



مقاله پژوهشی

ویروس کوتولگی سبزرده نخود ایرانی: تعیین ترادف ژنوم ویروس در دو میزبان جدید، آلفاستلایت همراه و اثبات بیماری‌زائی در گیاه بامیه

اسرا سالاری^۱، جهانگیر حیدرنژاد^{۲*} و حسین معصومی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۳)

چکیده

ویروس کوتولگی سبزرده نخود ایرانی (chickpea chlorotic dwarf virus, CpCDV) از جنس *Mastrevirus* و خانواده *Geminiviridae*، یکی از ویروس‌های مخرب در تعداد زیادی از گیاهان در مناطق مختلف دنیا است. در این مطالعه، نمونه‌های بامیه و علف هرز کتان هندی با علائم مشخص آلودگی به جمینی‌ویروس‌ها از مزارع شهرستان جیرفت جمع‌آوری شد و بعد از استخراج دی‌ان‌ا، مولکول‌های حلقوی موجود در آن با روش تکثیر دایره‌غلطان (rolling circle amplification, RCA) غنی‌سازی گردید. همسانه‌سازی و تعیین ترادف محصول آر سی ۱ مربوط به دو نمونه انتخابی از دو گیاه فوق نشان داد که آن‌ها به سویه F مربوط به CpCDV آلوده هستند. تلاش برای جداسازی آلفا و بتاستلایت‌های همراه با نمونه‌های این دو گیاه با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تنها منجر به ردیابی آلفاستلایت بدون علائم پنبه‌داروینی (*gossypium darwinii* symptomless alphasatellite, GDarSLA) در نمونه گیاه کتان هندی گردید. بررسی‌ها نشان داد که درصد یکسانی ژنوم کامل بین دو جدایه جدید CpCDV به میزان ۹۸ درصد بوده و بیشترین درصد یکسانی ژنوم کامل دو جدایه از ویروس و یک جدایه از آلفاستلایت همراه، مربوط به جدایه‌هایی است که قبلاً از ایران گزارش شده‌اند. در آزمایش‌های مربوط به بیماری‌زائی CpCDV، مایه‌کوبی سازه ساخته شده از قبل باعث ایجاد علائم زردی و کوتولگی در گیاه بامیه گردید. بر اساس نتایج بدست آمده، گیاهان بامیه و علف هرز کتان هندی به عنوان میزبان‌های جدید CpCDV به ترتیب از ایران و دنیا گزارش می‌گردند.

واژه‌های کلیدی: ویروس کوتولگی سبزرده نخود ایرانی، جمینی‌ویروس، بامیه، کتان هندی

* بخشی از یک طرح تحقیقاتی ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

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

۱ استادیار بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت

۲ استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان



DOI: 10.22034/ijpp.2023.2008218.422

Research Article

Chickpea chlorotic dwarf virus: genome sequence of the virus from two new natural hosts, associated alphasatellite and demonstration of the pathogenesis in okra plant

Asra Salari¹, Jahangir Heydarnejad^{2**}, Hossain Massumi²

(Received: 27.08.2023; Accepted: 26.10.2023)

Abstract

Chickpea chlorotic dwarf virus (*Mastrevirus*, *Geminiviridae*) is a destructive geminivirus worldwide. In this study, symptomatic okra and wild jute samples showing typical geminivirus symptoms were collected from Jiroft farms and circular molecules of extracted DNA were enriched using rolling circle amplification (RCA) method followed by cloning and sequencing of RCA products of two selective samples from okra and wild jute. Sequence analysis showed that two isolates belong to strain CpCDV-F. Attempts to recover associated alpha- and betasatellite molecules from two plant samples using polymerase chain reaction assay resulted in detection of *Gossypium darwinii* symptomless alphasatellite (GDarSLA) only in wild jute sample. Sequence analyses indicated that two new CpCDV isolates shared nucleotide identity of 98% with each other and two viral and one alphasatellite sequences are closely related to Iranian Genbank isolates. Pathogenesis tests using previously constructed infectious clone of CpCDV led to appearance of yellowing and dwarfing in agroinoculated okra seedlings. Based on the results of this study, okra and wild jute plants are reported as new hosts of the CpCDV in Iran and worldwide, respectively.

Key words: chickpea chlorotic dwarf virus, geminivirus, okra, wild jute

* A part of research project submitted to College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

** Corresponding author, e-mail: jheydarnejad@uk.ac.ir.

1. Assistant professor of Plant Pathology, College of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran

2. Professor of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

مقدمه

گونه، بعد از جنس *Begomovirus* دومین جنس بزرگ در این خانواده است. با وجودیکه بیشتر گونه‌های جنس *Mastrevirus* گیاهان تک لپه را آلوده می‌کنند، میزبان‌های چند گونه از مستری ویروس‌ها گیاهان دولپه هستند (Brown et al. 2012). در بین گونه‌های این جنس، ویروس منخط ذرت (maize streak virus, MSV) و ویروس کوتولگی سبزد نخود ایرانی باعث ایجاد بیماری‌های شدیدی به ترتیب در گیاه ذرت در قاره آفریقا و نخود ایرانی و تعداد دیگری از گیاهان زراعی و سبزیجات، به طور غالب در قاره‌های آفریقا و آسیا می‌گردند (Navas-Castillo & Fiallo-Olivé 2021).

