Archive of SID

میزبان‌های طبیعی و انتقال ویروس همراه با کوتولگی زرد تلخه‌بیان*

جهانگیر حیدرنژاد[۱]**، پریسا حسن شیخی[۲]، صدیقه باقری[۳]، جواد صادقی مجد[۳]، افسانه آویش کوهشاهی[۳]، نجمه پورامینی[۲] و حسین معصومی[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱)

چکیده

ویروس همراه با کوتولگی زرد تلخه‌بیان (Sophora yellow stunt-associated virus, SYSaV) از جنس *Nanovirus* و خانواده *Nanoviridae* یک ویروس جدید از این جنس است که اخیراً از ایران گزارش شده است و دارای گسترش وسیعی در مناطق مختلف این کشور است. در این تحقیق، به منظور شناسایی سایر میزبان‌های طبیعی این ویروس، آلودگی نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L.)، عدس (*Lens culinaris* Medikus)، شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، اسفند (*Peganum harmala* L.) و گَوَن (*Astragalus* sp.) با علائم مشخص نانوویروس‌ها مانند کوتولگی و زردی از چند منطقه ایران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز و تعیین ترادف کامل تعدادی از قطعات ژنوم نشان داد که این گیاهان به SYSaV آلوده هستند. آزمایش‌های مربوط به انتقال ویروس نشان داد که شته *Aphis craccivora* در شرایط گلخانه قادر به انتقال ویروس از بوته‌های آلوده تلخه‌بیان به بوته‌های سالم این گیاه است. همچنین، شته *Acyrthosiphon pisum* که از بوته‌های آلوده تلخه‌بیان در طبیعت جمع‌آوری شده بود به طور مستقیم ویروس را به گیاهچه-های نخود ایرانی و لوبیا چشم بلبلی انتقال داد. بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق، علاوه بر تلخه‌بیان، ویروس فوق دارای میزبان‌های دیگری در میان گیاهان دارویی است. همچنین، آلودگی ناشی از SYSaV محدود به گیاهان وحشی نیست و حداقل دو گونه از انواع بقولات نیز توسط آن آلوده می‌گردند.

کلیدواژه: ویروس همراه با کوتولگی زرد تلخه‌بیان، نانوویروس، *Aphis craccivora*، *Acyrthosiphon pisum*

---

* قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده سوم، ارائه‌شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

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

۱. استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کد پستی ۷۶۱۶۹۱۴۱۱۱ و عضو پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

www.SID.ir

Archive of SID

Natural hosts and transmission of Sophora yellow stunt-associated virus*

J. Heydarnejad[1], P. Hassan-Sheikhi[2], S. Bagheri[3], J. Sadeghi-Majd[3], A. Avish-Koohshahi[3], N. Pouramini[2], and H. Massumi[1]**

(Received: 30.9.2018; Accepted: 1.1.2019)

Abstract

Sophora yellow stunt-associated virus (SYSaV) (*Nanovirus*, *Nanoviridae*) is a new nanovirus that recently identified in Iran with wide distribution. In the present study, the SYSaV infection of chickpea (*Cicer arietinum* L.), lentil (*Lens culinaris* Medikus), liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), esfand (*Peganum harmala* L.) and milk vetch (*Astragalus* sp.) showing typical nanovirus symptoms including dwarfing and yellowing was tested by PCR and full-length sequencing of selected genome components. Results indicated that these samples are infected with SYSaV. In transmission experiments, the capability of cowpea aphid (*Aphis craccivora*) and pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) to transmit SYSaV to healthy plants was evaluated under greenhouse conditions. While *Aphis craccivora* transmitted the virus from infected to healthy sophora plants, *Acyrthosiphon pisum* collected on naturally infected sophora plants transmitted the virus to sophora, chickpea and cowpea seedlings. Based on the results of this study, beside the main host (sophora), SYSaV is able to infect two other medicinal plants. In addition, the host range of the virus is not limited to the wild species and at least two legume crops are infected with SYSaV.

Keywords: Sophora yellow stunt-associated virus, *Nanovirus*, *Aphis craccivora*, *Acyrthosiphon pisum*

---

* A part of MSc. thesis of the third author submitted to College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

** Corresponding author's E-mail: jheydarnejad@uk.ac.ir

1. Professor of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman 7616914111, Iran and member of Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman
2. PhD student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3. Former MSc student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویروس‌های خانواده *Nanoviridae* از حدود سه دهه قبل به عنوان یک گروه جدید از ویروس‌های گیاهی معرفی شدند (Chu and Helms 1988). پیکره‌های این ویروس‌ها بیست وجهی به قطر ۲۰-۱۷ نانومتر و دارای ۸-۶ قطعه ژنوم دی‌ان‌ای تک‌لای حلقوی، هر کدام به اندازه تقریبی یک کیلو باز می‌باشند. اعضای این خانواده براساس ویژگی‌هایی نظیر تعداد قطعات ژنوم و دامنه میزبانی در دو جنس *Nanovirus* و *Babuvirus* طبقه بندی می‌شوند. نانوویروس‌ها دارای هشت قطعه ژنومی بوده و گیاهان دولپه و عمدتا اعضای خانواده Fabaceae را آلوده می‌کنند. درحالیکه ژنوم بابوویروس‌ها شش قطعه بوده و گیاهان تک‌لپه متعلق به دو خانواده Musaceae و Zingiberaceae را آلوده می‌کنند. تمام نانوویروس‌ها و بابوویروس‌های شناخته شده توسط شته‌ها با رابطه گردشی منتقل می‌شوند (Vetten et al. 2012). باوجود اینکه چندین گونه شته در انتقال نانوویروس‌ها نقش دارند ولی ناقلین عمده آن‌ها شته‌های *Aphis craccivora* و *Acyrthosiphon pisum* گزارش شده‌اند (Franz et al. 1998; Gronenborn et al. 2011; Vetten et al. 2012).

