



مقاله پژوهشی

میزبان‌های طبیعی و ویژگی‌های ژنوم ویروس زردی بافت مرده باقلا در سه استان شرقی

ایران*

افسانه آویش کوهشاهی^۱، جهانگیر حیدر نژاد^{۲*}، مریم اسماعیلی^۳، جواد صادقی مجد^۱، وحید حسونند^۴ وحسین معصومی^۲

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۲۰)

چکیده

ویروس زردی بافت مرده باقلا (*Faba bean necrotic yellows virus, FBNYV*) از جنس *Nanovirus* و خانواده *Nanoviridae* یکی از نانوویروس‌های رایج گیاهان لگومینوز در قاره‌های آسیا، آفریقا و اروپا است. در این تحقیق، میزبان‌های طبیعی این ویروس در سه استان شرقی ایران مورد بررسی قرار گرفته و ترادف نوکلئوتیدی قطعات کامل ژنوم یک جدایه از آن از منطقه رابر استان کرمان تعیین گردیده است. بدین منظور، چندین گیاه زراعی و سبزیجات برگی از استان‌های کرمان، خراسان رضوی و خراسان شمالی ایران جمع آوری گردید و آلودگی آن‌ها با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مرز و/یا تعیین ترادف قطعه ژنومی *DNA-S* بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که گیاهان عدس، باقلا، لوبیا، نخود ایرانی، یونجه، شنبلله، جعفری و شوید به *FBNYV* آلوده هستند و ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنومی *DNA-S* مربوط به هفت جدایه از هفت میزبان مختلف به میزان ۸۹/۶ تا ۹۹/۷ درصد با یکدیگر شباهت دارند. سپس ترادف نوکلئوتیدی تمام هشت قطعه ژنوم مربوط به جدایه عدس از منطقه رابر استان کرمان تعیین و با ترادف‌های مشابه در بانک ژن مقایسه گردید. بر این اساس، جدایه رابر به میزان ۸۸/۵۷ تا ۹۹/۸۱ درصد با سایر جدایه‌های این ویروس از سایر نقاط دنیا از جمله ایران شباهت دارد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که *FBNYV* دارای دامنه میزبانی وسیعی در میان گیاهان خانواده *Fabaceae* است و حتی گیاهانی خارج از این خانواده را نیز آلوده می‌کند. گیاهان شنبلله، جعفری و شوید برای اولین بار در دنیا به عنوان میزبان‌های جدید این ویروس معرفی می‌گردند.

کلیدواژه: ویروس زردی بافت مرده باقلا، جنس نانوویروس، میزبان‌های طبیعی، سبزیجات برگی

* قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jheydarnejad@uk.ac.ir

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کد پستی ۷۶۱۶۹۱۴۱۱۱ و عضو پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی،

دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳. دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۴. دانشجوی سابق دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان



Natural hosts and genome characterization of *Faba bean necrotic yellows virus* in three eastern provinces of Iran*

A. Avish-Koohshahi¹, J. Heydarnejad^{2**}, M. Esmaeili³, J. Sadeghi-Majd¹, V. Hasanvand⁴, and H. Massumi²

(Received: 9.7.2021; Accepted: 11.11.2021)

Abstract

Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV) (*Nanovirus*, *Nanoviridae*) is a common nanovirus of leguminous plant in Asia, Africa and Europe continents. In this research, natural hosts of FBNYV in three eastern provinces of Iran have been studied and full-length genome components of a Rabor isolate (Kerman province) has been sequenced. To identify FBNYV natural hosts, leguminous plants and leaf vegetables were sampled in Kerman, Razavi Khorasan and Northern Khorasan, and the FBNYV infection of the samples was tested by PCR and/or nucleotide sequence of DNA-S component. Results indicated that lentil, faba bean, broad bean, chickpea, alfalfa, fenugreek, parsley and dill are infected with FBNYV and DNA-S of seven isolates from seven plant species share 89.6-99.7% nucleotide sequence identities. Among infected hosts, full-length genome components of a chickpea isolate of FBNYV from Rabor (Kerman province) was determined and compared with the related components of the GenBank isolates. Accordingly, all genome components of the Rabor isolate shared 88.57-99.81% nucleotide sequence identities with the corresponding sequence of other Iranian and GenBank isolates. To conclude, FBNYV has a broad host range in leguminous plants and even can infect non-leguminous leaf vegetables. It is the first report of the FBNYV infection of fenugreek, parsley and dill in the world.

Keywords: *Faba bean necrotic yellows virus*, *Nanovirus*, Natural hosts, Leaf vegetables

* A part of MSc. thesis of the third author submitted to College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

** Corresponding author's E-mail: jheydarnejad@uk.ac.ir

1. Former MSc student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2. Professor of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman 7616914111, Iran and member of Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman
3. PhD student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
4. Former PhD student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

مقدمه

دارد و نقش آن تنظیم چرخه سلولی گیاه میزبان می‌باشد (Aronson et al. 2000). قطعه DNA-R پروتئین مرتبط با تکثیر (Rep) را رمزگذاری می‌کند (Timchenko et al. 1999, 2000). قطعه DNA-M رمزکننده پروتئین حرکتی (movement protein, MP) است و نقش آن حرکت سلول به سلول در گیاه است (Wanitchakorn et al. 2000). پروتئین رفت و آمد هسته‌ای (nuclear shuttle protein, NSP) توسط قطعه DNA-N رمزگذاری می‌شود (Wanitchakorn et al. 2000). قطعات DNA-U1، DNA-U2 و DNA-U4 هرکدام پروتئینی را رمزگذاری می‌کنند که هنوز هیچ وظیفه‌ای به آن‌ها نسبت داده نشده است. تمامی قطعات ژنومی دارای یک ناحیه موسوم به ساقه و حلقه (CR-SL) و ناحیه دیگری بنام CR-II می‌باشند (Vetten et al. 2012). علاوه بر قطعات ژنومی اصلی، از بافت‌های آلوده گیاهی ناشی از نانوویروس‌ها، تعداد زیادی مولکول‌های دی‌ان‌ای حلقوی بنام قطعات آلفاستلایت نیز شناسایی و گزارش شده‌اند (Bridson et al. 2018). در مقایسه با نانوویروس‌ها، قطعات ژنومی DNA-U1، DNA-U2 و DNA-U4 در بابوویروس‌ها وجود ندارد ولی به جای آن‌ها قطعه DNA-U3 ششم ژنوم را تشکیل می‌دهد (Vetten et al. 2012).

