CC BY

مقاله پژوهشی

ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی: میزبان‌های طبیعی و مشخصات ژنوم یک جدایه از ویروس در شرق و جنوب ایران*

فرینوش عسکری[۱]، جهانگیر حیدرنژاد[۲]، ساناز وزیری[۱]، مریم اسماعیلی[۳] و حسین معصومی[۲]**

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۹)

چکیده

ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی (*Chickpea chlorotic dwarf virus*, CpCDV) از جنس *Mastrevirus* و خانوادهٔ *Geminiviridae* در طبیعت دارای دامنهٔ میزبانی بسیار گسترده‌ای است. علیرغم دارا بودن قابلیت ایجاد خسارت توسط این ویروس، هنوز مطالعه‌ای روی آن در مناطق شرق و جنوب ایران صورت نگرفته است. در این تحقیق، میزبان‌های طبیعی این ویروس در گیاهان خانوادهٔ Fabaceae در استان‌های کرمان، خراسان رضوی و فارس مورد بررسی قرار گرفته است و ویژگی‌های ژنوم کامل یک جدایه از گیاه نخود ایرانی (جدایهٔ شمارهٔ ۱۵) از منطقهٔ رابر استان کرمان تعیین گردیده است. بدین منظور، گیاهان زراعی از چند نقطه واقع در این سه استان جمع آوری گردید و آلودگی آن‌ها با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که چندین گیاه لگومینوز شامل انواع حبوبات، سبزیجات، گیاهان علوفه‌ای و وحشی به CpCDV آلوده هستند. ترادف نوکلئوتیدی مربوط به جدایهٔ نخود ایرانی از منطقهٔ رابر استان کرمان تعیین شد و با ترادف‌های مشابه در بانک ژن مقایسه گردید. همچنین، سازهٔ عفونت زای ویروس طراحی و ساخته شد و در آزمایش‌های بیماری زائی قادر به ایجاد بیماری در گیاهان مایه کوبی شده گردید. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که CpCDV در ایران دارای دامنهٔ میزبانی وسیعی در میان گیاهان خانوادهٔ Fabaceae است. گیاهان شنبلیله، اسپرس، یونجه و تلخه بیان برای اولین بار به عنوان میزبان‌های جدید این ویروس در ایران معرفی می‌گردند.

کلیدواژه: گیاهان لگومینوز، مستری ویروس، ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی

---

* قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید با هنر 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.

DOI: 10.22034/ijpp.2021.535291.363

Research Article

Chickpea chlorotic dwarf virus: natural hosts and genome characterization of an isolate in eastern and southern Iran*

F. Askari[1], J. Heydarnejad[2], S. Vaziri[1], M. Esmaeili[3], and H. Massumi[2]**

(Received: 4.8.2021; Accepted: 10.12.2021)

Abstract

Chickpea chlorotic dwarf virus (CpCDV) (*Mastrevirus*, *Geminiviridae*) has a wide natural host range. Despite of possessing the potential loss, until now the virus has not been studied in eastern and southern Iran. In this research, natural leguminous hosts of CpCDV in Kerman, Razavi Khorasan and Fars provinces were studied and the full-length genome of a chickpea isolate from Rabor (Kerman province) was characterized. Samples were collected from leguminous plants in different regions of the three aforementioned provinces and the CpCDV infection was tested in PCR. Results showed that leguminous plants including pulse, vegetables, foliage and wild species have been infected with the virus. The full-length genome of the Rabor isolate of CpCDV was sequenced and the resulted sequence was compared with the sequences of similar isolates available in the GenBank. Furthermore, the infectious clone of CpCDV was constructed and agroinoculated into some plants. Thus, the pathogenesis of the virus was demonstrated. Collectively, the results of this study indicated that CpCDV has a wide natural host range in the family Fabaceae. Fenugreek, common sainfoin, alfalfa and sophora are reported as the new hosts of the virus in Iran.

Keywords: Chickpea chlorotic dwarf virus, Leguminous plants, *Mastrevirus*

* A part of MSc. thesis of the first 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.

مقدمه

جمینی ویروس‌ها از نظر تعداد دومین گروه بزرگ ویروس‌های گیاهی محسوب می‌شوند و بر اساس ویژگی‌های حشرهٔ ناقل، دامنهٔ میزبانی و ساختار ژنوم به ١٤ جنس شامل *Becurtovirus*، *Begomovirus*، *Eragovirus*، *Curtovirus*، *Topocovirus*، *Turncurtovirus*، *Mastrev-irus*، *Capulavirus*، *Grablovirus*، *Citlodavirus*، *Ma-ldovirus*، *Mulcrilevirus*، *Opunvirus* و *Topilevirus* تقسیم بندی می‌گردند (Roumagnac *et al.* 2021). ژنوم آن‌ها از یک یا دو قطعه دی ان ای ای تک لایه به اندازهٔ ۲/۵-۵/۲ کیلو باز تشکیل شده است که در داخل پیکره‌های دوقلو و آیزومتریک به ابعاد ۳۸×۲۲ نانومتر بسته بندی می‌گردد (Brown *et al.* 2012).

جنس *Mastrevirus* از نظر تعداد، دومین جنس در خانوادهٔ *Geminiviridae* می‌باشد (Zerbini *et al.* 2017) و CpCDV یکی از مهم ترین ویروس‌های این جنس است (Kanakala and Kuria 2018) که اولین بار در دههٔ ۱۹۷۰ از هند (Horn 1994) گزارش گردید. باوجودیکه بیشتر اعضای جنس *Mastrevirus* گیاهان تک لپه را آلوده می‌کنند، میزبان‌های CpCDV و سه گونهٔ دیگر این جنس گیاهان دو لپه هستند (Brown *et al.* 2012). انتقال ویروس توسط زنجرک *Orosius albicinctus* (Distant) با نام قبلی *O. orientalis* به روش پایا و گردشی صورت می‌گیرد (Horn *et al.* 1993). ژنوم CpCDV همانند سایر مستری ویروس‌ها تک بخشی و دارای چهار چارچوب خوانش باز (open reading frame, ORF) است که دو عدد از آن‌ها (V1 و V2) روی رشتهٔ ویروسی و دوتای دیگر (C1 و C2) روی رشتهٔ مکمل قرار گرفته است. پدیدهٔ پیرایش (splicing) در چارچوب‌های خوانش C1 و C2 باعث رمزگذاری پروتئین همراه با همانند سازی (replication-associated protein, Rep) شده که به همراه پروتئین RepA در فرآیند تکثیر ژنوم ویروس بکار گرفته می‌شوند (Kanakala and Kuria 2018).

