



شناسایی و بررسی مولکولی ویروس موزاییک معمولی لویا (BCMV) و موزاییک نکروتیک معمولی لویا (BCMNV) در استان مازندران

زهره مرادی^۱ - محسن مهرور^{۲*} - احسان نظیفی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۲۹

چکیده

طی سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳، تعداد ۵۰ نمونه برگ لویا دارای علائم از مزارع استان مازندران جمع‌آوری و RNA کل آنها استخراج شد. طی آزمون RT-PCR با استفاده از یک جفت آغازگر دژنره منطبق بر ژن کدکننده پروتئین Cylindrical inclusion (CI) قطعه‌ای به طول ۶۸۰bp در ۱۳ نمونه تکثیر گردید. تکثیر اختصاصی نمونه‌های آلوده با آغازگرهای CIF/R، نشان از آلودگی به یک پوتی‌ویروس داشت. محصول PCR مربوط به دو جدایه پس از همسانه‌سازی در حامل pTG19-T، توالی‌یابی شد. آنالیز بلاست توالی‌ها نشان داد که قطعات تکثیر شده در واکنش PCR متعلق به ویروس موزاییک نکروتیک معمولی لویا (*Bean common mosaic necrosis virus*, BCMNV) (از لویا سفید) و ویروس موزاییک معمولی لویا (*Bean common mosaic virus*, BCMV) (از لویا چشم بلبلی) است. آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌های تعیین ترادف شده در ناحیه ژنی CI نشان داد که جدایه‌ی تعیین توالی شده BCMV-MAZ (از ساری) در سطح نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای به ترتیب دارای بیشترین شباهت (۹۶/۸٪ و ۹۸/۷٪) با جدایه آمریکای (RUIM) و کمترین شباهت (۷۹/۵٪ و ۹۱/۶٪) با جدایه کره جنوبی (Habin1) می‌باشد. همچنین جدایه BCMNV-MAZ (از جویبار) بیشترین شباهت (۹۷/۸٪) را با جدایه‌های آمریکایی NL5، NL-3 K و کمترین شباهت (۹۶/۹٪) را با NL8 در سطح نوکلئوتیدی دارد. در سطح اسید آمینه‌ای نیز ۹۷/۷٪ شباهت با سایر جدایه‌های مورد بررسی دارد. این اولین گزارش از وجود ویروس‌های مذکور در استان مازندران به روش مولکولی است.

واژه‌های کلیدی: BCMV، BCMNV، RT-PCR، آنالیز فیلوژنتیک

مقدمه

virus، متعلق به جنس *Potyvirus* (تیره *Potyviridae*) از شاخه -ترین و مخربترین آنها هستند و در تمام مناطق کشت لویا وجود دارند (۱۲). ژنوم این ویروس‌ها از یک رشته RNA تک‌لای مثبت، به طول تقریبی ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید تشکیل شده است (۲۵). پیکره‌ها رشته‌ای شکل، انعطاف پذیر، فاقد غشا و دارای طول ۷۵۰ نانومتر و عرض ۱۱-۱۳ نانومتر است (۱۱ و ۲۴). این پیکره‌ها دارای تقارن مارپیچی بوده و توسط ۲۰۰۰ زیر واحد پروتئین پوششی که بین ۲۸ تا ۳۴ کیلو دالتون وزن مولکولی دارند و ۹۵ درصد وزن کل پیکره ویروسی را شامل می‌شوند، احاطه شده اند (۱۱). این دو ویروس در طبیعت، دامنه میزبانی وسیعی نداشته و عمدتاً گونه‌های جنس *Phaseolus* به ویژه گونه *P. vulgaris* را آلوده می‌نمایند. BCMNV و BCMV در طبیعت، توسط بذر و شته‌های ناقل نظیر، *Aphis fabae*، *Aphis craccivora* بصورت ناپایا و در آزمایشگاه نیز به راحتی از طریق مایه زنی مکانی کی منتقل می‌گردند (۶ و ۳۷). پوتی‌ویروس‌ها در سیتوپلاسم سلول میزبان، اندامک‌های ویژه درون سلولی فرفره مانند

حبوبات پس از غلات، مهمترین منبع غذایی بشر بوده و مقدار پروتئین موجود در بذور حبوبات دو تا سه برابر بیشتر از دانه‌های غلات است. در بین حبوبات گسترده ترین سطح زیر کشت و همچنین بالاترین ارزش اقتصادی متعلق به لویا است (۳۶). لویا (*Phaseolus vulgaris* L. از خانواده *Fabaceae* (Leguminosae) بوده و شامل واریته‌های لویا سبز و لویا خشک (چیتی، سفید، قرمز و چشم بلبلی) می‌باشد (۵). واریته‌های مختلف لویا، به شدت تحت تاثیر عوامل بیماری‌زای ویروسی قرار می‌گیرند که در بین آنها، ویروس موزاییک معمولی لویا (*Bean common mosaic virus*) و ویروس موزاییک نکروتیک معمولی لویا (*Bean common mosaic necrosis*)

۱ و ۲- دانشجوی دکتری و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*- نویسنده مسئول: (Email: mehrvar@um.ac.ir)

