳۴) متعلق به رمز شماره ۱۱۸ بود (شکل ۲). در مقابل، ۳۴ جایگاه نیز شناسایی شدند که مقدار منفی از نسبت فوق را نشان دادند و بزرگترین آن (۱۶/۵۵-) متعلق به رمز شماره ۹۱ بود. وقوع نوترکیبی در در بین توالی‌ها بررسی گردید و نتایج نشان داد که حداقل نه رویداد نوترکیبی در موقعیت‌های نوکلئوتیدی مختلفی وجود دارد (شکل ۳).



جدول ۱. جزییات توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به چارچوب خوانش باز V2 از جدایه‌های مختلف BCTIV که از بانک ژن استخراج و مورد واکاوی قرار گرفت

**Table 1. Details of nucleotide sequences belonging to the V2 gene from different BCTIV isolates, which were extracted from the GenBank and analyzed**

Isolate	GenBank Accession Number	Source	Location	Reference	
Yazd	EU273816	<i>Beta vulgaris</i>	Yazd	Bolok Yazdi et al. (2008)	
Sh2	EU273817	<i>B. vulgaris</i>	Shiraz		
K	EU273818	<i>B. vulgaris</i>	Kerman		
IR:Yaz:B15P:Sug:06	JQ707938	<i>B. vulgaris</i>	Yazd	Heydarnejad et al. (2013)	
IR:Shi:B18K:Sug:06	JQ707939	<i>B. vulgaris</i>	Shiraz		
IR:Neg:B19K:Sug:04	JQ707940	<i>B. vulgaris</i>	Negar		
IR:Kav:B22K:Sug:08	JQ707941	<i>B. vulgaris</i>	Kavar		
IR:Kam:B23K:Sug:08	JQ707942	<i>B. vulgaris</i>	Kamal-Abad		
IR:Kam:B24K:Sug:08	JQ707943	<i>B. vulgaris</i>	Kamal-Abad		
IR:Neg:B25P:Sug:08	JQ707944	<i>B. vulgaris</i>	Negar		
IR:Neg:B26P:Sug:08	JQ707945	<i>B. vulgaris</i>	Negar		
IR:Dash:B29P:Sug:08	JQ707946	<i>B. vulgaris</i>	Dashtkar		
IR:Neg:B31K:Sug:08	JQ707947	<i>B. vulgaris</i>	Negar		
IR:Neg:B32P:Sug:08	JQ707948	<i>B. vulgaris</i>	Negar		
IR:Neg:B33P:Sug:08	JQ707949	<i>B. vulgaris</i>	Negar		
IR:Neg:B34P:Sug:08	JQ707950	<i>B. vulgaris</i>	Negar		
IR:Yaz:B35K:Sug:06	JQ707951	<i>B. vulgaris</i>	Yazd		
Siv	JX082259	<i>B. vulgaris</i>	Sivand		Soleimani et al. (2013)
IR:Tab:90:Cowpea:10	JX131633	<i>Vigna unguiculata</i>	Tabadkan		Gharouni Kardani et al. (2013)
IR:Dar:128:Cowpea:10	JX131634	<i>V. unguiculata</i>	Dargaz		
Zarghan	JX912248	<i>B. vulgaris</i>	Zarghan	Soleimani et al. (2013)	
IR:Toro:1B:Sug:10	JX945569	<i>B. vulgaris</i>	Torogh	Gharouni Kardani et al. (2013)	
IR:Boj:3Beet:Sug:10	JX945570	<i>B. vulgaris</i>	Bojnord	Gharouni Kardani et al. (2013)	
IR:Sabz:134T:Tomato:10	JX966233	<i>Solanum lycopersicum</i>	Sabzevar		
IR:Hom:Tu69:Seabeet:10	JX987671	<i>B. vulgaris</i> subsp. <i>maritima</i>	Homayehjan		
Iran:Chenaran:5Beet:Sugarbeet:2010	KC571252	<i>B. vulgaris</i>	Chenaran		
Iran:Fariman:6Beet:Sugarbeet:2010	KC571253	<i>B. vulgaris</i>	Fariman		
Kaftarak	KP410285	<i>S. lycopersicum</i>	Kaftarak	Eini et al. (2016)	
BCTIV_IR_CZ7_2013	KX533466	Leafhopper	Iran	Kamali et al. (2017)	
IR:Mash:Pep1:Pep:16	MH751505	<i>Capsicum frutescens</i>	Mashahd	Tahan and Heydarnejad (unpublished)	
Yozgat	MT459433	<i>B. vulgaris</i>	Yozgat	Yıldırım et al. (2022)	