در بین جمینی‌ویروس‌ها، همراهی سه نوع مولکول ستلایت شامل آلفاستلایت، بتاستلایت و دلتاستلایت با آلودگی‌های ناشی از ویروس‌های جنس *Begomovirus* گزارش شده است (Gnanasekaran and Chakraborty 2018). در آلودگی‌های ناشی از بگوموویروس‌ها، همراهی بتاستلایت‌ها باعث تشدید بیماری‌های ناشی از بگوموویروس کمکی و افزایش تجمع آن در بافت‌های آلوده گیاه می‌گردد. با این وجود، نقش مولکول‌های آلفاستلایت همراه، کاهش تجمع ویروس کمکی در گیاه است. در مقایسه با بگوموویروس‌ها، تنها در دو مورد همراهی دو مولکول آلفاستلایت و بتاستلایت با مستری ویروس‌ها از کشورهای هند و پاکستان گزارش شده است (Hamza et al. 2018; Kumar et al. 2014).

در دو دهه اخیر، بیماری ناشی از CpCDV در گیاهان مختلف شدت گرفته است و خسارت‌های گسترده ناشی از این ویروس از چندین گیاه مختلف گزارش شده است (Kanakala and Kuria 2018). تا قبل از چند سال گذشته، وسعت دامنه میزبانی CpCDV ناشناخته باقی مانده بود. در حال حاضر، بر اساس میزان یکسان بودن ترادف ژنوم کامل ویروس (کمتر از ۹۴ درصد)، آلودگی حداقل ۱۱ خانواده گیاهی شامل گیاهان زراعی، سبزیجات، گیاهان

جمینی‌ویروس‌ها (اعضای خانواده *Geminiviridae*) به عنوان یک گروه بزرگ از ویروس‌های گیاهی دارای گسترش وسیعی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا از جمله ایران هستند (Navas-Castillo & Fiallo-Olivé 2021). در طی دو دهه گذشته، استفاده از روش‌های جدید مانند تکثیر دایره غلتان (rolling circle amplification, RCA) و توالی‌یابی نسل جدید (next generation sequencing) کمک زیادی به شناسایی تعداد زیادی از این ویروس‌ها در گیاهان مختلف نموده است (Claverie et al. 2018). تا سال ۲۰۲۱، تعداد گونه‌های ثبت شده در این خانواده به بیش از ۵۰۰ گونه می‌رسد (Fiallo-Olivé et al. 2021) که در ۱۴ جنس شامل *Eragrovirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Turncurtovirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Maldovirus*, *Citlodavirus*, *Grablovirus*, *Capulavirus*, *Opunvirus*, *Mulcrilevirus* و *Topilevirus* طبقه‌بندی می‌گردند (Roumagnac et al. 2022). جمینی‌ویروس‌ها دارای پیکره‌های دوقلوی به هم چسبیده به ابعاد ۲۲×۳۸ نانومتر و یک یا دو قطعه ژنوم دی‌ان‌ای حلقوی و تک‌لا به طول ۲/۵-۵/۲ کیلوباز می‌باشند (Fiallo-Olivé et al. 2021). اعضای جنس *Mastrevirus* دارای ژنوم تک‌بخشی هستند که حاوی چهار چارچوب ژنی (open reading frame, ORF) به نام‌های V1 و V2 (برروی رشته ویروسی) و C1 و C2 (روی رشته مکمل) می‌باشند (Navas-Castillo & Fiallo-Olivé 2021). دو چارچوب ژنی اول به ترتیب پروتئین‌های پوششی (CP) و حرکتی (MP) و چارچوب‌های ژنی C1 و C2 دو پروتئین مرتبط با تکثیر (RepA و Rep) را رمزگذاری می‌کنند. پروتئین Rep بعد از پدیده حذف اینترون (splicing)، از مجموع ترادف دو چارچوب ژنی C1 و C2 رمزگذاری می‌گردد. جنس *Mastrevirus* از نظر تعداد، با در بر داشتن ۴۰

با علائم فنجان‌ی شدن شدید برگ‌ها، تورم رگبرگ‌ها در پشت برگ، و سبزدی و خشکیدگی بین رگبرگ‌ها و دو نمونه از علف هرز کتان هندی (*Corchorus olitorius* L., Malvaceae) با علائم پیچیدگی خفیف و سبزدی عمومی و سبزدی بین رگبرگ‌ها (شکل ۱) از مزارع اطراف شهرستان جیرفت (جنوب کرمان) جمع‌آوری گردید. استخراج دی‌ان‌ای کل از بافت برگ به روش C-TAB انجام گردید (Zhang et al. 1998).

تکثیر ژنوم

مولکول‌های حلقوی موجود در دی‌ان‌ای استخراج شده از هر هفت نمونه توسط آنزیم فی ۲۹ دی‌ان‌ای پلی‌مراز با استفاده از کیت تجارتي TempliPhi, GE Healthcare, (USA) و روش تکثیر دایره‌غلطان (RCA) بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شپرد و همکاران (۲۰۰۸) غنی‌سازی گردید. محصول آر سی اهر نمونه با آنزیم‌های برشی *HindIII* و *SalI*, *ApaI*, *BamHI*, *EcoRI* بریده شد تا آنزیمی شناسائی گردد که تنها دارای یک جایگاه در ژنوم کامل ویروس مرتبط با بیماری در گیاهان باشد. با توجه به الگوی برش آنزیمی یکسان برای تمام نمونه‌ها، در نهایت برای ادامه پژوهش از آنزیم برشی *ApaI* برای یک نمونه بامیه (جدایه Okra-J-1) و آنزیم برشی *HindIII* برای یک نمونه کتان هندی (جدایه W-ses-1) به منظور برش و بدست آوردن طول کامل ژنوم ویروس همراه بیماری استفاده گردید. به موازات این کار، پلاسمید pBluescript SK(+) نیز به صورت جداگانه با آنزیم‌های برشی *ApaI* و *HindIII* بریده شده و برای جلوگیری از چسبیدن دو انتهای پلاسمید در فرآیند همسانه‌سازی، هر دو نمونه پلاسمید با آنزیم آلکالین فسفاتاز (SAP) تیمار گردیدند.