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

تولید حبوبات در نقاط مختلف کشور می‌باشند (۲۸). در سال‌های اخیر میزان خسارت کاهش محصول در اثر آلودگی با این ویروس‌ها بیشتر از ۸۰ درصد گزارش شده است (۲۳). به دلیل گستردگی وسیع و تاثیر مهمی که این دو ویروس روی کیفیت و کمیت محصولات دارند ردیابی و شناسایی آنها در استان مازندران که از مناطق مهم کشت انواع مختلف حبوبات در ایران است، ضروری به نظر می‌رسد. روش‌های مبتنی بر PCR برای ردیابی و شناسایی پوتی‌ویروس‌ها در درجه اول بر اساس استفاده از آغازگرهای دژنره برای توالی‌های حفاظت شده در ژنوم‌های ویروسی است (۹). پروتئین CI بزرگترین محصول ژنی در پوتی‌ویروس‌هاست و به دلیل منحصر بفرد بودن در اعضای تیره *Potyviridae* دارای ارزش تاکسونومیک بالایی است. هدف از این تحقیق شناسایی و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروس‌های مذکور در استان مازندران می‌باشد که تاکنون بررسی جامعی در مورد آنها صورت نگرفته است. در این تحقیق با استفاده از آغازگرهای دژنره طراحی شده بر اساس ناحیه ژنی CI (۹) دو پوتی‌ویروس BCMV و BCMNV ردیابی شده و بخشی از منطقه ژنومی CI آنها تعیین ترادف گردید.

مواد و روش‌ها

طی تابستان سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ تعداد ۵۰ نمونه از واریته‌های مختلف لوبیا شامل لوبیا چشم بلبلی، لوبیا چیتی، لوبیا سفید و لوبیا قرمز که دارای علائمی از قبیل موزاییک، پیسکی (Mottling) خفیف تا شدید، بدشکلی، چین خوردگی (Rugosity) و بافت‌مردگی برگ و ساقه بودند جمع آوری شد. برگ‌های جمع آوری شده از هر بوته در پاکت جداگانه قرار داده شده، در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شد.

استخراج آر.ان.ای از بافت گیاهی با استفاده از Total RNA isolation kit (دنازیست) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. جهت انجام واکنش‌های RT-PCR از یک جفت آغازگر دژنره پوتی‌ویروس‌ها (۹) منطبق بر ژن کد کننده پروتئین Cylindrical inclusion (CI) استفاده شد که در ناحیه ۴۵۹۵-۴۵۷۰-۳۹۱۳-۳۹۳۸ ژنوم کامل اعضای جنس پوتی‌ویروس حفاظت شده‌اند. جهت سنتز cDNA ابتدا مخلوط ۴ میکرولیتر از RNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر از آغازگر برگشت (۱۵ pmol) و ۸ میکرولیتر آب مقطر تزریقاتی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C در دستگاه ترموسایکلر گرما داده شد تا آر.ان.ای واسرشته گردد و بلافاصله به مدت ۳ دقیقه داخل یخ قرار داده شد. مخلوط حاصل با افزودن ۲ میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۴ میکرولیتر بافر ۵x واکنش و ۱ میکرولیتر از آنزیم MMLV-Reverse Transcriptase (۲۰۰u/μl) (Fermentas, Lithuania)، به مدت یک ساعت داخل دستگاه

(Pinwheel) یا طومار مانند (Scroll) تولید می‌کنند که از ویژگی‌های مهم تاکسونومیک آنها است (۲۵). پروتئین CI (Cylindrical inclusion) کد شده توسط ویروس تشکیل این اندامک‌های ویژه درون سلولی استوانه‌ای را می‌دهد که منحصر به آلودگی پوتی-ویروس‌هاست (۳۰). پروتئین CI دارای فعالیت هلیکازی و ATPase است و در تکثیر، ترجمه و حرکت سلول به سلول ویروس نقش دارد (۱۴ و ۱۵).