تاکنون پنج نانوویروس شامل ویروس زردی بافت مرده باقلا (*Faba bean necrotic yellows virus*, FBNYV) (Alavinejad et al. 2011)، ویروس کوتولگی بافت مرده باقلا (*Faba bean necrotic stunt virus*, FBNSV) (Lotfipour et al. 2016)، ویروس مرتبط با کوتولگی زرد تلخه بیان (*sophora yellow stunt-associated virus*) (Heydarnejad et al. 2017)، ویروس کوتولگی سبزرده گون (*SYSaV milk vetch chlorotic dwarf virus*) (Hassan-Sheikhi et al. 2020) و ویروس

نانوویروس‌ها (ویروس‌های خانواده *Nanoviridae*)، ویروس‌هایی آیزومتریک به قطر ۲۰-۱۷ نانومتر و دارای ۶-۸ قطعه ژنوم دی‌ان‌ای تک لای حلقوی به اندازه تقریبی یک کیلو باز می‌باشند (Thomas et al. 2021) که از بیش از سه دهه قبل بعنوان یک گروه جدید از ویروس‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Chu and Helms 1988). اعضای این خانواده بر اساس ویژگی‌هایی مانند تعداد قطعات ژنوم، اندازه نسبی و محتوای ژنتیکی آن‌ها، دامنه میزبانی و نوع شته ناقل به دو جنس *Nanovirus* و *Babuvirus* تقسیم بندی می‌شوند (Thomas et al. 2021). نانوویروس‌ها (اعضای جنس *Nanovirus*) دارای هشت قطعه ژنومی به اندازه تقریبی ۰/۲-۹۲۳/۰۱ کیلو باز می‌باشند و به طور غالب گیاهان خانواده *Fabaceae* را آلوده می‌کنند. درحالی‌که بابوویروس‌ها دارای شش قطعه ژنومی به اندازه ۱/۱-۱ کیلو باز می‌باشند و تنها گیاهان تک لپه متعلق به خانواده‌های *Musaceae* و *Zingiberaceae* را آلوده می‌کنند. تمام نانو و بابوویروس‌های شناخته شده توسط شته‌ها با رابطه گردشی و پایا منتقل می‌شوند (Gronenborn and Vetten 2021; Vetten et al. 2012).

قطعات ژنومی نانوویروس‌ها شامل DNA-S، DNA-C، DNA-R، DNA-M، DNA-N، DNA-U1، DNA-U2 و DNA-U4 می‌باشند که هر کدام دارای یک چارچوب خوانش (open reading frame) اصلی هستند. قطعه DNA-S پروتئین پوششی (coat protein, CP) را رمزگذاری می‌کند که بطور جداگانه قطعات ژنومی را پوشش می‌دهد (Chu et al. 1993; Katul et al. 1997). قطعه DNA-C پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که clink نام

FBNYV از گیاه عدس از استان کرمان، با سایر جدایه‌های این ویروس از گیاهان و مناطق دیگر مقایسه شده است. علاوه بر این، دامنه میزبانی ویروس در سه استان فوق با تکثیر و تعیین ترادف قطعه DNA-S این ویروس مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه برداری و استخراج دی‌ان‌ای کل

در طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۹ از مزارع کاشت حبوبات و سبزیجات واقع در استان‌های کرمان، خراسان رضوی و خراسان شمالی بازدید گردید و نمونه‌های دارای علائم زردی، کوتولگی، ریزبرگی و یا پیچیدگی برگ شامل یونجه (*Medicago sativa* L., Fabaceae)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae)، عدس (*Lens culinaris* Medikus, Fabaceae)، باقلا (*Vicia faba* L., Fabaceae)، نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L., Fabaceae)، شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L., Fabaceae)، جعفری (*Petroselinum crispum* (Mill.), Fabaceae) و شوید (*Anethum graveolens* L., Apiaceae) جمع‌آوری گردید. دی‌ان‌ای کل نمونه‌ها با استفاده از روش CTAB و بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط ژانگ و همکاران (۱۹۹۸) استخراج گردید.

تشخیص ویروس و تکثیر ژنوم

تشخیص آلودگی نمونه‌ها به FBNYV با استفاده از آزمون واکنش زنجیره ای پلی‌مراس و آغازگرهای اختصاصی این ویروس که قادر به تکثیر طول کامل قطعه ژنومی DNA-S می‌باشد (جدول ۱) صورت گرفت. از میان جدایه‌هایی که آلودگی آن‌ها به FBNYV اثبات شده

مرتبط با کوتولگی شدید جعفری (-parsley severe stunt associated virus, PSSaV) (Hasanvand et al. 2021) از ایران گزارش شده‌اند. در میان نانویروس‌های گزارش شده، ویروس زردی بافت مرده باقلا اولین بار در سال‌های ۱۹۸۷ و ۱۹۸۸ از کشورهای واقع در غرب آسیا و شمال آفریقا گزارش گردید (Katul et al. 1993; Franz et al. 1995; Makkouk et al. 1994, 1998a, 1998b). در حال حاضر، این ویروس یکی از شایع‌ترین و مخرب‌ترین ویروس‌های حبوبات در سه قاره آسیا، آفریقا و اروپا می‌باشد (Lal et al. 2020b; Grigoras et al. 2014). اولین بار، FBNYV در سال ۲۰۰۲ با استفاده از روش‌های سرولوژیکی از گیاهان نخود ایرانی و عدس از پنج استان قزوین، کردستان، کرمانشاه، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی گزارش گردید (Makkouk et al. 2002). سپس این ویروس از گیاهان باقلا، لوبیا، یونجه، عدس، نخود و یا نخود فرنگی از استان‌های فارس، زنجان، گلستان، مازندران، اصفهان، مرکزی، البرز، لرستان، خوزستان و کهگیلویه و بویراحمد با استفاده از تعیین ترادف ژن رمزکننده پروتئین پوششی و/یا پروتئین حرکتی گزارش گردید (Alavinejad et al. 2011; Mansourpour et al. 2019).

بر اساس مطالعات قبلی، تاکنون شیوع FBNYV تنها در استان‌های واقع در غرب، شمال، مرکز و جنوب ایران مورد مطالعه قرار گرفته و تعیین ترادف برخی از قطعات ژنومی جدایه‌های این ویروس از گیاهان خانواده Fabaceae نیز انجام شده است (Alavinejad et al. 2011; Kraberger et al. 2002; Makkouk et al. 2018). در تحقیق حاضر، شیوع FBNYV در سه استان نوار شرقی ایران (استان‌های کرمان، خراسان رضوی و خراسان شمالی) مورد مطالعه قرار گرفته و ترادف تمام قطعات ژنومی یک جدایه از

جدول ۱. مشخصات جدایه‌ها، آغازگرها، طول قطعات ژنومی جدایه‌های ویروس زردی بافت مرده باقلا، به همراه درجه حرارت اتصال هر آغازگر در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مرز