زیتتی و علف‌های هرز عمدتاً از کشورهای آسیائی و آفریقائی به این ویروس با ۱۹ سویه مختلف (از CpCDV-Askari et al. 2018; تا CpCDV-S Askari et al. 2018; Kanakala and Kuria 2018).

ویروس کوتولگی سبزد نخود ایرانی اولین بار در دنیا در سال ۱۹۹۳ از گیاه نخود ایرانی از کشور هند (Horn et al. 1993) و برای اولین بار از ایران در سال ۲۰۰۸ از گیاه چغندرقد در استان کرمانشاه گزارش گردید (Farzadfar et al. 2008). علیرغم گزارش‌های اخیر در مورد آلودگی‌های ناشی از CpCDV در ۲۶ گیاه مختلف شامل سبزیجات، گیاهان زراعی و زیتتی از ایران (Askari et al. 2018)، ژنوم کامل چند جدایه از این ویروس تنها از گیاهان خانواده بقولات (Fabaceae) از استان‌های غربی، مرکزی و جنوب شرقی ایران تعیین ترادف شده و مورد بررسی قرار گرفته است (Askari et al. 2021; Kraberger et al. 2020; Shahmohammadi et al. 2015). تاکنون در مطالعات انجام شده، تمام سویه‌های گزارش شده از ایران، تحت عنوان سویه‌های CpCDV-A یا CpCDV-F طبقه‌بندی شده‌اند. در تحقیق حاضر، دو جدایه از CpCDV از گیاه بامیه و گیاه وحشی کتان هندی واقع در شهرستان جیرفت (استان کرمان) تعیین ترادف شده و به لحاظ تبارزائی مورد مطالعه قرار گرفته است. علاوه بر این، همراهی مولکول‌های ستلایت در این دو گیاه با CpCDV بررسی شده است.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری و استخراج دی‌ان‌ای کل

در تیرماه سال ۱۴۰۰ پنج نمونه از گیاه بامیه (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, Malvaceae)



شکل ۱- علائم گیاهان آلوده به ویروس کوتولگی سبزرده نخود ایرانی جمع آوری شده از مزارع جیرفت. (a) بامیه با علائم فنجان‌بانی شدن شدید، سبزدی برگ‌ها و متورم شدن رگبرگ‌ها؛ (b) علف هرز کتان هندی (*Corchorus olitorius*) با علائم سبزدی، پیچیدگی خفیف برگ‌ها و رگبرگ‌نوازی.

Figure 1. Symptoms of naturally infected plants with chickpea chlorotic dwarf virus collected from Jiroft farms. a) okra showing severe cup-shape leaves, leaf chlorosis and vein swelling; b) wild jute (*Corchorus olitorius*) showing whitish leaves, mild leaf curling and vein banding.

روش جوشانیدن (Holmes and Quigley, 1981) از باکتری *E. coli* استخراج شده و با برش آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی ژنوم ویروس از باکتری با استفاده از کیت استخراج پلاسمید طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و جهت تعیین ترادف به روش سانگر (Sanger) از هر دو طرف به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شدند.

ردیابی مولکول‌های ستلایت

برای ردیابی مولکول‌های ستلایت احتمالی در نمونه‌های مورد بررسی، از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و آغازگرهای اختصاصی همپوشان AS-F/AS-R (Bridson et al. 2002) به ترتیب برای تکثیر ژنوم کامل آلفا- و بتا ستلایت‌ها با استفاده از محصول آرسی^۱ به عنوان رشته الگو استفاده شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در

واکنش اتصال و همسانه‌سازی

به منظور قرار دادن ژنوم واحد ویروس همراه بیماری (محصول بریده شده آر سی^۱) در مورد هر دو گیاه به پلاسمید pBluescript SK(+) در فرآیند واکنش اتصال (ligation)، از نسبت ۳:۱ به ترتیب برای ناقل و ژنوم ویروس استفاده گردید. برای این منظور، غلظت پلاسمید و محصول آر سی^۱ با دستگاه اسپکتروفتومتر بر اساس $\text{ng}/\mu\text{l}$ اندازه‌گیری شد و واکنش اتصال با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific, USA) انجام گردید. محصول واکنش اتصال برای تراریخت‌سازی سلول‌های باکتری مستعد *Escherichia coli* سویه XL1-Blue مورد استفاده قرار گرفت. پس از کشت باکتری، از بین پرگنه‌های آبی و سفید، تعدادی از پرگنه‌های سفیدرنگ، جهت استخراج پلاسمید، انتخاب شدند و به منظور شناسایی پرگنه‌های مورد نظر، پلاسمید آن‌ها به