جایگاه نوکلئوتیدی ۲۴۷ با نرخ انترویی (Hx) ۰/۹۳ بیشترین تغییرات را در بین جایگاه‌های نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز V2 در جدایه‌های ایرانی BCTIV داشت (شکل ۴).

جدول ۲. پارامترهای چندشکلی DNA توالی‌های V2 از جدایه‌های مختلف BCTIV که در این مطالعه با استفاده از نرم افزار DnaSP (نسخه ۶) مورد بررسی قرار گرفت

Table 2. DNA polymorphism parameters of BCTIV V2 sequences examined in this study using DnaSP software (ver. 6)

Population Size	S	H	HD	Var(HD)	SD(HD)	Pi	Theta <sub>eta</sub>	Theta-W	K
31	94	20	0.963	0.00048	0.022	0.06517	0.07852	0.06710	23.463

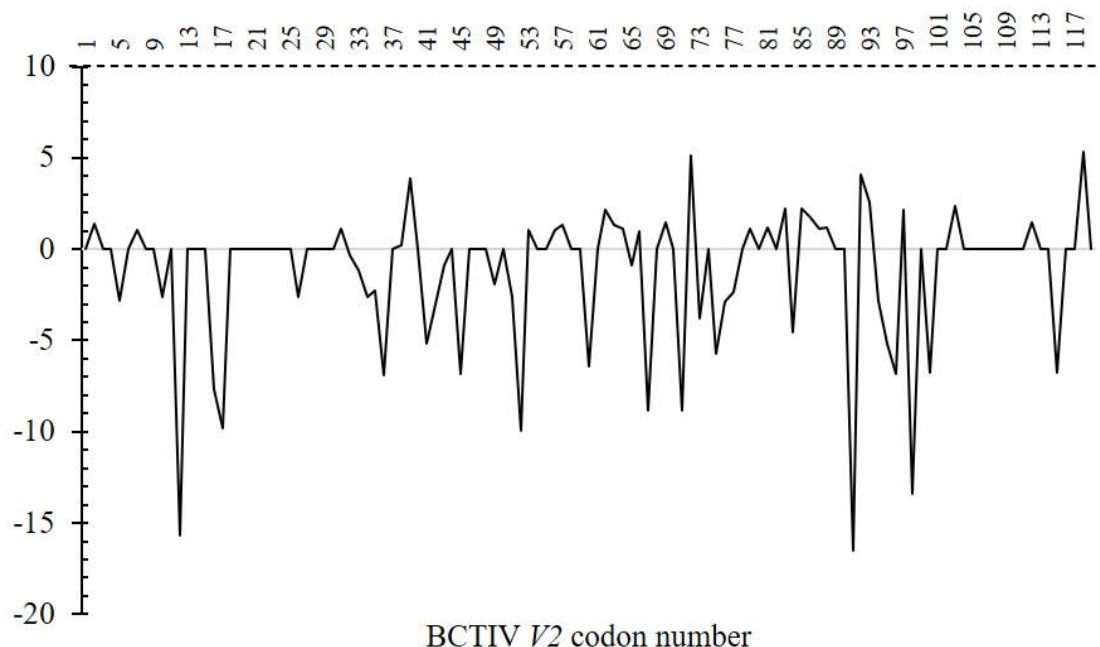
\*S: Number of polymorphic (segregating) sites, h: Number of Haplotypes, HD: Haplotype (gene) diversity, Var(HD): Variance of Haplotype diversity, SD(HD): Standard Deviation of Haplotype diversity, Pi: Nucleotide diversity, Theta<sub>eta</sub>: Theta (per site) from Eta, Theta-W: Theta (per site) from S, K: Average number of nucleotide differences.

