

ثبات نسبی ژنتیکی جدایه‌های ویروس برگ قاشقی باقلا بر اساس بخشی از ژن پروتئین پوششی از میزبان‌ها و مناطق جغرافیایی مختلف ایران*

امید بهرامی ترابی^۱، الهام علوی نژاد^۱، سیدعلی اکبر بهجت‌نیا^{۱*} و کرامت‌اله ایزدپناه^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

یکی از عوامل زردی، کوتولگی و پیچیدگی در حبوبات که باعث کاهش محصول می‌شود ویروس برگ قاشقی باقلا (Bean leaf roll virus, BLRV) می‌باشد. به منظور بررسی تنوع جدایه‌های ایرانی این ویروس از مزارع حبوبات در استان‌های مرکزی، فارس، خوزستان، کهگیلویه و بویر احمد، گلستان، زنجان و قزوین بازدید و از گیاهان یونجه، عدس، نخود، لوبیا، شبدر، باقلا، نخودفرنگی و شنبلله نمونه برداری انجام شد. در مورد نمونه‌های انتخابی مراحل استخراج آران‌ای ویروس، تکثیر بخشی از ژن کدکننده‌ی پروتئین پوششی (از نوکلئوتید ۳۲۵۰ تا نوکلئوتید ۳۶۳۸) با آغازگرهای اختصاصی، همسانه‌سازی و تعیین ترادف به عمل آمد. به این ترتیب، BLRV در گیاهان یونجه، عدس، نخود، لوبیا و شبدر عمدتاً با علائم زردی و در گیاه باقلا با علائم قاشقی شدن برگ‌ها و زرد شدن برگ‌های جوان تشخیص داده شد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف بخشی از ژن پروتئین پوششی ۱۵ جدایه‌ی ایرانی با ترادف ناحیه مشابه سایر جدایه‌های BLRV موجود در بانک ژن نشان داد که میزان شباهت نوکلئوتیدی و ترجمه آمینواسیدی این ناحیه از ژن پروتئین پوششی به ترتیب ۹۸-۹۴٪ و ۱۰۰-۹۶٪ می‌باشد. مطالعات تبارزایی نشان داد که تمام جدایه‌های BLRV از ایران در یک گروه مجزا از جدایه‌های غیرایرانی قرار می‌گیرند. میزان شباهت ژن در این بخش از ژنوم می‌تواند نشان دهنده‌ی پایداری و ثبات نسبی ژنتیکی ژن پروتئین پوششی ویروس مورد بررسی باشد.

کلیدواژه: استخراج آران‌ای، پروتئین پوششی، تنوع ژنتیکی، ویروس برگ قاشقی باقلا، ویروس‌های حبوبات

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده‌های اول و دوم، ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: behjatni@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجویان کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد بیماری شناسی گیاهی گروه آموزشی گیاهپزشکی دانشگاه شیراز.

Relative genetic stability of Bean leaf roll virus isolates based on a part of coat protein gene from different hosts and geographical regions in Iran*

O. Bahrami Torabi¹, E. Alavinejad¹, S.A.A. Behjatnia^{1**}, and K. Izadpanah¹

(Received: 12.12.2017; Accepted: 4.3.2018)

Abstract

Legume diseases characterized by yellowing, stunting and leaf rolling cause heavy losses to legume crops. One of the causal agents of these diseases is Bean leaf roll virus (BLRV) which is widespread in legume species throughout Iran. In the present research, genetic variation of BLRV isolates from different plants and different geographical regions is investigated. Samples of *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Cicer arietinum*, *Medicago sativa*, *Lens culinaris*, *Trifolium* spp., *Trigonella foenum-graecum* and *Phaseolus vulgaris* showing symptoms of yellowing, dwarfing and leaf rolling were collected from the fields of Markazi, Fars, Khuzestan, Kohgiluyeh-va-Boyer-Ahmad, Golestan, Zanzan and Qazvin provinces in 2016-2017. Total RNA was extracted from symptomatic samples and subjected to RT-PCR using specific primers amplifying a fragment of 389 bp in size from the CP region of the virus which was cloned and sequenced. BLRV was detected in faba bean, alfalfa, lentil, chickpea, bean and clover. Comparison of obtained nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences of Iranian isolates of BLRV with corresponding nt and aa sequences of other BLRV isolates available in GenBank showed a 94-98% and a 96-100% nt and aa similarity, respectively. Phylogenetic analyses indicated that all Iranian BLRV isolates constituted a group distinct from the group formed by non-Iranian BLRV isolates. These data indicated that the CP region of this virus is relatively conserved among different isolates of BLRV.

Keywords: Bean leaf roll virus, coat protein, genetic variation, legume viruses, RNA extraction

* Part of M.Sc. Thesis of the First and second Author Submitted to College of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

**Corresponding author's E-mail: behjatni@shirazu.ac.ir

1. M.Sc. Student, M.Sc. Student, Assoc. Prof., Prof., respectively, of Plant Pathol., College of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

مقدمه

در شرایط آزمایشگاهی از طریق پیوند نیز قابل انتقال می‌باشد. اما به طریق مایه‌زنی مکانیکی، بذر، دانه‌ی گرده و سس منتقل نمی‌شود (Ashby, 1984; Tinsley, 1959). انتقال BLRV توسط شته‌های *Aphis gossypii*، *A. craccivora*، *Acyrtosiphon pisum* و *A. fabae* گزارش شده است (Kaiser, 1972).