Table 1. Characteristics of faba bean necrotic yellows virus isolates, primers, length of genome components and annealing temperature in PCR test

| Component | Primer name | Primer sequence (5'→3') | Length | Annealing temp (°C) |
|-----------|-------------|-----------------------------|-----------|------------------------|
| DNA-N | FBNYV-N-F | CAGTGTGAGCTTTAATGGTAGTTTC | 987 | 53 |
| | FBNYV-N-R | CAACTAACAAGTAACACCTTCCTTG | | |
| DNA-C | FBNYV-C-F | AGTTGCAGAAGGCATGTGTGTCG | 991 | 51 |
| | FBNYV-C-R | AACGACACATGCCTTCTGCAAC | | |
| DNA-S | FBNYV-S-F | GATGGCTCCTGGAGAGTTAG | 1002-1005 | 52 |
| | FBNYV-S-R | CTCAAMGTACATGTAAGCATCACC | | |
| DNA-M | FBNYV-M-F | GTCCTGAAAGAGAACGTAATTGGG | 994 | 51 |
| | FBNYV-M-R | CAGTAGCTTCAAATGGAGTTCTGG | | |
| DNA-R | FBNYV-R-F | CATGGGAGTATGGAGAGTTCG | 1003 | 53 |
| | FBNYV-R-R | GACCTTCAAGCCTTGTATCTTTCYTTC | | |
| DNA-U1 | FBNYV-U1-F | GATTCGTGGCTTGTGATGAGG | 998 | 56 |
| | FBNYV-U1-R | GCGAACTGGTGAAACAMCCATG | | |
| DNA-U2 | FBNYV-U2-F | CGTATGAAGCTTTCGATGAGAG | 998 | 50 |
| | FBNYV-U2-R | CCTAATCGACGGCATCTTATTTTC | | |
| DNA-U4 | FBNYV-U4-F | GCAAGTGGATACTGGTCCCCAC | 928 | 54 |
| | FBNYV-U4-R | TGGGGACCAGTATCCACTTGC | | |
| | Nano-R | CTTCACGAATCACAGATCCTG | | |

شروع چرخه‌ها، پنج دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و در نهایت نیز ده دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بعنوان تکمیل ساخته شدن قطعات در نظر گرفته شد. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و قطعات تکثیر شده در نمونه‌های انتخابی به اندازه تقریبی یک کیلو باز در ناقل pTZ57R (ThermoFisher Scientific, USA) و یا pTG19-T (Vivantis, Malaysia) vector و با کمک باکتری *Escherichia coli* نژاد XL1 blue همسانه‌سازی گردیدند و سپس پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش Sanger sequencing تعیین ترادف شدند. در نهایت، ترادف‌های ویرایش شده شامل هشت قطعه ژنومی مربوط به جدایه عدس (14A1) و شش قطعه DNA-S مربوط به شش جدایه از گیاهان لوبیا، باقلا، یونجه، شنبلله، شوید و جعفری در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند.

بود، بصورت تصادفی جدایه 14A1 از گیاه عدس جمع آوری شده از منطقه رابر کرمان انتخاب گردید و تمام قطعات ژنوم کامل این جدایه تکثیر گردید. برای این منظور، ابتدا مولکول‌های دی‌ان‌ای حلقوی موجود در نمونه با آنزیم فی ۲۹ دی‌ان‌ای پلیمرز (TempliPhi, GE Healthcare, USA) و روش دایره غلتان (rolling circle amplification, RCA) بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شپرد و همکاران (۲۰۰۸) غنی سازی گردید و از محصول آر سی‌ای بعنوان رشته الگو در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مرز استفاده شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی مرز شامل ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه دمای اختصاصی مربوط به اتصال هر جفت آغازگر (جدول ۱) به رشته الگو و یک دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به منظور گسترش ساخت قطعات انتخاب گردید. در ابتدای

