

Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of chickpea, lentil and fenugreek isolates of faba bean necrotic yellows nanovirus collected in farms of Razavi and Northern Khorasan Provinces

1. Javad Sadeghi-Majd¹: Graduated MSc Student of plant pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
2. Jahangir Heydarnejad^{2*}: Professor of plant virology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman 7616913439, Iran | Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman
3. Asra Salari³: Assistant professor of plant virology, College of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft 7867155311, Iran

*Corresponding Author's Email Address: jheydarnejad@uk.ac.ir

Article Type:

Original Research

Received: 09 August 2025

Revised: date: 24 August 2025

Accepted: 10 September 2025

How to Cite: Sadeghi-Majd, J., Heydarnejad, J., & Salari, A. (2024). Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of chickpea, lentil and fenugreek isolates of faba bean necrotic yellows nanovirus collected in farms of Razavi and Northern Khorasan Provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 60(3), 328-341.

DOI: 10.22034/IJPP.2025.2021863.493

Abstract:

Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV; *Nanovirus necroflaviviciae*, *Nanoviridae*) is one of the most important viruses infecting leguminous plants in Asia, Africa and Europe. In the current research, eight genomic components of two chickpea and lentil isolates of the virus, as well as six genomic components of the fenugreek isolate, collected from farms in Northern Khorasan and Razavi Khorasan Provinces, respectively, were amplified using polymerase chain reaction, cloned and sequenced. Comparison of the sequences of concatenated genome components of DNA-R, DNA-S, DNA-M, DNA-N, DNA-U1 and DNA-U4 of the three isolates showed that they shared nucleotide identity of 94.9%-96.20%. Among the six components, DNA-R and DNA-M were found to be the most and the least diverse components relative to the others (99.1% and 99.3% and 85.9%-97.8% identities, respectively). Analysis of the constructed phylogenetic tree showed that three studied isolates were clustered with other Iranian, as well as two Azerbaijani GenBank isolates, in a district group. Furthermore, the pattern of the geographic distribution of all Iranian FBNYV isolates is related to their phylogeny. These results affirm that in addition to leguminous plants, FBNYV is prevalent in leafy vegetable farms in Iran.

Keywords: Chickpea, Lentil, Fenugreek, *Nanovirus*, *Nanoviridae*



© 2024 the authors. Published by Maher Publishing Institute. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

Extended Abstract

Introduction

Nanoviruses, belonging to the genus *Nanovirus* in the family *Nanoviridae*, are significant plant viruses affecting fabaceous plants and certain leafy vegetables (Avish-Koohshahi et al., 2021; Esmaeili et al., 2023; Lal, Kil, et al., 2020). Their genome consists of eight positive circular single-stranded (ss) DNA components including DNA-S, DNA-C, DNA-M, DNA-N, DNA-R, DNA-U1, DNA-U2, and DNA-U4, each ~1.0 kb in size and encapsidated within 17-19 nm polyhedral particles. Each genomic component contains a single open reading frame (ORF), with most encoded proteins having documented functions in replication and pathogenicity. Furthermore, each component features two intergenic regions, the common region major (CR-M) and common region stem-loop (CR-SL), essential for replication via rolling circle amplification (RCA) (Gronenborn et al., 2020; Thomas et al., 2021).

While nanoviruses typically infect fabaceous plants (Gronenborn et al., 2020), they are also reported to cause considerable losses in other plant families (Avish-Koohshahi et al., 2021; Esmaeili et al., 2023; Heydarnejad et al., 2019; Lal, Vo, et al., 2020). Until now, five of the 12 recognized nanovirus species (<https://ictv.global/report/chapter/nanoviridae/nanoviridae/nanovirus>), have been reported in Iran, including faba bean necrotic yellows virus (FBNYV) (Makkouk et al., 2002), faba bean necrotic stunt virus (FBNSV) (Lotfipour et al., 2016), sophora yellow stunt virus (SYSV) (Heydarnejad et al., 2017), milk vetch chlorotic dwarf virus (MVCDV) (Hassan-Sheikhi et al., 2020), and parsley severe stunt-associated virus (PSSaV) (Hasanvand et al., 2021).

Previous studies on FBNYV isolates from Iran, specifically in Razavi Khorasan and North Khorasan Provinces, relied primarily on polymerase chain reaction (PCR) or sequencing of only the DNA-S genomic component to document infection (Avish-Koohshahi et al., 2021). Due to the limited

genomic data of FBNYV isolates in these regions, this study aimed to analyze the complete nucleotide sequence of two FBNYV isolates, one from chickpea and one from lentil, both collected from North Khorasan Province. Additionally, six genome components (DNA-S, DNA-M, DNA-N, DNA-R, DNA-U1, and DNA-U4) of a fenugreek isolate of FBNYV from Khorasan Razavi Province were analyzed. The analysis included a subsequent phylogenetic characterization.

Materials and Methods

Plant samples including chickpea (*Cicer arietinum* L.) showing severe yellowing, cup-shaped leaves (Fig. 1a), lentil (*Lens culinaris* Medikus) showing yellowing, reduced leaf size (Fig. 1b), were collected in 2016 from North Khorasan Province and a fenugreek sample (*Trigonella foenum-graecum* L.) with symptoms of yellowing and mild cup-shaped leaves (Fig. 1c) was collected from Kohneh-Ab village located in western Sabzevar, Razavi Khorasan Province in 2016. Total DNA was extracted using a CTAB method (Zhang et al., 1998) and circular DNA molecules of the samples were enriched using the rolling circle amplification (RCA) method (TempliPhi kit, GE Healthcare, USA) (Shepherd et al., 2008). RCA products and specific primer pairs (Avish-Koohshahi et al., 2021) were used to amplify the full-length genome components of three FBNYV isolates. However, the DNA-C and DNA-U2 components of the fenugreek isolate failed to amplify. PCR products were ligated into the pTG19-T vector (Vivantis, Malaysia) followed by transformation of bacterial cells, *Escherichia coli* strain XL1 blue. Recombinant plasmids bearing genome components of three FBNYV isolates were Sanger sequenced and deposited in GenBank (MH113438-MH113445, MH113430-MH113437 and PV987715-PV987720 for chickpea, lentil and fenugreek, respectively). Due to the lack of DNA-C and DNA-U2 sequence for the fenugreek isolate, concatenated genome components of six components in order of DNA-R, DNA-S, DNA-M, DNA-N, DNA-U1 and DNA-U4 of three FBNYV isolates were used for phylogenetic analysis. Pairwise nucleotide identities were determined using SDT v1.3 software (Muhire et al.,

2014) and FBNYV sequences of three isolates were aligned with MUSCLE (Edgar, 2004) using MEGAX software (Kumar et al., 2018). The resulting alignments of concatenated genome sequence were used to construct a maximum likelihood phylogenetic tree using MEGAX and 1000 bootstrap replicates. Concatenated genome component of six components of subterranean clover stunt virus (SCSV), Myall Vale 2534B isolate was used as outgroup. Additionally, to compare each independent genome component to the counterpart sequences, SDT v1.3 software was used.