BLRV دارای پیکره‌های ایزومتریک است، ژنوم ویروس متشکل از یک رشته اران‌ای تک‌لای مثبت با اندازه تقریبی ۶ کیلو باز است که دارای پنج چارچوب خوانش (open reading frame, ORF) است. چارچوب‌های خوانش ۱ تا ۵ به ترتیب پروتئین‌های ۴۲، ۶۲، ۲۲، ۱۶ و ۵۹ کیلودالتون را کد می‌کنند. در چارچوب‌های خوانش ۱ و ۲ این ویروس ۱۵ نوکلئوتید هم‌پوشانی وجود دارد و این دو چارچوب خوانش آنزیم پلیمرز را کد می‌کنند. چارچوب خوانش ۳ پروتئین پوششی را کد کرده و با یک ناحیه‌ی بین ژنی از چارچوب خوانش ۲ جدا می‌شود. چارچوب خوانش ۴ یک پروتئین حرکتی و چارچوب خوانش ۵ یک پروتئین ساختاری به نام پروتئین پیوسته-خوانی (Read through protein) را کد می‌کند (Domier et al., 2002).

در حال حاضر یکی از روش‌های مطمئن برای کنترل بیماری‌های ویروسی، استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. داشتن اطلاعات در مورد تنوع ویروس‌ها و استرین‌های آن‌ها و واکنش هر کدام با میزبان در مناطق جغرافیایی مختلف برای انتخاب ژنوتیپ گیاه با صفات مقاومت در برنامه‌های اصلاح نباتات لازم است. بنابراین بررسی تنوع در مورد ویروس برگ قاشقی باقلا که باعث خسارات زیادی به حبوبات می‌گردد، ضروری به نظر می‌رسید.

حبوبات همانند سایر گیاهان زراعی هم در مزرعه و هم در انبار مورد حمله آفات و بیماری‌های مختلف قرار می‌گیرند. عوامل بیماری‌زای زیادی روی کیفیت و کمیت محصول حبوبات اثر گذاشته و خسارت سنگینی را به کشاورزان وارد می‌سازند که در بین آنها ویروس‌ها جایگاه ویژه‌ای دارند. در بین بیماری‌های ویروسی حبوبات، زردی و کاهش رشد که توسط لوتئوویروس‌ها و نانوویروس‌ها ایجاد می‌شود به عنوان مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی این محصولات در سراسر جهان مورد توجه قرار گرفته اند (Abraham et al., 2008). در بین این ویروس‌ها، ویروس برگ قاشقی باقلا (*Bean leaf roll virus, BLRV*) که متعلق به جنس *Luteovirus* از تیره *Luteoviridae* است، بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Makkouk, 1998). BLRV اولین بار از ایران در سال ۱۳۴۶ به عنوان یکی از عوامل خسارت‌زای عمده در مزارع باقلای استان‌های خوزستان و فارس گزارش گردید (Kaiser et al., 1967).

دامنه میزبانی BLRV محدود به گیاهان تیره‌ی Fabaceae می‌باشد و میزبان‌های مهم آن باقلا، نخود، نخودفرنگی، عدس، شبدر، یونجه، لوبیا، شنبلیله و علف‌های هرز این تیره هستند (Behjatnia & Izadpanah, 1993; Makkouk et al., 1998). علائم اصلی که توسط BLRV در حبوبات ایجاد می‌شود شامل زردی بین رگبرگ‌ها، کوتولگی، قاشقی شدن برگ، متمایل به قرمز شدن و ضخیم شدن برگ‌ها و جلوگیری از گلدهی و تشکیل غلاف، ریز شدن و نکروز برگ‌های انتهایی است (Behjatnia & Izadpanah, 1993).

BLRV توسط شته و به صورت پایا منتقل می‌گردد.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری

به منظور ردیابی BLRV در حبوبات، از مزارع این محصولات در استان‌های مرکزی، فارس، خوزستان، کهگیلویه و بویراحمد، گلستان، زنجان و قزوین طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ بازدید به عمل آمد و تعداد ۱۸۴ نمونه از گیاهان باقلا، یونجه، شبدر، لوبیا، نخود، عدس، نخودفرنگی و شنبلیله دارای علائم زردی، کوتولگی، پیچیدگی و برگ قاشقی نمونه‌برداری شد. علاوه بر این ۲۰ نمونه از بافت برگ تعدادی از نمونه‌های گیاهی موجود در مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشگاه شیراز که علائم زردی و کوتولگی آنها ثبت شده بود نیز استفاده گردید.

استخراج آران‌ا از گیاه، تکثیر و تعیین ترادف پروتئین پوششی ویروس مورد مطالعه

استخراج آران‌ای ویروس با استفاده از کیت شرکت دنا زیست آسیا (مشهد) صورت گرفت. جهت تهیه‌ی دی‌ان‌ای مکمل از آغازگر معکوس $5'$ -TCCAGCAATCTTGGCATCTC- $3'$ استفاده شد. از دی‌ان‌ای مکمل در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به-عنوان دی‌ان‌ای الگو استفاده شد و با استفاده از آغازگر اختصاصی معکوس فوق و آغازگر روبه جلو با ترادف $5'$ -GAAGATCAAGCCAGGTTCA- $3'$ قطعه به طول ۳۹۱ جفت باز از ناحیه پروتئین پوششی BLRV (Ortiz et al., 2005) استفاده گردید.