هشت قطعه ژنومی نانوویروس‌ها شامل قطعات DNA-R، DNA-S، DNA-M، DNA-C، DNA-N، DNA-U1، DNA-U2 و DNA-U4 هر کدام دارای یک چارچوب ژنی (open reading frame) اصلی می‌باشد. قطعه DNA-R پروتئین مرتبط با تکثیر (replication initiator protein, Rep) را رمزگذاری می‌کند. این پروتئین شروع کننده تکثیر تمامی قطعات ژنومی است (Timchenko et al. 1999, 2000). قطعه DNA-S پروتئین پوششی (coat protein, CP) را رمزگذاری می‌کند که به طور جداگانه هر قطعه ژنومی را در بر می‌گیرد (Chu et al. 1993; Katul et al. 1997). قطعه DNA-M پروتئین حرکتی (movement protein, MP) را رمزگذاری می‌کند که در حرکت سلول به سلول ویروس در گیاه نقش دارد (Wanitchakorn et al. 2000). قطعه DNA-C پروتئین clink را رمزگذاری می‌کند که نقش این پروتئین تنظیم چرخه سلولی گیاه میزبان می‌باشد (Aronson et al. 2000). قطعه DNA-N پروتئین رفت و آمد هسته‌ای (nuclear shuttle protein, NSP) را رمزگذاری می‌کند (Wanitchakorn et al. 2000). قطعات DNA-U1، DNA-U2 و DNA-U4 هر کدام پروتئینی را رمزگذاری می‌کنند که هنوز وظایفی برای آن‌ها شناخته نشده است. تمامی قطعات ژنومی دارای یک ناحیه لوپ-ساقه (common region stem-loop, CR-I) و ناحیه دیگری بنام (common region II, CR-II) می‌باشند (Vetten et al. 2012). از بافت‌های گیاهی آلوده به نانوویروس‌ها تعداد زیادی مولکول‌های دی‌ان‌ای حلقوی به نام قطعات آلفاستلایت نیز شناسایی شده‌اند (Briddon et al. 2018). در بابوویروس‌ها قطعات DNA-U1، DNA-U2 و DNA-U4 وجود ندارد و به جای آن‌ها قطعه DNA-U3 گزارش شده است (Vetten et al. 2012).

آلودگی‌های طبیعی به نانوویروس‌ها به طور عمده از گیاهان خانواده Fabaceae شامل باقلا، عدس، لوبیا، نخود، نخود فرنگی، لوبیا چشم بلبلی، سویا، یونجه، شبدر، چندین نوع گوَن و گیاه علوفه‌ای دیگر از همین خانواده گزارش شده است (Abraham et al. 2010, 2012; Alavinejad et al. 2011; Babin et al. 2000; Chu and Helms 1988; Gallet et al. 2018; Grigoras et al. 2010, 2014; Lotfipour et al. 2016; Kumari et al. 2009; Sano et al. 1998). تاکنون ویروس زردی بافت مرده باقلا (*Faba bean necrotic yellows virus*, FBNYV) و ویروس کوتولگی بافت مرده باقلا (*Faba*

www.SID.ir

Archive of SID

bean necrotic stunt virus, FBNSV) از چند گیاه زراعی این خانواده از ایران گزارش شده است (Alavinejad et al. 2011; Lotfipour et al. 2016). علاوه بر این، اخیراً یک نانوویروس جدید نیز به نام ویروس همراه با کوتولگی زرد تلخه‌بیان (Sophora yellow stunt-associated virus, SYSaV) از ایران گزارش شده است (شکل ۱a) (Heydarnejad et al. 2017). ویروس فوق دارای گسترش وسیعی روی این گیاه در نقاط مختلف ایران است (حیدرنژاد، مطالعات منتشر نشده). گیاه تلخه‌بیان نیز در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری ایران و برخی از قسمت‌های آسیا گسترش دارد (Bisby et al. 1994) و به عنوان علوفه دام و بعنوان گیاه دارویی در طب سنتی استفاده می‌گردد (Song et al. 1999; Zhao et al. 2013). بدلیل اینکه اطلاعات زیادی در مورد ویژگی‌های بیولوژیکی SYSaV مانند سایر میزبان‌های طبیعی و ناقل در دست نیست، در تحقیق حاضر، با استفاده از تلفیق دو روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (polymerase chain reaction, PCR) و تکثیر به روش دایره غلتان (rolling circle amplification, RCA) و سپس تعیین ترادف قطعات انتخابی ژنوم، آلودگی گیاهان نخود ایرانی، عدس، شیرین‌بیان، اسفند و گوَن به این ویروس در چند مکان مختلف ایران مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، قابلیت انتقال SYSaV توسط شته‌های *Aphis craccivora* و *Acyrthosiphon pisum* مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری

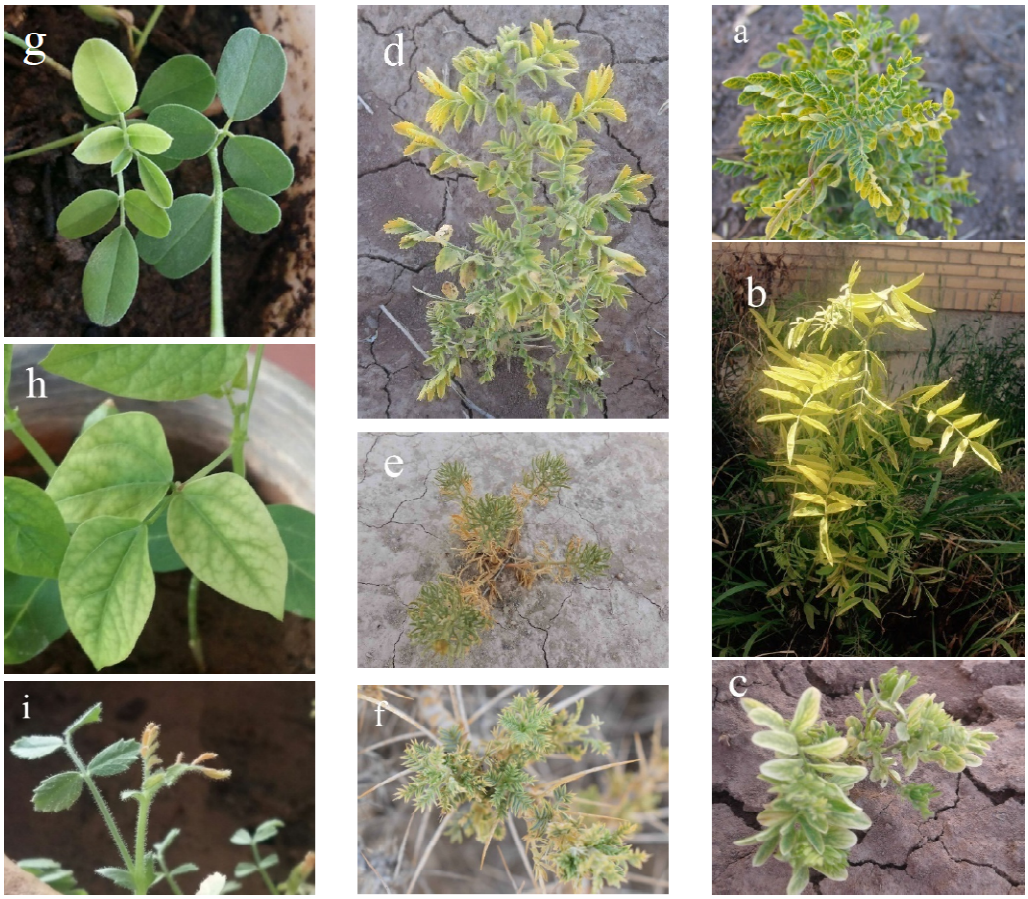
در سال های ۹۷-۱۳۹۵ در مجموع ۱۸ نمونه گیاهی شامل یک نمونه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L., Fabaceae) با علائم کوتولگی، ریزبرگی و زردی از محوطه دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز (باجگاه، استان فارس) (شکل ۱b) و چهار نمونه از همین گیاه با علائم فوق از دشت‌های اطراف گلباف (استان کرمان)، یک نمونه نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L., Fabaceae)، پنج نمونه عدس (*Lens culinaris* Medikus, Fabaceae) هر دو با علائم کوتولگی، ریزبرگی، فنجانی شدن برگ‌ها، زردی عمومی و در مورد عدس رگبرگ نواری (به ترتیب شکل-های ۱c و ۱d) از مزارع حبوب منطقه حنا (استان اصفهان)، دو نمونه گیاه اسفند (*Peganum harmala* L., Nitrariaceae) با علائم کوتولگی و زردی عمومی (شکل ۱e) در میان بوته‌های شدیدا آلوده تلخه‌بیان از دشت‌های اطراف گلباف (استان کرمان) و پنج نمونه گوَن (*Astragalus* sp., Fabaceae) با علائم کوتولگی، ریزبرگی و زردی حاشیه برگ‌ها (شکل ۱f) از دشت‌های اطراف شهرکرد (استان چهارمحال و بختیاری) جمع‌آوری گردید.

استخراج دی‌اِن‌اِ و پی‌سی‌آر

شناسایی ویروس عامل بیماری بلافاصله بعد از جمع-آوری هر نمونه (نمونه‌ها) صورت گرفت برای این منظور دی‌اِن‌اِی کل گیاهان با استفاده از CTAB بر اساس روش ژانک و همکاران (۱۹۹۸) استخراج شد. سپس مولکول‌های حلقوی موجود در نمونه‌ها با استفاده از تکثیر به روش دایره غلتان (rolling circle amplification, RCA) و آنزیم فی ۲۹ دی‌اِن‌اِ پلی مراز (TempliPhi, GE Healthcare, USA) غنی‌سازی گردید (Shepherd et al. 2008). تشخیص اولیه آلودگی نمونه‌ها به نانوویروس‌ها با پی‌سی‌آر با استفاده از محصول RCA بعنوان رشته الگو و آغازگرهای عمومی (5'-GAA GCG AAT STG ACG Nano-F (GAA GAT-3' و (5'-CTT CAC GAA TCA

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- علائم آلودگی به ویروس همراه با کوتولگی زرد تلخه‌بیان (SYSaV) بر روی گیاهان مختلف که در طبیعت یا در شرایط آزمایشگاه توسط شته ناقل آلوده شده‌اند. a) گیاه آلوده تلخه‌بیان با علائم زردی حاشیه برگ و رگبرگ و کوتولگی جمع‌آوری شده از کرمان (استان کرمان)، b) گیاه آلوده شیرین‌بیان با علائم کوتولگی، ریزبرگی و زردی عمومی جمع‌آوری شده از شیراز، باجگاه (استان فارس)، c و d) بترتیب گیاهان آلوده عدس و نخود ایرانی با علائم کوتولگی، ریزبرگی، فنجانی شدن برگ‌ها، زردی عمومی و در مورد عدس رگبرگ نواری جمع‌آوری شده از مزارع بقولات واقع در حنا (استان اصفهان)، e) گیاه آلوده اسفند با علائم زردی عمومی و کوتولگی جمع‌آوری شده از گلباف (استان کرمان)، f) گیاه آلوده گوَن با علائم کوتولگی، ریزبرگی و زردی حاشیه برگ‌ها جمع‌آوری شده از شهرکرد (استان چهارمحال و بختیاری)، علائم اولیه آلودگی به SYSaV در گیاه: g) تلخه‌بیان بعد از انتقال ویروس توسط شته ***Aphis craccivora*** (گیاه سمت چپ) در مقایسه با گیاه سالم (سمت راست)، h) لوبیا چشم بلبلی و i) نخود ایرانی بعد از انتقال ویروس توسط شته ***Acyrthosiphon pisum***.

Fig 1. Symptoms of SYSaV on naturally-infected a) sophora (*Sophora alopecuroides*) showing yellowing of leaf margins and veins collected from Kerman; b) liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) showing dwarfing, little leaves and general yellowing collected from Bajgah (Fars province); c and d) lentil (*Lens culinaris*) and chickpea (*Cicer arietinum*), respectively, showing dwarfing, cup-shaped and little leaves, general yellowing and in case of chickpea vein banding collected from legume farms in Hana (Isfahan province); e) esfand (*Peganum harmala*) showing general yellowing and dwarfing collected from Golbaf (Kerman province); f) milk vetch (*Astragalus* sp.) showing dwarfing, little leaves and yellowing of leaf margins collected from Shahr-e Kord (Chaharmahal and Bakhtiari province). g) early symptoms of SYSaV on sophora (left) inoculated by *Aphis craccivora* in comparison with healthy sophora seedlings (right). Early symptoms of SYSaV developed on cowpea (h) and chickpea (i) seedlings 40 days after inoculation by viruliferous *Acyrthosiphon pisum* collected on naturally-infected sophora plants.

www.SID.ir

Archive of SID

Nano-R (CAG ATC CTG-3' که قادر به تکثیر طول کامل برخی از قطعات ژنومی نانوویروس‌ها می‌باشد، انجام شد. آغازگرهای فوق براساس مقایسه ناحیه میان ژنی قطعات مختلف ژنوم مربوط به نانوویروس‌های مختلف طراحی گردید. تشخیص آلودگی به SYSaV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه DNA-N صورت گرفت (Heydarnejad et al. 2017). سپس از هر گونه گیاهی یک نمونه انتخاب گردید و تکثیر قطعات انتخابی ژنوم انجام شد. بر این اساس، قطعات ژنومی DNA-N، DNA-C و DNA-S از جدایه نخود ایرانی، قطعات ژنومی DNA-N وDNA-C از جدایه عدس، قطعات ژنومی DNA-R، DNA-C، DNA-S و DNA-N ازجدایه شیرین-بیان، قطعات ژنومی DNA-N و DNA-S از جدایه اسفند و قطعه ژنومی DNA-N از جدایه گوَن تکثیر گردیدند.