بیماری کوتولگی زرد نخود ایرانی (chickpea chlorotic dwarf disease, CpCDD) که CpCDV یکی از مهم ترین عوامل ایجادکنندهٔ آن است، یکی از بیماری‌های شایع این گیاه در برخی از کشورهای آسیائی و آفریقائی است و میزان خسارت ناشی از آن تا ۹۵-۷۵ درصد محصول تخمین زده می‌شود (Horn *et al.* 1995). تا قبل از یک دههٔ اخیر، آلودگی‌های ناشی از CpCDV تنها از گیاهان خانوادهٔ Fabaceace گزارش شده بود. با وجود این، در سال‌های اخیر، بسیاری از مهمترین محصولات زراعی مانند انواع کدوئیان، گوجه فرنگی، فلفل، چغندرقند و بسیاری دیگر از گیاهان (در مجموع از ۱۱ خانوادهٔ مختلف) به عنوان میزبان‌های این ویروس از نقاط مختلف دنیا گزارش شده اند. ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی دارای تنوع ژنتیکی بالائی است. بر اساس معیارهای کمیتهٔ بین المللی طبقه بندی ویروس‌ها (ICTV)، درصد یکسان بودن ترادف ژنوم کامل به منظور تقسیم بندی جدایه‌های مربوط به مستری ویروس‌ها به سویه‌های مختلف، ٩٤ درصد تعیین گردیده است (Muhire *et al.* 2013). بر این اساس، تاکنون ۱۹ سویه (از CpCDV-A تا CpCDV-S) برای این ویروس شناخته شده است (Kanakala and Kuria 2018). شاید به دلیل تنوع ژنتیکی بالای CpCDV است که دامنهٔ میزبانی وسیع ویروس تا مدت‌ها ناشناخته باقی مانده بود.

در مطالعات انجام شده روی این ویروس در ایران، برای اولین بار فرزادفر و همکاران، CpCDV را از چغندرقند جدا کرده و ضمن تعیین ترادف بخشی از ژنوم

جدایهٔ چغندرقند، زنجرک ناقل آن را در ایران معرفی کردند (Farzadfar *et al*. 2008). در یک مطالعه دیگر، نه جدایه از این ویروس از مناطق غربی ایران به همراه سایر جدایه‌هائی از نقاط مختلف دنیا مورد مطالعه و بررسی فیلوژنتیکی قرار گرفته است (Kraberger *et al*. 2015). اخیرا نیز تنوع ژنتیکی و آلودگی نخود ایرانی، عدس و باقلا به CpCDV از مناطق غرب و مرکز ایران بررسی شده است (Shahmohammadi *et al*. 2020).

علیرغم اهمیت گیاهان لگومینوز و نقش آن‌ها در تغذیهٔ انسان و دام (Singh and Saxena 1999) و همچنین اهمیت و گسترش CpCDV (Kanakala and Kuria 2018)، هنوز وضعیت این ویروس در مناطق شرقی و جنوبی ایران مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این تحقیق، میزبان‌های این ویروس در گیاهان خانوادهٔ Fabaceace در سه استان کرمان، خراسان رضوی و فارس مورد مطالعه قرار گرفته و ویژگی‌های ژنوم کامل یک جدایه از آن از منطقهٔ رابر استان کرمان بعد از تعیین ترادف، مورد مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه برداری و استخراج دی اِن اِی کل

در طی سال‌های ۱۳۹٦ و ۱۳۹۷ نمونه برداری از مزارع کاشت حبوبات یا گیاهان علوفه‌ای خانوادهٔ Fabaceace واقع در سه استان کرمان، خراسان رضوی و فارس انجام شد و نمونه‌های دارای علائم کوتولگی، زردی و/یا ریزبرگی شامل نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L.)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.)، عدس (*Lens culinaris* Medikus)، باقلا (*Vicia faba* L.)، شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)، یونجه (*Medicago sativa* L.)، لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)، تلخه بیان (*Sophora alopecuroides* L.) و اسپرس (*Onobrychis viciifolia* Scop.) جمع آوری گردیدند (جدول ۱). به منظور بررسی آلودگی نمونه‌ها به CpCDV، دی اِن اِی کل آن‌ها به روش CTAB و دستورالعمل ارائه شده توسط Zhang *et al*. (1998) استخراج گردید.

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص آلودگی نمونه‌های گیاهی جمع آوری شده به CpCDV بکار گرفته شد. برای طراحی آغازگرها، ژنوم ۲۰ جدایه از ویروس مربوط به ایران و برخی ازکشورهای منطقه شامل سوریه و پاکستان، موجود در بانک ژن با یکدیگر هم ردیف سازی و مقایسه شدند و سپس یک جفت آغازگر با نام و ترادف CpCDV-752-F (AAT CGT TGC AGG TGG CAA CCT)/CpCDV-326-R (CAC CAA CAA TGT AAA GGG CTC C) از بخش‌های حفاظت شدهٔ ژنوم که قادر به تکثیر یک قطعهٔ ۵۵۵ جفت بازی از ژن رمزکنندهٔ پروتئین پوششی می‌باشد، برای آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز طراحی گردید. برنامهٔ واکنش زنجیره‌ای پلی مراز شامل پنج دقیقه واسرشته سازی اولیه در درجه حرارت ۹٤°C و سی چرخهٔ مجزا هر کدام شامل واسرشته سازی به مدت سی ثانیه در درجه حرارت ۹٤°C، اتصال آغازگرها به مدت ٤۵ ثانیه در درجه حرارت ۵٤°C، یک دقیقه ساخته شدن رشته‌ها در درجه حرارت ۷۲°C و در نهایت تکمیل ساخت قطعات در درجه حرارت ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انتخاب گردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز گردید.

جدول ۱. محل و تعداد نمونه های جمع آوری شده از گیاهان خانوادهٔ Fabaceace، تعداد نمونه های آلوده در آزمون واکنش زنجیره ای پلی مراز و درصد آلودگی به ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی در شرق و جنوب ایران.

Table 1. Location and number of plant samples (family Fabaceace), number of CpCDV infected samples in the PCR test and percentage of the infection of leguminous plants to chickpea chlorotic dwarf virus in eastern and southern Iran.