واکنش PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری با استفاده از Master mix شرکت Ampliqon که حاوی دی‌ان‌ا پلیمرز تگ (Taq)، NH_4 buffer system، dNTP و MgCl_2 می-

باشد، انجام گرفت. هر واکنش حاوی ۱ میکرولیتر دی‌ان‌ای استخراج شده، ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط ذکر شده، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها و ۹/۵ میکرولیتر آب استریل بود. برنامه دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله دمای 95°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه با دمای واسرشت‌سازی 94°C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال $52/5^\circ\text{C}$ به مدت یک دقیقه و دمای گسترش 72°C به مدت دو دقیقه و در پایان یک چرخه 72°C به مدت ۱۵ دقیقه بود. در نهایت محصول PCR به دست آمده، در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید. پس از خالص‌سازی دی‌ان‌ای تکثیر شده از ژل با استفاده از Qiagen (Germany) gel extraction kit، اتصال دی‌ان‌ای خالص شده به ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T به منظور ساخت پلاسمید نوترکیب و انتقال آن به سلول‌های مستعد سویه‌ی XLBlue باکتری *E. coli* با استفاده از Ins T/A clone PCR product cloning kit (Fermentas) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس کلنی‌های سفید رنگ جهت تکثیر باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب انتخاب و پس از یک شب رشد در دمای 37°C ، استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش جوشاندن (Holmes & Quigley 1981) انجام گردید. همسانه‌های حاوی قطعه مورد نظر جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید.

آنالیز و مقایسه ترادف‌های نوکلئوتیدی

ترادف‌های به دست آمده مربوط به ژن پروتئین پوششی BLRV، با ترادف‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI توسط برنامه BLAST مقایسه شد و پس از تایید صحت آن‌ها، با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 (Kumar et al., 2016) و Vector.NTI 11، هم‌ردیف‌سازی ترادف

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های BLRV که در مقایسه ترادف‌ها و آنالیز فیلوژنتیکی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

Table 1. Characteristics of BLRV isolates used in sequence comparisons and phylogenetic analyses in this study

Accession number	Country (city)	Host	Accession number	Country (city)	Host
AF441393	USA	<i>Vicia faba</i>	MF780973	Iran (Kazeron)	<i>Vicia faba</i>
AY616761	Spain	<i>Vicia faba</i>	MF780974	Iran (Behbahan)	<i>Vicia faba</i>
HM439776	USA	<i>Pisum sativum</i>	MF780975	Iran (Khomein)	<i>Cicer arietinum</i>
HQ840723	Tunisia	<i>Cicer arietinum</i>	MF780976	Iran (Gachsaran)	<i>Vicia faba</i>
KJ847771	Saudi Arabia	<i>Medicago sativa</i>	MF780977	Iran (Mahallat)	<i>Medicago sativa</i>
KR261610	Argentina	<i>Medicago sativa</i>	MF780978	Iran (Mahallat)	<i>Vicia faba</i>
KT382813	Greece	<i>Lens culinaris</i>	MF780979	Iran (Qazvin)	<i>Medicago sativa</i>
U15978	USA	NR*	MF780980	Iran (Zafarabad, shiraz)	<i>Vicia faba</i>
X53865	Germany	NR*	MF780981	Iran (Zafarabad, shiraz)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>
FJ645759 (BYDV, out group)	Czech Republic	<i>Hordeum vulgare</i>	MF780982	Iran (Zanjan)	<i>Phaseolus vulgaris</i>
MF780970	Iran (Bajgah, shiraz)	<i>Medicago sativa</i>	MF780983	Iran (Zanjan)	<i>Vicia faba</i>
MF780971	Iran (Bajgah, shiraz)	<i>Trifolium stoloniferum</i>	MF780984	Iran (Zanjan)	<i>Lens culinaris</i>
MF780972	Iran (Golestan)	<i>Vicia faba</i>			

(شکل ۱). آران‌ای کل از این قبیل گیاهان استخراج و جهت تشخیص آلودگی به BLRV در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس بکار رفت. با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی BLRV، بخشی از قطعه‌ی پروتئین پوششی به طول ۳۸۹ جفت بازی تکثیر گردید (شکل ۲).

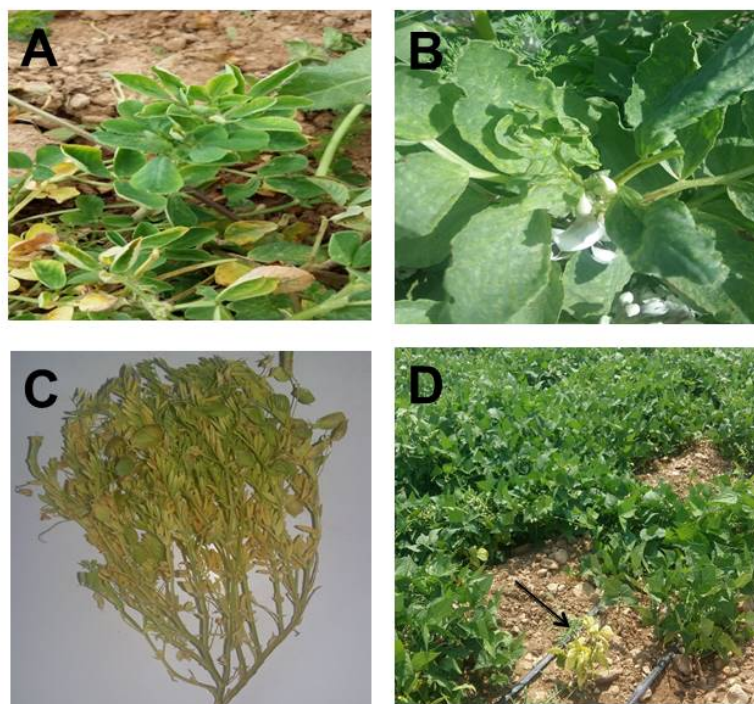
نتایج به دست آمده نشان داد که آلودگی به ویروس برگ قاشقی باقلا در مزارع حبوبات در استان‌های مورد بررسی شامل مزارع باقلای استان‌های فارس، خوزستان، گلستان، زنجان، مرکزی و کهگیلویه و بویراحمد؛ مزارع یونجه استان‌های مرکزی، قزوین و فارس؛ مزارع شبدر و سنبله استان فارس؛ مزارع لوبیا و عدس استان زنجان و مزارع نخود استان مرکزی وجود دارد (شکل ۱). این اولین گزارش از آلودگی مزارع حبوبات استان‌های مرکزی و قزوین به این ویروس است. با توجه به این‌که در تمام مناطق مورد بررسی آلودگی باقلا به BLRV مشاهده شد (تعداد ۶۳ نمونه آلوده از ۸۷ نمونه‌ی جمع‌آوری شده)، می‌توان این گیاه را میزبان اصلی ویروس در نظر گرفت و

