



شناسایی مولکولی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند مرتبط با لوبیا در استان زنجان

وحید حسینی^۱ - امید عینی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۳

چکیده

بیماری‌های گیاهی ناشی از جمنی‌ویروس‌ها (Geminiviruses) از محدودیت‌های مهم تولید حبوبات در دنیا می‌باشند. با توجه به اهمیت استان زنجان به عنوان یکی از مهم‌ترین مناطق کشت لوبیا، در این تحقیق به منظور تعیین نوع و پراکندگی جمنی‌ویروس‌های مولد بیماری در لوبیا، از مناطق عمده لوبیاکاری استان زنجان نمونه‌های گیاهی با توجه به علائمی مثل موزائیک طلایی، پیچیدگی، بدشکلی، تاوولی، زردی برگ‌ها و کوتولگی بوته جمع‌آوری شد. پس از استخراج دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید (deoxyribonucleic acid; DNA)، آلودگی ویروسی در نمونه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و آغازگرهای دجنره PAL1V 1978/ PARIC 496 و Primer B/ Primer V181 بررسی گردید. با توجه به نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و نوع علائم، چهار نمونه انتخاب و برای تأیید آلودگی و تکثیر ژنوم کامل ویروس از واکنش تکثیر دایره غلطان استفاده شد. سپس الگوی برشی DNA با استفاده از سه آنزیم برشی *EcoRV*، *EcoRI* و *PstI* مشخص گردید و بر این اساس قطعه ۲۸۰۰ جفت‌بازی برش یافته با آنزیم *EcoRI* مربوط به نمونه S37 انتخاب و در ناقل ژنی مناسب همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد. بررسی توالی مذکور نشان داد که قطعه تکثیر یافته شباهت بالایی (۹۸ درصد) به ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند (*Beet curly top Iran virus*) جدا شده از چغندر قند دارد ولی شباهت کمتری (۸۹ درصد) به جدایه این ویروس از لوبیا در خراسان رضوی دارد. این نتایج بیان‌گر گسترش وسیع ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند در ایران و همچنین وجود تنوع در جدایه‌های این ویروس در یک میزبان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: جمنی‌ویروس‌ها، چغندر قند، زنجان، لوبیا، ویروس ایرانی پیچیدگی بوته

مقدمه

تعیین کننده دامنه میزبانی و نوع علائم در روی قطعه B قرار دارند (۲۵). دامنه میزبانی جمنی‌ویروس‌ها وسیع بوده و خسارت اقتصادی بالایی در محصولات مهم از قبیل گوجه‌فرنگی، لوبیا، کدو، چغندر قند، توتون و ذرت ایجاد می‌کنند. میزان خسارت این ویروس‌ها بسته به تعداد گیاهان آلوده و سن گیاهان در موقع آلودگی بین ۲۰ تا ۱۰۰٪ می‌باشد. این ویروس‌ها از بیمارگرهای مهم و اقتصادی لوبیا در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و تا حدودی در مناطق معتدل هستند (۲۳).

بارزترین علائم گیاهان آلوده به جمنی‌ویروس‌ها، پیسک مشخص تا نوعی موزائیک زرد، پیچیدگی و بد شکلی برگ می‌باشد. زمانی که گیاهان جوان آلوده به ویروس می‌شوند، بوته‌ها کوتوله شده، کپه‌ای می‌مانند. آلودگی گیاهان مسن‌تر منتج به کاهش رشد شاخ و برگ جدید و کاهش تشکیل میوه می‌شود (۱). همانندسازی جمنی‌ویروس‌ها توسط مکانیسم دایره غلطان (Rolling Circle Replication) شبیه باکتریوفازهایی مثل M13 و پلاسמידها می‌باشد. همانندسازی در هسته سلول‌های آلوده گیاهی رخ می‌دهد. ابتدا DNA تک رشته‌ای حلقوی به DNA دو رشته‌ای حد واسط یا

ویروس‌های گیاهی اغلب داری ژنوم از نوع ریبونوکلئیک اسید (ribonucleic acid; RNA) می‌باشند ولی تعدادی از آن‌ها دارای ژنوم از نوع دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید (deoxyribonucleic acid; DNA) هستند (۲). جمنی‌ویروس‌ها (Geminiviruses) گروهی از ویروس‌های گیاهی هستند که دارای پیکره‌های ایزومتریکی دوقلو به ابعاد ۱۸ تا ۳۰ نانومتر، ژنوم DNA تک رشته‌ای و حلقوی یک یا دو بخشی می‌باشند. اندازه ژنوم DNA این ویروس‌ها دو و نیم تا سه کیلو باز می‌باشد. این ویروس‌ها یا دارای ژنوم تک بخشی بوده که کد کننده تمام ژن‌های ویروسی می‌باشد و یا دو بخشی با نام DNA-A و DNA-B است که در روی هر کدام از این قطعات یک سری از ژن‌ها موجود می‌باشند. ژن‌های مسئول در همانندسازی، تنظیم بیان ژن و کپسیده کردن در روی قطعه A و ژن‌های مسئول در حرکت ویروسی،

۱ و ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

(Email: omid.eini@znu.ac.ir)

*- نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/jpp.v30i4.51762

فارس، خوزستان و لرستان رتبه چهارم را از نظر مقدار تولید به خود اختصاص داده است (۲). این گیاه، میزبان بیمارگرهای مختلف از جمله ویروس‌ها می‌باشد که باعث ضعیف شدن گیاه و تغییر شکل بوته‌ها، مرگ گیاه و همچنین عقیم شدن گل‌ها و کاهش عملکرد محصول می‌شوند. با توجه به اهمیت اقتصادی کشت لوبیا در استان زنجان و همچنین شیوع بالای علایم بیماری‌های ویروسی از جمله جمینی‌ویروس‌ها در ایران و دنیا و اینکه تاکنون مطالعه‌ای دقیق در مورد آلودگی لوبیا به جمینی‌ویروس‌ها در این استان صورت نگرفته است، در این تحقیق با کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و همچنین تکثیر به شیوه دایره غلطان، ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند مرتبط با لوبیا در مناطق مهم کشت این محصول در استان شناسایی شد.