BCMV ابتدا در سال ۱۹۱۷ از آمریکا از روی *P. vulgaris* گزارش گردید (۱۷). این ویروس پراکنش جهانی دارد (۲۶ و ۳۲) و خسارت اقتصادی سنگینی از طریق کاهش عملکرد و کاهش کیفیت محصول ایجاد می‌نماید (۶). BCMV تا سال ۱۹۲۲ بر اساس سرولوژی و بروز علائم، شامل دو سروتیپ A و B بوده است که امروزه این دو سروتیپ به عنوان ویروس‌های مجزا شناخته می‌شوند (۱۸). مک کرن و همکاران (۱۹) با استفاده از روش HPLC اثبات کردند که این دو سروتیپ دو ویروس جدا از هم هستند. ترادف نوکلئوتیدی نوای کدکننده (Coat Protein) CP این دو سروتیپ نیز نشان داد که CP این دو از نظر اندازه و ترادف نوکلئوتیدی متفاوت است (۱۳). از این رو در نهایت دو سروتیپ A و B به‌عنوان دو گونه مجزا از جنس *Potyvirus* یعنی BCMV و BCMNV طبقه‌بندی شدند (۷ و ۳۵). BCMV معمولاً روی ارقام لوبیا علائم موزاییک ایجاد می‌نماید. در حالیکه جدایه‌های BCMNV روی ژنوتیپ‌های حاوی ژن غالب و مقاوم *I* در دماهای پائین و بالا، ایجاد نکروز سیستمیک کشنده (Lethal systemic necrosis) می‌کنند (۳۱). اما تمام نژادهای شناخته شده‌ی BCMV و BCMNV باعث ایجاد علائم مشابه بر روی ژنوتیپ‌های فاقد ژن مقاومت می‌شوند (۱۲). علائم ویروس‌ها روی ارقام لوبیا به صورت لکه‌های موزاییکی سبز تیره و روشن، پیچیدگی و بدشکلی برگ‌ها و غلاف‌ها، چین خوردگی برگ‌های پایینی و کاهش رشد است. در برخی ارقام، نکروز رگبرگی شدید رخ می‌دهد که سبب مرگ گیاه شده و به عنوان سیاهی ریشه (Black-root) شناخته می‌شود (۶ و ۲۰). در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۴۲ توسط منوچهری وجود BCMV از مزارع لوبیا در دماوند گزارش شد. نوع سروتیپ، پاتوتیپ‌ها و استرین‌های BCMV در استان تهران توسط نادریپور و همکاران (۲۱ و ۲۲) شناسایی شد. برداران و همکاران (۲) پراکنش BCMV را در منطقه مشهد و چناران بررسی نمودند. شهرآیین و همکاران (۲۹) با استفاده از روش‌های سرولوژی و الکترون میکروسکوپی موفق به شناسایی برخی از عوامل بیماری‌زای لوبیا در برخی مناطق کشور شدند. پیمبری و همکاران (۳۳) وجود BCMV را در استان‌های تهران، کهگیلویه و بویراحمد و فارس گزارش کردند. سالاری و همکاران (۲۷) BCMNV را از اراک و لاهیجان و BCMV را از کرج، نیشابور و زنجان گزارش کردند. BCMV و BCMNV مهمترین عوامل محدود کننده افزایش

واکنش RT-PCR با استفاده از یک جفت آغازگر دژنره از ژن CI، منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۸۰ جفت نوکلئوتید در ۱۳ نمونه شد ضمن اینکه در نمونه گیاه سالم هیچگونه بانندی مشاهده نشد (شکل ۲).

عمده ترین علائمی که مشاهده گردید موزاییک، پیسک، نکروز و چین خوردگی برگها بود (شکل ۱).

از بین ۱۳ نمونه‌یی که در آزمون PCR مثبت ارزیابی شده بودند، محصول PCR مربوط به دو جدایه پس از همسانه‌سازی و نیز تایید قطعه همسانه‌سازی شده، از دو جهت تعیین توالی شدند. با مقایسه ترادف‌های حاصل با اطلاعات موجود در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه BLASTn مشخص شد که قطعات همانندسازی شده در واکنش PCR مربوط به قسمتی از ژن پروتئین CI ویروس-های BCMV (از لوبیا چشم بلبلی، منطقه ساری) و BCMNV (از لوبیا سفید، منطقه جویبار) است.

در آنالیز فیلوژنتیکی، جدایه‌های تعیین توالی شده به همراه تعدادی از جدایه‌های موجود در GenBank (جدول ۱) بررسی شدند. ترادف‌های موجود از ناحیه ژنومی CI متناظر با ناحیه تعیین ترادف شده به اندازه حدود ۶۸۰ نوکلئوتید انتخاب و هم‌ردیف‌سازی شدند. دندروگرام حاصل از مطالعات تبارزائی (شکل ۳) نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی BCMV در دو گروه اصلی جدا از هم قرار می‌گیرند که هر گروه نیز به زیرگروه‌هایی تقسیم می‌شود (شکل ۳-A). زیر گروه IA شامل سه جدایه از چین و دو جدایه از اندونزی است. جدایه BCMV-MAZ از منطقه ساری استان مازندران به همراه جدایه RUIM (از آمریکا) در زیرگروه IB قرار می‌گیرند. گروه II با بیشترین تعداد شامل طیف وسیعی از جدایه‌های چین و نیز یک جدایه از آمریکا، آلمان، هند و کره جنوبی می‌باشد. نتایج فیلوژنتیکی بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن CI نشان داد که هشت جدایه BCMNV مورد بررسی به دو گروه اصلی I و II تقسیم می‌شوند (شکل ۳-B). جدایه BCMNV-TN1 (از آمریکا) به تنهایی در گروه I قرار گرفته و سایر جدایه‌ها در گروه II قرار می‌گیرند. گروه II خود به ۲ زیرگروه تقسیم می‌شود که جدایه BCMNV-MAZ از منطقه جویبار به همراه جدایه آمریکایی NL8 در زیرگروه IIA قرار می‌گیرند. زیر گروه IIB شامل تعدادی جدایه‌های آمریکایی و یک جدایه از بریتانیا می‌باشد. مقایسه هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای هر یک از جدایه‌های مذکور با سایر جدایه‌های موجود در دنیا نشان داد که در سطح نوکلئوتیدی جدایه‌ی BCMV-MAZ کمترین شباهت (۷۹/۵٪) را با جدایه Habin1 (از کره جنوبی) و بیشترین شباهت (۹۶/۸٪) را با جدایه RUIM (از آمریکا) دارد. در سطح اسید آمینه‌ای جدایه BCMV-MAZ بیشترین شباهت (۹۸/۷٪) را با جدایه RUIM و کمترین شباهت (۹۱/۶٪) را با Habin1 دارد.