Results and Discussion

PCR amplification of the genome components using specific primers and sequencing results showed that lentil, chickpea and fenugreek samples were infected with FBNYV. The resulting sequences of eight genome components of lentil and chickpea isolates, as well as six genome components of fenugreek isolate including DNA-S, DNA-M, DNA-N, DNA-R, DNA-U1 and DNA-U4 were recorded in GenBank (Table 1). Despite using common specific primers for amplification of the genome components of three FBNYV isolates, the possible reason for the failure to amplify two genomic fragments of the fenugreek isolate (DNA-C and DNA-U2) can be attributed to their low concentration in this host. The low concentration of some genomic components of nanoviruses and their lack of detection have also been reported in previous studies. For example, until now, the DNA-U4 genomic fragment has not been reported for PSSaV (Hasanvand et al., 2021; Vetten et al., 2019). Furthermore, despite the longer history of the type member of the genus *Nanovirus*, subterranean clover stunt virus, compared to other nanoviruses, its DNA-U2 and DNA-U4 genomic components had not been reported for a long time. Until 2019, the presence of these two components was detected and reported using precise methods.

Comparison of the concatenated six components revealed nucleotide sequence identities ranging from 94.96-96.20% among the three FBNYV isolates. The highest identity (96.2%) was found between the fenugreek and chickpea

isolates, and the lowest (94.9%) between the fenugreek and lentil isolates. Among the six genome components, the highest and lowest identities between the three isolates were for DNA-R (99.1-99.3) and DNA-M (85.97-97.80) components, respectively. In constructed phylogenetic tree using concatenated genome components, the three isolates grouped with other Iranian and two Azerbaijani isolates in a single clade, suggesting a phylogenetic relationship linked to geographical distribution. Notably, the isolates from the eastern strip of Iran (Kerman and Khorasan provinces) grouped together, separate from isolates found in the western region (Lorestan and Kermanshah provinces).

In summary, it can be concluded that, in addition to legumes, leafy vegetables from different families constitute an important group of hosts for nanoviruses including FBNYV, SYSV, and PSSaV in Iran (Avish-Koohshahi et al., 2021; Esmaeili et al., 2023; Hasanvand et al., 2021). Given the prominent role of these plants in the diet of the Iranian people, nanovirus infection of leafy vegetable is worth considering. Further studies on the infection of this group of plants with other common nanoviruses in Iran, such as FBNSV and MVCDV, could lead to a better understanding of the importance of the prevalence of nanoviruses in leafy vegetables.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest in conducting the present study.

Authors' Contributions

JH designed the study and provided laboratory support; JSM collected the samples, amplified and sequenced the genome components; JH and AS analysed the sequence data; JH drafted the manuscript, and all authors read and approved the final version.

Ethical Considerations

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Acknowledgments

This study was financially supported by Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman 7616914111, Iran (Project P/57/01).

تعیین ترادف ژنوم و واکاوی تبارزائی جدایه‌های نخود ایرانی، عدس و شنبلیله نانووایروس زردی بافت‌مردۀ باقلا جمع‌آوری شده از مزارع استان‌های خراسان رضوی و شمالی

۱. جواد صادقی‌مجد^{ID}: دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. جهانگیر حیدرنژاد^{ID}: استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کد پستی ۷۶۱۶۹۱۳۴۳۹ | پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳. اسرا سالاری^{ID}: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران، کد پستی ۷۸۶۷۱۵۵۳۱۱

*پست الکترونیک نویسنده مسئول: jheydarnejad@uk.ac.ir

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی اصیل

ویروس زردی بافت‌مردۀ باقلا (faba bean necrotic yellows virus, FBNYV) با نام علمی *Nanovirus necroflaviviciae* از خانواده *Nanoviridae* یکی از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده‌کننده گیاهان خانواده *Fabaceae* در آسیا، آفریقا و اروپا است. در تحقیق حاضر، ترادف نوکلئوتیدی هشت قطعه ژنوم دو جدایه این ویروس از گیاهان نخود ایرانی و عدس از مزارع استان خراسان شمالی و شش قطعه ژنوم جدایه گیاه شنبلیله از استان خراسان رضوی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین ترادف شدند. با مقایسه تجمیع ترادف (concatenated genome components) شش قطعه DNA-R، DNA-S، DNA-M، DNA-N، DNA-U1 و DNA-U4 از ژنوم، میزان یکسان‌بودن ترادف نوکلئوتیدی این سه جدایه با یکدیگر ۹۶٫۲ تا ۹۴٫۹ درصد تعیین گردید. از بین شش قطعه، بیش‌ترین و کم‌ترین درصد همسانی بین سه جدایه، به ترتیب مربوط به قطعات DNA-R (۹۹٫۳-۹۹٫۱) و DNA-M (۸۵٫۹-۹۷٫۸) به‌دست آمد. در تحلیل درخت تبارزائی رسم شده، این سه جدایه در کنار جدایه‌هائی از ایران و دو جدایه از کشور آذربایجان در یک گروه مستقل قرار گرفتند. علاوه بر این، مشخص گردید که توزیع جغرافیائی تمام جدایه‌های ایرانی با تبارزائی آن‌ها ارتباط دارد. این نتایج تأیید می‌کند که FBNYV علاوه بر گیاهان لگومینوز، در مزارع سبزیجات برگی ایران نیز شیوع دارد.