نوکلئوتیدی و آمینواسیدی انجام شد. این ترادف‌ها با یکدیگر و با ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جدایه‌های موجود در GenBank مورد مقایسه قرار گرفتند و درصد شباهت آن‌ها تعیین و درخت فیلوژنتیکی مربوطه توسط نرم‌افزار MEGA7 و روش neighbor-joining ترسیم شد و مورد واکاوی قرار گرفت. رس‌شمار (Accession number) ویروس‌هایی که در مقایسه‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی مورد استفاده واقع شدند در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج و بحث

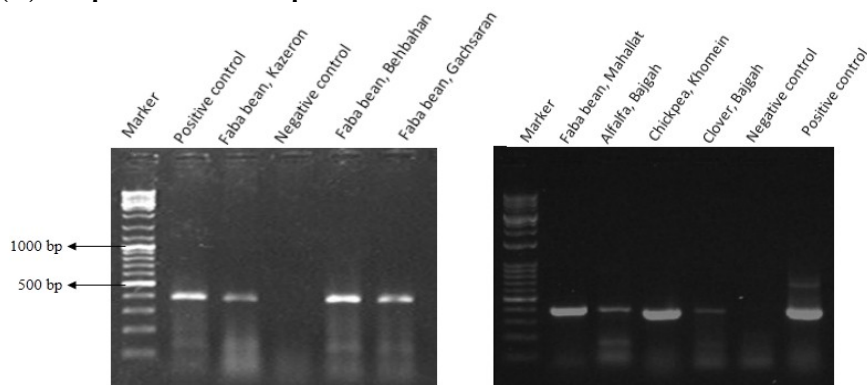
شناسایی ویروس برگ قاشقی باقلا در حبوبات

در بازدیدهایی که در فواصل مختلف از مزارع کشت حبوبات در مناطق مختلف ایران به عمل آمد، علائم زردی، کوتولگی، پیچیدگی و قاشقی شدن برگ‌ها مشاهده شد. در گیاه باقلا بیشتر حالت زردی و برگ قاشقی شدن، ولی در بقیه میزبان‌ها بیشتر علائم زردی در برگ‌ها دیده شد



شکل ۱. علائم زردی، کوتولگی و قاشقی شدن در شنبلیله از یک مزرعه در منطقه ظفرآباد شیراز (A) و در باقلا در یکی از مزارع شهرستان کازرون در استان فارس (B). زردی گیاه عدس از یکی از مزارع شهرستان اقلید (C) و کوتولگی یک بوته لوبیا (با پیکان مشخص شده است) در مزرعه ای در منطقه موردراز شهرستان یاسوج (D). بر اساس آزمون پی‌سی‌آر، همه این گیاهان آلوده به ویروس برگ قاشقی باقلا بودند.

Fig 1. Yellowing, dwarfing and leaf roll symptoms in *Trigonella foenum-graecum* from a field in Zafar Abad, Shiraz (A) and in *Vicia faba* from a field in Kazeroun, Fars Province (B). Yellowing in a *Lens culinaris* field plant from Eqlid (C) and stunting and yellowing in a *Phaseolus vulgaris* plant (shown by an arrow) in a field in Murderaz, Yasuj (D). All plants were PCR positive for BLRV.



شکل ۲. نقوش الکتروفورزی محصولات PCR بخشی از ژن پروتئین پوششی ویروس برگ قاشقی باقلا (BLRV) تکثیر شده با جفت آغازگر اختصاصی ویروس. در بالای هر راهک به ترتیب نوع میزبان و منطقه نمونه‌برداری نشان داده شده است. گیاه باقلای سالم به عنوان شاهد منفی (Negative control) و گیاه باقلای آلوده به BLRV به عنوان شاهد مثبت (Positive control). نشانگر = DNA ladder mix (Fermentas).

Fig 1. Electrophoresis pattern of PCR products amplified from the coat protein gene of BLRV from different plants and regions as indicated at the top of each lane using a BLRV specific primer pair. Total DNA extracted from a healthy faba bean and from a BLRV-infected faba bean were used as negative and positive controls, respectively. Marker = DNA ladder mix (Fermentas).

جدول ۲. میانگین میزان آلودگی گیاهان جمع‌آوری شده از مناطق مختلف به BLRV بر اساس ردیابی ویروس با استفاده از آزمون

PCR

Table 2. The average infection rate of collected plants from different regions to BLRV based on virus detection using PCR test

Plant	Location	No. of plants infected/No of plants collected	Average infection rate (%)	
<i>Vicia faba</i>	Khuzestan	7/15	47	72
	Golestan	12/16	75	
	Fars	18/24	75	
	Zanjan	20/22	91	
	Gachsaran	6/10	60	
<i>Medicago sativa</i>	Fars	4/11	36	42
	Qazvin	5/13	38	
	Markazi	6/12	50	
<i>Trifolium stoloniferum</i>	Fars	3/10	30	
<i>Lens culinaris</i>	Zanjan	6/18	33	
<i>Cicer arietinum</i>	Markazi	4/8	50	
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Fars	2/7	29	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Zanjan	9/18	50	
All plants		102/204	50	

دست آمده از مناطق مختلف ایران در ترادف نوکلئوتیدی قطعه مورد بررسی % ۱۰۰ - ۹۸ با هم شباهت دارند (جدول‌های ۳ و ۴).