Plant common name (scientific name)	Location (Province)	No. of collected samples	No. of PCR positive samples	Percentage of the infection
Faba bean (*Vicia faba* L.)	Khorasan Razavi	10	1	10%
"	Fars	2	0	0%
Chickpea (*Cicer arietinum* L.)	Kerman	14	3	21.42%
"	Khorasan Razavi	15	8	53.33%
Lentil (*Lens culinaris* Medikus)	Khorasan Razavi	26	8	30.76%
"	Kerman	20	3	15%
Alfalfa (*Medicago sativa* L.)	Kerman	5	1	20%
"	Khorasan Razavi	10	3	30%
"	Fars	2	2	100%
Common sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.)	Kerman	1	1	100%
Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)	Khorasan Razavi	1	1	100%
Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)	Khorasan Razavi	10	2	20%
Sophora (*Sophora alopecuroides* L.)	Kerman	5	1	20%
Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*)	Khorasan Razavi	28	6	20%

تکثیر طول ژنوم کامل ویروس

از میان جدایه‌هائی که آلودگی آن‌ها به CpCDV اثبات شده بود، جدایهٔ ۱۵ با نام کامل IR:Rab:15:chi:16 از گیاه نخود ایرانی که از منطقهٔ رابر استان کرمان جمع آوری شده بود انتخاب شده و ژنوم کامل این جدایه تکثیر گردید. برای این منظور، ابتدا مولکول‌های دی ان ای حلقوی موجود در نمونه با آنزیم فی ۲۹ دی ان ا پلیمراز (TempliPhi, GE Healthcare, USA) و روش دایرهٔ غلتان (rolling circle amplification, RCA) بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط *شپرد و همکاران* (۲۰۰۸) غنی سازی گردید. به منظور بررسی جایگاه‌های برشی موجود بر روی قطعات تکثیر یافته از آنزیم‌های برشی *Eco*RI، *Bam*HI، *Xho*I و *Hind*III برای برش محصول RCA استفاده شد. با توجه به اندازهٔ قطعات مشاهده شده بعد از برش آنزیمی و با مقایسهٔ آن با نزدیک ترین جدایه‌های موجود در بانک ژن، آنزیم *Hind*III برای به دست آوردن طول واحد ژنوم ویروس جهت انجام همسانه سازی، مناسب تشخیص داده شد. سپس ژنوم کامل ویروس در پلاسمید pGreen0029 (Hellens *et al.* 2000) که با همین آنزیم بریده شده بود، همسانه سازی گردید. پلاسمید نوترکیب حاصل، استخراج شده و ژنوم ویروس از هر دو طرف با روش سنگر توسط شرکت بیونیر کره جنوبی تعیین ترادف شد. ترادف‌های بدست آمده از قسمت‌های مختلف ژنوم ویرایش گردید و بعد از

کنار هم قرار دادن آن‌ها، ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل ویروس با رس شمار MN699955 (accession number) در بانک ژن ثبت گردید.

ساخت همسانهٔ عفونت زا

به منظور ساخت همسانهٔ آلوده کنندهٔ ویروس، از روش قرار دادن دو طول ژنوم کامل ویروس در داخل پلاسمید pGreen0029 (Hellens *et al.* 2000) استفاده شد. برای این منظور، پلاسمید نوترکیب حاصل با آنزیم *Hind*III بریده شد و ژنوم کامل CpCDV جدایهٔ IR:Rab:15:chi:16 از ژل آگاروز یک درصد استخراج گردید. واکنش اتصال با استفاده از ژنوم ویروس و پلاسمید pGreen0029 که قبلا با همین آنزیم بریده شده بود، صورت گرفت و بعد از انجام transformation، از میان کلنی‌های بدست آمده، کلنی مورد نظر که حاوی دو طول ژنوم کامل ویروس در داخل پلاسمید می‌باشد، شناسائی شد. برای این منظور، پلاسمیدهای استخراج شده با آنزیم‌های برشی *Eco*RI، *Kpn*I و *Hind*III که تنها دارای یک جایگاه برش برروی ژنوم ویروس بودند، بریده شده و نتایج بدست آمده به منظور تشخیص وجود دایمر در داخل پلاسمید، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

به منظور اثبات بیماری زائی، سازهٔ ساخته شده به همراه پلاسمید pSoup به سلول‌های مستعد آگروباکتریوم (با نام جدید *Rhizobium radiobacter*) (Young *et al.* 2001) نژاد C58 به روش ذوب و انجماد (Boulton 2008) منتقل گردید. سلول‌های باکتری حاوی سازهٔ عفونت زا در محیط جامد ال بی (LB broth) حاوی آنتی بیوتیک ریفامپیسین (۵۰ $\mu g\ ml^{-1}$) و کانامایسین (۳۰ $\mu g\ ml^{-1}$) کشت گردیدند و بعد از برداشت، سلول‌ها در یک میلی لیتر آب مقطر استریل به حالت تعلیق در آورده شدند. از طرف دیگر، بذر گیاهان نخود ایرانی و لوبیا در گلدان کاشته شد و سلول‌های باکتری از منطقهٔ ساقه به گیاهچه‌های سه برگی مایه زنی (agroinoculation) شدند (Grimsley *et al.* 1986). به منظور مقایسه، تعدادی گیاهچهٔ نخود ایرانی نیز با سلول‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمیدهای pGreen0029 (بدون سازه) و pSoup مایه کوبی شدند. گیاهان مایه کوبی شده به مدت دو ماه در شرایط گلخانه با درجه حرارت ۲۵°C نگهداری شدند. سپس دی ان ای کل از برگ‌های جدید و غیر مایه کوبی شده با استفاده از روش CTAB استخراج گردید و آلودگی یا عدم آلودگی آن‌ها با آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و آغازگرهای CpCDV-752-F/CpCDV-1326-R مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکاوی ترادف‌ها

ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایهٔ ۱۵ نخود ایرانی مربوط به ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی با سایر ترادف‌های موجود در بانک جهانی ژن شامل سایر جدایه‌های ایرانی، جدایه‌های سوری و جدایه‌هائی از کشور همسایه یعنی پاکستان مقایسه گردید. پس از آن، ترادف‌های موجود با استفاده از نرم افزار MEGAX (Kumar *et al.* 2018) و بکارگیری روش ClustalW هم ردیف سازی شدند. ترادف‌های هم ردیف سازی شده برای رسم درخت فیلوژنتیکی به روش اتصال مجاور (neighbor-joining, NJ) با استفاده از مدل Jukes-Canter و اعتبار سنجی (bootstrap) برابر ۱۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفتند. برای رسم درخت فیلوژنتیکی، از ترادف ژنوم یک جدایه از ویروس رگه‌ای ذرت با رس شمار X01633 به عنوان مدل خارج گروه (outgroup) استفاده شد. به علاوه، تشابه دو به دوی نوکلئوتیدهای ژنوم کامل جدایه موردنظر