تاریخ دریافت: ۱۸ مرداد ۱۴۰۴

تاریخ بازنگری: ۲ شهریور ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۹ شهریور ۱۴۰۴

نحوه استناددهی: صادقی‌مجد، جواد، حیدرنژاد، جهانگیر، و سالاری، اسرا. (۱۴۰۳). تعیین ترادف ژنوم و واکاوی تبارزائی جدایه‌های نخود ایرانی، عدس و شنبلیله نانووایروس زردی بافت‌مردۀ باقلا جمع‌آوری شده از مزارع استان‌های خراسان رضوی و شمالی. *بیماری‌های گیاهی*، ۶۰(۳)، ۳۲۸-۳۴۱.

DOI: 10.22034/IJPP.2025.2021863.493



مجوز و حق نشر: © ۱۴۰۳ تمامی حقوق انتشار این مقاله متعلق به نویسنده است. انتشار این مقاله توسط انتشارات ماهر به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با گواهی (CC BY 4.0) صورت گرفته است.

کلیدواژگان: *Nanovirus*، *Nanoviridae*، شنبلیله، نخود، عدس

خانواده‌های گیاهی دیگر نیز توسط این ویروس‌ها آلوده شده و باعث ایجاد

خسارت‌های قابل توجهی در آن‌ها می‌شوند (Avish-Koohshahi et al., 2021; Esmaeili et al., 2023; Heydarnejad et al., 2019; Lal, Vo, et al., 2020). لازم به ذکر است که تنها میزبان شناخته شده ویروس همراه با کوتولگی شدید جعفری (parsley severe stunt-associated virus, PSSaV; *Nanovirus petroselinii*)، گیاه جعفری گزارش شده است. علاوه بر تفاوت میزبان، برخی از ویژگی‌های ژنومی PSSaV نیز با دیگر اعضای جنس *Nanovirus* تفاوت دارد (Hasanvand et al., 2021; Vetten et al., 2019).

از میان ۱۲ گونه جنس *Nanovirus* (<https://ictv.global/report/chapter/nanoviridae/nanovirid>) تاکنون پنج گونه شامل ویروس زردی بافت‌مردۀ باقلا (ae/nanovirus) (Makkouk et al., 2002)، ویروس کوتولگی بافت‌مردۀ باقلا (faba bean necrotic stunt virus, FBNSV; *Nanovirus necropumiliviciae*) (Lotfipour et al., 2016)، ویروس کوتولگی زرد تلخه‌بیان (*sophora yellow stunt virus, SYSV; Nanovirus sophorae*) (Heydarnejad et al., 2017)، ویروس کوتولگی سبزرز گون (milk vetch chlorotic dwarf virus, MVCDV; *Nanovirus astragalirani*) (Hassan-Sheikhi et al., 2020) و PSSaV (Hasanvand et al., 2021) از ایران گزارش شده‌اند. اولین بار، ویروس زردی بافت‌مردۀ باقلا در ایران در سال ۲۰۰۲ از استان‌های قزوین، کردستان، کرمانشاه، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی گزارش شد (Makkouk et al., 2002) و در حال حاضر، در بیش‌تر نقاط ایران روی گیاهان نخودایرانی، عدس، یونجه، باقلا، لوبیا، نخودفرنگی، شنیلله، جعفری و شوید شایع است (Alavinejad et al., 2011; Avish-Koohshahi et al., 2021; Mansourpour et al., 2019).

نانوویروس‌ها (ویروس‌های جنس *Nanovirus*) از خانواده *Nanoviridae*، یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا در گیاهان خانواده *Fabaceae* و سبزیجات برگی محسوب می‌گردند (Avish-Koohshahi et al., 2021; Esmaeili et al., 2023; Lal, Kil, et al., 2020). ژنوم آن‌ها شامل هشت قطعه دی‌ان‌ای تک‌لای مثبت و حلقوی (circular ssDNA) هر کدام به اندازه تقریبی یک کیلوباز و شامل DNA-S، DNA-C، DNA-M، DNA-N، DNA-R، DNA-U1، DNA-U2، DNA-U4 و DNA-U4 می‌باشد که در پیکره‌های ایزومتریک به اندازه ۱۷-۱۹ نانومتر بسته‌بندی می‌گردند. هر کدام از قطعات ژنومی نانوویروس‌ها دارای یک چارچوب ژنی باز (open reading frame, ORF) است که یک پروتئین را رمزگذاری می‌کند و تاکنون نقش بیش‌تر این پروتئین‌ها در فرآیند تکثیر و بیماری‌زایی این ویروس‌ها مشخص گردیده است. همچنین، هر قطعه ژنوم دارای دو ناحیه میان‌ژنی به نام‌های common region stem-loop و common region major (CR-M) (CR-SL) می‌باشد که در حین تکثیر ژنوم به روش دایره غلتان (rolling circle amplification, RCA) به‌کار گرفته می‌شوند (Gronenborn et al., 2020; Thomas et al., 2021).

بر اساس معیارهای پیشنهاد شده توسط کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها (ICTV)، حد تفکیک گونه در جنس *Nanovirus* همسانی کمتر از ۱۵ درصد برای ترادف آمینواسیدی پروتئین پوششی و/یا همسانی کمتر از ۷۵ درصد برای تجمیع ترادف نوکلئوتیدی هشت قطعه ژنومی (concatenated genome components) می‌باشد (Vetten et al., 2012).

نانوویروس‌ها به طور معمول، گیاهان خانواده *Fabaceae* را آلوده می‌کنند (Gronenborn et al., 2020). با وجود این، گیاهانی از