مواد و روش‌ها

در تابستان ۱۳۹۲ از مزارع چهار منطقه عمده لوبیاکاری استان زنجان شامل زنجان، خرم‌دره، ابهر و خداآینده با توجه به علایم ویروسی مثل پیچیدگی، بدشکلی، تاوولی، قاشقی شدن، طلایی شدن، زردی و موزائیک برگ‌ها و همچنین کوتولگی بوته نمونه‌برداری انجام شد و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز

دی‌ان‌ای ژنومی از نمونه‌های گیاهی لوبیا با روش روحی بخش و همکاران (۲۰۰۸) از نمونه‌های جمع‌آوری شده استخراج گردید (۲۸). به منظور بررسی آلودگی نمونه‌ها به جمینی‌ویروس/ها واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از یک جفت آغازگر دجنره (جدول ۱) انجام شد. این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (شرکت سیناژن) که حاوی آنزیم پلی‌مرز، بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، نوکلئوتیدها و $MgCl_2$ می‌باشد به همراه ۱۰ پیکومولار از هر آغازگر تهیه گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل ASTECPC-320) با یک چرخه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ چرخه به مدت ۹۰ ثانیه و ۷۲ چرخه به مدت ۳۰ ثانیه و یک چرخه حرارتی ۷۲ درجه به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با الکتروفورز در آگارز (۱٪) بررسی گردید.

انجام واکنش تکثیر دایره غلطان

با توجه به نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و با در نظر گرفتن نوع علایم نمونه‌های مشکوک به آلودگی با جمینی‌ویروس‌ها تعدادی نمونه انتخاب و به منظور تأیید آلودگی و همچنین تکثیر ژنوم کامل

فرم تکثیری تبدیل شده و سپس مکانیسم دایره غلطان شروع می‌شود که در آن رشته‌ی DNA در یک سایت مشخصی واقع در مبداء همانندسازی توسط پروتئین تکثیری (Replication-associated protein) شکاف داده می‌شود تا همانندسازی شروع شود (۷). خانواده جمینی‌ویریده (*Geminiviridae*) قبلاً بر اساس دامنه میزبانی، نوع ناقل حشره‌ای و مشخصات ژنومی به چهار جنس *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus* و *Topocuvirus* گروه‌بندی می‌شد (۶) با پیدایش روش جدید تکثیر بصورت دایره غلطان (Rolling circle amplification) توسط آنزیم phi29 polymerase و تعیین توالی ژنوم، انقلابی در شناسایی و معرفی جمینی‌ویروس‌های جدید ایجاد شد به طوری که در تقسیم‌بندی جدید سه جنس دیگر شامل *Turncurtovirus*, *Becurtovirus* و *Eragrovirus* به مجموعه قبلی اضافه و اعضای این خانواده به هفت جنس تغییر یافت (۳۳) از مهم‌ترین ویروس‌های این گروه که در لوبیا اهمیت بالایی دارد ویروس موزائیک طلایی لوبیا (*Bean golden mosaic virus*; BGMV)، ویروس موزائیک کالیکوی لوبیا (*Bean calico mosaic virus*; BCMoV) و ویروس موزائیک کوتولگی لوبیا (*mosaic virus*; BDMV) می‌باشد (۳۱).

فرزادفر و همکاران (۲۰۰۲) با بررسی مزارع چغندر قند و لوبیای شش استان کشور و با استفاده از روش سنجش بلات نقطه‌ای (tissue-blot immunoassay; TIBA) ویروس کوتولگی کلروتیک نخود را که متعلق به جنس *Mastrevirus* می‌باشد گزارش کردند (۹). همچنین قربانی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در بررسی آلودگی ویروسی مزارع لوبیای استان گیلان با استفاده از آزمون سروولوژیکی DAS-ELISA هشت ویروس را گزارش کردند که در بین این هشت ویروس، ویروس موزائیک طلایی لوبیا نیز مشاهده شد که پنجمین ویروس از نظر درصد آلودگی با دو درصد (از ۲۴۸ نمونه) بود (۱۲). اخیراً قارونی‌کاردانی و همکاران (۲۰۱۲) برای اولین بار ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند را از مزارع لوبیای استان خراسان رضوی با به کارگیری تکثیر DNA حلقوی با استفاده از روش دایره غلطان گزارش کردند (۱۱). همچنین قارونی‌کاردانی و همکاران (۲۰۱۳) تنوع ژنتیکی جدایه‌های ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند را مورد بررسی قرار دادند (۱۲). در این تحقیق، ویروس مذکور از میزبان‌های مختلف از جمله لوبیا و گوجه‌فرنگی ردیابی شد و در نتیجه نه استرین جدید از ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند گزارش گردید (۱۱). این ویروس اهمیت و پراکنش وسیعی در ایران دارد و علاوه بر چغندر قند از سایر محصولات اقتصادی مهم از قبیل گوجه‌فرنگی، فلفل و لوبیا نیز جداسازی شده است (۷، ۱۰ و ۳۱).

استان زنجان با داشتن آب و هوای مناسب برای زراعت لوبیا یکی از مناطق مهم کاشت لوبیا در ایران می‌باشد به طوری که در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ با تولید ۱۸۶۱۲ تن محصول بعد از استان‌های

DNA polymerase و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. محصولات بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد بررسی شد.