با مقایسه ترادف همین بخش از ژنوم با ترادف قطعه مشابه از جدایه‌های موجود در بانک ژن مشخص شد که میزان شباهت جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های غیر ایرانی در سطح نوکلئوتیدی % ۹۸-۹۴ است و بیشترین شباهت (%۹۸) مربوط به جدایه‌های باقلای بهبهان (خوزستان) و کهگیلویه و بویراحمد با جدایه‌های تونس (HQ840723)، یونان (KT382813)، آرژانتین (KR261610)، آمریکا (AF441393 و HM439776) و اسپانیا (AY61761) و کمترین شباهت (%۹۴) مربوط به جدایه‌های یونجه و شبدر منطقه باجگاه (شیراز)، یونجه و باقلای کازرون (استان فارس)، نخود خمین (استان مرکزی) و باقلا و یونجه محلات (استان مرکزی) با جدایه‌های عربستان سعودی (KJ847771) بود. در سطح آمینواسیدی میزان شباهت این بخش از ژنوم جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های موجود در بانک ژن ۱۰۰-۹۶٪ تعیین شد که بیشترین شباهت (%۱۰۰)

در مناطق کشت این محصول، امکان بروز و خسارت‌زایی این ویروس و اثر آن در کاهش کمیت و کیفیت محصول را مورد توجه قرار داد. نوع گیاه، محل جمع‌آوری گیاهان، تعداد گیاهان جمع‌آوری شده و میانگین میزان آلودگی هر گیاه بر اساس ردیابی BLRV در آنها با استفاده از آزمون PCR در جدول ۲ آورده شده است. باید توجه داشت که علاوه بر ویروس برگ قاشقی باقلا، دو ویروس زردی بافت مرده باقلا (Faba bean necrotic yellows virus) و ویروس کوتولگی بافت مرده باقلا (Faba bean necrotic stunt virus)، از جنس *Nanovirus* و تیره *Nanoviridae*، نیز از ویروس‌های ایجاد کننده زردی و کوتولگی و از عوامل خسارت‌زا در حبوبات می‌باشند. وجود هر دو ویروس از مزارع حبوبات ایران گزارش شده است (Alavinejad et al. 2011; Lotfipour et al., 2016; Makkouk et al., 1998).

مقایسه ترادف نوکلئوتیدی بخشی از قطعه ژن پروتئین پوششی از نوکلئوتید ۳۲۵۰ تا ۳۶۳۸ BLRV (Ortiz et al., 2005) جدایه‌های ایرانی نشان داد که نمونه‌های به

جدول ۳. درصد تشابه و واگرایی نوکلئوتیدی بخشی از ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی BLRV با یکدیگر و با قطعه مشابه سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن. جدایه‌های ویروس در جدول ۱ آورده شده است.

Table 3. The percentage of nucleotide similarity and divergence of a part of coat protein gene of the Iranian isolates of BLRV with each other and with the same fragment of other isolates present in the GenBank. See Table 1 for the virus isolates.

	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	
1. AF441393.USA	100	99	95	95	96	100	98	95	95	98	98	100	98	98	95	95	96	100	100	96	96	96	96	96	1
2. AY616761.Spain	1	100	95	95	96	99	99	95	95	98	98	99	99	98	95	95	96	99	99	96	96	96	96	96	2
3. MF780970	5	5	100	99	95	95	100	100	98	94	95	95	98	100	100	99	95	95	99	99	99	99	99	99	3
4. MF780971	5	5	0	100	99	95	95	100	100	98	94	95	95	98	100	100	99	95	95	99	99	99	99	99	4
5. MF780972	4	4	1	1	100	96	96	99	99	98	95	96	96	98	99	99	100	96	96	100	100	100	100	100	5
6. HM439776.USA	0	1	5	5	4	100	98	95	95	98	97	100	98	98	95	95	96	100	99	96	96	96	96	96	6
7. HQ840723.Tunisia	2	1	5	5	4	2	100	95	95	98	99	98	100	98	95	95	96	98	98	96	96	96	96	96	7
8. MF780973	5	5	0	0	1	5	5	100	98	94	95	95	98	100	100	99	95	95	99	99	99	99	99	99	8
9. MF780975	5	5	0	0	1	5	5	0	100	98	94	95	95	98	100	100	99	95	95	99	99	99	99	99	9
10. MF780974	2	2	2	2	2	2	2	2	2	100	97	98	98	100	98	98	98	98	98	98	99	99	98	98	10
11. KJ847771.Saudi Arabia	2	2	4	4	5	3	1	6	6	3	100	98	99	97	94	94	95	98	97	95	95	95	95	95	11
12. KR261610.Argentina	0	1	5	5	4	0	2	5	5	2	2	100	98	98	95	95	96	100	100	96	96	96	96	96	12
13. KT382813.Greece	2	1	5	5	4	2	0	5	5	2	1	2	100	98	95	95	96	98	98	96	96	96	96	96	13
14. MF780976	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	3	2	2	100	98	98	98	98	98	99	99	98	98	98	14
15. MF780977	5	5	0	0	1	5	5	0	0	2	6	5	5	2	100	99	95	95	99	99	99	99	99	99	15
16. MF780978	5	5	0	0	1	5	5	0	0	2	6	5	5	2	0	100	99	95	95	99	99	99	99	99	16
17. MF780979	4	4	1	1	0	4	4	1	1	2	5	4	4	2	1	1	100	96	96	100	100	100	100	100	17
18. U15978.USA	0	1	5	5	4	0	2	5	5	2	0	2	2	5	5	4	4	100	96	96	96	96	96	96	18
19. X53865. Germany	0	1	5	5	4	1	2	5	5	2	3	0	2	2	5	5	4	0	100	96	96	96	96	96	19
20. MF780980	4	4	1	1	0	4	4	1	1	1	5	4	4	1	1	1	0	4	4	100	100	100	100	100	20
21. MF780981	4	4	1	1	0	4	4	1	1	1	5	4	4	1	1	1	0	4	4	0	100	100	100	100	21
22. MF780982	4	4	1	1	0	4	4	1	1	2	5	4	4	2	1	1	0	4	4	0	0	100	100	100	22
23. MF780983	4	4	1	1	0	4	4	1	1	2	5	4	4	2	1	1	0	4	4	0	0	0	100	100	23
24. MF780984	4	4	1	1	0	4	4	1	1	2	5	4	4	2	1	1	0	4	4	0	0	0	0	0	24
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	Divergence																								