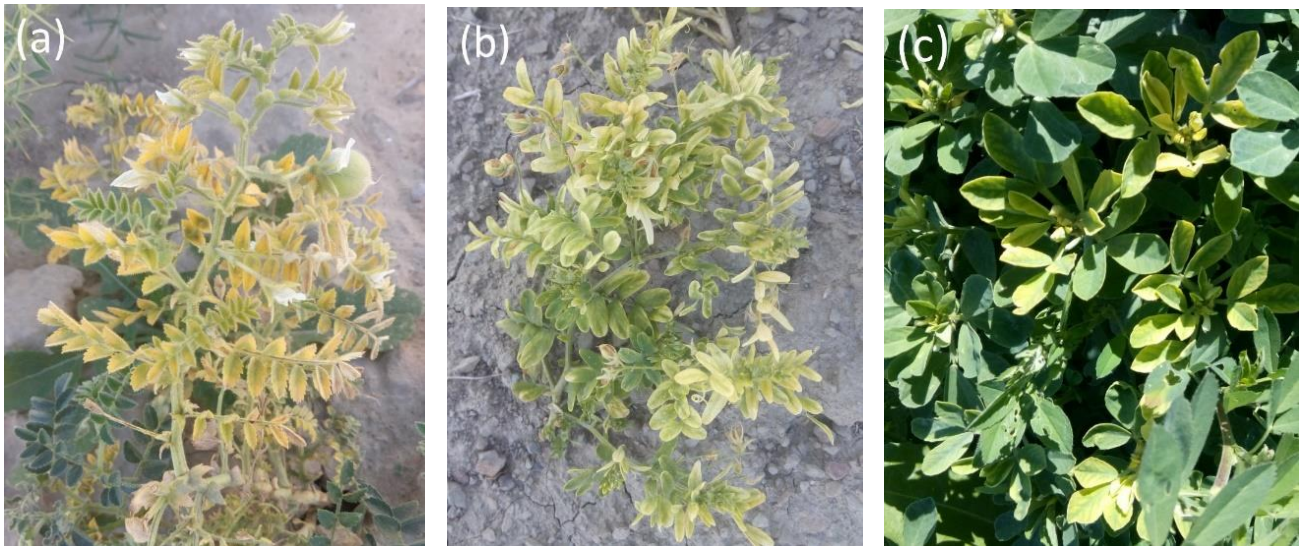
(*Lens culinaris* Medikus) با کد ۷۷ و علائم زردی، کوتولگی و ریزبرگی (شکل 1b) از منطقه راز و جرگلان واقع در شمال غربی استان خراسان شمالی و نمونه گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) با کد ۱۰۳ و علائم زردی و قاشقی شدن خفیف برگ‌ها (شکل 1c) از روستای کهنه آب واقع در غرب سبزوار، استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری شدند. دی‌ان‌ای کل این نمونه‌ها با استفاده از روش CTAB استخراج گردید (Zhang et al., 1998).

در مطالعات قبلی، ترادف نوکلئوتیدی ژنوم چندین جدایه FBNYV از استان‌های خراسان رضوی و شمالی مورد بررسی قرار گرفته است و آلودگی گیاهان به این ویروس تنها بر اساس آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراس و یا تعیین ترادف قطعه ژنومی DNA-S اثبات گردیده است (Avish-Koohshahi et al., 2021). در این تحقیق، ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل دو جدایه این ویروس از گیاهان نخودایرانی و عدس از استان خراسان شمالی و شش قطعه ژنوم جدایه شنبلیله از استان خراسان رضوی تعیین گردید و رابطه تبارزائی آن‌ها با سایر نانوویروس‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری و استخراج دی‌ان‌ای کل

نمونه گیاه نخودایرانی (*Cicer arietinum* L.) با کد ۸۸ و علائم زردی شدید، ریزبرگی و قاشقی شدن خفیف برگ‌ها (شکل 1a) و نمونه گیاه عدس



شکل ۱- علائم نمونه‌های گیاهان لگومینوز مورد مطالعه در این تحقیق شامل: (a) زردی عمومی، ریزبرگی و فنجانی شدن برگ‌ها در گیاه نخود ایرانی (نمونه ۸۸)؛ (b) زردی عمومی و ریزبرگی در گیاه عدس (نمونه ۷۷) و (c) زردی حاشیه برگ‌ها و فنجانی شدن خفیف برگ‌های گیاه شنبلیله (نمونه ۱۰۳).

Fig. 1. Symptoms of the leguminous plant samples used in this study: (a) general yellowing, little leaf and leaf cupping in chickpea (sample 88); (b) general yellowing and little leaf in lentil (sample 77), and (c) marginal leaf yellowing and mild leaf cupping in fenugreek (sample 103).

تکثیر ژنوم ویروس

به دلیل غلظت کم قطعات ژنومی نانویروس‌ها در گیاه، ابتدا مولکول‌های DNA حلقوی موجود در نمونه‌های استخراج شده، به روش آرسی با استفاده از کیت تجارتي TempliPhi, GE Healthcare, USA و آنزیم فی ۲۹ دی‌ان‌ا پلی‌مراز، غنی‌سازی گردیدند (Shepherd et al., 2008). از هر محصول آرسی به‌عنوان رشته‌الگو در آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراز با کمک آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعات ژنوم FBNYV جدایه‌های ۷۷ و ۸۸ و ۱۰۳ (به ترتیب نمونه‌های عدس، نخودایرانی و شنبلیله) استفاده شد (Avish-). در مورد جدایه ۱۰۳، علیرغم چند بار تلاش، تنها قطعات ژنومی DNA-S، DNA-M، DNA-N، DNA-R، DNA-U1 و DNA-U4 تکثیر گردید. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز درون ناقل pTG19-T (Vivantis, Malaysia) قرار داده شده و با کمک باکتری *Escherichia coli* نژاد XL1 blue همسانه‌سازی شدند. پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی قطعات ژنومی تکثیر شده برای تعیین ترادف به روش Sanger به کمپانی Bioneer (South Korea) ارسال شدند. سپس ترادف نوکلئوتیدی مربوط به هشت قطعه ژنوم دو جدایه نخودایرانی و عدس با کدهای ۸۸ و ۷۷ به ترتیب با رس‌شمارهای MH113438-MH113445 و MH113430-MH113437 و برای شش قطعه ژنوم جدایه شنبلیله با کد ۱۰۳ و رس‌شمارهای PV987715-PV987720 در بانک ژن ثبت گردیدند.