همسانه‌سازی و تعیین ترادف

محصول پی‌سی‌آر بدست آمده مربوط به قطعات انتخابی ژنوم نانوویروس‌ها به اندازه تقریبی یک کیلوباز در ناقل pTG19-T vector (Vivantis, Malaysia) با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase (ThermoFisher Scientific, USA) قرار داده شد و پلاسمیدهای نوترکیب بدست آمده به باکتری *Escherichia coli* نژاد XL1 blue منتقل گردید. پس از تکثیر باکتری، پلاسمیدهای نوترکیب حاوی قطعه ژنومی و مربوط به جدایه‌های مختلف گیاهان میزبان از باکتری استخراج گردید و از هر دو طرف توسط کمپانی بیونیر (Bioneer Company-South Korea) به روش Sanger تعیین ترادف گردید. ترادف‌های بدست آمده ویرایش گردید و در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت. رس شمارهای ترادف های بدست آمده و ارایه شده به بانک ژن در جدول ۱ آمده است.

آنالیزهای فیلوژنتیکی

ترادف نوکلئوتیدی قطعات ژنومی SYSaV بصورت تشابه دو به‌دوی نوکلئوتیدها با سایر ترادف‌های مربوط به جدایه‌های همین ویروس از گیاه تلخه‌بیان موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) با استفاده از نرم‌افزار SDT v 1.2 (Muhire et al. 2014) مقایسه گردید و میزان تشابه بین قطعات ژنومی همنام ولی مربوط به جدایه‌های مختلف SYSaV ثبت شد. ترادف‌های موجود با استفاده از نرم افزار MEGA6 (Tamura et al., 2013) و بکارگیری روش MUSCLE (Edgar, 2004) هم‌ردیف‌سازی شدند. ترادف‌های هم‌ردیف‌سازی شده برای رسم درخت فیلوژنتیکی به روش اتصال مجاور (Neighbor-Joining, NJ) با استفاده ازمدل Jukes-Canter و اعتبار سنجی (bootstrap) برابر ۱۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفتند. برای رسم درخت فیلوژنتیکی، از ترادف قطعات ژنوم ویروس زردی بافت مرده باقلا (*Faba bean necrotic yellows virus*) به‌عنوان مدل خارج گروه (outgroup) استفاده شد.

انتقال توسط شته

شته *Aphis craccivora* از درختان اقاقیا (*Robinia pseudoacacia* L., Fabaceae) جمع‌آوری شد و برای اطمینان از عدم آلودگی به SYSaV، به چهار گروه تقسیم شدند و هر گروه به مدت یک ماه روی یک گلدان حاوی گیاه باقلای سالم در زیر درپوش پلاستیکی نگهداری شدند. از آنجا که این شته بعنوان ناقل نانوویروس‌های مختلف گزارش شده است (Franz et al. 1998; Gronenborn et al. 2011; Vetten et al. 2012)، دی‌اِن‌اِی کل هم از گیاهان نگاهدارنده شته‌ها و هم از بدن تعدادی از شته‌ها با روش CTAB استخراج و از عاری بودن آن‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های ایرانی ویروس همراه با کوتولگی زرد تلخه‌بیان (SYSaV) جمع‌آوری شده از مناطق مختلف

Table 1. Characteristics of the Iranian isolates of Sophora yellow stunt-associated virus collected from different locations

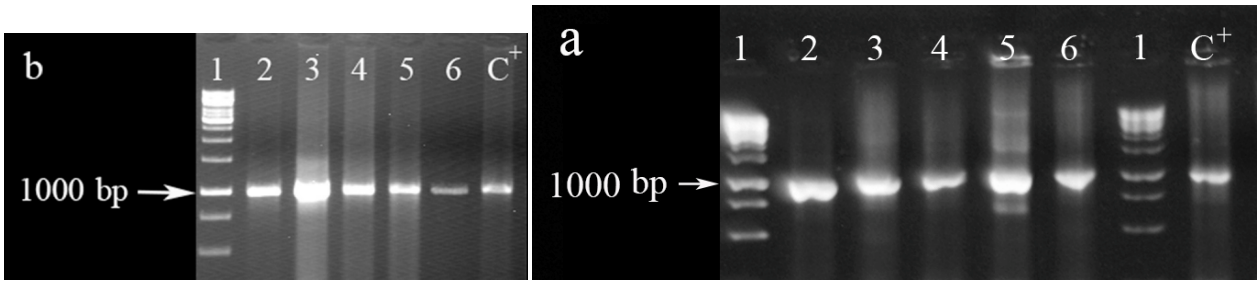
Isolate name	Host plant (family)	Location (Province)	Amplified Genome component	Primer sequence or Reference	Accession number
Sh5	*Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae)	Bajgah (Fars)	DNA-R	Heydarnejad et al. (2017)	MH898574
			DNA-N	Sa-N-F: 5′-GAAGCGAATSTGACGGAAGAT-3′ Sa-N-R: 5′-CTTCACGAATCACAGATCCTG-3′	MH898575
			DNA-S	Heydarnejad et al. (2017)	MH898576
			DNA-C	Sa-C-F: 5′-CCATGAAGTTGTAGAACCTGGGCA-3′ Sa-C-R: 5′-CATGGCATAACAGATGAACCATCTC-3′	MH898577
Gh8	*Peganum harmala* L. (Nitrariaceae)	Golbaf (Kerman)	DNA-N	Heydarnejad et al. (2017)	MH898578
			DNA-S	Heydarnejad et al. (2017)	MH898579
H37	*Cicer arietinum* L. (Fabaceae)		DNA-N	Sa-N-F: 5′-GAAGCGAATSTGACGGAAGAT-3′ Sa-N-R: 5′-CTTCACGAATCACAGATCCTG-3′	MH898580
			DNA-S	Heydarnejad et al. (2017)	MH898581
			DNA-C	Sa-C-F: 5′-CCATGAAGTTGTAGAACCTGGGCA-3′ Sa-C-R: 5′-CATGGCATAACAGATGAACCATCTC-3′	MH898582
H6	*Lens culinaris* Medikus (Fabaceae)	Hana (Isfahan)	DNA-N	Sa-N-F: 5′-GAAGCGAATSTGACGGAAGAT-3′ Sa-N-R: 5′-CTTCACGAATCACAGATCCTG-3′	MH898583
			DNA-C	Sa-C-F: 5′-CCATGAAGTTGTAGAACCTGGGCA-3′ Sa-C-R: 5′-CATGGCATAACAGATGAACCATCTC-3′	MH898584
G50	*Astragalus* sp. (Fabaceae)	Shahr-e Kord (Chaharmahal and Bakhtiari)	DNA-N	Heydarnejad et al. (2017)	MH898585