مربوط به جدایه‌های باقلای گلستان، یونجه و شبدر منطقه باجگاه (شیراز) با جدایه‌های آمریکا (AF441393) و (HM439776) و اسپانیا (AY61761)، جدایه‌ی باقلا کازرون با جدایه‌ی تونس (HQ840723)، جدایه‌های باقلا گچساران، یونجه و باقلا محلات، یونجه قزوین، باقلا و شنبلیله منطقه ظفرآباد (شیراز)، لوبیا، باقلا و عدس زنجان با جدایه‌های یونان (KT382813)، آرژانتین (KR261610)، آمریکا (U15978) و آلمان (X53865) و کمترین شباهت (۹۶٪) مربوط به جدایه‌های یونجه و باقلا محلات، یونجه قزوین، باقلا و شنبلیله منطقه ظفرآباد (شیراز) و لوبیا، باقلا و عدس زنجان با جدایه‌های جدایه‌های آمریکا (AF441393 و HM439776)، اسپانیا

مربوط به جدایه‌های باقلای گلستان، یونجه و شبدر منطقه باجگاه (شیراز) با جدایه‌های آمریکا (AF441393) و (HM439776) و اسپانیا (AY61761)، جدایه‌ی باقلا کازرون با جدایه‌ی تونس (HQ840723)، جدایه‌های باقلا گچساران، یونجه و باقلا محلات، یونجه قزوین، باقلا و شنبلیله منطقه ظفرآباد (شیراز)، لوبیا، باقلا و عدس زنجان با جدایه‌های یونان (KT382813)، آرژانتین (KR261610)، آمریکا (U15978) و آلمان (X53865) و کمترین شباهت (۹۶٪) مربوط به جدایه‌های یونجه و باقلا محلات، یونجه قزوین، باقلا و شنبلیله منطقه ظفرآباد (شیراز) و لوبیا، باقلا و عدس زنجان با جدایه‌های جدایه‌های آمریکا (AF441393 و HM439776)، اسپانیا

با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 و ترسیم دندروگرام حاصل از هم‌دیف‌سازی ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، تبارزایی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های موجود در بانک ژن مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). زمانی که ترادف نوکلئوتیدی مبنای مقایسه قرار گرفت، تمام جدایه‌های به دست آمده از ایران در یک گروه مجزا از جدایه‌های غیر ایرانی قرار گرفتند.

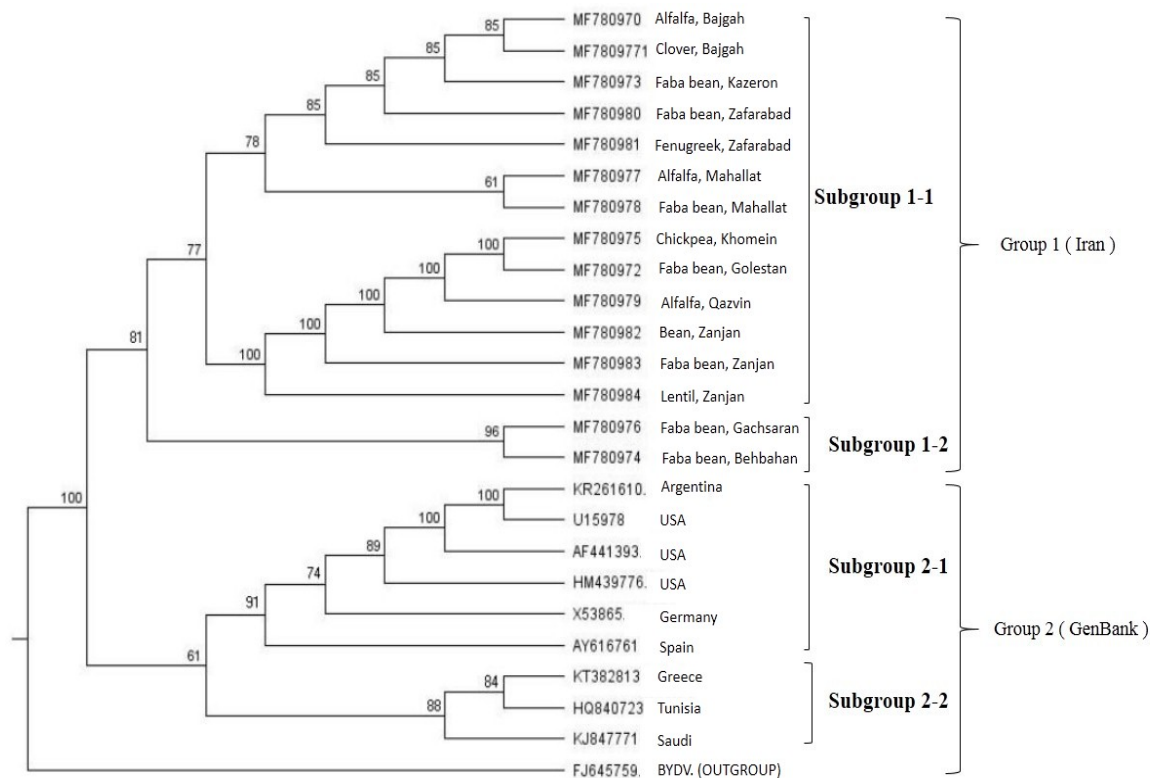
جدول ۴: درصد تشابه و واگرایی آمینواسیدی بخشی از ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی BLRV با یکدیگر و با قطعه مشابه سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن. جدایه‌های ویروس در جدول ۱ آورده شده است.