با سایر جدایه‌ها، با استفاده از نرم افزار SDT v 1.2 (Muhire *et al.* 2014) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

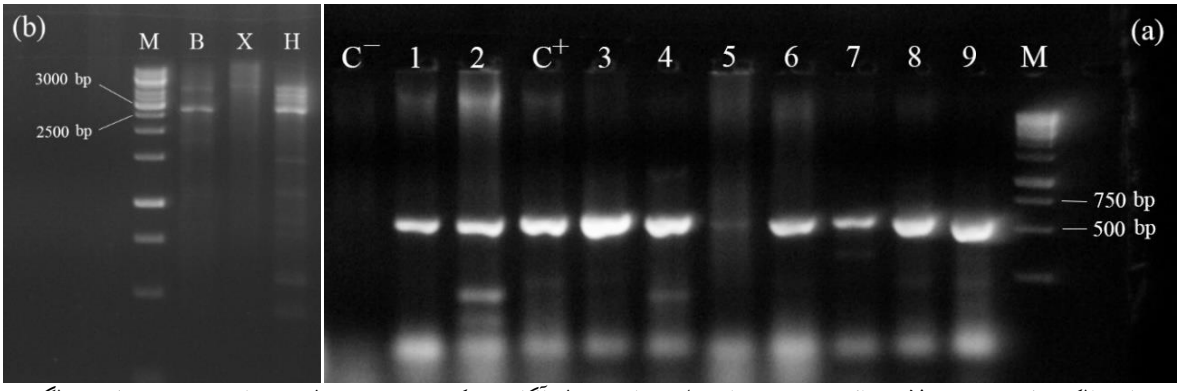
نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی تعیین آلودگی نمونه‌های جمع آوری شده از گیاهان خانوادهٔ Fabaceace مربوط به سه استان کرمان، خراسان رضوی و فارس به CpCDV با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نشان داد که گیاهان نخود ایرانی (شکل 1a)، لوبیا (شکل 1b)، عدس (شکل 1c)، باقلا (شکل 1d)، شنبلیله (شکل 1e)، یونجه (شکل 1f)، لوبیا چشم بلبلی (شکل 1g)، تلخه بیان (شکل 1h) و اسپرس (شکل 1i) با علائم کوتولگی، زردی، پیچیدگی برگ و/یا ریزبرگی به این ویروس آلوده می‌باشند (جدول ۱). در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مربوط به نمونه‌های آلوده، قطعهٔ قابل انتظار (۵۵۵ جفت بازی) در ژل آگاروز یک درصد تکثیر گردید؛ در حالیکه هیچ قطعه‌ای برای نمونهٔ سالم (یونجهٔ گلخانه) تکثیر نشد (شکل 2a). با توجه به مساوی نبودن تعداد نمونه‌های جمع آوری شده در گیاهان مختلف، نمی‌توان درصد آلودگی در گیاهان مختلف را با یکدیگر مقایسه نمود. با وجود این، در یک بررسی کلی، بیشترین درصد آلودگی مربوط به دو گیاه نخود ایرانی و یونجه می‌باشد. گیاه نخود ایرانی میزبان اصلی CpCDV است و گیاه یونجه نیز یک گیاه چند ساله است. به دلیل چند ساله بودن این گیاه، درصد آلودگی نسبتا بالای گیاه یونجه می‌تواند در شیوع این ویروس در مزارع بقولات از اهمیت بالائی برخوردار باشد. با وجودی که قبلا آلودگی گیاهان چغندرقند، باقلا، نخود ایرانی و عدس به CpCDV در مناطق غربی و مرکزی ایران گزارش شده است (Farzadfar *et al.* 2008; Shahmohammadi *et al.* 2020; Makkouk *et al.* 2001)، این اولین گزارش از آلودگی گیاهان شنبلیله، اسپرس، یونجه و تلخه بیان به این ویروس در ایران است. بصورت کلی، بیماری کوتولگی همراه با زردی توسط سایر ویروس‌ها مانند نانوویروس‌ها و ویروس‌های با ژنوم آر ان ا نیز در گیاهان لگومینوز ایجاد می‌گردد. بنابراین، برخی از علائم مربوط به نمونه‌هائی که در این مطالعه واکنش آن‌ها در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز منفی بود را ممکن است بتوان به آلودگی به ویروس‌های فوق الذکر و حتی سایر عوامل بیماری زا نسبت داد.

تکثیر ژنوم کامل ویروس به روش دایرهٔ غلتان (آر سی ا) و بریده شدن محصول بدست آمده با آنزیم‌های برشی *Eco*RI، *Bam*HI، *Xho*I و *Hind*III نشان داد که ژنوم جدایهٔ ۱۵ رابر کرمان مربوط به CpCDV دارای یک جایگاه برش برای آنزیم‌های *Eco*RI، *Bam*HI و *Hind*III می‌باشد؛ در حالیکه هیچ جایگاهی برای آنزیم *Xho*I وجود ندارد (شکل 2b). بعد از همسانه سازی و تعیین ترادف بخش‌های مختلف ژنوم کامل جدایهٔ رابر (IR:Rab:15:chi:16) به طول ۲۵۶۷ نوکلئوتید بدست آمد. با بررسی ترادف‌های حفاظت شده روی ژنوم این جدایه می‌توان پیش بینی کرد که همانند سایر جدایه‌های این ویروس، برای رمزگذاری پروتئین Rep، فرآیند حذف اینترون (پدیدهٔ پیرایش) در mRNA مربوط به این پروتئین (منطبق با نوکلئوتیدهای شمارهٔ ۱۷۲۷ تا ۱۸۱۲ ژنوم) اتفاق می‌افتد (Bozorgi *et al.* 2017). مقایسهٔ دو به دوی ترادف نوکلئوتیدی ژنوم این جدایه با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن نشان داد که جدایهٔ مورد بررسی بیشترین شباهت را به میزان ۹۹/۱۴ درصد با جدایهٔ KF111683 از کشور عمان نشان می‌دهد که از گیاه فلفل گزارش شده است (Akhtar *et al.* 2014). این جدایهٔ عمانی، به عنوان سویه F ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی (CpCDV-F)