واکاوی تبارزائی

به دلیل در دسترس نبودن ترادف نوکلئوتیدی قطعات DNA-C و DNA-U2 جدایه ۱۰۳ (نمونه شنبلیله)، برای مقایسه ژنوم، از تجمیع ترادف شش قطعه دیگر به ترتیب شامل DNA-R، DNA-S، DNA-M، DNA-N، DNA-C و DNA-U1 و DNA-U4 برای هر سه جدایه استفاده گردید. تجمیع شش قطعه با پشت سر هم قرار دادن توالی مربوط به تمام قطعات انجام شد. مقایسه درصد همسانی جدایه‌های مربوط به این تحقیق و جدایه‌های موجود در بانک ژن با

استفاده از نرم افزار SDT v1.3 انجام شد (Muhire et al., 2014). توالی‌های موجود با استفاده از نرم‌افزار MEGAX (Kumar et al., 2018) و به روش MUSCLE (Edgar, 2004) هم‌ردیف‌سازی شدند. درخت تبارزائی مربوط به تجمیع ترادف‌ها به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood) و اعتبارسنجی ۱۰۰۰ با استفاده از نرم‌افزار MEGAX رسم شد. از ترادف تجمیع شده ژنوم ویروس کوتولگی شبدر زیرزمینی (subterranean clover stunt virus, SCSV) جدایه Myall Vale 2534B به‌عنوان خارج‌گروه برای رسم درخت تبارزائی استفاده شد. برای مقایسه مستقل هر قطعه ژنومی ویروس نیز از نرم‌افزار SDT v1.3 استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج اولیه بررسی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و سپس تعیین ترادف آن‌ها، آلودگی هر سه نمونه عدس (با کد ۷۷)، نخودایرانی (با کد ۸۸) و شنبلیله (با کد ۱۰۳) به FBNYV را اثبات نمود. ترادف‌های بدست آمده شامل هشت قطعه ژنومی برای هر کدام از جدایه‌های عدس و نخودایرانی و شش قطعه ژنومی برای جدایه شنبلیله شامل DNA-R، DNA-S، DNA-M، DNA-N، DNA-U1 و DNA-U4 در بانک ژن ثبت گردید (جدول ۱). با وجودی که برای تکثیر قطعات ژنوم هر سه جدایه، از آغازگرهای مشترک استفاده گردید، علت احتمالی تکثیر نشدن دو قطعه ژنومی جدایه شنبلیله (قطعات DNA-C و DNA-U2) می‌تواند به پائین بودن غلظت آن‌ها در این گیاه نسبت داده شود. پائین بودن غلظت برخی از قطعات ژنومی نانویروس‌ها و عدم ردیابی آن‌ها، در تحقیقات قبلی نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال تاکنون قطعه ژنومی DNA-U4 برای PSSaV گزارش نشده است (Hasanvand et al., 2021; Vetten et al., 2012). علاوه بر این، علیرغم پیشینه بیش‌تر ویروس تیپ جنس *Nanovirus* یعنی

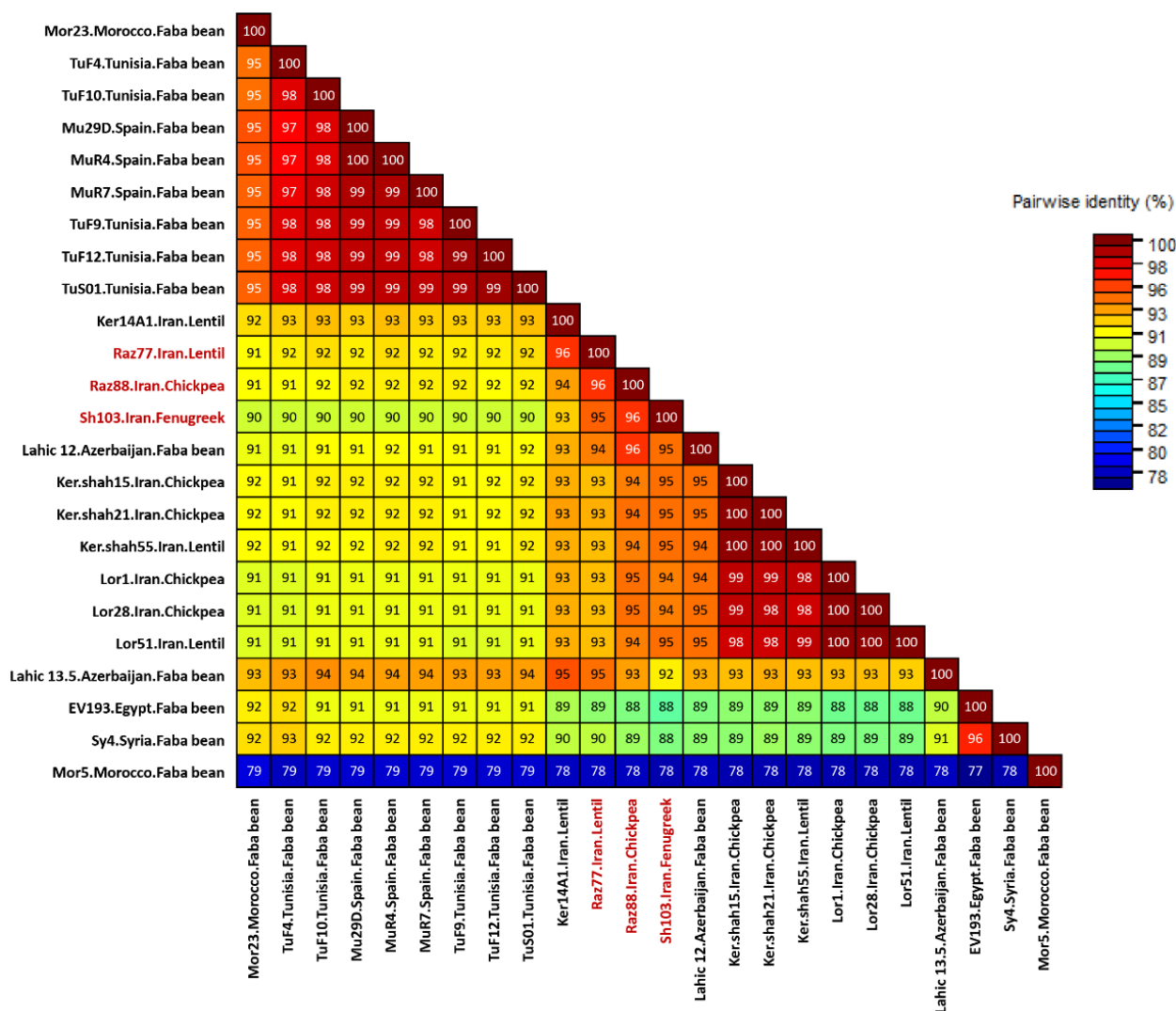
با استفاده از تجمیع قطعات ژنومی، این سه جدایه به همراه سایر جدایه‌های ایرانی FBNYV ثبت شده در بانک ژن و همچنین دو جدایه از کشور آذربایجان در یک گروه قرار گرفتند که نشان‌دهنده ارتباط فیلوژنتیکی با توزیع جغرافیایی آنها است (شکل ۳). در این گروه، جدایه‌های مناطق غربی و شرقی ایران نیز از یکدیگر جدا شده‌اند. بدین صورت که جدایه‌هایی از استان‌های لرستان و کرمانشاه (واقع در غرب ایران) یک زیرگروه مستقل را تشکیل داده‌اند. قرارگرفتن جدایه Ker-14A1 که قبلاً از منطقه رابر واقع در استان کرمان (جنوب شرقی ایران) گزارش شده است (Avish-Koohshahi et al., 2021)، در کنار سه جدایه مورد مطالعه در تحقیق حاضر که همگی آنها از نوار شرقی ایران (استان‌های کرمان، خراسان رضوی و خراسان شمالی) گزارش شده‌اند، قابل توجه است.