ویروس‌سی، واکنش تکثیر دایره غلتان با استفاده از کیت illustraTemplphi100 Amplification (GE Healthcare bacteriophage Phi29 و آنزیم Life Sciences, Germany)

جدول ۱- توالی آغازگرهای الیگونوکلوئوتیدی مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	اندازه	ترادف آغازگرها (5'-3')	منبع
Name of primer	Size	Sequence of primers(5'-3')	Reference
PCR V181-Forward	18	TAATATTACCGGTGGCC	27
Primer Bc-Reverse	23	TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA	27
PAL1V 1978- Forward	30	GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT	36
PaR1C 496- Reverse	27	AATACTGCAGGGCTTYCTRTRACATRGG	36

ارسال شد.

همسانه‌سازی محصول واکنش تکثیر دایره غلتان

پس از آن که محصول واکنش تکثیر دایره غلتان تهیه شد به منظور بررسی جایگاه‌های برشی موجود بر روی قطعات تکثیر یافته و تنوع آن‌ها از واکنش هضم آنزیمی توسط تعدادی از آنزیم‌های برشی *EcoRV*، *EcoRI* و *PstI* فوق‌الذکر استفاده شد.

پس از بررسی نتایج هضم آنزیمی محصول واکنش تکثیر دایره غلتان از نظر نوع برش و اندازه قطعات دی‌ان‌ای برش یافته، یک قطعه دی‌ان‌ای با اندازه ۲۸۰۰ نوکلئوتیدی برش یافته با آنزیم *EcoRI* از ژل آگارز استخراج و در ناقل ژنی همسانه‌سازی گردید. برای این منظور ابتدا ناقل ژنی pBlunt توسط آنزیم *EcoRI* برش داده شد. پس به منظور حذف گروه‌های فسفات از دو انتهای ناقل هضم شده با کمک آنزیم آلکالین فسفاتاز، از این ناقل ژنی به همراه قطعه دی‌ان‌ای هدف در واکنش اتصال (ligation) در حضور آنزیم لیگاز استفاده گردید. سپس محصول این واکنش به سلول‌های مستعد باکتری با روش شوک حرارتی منتقل گردید. گزینش سلول‌های باکتری حاوی ناقل ژنی نوترکیب توسط آنتی بیوتیک کانامیسین و سپس برش آنزیمی روی پلاسمید استخراج شده صورت گرفت. از پلاسمید نوترکیب و جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی)

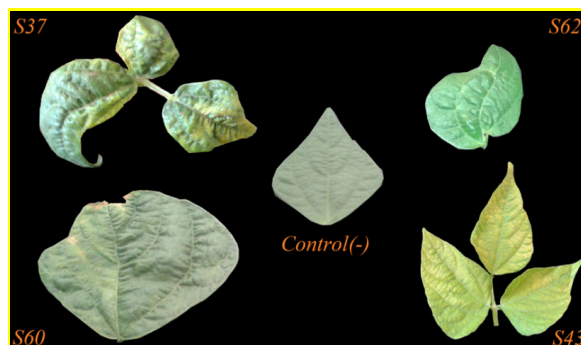
آنالیز فیلوژنی

تشابه توالی‌های به دست آمده، پس از بلاست در NCBI، با توالی‌های آمینواسیدی جیمینی‌ویروس‌های موجود در GenBank مورد بررسی قرار گرفت. سپس این توالی‌ها و سایر اعضای جیمینی‌ویروس‌ها (جدول ضمیمه ۱) در نرم‌افزار MEGA 6 با استفاده از الگوریتم ClustalW هم‌ردیف‌سازی شدند. با استفاده از MEGA 6، و بر اساس روش Neighbour joining و با ۱۰۰۰ تکرار، درخت فیلوژنتیکی رسم شد.

نتایج و بحث

پراکنش و نوع علائم در لوبیا

از نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان زنجان، ۶۰ نمونه گیاه لوبیا (جدول ۲) با علائم مشابه آلودگی به جیمینی‌ویروس‌ها (شکل ۱) جهت استخراج دی‌ان‌ای استفاده گردید.

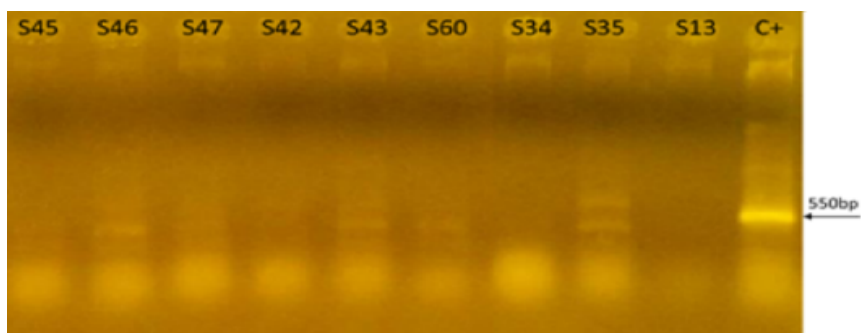


شکل ۱- گیاهان لوبیای مشکوک به آلودگی با جیمینی‌ویروس‌ها با علائم متنوع شامل: بدشکلی و زردی (S37)، قاشقی شدن برگ (S60)، زردی و موزائیک (S43)، تاولی و بدشکلی (S62)، نمونه فاقد علائم (گیاه سالم) به عنوان کنترل منفی (Control -)

Figure 1- Leaf samples from bean showing geminivirus-like symptoms such as: abnormal and yellowing (S37), cup shape (S60), yellowing and mosaic (S43), blistering and abnormality (S62), symptomless (Healthy) as a control (Control -)

Primer BC/ منجر به تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۵۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز می‌گردد که مرتبط با قسمت آخر ناحیه بین ژنی و حدود ۲۰۰ جفت نوکلئوتید از ناحیه ابتدای پروتئین پوششی در بگومو ویروس‌ها می‌باشد. اندازه قطعه تکثیر شده توسط این جفت آغازگر (شکل ۲) با نتایج مطالعاتی که به شناسایی و تعیین خصوصیات مولکولی بگومو ویروس‌های آلوده‌کننده گوجه‌فرنگی از جمله ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus*) پرداخته‌اند (۲۴) مشابه می‌باشد.