شکل ۱. گیاهان آلوده به ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی شامل a) نخود ایرانی (جدایهٔ 15) با علائم زردی عمومی بوته، کوتولگی و پیچیدگی برگ جمع آوری شده از رابر (استان کرمان)؛ b) لوبیا با علائم زردی عمومی بوته و کوتولگی جمع آوری شده از سبزوار (استان خراسان رضوی)؛ c) عدس با علائم کوتولگی و زردی عمومی جمع آوری شده از سبزوار (استان خراسان رضوی)؛ d) باقلا با علائم زردی عمومی بوته، کوتولگی و پیچیدگی برگ جمع آوری شده از سبزوار (استان خراسان رضوی)؛ e) شنبلیله با علائم زردی حاشیهٔ برگ ها و کوتولگی جمع آوری شده از سبزوار (استان خراسان رضوی)؛ f) یونجه با علائم زردی عمومی جمع آوری شده از کرمان (استان کرمان)؛ g) لوبیا چشم بلبلی با علائم کلروز شدید و کوتولگی جمع آوری شده از سبزوار (استان خراسان رضوی)؛ h) تلخه بیان با علائم کوتولگی و زردی شدید جمع آوری شده از محوطهٔ دانشگاه شهید باهنر کرمان (استان کرمان)؛ i) اسپرس با علائم کوتولگی و زردی حاشیهٔ برگ ها جمع آوری شده از کرمان (استان کرمان)؛ j) بوتهٔ نخود ایرانی با علائم زردی حاشیهٔ برگ ها، پیچیدگی خفیف برگ ها و کوتولگی چهار هفته بعد از مایه کوبی با سازهٔ عفونت زای CpCDV؛ k) بوتهٔ لوبیا با علائم زردی عمومی و کوتولگی چهار هفته بعد از مایه کوبی با سازهٔ عفونت زای CpCDV.

Figure 1. CpCDV infected plants including a) chickpea (the isolate 15) showing general yellowing, dwarfing and leaf curling collected from Rabor (Kerman province); b) bean showing general yellowing and dwarfing collected from Sabzevar (Razavi Khorasan province); c) lentil showing dwarfing and general yellowing collected from Sabzevar (Razavi Khorasan province); d) faba bean showing general yellowing, dwarfing and leaf curling collected from Sabzevar (Razavi Khorasan province); e) fenugreek showing marginal leaf yellowing and dwarfing collected from Sabzevar (Razavi Khorasan province); f) alfalfa showing general yellowing collected from Kerman (Kerman province); g) cowpea showing severe chlorosis and dwarfing collected from Sabzevar (Razavi Khorasan province) h) sophora showing severe dwarfing and yellowing collected at Shahid Bahonar University (Kerman province); i) sainfoin showing dwarfing and marginal leaf yellowing collected from Kerman (Kerman province); j) chickpea plant showing marginal leaf yellowing, mild leaf curling and dwarfing four weeks post agro-inoculation with the infectious clone of CpCDV; k) broad bean plant showing general yellowing and dwarfing four weeks post agro-inoculation with the infectious clone of CpCDV.



شکل ۲. نتایج الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلی مراز در ژل آگاروز یک درصد به منظور ردیابی ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی در گیاهان لگومینوز و سه استان واقع در جنوب و شرق ایران (a) و نتایج الکتروفورز محصول بریده شدهٔ آر سی ا با سه آنزیم برشی مختلف به منظور انتخاب آنزیم مناسب برای همسانه سازی ژنوم کامل ویروس (b). حروف مخفف و شماره ها عبارتند از: C^-، نمونهٔ سالم (شاهد منفی)؛ ۱، نمونهٔ یونجه (استان خراسان رضوی)؛ ۲، نمونهٔ باقلا (استان خراسان رضوی)؛ C^+، شاهد مثبت؛ ۳، نمونهٔ یونجه (استان خراسان رضوی)؛ ٤، نمونهٔ لوبیا (استان خراسان رضوی)؛ ٥، نمونهٔ یونجه (استان فارس)؛ ٦؛ نمونهٔ شنبلیله (استان خراسان رضوی)؛ ۷، یونجه (استان کرمان)؛ ۸، اسپرس (استان کرمان)؛ ۹، تلخه‌بیان (استان کرمان) M، نشانگر مولکولی (1 kb DNA ladder, Thermo Fishfer Scientific)؛ B، X و H، قطعات حاصل از برش محصول آر سی ا بترتیب با آنزیم های برشی *Bam*HI، *Xho*I و *Hind*III.

Fig. 2. Results of electrophoresis of PCR products in 1% agarose gel in order to monitor chickpea choloroic dwarf virus in leguminous plants in three Iranian provinces in southern and eastern Iran (a) and electrophoresis of the digested RCA products with three restriction enzymes to find the enzyme for cloning of the full-length genome of the virus. Abbreviations and numbers are C^-, healthy control; 1, alfalfa (Razavi Khorasan province); 2, faba bean (Razavi Khorasan province); C^+, positive control; 3, alfalfa (Razavi Khorasan province); 4, bean (Razavi Khorasan province); 5, alfalfa (Fars province); 6, Fenugreek (Razavi Khorasan province); 7, alfalfa (Kerman province); 8, sainfoin (Kerman province); 9, sophora (Kerman province); M, 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific); B, X and H, digested RCA product with *Bam*HI, *Xho*I and *Hind*III restriction enzymes, respectively.

طبقه بندی شده است. با توجه به شباهت نزدیک ترادف نوکلئوتیدی این جدایه و جدایهٔ ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق، سویهٔ جدایهٔ شمارهٔ ۱۵ رابر نیز تحت عنوان CpCDV-F تعیین می‌گردد. در میان سایر جدایه‌های گزارش شده از ایران نیز جدایهٔ رابر به میزان ۹٦/۷۷-۹٦/۹۷ درصد با جدایه‌های MK641859 (از گیاه نخود ایرانی)، MK641861 (از گیاه باقلا) و MK641862 (از گیاه عدس) شباهت دارد که همگی تحت سویهٔ CpCDV-F طبقه بندی می‌گردند (جدول ۲ و شکل ۳). در همین راستا، درخت فیلوژنتیکی رسم شده نیز جایگاه جدایهٔ رابر کرمان را در میان سایر جدایه‌های انتخابی از ایران و سایر نقاط دنیا تأیید می‌کند (شکل ٤). تاکنون تنها دو سویهٔ CpCDV-A و CpCDV-F از ایران گزارش شده اند که میزبان‌های آن‌ها نیز گیاهان خانوادهٔ Fabaceae شامل نخود ایرانی، عدس و باقلا می‌باشند (Shahmohammadi *et al.* 2020). با توجه به دامنهٔ میزبانی بسیار وسیع CpCDV (Kanakala and Kuria 2018)، به نظر می‌رسد که گیاه فلفل تنها میزبان خارج از خانوادهٔ Fabaceae برای سویهٔ CpCDV-F می‌باشد (Akhtar *et al.* 2014).