ویروس کوتولگی شبدر زیرزمینی نسبت به سایر نانویروس‌ها، تا مدت‌ها قطعات ژنومی DNA-U2 و DNA-U4 آن گزارش نشده بود. تا اینکه در سال ۲۰۱۹، وجود این دو قطعه با استفاده از روش‌های دقیق، ردیابی و گزارش گردید (Knierim et al., 2019). مقایسه تجمیع ترادف‌های بدست آمده با یکدیگر نشان داد که میزان یکسان بودن ژنوم این سه جدایه با یکدیگر بین ۹۴٫۹۶-۹۶٫۲۰ درصد می‌باشد و در بین این سه جدایه، بیش‌ترین و کم‌ترین میزان یکسانی ترادف نوکلئوتیدی به ترتیب بین جدایه‌های شنبليله و نخود ایرانی (۹۶٫۲ درصد) و شنبليله و عدس (۹۴٫۹۶ درصد) وجود دارد (شکل ۲). از بین شش قطعه، بیش‌ترین و کم‌ترین درصد یکسانی بین سه جدایه، به ترتیب مربوط به قطعات DNA-R (۹۹٫۱-۹۹٫۳) و DNA-M (۸۵٫۹۷-۹۷٫۸) بود. در درخت تبارزائی رسم شده

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های ویروس زردی بافت‌مردۀ باقلا مطالعه شده در این تحقیق.

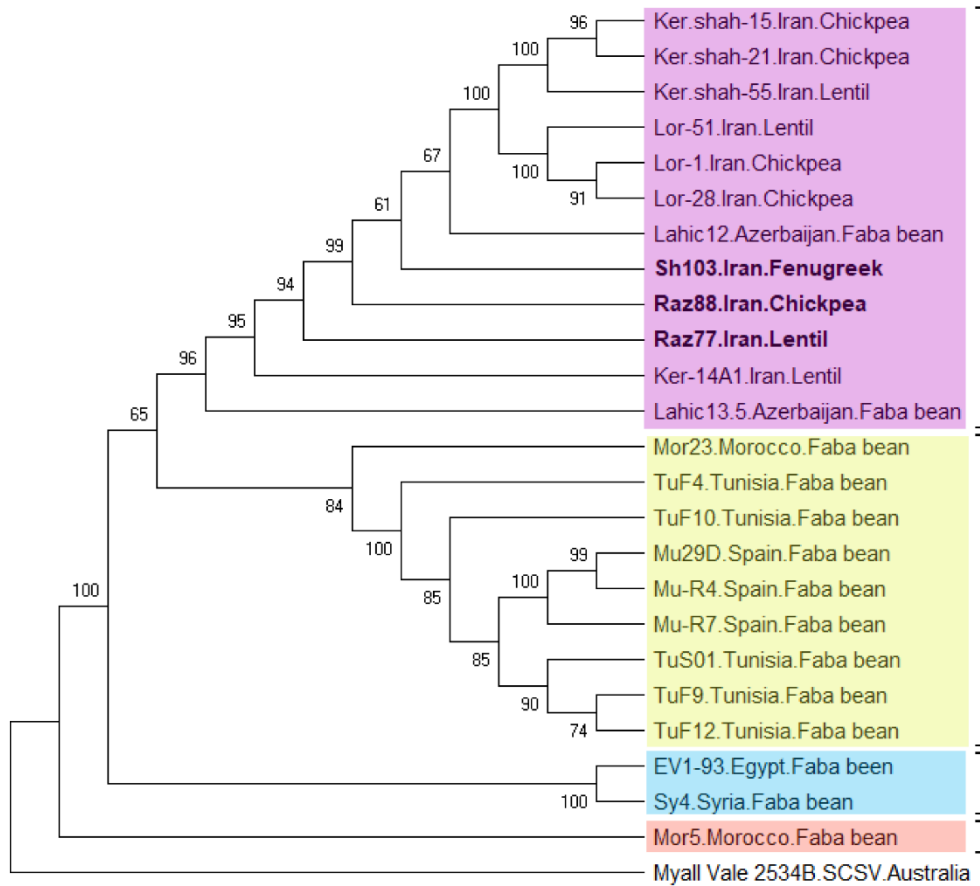
Table 1. Characteristics of faba bean necrotic yellows virus isolates studied in this work.

Isolate name component	Location (Province)	Length (nts)	Accession no.
IR:Raz:77:Len:16			
DNA-N	Northern Khorasan	987	MH113438
DNA-C	"	991	MH113439
DNA-S	"	1002	MH113440
DNA-M	"	994	MH113441
DNA-R	"	1003	MH113442
DNA-U1	"	998	MH113443
DNA-U2	"	991	MH113444
DNA-U4	"	991	MH113445
IR:Raz:88:Chi:16			
DNA-N	"	983	MH113430
DNA-C	"	991	MH113431
DNA-S	"	1002	MH113432
DNA-M	"	994	MH113433
DNA-R	"	1003	MH113434
DNA-U1	"	989	MH113435
DNA-U2	"	991	MH113436
DNA-U4	"	917	MH113437
IR:Sab:Sh103:Fen:16			
DNA-N	Razavi Khorasan	987	PV987715
DNA-S	"	1002	PV987716
DNA-M	"	992	PV987717
DNA-R	"	1003	PV987718
DNA-U1	"	989	PV987719
DNA-U4	"	992	PV987720



شکل ۲- ماتریکس مقایسه دو به دو ترادف نوکلئوتیدی قطعات ژنومی تجمیع شده (concatenated genome components) سه جدایه ویروس زردی بافت‌مردۀ باقلا (حروف قرمز رنگ) با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.3. هر خانه رنگی نشان‌دهنده درصد یکسان بودن بین دو ترادف است. مقیاس راهنمای رنگی، نشان‌دهنده همبستگی مقادیر یکسانی با رنگ‌های نمایش داده شده در ماتریکس است.