ترموسایکلر با دمای ۴۲°C به منظور سنتز cDNA قرار گرفت. پس از آن به مدت ۵ دقیقه در ۹۴°C جهت غیر فعال ساختن آنزیم‌ها قرار داده شد. آزمون PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۴ میکرولیتر از cDNA، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10× PCR، ۱ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ میلی مولار) و ۱ میکرولیتر (۵ واحد در میکرولیتر) Taq DNA polymerase (Lithuania) انجام گرفت. پروفایل دمایی PCR شامل یک چرخه در دمای ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ حاوی ۰/۵ μg/ml DNA Green Viewer (Pars tous) مورد بررسی قرار گرفت و با دستگاه UV Transilluminator اسید نوکلئیک مشاهده و به وسیله دستگاه Gel documentation (Syngene، انگلستان) از ژل عکسبرداری شد. محصول PCR مربوط به نمونه‌هایی که در ناحیه مورد انتظار (۶۸۰ bp) باند داده بودند، پس از جداسازی از ژل و خالص‌سازی با استفاده از Gel Recovery kit (دنازیست) به داخل ناقل پلاسمیدی pTG19-T الحاق شدند. پلاسمیدهای نوترکیب، درون سلولهای باکتریایی مستعد *Escherichia coli* سویه DH5 تراریخت شدند. باکتری‌های تراریخت در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک انتخابی آمپی سیلین در دمای ۳۷°C درجه به مدت ۱۲ ساعت مورد کشت قرار گرفتند. همسانه‌های حاوی ژن مورد نظر از طریق کلونی پی سی آر (Colony PCR) با استفاده از آغازگرهای M13 شناسایی شدند. دی.ان.ای پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت Plasmid DNA isolation (دنازیست) استخراج شده و مورد توالی یابی (توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی) قرار گرفتند. ترادف‌های حاصل، در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLASTn ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه شدند. پس از ادغام ترادف‌های حاصل از ۱ تا ۲ همسانه از قطعات مختلف، ترادف استنتاجی (Consensus sequence) با استفاده از نرم افزار DNAMAN7 به دست آمد. مقایسه هم‌ردیف‌سازی چندگانه^۱ ترادف نوکلئوتیدی بین جدایه‌های این ویروس‌ها و سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن، با استفاده از برنامه ClustalW2 و نیز نرم‌افزار DNAMAN7 انجام شد. درخت فیلوژنتیکی حاصل از هم‌ردیف‌سازی چندگانه به روش Neighbour joining به وسیله برنامه 5.1.MEGA و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap) نیز ترسیم گردید (۳۳).

نتایج

1- Multiple alignment

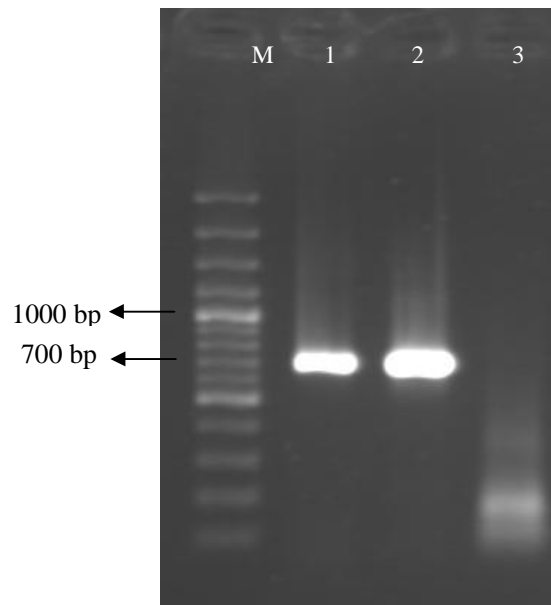
آمریکا و انگلستان ۹۷/۷ درصد می‌باشد. با توجه به دندروگرام رسم شده بین دندروگرام تبارزائی و شباهت نوکلئوتیدی جدایه‌ها همخوانی وجود دارد.

همچنین جدایه BCMNV-MAZ کمترین شباهت (۹۶/۹٪) را با NL8 (از آمریکا) و بیشترین شباهت (۹۷/۸٪) را با NL-3 K و NL5 (از آمریکا) در سطح نوکلئوتیدی دارد. در سطح اسید آمینه‌ای شباهت جدایه BCMNV-MAZ با دیگر جدایه‌های مورد بررسی از



شکل ۱- A- علائم موزاییک خفیف و چین خوردگی برگ در لوبیا چشم بلبلی آلوده به BCMNV B- موزاییک، پیسک و نکروز در برگ لوبیا سفید آلوده به BCMNV

Figure 1- A- Symptoms of mild mosaic and rugosity on Cowpea leaf infected by BCMNV B-mosaic, mottling and necrosis on white bean leaf infected by BCMNV