عفونت‌زای ویروس استفاده گردید. ابتدا آگروباکتریوم حاوی سازه دوپار CpCDV در پلاسمید pGreen0029 در محیط کشت مایع ال‌بی فعال‌سازی گردید و سپس گیاهچه‌های بامیه (*A. esculentus*) رقم Clemson Spineless در مرحله ۳-۴ برگی با سلول‌های برداشت شده *Agrobacterium tumefaciens* با تزریق به ساقه و رگبرگ‌ها، به روش Grimsley *et al.* (1986) مایه‌کوبی گردیدند. به منظور مقایسه، تعدادی گیاهچه بامیه نیز با همین باکتری حاوی پلاسمید بدون سازه pGreen0029 مایه‌کوبی شدند. گیاهچه‌های مایه‌کوبی شده در گلخانه با درجه حرارت ۲۵°C نگهداری شدند. بعد از سپری شدن چهار هفته، بررسی آلوده‌شدن گیاهچه‌ها به ویروس با استفاده از ظهور علائم ویروسی و سپس آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز صورت گرفت. برای این منظور، دی‌ان‌ای کل از برگ‌های جدید و غیر مایه‌کوبی شده گیاهان با استفاده از روش C-TAB استخراج گردید و آلودگی یا عدم آلودگی آن‌ها با آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و آغازگرهای CpCDV-752-F/CpCDV-1326-R (Askari *et al.* 2021) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از برش محصول آر سی ۱ نمونه‌های بامیه و کتان هندی به ترتیب توسط آنزیم‌های برشی *ApaI* و *HindIII* باعث بدست آمدن قطعه‌ای به اندازه تقریبی سه کیلوباز در ژل آگاروز گردید که اندازه آن مشابه قطعات ژنومی برای جمینی ویروس‌های شناخته شده بود. بعد از همسانه‌سازی و ترادف‌یابی دو جدایه انتخابی Okra-J-1 از گیاه بامیه و W-ses-1 از کتان هندی و سپس واکاوی ترادف‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار نوکلئوتیدبلاست (BLASTn) (Altschul *et al.* 1990) مشخص گردید که آن‌ها به CpCDV آلوده هستند و طول

ناقل pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA) همسانه‌سازی شد. پلاسمید نو ترکیب حاوی ژنوم آلفاستلایت همراه از باکتری استخراج گردید و مطابق قبل از هر دو طرف به روش سنگر تعیین ترادف شد.

واکاوی‌های تبارزائی

ترادف‌های بدست آمده (شامل دو ترادف مربوط به دو جدایه CpCDV و یک جدایه آلفاستلایت) با استفاده از نرم‌افزار SeqMan بعنوان بخشی از مجموعه Lasergene، نرم‌افزار واکاوی ترادف‌ها، ویرایش شده و بعد از جمع‌بندی خوانش‌های مختلف، در بانک ژن با رس‌شمارهای OR360838-OR360840 ثبت گردیدند. جهت بررسی میزان یکسانی سه ترادف بدست آمده در این تحقیق با سایر ترادف‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن مربوط به ایران و سایر نقاط دنیا، ابتدا آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2 (Muhire *et al.* 2014) با یکدیگر مقایسه شدند. سپس، با استفاده از نرم‌افزار MEGAX (Kumar *et al.* 2018b) و بکارگیری روش MUSCLE (Edgar 2004) هم‌ردیف‌سازی شدند. درخت‌های تبارشناسی به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood) و اعتبارسنجی ۱۰۰۰ با استفاده از نرم‌افزار MEGAX رسم شدند. از ترادف ژنوم مربوط به ویروس مخطط ذرت با رس‌شمار X01633 و آلفاستلایت جزیرای پیچیدگی برگ پنبه (Cotton leaf curl Gezira alphasatellite, CLCuGeA) با رس‌شمار FN554581 به عنوان مدل‌های خارج گروه استفاده شدند.