بررسی واکنش گیاهان مایه کوبی شده با سازهٔ عفونت زای ویروس به روش agroinoculation نشان داد که بعد از چهار هفته از شروع مایه کوبی، علائم مشخص ناشی از ویروس شامل زردی حاشیهٔ برگ‌ها، پیچیدگی خفیف برگ‌ها و کوتولگی در ١٦ گیاه از ۳۰ گیاه نخود ایرانی مایه

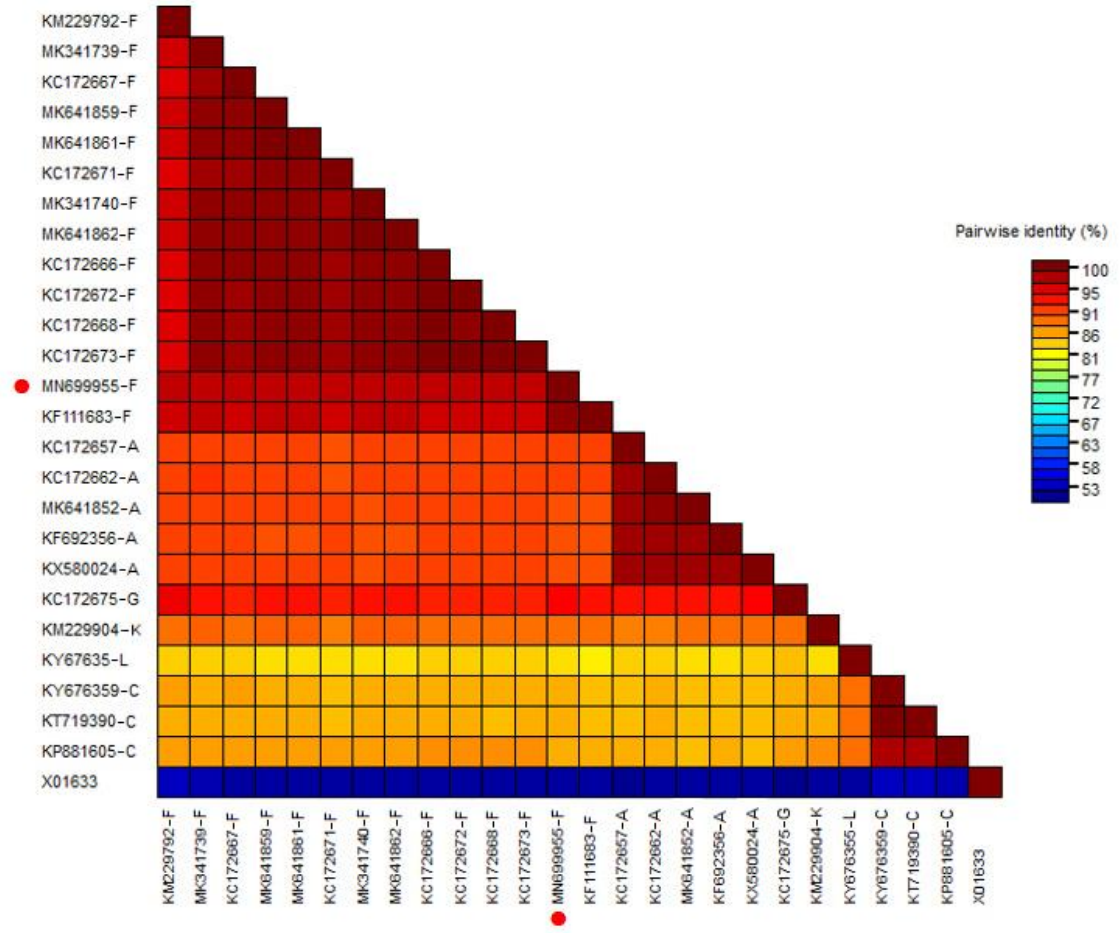
جدول ۲. لیست و مشخصات جدایه های ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی موجود در بانک ژن که در این مطالعه برای مقایسه دو به دوی ترادف ها و رسم درخت فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت.

Table 2. List and characteristics of chickpea chlorotic dwarf virus isolates available in the GenBank that were used in pairwise sequence comparisons and construction of the phylogenetic tree in this study.

Accession number	Strain	Country (Province)	Host	Family
KC172657	A	Iran	chickpea	Fabaceae
KC172662	A	Turkey	chickpea	Fabaceae
KC172666	F	Pakistan	lentil	Fabaceae
KC172667	F	Syria	chickpea	Fabaceae
KC172668	F	Syria	chickpea	Fabaceae
KC172671	F	Yemen	faba bean	Fabaceae
KC172672	F	Yemen	lentil	Fabaceae
KC172673	F	Yemen	lentil	Fabaceae
KC172675	G	Eritrea	chickpea	Fabaceae
MK341740	F	Iran (Urmia)	lentil	Fabaceae
MK641862	F	Iran (Lorestan)	lentil	Fabaceae
MK641859	F	Iran (West Azerbaijan)	chickpea	Fabaceae
MK641861	F	Iran (Esfahan)	faba bean	Fabaceae
MK341739	F	Iran (Kermanshah)	chickpea	Fabaceae
MK641852	A	Iran (Lorestan)	chickpea	Fabaceae
KM229792	F	Sudan	chickpea	Fabaceae
KM229904	K	Sudan	chickpea	Fabaceae
KF111683	F	Oman	pepper	Solanaceae
KF692356	A	Egypt	squash	Cucurbitaceae
KX580024	A	Tunisia	watermelon	Cucurbitaceae
KY676355	L	Pakistan	cotton	Malvaceae
KY676359	C	Pakistan	cotton	Malvaceae
KP881605	C	Pakistan	tomato	Solanaceae
KT719390	C	Pakistan	cucumber	Cucurbitaceae