S: تعداد مکانهای چندشکلی (تفکیک کننده)، h: تعداد هاپلوتیپ، HD: تنوع هاپلوتیپ (ژن)، Var(HD): واریانس تنوع هاپلوتیپ، SD(HD): انحراف استاندارد تنوع هاپلوتیپ، Pi: تنوع نوکلئوتیدی، Theta<sub>eta</sub>: تتا (در هر سایت) از اتا، Theta-W: تتا (در هر سایت) از S، K: میانگین تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی.

## بحث

خاموشی ژن بعد از ترانویسی (post-transcriptional gene silencing, PTGS) و خاموشی ژن هنگام ترانویسی (transcriptional gene silencing, TGS) به عنوان سازوکارهای دفاعی در گیاهان مطرح شده است. (Ratcliff et al. 1997; Carrillo-Tripp et al. 2007; Jovel et al. 2007; Raja et al. 2008). خاموشی ژن باعث کاهش همانندسازی ویروس در سلول شده و بدین ترتیب کاهش دی‌ان‌ای ویروس در بافت‌های بهبود یافته مشاهده می‌گردد (Carrillo-Tripp et al. 2007). ویروس‌ها برای مقابله با این سیستم دفاعی، طی تکامل پروتئین‌هایی را رمزگذاری کرده‌اند که می‌توانند خاموشی ژن را سرکوب کنند. آزمایش‌ها نشان داده است که چارچوب خوانش باز V2 به عنوان یک سرکوب‌گر خاموشی ژن در BCTV فعال است و با تداخل در این مسیر پدافندی گیاه، به پیدایش بیماری می‌انجامد (Luna et al. 2017). در این مطالعه، ساختار ژنتیکی چارچوب خوانش باز V2 مورد بررسی قرار گرفت. همردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز V2 و ترسیم درخت تبارزایی نشان داد که جدایه‌های مختلف در خوشه‌های مجزایی قرار گرفتند. این تفاوت درباره جدایه‌هایی که از میزبان‌های متفاوتی مانند چغندر ماریتیم، گوجه‌فرنگی و زنجبرک جداسازی شده بودند، مشاهده گردید. همچنین موقعیت جغرافیایی جدایه‌ها در مواردی باعث