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی قطعات تکثیر شده (۶۸۰bp) در RT-PCR در ژل آگاروز ۱٪ مربوط به دو جدایه‌ی انتخابی ۱: BCMNV از لوبیا چیتی

۲: BCMNV از لوبیا سفید ۳: کنترل منفی با گیاه سالم لوبیا M- مارکر دی.ان.ای ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas)

Figure 2- Electrophoresis patterns of DNA fragments amplified by RT-PCR in 1% agarose gel related to 2 selected isolates 1: BCMNV from Cowpea 2: BCMNV from white bean 3: healthy bean plant extract as negative control. M: 100 bp DNA marker (Fermentas)

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های ویروس موزاییک معمولی و موزاییک نکروتیک معمولی لوبیا مورد استفاده در این مطالعه

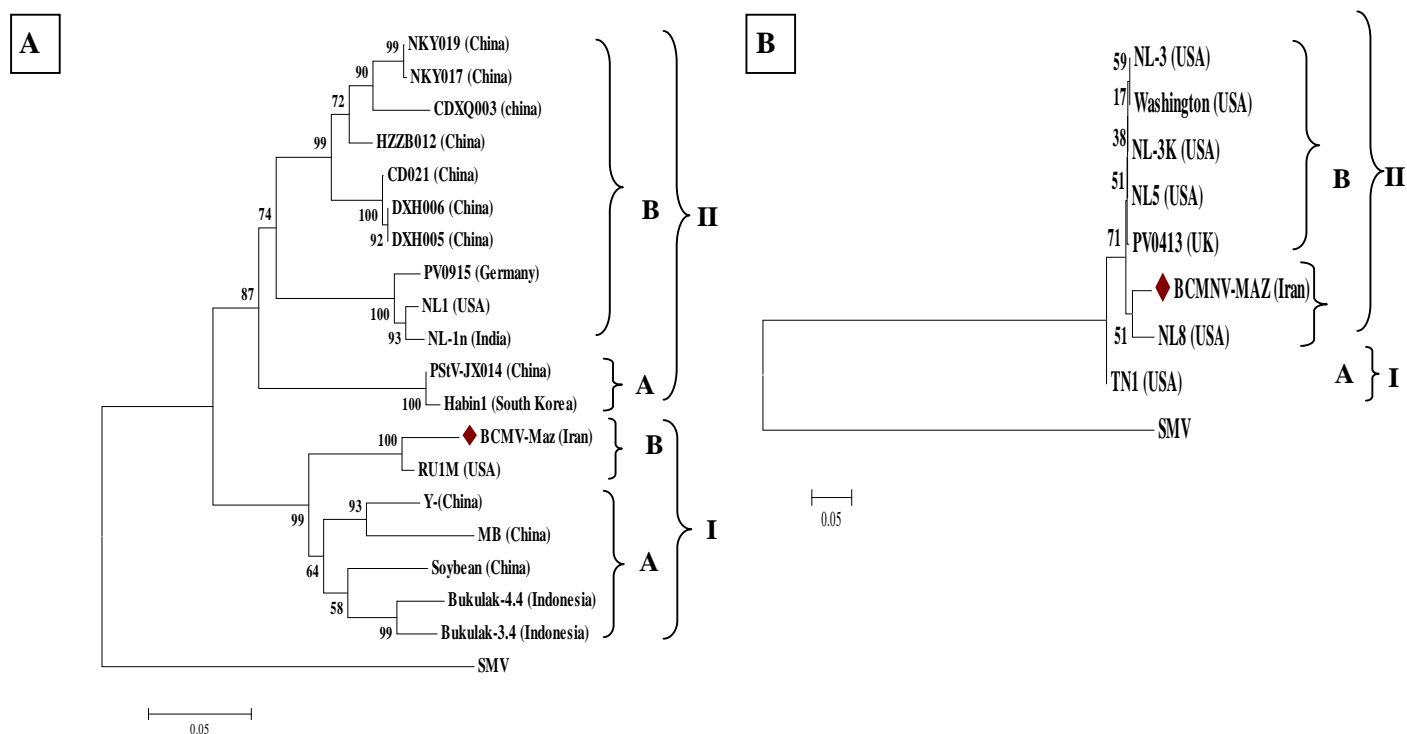
Table 1- Characteristics of BCMV and BCMNV isolates used in this study			
Isolate /Strain	Origin	Host	Accession no.
جدایه/استرین	منشا	میزبان	رس شمار
BCMV- Y	China:Zhejiang	Cowpea	AJ312438.1
BCMV- NKY019	China: Huai'an	<i>Glycine max</i>	KJ807818.1
BCMV- CDXQ003	China: Yancheng	<i>Glycine max</i>	KJ807821.1
BCMV- CD021	China: Wuhan	<i>Glycine max</i>	KM051426.1
BCMV- Habin1	South Korea	<i>Glycine max</i>	KJ508092.1
BCMV- RU1M	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	KJ645793.1
BCMV- NL1	USA:Iowa	<i>Phaseolus vulgaris</i>	KM023744.1
BCMV- NL-1n	India	<i>Phaseolus vulgaris</i>	KF114860.1
BCMV- NKY017	China:Huai'an	<i>Glycine max</i>	KJ807817.1
BCMV- HZZB012	China:Huai'an	<i>Glycine max</i>	KJ807816.1
BCMV- PV 0915	Germany	<i>Phaseolus vulgaris</i>	HG792064.1
BCMV-PStV.JX014	China: Wuhan	<i>Glycine max</i>	KJ807813.1
BCMV- DXH005	China: Wuhan	<i>Glycine max</i>	KJ807803.1
BCMV- DXH006	China: Wuhan	<i>Glycine max</i>	KM051431.1
BCMV- Bukulak-4.4	Indonesia	Yardlong bean	FJ653924.1
BCMV- Bukulak-3.4	Indonesia	Yardlong bean	FJ653921.1
BCMV- MB	China	Mung bean	KC832502.1
BCMV- soybean	China	Soybean	KC832501.1
BCMNV- NL5	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	HQ229993.1
BCMNV- NL8	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	HQ229994.1
BCMNV- TN1	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	HQ229995.1
BCMNV- NL-3 K	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AY864314.2
BCMNV- PV 0413	UK		HG792063.1
BCMNV- NL-3	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AY282577.1
BCMNV-Washington	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AY138897.1
SMV-N			NC_002634