کوبی شده و علائم زردی عمومی و کوتولگی در ۹ گیاه از ۱۹گیاه لوبیا مایه کوبی شده ایجاد شد (بترتیب شکل‌های 1j و 1k). نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای CpCDV-752-F/CpCDV-1326-R نیز آلودگی این گیاهان را به CpCDV تأیید نمود. در حالیکه مایه کوبی گیاهان نخود ایرانی با سلول‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمیدهای pGreen0029 (بدون سازه) و pSoup، منجر به ایجاد هیچ گونه علائمی در گیاهان مایه کوبی شده نگردید و آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نیز با استفاده از دی ان ای استخراج شده از این گیاهان و آغازگرهای اختصاصی CpCDV-752-F/CpCDV-1326-R منجر به تکثیر هیچ قطعه‌ای نگردید.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که CpCDV یکی از عوامل ایجاد کنندهٔ بیماری کوتولگی و زردی در مزارع کاشت حبوب و گیاهان علوفه‌ای در سه استان خراسان رضوی (شمال شرق ایران)، کرمان (جنوب شرقی ایران) و فارس (جنوب ایران) می‌باشد. با توجه به دامنهٔ میزبانی وسیع این ویروس و شیوع آن حتی در گیاهان خارج از خانوادهٔ Fabaceace مانند فلفل در کشور عمان (Akhtar *et al*. 2014)، خیار (Hameed *et al*. 2017)، پنبه (Manzoor *et al*. 2014)، اسفناج (Hamza *et al*. 2018)، گوجه فرنگی (Zia-Ur-Rehman *et al*. 2015) و بامیه (Zia-Ur-Rehman *et al*. 2017) در کشور پاکستان، به نظر می‌رسد که علاوه بر چغندرقند

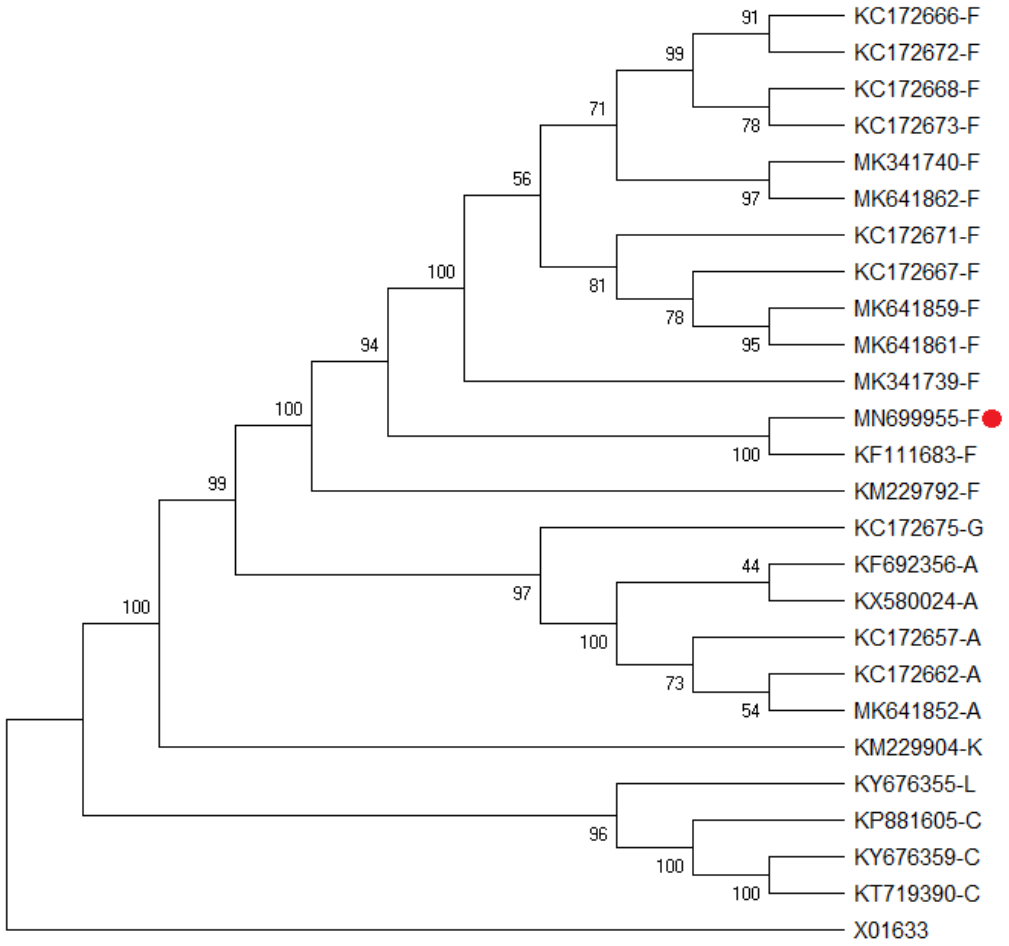


شکل ۳. مقایسهٔ دو به دوی ترادف نوکلئوتیدی ژنوم جدایهٔ ۱۵ رابر کرمان (دایرهٔ قرمز رنگ) مربوط به ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی با سایر جدایه های این ویروس از میزبان ها و کشورهای مختلف موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار SDT v1.2. مشخصات جدایه های مورد استفاده برای مقایسه، در جدول ۲ نشان داده شده است.

Figure 3. Pairwise sequence comparisons of the Rabor isolate (15) of chickpea chlorotic dwarf virus (the red circle) and the GenBank isolates from different hosts and geographical regions using SDT v1.2 software. See Table 2 for details of the GenBank isolates.

(Farzadfar *et al.* 2008) که قبلا به عنوان میزبان CpCDV از ایران گزارش شده است، این ویروس میزبان‌های دیگری نیز در ایران در خارج از خانوادهٔ Fabaceace داشته باشد.

گیاه نخود ایرانی به عنوان میزبان اصلی CpCDV از خانواده Fabaceace معرفی شده است (Kanakala and Kuria 2018). با در نظر گرفتن این حقیقت که کشور ایران از کانون‌های اولیه پیدایش و تنوع گیاه نخود ایرانی می‌باشد (Singh and Saxena 1999)، مطالعه ویژگی‌های مختلف CpCDV در ایران می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد وضعیت این ویروس شامل میزان گسترش، میزبان‌های طبیعی در خارج از خانوادهٔ Fabaceae و ارتباط برخی از علائم موجود در گیاهان زراعی، سبزیجات و حتی برخی از گیاهان زینتی با آلودگی به ویروس فوق را



شکل ٤. رسم درخت فیلوژنتیکی به روش اتصال مجاور (Neighbor-Joining) بـا اسـتفاده از نـرم افـزار MEGA X (Kumar *et al.* 2018) بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژنوم جدایهٔ ۱۵ رابر کرمان (دایرهٔ قرمز رنگ) مربوط به ویروس کوتولگی سبزرد نخود ایرانی و سـایر جدایه های همین ویروس از میزبان ها و کشورهای مختلف موجود در بانک ژن. برای محاسبهٔ اعتبارسنجی (Bootstrap)، از ۱۰۰۰ تکـرار استفاده شده است. از ترادف ژنوم ویروس رگه ای ذرت (*Maize streak virus*, MSV) با رس شمار X01633 به عنوان عضو خـارج از گروه استفاده شده است. مشخصات جدایه های مورد استفاده برای این مقایسه، در جدول ۲ نشان داده شده است.