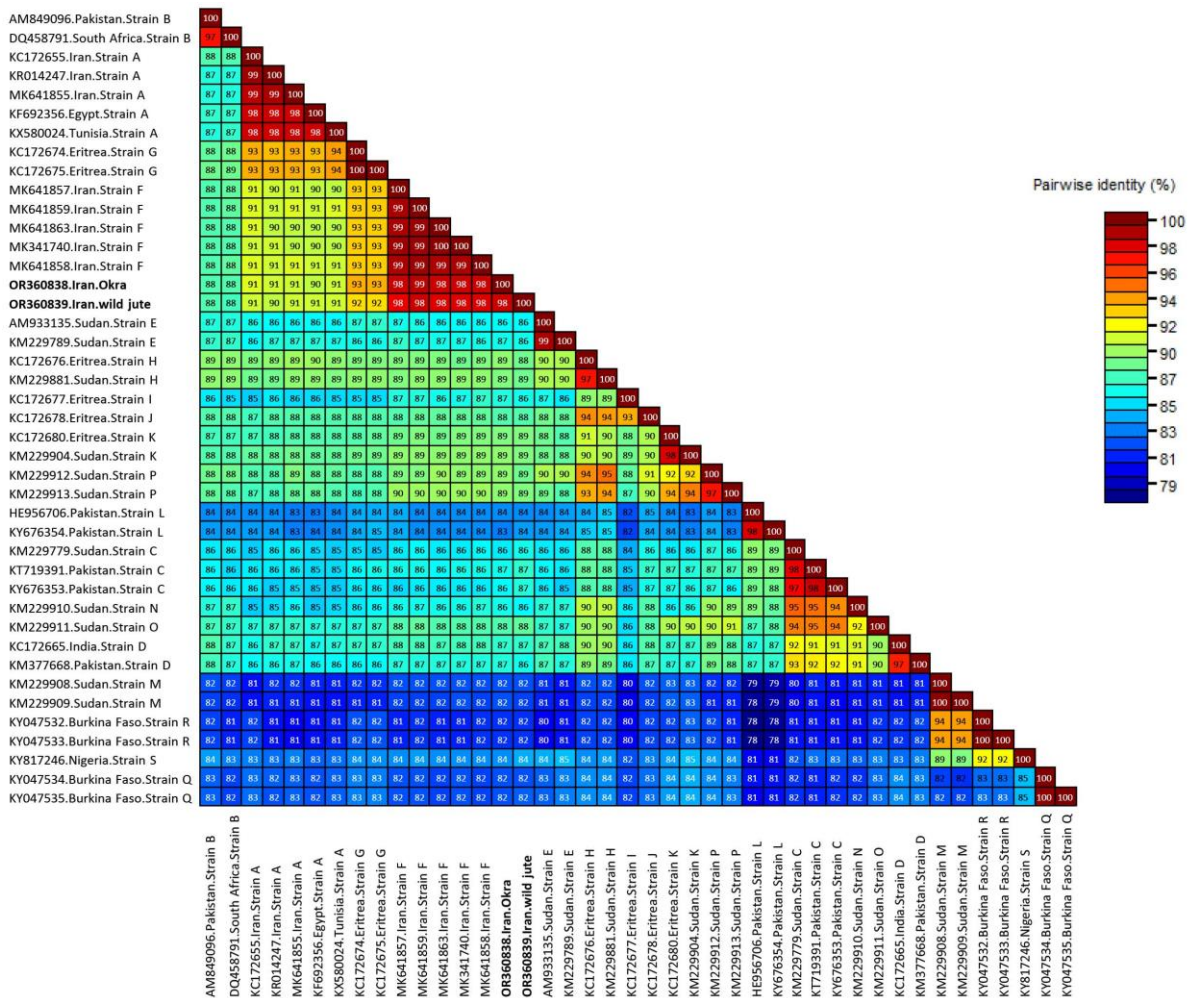
مایه‌کوبی گیاهان با سازه عفونت‌زا

با توجه به درصد یکسانی بالای دو ترادف بدست آمده در این تحقیق با جدایه رابر (IR:Rab:15:chi:16) (به میزان ۹۷-۹۸ درصد) که قبلاً از گیاه نخود ایرانی از استان کرمان گزارش شده و سازه آن ساخته شده بود (Askari *et al.* 2021)، از این سازه به منظور بررسی عکس‌العمل گیاهان بامیه در برابر مایه‌کوبی با سازه

ردیابی مولکول‌های ستلایت با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با کمک محصول آر سی، آغازگرهای اختصاصی Alpha-F/Alpha-R و آغازگرهای عمومی Beta01/Beta02 به ترتیب برای تکثیر ژنوم آلفاستلایت بدون علائم پنبه داروینی و بتاستلایت‌ها (Bridson *et al.*, 2002)، فقط منجر به تکثیر یک قطعه ۱۳۶۲ جفت بازی با آغازگرهای آلفاستلایت برای نمونه کتان هندی گردید و هیچ قطعه‌ای با آغازگرهای بتاستلایت‌ها تکثیر نشد. بررسی ترادف نوکلئوتیدی قطعه تکثیر شده آلفاستلایت نشان داد که این قطعه متعلق به ژنوم آلفاستلایت بدون علائم پنبه داروینی می‌باشد و دارای بیشترین میزان یکسانی با ترادف ژنوم همین آلفاستلایت موجود در بانک ژن با رس شمار ON886546 می‌باشد که از گیاه فلفل در ایران شناسائی شده است (Salari *et al.*, 2022). در واکاوی‌های تبارزائی نیز این جدایه آلفاستلایت در کنار سایر جدایه‌های گزارش شده از ایران و یک جدایه از کشور عمان قرار گرفت (شکل ۴).

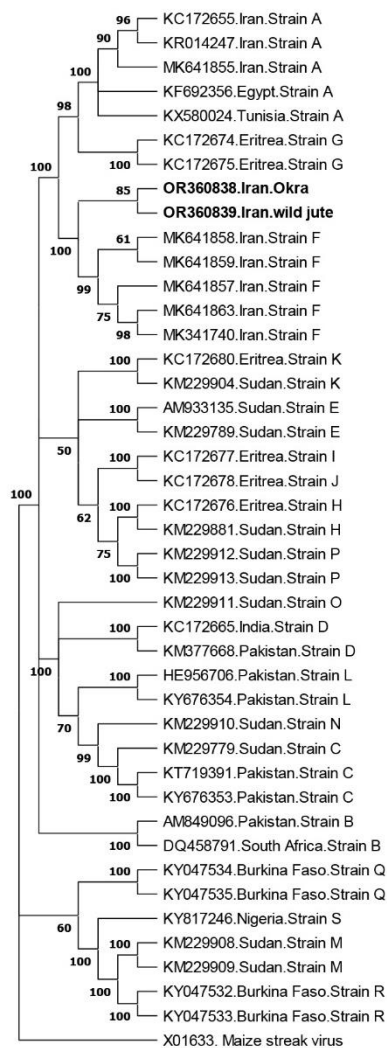
بیماری زائی CpCDV در گیاه بامیه با استفاده از مایه‌کوبی سازه ساخته شده در مطالعات قبلی (Askari *et al.*, 2021)، در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. بعد از دو هفته از شروع مایه‌کوبی، علائم زردی، رگبرگ نواری و کوتولگی در تعدادی از گیاهان مایه‌کوبی شده (۴۵ درصد) ظاهر شد. در حالیکه در مورد گیاهان مایه‌کوبی شده با پلاسمید pGreen0029 (بدون ژنوم ویروس) هیچ علائمی مشاهده نشد (شکل ۵). آلودگی این گیاهان با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس و دی ان ای استخراج شده از گیاهان دارای علائم با کمک آغازگرهای اختصاصی CpCDV-752-F/CpCDV-1326-R منجر به تکثیر قطعه قابل انتظار ۵۵۰ جفت بازی گردید. در حالیکه نتیجه این آزمون برای گیاهچه‌های مایه‌کوبی شده با پلاسمید pGreen0029 (بدون ژنوم ویروس) منفی بود و هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد.