بحث

تعدادی از نمونه‌های جمع‌آوری شده آلوده لوبیا، شناسایی شده و مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. ناحیه ژنومی CI دارای ۷ موتیف هلیکازی (I, Ia, II, III, IV, V و VI) بسیار حفاظت شده است (۳). آغازگرهای CIR و CIF به ترتیب بر اساس موتیف‌های I و V ناحیه ژنومی CI طراحی شده‌اند (۹). اسیدهای آمینه اسپارتیک و گلوتامیک اسید به ترتیب در موقعیت‌های اسیدآمینه‌های ۱۷۴ و ۱۷۵ این ناحیه از ژنوم وجود دارند، این دو اسیدآمینه که قبل از ناحیه غنی از اسیدهای آمینه هیدروفوبیک و غیرقطبی قرار دارند احتمالاً در حرکت ویروس نقش دارند (۱۶). توالی تکثیر شده در جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق دارای موتیف‌های Ia, II, III، بخشی از V و اسیدهای آمینه اسپارتیک و گلوتامیک اسید می‌باشند که دلالت بر توالی‌یابی درست جدایه‌ها دارد و با نتایج ها و همکاران (۹) و لی و همکاران (۱۶) نیز مطابقت دارد.

از آنجا که BCMV و BCMNV ممکن است در یک منطقه و یا حتی در یک گیاه مشاهده شوند، امکان نوترکیبی بین آنها وجود داشته که این موضوع می‌تواند منجر به ایجاد نژادها یا حتی پاتوتیپ‌های جدید شود (۳۴). بنابراین شناخت بیشتر تمایز سویه‌ها و جدایه‌های این ویروس‌ها به خصوص آنالیز تنوع ژنتیکی و تکامل آنها می‌تواند برای درک تکامل و توسعه بیماری‌ها و در نتیجه ارائه راهکار مناسب برای کنترل آن مفید باشد.

BCMV و BCMNV مهمترین و شایع‌ترین ویروس‌های لوبیا در دنیا هستند (۱۷) و در ایران نیز بطور گسترده‌ای در اغلب مناطق- کشت لوبیا پراکنده هستند (۲۸). وجود پوتی‌ویروس‌های لوبیا در مناطق کشت این محصول خطری بالقوه محسوب می‌شود که شناسایی این ویروس‌ها، منابع آنها و روابط آنها با یکدیگر را از اهمیت زیادی برخوردار می‌نماید. استفاده از آغازگرهای دژنره نه تنها ردیابی سریع پوتی‌ویروس‌های زیادی را تسهیل کرده بلکه توالی‌یابی قسمتی از ژنوم برای اهداف تاکسونومیک را نیز ممکن ساخته است. اکثر این آغازگرها بر اساس توالی‌های حفاظت شده در ژنوم از جمله ناحیه انتهایی ۳ ژنوم شامل نواحی کدکننده CP و NIb طراحی شده‌اند (۴، ۸ و ۱۰). بسیاری از محققین برای اهداف تاکسونومیک منطقه کد شونده CI را مناسبتر از CP (که بطور معمول استفاده می‌شود) می‌دانند. به اعتقاد آنها مقایسه با استفاده از منطقه کد شونده CI با بیشترین دقت منعکس‌کننده کل ژنوم است و این منطقه مناسبترین گزینه برای اهداف تشخیصی و طبقه‌بندی زمانی که توالی کامل ژنوم در دسترس نیست، می‌باشد (۱، ۹ و ۱۶). در این مطالعه نیز، با استفاده از آغازگرهای دژنره ژن کدکننده پروتئین CI که اختصاصی اعضای جنس پوتی‌ویروس است دو پوتی‌ویروس BCMV و BCMNV در



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های BCMV (A) و BCMNV (B) از همدریف سازی ۶۸۰ نوکلئوتید از ژن CI با استفاده از روش Neighbor-joining. اعداد نمایانگر درصد bootstrap هستند و مقدار bootstrap براساس ۱۰۰۰ تکرار برای محاسبه روابط فیلوژنتیکی به کار رفته است. جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه علامت‌دار شده‌اند. SMV (*Soybean mosaic virus*) به عنوان عضو برون گروه (Outgroup) در نظر گرفته شده است.