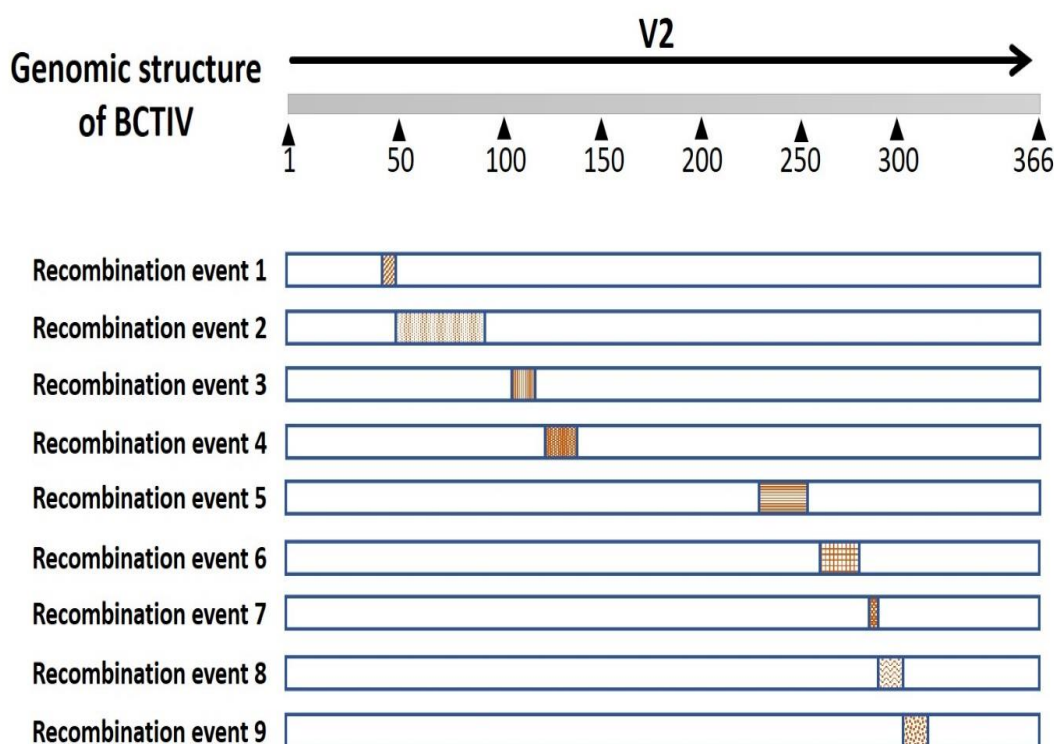
قرار گرفتن آن‌ها در خوشه‌های جداگانه‌ای گردید. نتایج حاکی از تأثیر موقعیت جغرافیایی و میزبان در تنوع ژنتیکی چارچوب خوانش باز V2 دارد. نتایج نرخ تکامل توسط شاخص  $dN/dS$  تعیین شد، که در آن یک فشار انتخاب بسیار منفی مشاهده گردید که بیانگر تعادل در انتخاب از طریق حذف تغییرات ژنتیکی مضر و پایداری ژن می‌باشد.



شکل ۲.  $dN-dS$  در ۲۸ نمونه از رمز مربوط چهارچوب خوانش چارچوب خوانش باز V2 در جدایه‌های BCTIV. این نسبت با تفاوت بین مکان‌های نامترادف و مترادف ( $dN-dS$ ) به دست می‌آید. شاخص  $dN-dS$  زیر صفر نشان دهنده انتخاب منفی در برابر تغییر پروتئین است. در مقابل، شاخص  $dN-dS$  بالای صفر ممکن است نشانه دهنده این باشد که انتخاب تطبیقی یا مثبت باعث واگرایی ژن می‌شود.  $dN$  و  $dS$  به ترتیب تعداد جایگزین‌های مترادف و نامترادف در هر جایگاه هستند

**Figure 2. The  $dN-dS$  along 28 samples of BCTIV V2 codons. This ratio is achieved by differences between nonsynonymous and synonymous positions ( $dN-dS$ ). The  $dN-dS$  index below zero is consistent with negative selection against protein change. In contrast, a  $dN-dS$  index above zero may be an indication that adaptive or positive selection is driving gene divergence.  $dS$  and  $dN$  are the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions per site, respectively**

این فشار منفی انتخاب احتمالاً به دلیل محافظت این توالی‌ها درون ژنوم ویروس است که نشان دهنده عدم فشار انتخاب طبیعی برای این ژن است. این امر می‌تواند به دلیل جداسازی اغلب این ژن‌ها از یک گونه‌ی گیاهی یعنی چغندر قند (*B. vulgaris*) باشد. همچنین، رمزهایی در توالی V2 مشاهده شدند که مقادیر مثبتی از نسبت dN/dS را نشان دادند که نشان دهنده فشار مثبت انتخاب بر روی این توالی‌ها است که در نتیجه، احتمال تغییر و تنوع ژنتیکی در آن‌ها را بالا می‌برد. با این حال، حضور رمزهایی با فشار منفی انتخاب نیز نشان دهنده عدم یکنواختی فشار انتخاب در طول توالی‌های V2 است. بیشترین و کمترین مقدار dN/dS در رمز شماره ۱۱۸ (۵/۳۴) و ۹۱ (۱۶/۵۵-) مشاهده شد که به ترتیب، نشان دهنده بالاترین میزان فشار انتخابی مثبت و منفی در این رمزها می‌باشد.