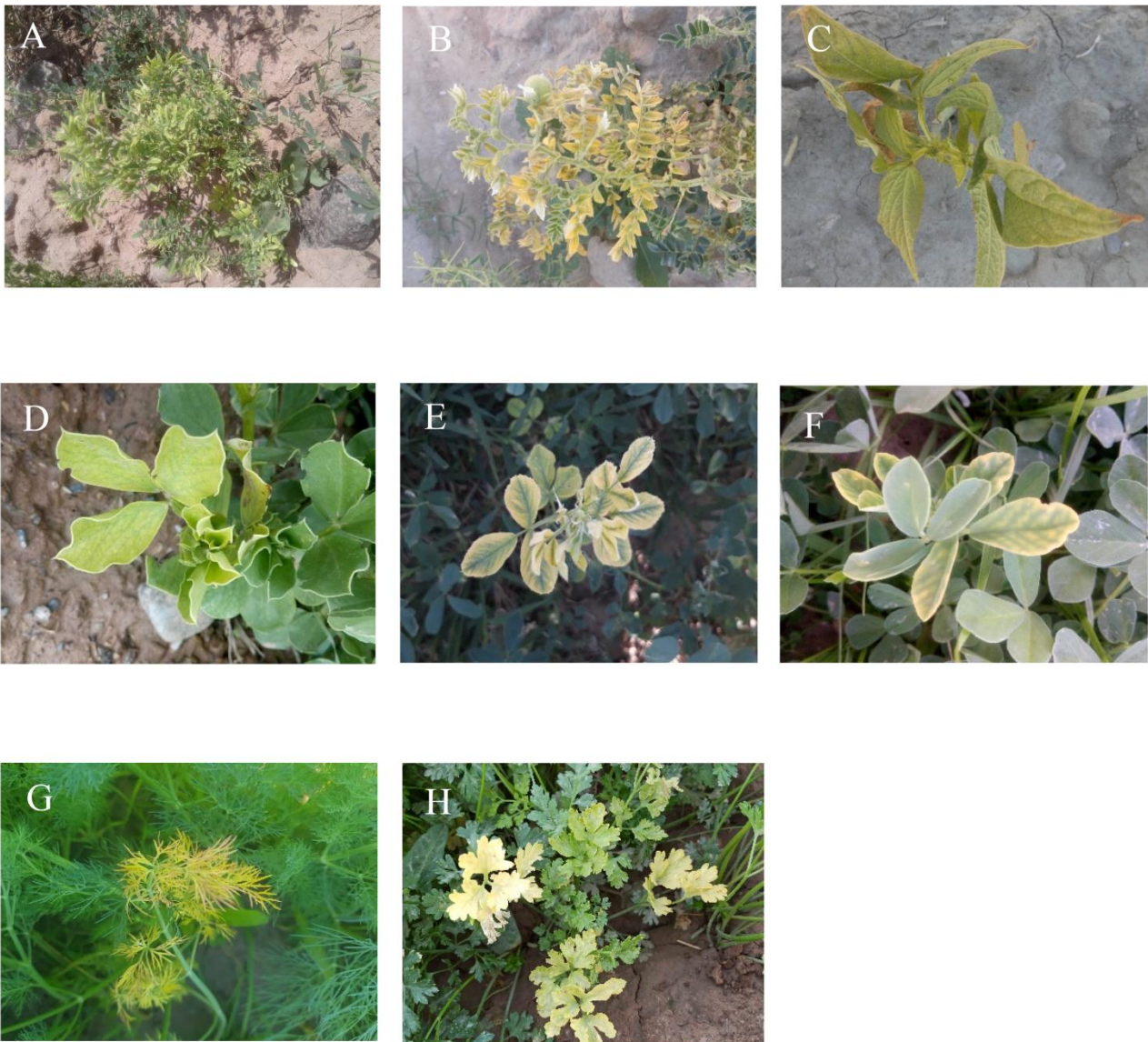
واکاوی ترادف‌ها

نتایج و بحث

در مجموع ۱۴ ترادف نوکلئوتیدی شامل هشت قطعه ژنومی FBNYV مربوط به جدایه عدس (14A1) و شش ترادف قطعه DNA-S مربوط به جدایه‌هایی از شش میزبان دیگر شامل باقلا، لوبیا، یونجه، شنبليله، جعفری و شوید بصورت تشابه دو به‌دوی نوکلئوتیدهای قطعات ژنومی با سایر ترادف‌های مربوط به جدایه‌های همین ویروس موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) با استفاده از نرم‌افزار SDT v 1.2 (Muhire et al. 2014) مقایسه گردید و میزان تشابه بین قطعات ژنومی متناظر در جدایه‌های مختلف FBNYV ثبت شد. بدلیل زیاد بودن تعداد ترادف‌های خارج از ایران، از هر منطقه یا ناحیه جغرافیائی، ترادف‌های مربوط به یک جدایه برای واکاوی و مقایسه انتخاب گردید. پس از آن، ترادف‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA X (Kumar et al. 2018) و بکارگیری روش MUSCLE (Edgar 2004) هم‌ردیف‌سازی شدند. سپس این ترادف‌ها به منظور رسم درخت فیلوژنتیکی به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood) و بر اساس مدل Tamura-nei و اعتبار سنجی (bootstrap) برابر ۱۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفتند. در مورد قطعات ژنومی DNA-S، DNA-C، DNA-R، DNA-، DNA-N و M برای رسم درخت فیلوژنتیکی، از ترادف قطعات ژنومی ویروس پرپشت شدن انتهائی موز (*Banana bunchy top virus, BBTV*) به‌عنوان مدل خارج گروه (outgroup) استفاده شد. در مورد قطعات ژنومی DNA-U1، DNA-U2 و DNA-U4 تنها از قطعات ژنومی مشابه از سایر نانویروس‌ها بعنوان مقایسه استفاده گردید.

بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون واکنش زنجیره ای پلی‌مراس و جفت آغازگر اختصاصی مربوط به قطعه DNA-S نشان داد که در مجموع هشت گیاه شامل نخود ایرانی، لوبیا، باقلا، عدس، یونجه، شنبليله، شوید و جعفری به FBNYV آلوده هستند و این ویروس یکی از عوامل ایجاد زردی و کوتولگی در حبوبات (نخود ایرانی، لوبیا، باقلا و عدس) می‌باشد (شکل ۱). از طرف دیگر، در میان نمونه‌های آلوده، آلودگی سبزیجات برگی شامل شنبليله از خانواده Fabaceae و به ویژه شوید و جعفری هر دو از خانواده Apiaceae جالب توجه بوده و برای اولین بار در دنیا گزارش می‌گردد. همچنین، بررسی نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون واکنش زنجیره ای پلی‌مراس و جفت آغازگر اختصاصی فوق نشان می‌دهد که شیوع FBNYV در گیاهان حبوبات در استان‌های خراسان رضوی و خراسان شمالی بیشتر از استان کرمان می‌باشد (جدول ۲). دلایل احتمالی این موضوع را می‌توان به شرایط آب و هوائی این سه استان، پوشش گیاهی تحت کشت در هر منطقه و/یا ژنتیک ارقام حبوبات کشت شده در این مناطق نسبت داد. سایر گیاهانی که علیرغم داشتن علائمی مانند زردی و/یا کوتولگی، آلودگی آن‌ها در این مطالعه به FBNYV اثبات نشد، ممکن است به سایر ویروس‌ها و یا حتی فیتوپلازماها آلوده باشند (Askari et al. 2018; Hasanvand et al. 2020; 2021; Salehi et al. 2016).

نتایج حاصل از بررسی دامنه میزبانی FBNYV در استان‌های واقع در نوار شرقی ایران نشان می‌دهد که این ویروس علاوه بر حبوبات، گیاهان دیگری در خانواده Fabaceae مانند یونجه و شنبليله و حتی خارج از این خانواده مانند شوید و جعفری را آلوده می‌کند (جدول ۲).



شکل ۱. گیاهان آلوده به ویروس زردی بافت مرده باقلا شامل (A) عدس (نمونه 14A1) با علائم زردی عمومی کل بوته؛ (B) نخود ایرانی با علائم زردی عمومی کل بوته و پیچیدگی خفیف حاشیه برگ ها؛ (C) لویبا با علائم کوتولگی و زردی عمومی؛ (D) باقلا با علائم زردی عمومی، لوله شدن و کوچک شدن برگ ها؛ (E) یونجه با علائم زردی حاشیه برگ ها و کوتولگی؛ (F) شنبلیله با علائم فنجان‌ی شدن و زردی حاشیه برگ ها؛ (G) شوید با علائم زردی شدید و پیچیدگی برگ ها و (H) جعفری با علائم فنجان‌ی شدن و زردی حاشیه برگ ها.

Fig. 1. FBNYV infected plants including A) lentil (14A1 sample) showing general yellowing; B) chickpea showing general yellowing and mild leaf curling; C) broad bean showing dwarfing and general yellowing; D) faba bean showing general yellowing, leaf curling and little leaves; E) alfalfa showing marginal leaf yellowing and dwarfing; F) Fenugreek marginal leaf yellowing and curling; G) dill showing severe yellowing and leaf curling and H) parsley showing mild leaf curling and leaf yellowing.

PSSaV بعنوان یک نانویروس جدید از یکی از سبزیجات برگی یعنی جعفری از ایران و آلمان گزارش

با وجود اینکه میزبان‌های اصلی نانویروس‌ها گیاهان خانواده Fabaceae هستند (Vetten et al. 2012)، اخیراً،

جدول ۲. نتایج ردیابی ویروس زردی بافت مرده باقلا در گیاهان خانواده *Fabaceae* و سبزیجات برگ‌ی در سال‌های ۲۰۲۰-۲۰۱۵

Table 2. Results of monitoring of faba bean necrotic yellows virus in leguminous plants and leaf vegetables in Kerman, Razavi Khorasan and Northern Khorasan provinces during 2015-2020

| Province | Samples | | | | | | | |
|-------------------|---------|--------|-----------|----------|----------|---------|--------|-----------|
| | Alfalfa | Bean | Faba bean | Lentil | Chickpea | Parsley | Dill | Fenugreek |
| Kerman | 2 (1) | 5 (0) | 52 (3) | 54 (3) | 30 (2) | 35 (5) | 10 (3) | 41 (4) |
| Razavi Khorasan | - | 35 (3) | 128 (14) | 143 (11) | 135 (13) | 28 (3) | 10 (1) | 10 (2) |
| Northern Khorasan | - | 27 (3) | 43 (5) | 63 (4) | 58 (4) | - | - | - |
| Total | 2 (1) | 67 (6) | 223 (22) | 260 (18) | 223 (19) | 63 (8) | 20 (4) | 51 (6) |