Figure 2- Phylogenetic tree constructed from the alignment of 680 bp nucleotide sequences of CI gene using neighbor -joining method based on 1000 replicates. The numbers indicate bootstrap percentage. Mazandaran isolates of BCMV and BCMNV generated from this study are marked. SMV (*Soybean mosaic virus*) included as out-group.

در مدیریت کنترل بیماری در جهت کاهش خسارت ضروری به نظر می‌رسد.

از آنجا که این ویروس‌ها بذر زاد نیز می‌باشند لذا بررسی میزان شیوع و تعیین درصد بذر زاد شدن آنها جهت ایجاد روش‌های مناسب برای مدیریت بیماری‌های ناشی از این ویروس‌ها در مزارع لوبیا اهمیت دارد. استفاده از بذور عاری از ویروس و ارقام مقاوم از روش‌های موثر کنترل این ویروس‌ها است. برای انجام مطالعات دقیق‌تر در زمینه شناسایی چگونگی مقاومت در گیاه لوبیا شناسایی بیشتر جدایه‌ها و سویه‌های این ویروس‌ها برای معرفی ارقام مقاوم موثر خواهد بود.

علاوه بر این BCMV و BCMNV اغلب اوقات باهم اثر هم‌افزایی داشته و بطور مشترک و تواما گیاه را آلوده می‌کنند (۲۷). هم‌افزایی نیز دارای جنبه‌های مختلفی است مثلاً افزایش شدت علائم ممکن است سبب کاهش فراوانی کل میزبان یا توده میزبان شود و یا افزایش غلظت ویروس موجب بالا رفتن پتانسیل میزبان به عنوان منبع زاد مایه گردد. از طرفی هم‌افزایی همانطور که میزان خسارت را در میزبان‌های آلوده افزایش می‌دهد، موجب افزایش میزان انتقال ویروس بوسیله ناقلین نیز خواهد شد (۱۱). بنابراین راه اندازی و توسعه سیستم دقیق ردیابی و آگاهی از خصوصیات و تنوع بیمارگر و نژادهای وابسته در یک منطقه و اثر هم‌افزایی آن با دیگر بیمارگرها

منابع

- Adams M.J., Antoniw J.F., and Fauquet C.M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviriidae*. *Archives of Virology*, 150:459–479.