نسبت به SYSaV با آزمون پی‌سی‌آر و با استفاده از آغازگرهای عمومی نانوویروس‌ها اطمینان حاصل گردید. سپس شته‌های فوق به مدت سه روز به بوته‌های تلخه‌بیان آلوده به SYSaV منتقل شدند. بوته‌های آلوده تلخه‌بیان از محوطه دانشگاه شهید باهنر کرمان جمع آوری شدند و آلودگی آن ها به SYSaV توسط آزمون زنجیره ای پلی مراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تائید گردید. بعد از سه روز، شته‌ها به هشت گلدان هر کدام حاوی چهار تا پنج گیاهچه سالم تلخه‌بیان در مرحله ۶-۵ برگی(سه شته برای هر گیاهچه) انتقال داده شدند. بعد از سه روز شته‌ها حذف گردید و گیاهان مورد تغذیه شته بمدت چهل روز در شرایط گلخانه نگهداری شدند. آلودگی بوته‌ها ابتدا از روی علائم و سپس با استفاده از آزمون زنجیره ای‌پلی‌مراز بررسی گردید. برای تهیه گیاهچه‌های تلخه‌بیان، بذور این گیاه به منظور حذف دوره رکود (dormancy) به مدت یک ماه در ۴°C نگهداری گردیدند و سپس در گلدان کاشته شدند.

برای بررسی قابلیت انتقال SYSaV توسط شته *Acyrthosiphon pisum*، شته فوق از یک بوته آلوده تلخه-بیان واقع در اطراف مزارع شهرستان گلباف (استان کرمان)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات تکثیر شده مربوط به قطعات ژنومی جدایه‌های SYSaV در آزمون زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای عمومی نانوویروس‌ها (a) و قطعه ژنومی DNA-N با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (b) در ژل آگاروز یک درصد. ۱ و ۷) نشانگر اندازه دی‌اِن‌اِ، ۲) شیرین‌بیان، ۳) عدس، ٤) نخود ایرانی، ٥) اسفند، ٦) گوَن و C^+ گیاه آلوده تلخه‌بیان.

Fig 2. Band patterns of amplified segment genomes of SYSaV isolates by PCR using degenerate primers of nanoviruses (a) and specific primers of DNA-N in 1% agarose gel. 1 and 7) 1 kb molecular marker; 2) liquorice; 3) lentil; 4) chickpea; 5) esfand; 6) milk vetch and C+, infected sophora.

جمع‌آوری گردید. آلودگی این بوته به SYSaV توسط آزمون زنجیره ای پلی مراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تائید گردید. شته ها به طور مستقیم برروی گیاهچه‌های سالم تلخه‌بیان (سه شته بازاء هر گیاهچه)، که به روش فوق آماده شده بودند، به مدت سه روز در زیر درپوش پلاستیکی نگهداری شدند. بعد از چهل روز، آلودگی بوته‌ها ابتدا از روی علائم و سپس با آزمون پی-سی‌آر بررسی شد.

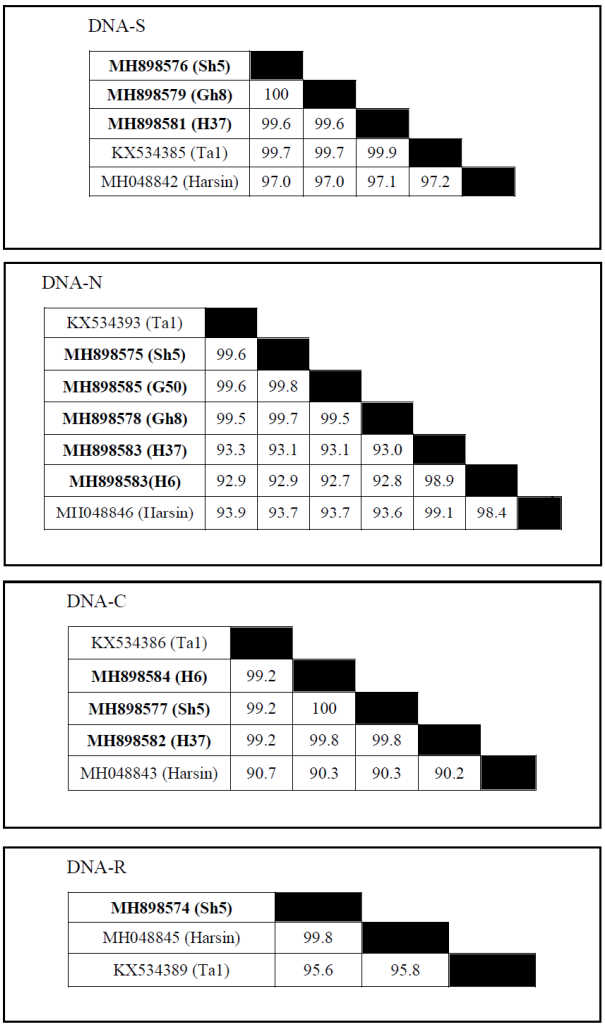
نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از آزمون پی‌سی‌آر و تکثیر قطعه‌ای به اندازه تقریبی یک کیلو باز با استفاده از آغازگرهای عمومی نانوویروس‌ها، آلودگی هر پنج نمونه گیاهی را به نانوویروس‌ها تأیید کرد (شکل ۲a). آزمون پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SYSaV (شکل ۲b) و تعیین ترادف قطعات ژنومی همسانه‌سازی شده توسط آنها نیز نشان داد که همگی این نمونه ها به SYSaV آلوده هستند. آلودگی این گیاهان (به استثنای اسفند) به این ویروس نشان دهنده شیوع SYSaV در گیاهان زراعی و غیر زراعی خانواده Fabaceae است. از میان پنج گیاه مورد مطالعه در این تحقیق، گیاه اسفند از خانواده Nitrariaceae تنها گیاه خارج از خانواده Fabaceae است که آلودگی آن به SYSaV اثبات گردید. با توجه به اینکه تاکنون گیاه تلخه‌بیان تنها میزبان شناخته شده این ویروس بوده است، می‌توان نتیجه گرفت که آلودگی به این ویروس محدود به گیاهان وحشی نیست و گیاهان زراعی نیز می‌توانند به آن آلوده شوند . آلودگی گیاهان نخود ایرانی و لوبیا چشم بلبلی در آزمایش‌های مربوط به انتقال نیز تأیید کننده دامنه میزبانی ویروس در میان گیاهان زراعی می‌باشد. این موضوع می‌بایست در علائم کوتولگی و زردی که در مزارع بقولات ایران دیده می‌شود مورد توجه قرار گیرد.