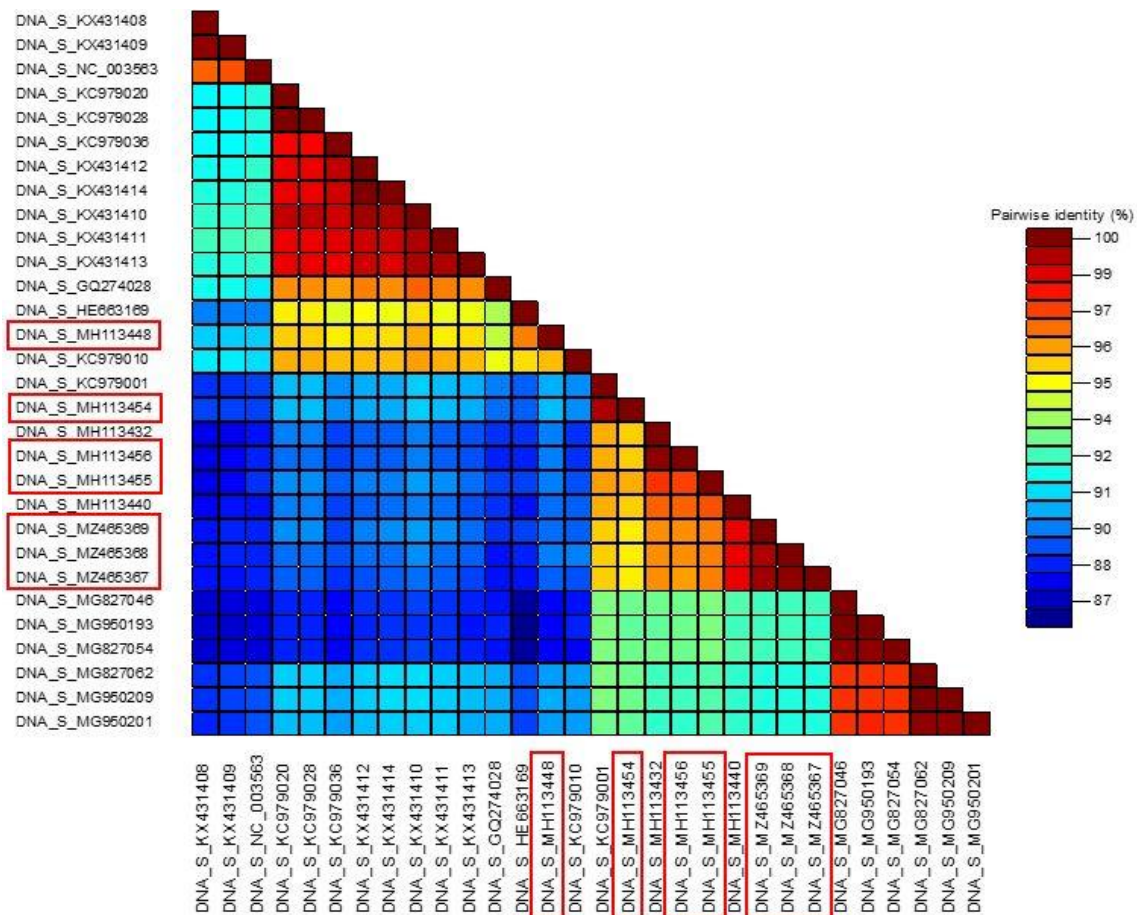
علامت -، نشان دهنده عدم نمونه برداری است

Symbol -, indicated that sampling has not been carried out

گردید و تنها ۹۲۸ نوکلئوتید از طول این قطعه در آزمون واکنش زنجیره ای پلی مرز تکثیر شد (جدول ۱). بعد از ویرایش ترادف‌های بدست آمده، اطلاعات مربوط به هشت قطعه ژنومی FBNYV مربوط به گیاه عدس (جدایه 14A1) از منطقه رابر استان کرمان و همچنین ترادف‌های قطعه DNA-S مربوط به سایر جدایه‌های این ویروس از شش گیاه دیگر، با رس شماره‌های MH113446-14A1 و MH113456-MZ465367-MZ465369 در بانک جهانی ژن ثبت گردید. در تمام ترادف‌های بدست آمده، ترادف حفاظت شده نونانوکلئوتید (TAGTATTAC)، یک چارچوب ژنی که حاوی کدون‌های شروع و خاتمه دهنده می‌باشند، دو سیگنال لازم برای شروع و خاتمه رونوشت برداری بترتیب بنام‌های تاتاباکس (TATA box) و پلی آدنیلشن (polyadenylation) شناسائی گردید. مقایسه دو به دوی ترادف نوکلئوتیدی قطعه DNA-S بین هفت گیاهی که در این مطالعه آلودگی آن‌ها به FBNYV اثبات شده بود، نشان داد که میزان شباهت آن‌ها بین ۸۹/۶ تا ۹۹/۷ درصد می‌باشد (شکل ۲). در میان این هفت جدایه از گیاهان مختلف، قطعه DNA-S مربوط به جدایه 14A1 (از گیاه عدس) به لحاظ شباهت ترادف نوکلئوتیدی، از بقیه جدایه‌ها متمایز است. میزان شباهت ترادف نوکلئوتیدی بین قطعه DNA-S مربوط به جدایه‌های مورد

شده است (Hasanvand et al. 2021; Vetten et al. 2019). علاوه بر این، برخی دیگر از نانویروس‌ها مانند ویروس کوتولگی گون و ویروس مرتبط با کوتولگی زرد تلخه بیان که میزبان‌های آن‌ها عمدتاً گیاهان لگومینوز هستند، از گیاهان خارج از خانواده Fabaceae نیز گزارش شده‌اند (Heydarnejad et al. 2019; Lal et al. 2020a). در مجموع، می‌توان گفت که بیماری‌های ویروسی در سبزیجات برگ‌ی، کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. با این وجود، اخیراً آلودگی گیاه جعفری به یک جمینی ویروس (Hasanvand et al. 2020) و یک نانویروس (Hasanvand et al. 2021) از جنوب شرقی ایران گزارش شده است. با توجه به نقش پررنگ سبزیجات برگ‌ی در رژیم غذایی مردم ایران، مطالعات بیشتری روی عوامل ایجادکننده زردی و کوتولگی در این گیاهان ضروری به نظر می‌رسد.

در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مرز، تمام قطعه ژنومی ویروس به غیر از DNA-U4 با آغازگرهای اختصاصی و همپوشان مربوط به این قطعه تکثیر و تعیین ترادف گردید. در تلاش مجدد برای تکثیر قطعه DNA-U4، از جفت آغازگرهای اختصاصی و غیرهمپوشان FBNYV-U4-R (TGG GGA CCA GTA TCC ACT TGC)/Nano-R (CTT CAC GAA TCA CAG ATC CTG) استفاده