ژنوم کامل دو جدایه به ترتیب ۲۵۷۰ و ۲۵۷۱ باز می‌باشد. مقایسه دو ترادف بدست آمده در این تحقیق با یکدیگر و با ترادف‌های انتخابی از بانک ژن مربوط به ایران و سایر نقاط دنیا با استفاده از نرم افزار SDT v1.2 (Muhire *et al.*, 2014) نشان داد که میزان یکسانی دو ترادف با یکدیگر و با سایر ترادف‌ها به ترتیب ۹۸ و ۸۶-۹۸ درصد می‌باشد. بیشترین میزان یکسانی بین دو ترادف مورد مطالعه در این تحقیق و ترادف‌های موجود در بانک ژن، مربوط به ترادف MK641859 می‌باشد که درصد یکسانی آن با جدایه‌های کتان هندی و بامیه به ترتیب ۹۸/۱ و ۹۸/۵ درصد می‌باشد (شکل ۲). جدایه MK641859 قبلاً از گیاه نخود ایرانی از شهرستان میاندوآب (استان آذربایجان غربی) گزارش شده است (Shahmohammadi *et al.*, 2020). در درخت تبارزائی که با روش حداکثر شباهت (Maximum Likelihood) و مدل Tamura-Nei با استفاده از نرم افزار Mega-X، ترسیم شد، دو جدایه مورد مطالعه در این تحقیق نزدیک به جدایه‌های ایرانی قرار گرفتند که همگی در سویه CpCDV-F گروه‌بندی شده‌اند (شکل ۳). جدایه‌ای از این ویروس با رس شمار KT719391 و سویه CpCDV-C قبلاً از گیاه بامیه از کشور پاکستان گزارش شده است (Zia-Ur-Rehman *et al.*, 2017). میزان یکسانی ژنوم جدایه بامیه از کشور پاکستان (متعلق به سویه C) با جدایه بامیه در تحقیق حاضر ۸۷ درصد تعیین گردید. با وجودیکه قبلاً CpCDV از ۲۶ گیاه مختلف شامل سبزیجات، گیاهان زراعی و زینتی از ایران گزارش شده است (Askari *et al.*, 2018)، ویروس فوق برای اولین بار از دو گیاه بامیه و کتان هندی (هر دو از خانواده Malvaceae) از ایران گزارش می‌گردد. ضمن اینکه، کتان هندی برای اولین بار به عنوان میزبان این ویروس در دنیا معرفی می‌گردد. نتایج حاصل از این تحقیق، نشان‌دهنده وسعت دامنه میزبانی CpCDV است.



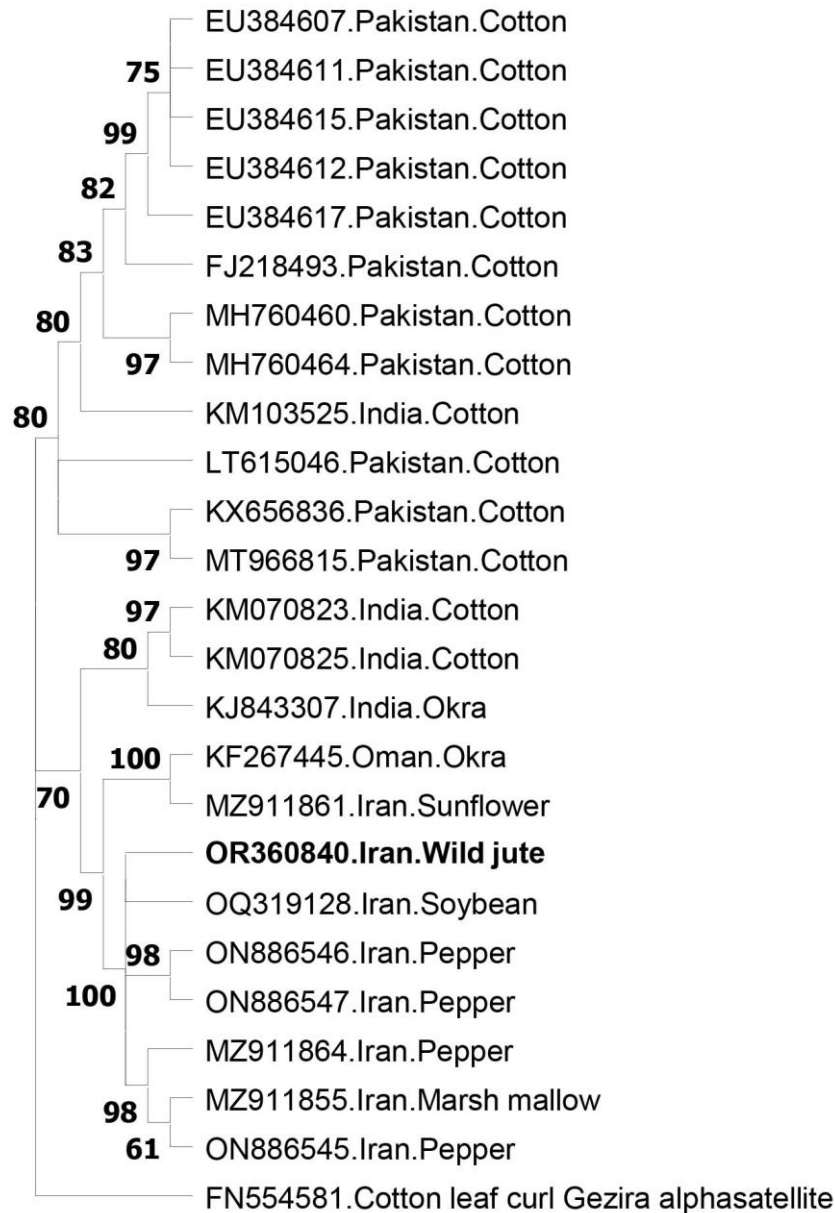
شکل ۲- ماتریس درصد یکسانی (identity) ترادف ژنوم کامل دو جدایه ویروس کوتولگی سبزد نخود ایرانی مربوط به این تحقیق (حروف پررنگ) با سایر جدایه‌های انتخابی این ویروس موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2.