از دیگرنتایج این تحقیق، تأیید نقش گیاهان چند ساله نظیر تلخه‌بیان، شیرین‌بیان، گوَن (از خانواده Fabaceae) و گیاه اسفند (از خانواده Nitrariaceae) در پایداری ویروس در طبیعت و انتقال آن به سایر میزبان‌ها می‌باشد. از میان دیگر نانوویروس‌ها، سایر میزبان‌های طبیعی FBNYV (غیر از حبوب) مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و مشخص گردیده چندین گیاه وحشی هم از خانواده Fabaceae و هم خارج از این خانواده در اپیدمیولوژی ویروس در طبیعت نقش دارند (Franz et al. 1997).

www.SID.ir

Archive of SID



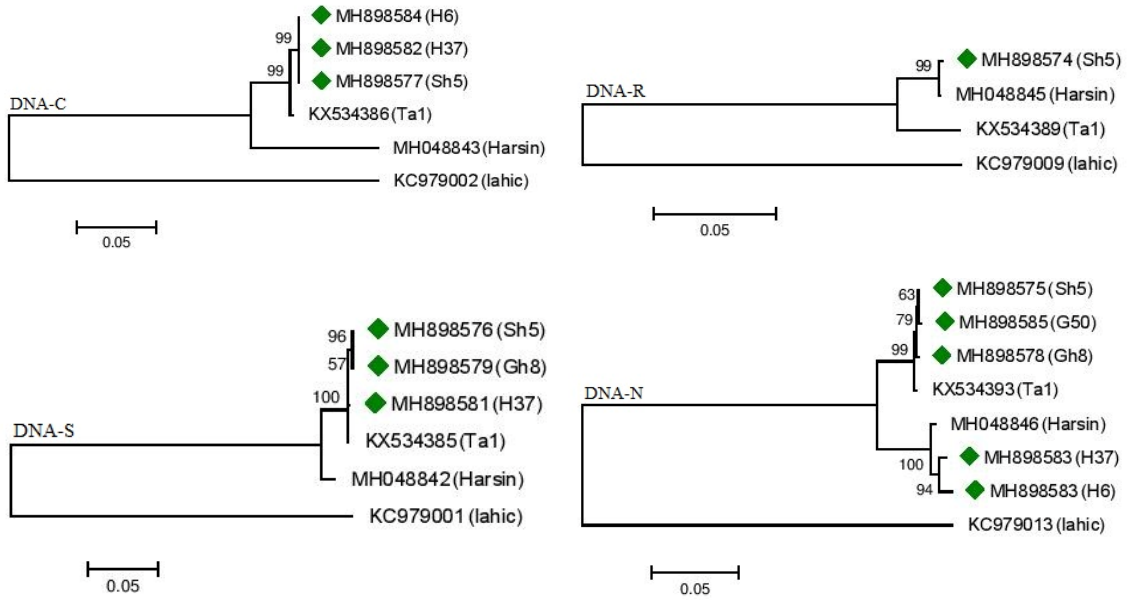
شکل ۳- درصد یکسان بودن (identity) ترادف نوکلئوتیدی قطعات ژنوم بین جدایه‌های SYSaV از میزبان‌های مختلف و قطعات مشابه مربوط به دو جدایه موجود در بانک ژن (GenBank). جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق با حروف پررنگ نشان داده شده‌اند. مشخصات جدایه ها در جدول ۱ آورده شده است.

Fig 3. The identity percent between nucleotide sequence of genome components of SYSaV isolates recovered from different hosts (in bold) and counterpart segments of two GenBank isolates. Characteristics of the virus isolates are shown in Table 1.