تکثیر ویروس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز
با توجه به نوع علائم مشاهده شده در نمونه‌های لوبیا (شکل ۱) و همچنین جمینی ویروس‌های گزارش شده از این میزبان، به منظور تکثیر بخشی از ژنوم جمینی ویروس/ها در نمونه‌های لوبیا از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با جفت آغازگر Primer BC/ PCR V181 و PAL1V 1978/PaR1C 496 استفاده گردید. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با جفت آغازگر Primer BC/ PCR V181 تکثیر قطعه‌ای از DNA با اندازه ۵۰۰ تا ۷۰۰ جفت‌باز (شکل ۲) در ۲۶ درصد از نمونه‌های تست شده بود. جفت آغازگر PCR V181

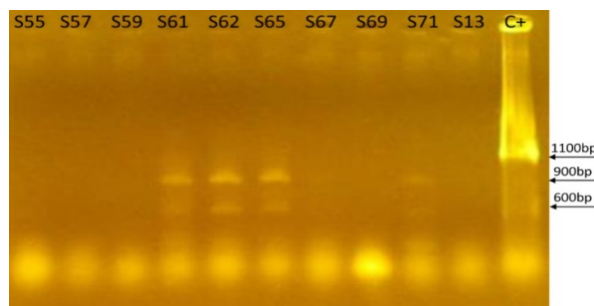


شکل ۲- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در نمونه‌های لوبیا با استفاده از جفت آغازگر PCR V181 و Primer BC. از ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی جدایه استرالیا به عنوان کنترل مثبت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز استفاده شده است

Figure 2- Gel electrophoresis for PCR products using BC and PCR V181 primers for bean samples. TLCV-Au was used as a positive control for the PCR reaction

دی‌ان‌ای با اندازه ۹۰۰ ت‌باز (شکل ۳) در ۱۵ درصد از نمونه‌ها بود.

دومین جفت آغازگر مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز PAL1V 1978/PaR1C 496 بود که منجر به تکثیر قطعه‌ای از



شکل ۳- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در نمونه‌های لوبیا با استفاده از جفت آغازگر PAL1V 1978 و PaR1C 496 از ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی جدایه استرالیا به عنوان کنترل مثبت (C+) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز استفاده شده است

Figure 3- Gel electrophoresis for PCR products using PaR1C 496 and PAL1V 1978 primers for bean samples. TLCV-Au was used as a positive control for the PCR reaction

گوجه‌فرنگی و غیره می‌شود (۲۷). اندازه قطعات تکثیر یافته با این جفت آغازگر با توجه به نوع ویروس مورد مطالعه متفاوت می‌باشد به طوری که این جفت آغازگر در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس

جفت آغازگر PAL1V 1978 / PaR1C 496 سبب تکثیر بخشی از ژن Rep و پروتئین پوششی تعدادی از بگومو ویروس‌ها از قبیل ویروس موزائیک طلائی لوبیا، ویروس پیچیدگی برگ زرد

در بررسی نتایج محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز اختلاف ۱۰۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتیدی در اندازه قطعات تکثیر یافته برخی نمونه‌ها با نتایج مطالعات انجام گرفته مشاهده می‌شود که این می‌تواند به دلیل تفاوت در قطعه هدف یا اتصال غیر اختصاصی آغازگرها به بخشی از ژنوم میزبان باشد.

پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی قطعه ۱۳۰۰ تا ۱۴۰۰ جفت‌بازی را تکثیر می‌دهد اما در گیاهان مختلفی مثل لوبیا، فلفل، گوجه‌فرنگی و غیره که با ویروس‌های دیگری مثل ویروس موزائیک طلایی لوبیا، ویروس موزائیک کوتولگی لوبیا یا ویروس موزائیک طلایی گوجه‌فرنگی آلوده شده‌اند منجر به تکثیر قطعه‌ای حدوداً ۹۰۰ تا ۱۱۰۰ جفت بازی می‌شوند (۱۲ و ۱۹).

جدول ۲- درصد آلودگی و پراکنش نمونه‌های لوبیا با علائم مرتبط به بگوموویروس‌ها

Table 2- Infection rate and distribution of bean samples showing symptoms associated with geminiviruses

شهر/منطقه City/region	درصد آلودگی Percentage of tinfection	تعداد کل نمونه Number of samples	تعداد نمونه آلوده به ویروس Number of infected plants
آبهر Abhar	37/5	24	9
خرم دره Dareh Khoram	40	24	6
خدابنده KhodaBande	36	11	4
زنجان Zanjan	60	10	6

شده است (۲۱،۱۰ و ۳۴).

جهت هضم آنزیمی محصول واکنش تکثیر دایره غلطان از سه آنزیم *EcoRV*، *EcoRI*، *PstI* استفاده گردید. این آنزیم‌ها سبب برش و ایجاد قطعات با اندازه‌های مختلف (۲۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۸۰۰، ۵۰۰ و ۴۰۰ جفت‌بازی) می‌شوند (شکل ۲ و ۳). ژنوم کامل جمینی‌ویروس‌ها اندازه‌ی ۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بازی دارند (۳۱). بنابراین قطعه (۲۸۰۰ جفت بازی) ایجاد شده احتمالاً مرتبط با ژنوم کامل یک جمینی‌ویروس می‌باشد. آنزیم برشی *PstI*، قطعه‌ای در حدود ۲۸۰۰ جفت بازی آزاد می‌کند که قطعه مورد انتظار احتمالی می‌باشد نتایج هضم آنزیمی مذکور با نتایج قارونی‌کردانی و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد (۱۲). آن‌ها همچنین با هضم آنزیمی محصول واکنش تکثیر دایره غلطان ناشی از نمونه‌های مشکوک چغندر قند (به آلودگی با جمینی‌ویروس‌ها) با آنزیم برشی *PstI* قطعات با اندازه ۲۸۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌باز را که مرتبط با ویروس ایرانی پیچیدگی چغندر قند بود را مورد مطالعه قرار دادند.