Fig. 2. Pairwise identity matrix generated from concatenated genome components of three isolates of faba bean necrotic yellows virus (in red) with those of the isolates available in GenBank using SDT v1.3 software. Each colored cell represents a percentage identity score (shown inside the cell) between two sequences. The color key correlates pairwise identity values with the colors displayed in the matrix.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی رسم شده به روش حداکثر تشابه (maximum likelihood) بر اساس تجمیع ترادف‌های نوکلئوتیدی قطعات ژنومی به ترتیب شامل DNA-R، DNA-S، DNA-M، DNA-N، DNA-U1 و DNA-U4 سه جدایه ویروس زردی بافت‌مردۀ باقلا در این مطالعه (حروف پررنگ) و سایر جدایه‌های این ویروس در بانک ژن. محاسبه اعتبارسنجی (bootstrap) با استفاده از ۱۰۰۰ تکرار صورت گرفته است. مقادیر اعتبارسنجی در انشعابات با کمتر از ۵۰٪ حذف شده‌اند. تجمیع ترادف قطعات ژنومی معادل ویروس کوتولگی شبدر زیرزمینی (subterranean clover stunt virus, SCSV) جدایه Myall Vale 2534B به عنوان خارج گروه استفاده شده است.

Fig. 3. Maximum-likelihood phylogenetic tree constructed based on the alignment of the sequences of concatenated genome components in order of DNA-R, DNA-S, DNA-M, DNA-N, DNA-U1 and DNA-U4 of three isolates of faba bean necrotic yellows virus (in bold) with those of the isolates available in GenBank. The values at the nodes represent percentage bootstrap confidence scores (1000 replicates). Branches with less than 50% bootstrap value were removed. The tree has been rooted with the corresponding sequence of subterranean clover stunt virus as an outgroup (Myall Vale 2534B isolate, Australia).

در گروه تبارزائی دوم، تمام جدایه‌های اروپائی با بیش‌تر جدایه‌های آفریقائی، همگی جداشده از گیاه باقلا قرار دارند. جدایه‌های آفریقائی (مصر و مراکش) و آسیائی (سوریه) تشکیل‌دهنده گروه‌های سوم و چهارم هستند که ارتباط تکاملی دورتری را با سایر جدایه‌های FBNYV نشان می‌دهند.

(Lamiaceae) به SYSV در ایران با تعیین ترادف تمام قطعات ژنومی آنها به اثبات رسیده است. به این سبزیجات می‌توان گیاه شنبلیله از خانواده Fabaceae را هم اضافه نمود (Esmaeili et al., 2023). در مطالعات قبلی نیز علاوه بر بقولات، شیوع FBNYV در سه استان شرقی ایران شامل استان‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی و کرمان در مزارع شوید، جعفری، شنبلیله و یونجه عمدتاً با تعیین ترادف قطعه ژنومی DNA-S گزارش شده است (Avish-Koohshahi et al., 2021). ضمن اینکه، تنها میزبان شناخته شده PSSaV که از ایران نیز گزارش شده است، گیاه جعفری است (Hasanvand et al., 2019; Vetten et al., 2021). بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق نیز به غیر از بقولات، آلودگی شنبلیله به FBNYV با تعیین ترادف شش قطعه ژنومی تأیید می‌گردد.

در مجموع، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که علاوه بر بقولات، سبزیجات برگ‌ی از خانواده‌های مختلف، گروه مهمی از میزبان‌های نانوویروس‌ها شامل FBNYV، SYSV و PSSaV را در ایران تشکیل می‌دهند (Avish-Koohshahi et al., 2021; Esmaeili et al., 2023; Hasanvand et al., 2021). این موضوع، با توجه به نقش پررنگ این گیاهان در رژیم غذایی مردم ایران، می‌تواند قابل تأمل باشد. مطالعات بیشتری در مورد آلودگی این گیاهان به سایر نانوویروس‌های شایع در ایران مانند FBNSV و MVCDV، می‌تواند منجر به درک بهتری از اهمیت شیوع نانوویروس‌ها در سبزیجات برگ‌ی گردد.

تعارض منافع

نویسندگان تأیید می‌کنند که این تحقیق در غیاب هرگونه روابط تجاری یا مالی که می‌تواند به عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

موازین اخلاقی

در انجام این پژوهش تمامی موازین و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.

تحلیل ترادف ژنومی نانوویروس‌ها، عمدتاً از طریق مقایسه تجمیع قطعات صورت می‌گیرد. نتایج نشان می‌دهد که این ویروس‌ها از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند و پدیده‌هایی مانند نوترکیبی درون و بین‌ژنی و همچنین بازآرایی ژنومی نقش مهمی در تکامل آنها دارند. در این میان، ویروس زرد بافت‌مردۀ باقلا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های بررسی‌شده، الگوهای پیچیده‌ای از تنوع را نشان می‌دهند. این ویژگی همراه با شواهد متعدد از بازآرایی و نوترکیبی، بیانگر پویایی بالای ژنوم FBNYV و توانایی آن در سازگاری با میزبان‌ها و محیط‌های جدید است (Grigoros et al., 2014). این تغییرات ژنتیکی، نه تنها توانایی ویروس را در تکثیر و انتقال افزایش می‌دهند، بلکه اهمیت بالایی در پیش‌بینی رفتار ویروس و طراحی راه‌یافت‌های مؤثر کنترل بیماری دارند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که برخی پروتئین‌های رمزگذاری‌شده توسط ژنوم نانوویروس‌ها در سازوکار بیماری‌زایی و سرکوب پاسخ دفاعی میزبان نقش مستقیم دارند. پروتئین رمزگذاری‌شده توسط قطعه DNA-U2 نانوویروس‌ها به‌عنوان یک سرکوبگر خاموشی آرنا، سبب مهار گسترش سیگنال خاموشی و سرکوب ایمنی ذاتی گیاه می‌شود (Yan et al., 2024). این یافته‌ها، بیانگر آن است که بررسی عملکرد پروتئین‌های ویروسی می‌تواند چشم‌انداز جدیدی برای درک سازوکار بیماری‌زایی و طراحی راهکارهای اصلاحی فراهم آورد.