Table 4. The percentage of amino acid similarity and divergence of a part of coat protein gene of the Iranian isolates of BLRV with each other and with the same fragment of other isolates present in the GenBank. See Table 1 for the virus isolates .

	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	
1. AF441393.USA	100	100	100	100	100	100	98	98	97	98	98	100	98	98	96	96	96	100	100	96	96	96	96	96	1
2. AY616761.Spain	0	100	100	100	100	100	98	98	97	98	98	99	99	99	96	96	96	100	100	96	96	96	96	96	2
3. MF780970	0	0	100	100	100	100	98	100	100	100	98	96	96	98	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	3
4. MF780971	0	0	0	100	100	100	98	100	100	100	98	96	96	98	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	4
5. MF780972	0	0	0	0	100	100	98	99	99	98	98	96	96	98	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	5
6. HM439776.USA	0	0	0	0	0	100	98	98	97	98	98	100	98	98	96	96	96	100	100	96	96	96	96	96	6
7. HQ840723.Tunisia	2	2	2	2	2	2	100	99	98	100	98	100	98	96	96	96	98	98	96	96	96	96	96	96	7
8. MF780973	2	2	0	0	1	2	0	100	98	98	96	96	98	100	100	100	96	96	100	100	100	100	100	100	8
9. MF780975	3	3	0	0	1	3	1	0	99	99	97	97	98	100	100	100	97	97	100	100	100	100	100	100	9
10. MF780974	2	2	0	2	2	2	2	2	1	100	98	98	100	98	98	98	98	98	98	98	100	100	98	98	10
11. KJ847771.Saudi	2	2	2	2	2	2	0	2	1	0	98	99	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	11
12. KR261610.Argentina	0	1	4	4	4	0	2	4	3	2	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	12
13. KT382813.Greece	2	1	4	4	4	2	0	4	3	2	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	13
14. MF780976	2	1	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	14
15. MF780977	4	4	0	0	0	4	4	0	0	2	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	15
16. MF780978	4	4	0	0	0	4	4	0	0	2	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	16
17. MF780979	4	4	0	0	0	4	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	17
18. U15978.USA	0	0	4	4	4	0	2	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	18
19. X53865. Germany	0	0	4	4	4	0	2	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	19
20. MF780980	4	4	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	20
21. MF780981	4	4	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	21
22. MF780982	4	4	0	0	0	4	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	22
23. MF780983	4	4	0	0	0	4	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	23
24. MF780984	4	4	0	0	0	4	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	Divergence																								

عربستان، تونس و یونان (شکل ۳) بود. زمانی که توالی آمینواسیدی مبنای مقایسه قرار گرفت، هیچ تفاوتی در گروه‌بندی و تشکیل زیرگروه‌ها در دندروگرام حاصل نسبت به دندروگرام نوکلئوتیدی (شکل ۳) مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). طی بررسی‌هایی که در این پژوهش صورت گرفت، مشخص شد در ناحیه‌ی پروتئین پوششی BLRV در جدایه‌های ایرانی و همچنین جدایه‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI تفاوت زیادی وجود ندارد و این ناحیه

این گروه خود به دو زیرگروه تقسیم شد. زیرگروه اول (subgroup 1-1) شامل تمام جدایه‌های مورد مطالعه بجز دو جدایه بهبهان از استان خوزستان و گچساران از استان کهگیلویه و بویراحد بود. دو جدایه اخیر زیر گروه دوم (subgroup 1-2) را تشکیل داد (شکل ۳). گروه دوم از جدایه‌های غیرایرانی تشکیل شده بود. این گروه نیز به دو زیر گروه تقسیم شد. زیرگروه اول (subgroup 2-1) شامل جدایه‌های آمریکا، آرژانتین و دو جدایه از اروپا (آلمان و اسپانیا) و زیرگروه دوم (subgroup 2-2) شامل جدایه‌های



شکل ۳. دندروگرام حاصل از هم‌ردیف‌سازی ترادف نوکلئوتیدی قطعه‌ای از ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی BLRV با یکدیگر و با جدایه‌های موجود در بانک ژن با روش Neighbour-joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA7. اعداد کنار شاخه‌ها درصد ارزش Bootstrap در میان ۱۰۰ تکرار را نشان می‌دهند که نشانه‌ی اعتبار گروه‌بندی است. ترادف نوکلئوتیدی یک جدایه از ویروس کوتولگی زرد جو (BYDV) به‌عنوان عضو خارجی (outgroup) به کار رفته است. جدایه‌های ویروس در جدول ۱ آورده شده است.

Figure 3. Phylogenetic tree obtained from the alignment of nucleotide sequences of coat protein gene of Iranian isolates of BLRV and other isolates available in GenBank using MEGA7 program and neighbor-joining method. Numbers on the branches indicate bootstrap percentage of 100 replicates. Nucleotide sequence of a Barley yellow dwarf virus (BYDV) isolate was used as outgroup member. See Table 1 for the virus isolates.