هضم آنزیمی محصول واکنش تکثیر دایره غلطان با آنزیم برشی *EcoRI* سبب جدا شدن قطعاتی با اندازه‌های ۲۸۰۰ و ۱۲۰۰ جفت بازی و چند قطعه کوچک گردید. تولید قطعات کوچکتر از ژنوم کامل ویروس احتمالاً به دلیل وجود بیش از یک مکان برشی در ژنوم ویروس می‌باشد (شکل ۴). تولید این قطعات کوچک در نتایج مالمورت (۲۰۱۰) که به مطالعه ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی پرداخته نیز مشاهده گردیده است. سومین آنزیم برشی مورد استفاده آنزیم *EcoRV* بود که نتایج هضم آنزیمی این واکنش

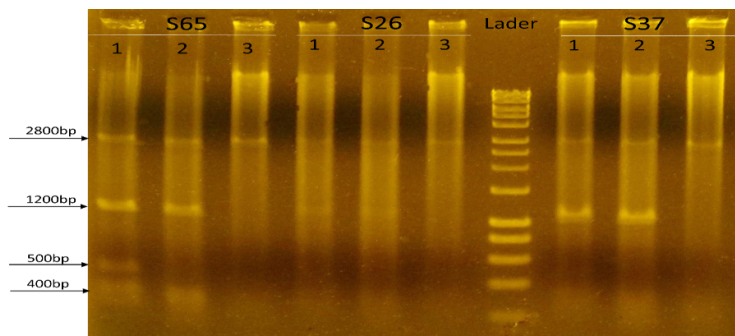
نمونه‌هایی که نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز آن‌ها مثبت بود دارای علائم کوتولگی بوته، زردی، قاشقی شدن، طلایی شدن، تاولی و بدشکلی برگ‌ها و دیگر علائم بودند که تعدادی از این علائم مثل پیچیدگی، زردی و بدشکلی برگ همراه با کوتولگی در لوبیای آلوده به ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند نیز در مزارع لوبیای استان خراسان رضوی مشاهده شده است (۱۰).

واکنش تکثیر دایره غلطان

از نمونه‌های S61, S65, S26, S37 با توجه به نتایج اولیه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و همچنین بر اساس نوع علائم مانند زردی، بدشکلی، موزائیک، پیچیدگی و تاولی برگ که به علائم ناشی از جمینی‌ویروس‌ها نزدیک بودند جهت ردیابی و شناسایی با روش واکنش تکثیر دایره غلطان استفاده گردید. انجام واکنش تکثیر دایره غلطان بیان‌گر تکثیر و ایجاد یک کلاف پر حجم از DNA در نمونه‌های مورد بررسی بود (راهک ۱، شکل ۴). در این روش آنزیم‌های دی‌ان‌ای پلی‌مرز تنها قطعات دی‌ان‌ای حلقوی را تکثیر می‌کند. بنابراین کلاف دی‌ان‌ای حاصله احتمالاً مربوط به دی‌ان‌ای حلقوی جمینی‌ویروس‌های موجود در نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. این روش اخیراً جهت ردیابی و تکثیر ژنوم جمینی‌ویروس‌هایی مثل *Banana streak Mysore virus* از موز، ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی از گوجه‌فرنگی، ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند از لوبیا و چندین جمینی‌ویروس دیگر استفاده

برشی در مطالعه‌ای که به شناسایی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند استان‌های خراسان رضوی و جنوبی پرداخته است نیز مشاهده می‌شود (۱۲).

منجر به تولید قطعه ۲۸۰۰ جفت بازی به عنوان قطعه هدف و در برخی نمونه قطعات با اندازه‌های دیگر مانند تولید یک قطعه ۱۸۰۰ جفت‌بازی شد (شکل ۴). تولید قطعات مشابه با کمک این آنزیم



شکل 0۴- الکتروفورز محصول واکنش تکثیر دایره غلطان نمونه‌های S65-26-27 پس از هضم آنزیمی. راهک‌های شماره یک: هضم با آنزیم *EcoRI*، راهک‌های با شماره دو: هضم با آنزیم *EcoRV*، راهک‌های با شماره سه: هضم با آنزیم *PstI*

Figure 4- Gel electrophoresis of RCA products for S65, S26 and S37 samples after digestion with restriction enzymes. Lanes 1 (*EcoRI* digested), lanes 2 (*EcoRV* digested) and lanes 3 (*PstI* digested)

از استان فارس داشت که در بررسی درخت فیلوژنتیکی (شکل ۵) نیز نشان داده شده است.

دیگر جدایه‌های نزدیک به این قطعه ویروسی به ترتیب تشابه شامل جدایه‌های ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند گزارش شده از لوبیا چشم‌بلبلی، گوجه‌فرنگی، لوبیا معمولی و شلغم می‌باشند (شکل ۵) که این جدایه‌ها به ترتیب از شهرستان‌های تبادکان، سبزوار و نیشابور (استان خراسان رضوی) و شهرستان شیراز (استان فارس) گزارش شده‌اند (۱۲ و ۱۱).