میزان تشابه دو به‌دوی ترادف نوکلئوتیدی برای قطعه ژنومی DNA-C جدایه‌های نخود ایرانی، عدس و شیرین-بیان و قطعات مشابه مربوط به دو جدایه Ta1 و H13 (جدایه‌های موجود در بانک ژن بترتیب با رس شمارهای KX534386 و MH048843) بین ۹۹/۸-۹۰/۲ درصد محاسبه گردید. به همین ترتیب میزان تشابه دو به‌دوی ترادف نوکلئوتیدی برای قطعات ژنومی DNA-S، DNA-N و DNA-R مربوط به جدایه‌های این تحقیق با قطعات مشابه مربوط به دو جدایه فوق در بانک ژن به ترتیب بین ۹۹/۷-۹۷/۰، ۹۹/۸-۹۲/۷ و ۹۹/۸-۹۵/۶ درصد محاسبه شد (شکل ۳). نتایج حاصل از رسم درخت های فیلوژنتیکی نشان داد که قطعات DNA-C و DNA-S مربوط به جدایه‌های نخود، عدس (جمع آوری شده از منطقه حنا در استان اصفهان) و گیاه اسفند (جمع آوری شده از اطراف گلباف در استان کرمان) و جدایه شیرین‌بیان (جمع آوری شده از منطقه باجگاه در اطراف شیراز) با جدایه Ta1 که قبلا از شهر کرمان جمع آوری شده است با اعتبارسنجی ۱۰۰-۹۹ درصد در یک گروه قرار می گیرند. درحالیکه جدایه هرسین که قبلا از غرب ایران (استان کرمانشاه) گزارش شده است در یک گروه مجزا طبقه بندی گردید (شکل ۴). در مورد قطعه DNA-R، جدایه شیرین‌بیان با جدایه هرسین با اعتبارسنجی ۹۹ درصد در یک گروه قرار گرفتند درحالیکه جدایه Ta1 بطور مجزا در گروه دیگری قرار گرفت. قطعه DNA-R تنها قطعه ای است که ترادف نوکلئوتیدی آن برای تمام جدایه های مورد مطالعه در این تحقیق موجود است. بر این اساس، پنج جدایه مربوط به میزبان های جدید در این تحقیق و دو جدایه موجود در بانک ژن با اعتبارسنجی ۱۰۰-۹۹ در دو گروه طبقه بندی شدند. در گروه اول جدایه های شیرین بیان، اسفند و گوَن به همراه جدایه Ta1 و در گروه دوم جدایه های نخود و عدس و جدایه هرسین قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- درخت فیلوژنتیکی براساس ترادف نوکلئوتیدی قطعات انتخابی ژنوم مربوط به جدایه‌های بدست آمده از پنج میزبان مختلف SYSaV (لوزی سبز رنگ) و قطعات مشابه مربوط به دو جدایه دیگر همین ویروس موجود در بانک ژن به روش اتصال مجاور (Neighbor-Joining). برای محاسبه bootstrap از ۱۰۰۰ تکرار استفاده شده است و قطعات مشابه مربوط به ویروس کوتولگی بافت مرده باقلا به‌عنوان مدل خارج گروه (outgroup) در نظر گرفته شده است. انشعابات با حمایت کمتر از ٤٠٪ از شکل حذف شده‌اند. مشخصات جدایه ها در جدول ۱ آورده شده است.

Fig 3. Neighbor-Joining phylogenetic tree using nucleotide sequence of selective genome components of SYSaV recovered from different hosts (green diamond) and counterpart sequences of two GenBank isolates. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and counterpart genome sequences of *Faba bean necrotic yellows virus* were used as outgroup. Branches with <40% bootstrap support have been collapsed. Characteristics of the virus isolates are shown in Table 1.

نتایج حاصل از مقایسه دو به‌دوی ترادف نوکلئوتیدی و رسم درخت‌های فیلوژنتیکی مربوط به قطعات انتخابی ژنوم نشان داد که هر پنج گیاه مورد مطالعه به SYSaV آلوده هستند. تمامی ترادف‌های بدست آمده مربوط به قطعات ژنوم جدایه‌های SYSaV از پنج گیاه مختلف در این تحقیق (جدول ۱)، علاوه بر داشتن یک چارچوب ژنی که حاوی کدون‌های شروع و خاتمه دهنده می‌باشند، دارای دو سیگنال برای شروع و خاتمه ترانویسی بترتیب بنام‌های تاتاباکس (TATA box) و پلی‌آدنیلیشن (polyadenylation) می‌باشند.

نتایج آزمایش‌های انتقال نشان داد که هر دو گونه شته *Aphis craccivora* و *Acyrthosiphon pisum* قادر به انتقال SYSaV می‌باشند. بدلیل اینکه گیاه تلخه‌بیان میزبان مناسبی برای شته *Aphis craccivora* نمی‌باشد شته‌های فوق بعد از چند روز از شروع تغذیه از بین رفتند. با وجود این، با راندمان ۱۸ درصد (۶/۳۴) قادر به انتقال ویروس بوده و علائم کوتولگی و کلروز در بوته‌های تلخه‌بیان تولید شد (شکل 1g). آزمون پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آلودگی بوته‌های فوق را اثبات نمود. راندمان انتقال ویروس به گیاه تلخه‌بیان در مورد شته *Acyrthosiphon pisum* بیشتر و برابر ۳۹ درصد (۱۲/۳۱) بدست آمد. همچنین بوته‌های نخود ایرانی و لوبیا

www.SID.ir

Archive of SID

چشم بلبلی که مورد تغذیه شته *Acyrthosiphon pisum* قرار گرفته بودند بعد از چند هفته علائم سبزردی و رگبرگ نواری (در مورد لوبیا چشم بلبلی) و کوتولگی، سبزردی و نکروز (در مورد نخود ایرانی) نشان دادند (شکل‌های ۱i و ۱h). راندمان انتقال ویروس برای این دو گیاه بترتیب ۵۰ (۴/۸) و ۴۳ (۳/۷) درصد ثبت گردید. مشابه قبل، آلودگی این بوته‌ها نیز به SYSaV با انجام آزمون پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگر های اختصاصی ویروس تأیید گردید. باوجود اینکه هر دو شته فوق قادر به انتقال SYSaV بودند، احتمالا شته *Acyrthosiphon pisum* ناقل اصلی این ویروس به تلخه‌بیان در طبیعت می‌باشد، زیرا برخلاف شته دیگر، بخوبی قادر به تکثیر و تغذیه روی این گیاه است. هر دو شته فوق بعنوان ناقل عمده نانوویروس‌ها گزارش شده‌اند (Franz et al. 1998; Gronenborn et al. 2011; Vetten et al. 2012).

با توجه به دامنه میزبانی نانوویروس‌ها به ویژه در میان گیاهان خانواده Fabaceae، گسترش وسیع این گیاهان در مناطق مختلف ایران و چندساله بودن برخی از آن‌ها، به نظر می‌رسد که مطالعات بیشتری در زمینه شناسایی نانوویروس‌های آلوده‌کننده این گیاهان در ایران ضروری می‌باشد.

قدردانی

این تحقیق با استفاده از اعتبارات پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

Abraham A.D., Varrelmann M. and Vetten H.J. 2012. Three distinct nanoviruses, one of which represents a new species, infect faba bean in Ethiopia. Plant Disease 96:1045–1053.