با مقایسه شش یا هشت قطعه انفرادی ژنوم این سه جدایه با قطعات ژنوم مشابه مربوط به جدایه‌های موجود در بانک ژن، مشخص گردید که نزدیک‌ترین جدایه به آنها، جدایه‌های ایرانی Lor1 و Lor28 از گیاه نخود ایرانی با یکسان‌بودن ترادف نوکلئوتیدی به میزان ۹۴/۵۰ درصد می‌باشند.

دامنه میزبانی نانوویروس‌ها محدود به گیاهان خانواده Fabaceae نیست و گیاهان دیگری از جمله سبزیجات برگ‌ی از دو خانواده مختلف نیز توسط این ویروس آلوده می‌شوند. به‌عنوان مثال، قبلا آلودگی گیاهان شوید (Apiaceae)، ریحان (Lamiaceae)، جعفری (Apiaceae) و نعناع

تشکر و قدردانی

این تحقیق، با حمایت مالی پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه

شهید باهنر کرمان (طرح شماره ۵۷/۰۱/پ) انجام شده است که بدین وسیله

سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Alavinejad, E., Behjatnia, S. A. A., Izadpanah, K., & 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.
- Avish-Koohshahi, A., Heydarnejad, J., Esmaeili, M., Sadeghi-Majd, J., Hasanvand, V., & Massumi, H. (2021). Natural hosts and genome characterization of Faba bean necrotic yellows virus in three eastern provinces of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 57(2), 139-152. [Link]
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797. [Link]
- Esmaeili, M., Heydarnejad, J., Hasanvand, V., Massumi, H., Kvarnheden, A., & Varsani, A. (2023). Genome characterization of Iranian Sophora yellow stunt virus isolates and construction of infectious clones. *Plant Pathology*, 72, 1283-1292. [Link]
- Grigoras, I., Ginzo, A. I., Martin, D. P., Varsani, A., Romero, J., Mammadov, A., Huseynova, I. M., Aliyev, J. A., Kheyir-Pour, A., Huss, H., Ziebell, H., Timchenko, T., Vetten, H. J., & Gronenborn, B. (2014). Genome diversity and evidence of recombination and reassortment in nanoviruses from Europe. *Journal of General Virology*, 95, 1178-1191. [Link]
- Gronenborn B. and Vetten H.J. (2020). Nanoviruses (Nanoviridae). pp 470-480. In: Bamford D. and Zuckerman M. (Eds). Encyclopedia of Virology. 4th ed., Vol. 3, Elsevier/Academic Press, London. [Link]
- Hasanvand, V., Heydarnejad, J., Massumi, H., Kleinow, T., Jeske, H., Fontenele, R. S., Kraberger, S., & Varsani, A. (2021). Genome characterization of parsley severe stunt associated virus in Iran. *Virus Genes*, 57, 293-301. [Link]
- Hassan-Sheikhi, P., Heydarnejad, J., Massumi, H., Kraberger, S., & Varsani, A. (2020). Novel nanovirus and associated alphasatellites identified in milk vetch plants with chlorotic dwarf disease in Iran. *Virus Research*, 276, 197830. [Link]
- 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. [Link]
- Heydarnejad, J., Kamali, M., Massumi, M., Kvarnheden, A., Male, M. M., Stainton, D., Kraberger, S., Martin, D. P., & Varsani, A. (2017). Identification of a nanovirus-alphasatellite complex in Sophora alopecuroides. *Virus Research*, 235, 24-32. [Link]
- Knierim, D., Barrière, Q., Grigoras, I., Winter, S., Vetten, H. J., Schwinghamer, M., Thomas, J., Chu, P., Gronenborn, B., & Timchenko, T. (2019). Subterranean clover stunt virus revisited: detection of two missing genome components. *Viruses*, 11(2), 138. [Link]
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. [Link]
- Lal, A., Kil, E. J., Thuy, V. T. B., Fadhila, C., Ho, P. T., Byun, H. S., Dao, H. T., Kim, J. K., & Lee, S. (2020). Milk vetch dwarf virus infection in the Solanaceae and Caricaceae families in Southeast Asia. *Plant Pathology*, 69, 1026-1033. [Link]
- Lal, A., Vo, T. T. B., Sanjaya, I. G. N. P. W., Ho, P. T., Kim, J. K., Kil, E. J., & Lee, S. (2020). Nanovirus disease complexes: An emerging threat in the modern era. *Frontiers in Plant Science*, 11, 558403. [Link]
- Lotfipour, M., Izadpanah, K., & 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. [Link]
- Makkouk, K. M., Fazlali, Y., Kumari, S. G., & 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. [Link]
- Mansourpour, M., Dizadji, A., & 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. [Link]
- Muhire, B. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One*, 9(9), e108277. [Link]
- Shepherd, D. N., Martin, D. P., Lefeuvre, P., Monjane, A. L., Owor, B. E., Rybicki, E. P., & Varsani, A. (2008). A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *Journal of Virological Methods*, 149, 97-102. [Link]
- 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. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Nanoviridae. *Journal of General Virology*, 102(3), 001544. [Link]
- Vetten, H. J., Dale, J. L., Grigoras, I., Gronenborn, B., Harding, R., Randles, J. W., Sano, Y., Thomas, J. E., Timchenko, T., Yeh, H. H., King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). Nanoviridae. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 395-404). Elsevier, Academic Press. [Link]
- Vetten, H. J., Knierim, D., Rakoski, M. S., Menzel, W., Maiss, E., Gronenborn, B., Winter, S., & Krenz, B. (2019). Identification of a novel nanovirus in parsley. *Archives of Virology*, 164, 1883-1887. [Link]

- Yan, D., Han, K., Lu, Y., Peng, J., Rao, S., Wu, G., Liu, Y., Chen, J., Zheng, H., & Yan, F. (2024). The nanovirus U2 protein suppresses RNA silencing via three conserved cysteine residues. *Molecular Plant Pathology*, 25(1), e13394. [[Link](#)]
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., & 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. [[Link](#)]