قطعه ویروسی مورد بررسی در مقایسه با ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند گزارش شده از مزارع لوبیای استان خراسان رضوی با فاصله‌ی بیش از حد مورد انتظار نسبت به آن قرار گرفت که حاکی از تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها و در یک نوع میزبان می‌باشد. تنوع ژنتیکی (۸۷ تا ۹۰ درصدی) جدایه‌های مختلف این ویروس در میزبان‌های دیگر مثل چغندر قند نیز مشاهده شده که بیانگر تغییر پذیری بالای این ویروس و سازگاری آن با یک میزبان می‌باشد. همچنین قرار گرفتن قطعه ویروسی مورد مطالعه در کنار جدایه‌های گزارش شده از چغندر قند نشان می‌دهد که تشابه نوکلئوتیدی این جدایه‌ها رابطه کاملی با نوع میزبان ندارد و گروه‌بندی آن‌ها از نظر نوع میزبان با گروه‌بندی آن‌ها از لحاظ فیلوژنتیکی هم‌خوانی ندارد. این تنوع ژنتیکی به همراه تنوع میزبانی در مطالعه این ویروس در میزبان‌های مختلف مثل چغندر قند، لوبیا معمولی، گوجه‌فرنگی و غیره نیز مشاهده شده است (۱۱).

با توجه به اینکه این دومین گزارش از وقوع ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند در مزارع لوبیا می‌باشد و با دقت به این

با توجه به نتایج تحقیقات اشاره شده می‌توان چنین استنباط کرد که در واکنش تکثیر دایره غلطان یکی از اساسی‌ترین و مهم‌ترین رکن‌هایی که بایستی مدنظر قرار داد اندازه قطعه هضم شده است که در مورد جمینی‌ویروس‌ها با توجه به نوع آنزیم برشی و بسته به تعداد قطعات برشی آنزیم مورد استفاده، قطعات با اندازه ۲۷۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌بازی بهترین حالت برای همسانه‌سازی و توالی‌یابی می‌باشند.

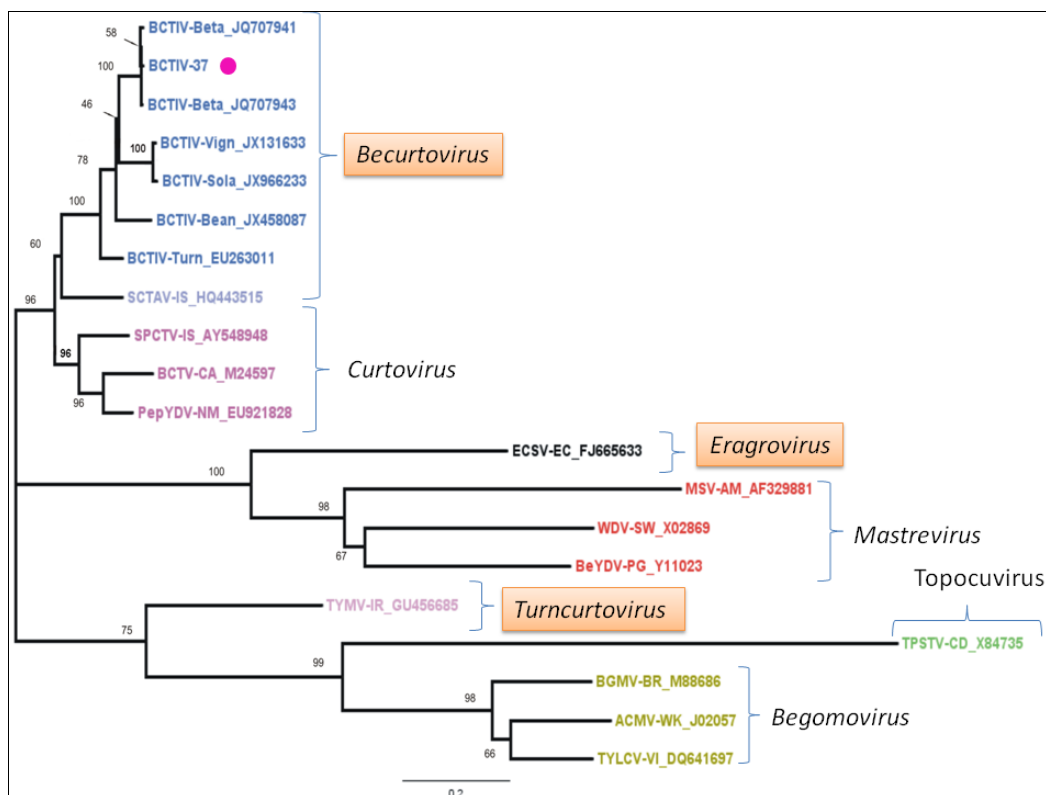
همسانه‌سازی و تعیین توالی محصول واکنش تکثیر دایره غلطان

با توجه به نتایج هضم آنزیمی که اشاره شد و با توجه به این‌که قطعه ۲۸۰۰ جفت‌بازی از نمونه S37 با علایم پیچیدگی، بدشکلی، زردی و تاولی (از مزارع لوبیای شهرستان خرم‌دره) اندازه‌ای مشابه به ژنوم کامل جمینی‌ویروس‌ها دارد جهت همسانه‌سازی و توالی‌یابی انتخاب شد. برای همسانه‌سازی قطعه اشاره شده از ناقل pBlunt استفاده شد.

ناقل نوترکیب (pBlunt-S37) حاوی قطعه هدف تکثیر یافته از نمونه S37 با واکنش تکثیر دایره غلطان پس از استخراج از باکتری با کمک آغازگر T7 توالی‌یابی شد. قطعه همسانه‌سازی شده بالاترین شباهت (۹۸ درصد) را با جدایه‌ای از ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند گزارش شده از کمال‌آباد استان کرمان (رس شمار JQ707943.1) و همچنین جدایه کوار استان فارس (رس شمار JQ707941.1) دارد. که هر دو جدایه از گیاه چغندر قند گزارش شده‌اند (۱۱). همچنین این توالی ۸۷ درصد تشابه با جدایه‌های ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند گزارش شده از گیاهان اسفناج و شلغم

بین جدایه‌ها موضوع قابل ملاحظه‌ای باشد که سبب سازگاری بیشتر این ویروس با لوبیا و دیگر میزبانان خواهد شد.