- 2- Baradaran G.R., and Jafarpour B. 1998. Study on occurrence of *bean common mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in Bean fields of Mashhad and Chenaran area. p. 157-163. Proceedings of the 13th Iranian plant protection congress, 23-27 Aug. 1998. Karaj, Iran. (In Persian)
- 3- Carrington J.C., Jensen P.E., and Schaad M.C. 1998. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant Journal*, 14(4):393-400.
- 4- Chen J., and Adams M.J. 2001. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology*, 146:757-766.
- 5- Dorri H., lak M., bani-jamali S.M., Dadivar M., Ghanbari A., Khodshenas M., and Asadi B. 2003. Beans (from planting to harvest). *Journal of Extension Education*, 305, 77 p.(In Persian)
- 6- Drijfhout E. 1991. Bean common mosaic. *Compendium of Bean Diseases*. APS Press, pp 37-39.
- 7- Flores-Estevez N., Acosta-Gallegos J.A., Silva-Rosales L. 2003. *Bean common mosaic virus* and *Bean common mosaic necrosis virus* in Mexico. *Plant Disease*, 87:21-25.
- 8- Gibbs A.J., Mackenzie A.M., and Gibbs M.J. 2003. The 'potyvird primers' will probably provide phylogenetically informative DNA fragments from all species of *Potyviridae*. *Journal of Virological Methods*, 112:41-44.
- 9- Ha C., Coombs S., Revill P.A., Harding R.M., Vu M., and Dale J.L. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives of Virology*, 153(1):25-36.
- 10- Hsu Y.C., Yeh T.J., and Chang Y.C. 2005. A new combination of RT-PCR and reverse dot blot hybridization for rapid detection and identification of potyviruses. *Journal of Virological Methods*, 128:54-60.
- 11- Hull R. 2014. *Plant virology* (5th ed.). New York: Academic Press. 1098 p.
- 12- Kelly J.D. 1997. A review of varietal response to bean common mosaic potyvirus in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Varieties and Seed*, 10:1-6.
- 13- Khan J.A., LohuisD., Goldbach R., and Dijkstra J. 1993. Sequence data to settle the taxonomic position of *Bean common mosaic virus* and *Blackeye cowpea mosaic virus* isolates. *Journal of General Virology*, 74: 2243-2249.
- 14- Klein P.G., Klein R.R., Rodriguez-Cerezo E., Hunt A.G., and Shaw J.G. 1994. Mutational analysis of the *Tobacco vein mottling virus* genome. *Virology*, 204:759-769.
- 15- Lopez-Moya J.J., Valli A., and Garcia J.A. 2009. *Potyviridae*. *Encyclopedia of Life Sciences. Annual Review of Phytopathology*, 34:227-247.
- 16- Lee K.C., Wong S.M., Mahtani P.H., and Chng C.G. 1997. Sequence and phylogenetic analysis of the cytoplasmic inclusion protein gene of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*: its role in classification of the *Potyviridae*. *Virus Genes*, 14:41-53.
- 17- Mavric I. and Sustar-Vozlic J. 2004. Virus diseases and resistance to *Bean common mosaic* and *Bean common mosaic necrosis potyvirus* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta agriculturae slovenica*, 83:181-190.
- 18- McKern N.M., Mink G.I., Barnett O.W., Mishra A., Whittaker L.A., Silbernagel M.J., Ward C.W. and Shukla D.D. 1992a. Isolates of *Bean common mosaic virus* comprising two distinct potyviruses. *Phytopathology*, 82:923-929.
- 19- McKern, N. M., Ward C.W., and Shukla D.D. 1992b. Strains of *Bean common mosaic virus* consist of at least two distinct potyviruses. *Archives of Virology*, [Suppl.5]:407-414.
- 20- Mink G.I., and Silbernagel M.J. 1992. Serological and biological relationship among viruses in the *Bean common mosaic virus* subgroup. In: Barnett OW (ed) *Potyvirus taxonomy*. Springer, Wien New York. *Archives of Virology*, pp 397-406.
- 21- Naderpour M., Mosahebi G., and Kohi Habibi M. 2000. III, Vta & Vib Pathotypes and NL-5, NL-8 & NL-3 necrotic strains of BCMV, a new record for Iran. P. 280-283. Proceedings of the 14th Iranian plant protection congress, 5-8 Sep. 2000. Isfahan, Iran. (In Persian)
- 22- Naderpour M., Mosahebi G., and Kohi Habibi M. 2000. Detection of BCMV serotypes by using of physicochemical methods. p. 284-287. Proceedings of the 14th Iranian plant protection congress, 5-8 Sep. 2000. Isfahan, Iran. (In Persian)
- 23- Peyambari, M., Kohi habibi M., Mosahebi G., and Izatpanah K. 2011. Consideration of BCMV in some provinces of Iran and three genotypes response to BCMV. *Journal of Plant Protection*, 25(3):250-257.
- 24- Pudashini B.J., Shahid M.S., and Natsuaki K.T. 2013. First report of *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) infecting sweet bean in Nepal. *Plant Disease*, Vol. 97 No. 2 pp. 290.
- 25- Revers F., Le Gall O., Candresse T., and Maule A.J. 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant: potyvirus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12:367-376.
- 26- Saiz M., de Blas C., Carazo G., Fresno J., Romero J., and Castro S. 1995. Incidence and characterization of *Bean common mosaic virus* isolates in Spanish bean fields. *Plant disease*, 79:79-81.
- 27- Salari N., Seyed Musavi M., Shahræen N., Ghobani S., and Maleki M. 2013. Identification and diagnosis of isolates of *Bean common mosaic virus* and *bean common mosaic necrosis virus* by immunocapture RT-PCR. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 3 (11):21-28. (In Persian)
- 28- Shahræin N., Hasani mehraban H., Poordavaei H., Beyzaei A., Mostaed M., and Bananj k. 2001. Determination of genetically sources of resistance to three importance common bean viruses, CMV, BYMV and BCMV. *Research*

- final report, Khomain and bojnoord station (In Persian).
- 29- Shahraein N., Hasani mehraban H., Mostaed M., and Ghotbi T. 2002. Report on *Bean common mosaic necrosis virus* infecting French bean in Arak and Lorestan provinces.p. 282-287. Proceedings of the 15th Iranian plant protection congress, 7-11 Sep. 2002. Kermanshah, Iran. (In Persian)
 - 30- Shukla D.D., Ward C.W., and Brunt A.A. 1994. The *Potyviridae*. CAB International, Walling ford, UK. p. 74-112.
 - 31- Silbernagel M.J., Mink G.I., Zhao R.L., and Zheng G.Y. 2001. Phenotypic recombination between *Bean common mosaic* and *Bean common mosaic necrosis potyviruses* in vivo. *Archive of Virology*, 146:1007-1020.
 - 32- Strausbaugh C.A., Miklas P.N., Singh S.P., Myers J.R., and Forster R.L. 2003. Genetic characterization of differential reaction among host group 3 common bean cultivars to NL-3 k strain of *Bean common mosaic necrosis virus*. *Phytopathology*, 93:683-690.
 - 33- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28:2731-2739.
 - 34- Vallejos C.E., Gustavo A.M., Valerie J., Tommy R.P., Ney S.S, and Sally A.M. 2006. Genetic and molecular characterization of the I locus of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 172:1229-1242.
 - 35- Vetten H.J., Lesemann D.E., and Maiss E. 1992. Serotype A and B Strain of *Bean common mosaic virus* are two distinct Potyvirus. *Archive of Virology*, Suppl 5:415-431.
 - 36- Yazdi Samadi B., and Abdemeyshaei S. 1996. Agronomical plant breeding. Iran University press. PP 283 (In Persian)
 - 37- Zheng H., Chen J., Chen J., Adams M.J., and Hou M. 2002. *Bean common mosaic virus* isolates causing different symptoms in asparagus bean in China differ greatly in the 5' parts of their genomes. *Archives of Virology*, 147:1257-1262.