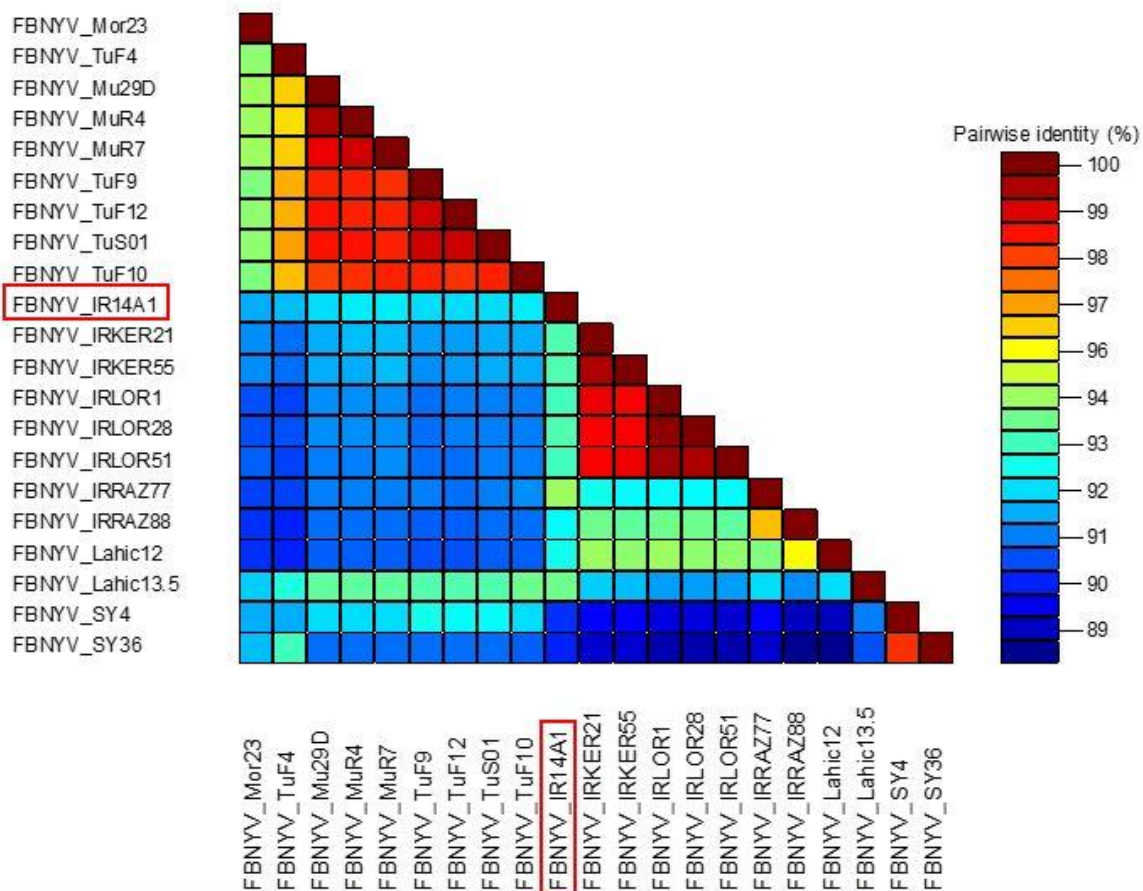


شکل ۲. مقایسه دو به دوی ترادف های نوکلئوتیدی قطعه DNA-S مربوط به هفت جدایه ویروس زردی بافت مرده باقلا از میزبان های مختلف (مستطیل های قرمز رنگ) با سایر جدایه های این ویروس موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار SDT v1.2.

Fig. 2. Pairwise identity color plot of the DNA-S component of the FBNYV genome recovered from different hosts (red rectangles) and that of other GenBank isolates of the virus using SDT v1.2 software.

جدایه IR-14A1 بترتیب با جدایه‌های IRRAZ77 و SY36 (از گیاهان عدس و باقلا؛ هر دو از ایران) به میزان ۹۴/۵۷ و ۹۰/۱۹ درصد می‌باشد. بررسی رابطه تبارزائی بین قطعات ژنومی جدایه IR-14A1 با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن (از ایران و سایر نقاط جهان) نشان می‌دهد که جدایه مورد مطالعه در این تحقیق، بیشتر به سایر جدایه‌های ایرانی همین ویروس که قبلاً از سایر نقاط ایران گزارش شده اند و یا جدایه‌های گزارش شده از کشور آذربایجان شباهت دارند (Grigoras et al. 2014; Mansourpour et al. 2019; Sokhansanj et al. 2018

مطالعه در این تحقیق و سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن بین ۸۷/۶ تا ۹۹/۹ درصد تعیین گردید. مقایسه دو به دوی ترادف نوکلئوتیدی تجمیع قطعات ژنومی (concatenated genome components) مربوط به جدایه 14A1 با ترتیب DNA-R، DNA-S، DNA-C، DNA-U4 و DNA-U2، DNA-U1، DNA-N، DNA-M با ترادف مشابه مربوط به سایر جدایه‌های همین ویروس که از ایران و یا سایر نقاط جهان گزارش شده اند، نشان داد که میزان شباهت آن‌ها بین ۸۸/۵۷ تا ۹۹/۸۱ می‌باشد (شکل ۳). همچنین، بیشترین و کمترین میزان شباهت