در مورد BLRV ذکر شده که دما مهم‌ترین عامل خارجی است که بر میزان تکثیر شته و ایجاد اشکال بال دار آن اثر می‌گذارد. از آنجا که وجود جمعیت کثیری از شته در مزارع یونجه می‌تواند عامل مؤثری در ایجاد اپیدمی BLRV در نظر گرفته شود، می‌توان به اهمیت میزبان‌های دائمی ویروس علاوه بر عوامل محیطی پی‌برد (Thottappilly et al., 1977).

این نتایج در مورد BLRV با نتایج به دست آمده در مورد لوتئوویروس‌های مختلف که نشان‌دهنده‌ی ترادف حفاظت شدگی ژن پروتئین پوششی در ژنوم ویروس است

در جدایه‌های BLRV یک ناحیه حفاظت شده می‌باشد. هرچند که در بین جدایه‌های ایرانی BLRV مورد بررسی در این مطالعه، توالی آمینواسیدی قطعه مورد مطالعه پروتئین پوششی جدایه‌های استان‌های خوزستان و کهگیلویه و بویراحمد در تعداد بیشتری آمینواسید (۶ آمینواسید در مقابل یک آمینواسید متفاوت در گروه‌های دیگر) با بقیه‌ی جدایه‌ها تفاوت داشتند که این موضوع می‌تواند در بررسی عوامل محیطی مانند دمای هوا و همچنین گونه و بیوتیپ شته‌های ناقل در این مناطق مورد توجه و بررسی قرار گیرد.

غنی از پروتئین هستند، شناسایی آفات و بیماری‌های آنها بسیار مهم و حائز اهمیت می‌باشد. از آنجایی که ویروس‌های مهمی به حبوبات حمله می‌کنند و باعث خسارات بسیار سنگینی به گیاه و کشاورزان می‌گردند، شناسایی سریع و به موقع این بیماری‌ها می‌تواند در مدیریت بیماری‌های ناشی از آنها کاربرد داشته باشد. برای تشخیص سریع، صرفه جویی در هزینه و مواد مصرفی، می‌توان از روش Multiplex PCR استفاده کرد که همزمان می‌تواند چندین ویروس را در یک واکنش PCR شناسایی و ردیابی کند و بر اساس شیوع ویروس‌ها در یک مزرعه، برنامه مدیریت بیماری‌های ناشی از آنها از جمله استفاده از ارقام مقاوم را طراحی کرد.

همانگی دارد (Mukherjee *et al.*, 2003) و بیان شده است که ساختار بسیار حفاظت شده در کپسید در برهم کنش بالقوه آن با گیرنده‌های سلولی در بدن شته در ارتباط است (Gray and Gildow, 2003). همچنین یک ثبات نسبی در دامنه‌ی میزبانی این ویروس مشاهده گردید و گروه‌بندی‌ها بر اساس مناطق انتشار BLRV به دست آمد و ظاهراً نوع میزبان در گروه‌بندی جدایه‌های ایرانی نقش نداشت. با وجود این، باقلا به عنوان مهمترین میزبان این ویروس شناسایی شد. برای تعیین تنوع در میان جدایه‌های BLRV لازم است سایر چارچوب‌های خوانش و نواحی دیگر ژنوم نیز تعیین ترادف شوند و مورد بررسی فیلوژنتیکی قرار گیرند. حبوبات به دلیل اینکه یکی از مهمترین منابع گیاهی

منابع

- Abraham A. D., Varrelmann M., and Vetten H. J. (2008). Molecular evidence for the occurrence of two new luteoviruses in cool season food legumes in Northeast Africa. *African Journal of Biotechnology* 7: 414-420.
- Alavinejad E., Behjatnia S. A. A., Izadpanah K. and M. Masoumi 2011. Molecular detection of Faba bean necrotic yellows virus in legume fields of some North, North West and South provinces of Iran. The 7th National Biotechnology Congress of I. R. Iran. 6 pp.
- Ashby J. W. (1984). Bean leaf roll virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, no. 286.
- Behjatnia S. A. A. and Izadpanah K. 1993. Purification, serology and natural hosts of the bean leaf roll virus in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 29:107-114.
- Domier L. L., McCoppin N. K., Larsen R. C. and D'Arcy C. J. (2002). Nucleotide sequence shows that Bean leaf roll virus has a Luteovirus-like genome organization. *Journal of General Virology* 83: 1791-1798.
- Edwardson J. R. and Christie R. G. (1991). CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes. CRC Press. 504 pp.
- Hampton R. O. (1983). Pea leaf roll in Northwestern U.S. pea seed production areas. *Plant Disease* 67: 1306-1310.
- Holmes D. S. and Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Analytical of Biochemistry* 114: 193-197.
- Kaiser W. J. (1972). Diseases of food legumes caused by pea leaf roll virus in Iran. *FAO Plant Protection Bulletin*.
- Kaiser W. J., Danesh D., Okhovvat M., and Mossahebi G. (1967). Diseases of pulse crops (Edible legumes) occurring in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 3: 2-6.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Lotfipour M, Izadpanah K. and Behjatnia S. A. A. (2016). Identification and molecular characterization of Faba bean necrotic stunt virus, a new nanovirus in legume fields in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52:503-517.
- Makkouk K. M., Bashir M., and Jones R. (1998). First record of faba bean necrotic yellows virus and beet western yellows luteovirus affecting lentil and chickpea in Pakistan. *Plant Disease* 82: 591-591.
- Ortiz V., Castro S. and Romero J. (2005). Optimization of RT-PCR for the detection of Bean leaf roll virus in

plant hosts and insect vectors. *Journal of Phytopathology* 153: 68-72.
Tinsley T. W. (1959). Pea leaf roll, a new virus disease of legumes in England. *Plant Pathology* 8: 17-18.