Figure 2. Pairwise identity matrix of full-length genome sequence of chickpea chlorotic dwarf virus isolates obtained in this study (bold letters) and the selected GenBank isolates using SDT v1.2 software.



شکل ۳- درخت تبارزائی رسم شده به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood) با استفاده از ترادف‌های ژنوم کامل ویروس کوتولگی سبزرده نخود ایرانی مربوط به این تحقیق (حروف پررنگ) و برخی جدایه‌های نزدیک به آن‌ها موجود در بانک ژن. برای محاسبه اعتبارسنجی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار استفاده شده است. ویروس مخطط ذرت (maize streak virus) با رس‌شمار X01633 به عنوان مدل خارج گروه (outgroup) در نظر گرفته شده و انشعابات با حمایت کمتر از ۵۰٪ از شکل حذف شده است.

Figure 3. Maximum likelihood phylogenetic tree using the full-length genome of chickpea chlorotic dwarf virus isolates obtained in this study (bold letters) and the selected GenBank isolates. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and the genome sequence of DNA-A component of maize streak virus (accession number X01633) was used as outgroup. Branches having bootstrap values lower than 50% have been collapsed.



شکل ۴- درخت تبارزائی رسم شده به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood) با استفاده از ترادف ژنوم آلفاستلایت بدون علائم پنبه داروینی مربوط به این تحقیق (با حروف پررنگ) و برخی جدایه‌های نزدیک به آن‌ها موجود در بانک ژن. برای محاسبه اعتبارسنجی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار استفاده شده است. آلفاستلایت جزیرای پیچیدگی برگ پنبه (**cotton leaf curl Gezira alphasetellite**) با رس‌شمار **FN554581** به عنوان مدل خارج گروه (outgroup) در نظر گرفته شده و انشعابات با حمایت کمتر از ۵۰٪ از شکل حذف شده است.

Figure 4. Maximum likelihood phylogenetic tree using genome sequence of gossypium darwinii symptomless alphasetellite isolates obtained in this study (bold letters) and the selected GenBank isolates. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and the genome sequence of DNA-A component of cotton leaf curl Gezira alphasetellite (accession number FN554581) was used as outgroup. Branches having bootstrap values lower than 50% have been collapsed.



شکل ۵- گیاهان مایه‌کوبی شده توسط سازه عفونت زای ویروس کوتولگی سبزرده نخود ایرانی با علائم کوتولگی و رگیبگ‌نوازی ۴۵ روز بعد از مایه‌کوبی با آگروباکتریوم (سمت چپ) در مقایسه با گیاه مایه‌کوبی شده با پلاسمید بدون سازه pGreen (سمت راست).
Figure 5. Agroinoculated okra plant with infectious clone of chickpea chlorotic dwarf virus showing dwarfing and vein banding 45 dpi (left side) compared to plant mock-inoculated with an *Agrobacterium* culture bearing empty pGreen plasmid (right side).