موضوع که قطعه ویروسی مورد بررسی با جدایه مورد مطالعه در مزارع لوبیا تفاوت‌هایی با همدیگر دارند به نظر می‌رسد بحث تنوع ژنتیکی



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی رسم شده برای نمونه BCTIV-37 و سایر جمینی‌ویروس‌ها با نرم افزار Mega-6. نمونه توالی‌یابی شده با علامت دایره مشخص شده است. جنس‌های جدید جمینی‌ویروس داخل کادر قرار گرفته‌اند

Figure 5- Phylogenetic tree made for BCTIV-37, indicated by a circle, and other geminiviruses using Mega6 software. New genus of geminiviruses is shown in rectangles

ژنتیکی زیادی با نمونه مورد مطالعه دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مهندس سرافراز نیکو برای کمک‌های آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌نمایند.

همچنین نتایج برآمده از این درخت فیلوژنتیکی و دیگر توالی‌های بررسی شده نشان می‌دهد که قطعه ویروسی گزارش شده از لوبیا در استان زنجان دارای ارتباط نسبتاً بیشتری با جدایه‌های گزارش شده از جنوب و جنوب‌شرق کشور در مقایسه با جدایه‌های گزارش شده از شمال‌شرق و دیگر مناطق کشور دارد که این می‌تواند نشان‌دهنده‌ی احتمالی منشای ورود از مناطق ذکر شده باشد. اگرچه برخی از جدایه‌های همین مناطق مثل جدایه گزارش شده از شلغم نیز فاصله‌ی

منابع

- 1- Adams M.J., King A.M., and Carstens E.B. 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to international committee on taxonomy of viruses. Archives of Virology, 158: 2023-2030.
- 2- Anonymous. 2013. The statistics of crop production in Zanjan Province. Agriculture Jihad organization of Zanjan Province. Available at <http://agrizanjan.ir/amaar/1392> (visited 5 November 2014).
- 3- Baliji S., Sunter J., and Sunter G. 2007. Transcriptional analysis of complementary sense genes in spinach curly top

- virus and functional role of c2 in pathogenesis. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 20: 194-206.5.
- 4- Bolok Yazdi H., Heydarnejad J., and Massumi H. 2008. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: A geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes*, 36: 539-545
 - 5- Briddon R.W., Heydarnejad J., Khosrowfar F., Massumi H., Martin D.P., and Varsani A. 2010. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Research*, 152: 169-175.
 - 6- Brown J. K., Fauquet C.M., Briddon R. W., Zerbini M., Moriones E., and Navas-Castillo J. 2012. Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic press, London.
 - 7- Chasan R. 1995. Geminiviruses: A twin approach to replication. *Plant Cell*, 7: 659-661.
 - 8- Eini O., Sahraei G.E., and Behjatnia S.A.A. 2016. Molecular characterization and construction of an infectious clone of a pepper isolate of Beet curly top Iran virus. *Molecular Biology Research Communications*, 5: 101-113.
 - 9- Farzadfar S., Pourrahim R., Golnaraghi A.R., Hahraeen N., and Makkouk M. 2002. First report of sugar beet and bean as natural hosts of *Chickpea chlorotic dwarf virus* in Iran. *Plant Pathology*, 51: 795-782.
 - 10- Gharouni Kardani S.G., Heydarnejad J., Zakiaghl M., Mehrvar M., Kraberger S., and Varsani A. 2013. Diversity of beet curly top Iran virus isolated from different hosts in Iran. *Virus Genes*, 46: 571-575.
 - 11- Gharouni Kardani S.G., Heydarnejad J., Zakiaghl M., and Mehrvar M. 2012. Identification of Beet curly top Iran virus in Razavi province. . P862. 20th Congree of Plant Protection, Iran
 - 12- Gharouni Kardani S. G., Jafarpour B., Mehrvar M., and Tarighi S. 2013. Identification and sequencing for coat protein of Tomato yellow leaf curl virus in Razavi Province. *Plant Protection*, 27: 427-433.
 - 13- Gilbertson R. L., Faria J.C., Hanson S.F., Morales F.J., Ahlquist P.G., Maxwell D.P., and Russell D.R. 1991. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. *Phytopathology*, 81: 980-985.
 - 14- Ghorbani S.G.M., Shahraeena N., and Elahinia S.A. 2010. Distribution and impact of virus associated diseases of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Northern Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43: 1183-1189.
 - 15- Ha C., Coombs S., Revill P., Harding R., Vu M., and Dale J. 2008. Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites from Vietnam: Additional evidence that the new world geminiviruses were present in the old world prior to continental separation. *Journal of General Virology*, 89: 312-326.
 - 16- Hernandez C., and Brown J.K. 2010. First report of a new curtovirus species, spinach severe curly top virus, in commercial spinach plants (*Spinacia oleracea*) from south-central Arizona. *Plant Disease*, 94: 94-97.
 - 17- Heydarnejad J., Keyvani N., Razavinejad S., Massumi H., and Varsani A. 2013. Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family Geminiviridae. *Archives of Virology*, 158: 435-443.
 - 18- Lam N., Creamer R., Rascon J., and Belfon R. 2009. Characterization of a new curtovirus, pepper yellow dwarf virus, from Chile pepper and distribution in weed hosts in New Mexico. *Archives of Virology*, 154: 429-436.
 - 19- Liu L., van Tonder T., Pietersen G., Davies J.W., and Stanley J. 1997. Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. *Journal of General Virology*, 78: 2113-2117.10.
 - 20- MacDowell S.W., Macdonald H., Hamilton W.D. O., Coutts R.H. A., and Buck K. W. 1985. The nucleotide sequence of cloned wheat dwarf virus DNA. *The EMBO Journal*, 4: 2173-2180.
 - 21- Malmrot A. 2010. Begomovirus prevalence and diversity in the TYLCV resistant tomato cultivar Shanty in Nicaragua. *Epsilon Archive*, 144: 1-16.
 - 22- Martin P., Willment J., Billharz R., Velders R., and Odhiambo B. 2001. Sequence diversity and virulence in Zea mays of maize streak virus isolates. *Virology*, 288: 247.
 - 23- Morales F. J., and Anderson P. K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, 146: 415-441
 - 24- Pakniat A., Behjatnia S.A.A., Kharazmi S., Shahbazi M., and Izadpanah K. 2010. Molecular characterization and construction of an infectious clone of a new strain of Tomato yellow leaf curl virus in southern Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 46: 101-115.
 - 25- Rodríguez-Pardina P.E., Zerbini F.M., and Ducasse D.A. 2006. Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northwestern Argentina. *Fitopatologia Brasileira*, 31: 342-348.
 - 26- Rojas M.R. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, 77: 340-348
 - 27- Rojas M.R., Gilbertson R.L., Russell D.R., and Maxwell D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, 77: 340-347.
 - 28- Rouhibakhsh A., Priya J., Periasamy M., Haq Q.M.I., and Malathi V.G. 2008. An improved DNA isolation method and PCR protocol for efficient detection of multicomponents of begomovirus in legumes. *Journal of Virological Methods*, 147: 37-42.
 - 29- Stanley J., and Gay M. 1983. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature*, 301: 260.
 - 30- Stanley J., Markham P. G., Callis R. J., and Pinner M. S. 1986. The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. *EMBO Journal*, 5: 1761 - 1767.