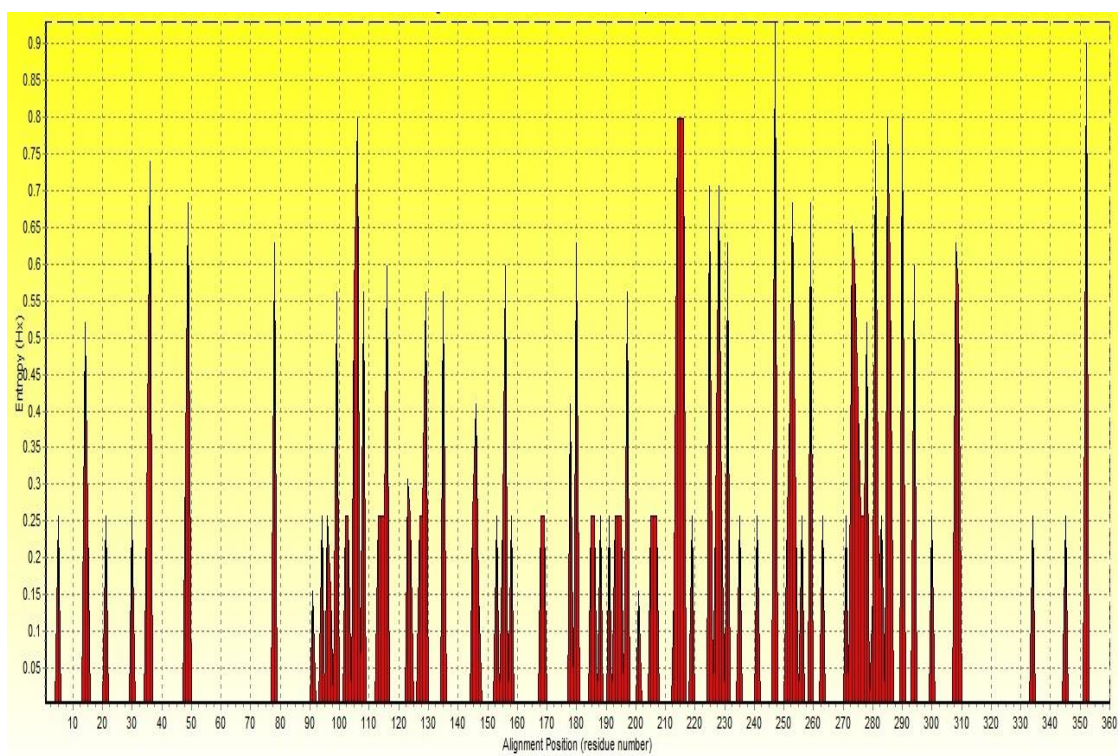


شکل ۳. نمایی شماتیک از نه رویداد نوترکیبی در موقعیت‌های مختلف توالی‌های نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز V2 متعلق به جدایه‌های BCTIV که با استفاده از نرم افزار DnaSP (نسخه ۶) واکاوی گردید

**Figure 3. Schematic view of nine recombination events in different positions of nucleotide sequences of V2 gene belonging to BCTIV isolates which were analyzed using DnaSP software (version 6)**

این پدیده در مورد سرکوب‌گر خاموشی 8K متعلق به ویروس بوته جارویی سیب زمینی (*Potato mop-top virus*) نیز مشاهده شده است (Tahmasebi et al. 2018). علاوه بر این، وجود رویدادهای نوترکیبی در موقعیت‌های مختلف توالی‌های

نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز V2 متعلق به جدایه‌های BCTIV نشان دهنده تنوع نسبی درون جمعیت‌های مختلف آن است. با توجه به نقش V2 در چرخه آلودگی BCTIV و همچنین نقش آن به عنوان یک سرکوبگر خاموشی RNA در گیاهان، تنوع آن ممکن است تهدید بزرگی برای آلوده کردن گیاهان دیگر یا غلبه بر ارقام مقاوم باشد. جایگاه نوکلئوتیدی ۲۴۷ با نرخ انتروپی (Hx) ۰/۹۳ بی‌شترین تغییرات را در بین جایگاه‌های نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز V2 در جدایه‌های ایرانی BCTIV داشت. بنابراین، مطالعات بیشتری برای تعیین نقش جایگاه نوکلئوتیدی ۲۴۷ در عملکرد چارچوب خوانش باز V2 در BCTIV مورد نیاز می‌باشد که در جهت شناخت عملکردهای مرتبط با این جایگاه در جدایه‌های ایرانی ویروس، می‌تواند مفید واقع شود. در نهایت، تغییرات قابل توجهی (جهش و نوترکیبی) در چارچوب خوانش باز V2 متعلق به جدایه‌های BCTIV یافت شد که احتمال داده می‌شود روی قدرت سرکوبگری این پروتئین در خاموشی ژن و شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف در ارقام مختلف چغندر قند اثرگذار باشند.



شکل ۴. آنالیز انتروپی تغییرات ژنتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز V2 در جدایه‌های ایرانی

**BCTIV**

**Figure 4. Entropy analysis of genetic changes of V2 open reading frame nucleotide sequences in Iranian BCTIV isolates**

**نتیجه گیری:** نتایج پیشنهاد می کند که تنوع موجود در توالی نوکلئوتیدی چارچوب خوانش باز V2 از جدایه های مختلف BCTIV می تواند در فعالیت سرکوب خاموشی ژن و شدت بیماری زایی جدایه های مختلف در میزبانان مختلف اثرگذار باشد. تغییرپذیری این بخش از ژنوم ویروس ممکن است در آینده منجر به افزایش دامنه ویزبانی ویروس یا غلبه بر مقاومت ارقام گیاهی گردد.

**سپاسگزاری:** از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می شود.

## منابع

- بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهش های تولیدات دامی ۱۱۳(۱)، ۱۹۲-۱۸۶.
- عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۵۶-۴۹.
- قاسمی میمندی مهرداد، محمدآبادی محمدرضا، منتظری مهدیه (۱۳۹۵) ارزیابی ساختار ژنتیکی شتر با استفاده از روش های PCA و خوشه بندی سلسله مراتبی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۸(۳)، ۹۶-۸۳.
- محمدی فر آمنه، محمدآبادی محمد رضا کاربرد نشانگرهای ریزماهوره برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی (۱۳۹۰). مجله علوم دامی ایران ۴۲(۴)، ۳۴۴-۳۳۷.

## References

- Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S (2007) Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (*Bos indicus*) using PCR-RFLP. *Pakistan J Biol Sci* 10 (23), 4291-4294.
- Askari N, A Baghizadeh, MR Mohammadabadi (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. *Modern Genet J* 5 (2), 49-56 (In Persian).
- Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2008) Analysis Of The Genetic Structure Of Iranian Indigenous Raeni Cashmere Goat Populations Using Microsatellite Markers. *Biotechnology* 2 (3), 1-4.
- Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2016) Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. *Research on Animal Production* 7 (13), 186-192 (In Persian).

- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, et al. (2016) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. *Iran J Appl Anim Sci* 6 (3), 571-579.
- Bennett CW (1971) The curly top disease of sugarbeet and other plants. *Am Phytopathol Soc Monogr* 7, e81.
- Bolok Yazdi HR, Heydarnejad J, Massumi H (2008) Genomic characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Gene* 36, 539-545.
- Eini O, Sahraei GE, Behjatnia SAA (2016) Molecular characterization and construction of an infectious clone of a pepper isolate of *Beet curly top Iran virus*. *Mol Biol Res Commun* 5(2), e101.
- Gharouni Kardani S, Heydarnejad J, Zakiaghl M, et al. (2013) Diversity of *Beet curly top Iran virus* isolated from different hosts in Iran. *Virus Gene* 46(3), 571-575.
- Ghasemi Meymandi M, Mohammadabadi MR, Montazeri M (2016) Analysing Genetic Structure of *Camelus dromedarius* Using PCA and Hierarchical clustering methods. *Agric Biotechnol J* 8 (3), 83-96 (In Persian).
- Gholamhoseini F, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M (2018) Polymorphism of the growth hormone gene and its effect on production and reproduction traits in goat. *Iran J Appl Anim Sci* 8 (4), 653-659.
- Gooki FG, Mohammadabadi M, Fozzi MA, Soflaei M (2019) Association of Biometric Traits with Growth Hormone Gene Diversity in Raini Cashmere Goats. *Walailak J Sci Technol* 16 (7), 499-508.
- Harrison BD (1985) Advances in geminivirus research. *Annu Rev Phytopathol* 23, 55-82.
- Heydarnejad J, Hosseini Abhari E, Bolok Yazdi HR, Massumi H (2007) Curly top of cultivated plants and weeds and report of a unique *Curtovirus* from Iran. *J Phytopathol* 155, 321-325.
- Heydarnejad J, Keyvani N, Razavinejad S, et al. (2013) Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family Geminiviridae. *Arch Virol* 158(2), 435-443.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics* 8(3), 275-282.
- Jovel J, Walker M, Sanfacon H (2007) Recovery of *Nicotiana benthamiana* plants from a necrotic response induced by a nepovirus is associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. *J Virol* 81, 12285-12297.



- Kamali M, Heydarnejad J, Pouramini N, et al. (2017) Genome sequences of *Beet curly top Iran virus*, *Oat dwarf virus*, *Turnip curly top virus*, and *Wheat dwarf virus* identified in leafhoppers. *Genome Announc* 5(8), e01674-16.
- Mohammadabadi M, Ghasemi Meymandi M, Montazeri M, et al. (2021) Molecular characterization of Iranian dromedaries using microsatellite markers. *Acta Agronomica* 69 (4), 321-330.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi M (2018) Melanocortin-3 receptor (MC3R) gene association with growth and egg production traits in fars indigenous chicken. *Malays Appl Biol* 47 (3), 85-90.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. *Iran J Anim Sci* 42 (4), 337-344 (In Persian).
- Mohamadipoor Saadatabadi L, Mohammadabadi M, Amiri Z, et al. (2021) Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in Iranian sheep breeds. *BMC Vet Res* 17 (1), 1-9.
- Nei M, Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3(5), 418-426.
- Luna AP, Rodríguez-Negrete EA, Morilla G, et al. (2017) V2 from a *Curtovirus* is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *J Gen Virol* 98, 2607-2614.
- Raja P, Sanville CB, Buchman CR, Bisaro D (2008) Viral genome methylation as an epigenic defence against geminiviruses. *J Virol* 82, 8997-9007.
- Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL (2005) Exploiting chinks in the plants armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43, 361-394.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.
- Sherwin WB (2010) Entropy and information approaches to genetic diversity and its expression: genomic geography. *Entropy* 12, 1765-1798.
- Soleimani R, Matic S, Taheri H, et al. (2013) The unconventional geminivirus Beet curly top Iran virus: Satisfying Koch's postulates and determining vector and host range. *Ann Appl Biol* 162(2), 174-181.
- Tahmasebi A, Afsharifar A, Heydari A, Mehrabadi M (2018) Evolutionary features of 8K (KDa) silencing suppressor protein of Potato mop-top virus. *Mol Biol Res Commun* 7(1), 43.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10(3), 512-526.
- Yang Z (1994) Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J Mol Evol* 39, 306-314.

Yıldırım K, Kavas M, Kaya R, et al. (2022) Genome-based identification of beet curly top Iran virus infecting sugar beet in Turkey and investigation of its pathogenicity by agroinfection. J Virol Methods 300, 114380.