Abraham A.D., Bencharki B., Torok V., Katul L., Varrelmann M. and Vetten H.J. 2010. Two distinct nanovirus species infecting faba bean in Morocco. Archives of Virology 155:37-46. https://doi.10.1007/s00705-009-0548-9

Alavinejad E., Behjatnia S.A.A., Izadpanah K. and Masoumi M. 2011. Molecular detection of Faba bean necrotic yellows virus in legume fields of some North, North West and South provinces of Iran. *Proceeding of the 7th National Biotechnology Congress*. Iran, Tehran. p 6.

Aronson M.N., Meyer A.D., Gyorgyey J., Katul L., Vetten H.J., Gronenborn B. and Timchenko T. 2000. Clink, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. Jornal of Virology 74:2967-2972.

Babin M., Ortiz V., Castro S. and Romero J. 2000. First detection of faba bean necrotic yellows virus in Spain. Plant Disease 84:707.

Bisby, F.A., Buckingham, J. and Harborne, J.B. 1994. Phytochemical dictionary of the Leguminosae. Vol. 1: Plants and their constituents. Chapman and Hall, London.

Briddon R.W., Martin D.P., Roumagnac P., Navas-Castillo J., Fiallo-Olive E., Moriones E., Lett J.-M., Zerbini F.M. and Varsani A. 2018. Alphasatellitidae: A new family with two subfamilies for the classification of geminivirus- and nanovirus-associated alphasatellites. Archives of Virology. doi:10.1007/s00705-018-3854-2.

Chu P.W.G., Keese P., Qiu B.S., Waterhouse P.M. and Gerlach W.L. 1993. Putative full-length clones of the genomic DNA segments of subterranean clover stunt virus and identification of the segment coding for the viral coat protein. Virus Research 27:161–171.

Chu P.W.G. and Helms K. 1988. Novel virus-like particles containing circular single-stranded DNA associated with subterranean clover stunt disease. Virology 167:38–49.

Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32:1792-1797.

www.SID.ir

Archive of SID

Franz A., Makkouk K.M. and Vetten H.J. 1998. Acquisition, retention and transmission of faba bean necrotic yellows virus by two of its aphid vectors, *Aphis craccivora* (Koch) and *Acyrthosiphon pisum* (Harris). Journal of Phytopathology 146:347-355.

Franz A., Makkouk K.M. and Vetten H.J. 1997. Host range of faba bean necrotic yellows virus and potential yield loss in infected faba bean. Phytopathologia Mediterranea 36:94–103.

Gallet R., Kraberger S., Filloux D., Galzi S., Fontes H., Martin D.P., Varsani A. and Roumagnac P. 2018. Nanovirus-alphasatellite complex identified in *Vicia cracca* in the Rhone delta region of France. Archives of Virology 163(3):695-700. https://doi.10.1007/s00705-017-3634-4.

Grigoras I., Ginzo A.I., Martin D.P., Varsani A., Romero J., Mammadov A., Huseynova I.M., Aliyev J.A., Kheyr-Pour A., Huss H., Ziebell H., Timchenko T., Vetten H.J. and Gronenborn B. 2014. Genome diversity and evidence of recombination and reassortment in nanoviruses from Europe. Jornal of General Virology 95:1178-1191.

Grigoras I., Gronenborn B., and Vetten H.J. 2010. First report of a nanovirus disease of pea in Germany. Plant Disease 94:642-642.

Gronenborn B., Grigoras I., and Vetten H.J. 2011. Nanovirus, pp 959-968. Nanoviridae. In: C. Tidona and G. Darai (Eds). The Springer Index of Viruses. Springer Science+Business Media, New York. https://doi.10.1007/978-0-387-95919-1.

Heydarnejad J., Kamali M., Massumi M., Kvarnheden A., Male M.M., Stainton D., Kraberger S. Martin D.P. and Varsani A. 2017. Identification of a nanovirus-alphasatellite complex in *Sophora alopecuroide*. Virus Research 235:24-32.

Katul L., Maiss E., Morozov S.Yu and Vetten H.J. 1997. Analysis of six DNA components of the faba bean necrotic yellows virus genome and their structural affinity to related plant virus genomes. Virology 233:247-259.

Kumari S.G., Attar N., Mustafayev E. and Akparov Z. 2009. First report of faba bean necrotic yellows virus affecting legume crops in Azerbaijan. Plant Disease 93:1220.

Lotfipour M., Izadpanah K. and 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.

Muhire B.M., Varsani A. and Martin D.P. 2014. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. PLoS One 9 (9):e108277.

Sano Y., Wada M., Hashimoto Y., Matsumoto T. and Kojima M. 1998. Sequences of ten circular ssDNA components associated with the milk vetch dwarf virus genome. Journal of General Virology 79:3111–3118.

Shepherd D.N., Martin D.P., Lefeuvre P., Monjane A. L., Owor B.E., Rybicki E.P. and Varsani A. 2008. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. Journal of Virological Methods 149:97-102.

Song J.Z., Xu H.X., Tian S.J. and But P.P., 1999. Determination of quinolizidine alkaloidsin traditional Chinese herbal drugs by nonaqueous capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A 857:303–311.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30:2725-2729.

Timchenko T., de Kouchkovsky F., Katul L., David C., Vetten H.J. and Gronenborn B. 1999. A single Rep protein initiates replication of multiple genome components of faba bean necrotic yellows virus, a single-stranded DNA virus of plants. Jornal of Virology 73:10173-10182.

Timchenko T., Katul L., Sano Y., de Kouchkovsky F., Vetten H.J. and Gronenborn B. 2000. The master Rep concept in nanovirus replication: Identification of missing genome components and potential for natural genetic reassortment. Virology 274:189-195.

Vetten H.J., Dale J.L., Grigoras I., Gronenborn B., Harding R., Randles J.W., Sano Y., Thomas J.E., Timchenko T. and Yeh H.H. 2012. *Nanoviridae*, pp 395-404. In: A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz, (Eds).Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses/Elsevier, Academic Press, London.

Wanitchakorn R., Hafner G.J., Harding R.M. and Dale J.L. 2000. Functional analysis of proteins encoded by banana bunchy top virus DNA-4 to -6. Journal of General Virology 81:299-306.

www.SID.ir

Archive of SID

Zhang Y.P., Uyemoto J.K. and Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. Journal of Virological Methods 71:45-50.

Zhao L.F., Xu Y.J., Ma Z.Q. and Deng Z.S. 2013. Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic Pseudomonas chlororaphis strain Zong1 isolated from Sophora alopecuroides root nodules. Brazilian Journal of Microbiology 44:623–631.

www.SID.ir