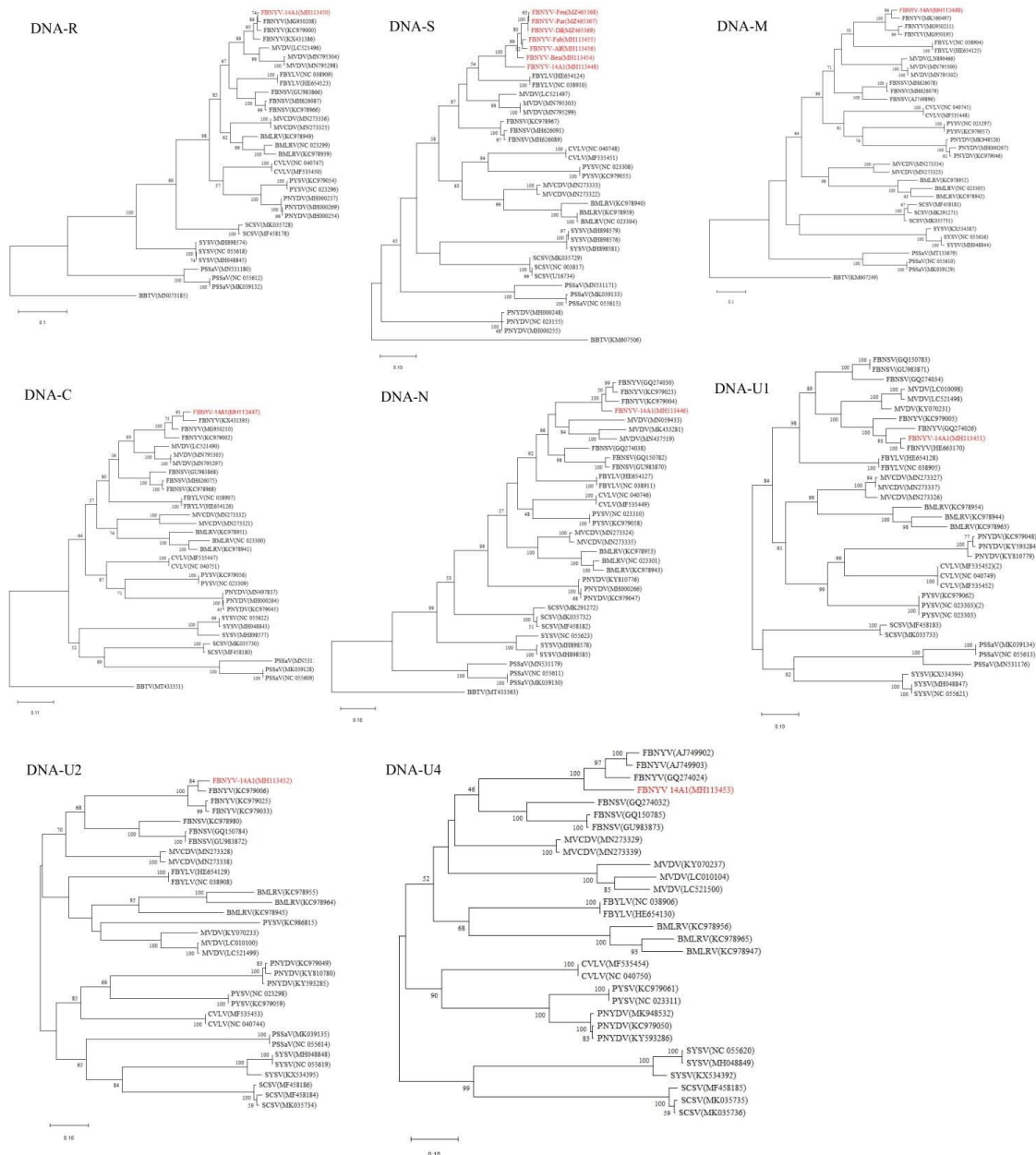


شکل ۳. مقایسه دو به دو ترادف نوکلئوتیدی تجمیع قطعات ژنومی مربوط به جدایه 14A1 ویروس زردی بافت مرده باقلا با ترتیب DNA-R, DNA-S, DNA-C, DNA-M, DNA-N, DNA-U1, DNA-U2 و DNA-U4 با ترادف مشابه سایر جدایه های این ویروس موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار SDT v1.2. جدایه مورد مطالعه در این تحقیق، در داخل مستطیل قرمز رنگ نشان داده شده است.

Fig. 3. Pairwise identity color plot of concatenated genome components of the 14A1 isolate of the FBNYV genome (red rectangle) in the order DNA-R, -S, -C, -M, -N, -U1, -U2 and -U4 and those of other GenBank isolates using SDT v1.2 software.

بیشترین تنوع ژنتیکی قطعه ژنومی DNA-M مربوط به این ویروس در زیرجمعیت مرکز ایران برآورد گردید. پیش از این مطالعه، وجود و/یا مشخصات ژنومی FBNYV فقط در استان‌های نوار غربی، شمالی، مرکزی و جنوبی ایران مورد بررسی قرار گرفته بود (Alavinejad et al. 2011; Kraberger et al. 2018; Makkouk et al. 2002). در این مطالعه، شیوع این ویروس در سه استان کرمان، خراسان رضوی و خراسان شمالی واقع در شرق

(شکل ۴). در مطالعات پیشین، تبارزائی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی FBNYV و سایر جدایه‌های این ویروس براساس ترادف نوکلئوتیدی قطعه DNA-M مورد مطالعه قرار گرفته است (Mansourpour et al. 2019). بر این اساس، تمام جدایه‌های FBNYV در سه شاخه مجزا قرار گرفتند و جدایه‌های ایرانی به همراه دو جدایه از کشور آذربایجان در یک زیر گروه مجزا طبقه‌بندی شدند. علاوه بر این، در بررسی تنوع ژنتیکی زیرجمعیت‌های FBNYV



شکل ۴. درخت فیلوژنتیکی رسم شده به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood) و بر اساس ترادف نوکلئوتیدی قطعات ژنومی DNA-C, -M, -N, -R, -S, -U1, -U2 و -U4 of FBNYV isolates in this study (shown in red color) and those of selected GenBank isolates. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and branches with <40% bootstrap support have been deleted. Counterpart sequences of genome components of *Banana bunchy top virus* (BBTV) were used as outgroup.

Fig. 4. Maximum likelihood phylogenetic tree using nucleotide sequence of eight genome components including DNA-C, -M, -N, -R, -S, -U1, -U2 and -U4 of FBNYV isolates in this study (shown in red color) and those of selected GenBank isolates. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and branches with <40% bootstrap support have been deleted. Counterpart sequences of genome components of *Banana bunchy top virus* (BBTV) were used as outgroup.

ایران است. علاوه بر این، آلودگی به این ویروس مختص به حبوبات نیست و سبزیجات برگ‌مانند شنبلیله، جعفری و شوید نیز توسط این ویروس آلوده می‌گردند.

ایران مورد بررسی قرار گرفت و مشخصات ژنومی برخی از جدایه‌های این ویروس در این نواحی تعیین گردید. بر اساس نتایج بدست آمده، FBNYV یکی از عوامل زردی و/یا کوتولگی در مناطق کاشت حبوبات در نواحی شرق

منابع

- Alavinejad E., Behjatnia S.A.A., Izadpanah K. and Masoumi M. 2011. Molecular detection of Faba bean necrotic yellows virus in legume fields of some North, North West and South provinces of Iran. The Proceeding of the 7th National Biotechnology Congress. Iran, Tehran. P. 6.
- Aronson M.N., Meyer A.D., Györgyey J., Katul L., Vetten H.J., Gronenborn B. and Timchenko T. 2000. Clink, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. *Jornal of Virology* 74: 2967-2972.
- Askari F., Heydarnejad J., Vaziri S., Sadeghi-Majd J., Kamali M. and Massumi H. 2018. *Chickpea chlorotic dwarf virus* a polyphagous mastrevirus infecting crops and vegetables in Iran. The Proceeding of the 23rd Iranian Plant Protection Congress, Iran, Gorgan. pp. 612-13.
- Briddon R.W., Martin D.P., Roumagnac P., Navas-Castillo J., Fiallo-Olivé E., Moriones E., Lett J.-M., Zerbini F.M. and Varsani A. 2018. Alphasatellitidae: A new family with two subfamilies for the classification of geminivirus- and nanovirus-associated alphasatellites. *Archives of Virology* 163: 2587-2600.
- Chu P.W.G., Keese P., Qiu B.S., Waterhouse P.M. and Gerlach W.L. 1993. Putative full-length clones of the genomic DNA segments of subterranean clover stunt virus and identification of the segment coding for the viral coat protein. *Virus Research* 27:161-171.
- Chu P.W.G. and Helms K. 1988. Novel virus-like particles containing circular single-stranded DNA associated with subterranean clover stunt disease. *Virology* 167: 38-49.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113.
- Franz, A., Makkouk K.M. and Vetten, H.J. 1995. Faba bean necrotic yellows virus naturally infects Phaseolus bean and cowpea in the coastal area of Syria. *Journal of Phytopathology* 143(5):319-320.
- Grigoras I., Ginzo A.I., Martin D.P., Varsani A., Romero J., Mammadov A., Huseynova I.M., Aliyev J.A., Kheyr-Pour A., Huss H., Ziebell H., Timchenko T., Vetten H.J. and Gronenborn B. 2014. Genome diversity and evidence of recombination and reassortment in nanoviruses from Europe. *Jornal of General Virology* 95: 1178-1191.
- Gronenborn B. and Vetten H.J. 2021. Nanoviruses (Nanovoridae). pp 470-480. In: D. Bamford and M. Zuckerman (Eds.). *Encyclopedia of Virology*. 4th edition, Vol 3, Elsevier/Academic Press, London.
- Hasanvand V., Heydarnejad J., Massumi H., Kleinow T., and Jeske H., and Varsani A. 2020. Isolation and characterization of a novel geminivirus from parsley. *Virus research* 286: 1-6.
- Hasanvand V., Heydarnejad J., Massumi H., Kleinow T., Jeske H., Fontenele R.S., Kraberger S., and Varsani A. 2021. Genome characterization of parsley severe stunt associated virus in Iran. *Virus Genes* 57: 293-301.
- Hassan-Sheikhi P., Heydarnejad J., Massumi H., Kraberger S. and Varsani A. 2020. Novel nanovirus and associated alphasatellites identified in milk vetch plants with chlorotic dwarf disease in Iran. *Virus Research* 276: 197830.
- Heydarnejad J., Kamali M., Massumi M., Kvarnheden A., Male M.M., Stainton D., Kraberger S. Martin D.P. and Varsani A. 2017. Identification of a nanovirus-alphasatellite complex in *Sophora alopecuroide*. *Virus Research* 235: 24-32.
- Heydarnejad J., Hassan-Sheikhi P., Bagheri S., Sadeghi-Majd J., Avish-Koohshahi A. 2019. Natural hosts and transmission of Sophora yellow stunt-associated virus. *Iranian Journal of Plant Pathology* 54:291-303.
- Katul L., Maiss E., Morozov S.Y. and Vetten H.J. 1997. Analysis of six DNA components of the faba bean necrotic yellows virus genome and their structural affinity to related plant virus genomes. *Virology* 233: 247-259.