هند و پاکستان به اثبات رسیده است (Hamza *et al.* 2018; Kumar *et al.* 2014). در تحقیق حاضر، همراهی آلفاستلایت بدون علائم پنبه داروینی با CpCDV توسط آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و آغازگرهای اختصاصی در گیاه کتان هندی آلوده به CpCDV به اثبات رسید؛ ولی نتیجه این آزمون به منظور ردیابی مولکول بتاستلایت با استفاده از آغازگرهای عمومی Beta01/Beta02 مربوط به بتاستلایت‌ها (Bridson *et al.* 2002) برای نمونه‌های بامیه و کتان هندی منفی بود. لازم به ذکر است که بر اساس مطالعات صورت گرفته، آغازگرهای عمومی Beta01/Beta02 توانائی تکثیر ژنوم تمام بتاستلایت‌ها را ندارند. در یک تحقیق، این جفت آغازگر، تنها قادر به تکثیر

مقایسه علائم گیاهان بامیه مایه‌کوبی شده در شرایط گلخانه با علائم مشاهده شده همین گیاه در شرایط طبیعی و مربوط به این تحقیق نشان داد که تفاوت آشکاری بین این دو گروه از علائم وجود دارد و شدت علائم در آلودگی طبیعی قابل توجه است. شدت این علائم در آلودگی طبیعی ناشی از بگوموویروس‌ها ممکن است به عوامل مختلفی از جمله همراهی مولکول بتاستلایت نسبت داده می‌شود (Gnanasekaran and Chakraborty 2018; Salari *et al.* 2023). در آلودگی طبیعی ناشی از مستری ویروس‌ها نیز همراهی و نقش مولکول‌های آلفا و بتاستلایت در ایجاد علائم در مورد ویروس هندی کوتولگی گندم (wheat dwarf India virus) و CpCDV به ترتیب در کشورهای

بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق، دو گیاه بامیه و کتان هندی به لیست گیاهان میزبان CpCDV در ایران اضافه می‌گردند. با توجه به گزارش‌های قبلی در مورد دامنه میزبانی وسیع این ویروس در ایران (Askari *et al.* 2018) و سایر نقاط دنیا (Kanakala and Kuria 2018)، نیاز به مطالعات بیش‌تری روی سویه‌های این ویروس و نقش مولکول‌های آلفا و بتاستلایت همراه در شدت آلودگی‌های ناشی از آن احساس می‌گردد.

این مولکول در پنج نمونه آلوده به مولکول‌های بتاستلایت از مجموع ۱۵ نمونه مورد مطالعه بودند (Kumar *et al.* 2018a). علت این موضوع، تنوع ژنتیکی ژنوم بتاستلایت‌های گزارش شده می‌باشد. بنابراین با توجه به این موارد، به نظر می‌رسد که نیاز به روش‌های دیگری از جمله تغییر آغازگرهای مورد استفاده و روش توالی‌یابی نسل جدید برای تعیین وجود آلودگی احتمالی نمونه‌های بامیه به مولکول‌های بتاستلایت می‌باشد.

References

منابع

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-10.
- Askari F., Heydarnejad J., Vaziri S., Esmaeili M. and Massumi H. 2021. Chickpea chlorotic dwarf virus: natural hosts and genome characterization of a virus isolate in eastern and southern Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 57(3): 203-216.
- 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., Bull S.E., Mansoor S., Amin I. and Markham P. G. 2002. Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA β ; a molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Molecular Biotechnology* 20: 315-318.
- 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: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, San Diego, USA.
- Claverie S., Bernardo P., Kraberger S., Hartnady P., Lefeuvre P., Lett J.M., Galzi S., Filloux D., Harkins G.W., Varsani A., Martin D.P. and Roumagnac P. 2018. From spatial metagenomics to molecular characterization of plant viruses: a geminivirus case study. pp 55-83. In: Malmstrom C.M. (Ed.), *Advances in Virus Research. Environmental Virology and Virus Ecology*. Academic Press, New York, USA.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-7.
- 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.
- Fiallo-Olivé E., Lett J.M., Martin D.P., Roumagnac P., Varsani A., Zerbini F.M. and Navas-Castillo J. 2021. ICTV virus taxonomy profile: *Geminiviridae*. *Journal of General Virology* 102(12): 001696.
- Gnanasekaran P. and Chakraborty S. 2018. Biology of viral satellites and their role in pathogenesis. *Current Opinion in Virology* 33: 96-105.
- Grimsley N., Hohn B. and 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, USA* 83: 3282-3286.
- 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.

- Holmes D.S. and Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* 114: 193-197.
- 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 J., Kumar J., Singh S.P. and Tuli R., 2014. Association of satellites with a mastrevirus in natural infection: complexity of wheat dwarf India virus disease. *Journal of Virology* 88: 7093-7104.
- Kumar R., Palicherla S.R., Mandal B. and Kadiri S. 2018a. PCR based detection of betasatellite associated with the begomoviruses using improved universal primers. *Australasian Plant Pathology* 47: 115-118.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K. 2018b. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547.
- 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.
- Navas-Castillo J. and Fiallo-Olivé E. 2021. Geminiviruses (Geminiviridae). pp 411-419. In: *Encyclopedia of Virology*, 4th ed., Vol. 3, Bamford D.H. and Zuckerman M. (Eds.), Academic Press, Oxford, UK.
- Roumagnac P., Lett J.M., Fiallo-Olivé E., Navas-Castillo J., Zerbini F.M., Martin D.P. and Varsani A. 2022. Establishment of five new genera in the family *Geminiviridae*: *Citlodavirus*, *Maldovirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, and *Topilevirus*. *Archives of Virology* 167(2): 695-710.
- Salari A., Heydarnejad J. and Massumi H. 2022. Genome characterization of chili leaf curl virus, the associated alphasatellite and betasatellite and demonstration of pathogenesis of the virus in south-eastern Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 58(4): 218-223.
- Salari Kh., Heydarnejad J., Massumi H. and Varsani A. 2023. Incidence of cotton leaf curl Gezira virus and the associated alphasatellites and betasatellites in crops and ornamental plants in southern Iran. *Tropical Plant Pathology* 48: 62-72.
- 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.
- 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.
- 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.