Figure 4. Neighbor-Joining phylogenetic tree using MEGA X (Kumar *et al.* 2018) based on the genome sequence of the Rabor isolate (15) of *Chickpea chlorotic dwarf virus* (the red circle) and those of GenBank isolates from different hosts and geographical regions. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates. The sequence of *Maize streak virus* (MSV) accession number X01633 was used as an outgroup. See Table 2 for details of the GenBank isolates.

در اختیار محققین قرار دهد.

باهنر کرمان انجام شـده اسـت کـه بـدین وسـیله قـدردانی می‌گردد.

قدردانی

این تحقیق با استفاده از حمایـت مـالی دانشـگاه شـهید

منابع

Akhtar S., Khan A.J. and Briddon R.W. 2014. A distinct strain of *Chickpea chlorotic dwarf virus* infecting pepper in Oman. Plant Disease 98: 286-286.

Bozorgi N., Heydarnejad J., Kamali M. and Massumi H. 2017. Splicing features in the expression of the complementary-sense genes of *Beet curly top Iran virus*. Virus Genes 53(2): 323–327.

Boulton M. 2008. Construction of infectious clones for DNA viruses: Mastreviruses. pp. 503–523. In: Foster G.D., Johansen I.E., Hong Y. and Nagy P.D. (Eds.), Methods in molecular biology 451, plant virology protocols: from viral sequence to protein function. Humana Press, Totowa.

Brown J.K., Fauquet, C.M., Briddon R.W., Zerbini M., Moriones E. and Navas-Castillo J. 2012. Geminiviridae. pp. 351–373. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. and Lefkowitz E.J. (Eds.), Virus Taxonomy. Elsevier, San Diego.

Farzadfar Sh., Pourrahim R., Golnaraghi A.R. and Ahoonmanesh A. 2008. PCR detection and partial molecular characterization of Chickpea chlorotic dwarf virus in naturally infected sugar beet plants in Iran. Journal of Plant Pathology 90: 247-251.

Grimsley N., Hohn B., Hohn T. and Walden R., 1986. Agroinfection, an alternative route for viral-infection of plants by using the Ti plasmid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83: 3282–3286.

Hameed U., Zia-ur-rehman M., Ali A.S., Haider M. and Brown J. 2017. First report of Chickpea chlorotic dwarf virus infecting cucumber in Pakistan. Plant Disease, 101(5): 848.

Hamza M., Tahir M.N., Mustafa R., Kamal H., Khan M.Z., Mansoor S., Briddon R.W. and Amin I. 2018. Identification of a dicot infecting mastrevirus along with alpha-and betasatellite associated with leaf curl disease of spinach (*Spinacia oleracea*) in Pakistan. Virus Research, 256: 174–182.

Hellens R.P., Edwards E.A., Leyland N.R., Bean S. and Mullineaux P.M. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium mediated plant transformation. Plant Molecular Biology 42: 819–832.

Horn N.M. 1994. Viruses Involved in Chickpea Stunt; Wageningen Agricultural University: Wageningen, The Netherlands, p. 139.

Horn N.M., Reddy S.V. and Reddy D.V.R. 1995. Assessment of yield losses caused by chickpea chlorotic dwarf geminivirus in chickpea (Cicer arietinum) in India. European Journal of Plant Pathology 101: 221–224.

Horn N.M., Reddy S.V., Roberts I.M. and Reddy D.V.R. 1993. Chickpea chlorotic dwarf virus, a new leafhopper transmitted geminivirus of chickpea in India. Annals of Applied Biology 122: 467–479.

Kanakala S. and Kuria P. 2018. Chickpea chlorotic dwarf virus: An emerging monopartite dicot infecting mastrevirus. Viruses: 11(1).

Kraberger S, Kumari S.G., Hamed A.A., Gronenborn B., Thomas J.E., Sharman M., Harkins G.W., Muhire B.M., Martin D.P. and Varsani A. 2015. Molecular diversity of *Chickpea chlorotic dwarf virus* in Sudan: high rates of intra-species recombination: a driving force in the emergence of new strains. Infection, Genetics and Evolution 29: 203–215.

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.

Makkouk K.M., Fazali Y., Kumari S. and Farzadfar S. 2001. First records 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. New Disease Reports 4: 6.

Manzoor M.T., Ilyas M., Shafiq M., Haider M., Shahid A. and Briddon R. 2014. A distinct strain of Chickpea chlorotic dwarf virus (genus Mastrevirus, family Geminiviridae) identified in cotton plants affected by leaf curl disease. Archives of Virology, 159(5): 1217–1221.

Muhire B., Martin D.P., Brown J.K., Navas-Castillo J., Moriones E., Zerbini M., Rivera-Bustamante R.F., Malathi V.G., Briddon R.W. and Varsani A. 2013. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus Mastrevirus (family Geminiviridae). Archives of Virology 158: 1411–1424.

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.

Roumagnac P, Lett J.M., Elvira Fiallo‐Olive E., Navas‐Castillo J., Zerbini M., Martin D.P., Varsani A. Establishment of five new genera in the family *Geminiviridae*: *Citlodavirus*, *Maldovirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, and *Topilevirus*. Archives of Virology 167(2):695-710.

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.

Shahmohammadi N., Dizadji A., Bihamta M.R. and Kvarnheden A. 2020. Diversity and occurrence of chickpea chlorotic dwarf virus on legumes from Iran. Plant Pathology 69:139-148.

Singh K.B. and Saxena M.C. 1999. Chickpeas. In: The Tropical Agriculturalist. Macmillan Education Ltd, London. United Kingdom. 134pp.

Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A., Sawada H. 2001. A revision of Rhizobium Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of Agrobacterium Conn 1942 and Allorhizobium undicola de Lajudie et al. 1998 as new combinations: Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola and R. vitis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:89-103.

Zerbini F.M., Briddon R.W., Idris A., Martin D.P., Moriones E., Navas-Castillo J., Rivera-Bustamante R., Rougmanac P. and Varsani A. 2017. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*. Journal of General Virology 98: 131–133.

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(1): 45-50.

Zia-Ur-Rehman M., Hameed U., Ali C.A., Haider M.S. and Brown J.K. 2017. First report of Chickpea chlorotic dwarf virus infecting okra in Pakistan. Plant Disease 101: 1336.

Zia-Ur-Rehman M., Hameed U., Herrmann H.W., Iqbal M., Haider M. and Brown J. K. 2015. First report of Chickpea chlorotic dwarf virus infecting tomato crops in Pakistan. Plant Disease 99(9): 1287.