- Katul, L., Vetten H.J., Maiss E., Makkouk, K.M. Lesemann D.E. and Casper R. 1993. Characteristics and serology of virus-like particles associated with faba bean necrotic yellows. *Annals of Applied Biology* 123: 629-647.
- Kraberger S., Kumari S.G., Najar A., Stainton D., Martin D.P. and Varsani A. 2018. Molecular characterization of faba bean necrotic yellows viruses in Tunisia. *Archives of Virology* 163(3): 687-694.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549.
- Lal A., Kil E.-J., Thuy V.T.B., Fadhila C., Ho P.T., Byun H.-S., Dao H.T., Kim J.-K. and Lee S. 2020a. Milk vetch dwarf virus infection in the Solanaceae and Caricaceae families in Southeast Asia. *Plant Pathology* 69: 1026-1033.
- Lal A., Vo T.T.B., Sanjaya I.G.N.P.W., Ho P.T., Kim J.K., Kil E.J. and Lee S. 2020b. Nanovirus disease complexes: An emerging threat in the modern era. *Frontiers in Plant Science* 11:558403. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.558403>
- 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* 54: 503-517.
- Makkouk K.M., Rizkallah L., Madkour M., EL-Sherbeeney M., Kumari S.G., Amriti A.W. and Sohl M.B. 1994. Survey of faba bean (*Vicia faba* L.) for viruses in Egypt. *Phytopathologia Mediterranea* 33(3): 207-211.
- Makkouk K.M., Muhammad B.M. and Jonens, R. 1998a. First record of Faba bean necrotic yellows virus and Beet western yellows luteovirus affecting lentil and chickpea in Pakistan. *Plant Disease* 5:591.
- Makkouk K.M., Katul L., Kumari S.G. and Vetten H.J. 1998b. Characterization and control of faba bean necrotic yellows nanovirus affecting legume crops in west Asia and North Africa. In: *Proceedings of the Eighth Turkish Phytopathological Congress*. Turkey, Ankara University. pp 210-217.
- Makkouk K.M., Fazlali Y. Kumari S.G. and Farzadfar S. 2002. First record of Beet western yellows virus, Chickpea chlorotic dwarf virus, Faba bean necrotic yellows virus and Soybean dwarf virus infecting chickpea and lentil crops in Iran. *Plant Pathology* 51: 387-387.
- Mansourpour M., Dizadji A. and Abbasi A. 2019. Phylogeny, genetic diversity and population structure of Faba bean necrotic yellows virus based on the nucleotide sequence of DNA-M. *Iranian Journal of Plant Pathology* 55(2): 161-176.
- Muhire B.M., Varsani A. and Martin D.P. 2014. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One* 9 (9): e108277.
- Salehi M., Esmailzadeh Hosseini S.A., Salehi E., Bertaccini A. 2016. Occurrence and characterization of a 16SrII-D subgroup phytoplasma associated with parsley witches' broom disease in Iran. *Journal of Phytopathology* 164:996-1002.
- Shepherd D.N., Martin D.P., Lefeuvre P., Monjane A. L., Owor B.E., Rybicki E.P. and Varsani A. 2008. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *Journal of Virological Methods* 149: 97-102.
- Sokhansanj Y. Bananej K., Rakhshandehroo F. and Ahoonmanesh A. (2018). Molecular characterization of three Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV) isolates, originated from chickpea in Iran. *Applied Entomology and Phytopathology* 86(1): 75-90
- Thomas J.E., Gronenborn B., Harding R.M., Mandal B., Grigoras I., Randles J.W., Sano Y., Timchenko T., Vetten H.J., Yeh H.H., Ziebell H., ICTV Report Consortium. 2021. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Nanoviridae*. *Journal of General Virology* (in press). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001544>
- Timchenko T., de Kouchkovsky F., Katul L., David C., Vetten H.J. and Gronenborn B. 1999. A single Rep protein initiates replication of multiple genome components of faba bean necrotic yellows virus, a single-stranded DNA virus of plants. *Jornal of Virology* 73: 10173-10182.
- Timchenko T., Katul L., Sano Y., de Kouchkovsky F., Vetten H.J. and Gronenborn B. 2000. The master Rep concept in nanovirus replication: Identification of missing genome components and potential for natural genetic reassortment. *Virology* 274: 189-195.
- Vetten H.J., Dale J.L., Grigoras I., Gronenborn B., Harding R., Randles J.W., Sano Y., Thomas J.E., Timchenko T. and Yeh H.H. 2012. *Nanoviridae*, pp. 395-404. In: A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J.

- Lefkowitz, (Eds). Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses/Elsevier, Academic Press, London.
- Vetten H.J., Knierim D., Rakoski M.S., Menzel W., Maiss E., Gronenborn B., Winter S. and Krenz B. 2019. Identification of a novel nanovirus in parsley. Archives of Virology 164: 1883-1887.
- Wanitchakorn R., Hafner G.J., Harding R.M. and Dale J.L. 2000. Functional analysis of proteins encoded by banana bunchy top virus DNA-4 to -6. Journal of General Virology 81: 299-306.
- Zhang Y.P., Uyemoto J.K. and Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. Journal of Virological Methods 71: 45-50.