- 31- Soleimani R., Matic S., Taheri H., Behjatnia S.A.A., Vecchiati M., Izadpanah K., and Accotto G.P. 2013. The unconventional geminivirus Beet curly top Iran virus: satisfying Koch's postulates and determining vector and host range. *Annals of Applied Biology*, 162: 174-181.
- 32- Varsani A., Shepherd D.N., Dent K., Monjane A.L., Rybicki E.P., and Martin D.P. 2009. A highly divergent south african geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology Journal*, 6: 1-12.
- 33- Varsani A., Navas-Castillo N., Moriones E., Hernandez-Zepeda C., Idris A., Brown J.K., Murilo Zerbini F., and Martin F.D. 2014. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurovirus. *Archives of Virology*, 159: 2193-2203
- 34- Wu C.Y., Lai Y.C., Lin N.S., Hsu Y.H., Tsai H.T., Liao J.Y., and Hu C.C. 2008. A simplified method of constructing infectious clones of begomovirus employing limited restriction enzyme digestion of products of rolling circle amplification. *Journal of Virological Methods*, 147: 355-359.
- 35- Zhou X., Liu Y., Calvert L., Munoz C., Otim-Nape G., Robinson D., and Harrison B. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology*, 78: 2101-2111.

جدول ضمیمه ۱- مشخصات جدایه‌های ویروس ایرانی پیچیدگی چغندر قند و سایر اعضای جمینی ویروس که در درخت فیلوژنی استفاده شده است

Appendix table 1- The details for Beet curly top Iran virus and other member of geminiviruses used to make a phylogenetic tree

ویروس Virus	میزبان Host	رس شماره Accession Number	مکان جغرافیایی Place/Province	منبع Ref
BCTIVIR:Kav]	چغندر قند Sugar beet	JQ707941	فارس/کوار Fars	17
BCTIV [IR:Kam]	چغندر قند Sugar beet	JQ707943	کرمان/کمال آباد Kerman	17
BCTIV [IR:Tab]	نخود فرنگی Cowpea	JX131633	خراسان رضوی/تبادکان zaviRa Khorasan	12
BCTIV [IR:Sabz]	گوجه فرنگی Tomato	JX966233	خراسان رضوی/سبزوار Razavi Khorasan	12
BCTIV [IR:Nesh]	لوبیا Bean	JX458087	خراسان رضوی/نیشابور Razavi Khorasan	4
BCTIV [IR: Tu]	چغندر قند Sugar beet	EU263011	فارس/اشیراز Fars	4
Beet curly top virus [USA]	اسفناج Spinach	AY548948	آمریکا USA	3
Beet curly top virus [USA: Cal]	چغندر قند Sugar beet	M24597	آمریکا USA	30
Pepper yellow dwarf virus[New Mexico]	فلفل Pepper	EU921828	آمریکا USA	18
Eragrostiscurvula streak virus [ZA]	weeping lovegrass	FJ665633	آفریقای جنوبی ZAF	32
Maize streak virus A[Zim]	ذرت Maize	AF329881	زیمباوه ZWE	22
Wheat dwarf virus [Sweden]	گندم Wheat	X02869	سوئد SWE	
Bean yellow dwarf virus [SA]	لوبیا Bean	Y11023	آفریقای جنوبی ZAF	19
Turnip curly top virus isolate [IR:Zaf]	شلغم Turnip	GU456685	کرمان/اکرمان Kerman	5
Bean golden mosaic virus [Brazil]	لوبیا Bean	M88686	برزیل BRA	29
African cassava mosaic virus isolate [West Kenyan]	کاساوا Cassava	J02057	کنیا KEN	29
Tomato yellow leaf curl [Vietnam]	گوجه فرنگی Tomato	DQ641697	ویتنام VNM	15
Spinach curly top Arizona virus [USA]	اسفناج Spinach	HQ443515	آمریکا USA	16